



Universidad de Guanajuato
División de Ciencias Naturales y Exactas

**“Estudio toxicológico *in silico*
del mecanismo de inhibición del plomo (Pb^{2+})
en hexocinasa de *S. cerevisiae*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA:

ÓSCAR ADRIÁN RODRÍGUEZ VARGAS

DIRECTOR:

Dr. Juvencio Robles García

CODIRECTORA:

Dra. Minerva Martínez Alfaro

GUANAJUATO, GTO., AGOSTO DE 2026

Jurado asignado para la evaluación de este trabajo

Presidente

Dr. Marco Antonio García Revilla
Departamento de Química, DCNE
Universidad de Guanajuato

Secretario

Dr. Miguel Ángel Vázquez Guevara
Departamento de Química, DCNE
Universidad de Guanajuato

Vocal

Dr. Axel Blokesch
Faculty of Computer Science and Engineering
Frankfurt University of Applied Sciences

Suplente

Dr. Erik Díaz Cervantes
Departamento de Alimentos, Centro Interdisciplinario del Noreste
Campus Irapuato-Salamanca
Universidad de Guanajuato

Agradecimientos

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Química Teórica y Computacional, y en el laboratorio de Toxicología Mecánica de la DCNE, Campus Guanajuato, UG, bajo la dirección del Dr. Juvencio Robles García y la codirección de la Dra. Minerva Martínez Alfaro, respectivamente, y contó con la beca número 4024131 de la Secretaría de Ciencia, Humanidades y Tecnología e Innovación (SECIHTI).

A los miembros de mi comité sinodal, los doctores Marco A. García Revilla, Miguel A. Vázquez, Axel Blockesh y Erik Díaz, por su tiempo, correcciones y apoyo en la revisión de este proyecto.

Al Dr. Marco, en particular, quiero agradecerle por sus enseñanzas sobre química cuántica y termodinámica estadística, así como por la paciencia que me tuvo para solventar la curva de mi ignorancia. Por las tardes compartidas, de música y pizza. Por dialogar conmigo respecto a los “actos de fe” y enseñarme a “matar moscas a cañonazos”.

A mi asesora, la Dra. Minerva, por recibirme en su laboratorio y formarme en el área de la toxicología mecánica. Por ofrecerme el tiempo y el espacio para conversar sobre bioquímica, el área de las ciencias naturales en donde se traslapa el nicho de nuestra fascinación por la vida biológica y sus enrevesados mecanismos moleculares. Por su apoyo incondicional y por exigirme lo propio.

A mi asesor, el Dr. Juvencio, por recibirme en su laboratorio y aceptarme como su estudiante. Por permitirme asistirlo como profesor y compartir no solamente las alegrías y los disgustos de la enseñanza, sino también una galleta de chocolate después de cada clase. Por sus enseñanzas y por mostrarme un mundo anteriormente desconocido para mí: la elegancia y la belleza detrás de la Teoría de Funcionales de la Densidad. Por su apoyo y comprensión, tanto en lo académico como lo personal. Pero tanto más, por las pruebas impuestas que me permitieron darme cuenta de que sí existía en mí el potencial de plantearme preguntas más complejas sobre la naturaleza. Hoy, vivo la dicha de agradecerle la confianza que me ha tenido.

A mis colegas del laboratorio, que son muchos: Adán, Ismael, Itzel, Rogelio, Óliver, Cristina, Paola, Gil, Brisa y Diana. Quiero agradecerles por lo que hemos compartido, como las jarras de café “absorbidas” y las rebanadas de pastel “engullidas”, los desvelos, las discusiones, las risas e incluso los enfurruñamientos. También he de agradecerles por sus arduas críticas sobre mi trabajo, que marcaron las pautas intelectuales que posteriormente me llevarían a resolver y concluir mi investigación. Realmente creo, colegas y amigos, que algún día hallaremos una insólita verdad sobre la naturaleza. Finalmente, quiero agradecerles por generarme un sentimiento de pertenencia como no había vivido anteriormente entre un núcleo académico de jóvenes científicos. Su amistad es un tesoro que aprecio en lo más hondo de mi pecho.

A Cristina, por cuánto me ha apoyado y enseñado. Por las mañanas, tardes y noches resolviendo ecuaciones a su lado. Por la ternura con la que me ha tratado, y los besos que me ha obsequiado.

A mi madre, la mujer más dulce, por proveerme de los pilares sentimentales y materiales que han sustentado mi vida académica desde la licenciatura. Por su apoyo incondicional, por su amor. Porque las flaquezas mías se esfuman en cuanto escucho su voz. Porque todo miedo mío, ella lo convierte en virtud.

A mi hermana Sofía y la anciana Crowley de pestañas güeras. Porque en la soledad, ambas han permanecido alegres a mi lado. Me han mimado, cuando he sentido que el mundo está por caérseme a pedazos. A Josué, a mis hermanas Wewé y Nicole, por la compañía y el apoyo que también me han brindado.

A mi padre, de regio porte y sabias barbas. Por los vericuetos que hemos discurrido juntos y de la mano, como cuando era niño. Por retornar a mi vida y traer consigo el recuerdo de una prístina enseñanza, casi olvidada en los albores de la infancia: Cómo soñar, cómo soñar con serpientes de mar.

Por último, pero no menos importante... A mi mejor amigo Pablo, colega en las aventuras detectivescas que nos imaginamos para pasar el rato. Por su fidelidad, por su atención, por siempre iluminarme el corazón.

Resumen

El envenenamiento por plomo (Pb) es un grave problema de salud pública. Sus mecanismos toxicológicos no están del todo descritos, pero es sabido que la exposición a este metal genera afectaciones irreversibles en múltiples sistemas mediante mecanismos inmunomoduladores, oxidativos e inflamatorios. Ya sea uniéndose como Pb^{2+} libre o desplazando a metales endógenos mediante mimetización química, la interacción de este tóxico con proteínas clave del metabolismo celular resulta en graves afectaciones.

Las hexocinasas (HK's), como enzimas centrales en el catabolismo de la glucosa, son un blanco de especial interés debido a que están implicadas en múltiples procesos celulares como la respuesta al daño a DNA, la homeostasis redox y la proliferación celular, entre otros; estas enzimas catalizan la transferencia de un grupo fosforilo del complejo Mg-ATP^{2-} a una molécula de glucosa para formar Glucosa-6-fosfato, la cual entra en vías metabólicas alternas.

En nuestro grupo, se ha observado que el Pb^{2+} inactiva la HK de *S. cerevisiae* cuando es preincubada sin glucosa, con Mg^{2+} y ATP^{4-} por 15 min. La actividad se recupera parcialmente al añadir Mg^{2+} al sistema y no se observa recuperación de la actividad con metales endógenos como Ca^{2+} y Mn^{2+} . Con el objetivo de elucidar el mecanismo toxicológico, se realizó un análisis estructural de la enzima y se describieron propiedades fisicoquímicas y electrónicas de los complejos Metal- ATP^{2-} (Metal = Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} y Pb^{2+}).

Los cálculos realizados mediante la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) —al nivel de teoría B3LYP con los conjuntos base 6-31+G(d, p) para C, H, O, N, P, Mg, Ca y Mn, y LANL2DZ para Pb— indican que la formación de complejos Pb-ATP^{2-} es termodinámicamente más favorable que la de complejos Mg-ATP^{2-} , y estos se forman por adición o por desplazamiento y mimetización química; en términos de reactividad global, todos los metales y modos de coordinación incrementan la susceptibilidad ante un ataque nucleofílico; en términos de reactividad local, hemos demostrado que la principal función del Mg^{2+} no es incrementar la electrofilicidad del fósforo- γ para su transferencia, sino estabilizar a la cadena trifosfato y disminuir la nucleofilicidad del $\text{PO}_{3-\gamma}$ para que se lleve a cabo el ataque nucleofílico por parte del 6-OH de la glucosa; este efecto implica que el magnesio esté coordinado con los fosfatos $\gamma\beta$, lo cual no se observa con ningún otro metal endógeno ni forma de coordinación. Los únicos complejos que tienen un efecto similar sobre el ATP^{4-} son los complejos $\text{Pb-ATP}_{\gamma\beta}^{2-}$ y $\text{Pb-ATP}_{\gamma\beta\alpha}^{2-}$. Los análisis de acoplamiento molecular, por otro lado, indican que todos los complejos Metal- ATP^{2-} se unen al sitio de unión de ATP^{4-} con la misma energía, independientemente del metal o el modo de coordinación. No obstante, las simulaciones por dinámica molecular de los complejos $\text{Mg-ATP}_{\gamma\beta}^{2-}$ y $\text{Pb-ATP}_{\gamma\beta}^{2-}$, muestran que la ocupación del sitio por parte del complejo de Pb^{2+} es transitoria. La predicción de sitios de unión de Pb^{2+} y la evaluación por dinámica molecular y DFT de uno de estos sitios, revela que por lo menos un ion de Pb^{2+} se une de manera estable en el sitio de unión de

glucosa y este no es desplazado por el sustrato endógeno. De tal manera que la formación de complejos Pb-ATP^{2-} y su capacidad de competir por el sitio de unión de ATP^{4-} , sí están relacionadas con la actividad relativa en los ensayos, pero no constituyen el principal mecanismo de inactivación de la HK. El principal mecanismo toxicológico es, aparentemente, la unión de Pb^{2+} al sitio de unión de glucosa. Finalmente, el análisis del estado de conservación entre las hexocinasas sugiere que el mecanismo toxicológico es el mismo para ambas isoformas de *S. cerevisiae*, y es posible que tenga efectos similares en HK's humanas en ensayos *in vitro*.

No obstante, es importante recalcar que para confirmar el sitio de unión Pb-glucosa, es necesario llevar a cabo estudios por cristalografía de rayos X. Además, hasta ahora sólo se ha analizado el efecto del Pb^{2+} sobre la actividad de la HK en ensayos enzimáticos *in vitro*, en donde no se toma en cuenta la participación de otras biomoléculas, ni las redes de regulación a nivel celular que podrían tener efecto sobre la enzima o los mecanismos toxicológicos.

Abstract

Lead (Pb) poisoning represents a major threat to public health. Its toxicological mechanisms are not fully understood, but exposure to this metal is known to cause irreversible damage to multiple systems through immunomodulatory, oxidative, and inflammatory mechanisms. Whether through the binding of free Pb^{2+} ions or through the displacement of endogenous metals by chemical mimicry, the interaction of this toxicant with key proteins involved in cellular metabolism results in severe biological dysfunction.

Hexokinases (HKs), as central enzymes in glucose catabolism, are targets of particular interest because they are involved in multiple cellular processes, including the DNA damage response, redox homeostasis and cell proliferation, among others. These enzymes catalyze the transfer of a phosphoryl group from the Mg-ATP^{2-} complex to glucose, forming glucose-6-phosphate, which subsequently enters alternative metabolic pathways.

In our group, it has been observed that Pb^{2+} inactivates the HK of *S. cerevisiae* when the enzyme is preincubated without glucose but in the presence of Mg^{2+} and ATP^{4-} for 15 min. Enzymatic activity is partially restored upon addition of Mg^{2+} to the system, whereas no recovery is observed with endogenous metals such as Ca^{2+} and Mn^{2+} . To elucidate the toxicological mechanism, we performed a structural analysis of the enzyme and characterized the physicochemical and electronic properties of Metal- ATP^{2-} complexes (Metal = Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} y Pb^{2+}).

Density Functional Theory (DFT) calculations —using B3LYP with 6-31+G(d,p) basis set for C, H, O, N, P, Mg, Ca and Mn and LANL2DZ for Pb— indicate that the formation of Pb-ATP^{2-} complexes is thermodynamically more favorable than that of Mg-ATP^{2-} complexes, and that these complexes are formed either by addition or through displacement and chemical mimicry. In terms of global reactivity, all metals and coordination modes increase susceptibility to nucleophilic attack. In terms of local reactivity, we demonstrated that the primary role of Mg^{2+} is not to increase the electrophilicity of the γ -phosphorus for transfer, but rather to stabilize the triphosphate chain and decrease the nucleophilicity of $\text{PO}_{3-\gamma}$, thereby enabling nucleophilic attack by the 6-OH group of glucose. This effect requires Mg^{2+} coordination with the $\gamma\beta$ phosphates and is not observed with any other endogenous metal or coordination mode. The only complexes that exert a similar effect on ATP^{4-} are $\text{Pb-ATP}_{\gamma\beta}^{2-}$ and $\text{Pb-ATP}_{\gamma\beta\alpha}^{2-}$ complexes. Molecular docking analyses, on the other hand, indicate that all Metal- ATP^{2-} complexes bind to the ATP-binding site with the same energy, regardless of the metal or coordination mode. Nevertheless, molecular dynamics simulations of the $\text{Mg-ATP}_{\gamma\beta}^{2-}$ and $\text{Pb-ATP}_{\gamma\beta}^{2-}$ complexes show that occupancy of the binding site by the Pb^{2+} complex is transient. Prediction of Pb-binding sites, together with molecular dynamics and DFT evaluation of one of these sites, revealed that at least one Pb^{2+} ion binds stably to the glucose-binding site and is not displaced by the endogenous substrate. Thus, although the formation of Pb-ATP^{2-} complexes and their ability to compete for the ATP-binding site are

related to the relative activity observed in the assays, they do not constitute the principal mechanism of HK inactivation. Instead, the main toxicological mechanism appears to be the binding of Pb^{2+} to the glucose-binding site. Finally, conservation analysis among hexokinases suggests that the toxicological mechanism is the same for both *S. cerevisiae* isoforms and may exert similar effects on human HKs *in vitro* assays.

Nevertheless, it is important to emphasize that confirmation of the Pb–glucose binding site requires further X-ray crystallography studies. Furthermore, to date, the effect of Pb^{2+} on HK activity has only been evaluated through *in vitro* enzymatic assays, which do not consider the participation of other biomolecules or the cellular regulatory networks that could influence either the enzyme itself or the associated toxicological mechanisms.

Índice

Agradecimientos	3
Resumen	5
Abstract	7
Abreviaturas	11
Índice de Figuras	12
Índice de Tablas	14
Índice de Información Suplementaria	14
Objetivo general.....	15
Objetivos particulares.....	15
I. Introducción	16
1.1 Efectos de la exposición a metales pesados y fisiopatología del plomo	16
1.1.1 Efectos fisiopatológicos del plomo.....	18
1.2 Enzimas Hexocinasas	21
1.2.1 Hexocinasas de <i>S. Cerevisiae</i>	24
1.2.2 Hexocinasas Humanas (I-IV)	29
1.3 Implicaciones del Mg como cofactor del ATP	32
1.3.1 Rol del magnesio en biosistemas	33
1.4 Métodos <i>in silico</i> para el análisis de sistemas bioquímicos y biomoleculares	35
II. Antecedentes	40
III. Hipótesis.....	40
Justificación.....	40
IV. Metodología	42
4.1 Cálculos a través de la teoría de funcionales de la densidad (DFT)	42
4.2 Análisis múltiple de secuencias	45
4.3 Acoplamiento molecular de los complejos Metal-ATP ²⁻ en HK de <i>S. cerevisiae</i>	46
4.4 Predicción de sitios de unión de Pb ²⁺	49
4.5 Dinámicas Moleculares de ATP ⁴⁻ , Mg-ATP ²⁻ , Pb-ATP ²⁻ y Pb ²⁺	49
4.6 Diseño de un modelo finito del sitio de unión de Pb ²⁺ y glucosa	51

V. Resultados.....	53
5.1 Análisis por la teoría de funcionales de la densidad del ATP ⁴⁻ y los complejos Metal-ATP ²⁻	53
5.2 Análisis del estado de conservación entre HK's de <i>S. cerevisiae</i> y <i>H. sapiens</i>	70
5.3 Análisis de las interacciones intermoleculares entre los complejos Metal-ATP ²⁻ y la HK PI de <i>S. cerevisiae</i>	74
5.4 Predicción de posibles sitios de unión de Pb.....	79
5.5 Análisis de dinámica molecular	83
5.6 Análisis por DFT de los modelos finitos de unión de Pb y glucosa	90
VI. Discusión de Resultados.....	90
VII. Conclusiones.....	96
7. 1 Perspectivas	96
VIII. Información Suplementaria (IS).....	96
IX. Producción académica generada a partir de esta tesis.	104
X. Referencias	105

Abreviaturas

Å	—Angstrom ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
^{APP} V _{MAX}	—Velocidad máxima aparente
ADHD	—Trastorno por déficit de atención e hiperactividad
ALAD	—Ácido delta-aminolevulínico deshidratasa
ATP	—Adenosín trifosfato
Bax	—Proteína X asociada a Bcl-2
BBB	—Barrera hematoencefálica
Bcl-2	—Linfoma de células B2
BLL	—Nivel de plomo en sangre
cAMP	—Monofosfato cíclico de adenosina
CAT	—Catalasa
CD133	—Clúster de diferenciación 133
CDC	—Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades
CDFT	—Teoría de Funcionales de la Densidad Conceptual
C-terminal	—Extremo carboxilo terminal
DFT	—Teoría de Funcionales de la Densidad
DNA	—Ácido desoxirribonucleico
EMBL-EBI	—Laboratorio Europeo de Biología Molecular-Instituto Europeo de Bioinformática
ETC	—Cadena de transporte de electrones
G6P	—Glucosa-6-fosfato
GPx	—Glutación peroxidasa
GSH	—Glutación reducido
GST	—Glutación S-transferasa
GTP	—Guanosín trifosfato
HBA	—Aceptor de enlaces de hidrógeno
HBD	—Donador de enlaces de hidrógeno
HK PII	—Isoforma II de hexocinasa de <i>S. cerevisiae</i>
HK PI	—Isoforma I de hexocinasa de <i>S. cerevisiae</i>
HK	—Hexocinasa
LN	—Loop N (e.g. L1-L4)
MDA	—Malondialdehído
MD	—Dinámica Molecular
MM	—Mecánica molecular
MPTP	—Poro de transición de la permeabilidad mitocondrial
MSA	—Análisis Múltiple de Secuencias
mTORC1	—Complejo 1 de la diana mecánica de la rapamicina
MUSCLE	—Comparación Múltiple de Secuencias basada en el valor esperado logarítmico
NADH	—Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NLRP3	—Proteína 3 de la familia NLR con dominio pirina
NOD	—Receptor tipo dominio de oligomerización de nucleótidos

N-terminal—Extremo amino terminal
 OMM—Membrana mitocondrial externa
 PDB—Banco de Datos de Proteínas o Protein Data Bank
 PD-L1—Ligando 1 de muerte celular programada
 QM—Mecánica Cuántica
 RMSD—Desviación cuadrática media
 RMSF—Fluctuación cuadrática media
 RNA—Ácido ribonucleico
 ROS—Especies Reactivas de Oxígeno
 S_N2 —Sustitución nucleofílica bimolecular
 SOD—Superóxido dismutasa
 Tot-Drift—Deriva total
 XNZ—Aminoácido X sustituido por el aminoácido Z en la posición N de la secuencia proteica (e.g. K423R)

Índice de Figuras

Figura 1. Efectos toxicológicos por exposición a metales tóxicos.....	17
Figura 2. Toxicocinética del envenenamiento por plomo	19
Figura 3. Efectos del envenenamiento por plomo a nivel celular	21
Figura 4. Familia enzimática EC 2.7.1.1., destino de azúcares de hexosa por actividad de hexocinasas y reacción general de transferencia del grupo fosforilo	22
Figura 5. Funciones de las Hexocinasas (HK's)	23
Figura 6. Estructuras secundarias y dominios en hexocinasas de <i>S. Cerevisiae</i>	25
Figura 7. Regiones funcionales y proceso catalítico/conformacional de la hexocinasa de <i>S. cerevisiae</i>	26
Figura 8. Relaciones evolutivas entre hexocinasas	30
Figura 9. Andamio molecular de inhibidores propuestos para la inactivación de HK II	31
Figura 10. Ejemplos de los principales mecanismos de activación de sustratos o cofactores en catálisis no-redox en biosistemas.....	34
Figura 11. Distribución del Mg en las seis familias de enzimas y frecuencia de iones metálicos en transferasas	35
Figura 12. Efecto de la preincubación con plomo sobre la actividad relativa de la HK de <i>S. cerevisiae</i>	40
Figura 13. Diagrama general de la metodología	42
Figura 14. Representación de los modelos finitos del sitio de unión Pb-glucosa	52

Figura 15. Representación de las condiciones de cierre del modelo finito	53
Figura 16. ΔE respecto a la especie energéticamente más estable	54
Figura 17. Estructuras optimizadas	57
Figura 18. ΔG de complejación	57
Figura 19. ΔG de desplazamiento	58
Figura 20. ΔG de transferencia del grupo fosforilo γ	59
Figura 21. Índice de electrofilicidad global.....	60
Figura 22. Principales descriptores químicos.....	64
Figura 23. Blandura local nucleofílica sobre el átomo de fósforo γ	64
Figura 24. Blandura local electrofílica sobre el grupo fosforilo gamma del ATP y complejos Metal-ATP	70
Figura 25. Clasificación general y tipo Zappo de aminoácidos	71
Figura 26. MSA tipo MUSCLE de las isoformas I y II de <i>S. cerevisiae</i>	72
Figura 27. MSA tipo MUSCLE de hexocinasas de <i>S. cerevisiae</i> y <i>H. sapiens</i>	74
Figura 28. Acoplamiento de región específica de la glucosa	75
Figura 29. Acoplamiento ciego de la glucosa	75
Figura 30. Potencial de unión de Pb entre la conformación abierta y semicerrada de HK de <i>S. cerevisiae</i>	80
Figura 31. Principales sitios de unión de Pb	82
Figura 32. Desviación cuadrática media (RMSD) de la cadena principal de la proteína....	83
Figura 33. Desviación cuadrática media (RMSD) de la glucosa respecto a la proteína	84
Figura 34. Desviación cuadrática media (RMSD) del ATP y complejos Metal-ATP	85
Figura 35. Fluctuación cuadrática media (RMSF) de carbonos alfa	86
Figura 36. Desviación cuadrática media (RMSD) de la cadena principal de la proteína....	88
Figura 37. Desviación cuadrática media (RMSD) del Pb en el sitio de unión de glucosa..	88
Figura 38. Fluctuación cuadrática media (RMSF) de carbonos alfa	89
Figura 39. ΔE de desplazamiento	90
Figura 40. Esquema representativo del mecanismo toxicológico putativo del Pb en HK de <i>S. cerevisiae</i>	95

Índice de Tablas

Tabla 1. Tipos de hexocinasas utilizadas en el alineamiento múltiple de secuencias	46
Tabla 2. Dimensiones de las cajas de acoplamiento.....	47
Tabla 3. Parámetros de simulación de dinámica molecular	50
Tabla 4. Cálculo de propiedades químicas	61
Tabla 5. Distribución de la reactividad sobre la cadena trifosfato	67
Tabla 6. Efecto del impedimento estérico en la reactividad de bromuros de alquilo en una reacción por el mecanismo S_N2	69
Tabla 7. Estado de conservación de las regiones funcionales entre las isoformas I y II de HK de <i>S. cerevisiae</i>	72
Tabla 8. Estado de conservación entre hexocinasas de <i>S. cerevisiae</i> y <i>H. sapiens</i>	74
Tabla 9. Acoplamiento flexible-específico del ATP y complejos Metal-ATP.....	76
Tabla 10. Tipos de interacciones y residuos.....	78
Tabla 11. Sitios de unión de Pb en la conformación abierta de la enzima	81
Tabla 12. Residuos con mayor fluctuación (RMSF) entre los cuatro sistemas	87
Tabla 13. Residuos con mayor fluctuación (RMSF)	90

Índice de Información Suplementaria

Información Suplementaria 1 (IS1). Parámetros utilizados en los cálculos de acoplamiento molecular	97
Información Suplementaria 2 (IS2). Variación en la energía potencial, presión y densidad a lo largo de 200ns de simulación de los sistemas Apo y ATP	97
Información Suplementaria 3 (IS3). Descriptor Dual Δf	101
Información Suplementaria 4 (IS4). MSA y estructuras secundarias de las HK's de <i>S. cerevisiae</i>	101
Información Suplementaria 5 (IS5). Diagrama en 2D de las interacciones intermoleculares en el sitio de unión de ATP	104
Información Suplementaria 6 (IS6). Numeración del anillo de purina de la adenina	104

Objetivo general

Elucidar el mecanismo toxicológico del plomo como inactivador de la hexocinasa (HK) de *S. cerevisiae*, mediante el análisis estructural de la enzima y la descripción de propiedades fisicoquímicas y electrónicas de complejos Metal-ATP²⁻ (Metal: Mg²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺ y Pb²⁺), asociadas con los efectos biológicos observados.

Objetivos particulares

- Calcular propiedades fisicoquímicas y electrónicas de complejos Metal-ATP²⁻, por la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT).
- Llevar a cabo un análisis múltiple de secuencias (MSA) tipo MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation) para contrastar el estado de conservación entre las dos isoformas de la HK de *S. cerevisiae* (PI y PII) y las HK's humanas I, II, III y IV, mediante el despachador de trabajos del EMBL-EBI (European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute).
- Llevar a cabo análisis de acoplamiento molecular de los complejos Metal-ATP²⁻ para identificar la pose de menor energía en el sitio de unión de ATP, sobre la estructura cristalográfica de la isoforma I de la hexocinasa de *S. cerevisiae* (PDB: 3B8A), tanto en regiones funcionales (e.g. sitio de unión de ATP o glucosa) como sobre la proteína completa, mediante un algoritmo genético Lamarckiano y la función de puntaje de Autodock4, con el software de Autodock-Tools.
- Identificar posibles sitios de unión del Pb presentes en la conformación abierta de la enzima, mediante el software MIB2 (Metal Ion Binding 2).
- Analizar la estabilidad de unión mediante simulaciones de dinámica molecular de Pb²⁺ y los complejos Mg-ATP²⁻ y Pb-ATP²⁻ con la HK de *S. cerevisiae*, con GROMACS.
- Construir un modelo finito representativo del sitio de unión de glucosa y analizarlo por la DFT.
- Identificar la correlación entre las velocidades iniciales de la actividad enzimática en función de la interacción de los complejos Mg-ATP²⁻ y Pb-ATP²⁻ con la HK de *S. Cerevisiae*.

I. Introducción

1.1 Efectos de la exposición a metales pesados y fisiopatología del plomo

La exposición a metales pesados (e.g. Pb, Hg, Cr, Cd) tiene efectos nocivos en la salud humana; la exposición a estos, por fuentes de agua, alimentos o el aire, ha aumentado y es inevitable debido a la industrialización moderna y las actividades antropogénicas ^{1,2}. La exposición aguda o crónica a estos metales afecta diferentes órganos (e.g. cerebro, hígado, riñones, sangre y piel), causando disfunción renal y gastrointestinal, desórdenes del sistema nervioso, lesiones en la piel, daño vascular, disfunción del sistema inmune, defectos al nacer y cáncer ^{1,3,4}. A nivel celular, los metales pesados disrumpen eventos como el crecimiento, proliferación, diferenciación, procesos de reparación de daño y apoptosis ¹. Sus mecanismos de acción toxicológica tienen similitudes, como el desplazamiento de metales divalentes endógenos en grupos prostéticos por mimetización química, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), debilitamiento de la defensa antioxidante e inactivación enzimática [**Figura 1**]; además, la exposición a más de un metal pesado puede tener efectos acumulativos ^{1,3-5}.

El mecanismo de carcinogenicidad de metales tóxicos (e.g. Cr, Cd, Pb, MeHg) es complejo y aún no se ha dilucidado por completo; para algunos metales, se piensa que su carcinogenicidad está ligada a su unión a proteínas reguladoras involucradas en la síntesis y reparación del DNA, apoptosis y regulación del ciclo celular; en el caso específico del plomo, este se ha clasificado como probablemente carcinogénico por la IARC (Agencia Internacional de Investigación en Cáncer) ^{1,3,4,6}. A su vez, estos metales pueden promover alteraciones epigenéticas como metilación del DNA (MeHg, Pb, Cr, Cd) y modificación de histonas [MeHg, Cr (VI)]⁷; el mecanismo exacto de cambios epigenéticos debidos a exposición a metales tóxicos no se ha determinado por completo, sin embargo, pareciera estar relacionado con un aumento en la expresión de oncogenes y el silenciamiento de genes supresores de tumores vía producción intracelular de ROS ¹.

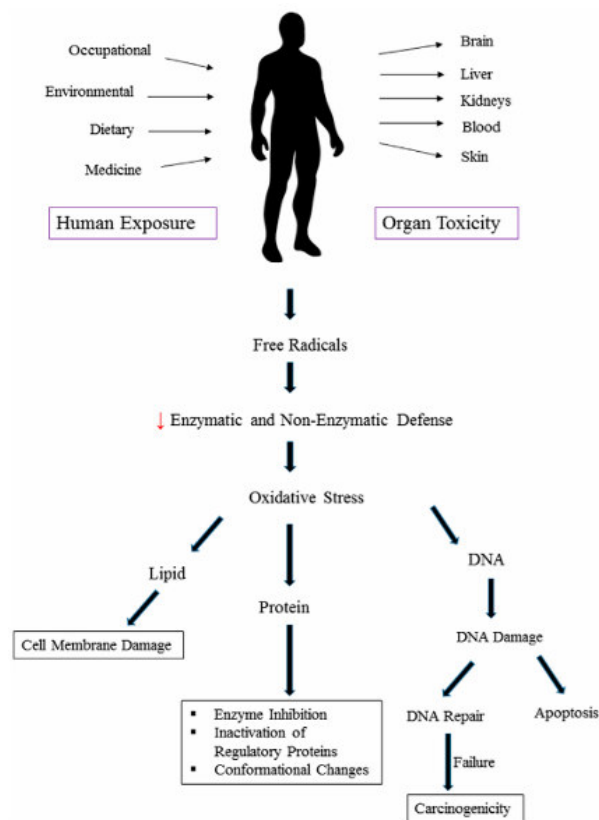


Figura 1. *Efectos toxicológicos por exposición a metales tóxicos.* Las fuentes de exposición a metales pesados son ocupacionales, ambientales, por la dieta o medicamentos alternativos. Estos metales suelen reaccionar con sistemas biológicos por la pérdida de uno o más electrones, formando así cationes metálicos que tienen afinidad por sitios nucleofílicos de macromoléculas vitales. En general, su mecanismo toxicológico implica inactivación enzimática y estrés oxidativo. Reproducida de *Oxidative stress and organ toxicity following exposure to heavy metals*, de Balali-Mood et al. doi.org/10.3389/FPHAR.2021.643972/BIBTEX

Algunos metales también presentan unión selectiva a macromoléculas específicas; el plomo, por ejemplo, causa anemia debido a que se une a dos enzimas implicadas en la síntesis del grupo hemo: la ácido δ -aminolevulínico deshidratasa (ALAD) y la ferroquelatasa ^{1,4,8–10}. La unión de metales tóxicos a enzimas y proteínas generalmente ocurre por grupos tiol (-SH) y residuos de cisteína modificados en proteínas; la unión a estos grupos y la generación de ROS causa la inactivación de macromoléculas vitales, una disminución de especies antioxidantes como el glutatión (GSH) y, por tanto, estrés oxidativo ^{1,11}.

En particular, se ha mostrado que la exposición a plomo disminuye la síntesis de ATP mediante mecanismos que interfieren con los sistemas bioenergéticos; dentro de los cuales, se incluyen la inhibición de la cadena de transporte de electrones (ETC), alteraciones en enzimas involucradas en el metabolismo de la glucosa, la inhibición de la Na^+/K^+ ATPasa, disminución en el potencial de membrana mitocondrial y apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (MPTP) ¹². Este daño mitocondrial resulta en estrés oxidativo

porque se reducen significativamente los parámetros antioxidantes, como la glutatión peroxidasa (GPx), la catalasa (CAT), la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión-S-transferasa (GST) y GSH, mientras que aumentan los parámetros oxidativos, como el malondialdehído (MDA) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) ¹³. Como resultado, tanto en animales como en humanos se observan disfunciones de órganos específicos, anormalidades metabólicas, alteraciones hormonales, desórdenes congénitos, disfunción del sistema inmune y cáncer ^{1,9,14}.

1.1.1 Efectos fisiopatológicos del plomo

Los efectos toxicológicos del plomo se han reportado desde por lo menos dos siglos antes de nuestra era; no obstante, este todavía representa tanto un peligro ocupacional, como un problema ambiental ^{2,9,14}. La exposición a este tóxico puede inducir desórdenes neurológicos, reproductivos, hematológicos (disrupción de la síntesis de hemoglobina), respiratorios, urinarios (daño renal y necrosis), cardiovasculares y hepatológicos, debido a mecanismos inmunomoduladores, oxidativos e inflamatorios ^{1,2,9,14}.

Aunque las vías de exposición incluyen la vía oral, respiratoria y dérmica, los compuestos de plomo son principalmente absorbidos por los tractos respiratorio e intestinal [**Figura 2**]; para ser absorbido por la piel, debe estar formando compuestos hidrofóbicos como el tetraetilo de plomo (TEL) ⁹. Algunas de las principales fuentes de exposición incluyen agua transportada a través de tuberías de plomo, esmaltes cerámicos, alfarería, soldaduras de alimentos enlatados, pinturas a base de plomo y medicinas tradicionales ^{1,2,9,14}. El acetato de plomo, por ejemplo, ha sido utilizado en tratamientos medicinales para enfermedades diarreicas como la disentería y el cólera, por lo que persiste como un problema de salud pública ².

El plomo se acumula en todo el cuerpo, en tejido blando (riñones, hígado, pulmones y cerebro), tejido duro (huesos y dientes) y principalmente en sangre, en donde más del 90% del plomo se asocia a eritrocitos [**Figura 2**]; en la sangre, su vida media es de 40 días, mientras que en tejido duro puede permanecer almacenado por décadas; este es excretado principalmente por la orina y heces, además, por el cabello, piel, sudor, leche y uñas ^{9,14}. Sus efectos tóxicos son acumulativos, irreversibles y afectan múltiples sistemas del cuerpo ^{1,2,9,14}.

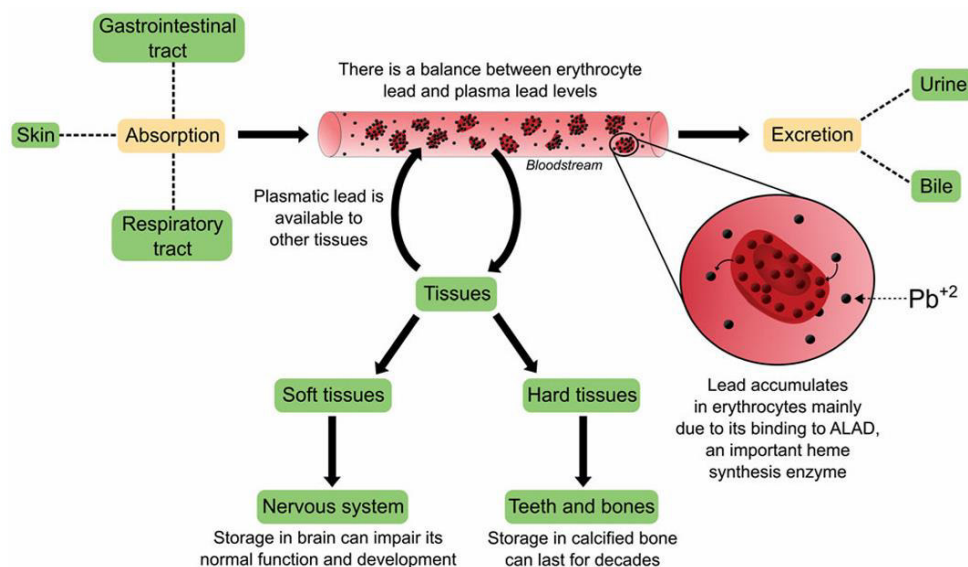


Figura 2. *Toxicocinética del envenenamiento por plomo.* Reproducida de *The toxicokinetics of lead poisoning*, de Souza et al. doi.org/10.1080/10408444.2018.1429387

El plomo asociado con células se mantiene en equilibrio con el plomo plasmático que interactúa con el plasma y proteínas celulares; aunque este corresponde a una pequeña porción del plomo en el sistema, es importante debido a que está disponible para interactuar con otros tejidos ⁹. De hecho, los niños son especialmente susceptibles a los efectos toxicológicos del plomo, debido a que presentan tasas de absorción mayores que los adultos y una menor capacidad para almacenarlo, lo que resulta en una mayor cantidad de plomo disponible en el torrente sanguíneo ^{2,9}.

Los síntomas asociados a la intoxicación por plomo varían dependiendo de si la exposición fue aguda o crónica; el amplio espectro de síntomas y alteraciones fisiológicas indica que el plomo puede dañar varios sistemas mediante la interacción con varios componentes celulares o afectando cascadas de señalización; la complejidad y heterogeneidad de los síntomas por intoxicación por plomo reflejan el daño sistémico de funciones celulares ^{8-10,14}. No obstante, las características clínicas observadas en el envenenamiento por plomo son no específicas y podrían confundirse por porfirias e intoxicación por otros metales; los síntomas más prominentes, como la irritabilidad, poca atención y apatía, están relacionados con el sistema nervioso central ⁹.

Desde los huesos —el principal reservorio de plomo en el cuerpo—, el plomo se libera a la sangre por cambios hormonales inducidos por la lactancia y el embarazo, representando así una fuente importante de exposición para los fetos ^{8-10,14}. Además, si se acumula en la médula ósea, el plomo también afecta el proceso de maduración de los componentes sanguíneos e inhibe fuertemente la síntesis del grupo hemo ^{9,10,14}.

El daño a la barrera hematoencefálica (BBB) resulta en encefalopatía con edema cerebral y hemorragias; después de dañar la BBB, el plomo puede acumularse en el cerebro y perjudicar

el desarrollo en niños ^{9,10,14}. Adicionalmente, ciertos estudios han mostrado que la exposición prenatal es particularmente relevante considerando la ineficiencia de la BBB para proteger el sistema nervioso de la contaminación por plomo durante el desarrollo ^{15,16}. En casos severos, la intoxicación resulta en convulsiones, parálisis y coma ¹⁰.

La enfermedad crónica de riñón ocurre con niveles crónicos de plomo en sangre (BLL) de 70-80µg/dl; niveles altos y constantes de plomo causan nefropatía por plomo, definida por nefritis tubulointersticial crónica ^{9,10,14}

A nivel molecular, parte de los efectos del plomo en el metabolismo celular están relacionados con su interacción con proteínas, pues desplaza a metales divalentes como calcio, zinc y magnesio en sus grupos prostéticos ⁵. Se han identificado por lo menos 23 proteínas que se unen al plomo, cuyos efectos se han categorizado como estimuladores, inhibidores y de unión; se denomina efecto estimulador cuando la interacción con plomo aumenta la actividad de la proteína; inhibidores, cuando la interacción disminuye la actividad de la proteína; y de unión, cuando los efectos de la interacción en la función de la proteína no se han observado o no han sido descritos apropiadamente ⁹. Las proteínas que interactúan con el plomo actúan en varias vías como la transducción de señales, la proliferación, la supervivencia celular, la secreción y regulación de la expresión génica [**Figura 3**] ^{8,9}.

Proteínas clave en la regulación de los procesos celulares, como las enzimas hexocinasas que catalizan la fosforilación de la glucosa, constituyen posibles blancos asociados a los efectos toxicológicos descritos para el plomo. En especial, porque la función de estas proteínas implica la participación de un metal endógeno (Mg) susceptible de ser desplazado, así como una región funcional conformada principalmente por aminoácidos que tienden a unir cationes divalentes como el Pb^{2+} ; sin embargo, los posibles efectos del plomo sobre esta enzima, hasta ahora sólo se han estudiado mediante ensayos *in vitro* ^{5,9,17,18}.

En resumen, el plomo produce estrés oxidativo inhibiendo enzimas antioxidantes como la GSH peroxidasa, SOD y catalasa, lo que aumenta las especies reactivas de oxígeno; inhibe enzimas importantes de la síntesis de hemoglobina, lo cual ocasiona los síntomas hematológicos; interfiere con el metabolismo del calcio a través de la activación de la proteína cinasa C y la calmodulina, y por la inhibición de la adenilato ciclasa y los canales de calcio voltaje-dependientes, los cuales son proteínas clave en la transducción de señales y la activación de segundos mensajeros; además, entre los mecanismos de genotoxicidad del plomo, se encuentran la interacción con factores de transcripción y con enzimas de reparación de DNA; finalmente, el plomo puede quelar proteínas citosólicas y proteínas del retículo endoplásmico ^{8,9}.

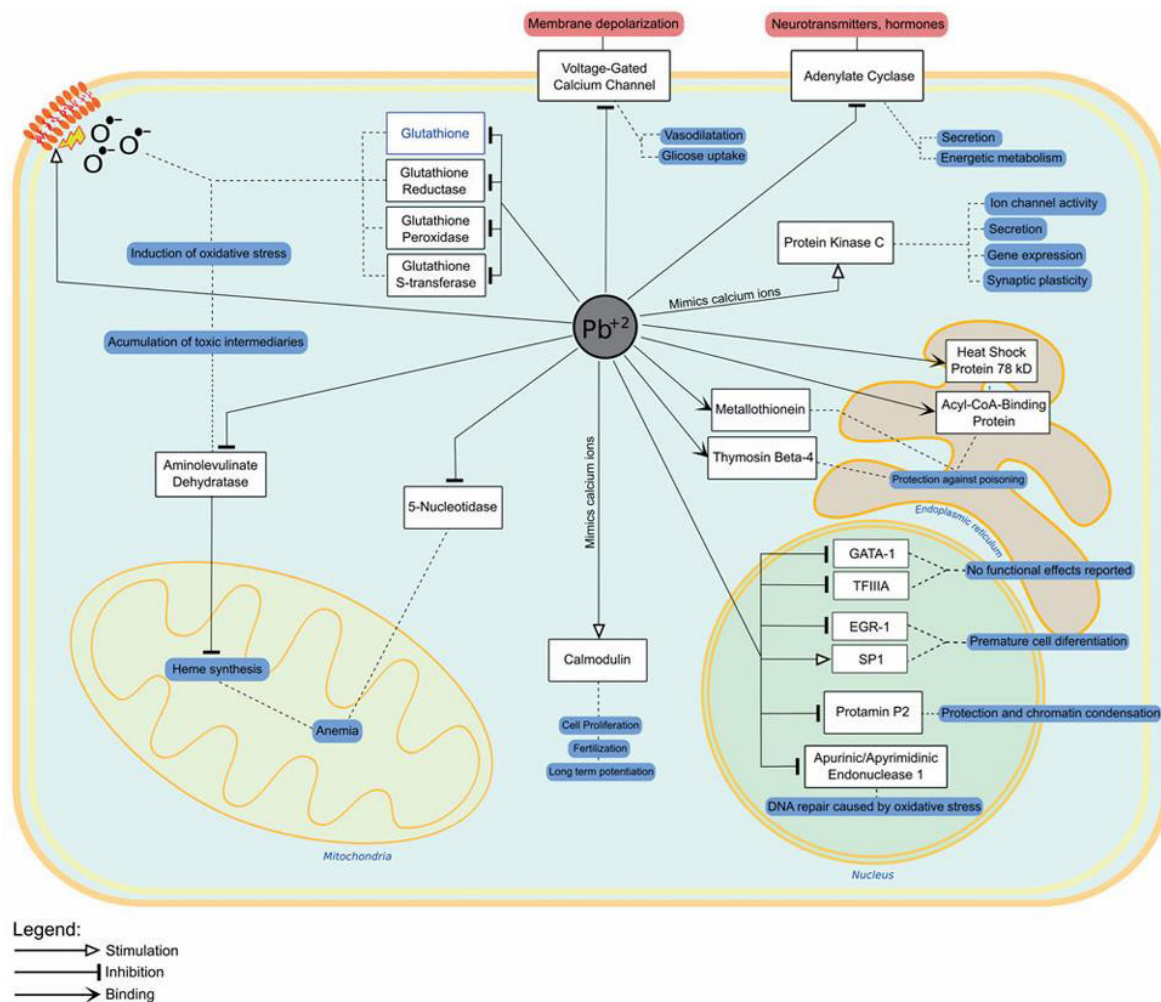


Figura 3. Efectos del envenenamiento por plomo a nivel celular. Reproducida de *Cellular effects of lead poisoning*, de Souza et al. doi.org/10.1080/10408444.2018.1429387

Anteriormente, los efectos tóxicos del plomo solían atribuirse solamente a la exposición a altas dosis y por tiempos prolongados; actualmente, el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos, ha establecido los niveles seguros de exposición al plomo; sin embargo, la evidencia sugiere que no existe tal nivel seguro de exposición^{2,8,9}. Internacionalmente, se consideran niveles tóxicos de plomo a partir de los 5µg/dl en sangre¹.

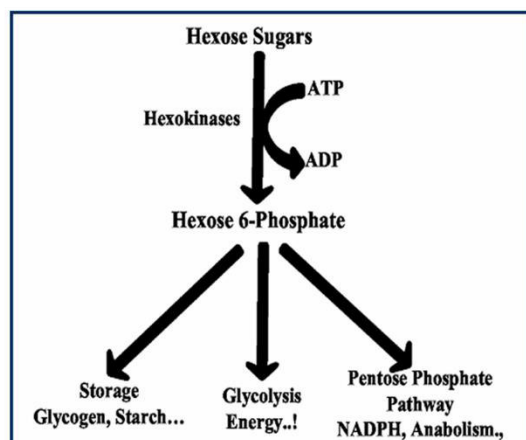
1.2 Enzimas Hexocinasas

Las hexocinasas (HK's) pertenecen a la familia de las cinasas de isoenzimas específicas de tejido (EC 2.7.1.1) [Figura 4A]; estas enzimas catalizan la fosforilación ATP-dependiente de azúcares de hexosas a Hexosa-6-fosfato (Hex-6-P), que entra en vías metabólicas alternas [Figura 4B]¹⁹⁻²¹. La reacción consiste en un ataque nucleofílico desde el grupo 6-OH de la glucosa hacia el Pγ del ATP, presuntamente por un mecanismo tipo S_N2 que no ha sido establecido de manera concluyente²²⁻²⁵ [Figura 4C].

A)



B)



C)

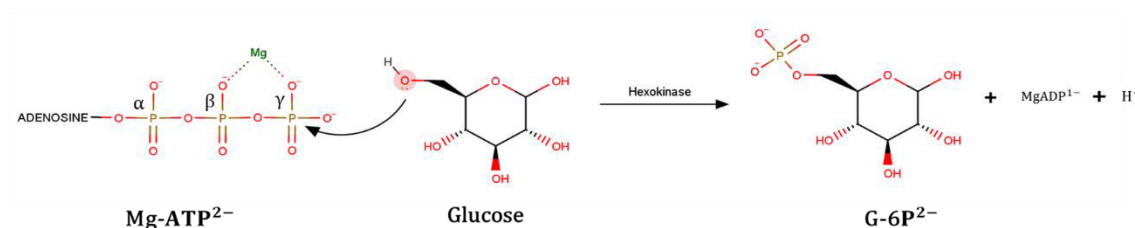


Figura 4. Familia enzimática EC 2.7.1.1., destino de azúcares de hexosa por actividad de hexocinasas y reacción general de transferencia del grupo fosforilo. **A)** 2 = Transferasas → 2.7 = Transferencia de grupos que contienen fósforo → 2.7.1 = Fosfotransferasas que tienen un grupo hidroxilo como aceptor → 2.7.1.1 = Hexocinasa. **B)** La Hex-6-P formada entra en vías metabólicas alternas: 1) formación de glucógeno y almacenamiento a corto plazo en el hígado, 2) uso inmediato en la producción de energía por la vía de la glucólisis o 3) formación de fosfatos de pentosa en reacciones anabólicas. **C)** Reacción de transferencia de grupo fosforilo para la formación de G6P; se indican las posiciones de los fósforos α , β y γ en la molécula de ATP. Reproducidas de **A)** *BRENDA:EC 2.7.1.1* (<https://www.brenda-enzymes.org/>) y **B)** de *Fate of Hexose Sugars by Hexokinases* de Kumar et al. doi.org/10.6026/97320630008543. **C)** Imagen generada con *AccelrysDraw v4.1*. Accelrys Software Inc.

El metabolismo de la glucosa es una vía altamente conservada evolutivamente e indispensable para el crecimiento y supervivencia celular, pues produce energía y provee los bloques de construcción para la síntesis de proteínas, lípidos y nucleótidos¹⁹. Como enzimas clave en el metabolismo de la glucosa, las hexocinasas son reguladas para cubrir necesidades metabólicas en múltiples procesos celulares como la respuesta inmune, regulación de células madre, autofagia y supervivencia celular, respuesta al daño en DNA, homeostasis redox, proliferación celular e invasión y migración de tumores [Figura 5]; la actividad que desempeñan tiene múltiples roles: promueven la expresión de PD-L1 (ligando 1 de muerte programada—inhibe la respuesta de linfocitos T) y la evasión inmunitaria tumoral;

desencadenan la activación de NLRP3 (receptor tipo NOD con dominio pirina 3—implicado en la respuesta del sistema inmune innato) e inflamación antibacteriana; promueven la expresión de CD133 (prominina-1—glicoproteína marcadora de células madre), incrementan las propiedades de las células madre leucémicas, inhiben la liberación de Bax (proteína proapoptótica X asociada a Bcl-2) inducida por citocromo-c y apoptosis; regulan la autofagia inhibiendo a mTORC1 (complejo 1 de la diana mecánica de la rapamicina) y su actividad está regulada mutuamente con la respuesta a daño a DNA; promueven la proliferación de células tumorales, promueven la migración e invasión tumoral y previenen la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno [Figura 5]¹⁹.

Dependiendo de la isoforma, la reducción de su actividad puede causar enfermedades como anemia hemolítica, cardiomiopatía o diabetes, mientras que el aumento de su actividad está asociado con tumorigénesis o hipoglicemia^{18,26–29}. En particular, la sobreexpresión de las hexocinasas está asociada con la proliferación de células cancerígenas debido a un incremento en la captación de glucosa y la producción de lactato, incluso en presencia de oxígeno (efecto de Warburg)^{19,26,27}. Por tanto, las hexocinasas son potenciales blancos terapéuticos para diferentes enfermedades.

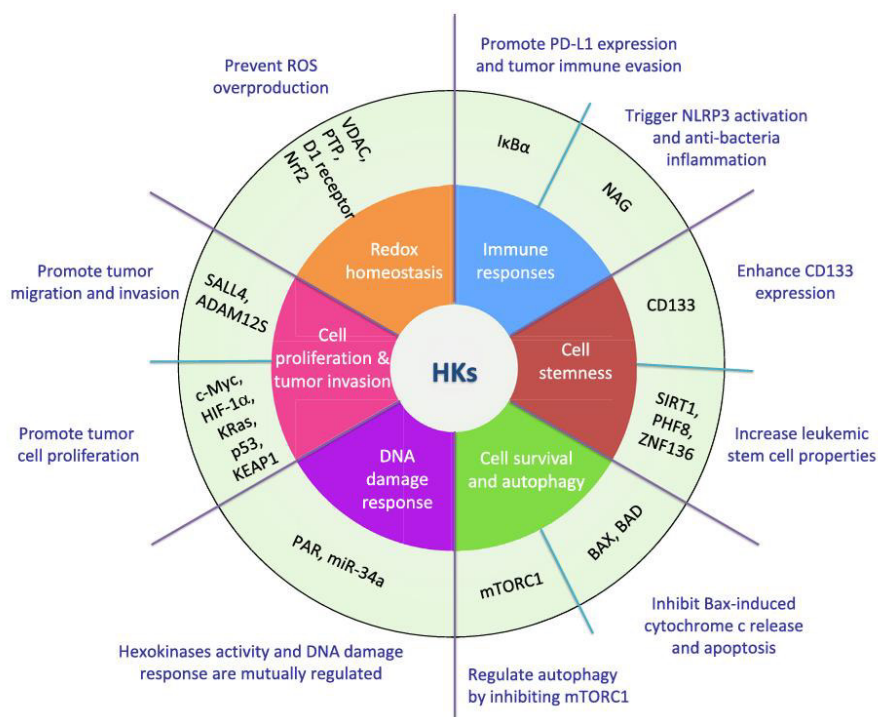


Figura 5. Funciones de las Hexocinasas (HK's). Estas enzimas transfieren un grupo fosforilo del ATP a las hexosas. Su actividad desempeña un papel fundamental en la respuesta inmune, regulación de células madre, autofagia y supervivencia celular, respuesta al daño en DNA, homeostasis redox, proliferación celular e invasión y migración de tumores a través de funciones canónicas y no-canónicas. Reproducida de *Roles of hexokinases in different cellular activities* de Guo et al. doi.org/10.1016/J.CELLIN.2023.100077

1.2.1 Hexocinasas de *S. Cerevisiae*

Las isoenzimas PI y PII de HK de *Saccharomyces cerevisiae* presentan una homología global del 76% en su secuencia de aminoácidos; la HK-II es la hexocinasa predominante en *S. Cerevisiae* crecida en glucosa y esta es requerida para la represión catabólica (por la glucosa) de otros genes^{18,30-33}. La actividad enzimática de PI con fructosa y manosa es 2.6 y 0.6 veces respecto a la glucosa; mientras que la de PII es 1.3 y 0.3, respectivamente³⁰. A diferencia de las HK's I-III de mamífero, PI y PII no son inhibidas por la formación de producto, G6P^{30,34,35}.

El *Protein Data Bank* (PDB) es un repositorio ampliamente utilizado y de libre acceso, que alberga la estructura en 3D de macromoléculas biológicas y sus complejos, determinadas experimentalmente^{36,37}. La estructura cristalográfica de PII, sin sustrato unido ni competidor inhibitorio, se ha resuelto a 2.2 Å (PDB: 1IG8), mientras que la estructura de PI con glucosa se ha resuelto a 2.89 Å (PDB:3B8A); ambas estructuras tienen la forma de una palma y presentan el mismo plegamiento α/β observado en otras hexocinasas [**Figura 6A**]^{18,30,35}.

Las hexocinasas conformadas por 485 (PI) y 486 (PII) residuos están plegadas en dos dominios de diferente tamaño: el dominio largo y el dominio pequeño; los cuales están separados por una hendidura profunda que contiene los residuos del sitio activo; tienen 13 α -hélices, 13 β -hebras y por lo menos tres hélices-3₁₀, que son elementos de estructura secundaria relativamente flexibles y con aproximadamente tres residuos por vuelta [**Figura 6B**]^{18,30}.

El dominio largo (residuos 17/13-76 y 212-457/458) comprende una hoja β mixta de seis hebras (β 1, β 9, β 10, β 11, β 12, β 13) y un número adicional de α -hélices; en un lado, la hoja β se empaqueta contra el dominio pequeño, mientras que en el otro lado está escudada por varias α -hélices; contiene, además, una α -hélice particularmente larga (α 11—36 residuos y 56.35Å de longitud en PII), que exhibe una ligera curvatura^{18,30}.

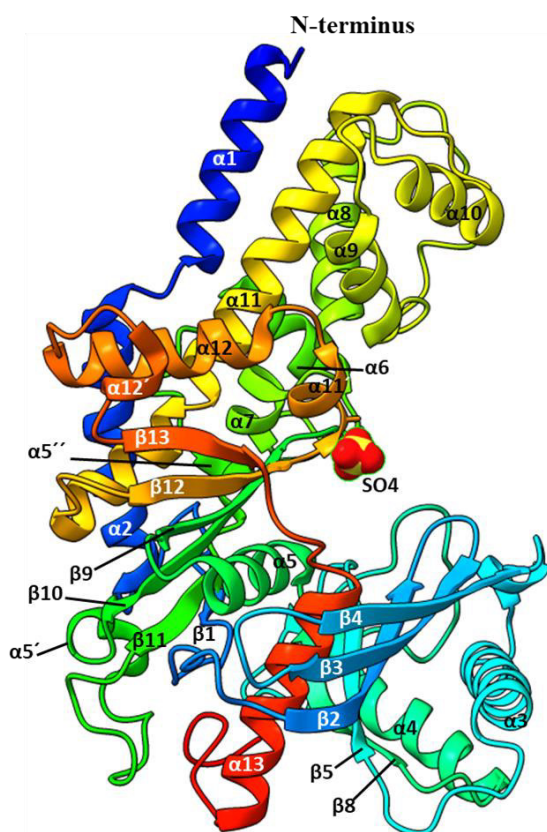
El dominio pequeño comprende los residuos 77-211 y 459-485/486, y está compuesto por una hoja β formada por dos hebras antiparalelas (β 6 y β 7) y una hoja β mixta de cinco hebras (β 2, β 3, β 4, β 5 y β 8); la hoja β está flanqueada por dos α -hélices en un lado, y por otra α -hélice en el otro^{18,30}.

Todos estos elementos de estructura secundaria encontrados en la estructura de la HK de *S. Cerevisiae*, a excepción de las 3₁₀-hélices adicionales, concuerdan con la estructura secundaria de HK humana¹⁸.

Se han llevado a cabo análisis del estado de conservación entre hexocinasas de *S. Cerevisiae* PI y PII, los extremos N- y C- terminal de la hexocinasa de cerebro de rata, los extremos N- y C- terminal de HK-I humana, el hongo *Debaryomyces occidentalis* (HDO), el platelminto *S. mansoni* (HSM) y la planta *Arabidopsis thaliana* (HAH); los cuales muestran una gran similitud entre las mitades N- y C-terminal de la HK-1, HK de rata y HK de *S. mansoni*, y

entre estas y las hexocinasas de *S. Cerevisiae*, lo cual es consistente con el concepto de duplicación-fusión de genes propuesto por Colowick^{18,34,38}. Aproximadamente el 34% de los residuos están conservados en todos los miembros de la familia y el 13% son idénticos, varios de los cuales se encuentran en el sitio de unión; la alta conservación de estos residuos implica la relevancia de su función biológica^{18,39}. Un alto número de residuos de glicina se encuentran también conservados (G76, G80, G88, G89, G154, G233, G235, G239, G307, G418 y G461); estos residuos están localizados en las terminaciones de las hojas β y α -hélices, cambiando la dirección de la cadena^{18,40}. Su conservación probablemente brinda a las HK's de la flexibilidad necesaria para la unión de la glucosa y el ATP; algunas están directamente involucradas en la formación del sitio activo y son esenciales para la actividad enzimática¹⁸.

A) 1IG8-open



B) 3B8A-semiclosed

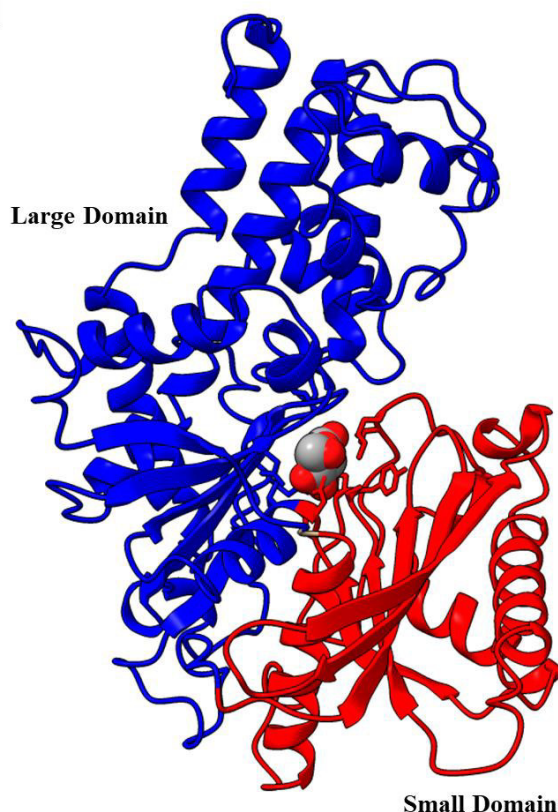


Figura 6. Estructuras secundarias y dominios en hexocinasas de *S. Cerevisiae*. **A)** PDB:1IG8. Código de color desde el azul (extremo N-terminal) hasta el rojo (extremo C-terminal). **B)** PDB:3B8A. Color azul: dominio grande; color rojo: dominio pequeño. Entre ambos dominios se muestra la glucosa co-cristalizada. A) Imagen modificada de *Schematic diagram of the yeast hexokinase PII model*, de P. R. Kuser et al. doi.org/10.1074/jbc.M910412199. **A-B)** Imágenes generadas con Chimera X v1.4. doi.org/10.1002/pro.3943.

Estas enzimas presentan cuatro regiones funcionales: el sitio de unión de glucosa, el sitio de unión de ATP, un canal hidrofóbico de protones y cuatro *loops* flexibles implicados en el cierre-apertura de la enzima [Figura 7A]. A grandes rasgos, el proceso catalítico y conformacional implica la unión de glucosa en la conformación abierta de la enzima, lo cual induce el cambio conformacional a la forma semicerrada que permite la unión del complejo Mg-ATP; la unión de ambos sustratos induce el “cierre” de la enzima que, finalmente, forma el sitio catalítico en donde ocurre la reacción [Figura 7B]

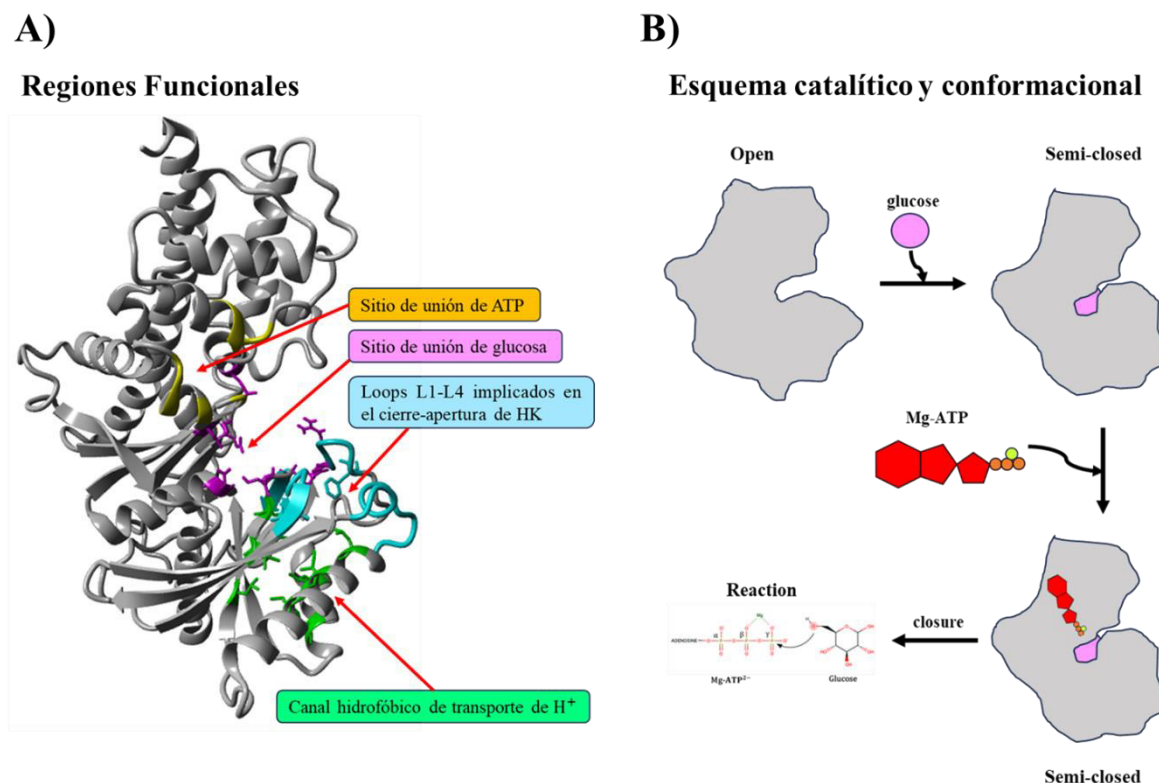


Figura 7. Regiones funcionales y proceso catalítico/conformacional de la hexocinasa de *S. cerevisiae*. **A)** Cristal 1IG8. **B)** Esquema ilustrativo. **A)** Imagen generada con YASARA v22.5.22. doi.org/10.1093/bioinformatics/btu426.

Loops flexibles

Además del cierre de cuerpo rígido del dominio pequeño, cuatro segmentos [L1 (87-92), L2 (115-124), L3 (158-163) y L4 (174-178)] se desplazan para abarcar el sitio activo; el movimiento de estos *loops* es importante para completar la formación del sitio de unión de la glucosa y preformar el sitio de unión nucleotídico¹⁸. Los loops L1 (87LGGTN91) y L4 (174WTKGF178), están compuestos por residuos conservados en todas las secuencias mencionadas previamente a excepción de dos; en los dominios regulatorios N-terminal de hexocinasas de rata y hexocinasas humanas, los residuos T90 y N91 del loop L1 están sustituidos por serinas, mientras que el residuo G177 del loop L4 está substituido por una

arginina; estas substituciones podrían estar relacionadas directamente con la falta de actividad enzimática de estos dominios ^{18,41,42}

La comparación entre la estructura 1IG8 y otros modelos de hexocinasa en complejo con sustrato, provee de información precisa respecto a los cambios conformacionales que esta enzima sufre por la unión del sustrato y confirma la teoría del mecanismo de ajuste inducido y observaciones previas de que el reconocimiento inicial de la glucosa por HK es seguido del cierre de la hendidura, alterando la interacción enzima-sustrato ^{18,43,44}.

Sitio de unión de la glucosa

La estructura de PI puede también dividirse entre el dominio fijo (residuos 20-59, 61-73, 104-106, 211, 214-259, 262-308, 310-458, 467-482) y el dominio móvil o rotatorio (residuos 74-103, 107-210, 212-213, 459-466); esta clasificación se ha propuesto para analizar el ajuste inducido por la glucosa y corresponde parcialmente con la clasificación tradicional del dominio grande y el dominio pequeño, respectivamente. Los residuos 73-74, 104-107, 211-212, 213-215, 458-459, 466-467, y los residuos altamente conservados D211, T213, G215 y G458 actúan como “bisagras mecánicas”.

En el cristal 1IG8 el sitio de unión de la glucosa concuerda con los sitios de unión previamente elucidados ^{43,45-47}: el residuo D211, identificado como una base catalítica, establece un enlace de hidrógeno con el grupo hidroxilo en la posición 6 de la glucosa, tanto en la forma abierta como cerrada, mientras que las cadenas laterales de los residuos N237, E269 y E302 se encuentran a distancias de enlace de hidrógeno de los átomos O4, O3 y O1 de la glucosa, respectivamente; el reconocimiento inicial de la glucosa, seguido por la cerradura de la hendidura entre los dos dominios de HK, acerca residuos del dominio pequeño (en particular T172 y K173) a distancias de interacción de enlace de hidrógeno con el sustrato ¹⁸. En el cristal 3B8A, los grupos hidroxilo 1- y 3-6 de la glucosa establecen interacciones en el sitio de unión; lo cual concuerda con lo descrito para HK de mamífero ⁴⁸. D211 establece enlaces de hidrógeno con los -OH en las posiciones 4 y 6 de la glucosa, mientras que K176 lo hace con el 6-OH ; adicionalmente, las cadenas laterales de E302, E269 y K176 se encuentran a distancias de enlace de hidrógeno de los -OH 1-, 3- y 5-, respectivamente ³⁰. La ausencia de interacciones entre el grupo 2-OH de la glucosa y el *pocket* es consistente con el hecho de que los derivados 2-sustituidos de la glucosa sirven como sustratos de la HK ³⁰. Por otro lado, mutaciones dirigidas sobre D211 causan una pérdida de la actividad catalítica, aunque se mantiene la gran afinidad de la glucosa por el sitio ⁴⁹; esto indica que la unión del azúcar es principalmente coordinada por D302 y D269, mientras que D211 es indispensable para promover el ataque nucleofílico del grupo 6-OH de la glucosa al fosforilo- γ del ATP; D302 y D269 forman parte del dominio largo y fijo, mientras que D211 pertenece a la hendidura entre ambos dominios, y K176 proviene del dominio pequeño y rotativo ³⁰.

Estudios de mutagénesis dirigida sobre Ser158 (estrictamente conservada entre HK's) la han identificado como un residuo determinante para la actividad catalítica de la HK ^{50,51}; las

estructuras cristalográficas muestran que, en conformación cerrada, el residuo Ser158 interactúa con el grupo hidroxilo 3 de la molécula de glucosa vía un oxígeno carboxílico, lo cual confirma los resultados de mutagénesis y resalta la importancia funcional del enlace de hidrógeno que se forma con la cadena lateral; además, se ha mostrado en ensayos con inhibidores que no pueden ser fosforilados (e.g. D-xilosa y D-lixosa), que la actividad hidrolítica de corta duración de la enzima es promovida en estos casos, seguida de su inactivación por autofosforilación de Ser158^{18,30,52,53}. En conjunto, estas evidencias respaldan la importancia de Ser158 en el sitio activo.

Sitio de unión del ATP

El análisis cristalográfico de un complejo binario de adenilato cinasa de *S. Cerevisiae* con 8-bromo-AMP y modelado de ATP en el sitio activo de la enzima indica que los residuos 344-348 y 422-424 interactúan con el anillo de adenina del ATP^{18,54,55}. En el cristal 1IG8, el sulfato cocrystalizado establece un enlace de hidrógeno con los átomos de nitrógeno de las cadenas principales de los residuos T234 y S419; estos residuos están estrictamente conservados en los motivos de reconocimiento de patrones ATPasa; con base en estos motivos, Kuser *et al.* modelaron la posición del ATP superponiendo el modelo actina-ATP en el cristal 1IG8. En este modelo, el fosfato β interactúa solamente con residuos del dominio pequeño; esto significa que, después de que la reacción enzimática haya tenido lugar y la hendidura de HK se abra, el dominio pequeño arrastrará la molécula de ADP fuera del sitio, abriendo el camino para la liberación de G6P¹⁸. Esto es consistente con la idea de que primero se une la glucosa y después el ATP, mientras que la liberación del ADP ocurre primero y después la de Glc-6-P¹⁸. En el cristal 3B8A, el sulfato cocrystalizado también interactúa con S419 y T234 en la misma posición³⁰.

La presencia de un ion sulfato en la conformación abierta de la HK en el cristal 1IG8 prueba que no provoca un cambio conformacional significativo tras su unión a la enzima; el hecho de que el mismo sitio de unión de anión sulfato/fosfato se encontró para los modelos de *S. Cerevisiae*, humano y *S. mansoni*, muestra que el sitio de unión de ATP de HK es capaz de unir monofosfatos; esto podría tener funciones importantes, por ejemplo, es bien sabido que la unión de la glucosa es fuertemente promovida en la presencia de 0.05M fosfato; por otro lado, la unión del fosfato podría restringir de alguna manera las conformaciones que adquieren los residuos en el sitio de unión de la glucosa, facilitando la unión de la glucosa¹⁸.

Canal hidrofóbico de transporte de protones

La mayoría de los aminoácidos estrictamente conservados en HK se encuentran en la hendidura entre los dos dominios y forman el sitio de unión para la glucosa y ATP; no obstante, varios residuos hidrofóbicos que pertenecen al dominio pequeño forman un canal que comienza cerca del sitio activo, atraviesa por completo el dominio pequeño, y termina en la superficie de la proteína aproximadamente a 30 Å del sitio de unión Glucosa-ATP; la sección transversal tiene una forma elongada y una anchura de 2.5-3 angstroms, la longitud

del canal es de aproximadamente 25 angstroms y las cargas de la superficie en su entrada son predominantemente negativas; los residuos que lo conforman son I85, L87, L127, I131, L135, M139, L153, F155, F157, F178, L192, I196¹⁸. Se ha propuesto que este canal actúa como un túnel para los protones generados en la reacción de fosforilación de la glucosa, pues el canal es demasiado pequeño para transportar cualquier otro sustrato (glucosa, ATP) o producto de la reacción (ADP, G6P) o fosfato inorgánico; además, el hecho de que está conectado al área del sitio activo y conformado por residuos estrictamente conservados sugiere su importancia en la función de la enzima¹⁸.

La unión de la glucosa al sitio activo de HK induce cambios conformacionales sustanciales; los loops L1-L4 —que forman parte de la entrada al canal hidrofóbico conservado— se cierran sobre el sitio activo llevando la entrada del canal hacia los sitios de unión de los ligandos; la conformación cerrada del sitio activo se completa después de los cambios conformacionales adicionales por la unión del ATP¹⁸.

Se ha propuesto que la fuerza que dirige la liberación de producto es probablemente la repulsión entre el fosfato de la G6P y el fosfato β del ADP; la repulsión entre estos dos grupos fosfato dependerá de la concentración local de protones, ya que un bajo pH local del sitio activo protegería la repulsión electrostática entre las cargas negativas de los grupos fosfato e impediría la liberación de ADP y G6P del sitio activo; por tanto, la transferencia de protones a través del canal hidrofóbico debe de proveer los medios para disminuir la concentración de protones en la cavidad del sitio activo, aumentando la repulsión mutua entre el ADP y G6P, facilitando así la liberación de ambos productos de reacción¹⁸. En cierto modo, la supuesta función del canal podría ser similar y opuesta a la del canal de protones de la ATP sintasa; si esto es cierto, la disrupción del canal debería impedir la liberación de los productos de reacción, mientras que la inversión del flujo de protones a través del canal cambiaría el balance de la reacción aumentando la actividad fosfato transferasa de HK; en esta situación, debería producirse ATP y glucosa a partir de ADP y G6P por HK^{18,56}.

1.2.2 Hexocinasas Humanas (I-IV)

Existen 4 HK's de mamífero (I-IV), que comparten características estructurales con las hexocinasas de *S. cerevisiae*^{30,34}. Las isoenzimas de 100 kDa (I-III) pudieron haber evolucionado por duplicación y fusión de un gen que codificaba para una hexocinasa ancestral de 50 kDa similar a la HK de *S. Cerevisiae* actual y a la HK-IV de mamífero^{34,38} [Figura 8]. Las secuencias de aminoácidos entre las isoformas I-III son idénticas en un 70%, la HK IV y las HK's de *S. cerevisiae* exhiben también una gran similitud con las mitades N- y C- terminal de las HK's I-III de mamífero⁴². No obstante, las propiedades funcionales de cada HK humana difieren significativamente.

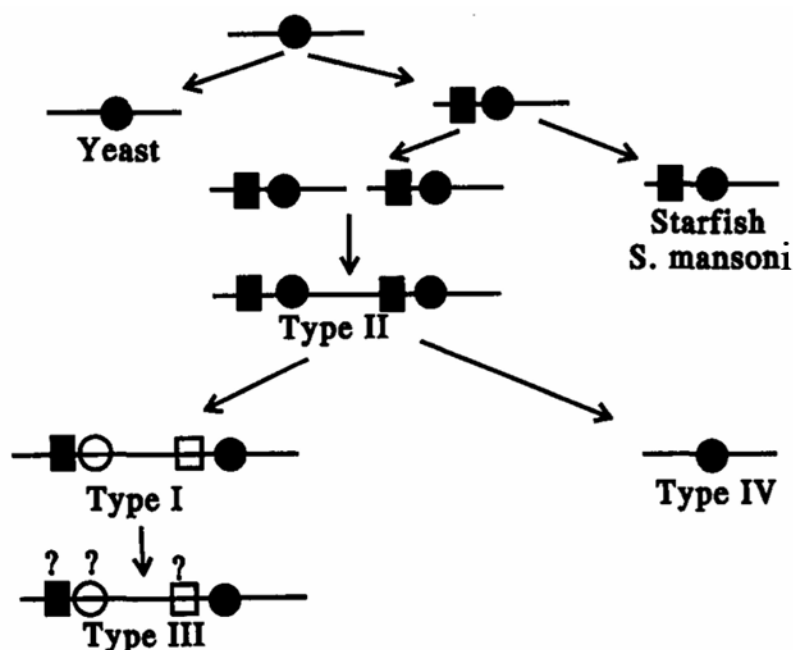


Figura 8. Relaciones evolutivas entre hexocinasas. Las masas moleculares (≈ 50 o ≈ 100 kDa) están representadas por la longitud de las líneas negras; Los círculos negros representan el sitio catalítico y los cuadrados negros el sitio de unión alostérica del producto inhibidor G-6P. Los círculos blancos representan el hipotético sitio de unión latente del producto G-6P y los cuadros blancos el hipotético sitio de unión latente para la glucosa en el extremo N-terminal. Los tipos I-IV se refieren a las hexocinasas de mamífero I-IV. Reproducida de *Evolutionary relationships among the hexocinases* de Wilson. doi.org/10.1042/BST0250103

HK I

Esta enzima gobierna el paso limitante de la glucólisis en el cerebro y en los eritrocitos ⁴². Está conformada por dos monómeros unidos mediante una alfa hélice que unen glucosa y glucosa-6-fosfato en regiones funcionales prácticamente adyacentes y que mantienen el plegamiento de la HK de *S. cerevisiae* ^{35,57}. La inhibición de su actividad por el producto G-6P puede aliviarse con niveles fisiológicos de fosfato (esto no ocurre en HK II y III) ^{35,57}. Además, es posible que cambios conformacionales en el extremo N-terminal —inducidos por la unión de glucosa, fosfato o glucosa-6P— efecten en la unión del ATP al dominio C-terminal ⁴².

El cristal 1HKB resuelto por cristalografía de rayos X a una resolución de 2.80 Å, muestra un 30% de aminoácidos idénticos respecto a la secuencia HKA de hexocinasa de *S. cerevisiae*, con una estructura secundaria y terciaria esencialmente idéntica ^{42,58}. La nula actividad catalítica en la mitad N-terminal apunta a diferencias estructurales entre las mitades N- y C-terminales en un subdominio flexible que aparentemente impide la unión de ATP ³⁵.

HK II

Esta enzima está sobreexpresada en todos los tumores agresivos, por lo que se han estudiado ampliamente las diferencias en sus características estructurales y bioquímicas, respecto a otras HK's, con el afán de desarrollar nuevas terapias anticancerígenas ^{26,27}.

Sus extremos N- y C-terminal presentan una actividad catalítica similar, pero son las interacciones a través del extremo N-terminal las que inician y mantienen la tumorigénesis ^{26,35}. El crecimiento acelerado de los diferentes tipos de tumores que utilizan glucólisis aeróbica en vez de fosforilación oxidativa (efecto de Warburg), requieren de un incremento en la tasa del metabolismo de la glucosa para producir energía y sintetizar los bloques bioquímicos de construcción para la proliferación de células cancerígenas, la localización de HK II en la membrana externa mitocondrial (OMM) implica un acceso preferencial al ATP, alivia la inhibición por el producto G6P y, más importante, suprime la apoptosis ^{26,27}.

Alteraciones en el tamaño de la alfa hélice-13 —que une las mitades N y C-terminales— causan una pérdida total en la actividad catalítica de la mitad N-terminal, en donde la longitud de esta hélice es proporcional a la disminución en la actividad catalítica hasta su completa inactivación; la mitad N-terminal es, por tanto, esencial para estabilizar la enzima completa ²⁶.

Se han propuesto glucosaminas 2-6 disustituidas como inhibidores selectivos de HK II que compiten por el sitio de unión de glucosa [Figura 9], el mecanismo de acción propuesto es que grupos voluminosos en R₁ evitan que los *loops* flexibles —implicados en el cierre-apertura de la enzima— formen el sitio catalítico para la transferencia del grupo fosforilo del ATP ²⁷. En R₂ los mejores resultados mantienen el grupo -OH análogo al -OH-2 de la glucosa.

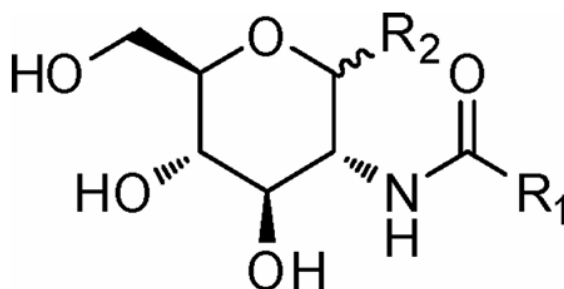


Figura 9. Andamio molecular de inhibidores propuestos para la inactivación de HK II. R₁ = grupos arilo, biarilo o alquenilo sustituidos. R₂ = OH, OMe o H,H. Reproducida de *SAR of C-2 Substituted Glucosamines* de Lin et al., doi.org/10.1021/acsmchemlett.5b00214.

HK III

La HK III es la isoenzima menos estudiada, esta carece de la secuencia N-terminal de anclaje a mitocondria, por lo que su localización es principalmente citosólica ³⁴. Existe un cristal del

extremo C-terminal de la HK III resuelto por cristalografía de rayos X con una resolución de 2.80 Å (PDB: 3HM8), pero la información estructural detallada no se ha publicado ⁵⁹.

HK IV

Está expresada principalmente en hígado y células pancreáticas β , actúa como un sensor de glucosa en la regulación hepática del metabolismo de la glucosa y la secreción de insulina dependiente de glucosa; las mutaciones que la inactivan están relacionadas con la diabetes, mientras que mutaciones que la activan están asociadas con hipoglicemia ^{28,29}.

A concentraciones fisiológicas, la única hexosa que funge como sustrato de HK-IV es la glucosa; no obstante, a concentraciones en exceso —no relevantes fisiológicamente— HK-IV también fosforila otras hexosas (e.g. manosa, 2-deoxiglucosa y fructosa) ⁶⁰. Por otro lado, HK-IV es la única hexocinasa que no es inhibida por el producto G-6P: su k_i es ≈ 60 mM (0.2-0.9 mM HKI-III), cuando las concentraciones hepáticas normales de G-6P son 0.1-0.3 mM ⁶⁰.

La cinética de HK-IV respecto al complejo $MgATP^{2-}$ corresponde a una cinética de Michaelis-Menten; la cinética de su otro sustrato, la glucosa, es distinta debido al efecto de su unión cooperativa; no obstante, se ha observado que el $MgATP^{2-}$ tiene efecto en la unión cooperativa de la glucosa: coeficiente de Hill de 1.6 a concentraciones saturadas de $MgATP^{2-}$ que disminuye conforme disminuye la concentración de $MgATP^{2-}$ ⁶⁰.

Debido a sus implicaciones regulatorias en hígado y páncreas, esta enzima se ha propuesto como blanco para el tratamiento de la diabetes tipo 2; dentro de los compuestos propuestos, se han encontrado activadores alostéricos que se acoplan a una región entre las α -hélices 13 y 5 ²⁹.

1.3 Implicaciones del Mg como cofactor del ATP

Dentro de las células, la energía es provista por la oxidación de macromoléculas como carbohidratos, lípidos y proteínas; esta energía es utilizada para llevar a cabo procesos como la síntesis de macromoléculas, la contracción muscular, el transporte activo de iones o termogénesis; la energía libre producida mediante la oxidación es almacenada en enlaces de alta energía contenidos en moléculas como el adenosín trifosfato (ATP), adenosín difosfato (ADP) o fosfoenolpiruvato, entre otros fosfógenos ⁶¹. Independientemente de que, en ciertos casos, moléculas como el guanosín trifosfato (GTP) proveen de la fuerza impulsora para llevar a cabo procesos demandantes de energía, la hidrólisis de ATP desempeña el papel central en la actividad de nucleótido difosfato cinasas y otras enzimas involucradas en la distribución de la red bioenergética de transferencia de grupos fosfato ⁶². El ATP provee la energía termodinámica impulsora para la química celular, actuando como el enlace central entre la producción de energía y los numerosos procesos celulares demandantes de energía; desde el mantenimiento del potencial de la membrana neural, hasta el transporte de organelos y la traslocación nucleocitosólica ^{61,62}.

Además de su papel en la transducción energética, el ATP también desempeña un rol importante en la señalización celular: 1) funge como donador de grupo fosfato para la activación de sustratos en reacciones metabólicas y como coenzima para un gran número de cinasas; 2) en la regulación de la función, por modificaciones postraduccionales de las proteínas, el ATP puede servir tanto como un donador de grupo fosfato, como un donador de grupo adenililo; 3) también es requerido en la síntesis de adenosín monofosfato cíclico (cAMP), el cual es un segundo mensajero crítico en la transducción de señales; 4) finalmente, el mismo ATP puede servir como ligando señalizador para receptores ionotrópicos o receptores acoplados a proteínas G sensibles a ATP o purinérgicos ⁶².

En general, la principal fuente de energía para el metabolismo celular es la glucosa, la cual es catabolizada en tres pasos subsecuentes (glicólisis, ciclo del ácido cítrico y fosforilación oxidativa) para producir ATP; durante el primer paso, cuando la glucosa es transformada en piruvato, la cantidad de ATP producido es poca; en el siguiente paso, el piruvato es transformado en acetil-CoA para entrar al ciclo del ácido cítrico y producir NADH; el NADH generado será utilizado en los complejos de la cadena respiratoria para generar un gradiente de protones a lo largo de la membrana mitocondrial interna, la cual es necesaria para la producción de grandes cantidades de ATP mediante la ATP sintasa mitocondrial ⁶¹.

1.3.1 Rol del magnesio en biosistemas

Aproximadamente un tercio de todas las proteínas requieren de un ion metálico para desempeñar su función o adquirir una estructura específica; sin embargo, el rol de estos iones fundamental en biología, no ha sido descrito exhaustivamente a nivel molecular ^{25,63–65}. El papel que desempeñan estos iones puede clasificarse entre catálisis redox y catálisis no-redox; el primero se refiere a cuando actúan como centros metálicos en catálisis o asistiendo la catálisis (e.g. Fe^{2+} en la isopenicilina N sintasa), mientras que el segundo se refiere a cuando actúan como activadores de especies reactivas o como estabilizadores electrostáticos; los principales mecanismos de activación de sustratos/cofactores en catálisis no-redox son: incrementar la electrofilia, incrementar la nucleofilia, incrementar ambos, incrementar la acidez o promover la heterólisis ²⁵ [Figura 10].

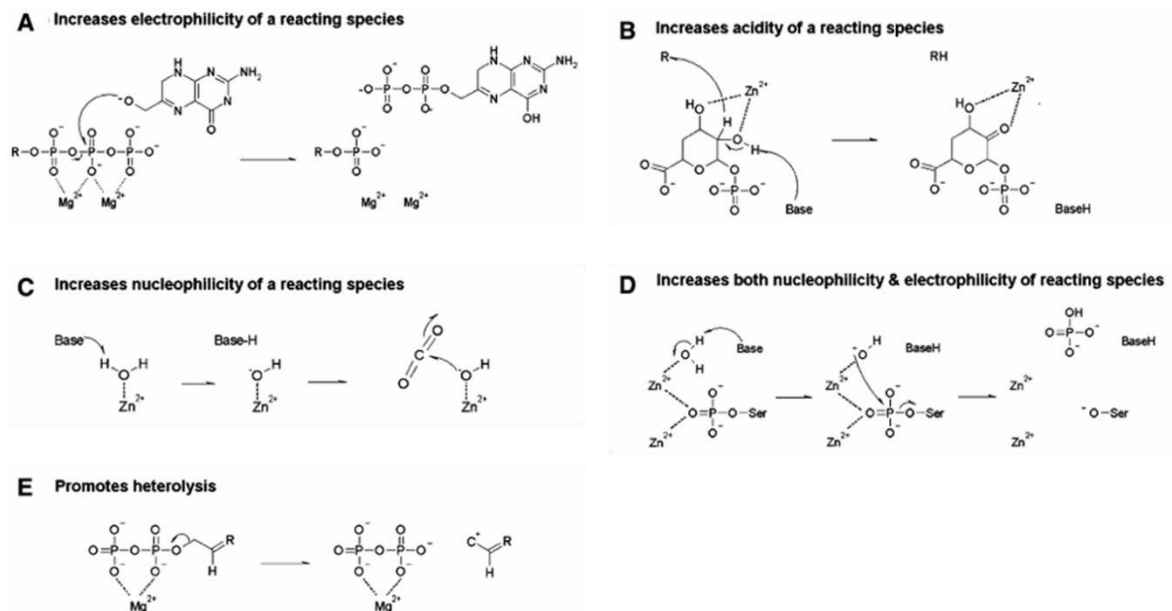


Figura 10. Ejemplos de los principales mecanismos de activación de sustratos o cofactores en catálisis no-redox en biosistemas. A) 6-hidroximetil-7,8-dihidropterina pirofosfocinasa. B) 3-deshidroquinato sintasa. C) anhidrasa carbónica. D) fosfatasa alcalina. E) pentaleneno sintasa. Reproducida de *Examples in Metal-MACiE of metals acting in different mechanisms of substrate/cofactor activation in non-redox catalysis*, de Andreini et al. doi.org/10.1007/S00775-008-0404-5

El magnesio es el cuarto metal más abundante en el cuerpo y se ha reconocido como cofactor de más de 300 reacciones enzimáticas (e.g. todas las reacciones dependientes de ATP) ^{66,67}. El magnesio es crucial para el metabolismo del ATP y es necesario para el funcionamiento estructural de las proteínas, ácidos nucleicos y mitocondrias; es requerido para la síntesis de proteínas, DNA y RNA, así como para la producción de energía aeróbica y anaeróbica, ya sea de forma indirecta como parte del complejo Mg-ATP o directamente como activador enzimático ^{63,64,66,67}. También desempeña un rol clave en el transporte activo de iones de calcio y de potasio a través de la membrana celular, lo cual es un proceso importante para la conducción de los impulsos nerviosos, contracción muscular, tono vasomotor y el ritmo cardíaco ^{66,67}. Niveles bajos de magnesio están asociados con un gran número de enfermedades crónicas como el Alzheimer, resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2, hipertensión, enfermedad cardiovascular, migraña y trastorno por déficit de atención e hiperactividad (ADHD) ⁶⁷.

Una de las principales clases de metaloenzimas que utilizan Mg^{2+} como cofactor catalítico son las cinasas (e.g. hexocinasas), las cuales pertenecen a la familia de las transferasas (EC2); de hecho, del Mg total en el sistema, aproximadamente el 45% se une a transferasas [Figura 11A]; y del total de transferasas, aproximadamente el 24 y 4 % utilizan Mg o Mg/Mn como cofactores, respectivamente [Figura 11B] ^{25,68}. El tipo de ion metálico divalente puede alterar la actividad de las cinasas y su señalización en compartimentos celulares definidos ^{25,68}.

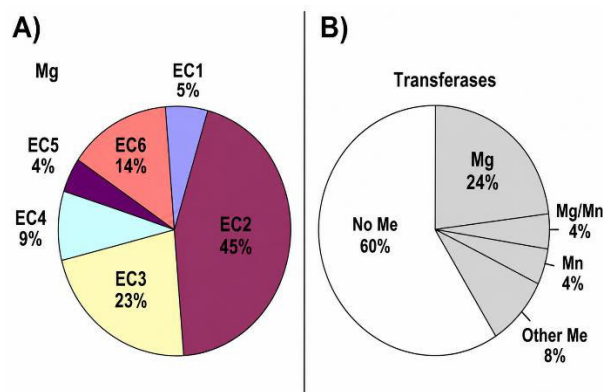


Figura 11. Distribución del Mg en las seis familias de enzimas y frecuencia de iones metálicos en transferasas. A) Las enzimas se clasifican en 6 familias (EC1-EC6), las transferasas corresponden a EC2. B) Me = Metal. Modificada de *Distribution of the eight most common catalytic metal ions across six EC classes* y *Relative Frequencies of catalytic metal ions in the six EC classes*, de Andreini et al. doi.org/10.1007/S00775-008-0404-5

Por otro lado, aunque virtualmente cualquier ion metálico divalente puede favorecer la transferencia de un grupo fosforilo, el Mg^{2+} es excepcionalmente eficiente como cofactor de catálisis; además, las concentraciones de iones metálicos divalentes difieren dependiendo del tejido u organismo; en general, mientras que las concentraciones de Mg^{2+} libre se encuentran en el rango milimolar, otros metales divalentes como el Mn^{2+} (10^{-6} M), Zn^{2+} (10^{-11} M) y Ca^{2+} (10^{-7} M en estado de relajación) se mantienen a concentraciones bajas ⁶⁸.

Existen múltiples ejemplos de enzimas que utilizan el complejo Mg-ATP^{2-} —o complejos similares— como sustrato (e.g. cinasas, miosinas, cinecinas, proteínas motoras, translocasas, NTPasas); sin embargo, lo que esencialmente diferencia la interacción de este complejo con el sitio activo, es la naturaleza de los residuos implicados, así como los dominios estructurales específicos de las proteínas ^{20,68-76}.

1.4 Métodos *in silico* para el análisis de sistemas bioquímicos y biomoleculares

La bioinformática es una disciplina que se enfoca en el desarrollo tecnológico de la recolección y procesamiento de datos biológicos, así como en el uso de esta información para la exploración y predicción biológica; los avances en este campo han generado cantidades vastas de información para cuantificar y caracterizar colecciones de biomoléculas que proveen las bases para comprender —a nivel molecular— los mecanismos mediante los cuales ocurren los fenómenos biológicos ⁷⁷. En el análisis de sistemas biológicos, particularmente de proteínas, es de gran relevancia analizar el estado de conservación de las regiones funcionales o alostéricas implicadas en los mecanismos de nuestro interés; la comparación de estructuras basadas en su secuencia codificante ha resultado de gran relevancia en este tipo de aproximaciones ^{78,79}.

Por otro lado, a los métodos de la química computacional los podemos dividir entre los que utilizan métodos de mecánica clásica y los que utilizan métodos de mecánica cuántica.

Los métodos que utilizan mecánica clásica consideran solamente los núcleos y enlaces de un sistema molecular e ignoran el movimiento electrónico; estos métodos que típicamente se basan en mecánicas moleculares (MM) y dinámicas moleculares (MD), calculan la energía de un sistema utilizando un campo de fuerza que, a grandes rasgos, es una función paramétrica de las posiciones de los núcleos que trata a los enlaces y ángulos como campos elásticos (resortes); la energía potencial del sistema suele descomponerse entre interacciones enlazantes representadas por potenciales harmónicos (estiramiento de enlaces, flexiones angulares y torsiones de los ángulos diedros) e interacciones no enlazantes representadas por potenciales Coulómbicos o de Lennard-Jones (interacciones electrostáticas y fuerzas de van der Waals) ⁸⁰⁻⁸³. Ya que son computacionalmente muy eficientes, estos métodos permiten analizar sistemas moleculares de gran tamaño; sin embargo, los alcances de sus resultados son limitados, pues no aportan resultados de propiedades electrónicas y sus resultados varían significativamente dependiendo de la parametrización específica ^{80,81,83}.

Los métodos de acoplamiento molecular (*Docking*) permiten simular cómo una macromolécula-blanco interactúa con una molécula pequeña como un ligando, sustrato o inhibidor; para modelar esta interacción entre el ligando y la molécula-blanco, sus estructuras tridimensionales son superpuestas para analizar los sitios clave de unión, utilizando campos de fuerza clásicos y haciendo cálculos de MM ^{78,79,82}. Combinar estos protocolos de acoplamiento molecular de bajo costo computacional junto con simulaciones de dinámica molecular, permite predecir complejos fiables proteína-ligando ^{78,82}. Las simulaciones de MD integran las ecuaciones de movimiento de Newton para simular las trayectorias de los átomos a lo largo del tiempo, típicamente con métodos de integración comunes como los algoritmos de Verlet y Leapfrog; el primero no calcula explícitamente las velocidades (deben derivarse por separado), mientras que el segundo las calcula en pasos intermedios de tiempo, lo cual mejora la precisión de los cálculos ⁸². En general, los pasos temporales deben seleccionarse para equilibrar la exactitud (capturar con precisión movimientos rápidos del sistema) con la eficiencia del muestreo (explorar eficientemente el espacio de fases) ⁸².

En contraste, los métodos que utilizan mecánica cuántica sí toman en cuenta el movimiento y estructura de los electrones, por lo que son computacionalmente mucho más demandantes y no son muy adecuados (por su alto costo computacional) para moléculas grandes.

Los postulados y teoremas de la mecánica cuántica constituyen la base para la predicción de propiedades químicas observables mediante métodos *ab initio* o “de primeros principios” ⁸⁰. En mecánica cuántica, para describir el estado de un sistema postulamos la existencia de una función de onda o función de estado Ψ , la cual contiene toda la información que es posible conocer sobre un sistema ^{80,84,85}. Formalmente, esta se obtiene al resolver exactamente la ecuación de Schrödinger del sistema. Aplicar un operador mecanocuántico (que corresponde a un observable físico en particular) a la función de onda permite predecir la probabilidad de

encontrar la totalidad de valores observables correspondientes a los valores experimentales de dicha variable dinámica que exhibe un sistema en específico ⁸⁰.

En la práctica, nuestro objetivo es resolver de manera aproximada la ecuación de Schrödinger no-relativista e independiente del tiempo: $\hat{H}\psi = E\psi$ [Ecuación 1]^{84,86}. En donde $\hat{H}$, es el operador hamiltoniano para un sistema molecular de M núcleos y N electrones en ausencia de campos magnéticos o eléctricos ^{84,86}. El hamiltoniano, $\hat{H}$, es un operador diferencial que representa la energía total del sistema. $\psi_i(\vec{x}_1, \vec{x}_2, \dots, \vec{x}_N, \vec{R}_1, \vec{R}_2, \dots, \vec{R}_M)$ representa la función de onda del estado i-ésimo del sistema, el cual depende de las 3N coordenadas electrónicas espaciales, $\{\vec{r}_i\}$, y las N coordenadas del espín del electrón, $\{\vec{s}_i\}$; las cuales se definen colectivamente como $\{\vec{x}_i\}$, mientras que $\{\vec{R}_i\}$ corresponde a las 3M coordenadas espaciales de los núcleos R_i (Szabo, Koch). E_i es el valor numérico de la energía del estado que describe ψ_i ^{84,86}.

$$\hat{H}\psi_i(\vec{x}_1, \vec{x}_2, \dots, \vec{x}_N, \vec{R}_1, \vec{R}_2, \dots, \vec{R}_M) = E_i\psi_i(\vec{x}_1, \vec{x}_2, \dots, \vec{x}_N, \vec{R}_1, \vec{R}_2, \dots, \vec{R}_M) \quad (1)$$

En la forma desarrollada del hamiltoniano, los primeros dos términos describen la energía cinética de los electrones y núcleos, mientras que los siguientes tres corresponden a la energía potencial y representan las interacciones electrostáticas atractivas entre el núcleo y los electrones, así como la repulsión debida a las interacciones electrón-electrón y núcleo-núcleo ^{84,86}. Si tomamos en cuenta la gran diferencia entre las masas de los núcleos y electrones, podemos simplificar más la ecuación de Schrödinger: como los núcleos (por sus masas mayores) se mueven muchísimo más lento que los electrones y, por tanto, podemos considerar que los electrones se mueven en el campo de núcleos fijos, el término de la energía cinética de los núcleos tiende a 0 y el término de la repulsión núcleo-núcleo se mantiene constante ^{84,86}. Esto es la aproximación de Born-Oppenheimer, que se utiliza en la gran mayoría de los métodos de estructura electrónica ^{84,86}.

Los métodos *ab initio* no requieren de calibración empírica y son aplicables a todos los sistemas moleculares y propiedades de nuestro interés, incluso en ausencia de información experimental; como resultado, estos métodos tienen el potencial de producir resultados mucho más precisos que los métodos utilizados tradicionalmente en las ciencias de la vida ^{80,81,83}. Sin embargo, estos métodos son los más costosos computacionalmente y, por ello, es prácticamente imposible aplicarlos a macromoléculas.

La teoría de funcionales de la densidad (DFT) es una reformulación de la mecánica cuántica ondulatoria clásica que utiliza la densidad electrónica, $\rho(\vec{r})$, como portadora de la información en lugar de la función de onda Ψ ⁸⁷. Para un sistema de N-electrones, uno cambia de una función de onda $\Psi(x^N)$ de 4N variables (tres espaciales y una de spin para cada electrón), a solamente tres variables en la densidad $\rho(x, y, z)$ ⁸⁷. El método de Kohn y Sham —aplicando los teoremas de Hohenberg y Kohn que constituyen las bases teóricas de la DFT —permite resolver el problema de N cuerpos con ecuaciones de una sola partícula que, de

forma autoconsistente, nos permiten calcular la densidad electrónica de un sistema de electrones interactuantes ⁸⁷. El primer Teorema de Hohenberg-Kohn establece que la densidad electrónica exacta, $\rho(\vec{r})$, es suficiente para describir un sistema electrónico de N partículas: la densidad electrónica determina biunívocamente el potencial externo y, por tanto, también su hamiltoniano, energía y función de onda [**Ecuación 2**] ⁸⁷.

$$\rho \leftrightarrow v(\vec{r}) \leftrightarrow \hat{H} \leftrightarrow E \leftrightarrow \psi \quad (2)$$

El segundo teorema establece que se puede formular un funcional de la energía $E[\rho]$ que depende solamente de la densidad electrónica y que la densidad que minimiza este funcional corresponde al estado fundamental del sistema ⁸⁷. Con base en el teorema anterior, ya que la densidad contiene toda la información necesaria para describir todas las propiedades del sistema, no es necesario calcular *a priori* la función de onda para hallar la energía total del sistema en su estado fundamental ⁸⁷. Este teorema provee del principio variacional de la energía (la energía calculada es siempre igual o mayor a la energía del estado fundamental), de tal manera que el funcional de Hohenberg-Kohn $F_{HK}[\rho]$ (también llamado funcional universal) es exacto y, por tanto, lo es también el funcional de la energía $E_{HK}[\rho]$ [**Ecuación 3**] ⁸⁷.

$$E_{HK} = \int \rho(\vec{r})v(\vec{r})d\vec{r} + F_{HK}[\rho] \quad (3)$$

Actualmente, la DFT es el “caballo de batalla por excelencia” para explorar la estructura, estabilidad, propiedades electrónicas, reactividad y reacciones de moléculas, polímeros y sólidos en múltiples ramas de la química; abarcando, gracias a la implementación de los efectos relativistas y su forma de tratar la energía de correlación, prácticamente los elementos de la tabla periódica completa ^{88,89}. La teoría de funcionales de la densidad conceptual (CDFT) ha introducido varios descriptores de la DFT, tanto globales como locales, para cuantificar propiedades químicas como los potenciales de ionización, la afinidad electrónica, la electronegatividad, dureza y blandura, reactividad a nivel global y local en términos de caracteres nucleofílicos o electrofílicos, entre otros; a través del enfoque perturbacional, todos estos descriptores pueden ser caracterizados como funciones de respuesta, reflejando la reactividad intrínseca de un átomo o molécula tras su perturbación por un sistema diferente ^{87,88,90–94}. En sistemas biológicos, CDFT se ha utilizado por más de veinte años para llevar a cabo análisis de catálisis enzimática, química de péptidos computacional y actividad biológica y toxicológica de moléculas orgánicas ^{88,89}

Adicionalmente, existen métodos híbridos que combinan técnicas de mecánica cuántica y mecánica clásica, denominados QM/MM; estos métodos permiten abordar grandes moléculas, mediante el tratamiento de estos sistemas complejos en subsistemas que integran métodos de estructura electrónica (QM) solamente para el subsistema principal ^{78,89,95}. Los demás subsistemas, que se consideran menos relevantes para la reactividad química de interés que se quiere describir y racionalizar, se tratan a nivel MM. Los detalles mecanísticos de la transferencia de protones acoplados a la escisión de un grupo fosfato, son uno de los retos

clave en los cálculos por QM/MM ⁹⁵; el estudio de esta y otras reacciones enzimáticas requiere de una cuidadosa elección del método computacional y de la separación arbitraria de la macromolécula en subsistemas, para abordar la gran complejidad química de estas reacciones ^{78,89,95}.

Las técnicas computacionales antes mencionadas, nos permiten investigar sistemas químicos y biológicos de interés a un nivel de detalle inasequible para la mayoría de los métodos experimentales ^{78,83,95}. Los complejos biomoleculares, incluidos las enzimas, son uno de los temas más difíciles de abordar debido a su complejidad estructural y de función ^{78,82,89,95}; no obstante, el 9 de octubre del año 2024 se entregó el premio nobel de química a David Baker, por su trabajo en el diseño computacional de nuevas proteínas, y a Demis Hassabis y John Jumper, por su trabajo en la dilucidación estructural de proteínas mediante inteligencia artificial, lo cual demuestra la relevancia e importancia de los métodos computacionales para el análisis de sistemas bioquímicos y biomoleculares ⁹⁶.

II. Antecedentes

En nuestro grupo de investigación se ha observado que el Pb^{2+} inactiva la hexocinasa de *S. cerevisiae* cuando es preincubada sin glucosa, con Mg^{2+} y ATP^{4-} por 15min [Figura 12] ¹⁷. La inactivación requiere preincubación sin glucosa, pero en ausencia de Mg^{2+} y ATP^{4-} , el efecto sobre la velocidad máxima aparente ($^{\text{APP}}V_{\text{MAX}}$) relativa disminuye ¹⁷. La actividad se recupera parcialmente al añadir Mg^{2+} al sistema, pero no se observa recuperación de la actividad con metales endógenos como Ca^{2+} y Mn^{2+} ¹⁷. En la **Figura 12** el eje Y corresponde al tiempo de preincubación, mientras que en el eje X se muestra el efecto sobre la actividad relativa de la enzima. La actividad enzimática se determinó mediante un ensayo espectrofotométrico acoplado con la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), el cual permite relacionar la concentración de NADPH formado con la actividad catalítica de la hexocinasa ¹⁷. El mecanismo toxicológico apunta a posibles sitios de unión de Pb en la enzima, así como al efecto indirecto de la formación de complejos Pb-ATP.

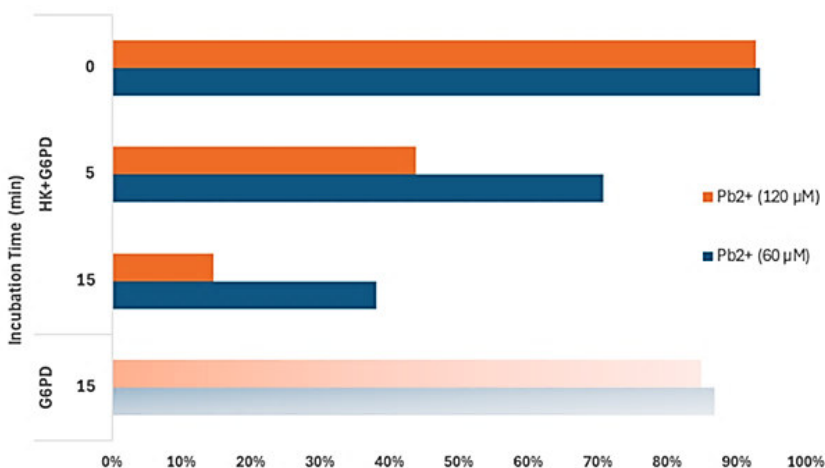


Figura 12. Efecto de la preincubación con plomo sobre la actividad relativa de la HK de *S. cerevisiae*. Condiciones de los experimentos: 15mM Mg^{2+} , 0.4mM ATP , 60 o 120 μM Pb^{2+} , pH = 7.5, T= 25°C. G6PD = glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

III. Hipótesis

La inactivación de la HK de *S. cerevisiae* está relacionada con la formación de complejos Pb-ATP^{2-} y la unión de Pb^{2+} libre en uno o varios sitios que solo están presentes en la conformación abierta de la enzima.

Justificación

El envenenamiento por plomo es un grave problema de salud pública debido a la inevitable exposición a este metal pesado, como consecuencia de la industrialización moderna y las actividades antropogénicas. Sus múltiples mecanismos toxicológicos aún no se encuentran

del todo descritos, pero es sabido que la exposición a este metal genera afectaciones irreversibles en los sistemas neurológicos, reproductivos, hematológicos, respiratorios, renales, cardiovasculares y hepatológicos, mediante mecanismos inmunomoduladores, oxidativos e inflamatorios; además, está clasificado como probablemente carcinogénico para humanos por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC).

Los efectos carcinogénicos de metales tóxicos se han asociado con la unión a proteínas reguladoras involucradas en la síntesis y reparación del DNA, apoptosis y regulación del ciclo celular. Las hexocinasas, además de fungir como enzimas centrales en el catabolismo de la glucosa, son también proteínas clave en los procesos de carcinogénesis porque están implicadas en múltiples procesos celulares como: diferenciación celular, supervivencia celular y autofagia, respuesta al daño a DNA, homeostasis redox, proliferación celular e invasión y migración de tumores. Estas enzimas catalizan la transferencia de un grupo fosforilo (PO_3^{2-}) del complejo Mg-ATP^{2-} a una molécula de hexosa (e.g. glucosa, fructuosa o galactosa) para formar hexosa-6-fosfato, la cual entra en vías metabólicas alternas (glucólisis, glucogénesis o síntesis de pentosas fosfato). En el laboratorio de toxicología mecanística del grupo, se ha demostrado que el plomo inactiva la HK de *S. cerevisiae* en ensayos *in vitro* y que la actividad se recupera parcialmente al tratar el sistema con magnesio.

Tanto la hexocinasa de *S. cerevisiae*, como las hexocinasas de otros organismos alejados evolutivamente, contienen residuos implicados en su actividad que son potenciales blancos de unión para iones metálicos como el Pb^{2+} ; más aún, uno de los mecanismos toxicológicos que se han identificado para metales exógenos divalentes como el plomo, es el desplazamiento de metales endógenos por mimetización química. Es posible que dicho mecanismo esté también implicado en la inactivación de la HK, por desplazamiento del ion magnesio en el complejo Mg-ATP^{2-} , determinante para la actividad enzimática.

Por tanto, en este estudio proponemos realizar un análisis estructural de la enzima y evaluar las propiedades fisicoquímicas y electrónicas de distintos complejos Metal-ATP, (Metal = Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} y Pb^{2+}). Para considerar tanto los aspectos termodinámicos, como evolutivos, electrónicos y cinéticos involucrados, llevamos a cabo análisis por la teoría de funcionales de la densidad, análisis del estado de conservación, cálculos de acoplamiento molecular sobre regiones funcionales y sobre la proteína completa, análisis de predicción de posibles sitios de unión de Pb, simulaciones de dinámica molecular y la construcción de un modelo finito de una región funcional.

IV. Metodología

En la **Figura 13** se muestra un diagrama general sobre la metodología que se utilizó.

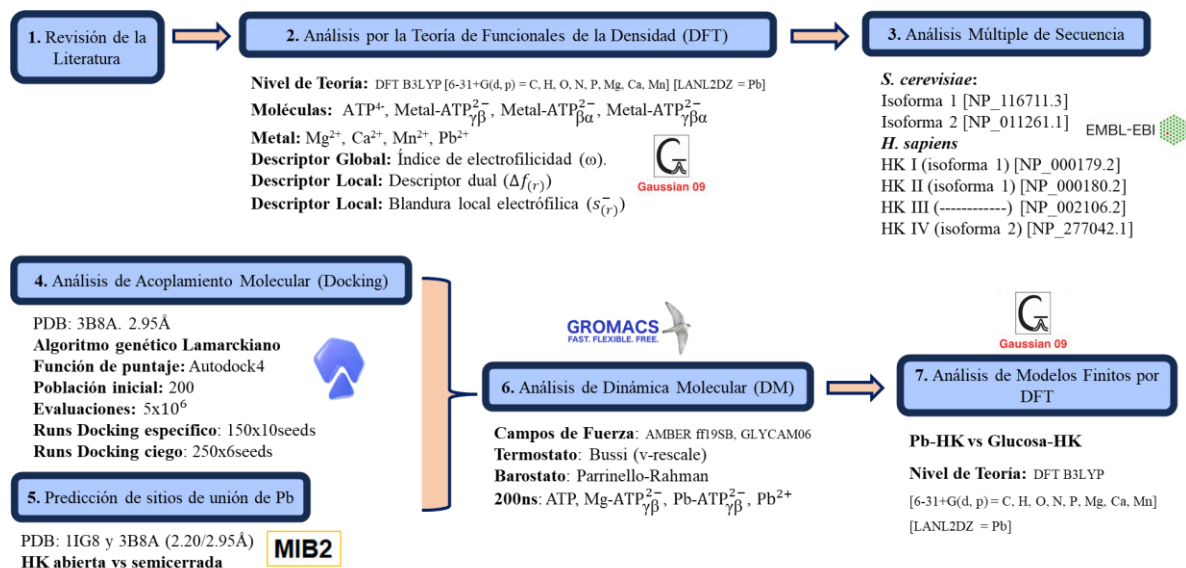


Figura 13. Diagrama general de la metodología. 1) Revisión de la literatura. 2) Se realizaron cálculos por DFT para describir propiedades físicoquímicas y electrónicas de la molécula de ATP^{4+} y los complejos Metal-ATP^{2-} , con Gaussian09. Las posiciones de los fósforos α , β y γ en la molécula de ATP se indican en la Figura 4 C. 3) Se analizó el estado de conservación entre las isoformas de la HK de *S. cerevisiae* y las cuatro HK's de *H. sapiens*, mediante el despachador de trabajos EMBL-EBI. 4) Se llevaron a cabo análisis de acoplamiento molecular en el cristal 3B8A sobre el sitio de unión de ATP y sobre la proteína completa, con Autodock4. 5) Se utilizaron los cristales 1IG8 y 3B8A para predecir posibles sitios de Pb con MIB2. 6) Se realizaron simulaciones de dinámica molecular para analizar la estabilidad del ATP^{4+} , los complejos $\text{Mg-ATP}_{\gamma\beta}^{2-}$ y $\text{Pb-ATP}_{\gamma\beta}^{2-}$, y un Pb^{2+} , mediante GROMACS. 7) Finalmente, se construyeron modelos finitos del sitio de unión de glucosa con base en los resultados de dinámica molecular e información cristalográfica.

4.1 Cálculos a través de la teoría de funcionales de la densidad (DFT)

Optimización Geométrica y Cálculo de Frecuencias

Las coordenadas iniciales, utilizadas para la molécula libre de ATP^{4+} y los complejos $\text{Metal-ATP}_{\gamma\beta}^{2-}$, $\text{Metal-ATP}_{\beta\alpha}^{2-}$ y $\text{Metal-ATP}_{\gamma\beta\alpha}^{2-}$ (ion metálico unido a los grupos fosfato gamma-beta, beta-alfa o gamma-beta-alfa de la molécula de ATP, respectivamente; ver mapa de estos sitios en la **Figura 4C**), se generaron utilizando el software *GaussView*⁹⁷. Los metales por evaluar fueron Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} y Pb^{2+} .

Para llevar a cabo los cálculos de frecuencias y optimizaciones geométricas de la molécula de ATP^{4+} y los complejos Metal-ATP^{2-} , utilizamos el software *Gaussian-09*⁹⁸. En cada

optimización, para determinar si la geometría que calculamos se encontraba en un mínimo de la superficie de energía potencial (PES), se verificó el criterio de que todas las frecuencias calculadas de la matriz Hessiana fueran positivas.

Los cálculos por DFT se realizaron al nivel de teoría del funcional híbrido B3LYP y un conjunto base doble zeta de Pople con funciones dobles de polarización y funciones difusas 6-31+G (d, p), para todos los átomos excepto el Pb ⁹⁹. En el caso del Pb utilizamos la base LANL2DZ, ya que es necesario emplear un conjunto base con un pseudopotencial efectivo del *core* (ECP), que tome en cuenta los efectos relativistas propios de átomos pesados y reduzca el costo computacional al reducir el número de electrones que se consideran, pues este escala aproximadamente como N⁴ veces con el número N de electrones explícitos tratados ⁹⁹. En todos los casos, se utilizó el modelo de solvente continuo IEFPCM, en agua y constante dieléctrica: $\epsilon = 78.355$ ^{100,101}. El funcional B3LYP y su variante CAM-B3LYP, en combinación con conjuntos base de Pople, se han utilizado anteriormente para estudiar el ATP, complejos Mg-nucleótido y sistemas fosfoanhídrido similares ^{102–105}.

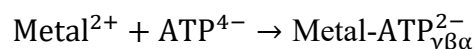
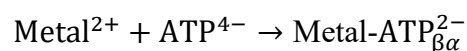
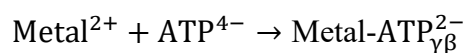
La molécula de ATP⁴⁻ se evaluó con multiplicidad de singlete, triplete y quintuplete; los complejos de Mn-ATP²⁻ se evaluaron en estados de doblete, cuadruplete, sextuplete y octuplete. El resto de los complejos con Mg²⁺, Ca²⁺ y Pb²⁺ se evaluaron con multiplicidad de singlete y triplete.

Cálculo de la energía libre de complejación, de desplazamiento por mimetización química y de transferencia del grupo fosforilo γ

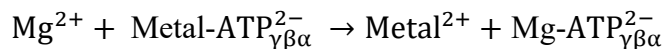
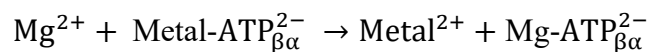
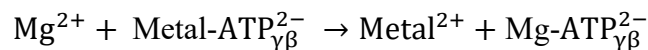
A partir de las estructuras optimizadas, se calculó la energía de formación de los complejos, la energía de desplazamiento del metal en el complejo por acción del magnesio, y la energía de transferencia del grupo fosforilo γ [**Ecuación 4**], donde ν es el coeficiente estequiométrico de cada compuesto en la reacción balanceada. Para esto se calcularon los iones metálicos, la glucosa y los productos G6P²⁻, Metal-ADP¹⁻ y H⁺, al mismo nivel de teoría que los complejos en solvente. Las posiciones de los fósforos α , β y γ en la molécula de ATP se indican en la **Figura 4C**.

$$\Delta G = \sum \nu G^{\circ}(\text{productos}) - \sum \nu G^{\circ}(\text{reactivos}) \quad (4)$$

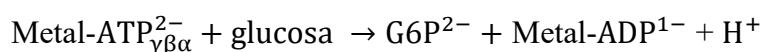
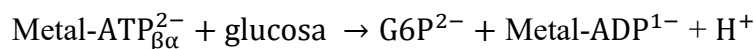
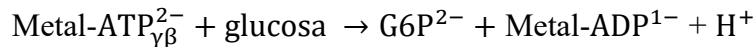
Reacciones generales de complejación:



Reacciones generales de desplazamiento por mimetización química:



Reacción general de transferencia de grupo fosforilo γ :



Cálculo de descriptores globales

Para analizar el efecto de cada ion sobre el complejo Metal-ATP, se calcularon el potencial de ionización (I) y la afinidad electrónica (A) por el método de diferencias finitas ⁸⁷. Este método permite calcular el potencial de ionización y la afinidad electrónica de una molécula, mediante la diferencia en energía entre la especie de N electrones (E_{neutro}), y las especies de N-1 ($E_{catión}$) y N+1 ($E_{anión}$) electrones, respectivamente [**Ecuaciones 5 y 6**] ⁸⁷. Nótese que los cálculos de las especies iónicas (catión y anión) se realizan a partir de la estructura optimizada del neutro, sin reoptimizar, dado que estamos calculando el I y la A verticales.

$$I = E_{catión} - E_{neutro} \quad (5)$$

$$A = E_{neutro} - E_{anión} \quad (6)$$

A partir del potencial de ionización y la afinidad electrónica, se pueden calcular el resto de las propiedades químicas de nuestro interés: potencial químico (μ), electronegatividad (χ), dureza química (η), blandura química (S) e índice de electrofilicidad (ω) [**Ecuaciones 6-10**] ^{87,90,106}. El índice de electrofilicidad de los complejos, está relacionado con su capacidad de actuar como posibles sustratos de la HK.

$$\mu = -\frac{(I+A)}{2} \quad (6)$$

$$\chi = -\mu \quad (7)$$

$$\eta = I - A \quad (8)$$

$$S = \frac{1}{\eta} \quad (9)$$

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} \quad (10)$$

Cálculo de descriptores locales

Para analizar el efecto de los iones metálicos sobre el átomo de fósforo γ (el que es transferido durante la reacción), se calcularon las cargas de los átomos bajo el esquema de cargas de Hirshfeld^{107,108}. Posteriormente se calcularon las funciones Fukui condensadas ($f_{(r)}^-$, $f_{(r)}^+$), la blandura local nucleofílica ($s_{(r)}^+$), la blandura local electrofílica ($s_{(r)}^-$), y el descriptor dual ($\Delta f_{(r)}$) [Ecuaciones 11-15]^{87,91}. Las funciones Fukui f^- y f^+ permiten calcular —sobre un átomo— la reactividad ante un ataque electrofílico o nucleofílico, respectivamente; el descriptor dual Δf nos permite analizar la reactividad que predomina en un sitio (atómico) en la molécula^{87,91}. No obstante, las funciones Fukui no se pueden comparar entre átomos similares de moléculas distintas, ya que la función integra siempre a 1 [Ecuación 16], por lo que los valores de Fukui locales dependen del tamaño de la molécula; es por tanto que se suele utilizar la blandura global (S) [Ecuación 9], como un factor de normalización que permita comparar la reactividad entre diferentes moléculas. Al multiplicar la Fukui respectiva por la blandura global, esta se reescala y se obtiene la blandura local [Ecuaciones 13 y 14]^{87,106}

$$f_{(r)}^- = q(N - 1) - q(N) \quad (11)$$

$$f_{(r)}^+ = q(N) - q(N + 1) \quad (12)$$

$$s_{(r)}^+ = f_{(r)}^+ * (S) \quad (13)$$

$$s_{(r)}^- = f_{(r)}^- * (S) \quad (14)$$

$$\Delta f_{(r)} = f_{(r)}^+ - f_{(r)}^- \quad (15)$$

$$\int f_{(r)} dr = 1 \quad (16)$$

4.2 Análisis múltiple de secuencias

Para este análisis se utilizaron las dos isoformas de hexocinasas de *S. cerevisiae* (PI y PII) y las hexocinasas I (isoforma 1), II (isoforma 1), III y IV (isoforma 2) de *H. sapiens* [Tabla 1]. Se utilizaron ambas isoformas de *S. cerevisiae*, ya que los experimentos se realizaron con una mezcla no caracterizada de ambas isoformas¹⁷.

La isoforma 1 de HK I humana corresponde a la variante que se expresa de manera ubicua, su extremo 5' incluye un exón único de este transcrito que codifica para el extremo N-terminal que contiene el dominio de unión a porinas (PBD) que media la asociación con la membrana mitocondrial [secuencia de referencia NP_000179.2]. La HK II es la forma predominante en músculo esquelético, se localiza en la membrana externa de la mitocondria y la expresión del gen que codifica para esta, es sensible a la insulina; la isoforma 1 de HK II está conformada por la misma cantidad de residuos (917) que la isoforma 1 de HK I [secuencia de referencia NP_000180.2]. Las isoformas de HK IV y su expresión específica

de tejido en el páncreas y el hígado, son el resultado del uso de múltiples promotores y *splicing* alternativo del gen que codifica para esta proteína; la isoforma 2 de HK IV corresponde a la principal isoforma expresada en el hígado, su primer exón es específico de los transcritos hepáticos (variantes 2 y 3), pero carece de un segundo exón específico del hígado presente en la variante 3; el dominio N-terminal de esta isoforma es distinto, pero el resto de la proteína es idéntico a las isoformas 1 y 3 [secuencia de referencia NP_277042.1].

De las HK's I, II y III solamente se utilizaron los dominios C-terminal catalíticos (residuos 458-917, 451-917 y 460-923, respectivamente). En el caso de HK I y II, la función del dominio N-terminal es proveer de estabilidad a la proteína y como anclaje a la membrana mitocondrial externa ^{26,35,57}. La HK III es citosólica, no contiene el dominio de anclaje a mitocondrias ^{34 34,59}.

Tabla 1. *Tipos de hexocinasas utilizadas en el alineamiento múltiple de secuencias.*

Organismo	Enzima	Isoforma	Secuencia de Referencia-NCBI
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HK PI	1	NP_116711.3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HK PII	2	NP_011261.1
<i>Homo sapiens</i>	HK I	1	NP_000179.2
<i>Homo sapiens</i>	HK II	1	NP_000180.2
<i>Homo sapiens</i>	HK III	-	NP_002106.2
<i>Homo sapiens</i>	HK IV	2	NP_277042.1

Nota: HK = Hexocinasa. Cepa de *S. cerevisiae*: S288C.

Se generó un archivo en formato FASTA con las secuencias de interés y, posteriormente, se llevó a cabo el alineamiento múltiple de secuencias (MSA) con MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation), mediante el gestor de trabajos de EMBL-EBI (European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute) ^{109,110}. Se utilizó el algoritmo MUSCLE ya que suele ser más rápido y preciso que otros algoritmos de MSA (e.g. ClustalW o T-Coffee) ¹¹⁰.

Posteriormente se utilizó el software Jalview para contrastar las regiones conservadas entre las hexocinasas ^{111,112}.

4.3 Acoplamiento molecular de los complejos Metal-ATP²⁻ en HK de *S. cerevisiae*

Para llevar a cabo los análisis por acoplamiento molecular (*Docking* en inglés), de la molécula de ATP⁴⁻ y los complejos Metal-ATP²⁻, utilizamos la estructura cristalográfica 3B8A de la HK PI de *S. cerevisiae* con resolución de 2.95 Å ³⁰. Utilizamos este cristal debido a que se encuentra cocrystalizado con glucosa, lo cual permite 1) validar los cálculos de acoplamiento molecular y 2) trabajar con la conformación semicerrada de la enzima que une

Mg-ATP²⁻. Utilizamos el visualizador de AutoDockTools, la función de puntuación de AutoDock4 y el algoritmo genético lamarckiano (LGA), con una población inicial de 200 y 5x10⁶ evaluaciones para ampliar el muestreo conformacional inicial y favorecer una exploración más exhaustiva del espacio de búsqueda^{113–115}. Para los acoplamientos de región específica se utilizó una caja de acoplamiento (*grid box*) que abarca tanto el sitio de unión de glucosa como el sitio de unión de ATP, las dimensiones específicas se indican en la **Tabla 2**. Para calcular los acoplamientos ciegos fue necesario incrementar el espaciado de la rejilla, de tal manera que esta contuviera la proteína completa [**Tabla 2**].

Tabla 2. Dimensiones de las cajas de acoplamiento.

Tipo de Acoplamiento	Parámetro	Valores
De región específica	Espaciado de la rejilla (Å)	0.375
	Número de puntos (X•Y•Z)	90 puntos-x, 90 puntos-y, 96 puntos-z
	Coordenadas del centro (Å)	25.200, 9.250, 56.462
	Coordenadas mínimas (Å)	8.325, -7.625, 38.462
	Coordenadas máximas (Å)	42.075, 26.125, 74.462
Ciego	Espaciado de la rejilla (Å)	0.650
	Número de puntos (X•Y•Z)	90 puntos-x, 120 puntos-y, 120 puntos-z
	Coordenadas del centro (Å)	25.220, 9.925, 53.462
	Coordenadas mínimas (Å)	-4,030, -29.075, 14.462
	Coordenadas máximas (Å)	54.470, 48.925, 92.462

Para los acoplamientos de región específica y ciegos se calcularon 10 y 6 corridas independientes, generando 150 y 250 conformeros por corrida, respectivamente. Para la validación del método (acoplamiento de la glucosa), los resultados se reclasificaron en clústeres de conformeros con un umbral de 1.0 Å RMSD (raíz de la desviación cuadrática media) [**Ecuación 17**]. Para cada una de las moléculas, los resultados de los múltiples acoplamientos se reclasificaron en clústeres de conformeros con un umbral de 2.5 Å RMSD. Solamente para el sustrato endógeno de referencia (Mg-ATP_{γβ}²⁻), la reclasificación de los clústeres se realizó con un total de 2,500 conformeros, calculados a partir de 10 corridas independientes de 100 conformeros y otras 10 corridas independientes de 150 conformeros. En todos los casos se emplearon semillas aleatorias para la inicialización del algoritmo.

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |\mathbf{r}_i^{(A)} - \mathbf{r}_i^{(B)}|^2} \quad (17)$$

En 17, N es el número total de átomos del ligando; i es el índice que etiqueta cada átomo de 1 a N ; $\mathbf{r}_i^{(A)}$ y $\mathbf{r}_i^{(B)}$ son los vectores de coordenadas cartesianas (x, y, z) del átomo i en las poses A y B , respectivamente; $|\cdot|$ denota el módulo del vector; y $|\mathbf{r}_i^{(A)} - \mathbf{r}_i^{(B)}|^2$ corresponde al cuadrado de la distancia entre el átomo i en ambas poses.

Ya que AutoDockTools no es capaz de asignar cargas a átomos metálicos que no sean iones con carga formal, sobre el archivo de entrada *ligando.pdbqt* se añadieron manualmente las cargas sobre cada uno de los átomos, para esto se tomó en cuenta que AutoDockTools fusiona los hidrógenos no polares sobre los átomos de carbono. El método para calcular estas cargas fue por DFT, al mismo nivel de teoría que en los cálculos previos y el esquema de cargas de Hirshfeld [Sección 4.1]. Adicionalmente, ya que el Pb no está parametrizado para los cálculos con la función de puntaje de AutoDock4, en la información suplementaria 1 [IS 1] se muestran los parámetros utilizados y una breve descripción sobre cómo se definieron.

Cálculo de las interacciones intermoleculares

Los criterios para seleccionar los conformeros de menor energía fueron los siguientes: 1) Pertenece a un clúster principal (i.e. de menor energía y población alta), 2) el clúster persiste en el acoplamiento ciego, y 3) la pose es congruente con lo descrito por cristalografía de rayos X. De tal manera que se reduce la incertidumbre en torno a conformeros estructuralmente plausibles y consistentes con la evidencia cristalográfica, frente a posibles artefactos del software.

Para estas poses se analizó la energía de unión ($\Delta E_{\text{unión}}$), la energía intramolecular (E_{internal}), la eficiencia de ligando (LE) y la constante de inhibición (K_i) [Ecuaciones 18-23].

La energía de unión es la contribución de la energía intermolecular (E_{inter}), la energía intramolecular (E_{internal}) y la contribución entrópica por torsión ($G_{\text{torsional}}$) [Ecuación 18]. E_{inter} se define como la suma de las contribuciones de la energía de van der Waals, de interacciones por enlace de hidrógeno, electrostáticas y de desolvatación [Ecuación 19]¹¹⁵. E_{internal} toma en cuenta casi los mismos términos, pero entre la misma molécula y permite identificar geometrías no plausibles [Ecuación 20]. $G_{\text{torsional}}$ toma en cuenta el número de enlaces rotables y lo multiplica por un valor empírico obtenido de información experimental¹¹⁵ [Ecuación 21]. La eficiencia de ligando se calcula con base en la energía de unión por número de átomos “pesados” (distintos de H) [Ecuación 22]. La constante de inhibición corresponde a la ecuación de Arrhenius [Ecuación 23].

$$\Delta E_{\text{unión}} = E_{\text{inter}} + E_{\text{internal}} + G_{\text{torsional}} \quad (18)$$

$$E_{\text{inter}} = E_{\text{vdW}} + E_{\text{H-bond}} + E_{\text{electrostático}} + E_{\text{desolvatación}} \quad (19)$$

$$E_{\text{internal}} = E_{\text{vdW}} + E_{\text{H-bond}} + E_{\text{electrostático}} \quad (20)$$

$$G_{\text{torsional}} = N_{\text{tors}} * 0.336 \quad (21)$$

$$LE = \frac{\Delta E_{\text{unión}}}{N_{\text{HA}}} \quad (22)$$

$$K_i = e^{-\frac{\Delta E_{\text{unión}}}{RT}} \quad (23)$$

La clasificación de las interacciones intermoleculares para el conformero de menor energía —de cada uno de los complejos Metal-ATP—, se calculó con el software de libre acceso *Discovery Studio*; este programa permite discriminar entre una amplia variedad de tipos de interacciones (e.g. enlaces de hidrógeno, apilamientos π - π o puentes salinos, entre otros), con base en parámetros geométricos predefinidos ¹¹⁶.

4.4 Predicción de sitios de unión de Pb²⁺

Mediante el software MIB2 (Metal Ion Binding 2), se predijeron posibles sitios de unión a plomo en la conformación abierta y semicerrada de la enzima. La estructura cristalográfica 1IG8 (conformación abierta) tiene una resolución de 2.2 Å y corresponde a la isoforma 2 de HK de *S. cerevisiae* ¹⁸. La estructura cristalográfica 3B8A —mencionada anteriormente—, corresponde a la conformación semicerrada de la isoforma 1 ³⁰.

MIB2 funciona comparando la estructura de una proteína respecto a la información estructural contenida en el PDB de sitios de unión a metales identificados experimentalmente; estos sitios los perfila mediante una función de puntuación específica para cada tipo de ion metálico que toma en cuenta información parametrizada sobre la naturaleza química de los metales (e.g. geometrías de coordinación) ^{117–119}.

Para analizar los sitios de unión de plomo entre ambas conformaciones, se contrastaron los perfiles calculados por MIB2.

4.5 Dinámicas Moleculares de ATP⁴⁻, Mg-ATP²⁻, Pb-ATP²⁻ y Pb²⁺

Mediante la plataforma web CHARMM-GUI se generaron los archivos de entrada (*input*) para realizar las simulaciones de dinámica molecular con el software GROMACS ^{120–124}. Esta plataforma permite cargar archivos en formato PDB, a partir de los cuales se definen los parámetros del sistema (e.g. campos de fuerza, dimensiones de la caja, composición de solvente y soluto, entre otros) que serán empleados en las simulaciones ^{125–131}. En la **Tabla 3** se indican los parámetros específicos utilizados.

Se realizaron simulaciones de cinco sistemas que podemos agrupar en dos subconjuntos: **1)** Apo, ATP, Mg-ATP, Pb-ATP, y **2)** Pb²⁺. El primer análisis se realizó sobre el sitio de unión

de ATP; como se ha mencionado anteriormente, el complejo endógeno Mg-ATP²⁻ se une a la conformación semicerrada de la HK; este cambio conformacional es inducido por la unión de la glucosa a la hendidura entre el dominio grande y pequeño de la enzima, de tal forma que, para este análisis, nuestro sistema de referencia es HK + glucosa (Apo) y no la enzima en conformación abierta y en ausencia de sustrato. En el segundo análisis nos enfocamos en el sitio de unión Pb-glucosa en la conformación abierta de la enzima.

Tabla 3. Parámetros de simulación de dinámica molecular.

Categoría	Parámetro	Apo	ATP	Mg-ATP	Pb-ATP	Pb ²⁺
Modelos y parametrización	Software	GROMACS v5.0.7				
	Campo de fuerza – proteína	AMBER ff19SB				
	Campo de fuerza – ligandos	—	Parámetros de-CHARMM36 para ATP (toppar_all36_na_nad_ppi.str)			—
	Campo de fuerza – glucosa	GLYCAM06				
	Modelo de agua	OPC				
Construcción del sistema	Tipo de caja	Cúbica				
	Dimensiones de caja (nm)	9.70 ³				
	Moléculas de agua	26,388	26,350	26,356	26,364	33,103
	Mg ²⁺	17	19	19	18	16
	Cl ⁻	15	15	15	15	18
	Pb ²⁺	0	0	0	1	1
	Neutralización	Si				
	Concentración iónica final	0.015 M				
Parámetros de simulación	Integrador	leap-frog				
	Paso de integración	1 fs (equilibración) / 2 fs (producción)				
	Restricciones	LINCS				
	Tratamiento electrostático	PME				
	Cutoff Coulomb (nm)	1.0				
	Cutoff vdW (nm)	1.0				
	Corrección energía/presión	EnerPres				
Control termodinámico	Termostato	v-rescale				
	τT (ps)	1.0				
	Temperatura (K)	298.15				
	Barostato	Berendsen (equilibración) Parrinello-Rahman (producción)				
	Constante de acoplamiento τP (ps)	5.0				
	Presión (bar)	1.0				
	Tipo acoplamiento	Isotrópico				
Protocolo	Minimización	≤ 5000 pasos				
	Equilibración	10 ns (NVT)	10ns (NVT)	10 ns (NPT)	10 ns (NPT)	10 ns (NPT)
	Producción	200 ns				

Para la proteína se utilizó el campo de fuerza AMBER ff19SB, debido a su parametrización mejorada del esqueleto peptídico; para este campo de fuerza se recomienda utilizar el modelo de agua OPC¹³². Los parámetros para el ATP se obtuvieron del campo de fuerza CHARMM36 y fueron convertidos a formato GROMACS mediante el módulo Force Field Converter de CHARMMGUI; estos parámetros se desarrollaron para describir con precisión nucleótidos y grupos fosfato^{133–135}. El paso de equilibración de los sistemas Apo y ATP se realizó sin baróstato; es decir, bajo un ensamble NVT. No obstante, las variables de energía potencial, presión y densidad se mantuvieron equilibradas a lo largo del paso de producción (ensamble NPT), lo cual indica que no se introdujeron variaciones significativas [IS 2].

4.6 Diseño de un modelo finito del sitio de unión de Pb²⁺ y glucosa

La construcción de un modelo finito implica el diseño de un subsistema representable de una región de interés (e.g. una región funcional o un sitio catalítico)^{78,89,95,136}. Existen diferentes aproximaciones para construir este tipo de modelos que —generalmente— implementan técnicas de QM/MM para abordar la dimensionalidad de subsistemas de macromoléculas^{78,89,95,136}. En nuestro caso, dado que el total de residuos que conforman la región de interés no está compuesto por demasiados átomos (< 250), optamos por abordar este subsistema directamente por DFT.

Los modelos se construyeron con base en los principales aminoácidos que forman parte del sitio de unión a glucosa y del posible sitio de unión a plomo identificado por el programa MIB2 [Figura 14]. La condición de cierre fue sustituir los carbonos alfa de los aminoácidos en los extremos, por grupos metilo; de tal manera que se conserva la naturaleza química del enlace peptídico adyacente a los aminoácidos de interés y no se modifica la hibridación del carbono alfa [Figura 15].

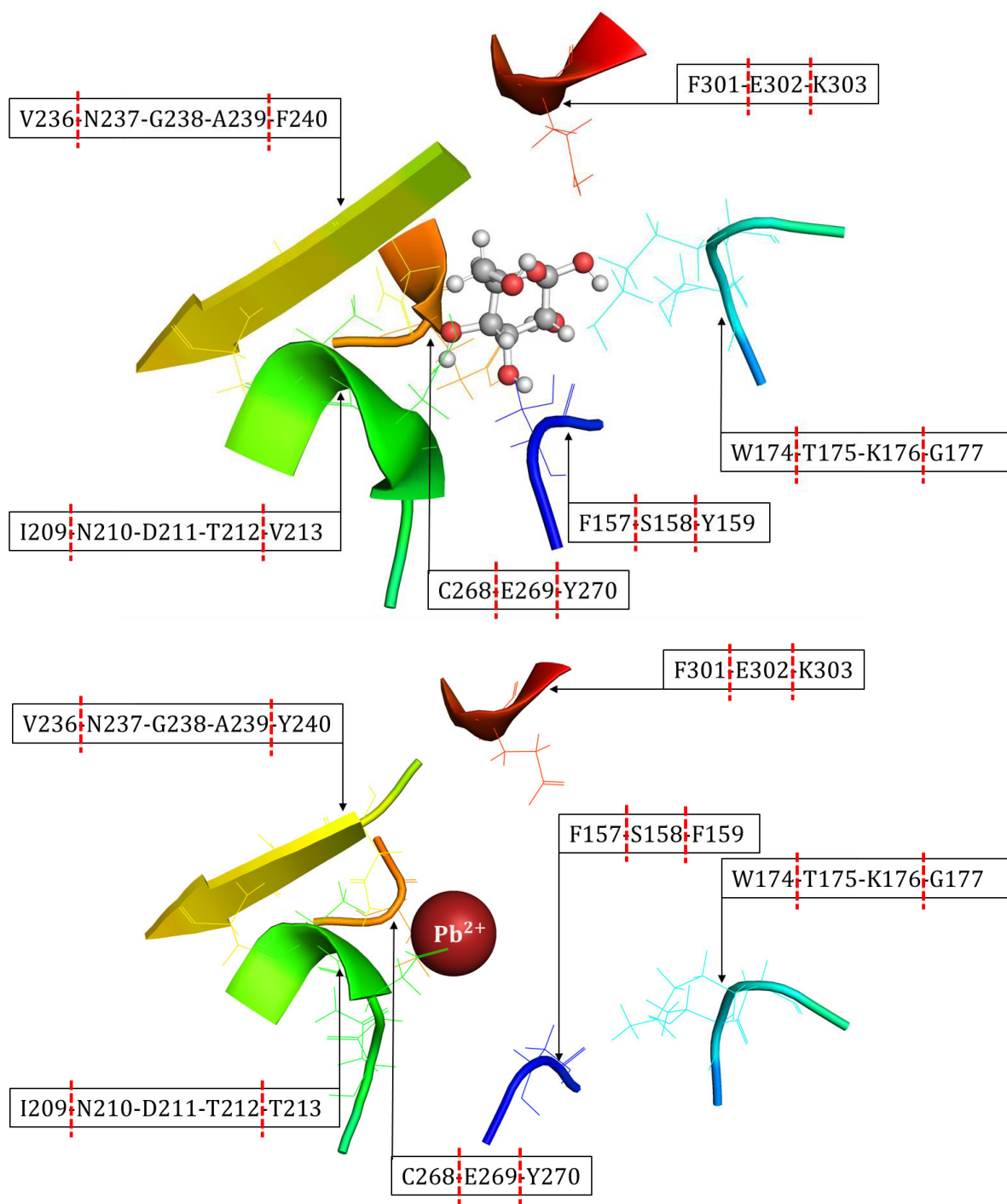


Figura 14. Representación de los modelos finitos del sitio de unión Pb-glucosa. Las líneas punteadas en color rojo indican los segmentos en donde fue truncada la secuencia de aminoácidos. Los aminoácidos que forman parte del modelo están conservados en ambas isoformas de HK de *S. cerevisiae*. Imagen creada con PyMOL v3.1.5.1. <https://pymol.org/>

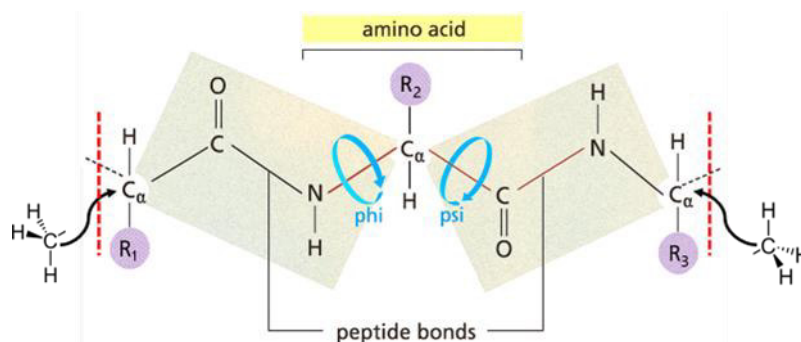


Figura 15. Representación de las condiciones de cierre del modelo finito. Modificada de *Steric limitations on the bond angles in a polypeptide* de Alberts et al. ISBN: 978-0-8153-4432-2.

El modelo con glucosa se extrajo directamente del cristal 3B8A (HK co-cristalizada con glucosa); mientras que el modelo con plomo se extrajo a partir de los resultados de un ensayo de dinámica molecular del cristal 1IG8 [sección 4.5]. El análisis por DFT del modelo se realizó al mismo nivel de teoría que los cálculos previos [sección 4.1]

V. Resultados

5.1 Análisis mediante la teoría de funcionales de la densidad del ATP^{4-} y los complejos Metal- ATP^{2-}

Optimización geométrica y cálculo de frecuencias

Al momento de analizar la molécula de ATP^{4-} o los complejos Metal- ATP^{2-} , debemos asegurarnos de que estemos describiéndolos correctamente. Ya que el ATP tiene una carga de -4 a pH fisiológico^{102,137}, su multiplicidad puede ser de singlete, triplete o quintuplete; para evitar la incertidumbre respecto al estado energéticamente más estable, evaluamos la molécula de ATP en estos tres estados de multiplicidad [Figura 16]. Los complejos Metal- ATP^{2-} con Mg, Ca y Pb fueron evaluados en estado de singlete y triplete, mientras que los complejos con Mn se evaluaron en estado de doblete, cuadruplete, sextuplete y octuplete; esto último debido al número impar de electrones en los complejos Mn- ATP^{2-} [Figura 16]. Tanto el ATP como los complejos Metal-ATP fueron calculados con el modelo de solvente implícito IEFPCM, debido a que son biomoléculas con carga que se encuentran en medio acuoso; considerando, además, que la molécula de ATP^{4-} actúa como un hidrófobo biológico

En todos los casos —descartando los complejos de Mn por obviedad—, el estado de singlete fue el más estable, con una diferencia de 73.9 ± 6.14 kcal/mol entre los estados de triplete y la especie de mínima energía. En el caso de los complejos Mn-ATP, el estado de sextuplete es el más estable con una diferencia de 43.59 ± 7.14 kcal/mol respecto al estado de cuadruplete. Por tanto, es posible que las demás especies no existan de forma estable en la naturaleza.

Respecto al modo de coordinación, hay una tendencia clara en el valor de la energía electrónica: tridentado < bidentado $\gamma\beta$ < bidentado $\beta\alpha$. Es decir, la especie tridentada es la más estable por 9.91 ± 3.10 kcal/mol respecto al complejo coordinado en $\gamma\beta$ y 23.55 ± 5.46 kcal/mol respecto al complejo en $\beta\alpha$.

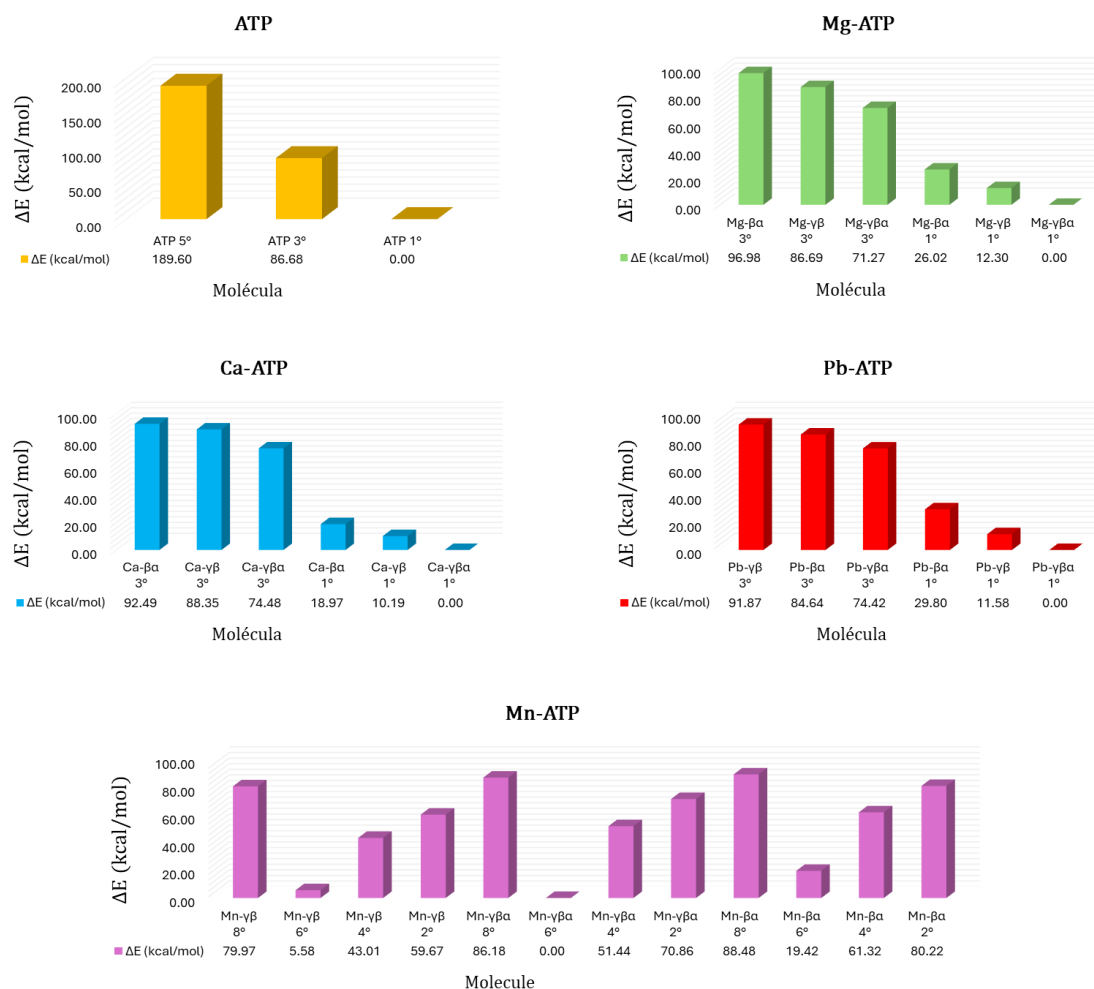
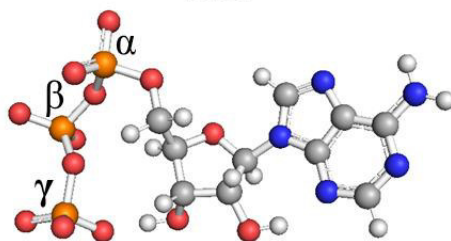


Figura 16. ΔE respecto a la especie energéticamente más estable. Se muestra la diferencia en energía de cada molécula (ATP o complejo Metal-ATP), respecto a la especie de mínima energía, al nivel de teoría B3LYP [6-31+G (d, p) = C, H, O, N, P, Mg, Ca, Mn] y [LANL2DZ = Pb], en solvente IEFPCM. En el gráfico se indican los estados de multiplicidad (1° = singlete, 2° = doblete, 3° = triplete, 4° = cuadruplete, 5° = quintuplete, 6° = sextuplete, 8° = octuplete) y los modos de coordinación de cada metal en los complejos Metal-ATP ($\gamma\beta\alpha$, $\gamma\beta$ o $\beta\alpha$).

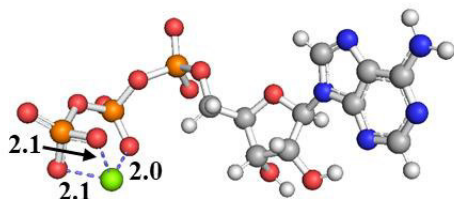
Respecto a las estructuras optimizadas de mínima energía [Figura 17], las distancias Metal-O son en general consistentes con lo descrito en la literatura^{141–143}, pero resalta que prácticamente todos los metales presentan una aparente coordinación tridentada, aunque

solamente estén coordinados con dos grupos fosfato (complejos $\gamma\beta$ o $\beta\alpha$), y que las distancias Pb-O son ≈ 0.2 — 0.3 Å menos largos de lo esperado. Esto se atribuye a la simplicidad del modelo, que no considera moléculas de agua explícitas que formen la esfera de coordinación completa, por lo que se favorece la interacción con más de un oxígeno por grupo fosfato (o distancias Pb-O más cortas). No obstante, seguiremos refiriéndonos a los complejos de metales coordinados con los fosfatos $\gamma\beta$ o $\beta\alpha$ como bidentados por simplicidad.

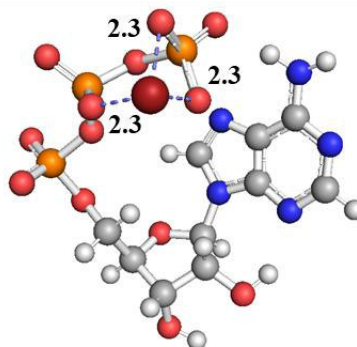
ATP



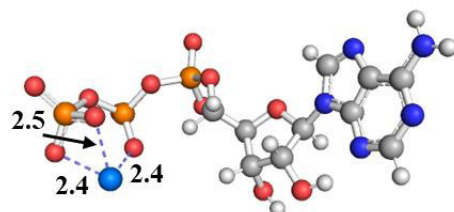
Mg- $\gamma\beta$



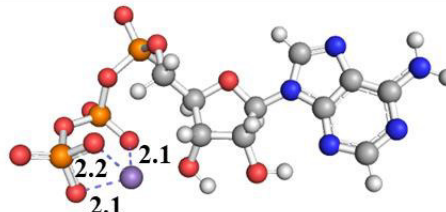
Pb- $\gamma\beta$



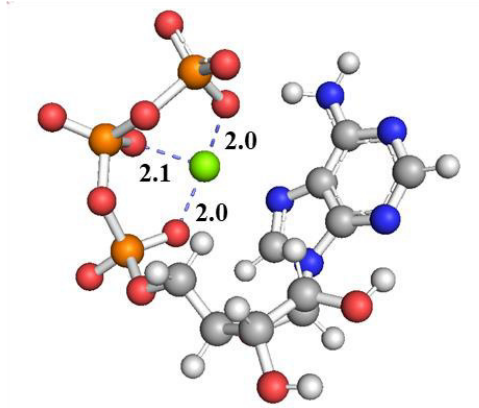
Ca- $\gamma\beta$



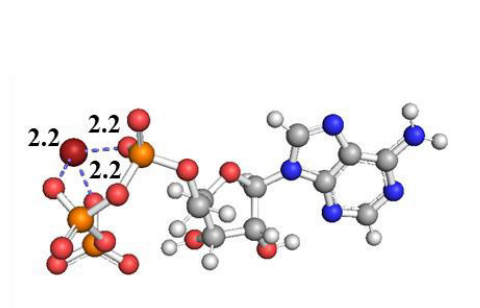
Mn- $\gamma\beta$



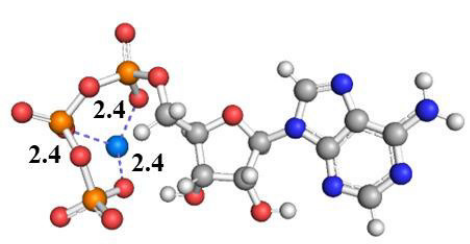
Mg- $\gamma\beta\alpha$



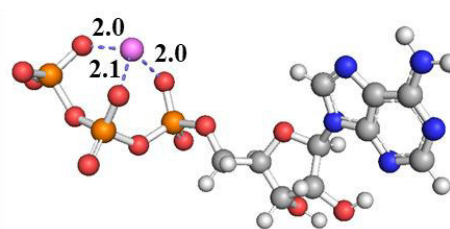
Pb- $\gamma\beta\alpha$



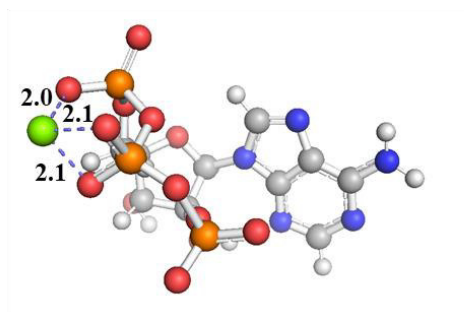
Ca- $\gamma\beta\alpha$



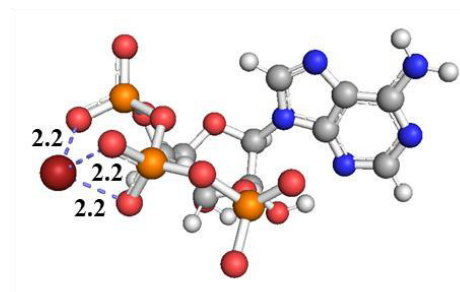
Mn- $\gamma\beta\alpha$



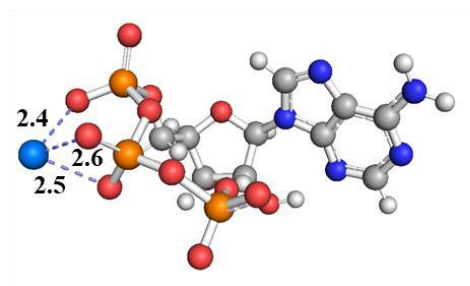
Mg- $\beta\alpha$



Pb- $\beta\alpha$



Ca- $\beta\alpha$



Mn- $\beta\alpha$

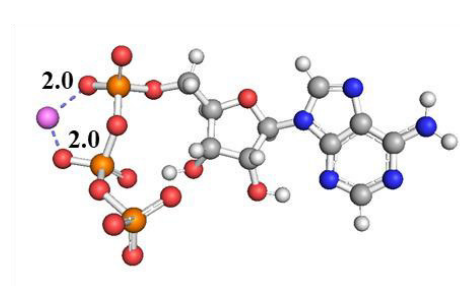


Figura 17. *Estructuras optimizadas.* Las unidades de distancia de enlace son angstroms. Nivel de teoría: B3LYP [6-31+G (d, p) = C, H, O, N, P, Mg, Ca, Mn] y [LANL2DZ = Pb], en solvente IEFPCM. Imágenes creadas con PyMOL v3.1.5.1. <https://pymol.org/>

Energía de complejación, de desplazamiento y de transferencia del fosforilo γ

Las energías de formación de los complejos, de desplazamiento por mimetización química y de transferencia del grupo fosforilo, se calcularon para las especies de mínima energía previamente descritas.

Respecto al modo de coordinación, la tendencia se mantiene: tridentado $<$ bidentado $\gamma\beta <$ bidentado $\beta\alpha$. Es decir, la formación de la especie tridentada es termodinámicamente más favorable.

Por otro lado, los cálculos indican que la formación de complejos de Pb es termodinámicamente más favorable que la formación de complejos de Mg, con una diferencia de aproximadamente 36, 28 y 18 kcal/mol entre los complejos tridentados, bidentados en $\gamma\beta$ y bidentados en $\beta\alpha$, respectivamente [Figura 18]. De hecho, entre la especie menos exergónica de Pb y la más exergónica de Mg, hay una diferencia de 7.76 kcal/mol.

Los complejos menos exergónicos son los de Ca; mientras que los complejos de Mn, dependiendo de su modo de coordinación, presentan energías de formación similares a otros complejos de Mg: por ejemplo, la diferencia entre los complejos $\text{Mg-ATP}_{\gamma\beta}^{2-}$ y $\text{Mn-ATP}_{\gamma\beta\alpha}^{2-}$ es de ≈ 1.8 kcal/mol.

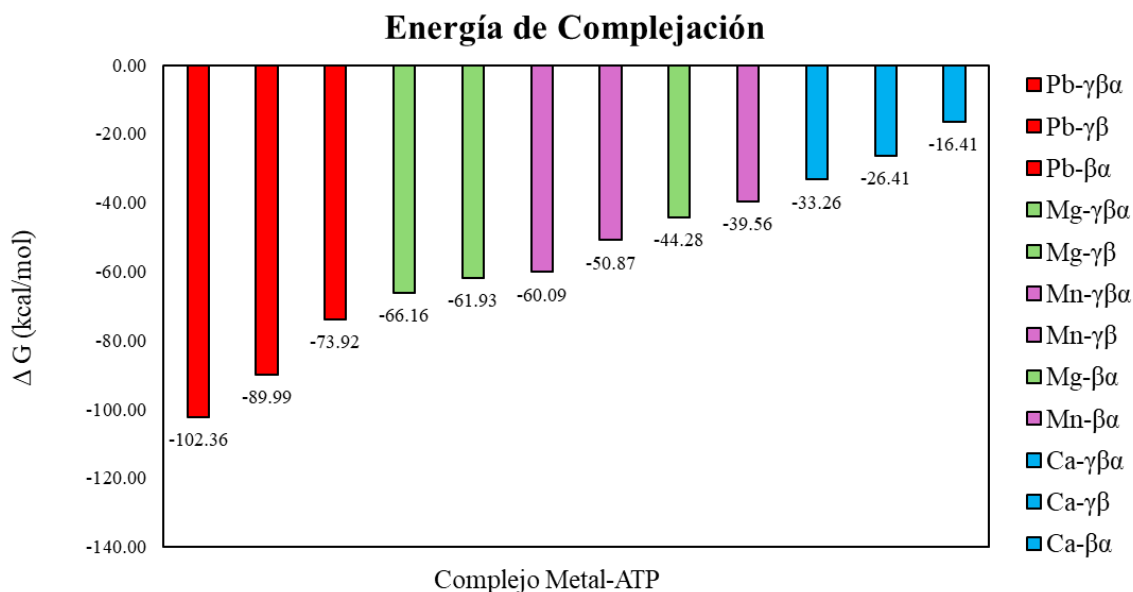


Figura 18. ΔG de complejación. Se muestra la energía de formación de los complejos, en el orden de aparición que indica la leyenda.

Por otro lado, los resultados indican que el Mg es capaz de desplazar al Mn y Ca en el complejo, liberando aproximadamente entre 5-15 y 30-50 kcal/mol, respectivamente [Figura 19]. No obstante, en los complejos Pb-ATP ocurre lo contrario; es decir, el Pb es el ión capaz de desplazar al magnesio en el complejo, mediante un proceso exergónico de aproximadamente 8-36 kcal/mol, dependiendo del modo de coordinación [Figura 19]. Estos resultados concuerdan con la función del magnesio como cofactor endógeno para la transferencia de grupos fosforilo y con uno de los mecanismos toxicológicos que se han descrito sobre el plomo: el desplazamiento de metales endógenos por mimetización química

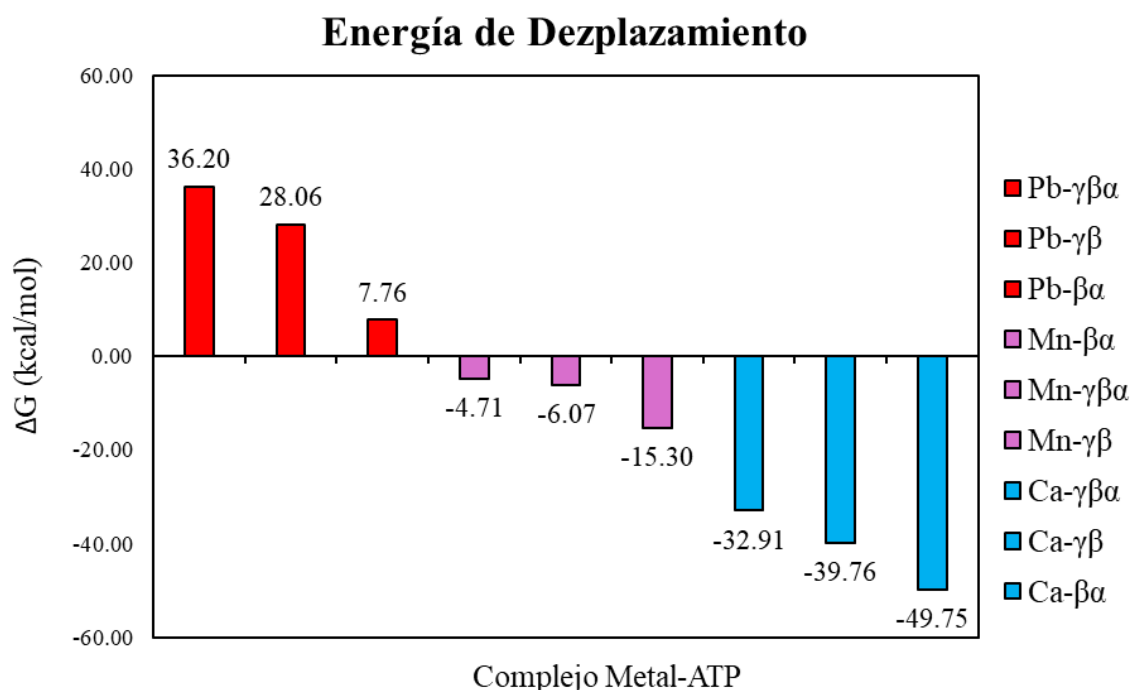


Figura 19. ΔG de desplazamiento. Se muestra la energía de desplazamiento por acción del Mg sobre los complejos Metal-ATP, en el orden de aparición que indica la leyenda.

Adicionalmente, calculamos la energía de la reacción de transferencia del $\text{PO}_3-\gamma$ [Figura 20]. La reacción es un proceso endergónico que requiere 184.77 ± 9.36 kcal/mol; en donde la tendencia respecto al modo de coordinación es: bidentado $\beta\alpha$ (172.91 ± 3.81 kcal/mol) < bidentado $\gamma\beta$ (186.66 ± 2.52 kcal/mol) < tridentado (194.83 ± 1.72 kcal/mol) [Figura 20]. Esto refleja la estabilidad de los complejos Metal-ATP y es congruente con la energía electrónica y la energía de complejación [Figuras 16 y 18].

La tendencia entre metales varía según el modo de coordinación. En $\beta\alpha$ es $\text{Pb} < \text{Mg} < \text{Mn} < \text{Ca}$; en $\gamma\beta$ es $\text{Pb} < \text{Ca} < \text{Mn} < \text{Mg}$; y en los complejos tridentados es $\text{Ca} < \text{Mn} < \text{Mg} < \text{Pb}$. Lo más importante es que entre el sustrato endógeno y el ATP hay una diferencia de 5.53 kcal/mol; lo cual sugiere que el Mg coordinado en $\gamma\beta$ tiene efecto en 1) la orientación de la

cadena trifosfato, 2) en disminuir la energía de activación o en ambos, ya que la transferencia del grupo fosforilo del ATP es termodinámicamente más estable. No obstante, comprobar esto implicaría llevar a cabo cálculos mecanísticos por DFT para cada uno de los complejos Metal-ATP.

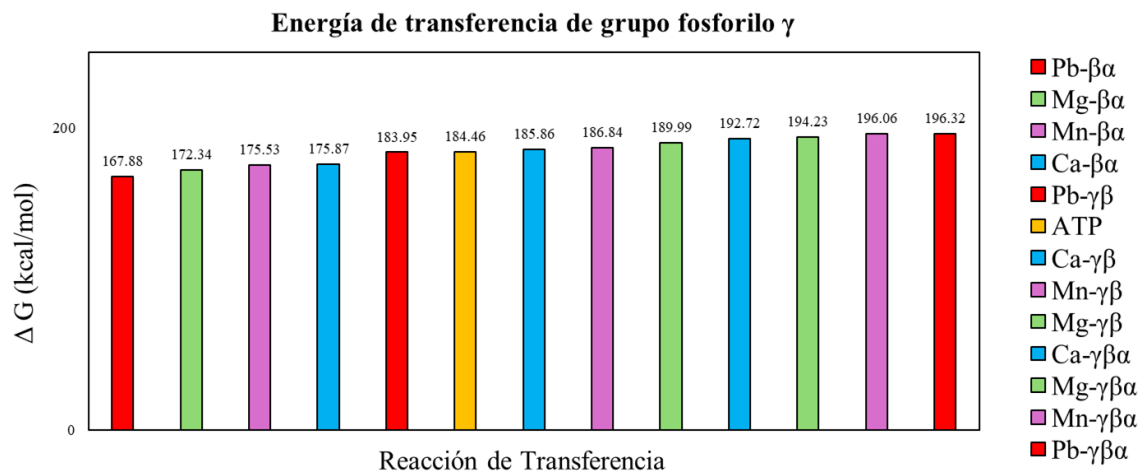


Figura 20. ΔG de transferencia del grupo fosforilo γ . Se muestra la energía de transferencia del $PO_3-\gamma$, en el orden de aparición que indica la leyenda.

Descriptores globales

El cálculo de los descriptores globales se realizó para las especies de mínima energía al nivel de teoría de B3LYP [6-31+G (d, p) = C, H, O, N, P, Mg, Ca, Mn] y [LANL2DZ = Pb], en modelo de solvente IEFPCM para considerar el efecto del medio acuoso en las especies involucradas.

1 kcal/mol corresponde aproximadamente a 0.04 eV [Ecuación 24]. Por tanto, establecimos 0.10 eV (≈ 2.3 kcal/mol) como criterio para considerar un cambio significativo entre los descriptores.

$$1 \text{ kcal/mol} \left(\frac{1 \text{ Hartree}}{627.503 \text{ kcal/mol}} \right) \left(\frac{27.2107 \text{ eV}}{1 \text{ Hartree}} \right) = 0.0433 \text{ eV} \quad (24)$$

Adicionalmente, nos enfocamos principalmente en aquellos complejos Metal-ATP con valores iguales o mayores al sustrato endógeno $Mg-ATP_{\gamma\beta}^{2-}$; ya que, incluso si a nivel energético hay un cambio significativo entre complejos, sabemos que *in vitro* el ATP no funge como sustrato (control negativo) y el $Mg-ATP_{\gamma\beta}^{2-}$ sí lo hace (control positivo)^{64,66,68,144}. De tal manera que, en el rango entre estas dos especies químicas, la incertidumbre respecto a la interpretación mecanística incrementa.

En la **Figura 21** se muestra el índice de electrofilicidad calculado a partir de los datos en la **Tabla 4**⁹⁰. En general, para el mismo modo de coordinación, la tendencia en la electrofilicidad global respecto a los metales es $\text{Pb} > \text{Mn} > \text{Mg} > \text{Ca}$. Excepto para los complejos tridentados, en donde el complejo de Mg presenta el mayor índice de electrofilicidad.

Respecto al modo de coordinación, hay una tendencia aparente en la electrofilicidad global: bidentado $\beta\alpha >$ bidentado $\gamma\beta >$ tridentado. Lo cual también es congruente con la tendencia en la energía electrónica y la energía de complejación: las especies más estables, son menos reactivas. En ese sentido, los únicos complejos que no siguen esta tendencia son el $\text{Mg-ATP}_{\gamma\beta\alpha}^{2-}$, que es tan electrofílico como los complejos de Mg, Ca y Mn bidentados en $\gamma\beta$; y el $\text{Ca-ATP}_{\beta\alpha}^{2-}$, que junto al complejo tridentado de calcio, no incrementan la electrofilicidad global de manera significativa (0.02 y 0.09 eV, respectivamente), en comparación con el ATP.

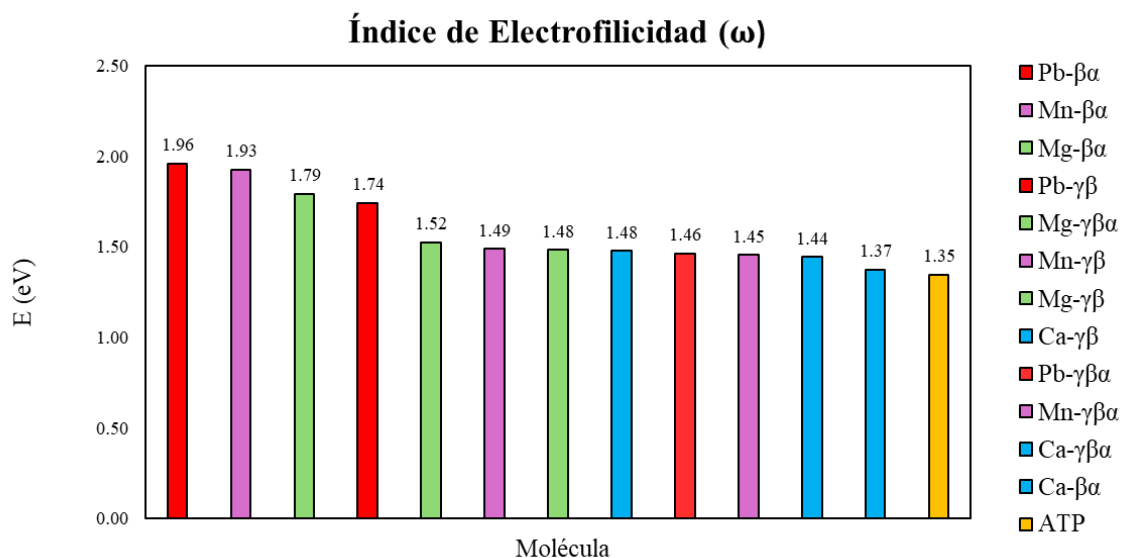


Figura 21. *Índice de electrofilicidad global.* Se muestra el índice de electrofilicidad de las moléculas, en el orden de aparición indicado en la leyenda.

Tabla 4. Cálculo de propiedades químicas.

Molécula	Potencial de Ionización (I)	Afinidad electrónica (A)	Potencial químico (μ)	Electronegatividad (χ)	Dureza química (η)	Blandura química (S)
ATP ⁴⁻	5.57	1.25	-3.41	3.41	4.31	0.232
Mg-ATP $\gamma\beta$	6.42	1.34	-3.88	3.88	5.08	0.197
Mg-ATP $\beta\alpha$	5.81	1.79	-3.80	3.80	4.02	0.249
Mg-ATP $\gamma\beta\alpha$	6.21	1.42	-3.82	3.82	4.78	0.209
Ca-ATP $\gamma\beta$	6.37	1.34	-3.85	3.85	5.03	0.199
Ca-ATP $\beta\alpha$	5.60	1.28	-3.44	3.44	4.32	0.232
Ca-ATP $\gamma\beta\alpha$	6.15	1.32	-3.73	3.73	4.83	0.207
Pb-ATP $\gamma\beta$	6.31	1.70	-4.01	4.01	4.60	0.217
Pb-ATP $\beta\alpha$	5.96	1.96	-3.96	3.96	4.00	0.250
Pb-ATP $\gamma\beta\alpha$	6.40	1.32	-3.86	3.86	5.08	0.197
Mn-ATP $\gamma\beta$	6.15	1.38	-3.77	3.77	4.77	0.21
Mn-ATP $\beta\alpha$	5.62	1.93	-3.77	3.77	3.70	0.271
Mn-ATP $\gamma\beta\alpha$	6.04	1.35	-3.70	3.70	4.69	0.213

Nota: Energías en unidades de eV para todos los descriptores, excepto la blandura química (eV⁻¹). Nivel de teoría B3LYP [6-31+G (d, p) = C, H, O, N, P, Mg, Ca, Mn] y [LANL2DZ = Pb], modelo de solvente IEFPCM.

La información de los demás descriptores está contenida, por definición, en el índice de electrofilicidad [Ecuación 10]; no obstante, en la **Figura 22** se muestran las tendencias generales de los descriptores químicos calculados.

Respecto al potencial de ionización, que es la energía mínima necesaria para abstraer un electrón del sistema, el complejo endógeno Mg-ATP $\gamma\beta^{2-}$ presenta el valor más alto (6.42 eV) entre las moléculas estudiadas, con una diferencia de 0.85 eV respecto al ATP. Los complejos que no muestran un incremento mayor a 0.1 eV son el complejo tridentado de calcio y el complejo Ca-ATP $\beta\alpha^{2-}$.

En contraste, la afinidad electrónica es la energía mínima necesaria para añadir un electrón al sistema. El complejo que presenta el valor numérico más alto de afinidad electrónica es el Pb-ATP $\beta\alpha^{2-}$ (1.96 eV), con una diferencia de 0.71 eV respecto al ATP. Los otros complejos

que muestran un incremento mayor a 0.1 eV son los tres complejos de Mn, los complejos bidentados de Pb, $\text{Mg-ATP}_{\beta\alpha}^{2-}$ y $\text{Mg-ATP}_{\gamma\beta\alpha}^{2-}$

El potencial químico en DFT mide la tendencia de escape de una nube electrónica; para un átomo o molécula en el estado fundamental, este es constante a través de todo el espacio y es igual al negativo de la electronegatividad, de tal manera que el concepto de potencial químico es el negativo del concepto de electronegatividad ⁸⁷. Entre las moléculas estudiadas, solamente los complejos bidentados de Pb presentan un valor de electronegatividad mayor que el sustrato endógeno $\text{Mg-ATP}_{\gamma\beta}^{2-}$. El complejo tridentado de plomo, en particular, presenta esencialmente la misma electronegatividad que el complejo $\text{Mg-ATP}_{\gamma\beta}^{2-}$, con una diferencia de 0.02 eV ($\approx 1/2$ kcal/mol).

Finalmente, la dureza química (el inverso de la blandura química) es la resistencia del potencial químico al cambio en el número de electrones ⁹⁴, y da una medida de la estabilidad de esa especie química. En este caso, cabe resaltar que los complejos bidentados $\beta\alpha$ de Mg, Pb y Mn son menos duros que la molécula de ATP (4.31 eV). Los complejos más duros (5.08 eV) son el sustrato endógeno $\text{Mg-ATP}_{\gamma\beta}^{2-}$ y el complejo tridentado de plomo. El complejo $\text{Ca-ATP}_{\gamma\beta}^{2-}$ tiene una dureza muy similar (5.03 eV).

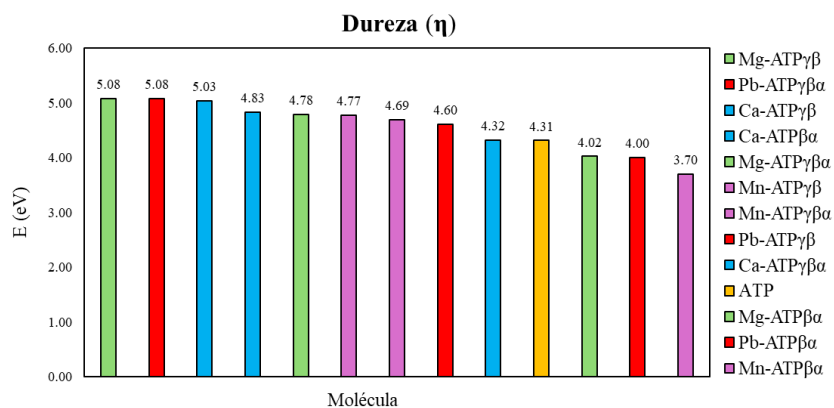
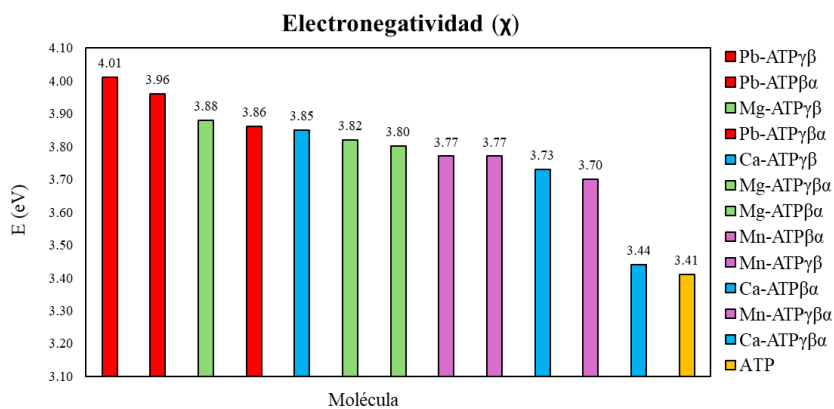
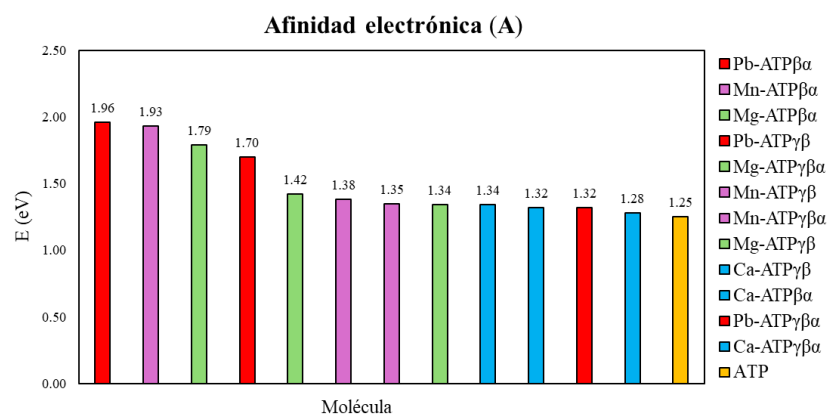
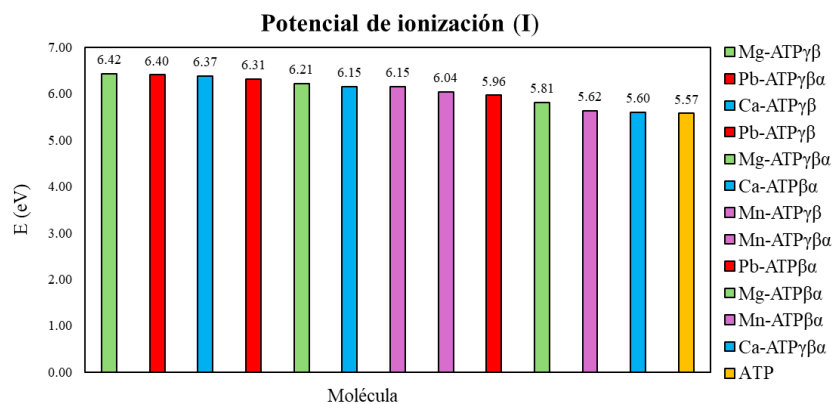


Figura 22. *Principales descriptores químicos.* Se muestran el potencial de ionización (I), la afinidad electrónica (A), la electronegatividad (χ) y la dureza química (η) de las moléculas, en el orden de aparición indicado en la leyenda.

Descriptores locales

En general, los cuatro metales y los tres modos de coordinación incrementan la electrofilicidad global del ATP de manera significativa. Por tanto, para estudiar con mayor precisión esta reactividad, analizamos los cambios en la reactividad del ATP a nivel local.

Para analizar el efecto de los metales y los modos de coordinación en la electrofilicidad del fósforo γ , calculamos —bajo el esquema de cargas de Hirshfeld— la blandura local nucleofílica sobre este átomo [Figura 23]^{87,93,106}.

Respecto al modo de coordinación, no hay una tendencia clara. Respecto a los metales, en los complejos bidentados $\gamma\beta$ observamos lo siguiente: $\text{Pb} > \text{Ca} > \text{Mn} \gg \text{Mg}$. En los bidentados $\beta\alpha$: $\text{Pb} > \text{Mg} > \text{Mn} \gg \text{Ca}$. Y en los tridentados: $\text{Mg} > \text{Pb} = \text{Ca} > \text{Mn}$. Es decir, cada metal y modo de coordinación está cambiando en una magnitud distinta la electrofilicidad sobre el fósforo gamma.

Lo más importante es notar que el fósforo γ menos electrofílico es el del sustrato endógeno $\text{Mg-ATP}_{\gamma\beta}^{2-}$ (el siguiente valor en el gráfico es negativo, lo cual indica que el fósforo γ no es electrofílico en el complejo $\text{Ca-ATP}_{\beta\alpha}^{2-}$). Esto implica que la principal función del Mg no es incrementar la electrofilicidad del átomo de fósforo que sufrirá el ataque nucleofílico.

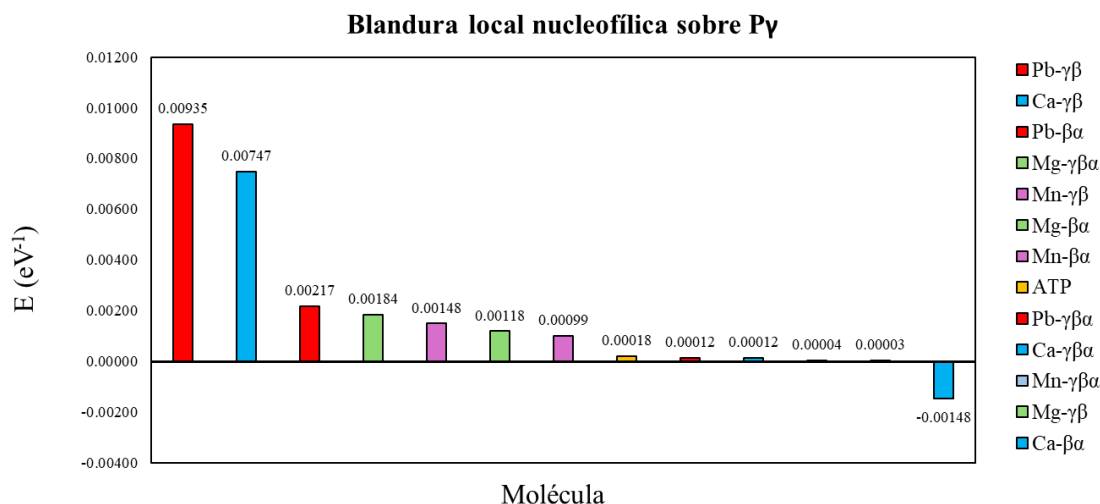


Figura 23. *Blandura local nucleofílica sobre el átomo de fósforo γ .* Se muestra la blandura local nucleofílica de las moléculas, en el orden de aparición indicado la leyenda.

En estudios previos, se ha sugerido que una de las principales funciones del Mg es estabilizar la cadena trifosfato^{102,144–147}. Para analizar el efecto de los metales y los modos de coordinación en la estabilización de la cadena trifosfato, calculamos el descriptor dual $\Delta f[\text{IS}$

3] ⁹¹. En general, **1)** en la ribosa no predomina el carácter electrofílico ni nucleofílico; **2)** en la región de la adenina predomina el carácter electrofílico en los complejos tridentados (a excepción del complejo de Pb) y los complejos bidentados en $\gamma\beta$ de Ca y Mn; en los bidentados en $\beta\alpha$ (a excepción del complejo de Ca) no predomina ninguno de los dos, y su carácter es principalmente nucleofílico en el complejo Pb-ATP $_{\gamma\beta}^{2-}$; finalmente, en el complejo Mg-ATP $_{\gamma\beta}^{2-}$ la reactividad varía entre los átomos que conforman la adenina. **3)** Respecto a la cadena trifosfato, en la mayoría de las moléculas el grupo fosforilo PO $_{3-\gamma}$ tiene un carácter muy nucleofílico, las únicas excepciones son: Mg-ATP $_{\gamma\beta}^{2-}$, Pb-ATP $_{\gamma\beta}^{2-}$ y Pb-ATP $_{\gamma\beta\alpha}^{2-}$ [IS 3].

Para analizar a detalle el carácter nucleofílico y electrofílico de la cadena trifosfato en cada complejo [Tabla 5], calculamos el porcentaje que corresponde a la distribución total de la reactividad de la siguiente manera:

Ya que la suma de los valores del descriptor dual sobre todos los átomos es aproximadamente 0 [Ecuación 25], para analizar el carácter electrofílico [$\Delta f_{(r)}$ positivo] o nucleofílico [$\Delta f_{(r)}$ negativo] de los metales y los grupos PO $_3$, calculamos la fracción del descriptor dual respecto a la suma total de sus valores positivos o negativos, respectivamente.

$$\Delta f_{(r)} = f_{(r)}^+ - f_{(r)}^-$$

$$\text{Condición de normalización: } \int f_{(r)} dr = 1$$

$$\int \Delta f_{(r)} dr = \int f_{(r)}^+ - \int f_{(r)}^- = 1 - 1 = 0 \text{ y } \sum_j \Delta f_{j(r)} \approx 0 \quad (25)$$

Los complejos bidentados en $\beta\alpha$ de Mg, Pb y Mn se caracterizan por átomos metálicos muy electrofílicos ($\approx 93, 86$ y 91 %, respectivamente) adyacentes a un PO $_{3-\gamma}$ muy nucleofílico ($\approx 96, 76, 97$ %); en el otro complejo $\beta\alpha$, entre el PO $_{3-\gamma}$ y el Ca suman el ≈ 98 % del carácter nucleofílico en la molécula, lo cual esclarece que este sea el único complejo Metal-ATP que no incrementó significativamente el índice de electrofiliidad global, ni tenga un P $_{\gamma}$ electrofílico [Figuras 21 y 23], pues este comportamiento no se observa en esa magnitud en ningún otro complejo.

Los complejos tridentados de Mg, Ca y Mn se caracterizan por un PO $_{3-\gamma}$ muy electrofílico ($\approx 91, 83$ y 66 %) y un PO $_{3-\beta}$ electrofílico ($\approx 7, 7$ y 12 %). El carácter nucleofílico de los metales sigue esta tendencia: Mg < Ca < Mn (medido de manera independiente respecto al carácter nucleofílico total de cada complejo). El complejo de Pb no sigue esta tendencia, por el contrario, el carácter nucleofílico o electrofílico en los grupos fosforilo y el metal es prácticamente nulo.

Los complejos bidentados en $\gamma\beta$ de Ca y Mn tienen un PO $_{3-\gamma}$ bastante nucleofílico (≈ 29 y 66 %) adyacente a un átomo metálico también nucleofílico (≈ 63 y 44 %). No obstante, en el complejo de Pb ocurre lo contrario: tiene un PO $_{3-\gamma}$ electrofílico (≈ 12 %) y un átomo metálico

muy electrofílico ($\approx 82\%$). En el sustrato endógeno $\text{Mg-ATP}_{\gamma\beta}^{2-}$, prácticamente todo el carácter nucleofílico o electrofílico está localizado en la región de la adenina; es decir, el Mg bidentado en $\gamma\beta$ efectivamente estabiliza la cadena trifosfato. Finalmente, el complejo tridentado de Pb es el más parecido al sustrato endógeno en términos de la distribución de la reactividad en la cadena trifosfato y el metal.

Tabla 5. Distribución de la reactividad sobre la cadena trifosfato. Definimos la reactividad como la fracción del descriptor dual respecto a la suma total de sus valores positivos o negativos.

Molécula	Región	Carácter Electrofílico (%)	Carácter Nucleofílico (%)
ATP	$\text{PO}_{3-\gamma}$	—	87.48
	$\text{PO}_{3-\beta}$	—	6.80
	$\text{PO}_{3-\alpha}$	—	1.34
$\text{Mg-ATP}_{\gamma\beta}^{2-}$	Metal	0.02	
	$\text{PO}_{3-\gamma}$	—	0.01
	$\text{PO}_{3-\beta}$	—	0.11
	$\text{PO}_{3-\alpha}$	—	0.41
$\text{Mg-ATP}_{\gamma\beta\alpha}^{2-}$	Metal	—	0.77
	$\text{PO}_{3-\gamma}$	—	91.02
	$\text{PO}_{3-\beta}$	—	7.41
	$\text{PO}_{3-\alpha}$	—	0.57
$\text{Mg-ATP}_{\beta\alpha}^{2-}$	Metal	93.17	—
	$\text{PO}_{3-\gamma}$	—	95.64
	$\text{PO}_{3-\beta}$	1.18	—
	$\text{PO}_{3-\alpha}$	4.06	—
$\text{Pb-ATP}_{\gamma\beta}^{2-}$	Metal	81.73	—
	$\text{PO}_{3-\gamma}$	11.77	—
	$\text{PO}_{3-\beta}$	5.43	—
	$\text{PO}_{3-\alpha}$	0.72	—
$\text{Pb-ATP}_{\gamma\beta\alpha}^{2-}$	Metal	0.19	
	$\text{PO}_{3-\gamma}$	—	0.03
	$\text{PO}_{3-\beta}$	0.004	—
	$\text{PO}_{3-\alpha}$	0.16	—
$\text{Pb-ATP}_{\beta\alpha}^{2-}$	Metal	85.80	
	$\text{PO}_{3-\gamma}$	—	75.97
	$\text{PO}_{3-\beta}$	7.42	—
	$\text{PO}_{3-\alpha}$	5.26	—

Ca-ATP $_{\gamma\beta}^{2-}$	Metal	—	62.97
	PO$_{3-\gamma}$	—	29.24
	PO $_{3-\beta}$	1.15	—
	PO $_{3-\alpha}$	0.16	—
Ca-ATP $_{\gamma\beta\alpha}^{2-}$	Metal	—	4.93
	PO$_{3-\gamma}$	—	82.63
	PO $_{3-\beta}$	—	6.93
	PO $_{3-\alpha}$	—	1.80
Ca-ATP $_{\beta\alpha}^{2-}$	Metal	—	21.02
	PO$_{3-\gamma}$	—	76.54
	PO $_{3-\beta}$	19.59	—
	PO $_{3-\alpha}$	4.11	—
Mn-ATP $_{\gamma\beta}^{2-}$	Metal	—	43.77
	PO$_{3-\gamma}$	—	39.00
	PO $_{3-\beta}$	—	1.75
	PO $_{3-\alpha}$	4.13	—
Mn-ATP $_{\gamma\beta\alpha}^{2-}$	Metal	—	17.85
	PO$_{3-\gamma}$	—	65.60
	PO $_{3-\beta}$	—	11.56
	PO $_{3-\alpha}$	—	4.77
Mn-ATP $_{\beta\alpha}^{2-}$	Metal	91.01	—
	PO$_{3-\gamma}$	—	97.05
	PO $_{3-\beta}$	0.90	—
	PO $_{3-\alpha}$	5.94	—

Nota: Los porcentajes de carácter electrofílico y nucleofílico no deben compararse como magnitudes absolutas entre sistemas distintos, ya que representan la distribución relativa de la reactividad dentro de cada molécula.

Una de las características cruciales para que ocurra un ataque nucleofílico S_N2, es que los grupos unidos al átomo en donde ocurre el ataque no generen impedimento estérico ¹⁴⁸. Un ejemplo básico de esto es el cambio en la velocidad de reacción de distintos bromuros de alquilo para formar yoduros de alquilo [Tabla 6] ¹⁴⁸.

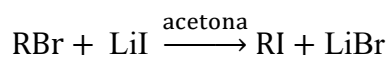


Tabla 6. Efecto del impedimento estérico en la reactividad de bromuros de alquilo en una reacción por el mecanismo S_N2 .

Bromuro de alquilo	Estructura	Clase	Velocidad Relativa*
Bromuro de metilo	CH_3Br	Primario No sustituido	221,000
Bromuro de etilo	CH_3CH_2Br	Primario	1,350
Bromuro de isopropilo	$(CH_3)_2CHBr$	Secundario	1
Bromuro de ter-butilo	$(CH_3)_3CBr$	Terciario	Demasiado pequeña para medirse

*Relación de la constante de velocidad de segundo orden K para el bromuro de alquilo respecto al bromuro de isopropilo a 25°C

Nota: Modificada de *Reactividad de algunos bromuros de alquilo hacia la sustitución por el mecanismo S_N2* , de F. Carey, ISBN 970-10-5610-8.

En nuestro caso, no analizamos el posible efecto estérico (relacionado con el tamaño de los sustituyentes) de los oxígenos respecto al fósforo para que ocurra el ataque por un mecanismo S_N2 , sino una propiedad de estructura electrónica que refleja la obstrucción de los sustituyentes en términos de distribución de carga, la nucleofilicidad local sobre $PO_{3-\gamma}$. Para esto, calculamos la blandura local electrofílica sobre $PO_{3-\gamma}$ [Ecuación 14].

Demostrando así, que el principal efecto que tiene el Mg sobre el sustrato endógeno $Mg-ATP_{\gamma\beta}^{2-}$, es disminuir la nucleofilicidad en $PO_{3-\gamma}$ para que ocurra el ataque [Figura 24]. Los otros dos complejos que tienen un efecto análogo —o similar— son los complejos $Pb-ATP_{\gamma\beta}^{2-}$ y $Pb-ATP_{\gamma\beta\alpha}^{2-}$.

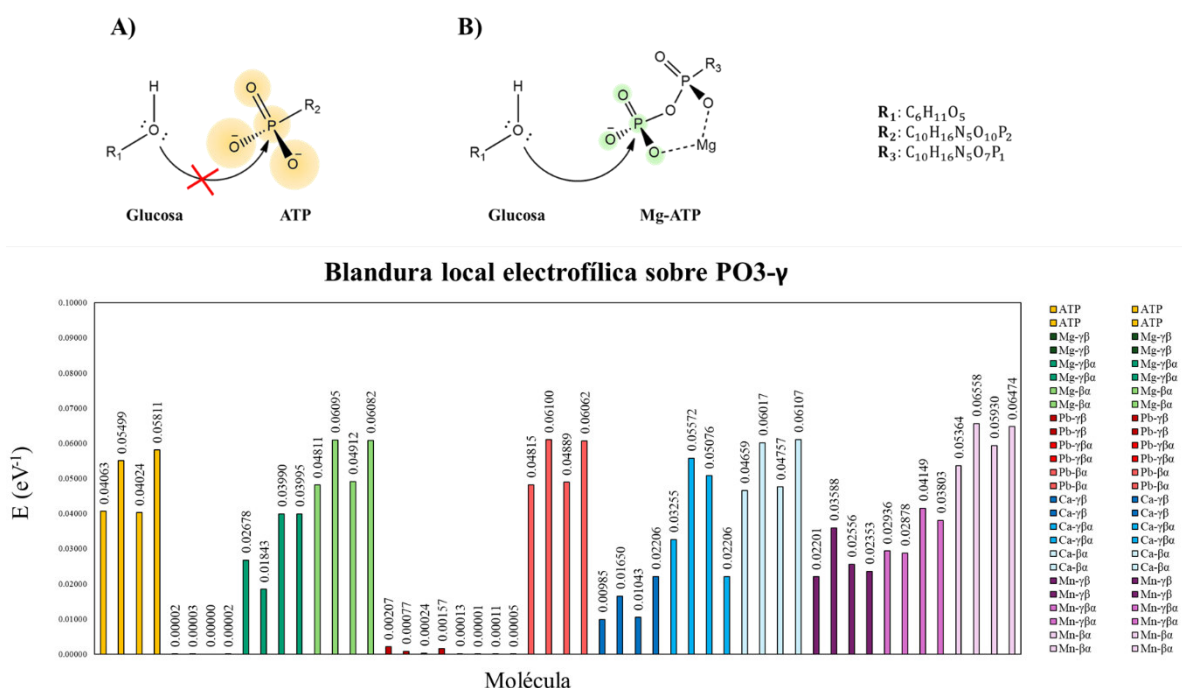


Figura 24. Blandura local electrofílica sobre el grupo fosforilo gamma del ATP y complejos Metal-ATP. **A-B)** Esquemas representativos del ataque nucleofílico por el grupo hidroxilo de la glucosa y el impedimento ocasionado por la distribución electrónica en los oxígenos y el fósforo. Se muestra la blandura local electrofílica de las moléculas, en el orden de aparición indicado en la leyenda. ATP en color amarillo, Mg-ATP en colores verdosos, Pb-ATP-en colores rojizos, Ca-ATP en colores azulados, Mn-ATP en colores rosados/morados. **A-B)** Esquemas generados con ChemDraw Ultra v12.0.2. <https://revvitysignals.com/products/research/chemdraw>.

5.2 Análisis del estado de conservación entre HK's de *S. cerevisiae* y *H. sapiens*

Los aminoácidos suelen clasificarse en cinco grupos con base en las propiedades físicoquímicas de su cadena lateral: no-polares alifáticos, aromáticos, polares sin carga, cargados positivamente y cargados negativamente ¹⁴⁹. En nuestro análisis, utilizamos el código de color tipo Zappo para definir sustituciones conservativas [Figura 25] ¹¹². Este código de color define dos subgrupos dentro de los no-polares alifáticos y los polares sin carga: **1)** se diferencia a la glicina y la prolina del resto, debido a que estos residuos suelen encontrarse en regiones que permiten cambios bruscos en la orientación entre estructuras secundarias (e.g, giros β o loops flexibles) ^{40,150}; **2)** se distingue a la cisteína del resto, debido a que puede formar enlaces disulfuro que, en algunas proteínas, están íntimamente relacionados con su función ^{151,152}.

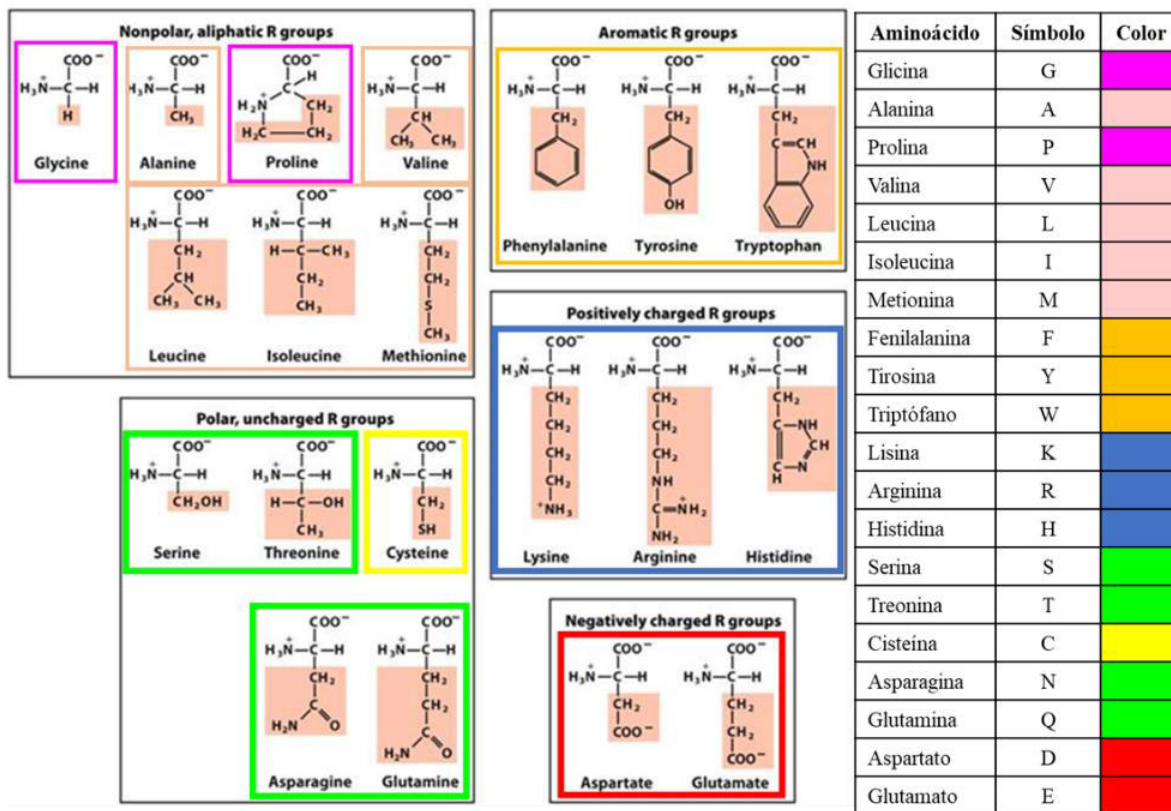


Figura 25. Clasificación general y tipo Zappo de aminoácidos. El color de los recuadros alrededor de las estructuras, corresponden al color indicado en la tabla del lado derecho. Modificada de *The 20 amino acids commonly found in proteins*, de Nelson & Cox, ISBN: 978-1429293129

El primer alineamiento múltiple de secuencias se realizó entre ambas isoformas de HK de *S. cerevisiae* [Figura 26] [Tabla 7]; para las cuales también mapeamos las estructuras secundarias de ambas isoformas sobre su estructura primaria (IS 4).

En este análisis nos enfocamos en comparar las regiones funcionales de la hexocinasa. El sitio de unión de glucosa, L1 y L4 están completamente conservados; mientras que, en el sitio de unión de ATP, el canal hidrofóbico de transporte de protones y L3 hay una sustitución conservativa (K423R, M139I, Y159F, respectivamente). La única región con sustituciones no conservativas es L2, que forma parte de una hélice 3₁₀ [IS 4].

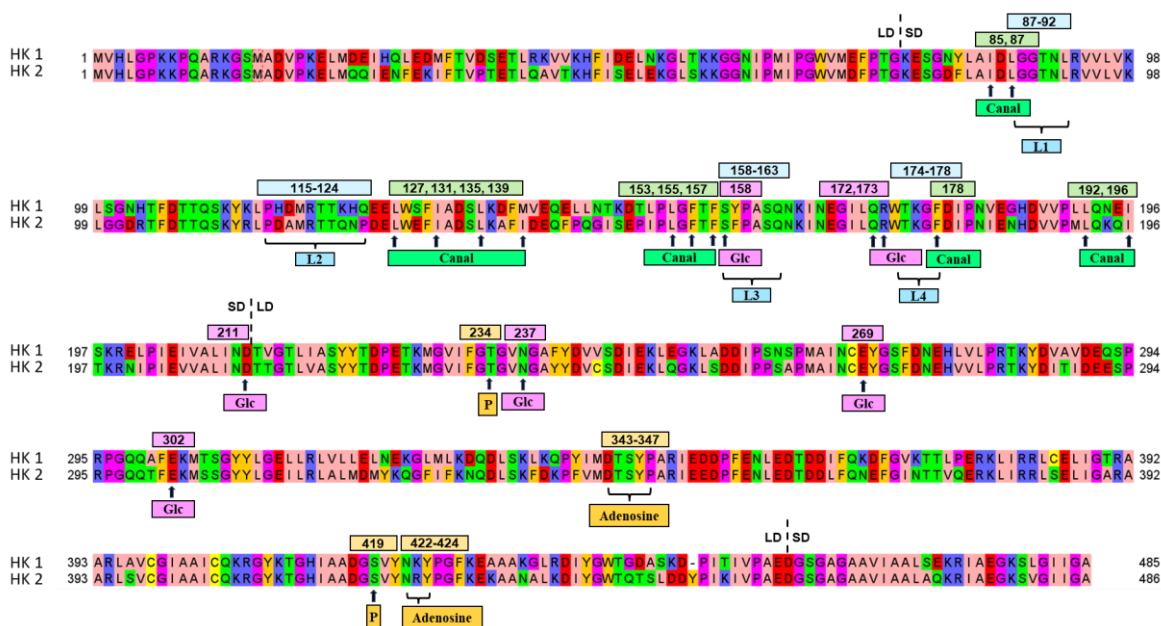


Figura 26. MSA tipo MUSCLE de las isoformas I y II de *S. cerevisiae*. HK 1 = isoforma PI. HK 2 = isoforma PII. Canal = canal hidrofóbico de transporte de protones. L1-L4 = loops 1-4, implicados en el cierre/apertura de la enzima. Glc = sitio de unión de glucosa. Adenosine = residuos del sitio de unión de ATP que interaccionan con la región de adenosina. P = residuos del sitio de unión de ATP que interaccionan con la cadena trifosfato. LD = dominio grande. SD = dominio pequeño.

Tabla 7. Estado de conservación de las regiones funcionales entre las isoformas I y II de HK de *S. cerevisiae*.

Región	Total de Residuos	Residuos Conservados	Sustituciones Conservativas	No Conservados	Porcentaje de Conservación
Unión a Glucosa	7	7 [S158, Q172, R173, D211, N237, E269, E302]	0	0	100%
Unión a ATP	10	9 [T234, D343, T344, S345, Y346, P347, S419, N422, Y424]	1 [K423R]	0	100%
Canal Hidrofóbico	12	11 [I85, L87, L127, I131, L135, L153, F155, F157, F178, L192, I196]	1 [M139I]	0	100%
Loop 1	6	6 [L87, G88, G89, T90, N91, L92]	0	0	100%
Loop 2	10	5 [P115, M118, R119, T120, T121]	0	5 [H116D, D117A, K122Q, H123N, Q124P]	50%
Loop 3	6	5 [S158, P160, A161, S162, Q163]	1 [Y159F]	0	100%
Loop 4	5	5 [W174, T175, K176, G177, F178]	0	0	100%
Proteína Completa	485/486	374	41	71	85.39%

Posteriormente analizamos el estado de conservación entre ambas isoformas de *S. cerevisiae* y las cuatro hexocinasas humanas [Figura 27]. En este caso, nos enfocamos en los sitios de unión de glucosa y ATP [Tabla 8]. Entre las distintas HK's, las principales diferencias se encuentran en los residuos que interactúan con la región de adenosina, mientras que el sitio de unión a glucosa se encuentra bastante más conservado (50 y 71.4 %, respectivamente). En R173 hay una sustitución conservativa por arginina en la HK II humana, mientras que en el resto de las secuencias de *H. sapiens* en esta posición, hay residuos polares no cargados como asparagina o treonina, lo cual corresponde a una sustitución conservativa respecto a Q172 en *S. cerevisiae*. En las hexocinasas humanas, los aminoácidos adyacentes respecto al extremo N-terminal son tres residuos alifáticos no polares (Ile, Leu y Leu o Ile), mientras que en *S. cerevisiae* son dos (I170, L171), lo cual resulta en un desplazamiento de los aminoácidos polares (N, T, K) en las enzimas humanas; es decir, en *H. sapiens* un solo aminoácido polar en esta región es suficiente para fijar a la glucosa en el sitio de unión. En todo caso, la secuencia W174-T175-K176-G177-F178, adyacente hacia el extremo C-terminal, se encuentra completamente conservada, y esta corresponde a L4 (WTKG) y a uno de los residuos que forman parte de la entrada al canal hidrofóbico de protones (F) en *S. cerevisiae*.

Sobre los residuos no conservados que unen la región de adenosina: S345 está sustituido en hexocinasas humanas por lisinas (o por arginina, en el caso de HK IV), mientras que P347 es reemplazado por residuos no polares alifáticos como Val o Leu que, en todo caso, son similares a A348 en *S. cerevisiae*. En ese sentido, un residuo tipo prolina en esa posición es prescindible en las HK's humanas. Los residuos 422-424 (NKY), están sustituidos por exactamente la misma secuencia, KLH, en las cuatro HK's humanas.

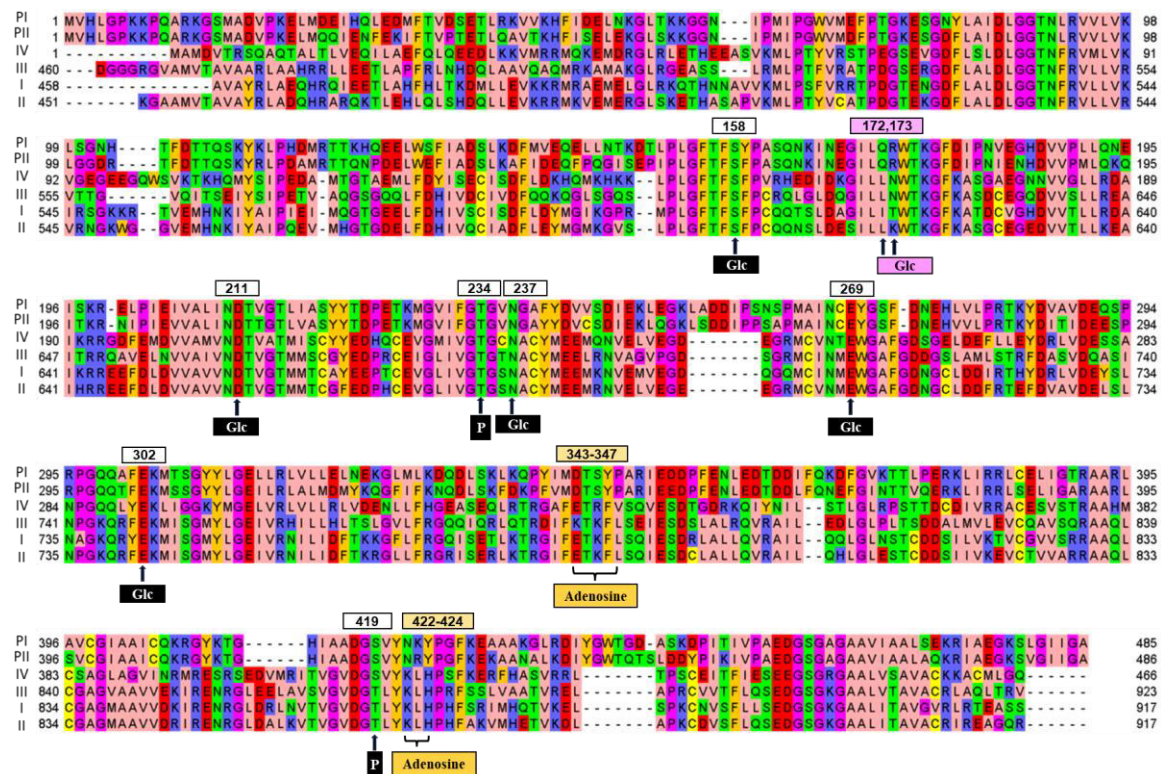


Figura 27. MSA tipo MUSCLE de hexocinasas de *S. cerevisiae* y *H. sapiens*. PI = Isoforma I de *S. cerevisiae*. PII = isoforma II de *S. cerevisiae*. Glc = sitio de unión de glucosa. Adenosine = residuos del sitio de unión de ATP que interaccionan con la región de adenosina. P = residuos del sitio de unión de ATP que interaccionan con la cadena trifosfato. Las etiquetas en color negro y letras color blanco corresponden a residuos completamente conservados entre las seis secuencias.

Tabla 8. Estado de conservación entre hexocinasas de *S. cerevisiae* y *H. sapiens*.

Región	Total de Residuos	Residuos Conservados	Sustituciones Conservativas	No Conservados	Porcentaje de Conservación
Unión a Glucosa	7	5 [S158, D211, N237, E269, E302]		2 [R173, Q172]	71.4%
Unión a ATP	10	2 [T234, T344]	3 [D343E, Y347F, S419T]	5 [S345, P347, N422, K423, Y424]	50.0%

Nota: Consideramos sustitución conservativa si los residuos pertenecen al mismo grupo, están presentes en ambas HK de *S. cerevisiae* y en, por lo menos, dos HK's humanas.

5.3 Análisis de las interacciones intermoleculares entre los complejos Metal-ATP²⁻ y la HK PI de *S. cerevisiae*

Para validar nuestro estudio, se realizó el acoplamiento de tipo ciego y de región específica de la glucosa co-cristalizada. En las [Figura 28 y 29] se muestra la reclasificación de clústeres de cónformeros con un umbral de 1.0 y 1.5 Å en la RMSD, del acoplamiento de región específica y ciego de la glucosa. A partir de los resultados de región específica, se

realizaron acoplamiento con los mismos parámetros para calcular un total de 500 poses, a partir de 5 semillas aleatorias distintas, para cada complejo de Mg. En estos resultados previos, los residuos del sitio de unión a ATP [Tabla 7] que no tendían a dirigir el acoplamiento fueron Y346 y N422. Debido a que existe un número máximo de enlaces rotatables permitidos por el software, estos residuos se mantuvieron rígidos cuando se llevaron a cabo los cálculos de tipo flexible y de región específica.

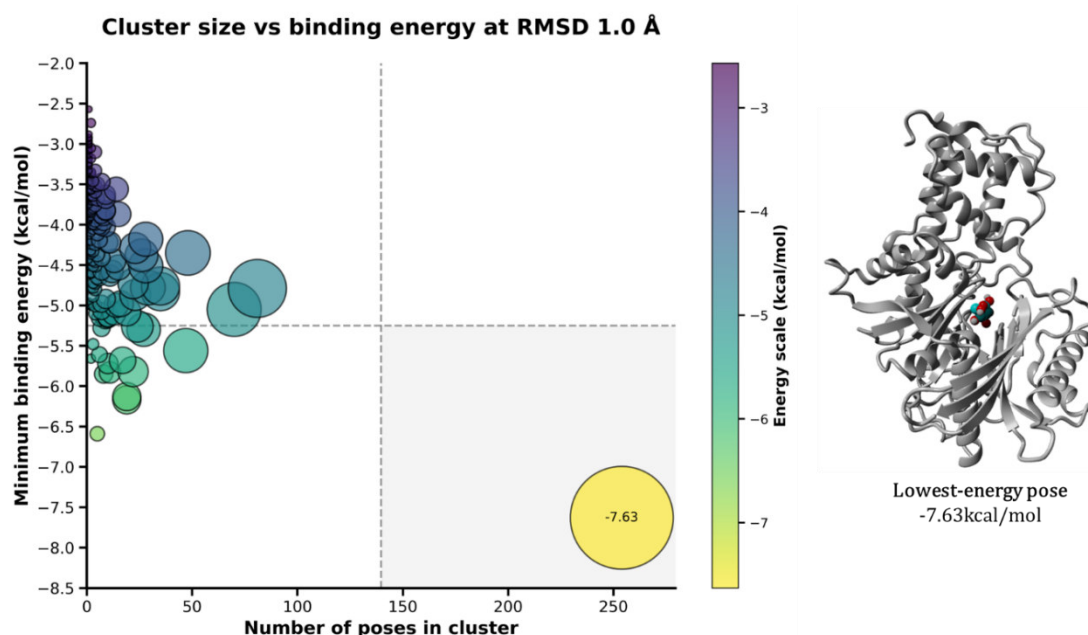


Figura 28. *Acoplamiento de región específica de la glucosa.*

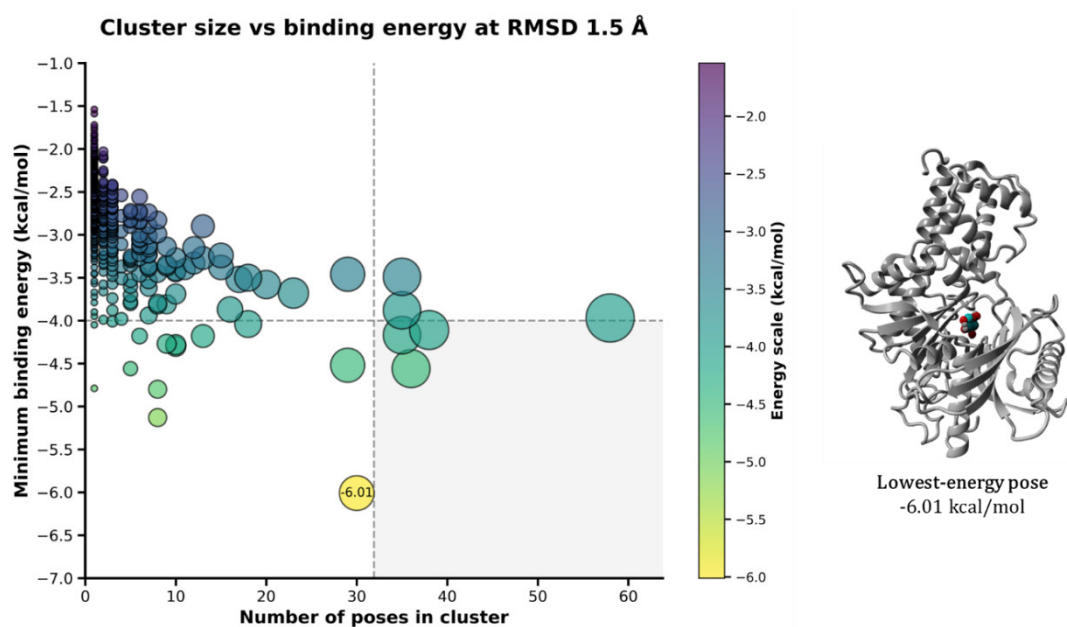


Figura 29. *Acoplamiento ciego de la glucosa.*

En la **Tabla 9** se muestran los resultados de las poses representativas (de menor energía) de los clústeres seleccionados. Estos clústeres se seleccionaron a partir de tres criterios: **1)** son clústeres principales (de menor energía y población alta de confórmers), **2)** las poses son congruentes con lo descrito por cristalografía de rayos X, y **3)** el clúster persiste en acoplamiento de tipo ciego.

Las diferencias en la energía de unión, la energía intramolecular y la eficiencia de ligando entre los complejos Metal-ATP²⁻, se encuentran dentro del margen de error del método (1-2 kcal/mol) ^{113,114}; por tanto, no es posible afirmar que el tipo de metal o el modo de coordinación tengan un efecto significativo en el acoplamiento de los complejos al sitio de unión.

Por otro lado, aunque las constantes de inhibición indican que los complejos bidentados de Mg y los complejos Pb-ATP_{β α} ²⁻ y Mn-ATP_{γ β} ²⁻, presentan valores de K_i menores que la molécula de ATP⁴⁻, esta constante es calculada a partir de la ecuación de Arrhenius [Ecuación 23], en donde pequeñas diferencias en la $\Delta E_{unión}$ escalan de manera exponencial. Es decir, aunque la constante de inhibición permite identificar tendencias en el acoplamiento entre distintos ligandos, en este caso dichas diferencias aparentes provienen de variaciones energéticas en el orden de 1-2 kcal/mol entre los complejos Metal-ATP²⁻.

Tabla 9. *Acoplamiento flexible-específico del ATP y complejos Metal-ATP.*

Molécula	Energía de unión (kcal/mol)	Energía intramolecular (kcal/mol)	Eficiencia de ligando (kcal/mol)	Constante de inhibición (pM)
ATP	-13.43	0.59	-0.43	143.65
Mg-ATP _{γβ} ²⁻	-13.68	-0.91	-0.43	94.4
Mg-ATP _{βα} ²⁻	-13.66	-1.58	-0.43	97.3
Mg-ATP _{γ$\beta$$\alpha$} ²⁻	-12.92	-2.2	-0.40	337
Pb-ATP _{γβ} ²⁻	-13.04	-1.2	-0.41	278.32
Pb-ATP _{γ$\beta$$\alpha$} ²⁻	-13.13	-2.00	-0.41	236.46
Pb-ATP _{βα} ²⁻	-13.57	-3.43	-0.42	112.33
Ca-ATP _{γβ} ²⁻	-12.78	-1.35	-0.40	423.05
Ca-ATP _{βα} ²⁻	-13.0	-2.63	-0.41	295.79
Ca-ATP _{γ$\beta$$\alpha$} ²⁻	-12.07	-1.97	-0.38	1,420
Mn-ATP _{γβ} ²⁻	-13.67	-1.5	-0.43	95.28
Mn-ATP _{βα} ²⁻	-12.1	-2.55	-0.38	1,360
Mn-ATP _{γ$\beta$$\alpha$} ²⁻	-12.84	-2.2	-0.40	385.16

Nota: En color verde amarillento se resaltan los cuatro complejos Metal-ATP con una constante de inhibición K_i menor a la molécula de ATP.

No obstante, se analizaron los tipos de interacciones que establecen estas poses de menor energía [Tabla 10]. En la [IS 5] se muestran los diagramas 2D generados por Discovery Studio.

En todos los complejos, alrededor de K423 se une la cadena trifosfato, estableciendo interacciones electrostáticas con los oxígenos de los grupos fosfato; en algunos casos, K423 establece interacciones de tipo puente salino cuando se encuentra a distancias más cortas entre los grupos funcionales interactuantes; e incluso se determinaron interacciones tipo Pi-cación (entre K423 y la adenina) en algunas poses. Las interacciones desfavorables (+)(+) con K423 están sobreestimadas porque Discovery Studio asigna cargas formales a los metales; la interacción desfavorable (-)(-) ocurre entre los oxígenos no coordinados del fosforilo γ y la cadena lateral de D343 en el complejo Mn-ATP $_{\gamma\beta}^{2-}$. Los apilamientos amida-Pi se establecen entre la cadena principal de T344 y la adenina.

Respecto a los enlaces de hidrógeno con carbono y utilizando como referencia la [IS 6], en la mayoría de las moléculas los residuos actúan como aceptores del enlace de hidrógeno: en el ATP, Pb-ATP $_{\gamma\beta}^{2-}$, Pb-ATP $_{\beta\alpha}^{2-}$ y D343—Mg-ATP $_{\beta\alpha}^{2-}$ el donador débil es C8, en Ser419—Mg-ATP $_{\beta\alpha}^{2-}$ es C2, y en Ca-ATP $_{\beta\alpha}^{2-}$ es N3. En el Pb-ATP $_{\gamma\beta\alpha}^{2-}$ un oxígeno del fosfato α actúa como aceptor del enlace, mientras que en el Mn-ATP $_{\gamma\beta\alpha}^{2-}$ el aceptor es el oxígeno endocíclico de la ribosa.

En general, los complejos establecen interacciones de van der Waals con 6-10 residuos diferentes. En el ATP la S345 establece una interacción tipo pi-par solitario, mientras que en el complejo tridentado de plomo la interacción es tipo π -HBD. A348 o V420 establecen interacciones π -alquil en todos los complejos. Las interacciones tipo π - σ se establecen principalmente entre residuos de serina (319/345), T344 e incluso K423 en el caso de algunos complejos (Mn- $\gamma\beta$ y Ca- $\gamma\beta\alpha$). Los residuos donadores de enlace de hidrógeno son T234, T344, S345, S419 y G418; las treoninas interactúan con la ribosa, mientras que las serinas interactúan principalmente con la cadena trifosfato y, en el caso de algunas poses, con la adenina. Los residuos aceptores de enlace de hidrógeno son G307, D343, K423; los cuales interactúan con los grupos hidroxilo de la ribosa o con el NH₂ del C6 [IS 6].

Tabla 10. *Tipos de interacciones y residuos.*

Molécula	Tipo de Interacciones y Residuos					
	Van der Waals	Enlace de Hidrógeno con Carbono	Enlace de Hidrógeno Convencional	Pi-Par Solitario o Pi-HBD	Pi-Alquil	Pi-Sigma
ATP	S419, N422, K423, Y424, D343, S345, R349	T344	D343	S345	A348	S345
Mg-ATP _{γβ} ²⁻	T234, G307, D343, T344, S345, R349, K423, Y424		D343, T344, S345, S419		A348, V420	S419
Pb-ATP _{γβ} ²⁻	T90, D417, T344, S345, S419, N422, Y424, K423, P425	S419	T234, D343, G418		A348, V420	
Ca-ATP _{γβ} ²⁻	T90, T234, G307, D343, S345, S419, Y424, P425		D343, S345, S419, K423,		A348, V420	S345
Mn-ATP _{γβ} ²⁻	T234, D343, T344 S345, R349, D352, S419, V420, Y424, P425		D343, S345, S419 K423		A348	K423
Mg-ATP _{βα} ²⁻	T90, T234, Y308, D343, S345, S419, K423, Y424, P425	S419, D343	G307, S345		A348, V420	T344
Pb-ATP _{βα} ²⁻	T234, S345, S419, K423, Y424, P425	D343	T344, S345, S419		A348, V420	S345
Ca-ATP _{βα} ²⁻	T234, G307, D343, S345, V420, Y424, P425	T344	D343, T344, S345, S419, K423		A348	S345
Mn-ATP _{βα} ²⁻	T90, T234, S345, T344, S419, K423, Y424, P425		D343, T344 S345, S419		A348, V420	T234
Mg-ATP _{γβα} ²⁻	T234, Y308, S345, R349, S419, V420		D343, T344		A348	S345
Pb-ATP _{γβα} ²⁻	T90, T234, G307, D343, T344, S345, R349, S419, V420, N422, K423, Y424, P425	S419	D343	S345	A348	T344
Ca-ATP _{γβα} ²⁻	T90, T234, S345, S419, V420, Y424, P425		T234, D343, T344, S419, K423		A348	S345, K423
Mn-ATP _{γβα} ²⁻	T234, D343, T344, S345, S419, Y424, P425	S419	D343, K423		A348, V20	T344, S345

Molécula	Tipo de Interacciones y Residuos					
	Apilamiento Amida-Pi	Pi-Catión	Electrostática Atractiva	Puente Salino	Desfavorable HBD-HBD	Desfavorable (+)(+) o (-)(-)
ATP			K423		T344	
Mg-ATP _{yβ} ²⁻			K423	K423		K423
Pb-ATP _{yβ} ²⁻			K423	K423		
Ca-ATP _{yβ} ²⁻	T344	K423	K423	K423	T344	
Mn-ATP _{yβ} ²⁻	T344		K423			D343
Mg-ATP _{βα} ²⁻		K423	K423			K423
Pb-ATP _{βα} ²⁻	T344	K423	K423	K423		
Ca-ATP _{βα} ²⁻	T344		K423	K423		
Mn-ATP _{βα} ²⁻		K423	K423			
Mg-ATP _{yβα} ²⁻	T344	K423	K423		S345	K423
Pb-ATP _{yβα} ²⁻	T344	K423	K423			
Ca-ATP _{yβα} ²⁻		K423	K423			
Mn-ATP _{yβα} ²⁻		K423	K423		T344	

Nota: Para simplificar la tabla, en dos columnas se agruparon tipos distintos de interacciones: **1)** las interacciones tipo Pi-par libre y Pi-HBD; **2)** las interacciones desfavorables positiva-positiva [(+)(+)] y negativa-negativa [(-)(-)]. Se utilizó el mismo código de color que en [IS 5].

5.4 Predicción de posibles sitios de unión de Pb

En los ensayos *in vitro*, la inactivación de la HK de *S. cerevisiae* requiere una preincubación sin glucosa ¹⁷. Esto implica que los posibles sitios de unión de Pb²⁺ que tienen efecto en la actividad relativa de la enzima, deben encontrarse en la conformación abierta (sin glucosa) y no en la conformación semicerrada (con glucosa). Para identificar estos sitios, calculamos el potencial de unión de Pb²⁺ en ambas conformaciones y después se contrastan estos perfiles [Figura 30]. En la Figura 30, el eje X corresponde al número de residuo en la secuencia de la proteína y el eje Y es el puntaje calculado por MIB2 respecto a sitios de plomo identificados experimentalmente en estructuras cristalográficas. En círculos u óvalos color rojo, se indican los aminoácidos que presentan una disminución significativa en el puntaje; estos corresponden a los aminoácidos en la leyenda inferior.

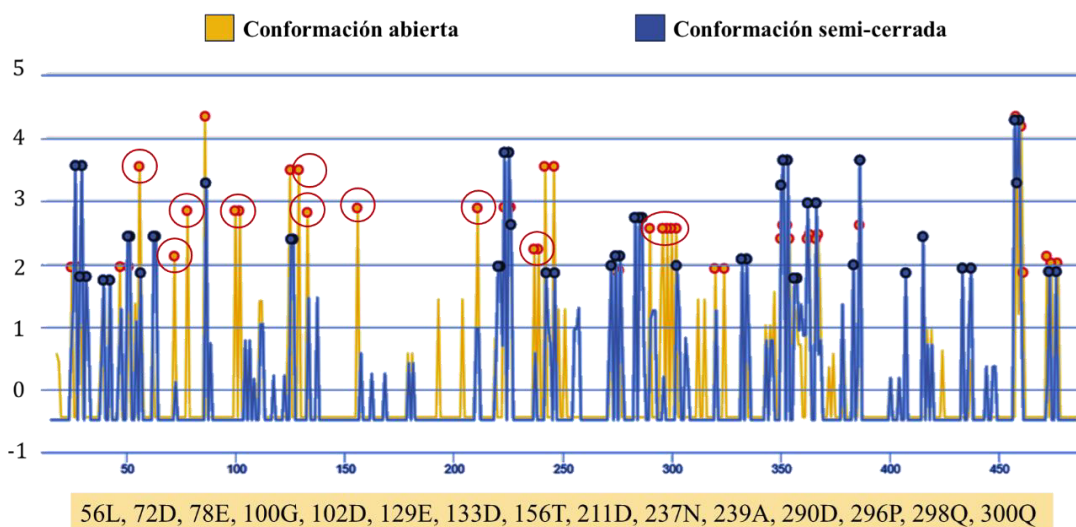


Figura 30. Potencial de unión de Pb entre la conformación abierta y semicerrada de HK de *S. cerevisiae*.

A partir de esta información, se seleccionaron los sitios de unión de Pb que están principal o completamente conformados por estos aminoácidos en la conformación abierta de la enzima [Tabla 11]. Los principales sitios seleccionados son el 8, 12 y 16, que renumeramos por simplicidad [Figura 31]. El sitio 9 se omitió para simplificar el análisis y por su limitada relevancia estructural, ya que está conformado únicamente por dos residuos, uno de los cuales presenta una sustitución no conservativa: E129S. Adicionalmente, las cadenas laterales implicadas en la coordinación de Pb en este sitio están orientadas hacia el medio, a lo largo de la hélice α -3. Aunque algunos de los residuos de esta hélice, que están orientados hacia el núcleo proteico, forman parte del canal hidrofóbico de transporte de protones, es poco probable que la rigidez inducida por la unión de Pb a este sitio tenga efecto sobre la actividad del canal hidrofóbico, el cual está conformado por elementos estructurales adicionales —dos α -hélices, dos β -hebras y el *loop* 4— que delimitan un entorno interno de esta región funcional.

Tabla 11. Sitios de unión de Pb en la conformación abierta de la enzima

Sitio	Residuos interactuantes	Templado	Puntaje	Cantidad de aa que conforman el sitio
1	86D, 458D	2v01A4	4.331	0
2	458D, 460S	1e9nA1	4.173	0
3	56L, 242D, 246D	2v01A3	3.536	1/3
4	125D, 129E	2v01A0	3.482	1/2
5	56L, 242D, 246D	2v01A1	3.377	1/3
6	223D, 225E, 226T	2v01A2	2.888	0
7	86D, 156T, 211D, 458D	5taoA1	2.875	2/4
8	78E, 100G, 102D	3t8yA0	2.833	3/3
9	129E, 133D	5taoA3	2.805	2/2
10	351E, 352E, 353D, 386E	2v01A2	2.605	0
11	223D, 225E, 226T	2v01A1	2.565	0
12	290D, 296P, 298Q, 300T, 302E	2v01A4	2.553	4/5
13	363D, 367N	5taoA3	2.457	0
14	350I, 351E, 353D, 354P, 386E	2v01A1	2.389	0
15	362D, 366Q	5taoA3	2.387	0
16	211D, 237N, 239A	3t8yA0	2.223	3/3
17	363D, 367N	2xaIA0	2.186	0
18	72D, 472Q	3fhA1	2.111	1/2
19	474R, 477E	1na0A1	2.004	0
20	125D, 129E	3t8yA0	1.958	1/2
21	47H, 51E	1ka4A0	1.943	0
22	25Q, 28E	1na0A1	1.938	0
23	320D, 324Q	2xaIA0	1.915	0
24	51E, 274D, 276E	1e9nA1	1.887	0
25	86D, 211D, 461G	4tkxL0	1.851	1/3
26	223D, 225E	2v01A0	1.704	0

Nota: El templado corresponde al código PDB del sitio identificado por MIB2. En color amarillo oscuro se resaltan los sitios que están conformados principal o completamente por residuos con un cambio significativo en su puntaje entre la conformación abierta y semicerrada.

El sitio I es el más relevante, ya que es el único localizado dentro de una región funcional de la enzima y los tres aminoácidos están conservados entre ambas isoformas de HK de *S. cerevisiae*. De hecho, D211 y N237 están conservados en las cuatro HK's humanas. En las posiciones 238 y 239, hay un desplazamiento aparente entre ambos organismos: G238-A239 en *S. cerevisiae* y A238-C239 en *H. sapiens*, por lo que la implicación de la alanina en este sitio no es evidente. No obstante, cabe recalcar que esta secuencia de dos aminoácidos está flanqueada por residuos conservados entre ambos organismos: N237-G238A-A239C-Y240. En la isoforma I de *S. cerevisiae*, el triptófano presenta una sustitución conservativa por una fenilalanina, pero en la isoforma II y las cuatro enzimas humanas se conserva Y240 [Tabla 8].

Adicionalmente, cabe recalcar que el resto del sitio de unión a glucosa está conformado por más aminoácidos polares cargados negativamente (E269 y E302), los cuales también se encuentran completamente conservados entre ambos organismos [Tabla 8]. Estos aminoácidos actúan como aceptores de enlace de hidrógeno de los grupos hidroxilo de la glucosa; por tanto, aunque estos no se hayan identificado como un sitio de unión de Pb mediante el software MIB2, es posible que, en la conformación abierta de la enzima, estos formen ya sea un segundo sitio de unión a plomo en el sitio de unión a glucosa, o funjan

como un primer sitio de coordinación de Pb que induzca la traslocación del plomo hacia el interior del sitio de unión a glucosa (sitio I).

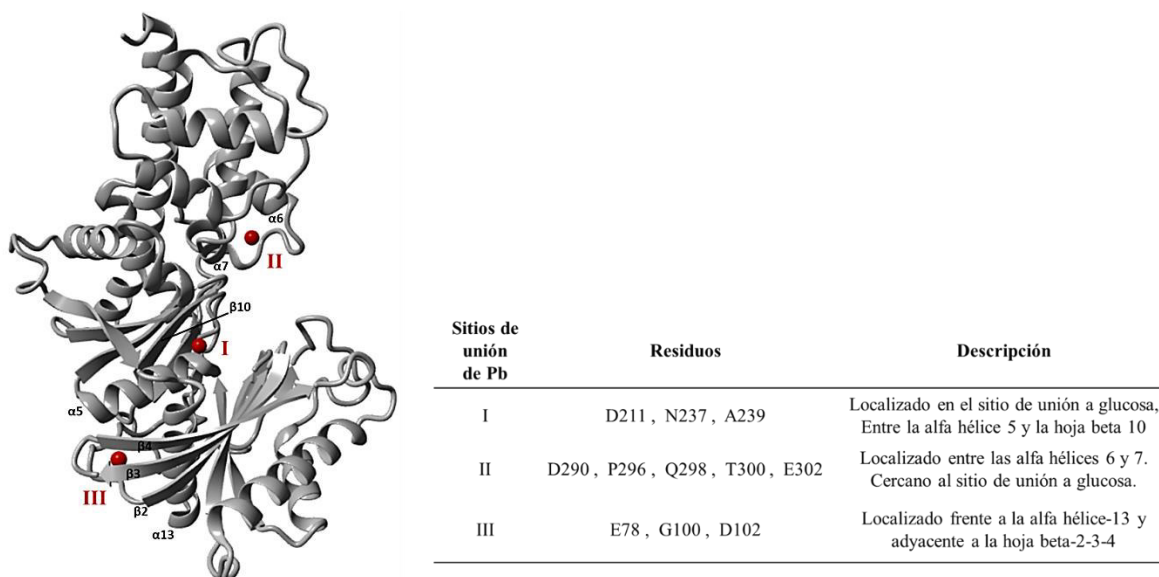


Figura 31. Principales sitios de unión de Pb. Imagen generada con YASARA v22.5.22. doi.org/10.1093/bioinformatics/btu426.

En el sitio II, los aminoácidos D290 y E302 se encuentran completamente conservados en ambos organismos. P296 presenta una sustitución en la hexocinasa humana 1 por una alanina, aunque flanqueada por residuos conservados (N-A-G) entre las cuatro hexocinasas humanas. Q298 está conservado en *S. cerevisiae* y HK IV, mientras que en las otras tres HK's humanas hay una sustitución por una lisina flanqueada por residuos conservados en ambos organismos: G297-Q298K-Q299. T300 es el único residuo no conservado entre las secuencias; en la isoforma I está sustituido por una alanina, en HK IV por una leucina y en el resto de HK's humanas por una arginina. Lo cual sugiere que las mutaciones en esta posición no afectan directamente la función de estas enzimas. La región entre las alfa hélices 6 y 7 no conforma una región funcional; sin embargo, algunos de los residuos de la hélice 6 orientados hacia la hélice 5 forman parte del sitio de unión de ATP y el residuo E302 establece interacciones por enlace de hidrógeno con la glucosa. Es posible que este sitio tenga algún efecto en el proceso de cierre de la enzima durante la actividad catalítica, pero es poco probable que tenga un efecto determinante en la unión de la adenosina o en la misma unión de la glucosa a su sitio de unión.

En el sitio III, 78E está conservado, pero no así G100S ni D102N, los cuales se encuentran en una región desordenada que une a la hebra-β3 con la hebra-β4. En hexocinasas humanas el residuo 100 varía (R en HK 1 y 2, T en HK 3, G en HK IV), mientras que el residuo 102 está conservado en las cuatro por una glicina. No es posible inferir si es posible que la rigidez inducida por el Pb sobre este loop entre ambas β-hebras, limite la flexibilidad de la hoja β en esta región; además, es en el otro extremo de esta hoja β, en donde se encuentran residuos

que forman parte del sitio de unión a glucosa y del canal hidrofóbico de transporte de protones. Más importante aún, es solamente en la isoforma II de *S. cerevisiae* que existe un segundo aminoácido polar cargado negativamente (D102) para coordinar al Pb y en la isoforma I no se detecta este posible sitio de unión; lo cual indica que este sitio no es una explicación plausible para la inactivación de la hexocinasa. Lo que más resalta de este sitio putativo es que se encuentra a un lado —en términos de estructuras secundarias— de una región alostérica con efecto activador en la actividad de HK IV humana ²⁹.

5.5 Análisis de dinámica molecular

Dinámica molecular del sitio de unión de ATP

Ya que no hay diferencias significativas en la energía de unión entre los complejos Metal-ATP —en el sitio de unión de ATP—, analizamos la estabilidad de los complejos de Mg y Pb bidentados en $\gamma\beta$ mediante simulaciones de dinámica molecular. En la **Figura 32**, el RMSD de ≈ 1.5 Å en los cuatros sistemas indica que no hay cambios conformacionales significativos en la cadena principal o *backbone* de la proteína. Por otro lado, el RMSD de $\approx 0.76 \pm 0.10$ Å de la molécula de glucosa respecto a la proteína [**Figura 33**], indica que esta permanece confinada en su sitio, sin cambios relevantes en el modo de interacción entre sistemas.

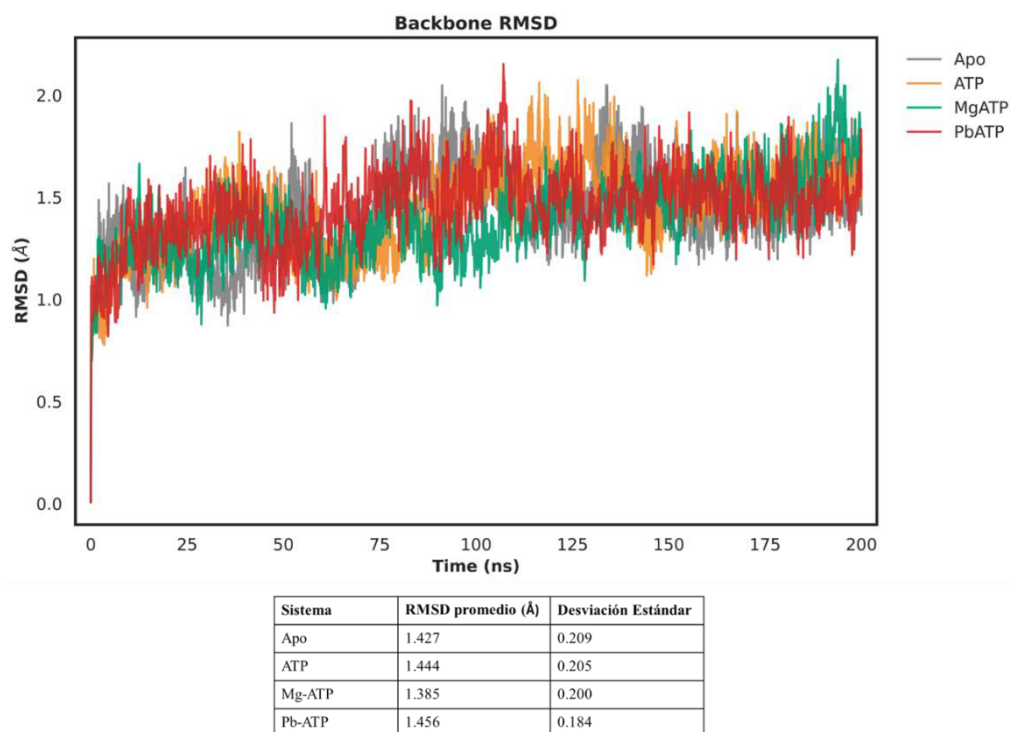


Figura 32. Desviación cuadrática media (RMSD) de la cadena principal de la proteína. Los cuatro sistemas contienen glucosa en su sitio de unión.

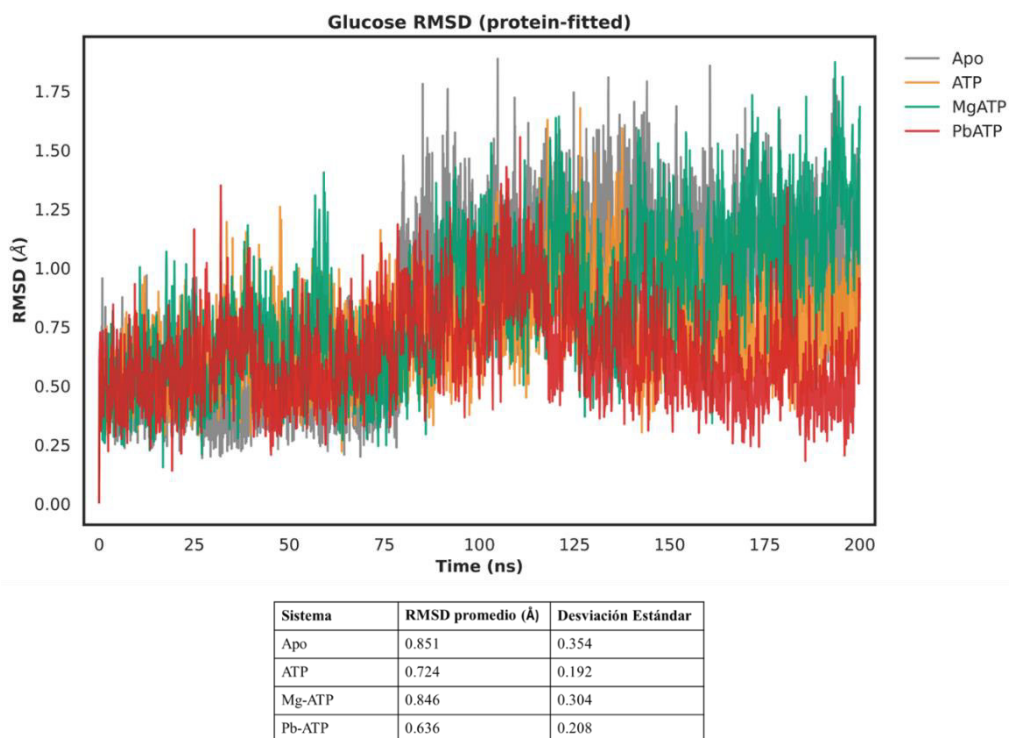
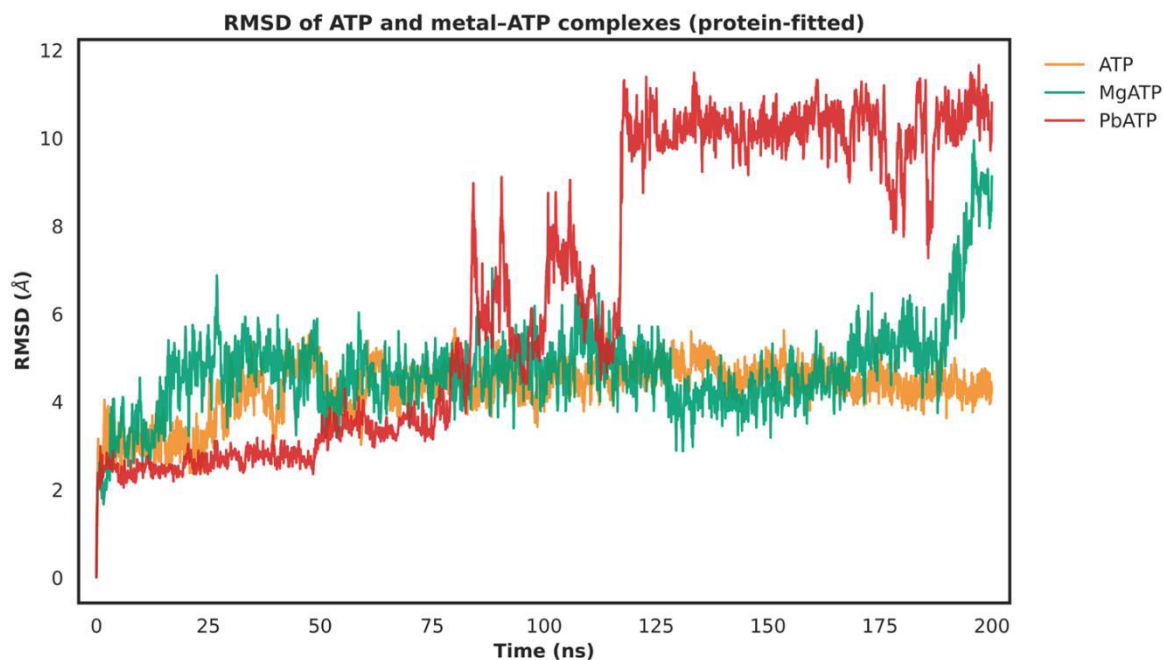


Figura 33. Desviación cuadrática media (RMSD) de la glucosa respecto a la proteína.

Respecto a los ligandos, la molécula de ATP presenta los valores de RMSD y de desviación estándar más pequeños, $\approx 4.3 \pm 0.6$ Å [Figura 34]. A lo largo de la dinámica, el ATP se mantiene en su sitio de unión sin cambios relevantes en el modo de interacción u orientación de la cadena trifosfato. Mientras que, en el caso del sustrato endógeno Mg-ATP, a partir de aproximadamente el nanosegundo 180 hay un incremento en el RMSD que corresponde a una reorientación de la cadena trifosfato hacia la glucosa [Figura 34]. Finalmente, el complejo Pb-ATP ocupa el sitio de unión de ATP solamente de manera transitoria [Figura 34], pues a partir de aproximadamente el nanosegundo 80, la región de adenosina ya no se encuentra en el espacio entre las hélices que conforman dicho sitio. Hacia el final de la dinámica, el Pb se coordina con D417 (hebra β -12), manteniendo el complejo orientado hacia el medio; cabe recalcar que a lo largo de la dinámica la coordinación del Pb entre los fosfatos γ y β se mantiene.



Sistema	RMSD promedio (Å)	Desviación Estándar
ATP	4.294	0.633
Mg-ATP	4.736	1.053
Pb-ATP	6.531	3.347

Figura 34. *Desviación cuadrática media (RMSD) del ATP y complejos Metal-ATP.*

Respecto a la fluctuación de los carbonos alfa de los residuos en los cuatro sistemas, la **Figura 35** y **Tabla 12** muestran que las regiones más fluctuantes corresponden a la discontinuidad estructural en el cristal (residuo 148 no resuelto), los extremos N-terminal y C-terminal, así como a regiones conformadas por residuos de glicina entre estructuras secundarias. El sistema en donde hay una mayor fluctuación (0.941 Å) es en la simulación con el sustrato endógeno Mg-ATP, lo cual refleja el cambio en la orientación de la cadena trifosfato, mencionado anteriormente.

Sistema	RMSF promedio (Å)
Apo	0.833
ATP	0.854
Mg-ATP	0.941
Pb-ATP	0.827

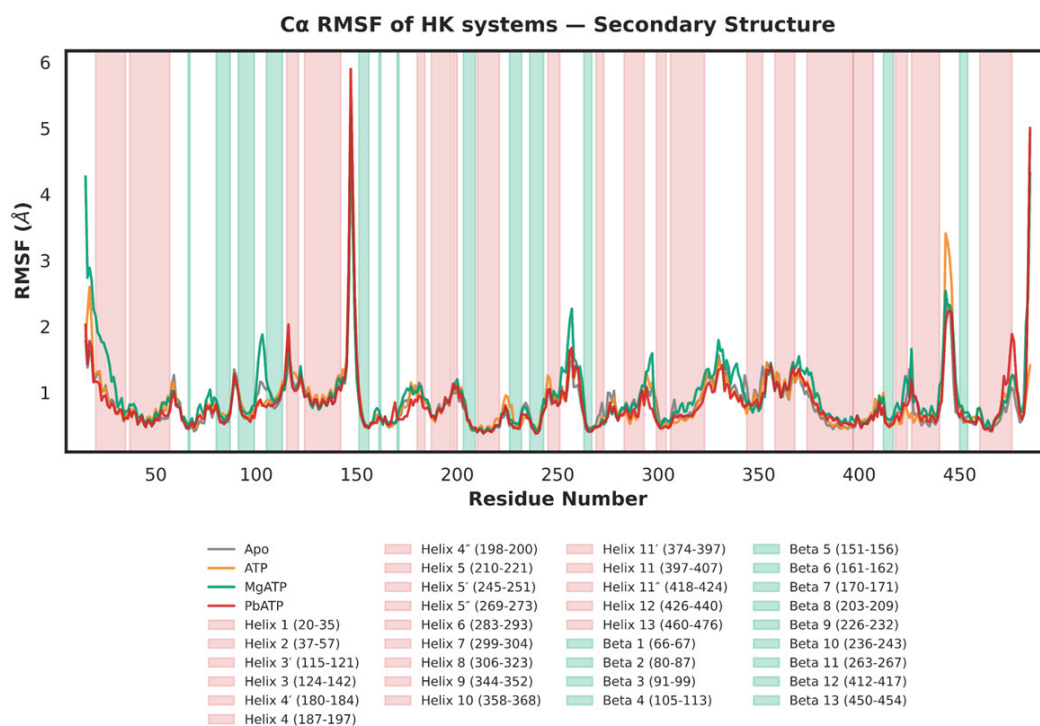
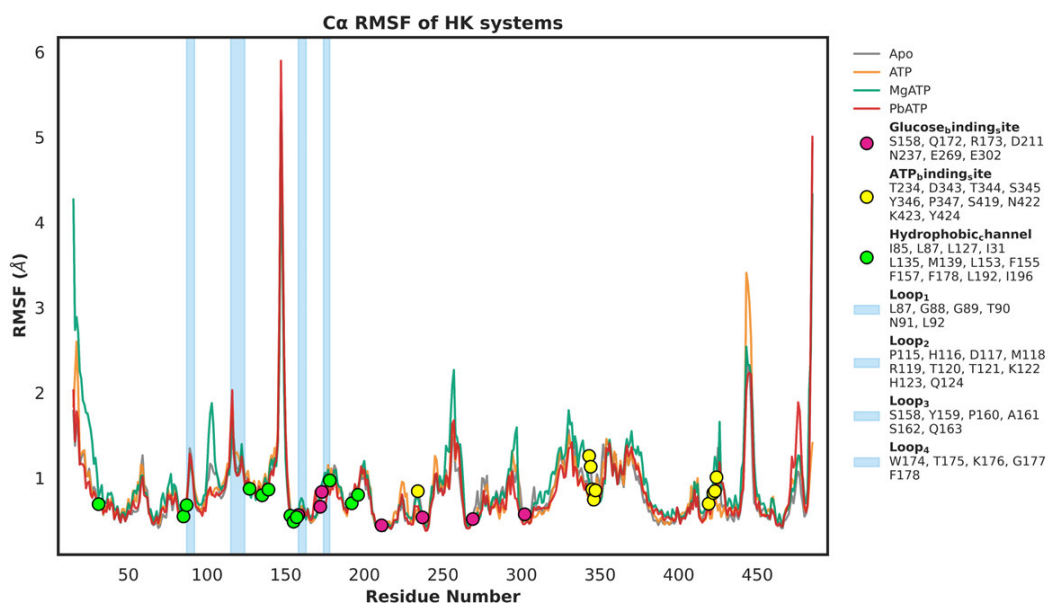


Figura 35. Fluctuación cuadrática media (RMSF) de carbonos alfa.

Tabla 12. *Residuos con mayor fluctuación (RMSF) entre los cuatro sistemas.*

Residuo	Apo (Å)	ATP (Å)	Mg-ATP (Å)	Pb-ATP (Å)	Descripción
T147	5.308	4.664	5.222	5.894	Discontinuidad estructural (residuo 148 no resuelto)
A485	4.930	—	4.330	5.004	C-Terminal
G484	2.781	—	2.442	2.739	Gly (flexibilidad intrínseca) y adyacente a C-Terminal
N146	2.702	3.008	2.451	2.927	Adyacente a discontinuidad estructural
G443	2.397	3.406	2.539	—	Gly (flexibilidad intrínseca)
A445	2.324	3.046	—	2.232	Próximo a G443
D149	2.246	2.200	—	2.478	Discontinuidad estructural (residuo 148 no resuelto)
D444	2.220	3.278	2.325	2.210	Adyacente a G443
S446	1.842	2.637	—	2.208	Próximo a G443
S15	1.790	—	4.269	2.028	N-Terminal
A17	—	2.599	2.887	—	Próximo a N-Terminal
M16	—	2.198	2.736	—	Adyacente N-Terminal
D18	—	2.064	2.711	—	Próximo a N-Terminal
H116	—	—	—	2.029	Adyacente a P115 (inductor de giro)

Dinámica molecular del sitio de unión de Pb-glucosa

Para analizar el sitio I de unión de plomo [sección 5.4], evaluamos la estabilidad del Pb^{2+} mediante dinámica molecular. La cadena principal de la proteína mantiene un RMSD similar de ≈ 1.6 Å, a pesar de haberse utilizado otro cristal (PDB: 1IG8, isoforma II en conformación abierta sin glucosa) [Figura 36]. Respecto al plomo, este se mantiene ocupando el sitio de unión de glucosa con un RMSD de $\approx 3.5 \pm 1.0$ Å [Figura 37]. La desviación respecto a la posición inicial corresponde a los cambios en las interacciones del Pb^{2+} con los residuos en el sitio. A los nanosegundos 25, 100 y 125, por ejemplo, el residuo que coordina al Pb^{2+} es la cadena lateral de E269; mientras que al nanosegundo 35, el plomo se coordina con las cadenas laterales de D211 y N210; de la misma manera, al nanosegundo 80 y 200 el Pb^{2+} se coordina con D211.

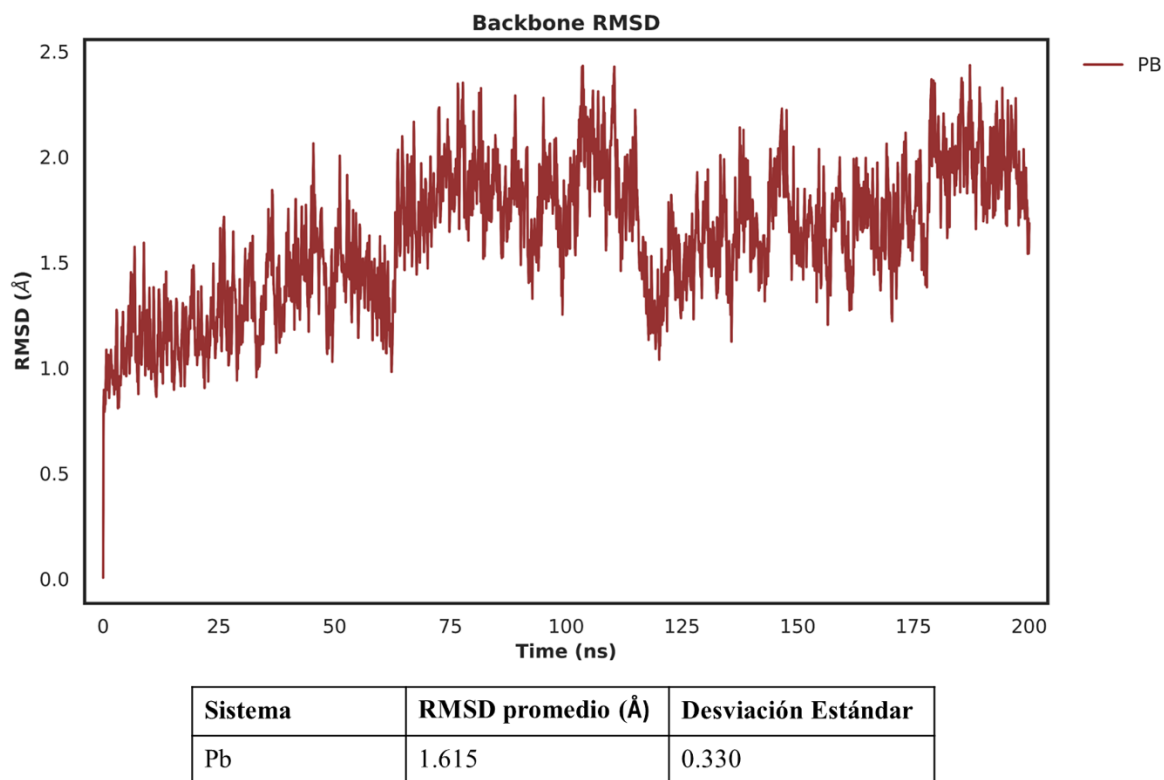


Figura 36. Desviación cuadrática media (RMSD) de la cadena principal de la proteína.

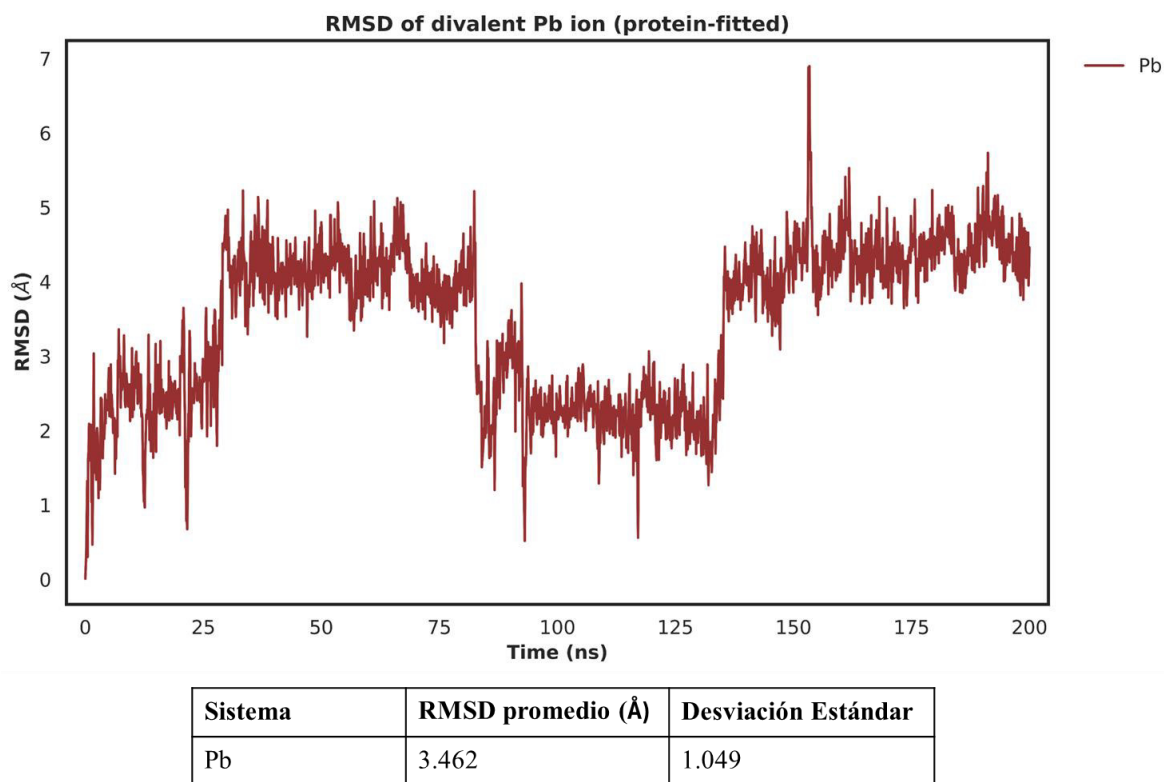


Figura 37. Desviación cuadrática media (RMSD) del Pb en el sitio de unión de glucosa.

La fluctuación de los carbonos alfa corresponde en este caso a residuos en los extremos N-terminal y C-terminal, así como a regiones con residuos de glicina o prolina entre estructuras secundarias [Figura 38] y [Tabla 13].

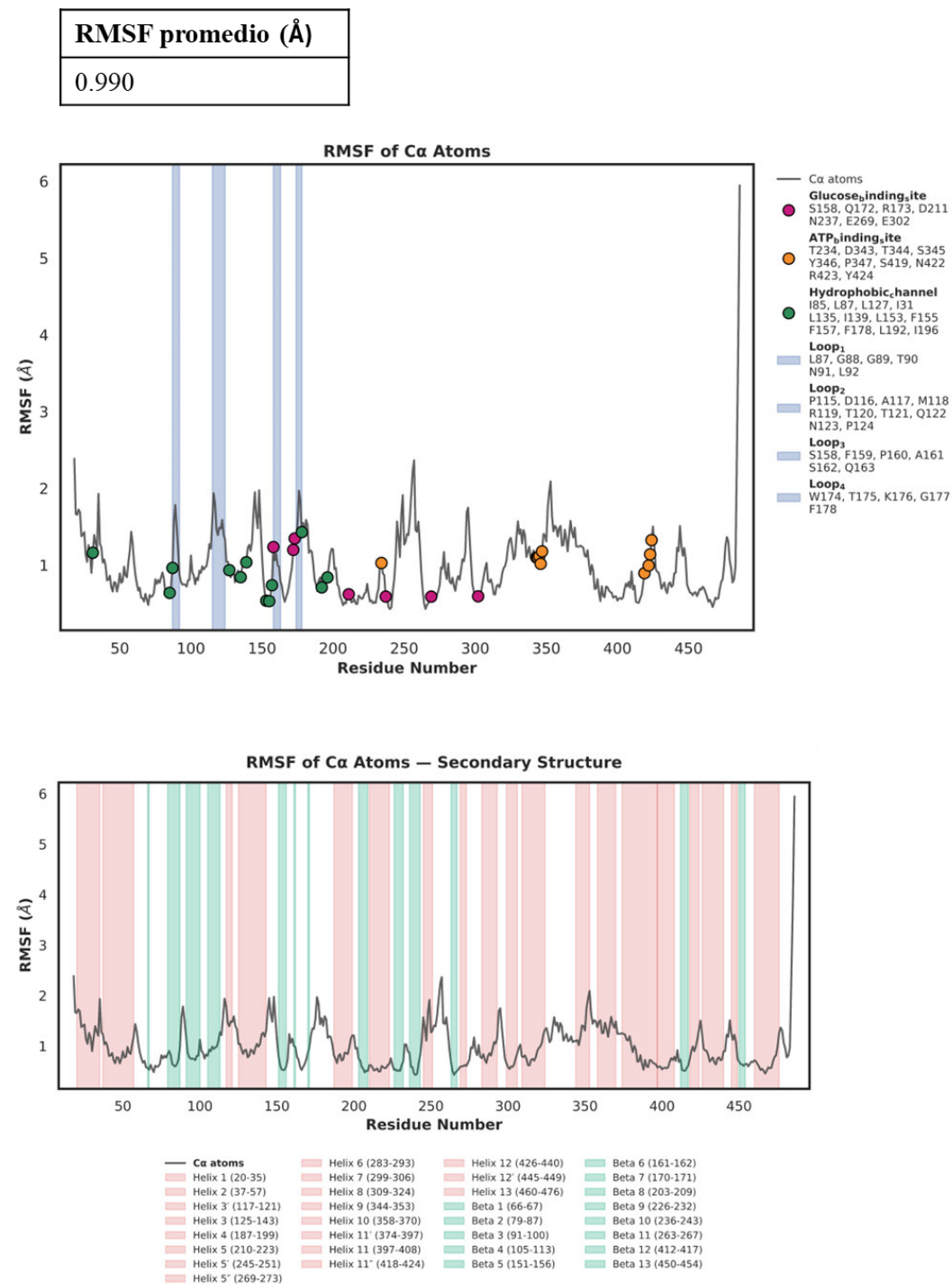


Figura 38. Fluctuación cuadrática media (RMSF) de carbonos alfa.

Tabla 13. Residuos con mayor fluctuación (RMSF).

Ranking	Residuo	Valor (Å)	Descripción
1	486	5.944	C-Terminal
2	485	3.948	Adyacente a C-Terminal
3	484	2.430	Próximo a C-Terminal
4	18	2.385	N-terminal
5	257	2.363	Próximo a P259 (inductor de giro)
6	256	2.229	Próximo a P259
7	353	2.088	Adyacente a P354
8	148	1.973	Próximo a P150
9	176	1.967	Adyacente a G177 (flexibilidad intrínseca)
10	352	1.948	Próximo a P354

5.6 Análisis por DFT de los modelos finitos de unión de Pb y glucosa

A partir de los resultados de dinámica molecular, se calculó por DFT y al mismo nivel de teoría que los cálculos previos [sección 4.1], la energía electrónica de los modelos finitos del sitio de unión de Pb y de glucosa. A partir de estos, se calculó la energía de desplazamiento del plomo por la glucosa, en el sitio de unión a la glucosa [Figura 39]. Los resultados indican que la glucosa no es capaz de desplazar al plomo de su sitio ($\Delta E = 258.02$ kcal/mol).

$$E_{\text{desplazamiento}} = (E_{\text{Pb}} + E_{\text{glucosa-HK}}) - (E_{\text{glucosa}} + E_{\text{Pb-HK}}) = 258.02 \text{ kcal/mol}$$

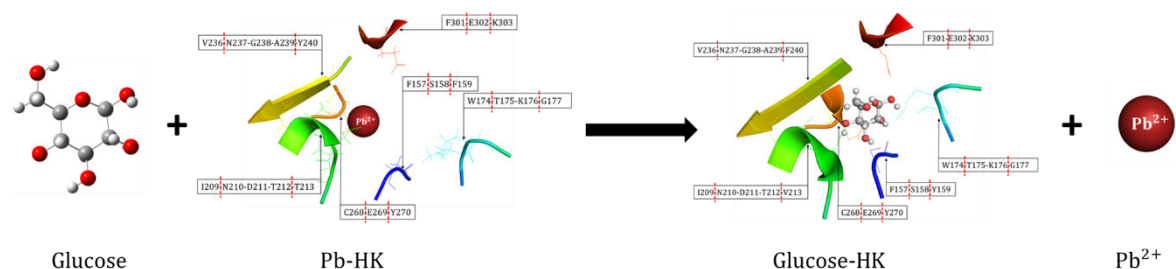


Figura 39. ΔE de desplazamiento. Pb-HK indica el modelo finito del sitio de unión de Pb y Glucose-HK indica el modelo finito del sitio de unión de glucosa.

VI. Discusión de Resultados

Previo a este proyecto, calculamos una primera aproximación sobre algunos complejos Metal-ATP²⁻ en fase gas y con estados de espín altos, en donde analizamos el cambio en la electrofilicidad sobre los átomos de fósforo de los complejos; en ese estudio, mostramos que todos los metales tenían un efecto significativo sobre la función Fukui nucleofílica condensada en el átomo de fósforo- γ ¹⁷. Sin embargo, al profundizar en el estudio de los complejos Metal-ATP —incluyendo un tercer modo de coordinación— hallamos que estas estructuras de mínima energía en la superficie de energía potencial no correspondían al estado

electrónico más estable; además, para mejorar la representabilidad de nuestro estudio, era necesario realizar los cálculos en solvente.

Como se ha mencionado previamente, el estado de espín más estable para la molécula de ATP y los complejos de magnesio, calcio y plomo es el estado de singlete [Figura 16]. En general, esto se cumple en la naturaleza porque las reglas de Hund son válidas solamente para átomos aislados^{153–155}; en el caso de los complejos de manganeso, el estado de singlete es imposible debido al número impar de electrones. En términos de estructura electrónica, esto podría estar asociado con que el sustrato endógeno sea Mg-ATP y no Mn-ATP, sabiendo que el Mn^{2+} tiene la capacidad de mimetizar al magnesio en múltiples biosistemas^{25,68}.

Respecto a la energía libre de Gibbs, es consistente que los complejos con los modos de coordinación más estables ($\gamma\beta\alpha < \gamma\beta < \beta\alpha$) presenten las energías de formación más exergónicas y las energías de transferencia de grupo fosforilo más endergónicas [Figura 18 y 20]. La energía de desplazamiento por mimetización química es congruente respecto a la estabilidad de los complejos en función del metal ($Pb < Mg-Mn < Ca$), y respalda la participación de este mecanismo toxicológico ampliamente descrito para el Pb^{2+} ^{5,68} [Figura 19]. En conjunto, estos cálculos sugieren que en los ensayos *in vitro* la formación de complejos de Pb tuvo efecto en, por lo menos, la concentración efectiva de sustrato endógeno disponible para la catálisis, pues su formación es termodinámicamente más favorable que la de complejos de Mg y estos se forman tanto por adición como por desplazamiento y mimetización química.

En términos de reactividad global, todos los complejos Metal-ATP²⁻ incrementan la susceptibilidad ante un ataque nucleofílico, respecto al ATP [Figura 21]. Aunque no necesariamente de manera significativa. Lo más interesante es que la diferencia entre los complejos de Mg coordinados en $\gamma\beta$ y $\gamma\beta\alpha$, respecto al ATP, es de ≈ 3 y 4 kcal/mol, respectivamente. Sabemos que el complejo de Mg coordinado en $\gamma\beta\alpha$ no actúa como sustrato; de tal manera que los altos índices de electrofilicidad que presentan los complejos coordinados en $\beta\alpha$ de Mg, Mn y Pb (≈ 10 , 13 y 14 kcal/mol, respecto al ATP), y el $Pb-ATP_{\gamma\beta}^{2-}$ (≈ 9 kcal/mol, respecto al ATP), tal vez tengan efectos contraproducentes respecto a un acoplamiento estable en la región funcional.

En términos de reactividad local, hemos demostrado cuantitativamente que la función del Mg, en el sustrato endógeno, no es incrementar la electrofilicidad del fósforo γ para su transferencia, sino estabilizar la cadena trifosfato y disminuir el carácter nucleofílico del $PO_{3-\gamma}$ para que ocurra el ataque nucleofílico por parte del 6-OH de la glucosa [Tabla 5 y Figuras 23 y 24]. Estos resultados son muy importantes, porque las posibles implicaciones del Mg como cofactor del ATP y la razón por la cual este es su cofactor y no otros metales endógenos, son preguntas que hasta el momento no se habían respondido de manera concreta. La diferencia abismal en la blandura local electrofílica, entre el sustrato y los demás complejos, provee evidencia directa que responde a las preguntas: ¿Por qué el ATP no

funciona como sustrato? ¿Por qué magnesio y no otro metal? ¿Por qué coordinado con los fosfatos γ y β ?

Adicionalmente, estos resultados nos permitieron identificar los complejos de Pb que, en términos de reactividad local, mimetizan al sustrato endógeno. Como hemos mencionado anteriormente, el complejo de Pb coordinado en $\gamma\beta\alpha$ es análogo al sustrato endógeno; mientras que el complejo de Pb coordinado en $\gamma\beta$, aunque también disminuye la reactividad en la cadena trifosfato, tiene un átomo metálico muy electrofílico susceptible de reaccionar con otras moléculas o residuos proteicos.

El análisis múltiple de secuencias indica que —parafraseando a Jacques Monod¹⁵⁶— en el sitio catalítico lo que es cierto para la isoforma I, es cierto para la isoforma II de *S. cerevisiae*; y en el sitio de unión de glucosa, lo que es cierto para *S. cerevisiae*, es posible que también lo sea para *H. sapiens* en ensayos *in vitro* [Tablas 7 y 8]. La única región funcional no conservada en las HK's de *S. cerevisiae* es L2; sin embargo, estas diferencias no apuntan a implicaciones regulatorias entre ambas isoformas, pues en ambas HK's este loop forma parte de una hélice 3₁₀; este tipo de estructuras comparten características entre los loops flexibles y las alfa-hélices, y se asocian principalmente a regiones implicadas en cambios de orientación entre estructuras secundarias formales. De tal manera que, siempre y cuando se conserve la estructura de hélice-3₁₀, la función en el cierre/apertura de la enzima debe mantenerse.

Por otro lado, los análisis de acoplamiento molecular muestran que los complejos Metal-ATP²⁻ se unen al sitio de unión de ATP con la misma energía, independientemente del metal o el modo de coordinación [Tabla 9]. Las interacciones que favorecen el acoplamiento son interacciones electrostáticas entre la cadena trifosfato y K423, así como la formación de enlaces de hidrógeno entre la cadena trifosfato o la ribosa con los residuos S345/419, D343 y T344, además de distintas interacciones tipo π con la adenina [Tabla 10]. Estos análisis mostraron que la presencia de al menos un residuo cargado positivamente es esencial para el acoplamiento de la cadena trifosfato; de hecho, en los acoplamientos moleculares ciegos, los sitios alostéricos de baja energía de unión también estaban conformados por este tipo de residuos en regiones no funcionales y expuestas al medio.

En la isoforma PII de *S. cerevisiae*, la lisina está sustituida por una arginina (K423R); si una sustitución conservativa es suficiente en este sitio o si existe alguna implicación regulatoria relacionada con K423R, es algo que no podemos concluir con base en nuestros resultados; no obstante, llama la atención que en las hexocinasas humanas este sitio lo ocupa la secuencia conservada KLH (correspondiente a las posiciones 422, 423 y 424 en *S. cerevisiae*) [Figura 27], en ese sentido, debemos tomar en cuenta tres aspectos: la lisina está desplazada en una posición, hay un segundo aminoácido polar y las HK's humanas I-III tienen una región funcional adicional que une G6P (adyacente al sitio catalítico, en la hoja beta del dominio pequeño). La hipótesis es que la presencia de dos residuos del subconjunto “cargados positivamente” (la histidina es neutra a pH fisiológico), y espaciados por una leucina,

probablemente faciliten la estabilización de dos sustratos con grupos fosfato (Mg-ATP y G6P) en las HK's humanas I-III. Pero entonces, ¿qué implica que la HK IV, que no es inhibida por G6P, conserve la secuencia? Esto sugiere que la presencia de por lo menos un aminoácido cargado positivamente es suficiente para estabilizar el acoplamiento de la cadena trifosfato y que es poco probable que la sustitución K423R tenga un efecto regulatorio entre las isoenzimas de *S. cerevisiae*; pues hemos de recordar que HK IV proviene, en términos evolutivos, de la HK II humana [Figura 8], y en HK IV la secuencia KLH es funcional aunque no sea inhibida por G6P y también carezca de un dominio N-terminal regulatorio, como es el caso de las hexocinasas de *S. cerevisiae* de $\approx 50\text{kDa}$; es decir, la misma secuencia es funcional en cuatro HK's que son altamente reguladas por distintos mecanismos.

Las simulaciones de dinámica molecular muestran que el ATP^{4-} ocupa de manera estable el sitio [Figura 34], pero sin cambios significativos en la orientación de la cadena trifosfato que apunten el grupo fosforilo- γ hacia el sitio catalítico; adicionalmente, sabemos que, en términos de reactividad local, es imposible que ocurra el ataque nucleofílico sobre un fosforilo γ no coordinado por magnesio [Figura 24].

Respecto a los complejos Metal- ATP^{2-} , debido a la gran diferencia en la concentración de magnesio respecto a la de plomo en los ensayos *in vitro*, $[\text{Mg}] \gg [\text{Pb}]$, es poco probable que el rol de los complejos Pb-ATP^{2-} constituya un factor determinante en el mecanismo toxicológico, en especial tomando en cuenta que el análisis de la estabilidad de los complejos de $\text{Mg-ATP}_{\gamma\beta}^{2-}$ y $\text{Pb-ATP}_{\gamma\beta}^{2-}$ demuestran que, aunque el complejo de plomo es capaz de competir por el sitio de unión de ATP, su ocupación es transitoria [Figura 34]; no obstante, ya que en términos de reactividad local el complejo de Pb coordinado en $\gamma\beta\alpha$ es análogo al complejo endógeno de magnesio [Tabla 5, Figura 24], sería importante analizar también su estabilidad en la enzima.

Sabemos que el complejo de plomo que ocupa de manera transitoria el sitio de unión de ATP tiene una adenina de carácter electrofílico, mientras que el perfil de reactividad de la adenina del sustrato endógeno es análogo en el complejo de Pb coordinado en $\gamma\beta\alpha$ [IS 3]; por tanto, es probable que este complejo Metal- ATP^{4-} sea mucho más estable entre las hélices que unen la región de la adenina. Empero, las simulaciones de dinámica molecular carecen de información de estructura electrónica.

La estabilidad del plomo enclaustrado entre los tres fosfatos, no obstante, podría ser el factor determinante para mantener al complejo unido de manera estable en simulaciones de dinámica molecular, recordando que durante la simulación del $\text{Pb-ATP}_{\gamma\beta}^{2-}$ un factor importante fue la exposición del Pb para coordinarse con residuos fuera de la región funcional. Si esto es así, sería importante analizar la estabilidad energética del complejo $\text{Pb-ATP}_{\gamma\beta\alpha}^{2-}$ vs el sustrato endógeno en la región funcional, mediante un modelo finito analizado por la DFT; esto también sería relevante porque el único modelo finito que se ha planteado sobre el sitio de unión a ATP de hexocinasas se realizó sobre la HK IV humana y el principal

residuo que se discute no está conservado en ninguna HK humana ni de *S. cerevisiae*, así que el modelo no es extrapolable a otras hexocinasas ²³. Más aún, la geometría de coordinación del $\text{Pb-ATP}_{\gamma\beta\alpha}^{2-}$ implica que no es plausible que actúe como sustrato para la transferencia del grupo fosforilo, por lo que el comportamiento esperado sería el de un inhibidor competitivo reversible.

Finalmente, ya que el $\text{Pb-ATP}_{\beta\alpha}^{2-}$ presenta un átomo metálico también muy electrofílico y expuesto al medio, lo más probable es que este complejo también ocupe de manera transitoria el sitio de unión de ATP; además, es el complejo menos estable termodinámicamente y también el más reactivo, en contraste con los otros complejos de plomo.

La predicción de posibles sitios de unión de plomo sugieren que la región funcional del sitio de unión de glucosa es un blanco de unión para el Pb^{2+} , debido principalmente a los residuos cargados negativamente que establecen las interacciones por enlace de hidrógeno con los grupos hidroxilo de la glucosa; el análisis de dinámica molecular indica que la unión de Pb^{2+} en este sitio es estable, mientras que el modelo finito del sitio de unión Pb-glucosa sugiere que la glucosa no es capaz de desplazar al plomo del sitio [**Figuras 36 y 38**]; sin embargo, en nuestro modelo el cálculo de la energía de desplazamiento se hizo con la energía electrónica, que es más bien equivalente a la entalpía de reacción. Aterrizar esta discusión en términos de la energía libre de Gibbs ha quedado pendiente en este trabajo. Más aún, solamente hemos considerado la capacidad de la glucosa para desplazar al plomo del sitio; el hecho de que no pueda desplazar al plomo no implica que la glucosa no pueda acoplarse de forma estable a los residuos más externos como S158, T175, K176 o E302 [**Figura 14**]. De hecho, el glutamato del dominio grande, así como la treonina y la lisina que forman parte del loop 4, se aproximan al sitio como consecuencia del cambio conformacional hacia la forma semicerrada. A su vez, Q172 y R173 —que no consideramos en nuestro modelo finito por la distancia a la que se encuentran— son residuos que posteriormente se aproximan al sitio catalítico para que la enzima adquiera la conformación cerrada y se lleve a cabo la reacción. Es decir, si la unión del Pb^{2+} al sitio catalítico evita que la glucosa se una, esto implica que el plomo está actuando como un antagonista ortostérico; por otro lado, si la unión del Pb^{2+} causa una disrupción en la geometría conformacional del sitio y, por tanto, la glucosa queda parcialmente desplazada o mal orientada, estaríamos hablando entonces de un mecanismo que impide la formación del sitio catalítico natural. De hecho, los inhibidores que se han sintetizado para la HK II humana funcionan mediante ambos mecanismos ²⁷: evitan que la glucosa se una al sitio y la catálisis no ocurre porque su tamaño impide que los loops formen el sitio catalítico (en principio, el 6-OH de estos inhibidores podría desempeñar la transferencia del grupo fosforilo) [**Figura 9**]. Sin embargo, con las estructuras cristalográficas actuales de HK de *S. cerevisiae*, no tenemos manera de validar un acoplamiento de la glucosa sobre la HK en conformación abierta y el Pb^{2+} ocupando el sitio; a menos que utilicemos el resultado de la dinámica molecular del Pb^{2+} como estructura de referencia para el acoplamiento. Aun así, lo ideal sería primero demostrar por cristalografía

de rayos X que el plomo ocupa el sitio de unión de glucosa después de 15 min de preincubación; de tal manera que disminuya la incertidumbre respecto a las aproximaciones que podemos realizar en este momento por métodos computacionales.

En conjunto, la evidencia experimental y nuestros resultados sugieren que el plomo se une de manera estable en el sitio de unión de glucosa, pero esta inactivación requiere tiempo de preincubación porque la afinidad de la glucosa por la enzima es mayor que la del Pb^{2+} ; si no fuera así, la inactivación también se observaría en presencia del sustrato endógeno (glucosa) y su cinética correspondería a la de un inhibidor competitivo, el cual no es el caso¹⁷; además, debemos recordar que la enzima une glucosa de forma cooperativa gracias a los cambios conformacionales inducidos por la misma glucosa, de tal manera que la disponibilidad del sitio para coordinar plomo disminuiría con el tiempo. Por tanto, es posible que la inactivación no ocurra a concentraciones fisiológicas de glucosa.

Por otro lado, la recuperación parcial de la actividad por el magnesio parece estar relacionada con la concentración efectiva de sustrato y la fracción de HK inhibida por Pb^{2+} ; añadir Ca^{2+} o Mn^{2+} no revierte la actividad porque estos metales no funcionan como análogos al sustrato endógeno ($\text{Mg-ATP}_{\gamma\beta}$).

En la **Figura 40** resumimos mediante un esquema, el mecanismo toxicológico putativo de la inactivación de la hexocinasa de *S. Cerevisiae* causada por el plomo.

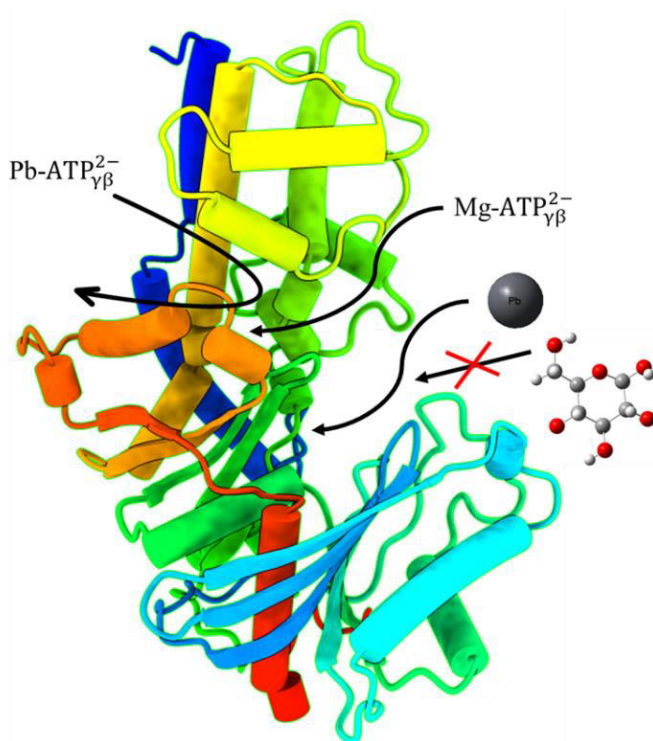


Figura 40. Esquema representativo del mecanismo toxicológico putativo del Pb en HK de *S. cerevisiae*.

VII. Conclusiones

El plomo afecta la actividad enzimática de la hexocinasa por más de un mecanismo toxicológico, con una K_I aparente de 117 μM . La formación de complejos Pb-ATP^{2-} [sección 5.1] y su capacidad de competir por el sitio de unión de ATP [secciones 5.3 y 5.5], están relacionadas con la actividad relativa en los ensayos de preincubación, pero no constituyen el principal mecanismo toxicológico. Los experimentos en ausencia de Mg^{2+} y ATP^{4-} , donde se sigue inactivando la hexocinasa, pero hay una disminución del efecto sobre la $^{APP}V_{MAX}$ relativa, concuerdan con estos resultados. El principal mecanismo toxicológico implica, aparentemente, la unión de Pb^{2+} en el sitio de unión de glucosa, el cual no es desplazado por su ligando endógeno [secciones 5.4, 5.5 y 5.6]. Esto concuerda con la disminución en un $\approx 60\text{--}85\%$ de la $^{APP}V_{MAX}$ relativa, dependiente del tiempo de preincubación (15 min) y de la concentración de Pb^{2+} (60 y 120 μM , respectivamente) en ausencia de glucosa.

El análisis del estado de conservación entre las isoformas de HK de *S. cerevisiae* y las cuatro HK's humanas [sección 5.2], indican que el mecanismo toxicológico del Pb es el mismo para ambas isoformas de *S. cerevisiae* y es posible que también inactive hexocinasas humanas en ensayos *in vitro*. Finalmente, es posible que la recuperación parcial de la actividad sea consecuencia de la proporción $[\text{Mg}]:[\text{Pb}]$, ya que la concentración de Mg y ATP era mucho mayor que la de plomo en los ensayos *in vitro* [15 mM Mg $\gg$ 0.4 mM ATP $>$ 120 o 60 μM Pb].

7.1 Perspectivas

- Se requiere llevar a cabo estudios de cristalografía por rayos X de la enzima, para corroborar los sitios de unión de plomo y esclarecer el mecanismo toxicológico putativo en el sitio de unión de glucosa.
- Para elucidar las implicaciones de la reactividad análoga del complejo $\text{Pb-ATP}_{\gamma\beta\alpha}^{2-}$ respecto al sustrato endógeno, es necesario analizar la estabilidad del complejo por simulaciones de dinámica molecular. Dependiendo de los resultados, podría también ser necesario construir un modelo finito de esta región.

VIII. Información Suplementaria (IS)

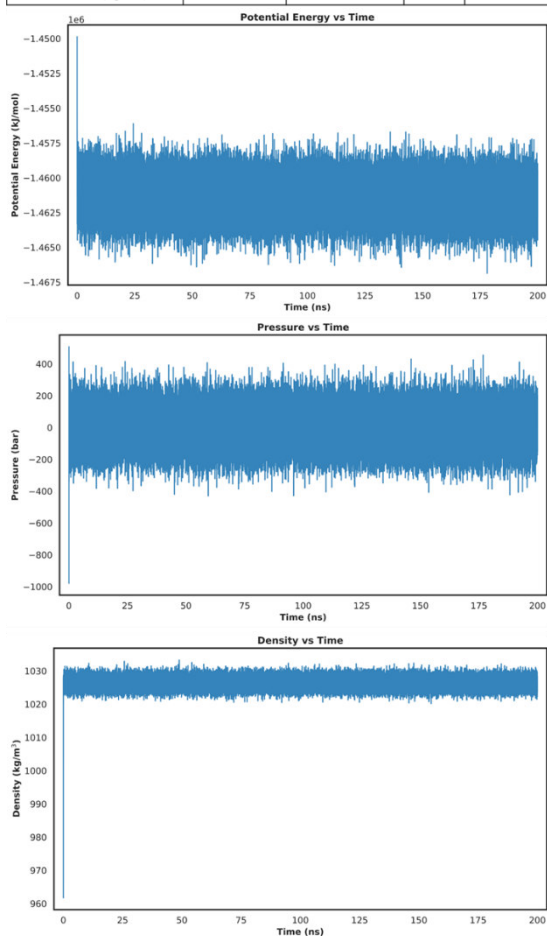
Los softwares utilizados para la generación de esquemas, estructuras o imágenes moleculares en este trabajo fueron Chimera X v1.4, Accelrys Draw v4.1, YASARA v22.5.22, PyMOL v3.1.5.1, y ChemDraw Ultra v12.0.2^{157–161}.

Atom type	rii	epsii	vol	solpar	rij_hb	epsij_hb	hbond
Mg	1.30	0.875	1.5600	-0.00110	0.0	0.0	0
Ca	1.98	0.550	2.7700	-0.00110	0.0	0.0	0
Mn	1.30	0.875	2.1400	-0.00110	0.0	0.0	0
Pb	4.30	0.663	12.0000	-0.00110	0.0	0.0	0

Información Suplementaria 1 (IS1). *Parámetros utilizados en los cálculos de acoplamiento molecular.* Los parámetros de Mg, Ca y Mn se encuentran en el archivo oficial AD4_parameters.dat. Para el caso del Pb, los valores que corresponden a la suma de radios de van der Waals (Rii), profundidad del pozo de van der Waals (epsii) y el volumen atómico de solvatación (vol) se extrajeron de los parámetros en el Universal Force Field (UFF) ¹⁶²; el parámetro de solpar conserva consistencia con el tratamiento de solvatación de AutoDock4; rij_hb, epsij_hb y hbond implican que los átomos metálicos no actúan como aceptores o donadores de enlace de hidrógeno.

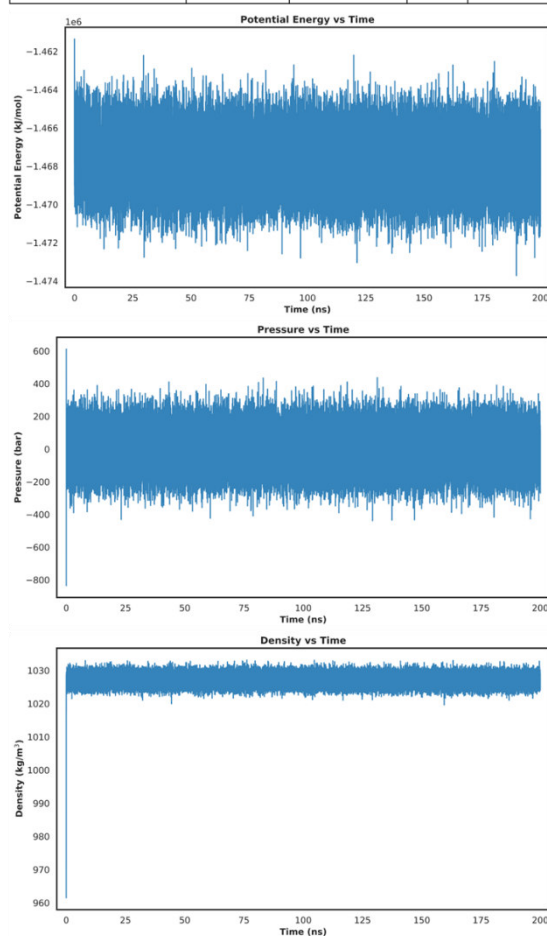
A) Apo₁

Variable	Promedio (Å)	Error Estimado	RMSD	Tot-Drift
Energía Potencial (kJ/mol)	-1.46E+06	52.0	1254.14	-345.397
Presión (bar)	0.9536	0.054	104.9	-0.290298
Densidad (kg/m ³)	1026.4	0.028	1.52448	-0.170845

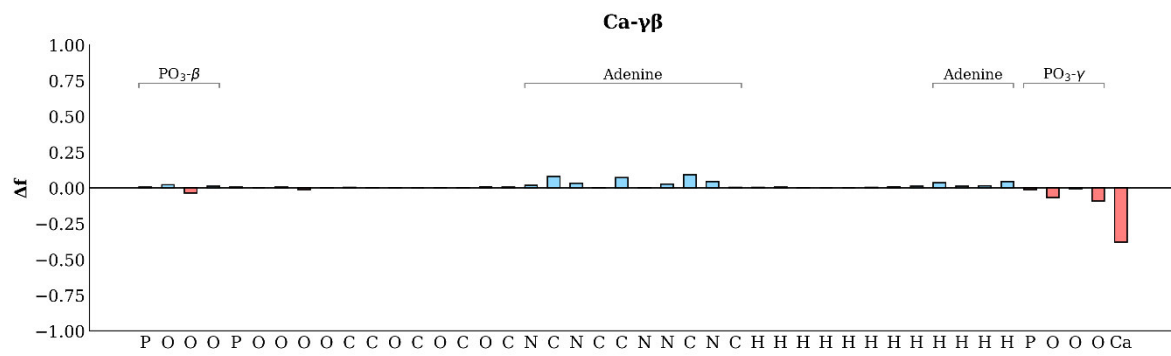
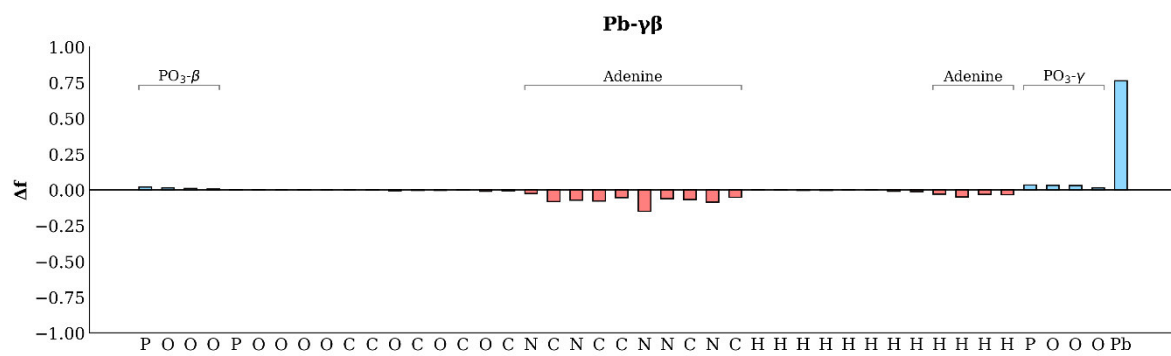
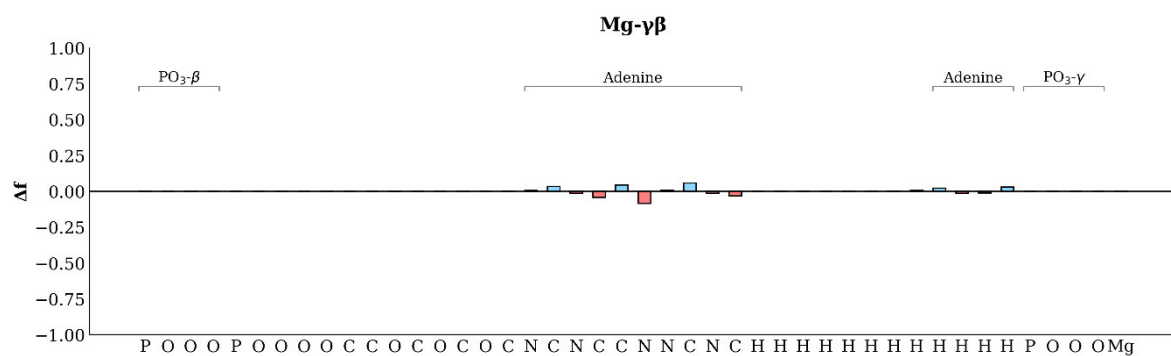
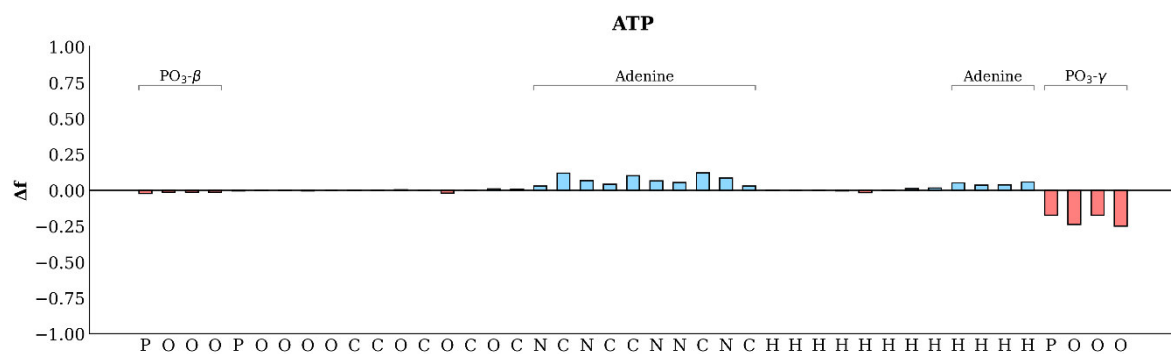


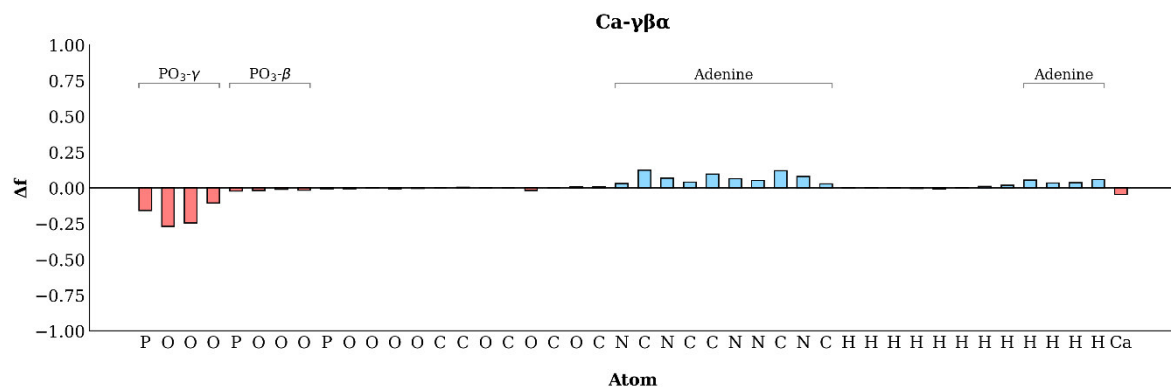
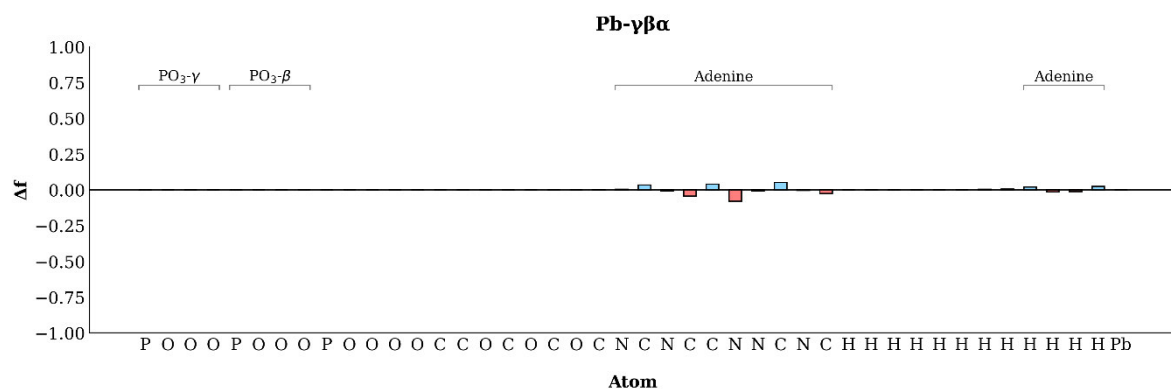
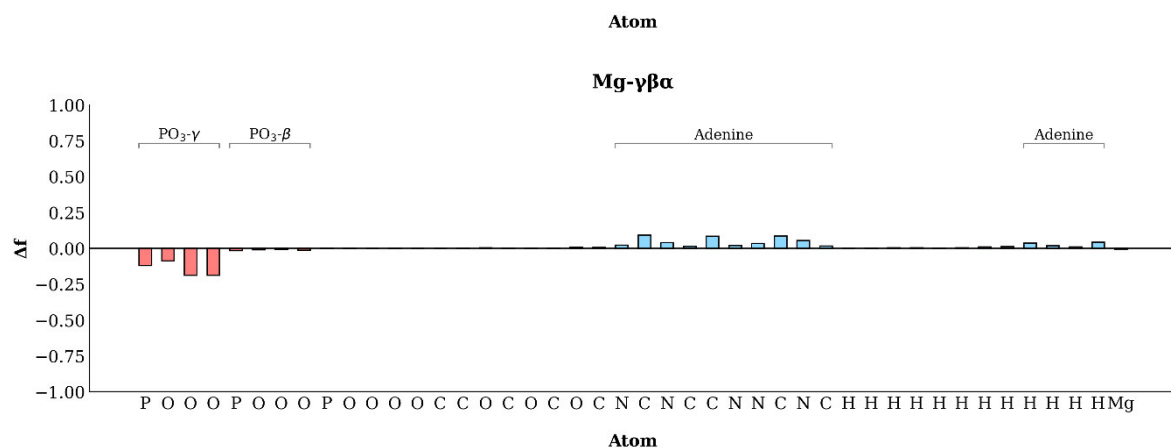
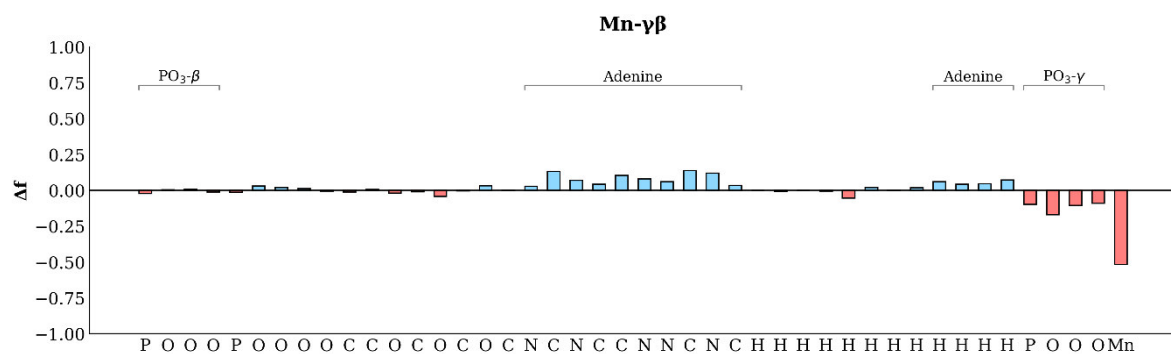
B) ATP

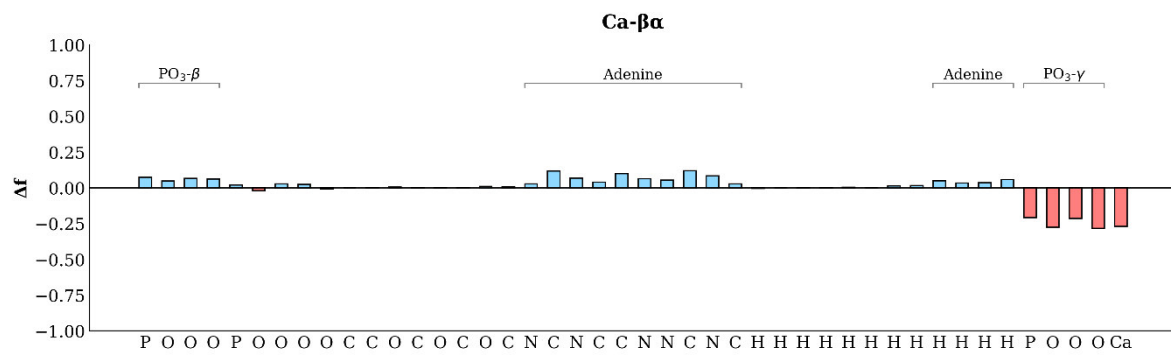
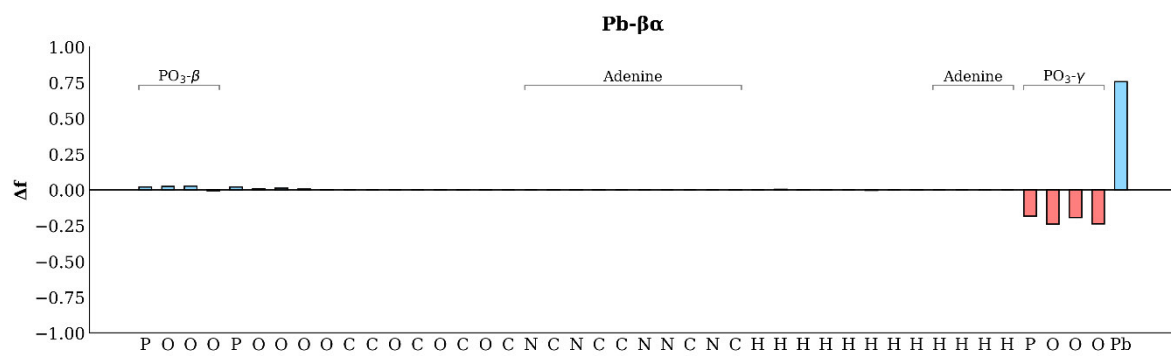
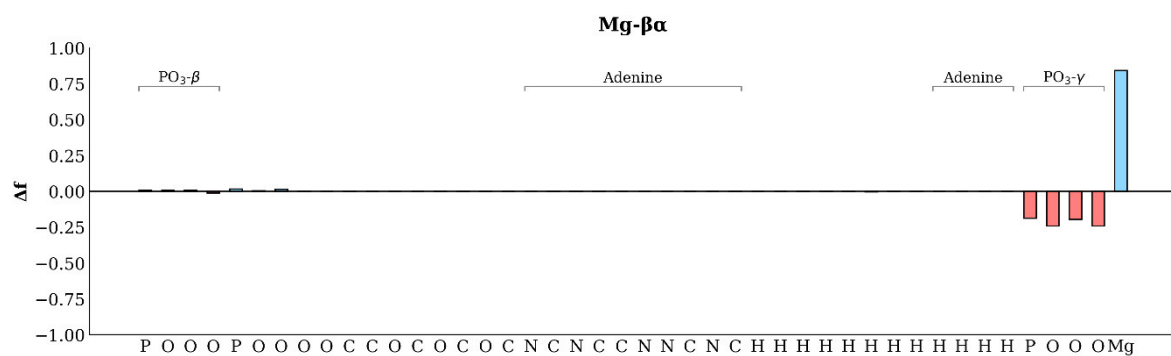
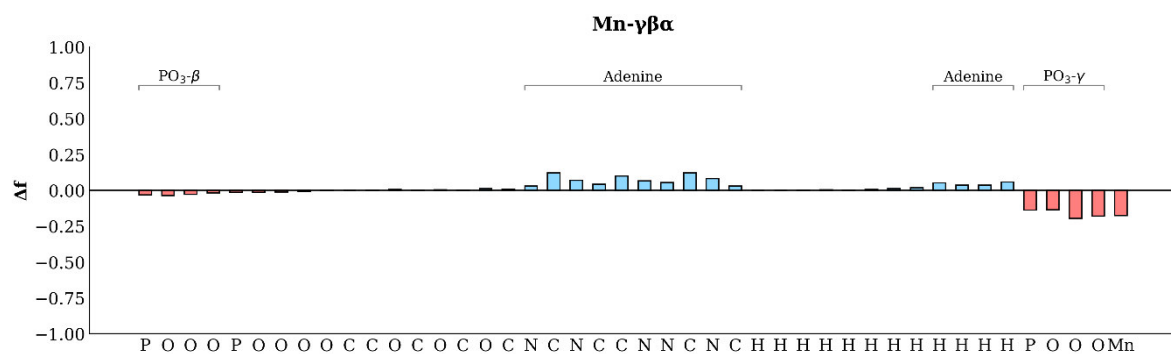
Variable	Promedio (Å)	Error Estimado	RMSD	Tot-Drift
Energía Potencial (kJ/mol)	-1.47E+06	48	1257.86	-287.005
Presión (bar)	1.04507	0.055	105.023	-0.193756
Densidad (kg/m ³)	1027.17	0.035	1.53348	-0.218956



Información Suplementaria 2 (IS2). *Variación en la energía potencial, presión y densidad a lo largo de 200ns de simulación de los sistemas Apo y ATP.* Ambos sistemas se mantuvieron estables con fluctuaciones dentro de los rangos esperados para el ensamble NPT, lo cual indica que permanecieron equilibradas y estructuralmente estables a lo largo del tiempo.

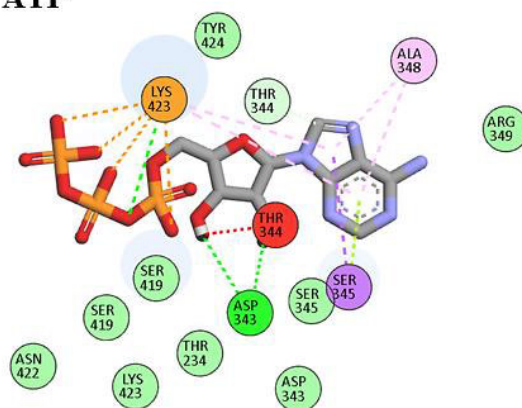




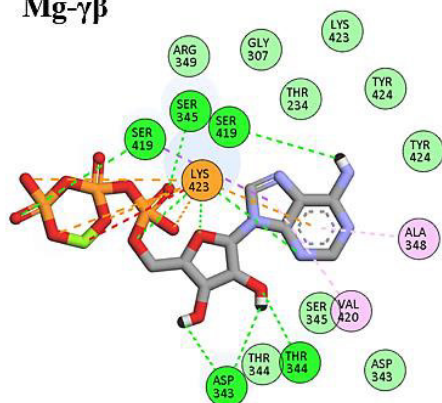


Tipo de interacción	Color
Van der Waals	Light Green
Enlace de hidrógeno con carbono	Light Green
Enlace de hidrógeno convencional	Green
Pi-Par solitario	Light Green
Pi-Alquil	Light Purple
Pi-Sigma	Purple
Apilamiento Amida-Pi	Pink
Pi-Catión	Orange
Electrostática atractiva	Orange
Puente salino	Red
Desfavorable donador-donador	Red
Desfavorable negativo-negativo	Red
Desfavorable positivo-positivo	Red

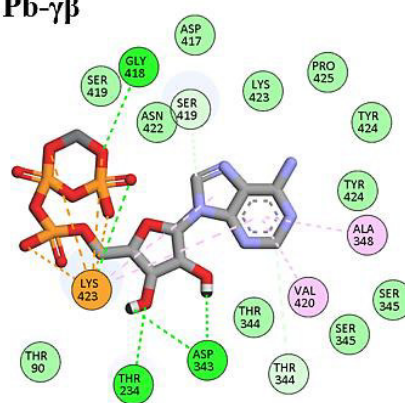
ATP



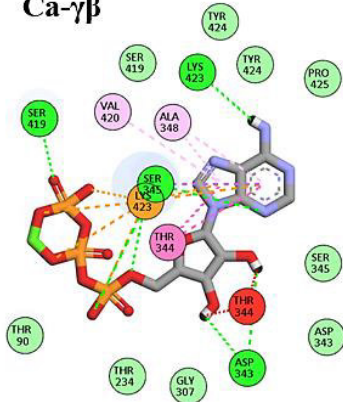
Mg- $\gamma\beta$



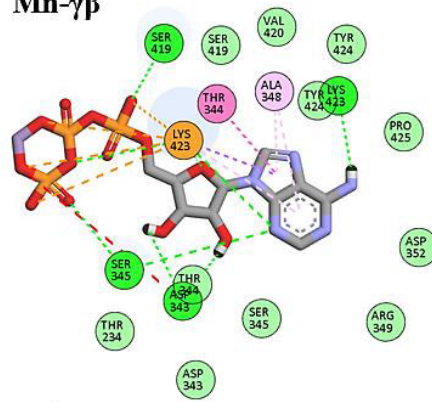
Pb- $\gamma\beta$



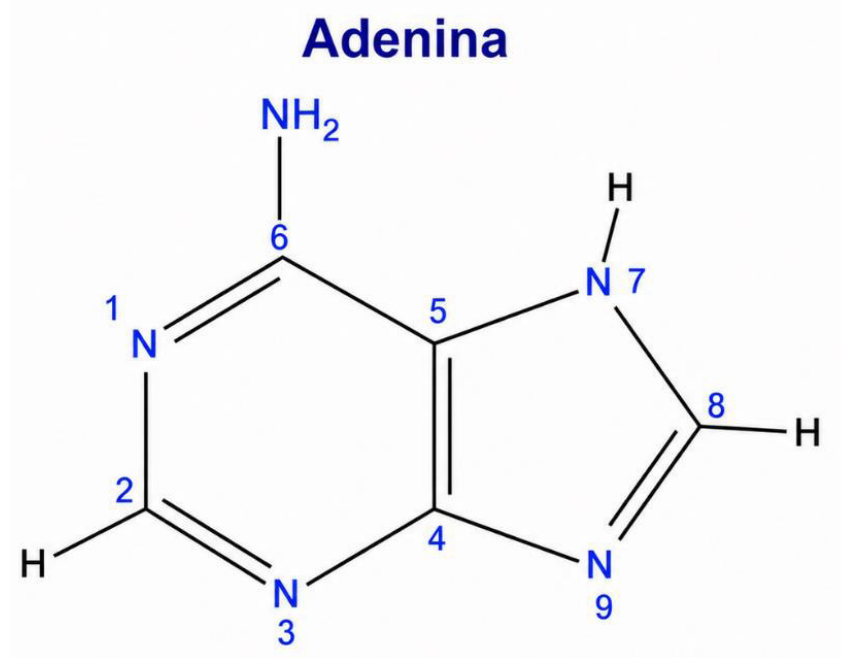
Ca- $\gamma\beta$



Mn- $\gamma\beta$



Información Suplementaria 5 (IS5). *Diagrama en 2D de las interacciones intermoleculares en el sitio de unión de ATP.* Las esferas indican el residuo con el que se dan las interacciones. El tipo de interacción y su código de color se muestran en la figura.



Información Suplementaria 6 (IS6). *Numeración del anillo de purina de la adenina.*

IX. Producción académica generada a partir de esta tesis.

Artículos científicos:

- Rodríguez-Sotres, R.; Blokesch, A.; Moreno-Galván, C.; Rodríguez-Vargas, A.; Robles, J.; Martínez-Alfaro, M. Yeast Hexokinase Inactivation by Lead and Its Reversion by Magnesium as One Possible Aspect of Lead Toxicity. *J. Inorg. Biochem.* (2025), 272, 112983. <https://doi.org/10.1016/J.JINORGBIO.2025.112983>.

Manuscritos en preparación:

- Rodríguez-Vargas, A.; Martínez-Alfaro, M; Robles, J. Elucidación del mecanismo toxicológico del plomo en la inactivación de la hexocinasa de *S. cerevisiae*. (2026). En preparación.

Participación en Congresos:

- “*Estudio toxicológico del mecanismo de inhibición del plomo en hexocinasa de S. cerevisiae*”. Rodríguez-Vargas, A.; Martínez-Alfaro, M.; Robles, J. Presentación oral en la Reunión Mexicana de Fisiología Teórica XXIII, Guanajuato, Gto., noviembre 2025.

X. Referencias

- (1) Balali-Mood, M.; Naseri, K.; Tahergorabi, Z.; Khazdair, M. R.; Sadeghi, M. Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 643972. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.643972>.
- (2) Jonasson, M. E.; Afshari, R. Historical Documentation of Lead Toxicity Prior to the 20th Century in English Literature. *Hum. Exp. Toxicol.* **2018**, *37* (8), 775–788. <https://doi.org/10.1177/0960327117737146>.
- (3) Tchounwou, P. B.; Yedjou, C. G.; Patlolla, A. K.; Sutton, D. J. Heavy Metal Toxicity and the Environment. In *Experientia supplementum (2012)*; Exp Suppl, 2012; Vol. 101, pp 133–164. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6.
- (4) Rehman, K.; Fatima, F.; Waheed, I.; Akash, M. S. H. Prevalence of Exposure of Heavy Metals and Their Impact on Health Consequences. *J. Cell. Biochem.* **2018**, *119* (1), 157–184. <https://doi.org/10.1002/jcb.26234>.
- (5) Kirberger, M.; Wong, H. C.; Jiang, J.; Yang, J. J. Metal Toxicity and Opportunistic Binding of Pb²⁺ in Proteins. *J. Inorg. Biochem.* **2013**, *125*, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.04.002>.
- (6) Cancer International Agency for Research on Cancer. *Inorganic and Organic Lead Compounds*; IARC Press, 2006.
- (7) Cheng, T. F.; Choudhuri, S.; Muldoon-Jacobs, K. Epigenetic Targets of Some Toxicologically Relevant Metals: A Review of the Literature. *Journal of Applied Toxicology*. *J Appl Toxicol* September 2012, pp 643–653. <https://doi.org/10.1002/jat.2717>.
- (8) Mani, M. S.; Kabekkodu, S. P.; Joshi, M. B.; Dsouza, H. S. Ecogenetics of Lead Toxicity and Its Influence on Risk Assessment. *Hum. Exp. Toxicol.* **2019**, *38* (9), 1031–1059. <https://doi.org/10.1177/0960327119851253>.
- (9) de Souza, I. D.; de Andrade, A. S.; Dalmolin, R. J. S. Lead-Interacting Proteins and Their Implication in Lead Poisoning. *Crit. Rev. Toxicol.* **2018**, *48* (5), 375–386. <https://doi.org/10.1080/10408444.2018.1429387>.
- (10) Flora, G.; Gupta, D.; Tiwari, A. Toxicity of Lead: A Review with Recent Updates. *Interdisciplinary Toxicology*. *Interdiscip Toxicol* 2012, pp 47–58. <https://doi.org/10.2478/v10102-012-0009-2>.
- (11) Vašková, J.; Kočan, L.; Vaško, L.; Perjési, P. Glutathione-Related Enzymes and Proteins: A Review. *Molecules* **2023**, *28* (3), 1447. <https://doi.org/10.3390/molecules28031447>.
- (12) Chlubek, M.; Baranowska-Bosiacka, I. Selected Functions and Disorders of Mitochondrial Metabolism under Lead Exposure. *Cells* **2024**, *13* (14), 1182. <https://doi.org/10.3390/CELLS13141182>.
- (13) Wang, J.; Zhu, H.; Yang, Z.; Liu, Z. Antioxidative Effects of Hesperetin against Lead

Acetate-Induced Oxidative Stress in Rats. *Indian J. Pharmacol.* **2013**, 45 (4), 395. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.115015>.

- (14) Caito, S.; Lopes, A. C. B. A.; Paoliello, M. M. B.; Aschner, M. 16. Toxicology of Lead and Its Damage to Mammalian Organs. In *Lead – Its Effects on Environment and Health*; De Gruyter, 2017; Vol. 17, pp 501–534. <https://doi.org/10.1515/9783110434330-016>.
- (15) Toews, A. D.; Kolber, A.; Hayward, J.; Krigman, M. R.; Morell, P. Experimental Lead Encephalopathy in the Suckling Rat: Concentration of Lead in Cellular Fractions Enriched in Brain Capillaries. *Brain Res.* **1978**, 147 (1), 131–138. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(78\)90777-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(78)90777-1).
- (16) Rísová, V. The Pathway of Lead through the Mother’s Body to the Child. *Interdisciplinary Toxicology*. Interdiscip Toxicol September 1, 2019, pp 1–6. <https://doi.org/10.2478/intox-2019-0001>.
- (17) Rodríguez-Sotres, R.; Blokesch, A.; Moreno-Galván, C.; Rodríguez-Vargas, A.; Robles, J.; Martínez-Alfaro, M. Yeast Hexokinase Inactivation by Lead and Its Reversion by Magnesium as One Possible Aspect of Lead Toxicity. *J. Inorg. Biochem.* **2025**, 272, 112983. <https://doi.org/10.1016/J.JINORGBIO.2025.112983>.
- (18) Kuser, P. R.; Krauchenco, S.; Antunes, O. A. C.; Polikarpov, I. The High Resolution Crystal Structure of Yeast Hexokinase PII with the Correct Primary Sequence Provides New Insights into Its Mechanism of Action. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275 (27), 20814–20821. <https://doi.org/10.1074/jbc.M910412199>.
- (19) Guo, D.; Meng, Y.; Jiang, X.; Lu, Z. Hexokinases in Cancer and Other Pathologies. *Cell Insight*. Elsevier February 1, 2023, p 100077. <https://doi.org/10.1016/j.cellin.2023.100077>.
- (20) Kumar, Y. N.; Kumar, P. S.; Sowjenya, G.; Rao, V. K.; Yeswanth, S.; Prasad, U. V.; Pradeepkiran, J. A.; Sarma, P.; Bhaskar, M. Comparison and Correlation of Binding Mode of ATP in the Kinase Domains of Hexokinase Family. *Bioinformation* **2012**, 8 (12), 543–547. <https://doi.org/10.6026/97320630008543>.
- (21) Wilson, J. E. Isozymes of Mammalian Hexokinase: Structure, Subcellular Localization and Metabolic Function. *J. Exp. Biol.* **2003**, 206 (Pt 12), 2049–2057. <https://doi.org/10.1242/JEB.00241>.
- (22) Lassila, J. K.; Zalatan, J. G.; Herschlag, D. Biological Phosphoryl-Transfer Reactions: Understanding Mechanism and Catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* **2011**, 80, 669. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-060409-092741>.
- (23) Zhang, J.; Li, C.; Shi, T.; Chen, K.; Shen, X.; Jiang, H. Lys169 of Human Glucokinase Is a Determinant for Glucose Phosphorylation: Implication for the Atomic Mechanism of Glucokinase Catalysis. *PLoS One* **2009**, 4 (7), e6304. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0006304>.
- (24) Cox, M.; Nelson, D. L. *Lehninger Principles of Biochemistry*, Sixth.; W. H. Freeman, 2008.

- (25) Andreini, C.; Bertini, I.; Cavallaro, G.; Holliday, G. L.; Thornton, J. M. Metal Ions in Biological Catalysis: From Enzyme Databases to General Principles. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13* (8), 1205–1218. <https://doi.org/10.1007/s00775-008-0404-5>.
- (26) Nawaz, M. H.; Ferreira, J. C.; Nedyalkova, L.; Zhu, H.; Carrasco-López, C.; Kirmizialtin, S.; Rabeh, W. M. The Catalytic Inactivation of the N-Half of Human Hexokinase 2 and Structural and Biochemical Characterization of Its Mitochondrial Conformation. *Biosci. Rep.* **2018**, *38* (1). <https://doi.org/10.1042/BSR20171666/57169>.
- (27) Lin, H.; Zeng, J.; Xie, R.; Schulz, M. J.; Tedesco, R.; Qu, J.; Erhard, K. F.; Mack, J. F.; Raha, K.; Rendina, A. R.; Szewczuk, L. M.; Kratz, P. M.; Jurewicz, A. J.; Cecconie, T.; Martens, S.; McDevitt, P. J.; Martin, J. D.; Chen, S. B.; Jiang, Y.; Nickels, L.; Schwartz, B. J.; Smallwood, A.; Zhao, B.; Campobasso, N.; Qian, Y.; Briand, J.; Rominger, C. M.; Oleykowski, C.; Hardwicke, M. A.; Luengo, J. I. Discovery of a Novel 2,6-Disubstituted Glucosamine Series of Potent and Selective Hexokinase 2 Inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7* (3), 217–222. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.5b00214>.
- (28) Liu, S.; Ammirati, M. J.; Song, X.; Knafels, J. D.; Zhang, J.; Greasley, S. E.; Pfeifferkorn, J. A.; Qiu, X. Insights into Mechanism of Glucokinase Activation. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (17), 13598–13610. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.274126>.
- (29) Mitsuya, M.; Kamata, K.; Bamba, M.; Watanabe, H.; Sasaki, Y.; Sasaki, K.; Ohyama, S.; Hosaka, H.; Nagata, Y.; Eiki, J. ichi; Nishimura, T. Discovery of Novel 3,6-Disubstituted 2-Pyridinecarboxamide Derivatives as GK Activators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (10), 2718–2721. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2009.03.137>.
- (30) Kuser, P.; Cupri, F.; Bleicher, L.; Polikarpov, I. Crystal Structure of Yeast Hexokinase PI in Complex with Glucose: A Classical “Induced Fit” Example Revised. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2008**, *72* (2), 731–740. <https://doi.org/10.1002/prot.21956>.
- (31) Kuser, P. R.; Golubev, A. M.; Polikarpov, I. Crystallization and Preliminary Crystal Analysis of Yeast Hexokinase PI and PII. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **1999**, *55* (12), 2047–2048. <https://doi.org/10.1107/S09074444999012263>.
- (32) De Winde, J. H.; Crauwels, M.; Hohmann, S.; Thevelein, J. M.; Winderickx, J. Differential Requirement of the Yeast Sugar Kinases for Sugar Sensing in Establishing the Catabolite-Repressed State. *Eur. J. Biochem.* **1996**, *241* (2), 633–643. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1996.00633.X>.
- (33) Entian, K. D. Genetic and Biochemical Evidence for Hexokinase PII as a Key Enzyme Involved in Carbon Catabolite Repression in Yeast. *Mol. Gen. Genet.* **1980**, *178* (3), 633–637. <https://doi.org/10.1007/BF00337871>.
- (34) Wilson, J. E. An Introduction to the Isoenzymes of Mammalian Hexokinase Types I–III. *Biochem. Soc. Trans.* **1997**, *25* (1), 103–107. <https://doi.org/10.1042/bst0250103>.
- (35) Aleshin, A. E.; Zeng, C.; Bourenkov, G. P.; Bartunik, H. D.; Fromm, H. J.; Honzatko, R. B. The Mechanism of Regulation of Hexokinase: New Insights from the Crystal Structure of Recombinant Human Brain Hexokinase Complexed with Glucose and

Glucose-6-Phosphate. *Structure* **1998**, 6 (1), 39–50. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(98\)00006-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(98)00006-9).

- (36) Burley, S. K.; Bhikadiya, C.; Bi, C.; Bittrich, S.; Chao, H.; Chen, L.; Craig, P. A.; Crichlow, G. V.; Dalenberg, K.; Duarte, J. M.; Dutta, S.; Fayazi, M.; Feng, Z.; Flatt, J. W.; Ganesan, S. J.; Ghosh, S.; Goodsell, D. S.; Green, R. K.; Guranovic, V.; Henry, J.; Hudson, B. P.; Khokhriakov, I.; Lawson, C. L.; Liang, Y.; Lowe, R.; Peisach, E.; Persikova, I.; Piehl, D. W.; Rose, Y.; Sali, A.; Segura, J.; Sekharan, M.; Shao, C.; Vallat, B.; Voigt, M.; Webb, B.; Westbrook, J. D.; Whetstone, S.; Young, J. Y.; Zalevsky, A.; Zardecki, C. RCSB Protein Data Bank: Tools for Visualizing and Understanding Biological Macromolecules in 3D. *Protein Sci.* **2022**, 31 (12), e4482. <https://doi.org/10.1002/pro.4482>.
- (37) Burley, S. K.; Berman, H. M.; Kleywegt, G. J.; Markley, J. L.; Nakamura, H.; Velankar, S. Protein Data Bank (PDB): The Single Global Macromolecular Structure Archive. In *Methods in Molecular Biology*; Humana Press Inc., 2017; Vol. 1607, pp 627–641. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7000-1_26.
- (38) Colowick, S. P. 1 The Hexokinases. *Enzymes* **1973**, 9 (C), 1–48. [https://doi.org/10.1016/S1874-6047\(08\)60113-4](https://doi.org/10.1016/S1874-6047(08)60113-4).
- (39) Sitbon, E.; Pietrokovski, S. Occurrence of Protein Structure Elements in Conserved Sequence Regions. *BMC Struct. Biol.* **2007**, 7, 3. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-7-3>.
- (40) Krieger, F.; Möglich, A.; Kiefhaber, T. Effect of Proline and Glycine Residues on Dynamics and Barriers of Loop Formation in Polypeptide Chains. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (10), 3346–3352. <https://doi.org/10.1021/JA042798I>.
- (41) Mulichak, A. M.; Wilson, J. E.; Padmanabhan, K.; Michael Garavito, R. The Structure of Mammalian Hexokinase-1. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, 5 (7), 555–560. <https://doi.org/10.1038/811>.
- (42) Aleshin, A. E.; Zeng, C.; Bourenkov, G. P.; Bartunik, H. D.; Fromm, H. J.; Honzatko, R. B. The Mechanism of Regulation of Hexokinase: New Insights from the Crystal Structure of Recombinant Human Brain Hexokinase Complexed with Glucose and Glucose-6-Phosphate. *Structure* **1998**, 6 (1), 39–50. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(98\)00006-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(98)00006-9).
- (43) Pickover, C. A.; McKay, D. B.; Engelman, D. M.; Steitz, T. A. Substrate Binding Closes the Cleft between the Domains of Yeast Phosphoglycerate Kinase. *J. Biol. Chem.* **1979**, 254 (22), 11323–11329.
- (44) Wilson, J. E. Hexokinases. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **1995**, 126, 65–198. <https://doi.org/10.1007/BFb0049776>.
- (45) Anderson, C. M.; Stenkamp, R. E.; McDonald, R. C.; Steitz, T. A. A Refined Model of the Sugar Binding Site of Yeast Hexokinase B. *J. Mol. Biol.* **1978**, 123 (2), 207–219. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(78\)90321-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(78)90321-2).
- (46) Bennett, W. S.; Steitz, T. A. Structure of a Complex between Yeast Hexokinase A and

- Glucose: I. Structure Determination and Refinement at 3.5 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **1980**, *140* (2), 183–209. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(80\)90102-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(80)90102-3).
- (47) Steitz, T. A.; Flatterick, R. J.; Anderson, W. F.; Anderson, C. M. High Resolution X-Ray Structure of Yeast Hexokinase, an Allosteric Protein Exhibiting a Non-Symmetric Arrangement of Subunits. *J. Mol. Biol.* **1976**, *104* (1), 197–222. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(76\)90009-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(76)90009-7).
 - (48) Sols, A., & Crane, R. K. Substrate Specificity of Brain Hexokinase. *J. Biol. Chem.* **1954**, *210* (2), 581–595.
 - (49) Kraakman, L. S.; Winderickx, J.; Thevelein, J. M.; De Winde, J. H. Structure-Function Analysis of Yeast Hexokinase: Structural Requirements for Triggering CAMP Signalling and Catabolite Repression. *Biochem. J.* **1999**, *343 Pt 1* (Pt 1), 159–168.
 - (50) Arora, K. K., Filburn, C. R., & Pedersen, P. L. Glucose Phosphorylation. Site-Directed Mutations Which Impair the Catalytic Function of Hexokinase. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266* (9), 5359–5362.
 - (51) Xu, L. Z.; Harrison, R. W.; Weber, I. T.; Pilgis, S. J. Human β -Cell Glucokinase: Dual Role of Ser-151 in Catalysis and Hexose Affinity. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (17), 9939–9946. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.17.9939>.
 - (52) Heidrich, K.; Otto, A.; Behlke, J.; Rush, J.; Wenzel, K. W.; Kriegel, T. Autophosphorylation-Inactivation Site of Hexokinase 2 in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Biochemistry* **1997**, *36* (8), 1960–1964. <https://doi.org/10.1021/BI9623643>.
 - (53) DelaFuente, G. Specific Inactivation of Yeast Hexokinase Induced by Xylose in the Presence of a Phosphoryl Donor Substrate. *Eur. J. Biochem.* **1970**, *16* (2), 240–243. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1970.TB01077.X>.
 - (54) Shoham, M.; Steitz, T. A. Crystallographic Studies and Model Building of ATP at the Active Site of Hexokinase. *J. Mol. Biol.* **1980**, *140* (1), 1–14. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(80\)90353-8](https://doi.org/10.1016/0022-2836(80)90353-8).
 - (55) Egner, U.; Tomasselli, A. G.; Schulz, G. E. Structure of the Complex of Yeast Adenylate Kinase with the Inhibitor P1,P5-Di(Adenosine-5'-)Pentaphosphate at 2.6 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **1987**, *195* (3), 649–658. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90188-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90188-4).
 - (56) Althaher, A. R.; Alwahsh, M. An Overview of ATP Synthase, Inhibitors, and Their Toxicity. *Heliyon* **2023**, *9* (11), e22459. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2023.E22459>.
 - (57) Rosano, C.; Sabini, E.; Rizzi, M.; Deriu, D.; Murshudov, G.; Bianchi, M.; Serafini, G.; Magnani, M.; Bolognesi, M. Binding of Non-Catalytic ATP to Human Hexokinase I Highlights the Structural Components for Enzyme–Membrane Association Control. *Structure* **1999**, *7* (11), 1427–1437. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)80032-5](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)80032-5).
 - (58) Kopetzki, E.; Entian, K. D.; Mecke, D. Complete Nucleotide Sequence of the Hexokinase PI Gene (HXK1) of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Gene* **1985**, *39* (1), 95–101. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(85\)90113-1](https://doi.org/10.1016/0378-1119(85)90113-1).

- (59) Nedyalkova Tong, Y., Rabeh, W., Tempel, W., Landry, R., Arrowsmith, C.H., Edwards, A.M., Bountra, C., Weigelt, J., Bochkarev, A., Park, H., L. Crystal Structure of the C-Terminal Hexokinase Domain of Human HK3. August 11, 2009. <https://doi.org/10.2210/pdb3hm8/pdb>.
- (60) Pollard-Knight, D.; Cornish-Bowden, A. Mechanism of Liver Glucokinase. *Mol. Cell. Biochem.* **1982**, *44* (2), 71–80. <https://doi.org/10.1007/BF00226892>.
- (61) Bonora, M.; Patergnani, S.; Rimessi, A.; de Marchi, E.; Suski, J. M.; Bononi, A.; Giorgi, C.; Marchi, S.; Missiroli, S.; Poletti, F.; Wieckowski, M. R.; Pinton, P. ATP Synthesis and Storage. *Purinergic Signalling*. Springer September 2012, pp 343–357. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9305-8>.
- (62) Rajendran, M.; Dane, E.; Conley, J.; Tantama, M. Imaging Adenosine Triphosphate (ATP). *Biological Bulletin*. Marine Biological Laboratory August 1, 2016, pp 73–84. <https://doi.org/10.1086/689592>.
- (63) Gottesman, M. E.; Chudaev, M.; Mustaev, A. Key Features of Magnesium That Underpin Its Role as the Major Ion for Electrophilic Biocatalysis. *FEBS J.* **2020**, *287* (24), 5439–5463. <https://doi.org/10.1111/febs.15318>.
- (64) Szabó, Z. Multinuclear NMR Studies of the Interaction of Metal Ions with Adenine-Nucleotides. *Coordination Chemistry Reviews*. Elsevier November 1, 2008, pp 2362–2380. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.03.002>.
- (65) Williams, R. J. P. Systems Biology of Evolution: The Involvement of Metal Ions. *BioMetals* **2007**, *20* (2), 107–112. <https://doi.org/10.1007/s10534-007-9087-6>.
- (66) Jahnen-Dechent, W.; Ketteler, M. Magnesium Basics. *Clin. Kidney J.* **2012**, *5* (Suppl 1), i3–i14. <https://doi.org/10.1093/ndtplus/sfr163>.
- (67) Gröber, U.; Schmidt, J.; Kisters, K. Magnesium in Prevention and Therapy. *Nutrients*. Nutrients September 23, 2015, pp 8199–8226. <https://doi.org/10.3390/nu7095388>.
- (68) Knape, M. J.; Ballez, M.; Burghardt, N. C.; Zimmermann, B.; Bertinetti, D.; Kornev, A. P.; Herberg, F. W. Divalent Metal Ions Control Activity and Inhibition of Protein Kinases. *Metallomics* **2017**, *9* (11), 1576–1584. <https://doi.org/10.1039/c7mt00204a>.
- (69) Vyas, P.; Malitsky, S.; Itkin, M.; Tawfik, D. S. On the Origins of Enzymes: Phosphate-Binding Polypeptides Mediate Phosphoryl Transfer to Synthesize Adenosine Triphosphate. *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *145* (15), 8344–8354. <https://doi.org/10.1021/JACS.2C08636>.
- (70) Merino, F.; Rivas-Pardo, J. A.; Caniuguir, A.; García, I.; Guixé, V. Catalytic and Regulatory Roles of Divalent Metal Cations on the Phosphoryl-Transfer Mechanism of ADP-Dependent Sugar Kinases from Hyperthermophilic Archaea. *Biochimie* **2012**, *94* (2), 516–524. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.08.021>.
- (71) Chinopoulos, C.; Vajda, S.; Csanády, L.; Mándi, M.; Mathe, K.; Adam-Vizi, V. A Novel Kinetic Assay of Mitochondrial ATP-ADP Exchange Rate Mediated by the ANT. *Biophys. J.* **2009**, *96* (6), 2490–2504. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.12.3915>.

- (72) Monasterio, O.; Cárdenas, M. L. Kinetic Studies of Rat Liver Hexokinase D ('glucokinase') in Non-Co-Operative Conditions Show an Ordered Mechanism with MgADP as the Last Product to Be Released. *Biochem. J.* **2003**, *371* (1), 29–38. <https://doi.org/10.1042/BJ20020728>.
- (73) Storer, A. C.; Cornish Bowden, A. Kinetics of Rat Liver Glucokinase. Cooperative Interactions with Glucose at Physiologically Significant Concentrations. *Biochem. J.* **1976**, *159* (1), 7–14. <https://doi.org/10.1042/bj1590007>.
- (74) McGrath, M. J.; Kuo, I. F. W.; Hayashi, S.; Takada, S. Adenosine Triphosphate Hydrolysis Mechanism in Kinesin Studied by Combined Quantum-Mechanical/Molecular-Mechanical Metadynamics Simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (24), 8908–8919. <https://doi.org/10.1021/ja401540g>.
- (75) Lu, X.; Ovchinnikov, V.; Demapan, D.; Roston, D.; Cui, Q. Regulation and Plasticity of Catalysis in Enzymes: Insights from Analysis of Mechanochemical Coupling in Myosin. *Biochemistry* **2017**, *56* (10), 1482–1497. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00016>.
- (76) Molnes, J.; Teigen, K.; Aukrust, I.; Bjørkhaug, L.; Søvik, O.; Flatmark, T.; Njølstad, P. R. Binding of ATP at the Active Site of Human Pancreatic Glucokinase - Nucleotide-Induced Conformational Changes with Possible Implications for Its Kinetic Cooperativity. *FEBS J.* **2011**, *278* (13), 2372–2386. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08160.x>.
- (77) Xu, M.; Xu, C.; Chen, M.; Xiao, Z.; Wang, Y.; Xu, Y.; Xu, D. Comparative Analysis of Commonly Used Bioinformatics Software Based on Omics. *Gene Reports* **2023**, *32*, 101800. <https://doi.org/10.1016/J.GENREP.2023.101800>.
- (78) Ferrer, S.; Ruiz-Pernía, J.; Martí, S.; Moliner, V.; Tuñón, I.; Bertrán, J.; Andrés, J. Hybrid Schemes Based on Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Simulations: Goals to Success, Problems, and Perspectives. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*; Adv Protein Chem Struct Biol, 2011; Vol. 85, pp 81–142. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386485-7.00003-X>.
- (79) Wishart, D. S. Introduction to Cheminformatics. *Curr. Protoc. Bioinforma.* **2016**, *53*, 14.1.1–14.1.21. <https://doi.org/10.1002/0471250953.BI1401S53>.
- (80) Cramer, C. J. *Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models*; 2004.
- (81) Jensen, F. *Introduction to Computational Chemistry*; Wiley, 2017.
- (82) Son, A.; Kim, W.; Park, J.; Lee, W.; Lee, Y.; Choi, S.; Kim, H. Utilizing Molecular Dynamics Simulations, Machine Learning, Cryo-EM, and NMR Spectroscopy to Predict and Validate Protein Dynamics. *International Journal of Molecular Sciences*. Int J Mol Sci September 1, 2024. <https://doi.org/10.3390/ijms25179725>.
- (83) Van Mourik, T. First-Principles Quantum Chemistry in the Life Sciences. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. Philos Trans A Math Phys Eng Sci December 15, 2004, pp 2653–2670. <https://doi.org/10.1098/rsta.2004.1469>.

- (84) Koch, W.; Holthausen, M. C. *A Chemist's Guide to Density Functional Theory*; Wiley-VCH, 2001.
- (85) Levine, I. N. *Química Cuántica*, 5th ed.; Pearson Education, 2001.
- (86) Szabo, A.; Ostlund, N. S. *Modern Quantum Chemistry: Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*; Dover Publications, 1996.
- (87) Parr, R. G.; Weitao, Y. *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules (International Series of Monographs on Chemistry)*; Oxford University Press, 1989.
- (88) Geerlings, P. From Density Functional Theory to Conceptual Density Functional Theory and Biosystems. *Pharmaceuticals* **2022**, *15* (9). <https://doi.org/10.3390/ph15091112>.
- (89) Culka, M.; Gisdon, F. J.; Ullmann, G. M. Computational Biochemistry—Enzyme Mechanisms Explored. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*; Adv Protein Chem Struct Biol, 2017; Vol. 109, pp 77–112. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2017.04.004>.
- (90) Parr, R. G.; Szentpály, L. V.; Liu, S. Electrophilicity Index. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (9), 1922–1924. <https://doi.org/10.1021/JA983494X>.
- (91) Morell, C.; Grand, A.; Toro-Labbé, A. New Dual Descriptor for Chemical Reactivity. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109* (1), 205–212. <https://doi.org/10.1021/jp046577a>.
- (92) Thanikaivelan, P.; Padmanabhan, J.; Subramanian, V.; Ramasami, T. Chemical Reactivity and Selectivity Using Fukui Functions: Basis Set and Population Scheme Dependence in the Framework of B3LYP Theory. *Theor. Chem. Acc.* **2002**, *107* (6), 326–335. <https://doi.org/10.1007/S00214-002-0352-Z/METRICS>.
- (93) Roy, R. K.; Krishnamurti, S.; Geerlings, P.; Pal, S. Local Softness and Hardness Based Reactivity Descriptors for Predicting Intra- and Intermolecular Reactivity Sequences: Carbonyl Compounds. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102* (21), 3746–3755. <https://doi.org/10.1021/jp973450v>.
- (94) Parr, R. G.; Pearson, R. G. Absolute Hardness: Companion Parameter to Absolute Electronegativity. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *105* (26), 7512–7516. <https://doi.org/10.1021/ja00364a005>.
- (95) Berta, D.; Buigues, P. J.; Badaoui, M.; Rosta, E. Cations in Motion: QM/MM Studies of the Dynamic and Electrostatic Roles of H⁺ and Mg²⁺ Ions in Enzyme Reactions. *Current Opinion in Structural Biology*. Elsevier Current Trends April 1, 2020, pp 198–206. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.01.002>.
- (96) The Nobel Foundation. *The Nobel Prize in Chemistry 2024*. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2024/summary/> (accessed 2026-04-30).
- (97) Dennington, R.; Keith, T.; Millam, J. GaussView, Version 5. *Semichem Inc. , Shawnee Mission, KS*. 2009.
- (98) H. B. Schlegel, G. E. S. M. J. F. G. W. T.; V. Barone, B. M. M. A. R. J. R. C. G. S.; X. Li, H. P. H. G. A. P. H. N. M. C.; J. L. Sonnenberg, M. H. A. F. I. J. B. G. Z.; M.

Ishida, T. N. M. E. K. T. R. F. J. H.; J. A. Montgomery, J. Y. H. O. K. H. N. T. V.; J. J. Heyd, E. B. J. E. P. F. O. M. B.; R. Kobayashi, J. N. K. N. K. V. N. S. T. K.; S. S. Iyengar, J. T. K. R. A. R. J. C. B.; J. E. Knox, J. B. C. M. C. N. R. J. M. M. M. K.; R. Gomperts, R. E. S. V. B. C. A. J. J.; C. Pomelli, J. W. O. O. Y. A. J. A. R. C.; V. G. Zakrzewski, G. A. V. R. L. M. K. M.; S. Dapprich, A. D. D. P. S. J. J. D.; J. V. Ortiz, J. C. O. F. J. B. F.; and D. J., G. I. F. Gaussian 09. Gaussian Inc.: Wallingford, CT 2010.

- (99) Yang, Y.; Weaver, M. N.; Merz, K. M. Assessment of the “6-31+G** + LANL2DZ” Mixed Basis Set Coupled with Density Functional Theory Methods and the Effective Core Potential: Prediction of Heats of Formation and Ionization Potentials for First-Row-Transition-Metal Complexes. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113* (36), 9843–9851. <https://doi.org/10.1021/jp807643p>.
- (100) Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. Quantum Mechanical Continuum Solvation Models. *Chemical Reviews*. American Chemical Society 2005, pp 2999–3093. <https://doi.org/10.1021/cr9904009>.
- (101) Scalmani, G.; Frisch, M. J. Continuous Surface Charge Polarizable Continuum Models of Solvation. I. General Formalism. *J. Chem. Phys.* **2010**, *132* (11). <https://doi.org/10.1063/1.3359469>.
- (102) Mudryk, K.; Lee, C.; Tomaník, L.; Malerz, S.; Trinter, F.; Hergenhausen, U.; Neumark, D. M.; Slavíček, P.; Bradforth, S.; Winter, B. How Does Mg²⁺(Aq) Interact with ATP(Aq)? Biomolecular Structure through the Lens of Liquid-Jet Photoemission Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2024**, *146* (23), 16062–16075. <https://doi.org/10.1021/jacs.4c03174>.
- (103) Summerton, J. C.; Evanseck, J. D.; Chapman, M. S. Hyperconjugation-Mediated Effects in Phosphoanhydride. *J. Phys. Chem. A* **2012**, *116* (41), 10209–10217. <https://doi.org/10.1021/JP306607K>.
- (104) Tulub, A. A. Molecular Dynamics DFT:B3LYP Study of Guanosinetriphosphate Conversion into Guanosinemonophosphate upon Mg²⁺ Chelation of α and β Phosphate Oxygens of the Triphosphate Tail. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8* (18), 2187–2192. <https://doi.org/10.1039/B517072A>.
- (105) Arabi, A. A.; Matta, C. F. Where Is Electronic Energy Stored in Adenosine Triphosphate? *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113* (14), 3360–3368. <https://doi.org/10.1021/JP811085C>.
- (106) Geerlings, P.; De Proft, F.; Langenaeker, W. Conceptual Density Functional Theory. *Chem. Rev.* **2003**, *103* (5), 1793–1873. <https://doi.org/10.1021/CR990029P>.
- (107) Hirshfeld, F. L. Bonded-Atom Fragments for Describing Molecular Charge Densities. *Theor. Chim. Acta* **1977**, *44* (2), 129–138. <https://doi.org/10.1007/BF00549096>.
- (108) Ritchie, J. P.; Bachrach, S. M. Some Methods and Applications of Electron Density Distribution Analysis. *J. Comput. Chem.* **1987**, *8* (4), 499–509. <https://doi.org/10.1002/jcc.540080430>.

- (109) Madeira, F.; Madhusoodanan, N.; Lee, J.; Eusebi, A.; Niewielska, A.; Tivey, A. R. N.; Lopez, R.; Butcher, S. The EMBL-EBI Job Dispatcher Sequence Analysis Tools Framework in 2024. *Nucleic Acids Res.* **2024**, *52* (W1), W521–W525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae241>.
- (110) Edgar, R. C. MUSCLE: Multiple Sequence Alignment with High Accuracy and High Throughput. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32* (5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>.
- (111) Clamp, M.; Cuff, J.; Searle, S. M.; Barton, G. J. The Jalview Java Alignment Editor. *Bioinformatics* **2004**, *20* (3), 426–427. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg430>.
- (112) Waterhouse, A. M.; Procter, J. B.; Martin, D. M. A.; Clamp, M.; Barton, G. J. Jalview Version 2—a Multiple Sequence Alignment Editor and Analysis Workbench. *Bioinformatics* **2009**, *25* (9), 1189–1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>.
- (113) Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19* (14), 1639–1662. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19981115\)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B).
- (114) Morris, G. M.; Ruth, H.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30* (16), 2785. <https://doi.org/10.1002/JCC.21256>.
- (115) Huey, R.; Morris, G. M.; Olson, A. J.; Goodsell, D. S. A Semiempirical Free Energy Force Field with Charge-Based Desolvation. *J. Comput. Chem.* **2007**, *28* (6), 1145–1152. <https://doi.org/10.1002/JCC.20634>.
- (116) BIOVIA, Dassault Systèmes. Discovery Studio, Modeling Environment, V25.1.0.24284. Dassault Systèmes: San Diego 2025.
- (117) Lu, C.-H.; Chen, C.-C.; Yu, C.-S.; Liu, Y.-Y.; Liu, J.-J.; Wei, S.-T.; Lin, Y.-F. MIB2: Metal Ion-Binding Site Prediction and Modeling Server. *Bioinformatics* **2022**, *38* (18), 4428–4429. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac534>.
- (118) Lu, C. H.; Lin, Y. F.; Lin, J. J.; Yu, C. S. Prediction of Metal Ion-Binding Sites in Proteins Using the Fragment Transformation Method. *PLoS One* **2012**, *7* (6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0039252>.
- (119) Lu, C.; Lin, Y.; Chen, Y.; Yu, C.; Chang, S.; Hwang, J. The Fragment Transformation Method to Detect the Protein Structural Motifs. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2006**, *63* (3), 636–643. <https://doi.org/10.1002/prot.20904>.
- (120) Lee, J.; Cheng, X.; Swails, J. M.; Yeom, M. S.; Eastman, P. K.; Lemkul, J. A.; Wei, S.; Buckner, J.; Jeong, J. C.; Qi, Y.; Jo, S.; Pande, V. S.; Case, D. A.; Brooks, C. L.; MacKerell, A. D.; Klauda, J. B.; Im, W. CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the

CHARMM36 Additive Force Field. *J. Chem. Theory Comput.* **2016**, *12* (1), 405–413. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00935>.

- (121) Brooks, B. R.; Brooks, C. L.; Mackerell, A. D.; Nilsson, L.; Petrella, R. J.; Roux, B.; Won, Y.; Archontis, G.; Bartels, C.; Boresch, S.; Caflisch, A.; Caves, L.; Cui, Q.; Dinner, A. R.; Feig, M.; Fischer, S.; Gao, J.; Hodoscek, M.; Im, W.; Kuczera, K.; Lazaridis, T.; Ma, J.; Ovchinnikov, V.; Paci, E.; Pastor, R. W.; Post, C. B.; Pu, J. Z.; Schaefer, M.; Tidor, B.; Venable, R. M.; Woodcock, H. L.; Wu, X.; Yang, W.; York, D. M.; Karplus, M. CHARMM: The Biomolecular Simulation Program. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30* (10), 1545–1614. <https://doi.org/10.1002/jcc.21287>.
- (122) Jo, S.; Kim, T.; Iyer, V. G.; Im, W. CHARMM-GUI: A Web-based Graphical User Interface for CHARMM. *J. Comput. Chem.* **2008**, *29* (11), 1859–1865. <https://doi.org/10.1002/jcc.20945>.
- (123) Abraham, M. J.; Murtola, T.; Schulz, R.; Páll, S.; Smith, J. C.; Hess, B.; Lindahl, E. Gromacs: High Performance Molecular Simulations through Multi-Level Parallelism from Laptops to Supercomputers. *SoftwareX* **2015**, *1–2*, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>.
- (124) Van Der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; Groenhof, G.; Mark, A. E.; Berendsen, H. J. C. GROMACS: Fast, Flexible, and Free. *Journal of Computational Chemistry*. J Comput Chem December 2005, pp 1701–1718. <https://doi.org/10.1002/jcc.20291>.
- (125) Lee, J.; Hitzenberger, M.; Rieger, M.; Kern, N. R.; Zacharias, M.; Im, W. CHARMM-GUI Supports the Amber Force Fields. *J. Chem. Phys.* **2020**, *153* (3). <https://doi.org/10.1063/5.0012280>.
- (126) Jo, S.; Cheng, X.; Islam, S. M.; Huang, L.; Rui, H.; Zhu, A.; Lee, H. S.; Qi, Y.; Han, W.; Vanommeslaeghe, K.; MacKerell, A. D.; Roux, B.; Im, W. CHARMM-GUI PDB Manipulator for Advanced Modeling and Simulations of Proteins Containing Nonstandard Residues. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*; Academic Press, 2014; Vol. 96, pp 235–265. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2014.06.002>.
- (127) Park, S.-J.; Kern, N.; Brown, T.; Lee, J.; Im, W. CHARMM-GUI PDB Manipulator: Various PDB Structural Modifications for Biomolecular Modeling and Simulation. *J. Mol. Biol.* **2023**, *435* (14), 167995. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2023.167995>.
- (128) Kong, L.; Park, S.-J.; Im, W. CHARMM-GUI PDB Reader and Manipulator: Covalent Ligand Modeling and Simulation. *J. Mol. Biol.* **2024**, *436* (17), 168554. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2024.168554>.
- (129) Jo, S.; Song, K. C.; Desaire, H.; MacKerell, A. D.; Im, W. Glycan Reader: Automated Sugar Identification and Simulation Preparation for Carbohydrates and Glycoproteins. *J. Comput. Chem.* **2011**, *32* (14), 3135–3141. <https://doi.org/10.1002/jcc.21886>.
- (130) Park, S. J.; Lee, J.; Patel, D. S.; Ma, H.; Lee, H. S.; Jo, S.; Im, W. Glycan Reader Is Improved to Recognize Most Sugar Types and Chemical Modifications in the Protein Data Bank. *Bioinformatics* **2017**, *33* (19), 3051–3057. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx358>.

- (131) Park, S. J.; Lee, J.; Qi, Y.; Kern, N. R.; Lee, H. S.; Jo, S.; Joung, I.; Joo, K.; Lee, J.; Im, W. CHARMM-GUI Glycan Modeler for Modeling and Simulation of Carbohydrates and Glycoconjugates. *Glycobiology* **2019**, *29* (4), 320–331. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwz003>.
- (132) Tian, C.; Kasavajhala, K.; Belfon, K. A. A.; Raguette, L.; Huang, H.; Migués, A. N.; Bickel, J.; Wang, Y.; Pincay, J.; Wu, Q.; Simmerling, C. Ff19SB: Amino-Acid-Specific Protein Backbone Parameters Trained against Quantum Mechanics Energy Surfaces in Solution. *J. Chem. Theory Comput.* **2020**, *16* (1), 528–552. <https://doi.org/10.1021/ACS.JCTC.9B00591>.
- (133) Lee, J.; Cheng, X.; Swails, J. M.; Yeom, M. S.; Eastman, P. K.; Lemkul, J. A.; Wei, S.; Buckner, J.; Jeong, J. C.; Qi, Y.; Jo, S.; Pande, V. S.; Case, D. A.; Brooks, C. L.; MacKerell, A. D.; Klauda, J. B.; Im, W. CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *12* (1), 405–413. <https://doi.org/10.1021/ACS.JCTC.5B00935>.
- (134) Huang, J.; Mackerell, A. D. CHARMM36 All-Atom Additive Protein Force Field: Validation Based on Comparison to NMR Data. *J. Comput. Chem.* **2013**, *34* (25), 2135–2145. <https://doi.org/10.1002/JCC.23354>.
- (135) Pavelites, J. J.; Gao, J.; Bash, P. A.; Mackerell, A. D. A Molecular Mechanics Force Field for NAD⁺ NADH, and the Pyrophosphate Groups of Nucleotides. *J. Comput. Chem.* **1997**, *18* (2), 221–239. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19970130\)18:2<221::AID-JCC7>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19970130)18:2<221::AID-JCC7>3.0.CO;2-X).
- (136) de Visser, S. P.; Wong, H. P. H.; Zhang, Y.; Yadav, R.; Sastri, C. V. Tutorial Review on the Set-Up and Running of Quantum Mechanical Cluster Models for Enzymatic Reaction Mechanisms. *Chem. – A Eur. J.* **2024**, *30* (60), e202402468. <https://doi.org/10.1002/CHEM.202402468>.
- (137) Tribolet, R.; Sigel, H. Influence of the Protonation Degree on the Self-association Properties of Adenosine 5'-triphosphate (ATP). *Eur. J. Biochem.* **1988**, *170* (3), 617–626. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb13742.x>.
- (138) Patel, A.; Malinowska, L.; Saha, S.; Wang, J.; Alberti, S.; Krishnan, Y.; Hyman, A. A. Biochemistry: ATP as a Biological Hydrotrope. *Science (80-.)*. **2017**, *356* (6339), 753–756. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6846>.
- (139) Hautke, A.; Ebbinghaus, S. The Emerging Role of ATP as a Cosolute for Biomolecular Processes. *Biological Chemistry*. Biol Chem September 1, 2023, pp 897–908. <https://doi.org/10.1515/hsz-2023-0202>.
- (140) Sridharan, S.; Kurzawa, N.; Werner, T.; Günthner, I.; Helm, D.; Huber, W.; Bantscheff, M.; Savitski, M. M. Proteome-Wide Solubility and Thermal Stability Profiling Reveals Distinct Regulatory Roles for ATP. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1), 1155. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09107-y>.
- (141) Wang, X.; Kirberger, M.; Qiu, F.; Chen, G.; Yang, J. J. Towards Predicting Ca²⁺ – Binding Sites with Different Coordination Numbers in Proteins with Atomic

- Resolution. *Proteins* **2009**, 75 (4), 787. <https://doi.org/10.1002/PROT.22285>.
- (142) Persson, I. Structure and Size of Complete Hydration Shells of Metal Ions and Inorganic Anions in Aqueous Solution. *Dalt. Trans.* **2024**, 53 (37), 15517–15538. <https://doi.org/10.1039/D4DT01449A>.
- (143) Persson, I.; Lyczko, K.; Lundberg, D.; Eriksson, L.; Pjaczek, A. Coordination Chemistry Study of Hydrated and Solvated Lead(II) Ions in Solution and Solid State. *Inorg. Chem.* **2011**, 50 (3), 1058–1072. <https://doi.org/10.1021/IC1017714>.
- (144) Noat, G.; Ricard, J.; Borel, M.; Got, C. Kinetic Study of Yeast Hexokinase. *Eur. J. Biochem.* **1970**, 13 (2), 347–363. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1970.tb00937.x>.
- (145) Nam, K.; Thodika, A. R. A.; Tischlik, S.; Phoeurk, C.; Nagy, T. M.; Schierholz, L.; Ådén, J.; Rogne, P.; Drescher, M.; Sauer-Eriksson, A. E.; Wolf-Watz, M. Magnesium Induced Structural Reorganization in the Active Site of Adenylate Kinase. *Sci. Adv.* **2024**, 10 (32). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.ADO5504>.
- (146) Pilotelle-Bunner, A.; Cornelius, F.; Sebban, P.; Kuchel, P. W.; Clarke, R. J. Mechanism of Mg²⁺ Binding in the Na⁺,K⁺-ATPase. *Biophys. J.* **2009**, 96 (9), 3753. <https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2009.01.042>.
- (147) Cliff, M. J.; Bowler, M. W.; Varga, A.; Marston, J. P.; Szabó, J.; Hounslow, A. M.; Baxter, N. J.; Blackburn, G. M.; Vas, M.; Waltho, J. P. Transition State Analogue Structures of Human Phosphoglycerate Kinase Establish the Importance of Charge Balance in Catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132 (18), 6507–6516. <https://doi.org/10.1021/JA100974T>.
- (148) Carey, F. A. *Química Orgánica*, Sixth.; McGraw-Hill Interamericana, 2006.
- (149) Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*, Sixth.; W. H. Freeman, 2012.
- (150) Nestl, B. M.; Hauer, B. Engineering of Flexible Loops in Enzymes. *ACS Catal.* **2014**, 4 (9), 3201–3211. <https://doi.org/10.1021/CS500325P>.
- (151) Francioso, A.; Baseggio Conrado, A.; Mosca, L.; Fontana, M. Chemistry and Biochemistry of Sulfur Natural Compounds: Key Intermediates of Metabolism and Redox Biology. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2020**, 2020, 8294158. <https://doi.org/10.1155/2020/8294158>.
- (152) Chatterjee, S.; Hausinger, R. P. Sulfur Incorporation into Biomolecules: Recent Advances. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2022**, 57 (5–6), 461. <https://doi.org/10.1080/10409238.2022.2141678>.
- (153) Boyd, R. J. A Quantum Mechanical Explanation for Hund's Multiplicity Rule. *Nature* **1984**, 310 (5977), 480–481. <https://doi.org/10.1038/310480a0>.
- (154) Katriel, J.; Pauncz, R. Theoretical Interpretation of Hund's Rule. In *Advances in Quantum Chemistry*; Academic Press, 1977; Vol. 10, pp 143–185. [https://doi.org/10.1016/S0065-3276\(08\)60580-8](https://doi.org/10.1016/S0065-3276(08)60580-8).

- (155) Yoshida, D.; Raebiger, H. Term Rules for Simple Metal Clusters. *Sci. Rep.* **2015**, *5* (1), 15760. <https://doi.org/10.1038/srep15760>.
- (156) Friedmann, H. C. From Butyribacterium to E. Coli: An Essay on Unity in Biochemistry. *Perspect. Biol. Med.* **2004**, *47* (1), 47–66. <https://doi.org/10.1353/pbm.2004.0007>.
- (157) Accelrys Software Inc. Accelrys Draw. Accelrys Software Inc.: San Diego 2013.
- (158) Krieger, E.; Vriend, G. YASARA View—Molecular Graphics for All Devices—from Smartphones to Workstations. *Bioinformatics* **2014**, *30* (20), 2981–2982. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu426>.
- (159) Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Meng, E. C.; Couch, G. S.; Croll, T. I.; Morris, J. H.; Ferrin, T. E. UCSF ChimeraX: Structure Visualization for Researchers, Educators, and Developers. *Protein Sci.* **2021**, *30* (1), 70–82. <https://doi.org/10.1002/pro.3943>.
- (160) Schrödinger LLC. The PyMOL Molecular Graphics System. 2024. <https://pymol.org/>.
- (161) CambridgeSoft Corporation. ChemDraw Ultra. 2010. <https://revvitysignals.com/products/research/chemdraw>.
- (162) Rappé, A. K.; Casewit, C. J.; Colwell, K. S.; Goddard, W. A.; Skiff, W. M. UFF, a Full Periodic Table Force Field for Molecular Mechanics and Molecular Dynamics Simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *114* (25), 10024–10035. <https://doi.org/10.1021/JA00051A040>.