

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Estudio computacional de los cambios estructurales de dos
mutaciones de la proteína Cereblon**

Andrés Sebastián Ayala Ruano

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Quito, 21 de Diciembre de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Estudio computacional de los cambios estructurales de dos mutaciones de
la proteína Cereblon**

Andrés Sebastián Ayala Ruano

Nombre del profesor, Título académico

Miguel Ángel Méndez, PhD

Quito, 21 de Diciembre de 2020

DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Nombres y apellidos: Andrés Sebastián Ayala Ruano

Código: 00131757

Cédula de identidad: 0401796149

Lugar y fecha: Quito, 21 de Diciembre de 2020

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

La proteína Cereblon (CRBN) es el receptor de los sustratos que se unen al complejo CRL4^{CRBN} E3 ubiquitina ligasa, cuya función es controlar la degradación selectiva de proteínas durante varios procesos celulares. Se han reportado varias mutaciones de CRBN asociadas con casos clínicos de discapacidad intelectual. Una de estas mutaciones se produjo por un cambio en la Arg419, lo que generó una versión truncada de la proteína (R419X); y otra mutación ocurrió por la sustitución del aminoácido Cys391 por Arg en el sitio de unión de CRBN al ZN (C391R). De momento, se conocen las causas genéticas y los efectos fenotípicos producidos por las mutaciones de CRBN, pero no hay información de los cambios estructurales que provocan estas mutaciones. Por tanto, en esta investigación se usaron simulaciones de química cuántica (QM) y dinámica molecular (DM) para estudiar los cambios que causan las mutaciones R419X y C391R en CRBN. De acuerdo a los resultados de los parámetros químicos de las simulaciones de QM, se observaron diferencias entre los complejos nativo y C391R en la carga, ángulos, ángulos diedros, y distancias de enlace de los átomos interactuantes de los dos sistemas, por lo que la mutación C391R podría afectar el sitio de unión de CRBN al ZN. Considerando los parámetros termodinámicos de las simulaciones de QM, se observó que manteniendo fijos los átomos de los residuos Cys326, Cys323 y Cys394 la reacción no sería favorable, pero dejando libres todos los átomos la reacción sí podría ocurrir. Respecto a los resultados de DM, las simulaciones cumplieron con los parámetros termodinámicos, y existieron diferencias en los parámetros conformacionales (RMSD, Rg y RMSF) entre el complejo nativo y los sistemas mutados. Los resultados obtenidos demostraron que las mutaciones de CRBN podrían afectar regiones de la proteína de unión a otros sustratos, y el hecho de que los sustratos no se degraden podría ser una de las causas de los desórdenes mentales en los pacientes con las mutaciones.

Palabras clave: CRBN, CRL4^{CRBN} E3 ubiquitina ligasa, C391R, R419X, discapacidad intelectual, Química cuántica, Dinámica molecular.

ABSTRACT

Cereblon protein (CRBN) is the receptor for substrates that bind to the CRL4^{CRBN} E3 ubiquitin ligase complex, whose function is to control the selective degradation of proteins during various cellular processes. Some CRBN mutations associated with clinical cases of intellectual disability have been reported. One of these mutations occurred due to a change in Arg419, which generated a truncated version of the protein (R419X); and another mutation was caused by the substitution of the amino acid Cys391 by Arg in the CRBN binding site to ZN (C391R). At the moment, the genetic causes and phenotypic effects produced by CRBN mutations are known, but there is no information on the structural changes that cause these mutations. Therefore, in this research quantum mechanics (QM) and molecular dynamics (MD) simulations were used to study the changes caused by R419X and C391R mutations in CRBN. According to the results of the chemical parameters of the QM simulations, differences were observed between the native and C391R complexes in charge, angles, dihedral angles, and bond distances of the interacting atoms of the two systems, therefore the C391R mutation could affect the CRBN binding site to ZN. Considering the thermodynamic parameters of the QM simulations, it was observed that keeping the atoms of the Cys326, Cys323 and Cys394 residues fixed, the reaction would not be favorable, but leaving all the atoms free, the reaction could occur. Regarding the MD results, the simulations complied with the thermodynamic parameters, and there were differences in the conformational parameters (RMSD, Rg, and RMSF) between the native complex and the mutated systems. The results obtained showed that CRBN mutations could affect regions of the protein that bind to other substrates, and the fact that the substrates are not degraded could be one of the causes of intellectual disability in patients with C391R and R419X mutations.

Key words: CRBN, CRL4^{CRBN} E3 ubiquitin ligase, C391R, R419X, intellectual disability, Quantum Mechanics, Molecular Dynamics

TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	10
MÉTODOS	15
1. Preprocesamiento de la estructura 3D de CRBN y obtención de los complejos WT, C391R y R419X.....	15
2. Simulación de QM	16
3. Simulación de DM	17
RESULTADOS.....	20
1. Preprocesamiento de la estructura 3D de CRBN y obtención de los complejos WT, C391R y R419X.....	20
2. Simulación de QM	21
2.1 Parámetros químicos	21
2.2 Parámetros termodinámicos	22
3. Simulación de DM	23
3.1 Propiedades termodinámicas	23
3.2 Propiedades conformacionales y de estabilidad	24
3.3 Propiedades estructurales.....	25
DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES	32
TABLAS	33
FIGURAS	36
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
ANEXOS	49
Anexo A: Distancias de enlaces de los átomos que participan en el pocket de interacción con ZN de 11 estructuras diferentes del CRBN disponibles en la base de datos RSCB PDB	49
Anexo B: Ángulos de enlaces de los átomos que participan en el pocket de interacción con ZN de 11 estructuras diferentes del CRBN disponibles en la base de datos RSCB PDB	50
Anexo C: Temperatura, presión, volumen, energía potencial, energía cinética y energía total de las tres réplicas de las simulaciones de dinámica molecular de los complejos WT, C391R y R419X.....	51
Anexo D: RMSD, Rg, SASA, Número de enlaces de hidrógeno y RMSF de las tres réplicas de las simulaciones de dinámica molecular de los complejos WT, C391R y R419X.....	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Distancias y ángulos de enlace de los átomos que participan en el <i>pocket</i> de interacción con ZN del complejo WT, antes y después del refinamiento mediante PDB-REDO, y después de la simulación de QM.....	33
Tabla 2.- Distancias y ángulos de enlace de los átomos que participan en el <i>pocket</i> de interacción con ZN del complejo C391R antes y después de la simulación de QM	34
Tabla 3.- Carga de los átomos interactuantes de los complejos 4Cys-Zn y 3Cys1Arg-Zn después de la simulación de QM	34
Tabla 4.- Carga de los átomos interactuantes de los complejos Cys, Arg, 4Cys-Zn y 3Cys1Arg-Zn después de la simulación de QM	35
Tabla 5.- Propiedades termodinámicas de los complejos Cys, Arg, 4Cys-Zn y 3Cys1Arg-Zn luego de la simulación de QM	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Proteína humana CRBN obtenida del RCSB PDB (ID: 4TZ4) luego del preprocesamiento	36
Figura 2.- Pocket de interacción de CRBN con ZN de diferentes complejos durante distintas etapas.....	37
Figura 3.- Temperatura, presión y volumen promedio de las réplicas de las simulaciones de dinámica molecular de los complejos WT, C391R y R419X	38
Figura 4.- Energía potencial, cinética y total promedio de las réplicas de las simulaciones de dinámica molecular de los complejos WT, C391R y R419X	39
Figura 5.- RMSD promedio de las tres réplicas de las simulaciones de dinámica molecular de los complejos WT, C391R y R419X	40
Figura 6.- Rg promedio de las tres réplicas de las simulaciones de dinámica molecular de los complejos WT, C391R y R419X.....	41
Figura 7.- RMSF de las tres réplicas de las simulaciones de dinámica molecular de los complejos WT, C391R y R419X y superposición de los sistemas completos y de la región con mayor RMSF.....	42
Figura 8.- SASA y número de enlaces de hidrógeno promedio de las réplicas de las simulaciones de dinámica molecular de los complejos WT, C391R y R419X	43

INTRODUCCIÓN

La proteína CRBN humana fue descubierta en un estudio sobre la identificación de factores genéticos asociados con trastornos cognitivos leves (J. Higgins et al., 2004). Así, el nombre de esta molécula fue dado por su alta expresión en el cerebro y porque posee el dominio LON en su secuencia. Se ha descrito que la expresión de CRBN es ubicua en toda la célula (núcleo, citoplasma, y otros sitios) y sus funciones se han asociado con la interacción y regulación de varias moléculas (Lupas et al., 2015).

Hasta el momento se conoce que la interacción de CRBN con diferentes moléculas ocurre principalmente por dos mecanismos. Primero, esta proteína es parte del complejo CRL4^{CRBN} E3 ubiquitina ligasa, que participa en la vía ubiquitina-proteosoma, cuya función es controlar la degradación selectiva de proteínas durante varios procesos celulares (Chamberlain et al., 2014). En segundo lugar, CRBN tiene actividad chaperona, que permite el plegamiento y ensamblaje adecuado de otras proteínas, lo que contribuye con la homeostasis celular (Min et al., 2016). Además, se ha reportado que esta proteína es diana de varios fármacos inmunomoduladores (IMiDs por sus siglas en inglés) como la talidomida, lenalidomida, y otros compuestos similares (Rehman et al., 2011).

Con respecto al primer mecanismo de regulación como parte del complejo CRL4^{CRBN} E3 ubiquitina ligasa, CRBN es el receptor de los sustratos que se unen al sistema y que luego son ubiquitinados y degradados. En este complejo, la proteína CUL4 sirve como soporte para las otras, ROC1 se asocia con E2 que es la responsable de la ubiquitinación, y DDB1 se une a CRBN (Sang et al., 2015). Se conoce que hay dos tipos de sustratos del CRBN: endógenos como GS, AMPK, MEIS2 y BK Channels, que se unen directamente con CRBN, y neo-sustratos como IKZF1/3 y CK1, que necesitan la ayuda de IMiDs para unirse a CRBN (Chamberlain et al., 2014).

Por otra parte, el mecanismo de regulación de CRBN como chaperona se ha evidenciado en algunas proteínas como CD147 y MCT1. Así, se ha reportado que CRBN es crucial para el plegamiento de MCT1 y para que esta proteína permanezca en la membrana celular, lo que contribuye con la estabilidad de MTC1 (Eichner et al., 2016).

Debido al rol clave que cumple CRBN en diversos procesos celulares, se ha reportado que las mutaciones en esta molécula tienen graves consecuencias (Chamberlain et al., 2014). De hecho, el descubrimiento de esta molécula ocurrió debido a la identificación de la mutación transicional homocigótica C→T en el nucleótido 1274 del gen *CRBN* en el cromosoma 3 de los pacientes. Esta mutación produjo la sustitución de la Arg419 a un codón de terminación (R419X). Como resultado, se produjo una versión truncada de la proteína con 24 aminoácidos faltantes en el extremo C terminal. La genotipificación de la mutación R419X se hizo en una familia, cuyos miembros afectados presentaron cuadros de retraso mental leve, y se observó que el cambio se segregó con el fenotipo correspondiente (J. Higgins et al., 2004).

Existe otra mutación transicional homocigótica reportada en CRBN, en este caso T→C en el nucleótido 1171 del gen *CRBN*. Esta mutación produjo la sustitución del aminoácido Cys391 del dominio CULT por Arg (C391R). Al igual que con la mutación R419X, se hizo la genotipificación en una familia y sus miembros afectados presentaron cuadros de discapacidad intelectual grave, comportamiento de automutilación y convulsiones. En este caso también se evidenció que la mutación segregó con el fenotipo (Sheereen et al., 2017).

Un aspecto importante es que CRBN es una metalo-proteína que interactúa con un átomo de Zinc (ZN). Se sabe que la mayoría de los sitios de unión al ZN en las proteínas están formados por cuatro residuos de Cys y/o Hys que coordinan el ion ZN (II) mediante átomos de Nitrógeno (N) o Azufre (S), y adoptan una conformación tetraédrica con ángulos de enlace y distancias específicos de esta geometría particular (Trzaskowski et al., 2008). Así, en la forma nativa de CRBN (WT) (**Figura 1A**), los átomos de S de los residuos de Cys 391, 323, 326 y

394 son los sitios de coordinación del ZN y forman un *pocket* de interacción con este metal (**Figuras 1B y 1C**). Debido a que la mutación C391R ocurre en uno de los residuos que interactúan con el ZN, se ha reportado que esto podría causar problemas de estabilidad en la proteína (Sheereen et al., 2017).

El *pocket* de interacción con ZN se encuentra en el dominio CULT de CRBN (residuos 318-426), donde también se ubica el sitio de interacción de la proteína con IMiDs (residuos 378-386). Este dominio de CRBN se ha caracterizado como la región más conservada de esta proteína porque existen proteínas homólogas a esta región en diferentes procariotas y eucariotas. Se ha propuesto que debido a la gran conservación de este dominio los cambios que ocurran en esa región podrían tener graves consecuencias (Lupas et al., 2015).

Como se explicó antes, se conocen las causas genéticas y los efectos fenotípicos producidos por las mutaciones R419X y C391R de la proteína CRBN en los pacientes que portan estas mutaciones (J. Higgins et al., 2004; Sheereen et al., 2017). Sin embargo, todavía no existe una explicación de las consecuencias de las mutaciones en CRBN y los cuadros clínicos de discapacidad intelectual (Chamberlain et al., 2014).

En los últimos años, la simulación computacional de biomoléculas se ha convertido en un aspecto clave para la Biología molecular. Esto se debe a que el estudio en el laboratorio de los movimientos de átomos individuales de biomoléculas y el análisis del efecto de una mutación, ligando, u otra variable es una tarea complicada (Dror et al., 2012).

Por tanto, las simulaciones computacionales de Dinámica Molecular (DM), Mecánica Cuántica (QM) y otros enfoques, son alternativas adecuadas para estudiar los movimientos, mecanismos, e interacciones de las biomoléculas a escala molecular y atómica. Esto ha ayudado a responder innumerables preguntas en diferentes áreas de investigación, incluyendo la Biología molecular (Huggins et al., 2019).

La DM es el estudio de los movimientos físicos de átomos y moléculas en el tiempo bajo condiciones determinadas de temperatura, presión, tipo de solvente, algoritmos de minimización, cálculo de fuerzas implicadas, y otros aspectos de interés. Estas simulaciones se basan en las leyes de Newton para calcular la fuerza y posición de los átomos, por lo que no se considera lo que ocurre a nivel atómico (Hollingsworth & Dror, 2018).

De forma general, los cálculos de DM se dividen en cuatro etapas: preparación del sistema, minimización energética, etapa de equilibrio y producción. El primer paso se realiza para obtener un archivo de entrada que pueda ser usado por el programa de simulación. La minimización energética se refiere a la obtención de una molécula con baja energía, de forma que sea una estructura estable (Hospital et al., 2015). El paso de equilibrio corresponde a la modificación de las condiciones de temperatura y presión para que la mayor parte de energía cinética del sistema se convierta en potencial y de esta forma el sistema alcance el equilibrio energético. Finalmente, en el paso de producción se calculan las fuerzas que actúan en cada átomo del sistema empleando los parámetros especificados del campo de fuerza, y se calcula la posición y velocidad de cada átomo (Hollingsworth & Dror, 2018).

El requisito principal para realizar las simulaciones de DM es la disponibilidad de la estructura tridimensional (3D) de la molécula de interés. Este proceso se realiza mediante técnicas como la difracción de rayos X, resonancia magnética nuclear, criomicroscopía electrónica, entre otras (Hospital et al., 2015), pero en los últimos años también se han desarrollado métodos computacionales basados en inteligencia artificial (Callaway, 2020).

Por otra parte, la QM es el estudio de las propiedades de átomos, moléculas, superficies y otros sistemas resolviendo las ecuaciones de la mecánica cuántica que describen las posiciones y energías de los electrones alrededor de los núcleos. Estas herramientas permiten calcular los ángulos de enlace, diedros, distancia, carga, energía y otras propiedades a nivel atómico. Para estas simulaciones las estructuras 3D no son un requisito fundamental, puesto

que se pueden considerar estas como referencia o es posible crear sistemas cuánticos sin una referencia previa (Huggins et al., 2019).

Sin embargo, se debe considerar que los cálculos de QM son más demandantes en términos de recursos computacionales que las simulaciones de DM. Por tanto, para sistemas con más de 150 átomos las simulaciones de QM son imprácticas debido a la gran cantidad de recursos computacionales y tiempo requeridos (Hollingsworth & Dror, 2018).

Las simulaciones tanto de DM como de QM requieren el uso de arquitecturas de cómputo de alto rendimiento (HPC) debido a la inmensa cantidad de cálculos y datos generados por estas herramientas. Los equipos de HPC son computadoras con un alto nivel de rendimiento en comparación con los equipos convencionales debido a que usan computación paralela y otras estrategias para la ejecución de los procesos y cálculos correspondientes. De esta forma, los equipos de HPC permiten ejecutar simulaciones con biomoléculas en cuestión de horas o días, que de otra forma durarían semanas o meses en equipos convencionales (Bolnykh et al., 2020).

Entonces, el objetivo de esta investigación fue entender cómo las mutaciones R419X y C391R de la proteína CRBN se relacionan con los cuadros clínicos de discapacidad intelectual debido a cambios estructurales a nivel atómico y molecular. Para esto, se realizaron simulaciones de DM y QM usando equipos de HPC, y se realizaron los análisis pertinentes para explicar el efecto de las mutaciones en CRBN.

Nuestra hipótesis fue que las mutaciones C391R y R419X podrían causar cambios estructurales en CRBN que afecten los sitios de unión a los sustratos del complejo $CRL4^{CRBN}$ E3 ubiquitina ligasa. Entonces, los sustratos de este sistema no se estarían degradando, lo que podría ser la causa de los síntomas de las enfermedades mentales por las mutaciones en CRBN.

MÉTODOS

Para comprender la relación entre los cambios estructurales debido a las mutaciones C391R y R419X en el dominio CULT de CRBN y los cuadros de discapacidad intelectual de los pacientes con estas mutaciones, se utilizaron dos enfoques de simulación molecular. El primer enfoque fue QM, que se empleó para estudiar el sistema a escala atómica y comparar la geometría del tetraedro del *pocket* de interacción con ZN en los sistemas WT y C391R. El otro enfoque fue DM, que se realizó para verificar si hay diferencias estructurales a gran escala entre el complejo WT y los sistemas mutados. Además, con las simulaciones de DM se verificaron los cambios en dominios clave de interacción con sustratos de CRBN.

1. Preprocesamiento de la estructura 3D de CRBN y obtención de los complejos WT, C391R y R419X

De forma general, cuando se trabaja con estructuras 3D de proteínas es necesario realizar el preprocesamiento de las mismas. Para esta investigación se usó la estructura 3D de la proteína CRBN humana de la base de datos RCSB PDB (ID: 4TZ4). Este modelo se obtuvo mediante difracción de rayos X, posee una resolución de 3,01 Å y contiene la información de CRBN humana (residuos 48-428) en complejo con DDB1 (residuos 2-1140) y lenalidomida (Matyskiela et al., 2016).

Para realizar las simulaciones con esta estructura 3D, el primer paso fue eliminar la información de DDB1 y lenalidomida del sistema. Luego de aislar las coordenadas y átomos solamente de CRBN, se realizó el refinamiento de lazos para completar las partes faltantes en el sistema, para lo que se empleó la funcionalidad *ModLoop* del software *Modeller v. 9.19* (Eswar et al., 2006). Finalmente, se utilizó el software *PDB-REDO* para optimizar la estructura 3D, específicamente el *pocket* de interacción con ZN, que fue refinado considerando estructuras previamente validadas de la base de datos RCSB PDB (Joosten et al., 2014). Con esto, se obtuvo el complejo WT en formato PDB para las simulaciones posteriores.

Para obtener el PDB del complejo C391R, se usó el complemento “rotamer” del software *UCSF Chimera v. 1.13.1* con la biblioteca de rotamer Dunbrack (Shapovalov & Dunbrack, 2011), que permite realizar mutaciones en estructuras 3D de proteínas. De esta forma, se reemplazó la Cys por Arg en la posición 391 de la estructura WT refinada. Por otro lado, el PDB del complejo R419X se obtuvo eliminando los residuos 420-428 de la estructura refinada WT usando la funcionalidad de eliminar aminoácidos del software *UCSF Chimera* (Pettersen et al., 2004).

2. Simulación de QM

Esta simulación se usó para analizar a escala atómica la diferencia entre los sistemas WT y C391R debido a la mutación de Cys por Arg en C391R. Los cálculos de QM consistieron en la optimización de la geometría de cuatro complejos: residuo Cys; residuo Arg; 4 Cys y 1 átomo de Zn (4Cys-Zn); 3 Cys, 1 Arg y 1 átomo de Zn (3Cys1Arg-Zn) utilizando un nivel de teoría del funcional de la densidad (DFT).

Los complejos 4Cys-Zn y 3Cys1Arg-Zn se construyeron considerando los complejos WT y C391R obtenidos en el preprocesamiento. Por tanto, en esta simulación se mantuvieron fijos los átomos de los residuos Cys326, Cys323 y Cys394, y se dejaron libres los átomos del residuo 391, Cys en el sistema 4Cys-Zn y Arg en 3Cys1Arg-Zn. Además, se realizó otra simulación dejando libres todos los átomos de ambos complejos.

Todos los cálculos se realizaron en la suite *Gaussian 16* (Frisch et al., 2016) usando el nivel de teoría Rwb97XD/6-311+G (2d, 2p). Los orbitales de los átomos de los complejos se describieron usando el conjunto de bases de Pople 6-311 ++ G (2d, 2p) (Papajak et al., 2011). El criterio de convergencia para la optimización de los complejos en cálculos de campo autoconsistente (SCF) se estableció por defecto.

El valor requerido de convergencia en la matriz de densidad fue 10^{-9} unidades atómicas; el valor del umbral de desplazamiento máximo fue 0,0018 Å y el valor del umbral de fuerza máximo fue 0,00045 Hartree/Bohr. Los reactivos y productos se caracterizaron como puntos estacionarios mínimos en las coordenadas de reacción. Para todos los complejos se utilizó agua como disolvente, y el efecto de solvatación se tuvo en cuenta directamente en el proceso de optimización utilizando el modelo continuo polarizable (PCM) con la densidad del modelo de solvatación (SMD) (Marenich et al., 2009).

La medición de las cargas de los átomos interactuantes se realizó utilizando la herramienta de distribución de carga de *Gaussview 6.0.16* (Dennington et al., 2009) utilizando el tipo de carga de Mulliken. Los ángulos de enlace y las distancias de enlace de 4Cys-Zn y 3Cys1Arg-Zn optimizados se midieron utilizando herramientas específicas de *Gaussview 6.0.16*. Además, para comparar los resultados de ángulos y distancias de enlaces de los complejos 4Cys-Zn y 3Cys1Arg-Zn obtenidos con *Gaussview*, se usaron las herramientas del software *UCSF Chimera v.1.13.1* (Pettersen et al., 2004).

Finalmente, los parámetros termodinámicos como los valores de entalpía absoluta (H), energía libre (G) y entropía (S) con la correspondiente corrección de temperatura, se obtuvieron utilizando el cálculo de frecuencia de *Gaussian 16* (Frisch et al., 2016).

3. Simulación de DM

Esta simulación se usó para analizar a gran escala la diferencia entre los sistemas WT, C391R, y R419X debido a las mutaciones de los dos últimos complejos. Los cálculos de DM de los tres complejos se realizaron utilizando *Gromacs v. 2019.0* con el campo de fuerza Zinc AMBER (ZAFF) (Peters et al., 2010). Este campo de fuerza se eligió para simular el *pocket* de interacción con ZN de forma adecuada. Se realizaron tres réplicas de las simulaciones de cada complejo para garantizar la reproducibilidad y robustez de los cálculos.

La preparación de todos los sistemas con el campo de fuerza ZAFF se realizó mediante el módulo *LEaP* del paquete *AmberTools20*. Cada réplica de los tres complejos se colocó en una caja cúbica solvatada llena de moléculas de agua tipo TIP3P, así como iones Na⁺ y Cl⁻ a una concentración de 0.1 M para neutralizar la carga de las moléculas, con lo que se intentan replicar las condiciones fisiológicas de los sistemas de estudio. Con esto, se generaron los archivos de topología y coordenadas de los sistemas en los formatos *Amber* (prmtop e inpcrd). Para realizar las simulaciones en *Gromacs* estos archivos se transformaron a los formatos aceptados por este programa (top y gro) usando la librería *acpype* del lenguaje de programación *Python*.

Para las simulaciones se aplicaron las condiciones de frontera periódicas y el método Particle-Mesh-Ewald para calcular las interacciones electrostáticas (Cheatham et al., 1995). Considerando las especificaciones mencionadas, en todas las réplicas de los tres sistemas se realizó la minimización energética utilizando el algoritmo de descenso de gradiente y la convergencia escogida menor a 10 kJ mol⁻¹nm⁻¹. Para el paso de equilibrio, se realizaron simulaciones NVT y NPT de 500 ps cada una; se utilizó el termostato “V-rescale” a 310 K y el barostato “Parrinello-Rahman” a 1 bar. Luego, se realizó la etapa de producción durante 50 ns manteniendo la misma temperatura y presión usando el termostato y barostato mencionados.

Con los resultados de las simulaciones de DM se realizaron los análisis de las propiedades termodinámicas, conformacionales y de estabilidad, y estructurales de las trayectorias obtenidas. Se emplearon las herramientas de *Gromacs gmx energy* para calcular las propiedades termodinámicas de la simulación, incluyendo la temperatura, presión, volumen, energía potencial, cinética y total. Con respecto a las propiedades conformacionales y de estabilidad, se empleó *gmx gyrate* para determinar el radio de giro (Rg), *gmx rms* para calcular la raíz de la desviación media cuadrática (RMSD) y *gmx rmsf* para determinar la raíz de la fluctuación media cuadrática por residuos (RMSF). Finalmente, las propiedades

estructurales se analizaron usando *gmx hbond* para calcular el número de enlaces de hidrógeno y *gmx sasa* para calcular la superficie accesible al solvente (SASA).

Luego de usar las herramientas de *Gromacs* mencionadas, se obtuvieron archivos de texto con la información de los análisis correspondientes. Las figuras y gráficos de esta sección se realizaron usando las librerías de visualización *Matplotlib* y *Seaborn* del lenguaje de programación *Python* (Hunter, 2007). Además, se empleó *Jupyter Notebook* como interfaz web para la escritura del código y creación de gráficos.

RESULTADOS

1. Preprocesamiento de la estructura 3D de CRBN y obtención de los complejos WT, C391R y R419X

En este estudio, primero se realizó el preprocesamiento del sistema WT, ya que a partir de este complejo se generaron los sistemas mutados (C391R y R419X). En la **Figura 1** se presenta la estructura WT luego de realizar el refinamiento de lazos y la optimización del sitio de unión con ZN de la proteína. Además, en la **Tabla 1** se presentan los datos de distancias y ángulos de enlace de los átomos que intervienen en el *pocket* de interacción con ZN del complejo WT, antes y después del refinamiento mediante PDB-REDO y después de la simulación de QM.

A partir del complejo WT se obtuvieron los sistemas C391R y R419X de acuerdo a los procedimientos explicados en la sección de Métodos. Con esto, se midieron las distancias y ángulos de enlace del *pocket* de interacción con ZN del complejo C391R antes y después de la simulación de QM (**Tabla 2**). Se debe considerar que los átomos que coordinan la unión con ZN son N o S (Trzaskowski et al., 2008), por lo que para la Arg de C391R se asumió que N fue el átomo que interactúa con Zn, y para las Cys de WT se consideró al S.

Así, se analizaron las diferencias a nivel de distancias y ángulos de enlace entre los complejos WT y C391R antes de realizar los cálculos de QM. En las **Figuras 2A** y **2B** se presentan los sitios de unión al ZN de los complejos WT y C391R respectivamente antes de las simulaciones de QM y DM.

Para poner en evidencia la alta variabilidad de las distancias y ángulos de enlaces del *pocket* de interacción con ZN del CRBN, se midieron estos parámetros de 11 estructuras diferentes reportadas en la base de datos RSCB PDB. Los datos de esta búsqueda reflejaron que el promedio de las distancias de enlace de los residuos de Cys 323, 326, 391 y 394 fueron de 2.38 ± 0.20 , 2.40 ± 0.10 , 2.51 ± 0.69 , y 2.39 ± 0.20 Å respectivamente (**Anexo 1**). Por otra

parte, el promedio de ángulos de enlaces de los distintos residuos de Cys fluctuaron en un intervalo de 94.75 ± 8.11 y 122.30 ± 15.33 (**Anexo 2**). Considerando estos resultados es evidente la diferencia de las distancias y ángulos de enlaces de CRBN en diferentes estructuras.

2. Simulación de QM

El objetivo de esta simulación fue comprender los cambios químicos en el sitio de unión al Zn de CRBN cuando se produce la sustitución de Cys por Arg en el residuo 391. Se propuso la siguiente reacción química para modelar el sistema:



En esta ecuación se muestra el reemplazo de una de las Cys del complejo 4Cys-Zn por una Arg, con lo que se obtuvieron los complejos 3Cys1Arg-Zn y Arg en los reactivos. Con esta reacción se representó el cambio ocurrido en el sistema C391R de CRBN.

Los resultados expuestos se basan en parámetros químicos y propiedades termodinámicas de los complejos Cys, Arg, 4Cys-Zn y 3Cys1Arg-Zn luego de realizar su optimización geométrica mediante DFT usando *Gaussian 16*. Los parámetros químicos analizados fueron la carga, ángulos de enlace, ángulos diedros de enlace y las distancias de enlace de los átomos interactuantes; mientras que las propiedades termodinámicas fueron la entalpía, energía libre y entropía de los complejos optimizados.

A continuación, se presentan los resultados de la simulación en la que se fijaron los átomos de los residuos Cys326, Cys323 y Cys394.

2.1 Parámetros químicos

El primer parámetro químico que se analizó fue la carga de los átomos luego de la optimización mediante QM. La **Tabla 3** muestra las cargas de los complejos 4Cys-Zn y 3Cys1Arg-Zn, así como la diferencia de carga de los átomos correspondientes de ambos complejos luego de la simulación de QM.

Además, en el **Tabla 4** se muestran las diferencias de cargas entre los átomos interactuantes de los complejos 4Cys-Zn y Cys, así como de los sistemas 3Cys1Arg-Zn y Arg. Como se mencionó antes, se ha reportado que el ZN es coordinado por átomos de N o S (Trzaskowski et al., 2008), por lo que para las comparaciones de cargas se usaron los átomos de S de las Cys y el átomo de N de la cadena lateral más externa de la Arg.

Además, se analizaron las distancias, ángulos y ángulos diedros de enlaces de los complejos optimizados por QM. En la **Tabla 1** se muestran los resultados de las distancias y ángulos de enlaces del sistema WT y en la **Tabla 2** están los datos respectivos para el sistema C391R. En la **Figura 2C** y **2D** se presentan los sitios de unión al ZN de los complejos WT y C391R respectivamente después de las simulaciones de QM.

2.2 Parámetros termodinámicos

Finalmente, se analizaron los cálculos de las propiedades termodinámicas de entalpía y entropía de los complejos Cys, Arg, 4Cys-Zn y 3Cys1Arg-Zn luego de la optimización por QM. En base a estos resultados se calcularon los valores del cambio en la energía libre de Gibbs (DG) y el cambio en la entalpía (DH) utilizando la ecuación (1) restando los valores de los productos y reactivos. Además, se realizó la transformación unitaria de Hartree a kcal/mol utilizando el factor de conversión 627.51. Finalmente, se calculó el cambio en la entropía (DS) mediante la resta de DH y DG, dividido por el valor de temperatura de 298.15 en K (**Tabla 5**).

En este trabajo no se muestran los resultados de la simulación de QM en la que se dejaron libres los átomos de todos los residuos de los sistemas 4Cys-Zn y 3Cys1Arg-Zn. En esta simulación también existieron diferencias respecto a los parámetros químicos de ambos sistemas, pero la reacción planteada fue favorable en términos termodinámicos, lo que indicó que a nivel cuántico existe una conformación en la que esta reacción si ocurre, y por tanto debe existir un relajamiento del sistema mutado para que ocurra la reacción.

3. Simulación de DM

El código y los gráficos de esta sección son de acceso libre y se encuentran disponibles en formato de *Jupyter notebooks* en el siguiente repositorio de *GitHub*: https://github.com/asar1245/Molecular_dynamics_analysis_undergraduate_thesis_CRBN_mutations.

3.1 Propiedades termodinámicas

Los resultados de los parámetros termodinámicos de las tres réplicas de los sistemas WT, C391R y R419X se muestran en el **Anexo 3**. En todos los gráficos de este anexo se observó que las réplicas de los tres sistemas siguieron una misma tendencia y las variaciones observadas en las simulaciones de las diferentes réplicas fueron muy pequeñas. Por tanto, la interpretación de los resultados obtenidos se realizó en base a los gráficos del promedio de las réplicas de los diferentes parámetros termodinámicos (**Figuras 3 y 4**).

En la **Figura 3** se observa que todas las simulaciones convergieron a los valores especificados en la etapa de equilibrio: temperatura (310 K), presión (1 bar) y volumen (566 nm³). Con respecto a la fluctuación de temperatura de los tres sistemas se observó una variación en el intervalo de 307-313 K (**Figura 3A**). En el gráfico de la fluctuación de volumen (**Figura 3C**) se observó una variación de 6 nm³ (entre 561 y 567 nm³). Los resultados de la fluctuación de presión de los tres sistemas indicaron que hubo una variación entre -250 y 250 bar (**Figura 3B**), que representan cambios grandes en comparación con los otros parámetros.

En la **Figura 4** se observa que los valores de energía potencial, cinética y total de los tres sistemas se estabilizaron en tiempos específicos, y esta tendencia se mantuvo constante a lo largo de las simulaciones con pequeñas fluctuaciones. Los valores promedio y la desviación estándar del promedio de energía potencial, cinética y total de las tres réplicas del sistema WT fueron $-7.032 \times 10^5 \pm 857.136$, $1.447 \times 10^5 \pm 608.189$ y $-5.585 \times 10^5 \pm 1143.302$, respectivamente. Para el sistema C391R estos valores promedio y de desviación estándar fueron $-7.036 \times 10^5 \pm$

858.597, $1.448 \times 10^5 \pm 606.138$ y $-5.588 \times 10^5 \pm 1143.145$; y para el sistema R419X fueron $-7.042 \times 10^5 \pm 858.555$, $1.446 \times 10^5 \pm 605.492$ y $-5.595 \times 10^5 \pm 1139.465$ de forma correspondiente.

3.2 Propiedades conformacionales y de estabilidad

Los resultados de los parámetros conformacionales y de estabilidad de las tres réplicas de los sistemas WT, C391R y R419X se muestran en el **Anexo 4**. Al igual que con los parámetros termodinámicos, en todos los gráficos se observó que las réplicas de los tres sistemas siguieron una misma tendencia y las fluctuaciones entre réplicas fueron muy pequeñas. Por tanto, la interpretación de los resultados obtenidos se realizó en base a los gráficos del promedio de las réplicas de RMSD, Rg, y RMSF (**Figuras 5, 6 y 7** respectivamente).

Respecto a los resultados del RMSD, en la **Figura 5A** se muestra el cambio de esta variable durante los 50 ns de simulación. Los valores promedio y la desviación estándar de los sistemas WT, C391R y R419X fueron 0.202 ± 0.0199 , 0.238 ± 0.051 y 0.266 ± 0.0332 respectivamente. Para validar estas diferencias, se realizó el gráfico de la función de densidad de probabilidad del RMSD (**Figura 5B**), en el que se observa una clara diferencia entre los sistemas R419X y WT, ya que los picos de las curvas están en valores distintos de RMSD (aproximadamente 0.275 nm para R419X y 0.22 nm para WT), pero esta diferencia no es evidente entre los sistemas C391R y WT.

En la **Figura 5A** se observa que los primeros 20 ns de la simulación tienen alta fluctuación, lo que es normal debido a que este tiempo es necesario para la estabilización de los sistemas. Por tanto, para evidenciar de mejor forma si existen diferencias entre los sistemas C391R y WT se realizaron los gráficos del cambio de RMSD en el tiempo y el de la función de densidad de probabilidad de los últimos 30 ns de simulación (**Figuras 3C y 3D**

respectivamente). En la **Figura 3D** se observa una diferencia más clara entre los sistemas C391R y WT, ya que los picos más altos de los sistemas están en valores distintos de RMSD (aproximadamente 0.26 nm para C391R y 0.215 para WT).

En la **Figura 6A** se muestra el cambio del Rg durante los 50 ns de simulación. Los valores promedio y la desviación estándar de los sistemas WT, C391R y R419X fueron 2.2797 ± 0.0150 , 2.280 ± 0.0211 y 2.299 ± 0.020 respectivamente. Al igual que con el RMSD, se realizó el gráfico de la función de densidad de probabilidad (**Figura 6B**), en el que se observaron diferencias en los valores de los picos de R419X y WT (aproximadamente 0.30 nm para R419X y 0.28 nm para WT), pero no hubo diferencias claras entre C391R y WT. Los gráficos del cambio de Rg en el tiempo y de la función de densidad de probabilidad de los últimos 30 ns (**Figuras 6C y 6D**) mostraron pequeñas diferencias entre los sistemas C391R y WT, pero todavía hubo superposición de los picos de los valores de Rg de ambos sistemas, y por tanto la diferencia no fue evidente.

En la **Figura 7A** se observa el cambio de RMSF del promedio de las réplicas de los tres sistemas. Para evidenciar las diferencias de forma más clara se realizó el gráfico de la función de densidad de probabilidad del RMSF (**Figura 7B**), donde las diferencias no fueron evidentes, aunque hubo fluctuación en las colas de la distribución de los sistemas. Además, se realizó el alineamiento de las estructuras finales de las simulaciones de los tres sistemas (**Figura 7C**), y se constataron de forma visual las regiones con mayor cambio de RMSF (**Figura 7D**), donde se observaron diferencias aparentes entre las estructuras de los tres sistemas.

3.3 Propiedades estructurales

En el **Anexo 4** se muestran los resultados individuales de los parámetros estructurales de los sistemas WT, C391R y R419X. En todos los gráficos se observa que las diferencias entre

las réplicas fueron pequeñas, por lo que al igual que los otros parámetros, los análisis se realizaron considerando el promedio de las tres réplicas.

Con respecto a los resultados de SASA, en la **Figura 8A** se presenta el cambio de este parámetro durante los 50 ns de simulación, pero no se observaron diferencias entre los tres sistemas, lo que se constató con el gráfico de la función de densidad de probabilidad (**Figura 8B**). Los valores promedio y la desviación estándar de los sistemas WT, C391R y R419X fueron 198.938 ± 2.926 , 198.815 ± 3.594 y 199.987 ± 3.481 respectivamente. Además, en los gráficos de los últimos 30 ns de simulación tampoco se observaron diferencias (**Figuras 8C y 8D**).

Al igual que con SASA, el número de enlaces de hidrógeno durante los 50 ns y últimos 30 ns de simulación no mostraron diferencias entre los tres sistemas (**Figuras 8E y 8G** respectivamente), lo que se constató con los gráficos de densidad de la función de densidad de probabilidad (**Figuras 8F y 8H**).

DISCUSIÓN

Como primer punto, se debe analizar la importancia del preprocesamiento de las estructuras de CRBN usadas en este estudio. El refinamiento de lazos y la optimización de sitios de unión a metales como el ZN fueron necesarios porque se conoce que los métodos experimentales para determinar la estructura de proteínas tienen fallos en la caracterización de estos aspectos (Handing et al., 2018). Para esto, se usaron los programas *ModLoop* de *Modeller* v. 9.19 (Eswar et al., 2006) y *PDB-REDO* (Joosten et al., 2014), que han sido usados en varios estudios previos para estos fines (Haddad et al., 2020; van Beusekom et al., 2018).

En una investigación se estudiaron los sitios de unión al ZN de miles de proteínas disponibles en la base de datos RCSB PDB, con lo que se determinó un estándar confiable de las distancias y ángulos de enlace para los sitios activos de las proteínas que interactúan con ZN. El estudio reflejó que las distancias medias de Zn-S (Cys) son de 2.330 ± 0.029 , y los ángulos S (Cys)-Zn-S (Cys) corresponden a 109.45 ± 5.46 (Touw et al., 2016).

De acuerdo a los resultados obtenidos de la medición de distancias y ángulos de enlaces de 11 estructuras diferentes de CRBN reportadas en el RCSB PDB (**Anexo 1 y 2**), se encontró que estos parámetros tienen una alta fluctuación entre las distintas estructuras de una misma proteína. Este hecho puede explicarse debido a los fallos en la caracterización de sitios de unión a metales como el ZN de los métodos para obtener las estructuras de proteínas (Handing et al., 2018). Además, se observó que la mayoría de los datos promedio de estos parámetros no están dentro de los estándares reportados por Touw et al., 2016.

Sin embargo, se observó que luego de aplicar el proceso de refinamiento del sitio de unión al ZN del sistema WT con el software *PDB-REDO* hubo un cambio considerable de las distancias y ángulos de enlaces (**Tabla 1**). Por lo tanto, fue evidente que el refinamiento fue exitoso debido a que este proceso reorganizó las distancias y ángulos de enlaces del *pocket* de

interacción con ZN del sistema WT para obtener una conformación adecuada de acuerdo con los estándares correspondientes (Touw et al., 2016).

Además, se midieron las distancias y los ángulos de enlaces del pocket de interacción con ZN del sistema C391R antes de la simulación de QM (**Tabla 2**). Con respecto a la estructura de C391R, se muestra que el reemplazo de Cys por Arg en la posición 391 causó la distorsión de la geometría de tetraedro propia de este complejo. Este hecho se evidenció tanto en los datos de la distancia como en los ángulos de enlaces del residuo mutado antes de la simulación de QM (**Tablas 1 y 2**). Además, en las **Figuras 2A y 2B** se observan los sitios de unión al ZN de los complejos WT y C391, donde existe una aparente distorsión de la geometría tetraédrica en el C391 respecto al WT, lo que se comprobó con las medidas de las distancias y ángulos de enlaces mencionadas anteriormente.

Luego de preparar los sistemas WT y C391 se realizaron las simulaciones de QM. Se empleó un nivel de teoría DFT, que es un modelo computacional de mecánica cuántica en el que se describen las propiedades de sistemas de muchos electrones considerando el funcional de la densidad electrónica, que es una función del espacio y tiempo (Becke, 2014).

La primera propiedad química que se analizó luego de las simulaciones de QM fue la carga de los átomos interactuantes de los complejos optimizados. De acuerdo a los cálculos realizados, se evidenció un aumento de las cargas de los átomos interactuantes de los residuos Cys326 y Cys394 en 3Cys1Arg-Zn en comparación con 4Cys-Zn; mientras que las cargas de los átomos de Cys323, Cys391 y Zn disminuyeron (**Tabla 3**). Estos cambios probablemente se deben a la redistribución de la carga en 3Cys1Arg-Zn debido a la sustitución de la Cys por la Arg, lo que podría afectar la unión de CRBN con Zn.

Por otra parte, al comparar las cargas entre los complejos 4Cys-Zn y Cys se observó que la presencia del átomo de Zn modificó todas las cargas de los átomos interactuantes en el

complejo 4Cys-Zn, cuya modificación de cargas se observó también al comparar los complejos 3Cys1Arg-Zn y Arg (**Tabla 4**).

Con respecto a los resultados de las distancias de enlaces luego de la simulación de QM, se observó que estos parámetros de los complejos WT (**Tabla 1**) y C391R (**Tabla 2**) estuvieron cerca de las distancias promedio de Zn-S (Cys) propuestas por Touw, et al., 2016 (2.330 ± 0.029). Sin embargo, estos cambios podrían afectar la geometría del tetraedro del sitio de unión al ZN de los dos sistemas. La principal diferencia se produjo en la distancia de enlace del ZN con el átomo del residuo 391, lo que está de acuerdo con los resultados esperados, ya que el átomo responsable de esta interacción es diferente en ambos complejos (**Tabla 1 y 2**).

Considerando los ángulos de enlace luego de la simulación de QM, se evidenció que la mayoría de estos parámetros en los complejos WT (**Tabla 1**) y C391R (**Tabla 2**) estuvieron dentro de los ángulos promedio S(Cys)-Zn-S(Cys) reportados por Touw, et al., 2016. Sin embargo, dos ángulos en 4Cys-Zn y uno en 3Cys1Arg-Zn estuvieron fuera del límite permitido (**Tabla 1 y 2**), lo que podría afectar la geometría del tetraedro de ambos sistemas.

Además, se midieron los ángulos diedros de enlace (Datos no mostrados). Se observó que hubo cambios en estos ángulos entre los sistemas WT y C391R, lo que podría causar una distorsión de la geometría tetraédrica del sitio de unión al ZN en CRBN. En las **Figuras 2C y 2D** se muestran los complejos WT y C391 respectivamente luego de la simulación de QM, en las que se observa la geometría de los dos complejos de unión al ZN.

Como último punto de los cálculos de la simulación de QM se analizaron los parámetros termodinámicos de los complejos optimizados y en base a estos datos se calcularon los valores de DG, DH, y DS (**Tabla 5**). Considerando estos parámetros se determinó que este sistema es endotérmico ($DH > 0$), la entropía del sistema disminuye ($DS < 0$), y por tanto el DG es positivo

a cualquier temperatura en el que se encuentre el sistema (Berry, 2019). Por tanto, este proceso nunca sería espontáneo, lo que quiere decir que es improbable que la reacción ocurra.

Este hecho puso en evidencia que el cambio de la Cys por Arg en el residuo 391 del CRBN podría causar cambios irreversibles en el sitio de unión al ZN que podrían impedir la interacción adecuada de este metal con la proteína. Sin embargo, de acuerdo a los resultados de la simulación de QM en el que se dejaron libres todos los átomos (Datos no mostrados), sí existe una conformación en la que la reacción sería espontánea, lo que justifica la presencia de la mutación en los miembros de la familia Saudi (Sheereen et al., 2017).

Los resultados de QM permitieron estudiar los cambios en el sitio de unión al ZN de la proteína CRBN debido a la mutación C391R a escala atómica. Para determinar los cambios a gran escala de la proteína CRBN debido a las mutaciones C391R y R419X se utilizó el enfoque de DM, ya que estas simulaciones permiten determinar los movimientos de todos los átomos de los sistemas proteicos (Hollingsworth & Dror, 2018).

Se calcularon parámetros termodinámicos, conformacionales, y estructurales luego de realizar las simulaciones de DM. Los aspectos termodinámicos se calcularon porque permiten verificar la convergencia de las simulaciones a los valores establecidos durante la etapa de equilibrio, y porque permiten comprobar la estabilidad energética de las simulaciones (Huggins et al., 2019).

Respecto a los resultados de temperatura, presión y volumen, las simulaciones convergieron a los valores especificados en la etapa del equilibrio y las fluctuaciones de estos valores estuvieron en los rangos normales. Sin embargo, la fluctuación de la presión fue más grande que la de temperatura y volumen (**Figura 3**). Se conoce que las variaciones grandes de presión en simulaciones de DM son normales porque la presión es una propiedad macroscópica y solo se puede medir correctamente como promedio en el tiempo, mientras se ajusta con datos de presión a escala microscópica, y porque depende de otras variables (Abraham et al., 2019).

Además, se determinó que las trayectorias de todos los sistemas fueron estables energéticamente a lo largo de las simulaciones (**Figura 4**).

Los parámetros conformacionales y de estabilidad que se analizaron fueron: RMSD, Rg y RMSF. El RMSD es una medida global de la estabilidad de un sistema en comparación con una estructura de referencia, entre mayor sea la variación de este valor el sistema es más inestable (Hollingsworth & Dror, 2018). Se observó que los sistemas C391R y R419X tuvieron valores mayores de RMSD que el sistema nativo, lo que indica que hubo más cambios conformacionales en los sistemas mutados y por tanto fueron menos estables (**Figura 5**).

El Rg es una medida del grado de compactación y el plegamiento de una proteína (Hospital et al., 2015). Se determinó que el Rg de R419X fue mayor que los sistemas WT y C391R (**Figura 6**), lo que indica que R419X fue menos compacto que los otros dos sistemas.

El último parámetro conformacional que se analizó fue el RMSF, que es una medida local de la estabilidad de la proteína que predice la variación de los átomos y residuos a lo largo de la simulación (Hollingsworth & Dror, 2018). Se observaron diferencias entre los tres sistemas en diferentes regiones de la proteína, en especial entre los átomos 2500-3000 y 3500-4500, donde se ubican los dominios N-LON, DDB1 binding domain y C-LON (**Figura 7**). Se conoce que esta región es importante en la interacción de CRBN con algunos de sus sustratos (Min et al., 2016), por lo que en los sistemas mutados se podrían afectar estas interacciones.

Los parámetros estructurales analizados fueron: SASA y el número de enlaces de hidrógeno. SASA es una medida del área superficial de una biomolécula que es accesible al solvente (Lins et al., 2003); mientras que los enlaces de hidrógeno son fuerzas intermoleculares que juegan un rol fundamental en el reconocimiento molecular y la estabilidad de las proteínas (Baig et al., 2014). En ninguno de estos parámetros se encontraron diferencias entre los sistemas (**Figura 8**).

CONCLUSIONES

En esta investigación se estudiaron los cambios a nivel atómico y molecular de las mutaciones R419X y C391R de la proteína CRBN. Las simulaciones de QM se usaron para estudiar los cambios a escala atómica en el *pocket* de interacción con ZN de la proteína CRBN debido a la mutación C391R, y los cálculos de DM sirvieron para identificar los cambios a gran escala de la proteína CRBN debido a las mutaciones C391R y R419X.

De acuerdo a los resultados de los parámetros químicos de las simulaciones de QM, se observaron diferencias entre los complejos 4Cys-Zn y 3Cys1Arg-Zn en la carga, ángulos de enlace, ángulos diedros de enlace y las distancias de enlace de los átomos interactuantes de los sistemas. Es probable que la mutación C391R afectó la geometría del sitio de unión de CRBN al ZN. Considerando los parámetros termodinámicos de las simulaciones de QM, se observó que manteniendo fijos los átomos de los residuos Cys326, Cys323 y Cys394 la reacción no sería favorable, pero dejando libres todos los átomos la reacción sí podría ocurrir. Por tanto, la mutación del sistema C391R produce cambios drásticos en el sitio de unión de CRBN al ZN, pero existen una conformación en la que la reacción sería espontánea, lo que justifica la presencia de la mutación en los miembros de la familia Saudi.

Respecto a los resultados de DM, las simulaciones cumplieron con los parámetros termodinámicos, y existieron diferencias en los parámetros conformacionales entre el complejo nativo y los sistemas mutados, lo que se observó en el RMSD, Rg y RMSF. Los parámetros estructurales no mostraron diferencias entre los sistemas de estudio.

Los resultados mostrados están de acuerdo con la hipótesis planteada, por lo que las mutaciones de CRBN podrían afectar regiones de la proteína de unión a otros sustratos, y el hecho de que estos no se degraden podría ser una de las causas de los desórdenes mentales en los pacientes con estas mutaciones. Sin embargo, se necesitan más estudios computacionales y experimentales para validar estos resultados preliminares.

TABLAS

Tabla 1.- Distancias y ángulos de enlace de los átomos que participan en el *pocket* de interacción con ZN del complejo WT, antes y después del refinamiento mediante PDB-REDO, y después de la simulación de QM

Átomos interactuantes	Parámetros antes del refinamiento	Parámetros después del refinamiento	Parámetros después de la simulación de QM
	Distancia de enlace (Å)		
Zn-S(Cys391)	2.11	2.32	2.42
Zn-S(Cys323)	2.28	2.34	2.34
Zn-S(Cys326)	2.4	2.35	2.35
Zn-S(Cys394)	2.28	2.33	2.33
	Ángulos de enlace (°)		
S(Cys391)-Zn-S(Cys323)	109.53	110.26	110.72
S(Cys391)-Zn-S(Cys326)	109.9	109.48	103.08
S(Cys391)-Zn-S(Cys394)	117.15	111.19	117.01
S(Cys323)-Zn-S(Cys326)	102.34	104.4	104.39
S(Cys323)-Zn-S(Cys394)	89.13	104.06	104.07
S(Cys326)-Zn-S(Cys394)	124.13	116.98	116.98

Tabla 2.- Distancias y ángulos de enlace de los átomos que participan en el *pocket* de interacción con ZN del complejo C391R antes y después de la simulación de QM

Átomos interactuantes	Parámetros antes de la simulación de QM	Parámetros después de la simulación de QM
	Distancia de enlace (Å)	
Zn-N(Arg391)	1.94	2.29
Zn-S(Cys323)	2.34	2.34
Zn-S(Cys326)	2.35	2.35
Zn-S(Cys394)	2.33	2.33
	Ángulos de enlace (°)	
N(Arg391)-Zn-S(Cys323)	101.18	110.38
N(Arg391)-Zn-S(Cys326)	109.7	108.14
N(Arg391)-Zn-S(Cys394)	118.02	112.42
S(Cys323)-Zn-S(Cys326)	104.40	104.40
S(Cys323)-Zn-S(Cys394)	104.06	104.06
S(Cys326)-Zn- S(Cys394)	116.98	116.99

Tabla 3.- Carga de los átomos interactuantes de los complejos 4Cys-Zn y 3Cys1Arg-Zn después de la simulación de QM

Átomo Complejo	4Cys-Zn (au)	3Cys1Arg-Zn (au)	Diferencia (au)
Zn	0.394	0.375	0.019
S(Cys391) / N1(Arg391)	0.298	-0.442	0.74
S(Cys323)	0.58	0.242	0.338
S(Cys326)	0.043	0.278	0.235
S(Cys394)	0.178	0.214	0.036

Tabla 4.- Carga de los átomos interactuantes de los complejos Cys, Arg, 4Cys-Zn y 3Cys1Arg-Zn después de la simulación de QM

Átomo	Aminoácido (au)	Complejo (au)	Diferencia (au)
	Cys	4Cys-Zn	
S(Cys391)	-0.202	0.298	0.5
S(Cys323)	-0.202	0.58	0.782
S(Cys326)	-0.202	0.043	0.245
S(Cys394)	-0.202	0.178	0.38
	Arg	3Cys1Arg-Zn	
N1(Arg391)	-0.594	-0.442	0.152
N2(Arg391)	-0.673	-0.598	0.075
N3(Arg391)	-0.309	-0.089	0.22
C(Arg391)	0.631	0.208	0.423

Todos los átomos presentados en esta tabla pertenecen a la cadena lateral Arg. La numeración de átomos de N comienza con el átomo más externo de la cadena lateral del residuo Arg.

Tabla 5.- Propiedades termodinámicas de los complejos Cys, Arg, 4Cys-Zn y 3Cys1Arg-Zn luego de la simulación de QM

Propiedades termodinámicas	Complejo	4Cys-Zn	Arg	3Cys1Arg-Zn	Cys
H (Hartree)		-4818.65	-644.75	-4703.35	-759.89
G (Hartree)		-4818.71	-644.81	-4703.42	-759.94
DG (kcal/mol)		98.97			
DH (kcal/mol)		97.38			
DS (kcal/mol)		-5.35009			

FIGURAS

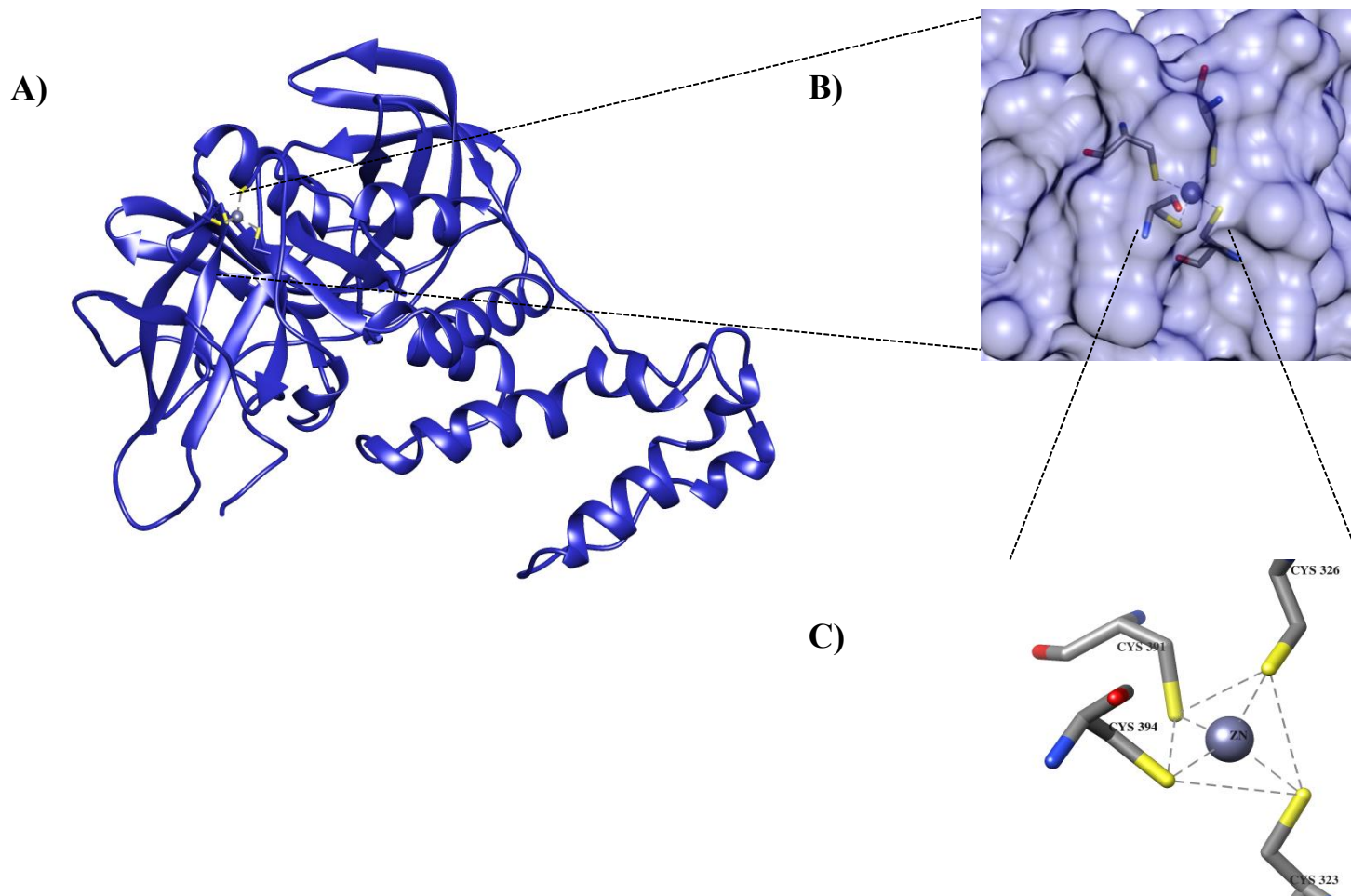


Figura 1.- Proteína humana CRBN obtenida del RCSB PDB (ID: 4TZ4) luego del preprocesamiento

En la parte A) se observa la estructura 3D completa. B) Superficie del sitio de unión de la proteína CRBN con el átomo de ZN. C) Complejo tetraédrico de unión del ZN con residuos de Cys 391, 323, 326 y 394. Los átomos de Azufre se presentan de color amarillo, los de Carbono gris, los de Oxígeno rojo y los de Nitrógeno azul.

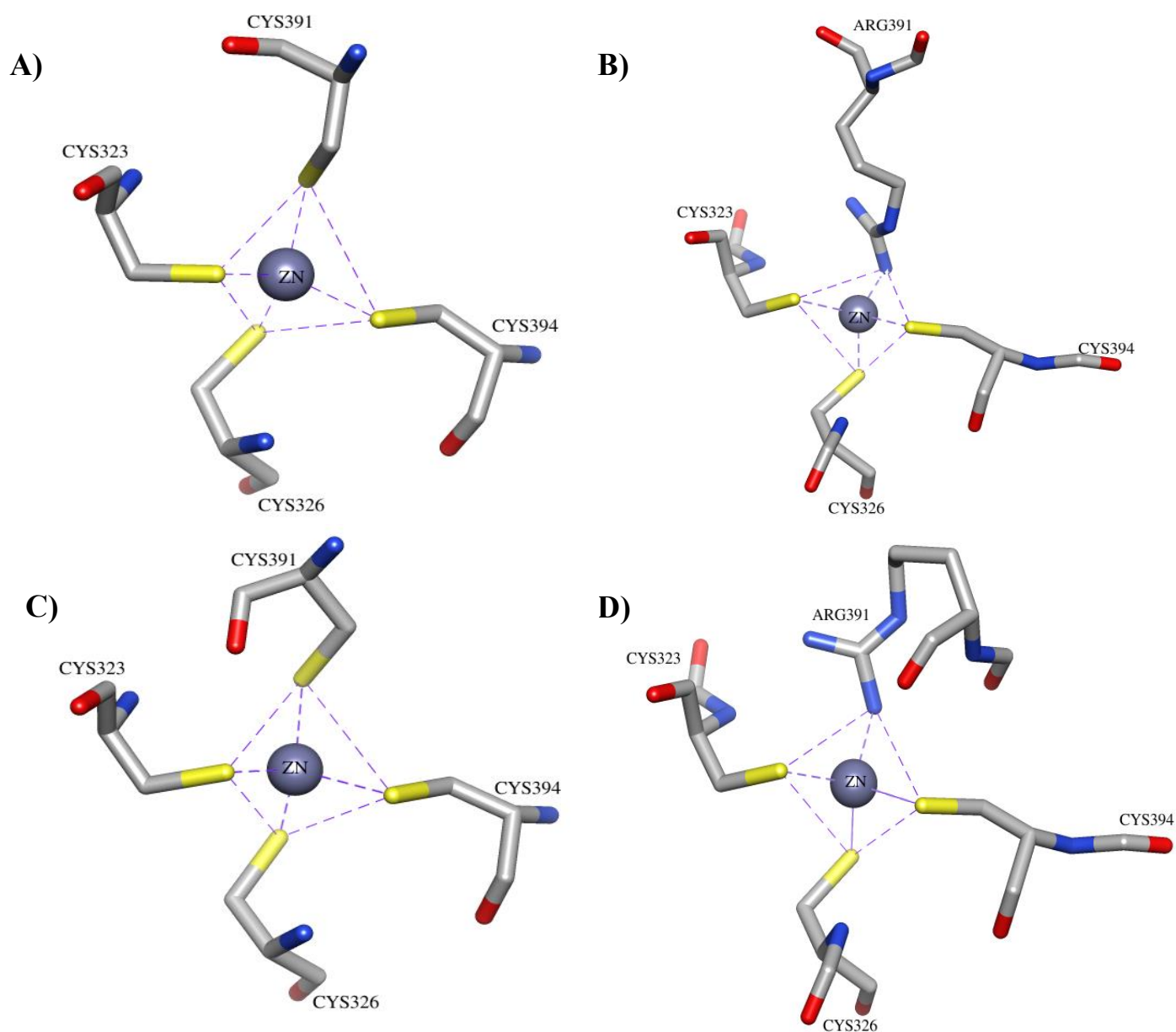


Figura 2.- Pocket de interacción de CRBN con ZN de diferentes complejos durante distintas etapas

En la parte **A)** se observa el sistema WT y **B)** C391R después del refinamiento mediante PDB-REDO y antes de las simulaciones de QM. **C)** Sistema WT y **D)** C391R después de la simulación de QM.

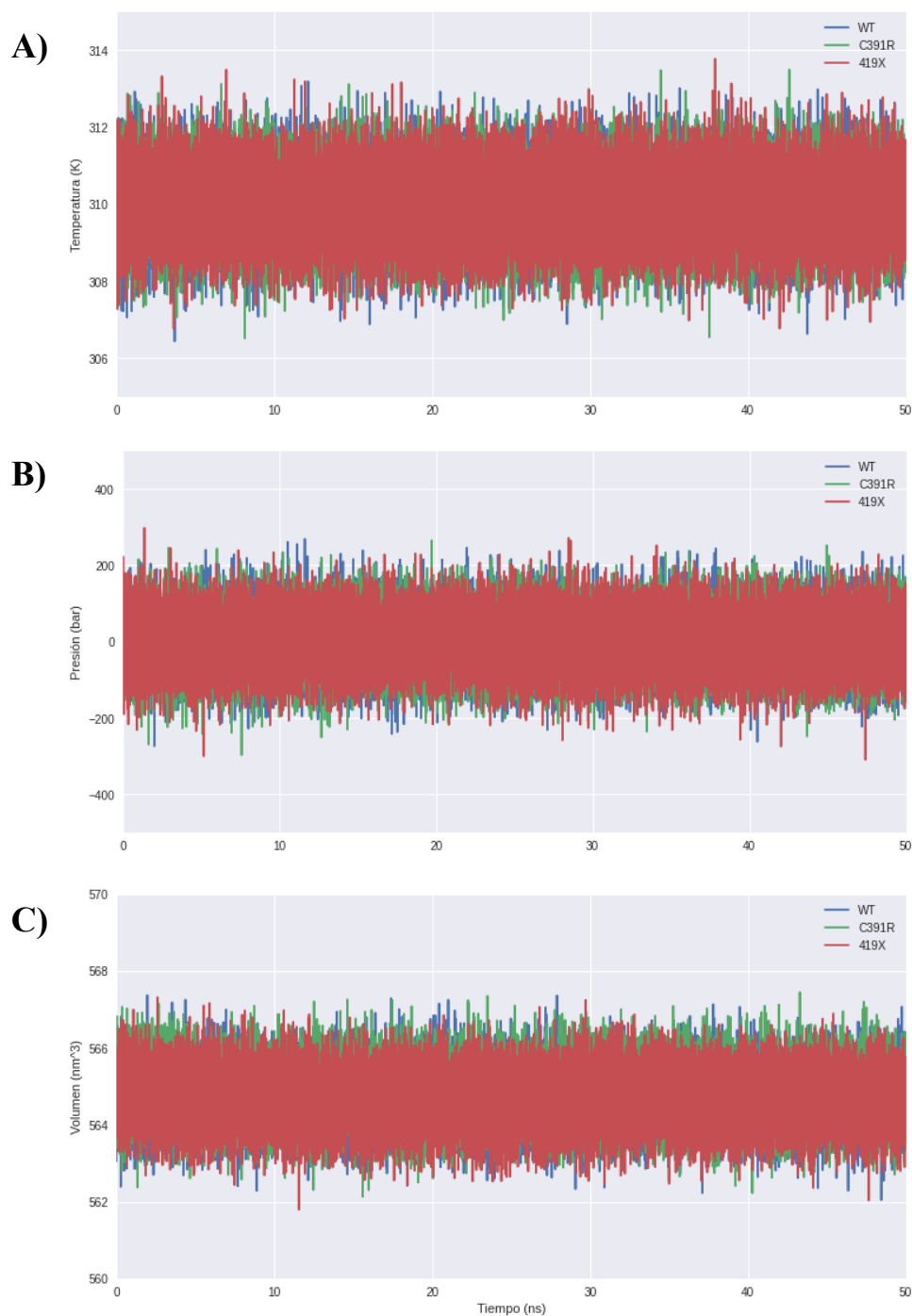


Figura 3.- Temperatura, presión y volumen promedio de las réplicas de las simulaciones de dinámica molecular de los complejos WT, C391R y R419X

Los tres gráficos muestran los valores termodinámicos promedio de las tres réplicas de las simulaciones de los sistemas WT, C391R y R419X. El eje “x” representa el tiempo de simulación en nanosegundos y el eje “y” muestra la propiedad termodinámica medida. En la parte **A)** se observa la temperatura, en **B)** la presión y en **C)** el volumen.

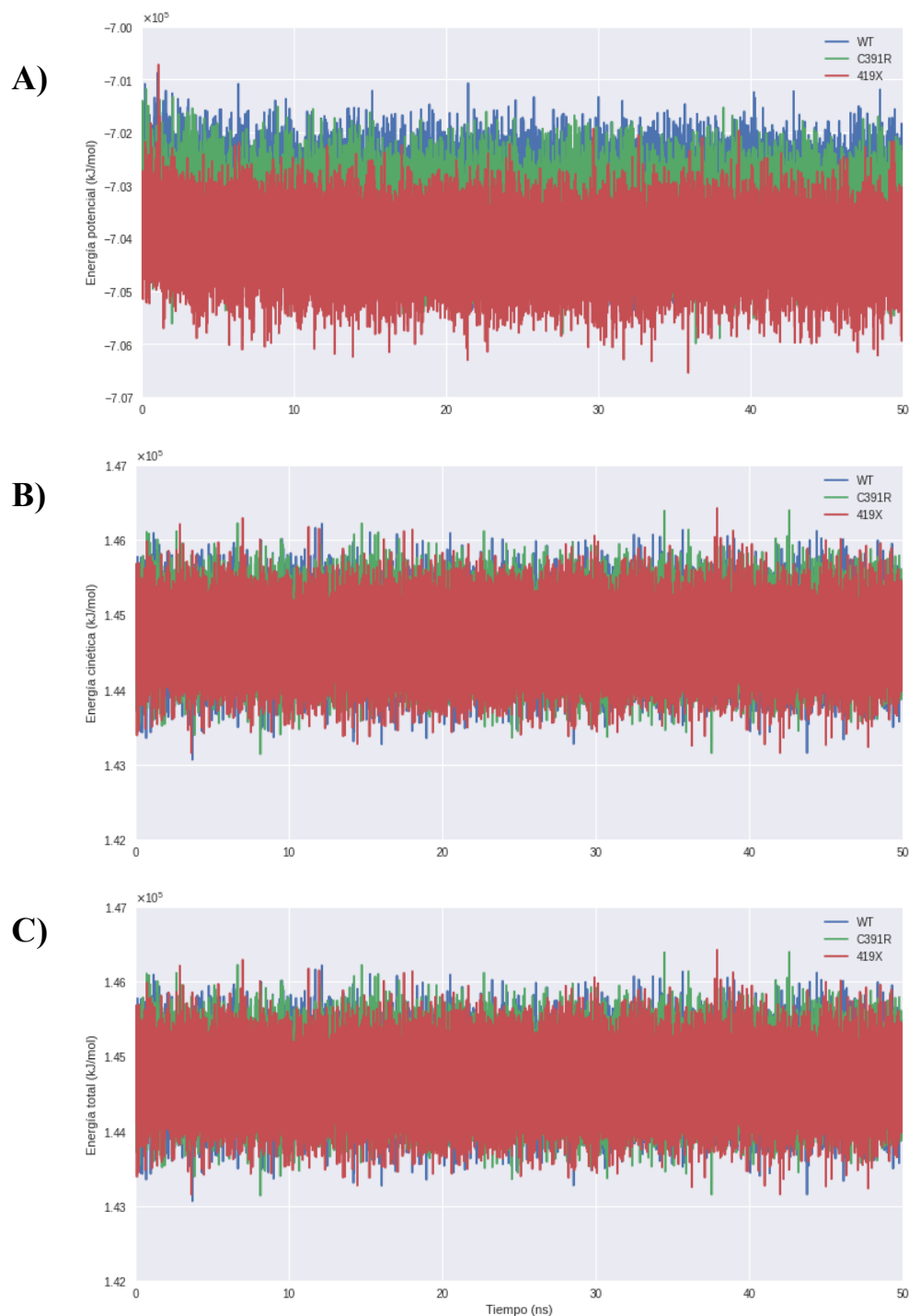


Figura 4.- Energía potencial, cinética y total promedio de las réplicas de las simulaciones de dinámica molecular de los complejos WT, C391R y R419X

Los tres gráficos muestran los valores energéticos promedio de las tres réplicas de las simulaciones de los sistemas WT, C391R y R419X. El eje “x” representa el tiempo de simulación en nanosegundos y el eje “y” muestra la propiedad energética medida. En la parte **A)** se observa la energía potencial, en **B)** la energía cinética y en **C)** la energía total.

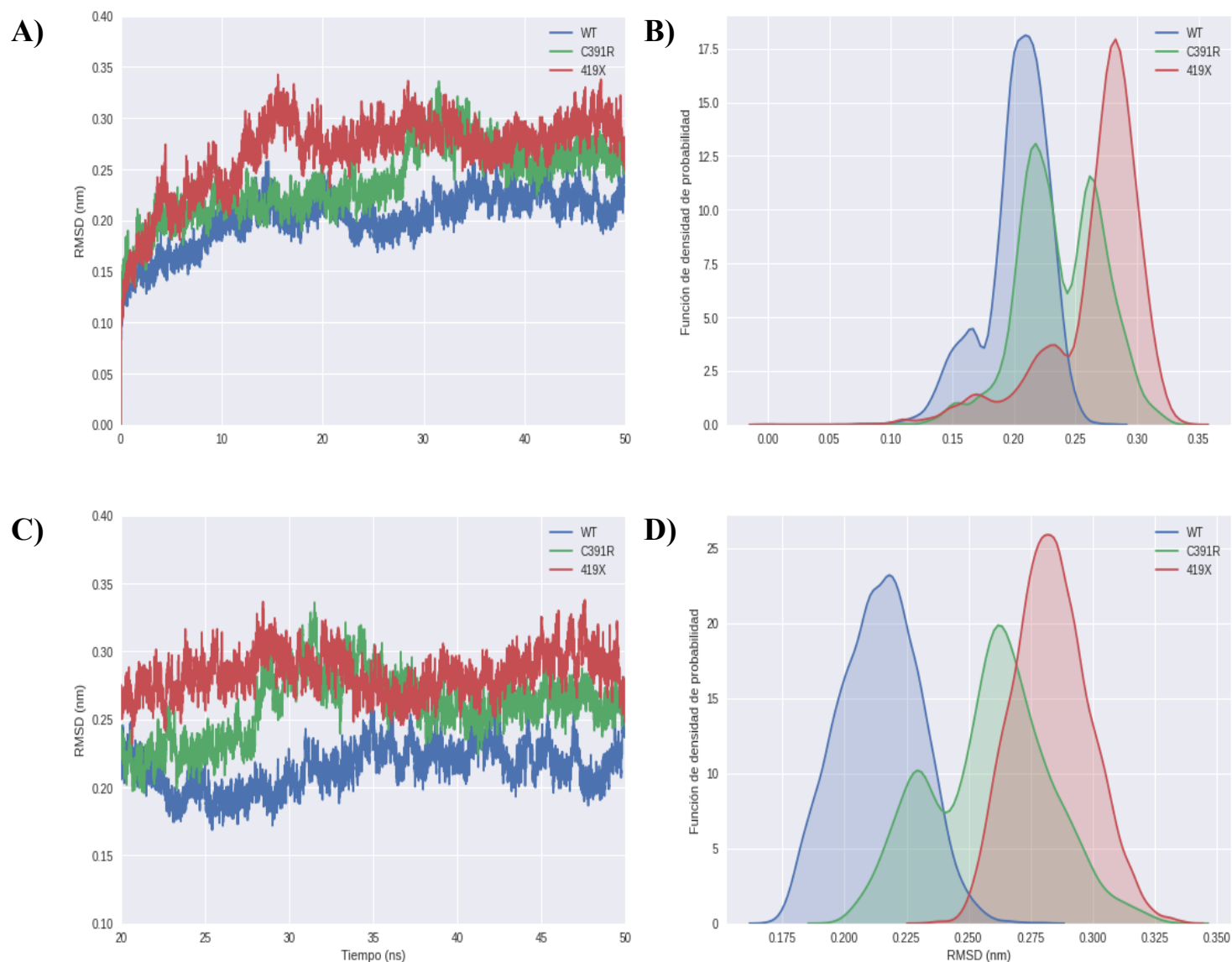


Figura 5.- RMSD promedio de las tres réplicas de las simulaciones de dinámica molecular de los complejos WT, C391R y R419X

La parte **A)** muestra el cambio de RMSD durante 50 ns de simulación y **C)** durante los últimos 30 ns. En ambos gráficos el eje x representa el tiempo de simulación en nanosegundos y el eje y muestra los valores de RMSD. Las partes **B)** y **D)** muestran la función de densidad de probabilidad de los gráficos **A)** y **C)** respectivamente.

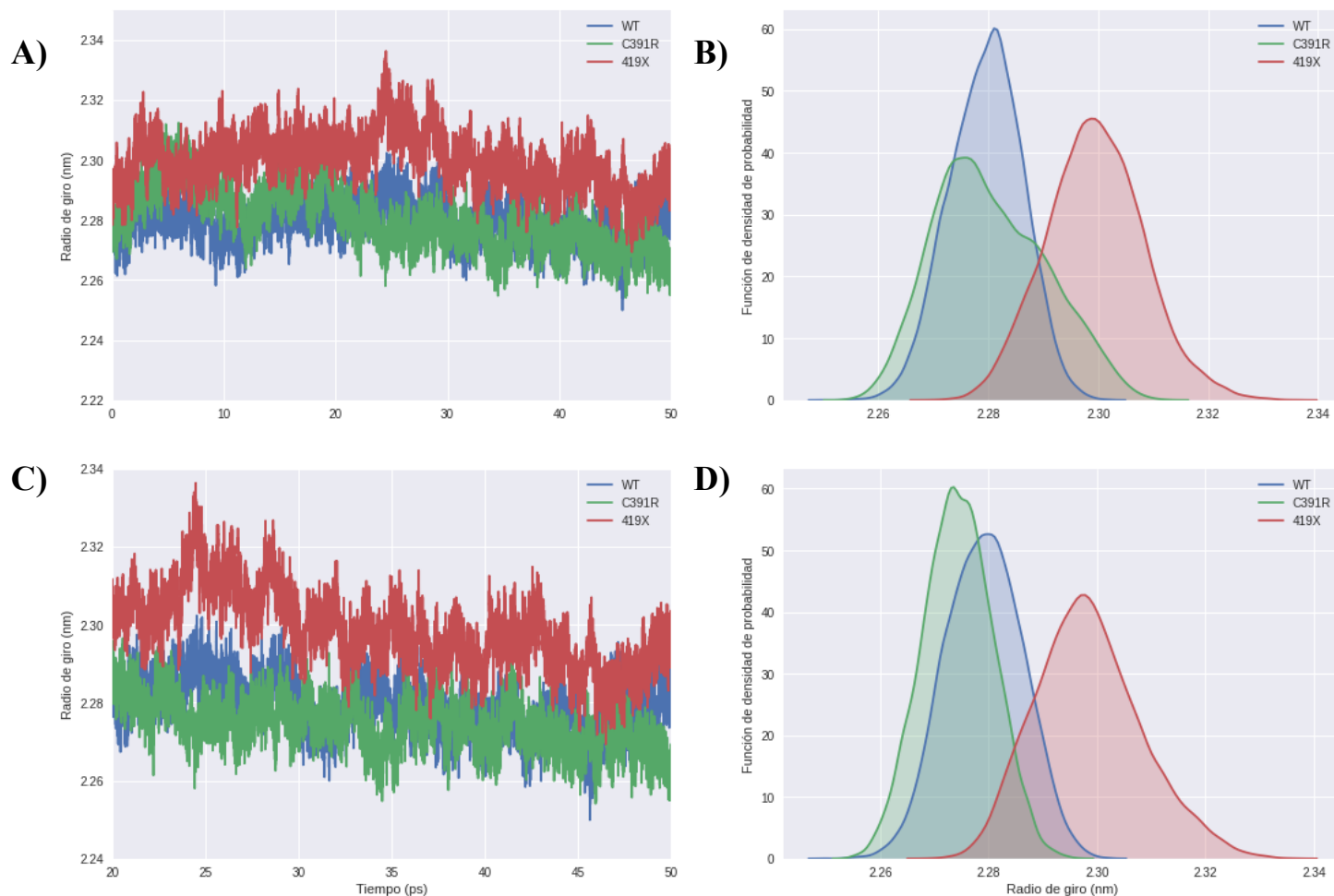


Figura 6.- Rg promedio de las tres réplicas de las simulaciones de dinámica molecular de los complejos WT, C391R y R419X

La parte **A)** muestra el cambio del radio de giro durante 50 ns de simulación y **C)** durante los últimos 30 ns. En ambos gráficos el eje “x” representa el tiempo de simulación en nanosegundos y el eje “y” muestra los valores de Rg. Las partes **B)** y **D)** muestran la función de densidad de probabilidad de los gráficos **A)** y **C)** respectivamente.

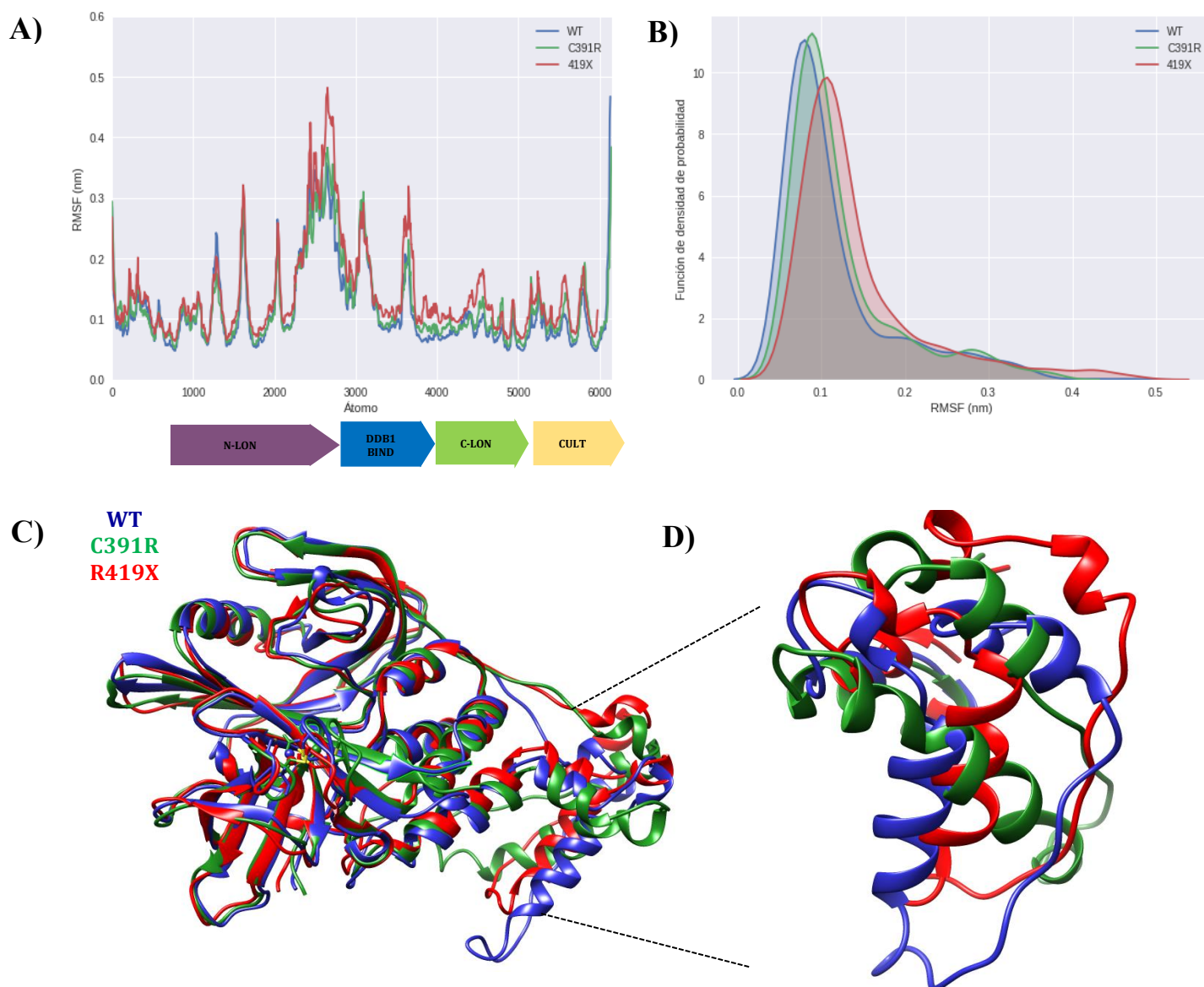


Figura 7.- RMSF de las tres réplicas de las simulaciones de dinámica molecular de los complejos WT, C391R y R419X y superposición de los sistemas completos y de la región con mayor RMSF

La parte **A)** muestra el cambio de RMSF durante la simulación, el eje “x” representa los átomos de los residuos de cada sistema proteico y el eje “y” muestra los valores de RMSF. La parte **B)** muestra la función de densidad de probabilidad de **A)**. En **C)** se observa el alineamiento de las estructuras finales de las simulaciones de los tres sistemas, y en **D)** se proyecta la sección de las proteínas con los átomos con mayor variación de RMSF, de 3500 a 4500.

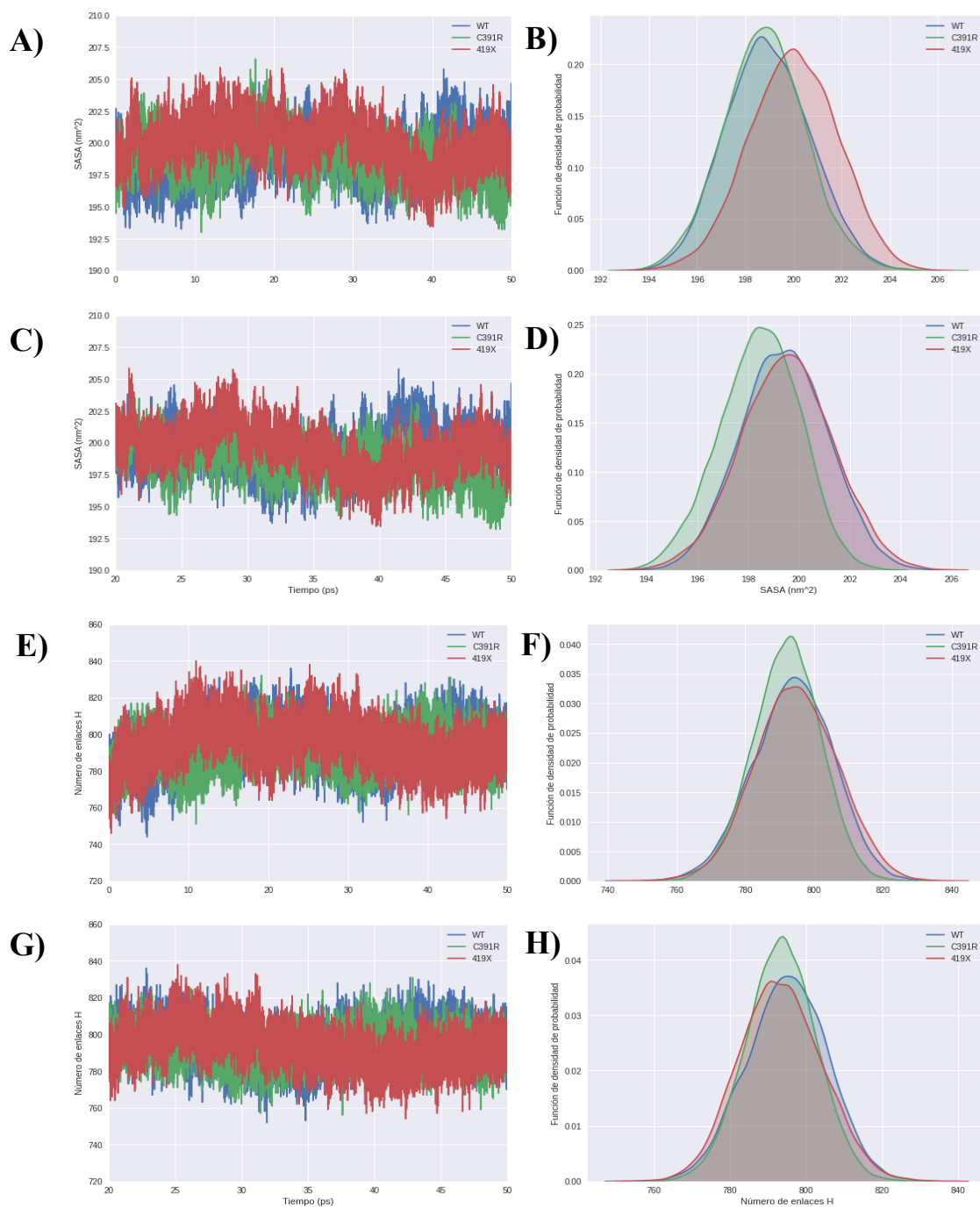


Figura 8.- SASA y número de enlaces de hidrógeno promedio de las réplicas de las simulaciones de dinámica molecular de los complejos WT, C391R y R419X

Las partes A) y E) muestran el cambio de SASA y el número de enlaces de hidrógeno respectivamente durante 50 ns de simulación, y en C) y G) se observa el cambio de los mismos parámetros durante los últimos 30 ns. En los cuatro gráficos gráficos el eje “x” representa el tiempo de simulación en nanosegundos y el eje “y” muestra los valores de los parámetros estructurales calculados. Las partes B), D) F) y H) muestran la función de densidad de probabilidad de los gráficos A), C), E), y G) respectivamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, M., van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., & GROMACS development team. (2019). *GROMACS User Manual version 2019*. Recuperado el 10 de Octubre del 2020 de <http://www.gromacs.org>
- Baig, M., Sudhakar, D., Kalaiarasan, P., Subbarao, N., Wadhawa, G., Lohani, M., ... Khan, A. (2014). Insight into the Effect of Inhibitor Resistant S130G Mutant on Physico-Chemical Properties of SHV Type Beta-Lactamase: A Molecular Dynamics Study. *PLOS ONE*, 9(12), e112456. doi: 10.1371/journal.pone.0112456
- Becke, A. (2014). Perspective: Fifty years of density-functional theory in chemical physics. *The Journal of Chemical Physics*, 140(18), 18A301. doi: 10.1063/1.4869598
- Berry, R. (2019). *Three Laws of Nature: A Little Book on Thermodynamics*. Yale University Press.
- Bolnykh, V., Rothlisberger, U., & Carloni, P. (2020). Biomolecular Simulation: A Perspective from High Performance Computing. *Israel Journal of Chemistry*, 60(7), 694–704. doi: 10.1002/ijch.202000022
- Callaway, E. (2020). ‘It will change everything’: DeepMind’s AI makes gigantic leap in solving protein structures. *Nature*, 588(7837), 203–204. doi: 10.1038/d41586-020-03348-4
- Chamberlain, P., Lopez-Girona, A., Miller, K., Carmel, G., Pagarigan, B., Chie-Leon, B., ... Cathers, B. (2014). Structure of the human Cereblon-DDB1-lenalidomide complex reveals basis for responsiveness to thalidomide analogs. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(9), 803–809. doi: 10.1038/nsmb.2874
- Cheatham, T., Miller, J., Fox, T., Darden, T., & Kollman, P. (1995). Molecular Dynamics Simulations on Solvated Biomolecular Systems: The Particle Mesh Ewald Method

- Leads to Stable Trajectories of DNA, RNA, and Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 117(14), 4193–4194. doi: 10.1021/ja00119a045
- Dennington, R., Keith, T., & Millam, J. (2009). *GaussView* (Versión 6) [Computer software]. Semichem Inc.
- Dror, R., Dirks, R., Grossman, J., Xu, H., & Shaw, D. (2012). Biomolecular simulation: A computational microscope for molecular biology. *Annual Review of Biophysics*, 41, 429–452. doi: 10.1146/annurev-biophys-042910-155245
- Eichner, R., Heider, M., Fernández-Sáiz, V., van Bebber, F., Garz, A., Lemeer, S., ... Bassermann, F. (2016). Immunomodulatory drugs disrupt the cereblon-CD147-MCT1 axis to exert antitumor activity and teratogenicity. *Nature Medicine*, 22(7), 735–743. doi: 10.1038/nm.4128
- Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M., Madhusudhan, M., Eramian, D., Shen, M., ... Sali, A. (2006). Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. *Current protocols in bioinformatics*, 0(5), 5-6. doi: 10.1002/0471250953.bi0506s15
- Frisch, M., Trucks, G., Schlegel, H., Scuseria, G., Robb, M., Cheeseman, J., ... Barone, V. (2016). *Gaussian 16, Revision A. 03* (Versión 16) [Computer software]. Gaussian Inc.
- Haddad, Y., Adam, V., & Heger, Z. (2020). Ten quick tips for homology modeling of high-resolution protein 3D structures. *PLOS Computational Biology*, 16(4), e1007449. doi: 10.1371/journal.pcbi.1007449
- Handing, K., Niedzialkowska, E., Shabalina, I., Kuhn, M., Zheng, H., & Minor, W. (2018). Characterizing metal binding sites in proteins with X-ray crystallography. *Nature protocols*, 13(5), 1062–1090. doi: 10.1038/nprot.2018.018
- Higgins, J., Pucilowska, J., Lombardi, R., & Rooney, J. (2004). A mutation in a novel ATP-dependent Lon protease gene in a kindred with mild mental retardation. *Neurology*, 63(10), 1927–1931. doi: 10.1212/01.wnl.0000146196.01316.a2

- Hollingsworth, S., & Dror, R. (2018). Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron*, 99(6), 1129–1143. doi: 10.1016/j.neuron.2018.08.011
- Hospital, A., Goñi, J., Orozco, M., & Gelpí, J. (2015). Molecular dynamics simulations: Advances and applications. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry: AABC*, 8, 37–47. doi: 10.2147/AABC.S70333
- Huggins, D., Biggin, P., Dämgen, M., Essex, J., Harris, S., Henchman, R., ... Kamp, M. (2019). Biomolecular simulations: From dynamics and mechanisms to computational assays of biological activity. *WIREs Computational Molecular Science*, 9(3), e1393. doi: 10.1002/wcms.1393
- Hunter, J. (2007). Matplotlib: A 2D Graphics Environment. *Computing in Science Engineering*, 9(3), 90–95. doi: 10.1109/MCSE.2007.55
- Joosten, R., Long, F., Murshudov, G., & Perrakis, A. (2014). The PDB_REDO server for macromolecular structure model optimization. *IUCrJ*, 1(Pt 4), 213–220. doi: 10.1107/S2052252514009324
- Lins, L., Thomas, A., & Brasseur, R. (2003). Analysis of accessible surface of residues in proteins. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 12(7), 1406–1417. doi: 10.1110/ps.0304803
- Lupas, A., Zhu, H., & Korycinski, M. (2015). The Thalidomide-Binding Domain of Cereblon Defines the CULT Domain Family and Is a New Member of the β -Tent Fold. *PLoS Computational Biology*, 11(1). doi: 10.1371/journal.pcbi.1004023
- Marenich, A., Cramer, C., & Truhlar, D. (2009). Universal solvation model based on solute electron density and on a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 113(18), 6378–6396. doi: 10.1021/jp810292n

- Matyskiela, M., Lu, G., Ito, T., Pagarigan, B., Lu, C., Miller, K., ... Chamberlain, P. (2016). A novel cereblon modulator recruits GSPT1 to the CRL4(CRBN) ubiquitin ligase. *Nature*, 535(7611), 252–257. doi: 10.1038/nature18611
- Min, Y., Wi, S., Kang, J., Yang, T., Park, C., Park, S., ... Lee, K. (2016). Cereblon negatively regulates TLR4 signaling through the attenuation of ubiquitination of TRAF6. *Cell Death & Disease*, 7(7), e2313. doi: 10.1038/cddis.2016.226
- Papajak, E., Zheng, J., Xu, X., Leverentz, H., & Truhlar, D. (2011). Perspectives on Basis Sets Beautiful: Seasonal Plantings of Diffuse Basis Functions. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 7(10), 3027–3034. doi: 10.1021/ct200106a
- Peters, M., Yang, Y., Wang, B., Füsti-Molnár, L., Weaver, M., & Merz, K. (2010). Structural Survey of Zinc Containing Proteins and the Development of the Zinc AMBER Force Field (ZAFF). *Journal of Chemical Theory and Computation*, 6(9), 2935–2947. doi: 10.1021/ct1002626
- Pettersen, E., Goddard, T., Huang, C., Couch, G., Greenblatt, D., Meng, E., ... Ferrin, T. (2004). UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612. doi: 10.1002/jcc.20084
- Rehman, W., Arfons, L., & Lazarus, H. (2011). The rise, fall and subsequent triumph of thalidomide: Lessons learned in drug development. *Therapeutic Advances in Hematology*, 2(5), 291–308. doi: 10.1177/2040620711413165
- Sang, Y., Yan, F., & Ren, X. (2015). The role and mechanism of CRL4 E3 ubiquitin ligase in cancer and its potential therapy implications. *Oncotarget*, 6(40), 42590–42602. doi: 10.18632/oncotarget.6052
- Shapovalov, M., & Dunbrack, R. (2011). A smoothed backbone-dependent rotamer library for proteins derived from adaptive kernel density estimates and regressions. *Structure*, 19(6), 844–858. doi: 10.1016/j.str.2011.03.019

- Sheereen, A., Alaamery, M., Bawazeer, S., Al Yafee, Y., Massadeh, S., & Eyaid, W. (2017). A missense mutation in the CRBN gene that segregates with intellectual disability and self-mutilating behaviour in a consanguineous Saudi family. *Journal of Medical Genetics*, *54*(4), 236–240. doi: 10.1136/jmedgenet-2016-104117
- Touw, W., van Beusekom, B., Evers, J., Vriend, G., & Joosten, R. (2016). Validation and correction of Zn–CysxHis_y complexes. *Acta Crystallographica. Section D, Structural Biology*, *72*(Pt 10), 1110–1118. doi: 10.1107/S2059798316013036
- Trzaskowski, B., Adamowicz, L., & Deymier, P. (2008). A theoretical study of zinc(II) interactions with amino acid models and peptide fragments. *Journal of Biological Inorganic Chemistry: JBIC: A Publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, *13*(1), 133–137. doi: 10.1007/s00775-007-0306-y
- van Beusekom, B., Joosten, K., Hekkelman, M., Joosten, R., & Perrakis, A. (2018). Homology-based loop modeling yields more complete crystallographic protein structures. *IUCrJ*, *5*(5), 585–594. doi: 10.1107/S2052252518010552

ANEXOS

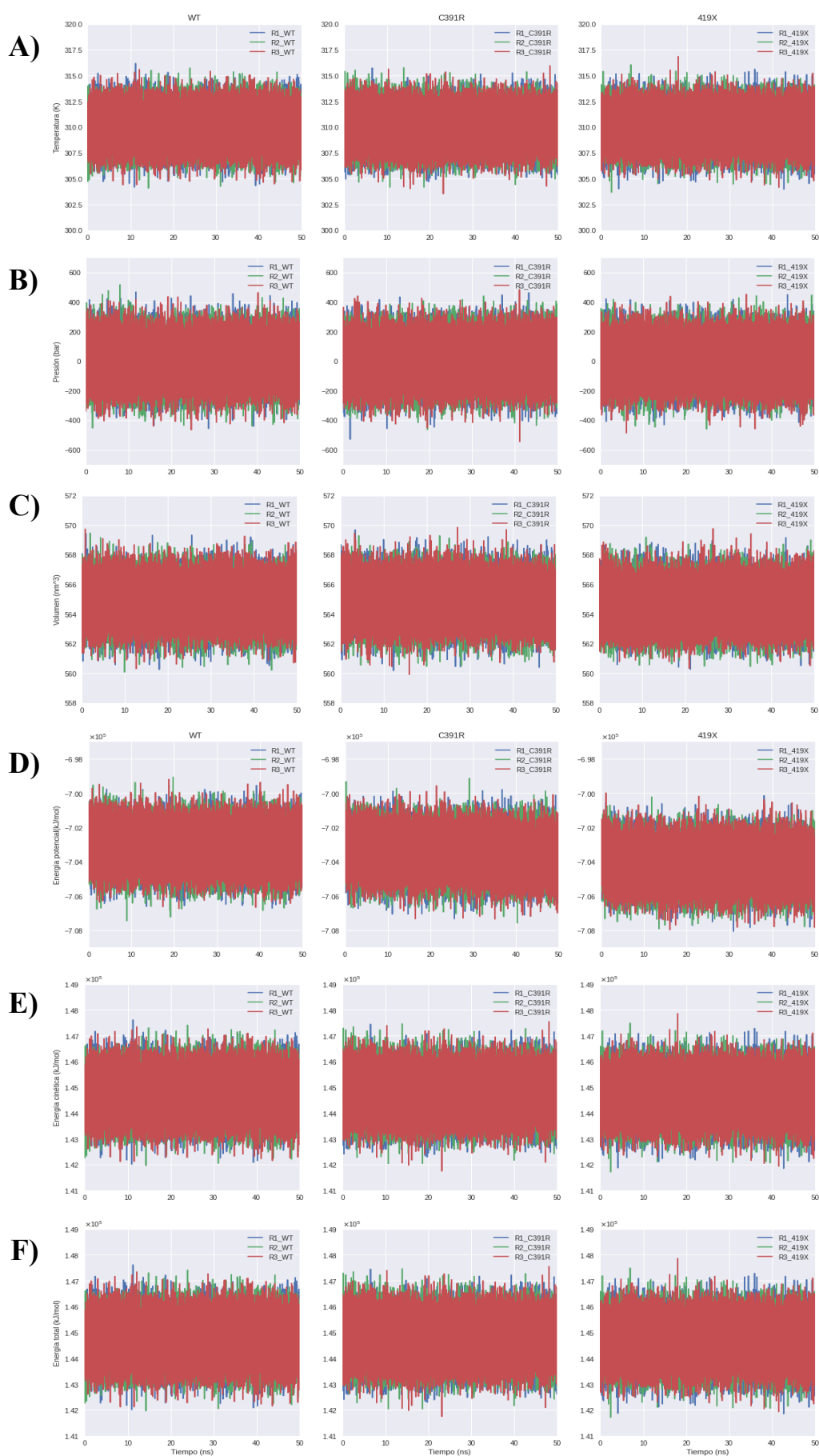
Anexo A: Distancias de enlaces de los átomos que participan en el pocket de interacción con ZN de 11 estructuras diferentes del CRBN disponibles en la base de datos RSCB PDB

ID del RSCB PDB	Ligando (ID PubChem)	Zn-S (Cys323) (Å)	Zn-S (Cys326) (Å)	Zn-S (Cys391) (Å)	Zn-S (Cys394) (Å)
4tz4	S- Lenalidomide (12044976)	2.28	2.4	2.11	2.28
5fqd	S- Lenalidomide (12044976)	2.4	2.46	2.45	2.38
6h0f	S- Pomalidomide (9965330)	2.42	2.28	2.45	2.38
6h0g	S- Pomalidomide (9965330)	2.57	2.33	2.54	2.71
5hxb	CC-885 (24788636)	2.18	2.29	1.79	2.43
5v3o	CC-220 (53328043)	2.49	2.46	4.49	2.35
6bn7	dBet23 (138108113)	2.34	2.43	2.3	2.41
6bnb	dBET57 (138108340)	2.65	2.61	2.56	2.6
6bn9	dBet70	2.58	2.31	2.32	2.55
6boy	dBET6 (121427831)	2.31	2.35	2.4	2.27
6bn8	dBet55	1.96	2.43	2.22	1.93
Promedio		2.38	2.40	2.51	2.39
Desviación estándar		0.20	0.10	0.69	0.20

Anexo B: Ángulos de enlaces de los átomos que participan en el pocket de interacción con ZN de 11 estructuras diferentes del CRBN disponibles en la base de datos RSCB PDB

ID del RSCB PDB	Ligando (ID PubChem)	S(Cys323)-Zn-S(Cys326) angle (°)	S(Cys323)-Zn-S(Cys391) angle (°)	S(Cys323)-Zn-S(Cys394) angle (°)	S(Cys326)-Zn-S(Cys391) angle (°)	S(Cys326)-Zn-S(Cys394) angle (°)	S(Cys391)-Zn-S(Cys394) angle (°)
4tz4	S-Lenalidomide (12044976)	102.34	109.53	89.13	109.9	124.13	117.15
5fqd	S-Lenalidomide (12044976)	117.36	114.7	100.63	106.46	105.1	112.2
6h0f	S-Pomalidomide (9965330)	121.29	108.21	93.59	101.93	127.57	102.21
6h0g	S-Pomalidomide (9965330)	110.73	137.29	97.33	110.04	80.44	101.42
5hxb	CC-885 (24788636)	88.42	97.46	112	97.45	114.07	100.89
5v3o	CC-220 (53328043)	123.34	108.5	90.64	121.72	80.4	108.19
6bn7	dBet23 (138108113)	114.23	140.71	92.78	97.28	90.1	110.73
6bnb	dBET57 (138108340)	118.09	140.27	82.55	101.23	91.12	91.7
6bn9	dBet70	130.02	125.63	86.35	104.34	90.06	95.98
6boy	dBET6 (121427831)	116.08	136.79	101.45	95.38	94.66	104.81
6bn8	dBet55	128.2	126.2	95.8	102.36	92.35	99.62
Promedio		115.46	122.30	94.75	104.37	99.09	104.08
Desviación estándar		11.87	15.33	8.11	7.53	16.39	7.47

Anexo C: Temperatura, presión, volumen, energía potencial, energía cinética y energía total de las tres réplicas de las simulaciones de dinámica molecular de los complejos WT, C391R y R419X



Anexo D: RMSD, Rg, SASA, Número de enlaces de hidrógeno y RMSF de las tres réplicas de las simulaciones de dinámica molecular de los complejos WT, C391R y R419X

