

COMPLEJOS ENZIMA-SUSTRATO EN LA SÍNTESIS DE FAD DE  
*Corynebacterium ammoniagenes*: ESTUDIO COMPUTACIONAL

JUAN DE JESÚS SECO ARIAS

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

BUCARAMANGA

2017

COMPLEJOS ENZIMA-SUSTRATO EN LA SÍNTESIS DE FAD DE  
*Corynebacterium ammoniagenes*: ESTUDIO COMPUTACIONAL

JUAN DE JESÚS SECO ARIAS

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE BIÓLOGO

DIRECTOR: DOCTOR EN ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE PROTEÍNAS ISAIAS  
LANS VARGAS

CODIRECTORA: DOCTORA EN CIENCIAS-QUÍMICA MARTHA CECILIA DAZA  
ESPINOSA

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

BUCARAMANGA

2017

A mi madre.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco profundamente a mi familia y amigos por todo el amor compartido, toda su ayuda y consejos han sido vitales para mi vida y el desarrollo de este trabajo.

Gracias a la profesora Martha y el profesor Isaias por la oportunidad brindada. Sus enseñanzas, comentarios oportunos y acertados fueron esenciales para el desarrollo de este trabajo.

Gracias por su apoyo.

Mil gracias a Lenis y su familia por su apoyo incondicional y ayuda desinteresada, quedaran por siempre en mi vida. De manera especial agradezco a Lenis por todos los comentarios precisos para el desarrollo de este trabajo.

Agradezco a todos mis compañeros del Grupo de Bioquímica Teórica toda su ayuda fue fundamental para entrar y comprender mejor una parte de esta rama de la ciencia.

## CONTENIDO

INTRODUCCIÓN .....	15
1. OBJETIVOS.....	19
1.1 OBJETIVO GENERAL .....	19
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
2. METODOLOGÍA.....	20
2.1. CAMPO DE FUERZA.....	20
2.2. MINIMIZACIÓN .....	20
2.3. ACOPLAMIENTO MOLECULAR.....	21
2.4. DINÁMICA MOLECULAR.....	21
2.5. PREDICCIÓN DE LOS COMPLEJOS ENZIMA-SUSTRATO EN EL MÓDULO FMNAT Y MÓDULO FMNAT+RFK .....	22
2.5.1.Preparación del sistema molecular. ....	22
2.5.2.Acoplamiento molecular del ATP, Mg <sup>2+</sup> y FMN en el módulo FMNAT y el módulo FMNAT+RFK. ....	22
2.5.3.Acoplamiento molecular del ATP.....	22
2.5.4.Acoplamiento molecular del Mg <sup>2+</sup> .....	23
2.5.5.Acoplamiento molecular del FMN. ....	23
2.5.6.Selección de los complejos enzima-sustrato.....	23
2.6. DINÁMICA MOLECULAR DE LOS COMPLEJOS ENZIMA-SUSTRATO.....	24
2.7. ANÁLISIS DE LOS COMPLEJOS ENZIMA-SUSTRATO .....	24
3. RESULTADOS .....	26
3.1. ACOPLAMIENTO MOLECULAR DEL ATP EN EL MÓDULO FMNAT .....	26

3.2. ACOPLAMIENTO MOLECULAR DEL $Mg^{2+}$ EN LOS FOSFATOS DEL ATP ACOPLADO AL MÓDULO FMNAT .....	28
3.3. ACOPLAMIENTO MOLECULAR DEL FMN EN EL COMPLEJO ATP/ $Mg^{2+}$ -MÓDULO FMNAT .....	29
3.4. ACOPLAMIENTO MOLECULAR DEL FMN EN EL COMPLEJO ATP/ $Mg^{2+}$ -MÓDULO FMNAT+RFK.....	32
3.5. DINÁMICA MOLECULAR DEL COMPLEJO ATP/ $Mg^{2+}$ /FMN-MÓDULO FMNAT	37
3.6. ESTRUCTURA REPRESENTATIVA DE LA DINÁMICA MOLECULAR DEL COMPLEJO ATP/ $Mg^{2+}$ /FMN-MÓDULO FMNAT .....	39
3.7. DINÁMICA MOLECULAR DEL COMPLEJO ATP/ $Mg^{2+}$ /FMN-MÓDULO FMNAT+RFK .....	43
3.8. ESTRUCTURA REPRESENTATIVA DE LA DINÁMICA MOLECULAR DEL MÓDULO FMNAT+RFK.....	47
4. DISCUSIÓN .....	52
4.1. ACOPLAMIENTO MOLECULAR DEL ATP, $Mg^{2+}$ Y FMN EN EL MÓDULO FMNAT Y EN EL MÓDULO FMNAT+RFK .....	52
4.2. DINÁMICA MOLECULAR DEL ATP EN LOS COMPLEJOS ATP/ $Mg^{2+}$ /FMN-MÓDULO FMNAT Y ATP/ $Mg^{2+}$ /FMN-MÓDULO FMNAT+RFK.....	54
4.3. DINÁMICA MOLECULAR DEL FMN EN LOS COMPLEJOS ATP/ $Mg^{2+}$ /FMN-MÓDULO FMNAT Y ATP/ $Mg^{2+}$ /FMN-MÓDULO FMNAT+RFK.....	55
5. CONCLUSIONES .....	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
BIBLIOGRAFÍA.....	66
ANEXOS .....	69

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resumen del acoplamiento molecular del ATP en el módulo FMNAT.....	27
Tabla 2. Resumen del acoplamiento molecular del ion $Mg^{2+}$ en el complejo ATP- módulo FMNAT. ....	29
Tabla 3. Resumen del acoplamiento molecular del FMN en el complejo ATP/ $Mg^{2+}$ - módulo FMNAT .....	30
Tabla 4. Resumen del acoplamiento molecular del FMN en el complejo ATP/ $Mg^{2+}$ - módulo FMNAT+RFK .....	36

\*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Acoplamiento molecular del ATP en el módulo FMNAT .....	27
Figura 2. Características del acoplamiento molecular del $Mg^{2+}$ y FMN en el módulo FMNAT. ....	31
Figura 3. Acoplamiento molecular del FMN en el complejo ATP/ $Mg^{2+}$ -módulo FMNAT. ....	32
Figura 4. Acoplamiento molecular del FMN en el complejo ATP/ $Mg^{2+}$ -módulo FMNAT+RFK .....	34
Figura 5. RMSD del complejo ATP/ $Mg^{2+}$ /FMN-módulo FMNAT, durante la trayectoria de la DM.....	37
Figura 6. Distancia de los puentes de hidrógeno que estabilizan el ATP en el complejo ATP/ $Mg^{2+}$ /FMN-módulo FMNAT durante la trayectoria de la DM. ....	38
Figura 7. Distancia de los puentes de hidrógeno que estabilizan el FMN en el complejo ATP/ $Mg^{2+}$ /FMN-módulo FMNAT, durante la trayectoria de la DM. ....	39
Figura 8. Representación esquemática de las interacciones polares y apolares que estabilizan el ATP y el FMN en el complejo ATP/ $Mg^{2+}$ /FMN-módulo FMNAT en la estructura representativa de la trayectoria de la DM. ....	40
Figura 9. Vista estereoscópica de la estructura representativa de la DM del complejo ATP/ $Mg^{2+}$ /FMN-módulo FMNAT. ....	41
Figura 10. Vista estereoscópica de la estabilización del $Mg^{2+}$ en la estructura representativa de la DM del complejo ATP/ $Mg^{2+}$ /FMN-módulo FMNAT. ....	42
Figura 11. Distancia de interacciones que estabilizan el $Mg^{2+}$ en el complejo ATP/ $Mg^{2+}$ /FMN-módulo FMNAT durante la trayectoria de la DM .....	42
Figura 12. RMSD del complejo ATP/ $Mg^{2+}$ /FMN-módulo FMNAT+RFK, durante la trayectoria de la DM. ....	43
Figura 13. Puentes de hidrógeno que estabilizan el ATP en el complejo ATP/ $Mg^{2+}$ /FMN-módulo FMNAT+RFK durante la trayectoria de la DM. ....	44
Figura 14. Puentes de hidrógeno que estabilizan el FMN en el complejo ATP/ $Mg^{2+}$ /FMN-módulo FMNAT+RFK durante la trayectoria de la DM. ....	46

Figura 15. Distancia de interacciones que estabilizan el $Mg^{2+}$ en el complejo ATP/ $Mg^{2+}$ /FMN-módulo FMNAT+RFK durante la trayectoria de la DM. ....	46
Figura 16. Representación esquemática de las interacciones polares y apolares que estabilizan el ATP y el FMN en el complejo ATP/ $Mg^{2+}$ /FMN-módulo FMNAT+RFK en ERC-C1 y ERC-C2. ....	48
Figura 17. Superposición del módulo RFK de la estructura ERC-C2 con la estructura de partida de la DM. ....	50
Figura 18. Estabilización de la configuración cabeza-cola por puentes salinos entre los módulos FMNAT y RFK. ....	51

## LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Resultado de los 100 acoplamientos del ATP en el módulo FMNAT. ....	69
Anexo B. Resultado de los 100 acoplamientos del FMN en el módulo FMNAT. ....	73
Anexo C. Resultado de los 100 acoplamientos del FMN en el módulo FMNAT+RFK (cabeza-cola). .....	78
Anexo D. Puentes de hidrógeno en el módulo FMNAT independiente. ....	82
Anexo E. Puentes de hidrógeno en el módulo FMNAT+RFK. ....	83
Anexo F. Reacciones que cataliza la FAD sintetasa procariota. ....	84
Anexo G. Vista estereoscópica del dímero de trímeros de la CaFADS. (a) Vista lateral del dímero de trímeros. (b) Vista frontal del trímero de la CaFADS. ....	84
Anexo H. Nombre de los átomos de los sustratos del módulo FMNAT de C. ammoniagenes, ATP y FMN. ....	85
Anexo I. Frecuencia de conteo de las distancias elegidas para seleccionar la estructura representativa de la trayectoria de DM del complejo ATP/Mg <sup>2+</sup> /FMN- módulo FMNAT. ....	86
Anexo L. Apilamiento $\pi$ entre los anillos imidazol de H28 y H31 en el acoplamiento del ATP en el módulo FMNAT configuración cabeza-cola. En línea punteada puente de hidrógeno H31 con el átomo O1 $\alpha$ del ATP. ....	89

## RESUMEN

**TITULO:** COMPLEJOS ENZIMA-SUSTRATO EN LA SÍNTESIS DE FAD DE *Corynebacterium ammoniagenes*: ESTUDIO COMPUTACIONAL\*

**AUTOR:** Juan de Jesús Seco Arias\*\*

**PALABRAS CLAVE:** FMN, FAD, CaFADS, Acoplamiento molecular, Dinámica molecular.

### DESCRIPCIÓN:

En mamíferos, la síntesis de FMN y FAD es catalizada por la riboflavina quinasa (RFK) y la FMN adenililtransferasa (FMNAT) respectivamente, mientras que en procariontes estos dos procesos son catalizados por la enzima bifuncional FAD sintetasa (FADS). En la FADS, la síntesis de FMN ocurren en el módulo C.-Terminal (o módulo RFK), mientras que la síntesis de FAD ocurre en el módulo N-Terminal (o módulo FMNAT). Diferencias como las descritas anteriormente entre la FADS de procariontes y las enzimas monofuncionales de eucariotes, han convertido la FADS en un blanco para el diseño de fármacos.

Este trabajo está enfocado en el de la interacción enzima-sustrato del módulo FMNAT de la CaFADS y los efectos de la configuración cabeza-cola en esta interacción. Actualmente no se conoce la estructura del complejo enzima-sustrato para el módulo FMNAT de la FADS, por lo que ha dificultado su investigación. En este estudio se proponen dos complejos enzima-sustrato para el módulo FMNAT de la FADS de *C. ammoniagenes* (CaFADS). El primero muestra la interacción entre el módulo FMNAT-sustratos. El segundo muestra la interacción FMNAT-sustratos, en la configuración cabeza-cola. Para ello, se utilizaron herramientas computacionales como: acoplamiento molecular, minimización y dinámica molecular. Los resultados muestran que el ATP es estabilizado por puentes de hidrógeno con los residuos F24, H31, N125, L155 e I162. Mientras que el FMN es estabilizado mediante puentes de hidrógeno con Y106, G129, T127, H57 y N125.

El módulo RFK indujo la formación de puentes de hidrógeno en el ATP que pueden ser importantes en la catálisis; además favoreció el acoplamiento del FMN con los metilos expuestos al exterior del sitio activo y restringió los movimientos del FMN. La configuración cabeza-cola se estabilizó por puentes salinos entre R65, R66 y E208. Este estudio aporta nuevo conocimiento acerca de la interacción enzima-sustrato en el módulo FMNAT.

---

\* Trabajo de Grado

\*\* Facultad de ciencias, Escuela de Biología, Directores: Doctor Isaias Lans Vargas, Doctora Martha Cecilia Daza.

## ABSTRACT

**TITLE:** ENZYME-SUBSTRATE COMPLEXES ON THE SYNTHESIS OF FAD FROM *Corynebacterium ammoniagenes*: COMPUTATIONAL STUDY\*

**AUTHOR:** Juan de Jesús Seco Arias\*\*

**KEY TERMS:** FMN, FAD, CaFADS, molecular docking, molecular dynamic.

### DESCRIPTION:

In mammals, FMN and FAD synthesis is catalyzed by the Riboflavin Kinase and the FMN adenylyltransferase respectively, whereas in prokaryotes, these both processes are catalyzed by bifunctional FAD enzyme synthetase (FADS). In FADS, the synthesis of FMN happens in the C-terminal module (RFK module), while the synthesis of FAD happens in the N-terminal module (FMNAT module). Differences as described above between FADS prokaryotes and mono-functional eukaryotes enzymes, have made FADS a target for the design of pharmaceutical agents.

This study is focused on the enzyme-substrate interaction of the FMNAT module of the CaFADS and the effects of the head-tail configuration in this interaction. The structure of the enzyme-substrate complex for the FADS FMNAT module is not known, making its research difficult. Two enzyme-substrate complexes have been proposed in this analysis for the FMNAT. The first one shows the interaction between the FMNAT-substrate module. The second one shows the interaction FMNAT-substrate but with the FMNAT module in the presence of the RFK module in the head-tail configuration of the CaFADS. For it, some computational tools were used such as: molecular docking, minimization and molecular dynamic. The results show that the ATP is stabilized by hydrogen bonding with the F24, H31, N125, L155 and I162 residues and the Hydrogen Bonding FMN with Y106, G129, T127, H57 and N125 ones. The RFK module induced the formation of Hydrogen Bonding in the ATP that might be important in the catalysis; in addition, it helped the docking of the FMN with the Methyl exposed outside of the active site and restricted the movements of the FMN. The head-tail configuration was stabilized by saline bonding among R65, R66 and E208. The Mg<sup>2+</sup> stabilized the ATP and FMN phosphates. These analyses provide new knowledge about the enzyme-substrate interaction on the FMNAT module.

---

\* Investigation.

\*\* Faculty of sciences, Program of Biology, Directors: Doctor Isaias Lans Vargas, Doctor Martha Cecilia Daza.

## INTRODUCCIÓN

Las flavoproteínas y flavoenzimas usan como cofactores derivados de la flavina: mononucleótido de flavina (FMN) o dinucleótido de adenina y flavina (FAD), formas biológicamente activas de la riboflavina (RF). El rol del FMN y el FAD en reacciones de oxidación/reducción es fundamental para mantener la homeostasis celular [1].

Todos los seres vivos transforman la RF primero en FMN y luego el FMN en FAD en dos reacciones secuenciales [2]–[5]. En procariontes, la enzima bifuncional FAD sintetasa (FADS) realiza la síntesis de FAD. La FADS se compone de dos módulos estructurales: el módulo terminal-C, riboflavina quinasa (RFK) y el módulo terminal-N, FMN adenililtransferasa (FMNAT). El módulo RFK fosforila la RF para formar FMN en una reacción dependiente de trifosfato de adenosina (ATP) y  $Mg^{2+}$ . Posteriormente, el FMN sintetizado pasa al módulo FMNAT para formar FAD en una reacción dependiente de ATP y  $Mg^{2+}$  (Anexo F) [6]. La síntesis de FAD requiere un reordenamiento estructural para producir un complejo Enzima-sustratos catalíticamente competente, de tal forma que se facilite la ruptura del enlace  $\alpha$ -fosfodiéster del ATP [7]. Esta estructura presenta el  $Mg^{2+}$  coordinado por los fosfatos del ATP, interacción que favorece que el fosfato del FMN se aproxime al fosfato- $\alpha$  del ATP en dirección opuesta al fosfato- $\beta$ , esta configuración propicia el ataque nucleofílico en línea directa [7], [8]. Por otro lado, en mamíferos, la síntesis de FMN y FAD se cataliza en dos enzimas independientes: la riboflavina quinasa (RFK) (EC 2.7.1.26) y FMN adenilil transferasa (FMNAT) (EC 2.7.7.2), siguiendo la misma secuencia de reacciones descrita para procariontes [6], [9], [10].

Estudios han revelado diferencias en la estructura y en el mecanismo catalítico de la síntesis de FMN y FAD entre procariontes y eucariotes. Se destaca que si bien el módulo RFK de la FADS presenta alta homología secuencial y estructural con las RFK de mamíferos; el módulo FMNAT de la FADS, presenta baja homología secuencial y estructural con las FMNAT de mamíferos [11]–[13]. Estas diferencias

convierten a la FADS en un blanco potencial para el diseño racional de fármacos selectivos contra patógenos procariotas, resistentes a fármacos conocidos en la actualidad [14]–[18].

La FADS de *Corynebacterium ammoniagenes* (CaFADS), es la FADS mejor caracterizada de los procariotas, ha sido propuesta como modelo de entendimiento de las FADS bacterianas, tales como *Mycobacterium tuberculosis* (microorganismo causante de la tuberculosis) y *Streptococcus pneumoniae* (principal agente etiológico de la neumonía) [17]–[19]. En Colombia, la tuberculosis representa la cuarta causa de muerte por enfermedades transmisibles [20]. Por otro lado, *S. pneumoniae* es un patógeno asociado a diferentes enfermedades, entre las que se encuentra la neumonía, que es una de las causas más frecuentes de morbilidad y mortalidad en nuestro país [19].

La CaFADS está compuesta por 338 residuos aminoacídicos, presenta dos módulos estructurales: el módulo terminal-N (residuos 1-186, FMNAT) y el módulo terminal-C (187-338, RFK) [7]. El módulo FMNAT, posee actividad FMN adenilil transferasa y muestra una topología de plegamiento de tipo Rossmann [17]. El módulo FMNAT muestra alta similaridad con enzimas de la superfamilia nucleotidil transferasa; mientras que con la FMNAT de mamíferos muestra baja similaridad secuencial y estructural [6]. Por otro lado, el módulo RFK posee actividad riboflavina quinasa, su topología consiste de un barril- $\beta$  y muestra alta similaridad con las RFK de eucariotas [6].

La estructura cristalográfica de la CaFADS (FADS, PDB 2X0K), muestra una estructura cuaternaria compuesta de un hexámero conformado por un dímero de trímeros [17]. Cada trímero muestra una configuración que se le ha denominado cabeza-cola, esta configuración facilita la transferencia del FMN sintetizado en el módulo RFK al módulo FMNAT de un protómero vecino; debido a la formación de

un canal que comunica ambos sitios activos (Anexo G). Estudios han evidenciado que la configuración cabeza-cola es importante para la estabilización del hexámero y la catálisis en módulo RFK. Además el módulo RFK en configuración cabeza-cola se presume debe tener un rol en la actividad enzimática del módulo FMNAT, ya que interacciona con el sitio de unión del FMN [16], [17], [21], [22].

La FADS es una enzima objetivo para el diseño de inhibidores selectivos de la síntesis de FMN y FAD en procariontes [17]. Sin embargo, para buscar los inhibidores selectivos, el primer paso es entender los mecanismos estructurales y funcionales de la síntesis de FMN y FAD catalizada por la FADS procarionte e identificar las diferencias con la síntesis de FMN y FAD en eucariotes, particularmente mamíferos. A la fecha se han realizado estudios de la FADS bacteriana que han aportado conocimiento estructural y funcional de la síntesis de FMN y FAD. Sin embargo, estos estudios se han centrado principalmente en la síntesis de FMN; lo anterior se debe principalmente a que se cuenta con una estructura cristalográfica del complejo enzima-sustrato del módulo RFK, mientras que la síntesis de FAD ha sido estudiada en menor extensión porque no existe un complejo enzima-sustrato para el módulo FMNAT [13], [16]–[18], [22], [23].

El presente trabajo está direccionado a proponer y describir un complejo enzima-sustrato para el módulo FMNAT de la CaFADS, con sus sustratos ATP, FMN y el cofactor  $Mg^{2+}$ , además de evaluar la estabilidad y analizar las interacciones enzima-sustrato en el sitio activo del módulo FMNAT. El estudio se realizó usando dos modelos: el primero con la estructura cristalográfica del módulo FMNAT y el segundo en el módulo FMNAT interaccionando con el módulo RFK, teniendo en cuenta la configuración cabeza-cola del hexámero de la CaFADS. Para alcanzar nuestros objetivos utilizamos herramientas computacionales, tales como acoplamiento molecular y dinámica molecular. En ambos modelos los complejos enzima-sustrato propuestos fueron estables. El  $Mg^{2+}$  estabiliza los grupos fosfato de ambos sustratos de la enzima. El módulo RFK en configuración cabeza-cola contribuye a la

estabilización y a la correcta orientación del FMN *para producir un complejo Enzima-sustratos catalíticamente competente*, [7], [8]. La estabilidad de la configuración cabeza-cola fue atribuida a los puentes salinos establecidos entre R65 y R66 con el residuo E268.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar la interacción enzima-sustrato del módulo FMNAT de la enzima FAD sintetasa de *Corynebacterium ammoniagenes*.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Proponer un modelo del complejo ATP/Mg<sup>2+</sup>-módulo FMNAT de la FADS de *C. ammoniagenes*.

Proponer un modelo del complejo ATP/Mg<sup>2+</sup>/FMN-módulo FMNAT de la FADS de *C. ammoniagenes*.

Proponer un modelo del complejo ATP/Mg<sup>2+</sup>/FMN-módulo FMNAT con la interacción cabeza-cola de la FADS de *C. ammoniagenes*.

Analizar la estabilidad de los complejos enzima-sustrato del módulo FMNAT de la FADS a través de simulación por dinámica molecular.

## 2. METODOLOGÍA

En este trabajo se usaron técnicas de simulación molecular ampliamente conocidas. A continuación se hará una leve descripción de los conceptos involucrados en dichas técnicas, con el objetivo de exponer los conceptos básicos.

### 2.1. CAMPO DE FUERZA

En mecánica molecular (MM), las moléculas se representan como un conjunto de partículas (núcleos) conectadas entre sí por medio de resortes (enlaces). En este modelo, las moléculas pueden rotar o plegarse en respuesta a fuerzas inter- e intramoleculares. Estas rotaciones pueden ser descritas por medio de funciones que representan el comportamiento de los enlaces, de ángulos de enlace y ángulos diedros, y de las interacciones no enlazantes. El tipo y número de funciones, así como los parámetros usados en ellas, definen los llamados campos de fuerza [24], [25]. Los campos de fuerza se usan para calcular la energía potencial como una suma de términos, cada término describe la energía requerida para distorsionar una molécula en una manera específica [25], [26]. Así, campos de fuerza como, Amber, Gromos, y CHARMM, entre otros, son utilizados para calcular la energía de sistemas moleculares [27]–[29].

### 2.2. MINIMIZACIÓN

Podemos calcular la energía potencial asociada a una configuración nuclear específica con el uso de funciones de energía potencial. Si exploramos cada configuración del espacio configuracional ( $N$ -dimensional) y a cada configuración del espacio configuracional se le evalúa su energía potencial, se obtiene como resultado la superficie de energía potencial  $N$ -dimensional (SEP) para ese sistema nuclear en función de las coordenadas nucleares [30]. Si el sistema en consideración está compuesto por  $N$  núcleos, el número de grados de libertad en el espacio conformacional será  $3N$ . Por lo tanto, para obtener la totalidad de la SEP

se tendría que explorar infinitos puntos de cada una de las  $3N$  dimensiones en coordenadas cartesianas ( $3N-6$  en coordenadas internas) del sistema.

La SEP posee puntos que presentan mayor interés, como los máximos y mínimos energéticos. El conocimiento de la SEP es fundamental para explicar la estabilidad, estructura y describir las reacciones químicas [24], [25]. Así, la minimización se usa para encontrar estructuras correspondientes a los mínimos energéticos dentro de la SEP.

### **2.3. ACOPLAMIENTO MOLECULAR**

El AM es una técnica computacional ampliamente usada para la predicción del modo de unión de un sustrato al sitio activo de una enzima. Existen varios programas para realizar AM [31]. En el presente estudio se usó Autodock 4.2, el cual usa un algoritmo genético lamarckiano para generar las poses, y una función de puntuación basada en el campo de fuerza de amber para seleccionar la pose del sustrato con mayor afinidad por la enzima [27], [32].

### **2.4. DINÁMICA MOLECULAR**

A partir de la función de campo de fuerza se puede determinar la energía potencial de un sistema estático. Sin embargo, integrando la ecuación de movimiento de Newton ( $F = ma$ , donde,  $F$  es la fuerza ejercida sobre la partícula,  $m$  es la masa de la partícula y  $a$  su aceleración) se puede simular la evolución del sistema en función del tiempo y así, generar una trayectoria del sistema en el tiempo. A partir de dicha trayectoria es posible obtener el valor promedio de los observables del sistema. [24], [26].

## **2.5. PREDICCIÓN DE LOS COMPLEJOS ENZIMA-SUSTRATO EN EL MÓDULO FMNAT Y MÓDULO FMNAT+RFK**

**2.5.1. Preparación del sistema molecular.** El módulo FMNAT de la CaFADS se extrajo del PROTEIN DATA BANK (PDB) código 2X0K. Debido a que la estructura cristalográfica de la CaFADS no presenta los átomos de hidrógeno; se usó el programa PDB2PQR/PROPKA para protonar la enzima a pH 7.0 [33]. Al ATP y FMN les fueron asignadas cargas del tipo Gasteiger-Marsili [34].

**2.5.2. Acoplamiento molecular del ATP, Mg<sup>2+</sup> y FMN en el módulo FMNAT y el módulo FMNAT+RFK.** Los sustratos ATP y FMN fueron con optimizados usando mecánica cuántica con el programa gaussian09, usando el funcional híbrido B3LYP y una base de cálculo 6-31G (d,p). Las estructuras optimizadas fueron usadas como entrada para el acoplamiento molecular [35]. Se realizaron 100 acoplamientos para cada sustrato (ATP, FMN) y el cofactor Mg<sup>2+</sup> usando el programa Autodock 4.2 [36]. El acoplamiento de los sustratos se hizo en el orden descrito experimentalmente [37]. Primero se acopló el ATP en el módulo FMNAT, después se acopló el Mg<sup>2+</sup> en los fosfatos del ATP, en el complejo ATP-Módulo FMNAT y posteriormente se acopló el FMN en el complejo ATP/Mg<sup>2+</sup>-Módulo FMNAT. Para obtener el complejo enzima-sustrato en el módulo FMNAT+RFK (configuración cabeza-cola) se usó el complejo ATP/Mg<sup>2+</sup>-módulo FMNAT previamente hallado y en este complejo se acopló el FMN. Para la búsqueda de las poses más probables se utilizó el algoritmo genético poblacional de Autodock4.2 con población inicial 150, 25000000 evaluaciones de energía, 27000 generaciones, tasa de mutación 0.2 y tasa de crossover 0.8.

**2.5.3. Acoplamiento molecular del ATP.** La caja de búsqueda para el acoplamiento del ATP se centró en átomo OD1 de la cadena latera del residuo N125, el espaciado de la rejilla de la caja fue de 0.125 Å y el tamaño de la caja de 16 Å en los ejes X, Y y Z.

**2.5.4. Acoplamiento molecular del  $Mg^{2+}$ .** La caja de búsqueda del acoplamiento del  $Mg^{2+}$  se localizó en los fosfatos del ATP con centro en el fósforo- $\beta$  del ATP, dado que en estructuras homólogas a la CaFADS (tales como la enzima mononucleótido de nicotinamida adenilil transferasa (PDB: 1f9a) de *Methanococcus jannaschii*, o la enzima NMN adenilil transferasa (PDB: 1ej2) de *Methanobacterium thermoautotrophicum*) presentan el  $Mg^{2+}$  asociado a los fosfatos del ATP [38], [39]. El espaciado de la rejilla de la caja fue de 0.1 Å y el tamaño de la caja de 14 Å en los ejes X, Y y Z.

**2.5.5. Acoplamiento molecular del FMN.** La caja de búsqueda para el acoplamiento del FMN se centró en el carbono- $\alpha$  del residuo T127, el espaciado de la rejilla de la caja fue de 0.125 Å y el tamaño de la caja de 16 Å en los ejes X, Y y Z.

**2.5.6. Selección de los complejos enzima-sustrato.** Los complejos enzima-sustrato se seleccionaron teniendo en cuenta: a) conformaciones con energía de afinidad más bajas obtenidas con Autodock 4.2, b) complejos que tuvieron mayor número de coincidencias de interacciones por puente de hidrógeno que han sido reportadas en enzimas homólogas a la FADS de *C. ammoniagenes* [11]–[13], [17], [23].

**2.5.7. Minimización de los complejos enzima-sustrato.** Las minimizaciones de energía potencial de los complejos enzima-sustrato seleccionados: ATP/ $Mg^{2+}$ /FMN-módulo FMNAT y ATP/ $Mg^{2+}$ /FMN-módulo FMNAT+RFK se realizaron en el programa CHARMM [40], usando el campo de fuerza CHARMM-27 [29]. Se usó el algoritmo Newton Raphson (ABNR). El algoritmo de Newton Raphson se usa para encontrar mínimos en la superficie de energía potencial y evitar puntos de silla. La minimización del complejo enzima-sustrato se realizó en dos etapas, en la primera se minimizó el solvente fijando las coordenadas del sistema enzimático y en la segunda etapa se minimizó el complejo enzima-sustrato más el solvente.

Consideramos que el modelo está minimizado cuando la raíz cuadrada de la media del gradiente de energía es menor a  $1 \times 10^{-3}$  [kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-1</sup>] [41].

## **2.6. DINÁMICA MOLECULAR DE LOS COMPLEJOS ENZIMA-SUSTRATO**

Las estructuras minimizadas del complejo enzima-sustrato del módulo FMNAT y el complejo enzima-sustrato del módulo FMNAT+RFK, se les realizó una dinámica molecular de 5 ns, en una caja ortorrómbica de moléculas de agua TIP3P, equilibrada bajo condiciones periódicas de contorno. Se usó el algoritmo extendido implementado en CHARMM para mantener constante una presión de una 1 atm y el algoritmo Hoover para mantener una temperatura constante de 300K [42]. Se usó el método Ewald para calcular las interacciones electrostáticas de largo alcance. Las distancias que involucran átomos de hidrógeno se fijaron usando el algoritmo SHAKE [40].

Previo a la dinámica molecular el sistema fue calentado y equilibrado. El sistema fue calentado desde 5 K hasta 300 K, incrementando 25 K cada 200 pasos de DM, restringiendo la movilidad de los sustratos y la cadena principal de la enzima con una constante de fuerza de 50 kcal/molÅ<sup>2</sup>. Una vez alcanzado los 300 K, se disminuyó progresivamente la constante de fuerza usada para restringir el movimiento de a los sustratos y la cadena principal durante 30 ps, hasta permitir el libre movimiento de los mismos. Una vez equilibrado el sistema se realizaron 5 ns de dinámica molecular.

## **2.7. ANÁLISIS DE LOS COMPLEJOS ENZIMA-SUSTRATO**

A los complejos enzima-sustrato seleccionados para el módulo FMNAT y para el módulo FMNAT+RFK, se les calculó RMSD (raíz cuadrada de la media de las

posiciones atómicas) respecto a la conformación estructural de partida y estructuras obtenidas durante la trayectoria de la dinámica molecular.

Se les realizó seguimiento de la estabilidad de las Interacciones polares (distancias entre 2.5 y 3.9 Å y ángulos no menores a 90° entre átomo donador y aceptor se considerará un puente de hidrógeno) de los complejos enzima-sustrato a través de la dinámica molecular y se determinaron los contactos de tipo hidrofóbico usando los parámetros por defecto del programa LigPlot [43].

Finalmente se realizó una descripción de las interacciones enzima-sustrato (polares y apolares) encontradas en el acoplamiento molecular y las estructuras representativas de la dinámica molecular. Para facilitar la descripción de las interacciones enzima-sustrato los nombres de los átomos de los sustratos ATP y FMN se muestran en el Anexo H.

### 3. RESULTADOS

A continuación se muestran los resultados en el orden descrito en estudios cinéticos del módulo FMNAT de la CaFADS, donde el ATP se une primero al sitio activo de la enzima, luego se une el FMN y posteriormente se libera el FAD [7].

#### 3.1. ACOPLAMIENTO MOLECULAR DEL ATP EN EL MÓDULO FMNAT

Se ejecutó la simulación de acoplamiento molecular del ATP en el sitio activo del módulo FMNAT obteniendo 100 poses diferentes, estas poses fueron agrupadas según el valor de RMSD respecto a la pose con menor energía de afinidad (Tabla 1). La energía libre promedio de todos los agrupamientos fue negativa, sin embargo, la energía libre promedio de unión del agrupamiento 1 fue 2.35 kcal/mol más baja que las del segundo agrupamiento. Además, el agrupamiento 1 fue el único agrupamiento que presentó todas las interacciones reportadas entre ATP y residuos conservados en enzimas homologas a la FADS bacteriana (I162, L155, G123 y S164 en *C. ammoniagenes*) [11]–[13], [17], [23]. Estas características de las poses del agrupamiento 1 frente a las poses de los demás agrupamientos, lo convirtieron en el agrupamiento del cual se seleccionó el modelo del complejo ATP- FMNAT.

Las poses correspondientes al agrupamiento 1 presentan variaciones en la orientación de los fosfatos, de tal forma que los oxígenos de los fosfatos apuntan a direcciones diferentes. Para seleccionar el complejo ATP-módulo FMNAT a partir del agrupamiento 1, se tuvo en cuenta la pose en que los oxígenos del fosfato- $\alpha$  apuntan hacia el sitio de unión del FMN y que además presente la menor energía libre de unión (Figura 1a). Esta orientación de los oxígenos facilita la adenilación del FMN [8]. Así, se seleccionó la pose 16 del agrupamiento 1, el cual presenta una energía libre de unión de -10.36 kcal/mol (Anexo A) [44].

**Tabla 1. Resumen del acoplamiento molecular del ATP en el módulo FMNAT.**

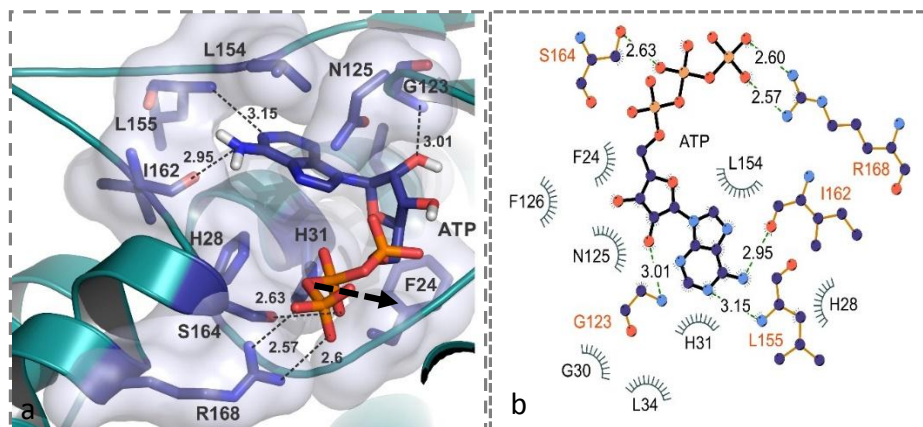
<b>Acoplamiento del ATP</b>							
<b>Agrupamiento</b>	<b>Energía libre<sup>a</sup> [kcal/mol ATP]</b>	<b>Energía promedio<sup>b</sup> [kcal/mol ATP]</b>	<b>Número de poses por agrupamiento</b>	<b>I162- ATP (N6)<sup>c</sup></b>	<b>L155- ATP (N1)<sup>c</sup></b>	<b>G123- ATP (O2')<sup>c</sup></b>	<b>S164- ATP (Py)<sup>c</sup></b>
<b>1</b>	-11.05	-9.48	71	1	1	1	1
<b>2</b>	-7.88	-7.13	10	-	-	-	1
<b>3</b>	-7.75	-7.62	2	-	-	-	1
<b>5</b>	-7.57	-7.57	1	-	-	-	-
<b>6</b>	-7.49	-7.06	2	1	-	-	1
<b>7</b>	-7.35	-7.14	2	-	-	1	1
<b>8</b>	-7.25	-7.25	1	-	-	-	-
<b>9</b>	-7.24	-7.24	1	-	-	-	-
<b>10</b>	-6.89	-6.89	1	1	-	-	-
<b>11</b>	-6.78	-6.2	2	-	1	1	-
<b>12</b>	-6.54	-6.54	1	-	-	-	-
<b>13</b>	-6.51	-6.51	1	-	1	-	-
<b>14</b>	-5.69	-5.69	1	-	-	-	-

<sup>a</sup> Menor energía libre calculada en el agrupamiento de las poses.

<sup>b</sup> Energía promedio calculada para cada agrupamiento.

<sup>c</sup> Presencia o ausencia de puentes de hidrógeno entre ATP y el módulo FMNAT reportados en enzimas homologas a la CaFADS. (1) indica presencia, (-) indica ausencia.

**Figura 1. Acoplamiento molecular del ATP en el módulo FMNAT**



**(a)** Vista estereoscópica del acoplamiento del ATP, en azul residuos del módulo FMNAT que estabilizan el ATP, en línea punteada puentes de hidrógeno entre ATP-FMNAT. Flecha negra, orientación de los oxígenos del en fosfato- $\alpha$  hacia el sitio de unión del FMN. **(b)** Representación esquemática del acoplamiento 16 del agrupamiento 1; puentes de hidrógeno en etiqueta naranja, contactos hidrofóbicos etiqueta negra.

En la pose seleccionada (Figura 1a y 1b), el ATP es estabilizado por puentes de hidrógeno e interacciones apolares con el módulo FMNAT. La adenina del ATP se estabiliza por los siguientes puentes de hidrógeno: I162/O-ATP/N6 y L155/N-ATP/N1. La ribosa del ATP se estabiliza por el puente de hidrógeno G123/N-ATP/O2'. Los fosfatos  $\beta$  y  $\gamma$  se estabilizan por los puentes de hidrógeno, S164/OG-ATP/O1 $\beta$  y R168/NH1-ATP/O3 $\gamma$  y R168/NH2-ATP/O2 $\gamma$ . Se observan interacciones apolares de la adenina del ATP con los residuos H28, G30, H31, L34, N125, L154; interacciones apolares de la ribosa del ATP con los residuos F24, N125, F126 e interacciones apolares de los fosfatos del ATP con el residuo F24.

### 3.2. ACOPLAMIENTO MOLECULAR DEL $Mg^{2+}$ EN LOS FOSFATOS DEL ATP ACOPLADO AL MÓDULO FMNAT

El acoplamiento molecular del  $Mg^{2+}$  se realizó en la conformación del ATP seleccionada del acoplamiento del ATP. En la ejecución del acoplamiento molecular

del  $Mg^{2+}$  se obtuvo una sola posición probable para este (Tabla 2). Se observa que los fosfatos del ATP estabilizan la carga positiva del  $Mg^{2+}$  (Figura 2a). El  $Mg^{2+}$  no muestra interacciones con residuos del módulo FMNAT.

**Tabla 2. Resumen del acoplamiento molecular del ion  $Mg^{2+}$  en el complejo ATP-módulo FMNAT.**

<b>Acoplamiento del <math>Mg^{2+}</math></b>		
<b>Agrupamiento</b>	<b>kcal/mol <math>Mg^{2+}</math> <sup>a</sup></b>	<b>Número de acoplamientos en agrupamiento</b>
1	-11.1	100

<sup>a</sup> Energía libre calculada para el acoplamiento del  $Mg^{2+}$  en el complejo ATP-módulo FMNAT.

### **3.3. ACOPLAMIENTO MOLECULAR DEL FMN EN EL COMPLEJO ATP/ $Mg^{2+}$ -MÓDULO FMNAT**

El acoplamiento molecular del FMN se realizó en el complejo ATP/ $Mg^{2+}$ -FMNAT hallado previamente. La caja de búsqueda se centró en el carbono- $\alpha$  del residuo T127, localizado en el sitio de unión propuesto para el FMN en estudios realizados anteriormente [17], [23].

Se encontraron 5 agrupamientos los cuales en su totalidad están constituidos por 100 poses del FMN en el módulo FMNAT. Organizados de menor a mayor energía libre de unión (Tabla 3). Todos los agrupamientos presentaron energía libre de unión negativa de valor similar.

**Tabla 3. Resumen del acoplamiento molecular del FMN en el complejo ATP/Mg<sup>2+</sup>-módulo FMNAT**

<b>Acoplamiento del FMN</b>					
<b>Agrupamiento</b>	<b>Energía libre [kcal/mol FMN] <sup>a</sup></b>	<b>Energía promedio [kcal/mol FMN] <sup>b</sup></b>	<b>Número de poses en agrupamiento</b>	<b>Modo de unión <sup>c</sup></b>	<b>Distancia ATP(P<math>\alpha</math>)-FMN(P) <sup>d</sup></b>
1	-8.62	-7.66	65	FMN-ME	4.5
2	-7.92	-7	19	FMN-MI	4.9
3	-7.13	-7.07	3	FMN-MI	5.3
4	-6.6	-6.37	12	FMN-MI	5.0
5	-6.42	-6.42	1	FMN-ME	4.6

<sup>a</sup> Menor energía libre calculada en el agrupamiento.

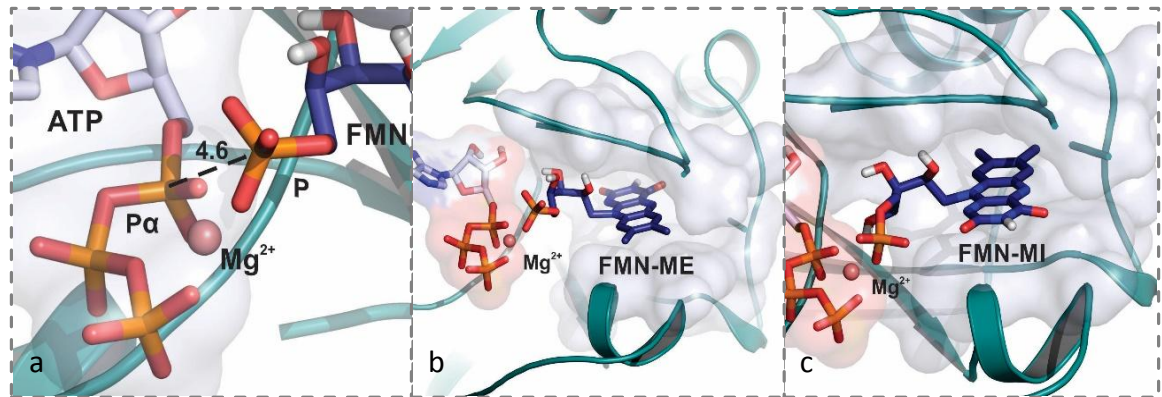
<sup>b</sup> Energía promedio calculada en el agrupamiento.

<sup>c</sup> Modo de unión del FMN en el sitio activo.

<sup>d</sup> Menor distancia entre fósforo- $\alpha$  del ATP y fósforo del FMN en el agrupamiento.

En los 5 agrupamientos se pudo observar que el FMN se orienta de 2 formas distintas en el sitio activo del módulo FMNAT. En la primera, el FMN presenta los metilos del triple anillo de isoaloxazina apuntando hacia el exterior del sitio activo (FMN-ME) y en la segunda los metilos están apuntando hacia el interior del sitio activo (FMN-MI) (Figura 2b y 2c).

**Figura 2. Características del acoplamiento molecular del  $Mg^{2+}$  y FMN en el módulo FMNAT.**



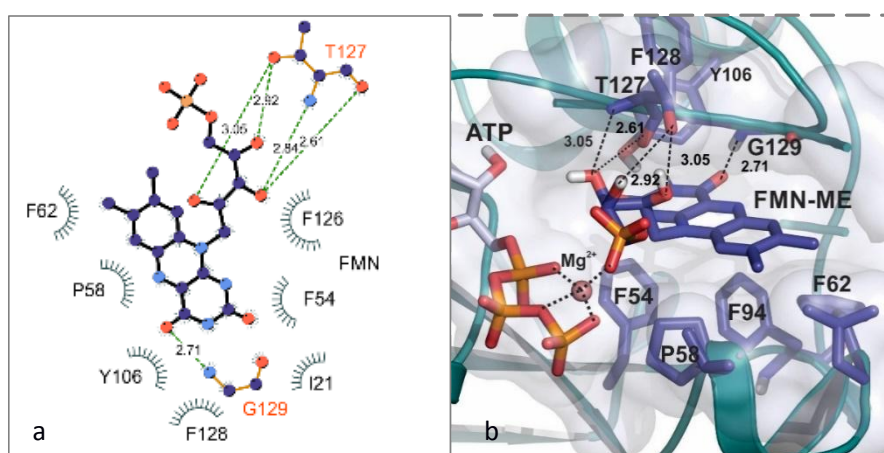
(a) Acoplamiento del  $Mg^{2+}$ . En línea punteada se muestra la distancia entre el fósforo- $\alpha$  del ATP y fósforo del FMN acoplados en módulo FMNAT. (b) Disposición de los metilos del FMN hacia el exterior del sitio activo del módulo FMNAT (FMN-ME). (c) Disposición de los metilos del FMN hacia el interior del sitio activo del módulo FMNAT (FMN-MI).

Las poses FMN-ME y FMN-MI son estabilizadas por puentes de hidrógeno e interacciones apolares, algunas de tipo apilamiento  $\pi$  con el módulo FMNAT. Ambas poses presentan energía libre de unión similar, además en ambos casos el fosfato del FMN se aproxima al fosfato- $\alpha$  del ATP. Éstas características no permiten hacer una elección entre las dos poses.

La pose FMN-ME se estabiliza por puentes de hidrógeno e interacciones apolares. El residuo T127 forma 4 puentes de hidrógeno con el ribitol del FMN-ME, estos son: T127/OG1-FMN/O2', T127/OG1-FMN/O4', T127/N-FMN/O3' y T127/O-FMN/O2' (Figura 3a). La cadena principal de G129 forma un puente de hidrógeno con la isoaloxazina del FMN-ME, G129/N-FMN/O4 (Figura 3a); adicionalmente los residuos F54, P58, Y106 y F128 estabilizan por interacciones apolares a la isoaloxazina. El anillo aromático del residuo F62 interacciona con la isoaloxazina por apilamiento  $\pi$  y el anillo del residuo F94 se encuentra perpendicular a la isoaloxazina (Figura 3b).

En la pose FMN-ME, el oxígeno O1P del fosfato del FMN interacciona con el  $Mg^{2+}$ , está interacción aproxima el fosfato del FMN en FMN-ME al fosfato- $\alpha$  del ATP. Esta configuración favorecería la formación de FAD [7]. Se observa que el módulo FMNAT estabiliza el FMN-ME en su mayoría por interacciones hidrofóbicas con el triple anillo de isoaloxazina (Figura 3a y 3b).

**Figura 3. Acoplamiento molecular del FMN en el complejo ATP/ $Mg^{2+}$ -módulo FMNAT.**



(a) Representación esquemática del acoplamiento molecular del FMN en el complejo ATP/ $Mg^{2+}$ -FMNAT; puentes de hidrógeno en etiqueta naranja, contactos hidrofóbicos en etiqueta negra. (b) Vista estereoscópica del acoplamiento molecular del FMN en el complejo ATP/ $Mg^{2+}$ -FMNAT, en azul se muestran los residuos de FMNAT que estabilizan el FMN, en línea punteada interacciones enzima-sustrato.

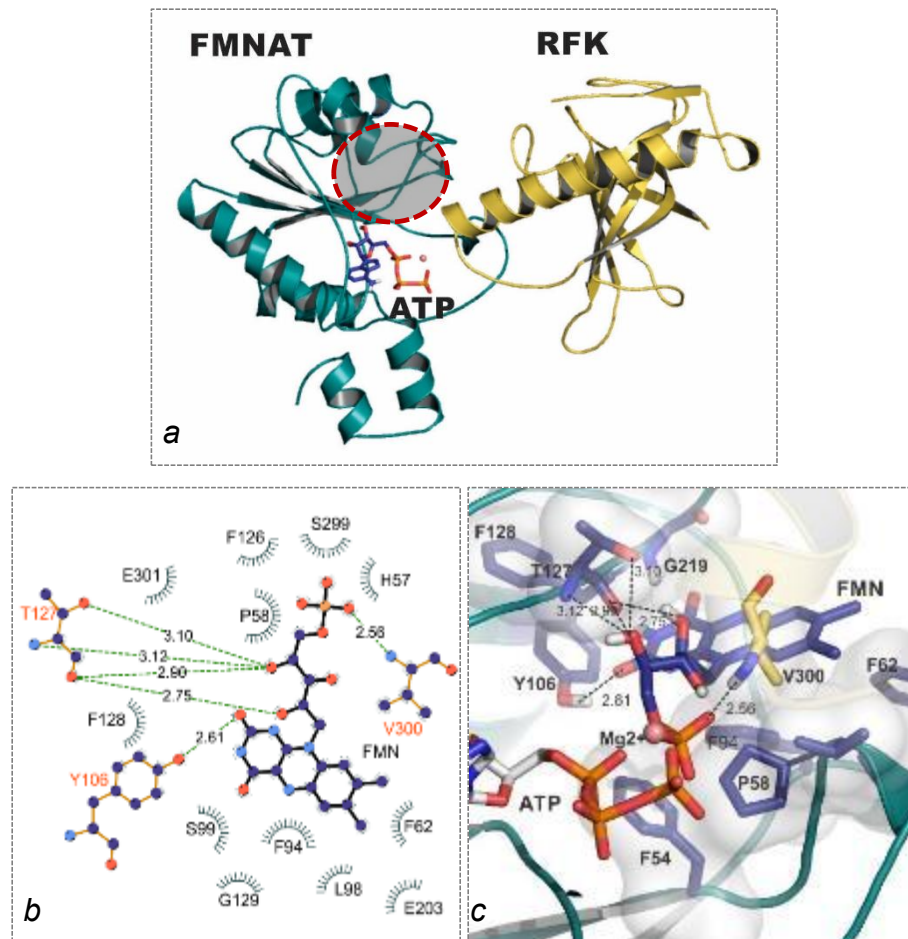
### 3.4. ACOPLAMIENTO MOLECULAR DEL FMN EN EL COMPLEJO ATP/ $Mg^{2+}$ -MÓDULO FMNAT+RFK

La configuración cabeza-cola entre el módulo FMNAT y el módulo RFK de la FADS, se forma cuando la enzima adopta su estado oligomérico (hexámero). El hexámero está compuesto por un dímero de trímeros de FADS (Anexo G). La orientación de los protómeros de FADS en el trímero permite la aproximación de los módulos de

FMNAT y RFK de dos protómeros distintos del trímero, formando la denominada configuración o interacción cabeza-cola (Anexo G). En esta configuración el módulo RFK se aproxima al sitio activo del módulo FMNAT, siendo fundamental para que se dé el paso del FMN sintetizado previamente en el módulo RFK al módulo FMNAT, además, el módulo RFK en la configuración cabeza-cola interacciona con el sitio activo del módulo FMNAT, específicamente con el sitio de unión del FMN, reduciendo el espacio de acoplamiento del FMN (Figura 4a). A la fecha no se conoce como el módulo RFK interviene en el acoplamiento de los sustratos en el módulo FMNAT. Por esta razón se realizó el acoplamiento del FMN en sitio activo del módulo FMNAT interaccionando con el módulo RFK en configuración cabeza-cola.

Para el acoplamiento del FMN en el módulo FMNAT en configuración cabeza-cola con el módulo RFK, se mantuvo la pose seleccionada del ATP y la posición del  $Mg^{2+}$  obtenidos en el acoplamiento del ATP y  $Mg^{2+}$ . A este complejo ATP/ $Mg^{2+}$ -FMNAT, se le superpuso la estructura cristalográfica del hexámero de CaFADS (PDB 2X0K), en la que un módulo RFK presenta configuración cabeza-cola con el complejo ATP/ $Mg^{2+}$ -módulo FMNAT. Posteriormente se seleccionó el módulo RFK involucrado en la configuración cabeza-cola. El complejo resultante es finalmente ATP/ $Mg^{2+}$ -módulo FMNAT+RFK en configuración cabeza-cola; en este complejo se realizó el acoplamiento del FMN en sitio activo del módulo FMNAT.

**Figura 4. Acoplamiento molecular del FMN en el complejo ATP/Mg<sup>2+</sup>-módulo FMNAT+RFK**



**(a)** Vista estereoscópica, configuración cabeza-cola con el ATP y Mg<sup>2+</sup> acoplado al módulo FMNAT. El círculo discontinuo muestra el sitio de unión del FMN **(b)** Representación esquemática del acoplamiento del FMN en el complejo en la configuración cabeza-cola. Puentes de hidrógeno en etiqueta naranja, contactos hidrofóbicos etiqueta negra. **(c)** Vista estereoscópica, FMN-ME acoplado en la configuración cabeza-cola, en azul residuos del módulo FMNAT que estabilizan el FMN, en línea punteada puentes de hidrógeno enzima-sustrato, en amarillo el módulo RFK.

Los criterios usados para seleccionar la pose del FMN fueron los siguientes: 1) acoplamiento con energía libre de unión más baja. 2) Que tenga la menor distancia

entre fósforo- $\alpha$  del ATP y fósforo del FMN. Esto con el objetivo de buscar una configuración que favorezca la adenilación del FMN.

En el acoplamiento del FMN en el complejo ATP/Mg<sup>2+</sup>-FMNAT+RFK en configuración cabeza-cola se encontraron 7 agrupamientos a partir de las 100 poses obtenidas (Tabla 4). En los primeros cuatro agrupamientos se encontraron poses con energía libre de unión negativa, sin embargo, en los agrupamientos 3 y 4 el promedio de energía libre de unión mostró valores positivos. El resto de agrupamientos muestra energía libre de unión positiva. Resulta interesante que los agrupamientos 1 y 2 únicos viables en términos de energía de unión, exhiben los metilos del triple anillo de isoaloxazina apuntando hacia el exterior del sitio activo, pose (FMN-ME) (Figura 4c); en contraste con los acoplamientos del FMN al módulo FMNAT que mostró dos poses viables (FMN-ME y FMN-MI) (Figura 2b y 2c).

Debido a que el acoplamiento en la configuración cabeza-cola solo mostró viable la pose FMN-ME, esta pose se usó para describir las interacciones enzima-sustrato y analizar la estabilidad del acoplamiento del FMN en ambos modelos (sustratos-módulo FMNAT y sustratos-módulo FMNAT+RFK), a los cuales se les realizó simulación de DM. Con base en los criterios establecidos se seleccionó la pose 30 del agrupamiento 1 con energía libre de unión -7.69 para el acoplamiento del FMN en el módulo FMNAT (Tabla 3), (Anexo B) y se seleccionó la pose 4 del agrupamiento 1 con energía libre de unión -1.76 kcal/mol para el acoplamiento del FMN en el módulo FMNAT+RFK (Anexo C).

**Tabla 4. Resumen del acoplamiento molecular del FMN en el complejo ATP/Mg<sup>2+</sup>-módulo FMNAT+RFK**

<b>Acoplamiento FMN en el módulo FMNAT+RFK</b>					
<b>Agrupamiento</b>	<b>Energía libre [kcal/mol FMN] <sup>a</sup></b>	<b>Energía promedio [kcal/mol FMN] <sup>b</sup></b>	<b>Número de acoplamientos en agrupamiento</b>	<b>Modo de unión</b>	<b>Distancia ATP(P<math>\alpha</math>)-FMN(P) <sup>c</sup></b>
1	-2.47	-0.99	65	FMN-ME	5.3
2	-1.1	-0.89	2	FMN-ME	7.2
3	-0.44	0.18	8	FMN-MI	16.8
4	-0.23	0.21	19	FMN-MI	12.8
5	0.04	0.58	4	FMN-MI	5.2
6	1.03	1.03	1	FMN-ME	4.6
7	2.05	2.05	1	FMN-MI	14.1

<sup>a</sup> Menor energía libre calculada en el agrupamiento.

<sup>b</sup> Energía promedio calculada en el agrupamiento.

<sup>c</sup> Menor distancia entre el fósforo- $\alpha$  del ATP y fósforo del FMN.

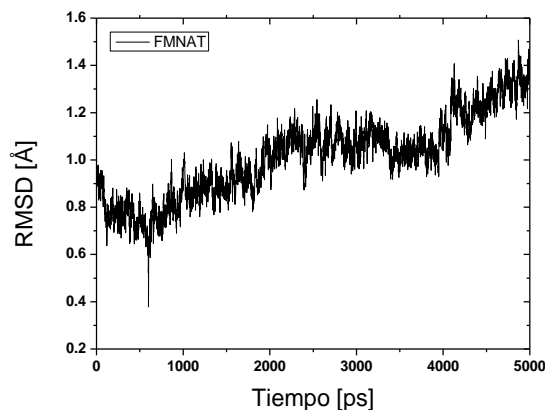
El FMN-ME en la configuración cabeza-cola es estabilizado por puentes de hidrógeno e interacciones apolares, algunas de tipo aril con los módulos FMNAT y RFK. El ribitol del FMN-ME es estabilizado por los puentes de hidrógeno, T127/O-FMN/O4', T127/OG1-FMN/O4', T127/N-FMN/O4', T127/O-FMN/O2'. El módulo RFK estabiliza el fosfato del FMN con el puente de hidrógeno V300/N-FMN/O3P y la isoaloxazina se estabiliza con el puente de hidrógeno Y106/OH-FMN/O2. El anillo aromático de F94 estabiliza el triple anillo de isoaloxazina por medio de interacción de apilamiento  $\pi$ . Los residuos H57, P58, F62, F94, L98, S99, F126, F128, G129,

E203, S299 y E301, contribuyen a la estabilización del FMN por interacciones apolares (Figura 4b y 4c).

### 3.5. DINÁMICA MOLECULAR DEL COMPLEJO ATP/MG<sup>2+</sup>/FMN-MÓDULO FMNAT

El RMSD calculado entre la estructura de partida y la trayectoria de la DM del complejo ATP/Mg<sup>2+</sup>/FMN-módulo FMNAT, aumentó aproximadamente hasta 1.4 Å (Figura 5); este valor de RMSD muestra que el acoplamiento de los sustratos no genera cambios conformacionales importantes en la estructura de la enzima durante la DM. En consecuencia, este resultado indica que el complejo enzima-sustrato seleccionado es estable durante la DM.

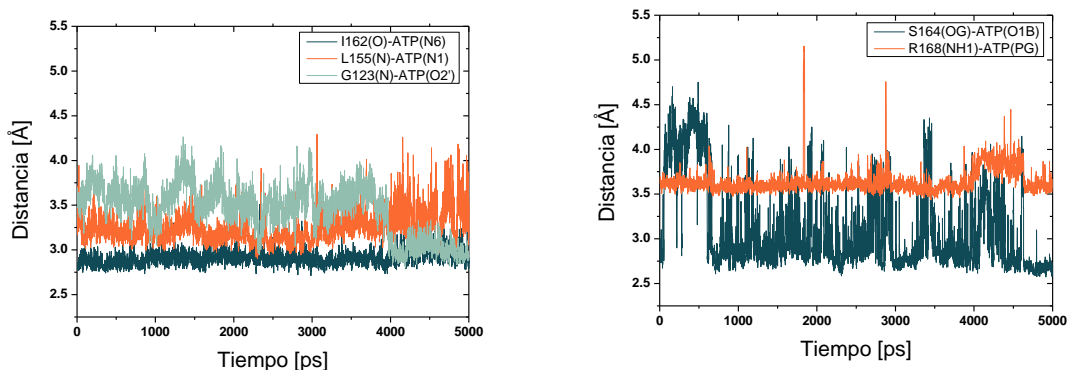
**Figura 5. RMSD del complejo ATP/Mg<sup>2+</sup>/FMN-módulo FMNAT, durante la trayectoria de la DM.**



La distancia de los puentes de hidrógeno del acoplamiento: L155/N-ATP/N1, I162/O-ATP/N6, R168/NH1-ATP/O3 $\gamma$ , R168/NH2-ATPO2 $\gamma$  se mantuvieron en un rango de 2.5-4.0 Å, indicando que estos puentes de hidrógeno son estables (Figura 6a),

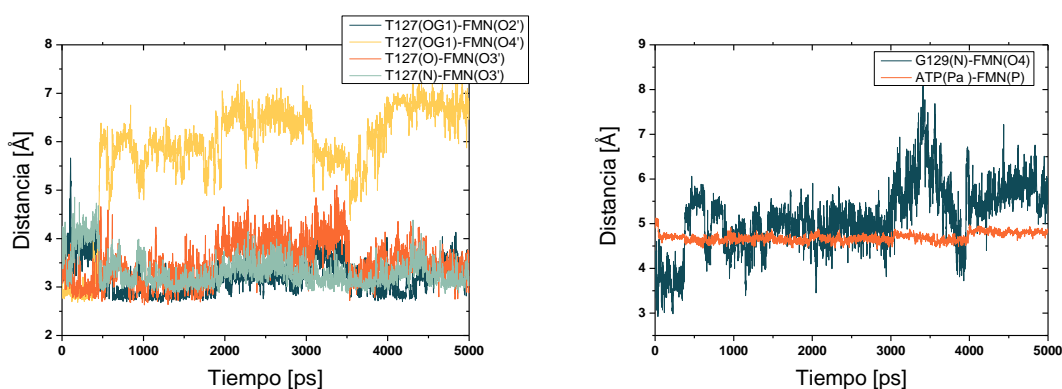
contrario, las distancias entre los puentes de hidrógeno G123/N-ATP/O2' y S164/OG-ATP/O1 $\beta$ , se mostraron inestables, variando entre 3.9-4.5 Å durante la trayectoria de la DM (Figura 6a, 6b). Este resultado muestra que aunque se pierden algunas interacciones polares, la adenina, ribosa y fosfatos del ATP se mantiene próxima al sitio de unión, sugiriendo que el acoplamiento del ATP es estable.

**Figura 6. Distancia de los puentes de hidrógeno que estabilizan el ATP en el complejo ATP/Mg<sup>2+</sup>/FMN-módulo FMNAT durante la trayectoria de la DM.**



El puente de hidrógeno formado entre la enzima y la isoaloxazina del FMN (G129/N-FMN/O4) se rompe durante la DM (Figura 7b). No obstante, los puentes de hidrógeno entre el grupo ribitol del FMN-ME y T127 (T127/OG1-FMN/O2', T127/OG1-FMN/O4', T127/N-FMN/O3' y T127/O-FMN/O2') formados en el acoplamiento, fluctúan durante la DM (Figura 7a, 7b). La distancia entre el fósforo  $\alpha$  del ATP y el fósforo del FMN varía entre 5 y 6 Å (Figura 7b). Este resultado indica que las interacciones enzima-sustrato son suficientes para mantener próximos el fosfato- $\alpha$  del ATP y el fosfato del FMN. Esta configuración haría que la adenilación del FMN sea factible [7].

**Figura 7. Distancia de los puentes de hidrógeno que estabilizan el FMN en el complejo ATP/Mg<sup>2+</sup>/FMN-módulo FMNAT, durante la trayectoria de la DM.**



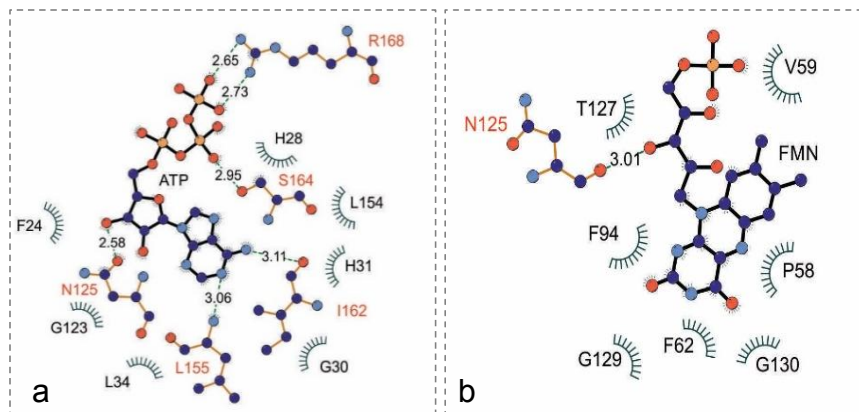
### **3.6. ESTRUCTURA REPRESENTATIVA DE LA DINÁMICA MOLECULAR DEL COMPLEJO ATP/MG<sup>2+</sup>/FMN-MÓDULO FMNAT**

Las estructuras representativas en DM, son aquellas estructuras que se presentan durante la mayor parte del tiempo de la trayectoria de la DM, respecto a unos criterios de distancia seleccionados y/o RMSD. La estructura representativa se obtuvo a partir de la frecuencia relativa de dos parámetros: variación de la distancia entre el fósforo- $\alpha$  del ATP y fósforo del FMN, y el RMSD de los átomos pesados calculado entre la estructura de partida y la trayectoria de la DM del complejo ATP/Mg<sup>2+</sup>/FMN-módulo FMNAT (Anexo I). Con base en estos dos parámetros se seleccionó aleatoriamente una estructura cuyo valor de distancia entre el fósforo- $\alpha$  del ATP y fósforo del FMN sea igual al valor de la distancia que se presenta con

mayor frecuencia durante la DM, y simultáneamente presente el valor de RMSD de mayor frecuencia (Anexo I).

La estructura representativa para la trayectoria de la DM del complejo enzima-sustrato del módulo FMNAT, muestra que la estabilización del FMN en el sitio activo de la enzima se realiza por interacciones hidrofóbicas con la isoaloxazina y los puentes de hidrógeno formados con el ribitol (Anexo D) (Figura 7b). Esta estructura evidencia que el residuo N125, que en el acoplamiento solo realizaba contactos apolares con el ATP, en la DM N125 se orienta de tal forma que forma un puente hidrógeno con el ATP (N125/ND2- ATP/O3') y simultáneamente un puente de hidrógeno con el FMN (N125/OD1- FMN/O4'). (Figura 8a, 8b).

**Figura 8. Representación esquemática de las interacciones polares y apolares que estabilizan el ATP y el FMN en el complejo ATP/Mg<sup>2+</sup>/FMN-módulo FMNAT en la estructura representativa de la trayectoria de la DM.**

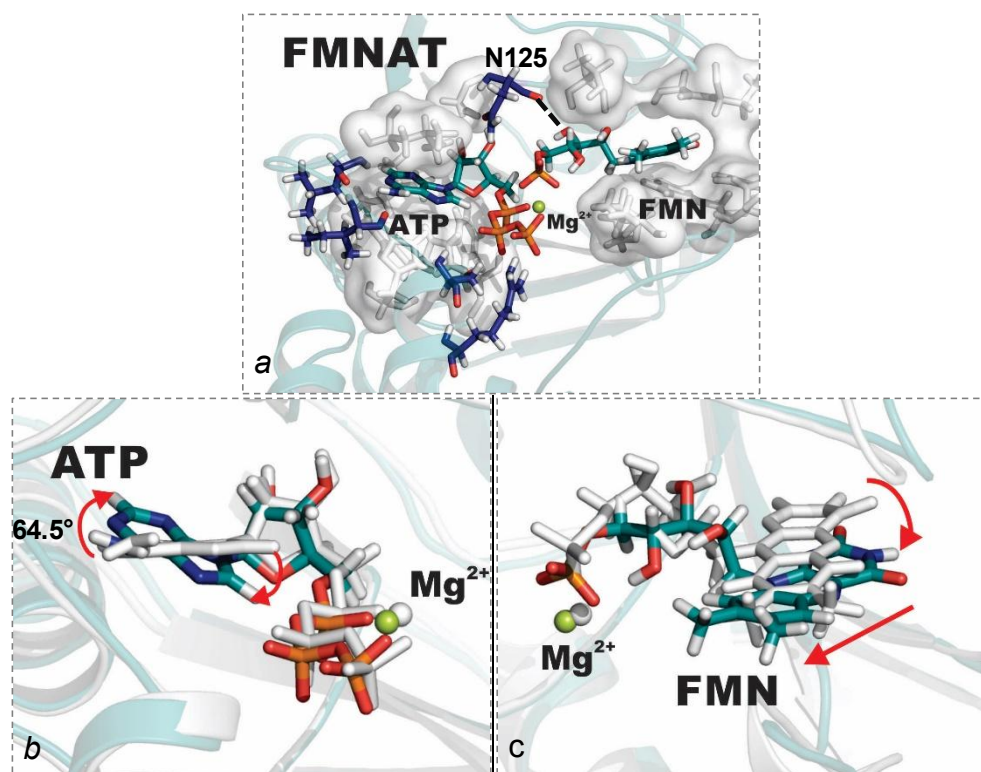


**(a)** Interacciones enzima-sustrato del ATP. **(b)** Interacciones enzima-sustrato del FMN.

El puente de hidrógeno formado entre N125 y el grupo ribitol del FMN sustituye los puentes de hidrógeno que fluctúan entre T127 y el FMN en el acoplamiento. Resulta interesante que los puentes de hidrógeno formados entre N125-ATP y N125-FMN, podrían servir de puente aproximando el fosfato- $\alpha$  del ATP y el fosfato del FMN (Figura 9a).

La estructura representativa permitió evidenciar cambios conformacionales realizados por los sustratos durante la dinámica molecular. La adenina del ATP, giró  $64.5^\circ$  en relación con la pose de partida del ATP de la DM (medida realizada con el programa Pymol) (Figura 9b) [45]. En el FMN, el triple anillo de isoaloxazina se encuentra desplazado hacia el exterior del sitio activo del módulo FMNAT (Figura 9c), este movimiento explica la pérdida del puente de hidrógeno entre la enzima y el triple anillo de isoaloxazina (G129/N-FMN/O4).

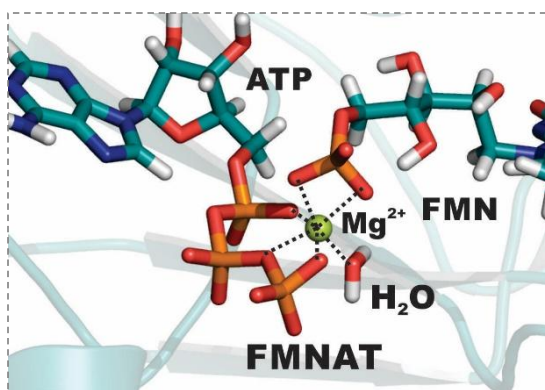
**Figura 9. Vista estereoscópica de la estructura representativa de la DM del complejo ATP/Mg<sup>2+</sup>/FMN-módulo FMNAT.**



(a) En línea punteada, puentes de hidrógeno del residuo N125 con el ATP y FMN (b) En palos blancos, pose de partida del ATP, en palos verdes, pose del ATP en la estructura representativa. Las flechas muestran el movimiento del ATP (c) En palos blancos se muestra la pose de partida del FMN. En palos verdes la pose del FMN en la estructura representativa del FMN. Las flechas muestran el movimiento del FMN.

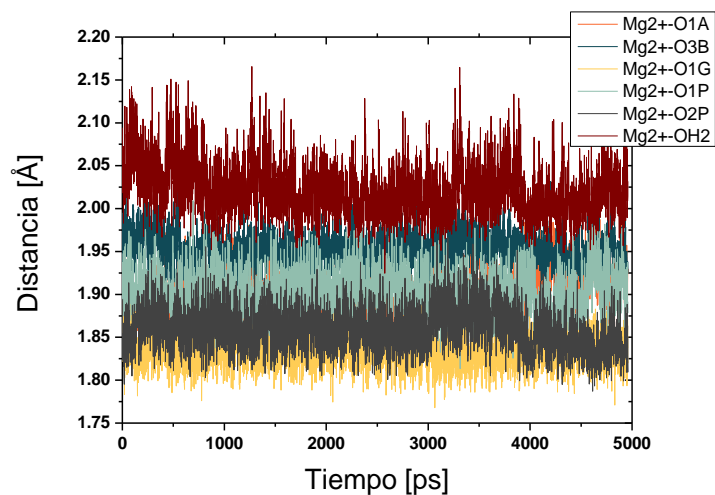
Durante la DM, el  $Mg^{2+}$  se estabilizó por interacciones electrostáticas con los fosfatos del ATP, FMN y una interacción ion-dipolo con el oxígeno de una molécula de agua (Figura 10). Estas interacciones con el  $Mg^{2+}$  se mantienen en un rango de 1.8-2.15 Å (Figura 11). El acoplamiento del  $Mg^{2+}$  se mostró estable a durante la DM.

**Figura 10. Vista estereoscópica de la estabilización del  $Mg^{2+}$  en la estructura representativa de la DM del complejo ATP/ $Mg^{2+}$ /FMN-módulo FMNAT.**



En línea punteada, átomos implicados en la estabilización del  $Mg^{2+}$  durante la DM.

**Figura 11. Distancia de interacciones que estabilizan el  $Mg^{2+}$  en el complejo ATP/ $Mg^{2+}$ /FMN-módulo FMNAT durante la trayectoria de la DM.**

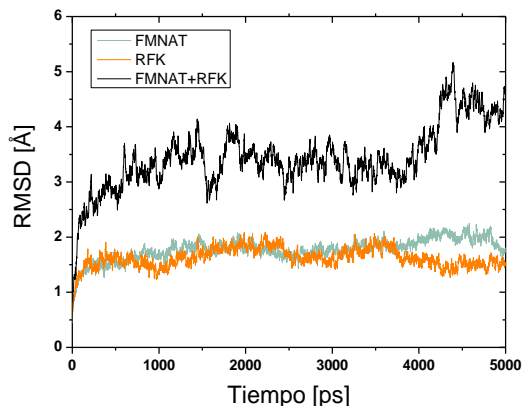


Estos resultados sugieren que de manera recíproca el  $Mg^{2+}$  cumple un rol en la estabilización de los fosfatos de del ATP y del FMN, favoreciendo el acercamiento del fosfato- $\alpha$  del ATP y fosfato del FMN.

### **3.7. DINÁMICA MOLECULAR DEL COMPLEJO ATP/MG<sup>2+</sup>/FMN-MÓDULO FMNAT+RFK**

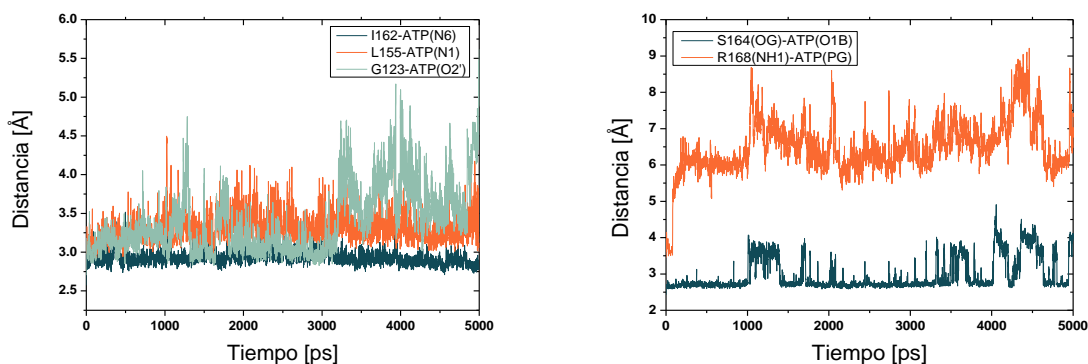
Para el complejo enzima-sustrato de la configuración cabeza-cola, se calculó el RMSD de los átomos pesados del sistema subdividido en tres partes, la primera para todo el sistema (RMSD global), la segunda para el módulo FMNAT con los sustratos y la tercera para el módulo RFK (Figura 12). El RMSD de la trayectoria de la DM respecto a la estructura de partida para sustratos-módulo FMNAT y módulo RFK, indican que el acoplamiento de los sustratos no indujo cambios considerables en la conformación de los módulos FMNAT y RFK. Sin embargo, el RMSD global muestra valores de RMSD entre 1-5 Å; estos valores de RMSD indican que la configuración cabeza-cola presenta cambios configuracionales considerables, se tratará sobre este tema más adelante. Se destaca que cerca de los 4000 ps el RMSD global presenta cambios, entre 3-5 Å.

**Figura 12. RMSD del complejo ATP/Mg<sup>2+</sup>/FMN-módulo FMNAT+RFK, durante la trayectoria de la DM.**



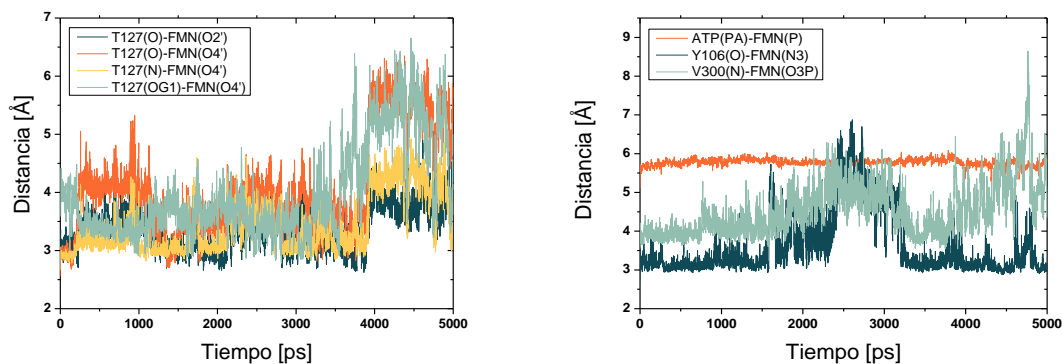
La distancia de los puentes de hidrógeno durante la DM entre la enzima y el ATP descritos en el acoplamiento del módulo FMNAT (en la adenina: I162/O-ATP/N6 y L155/N-ATP/N1; En la ribosa: G123/N-ATP/O2' y en los fosfatos: S164/OG-ATP/O1 $\beta$  y R168/NH1-ATP/O3 $\gamma$  y R168/NH2-ATP/O2 $\gamma$ ), se mantuvieron estables en la configuración cabeza-cola entre 2.8-4.0 Å, excepto: G123/N-ATP/O2' y R168/NH2-ATP/O2 $\gamma$  en la ribosa y el fosfato gama del ATP respectivamente (Figura 13a y 13b). Este resultado evidencia que la estabilización del ATP se realiza principalmente por los puentes de hidrógeno formados con los residuos I162, L155 y S164 en la configuración cabeza-cola.

**Figura 13. Puentes de hidrógeno que estabilizan el ATP en el complejo ATP/Mg<sup>2+</sup>/FMN-módulo FMNAT+RFK durante la trayectoria de la DM.**



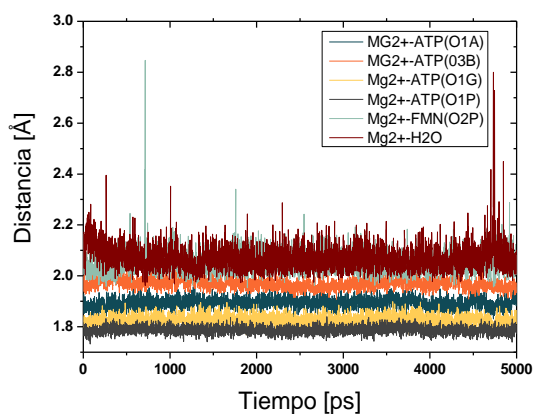
Los puentes de hidrógeno entre T127 y el ribitol del FMN descritos en el acoplamiento (T127/O-FMN/O4', T127/OG1-FMN/O4', T127/N-FMN/O4', T127/O-FMN/O2'), al igual que en la DM del módulo FMNAT, fluctúan rompiéndose y formándose (Figura 14a). El puente de hidrógeno formado con la isoaloxazina del FMN (Y106/O-FMN/N3) fluctúa rompiéndose y formándose durante la DM. Sin embargo, esta interacción se conserva finalizada la DM. Se observa además que la distancia entre el fósforo- $\alpha$  del ATP y el fósforo del FMN se mantiene estable durante la DM (Figura 14b). El puente de hidrógeno formado con el módulo RFK (V300/N-FMN/O3P) se rompe durante la DM de manera que el módulo RFK no contribuye a la estabilización de los sustratos por interacciones polares (Figura 14b).

**Figura 14. Puentes de hidrógeno que estabilizan el FMN en el complejo ATP/Mg<sup>2+</sup>/FMN-módulo FMNAT+RFK durante la trayectoria de la DM.**



Durante la DM, el Mg<sup>2+</sup> al igual que en el acoplamiento en el módulo FMANT, es estabilizado por interacciones electrostáticas con los fosfatos del ATP, FMN, y una interacción ion-dipolo con el oxígeno de una molécula de agua. Estas interacciones con el Mg<sup>2+</sup> se mantuvieron entre 1.8-2.2 Å. El acoplamiento del Mg<sup>2+</sup> se muestra estable a través de la DM (Figura 15).

**Figura 15. Distancia de interacciones que estabilizan el Mg<sup>2+</sup> en el complejo ATP/Mg<sup>2+</sup>/FMN-módulo FMNAT+RFK durante la trayectoria de la DM.**

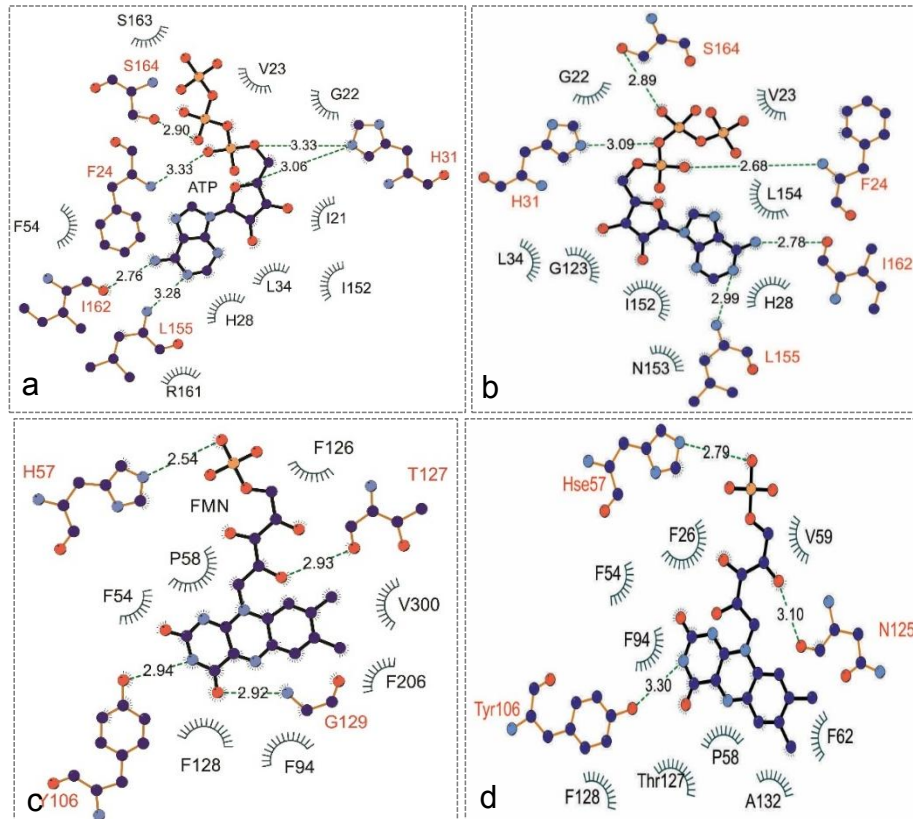


### **3.8. ESTRUCTURA REPRESENTATIVA DE LA DINÁMICA MOLECULAR DEL MÓDULO FMNAT+RFK**

Se obtuvieron 2 estructuras representativas de la configuración cabeza-cola con los mismos parámetros usados para la DM del módulo FMNAT (Figura 16). La primera estructura fue seleccionada al azar de las estructuras con mayor frecuencia relativa de la trayectoria de 5000 ps, denominada ahora ERC-C1 (Anexo J). La segunda estructura representativa fue seleccionada al azar de las estructuras con mayor frecuencia relativa entre 4000-5000 ps, denominada ahora ERC-C2 (Anexo K). Esta última estructura se obtuvo con el objetivo de observar qué interacciones cambiaron entre los 4000-5000 ps, tiempo en que hubo aumento de RMSD (Figura 12).

En la estructura ERC-C1, la adenina del ATP mantiene sus interacciones polares formadas en el acoplamiento (Figura 16a). La ribosa del ATP forma un puente de hidrógeno con H31 (H31/NE2-ATP/O4') y es acomodada por interacciones apolares con I21, L34 e I152. El fosfato- $\alpha$  del ATP forma nuevos puentes de hidrógeno respecto al acoplamiento, (F24/N-ATP/O2 $\alpha$ , H31/NE2-ATP/O5'); no obstante, se pierde el puente de hidrógeno R168/NH1-ATP/O3 $\gamma$  y R168/NH2-ATP/O2 $\gamma$ , debido a que el fosfato- $\gamma$  del ATP se desplaza hacia el interior del sitio activo.

**Figura 16. Representación esquemática de las interacciones polares y apolares que estabilizan el ATP y el FMN en el complejo ATP/Mg<sup>2+</sup>/FMN-módulo FMNAT+RFK en ERC-C1 y ERC-C2.**



**(a)** Interacciones enzima-sustrato del ATP de ERC1. **(b)** Interacciones enzima-sustrato del ATP ERC-C2. **(c)** Interacciones enzima-sustrato del FMN ERC-C1. **(d)** Interacciones enzima sustrato del FMN ERC-C2.

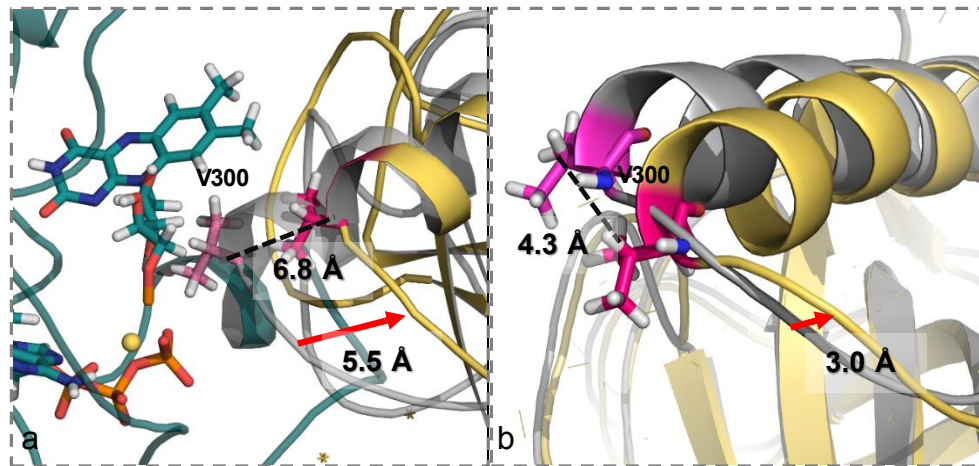
En la estructura ERC-C1, el FMN-ME pierde 3 de los 4 puentes de hidrógeno formados en el acoplamiento del FMN en el complejo ATP/Mg<sup>2+</sup>/FMN-módulo FMNAT+RFK. También pierde el puente de hidrógeno con V300/N del módulo RFK, esto muestra que la interacción del módulo RFK con el FMN se realiza por contactos hidrofóbicos. Por otro lado, se forman dos nuevos puentes de hidrógeno, G129/N-FMN/O4 y H57/NE2-FMN/O2p (Figura 16c), el primero indica que el triple anillo de

isoaloxazina se mantiene estable dentro del sitio de unión y el segundo proporciona estabilidad al fosfato del FMN.

En la estructura ERC-C2, las interacciones polares del ATP no cambian respecto a las del ATP de ERC-C1 (Figura 16b). Respecto al FMN en la estructura ERC-C2 se puede observar que se pierde el puente de hidrógeno G129/N-FMN/O4; sin embargo, se forma un puente de hidrógeno con Y106 (Y106/O-FMN/N3), el cual actúa también estabilizando la isoaloxazina del FMN dentro del sitio activo. Teniendo en cuenta ambas estructuras, ERC-C1 y ERC-C2, G129 y Y106, estabilizan la isoaloxazina del FMN con puentes de hidrógeno que fluctúan durante la DM. La estructura ERC-C2 además evidencia que posterior a los 4000 ps, T127 se mantiene próximo al ribitol realizando contactos hidrofóbicos, y N125 forma un puente de hidrógeno con el ribitol (N125/OD1-FMN/O4'), residuo más cercano al sitio de unión del ATP que puede actuar estabilizando y acercando el fosfato del FMN al fosfato- $\alpha$  del ATP.

En la figura 12 se observa que el RMSD global aumenta hasta los 5 Å, a diferencia del RMSD para cada módulo, RFK y FMNAT, los cuales no superan los 2 Å. En la Figura 17 se muestra la superposición estructural de ERC-C2 con la estructura de partida (Figura 17a) y la superposición estructural de solo el módulo RFK de ERC-C2 (Figura 17b). Se observa que el movimiento de la V300 del módulo RFK respecto a la estructura de partida es 2.5 Å mayor cuando se superpone todo el sistema, a diferencia de cuando solo se superpone el módulo RFK de la configuración cabeza-cola. Además, se observa que los cambios más considerables se encuentran en los bucles (Figura 17). Este resultado evidencia que el aumento del RMSD global (Figura 12), no ocurre porque los sustratos provoquen cambios en la estructura de los módulos FMNAT y RFK, sino que ocurre porque la superposición de ambos módulos aumenta el RMSD principalmente en los bucles.

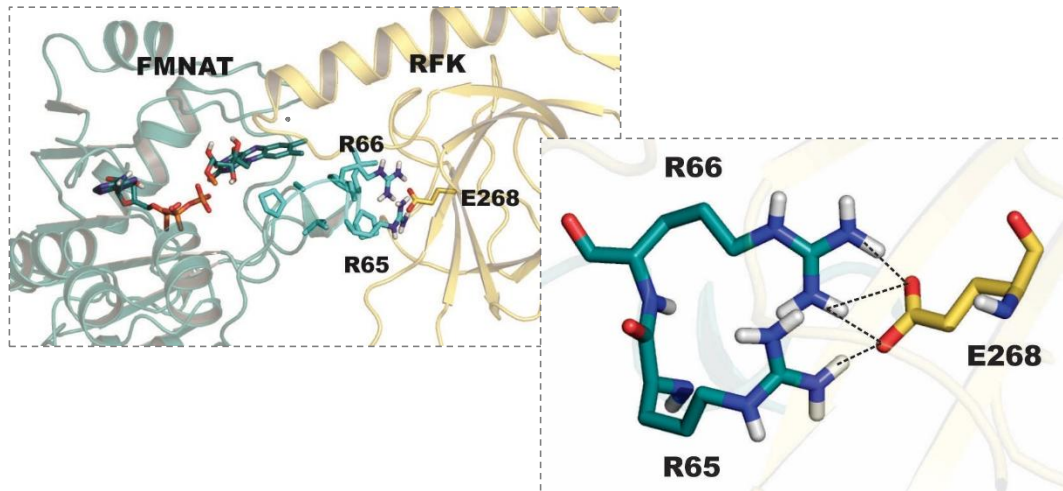
**Figura 17. Superposición del módulo RFK de la estructura ERC-C2 con la estructura de partida de la DM.**



**(a)** Superposición estructural de la estructura ERC-C2 con la estructura de partida. En palos rosa desplazamiento de la V300 del módulo RFK de ERC-C2. La flecha roja indica desplazamiento un bucle del módulo RFK **(b)** Superposición estructural del módulo RFK de la estructura ERC-C2 con la estructura de partida. En palos rosa desplazamiento de la V300 del módulo RFK de ERC-C2. La flecha roja indica desplazamiento un bucle del módulo RFK.

El módulo RFK se mantuvo estable durante la DM, unido al módulo FMNAT por los puentes salinos realizados entre R65, R66 con E268 (R65/NH1-E268/OE2, y R66/NH1-E268/OE2 y R66/NH2-E268/OE2) (Figura 18).

**Figura 18. Estabilización de la configuración cabeza-cola por puentes salinos entre los módulos FMNAT y RFK.**



Se muestra ampliación de los residuos implicados en la estabilización de la configuración cabeza-cola.

## 4. DISCUSIÓN

Estudios previos han propuesto un complejo enzima-sustrato para el módulo FMNAT de la FADS de *Corynebacterium ammoniagenes* (CaFADS). Sin embargo, estos estudios se han realizado haciendo solo superposición entre la estructura cristalográfica del módulo FMNAT y enzimas homologas a la CaFADS con el complejo enzima-sustrato [11]–[13], [17], [23]. En el presente estudio, presentamos dos modelos del complejo enzima-sustrato para el módulo FMNAT de la CaFADS: el primero para el módulo FMNAT y el segundo para el módulo FMNAT+RFK en la configuración cabeza-cola de la CaFADS, es importante aclarar que esta configuración oligomérica la adopta la enzima in vitro [21].

### 4.1. ACOPLAMIENTO MOLECULAR DEL ATP, $Mg^{2+}$ Y FMN EN EL MÓDULO FMNAT Y EN EL MÓDULO FMNAT+RFK

El acoplamiento del ATP en el módulo FMNAT presentó puentes de hidrógeno con I162, L155, G123 y S164 (Anexo D). Estos residuos pertenecen a dominios proteicos conservados en enzimas FAD sintetasa y NMN adenilil transferasa de procariontas, y además están implicados en la estabilización del ATP [12], [22], [23]. Interacciones hidrofóbicas reportadas en estudios de superposición estructural para determinar el modo de unión de los sustratos del módulo FMNAT, también fueron obtenidas en nuestros resultados, F24, G30 y L34 (Figura 1) [9], [16], [24].

Estudios sobre la cinética enzimática de la actividad de la CaFADS y NMN adenilil transferasas han demostrado que estas enzimas no muestran actividad catalítica en ausencia de  $Mg^{2+}$ . Así mismo, se ha determinado que el ATP y el  $Mg^{2+}$  se acoplan simultáneamente al módulo FMNAT en un complejo ATP/ $Mg^{2+}$  preformado [7]. Sin embargo, en este estudio para predecir el acoplamiento del  $Mg^{2+}$  se seleccionó previamente un complejo ATP-módulo FMNAT y en esta configuración del ATP se acopló el  $Mg^{2+}$  en los fosfatos del ATP. Se encontró que el  $Mg^{2+}$  se acopla en los

fosfatos  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , y no interacciona con ningún residuo del módulo FMNAT (Figura 2a). Un complejo similar entre el ATP y el  $Mg^{2+}$  ha sido reportado en la estructura cristalográfica del complejo enzima-sustrato del módulo RFK en [22].

El acoplamiento del FMN en el módulo FMNAT mostró dos poses favorables, el FMN con los metilos apuntando hacia el exterior del sitio de unión (FMN-ME) y el FMN con los metilos apuntando hacia el interior del sitio de unión (FMN/MI). S. Frago y colaboradores (2009) y B. Herguedas y colaboradores (2010), han propuestos estas dos conformaciones del FMN [17], [23]. Sin embargo, nuestros resultados obtenidos en el acoplamiento del FMN en el módulo FMNAT+RFK en configuración cabeza-cola, mostró favorable solo la configuración FMN-ME (Tabla 4). La configuración cabeza-cola reduce el espacio en el sitio de unión del FMN, provocando un aumento en la energía libre de unión en el acoplamiento del FMN. En el caso del FMN-MI los valores de afinidad para la configuración cabeza-cola son positivos, siendo esta pose improbable; mientras que el FMN-ME se acopla con valores negativos. Así, para la selección del complejo ATP/ $Mg^{2+}$ /FMN-módulo FMNAT y ATP/ $Mg^{2+}$ /FMN-módulo FMNAT+RFK se tuvo en cuenta solo la configuración FMN-ME, con menor energía libre de unión y menor distancia entre el fósforo- $\alpha$  del ATP y fósforo del FMN. El acoplamiento del FMN-ME en el módulo FMNAT y en módulo FMNAT+RFK es similar, la estabilización del triple anillo de isoaloxazina se realiza por un puente de hidrógeno: G129 en el módulo FMNAT y Y106 en el caso de la configuración cabeza-cola (Anexo D y E). Estos puentes de hidrógeno con el triple anillo de isoaloxazina no se habían reportado en estudios previos. No obstante, el triple anillo de isoaloxazina es estabilizado principalmente por interacciones aril e hidrofóbicas con los residuos P58, F62, F94 (Figura 4). Resultados similares fueron obtenidos por S. Frago y colaboradores (2008) y B. Herguedas y colaboradores (2010) [13], [17].

La orientación del fosfato del FMN hacia el fosfato- $\alpha$  del ATP requirió de la estabilización del grupo ribitol y del fosfato del FMN. T127 realizó la función de

estabilizar el ribitol formando cuatro puentes de hidrógeno (Anexo D y E). Mientras que el  $Mg^{2+}$  por interacciones electrostáticas estabilizó el fosfato del FMN. El rol de T127 y  $Mg^{2+}$  en la estabilización del ribitol y fosfato del FMN respectivamente, no se había reportado anteriormente. En la configuración cabeza-cola el sitio de unión del FMN es cerrado por la interacción con el módulo RFK, contribuyendo a la estabilización del FMN con un puente de hidrógeno con V300 e interacciones hidrofóbicas con S296 y E301 (Figura 4b y 4c), (Anexo E). Esto evidencia que si bien la configuración cabeza-cola es importante para que el FMN sintetizado en el módulo RFK pase al módulo FMNAT; el módulo RFK también influencia el modo de unión del FMN, y además contribuye a la estabilización del FMN [17]. Estos hallazgos no se habían reportado en estudios previos.

#### **4.2. DINÁMICA MOLECULAR DEL ATP EN LOS COMPLEJOS ATP/ $Mg^{2+}$ /FMN-MÓDULO FMNAT Y ATP/ $Mg^{2+}$ /FMN-MÓDULO FMNAT+RFK**

El acoplamiento del ATP se mostró estable en DM, esto se debe principalmente a los puentes de hidrógeno formados entre los grupos adenina y fosfatos con los residuos I162, L155, R168 y S164 (Anexo D). Estos residuos pertenecen a motivos estructurales conservados en las FADs de procariontes [9], [16], [24]. La adenina del ATP presenta interacciones hidrofóbicas con H28, H31, G123 y L155 (Figura 16). La ribosa del ATP es estabilizada por interacciones con los residuos I21, G30, L34; adicionalmente, G123 y N125 formaron puentes de hidrógeno en la DM. Este resultado confirma el rol de la región G123-N125, propuesta como zona de estabilización de la ribosa en las FADs procariontes (Anexo D) [9]. La estabilización de los fosfatos del ATP en el módulo FMNAT no cambió durante la DM, los puentes de hidrógeno formados por los residuos S164 y R168 en el fosfato  $\beta$  y  $\gamma$  respectivamente, se mantuvieron estables (Figura 1) (Anexo D).

Resulta interesante que durante la DM del acoplamiento del ATP en la configuración cabeza-cola, se evidenció que el módulo RFK induce que los fosfatos del ATP se desplacen hacia dentro del sitio de unión. Este movimiento provocó la ruptura del puente de hidrógeno entre R168 y el fosfato- $\gamma$  del ATP; no obstante, se mantuvo el puente de hidrógeno entre S164 y el fosfato- $\beta$  del ATP durante la DM (Anexo E). Así, S164 se encontró como un residuo importante para la estabilización de los fosfatos del ATP. Este resultado corrobora la importancia de S164, el cual al ser mutado no ocurre la adenililación del FMN [16]. Por otro lado, el desplazamiento de los fosfatos del ATP hacia el interior del sitio activo, favorece la formación de puentes de hidrógeno entre F24, H31 y el fosfato- $\alpha$  del ATP, los cuales están presentes en la estructura representativa de la DM (Figura 16a y 16b) (Anexo E). Los puentes de hidrógeno formados entre F24 y H31 podrían tener un papel fundamental en la catálisis de la enzima, debido a que la ruptura del ATP se realiza entre el fósforo- $\alpha$  y el oxígeno que conecta a este con el fósforo  $\beta$  [37]. Estos resultados son consistentes con estudios que han encontrado que una mutación de la H31 por una asparagina, elimina la actividad enzimática [16], [8]. Por otro lado, en estudios previos H28 había sido propuesto como residuo para la estabilización de los fosfatos del ATP por puentes de hidrógeno [16]. Sin embargo, nuestros resultados indican que el anillo imidazol de este residuo realiza un contacto hidrofóbico con la adenina del ATP. Además, se encontró que H28 orienta la cadena lateral de la H31 hacia los fosfatos del ATP, a través de un apilamiento  $\pi$  entre ambos anillos imidazol, favoreciendo la formación de puentes de hidrógeno (Anexo L). Estos resultados ponen en evidencia el efecto del módulo RFK en configuración cabeza-cola sobre el acoplamiento del ATP en el módulo FMNAT; el cual induce la formación de puentes de hidrógeno que pueden ser fundamentales para que ocurra la catálisis enzimática.

#### **4.3. DINÁMICA MOLECULAR DEL FMN EN LOS COMPLEJOS ATP/MG<sup>2+</sup>/FMN-MÓDULO FMNAT Y ATP/MG<sup>2+</sup>/FMN-MÓDULO FMNAT+RFK**

El FMN-ME en el módulo FMNAT es acoplado principalmente por interacciones hidrofóbicas en ambas dinámicas moleculares (módulo FMNAT y la configuración cabeza-cola). En ambas DM se encontró que T127 por medio de puentes de hidrógeno estabiliza el grupo ribitol, sin embargo, estos puentes de hidrógeno fluctúan a largo de la DM y se sustituyen por el puente de hidrógeno formado entre N125 y ribitol. La cadena lateral de N125 simultáneamente realiza un puente de hidrógeno con la ribosa del ATP (Figura 9) (Anexo D y E). Estos dos puentes de hidrógeno podrían funcionar como un puente que aproximaría los fosfatos reaccionantes en ambos sustratos durante la catálisis. Estudios previos solo habían reportado a N125 estableciendo puentes de hidrógeno con el ATP [13], [17], [23]. Por otro lado, la isoaloxazina del FMN-ME en el módulo FMNAT, se desplazó hacia el exterior del sitio activo durante la DM, hecho que causó que se rompieran interacciones polares con la isoaloxazina dentro del sitio de unión (Anexo D). En contraste, en la configuración cabeza-cola, el triple anillo de isoaloxazina permanece durante toda la DM en el interior del sitio de unión, estabilizada por puentes de hidrógeno con Y106 y G129 (Anexo E). El módulo RFK mostró contribuir a la estabilización del FMN, a pesar que en el último ns se disociaron los contactos hidrofóbicos entre el FMN y el módulo RFK. Una DM molecular más larga permitiría observar si bajo estas circunstancias el triple anillo de isoaloxazina permanece dentro del sitio activo. El fosfato del FMN fue direccionado y estabilizado durante toda la DM molecular por el  $Mg^{2+}$ , en el módulo FMNAT. En la configuración cabeza-cola se encontró el mismo resultado, además de la formación de un puente de hidrógeno entre H57 y el fosfato del FMN, el cual aporta mayor estabilidad al acoplamiento (Anexo E).

Los complejos enzima-sustrato para ambos modelos se mantuvieron estables durante los 5 ns de DM. Aunque el RMSD global de la configuración cabeza-cola aumentó hasta cerca de los 5 Å, la estabilidad de esta estructura no se mostró afectada (Figura 5 y 12). La estabilización de la configuración cabeza-cola por un puente salino entre el residuo R66 y E268 es consistente con los resultados

obtenidos en [29]. Sin embargo, nosotros encontramos que R65 a través de un puente salino con E268 también es responsable de esta estabilización, que finalmente tiene efecto en la formación y estabilidad del hexámero (Figura 18) [16].

## 5. CONCLUSIONES

- Nuestro estudio entrega dos modelos de interacción enzima-sustrato: uno para el módulo FMNAT y otro para el módulo FMNAT+RFK en configuración cabeza-cola de la CaFADS. En los dos modelos propuestos, el ATP se estabiliza principalmente por puentes de hidrógeno con los residuos N125, L155, I162 y S164, y el FMN por puentes de hidrógeno con los residuos Y106, G129, T127 y N125.
- En todos los complejos enzima-sustrato propuestos, el  $Mg^{2+}$  estabiliza por interacciones electrostáticas los fosfatos del ATP y FMN, favoreciendo que se aproximen los fosfatos involucrados en la reacción.
- Los residuos T127 y N125 y el ión  $Mg^{2+}$  facilitan la aproximación del grupo fosfato- $\alpha$  del ATP y el grupo fosfato del FMN.
- La configuración cabeza-cola favorece la formación de puentes de hidrógeno entre H31, F24 y el fosfato- $\alpha$  del ATP; los cuales pueden ser relevantes en la catálisis enzimática.
- La configuración cabeza cola contribuye a la correcta orientación del FMN en el sitio activo del módulo FMNAT de CaFADS.
- La configuración cabeza-cola de la CaFADS es estabilizada por los puentes salinos realizados entre R65 y R66 con E208.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] S. O. Mansoorabadi, C. J. Thibodeaux, and H. Liu, "The diverse roles of flavin coenzymes--nature's most versatile thespians.," *J. Org. Chem.*, vol. 72, no. 17, pp. 6329–6342, 2007.
- [2] M. Fischer and A. Bacher, "Biosynthesis of flavocoenzymes.," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 22, no. 3, pp. 324–350, 2005.
- [3] M. Barile, C. Brizio, D. Valenti, C. De Virgilio, and S. Passarella, "The riboflavin/FAD cycle in rat liver mitochondria.," *Eur. J. Biochem.*, vol. 267, no. 15, pp. 4888–4900, 2000.
- [4] T. J. Belinda, "Significance of Riboflavin ( Vitamin-B2 ) for Health," vol. 6, no. 8, pp. 285–287, 2014.
- [5] V. Bafunno, T. A. Giancaspero, C. Brizio, D. Bufano, S. Passarella, E. Boles, and M. Barile, "Riboflavin uptake and FAD synthesis in *saccharomyces cerevisiae* mitochondria. Involvement of the flx1p carrier in fad export," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 1, pp. 95–102, 2004.
- [6] M. Barile, C. Brizio, D. Valenti, C. De Virgilio, S. Passarella, A. Krupa, K. Sandhya, N. Srinivasan, S. Jonnalagadda, M. Fischer, A. Bacher, W. Wang, R. Kim, H. Yokota, S. H. Kim, C. Brizio, M. Galluccio, R. Wait, E. M. Torchetti, V. Bafunno, R. Accardi, E. Gianazza, C. Indiveri, and M. Barile, "A conserved domain in prokaryotic bifunctional FAD synthetases can potentially catalyze nucleotide transfer," *Proteins Struct. Funct. Genet.*, vol. 344, no. 3, pp. 324–350, 2005.

- [7] I. Efimov, V. Kuusk, X. Zhang, and W. S. McIntire, "Proposed steady-state kinetic mechanism for *Corynebacterium ammoniagenes* FAD synthetase produced by *Escherichia coli*," *Biochemistry*, vol. 37, no. 27, pp. 9716–9723, 1998.
- [8] C. Huerta, D. Borek, M. Machius, N. V. Grishin, and H. Zhang, "Structure and Mechanism of a Eukaryotic FMN Adenylyltransferase," *J. Mol. Biol.*, vol. 389, no. 2, pp. 388–400, 2009.
- [9] D. J. Manstein and E. F. Pai, "Purification and characterization of FAD synthetase from *Brevibacterium ammoniagenes*," *J. Biol. Chem.*, vol. 261, no. 34, pp. 16169–16173, 1986.
- [10] M. Galluccio, C. Brizio, E. M. Torchetti, P. Ferranti, E. Gianazza, C. Indiveri, and M. Barile, "Over-expression in *Escherichia coli*, purification and characterization of isoform 2 of human FAD synthetase," *Protein Expr. Purif.*, vol. 52, no. 1, pp. 175–181, 2007.
- [11] A. Krupa, K. Sandhya, N. Srinivasan, and S. Jonnalagadda, "A conserved domain in prokaryotic bifunctional FAD synthetases can potentially catalyze nucleotide transfer," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 28, no. 1, pp. 9–12, 2003.
- [12] L. Schubert, S. Frago, M. Martínez-Júlvez, and M. Medina, "Sequence and Phylogenetic Analysis of FAD Synthetase," in *AIP Conference Proceedings*, 2006, vol. 851, no. 1, pp. 180–184.
- [13] S. Frago, M. Martínez-Júlvez, A. Serrano, and M. Medina, "Structural analysis of FAD synthetase from *Corynebacterium ammoniagenes*," *BMC Microbiol.*, vol. 8, p. 160, 2008.

- [14] S. Karthikeyan, Q. Zhou, F. Mseeh, N. V. Grishin, A. L. Osterman, and H. Zhang, "Crystal Structure of Human Riboflavin Kinase Reveals a  $\beta$  Barrel Fold and a Novel Active Site Arch," *Structure*, vol. 11, no. 3, pp. 265–273, 2003.
- [15] S. Bauer, K. Kemter, A. Bacher, R. Huber, M. Fischer, and S. Steinbacher, "Crystal structure of *Schizosaccharomyces pombe* riboflavin kinase reveals a novel ATP and riboflavin-binding fold," *J. Mol. Biol.*, vol. 326, no. 5, pp. 1463–1473, 2003.
- [16] A. Serrano, M. Sebastián, S. Arilla-Luna, S. Baquedano, M. C. Pallarés, A. Lostao, B. Herguedas, A. Velázquez-Campoy, M. Martínez-Júlvez, and M. Medina, "Quaternary organization in a bifunctional prokaryotic FAD synthetase: Involvement of an arginine at its adenylyltransferase module on the riboflavin kinase activity," *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1854, no. 8, pp. 897–906, 2015.
- [17] B. Herguedas, M. Martínez-Júlvez, S. Frago, M. Medina, and J. a. Hermoso, "Oligomeric State in the Crystal Structure of Modular FAD Synthetase Provides Insights into Its Sequential Catalysis in Prokaryotes," *J. Mol. Biol.*, vol. 400, no. 2, pp. 218–230, 2010.
- [18] A. Serrano, P. Ferreira, M. Martínez-Júlvez, and M. Medina, "The prokaryotic FAD synthetase family: a potential drug target.," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 19, no. 14, pp. 2637–48, 2013.
- [19] "Infectio Asociación Colombiana de Infectología Recomendaciones para el diagnóstico , tratamiento y prevención de la neumonía adquirida en la comunidad en adultos Recommendations for diagnosis , treatment and prevention of community-acquired pneumonia in i," *Infectio*, vol. 17, no. Supl

1, pp. 1–38, 2013.

- [20] Ministerio Protección Social, Instituto Nacional de Salud, and Organización Panamericana de la Salud, “Plan Estratégico Colombia Libre de Tuberculosis 2010-2015 Para la Expansión y Fortalecimiento de la Estrategia Alto a la TB,” Jan. 2009.
- [21] C. Marcuello, S. Arilla-Luna, M. Medina, and A. Lostao, “Detection of a quaternary organization into dimer of trimers of *Corynebacterium ammoniagenes* FAD synthetase at the single-molecule level and at the in cell level,” *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1834, no. 3, pp. 665–676, 2013.
- [22] J. A. Hermoso, B. Herguedas, M. Medina, I. Lans, M. Sebastián, J. A. Hermoso, M. Martínez-Júlvez, and M. Medina, “Structural insights into the synthesis of FMN in prokaryotic organisms research papers,” *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 71, pp. 2526–2542, 2015.
- [23] S. Frago, A. Velázquez-Campoy, and M. Medina, “The puzzle of ligand binding to *corynebacterium ammoniagenes* FAD synthetase,” *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 11, pp. 6610–6619, 2009.
- [24] A. R. Leach, “Molecular modelling : principles and applications,” Second Edi., vol. 21, no. 3, Pergamon, 2001, p. 784.
- [25] J. R. Perilla, B. C. Goh, C. K. Cassidy, B. Liu, R. C. Bernardi, T. Rudack, H. Yu, Z. Wu, and K. Schulten, “Molecular dynamics simulations of large macromolecular complexes,” *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 31, pp. 64–74, Apr. 2015.

- [26] D. C. C. Rapaport, "The Art of Molecular Dynamics Simulation," Second Edi., vol. 2, Cambridge University, 2004, p. 549.
- [27] J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, and D. A. Case, "Development and testing of a general amber force field.," *J. Comput. Chem.*, vol. 25, no. 9, pp. 1157–74, Jul. 2004.
- [28] M. A. E. van Gunsteren WF Daura X, "G{ROMOS} force field," *Encycl. Comput Chem*, vol. 2, pp. 1211–1216, 1998.
- [29] K. Vanommeslaeghe, E. Hatcher, C. Acharya, S. Kundu, S. Zhong, J. Shim, E. Darian, O. Guvench, P. Lopes, I. Vorobyov, and A. D. Mackerell, "CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields," *J. Comput. Chem.*, vol. 31, no. 4, pp. 671–690, 2010.
- [30] D. N. Nanda and K. Jug, "SINDO1. A semiempirical SCF MO method for molecular binding energy and geometry I. Approximations and parametrization," *Theor. Chim. Acta*, vol. 57, no. 2, pp. 95–106, 1980.
- [31] X.-Y. Meng, H.-X. Zhang, M. Mezei, and M. Cui, "Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery.," *Curr. Comput. Aided. Drug Des.*, vol. 7, no. 2, pp. 146–157, 2011.
- [32] C. Steffen, K. Thomas, U. Huniar, A. Hellweg, O. Rubner, and A. Schroer, "A Semiempirical Free Energy Force Field with Charge-Based desolvation," *J. Comput. Chem.*, vol. 31, no. 16, pp. 2967–2970, 2010.
- [33] T. J. Dolinsky, J. E. Nielsen, J. A. McCammon, and N. A. Baker, "PDB2PQR:

An automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations," *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, no. WEB SERVER ISS., 2004.

- [34] J. GASTEIGER and M. MARSILI, "New Model for Calculating Atomic Charges in Molecules," *TETRAHEDRON Lett.*, no. 34, pp. 3181–3184, 1978.
- [35] G. A. Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., ... & Petersson, "GAUSSIAN09," *Gaussian, Inc., Wallingford, CT, USA*. 2009.
- [36] G. Morris and R. Huey, "AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility," *J. ....*, vol. 30, no. 16, pp. 2785–2791, 2009.
- [37] S. Nakagawa, T. Hagihara, T. Fujio, and K. Aisaka, "Corynebacterium ammoniagenes," pp. 325–329, 1995.
- [38] V. Saridakis, D. Christendat, M. S. Kimber, A. Dharamsi, A. M. Edwards, and E. F. Pai, "Insights into Ligand Binding and Catalysis of a Central Step in NAD<sup>+</sup> Synthesis: STRUCTURES OF METHANOBACTERIUM THERMOAUTOTROPHICUMNMN ADENYLYLTRANSFERASE COMPLEXES," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 10, pp. 7225–7232, Mar. 2001.
- [39] I. D'Angelo, N. Raffaelli, V. Dabusti, T. Lorenzi, G. Magni, and M. Rizzi, "Structure of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase: a key enzyme in NAD(+) biosynthesis," *Structure*, vol. 8, no. 9, pp. 993–1004, 2000.
- [40] B. R. Brooks, R. E. Bruccoleri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan, and M. Karplus, "CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations," *J. Comput. Chem.*, vol. 4, no. 2, pp.

187–217, 1983.

- [41] C. Steffen, K. Thomas, U. Huniar, A. Hellweg, O. Rubner, and A. Schroer, “CHARMM: The Biomolecular Simulation Program,” *J. Comput. Chem.*, vol. 31, no. 16, pp. 2967–2970, 2010.
- [42] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, and J. R. Haak, “Molecular dynamics with coupling to an external bath,” *J. Chem. Phys.*, vol. 81, no. 8, pp. 3684–3690, Oct. 1984.
- [43] R. A. Laskowski and M. B. Swindells, “LigPlot+: Multiple Ligand–Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery,” *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 51, no. 10, pp. 2778–2786, Oct. 2011.
- [44] T. Izard, “The crystal structures of phosphopantetheine adenylyltransferase with bound substrates reveal the enzyme’s catalytic mechanism.,” *J. Mol. Biol.*, vol. 315, no. 4, pp. 487–495, 2002.
- [45] W. Delano, “The PyMOL Molecular Graphics System,” 2002.

## BIBLIOGRAFÍA

A. Krupa, K. Sandhya, N. Srinivasan, and S. Jonnalagadda, "A conserved domain in prokaryotic bifunctional FAD synthetases can potentially catalyze nucleotide transfer," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 28, no. 1, pp. 9–12, 2003.

A. Serrano, M. Sebastián, S. Arilla-Luna, S. Baquedano, M. C. Pallarés, A. Lostao, B. Herguedas, A. Velázquez-Campoy, M. Martínez-Júlvez, and M. Medina, "Quaternary organization in a bifunctional prokaryotic FAD synthetase: Involvement of an arginine at its adenylyltransferase module on the riboflavin kinase activity," *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1854, no. 8, pp. 897–906, 2015.

A. Serrano, P. Ferreira, M. Martínez-Júlvez, and M. Medina, "The prokaryotic FAD synthetase family: a potential drug target.," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 19, no. 14, pp. 2637–48, 2013.

B. Herguedas, M. Martínez-Júlvez, S. Frago, M. Medina, and J. a. Hermoso, "Oligomeric State in the Crystal Structure of Modular FAD Synthetase Provides Insights into Its Sequential Catalysis in Prokaryotes," *J. Mol. Biol.*, vol. 400, no. 2, pp. 218–230, 2010.

C. Huerta, D. Borek, M. Machius, N. V. Grishin, and H. Zhang, "Structure and Mechanism of a Eukaryotic FMN Adenylyltransferase," *J. Mol. Biol.*, vol. 389, no. 2, pp. 388–400, 2009.

C. Marcuello, S. Arilla-Luna, M. Medina, and A. Lostao, "Detection of a quaternary organization into dimer of trimers of *Corynebacterium ammoniagenes* FAD synthetase at the single-molecule level and at the in cell level," *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1834, no. 3, pp. 665–676, 2013.

I. Efimov, V. Kuusk, X. Zhang, and W. S. McIntire, "Proposed steady-state kinetic mechanism for *Corynebacterium ammoniagenes* FAD synthetase produced by *Escherichia coli*," *Biochemistry*, vol. 37, no. 27, pp. 9716–9723, 1998.

J. A. Hermoso, B. Herguedas, M. Medina, I. Lans, M. Sebastián, J. A. Hermoso, M. Martínez-Júlvez, and M. Medina, "Structural insights into the synthesis of FMN in prokaryotic organisms research papers," *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 71, pp. 2526–2542, 2015.

M. Fischer and A. Bacher, "Biosynthesis of flavocoenzymes.," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 22, no. 3, pp. 324–350, 2005.

M. Barile, C. Brizio, D. Valenti, C. De Virgilio, S. Passarella, A. Krupa, K. Sandhya, N. Srinivasan, S. Jonnalagadda, M. Fischer, A. Bacher, W. Wang, R. Kim, H. Yokota, S. H. Kim, C. Brizio, M. Galluccio, R. Wait, E. M. Torchetti, V. Bafunno, R. Accardi, E. Gianazza, C. Indiveri, and M. Barile, "A conserved domain in prokaryotic bifunctional FAD synthetases can potentially catalyze nucleotide transfer," *Proteins Struct. Funct. Genet.*, vol. 344, no. 3, pp. 324–350, 2005.

S. Frago, A. Velázquez-Campoy, and M. Medina, "The puzzle of ligand binding to *corynebacterium ammoniagenes* FAD synthetase," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 11, pp. 6610–6619, 2009.

S. O. Mansoorabadi, C. J. Thibodeaux, and H. Liu, "The diverse roles of flavin coenzymes--nature's most versatile thespians.," *J. Org. Chem.*, vol. 72, no. 17, pp. 6329–6342, 2007.

T. Izard, "The crystal structures of phosphopantetheine adenylyltransferase with bound substrates reveal the enzyme's catalytic mechanism.," *J. Mol. Biol.*, vol. 315,

no. 4, pp. 487–495, 2002.

## ANEXOS

Anexo A. Resultado de los 100 acoplamiento del ATP en el módulo FMNAT.

<b>Agrupamiento</b>	<b>Sub-agrupamiento</b>	<b>Energía libre de unión [kcal/mol]</b>	<b>RMSD agrupamiento</b>
1	1	-11.05	0.00
1	2	-11.01	0.17
1	3	-11.00	0.17
1	4	-10.86	0.64
1	5	-10.71	1.48
1	6	-10.69	1.56
1	7	-10.64	1.66
1	8	-10.64	1.20
1	9	-10.57	1.21
1	10	-10.53	1.19
1	11	-10.52	1.20
1	12	-10.48	0.71
1	13	-10.47	1.00
1	14	-10.45	1.24
1	15	-10.40	1.54
1	16	-10.36	1.62
1	17	-10.32	1.71
1	18	-10.15	1.14

1	19	-10.09	1.57
1	20	-10.01	1.54
1	21	-9.97	1.03
1	22	-9.94	0.93
1	23	-9.94	0.89
1	24	-9.93	1.87
1	25	-9.92	0.88
1	26	-9.89	0.88
1	27	-9.87	1.07
1	28	-9.86	1.70
1	29	-9.72	1.55
1	30	-9.72	1.85
1	31	-9.71	1.15
1	32	-9.64	1.56
1	33	-9.63	1.23
1	34	-9.57	1.14
1	35	-9.56	1.20
1	36	-9.52	1.49
1	37	-9.45	1.53
1	38	-9.43	1.21
1	39	-9.43	1.28
1	40	-9.39	1.34
1	41	-9.39	1.72

1	42	-9.36	1.17
1	43	-9.26	1.39
1	44	-9.19	1.06
1	45	-9.19	1.05
1	46	-9.15	1.22
1	47	-9.13	1.40
1	48	-9.09	1.28
1	49	-9.02	1.40
1	50	-9.01	1.23
1	51	-9.01	1.71
1	52	-9.00	1.38
1	53	-9.00	1.46
1	54	-8.99	0.92
1	55	-8.93	1.16
1	56	-8.90	1.41
1	57	-8.77	1.41
1	58	-8.76	1.68
1	59	-8.60	1.11
1	60	-8.59	1.66
1	61	-8.58	1.56
1	62	-8.57	1.60
1	63	-8.57	1.06
1	64	-8.53	1.57

1	65	-8.48	1.38
1	66	-8.11	1.35
1	67	-7.69	1.30
1	68	-7.66	1.80
1	69	-7.57	1.71
1	70	-7.26	1.44
1	71	-6.88	1.91
2	1	-7.88	0.00
2	2	-7.88	1.60
2	3	-7.73	0.72
2	4	-7.43	1.12
2	5	-7.40	1.14
2	6	-7.14	1.68
2	7	-7.13	0.65
2	8	-6.30	1.58
2	9	-6.26	1.12
2	10	-6.13	1.52
3	1	-7.75	0.00
3	2	-7.48	0.91
4	1	-7.66	0.00
4	2	-7.32	1.63
4	3	-7.16	1.93
4	4	-6.65	1.43

5	1	-7.57	0.00
6	1	-7.49	0.00
6	2	-6.64	1.12
7	1	-7.35	0.00
7	2	-6.93	1.29
8	1	-7.25	0.00
9	1	-7.24	0.00
10	1	-6.89	0.00
11	1	-6.78	0.00
11	2	-5.61	1.87
12	1	-6.54	0.00
13	1	-6.51	0.00
14	1	-5.69	0.00

Anexo B. Resultado de los 100 acoplamientos del FMN en el módulo FMNAT.

<b>Agrupamiento</b>	<b>Sub-agrupamiento</b>	<b>Energía libre de unión [kcal/mol]</b>	<b>RMSD agrupamiento</b>
1	1	-8.62	0
1	2	-8.51	0.77
1	3	-8.43	0.72

1	4	-8.23	1.14
1	5	-8.2	1.53
1	6	-8.12	1.48
1	7	-8.12	0.82
1	8	-8.11	1.48
1	9	-8.04	1.48
1	10	-8.04	1.48
1	11	-7.97	0.75
1	12	-7.95	1.5
1	13	-7.94	1.53
1	14	-7.9	1.04
1	15	-7.9	1.46
1	16	-7.89	1.49
1	17	-7.88	0.94
1	18	-7.86	1.42
1	19	-7.81	1.2
1	20	-7.79	1.43
1	21	-7.79	1.47
1	22	-7.78	1.53
1	23	-7.77	1
1	24	-7.75	1.58
1	25	-7.74	1.55
1	26	-7.72	1.57
1	27	-7.71	1.43

1	28	-7.7	1.03
1	29	-7.69	1.59
1	30	-7.69	1.48
1	31	-7.69	1.49
1	32	-7.68	1.44
1	33	-7.66	1
1	34	-7.66	1.31
1	35	-7.64	0.9
1	36	-7.63	0.94
1	37	-7.63	1.02
1	38	-7.62	1.44
1	39	-7.62	1
1	40	-7.61	1.4
1	41	-7.6	1.33
1	42	-7.58	1.38
1	43	-7.57	0.93
1	44	-7.57	1.04
1	45	-7.57	1.07
1	46	-7.54	1.42
1	47	-7.54	0.98
1	48	-7.53	1.03
1	49	-7.51	0.96
1	50	-7.49	1.55
1	51	-7.49	1.56

1	52	-7.42	0.96
1	53	-7.39	1.06
1	54	-7.35	1.41
1	55	-7.32	0.96
1	56	-7.3	1.51
1	57	-7.29	1.51
1	58	-7.23	0.92
1	59	-7.23	1.4
1	60	-7.2	1.42
1	61	-7.12	0.96
1	62	-7.02	1.46
1	63	-6.91	0.96
1	64	-6.61	1.52
1	65	-6.6	1.62
2	1	-7.92	0
2	2	-7.91	0.4
2	3	-7.26	1.72
2	4	-7.2	1.92
2	5	-7.19	1.68
2	6	-7.18	1.16
2	7	-7.16	1.78
2	8	-7.16	1.27
2	9	-7.11	1.95
2	10	-6.94	1.87

2	11	-6.92	1.29
2	12	-6.79	1.55
2	13	-6.78	1.17
2	14	-6.76	1.49
2	15	-6.76	1.04
2	16	-6.67	1.36
2	17	-6.56	1.39
2	18	-6.4	1.62
2	19	-6.37	1.43
3	1	-7.13	0
3	2	-7.07	0.36
3	3	-7	0.56
4	1	-6.6	0
4	2	-6.59	1.44
4	3	-6.59	0.64
4	4	-6.54	0.44
4	5	-6.48	0.97
4	6	-6.38	1.56
4	7	-6.35	1.46
4	8	-6.32	1.54
4	9	-6.29	0.71
4	10	-6.12	0.97
4	11	-6.11	1.06
4	12	-6.07	1.2

5	1	-6.42	0
---	---	-------	---

Anexo C. Resultado de los 100 acoplamientos del FMN en el módulo FMNAT+RFK (cabeza-cola).

<b>Agrupamiento</b>	<b>Sub-agrupamiento</b>	<b>Energía libre de unión [kcal/mol]</b>	<b>RMSD agrupamiento</b>
1	1	-2.47	0
1	2	-2.45	0.08
1	3	-2.06	0.98
1	4	-1.76	1.39
1	5	-1.73	0.55
1	6	-1.48	0.7
1	7	-1.46	1.43
1	8	-1.41	1.46
1	9	-1.36	1.6
1	10	-1.33	0.71
1	11	-1.31	1.61
1	12	-1.3	1.38
1	13	-1.29	1.6
1	14	-1.27	1.6
1	15	-1.26	1.6
1	16	-1.26	1.59
1	17	-1.26	1.62

1	18	-1.2	1.59
1	19	-1.18	1.59
1	20	-1.15	1.58
1	21	-1.14	1.59
1	22	-1.13	1.57
1	23	-1.1	1.6
1	24	-1.07	1.61
1	25	-1.06	1.59
1	26	-1.02	1.58
1	27	-0.95	1.63
1	28	-0.88	0.93
1	29	-0.88	1.57
1	30	-0.88	0.94
1	31	-0.87	0.92
1	32	-0.87	1.57
1	33	-0.86	1.62
1	34	-0.85	0.92
1	35	-0.85	0.93
1	36	-0.84	0.95
1	37	-0.84	0.96
1	38	-0.84	0.96
1	39	-0.83	0.93
1	40	-0.83	1.58
1	41	-0.82	0.95
1	42	-0.82	0.94

1	43	-0.81	1.59
1	44	-0.81	1.58
1	45	-0.8	0.94
1	46	-0.8	0.95
1	47	-0.79	0.96
1	48	-0.78	0.93
1	49	-0.78	0.94
1	50	-0.77	0.95
1	51	-0.77	0.99
1	52	-0.76	0.98
1	53	-0.75	1.65
1	54	-0.74	0.92
1	55	-0.74	0.95
1	56	-0.73	0.92
1	57	-0.71	0.97
1	58	-0.71	0.96
1	59	-0.7	1.23
1	60	-0.69	0.96
1	61	-0.67	0.94
1	62	-0.38	1.06
1	63	-0.15	1.75
1	64	-0.1	1.71
1	65	0.96	1.69
2	1	-1.1	0
2	2	-0.69	0.38

3	1	-0.44	0
3	2	-0.35	0.52
3	3	0.01	0.82
3	4	0.06	0.58
3	5	0.06	0.82
3	6	0.28	0.96
3	7	0.85	1.82
3	8	0.99	1.87
4	1	-0.23	0
4	2	-0.14	1.41
4	3	-0.13	0.31
4	4	-0.11	1.45
4	5	-0.04	1.43
4	6	0	1.48
4	7	0.03	0.36
4	8	0.04	1.57
4	9	0.09	1.45
4	10	0.11	1.53
4	11	0.14	1.48
4	12	0.16	1.49
4	13	0.27	1.43
4	14	0.35	1.49
4	15	0.45	1.6
4	16	0.58	1.12
4	17	0.7	1.38

4	18	0.86	1.33
4	19	0.91	1.12
5	1	0.04	0
5	2	0.07	0.52
5	3	0.56	1.3
5	4	1.65	0.91
6	1	1.03	0
7	1	2.05	0

Anexo D. Puentes de hidrógeno en el módulo FMNAT independiente.

<b>Puentes de hidrógeno módulo FMNAT independiente</b>			
<b>Puentes de hidrógeno ATP</b>		<b>Puentes de hidrógeno FMN</b>	
Residuo y átomo	Grupo del ATP y átomo	Residuo y átomo	Grupo del FMN y átomo
L155/N	Adenina/N1	G129/N*	Isoaloxazina/O4*
I162/O	Adenina/N6	N125/OD1	Ribitol/O4'
S164/OG	Fosfato-β/O1	T127/OG1	Ribitol/O2'
G123/N	Ribosa/O2'	T127/OG1*	Ribitol/O4**
R168/NH1	Fosfato-γ/O3	T127/N*	Ribitol/O3**
R168/NH2	Fosfato-γ/O2	T127/O*	Ribitol/O3**
N124/ND2	Ribosa-Or3*	---	---

\*Puentes de hidrógeno que fluctúan en la DM

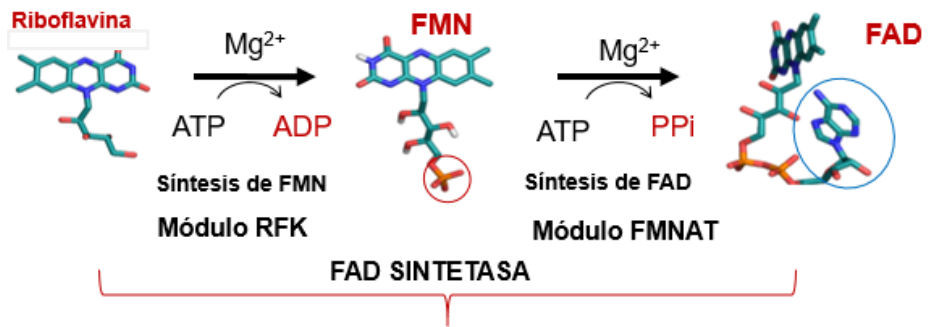
\*\*Puentes de hidrógeno que se rompen en la DM.

Anexo E. Puentes de hidrógeno en el módulo FMNAT+RFK.

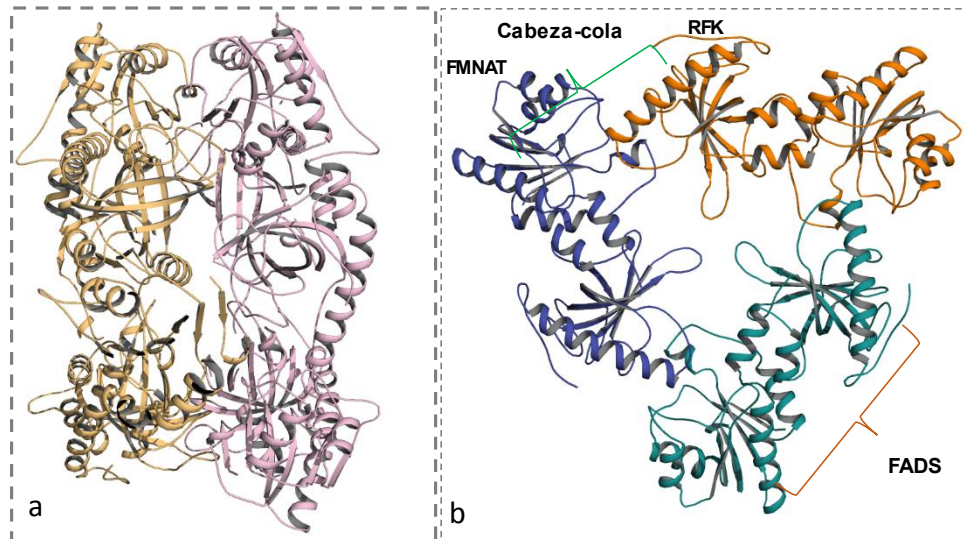
<b>Puentes de hidrógeno módulo FMNAT+RFK</b>			
<b>Puentes de hidrógeno ATP</b>		<b>Puentes de hidrógeno FMN</b>	
Residuo y átomo	Grupo del ATP y átomo	Residuo y átomo	Grupo del FMN y átomo
L155/N	Adenina/N1	Y106/O	Isoaloxazina/N3
I162/O	Adenina/N6	V300/N**	Fosfato/O3P**
S164/OG	Fosfato-β/O1β	T127/O	Ribitol/O2'
G123/N*	Ribosa/O2'*	T127/O*	Ribitol/O4'*
R168/NH1**	Fosfato-γ/O3**	T127OG1*	Ribitol/O4*
R168/NH2**	Fosfato-γ/O2**	T127/N*	Ribitol/O4*
F24/N*	Fosfato-α/O2α*	G129/N*	Isoaloxazina/O4*
H31/NE2*	Ribosa/O5*	H57/NE2*	Fosfato/O2p*
H31/NE2*	Ribosa/O4' *	N125/OD1*	Ribitol O4*

\*Puentes de hidrógeno que fluctúan en la DM.

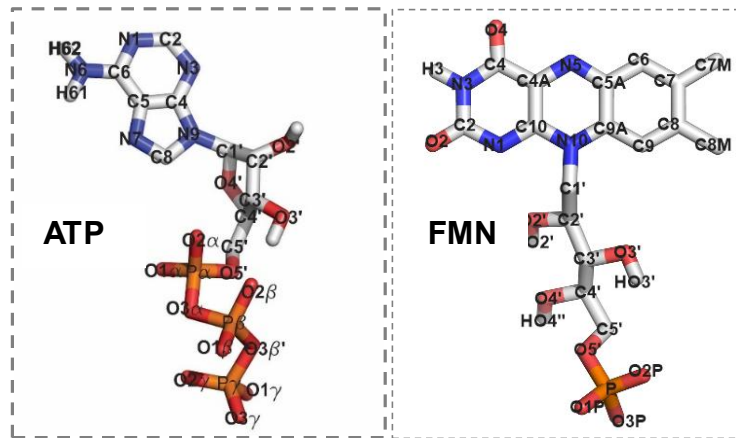
\*\*Puentes de hidrógeno que se rompen en la DM.



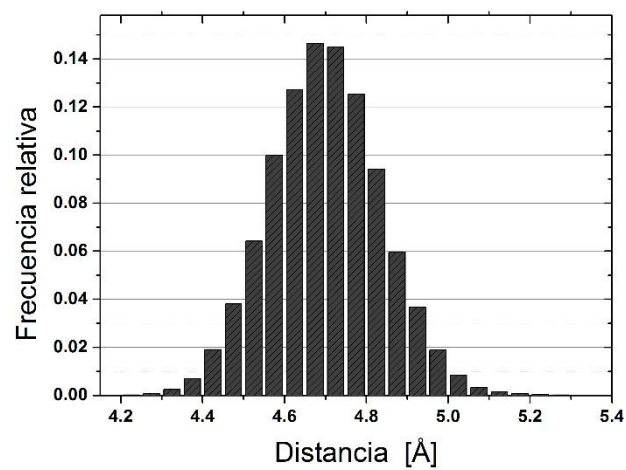
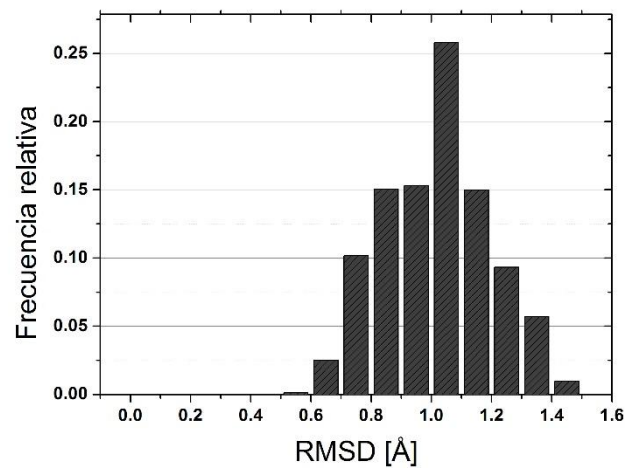
Anexo F. Reacciones que cataliza la FAD sintetasa procariota.



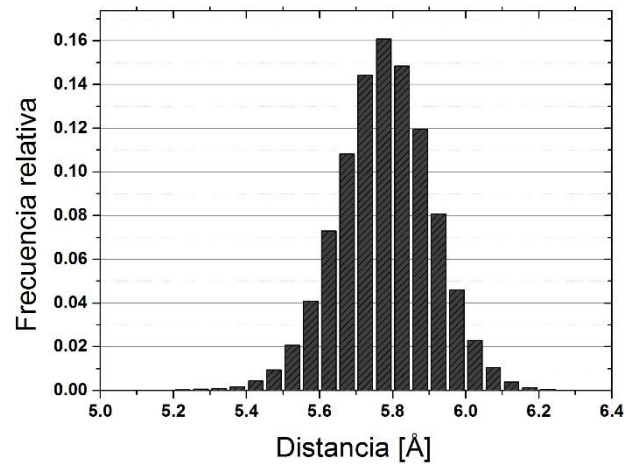
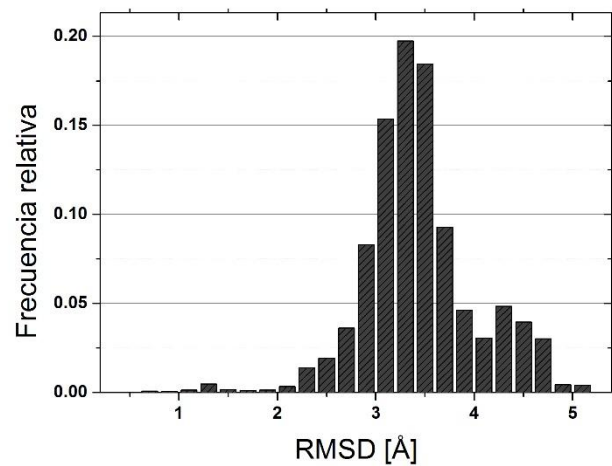
Anexo G. Vista estereoscópica del dímero de trímeros de la CaFADS. (a) Vista lateral del dímero de trímeros. (b) Vista frontal del trímero de la CaFADS.



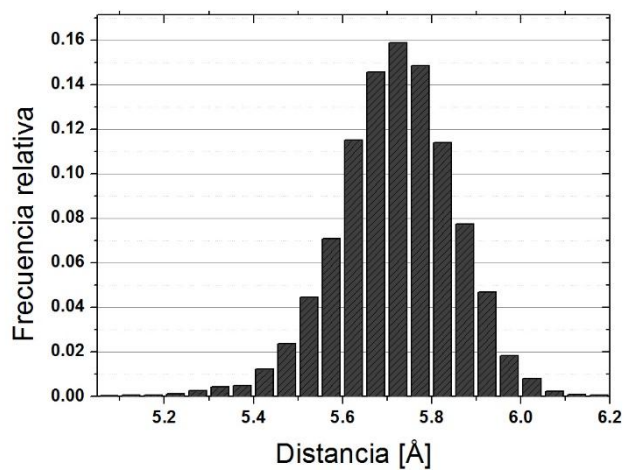
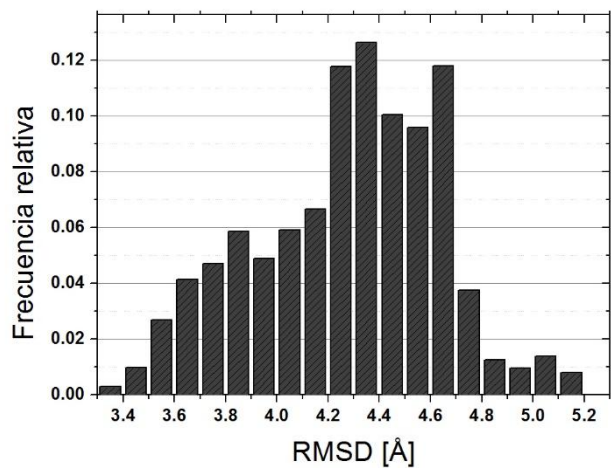
Anexo H. Nombre de los átomos de los sustratos del módulo FMNAT de *C. ammoniagenes*, ATP y FMN.



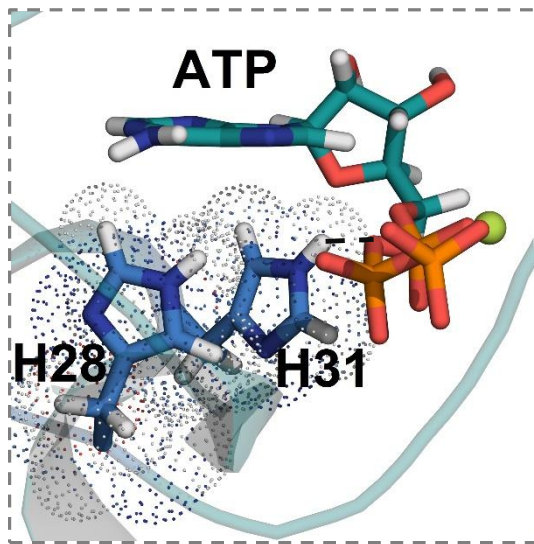
Anexo I. Frecuencia de conteo de las distancias elegidas para seleccionar la estructura representativa de la trayectoria de DM del complejo ATP/Mg<sup>2+</sup>/FMN-módulo FMNAT.



Anexo J. Frecuencia de conteo de las distancias elegidas para seleccionar la estructura representativa de la trayectoria completa de DM del complejo ATP/Mg<sup>2+</sup>/FMN-módulo FMNAT+RFK.



Anexo K. Frecuencia de conteo de las distancias elegidas para seleccionar la estructura representativa de la trayectoria entre los 4000 y 5000 ps de DM del complejo ATP/Mg<sup>2+</sup>/FMN-módulo FMNAT+RFK.



Anexo L. Apilamiento  $\pi$  entre los anillos imidazol de H28 y H31 en el acoplamiento del ATP en el módulo FMNAT configuración cabeza-cola. En línea punteada puente de hidrógeno H31 con el átomo O1 $\alpha$  del ATP.