



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA



Modelamiento computacional de la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS) de
Mycobacterium tuberculosis

Trabajo de Titulación, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autora: Evelyn Katherine Jurado Barona

Tutor: PhD. Mario Daniel García Solís

Ambato – Ecuador

Septiembre 2021

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Mario Daniel García Solís

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Título y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 22 de julio de 2021

PhD. Mario Daniel García Solís

C.I. 1103605471

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Jurado Barona Evelyn Katherine, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica, son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las citas bibliográficas.



Evelyn Katherine Jurado Barona

C.I. 1803834843

AUTORA

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, de la Universidad Técnica de Ambato.

Por constancia firman:

Presidente del tribunal

Dr. William Ricardo Calero Cáceres
C.I. 1714348859

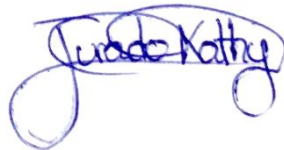
Mg. Cristian Fernando Galarza Galarza
C.I. 1803160272

Ambato, 30 de agosto de 2021

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Con los derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Evelyn Katherine Jurado Barona

CC: 1803834843

AUTORA

DEDICATORIA

A Dios, porque con su amor incondicional y misericordia me permitió cumplir uno de mis anhelos más grandes.

A mis padres, Flavio e Hipatia, quienes con sus oraciones, enseñanzas, paciencia y sobretodo amor guiaron cada uno de mis pasos, e inculcaron en mi la constancia y determinación que hicieron todo esto posible.

AGRADECIMIENTOS

“Cuando cruces las aguas, yo estaré contigo; cuando cruces los ríos, no te cubrirán sus aguas; cuando camines por el fuego, no te quemarás ni te abrasarán las llamas.”

Isaías 43:2

Gracias a Dios por ser mi guía y refugio, por habitar en mi corazón, por consolarme y mostrarme que siempre hay un arcoíris tras la tormenta.

Mi gratitud infinita hacia mis padres, por acompañarme en esta etapa y animarme a continuar, por ser ejemplo de unidad y superación. Gracias por creer en mí y no dejarme sola en ningún momento.

A mis ángeles de la guarda, mis abuelitos, por su amor, cariño y consejos que me ayudaron a forjar mi carácter y ser mejor persona, gracias por cuidarme y seguir velando por mi bienestar y felicidad.

A mis hermanas, María Fernanda, Jessica y María José, por ser mi compañía y equilibrio, por su comprensión y sobre todo por sus enseñanzas que siguen marcando mi vida.

A mis sobrinos, por sus ocurrencias que iluminan mi vida.

A mi novio Leo, porque su presencia en mi vida ha sido realmente una bendición, gracias por ser mi apoyo, por motivarme y por no soltar mi mano en ningún momento.

Y finalmente, gracias infinitas a mi tutor, PhD. Mario García, por sus valiosas lecciones y auténtico interés al guiarme en el desarrollo de esta tesis, gracias por su paciencia y en especial el tiempo que dedicó a solventar todas mis dudas.

Con mucho cariño y gratitud,

Kathy

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO	1
1.1 Antecedentes investigativos.....	1
1.1.1 Tuberculosis.....	1
1.1.2 Patogénesis y ciclo de infección por <i>M. tuberculosis</i>	2
1.1.3 Índices de contagios y morbilidad	3
1.1.4 Tratamiento tradicional.....	5
1.1.5 Resistencia y multirresistencia a fármacos	6
1.1.6 Tratamiento de cepas resistentes y multirresistentes	6
1.1.7 Alternativas para la terapia del bacilo tuberculoso.....	7
1.1.8 Ruta biosintética de aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs).....	8
1.1.9 Enzima acetohidroxiácido sintasa	10
1.1.10 Capacidad inhibitoria de AHAS con el empleo de compuestos herbicidas 11	
1.1.11 Inhibición de <i>M. tuberculosis</i> por herbicidas comerciales	15
1.1.12 Estructura de los complejos de <i>ScAHAS</i> y <i>AtAHAS</i>	16
1.1.13 Estructura de <i>MtAHAS</i>	17
1.2 Objetivos	18
1.2.1 Objetivo general	18

1.2.2	Objetivos específicos	18
1.3	Hipótesis	19
1.3.1	Hipótesis nula	19
1.3.2	Hipótesis alternativa	19
1.4	Señalamiento de las variables de la hipótesis	19
1.4.1	Variables dependientes	19
1.4.2	Variables independientes	19
CAPÍTULO II.....		20
METODOLOGÍA.....		20
2.1	Materiales.....	20
2.1.1	Páginas web	20
2.1.2	Servidor web bioinformático	20
2.1.3	Programas	20
2.1.4	Equipos	20
2.1.5	Códigos empleados para la obtención de secuencias FASTA.....	20
2.1.6	Códigos de las estructuras en PDB	20
2.2	Métodos.....	21
2.2.1	Identificación de las secuencias de AHAS de <i>M. tuberculosis</i> , <i>S. cerevisiae</i> y <i>A. thaliana</i>	21
2.2.2	Alineamiento de CSU y RSU de <i>Mt</i> AHAS, <i>Sc</i> AHAS y <i>At</i> AHAS	21
2.2.3	Selección del modelo tridimensional base para el modelamiento de <i>Mt</i> AHAS.....	21
2.2.4	Obtención del modelo tridimensional de <i>Mt</i> AHAS	22
2.2.5	Análisis del modelo de <i>Mt</i> AHAS	22
CAPÍTULO III		23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		23
3.1	Interpretación de resultados y discusión	23

3.1.1	Identificación de las secuencias de AHAS de <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	23
3.1.2	Alineamiento múltiple de secuencias de la subunidad catalítica y subunidad reguladora de <i>MtAHAS</i> , <i>ScAHAS</i> y <i>AtAHAS</i>	25
3.1.3	Construcción del modelo tridimensional <i>MtAHAS</i>	33
3.1.4	Complejo de <i>MtAHAS</i>	48
3.1.5	Cofactores de la enzima AHAS de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	52
3.1.6	Inhibición de <i>MtAHAS</i> con metsulfurón metil	57
3.1.7	Verificación de hipótesis	60
CAPÍTULO IV		61
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		61
4.1	Conclusiones	61
4.2	Recomendaciones	62
BIBLIOGRAFÍA		64
ANEXOS		71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo de infección por <i>M. tuberculosis</i>	3
Figura 2.	Incidencia de la tuberculosis a nivel mundial.	4
Figura 3.	Ruta biosintética de aminoácidos de cadena ramificada.....	10
Figura 4.	Reacción catalizada por AHAS.....	11
Figura 5.	Estructuras de ThDP, ThAThDP y ThThDP.	12
Figura 6.	Familias de herbicidas que inhiben AHAS.	12
Figura 7.	Moléculas de H ₂ O estabilizan al cofactor ThDP (modificado), en el complejo herbicida- <i>AtAHAS</i>	13
Figura 8.	Estructura de varios compuestos inhibidores de AHAS.	16
Figura 9.	Estructura de los complejos de <i>ScAHAS</i> y <i>AtAHAS</i>	17

Figura 10. Micrografías electrónicas de tinción negativa de <i>AtAHAS</i> y <i>MtAHAS</i>	18
Figura 11. Alineamiento múltiple de secuencias de <i>ScRSU</i> , <i>AtRSU_R1</i> , <i>AtRSU_R2</i> y <i>MtRSU</i>	26
Figura 12. Alineamiento múltiple de secuencias de <i>ScCSU</i> , <i>AtCSU</i> y <i>MtCSU</i>	32
Figura 13. Reporte de las plantillas.	35
Figura 14. Alineamiento entre el modelo y 6u9d.1.	37
Figura 15. Alineamiento entre el modelo y 6u9d.1.	40
Figura 16. Estequiometría de las plantillas analizadas para la construcción del modelo.	43
Figura 17. Huella dactilar de PPI.	44
Figura 18. Resultado del modelo obtenido en Swiss-Model.....	46
Figura 19. Estimación de calidad local.....	47
Figura 20. Comparación con un conjunto de estructuras de PDB no redundantes.	47
Figura 21. Estructura cuaternaria generada en Swiss-Model de <i>MtAHAS</i>	48
Figura 22. Modelo acetohidroxiácido sintasa de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	50
Figura 23. Dímero A-B del complejo <i>MtAHAS</i>	51
Figura 24. Dímero K-L.....	52
Figura 25. Interacciones de ATP en RSUs.....	53
Figura 26. Interacciones de ThDP y FAD en CSU.	55
Figura 27. Anillo de isoaloxacina de FAD.....	56
Figura 28. Sitio de unión del herbicida MM.	58
Figura 29. Residuos de <i>MtAHAS</i> y <i>ScAHAS</i> próximos al sitio de unión de MM.....	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Inhibición en <i>AtAHAS</i> mutante.....	15
Tabla 2. Inhibición en <i>MtAHAS</i>	16
Tabla 3. Códigos de las secuencias de las subunidades catalítica y regulatoria de AHAS empleadas	20

Tabla 4. Código de estructura.....	20
Tabla 5. Residuos del sitio de unión de herbicidas en diferentes AHAS que forman interacciones con PS.....	32
Tabla 6. Matriz de identidad en RSU	33
Tabla 7. Matriz de identidad en CSU	33
Tabla 8. Reporte de la plantilla (6u9d.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> acetohidroxiácido sintasa) empleada para la construcción del modelo.....	41
Tabla 9. Aminoácidos del sitio de unión al herbicida metsulfurón metil.....	60

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Reporte de las plantillas.....	76
Anexo 2. Estimación de calidad local cadena A.	77
Anexo 3. Estimación de calidad local cadena B.	77
Anexo 4. Estimación de calidad local cadena C.	78
Anexo 5. Estimación de calidad local cadena D.	78
Anexo 6. Estimación de calidad local cadena E.....	79
Anexo 7. Estimación de calidad local cadena F.....	79
Anexo 8. Estimación de calidad local cadena G.	80
Anexo 9. Estimación de calidad local cadena H.	80
Anexo 10. Estimación de calidad local cadena I.....	81
Anexo 11. Estimación de calidad local cadena J.....	81
Anexo 12. Estimación de calidad local cadena K.	82
Anexo 13. Estimación de calidad local cadena L.....	82
Anexo 14. Estimación de calidad local cadena M.....	83
Anexo 15. Estimación de calidad local cadena N.	83
Anexo 16. Estimación de calidad local cadena O.	84
Anexo 17. Estimación de calidad local cadena P.	84

RESUMEN

La epidemiología de tuberculosis causada por el patógeno *Mycobacterium tuberculosis* anualmente provoca millones de muertes a nivel mundial, a pesar de que existen tratamientos efectivos en pacientes infectados con cepas susceptibles a medicamentos convencionales. La gravedad de esta afección es originada por la progresiva aparición de cepas con resistencia múltiple a fármacos (MDR-TB) y tuberculosis ampliamente resistente a fármacos (XDR-TB). Por tal motivo, es común el uso de tratamientos más prolongados y con efectos no deseados. Ante la carencia de fármacos efectivos, es preciso la investigación de nuevos targets que permitan ralentizar la propagación del bacilo tuberculoso. Entre los targets más prometedores se encuentra la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS). AHAS es la primera enzima de la ruta biosintética de aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs) y cuya inhibición ha demostrado ejercer un efecto biocida en modelos de *Arabidopsis thaliana*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, entre otros organismos. De manera que, el objetivo del presente proyecto es realizar el modelamiento de la enzima AHAS de *Mycobacterium tuberculosis* por medio de Swiss-Model empleando la estructura del complejo AHAS de *S. cerevisiae*. También, se ha establecido la similitud estructural de cruz maltesa con sus homólogos en *A. thaliana* y *S. cerevisiae*, mientras que las interacciones con cofactores y los motifs más importantes involucrados en la inhibición con metsulfurón metil se dilucidaron por medio de WinCoot y LigPlot. El complejo hexadecamérico de *Mt*AHAS generado provee una plataforma para el diseño racional de inhibidores de la enzima para el tratamiento efectivo de distintas cepas de *Mycobacterium tuberculosis*.

Palabras clave: Bioinformática, modelado computacional, genética molecular, AHAS, *Mycobacterium tuberculosis*, MDR, XDR.

ABSTRACT

Tuberculosis is a disease caused by the pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. It annually produces millions of deaths worldwide. The severity of this condition is caused by the progressive appearance of multidrug resistant strains (MDR-TB) and extensively drug resistant tuberculosis (XDR-TB). For this reason, it is common to use long treatments that produce unwanted effects in patients. Given the lack of effective and well tolerated drugs to treat tuberculosis, it is necessary to investigate new targets which will slow down the spread of the pathogen. The enzyme acetohydroxyacid synthase (AHAS) is amongst the most promising targets. AHAS is the first enzyme in the branched chain amino acid biosynthetic pathway (BCAAs). It has been already shown that AHAS is crucial for the survival of *Arabidopsis thaliana*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, and other organisms. Here, a model of *Mycobacterium tuberculosis* AHAS complex was obtained using the Swiss-Model. The model was derived from its closest structure, *S. cerevisiae* AHAS. The *Mt*AHAS complex exhibited the same structural features described previously for *At*AHAS and *Sc*AHAS, including its resemblance to the Maltese cross. The interactions with cofactors and the most important motifs involved in the inhibition with methyl metsulfuron were elucidated using the software WinCoot and LigPlot. The hexadecameric complex of *Mt*AHAS generated provides a platform for the rational design of enzyme inhibitors for the effective treatment of different strains of *Mycobacterium tuberculosis*.

Keywords: Bioinformatic, computational modeling, molecular genetics, AHAS, *Mycobacterium tuberculosis*, MDR, XDR.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos

1.1.1 Tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* y denominada así por los tuberculomas que se forman debido a las lesiones que este microorganismo provoca en el pulmón. Esta bacteria pertenece al género *Mycobacterium*, integrado por los complejos, tuberculosis (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* y *M. microti*), lepra (*M. leprae*) y otras micobacterias no tuberculosas (MOTT) (Bermejo, Clavera, Michel de la Rosa, & Marín, 2007). *M. tuberculosis* es un bacilo aerobio estricto, levemente curvo, descrito inicialmente por Robert Koch en 1882. A pesar de su dificultad de tinción, se lo considera un microorganismo Gram positivo, con un tamaño que varía entre 0.2-0.6 µm x 1-10 µm. Además, la estructura de su pared celular le otorga resistencia a ácido-alcohol, y es incapaz de formar esporas (Pérez, Tuñez, García, & Lado, 2002). Posee un crecimiento relativamente pausado (con condiciones óptimas de cultivo de pH 7 y 37 °C) explicando así su estado latente (patógeno inactivo o de replicación lenta) en individuos que no han presentado síntomas en algunos años (Hernández et al., 2005).

La tuberculosis posee sintomatología pulmonar muy similar a otras enfermedades respiratorias, por lo que la manifestación clínica en muchos casos empieza con fatiga, pérdida de apetito y fiebre. Estos indicios se ven complementados con tos, disnea, afección torácica y expectoración prolongada (tuberculosis limitada a los pulmones) (Caminero, 2016). Cuando existe tuberculosis extrapulmonar, los síntomas antes mencionados pueden verse acompañados por otras afecciones que involucran al sistema circulatorio, y sistema linfático. En el sistema nervioso central causa enfermedades menos frecuentes como la meningitis tuberculosa, aracnoiditis tuberculosa espinal y tuberculoma intracraneal (Fanlo & Tiberio, 2007) (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, 2012).

1.1.2 Patogénesis y ciclo de infección por *M. tuberculosis*

La naturaleza lipídica e insoluble de la gruesa pared celular de *M. tuberculosis* se divide en dos zonas conocidas como “alta” y “baja”. En el segmento superior se encuentran lípidos libres encargados de complementar las cadenas de ácidos grasos, proteínas y lipoglicanos, cuya función conjunta es actuar como moléculas de señalización de la enfermedad y que contribuyen a la respuesta inmune. En la zona “baja” se localiza el núcleo de la pared y está formada por peptidoglicano enlazado de manera covalente con galactofurano lineal, el cual se encuentra unido a varias hebras ramificadas de arabinofurano y reforzado por la presencia de ácidos micólicos. Esta zona de la pared celular, incrementa la patogénesis de *M. tuberculosis* al garantizar la viabilidad en las células, ya que los bacilos son envueltos por pequeños fragmentos de manosa que facilitan su fagocitosis (**Brennan, 2003**).

M. tuberculosis se transmite fácilmente en forma de pequeñas gotas de esputo al toser o estornudar, de una persona infectada hacia otra que inhala dichas gotículas. Entre los factores que influyen en el contagio se encuentran, la proximidad y tiempo del contacto, la carga bacilar y la velocidad de circulación del aire (**Gandhi et al., 2010**). Para que se produzca una infección de tuberculosis activa (TBA) es necesaria la exposición prolongada del paciente (6 horas/día) (**Ministerio de Salud Pública, 2018**). La infección inicia cuando el bacilo es fagocitado por un macrófago alveolar (MA). Aprovechándose de su ciclo de división (aproximadamente cada 24 horas), se logra una concentración de 384 bacilos por macrófago, antes de su necrosis en los 6 días posteriores. Una vez que el bacilo ingresa al alveolo, se da inicio a la excreción de la proteína ESAT-6 (objetivo antigénico secretor temprano), la cual impide la apoptosis y también facilita el ingreso del bacilo al citoplasma del MA. A partir del inicio de la inflamación causada por quimiocinas y citocinas segregadas por el MA, el alveolo afectado pasa por los capilares linfáticos hasta llegar a los linfonodos (Figura 1) (**Cardona, 2018**).

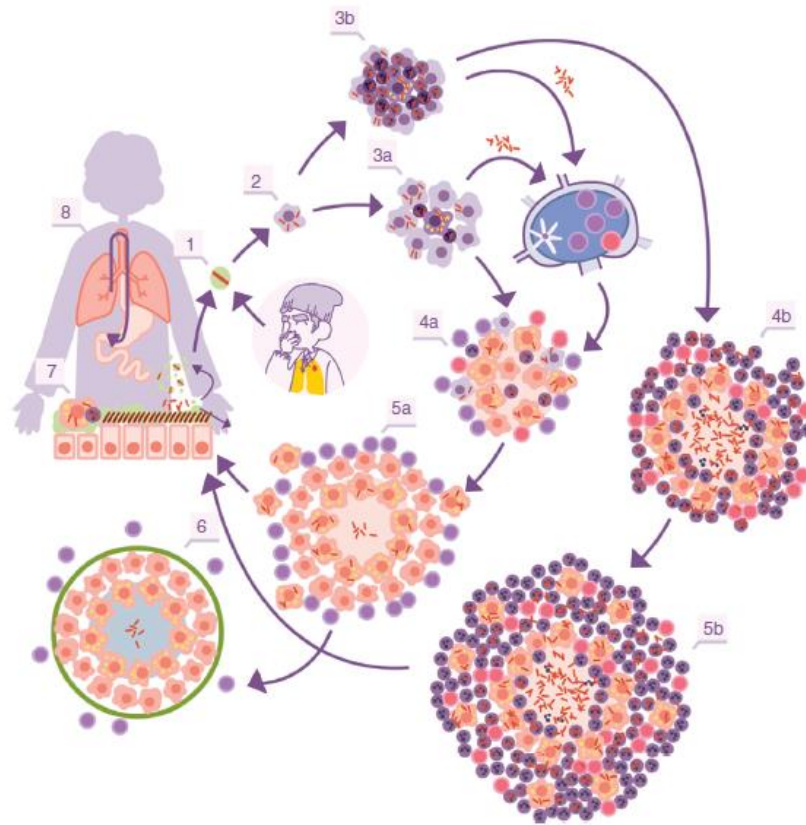


Figura 1. Ciclo de infección por *M. tuberculosis*. 1) Ingreso de bacilos hacia el alveolo pulmonar. 2) Fagocitosis de bacilo por un MA. 3a) Respuesta inflamatoria de PMN (células polimorfonucleares). 3b) Los bacilos llegan hasta el ganglio linfático regional, en donde incrementan la concentración de linfocitos Th1 o Th17. 4a) Se desencadena la respuesta tipo Th1. 4b) Respuesta inmune de Th17. 5a) Macrófagos espumosos actúan en el drenaje de bacilos (encapsulación). 5b) Drenaje de por medio del fluido alveolar o nivel sistémico (neo vascularización del granuloma). 6) Incremento de tamaño extracelular de los bacilos por NET (trampas extracelulares de neutrófilos) e ingreso de PMN. 7) Los bacilos que se encontraban en el fluido alveolar son drenados hacia el tracto digestivo. 8) Luego de la infección se puede repetir el ciclo, al expandirse en gotículas (**Cardona, 2018**).

1.1.3 Índices de contagios y morbilidad

La incidencia de personas contagiadas con tuberculosis es preocupante, ya que según el informe anual de la OMS del año 2019, una cuarta parte de la población global se encuentra infectada. El mayor porcentaje de portadores de *M. tuberculosis* se encuentra en Asia Sudoriental, con el 44% del número total de casos reportados en el año 2018 (**Organización Mundial de la Salud, 2019**). A nivel mundial, en el año 2020, se reportó que al menos 500000 personas eran

resistentes a la rifampicina, de los cuales el 3.3% correspondieron a casos nuevos de TB (RR-TB). En tanto que el 17.7% ya habían sido tratados por tuberculosis previamente, con la particularidad de que presentaban resistencia por lo menos a dos antituberculosos primarios, conocida como tuberculosis multirresistente (MDR-TB). De acuerdo a los datos reportados por la OMS en 2019, 30 países representaron mayor incidencia de TB, con el 87% de casos en el mundo. De este total, 8 países alcanzaron dos tercios de los casos reportados a nivel global (Figura 2) (World Health Organization, 2020).

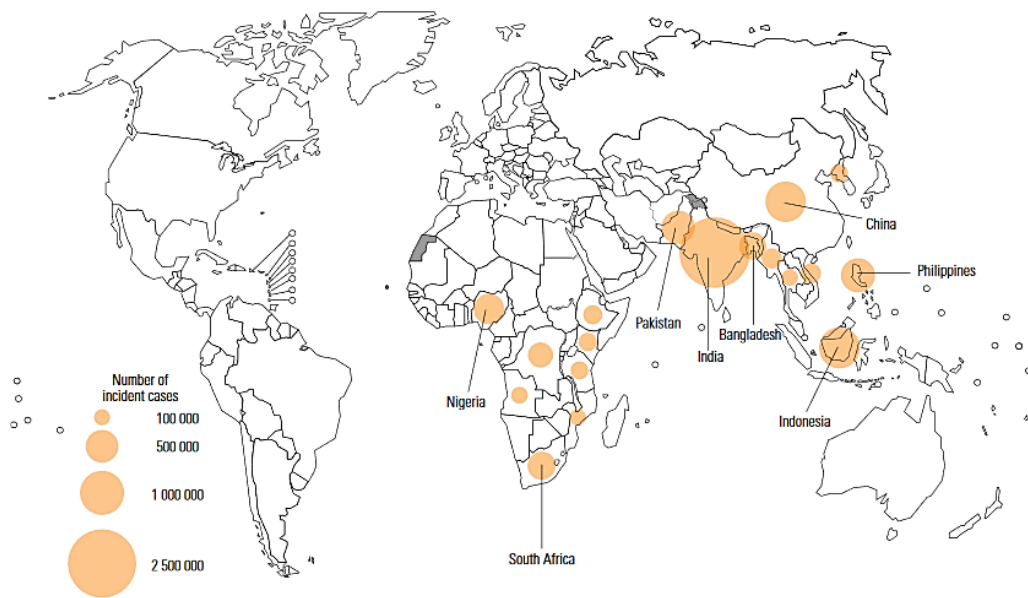


Figura 2. Incidencia de la tuberculosis a nivel mundial. Las burbujas naranjas indican el número de casos incidentes de los países con al menos 100000 personas contagiadas de tuberculosis en el 2019 (World Health Organization, 2020).

En Ecuador, en el año 2018 se reportaron 5960 personas con tuberculosis, entre casos nuevos y pacientes que ya habían tenido un tratamiento previo. La tasa de incidencia es de 34.53 por cada 100000 ecuatorianos. Del total, el 55.03% se registraron en la provincia de Guayas, mientras que en la provincia El Oro ocupa el segundo lugar con el 7.3%. A su vez, el rango de edad en el que se presenta con mayor frecuencia esta afección es de 25-34 años (25% del total reportado), seguido por pacientes en el rango de 15-24 años (20.54%). De estos, el género masculino se ve más afectado en razón 2.4 hombres por una mujer (Ministerio de Salud Pública, 2018). Con estos antecedentes, la tasa de letalidad en el país calculado por la OPS en el 2018 fue de

9.1%, mientras que se estimó 220 casos de TB con resistencia a la rifampicina o multirresistencia (**Organización Panamericana de la Salud, 2019**).

1.1.4 Tratamiento tradicional

La vacuna BCG (bacilo de Calmette-Guérin) se considera como la primera línea de defensa ante la tuberculosis, y se inocula en bebés y niños de países con un alto índice de casos de tuberculosis, con una eficacia del 0-80%. La garantía de que la vacuna impida el contagio con TB depende de la cepa, la exposición que haya tenido con MOTT en el pasado, edad, y también variables genéticas (respuesta inmune del individuo). Sin embargo, esta vacuna no impide el desarrollo de tuberculosis latente con el transcurso de los años. Ante esto, se ha planteado la necesidad de crear nuevas vacunas que reemplacen a la BCG. Las vacunas experimentales en desarrollo involucran el uso de vectores virales capaces de expresar antígenos de la micobacteria y vacunas de ADN que generan péptidos para presentados a células T o al complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (**Bocanegra-García et al., 2011**). La generación de dichas vacunas, además de considerar factores de seguridad al aplicarlas, también deben cumplir con la eficacia al usarlas en diferentes poblaciones, considerando su composición genética. Por otra parte, las vacunas deben tomar en cuenta la variabilidad del patógeno cuando se ha dado la distribución geográfica de individuos e involucrando especiación simpátrica (intercambio del flujo genético entre una población y otra), propiciando de esta forma que hospedadores alopátricos de tuberculosis causen que grupos de alto riesgo posean menor resistencia hacia *M. tuberculosis* (**Gagneux et al., 2006**).

En contraparte, en el caso de detección de tuberculosis en adultos el diagnóstico bacteriológico (baciloscopía o PCR) se da tras la identificación de síntomas característicos contemplados en el criterio clínico, como expectoración por más de 15 días, fiebre, astenia y dolor torácico (**Ministerio de Salud Pública, 2018**). En base al criterio de diagnóstico se procede con el tratamiento estándar de la tuberculosis, el cual comprende el empleo de 4 fármacos: 2 esenciales que actúan como bactericidas de poblaciones de bacilos con metabolización activa y metabolización intermitente (bactericidas y fármacos esterilizantes), y 2 fármacos acompañantes (**González-Martín et al., 2010**).

1.1.5 Resistencia y multirresistencia a fármacos

La creciente resistencia y multirresistencia a fármacos como la isoniacida y rifampicina ha incrementado considerablemente en países europeos y de Sudáfrica a pesar de los esfuerzos realizados por el Comité Luz Verde (GLC) que promueve programas de prevención y control de MDR-TB y que facilita el acceso a medicamentos aprobados por la OMS para tratar casos de resistencia (**World Health Organization, 2009**). Un factor importante a considerar en la resistencia a medicamentos antituberculosos es la coinfección de tuberculosis con VIH, ya que en pacientes inmunodeprimidos los fármacos presentan menor absorción, ocasionando la combinación de medicamentos de primera línea para evitar posibles efectos secundarios y que garanticen la recuperación total (**González-Martín et al., 2010**). En el caso de MDR-TB se considera la resistencia por lo menos a isoniacida o rifampicina, mientras que para XDR-TB se muestra resistencia a algún tipo de fluoroquinolonas, y a medicamentos de segunda línea, como capreomicina, amikacina o kanamicina (**González-Martín et al., 2010**). Tanto la tuberculosis resistente a múltiple fármacos como la tuberculosis ampliamente resistente a fármacos (XDR-TB), han ocasionado mayores índices de morbilidad y tratamientos ineficaces. En consecuencia, ha incrementado el número de cepas resistentes a varios fármacos, corroborando esto en el transcurso del 2018 al 2019 los pacientes reportados con resistencia a rifampicina (RR) combinada con MDR-TB fueron 206030 y para XDR-TB existieron 12350 casos a nivel mundial (**World Health Organization, 2020**).

1.1.6 Tratamiento de cepas resistentes y multirresistentes

Entre los medicamentos empleados para el tratamiento de la tuberculosis, se encuentran los denominados fármacos orales de primera línea (grupo 1), en segundo lugar se tiene a las fluoroquinolonas (grupo 2), y como tratamiento en tercer lugar se encuentran los fármacos inyectables de segunda línea (grupo 3). En casos más severos si es propicio, se administra un grupo mixto de fármacos esenciales con escasa evidencia y fármacos adicionales con menor eficacia (grupo 4). Finalmente, para casos críticos se usa fármacos con mínima eficacia y toxicidad elevada (grupo 5) (**Singh, Chandra, Srivastava, & Srivastava, 2011**).

En los casos de resistencia se procede a intercalar fármacos de los grupos citados anteriormente, por lo que se escoge entre pirazinamida, rifampicina, isoniazida (grupo 1), moxifloxacino o levofloxacino (grupo 2), kanamicina, capreomicina, amikacina o estreptomicina (grupo 3), etionamida o cicloserina (grupo 4), linezolid, bedaquilina, delamanid (grupo 5). De los fármacos del grupo 5, existen varios que presentan perfiles de toxicidad y trastornos neurológicos o afecciones hematológicas, por lo que su empleo se ha visto contrariado (**Caminero, 2016**). En relación a lo anterior, en un estudio realizado en México se demostró el riesgo de usar kanamicina, amikacina y capreomicina (inyectables de segunda línea, ISL) al tratar casos de MDR-TB. Estos medicamentos han hecho evidente su alta toxicidad renal y otológica, en donde el síntoma secundario más común reportado es la pérdida de la agudeza auditiva (destrucción de células de la cóclea) en 8.4% de las personas a las que se les aplicó ISL, mientras que en otras este tratamiento se suspendió por disfunción renal (14.8%). Pero a pesar de esto, es común el empleo de los citados fármacos en varios lugares del mundo cuando el paciente muestra resistencia ante rifampicina, frente a la renuencia de varios gobiernos a adquirir otros fármacos recomendados por la OMS (como bedaquilina, delamanid, clofazimina o linezolid) que han sido comprobados para tratar cepas resistentes (**Jiménez-Gracia, Félix-Ponce, & Laniado-Laborín, 2019**).

La duración de la terapia con este tipo de medicación también presenta otro aspecto desfavorable, la cual puede variar entre 6 y 18 meses. En el transcurso del uso de estos medicamentos se monitorea continuamente al paciente por medio de antibiogramas, facilitando la variación de las dosis si existe sensibilidad según se trate de una cepa MDR-TB o XDR-TB (**Singh et al., 2011**). Ante estas desventajas, se están desarrollando nuevos medicamentos que reduzcan al mínimo los efectos indeseables y se ha planteado el uso de inmunoterapias complementarias que permitan combatir cepas tuberculosas XDR asegurando la recuperación total del paciente (**Gandhi et al., 2010**).

1.1.7 Alternativas para la terapia del bacilo tuberculoso

Actualmente para tratar la resistencia a fármacos, se están probando dos opciones: la primera, tratar la tuberculosis con otros medicamentos creados para combatir otras

afecciones y la segunda es el desarrollo de nuevos fármacos. Dentro de la segunda alternativa se encuentran los fármacos:

- Bedaquilina: se dirige hacia la ATP sintasa en donde detiene la translocación de protones por lo que la síntesis de ATP se ve reducida en sobremanera. Entre las ventajas que presenta se encuentra la buena tolerabilidad de la ATP sintasa mitocondrial humana (menos sensible que en las micobacterias), adicionalmente actúa favorablemente al tratar TB latente. Mientras que entre sus desventajas mostradas, se encuentra la acumulación del fármaco en los tejidos y arritmias entre los pacientes.
- Delamanid: detiene la síntesis de la pared celular al impedir la formación de ácido metoxi-micólico y ácido ceto-micólico, también por la generación de NO que impide la multiplicación de otras bacterias.
- PA-824: este nitroimidazol al igual que en el caso anterior impide la propagación de bacterias anaeróbicas al producir especies reactivas de nitrógeno. Para ser activado necesita de una nitroreductasa (Ddn), por lo que en cepas de tuberculosis mutantes resistentes no surgiría efecto al poseer Ddn inactiva.
- SQ109: su efecto es la debilitación de la pared celular al inhibir la síntesis del ácido micólico. En ensayos se ha probado su aplicación conjunta con bedaquilina, potenciando la acción bactericida, al permitir que la bedaquilina llegue con mayor facilidad hacia la ATP sintasa.
- Benzotiazinonas: el objetivo de este fármaco es la decaprenilfosforil- β -D-ribose 2'-epimerasa (DprE1), esta enzima está involucrada en la síntesis final del lipoarabinomanano y arabinogalactano (pared celular de TB).

Si bien estos fármacos actúan a diferente nivel celular, sus efectos secundarios se encuentran todavía en análisis, además de que la efectividad (a excepción del delamanid) es reducida en el control de la propagación de la tuberculosis. (**Guzmán, 2017**).

1.1.8 Ruta biosintética de aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs)

Con estos antecedentes surge la necesidad de generar nuevas opciones terapéuticas para tratar este patógeno, una de estas alternativas es atacar rutas metabólicas que sintetizan aminoácidos. En hongos en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (triptófano, tirosina, fenilalanina) se ha sugerido como diana la enzima 3-deoxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato (DAHP), ya que al dar inicio la síntesis de los

aminoácidos aromáticos en *C. albicans* se inhibió el crecimiento del patógeno, y solo suministrando dichos aminoácidos su patogenicidad se restituyó. Otra ruta biosintética explorada es la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs). La síntesis de BCAAs se realiza en plantas, bacterias, hongos, arqueas, algas, pero no en animales. En esta vía se reportado la obligatoriedad de varias enzimas, entre las que se encuentran: acetohidroxiácido sintasa, cetol-ácido reductoisomerasa, dihidroxiácido deshidratasa, 2-isopropilmalato sintasa, 3-isopropilmalato isomerasa, y 3-isopropilmalato deshidrogenasa, enzimas claves en la biosíntesis de valina, leucina e isoleucina (**Jastrzębowska & Gabriel, 2015**).

En la ruta biosintética de aminoácidos de cadena ramificada participan varias enzimas (Figura 3) en la síntesis de isoleucina la primera enzima de la ruta es la treonina desaminasa (TD) permitiendo la desaminación de la treonina para obtener 2-cetobutirato, ya que a diferencia de la síntesis de valina no se parte del piruvato. La enzima AHAS cataliza la síntesis de 2-acetolactato a partir de 2 moléculas de piruvato (Val, Leu) o la formación de 2-aceto-2-hidroxi-3-metilvalerato con una molécula de piruvato con 2-cetobutirato (Ile). En la siguiente reacción se necesita de la isomerización para la obtención de 2-3-dihidroxi-3-isovalerato (en el caso de Leu y Val), mientras que en el caso de Ile, se obtiene 2,3-dihidroxi-3-metilvalerato. En esta reacción interviene la enzima cetol-ácido reductoisomerasa (KARI). A continuación, los dihidroxiácidos son transformados en 2-cetoácidos (2-cetoisovalerato para Val y Leu, y 2-ceto-3-metilvalerato para Ile) por la enzima dihidroxiácido sintasa (DHAD) (**McCourt & Duggleby, 2006**).

Para la síntesis de Leu es necesario la intervención de tres enzimas adicionales; 2-isopropilmalato sintasa (2-IPMS) la que cataliza una reacción de condensación aldólica entre 2-cetoisovalerato y acetil CoA formando 2-isopropilmalato, 3-isopropilmalato deshidratasa (3-IPMD), intercambiando la posición del grupo -OH de 2-isopropilmalato hacia 3-isopropilmalato, y 3-isopropilmalato deshidrogenasa (3-IPMD) que permite la descarboxilación oxidativa de 3-isopropilmalato para la obtención de 2-cetoisocaproato. La última enzima que se emplea para la obtención de los aminoácidos leucina, isoleucina y valina es la transaminasa (TA), dicha enzima BCAT (aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada) cataliza reacciones

que se dan en dos partes, y de las que además se necesita del grupo prostético piridoxal-5'-fosfato. En primer lugar, el glutamato dona un grupo amino, y se obtiene 2-cetoglutarato conjuntamente con el intermediario piridoxamina 5'-fosfato. En segundo lugar, piridoxamina 5'-fosfato transfiere su grupo amino hacia dos moléculas de 2-cetoácidos (formados por DHAD), y 2-cetoisocaproato originado a partir de 3-IPMDH (Leu) (McCourt & Duggleby, 2006).

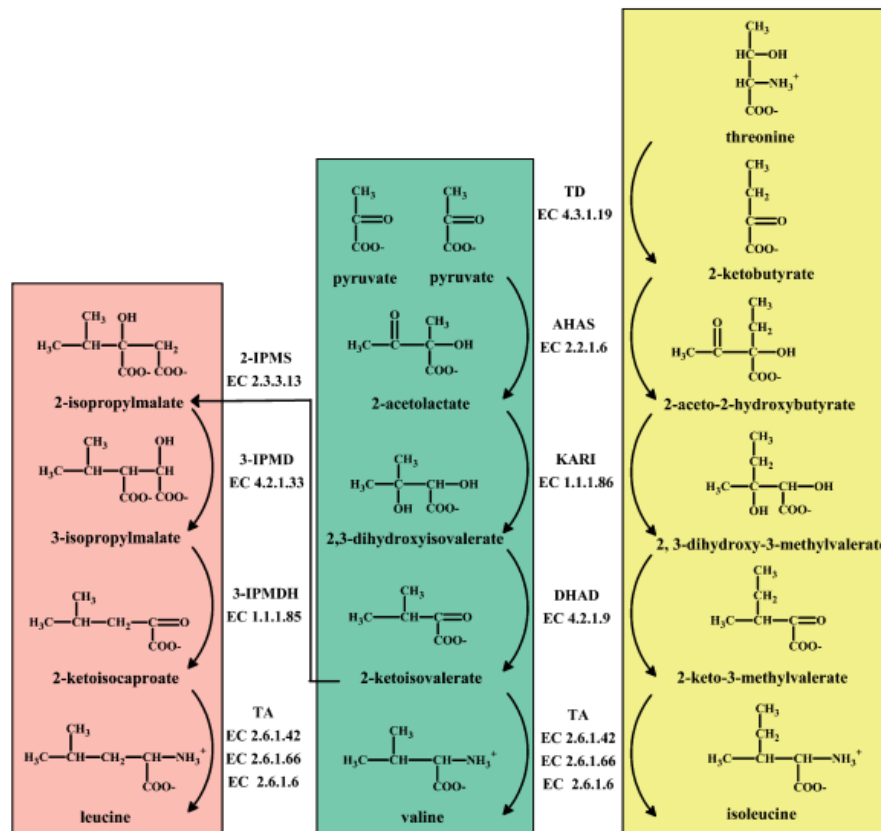


Figura 3. Ruta biosintética de aminoácidos de cadena ramificada. Para la síntesis de Leu, Val e Ile, participan las enzimas: 2-IPMS (2-isopropilmalato sintasa), 3-IPMD (3-isopropilmalato deshidratasa), 3-IPMDH (3-isopropilmalato deshidrogenasa), TA (transaminasa), TD (treonina desaminasa), AHAS (acetohidroxiácido sintasa), KARI (cetolácido reductoisomerasa), DHAD (dihidroxiácido sintasa) (McCourt & Duggleby, 2006).

1.1.9 Enzima acetohidroxiácido sintasa

Acetohidroxiácido sintasa (AHAS; EC 2.2.1.6) es una enzima dependiente de los cofactores difosfato de tiamina (ThDP), Mg^{2+} y dinucleótido de flavina y adenina (FAD), y es la encargada de catalizar el primer paso en la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada, en microorganismos como bacterias y hongos, plantas. La

acción de AHAS es la descarboxilación del piruvato y su unión a un segundo sustrato (piruvato o 2-cetobutirato) produciendo 2-acetolactato o 2-aceto-2-hidroxiacetato. Los productos de la reacción que cataliza AHAS sirven para finalmente sintetizar valina y leucina (a partir de 2-acetolactato) e isoleucina (2-aceto-2-hidroxiacetato) (Figura 4) (McCourt, Pang, Guddat, & Duggleby, 2005).

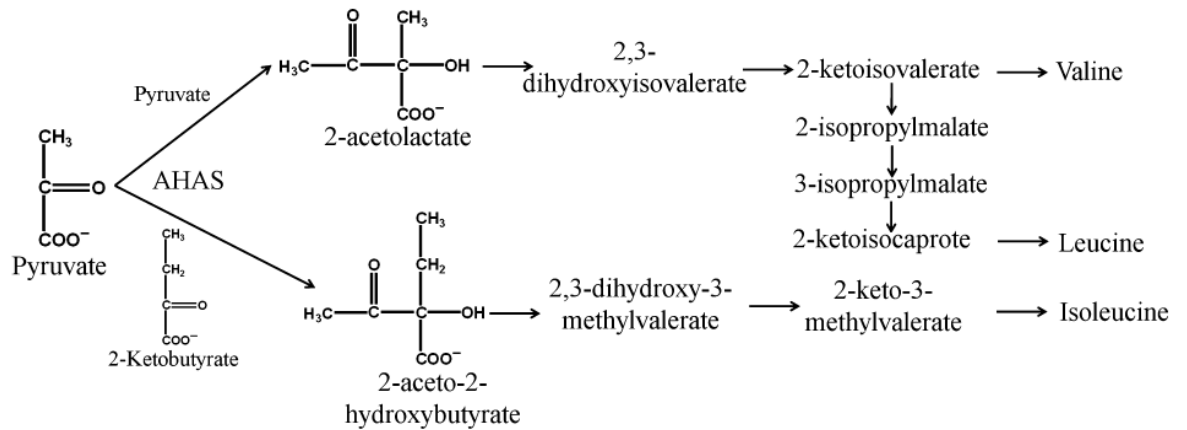


Figura 4. Reacción catalizada por AHAS. Vía de la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada BCAA (Gedi & Yoon, 2012).

1.1.10 Capacidad inhibitoria de AHAS con el empleo de compuestos herbicidas

La inhibición de AHAS por herbicidas es del tipo acumulativa reversible dependiente del tiempo, en donde su inactivación es oxidativa con la alteración química de ThDP. Se ha observado que el cofactor ThDP puede sufrir dos tipos de modificaciones. La primera consiste en remoción del C2 de ThDP forma ThAthDP, mientras que si el C2 es atacado por un oxígeno, el ThDP se oxida a su forma ThThDP (Figura 5). Tanto ThAthDP como ThThDP detienen la catálisis de AHAS, la cual puede recuperarse cuando la enzima reemplaza a estas moléculas con ThDP fresco (Lonhienne et al., 2018). La inhibición de AHAS se logra con 5 tipos de herbicidas químicamente diferentes, y estos son: sulfonilureas (SU), imidazolinonas (IMI), triazolopirimidinas (TP), sulfonilamino-carbonil-triazolinonas (SCT) y pirimidinil-benzoato (PYB) (Figura 6) (Zhou, Liu, Zhang, & Liu, 2007).

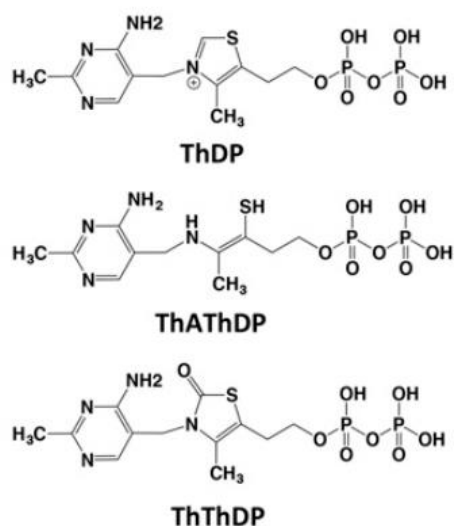


Figura 5. Estructuras de ThDP, ThAThDP y ThThDP. Formas químicamente alteradas de ThDP causadas al unirse un herbicida (Lonhienne et al., 2018).

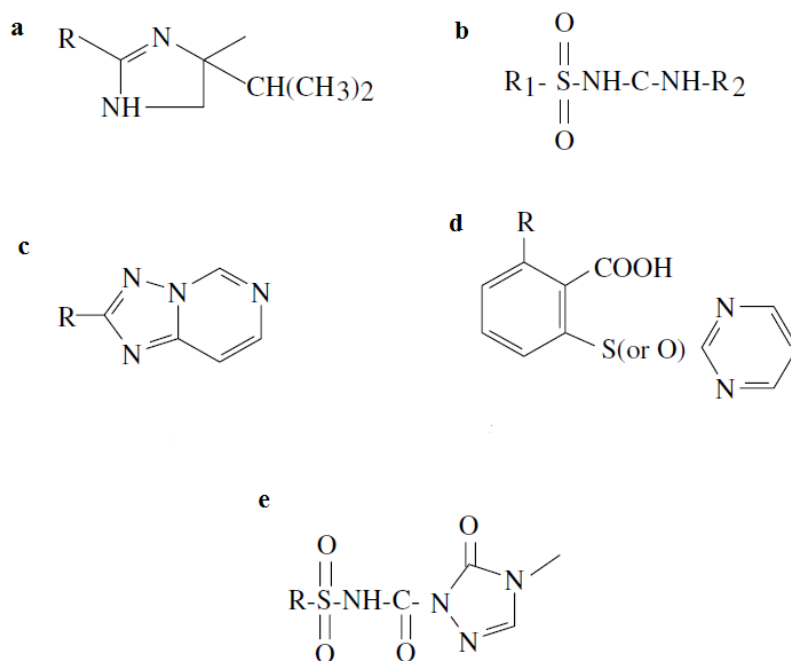


Figura 6. Familias de herbicidas que inhiben AHAS. 6a) imidazolinonas. 6b) sulfonilureas. 6c) triazolopirimidinas. 6d) pirimidinil (u oxi)-benzoato. 6e) sulfonilamino-carbonil-triazolinonas (Zhou et al., 2007).

De estos, en *Arabidopsis thaliana*, se ha probado la alta inhibición de clorimurón etil (SU) con un valor de K_{iapp} of 10.8 nM. Por otro lado, se ha demostrado que el mecanismo de inhibición de piritiobac (PB) y tiencarbazona metil (TCM) es formando

un complejo en donde una molécula de H₂O se une al anillo tiazol escindido de ThDP, para que se establezcan enlaces de hidrógeno con su respectivo herbicida (Figura 7a). Como segundo paso, dos moléculas de H₂O se enlazan al oxígeno del enlace éter, mientras que otra molécula de H₂O forma un enlace con el hidrógeno de la amida del residuo Gly121 de AHAS. Estas interacciones permiten que se ocupe totalmente el espacio entre el herbicida y el cofactor ThDP (que ahora es ThThDP, al enlazarse con las moléculas de H₂O) (Figura 7b) (Garcia, Nouwens, Lonhienne, & Guddat, 2017).

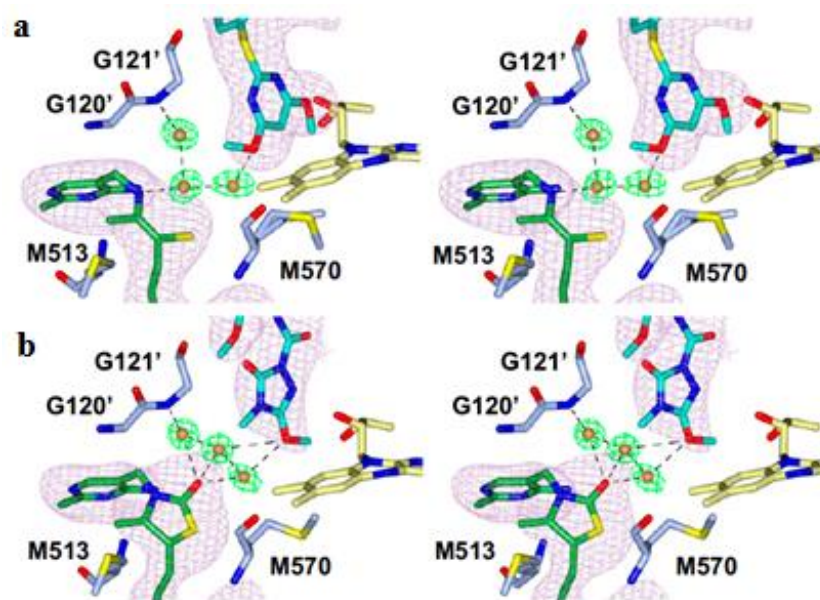


Figura 7. Moléculas de H₂O estabilizan al cofactor ThDP (modificado), en el complejo herbicida-AtAHAS. 7a) ThAthDP en complejo con PB. 7b) ThThDP en complejo con TCM. Las moléculas de H₂O se muestran como esferas naranjas, ThDP, FAD, herbicidas y residuos próximos se colorean de verde, amarillo, cian y azul claro. Los átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre se representan con verde, azul, rojo y amarillo (Garcia et al., 2017).

El potencial antimicrobiano exhibido por la inhibición de AHAS ha sido demostrado mediante varios estudios al actuar como target de compuestos con actividad herbicida, los cuales presentan un amplio espectro *in vitro* y mínima toxicidad (Richie et al., 2013). Empleando como punto de partida estos indicios, se ha evaluado la eficacia de las cinco familias de herbicidas comerciales capaces de inhibir la actividad de AHAS sobre diferentes patógenos. Por ejemplo, se demostró que derivados de sulfonilureas son capaces de inhibir totalmente crecimiento de *C. albicans* en disco y placa en

concentraciones en extremadamente bajas (K_i de 3.8 nM con etilo 2-(N-((4-yodo-6-metoxipirimidin-2-il) carbamoil) sulfamoil) benzoato) (Lee et al., 2013). Igualmente, se obtuvieron resultados positivos al aplicar triazolo-pirimidina-sulfonamida en cultivos de *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Rhizopus oryzae*, en cuyas placas se apreció un inexistente crecimiento (Richie et al., 2013). Además, se ha demostrado la potente actividad antifúngica de sulfonilureas (principalmente clorimurón etil) y triazolopirimidinas frente a *C. albicans* y *C. neoformans* (Garcia et al., 2018). Por otra parte el fungicida bensulfurón metil mostró un MIC₅₀ de 0.090 μM en *C. auris* (Agnew-Francis et al., 2020).

Para comprobar el efecto antifúngico *in vivo* de herbicidas que actúan sobre AHAS, se suministró dosis de 500 mg·kg⁻¹·d⁻¹, del herbicida CE (clorimurón etil) en ratones BALB/c por 7 días. Tras probar que no existió toxicidad en los mismos, se realizó un modelo de candidiasis aguda en ratones BALB/c mediante su infección con la cepa SC5314 de *C. albicans*. El progreso de la infección se monitoreó mediante la pérdida de peso de los roedores además de la evaluación de su estado físico general. Este experimento permitió determinar que dosis entre 100 a 500 mg·kg⁻¹·d⁻¹ de CE son capaces de eliminar significativamente la carga fúngica en el hígado, pulmón, cerebro y bazo (Garcia et al., 2018).

Uno de los aspectos que generan preocupación al aplicar un fármaco es el potencial desarrollo de resistencias. En el caso de AHAS, se conoce que existen mutaciones puntuales que provocan la resistencia de la enzima a las diferentes familias de herbicidas comerciales. Un ejemplo claro de desarrollo de resistencias se ha observado en plantas arvenses objetivo de inhibidores de AHAS. Por ejemplo, las mutaciones más frecuentes y perjudiciales son las que ocurren en las posiciones Pro197 y Trp574. La mutación Pro197Leu AHAS de *A. thaliana* puede ser contrarrestada mediante la modificación de los inhibidores en las posiciones *-meta*, *-orto*, *-para*, de 3-fluoroanisol. De esta forma fue posible establecer resultados prometedores de inhibición (Tabla 1) al incluir una sola modificación en el anillo fenoxi (con el objetivo de no afectar la actividad enzimática), que se pueden aplicar a futuro en agricultura (Qu et al., 2017).

Tabla 1. Inhibición en *AtAHAS* mutante

Compuesto	Ki (μM)	
	Wild type <i>AtAHAS</i>	Mutante P197L
4-Ph	3,69 \pm 0,89	2,71 \pm 0,12
3.4-benzo	1,79 \pm 0,18	3,17 \pm 0,15
3-CH ₃ -4-Br	1,41 \pm 0,28	3,34 \pm 0,40
3-CH ₃ -2-F	0,53 \pm 0,03	3,35 \pm 0,42
2-Cl-4-CH ₃	1,59 \pm 0,45	3,70 \pm 0,51

Inhibidores creados química sintética. Se indican los 5 primeros inhibidores que mostraron mayor inhibición en la variante mutante (Qu et al., 2017)

1.1.11 Inhibición de *M. tuberculosis* por herbicidas comerciales

Las enzimas KARI y AHAS han sido objetivos de estudio de su actividad anti *M. tuberculosis* por su participación en la ruta de biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada. Sin embargo, la inhibición de AHAS ha superado en análisis *in vitro* a la inhibición de la enzima KARI, al conseguir con la primera el nulo crecimiento de *M. tuberculosis* en placa. En este sentido, has sido posible demostrar la eficacia de sulfometurón metil (SM) y metsulfurón metil (MM) en el tratamiento de roedores infectados con la cepa ATCC 35801 de *Mycobacterium tuberculosis*. Dichos compuestos fueron suministrados posterior a la infección con *M. tuberculosis* durante 28 días con concentraciones de 12 y 16 μM , respectivamente. Transcurridos 30 días del tratamiento, se analizaron sus órganos mostrando además de la integridad de los mismos, mínima concentración de *M. tuberculosis* en sus pulmones. De esta forma se concluyó que SM (500 mg/kg del peso del roedor) es un potencial agente inhibidor de AHAS efectivo para el tratamiento de la tuberculosis (Grandoni, Marta, & Schloss, 1998). Asimismo, los herbicidas SM y KHG20613, que son potentes inhibidores de AHAS, han demostrado la capacidad de matar células de *M. tuberculosis* comunes, así como cepas XDR-TB y MDR-TB en macrófagos (Choi, Yeon, Hoh, Choi, & Yoon, 2005).

La inhibición de AHAS se puede lograr con distintas familias de herbicidas. Entre la variedad de estructuras químicas de los herbicidas existentes se analizó una librería de compuestos, con cuyo cribado se obtuvo a 15 potentes agentes de inhibición de la

familia de las triazolopirimidinas (Figura 8). El análisis *in vitro* se realizó en macrófagos de roedores, estas células se emplearon como material para realizar la infección con *M. tuberculosis*, cinco compuestos mostraron la menor concentración inhibitoria (IC₅₀) (Tabla 2), al emplear concentraciones mínimas (<20 µM) (Jung, Ha, Lee, Ryoo, & Yoon, 2016). Esto convierte a AHAS en un target óptimo para el desarrollo de fármacos con actividad bactericida en *M. tuberculosis*.

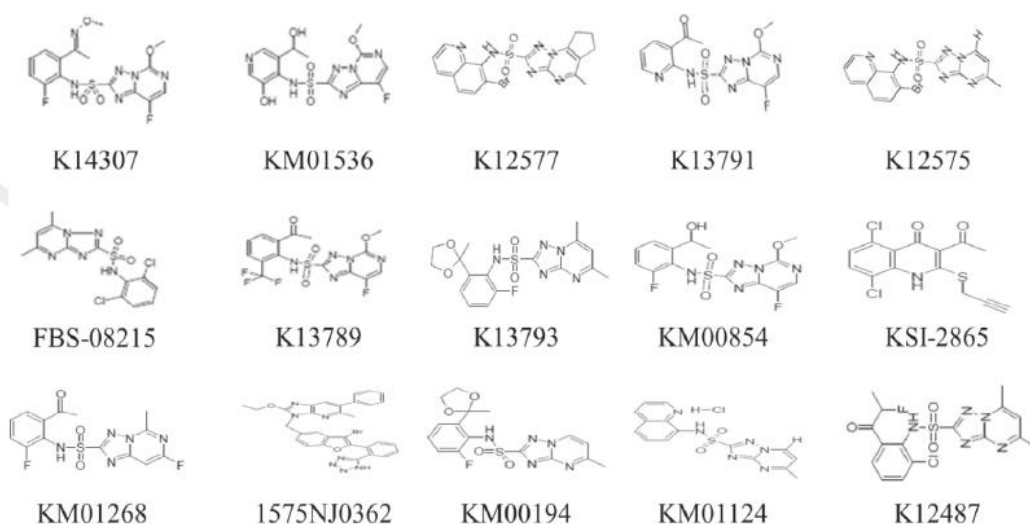


Figura 8. Estructura de varios compuestos inhibidores de AHAS. De la familia de las triazolopirimidinas se encuentra: K14307, KM01536, K12577, K13791, K12575, FBS-08215, K13789, K13793, KM00854, KM01268, 1575NJ0362, KM00194, KM01124 y K12487. Y el compuesto KSI-2865, correspondiente a la familia de las quinolinas (Jung et al., 2016).

Tabla 2. Inhibición en *Mt*AHAS

Inhibidor	Ki (µM)
K14307	0,425
KM01536	0,46
K12577	0,446
K13791	0,936
K12575	1,24

Inhibidores con máxima actividad antimicrobacteriana. De los 15 compuestos aplicados, se muestran los compuestos con mayor inhibición (Jung et al., 2016).

1.1.12 Estructura de los complejos de *Sc*AHAS y *At*AHAS

La elucidación de la estructura de AHAS ha sido evidenciada por medio de estructuras cristalinas, en donde el complejo AHAS en *Saccharomyces cerevisiae* y *Arabidopsis*

thaliana adoptan forma de cruz maltesa con la diferencia de que en *Sc* es un complejo hexadecamérico y en *At* es un dodecámero (Figura 9) (Lonhienne et al., 2020).

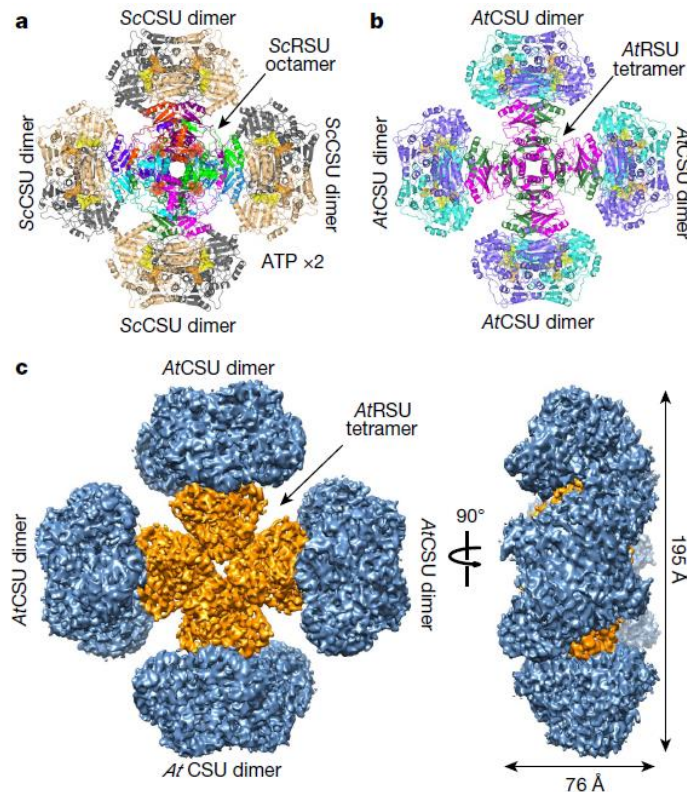


Figura 9. Estructura de los complejos de *Sc*AHAS y *At*AHAS. 9a) Complejo *Sc*AHAS: ocho RSUs (cada uno con su dominio ACT) forman el núcleo de los cuatro dímeros de CSU, ambas subunidades se unen por 4 pares de ATP. 9b) Complejo *At*AHAS: cuatro RSUs (cada uno posee dos pseudo repeticiones del dominio ACT), de igual forma son parte del centro del complejo, que se comunica con cuatro dímeros de CSU. 9c) Mapa crio-EM de *At*AHAS (Lonhienne et al., 2020).

1.1.13 Estructura de *Mt*AHAS

Con las estructuras precedentes de *Sc*AHAS y *At*AHAS se ha establecido la similitud estructural en concordancia con el arreglo de las subunidades entre ambos reinos (Lonhienne et al., 2020). Por ende, para probar la relación existente con la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* se clonó las subunidades de AHAS, *ilvB* (CSU) e *ilvN* (RSU) del ADN genómico de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* en *E. coli*. Posterior a la expresión y purificación de las subunidades de AHAS, mediante SDS-PAGE se determinó que estas poseen pesos moleculares de 68.3 kDa (CSU) y 20.4 kDa (RSU) (Choi et al., 2005). De esta manera se observó una similitud entre el peso molecular

de ambas subunidades con aquellas de AHAS de *Saccharomyces cerevisiae*, cuyos pesos moleculares son iguales a 70.5 kDa (CSU) y 29.6 (RSU). Las estructuras en forma de cruz observadas por microscopía electrónica (Figura 10) muestran que la estructura tridimensional de AHAS en *M. tuberculosis* es efectivamente semejante a los complejos de *Sc*AHAS y *At*AHAS (Lonhienne et al., 2020), comprobando de esta forma la conservación de AHAS en distintos reinos. Hasta el momento no se cuenta con una estructura tridimensional de *Mt*AHAS determinada a nivel atómico con la cual se puede comprender su mecanismo de inhibición o desarrollar nuevos inhibidores de la enzima mediante métodos de diseño racional.

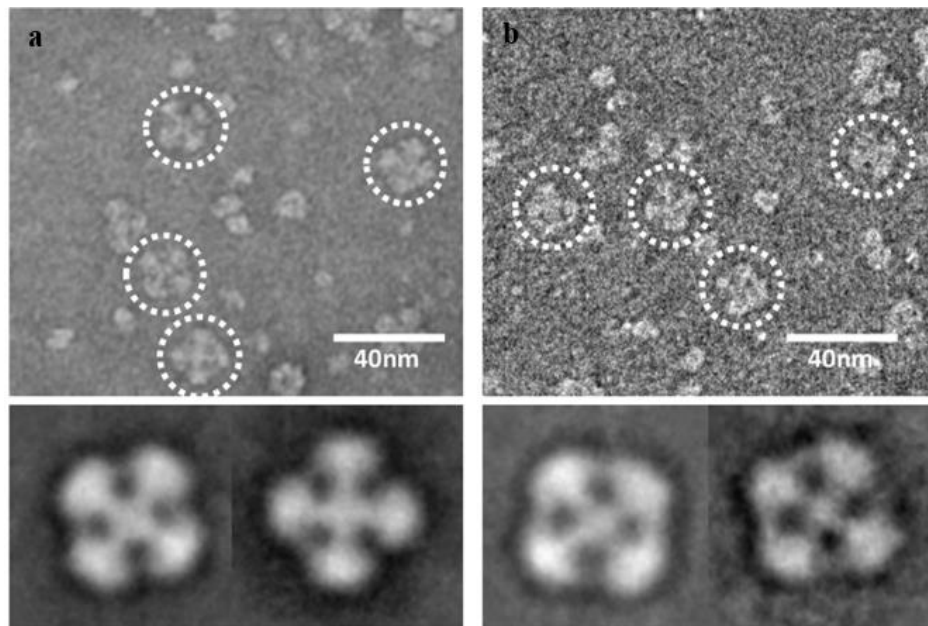


Figura 10. Micrografías electrónicas de tinción negativa de *At*AHAS y *Mt*AHAS. Ambos complejos muestran la forma de cruz maltesa. 10a) Complejo *At*AHAS. 10b) Complejo *Mt*AHAS (Lonhienne et al., 2020).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Establecer un modelo computacional la estructura tridimensional de la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS) de *Mycobacterium tuberculosis*.

1.2.2 Objetivos específicos

- Identificar las secuencias codificantes para la subunidad catalítica y la subunidad regulatoria de la enzima acetohidroxiácido sintasa de *Mycobacterium tuberculosis*.

- Determinar la mejor estructura base para el modelo de la enzima acetohidroxiácido sintasa de *Mycobacterium tuberculosis* y el grado de conservación de sus motivos más importantes.
- Construir un modelo tridimensional de la enzima acetohidroxiácido sintasa de *Mycobacterium tuberculosis*.

1.3 Hipótesis

1.3.1 Hipótesis nula

La identificación y comparación de las secuencias de las subunidades catalítica y regulatoria de la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS) de *M. tuberculosis* con ScAHAS y AtAHAS, no permiten establecer la estructura tridimensional de la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS) de *Mycobacterium tuberculosis*.

1.3.2 Hipótesis alternativa

La identificación y comparación de las secuencias de las subunidades catalítica y regulatoria de la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS) de *M. tuberculosis* con ScAHAS y AtAHAS, permiten establecer la estructura tridimensional de la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS) de *Mycobacterium tuberculosis*.

1.4 Señalamiento de las variables de la hipótesis

1.4.1 Variables dependientes

- Homología estructural de AHAS.
- Grado de conservación de residuos aminoacídicos involucrados en interacciones con cofactores e inhibidores.

1.4.2 Variables independientes

- Secuencias de CSU y RSU de la enzima acetohidroxiácido sintasa de *M. tuberculosis*, *S. cerevisiae* y *A. thaliana*.
- Estructuras tridimensionales de AHAS de *S. cerevisiae* y *A. thaliana*.

CAPÍTULO II METODOLOGÍA

2.1 Materiales

2.1.1 Páginas web

- National Center for Biotechnology Information (NCBI)
- Protein Data Bank (PDB)
- T-coffee
- Boxshade
- Clustal Omega

2.1.2 Servidor web bioinformático

- Swiss-Model

2.1.3 Programas

- WinCoot
- PyMOL
- LigPlot
- Yasara
- Microsoft office

2.1.4 Equipos

- Computadora personal

2.1.5 Códigos empleados para la obtención de secuencias FASTA

Tabla 3. Códigos de las secuencias de las subunidades catalítica y regulatoria de AHAS empleadas

Organismos	CSU	RSU
<i>Mt</i> AHAS	YP_177917.1	CCP45808.1
<i>Sc</i> AHAS	NP_013826.1	NP_009918.1
<i>At</i> AHAS	AEE78430.1	NP_850174.1

2.1.6 Códigos de las estructuras en PDB

Tabla 4. Código de estructura

Organismo	Complejo
<i>Sc</i> AHAS	6u9d.1

2.2 Métodos

2.2.1 Identificación de las secuencias de AHAS de *M. tuberculosis*, *S. cerevisiae* y *A. thaliana*

Se buscó las secuencias de las subunidades catalítica y regulatoria de *MtAHAS*, *ScAHAS* y *AtAHAS* en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Esta base de datos provee información de genomas de distintos organismos y las proteínas que codifican. Una vez obtenidas las secuencias de las proteínas de interés, se descargaron en formato FASTA y se almacenaron en archivos de texto.

2.2.2 Alineamiento de CSU y RSU de *MtAHAS*, *ScAHAS* y *AtAHAS*

Para realizar el alineamiento múltiple de secuencias se utilizó la herramienta T-coffee (<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:regular>), en donde se ingresaron las secuencias FASTA y se presionó “submit” para iniciar el alineamiento. Concluido el alineamiento se descargaron los resultados en formato “fasta_aln”.

Con el archivo de respuesta se procedió a generar un alineamiento coloreado con la herramienta Boxshade (https://embnet.vital-it.ch/software/BOX_form.html). Para llevar a cabo este proceso se incorporó los resultados en el formato “fasta_aln”, y se escogieron los siguientes parámetros:

- “other” en la ventana del formato de entrada de la secuencia.
- “RTF_new” como formato de salida.
- Con “run boxshade” se inició y finalmente se descargó como “Output number 1”.

2.2.3 Selección del modelo tridimensional base para el modelamiento de *MtAHAS*

Con el cotejo entre las secuencias de *ScAHAS*, *AtAHAS* y *MtAHAS* se definió el modelo tridimensional más afín (*ScAHAS*), el cual se descargó de la base de datos del Protein Data Bank (PDB).

En el repositorio PDB, es posible estudiar modelos tridimensionales de proteínas y ácidos nucleicos, obtenidos principalmente a partir de cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear y microscopía electrónica. Una vez identificado el modelo se lo descargó en formato .pdb.

2.2.4 Obtención del modelo tridimensional de *MtAHAS*

Para la construcción del modelo tridimensional de *MtAHAS* se empleó el servidor Swiss-Model. Esta herramienta automatizada, permite el modelado de proteínas homólogas, para lo cual fue necesario la plantilla del modelo base apropiado (*ScAHAS*), la que sirvió para la construcción de la nueva estructura. Adicionalmente, el servidor elaboró el modelo con base a un alineamiento entre la secuencia de la plantilla y la secuencia objetivo.

Como resultado, se generó la estructura cuaternaria en formato .pdb, y tablas de resultados del procedimiento que incluyeron los parámetros de GMQE (estimación de la calidad del modelo global), QMEAN (calidad absoluta del modelo global). Además de representaciones gráficas que reflejaron las comparaciones tomadas en cuenta para la construcción del modelo.

2.2.5 Análisis del modelo de *MtAHAS*

Tras obtener el complejo de *MtAHAS* de Swiss-Model fue necesaria la inserción de los cofactores (ThDP, FAD y Mg^{+2}), e identificar sus motifs de unión. Este paso se lo realizó en el programa WinCoot. Finalmente se realizó la minimización de la energía del complejo unido a sus cofactores mediante el servidor Yasara.

Con el modelo tridimensional de *MtAHAS* completo, se procedió al análisis estructural de cada subunidad mediante los programas PyMOL, LigPlot y WinCoot. La investigación se centró en definir las características de los residuos involucrados en la unión a los cofactores, herbicidas y BCAAs. Las imágenes e ilustraciones se construyeron en el programa PyMOL. Y finalmente las interacciones de los ligandos se las identificó y midió en LigPlot.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Interpretación de resultados y discusión

3.1.1 Identificación de las secuencias de AHAS de *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Mycobacterium tuberculosis*.

A partir del año 1998 muchos avances han transcurrido desde la secuenciación completa del genoma de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*. Con este gran primer paso, se entendió que varios factores contribuían a la resistencia de la micobacteria, como la naturaleza hidrofóbica de la envoltura celular y la codificación de proteínas causantes de lipogénesis y lipólisis (Cole et al., 1998).

Entre los varios estudios que se han realizado para suplir el empleo de medicamentos antituberculosos con elevada toxicidad y proveer un tratamiento para cepas con resistencia a medicamentos de primera línea, se ha propuesto a la enzima AHAS como potencial target, ya que al inhibirla es posible detener la provisión de aminoácidos de cadena ramificada e inhibir el crecimiento y desarrollo de los bacilos (Singh et al., 2011). Con estos antecedentes, en modelos superiores como plantas, la enzima AHAS es el target de al menos 50 herbicidas empleados en cultivos de algodón, trigo, arroz, entre otros. Estos compuestos pertenecen a las familias sulfonilurea (SU), sulfonilamino-carbonil-triazolinona (SCT), pirimidinil-benzoato (PB), triazolopirimidina (TP) e imidazolinona (IMI), cuyo objetivo es la inhibición de AHAS, con amplio espectro de actividad y baja toxicidad en animales (Garcia et al., 2017).

En el caso de *Arabidopsis thaliana* los herbicidas (SU, IMI, TP, SCT y PYB) bloquean la entrada del sustrato hacia el sitio activo al situarse en el canal de acceso del mismo (McCourt, Pang, King-Scott, Guddat, & Duggleby, 2006). De esta manera causan la inhibición reversible de la enzima. (Lonhienne et al., 2018). Este mecanismo de inhibición explica la extremadamente alta potencia de estos herbicidas tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. Además de inhibir a la enzima AHAS presente en plantas, también se ha demostrado que los herbicidas comerciales tienen actividad inhibitoria de AHAS en levaduras y hongos. Específicamente, el compuesto

triazolopirimidina, Compuesto 1, mostró una concentración mínima inhibitoria (CMI₁₀₀) de 4 µg/mL en *Saccharomyces cerevisiae* (Richie et al., 2013), en tanto que al aplicar el herbicida sulfonilurea, CE, se logró un MIC de 0.03 µg/mL para *Candida albicans* y 2.75 µg/mL para *Cryptococcus neoformans* (Garcia et al., 2018).

Al comprobar la exitosa inhibición que se logra no solo en plantas sino en microorganismos, se ha optado por analizar el efecto que causa en experimentos *in vitro* e *in vivo* destinando a AHAS de *Mycobacterium tuberculosis* como target de sulfonilureas. Los resultados obtenidos, indicaron mayor concentración inhibitoria mínima para los compuestos modificados K13010 (a partir de metsulfurón metil) y K13030 (variación de sulfometurón metil) al obtener un MIC (µg/ml) de 6.3 y 3.1-6.3, respectivamente en una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente a fármacos (Sohn et al., 2008). Estos indicios previos, sugieren que AHAS es un target óptimo para el desarrollo de fármacos que traten no solo cepas comunes de *Mycobacterium tuberculosis*, sino también aquellas variantes que presenten diferentes tipos de resistencia a los fármacos convencionales. Ante esto, en el presente estudio se propuso el modelamiento computacional de la estructura tridimensional de *Mt*AHAS, al contemplar la organización oligomérica de sus subunidades catalítica y regulatoria como un solo complejo.

Dado que las únicas estructuras tridimensionales disponibles hasta la fecha para el complejo AHAS corresponden a *Sc*AHAS y *At*AHAS (Lonhienne et al., 2020) se las definió como plantillas para la construcción del modelo tridimensional de *Mt*AHAS. En primer lugar, previo a la construcción del modelo *Mt*AHAS, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias. Para ello, se identificó las secuencias AHAS de *A. thaliana*, *S. cerevisiae* (cepa S288c) y *M. tuberculosis* (cepa H37Rv) en la base de datos del NCBI. Las secuencias de las subunidades catalíticas (CSU, o también llamada subunidad grande) de AHAS (también conocida como acetolactato sintasa, ALS) identificadas fueron: YP_177917.1 (*Mt*CSU), NP_013826.1 (*Sc*CSU), y AEE78430.1 (*At*CSU). De la misma forma, se identificó las secuencias para las subunidades regulatorias (RSU, o también llamada subunidad pequeña) de AHAS estos organismos: CCP45808.1 (*Mt*RSU), NP_009918.1 (*Sc*RSU), y NP_850174.1 (*At*RSU). Todas las secuencias fueron descargadas en su formato FASTA.

3.1.2 Alineamiento múltiple de secuencias de la subunidad catalítica y subunidad regulatoria de *MtAHAS*, *ScAHAS* y *AtAHAS*

Para la construcción del alineamiento múltiple de secuencias se empleó la herramienta T-coffee y Boxshade. Adicionalmente, para analizar las interacciones entre los cofactores de la enzima (ATP, ThDP, FAD) y los residuos que conforman su sitio de unión se empleó los programas WinCoot y LigPlot. En LigPlot, se tomó en cuenta la distancia máxima de 2.70 Å (hidrógeno-aceptor) y 3.35 Å (donor-aceptor) para puentes de hidrógeno, mientras que para las interacciones no polares se determinó contacto mínimo con valor de 2.90 Å y 3.90 Å como contacto máximo. En cambio, en el programa WinCoot, las distancias medio ambientales (contactos polares y no polares) se establecieron en un rango entre 2.2 Å (distancia mínima) y 4.2 Å (distancia máxima).

En la Figura 11 se encuentra el alineamiento de las subunidades regulatorias de los tres organismos, en donde se muestra las interacciones y el grado de conservación de los residuos. Mientras que en *ScAHAS* y en *MtAHAS* la RSU tiene una conformación homodimérica, en el caso de *A. thaliana* la RSU es un monómero, cuya secuencia de aminoácidos (aa) exhibe una duplicación interna (RSU_R1 y RSU_R2) y un linker de 54 aa entre ambas repeticiones (**Lee & Duggleby, 2001**). Se cree que la duplicación del gen que codifica para la RSU en *A. thaliana* y su expresión como un solo péptido se podría deber a que ambos dominios poseen una separación para que un dominio de RSU se una a Val o Ile, mientras que el otro permitiría la unión de Leu como mecanismo de inhibición por retroalimentación. Este arreglo a su vez indica la variación evolutiva que surgió esta subunidad a partir de la enzima treonina desaminasa (**Wessel, Graciet, Douce, & Dumas, 2000**). Para el alineamiento múltiple de secuencias se dividió la secuencia de *AtRSU* en dos secciones. La primera correspondió a 259 aa de *AtRSU_R1* (80 aa del péptido señal y 179 aa correspondientes a la repetición 1), mientras que la segunda incluyó 156 aa de *AtRSU_R2*. El linker entre ambas repeticiones no fue considerado durante este análisis. La repetición 1 es de mayor longitud ya que considera los primeros 80 aa correspondiente al cpTP (péptido de destinación al cloroplasto) (**Heijne, Stepphun, & Herrmann, 1989**).

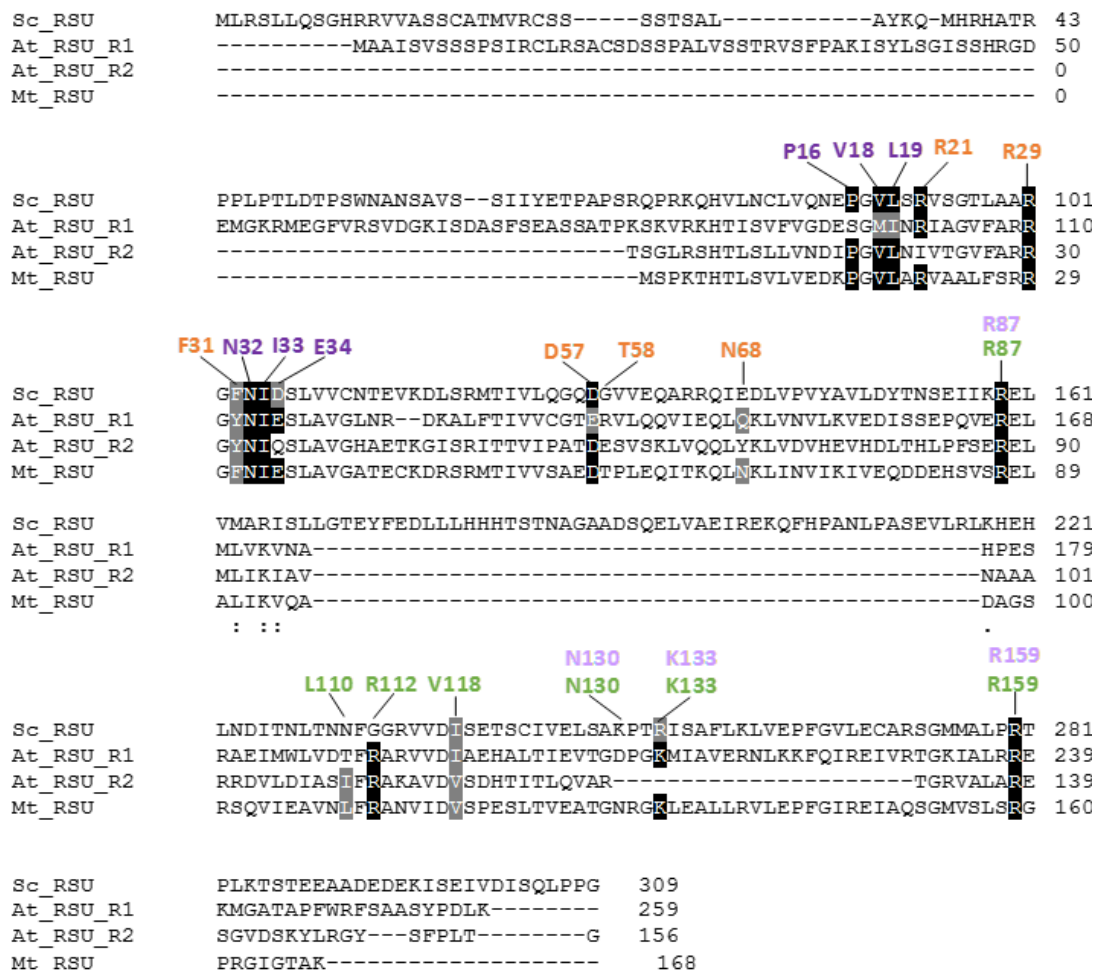


Figura 11. Alineamiento múltiple de secuencias de *Sc*RSU, *At*RSU_R1, *At*RSU_R2 y *Mt*RSU. Aminoácidos involucrados en interacciones con CSU (naranja), aminoácidos con unión a ATP (verde), sitio de unión de valina (morado), restos aminoacídicos con unión a Mg^{2+} (lila). Aminoácidos altamente conservados (sombreados en negro), aminoácidos conservados (sombreados en gris), no conservados (se mantienen sombreados en blanco).

Con base al análisis de la estructura tridimensional del complejo *Sc*AHAS se determinó que los aminoácidos de RSU involucrados en su unión a CSU son Arg21, Arg29, Phe31, Asp57, Thr58 y Asn68 (numeración basada en la secuencia de *Mt*RSU) (Figura 11, aa descritos en naranja). Entre los tres organismos únicamente se encuentran altamente conservado al residuo en la posición Arg29, y Phe31 como aminoácido conservado, en donde la secuencia de RSU de levadura y bacteria presenta una fenilalanina mientras que en planta este residuo es una tirosina. En la posición Asp57 se observa la variación del aspartato por otro aminoácido de carga negativa, como el glutamato, únicamente en el *At*_RSU_R1. Además, Arg21 varía por Ile solo

en *At_RSU_R2*. Entre tanto, en Asn68 se determinó como aminoácidos conservados a glutamina y asparagina (*At_RSU_R1* y *Mt_RSU*), en contraste con los residuos no conservados: ácido glutámico (*Sc*) y tirosina (*At_RSU_R2*). Finalmente en esta comparación, en Thr58 varían todos los residuos, por lo que no existe conservación en ninguna de las 4 secuencias.

El lugar clave en el que se interrelacionan las subunidades regulatorias con las subunidades catalíticas, es en el dominio ACT del RSU donde se establece la primera conexión al formarse un puente salino entre Arg101 (primera hélice α) con Asp199 del CSU, en la siguiente unión participa la segunda hélice α del RSU con el dominio β (cadena A del CSU) específicamente los residuos Ile413, y Pro410. Los aminoácidos Asp129 y Glu140 también son parte del dominio ACT del RSU e interactúan con el dominio β de una unidad del dímero CSU y el residuo Arg93 permitiendo la comunicación entre los sitios activos en *Saccharomyces cerevisiae*. En el caso de *Arabidopsis thaliana* Arg110, Tyr112 y Arg137, participan en la unión entre el dominio ACT *AtRSU* y el dominio β de *AtCSU* (Lonhienne et al., 2020). Los cinco residuos involucrados en la unión a RSU (mostrados en naranja en la Figura 12) se encuentran totalmente conservados, a excepción de la sustitución de una serina en *At* en la posición Pro339, indicando de esta manera el alto grado de conservación en los lugares de conexión con las subunidades regulatorias de los tres organismos.

Los sitios de unión del ATP se denotan en color verde, Arg87, y Arg159 (altamente conservados), en el caso de Arg112 en ambos repeats de *At* como en *Mt* existe un residuo de arginina mientras que para *Sc* este aminoácido es no conservado al variar por una glicina, en la posición Val118 los residuos son conservados al ubicarse valina (*Mt* y *At_RSU_R2*) e isoleucina en *Sc* y en *At_RSU_R1*, para el caso de Asn130 (lisina en *Sc*, ácido aspártico en *At_RSU_R1* y asparagina en *Mt*) existe no conservación en los tres organismos, para Lys133 (lisina en *At_RSU_R1* y *Mt*, arginina en *Sc*) en la levadura el residuo es conservado. Para adoptar la conformación de octámero o tetrámero es necesario la presencia de ATP, caso contrario se mantendrían las subunidades regulatorias en forma de dímero. En cuanto a *Sc* al ser un octámero es necesario de 4 pares de ATP para que las subunidades regulatorias se unan, sin embargo, las RSUs de *At* forman un tetrámero precisando de 2 pares de ATP.

En *Saccharomyces cerevisiae* los residuos Arg159 y Arg280 son invariantes en sus posiciones homólogas de *Arabidopsis thaliana* y *Mycobacterium tuberculosis*, corroborando de esta forma la alta conservación que se mantuvo entre las especies **(Lonhienne et al., 2020)**.

Al proveer el aminoácido valina a AHAS se une con los residuos Pro16, Val18, Leu19 de los cuales existe un resto no conservado para el caso del repeat 1 de *At* al encontrarse serina, mientras que son conservados al situarse metionina e isoleucina, respectivamente. Los aa Asn32 e Ile33 son altamente conservados, finalmente en el repeat 1 de *At* y en *Mt* se encuentra altamente conservado a Glu34, conservado al ser sustituido por ácido aspártico (*Sc*) y no conservado al situarse una glutamina en el repeat 2 de *At*. Experimentalmente al adicionar l-valina, el centro de la amida se sitúa entre las posiciones Val90, Leu91 e Ile105, estableciendo también tres puentes de hidrógeno con Asn113 y Asp328 (cadena lateral), e Ile114 (oxígeno del grupo carbonilo), probando con esta disposición que la forma conformacional en la que se localiza la valina se encuentra altamente conservada tanto en modelos de plantas, bacterias y hongos **(Lonhienne et al., 2020)**.

El alineamiento de las subunidades regulatorias en el caso del magnesio indica la conservación en las posiciones de Arg87 y Arg159, pero las variaciones no conservadas en Asn130 (lisina en *Sc_RSU*, ácido aspártico en *At_RSU_R1* y asparagina en *Mt_RSU*) y Lys133 (arginina en *Sc_RSU*). Al situarse asparagina en la posición 130 en *Mycobacterium tuberculosis* por su naturaleza polar sin carga, la ubicación del magnesio no se vería afectada, sin embargo, al posicionarse un aminoácido con carga negativa como el aspartato probablemente existiría una repulsión del cofactor pero al presentarse este cambio en *Arabidopsis thaliana* y como se mencionó anteriormente en el modelo de planta únicamente es necesario dos pares de ATP, razón por la que no afectaría su disposición en la proteína, reafirmando de esta manera que para estabilizar las cargas negativas el Mg^{2+} se une a seis argininas y dos lisinas (de distintas RSUs), en *Saccharomyces cerevisiae* **(Lonhienne et al., 2020)**.

Con respecto a la subunidad catalítica (Figura 12) las interacciones con el cofactor ThDP se denotan en amarillo y se analizó en el dímero 4 (cadenas M-N). Los aa involucrados poseen conservación total en: Pro60, Pro111, Gly112, Asn115, Gln148, Gln429, His430, Gly453 y Gly511, en *Mt* hay un residuo no conservado en Cys482 al mantenerse serina para *Sc* y *At*. El difosfato de tiamina al interrelacionarse con Mg^{2+} se ubica en el centro activo del dímero por lo que involucra a ambos monómeros. A su vez, los oxígenos del grupo pirofosfato crean puentes de hidrógeno con las cadenas laterales de His500, Asp550, Ser552 y Asn577 y con las cadenas principales de Gln499, His500, Ala551 y Ser552, de igual manera fuerzas de Van der Waals intervienen en la unión de los dos anillos del ThDP implicando a Met525 y Met555 (un monómero), y Tyr113, Gly115, Glu139, Thr162 y Pro165 (con otro monómero del dímero). Al situarse en el centro del sitio activo de ambos monómeros, la conformación de ThDP adopta forma de V al unirse a la enzima, causando una cercanía de 3.1 Å entre la porción de 4-amino y los átomos de C2 de los residuos cercanos (**Pang, Duggleby, & Guddat, 2002**). Esta distancia causa, que K_m de ThDP en *Sc*AHAS sea de 110 μM (**Poulsen & Stougaard, 1989**), en *Mt*AHAS se ha reportado el valor de 51.23 μM (**Choi et al., 2005**) y de 25 μM en *At*AHAS (**Chang & Duggleby, 1998**). Explicando la mayor afinidad de ThDP en el modelo de planta, se conoce que existe una estructura denominada “tapa” formada por el bucle móvil y el brazo de C-terminal (“capping region”). Esta configuración difiere en el modelo de planta y en el de levadura, en *A. thaliana* el C2 de ThDP es el único carbono de acceso al solvente cuando el bucle móvil se dispone como hélice-alfa protegiendo al resto de la estructura, en el caso de *Sc* el anillo de tiazol es desprotegido totalmente cuando el bucle móvil adopta forma de láminas beta antiparalelas. Adicionalmente, la segunda conformación (brazo de C-terminal) se torna en forma de U en *At*, mientras que en *Sc* es una cola desordenada, también el sitio activo de *At* es reforzado por la presencia de un “bucle apéndice” (residuos Phe587-Pro599) el cual interactúa con el bucle móvil, y estabiliza la región (**Garcia, Wang, Lonhienne, & Guddat, 2017**).

El cofactor FAD forma 12 enlaces con residuos en la cadena N (dímero 4), de estos se indica conservación total en: Thr272, Leu273, His293, Arg314, Asp316 y Asp355. En el modelo de planta y bacteria existe conservación en Gly247 y Asp336, pero en levadura los aminoácidos son conservados al situarse alanina y ácido glutámico, respectivamente. En *S. cerevisiae* en las posiciones Ser127 y Val356 existen

diferencias al poseer aminoácidos no conservados (Gly y Ala) en comparación con *A. thaliana* y *M. tuberculosis*, para el caso de la bacteria en la posición Pro290 es una no conservación al ser leucina el residuo presente en las secuencias de la planta y levadura. Finalmente, en cuanto al cofactor FAD hay una no conservación marcada en Thr313, al posicionarse alanina, valina y treonina, para *Sc*, *At* y *Mt*.

En *S. cerevisiae* en cada monómero de las subunidades catalíticas existen tres dominios: α (85-269), β (281-458) y γ (473-643), de los cuales el cofactor FAD presenta más afinidad con el dominio beta que con alfa y lambda y posee un elevado valor de K_m (0.3 μ M) al presentar doce enlaces (entre puentes de hidrógeno y enlaces de Van der Waals). En *A. thaliana*, de igual forma que en el modelo de levadura cada subunidad catalítica está compuesta por tres dominios α (86-280), β (281-451) y γ (463-639). De igual modo, en ambos organismos la disposición del anillo flavín del FAD se localiza en el sitio activo de la subunidad catalítica con los grupos hidroxilos direccionados hacia el C2 del ThDP. Dicho flavín adenín dinucleótido en el modelo de *At* se une a las cadenas laterales de los aminoácidos: His351, Met352 y Arg377, además los residuos que se ubican en el brazo del C-terminal abarcan desde el residuo Pro649 hasta el Ser653 (**Garcia, Wang, Lonhienne, & Guddat, 2017**). Al poseer menos interacciones la afinidad de FAD con los residuos de la subunidad catalítica en *Arabidopsis thaliana* es menor al reflejar un valor de 1.46 μ M (**Chang & Duggleby, 1998**).

Tras identificar los lugares de unión a cofactores, se ha priorizado también establecer los contactos con herbicidas que se ubican en el sitio activo en la secuencia de CSU. Por consiguiente, al usar como referencia los lugares de unión del herbicida penoxsulam (PS) con *S. cerevisiae*, se exhibe alta conservación en: Gly62, Ala63, Val137, Ala146, Phe147, Lys197, Met292, Asp317, Arg318, Met512, Val513 y Trp516 entre los tres organismos, aunque existe una no conservación en Gly138 al posicionarse una glicina en *Mt* en lugar de prolina de los modelos de levadura y planta. La estructura cristalina de la enzima AHAS de *S. cerevisiae* al unirse al herbicida PS ha demostrado que una sola molécula de PS se enlaza a cada subunidad de la interface formada por dos dímeros, al ingresar en la enzima se ubica en el fondo del “bolsillo” del sitio activo, y aquí es estabilizado por las regiones de los bucles 1, 2

y Q, la cola de C-terminal y el bucle móvil, y para intensificar el lugar de unión forma 13 interacciones con *Sc*AHAS y 18 con *At*AHAS (Tabla 5) (Lonhienne et al., 2018).

<i>Sc</i> _CSU	MIRQSTLKNFAIKRCFQHIAYRNT PAMRS--VALA-QRF-----YSSSSRY---Y	44
<i>At</i> _CSU	MAAATTTT-----TTSSSISFSTKPSPPSSSKSPLPISRFSLPFSLNPNKSSSSSRRRGIK	55
<i>Mt</i> _CSU	-----	0
<i>Sc</i> _CSU	SASP--LPASKRPEPAPSFNVDPLEQPAEPSKLAKKLRAEPDMDTSFVGLTGGQIFNEMM	102
<i>At</i> _CSU	SSSPSSISAVLNTTNTVTTTPSP----TKPTKPET----FISRFAPDQPRKGADILVEAL	107
<i>Mt</i> _CSU	MSAPTK-----PHSPTFKPEPHSAANEPKHPAA-----RPKHVALQQLTGAQAVIRSL	48
	P60 G62 A63	
<i>Sc</i> _CSU	SRQNVDTVFGYPCGAILPVYDAIHNSDKFNFLPKHEQGAGHMAEGYARASGKPGVVLVT	162
<i>At</i> _CSU	ERQGVETVFAYPCGASMEIHQALTRSSSIRNVLP RHEQGGVFAAEGYARSSGKPGICIAI	167
<i>Mt</i> _CSU	EELGVDVIFGIPCGAVLPVYDPLFDSKLRHVLVRHEQGAGHAASGYAHVTGRVGVCMAT	108
	P111 G112 N115 S127 V137 G138 D145 A146 F147 Q148	
<i>Sc</i> _CSU	SGPGATNLVVTPMADAFADGIPMVVFTGQVPTSAIGTDAFQCEADVVGISRSCTKWNVMVKS	222
<i>At</i> _CSU	SGPGATNLVSGGLADALLDSVPLVAITGQVPRRMIGTDAFQETPIIVEVTRSRITKHNLYLMD	227
<i>Mt</i> _CSU	SGPGATNLVTPLADAQMDSIPVVAITGQVGRGLIGTDAFQCEADISGITMPITKHNFLVRS	168
	K197	
<i>Sc</i> _CSU	VEELPLRINEAFEIATSGRPGPVLVDLKKDVTAAILRNPIPTKTTLPSNALNQLTSRAQD	282
<i>At</i> _CSU	VEDIPRIIEEAFFLATSGRPGPVLVDVFKDIQQQLAIPNWEQAMRLPGYMSRM-----PK	282
<i>Mt</i> _CSU	GDDIPRVLAEAFHIAASGRPGAVLVDIEKDLVLDGQCTFSWPPRMELPGYKPN-----	221
	G247 T272 L273	
<i>Sc</i> _CSU	EFVMSINKAADLINLAKKPVLYVGGILNHADGPRLLKELSDRAQIPVTTTIQGLGSFD	342
<i>At</i> _CSU	PPEDSHLEQIVRLISESKKPVLYVGGCLNS---SDELGRFVELTGIPVASTIMGLGSYP	339
<i>Mt</i> _CSU	KPHSRQVREAAKLIAAARKPVLYVGGVIRGEA-TEQLRELAELTGIPVVTIMMARGAFP	280
	P290 M292 H293 T313 R314 D316 D317 R318	
<i>Sc</i> _CSU	QEDPKSLDMIGMHGCATANLAVQNADLIIAVGARFDDRVVTGNISKFAPEARRAAAEGRGG	402
<i>At</i> _CSU	CDDELSLHMLGMHGTVYANYAVEHSDLLAFGVRFDDRVVTGKLEAFASRAK-----	390
<i>Mt</i> _CSU	DHRQNLGMPCMHGTVAAVAALQRSDLLIALGTFFDDRVVTGKLDSFAPEAK-----	331
	D336 P339 I342 D355 V356	
<i>Sc</i> _CSU	IIHFVSEKNIKVVQTQIAVEGDATNLGKMMSKI-----FPVKERSEWFAQINKWKKE	457
<i>At</i> _CSU	IVHIDIISAETIGKNTPHVSVCGDVKLLALQGMNKVLENRAEELKLDPGVWRNELNVQKQK	450
<i>Mt</i> _CSU	VIHADIDEAETIGKNRHADVPIVGDVKAVITELIAMLRHHHIPGTIEMADWWAYLNGVRKT	391
	Q429 H430	
<i>Sc</i> _CSU	YPYAYMEETPGSKIKPQTVIKKLSKVANDTGRHVIVTTGVGQHQMWAQHWTRNPHTFI	517
<i>At</i> _CSU	FPLSFKTFG--EAI PPQYAIKVLDEL---DGKAIISTGVGQHQMWAQFYNYKKPRQWL	505
<i>Mt</i> _CSU	YPLSYGPQSD-GSLSPYVIEKLG EIA---GPDVAVFVAGVGQHQMWAQFIRYKPRSWL	447

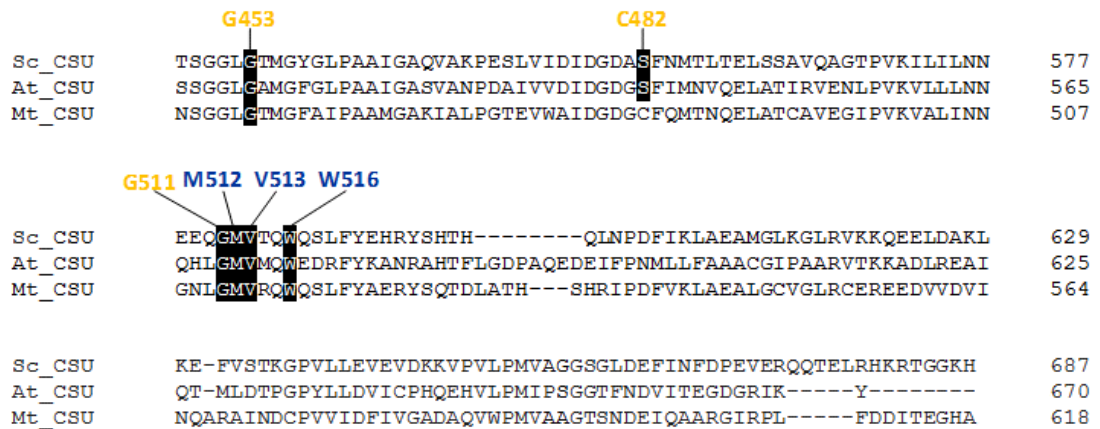


Figura 12. Alineamiento múltiple de secuencias de *Sc*CSU, *At*CSU y *Mt*CSU.

Aminoácidos involucrados en interacciones con RSU (naranja), Aminoácidos con unión a PS (azul), aminoácidos con unión a FAD (marrón) (cadena N), aminoácidos con unión a ThDP (amarillo). Aminoácidos altamente conservados (sombreados en negro), aminoácidos conservados (sombreados en gris), no conservados (se mantienen sombreados en blanco).

Tabla 5. Residuos del sitio de unión de herbicidas en diferentes AHAS que forman interacciones con PS

<i>Mt</i> AHAS ^b	<i>Sc</i> AHAS ^a	Interacciones con PS ^a	<i>At</i> AHAS ^a	Interacciones con PS ^a
Gly62	Gly116	*	Gly121	*
Ala63	Ala117	*	Ala122	*
Ser109	Ser163	--	Ser168	*
Val137	Val191	*	Val196	*
Gly138	Pro192	*	Pro197	*
Arg140	Ser194	--	Arg199	*
Leu141	Ala195	--	Met200	*
Ala146	Ala200	*	Ala205	*
Phe147	Phe201	*	Phe206	*
Lys197	Lys251	*	Lys256	*
Met292	Met354	*	Met351	*
Asp317	Asp 379	*	Asp 376	*
Arg 318	Arg 380	*	Arg 377	*
Met512	Met582	*	Met570	*
Val513	Val583	*	Val571	*
Trp516	Trp586	*	Trp574	*
Ala593	Gly657	--	Ser653	*
Gly594	Gly658	--	Gly654	*

^a Se indican los aminoácidos involucrados en las interacciones del sitio de unión con PS (tanto en *A. thaliana* como *S. cerevisiae*) (Lonhienne et al., 2018). ^b Interacciones inferidas en el presente estudio asumiendo la presencia de las interacciones que se observan en *Sc*AHAS o *At*AHAS. * = interactúa con el herbicida; -- = no interactúa con el herbicida.

Con el alineamiento establecido en ambas subunidades se analizó las matrices de porcentaje de identidad (Tablas 6 y 7) generadas en Clustal Omega. En la subunidad regulatoria existe mayor afinidad entre *At_RSU_R1* y *Mt_RSU* con el 42.77%. De la misma manera, para CSU el mayor valor de identidad es igual a 44.85% entre *At_CSU* y *Mt_CSU*. Con este resultado se creería que el modelo del que se debe partir para generar el complejo de *MtAHAS* debería ser el complejo AHAS de *A. thaliana*. Sin embargo, el programa bioinformático Swiss-Model estableció que la estructura con código PDB 6u9d.1, correspondiente al complejo *ScAHAS*, es la mejor plantilla base para la construcción del modelo tridimensional del complejo *MtAHAS* (Figura 13). Esta determinación fue establecida considerando la calidad global y estructura secundaria de la proteína en relación a la estructura plantilla.

Tabla 6. Matriz de identidad en RSU

Organismos	%			
	<i>Sc_RSU</i>	<i>At_RSU_R1</i>	<i>At_RSU_R2</i>	<i>Mt_RSU</i>
<i>Sc_RSU</i>	100.00	25.00	30.77	36.31
<i>At_RSU_R1</i>	25.00	100.00	39.22	42.77
<i>At_RSU_R2</i>	30.77	39.22	100.00	38.36
<i>Mt_RSU</i>	36.31	42.77	38.36	100.00

Tabla 7. Matriz de identidad en CSU

Organismos	%		
	<i>Sc_CSU</i>	<i>At_CSU</i>	<i>Mt_CSU</i>
<i>Sc_CSU</i>	100.00	41.00	42.98
<i>At_CSU</i>	41.00	100.00	44.85
<i>Mt_CSU</i>	42.98	44.85	100.00

3.1.3 Construcción del modelo tridimensional *MtAHAS*

Tras realizar el alineamiento múltiple de secuencias e identificar los valores de identidad, en el espacio de trabajo de Swiss-Model se ingresó la secuencia de *MtAHAS*. En este lugar, el primer paso fue la selección de posibles plantillas al analizar las secuencias de aminoácidos proporcionadas correspondientes a *Mt_RSU* y *Mt_CSU*. Durante esta evaluación Swiss-Model emplea programas complementarios en los que la comparación de las secuencias otorga alta sensibilidad y exactitud. Al realizar comparaciones entre las secuencias objetivo y la base de datos del Protein Data

Bank (PDB) es mucho más probable hallar una proteína homóloga con estructura previamente establecida, y de esta forma sea posible obtener un modelo más exacto. Además, el algoritmo de alineamiento múltiple de Swiss-Model permite predecir desde las estructuras secundarias y terciarias hasta residuos funcionales y la interacción entre sus motifs (**Söding & Remmert, 2011**).

La robustez de la búsqueda que realiza Swiss-Model se basa en los algoritmos BLAST y HHblits. El primero es una herramienta básica que se encuentra en continuo mejoramiento, muy empleada por su rapidez y el otorgamiento adicional de un valor estadístico con el que se conoce el grado de significancia de cada alineamiento (**Camacho et al., 2009**). Por otro lado, HHblits pertenece al paquete de software de HH-suite. Esta base de datos es mucho más sensible que BLAST, en parte a su “perfil de secuencia” con el cual se compara la secuencia objetivo con alineamientos de secuencia múltiple (MSA) que otorga puntuaciones cuando existen aa sustituidos. Así, estos valores determinan el perfil de secuencia mediante modelo oculto de Márkov (HMM). Este modelo estadístico es capaz de establecer parámetros desconocidos al ensayar las deleciones o inserciones en el MSA (**Steinegger et al., 2019**).

Swiss-Model cotejó 84 plantillas mediante los programas BLAST y HHblits que alinearon la secuencia objetivo con secuencias similares proporcionadas por la base de datos. La plantilla resaltada en rojo (Figura 13) fue la que mayores valores de GMQE (0.72) y QSQE (0.49) presentó. El valor de Estimación de la Calidad Global del Modelo (GMQE) puede variar entre 0 y 1, siendo 1 el más alto. Este indicador, comprende la alineación de la secuencia objetivo y secuencias plantilla al analizarlas por medio de un perceptrón multicapa, otorgando la fidelidad del modelo que se puede obtener al cubrir distintas regiones de la secuencia objetivo (**Waterhouse et al., 2018**). Por otro lado, la Estimación de la Calidad de la Estructura Cuaternaria (QSQE) representa la calidad que se puede esperar del modelo al compaginar los contactos que se establecen entre las cadenas de la estructura, y generan la estructura cuaternaria de la proteína. Este cotejo, toma como parámetro los contactos compartidos de la interfaz de las dos estructuras con una distancia menor a 12 Å (residuos intercatenarios C β -C β). Al igual que GMQE, la puntuación se encuentra entre 0-1, donde 1 corresponde

a modelos de estequiometría idéntica y contactos en la interfaz altamente similares (Bertoni, Kiefer, Biasini, Bordoli, & Schwede, 2017).

Al evaluar GMQE y QSQE se seleccionó el modelo 6u9d.1 correspondiente a la enzima ScAHAS, la cual tiene una estructura hetero-8-8-mero. De hecho, los primeros 15 modelos (6u9d.1 y 6u9d.2) generados por Swiss-Model tomaron como plantilla la estructura de AHAS de *S. cerevisiae*. La única diferencia entre dichos modelos fueron ciertas variaciones entre los ligandos presentes en el complejo y la cobertura de secuencia. Por consiguiente, hubieron variaciones en los valores de GMQE y QSQE. Desde el modelo número 16 hasta el 31, los modelos con los que se cotejó se basaron en la estructura de AHAS de *A. thaliana* en unión a distintos ligandos. La más grande diferencia radica en la composición de la RSU en AtAHAS, la cual le otorga una organización oligomérica hetero-8-4-mero. Conforme desciende la posición de los posibles candidatos se observa una variación entre: híbridos de *C. neoformans* y *S. cerevisiae*, holoenzimas, y otros modelos de *A. thaliana* y *S. cerevisiae*, con unión a diferentes ligandos (Anexo 1). El modelo del complejo MtAHAS generado en este estudio fue obtenido a partir de la plantilla 6u9d.1, con la cual se aseguró la mayor cobertura de secuencias y mejores estadísticas de calidad.

Models	Name	Coverage	Range	Seq Id	Oligo-state	Description	Ligands	Method	Resolution	Seq Similarity	Found by	GMQE	QSQE
6u9d.1		0.95	2 - 165 9 - 600	43.41	hetero-8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	8 x TPP, 12 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP		3.19	0.41	BLAST / HHblits	0.72	0.49
6u9d.1		0.95	2 - 165 9 - 600	43.41	hetero-8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	8 x TPP, 12 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP		3.19	0.41	BLAST / HHblits	0.72	
6u9d.1		0.95	2 - 165 9 - 600	43.41	hetero-8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	8 x TPP, 12 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP		3.19	0.41	BLAST / HHblits	0.72	
6u9d.1		0.95	2 - 165 9 - 600	43.41	hetero-8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	8 x TPP, 12 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP		3.19	0.41	BLAST / HHblits	0.72	0.49
6u9d.2		0.95	2 - 165 9 - 600	43.41	hetero-8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	6 x TPP, 8 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP		3.19	0.41	BLAST / HHblits	0.56	

Figura 13. Reporte de las plantillas. Primeros 5 modelos con los que se comparó el alineamiento de MtAHAS. Se ubican en orden descendente, en base a QMQE, QSQE, y la cobertura de la secuencia de MtAHAS.

El alineamiento entre cada cadena de *Mt*AHAS (model_01) y *Sc*AHAS (6u9d.1) se puede observar en las figuras 14 (RSU) y 15 (CSU). Aquí se puede identificar la predicción de la estructura secundaria de *Mt*AHAS de acuerdo con la identidad de secuencia además de la calidad del alineamiento mediante un esquema de colores: azul (mayor calidad) y naranja (baja calidad).

La identidad total del complejo con *Mt*AHAS se estimó en 0.40. Para la subunidad catalítica se estableció un mayor valor de identidad y similaridad al situarse en 42.8 y 0.41, respectivamente. En el caso de la subunidad regulatoria para las mismas variables se reportaron valores de 36.3 y 0.39 (Tabla 8). Estos resultados indican que existe más variación entre los residuos de la subunidad pequeña de AHAS en comparación a la subunidad catalítica y por ende la arquitectura de *Mt*RSU podría ser algo diferente a lo observado en *Sc*RSU y a lo modelado por Swiss-Model. En la tabla 8 también se detallan las características de la estructura plantilla (6u9d.1) para generar el modelo de *Mt*AHAS, la cual como se mencionó anteriormente corresponde a la estructura cristalina del complejo *Sc*AHAS (hetero-16-mero) la cual se determinó por difracción de rayos X en presencia de sus cofactores: ThDP, FAD, ATP e ion magnesio. Así mismo, se detallan los valores de GMQE para cada cadena del complejo *Mt*AHAS es igual a 0.73, a excepción de la cadena J que muestra un valor de 0.72.

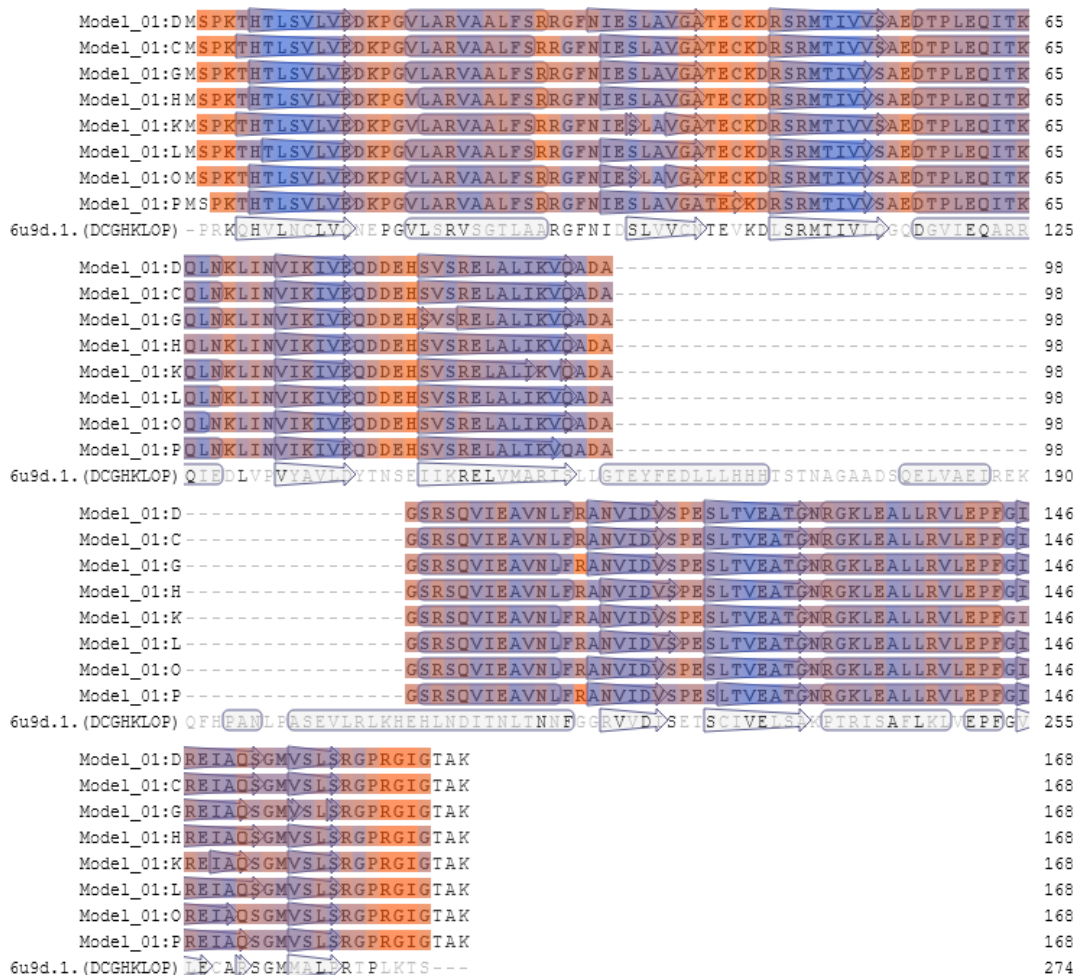


Figura 14. Alineamiento entre el modelo y 6u9d.1. Subunidad regulatoria, cadenas DCGHKLOP. El esquema de color indica azul (mayor calidad de alineamiento), naranja (baja calidad).

Model_01:AMSAPTKPHSPTFKPEPHSAANEPKHP AARPKHVALQQLTGAQAVIRSLEELGVDVIFGTPGGAVL 65
 Model_01:BMSAPTKPHSPTFKPEPHSAANE PKHFAARPKHVALQQLTGAQAVIRSLEELGVDVIFGTPGGAVL 65
 Model_01:EMSAPTKPHSPTFKPEPHSAANEPKHFAARPKHVALQQLTGAQAVIRSLEELGVDVIFGTPGGAVL 65
 Model_01:FMSAPTKPHSPTFKPEPHSAANEPKHP AARPKHVALQQLTGAQAVIRSLEELGVDVIFGTPGGAVL 65
 Model_01:IMSAPTKPHSPTFKPEPHSAANEPKHP AARPKHVALQQLTGAQAVIRSLEELGVDVIFGTPGGAVL 65
 Model_01:JMSAPTKPHSPTFKPEPHSAANEPKHP AARPKHVALQQLTGAQAVIRSLEELGVDVIFGTPGGAVL 65
 Model_01:MMSAPTKPHSPTFKPEPHSAANEPKHPAARPKHVALQQLTGAQAVIRSLEELGVDVIFGTPGGAVL 65
 Model_01:NMSAPTKPHSPTFKPEPHSAANEPKHFAARPKHVALQQLTGAQAVIRSLEELGVDVIFGTPGGAVL 65
 6u9d.1.A -----DPLEQPAEPSKLAKKLRAEP-D---M>TSFVGLTGGQIFNEMMSRQNVDTVFGY PGGAIL 76
 6u9d.1.B -----DPLEQPAEPSKLAKKLRAEP-D---M>TSFVGLTGGQIFNEMMSRQNVDTVFGY PGGAIL 76
 6u9d.1.E -----DPLEQPAEPSKLAKKLRAEP-D---M>TSFVGLTGGQIFNEMMSRQNVDTVFGY PGGAIL 76
 6u9d.1.F -----DPLEQPAEPSKLAKKLRAEP-D---M>TSFVGLTGGQIFNEMMSRQNVDTVFGY PGGAIL 76
 6u9d.1.I -----DPLEQPAEPSKLAKKLRAEP-D---M>TSFVGLTGGQIFNEMMSRQNVDTVFGY PGGAIL 76
 6u9d.1.J -----DPLEQPAEPSKLAKKLRAEP-D---M>TSFVGLTGGQIFNEMMSRQNVDTVFGY PGGAIL 76
 6u9d.1.M -----DPLEQPAEPSKLAKKLRAEP-D---M>TSFVGLTGGQIFNEMMSRQNVDTVFGY PGGAIL 76
 6u9d.1.N -----DPLEQPAEPSKLAKKLRAEP-D---M>TSFVGLTGGQIFNEMMSRQNVDTVFGY PGGAIL 76
 Model_01:A PVYDPLFDSKKLRHVLRHEQGAGHAASGYAHVTGRVGVCMATSGPGATNLVTPLADAQMSIPV 130
 Model_01:B PVYDPLFDSKKLRHVLRHEQGAGHAASGYAHVTGRVGVCMATSGPGATNLVTPLADAQMSIPV 130
 Model_01:E PVYDPLFDSKKLRHVLRHEQGAGHAASGYAHVTGRVGVCMATSGPGATNLVTPLADAQMSIPV 130
 Model_01:F PVYDPLFDSKKLRHVLRHEQGAGHAASGYAHVTGRVGVCMATSGPGATNLVTPLADAQMSIPV 130
 Model_01:I PVYDPLFDSKKLRHVLRHEQGAGHAASGYAHVTGRVGVCMATSGPGATNLVTPLADAQMSIPV 130
 Model_01:J PVYDPLFDSKKLRHVLRHEQGAGHAASGYAHVTGRVGVCMATSGPGATNLVTPLADAQMSIPV 130
 Model_01:M PVYDPLFDSKKLRHVLRHEQGAGHAASGYAHVTGRVGVCMATSGPGATNLVTPLADAQMSIPV 130
 Model_01:N PVYDPLFDSKKLRHVLRHEQGAGHAASGYAHVTGRVGVCMATSGPGATNLVTPLADAQMSIPV 130
 6u9d.1.A PVYDAIHNSDKFNEVLPKHEQGAGHMAEGYARASGKPEGVVLTSGPGATNVVTPMADAFADGIPV 141
 6u9d.1.B PVYDAIHNSDKFNEVLPKHEQGAGHMAEGYARASGKPEGVVLTSGPGATNVVTPMADAFADGIPV 141
 6u9d.1.E PVYDAIHNSDKFNEVLPKHEQGAGHMAEGYARASGKPEGVVLTSGPGATNVVTPMADAFADGIPV 141
 6u9d.1.F PVYDAIHNSDKFNEVLPKHEQGAGHMAEGYARASGKPEGVVLTSGPGATNVVTPMADAFADGIPV 141
 6u9d.1.I PVYDAIHNSDKFNEVLPKHEQGAGHMAEGYARASGKPEGVVLTSGPGATNVVTPMADAFADGIPV 141
 6u9d.1.J PVYDAIHNSDKFNEVLPKHEQGAGHMAEGYARASGKPEGVVLTSGPGATNVVTPMADAFADGIPV 141
 6u9d.1.M PVYDAIHNSDKFNEVLPKHEQGAGHMAEGYARASGKPEGVVLTSGPGATNVVTPMADAFADGIPV 141
 6u9d.1.N PVYDAIHNSDKFNEVLPKHEQGAGHMAEGYARASGKPEGVVLTSGPGATNVVTPMADAFADGIPV 141
 Model_01:A VAITGOVGRGLIGTDAFQEADISGITMPITKHNFLVRSRDDIPRVLAFAFHIAASGRPGAVLVDI 195
 Model_01:B VAITGOVGRGLIGTDAFQEADISGITMPITKHNFLVRSRDDIPRVLAFAFHIAASGRPGAVLVDI 195
 Model_01:E VAITGOVGRGLIGTDAFQEADISGITMPITKHNFLVRSRDDIPRVLAFAFHIAASGRPGAVLVDI 195
 Model_01:F VAITGOVGRGLIGTDAFQEADISGITMPITKHNFLVRSRDDIPRVLAFAFHIAASGRPGAVLVDI 195
 Model_01:I VAITGOVGRGLIGTDAFQEADISGITMPITKHNFLVRSRDDIPRVLAFAFHIAASGRPGAVLVDI 195
 Model_01:J VAITGOVGRGLIGTDAFQEADISGITMPITKHNFLVRSRDDIPRVLAFAFHIAASGRPGAVLVDI 195
 Model_01:M VAITGOVGRGLIGTDAFQEADISGITMPITKHNFLVRSRDDIPRVLAFAFHIAASGRPGAVLVDI 195
 Model_01:N VAITGOVGRGLIGTDAFQEADISGITMPITKHNFLVRSRDDIPRVLAFAFHIAASGRPGAVLVDI 195
 6u9d.1.A VVFTGOVPTSAIGTDAFQEADVVGISRSTCKNVLVKSVEELPLRINEAFEIATSGRPGFVLVDI 206
 6u9d.1.B VVFTGOVPTSAIGTDAFQEADVVGISRSTCKNVLVKSVEELPLRINEAFEIATSGRPGFVLVDI 206
 6u9d.1.E VVFTGOVPTSAIGTDAFQEADVVGISRSTCKNVLVKSVEELPLRINEAFEIATSGRPGFVLVDI 206
 6u9d.1.F VVFTGOVPTSAIGTDAFQEADVVGISRSTCKNVLVKSVEELPLRINEAFEIATSGRPGFVLVDI 206
 6u9d.1.I VVFTGOVPTSAIGTDAFQEADVVGISRSTCKNVLVKSVEELPLRINEAFEIATSGRPGFVLVDI 206
 6u9d.1.J VVFTGOVPTSAIGTDAFQEADVVGISRSTCKNVLVKSVEELPLRINEAFEIATSGRPGFVLVDI 206
 6u9d.1.M VVFTGOVPTSAIGTDAFQEADVVGISRSTCKNVLVKSVEELPLRINEAFEIATSGRPGFVLVDI 206
 6u9d.1.N VVFTGOVPTSAIGTDAFQEADVVGISRSTCKNVLVKSVEELPLRINEAFEIATSGRPGFVLVDI 206
 Model_01:A PKDVLOGCTFSWPPRMELPG -----YKPNTKPHSRQVREAAKLIAAARKPVLYYGGGVIR-G 252
 Model_01:B PKDVLOGCTFSWPPRMELPG -----YKPNTKPHSRQVREAAKLIAAARKPVLYYGGGVIR-G 252
 Model_01:E PKDVLOGCTFSWPPRMELPG -----YKPNTKPHSRQVREAAKLIAAARKPVLYYGGGVIR-G 252
 Model_01:F PKDVLOGCTFSWPPRMELPG -----YKPNTKPHSRQVREAAKLIAAARKPVLYYGGGVIR-G 252
 Model_01:I PKDVLOGCTFSWPPRMELPG -----YKPNTKPHSRQVREAAKLIAAARKPVLYYGGGVIR-G 252
 Model_01:J PKDVLOGCTFSWPPRMELPG -----YKPNTKPHSRQVREAAKLIAAARKPVLYYGGGVIR-G 252
 Model_01:M PKDVLOGCTFSWPPRMELPG -----YKPNTKPHSRQVREAAKLIAAARKPVLYYGGGVIR-G 252
 Model_01:N PKDVLOGCTFSWPPRMELPG -----YKPNTKPHSRQVREAAKLIAAARKPVLYYGGGVIR-G 252
 6u9d.1.A PKDVTAAALRNPEPTKTTLP SNALNQLTSRAQDEFVMSINKAADLINLAKKPVLYYGGGIDNHA 271
 6u9d.1.B PKDVTAAALRNPEPTKTTLP SNALNQLTSRAQDEFVMSINKAADLINLAKKPVLYYGGGIDNHA 271
 6u9d.1.E PKDVTAAALRNPEPTKTTLP SNALNQLTSRAQDEFVMSINKAADLINLAKKPVLYYGGGIDNHA 271
 6u9d.1.F PKDVTAAALRNPEPTKTTLP SNALNQLTSRAQDEFVMSINKAADLINLAKKPVLYYGGGIDNHA 271
 6u9d.1.I PKDVTAAALRNPEPTKTTLP SNALNQLTSRAQDEFVMSINKAADLINLAKKPVLYYGGGIDNHA 271
 6u9d.1.J PKDVTAAALRNPEPTKTTLP SNALNQLTSRAQDEFVMSINKAADLINLAKKPVLYYGGGIDNHA 271
 6u9d.1.M PKDVTAAALRNPEPTKTTLP SNALNQLTSRAQDEFVMSINKAADLINLAKKPVLYYGGGIDNHA 271
 6u9d.1.N PKDVTAAALRNPEPTKTTLP SNALNQLTSRAQDEFVMSINKAADLINLAKKPVLYYGGGIDNHA 271

Model_01:A **EATEQLRELAELTGIPVVTLMARGAFPDSHRONLGMPPGMHGTVAAVAALQRSDLLIAIGTRFDD** 317
 Model_01:B **EATEQLRELAELTGIPVVTLMARGAFPDSHRONLGMPPGMHGTVAAVAALQRSDLLIAIGTRFDD** 317
 Model_01:E **EATEQLRELAELTGIPVVTLMARGAFPDSHRONLGMPPGMHGTVAAVAALQRSDLLIAIGTRFDD** 317
 Model_01:F **EATEQLRELAELTGIPVVTLMARGAFPDSHRONLGMPPGMHGTVAAVAALQRSDLLIAIGTRFDD** 317
 Model_01:I **EATEQLRELAELTGIPVVTLMARGAFPDSHRONLGMPPGMHGTVAAVAALQRSDLLIAIGTRFDD** 317
 Model_01:J **EATEQLRELAELTGIPVVTLMARGAFPDSHRONLGMPPGMHGTVAAVAALQRSDLLIAIGTRFDD** 317
 Model_01:M **EATEQLRELAELTGIPVVTLMARGAFPDSHRONLGMPPGMHGTVAAVAALQRSDLLIAIGTRFDD** 317
 Model_01:N **EATEQLRELAELTGIPVVTLMARGAFPDSHRONLGMPPGMHGTVAAVAALQRSDLLIAIGTRFDD** 317
 6u9d.1.A **GPRLKELSDBAQIPVITLQGLGSFDQEDPKSLDMLGMHGCATANLAVQNADLLIAGARFDD** 336
 6u9d.1.B **GPRLKELSDBAQIPVITLQGLGSFDQEDPKSLDMLGMHGCATANLAVQNADLLIAGARFDD** 336
 6u9d.1.E **GPRLKELSDBAQIPVITLQGLGSFDQEDPKSLDMLGMHGCATANLAVQNADLLIAGARFDD** 336
 6u9d.1.F **GPRLKELSDBAQIPVITLQGLGSFDQEDPKSLDMLGMHGCATANLAVQNADLLIAGARFDD** 336
 6u9d.1.I **GPRLKELSDBAQIPVITLQGLGSFDQEDPKSLDMLGMHGCATANLAVQNADLLIAGARFDD** 336
 6u9d.1.J **GPRLKELSDBAQIPVITLQGLGSFDQEDPKSLDMLGMHGCATANLAVQNADLLIAGARFDD** 336
 6u9d.1.M **GPRLKELSDBAQIPVITLQGLGSFDQEDPKSLDMLGMHGCATANLAVQNADLLIAGARFDD** 336
 6u9d.1.N **GPRLKELSDBAQIPVITLQGLGSFDQEDPKSLDMLGMHGCATANLAVQNADLLIAGARFDD** 336
 Model_01:A **RVTGKLD SFAP E** ----- **AKVIHADIDPAEIGKNRHADVPIVGDVKAVITELIAMLRHHHIP** 373
 Model_01:B **RVTGKLD SFAP E** ----- **AKVIHADIDPAEIGKNRHADVPIVGDVKAVITELIAMLRHHHIP** 373
 Model_01:E **RVTGKLD SFAP E** ----- **AKVIHADIDPAEIGKNRHADVPIVGDVKAVITELIAMLRHHHIP** 373
 Model_01:F **RVTGKLD SFAP E** ----- **AKVIHADIDPAEIGKNRHADVPIVGDVKAVITELIAMLRHHHIP** 373
 Model_01:I **RVTGKLD SFAP E** ----- **AKVIHADIDPAEIGKNRHADVPIVGDVKAVITELIAMLRHHHIP** 373
 Model_01:J **RVTGKLD SFAP E** ----- **AKVIHADIDPAEIGKNRHADVPIVGDVKAVITELIAMLRHHHIP** 373
 Model_01:M **RVTGKLD SFAP E** ----- **AKVIHADIDPAEIGKNRHADVPIVGDVKAVITELIAMLRHHHIP** 373
 Model_01:N **RVTGKLD SFAP E** ----- **AKVIHADIDPAEIGKNRHADVPIVGDVKAVITELIAMLRHHHIP** 373
 6u9d.1.A **RVTGNISKFAPARRAAEGRG** **GIIHFVS** **PKN** **INKVVQTCIAV** **GDATTNLGKMMS** **IFPVK** -- 399
 6u9d.1.B **RVTGNISKFAPARRAAEGRG** **GIIHFVS** **PKN** **INKVVQTCIAV** **GDATTNLGKMMS** **IFPVK** -- 399
 6u9d.1.E **RVTGNISKFAPARRAAEGRG** **GIIHFVS** **PKN** **INKVVQTCIAV** **GDATTNLGKMMS** **IFPVK** -- 399
 6u9d.1.F **RVTGNISKFAPARRAAEGRG** **GIIHFVS** **PKN** **INKVVQTCIAV** **GDATTNLGKMMS** **IFPVK** -- 399
 6u9d.1.I **RVTGNISKFAPARRAAEGRG** **GIIHFVS** **PKN** **INKVVQTCIAV** **GDATTNLGKMMS** **IFPVK** -- 399
 6u9d.1.J **RVTGNISKFAPARRAAEGRG** **GIIHFVS** **PKN** **INKVVQTCIAV** **GDATTNLGKMMS** **IFPVK** -- 399
 6u9d.1.M **RVTGNISKFAPARRAAEGRG** **GIIHFVS** **PKN** **INKVVQTCIAV** **GDATTNLGKMMS** **IFPVK** -- 399
 6u9d.1.N **RVTGNISKFAPARRAAEGRG** **GIIHFVS** **PKN** **INKVVQTCIAV** **GDATTNLGKMMS** **IFPVK** -- 399
 Model_01:A **GTIEMADWWAYLNGVRKTYPLSY** - **GPOS** **DGSL** **SPEYVIEKLGEIAGP** --- **DAVFVAVGVGQHQMWA** 434
 Model_01:B **GTIEMADWWAYLNGVRKTYPLSY** - **GPOS** **DGSL** **SPEYVIEKLGEIAGP** --- **DAVFVAVGVGQHQMWA** 434
 Model_01:E **GTIEMADWWAYLNGVRKTYPLSY** - **GPOS** **DGSL** **SPEYVIEKLGEIAGP** --- **DAVFVAVGVGQHQMWA** 434
 Model_01:F **GTIEMADWWAYLNGVRKTYPLSY** - **GPOS** **DGSL** **SPEYVIEKLGEIAGP** --- **DAVFVAVGVGQHQMWA** 434
 Model_01:I **GTIEMADWWAYLNGVRKTYPLSY** - **GPOS** **DGSL** **SPEYVIEKLGEIAGP** --- **DAVFVAVGVGQHQMWA** 434
 Model_01:J **GTIEMADWWAYLNGVRKTYPLSY** - **GPOS** **DGSL** **SPEYVIEKLGEIAGP** --- **DAVFVAVGVGQHQMWA** 434
 Model_01:M **GTIEMADWWAYLNGVRKTYPLSY** - **GPOS** **DGSL** **SPEYVIEKLGEIAGP** --- **DAVFVAVGVGQHQMWA** 434
 Model_01:N **GTIEMADWWAYLNGVRKTYPLSY** - **GPOS** **DGSL** **SPEYVIEKLGEIAGP** --- **DAVFVAVGVGQHQMWA** 434
 6u9d.1.A --- ER **SEWFAQINKWK** **KEYPAYMEETPGSKIK** **PQTVIKKLSKVANDTGRHVIVT** **GVGQHQMWA** 461
 6u9d.1.B --- ER **SEWFAQINKWK** **KEYPAYMEETPGSKIK** **PQTVIKKLSKVANDTGRHVIVT** **GVGQHQMWA** 461
 6u9d.1.E --- ER **SEWFAQINKWK** **KEYPAYMEETPGSKIK** **PQTVIKKLSKVANDTGRHVIVT** **GVGQHQMWA** 461
 6u9d.1.F --- ER **SEWFAQINKWK** **KEYPAYMEETPGSKIK** **PQTVIKKLSKVANDTGRHVIVT** **GVGQHQMWA** 461
 6u9d.1.I --- ER **SEWFAQINKWK** **KEYPAYMEETPGSKIK** **PQTVIKKLSKVANDTGRHVIVT** **GVGQHQMWA** 461
 6u9d.1.J --- ER **SEWFAQINKWK** **KEYPAYMEETPGSKIK** **PQTVIKKLSKVANDTGRHVIVT** **GVGQHQMWA** 461
 6u9d.1.M --- ER **SEWFAQINKWK** **KEYPAYMEETPGSKIK** **PQTVIKKLSKVANDTGRHVIVT** **GVGQHQMWA** 461
 6u9d.1.N --- ER **SEWFAQINKWK** **KEYPAYMEETPGSKIK** **PQTVIKKLSKVANDTGRHVIVT** **GVGQHQMWA** 461
 Model_01:A **AQFIRYEKPRS** **WLN** **SGGLGTMGFAIPAAMGAKIALPGTEVWAID** **DGCFQMTNQELATCAVEGIP** 499
 Model_01:B **AQFIRYEKPRS** **WLN** **SGGLGTMGFAIPAAMGAKIALPGTEVWAID** **DGCFQMTNQELATCAVEGIP** 499
 Model_01:E **AQFIRYEKPRS** **WLN** **SGGLGTMGFAIPAAMGAKIALPGTEVWAID** **DGCFQMTNQELATCAVEGIP** 499
 Model_01:F **AQFIRYEKPRS** **WLN** **SGGLGTMGFAIPAAMGAKIALPGTEVWAID** **DGCFQMTNQELATCAVEGIP** 499
 Model_01:I **AQFIRYEKPRS** **WLN** **SGGLGTMGFAIPAAMGAKIALPGTEVWAID** **DGCFQMTNQELATCAVEGIP** 499
 Model_01:J **AQFIRYEKPRS** **WLN** **SGGLGTMGFAIPAAMGAKIALPGTEVWAID** **DGCFQMTNQELATCAVEGIP** 499
 Model_01:M **AQFIRYEKPRS** **WLN** **SGGLGTMGFAIPAAMGAKIALPGTEVWAID** **DGCFQMTNQELATCAVEGIP** 499
 Model_01:N **AQFIRYEKPRS** **WLN** **SGGLGTMGFAIPAAMGAKIALPGTEVWAID** **DGCFQMTNQELATCAVEGIP** 499

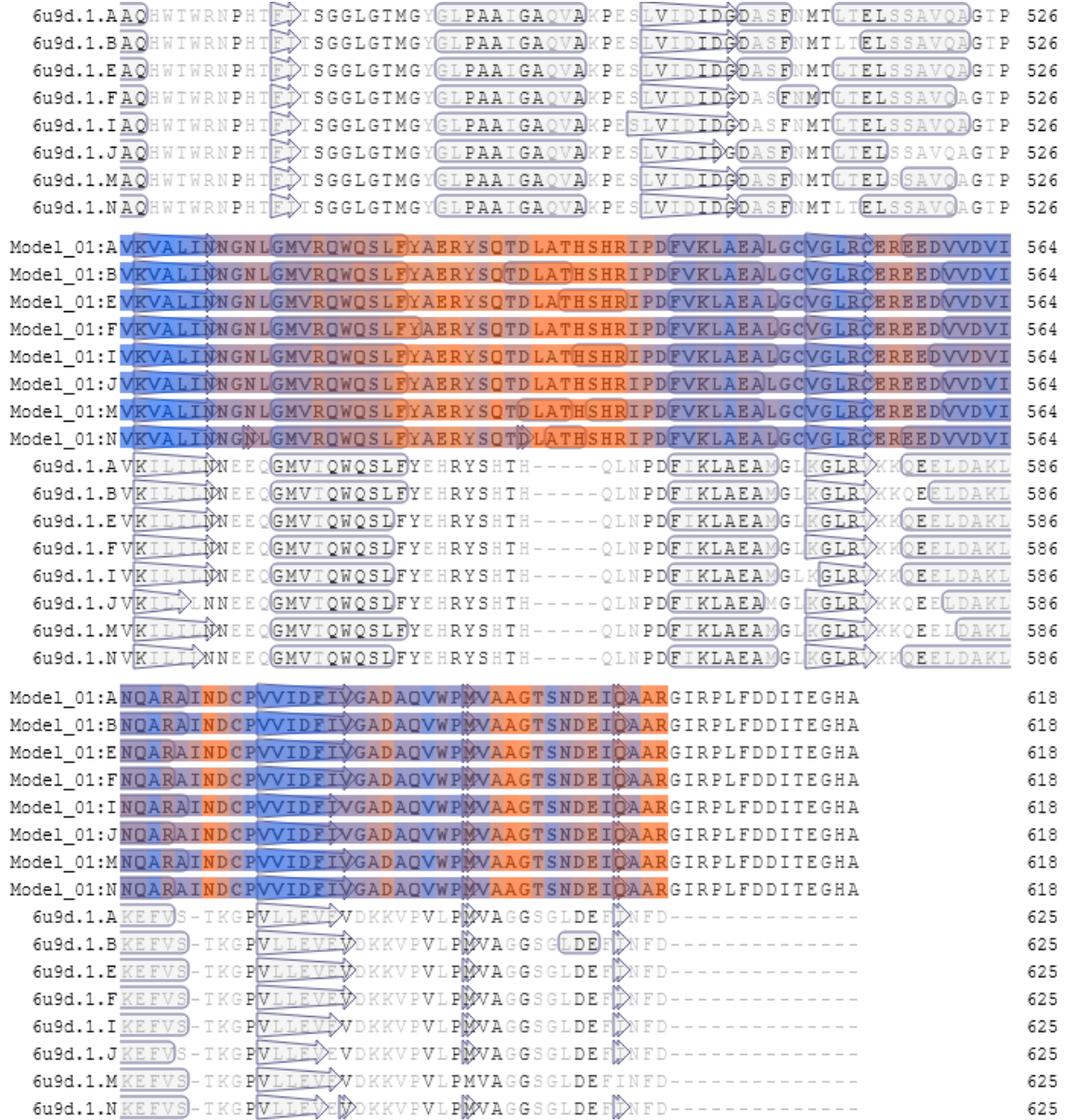
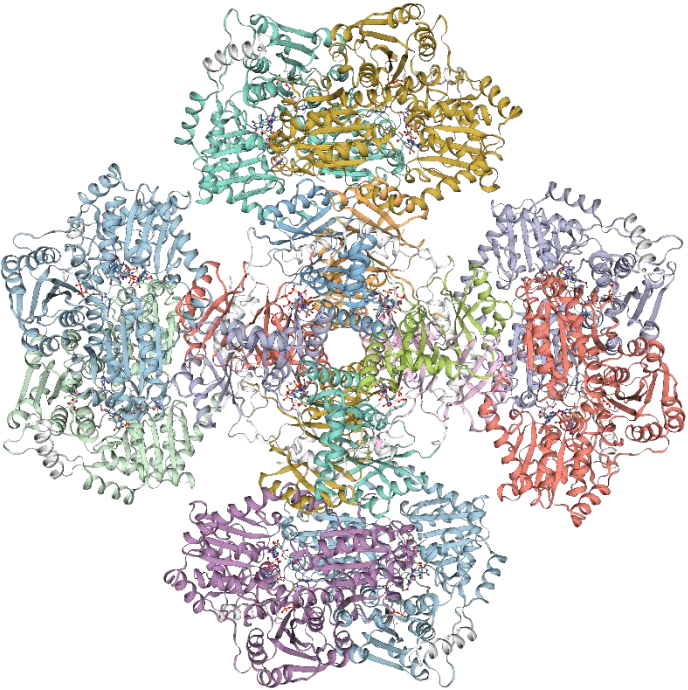


Figura 15. Alineamiento entre el modelo y 6u9d.1. Subunidad catalítica, cadenas ABEFIJMN. El esquema de color indica azul (mayor calidad de alineamiento), naranja (baja calidad).

Tabla 8. Reporte de la plantilla (6u9d.1 *Saccharomyces cerevisiae* acetohidroxiácido sintasa) empleada para la construcción del modelo

GMQE	QSQE	Identidad	Método	Biounidad	Ligandos
0.73	0.52	41.44	Rayos X, 3.2 Å	Hetero-16- mero	8 x TPP, 12 x MG, 8 x FAD, 8 x 60G, 8 x ATP
Estructura					
Similaridad de secuencia		0.40			
Predicción de target		Todas las cadenas se emplearon para construir el hetero-8-8-mero			
Subunidad pequeña de acetolactato sintasa	Cadenas	GMQE	Identidad	Similaridad	
	C,D, G,H, K,L, O,P	0.73, 0.73, 0.73,0.73, 0.73, 0.73, 0.73, 0.73	36.6	0.39	
Subunidad catalítica de acetolactato sintasa	Cadenas	GMQE	Identidad	Similaridad	
	A, B, E,F, I,J, M,N	0.73, 0.73, 0.73, 0.73, 0.73, 0.72, 0.73, 0.73	42.8	0.41	

Otro factor estimado para la obtención de la plantilla más similar, es el árbol de decisión y la huella dactilar PPI (Figura 16) en los que se analizaron los subsecuentes

modelos: hetero-8-4-mero (6u9h.1 y 6vz8.1), hetero-8-8-mero (6u9d.1 y 6u9d.2) y hetero-1-1-mero (6wo1.1 y 6lpi.1). Los modelos, 6u9h.1 (complejo de AHAS de *Arabidopsis thaliana*), 6vz8.1 (complejo de AHAS de *Arabidopsis thaliana* unido a valina), 6u9d.1 y 6u9d.2 (ambos de *S. cerevisiae*, con la diferencia de que 6u9d.2 posee 6 TPP y 8 Mg como ligandos, en lugar de 8 TPP y 12 Mg de 6u9d.1), 6wo1.1 (híbrido de AHAS, RSU de *S. cerevisiae*, y CSU perteneciente a *C. neoformans*), y 6lpi.1 (estructura cristalina de la holoenzima de AHAS).

En la Figura 16a se muestra la estructura de cada heterómero y el modelo al que corresponde. En la figura 16b se indica la interacción proteína-proteína (PPI) de los heterómeros mostrando en azul al hetero-8-4-mero, rojo al hetero-1-1-mero y verde al hetero-8-8-mero, de estas curvas la azul y verde poseen valores menores a 0. Este criterio indica que los residuos en la interfaz de cada subunidad de los citados modelos tienen baja capacidad de mutar, por lo que son los más adecuados para ser la plantilla del modelo objetivo. Estas curvas se denominan como huellas dactilares de interacción PPI, ya que muestran el impacto evolutivo entre los sitios de interacción. La particularidad que posee esta representación es que cuando la identidad de la secuencia va del 80 al 90%, la conservación de la interfaz tiende a 0 (por la poca variabilidad en MSA) (**Bertoni et al., 2017**). Con el fin de delimitar el análisis de interacción proteína-proteína, se examinó únicamente a las estructuras con los valores más altos de QSQE, las cuales fueron 6u9h.1 (0.58) y 6u9d.1 (0.52). Este factor de PPI muestra la precisión de la interacción entre las cadenas que puede existir al momento de construir el modelo.

Para obtener un esclarecimiento de la huella dactilar de PPI, se tomó como referencia dos puntos a partir de los cuales existe mayor variabilidad entre los heterómeros propuestos. Como se indica en la Figura 17a en el punto de corte 45 (identidad de secuencia) se aprecia un valor de 0.10 para el hetero-8-4-mero, mientras que para el hetero-8-8-mero es de -0.46. A diferencia de la Figura 17b en el punto de corte 60 se aprecia un valor de 0.23 para el hetero-8-4-mero, en contraste con el hetero-8-8-mero es de -0.39. Swiss-Model escogió el modelo hetero-8-8-mero ya que los valores son menores en ambos puntos. Además, para este modelo, conforme va ascendiendo los puntos de corte en las secuencias es perceptible un valor mayor de identidad de la

secuencia (Figura 16b). Como se mencionó anteriormente, mientras menor sea el valor de PPI es mayor el grado de conservación de las interfaces entre las subunidades y, por ende, menor el grado de sufrir una variabilidad.

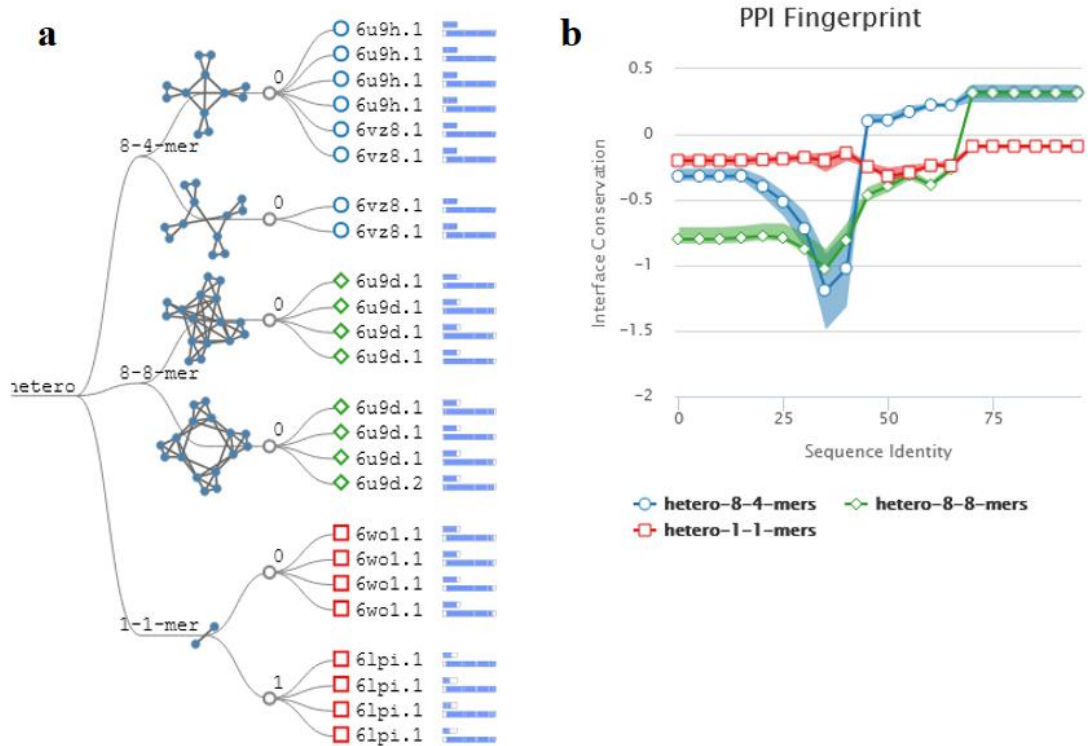


Figura 16. Estequiometría de las plantillas analizadas para la construcción del modelo.

16a) Se muestran los heterómeros considerados para realizar la identidad de secuencia, cada mero posee su valor de GSQE. 16b) Huella dactilar de interacción proteína-proteína, identidad de la secuencia (eje X) vs conservación de la interfaz (eje Y).

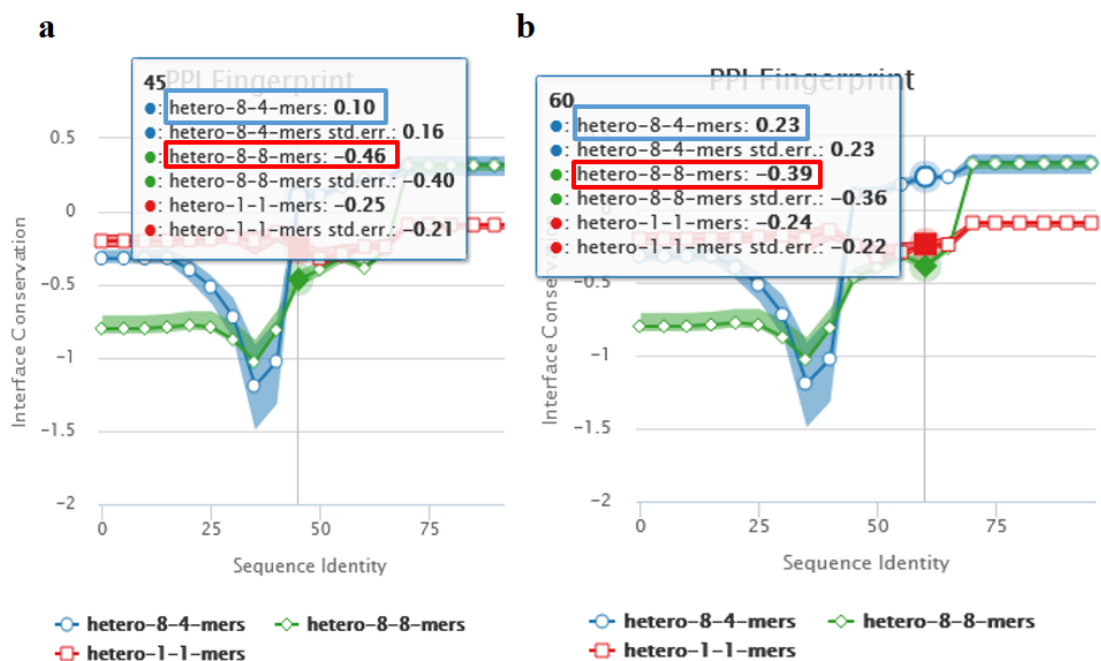


Figura 17. Huella dactilar de PPI. En ambos paneles, se toma como referencia al hetero-8-8-mero (6u9d.1) y el hetero-8-4-mero (6u9h.1). 17a) Punto de corte 45. 17b) Punto de corte 60.

En la Figura 18 se encuentran las características del modelo *MtAHAS* generado con los valores de los parámetros considerados en el análisis. Cuando el valor de *Z* de QMEAN ronda al 0 se considera que el modelo es de alta calidad, mientras que valores menores a -4.0 indican que la estructura generada es de baja calidad. Con esta referencia, el valor *Z* del modelo *MtAHAS* fue igual a -2.35 (Figura 18a). El símbolo con el pulgar hacia arriba indica que el complejo de *MtAHAS* tiene una calidad global satisfactoria. En la Figura 18b se muestra el valor de 0.73 correspondiente a GMQE, que al ser superior de 0.7 es indicativo de la alta precisión de la estructura en base al alineamiento proporcionado (*MtAHAS*), y la plantilla sugerida (6u9d.1). Para asegurar la idealidad del modelo es imprescindible contar con estimaciones de calidad absoluta del complejo, como respuesta a esta necesidad se encuentra el valor de QMEAN. Este indicador ejemplifica el grado de natividad de la estructura, esto es, el número de interacciones que tiene la proteína de forma global, al comparar la calidad del modelo generado con estructuras de alta resolución que se hayan obtenido de forma experimental por medio de cristalografía de rayos X (Benkert, Biasini, & Schwede, 2011).

La Figura 18c (ampliado en la figura 19) corresponde a la estimación de calidad local y se presenta conforme al esquema de colores de QMEAN, los que simbolizan baja calidad (naranja más intenso), conforme la calidad asciende se torna de color azul (alta calidad). Los residuos al poseer un valor menor a 0.6 son de menor calidad, por lo que bajo este rango los aminoácidos situados en las posiciones resaltados con el triángulo cian presentan más variaciones en relación al resto. En anexo 2 hasta anexo 17 se presenta la estimación de calidad local para cada cadena del complejo.

En el gráfico 18d y en la figura 20 se muestra un análisis complementario en base al posicionamiento de los valores de la calidad del modelo. En esta comparación del modelo (marcado con una estrella roja) se lo relaciona con estructuras de tamaño similar (cada punto) resaltando que el tamaño de la subunidad catalítica de la proteína ronda los 600 residuos y que en base al puntaje de QMEAN presenta una desviación estándar menor a 1. Para diferenciar estructuras con desviación estándar entre 0 y 1, se los colorea de negro, los que presentan desviación entre 1-2 son de color gris, y finalmente los que exhiben mayor desviación que los rangos mencionados son de color gris claro (**Waterhouse et al., 2018**).

En la Figura 18e se señalan los parámetros correspondientes a Z de QMEAN que se analizaron para obtener la estimación de calidad global. El color blanco es la porción cercana a cero. Los valores superiores a 0 muestran que el modelo generado posee valores más altos que las estructuras de tamaño semejante. En cambio, los valores menores a cero señalan valores más bajos que otras estructuras. Las interacciones entre los átomos de C- β es menor que en otras estructuras al ser de -0.56. Todos los átomos involucrados en la estructura poseen un valor de -0.53, por lo que la cantidad es menor que conformaciones de tamaño semejante. El potencial de solvatación determinado es de -0.50, por lo que al tender parcialmente hacia la parte del esquema coloreado de rojo posee un SOA (Solvent Accessibility) ligeramente bajo. Además, esto es un indicativo de que la entropía del solvente debe ser un poco mayor. La torsión total del complejo *MtAHAS* es de -2.03, indicando menores rotaciones que en estructuras de similar peso.

Por otra parte, en la Figura 18f se aprecia la plantilla empleada con el nivel de cobertura y la identidad total de secuencia correspondiente a 41.44% (*Sc*AHAS con *Mt*AHAS). En tanto, en la Figura 18g se enuncian las características del modelo base al ser un hexadecámero obtenido por rayos X y los valores de identidad y similitud total con el modelo generado al ser de 41.44% y 0.40, respectivamente. Finalmente en la Figura 18h se encuentra la identidad y similitud del target con la plantilla, en donde el puntaje de cobertura de la secuencia de *Mt*AHAS es de 0.98 en función de RSU y 0.94 para CSU.

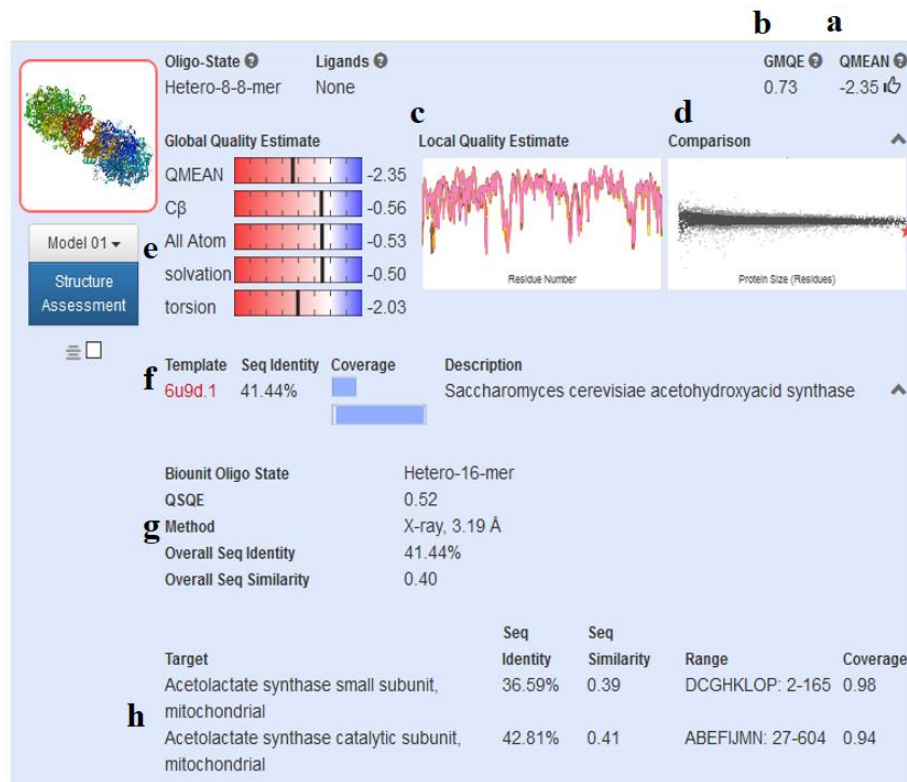


Figura 18. Resultado del modelo obtenido en Swiss-Model. 18a) QMEAN. 18b) GMQE. 18c) Estimación de la calidad local. 18d) Comparación con otras estructuras de PDB. 18e) Estimación de la calidad global. 18f) Plantilla empleada para la generación del modelo. 18g) Características del modelo base. 18h) Identidad y similitud de la plantilla con la secuencia de RSU y CSU de *Mt*AHAS.

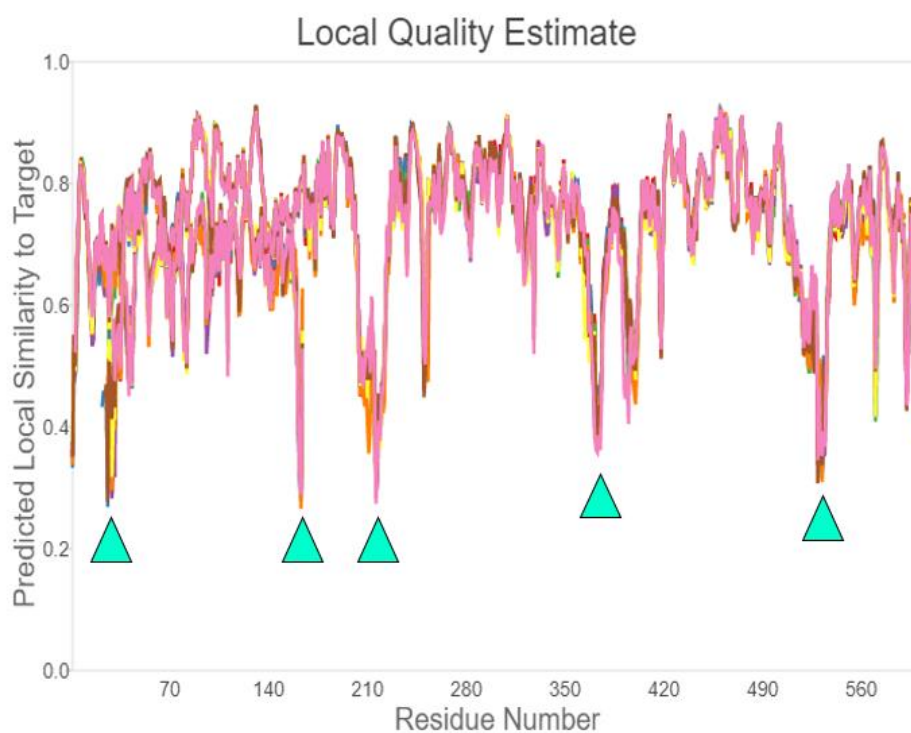


Figura 19. Estimación de calidad local. En el eje X (número de residuo), eje Y (similitud predicha local con la estructura objetivo).



Figura 20. Comparación con un conjunto de estructuras de PDB no redundantes. En el eje X (tamaño de la proteína, número de residuos), eje Y (puntuación QMEAN).

Swiss-Model proporcionó las coordenadas tridimensionales del modelo *MtAHAS* (figura 21a). En conjunto, la estructura de la enzima adopta forma un complejo hexadecamérico constituido por cuatro dímeros de CSU y cuatro dímeros de RSU. La estructura tridimensional de *MtAHAS* se asemeja a la “*cruz maltesa*”, forma con la que previamente se ha comparado a las estructuras de los complejos *AtAHAS* y *ScAHAS* (Lonhienne et al., 2020). Al colorear la estructura con respecto al esquema de color QMEAN se puede apreciar que la mayor parte del polipéptido tienen buena calidad con respecto a su ubicación espacial (figura 21b). Las zonas de menor calidad se ubican mayoritariamente en segmentos cercanos a la superficie de la enzima, mientras que el sitio activo y el sitio de unión de herbicidas están ampliamente conservados.

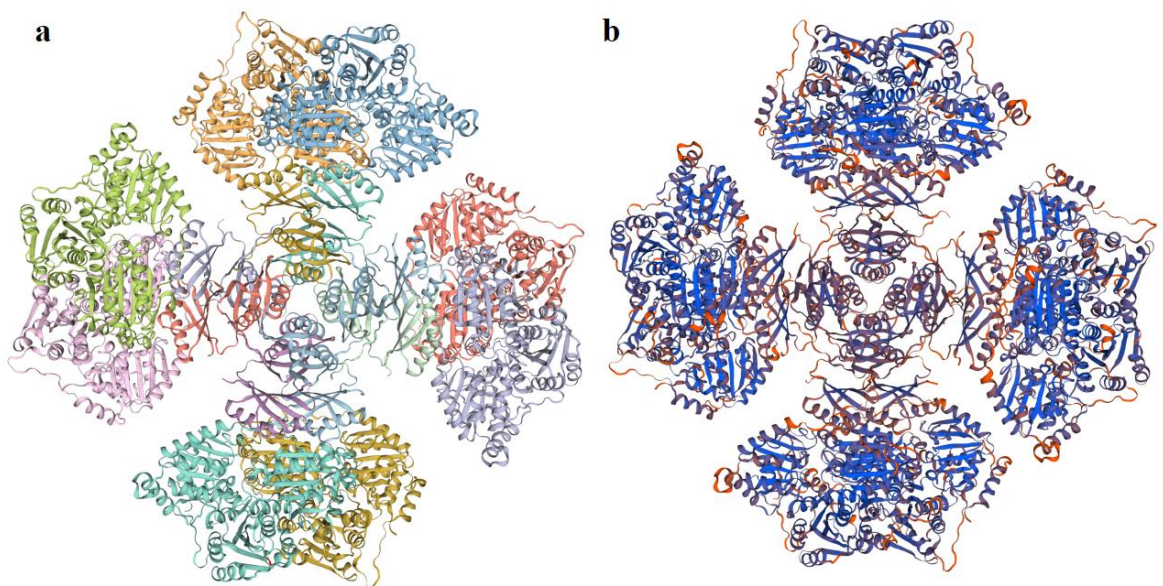


Figura 21. Estructura cuaternaria generada en Swiss-Model de *MtAHAS*. 21a) Complejo de *MtAHAS* con cada cadena representada por un color. 21b) *MtAHAS* representado por el esquema de color QMEAN.

3.1.4 Complejo de *MtAHAS*

El modelo generado por Swiss-Model únicamente reflejaba las subunidades catalíticas y regulatorias del complejo *MtAHAS* ocasionando que la comparación de los motivos de unión a cofactores del complejo no se pudieran establecer. En este sentido, para obtener el diseño final de la proteína se empleó el software WinCoot y Yasara para adicionar los cofactores y minimizar la energía de la enzima, respectivamente.

La enzima acetohidroxiácido sintasa de *Mycobacterium tuberculosis* consta de 604 aminoácidos para cada CSU y 165 residuos para cada RSU. Así, el complejo *Mt*AHAS tiene un total de 6152 aminoácidos. En la Figura 22a se aprecia el modelo tridimensional de *Mt*AHAS unido a sus cofactores. Cada dímero de la subunidad catalítica consta de una subunidad de color naranja y otra celeste, mientras que para la subunidad regulatoria cada dímero consta de un monómero de color rosa y otro de color vino tinto. El modelo de *Mt*AHAS ha sido identificado con las cadenas A, B, E, F, J, I, N y M, correspondientes a los dímeros 1, 2, 3 y 4 de las subunidades catalíticas, en cambio las cadenas C, D, G, H, K, L, O y P, pertenecen a los dímeros 5, 6, 7 y 8, de las subunidades regulatorias. En conjunto la estructura adopta la disposición de un complejo hexadecamérico, en el cual cada dímero del RSU interactúa con seis subunidades de RSU y tres CSUs, tal como **Lonhienne et al., (2020)** describió para el modelo de *Sc*AHAS. El mismo autor realizó la triple comparación por micrografía electrónica por tinción negativa de *Mt*AHAS (Figura 22b), en la que se pudo observar que *Mt*AHAS en solución adopta la forma de cruz maltesa, corroborando que dicha característica estructural era equivalente al complejo de *At*AHAS generado por criomicroscopía electrónica. La superposición del modelo *Mt*AHAS obtenido en el presente estudio sobre la micrografía de *Mt*AHAS obtenida por microscopía electrónica muestra que el modelo de *Mt*AHAS es altamente congruente con los datos experimentales.

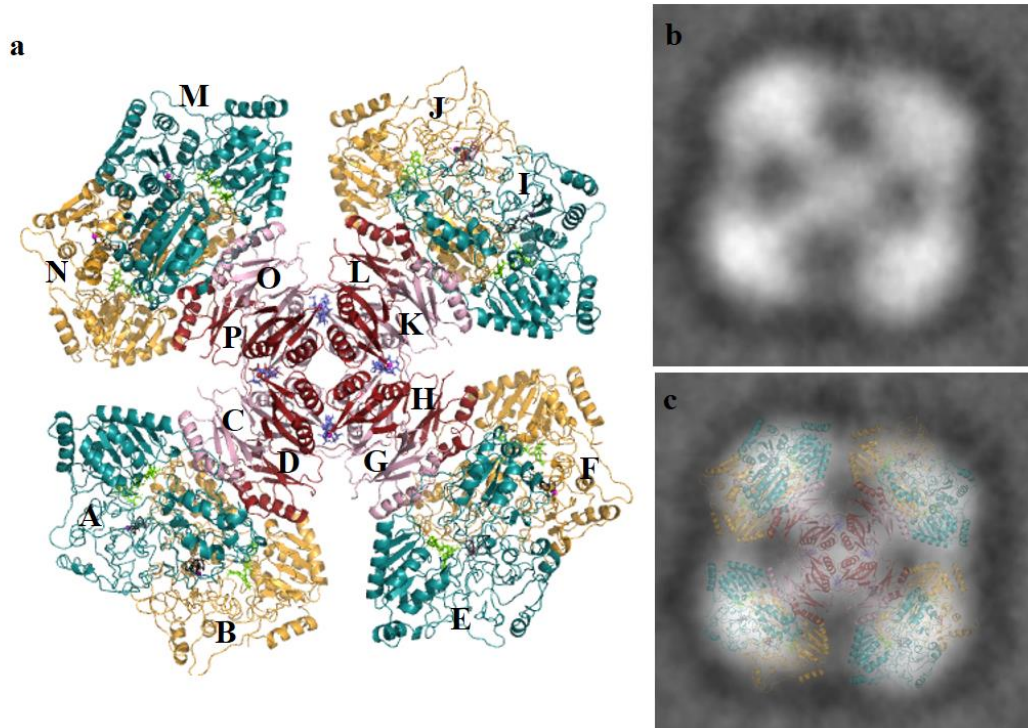


Figura 22. Modelo acetohidroxiácido sintasa de *Mycobacterium tuberculosis*. 22a)

Subunidades catalíticas: Dímero 1 (cadena A y B), dímero 2 (cadena E y F), dímero 3 (cadena I y J), dímero 4 (cadena M y N). Subunidades regulatorias: dímero 5 (cadena C y D), dímero 6 (cadena G y H), dímero 7 (cadena K y L), dímero 8 (cadena P y O), CSUs en color naranja y celeste, RSUs en color rosa y vino tinto. 22b) Micrografía electrónica de tinción negativa de *MtAHAS* (Lonhienne et al., 2020). 22c) Superposición de *MtAHAS* obtenido con la micrografía electrónica de tinción negativa de *MtAHAS*.

La Figura 23, exhibe al dímero 1 (cadenas A-B), en donde se aprecia su posicionamiento frontal (a), superior (b) y lateral (c). Ambas subunidades contienen ThDP, FAD y Mg^{+2} como cofactores presentes en el sitio activo de la enzima. El lugar que permite la interacción entre las subunidades catalítica y regulatoria es el linker α - β . En el caso de *ScAHAS*, dicho linker (Leu258, Arg259 y Arg279 de la cadena B) se une al bucle de contacto (cadena C), a la segunda hoja plegada β (cadena D) y a la porción N-terminal (cadena G) de distintas RSUs (Lonhienne et al., 2020). De la misma forma, en el modelo de *MtAHAS* el linker α - β de la cadena B está presente (resaltado en un círculo rojo en la vista lateral c de la Figura 23) e involucra a los residuos Cys204 y Thr205, permitiendo así la unión con las cadenas L, K y G de las RSUs adjuntas.

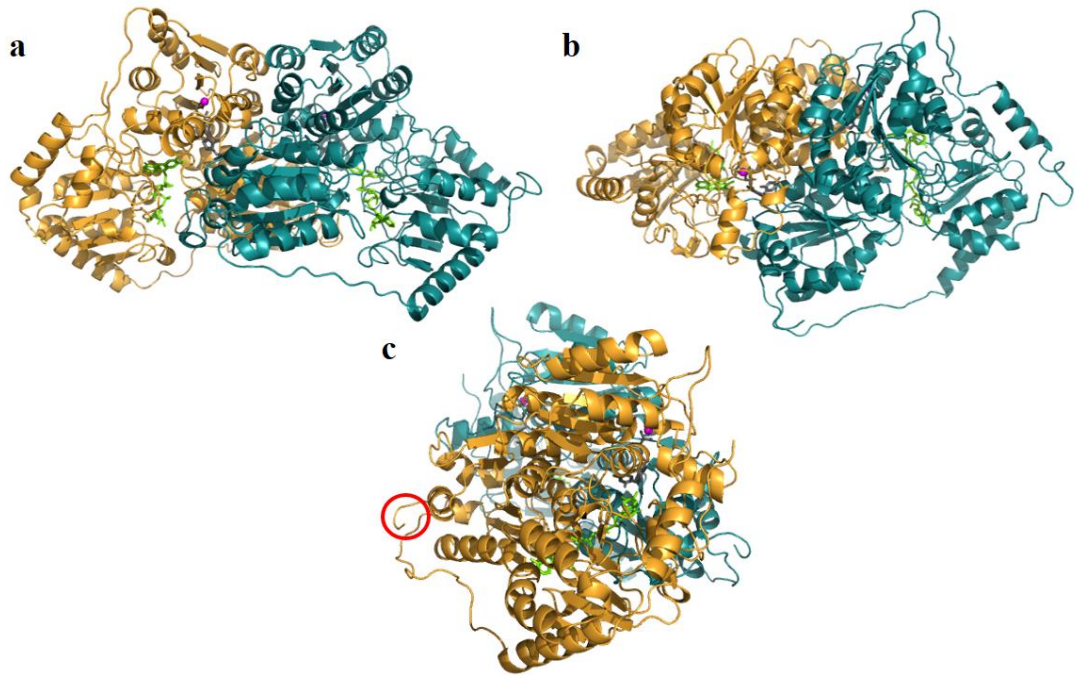


Figura 23. Dímero A-B del complejo *MtAHAS*. Cadena A (celeste), cadena B (naranja). 23a) Vista frontal. 23b) Vista superior. 23c) Vista lateral, el círculo rojo representa la ubicación del linker α - β . Mg^{+2} (esfera magenta), FAD (sticks verde), ThDP (sticks gris oscuro).

El pequeño dímero de las subunidades regulatorias unido al ATP se muestra en la figura 24. En la vista frontal (Figura 24a) es posible apreciar los dos tentáculos que sobresalen de la parte externa, esta disposición de las estructuras permite la comunicación del dímero a través del centro de la estructura con las RSUs vecinas. En la interfaz de los dímeros se sitúan 4 pares de ATP con 4 moléculas de magnesio (cada uno entre un par de ATP) que contribuyen al ensamble de las RSU (**Lonhienne et al., 2020**). En las tres vistas del dímero se presencia únicamente un ATP con Mg^{+2} debido a que el ATP con el que se empareja se encuentra en el dímero de la subunidad regulatoria contigua.

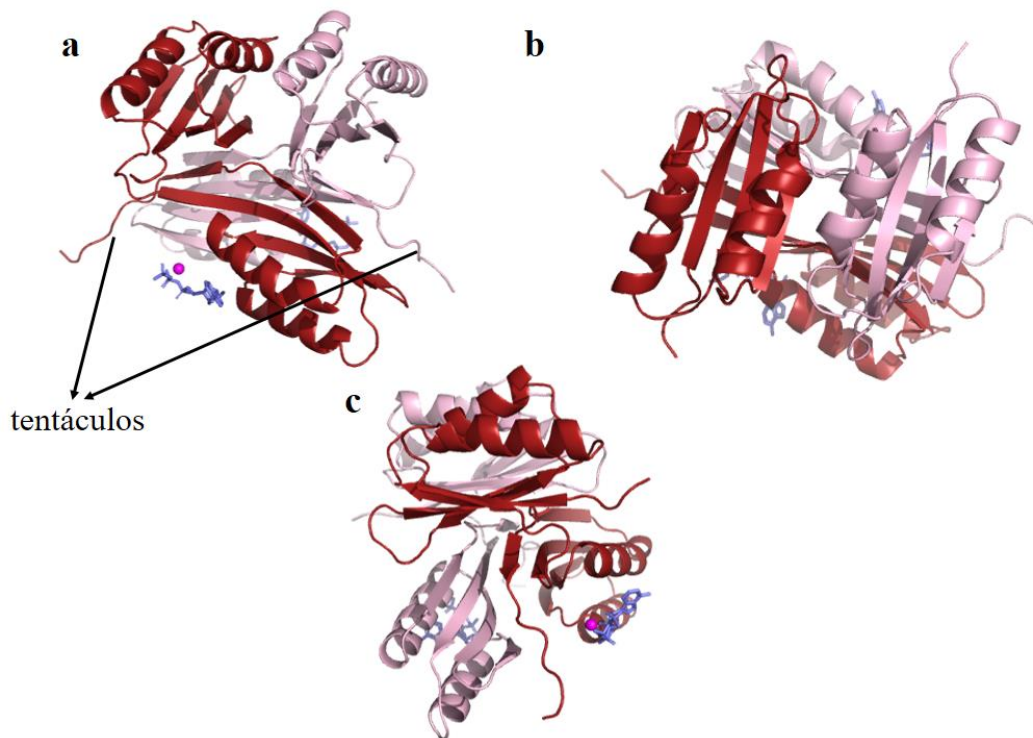


Figura 24. Dímero K-L. Cadena K (rosa), cadena L (vino tinto). 24a) Vista frontal. 24b) Vista superior. 24c) Vista lateral. Mg^{+2} (esfera magenta), ATP (stick lila).

3.1.5 Cofactores de la enzima AHAS de *Mycobacterium tuberculosis*

Para que las subunidades catalíticas sean funcionales es obligatoria la dimerización de los monómeros en las RSUs y que exista sincronía entre CSU-RSU. La intervención de ATP reduce la constante de disociación del dímero en CSU, por tal motivo, sin estos parámetros no se conseguiría la formación de sitios activos de la enzima, y por ende la inactividad del complejo (Lonhienne et al., 2020).

Para la enzima AHAS de *M. tuberculosis* los pares de ATP (al igual que en el modelo de planta y levadura) se sitúan en la interfaz de dos dímeros de RSUs. La Figura 25 comprende el dímero 1 y 4 y su vista general abarca a dos moléculas de ATP antiparalelas interactuando con Mg^{+2} por sus grupos trifosfatos. El ATP de la izquierda enunciado como “ATP 1” se une a la cadena C (rosa) por medio de la pentosa al formar interacciones no covalentes con los aminoácidos Leu110 (2.6 Å) y Lys133 (3.0 Å). La base nitrogenada, adenina, forma un puente de hidrógeno con Val118 (3.0 Å) de la cadena O, y finalmente los fosfatos son estabilizados gracias a Lys133 (3.0 y 3.2 Å) y Arg112 (2.8 y 3.1 Å) también de la cadena O (Figura 25b). La molécula de ATP

ubicado a la derecha del ion magnesio se denota como “ATP 2” y forma enlaces con Lys133 (2.9 Å), Arg87 (3.0 Å) y Arg159 (2.8 Å) de la cadena C y en la cadena P existen vínculos con Lys133 (2.9 Å), la pentosa se enlaza con Leu110 (2.7 Å), y únicamente se establece un puente de hidrógeno con la cadena D en la posición Val118 (2.9 Å) (Figura 25c).

En las subunidades regulatorias del complejo de AHAS en *S. cerevisiae* al tener seis cargas negativas, Mg^{+2} estabiliza sus cargas conjuntamente con seis residuos de Arg y dos Lys (de cuatro cadenas), en tanto que el resto de la molécula se enlaza con Asn231 e Ile239, y finalmente un enlace aromático (π - π) de Phe232 con adenina (**Lonhienne et al., 2020**). Con esta referencia, la variación entre la naturaleza de los residuos de leucina y valina (aa hidrofóbicos) son similares a la carga repulsiva de la fenilalanina (modelo de *Sc*), sustituida por Val118 y Leu110 (ATP 1), y en la caso del ATP 2 si existe una no conservación ya que Leu110 forma un enlace con la pentosa.

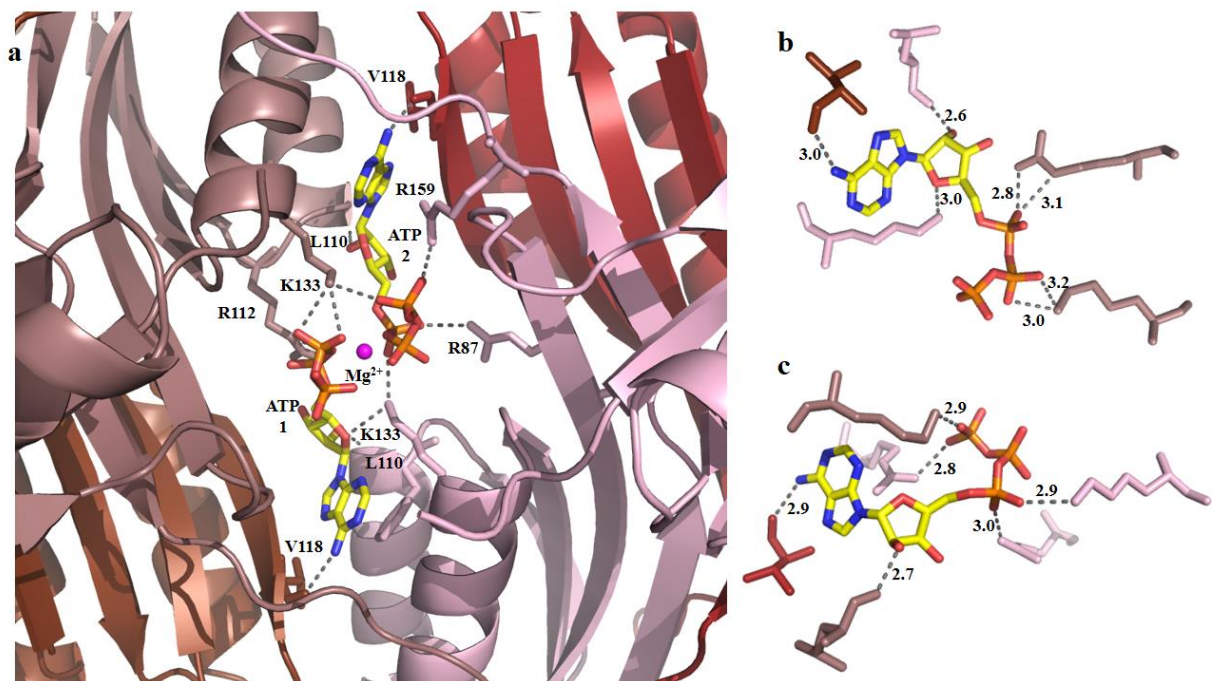


Figura 25. Interacciones de ATP en RSUs. Cadena P (chocolate), Cadena O (marrón oscuro), cadena C (rosa), cadena D (vino tinto). 25a) Interacciones de un par de ATPs con los dos dímeros. 25b) Puentes de hidrógeno entre los residuos y ATP 1. 25c) Puentes de hidrógeno entre los residuos y ATP 2. Los ATPs y residuos se muestran en modelo de sticks. Los elementos de ATP se representan por: amarillo (carbono), azul (nitrógeno), rojo (oxígeno) y naranja (fosforo). Las distancias se encuentran en angstroms.

Como se observa en la Figura 26a, la riboflavina del FAD se encuentra orientada hacia el anillo de pirimidina del ThDP, en tanto que el grupo pirofosfato de la molécula de ThDP es estabilizado por el ion magnesio. En las diferentes estructuras de AHAS se observa que el FAD se sitúa en el centro activo (en medio de los tres dominios de la subunidad catalítica), y con los grupos –OH direccionados hacia el C2 de ThDP (**Garcia et al., 2017**). El cofactor FAD forma doce interacciones con 11 residuos de CSU. La base nitrogenada adenina forma enlaces de hidrógeno con Asp355 (2.9 Å) y Val356 (3.1 Å). La ribosa forma un puente de hidrógeno con Asp336 (2.7 Å). El grupo pirofosfato posee interacciones con Gly247 (2.8 Å), Arg314 (2.7 Å), y Ser127 (2.8 Å), y al mismo tiempo el grupo de la riboflavina se une a Asp316 (2.7 Å), Pro290 (2.9 Å), His293 (2.8 Å) y Leu273 (2.9 Å). El residuo Thr272 forma dos enlaces de 2.9 Å cada uno con riboflavina y el grupo pirofosfato. Para el modelo de levadura la adenina es sostenida por Asp426 y Asn312, el anillo de ribosa por Glu407, y el pirofosfato por Arg376, Thr334, Ala308, Arg241. El anillo de flavina presenta contactos con Leu335, Leu352 e His355 (**Pang et al., 2002**). Al presentarse más interacciones en el modelo de *Mt*AHAS que en el de *Sc*AHAS, la afinidad de la enzima por el mencionado cofactor se espera que sea mayor.

La función del cofactor FAD se ha aclarado en los últimos años, ya que inicialmente se lo consideraba como un remanente conservado a partir de su ancestro, la enzima piruvato oxidasa. Se ha demostrado que el FAD es un aceptor de electrones al estar involucrado en una reacción secundaria del ciclo catalítico. Esto ocurre por una reacción redox contigua que se da por medio del ThDP en respuesta a la formación del carbanión/enamina del 2-hidroxietil-ThDP intermediario del ThDP acetil. Esta reacción no involucra únicamente la adición de 2-cetoácidos, sino también la transferencia intramolecular de electrones hacia FAD y su reducción a FADH₂ (**Tittmann et al., 2004**) (**McCourt et al., 2005**). Como consecuencia de esto, el anillo de isoaloxacina parte del FAD posee la característica de presentarse tanto en forma “plana” como “curva”. En la enzima piruvato oxidasa ha sido posible evidenciar la curvatura en 15 grados del eje N5-N10 del anillo de isoaloxacina, con la finalidad de incrementar el potencial redox de FAD (**Muller & Schulz, 1993**).

El anillo de isoaloxacina de FAD en *MtAHAS* (Figura 27c) muestra una curvatura un poco más marcada que la descrita por **Muller & Schulz (1993)** al compararlo con el anillo plano (Figura 27a) y el anillo curvo (Figura 27b) de *S. cerevisiae* (**McCourt et al., 2005**). Se ha observado que los residuos involucrados en la flexión del anillo de isoaloxacina (entre atractores y repulsores) están conservados en 21 secuencias de varias especies de planta, bacterias, hongos y algas (**Duggleby & Pang, 2000**).

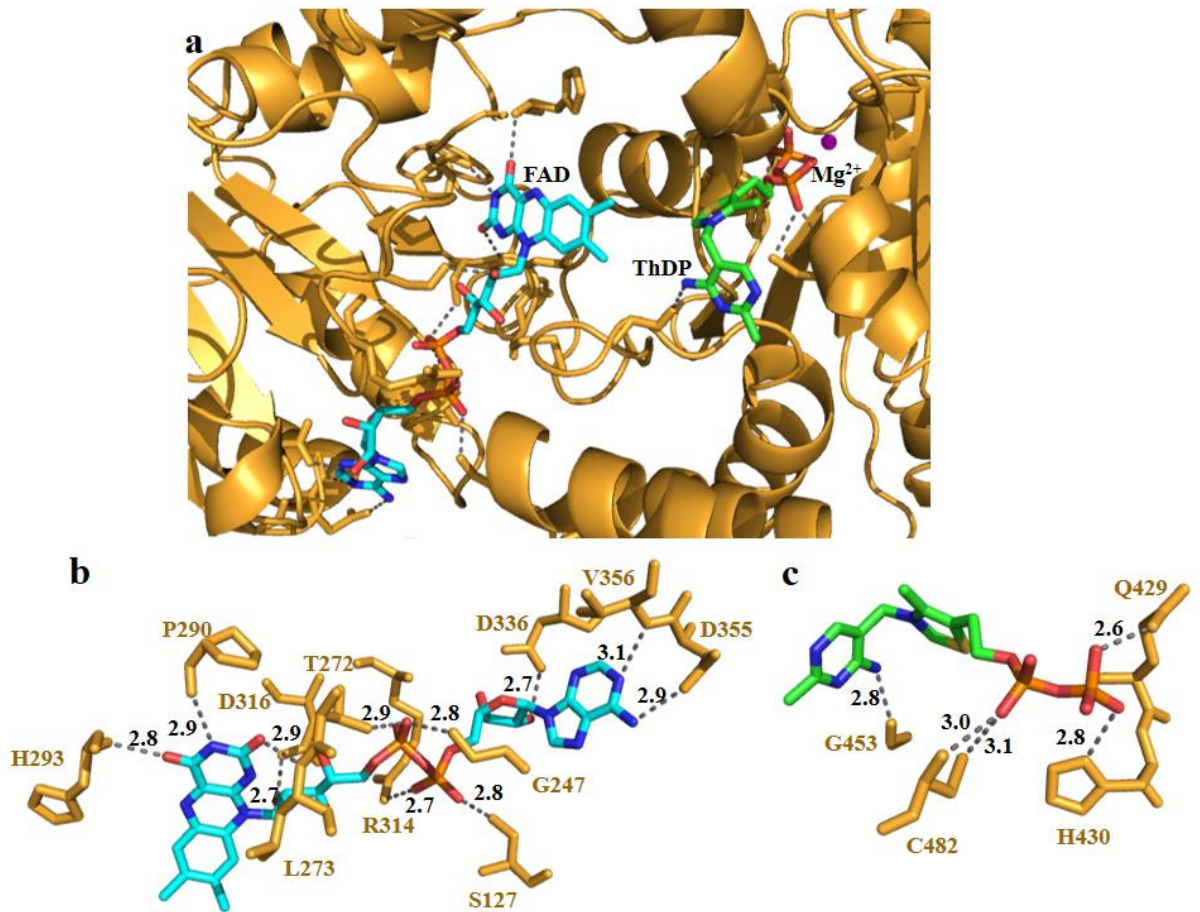


Figura 26. Interacciones de ThDP y FAD en CSU. Cadena N (dorado). 26a) Ubicación de ThDP y FAD. 26b) Enlaces de FAD. 26c) Puentes de hidrógeno entre los residuos y ThDP.

Los cofactores y residuos se muestran en modelo de sticks. Los elementos de FAD se representan por: cian (carbono), azul (nitrógeno), rojo (oxígeno) y naranja (fosforo). En el caso de ThDP, verde (carbono), azul (nitrógeno), rojo (oxígeno), naranja (fosforo), y amarillo (azufre). Las distancias se encuentran en angstroms.

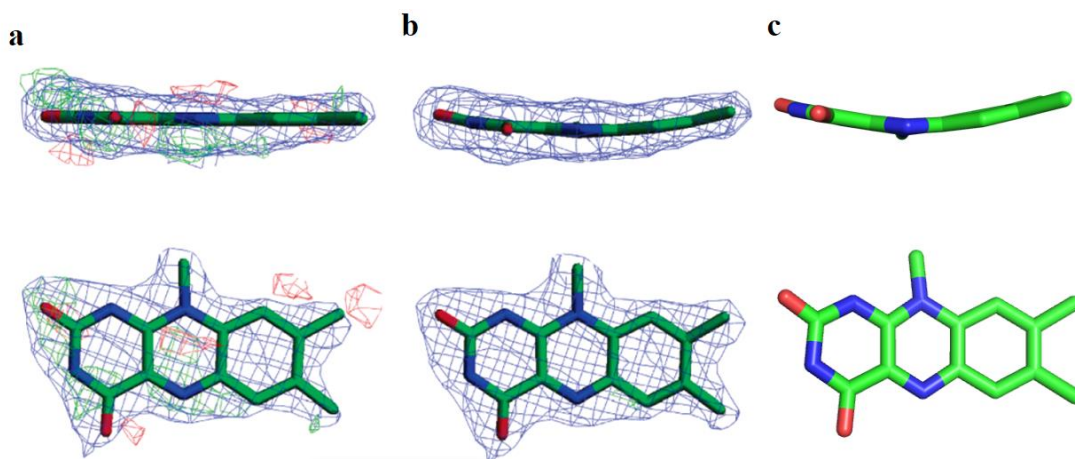


Figura 27. Anillo de isoaloxacina de FAD. Representación de sticks. 27a y 27b, mapa de densidad electrónica $2F_o - F_c$. En donde la densidad electrónica $>1.2\sigma$ (nube azul), $>2.6\sigma$ (nube verde) y densidad menor a -2.6σ (nube roja). 27a) Estructura del anillo de isoaloxacina plana de *S. cerevisiae*. 27b) Estructura del anillo de isoaloxacina curvo (McCourt et al., 2005). 27c) Anillo de isoaloxacina del modelo de MtAHAS. Los colores de los átomos: carbono (verde), nitrógeno (azul) y oxígeno (rojo).

El cofactor ThDP se encuentra próximo a FAD, con la diferencia de ubicarse en la interfaz de las cadenas del dímero. Como se mencionó anteriormente, las cargas negativas del grupo pirofosfato son estabilizadas por el ion magnesio. Existen 12 aminoácidos que forman enlaces no covalentes con el cofactor. Estas interacciones incluyen puentes de hidrógeno (2.2-3.2 Å) e interacciones hidrofóbicas (3.3-4.2 Å) con ThDP. Los enlaces de Van der Waals no están representados en la Figura 26c; sin embargo, estos tienen lugar entre el cofactor y los residuos Pro60, Pro111, Gly112, Asn115, Gln148, y Gly511. Los puentes de hidrógeno se forman entre el anillo de pirimidina y Gly453 (2.8 Å) y con el grupo pirofosfato al interactuar con Cys482 (3.0 y 3.1 Å), His430 (2.8 Å) y Gln429 (2.6 Å). El cofactor ThDP en MtAHAS adopta una conformación similar a lo observado en las estructuras de AtAHAS y ScAHAS mediante la formación de un número similar de interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas (García et al., 2017).

Tras identificar los motifs más importantes de unión a los cofactores del modelo de acetohidroxiácido sintasa de *M. tuberculosis*, se ha considerado pertinente establecer los cambios conformacionales de FAD y ThDP, al simular el ingreso de un herbicida en el sitio activo. Como se ha observado previamente, cuando AHAS es inhibida por

herbicidas comerciales, el cofactor ThDP puede sufrir cambios en su estructura (Garcia et al., 2017; Garcia et al., 2018 y Lonhienne et al., 2018). Por ejemplo, al ubicarse los compuestos bispiribac y piritiobac (familia PYB) en el sitio activo de *At*AHAS, el carbono C2 del anillo de tiazol es separado del resto de la molécula. La escisión causa que se forme el compuesto amino etanotiol difosfato (ThAthDP). De igual manera, al emplear el inhibidor propoxicarbazona de la familia SCT (sulfonilamino-carbonil-triazolinonas) el ThDP cambia a tiamina tiazolona difosfato (ThThDP) por oxidación del átomo C2 (Garcia et al., 2017). En contraposición, el ThDP permanece inalterable cuando la enzima es inhibida por herbicidas de la familia de imidazolinona (en específico el compuesto imazaquin) conservando la misma forma que el cofactor en la subunidad catalítica de *Sc*AHAS desinhibida (Pang et al., 2002).

Al inhibir *At*AHAS con monosulfurón y monosulfurón éster (herbicidas de la familia de las sulfonilureas), tras medir la densidad electrónica se determinó densidad adicional en el C2 generada por un grupo plano (inconfundiblemente, no correspondiente a hidrógenos), y aunque en un principio se creyó que podría ser acetil-ThDP, más tarde se confirmó que la densidad electrónica procedía del intermediario HeThDP (hidroxietil-ThDP) (Wang et al., 2009).

3.1.6 Inhibición de *Mt*AHAS con metsulfurón metil

Teniendo en cuenta, la variación de la conformación estructural de los cofactores FAD y ThDP en la actividad enzimática, y los antecedentes al usar compuestos herbicidas como inhibidores de AHAS, es necesario demostrar la capacidad de destinar a la enzima AHAS como target de inhibición en *Mycobacterium tuberculosis*. Para lo cual, se ha considerado oportuno emplear el herbicida metsulfurón metil, ya que según Grandoni et al., (1998) y Sohn et al., (2008), se ha probado su efectividad en modelos *in vitro* e *in vivo* al tratar cepas de *M. tuberculosis*, indicando su idoneidad como inhibidor de *Mt*AHAS.

Con el objetivo de determinar los residuos de *Mt*AHAS que podrían formar interacciones con el herbicida MM y su nivel de conservación se tomó como referencia la estructura de *Sc*AHAS en complejo con metsulfurón metil (código PDB 1t9c)

(Figura 28a). El análisis de las interacciones formadas entre el inhibidor y la enzima muestran que se forman puentes de hidrógeno con el residuo Arg380, e interacciones hidrofóbicas con Ala195, Pro192 y Lys251 (McCourt et al., 2005). Por otra parte, los residuos Gly116 y Ala117 aportan a la unión del herbicida mediante la formación de interacciones hidrofóbicas. Al comparar las mismas interacciones con el modelo de *Mt*AHAS al sobreponer en el bolsillo de unión de herbicidas el herbicida MM del complejo *Sc*AHAS-MM (Figura 28b) se observó que potencialmente se pueden formar puentes de hidrógeno con los residuos Arg318, Leu141 y Gly62, e interacciones hidrofóbicas con Gly62, Ala63 y Lys197. Sin embargo, en *Mt*AHAS existe una sustitución en la posición Pro192 de *Sc*AHAS. En lugar de la prolina, *Mt*AHAS presenta una glicina (Gly138) la cual no cuenta con cadena lateral y por ende no aporta con el mismo número de interacciones que Pro192 en *Sc*AHAS. Así mismo, el residuo Ala195 de *Sc*AHAS ha sido sustituido por Leu141 en *Mt*AHAS. La leucina tiene una cadena lateral más voluminosa que la alanina, por lo cual se puede inferir que esta formaría choques estéricos con el anillo aromático de MM.

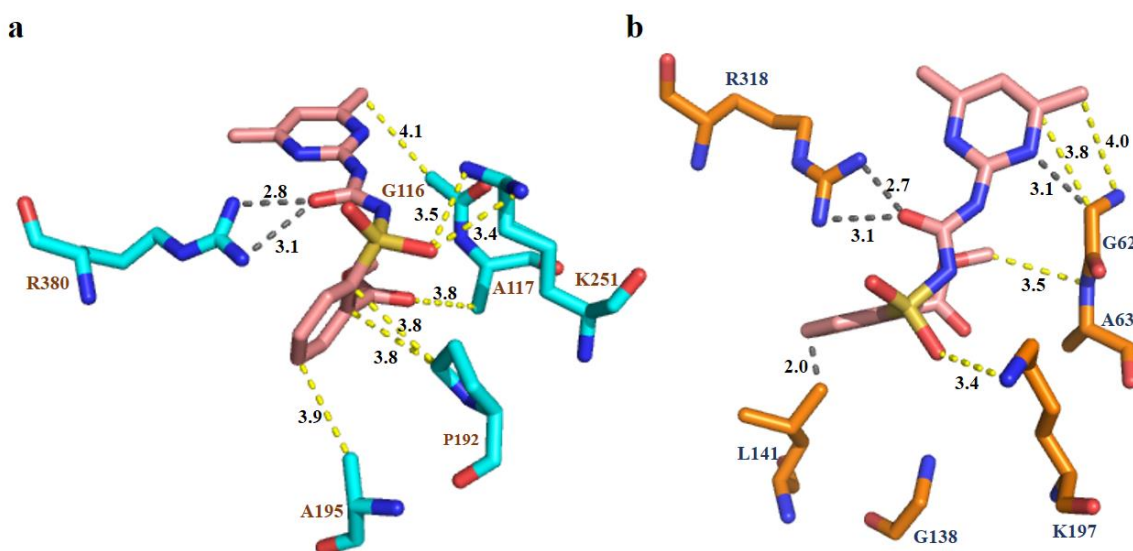


Figura 28. Sitio de unión del herbicida MM. Herbicida y residuos en representación de sticks. 28a) Interacciones en el modelo de *Sc*AHAS, los colores de los elementos de los residuos se muestran en: cian-carbono, azul-nitrógeno y rojo-oxígeno. 28b) Interacciones con *Mt*AHAS, los colores de los átomos se colorean de: naranja-carbono, azul-nitrógeno y rojo-oxígeno. El herbicida metsulfurón metil, en ambas representaciones, carbono (rosa pálido), nitrógeno (azul), azufre (amarillo) y oxígeno (rojo). Los enlaces covalentes se marcan con líneas entrecortadas en negro, y los contactos hidrofóbicos en color amarillo. Las distancias se encuentran en angstroms.

Por medio del análisis de **McCourt et al., (2005)**, fue posible realizar la superposición de los aminoácidos claves en el sitio de unión de sulfonilureas en *ScAHAS* y *MtAHAS*. En la Figura 29a se presenta de manera global la localización de los residuos de *MtAHAS* (azul) y los aminoácidos de *ScAHAS* (amarillo) alrededor del herbicida MM. De los ocho residuos seleccionados para realizar la simulación de posición en el sitio activo de la enzima, cinco de estos presentan una superposición casi exacta al ser aminoácidos conservados (Tabla 9). En el caso de los aminoácidos que han sufrido una mutación de un organismo al otro (Figuras 29b y 29c) se puede concluir que el residuo Leu141 de *MtAHAS* se sitúa más próximo al herbicida que el residuo Ala195 de *ScAHAS*. Esta comparación resulta contraria en el caso de Gly138 (*MtAHAS*) debido a que Pro192 (*ScAHAS*) por el volumen de su anillo es capaz de formar un gran número de interacciones con MM. Finalmente, aunque exista conservación entre las lisinas, Lys197 (*MtAHAS*) y Lys251 (*ScAHAS*), estas sufren una ligera variación en su sobre posición por el efecto de la generación de contactos hidrofóbicos con uno de los oxígenos del grupo sulfamoil al ingreso de MM.

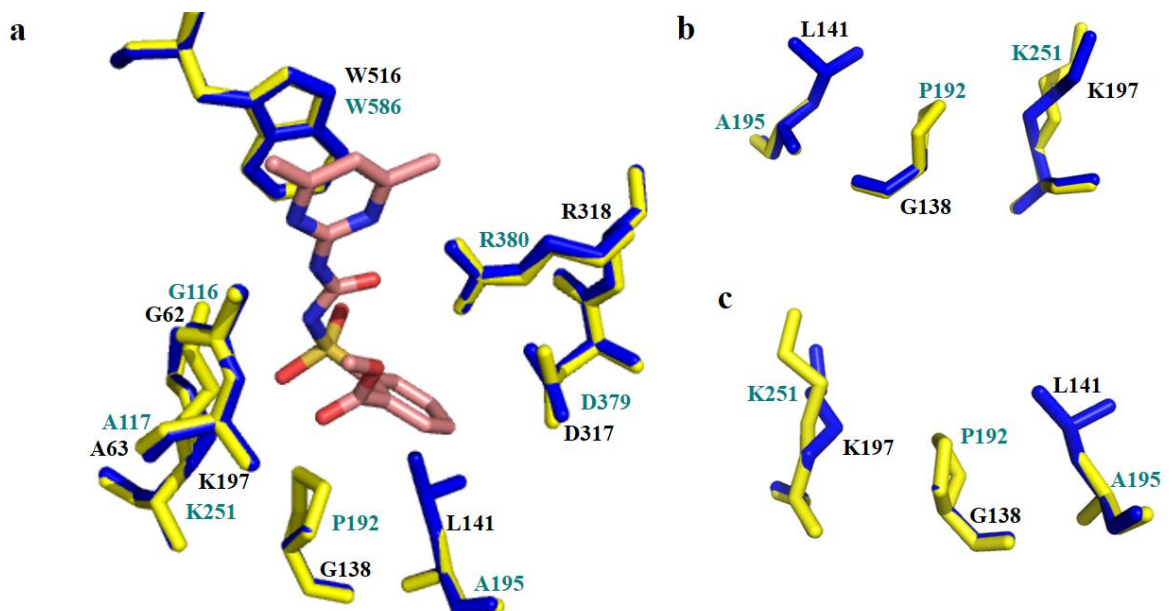


Figura 29. Residuos de *MtAHAS* y *ScAHAS* próximos al sitio de unión de MM.

Herbicida y residuos en representación de sticks. 29a) Los residuos de *S. cerevisiae* en amarillo (número de residuo en celeste), aminoácidos de *M. tuberculosis* se manifiestan de color azul (número de residuo en negro). 29b) Vista frontal de aminoácidos que presentan variación. 29c) Vista posterior de distintos aminoácidos presentes en el lugar de unión del herbicida. Metsulfurón metil, en ambas representaciones, carbono (rosa pálido), nitrógeno (azul), azufre (amarillo) y oxígeno (rojo).

La presencia de los residuos Leu141 y Gly138 sugiere que la enzima *MtAHAS* posee cierta resistencia a la inhibición por herbicidas de la familia sulfonilurea, ya que las constantes de inhibición serán mayores como consecuencia de las interacciones desfavorables que estos residuos forman con el inhibidor. Estos resultados son congruentes con lo reportado en estudios previos, donde se ha determinado que la K_i de MM en *MtAHAS* es igual a 9.0 μM (Choi et al., 2006), mientras que en *ScAHAS* es igual a 9.4 nM (Duggleby, Pang, Yu, & Guddat, 2003). Esto sugiere que *MtAHAS* presenta un factor de resistencia igual a 957.5 para el inhibidor MM.

Tabla 9. Aminoácidos del sitio de unión al herbicida metsulfurón metil

<i>MtAHAS</i>	<i>ScAHAS</i>	Aminoácidos conservados (*), no conservados (-)
Trp516	Trp586	*
Arg318	Arg380	*
Asp317	Asp379	*
Leu141	Ala195	-
Gly138	Pro192	-
Lys197	Lys251	*
Ala63	Ala117	*
Gly62	Gly116	*

3.1.7 Verificación de hipótesis

El complejo de *MtAHAS* obtenido en este trabajo de investigación ha dilucidado la disposición de sus subunidades regulatorias y subunidades catalíticas de la enzima, la forma en la que interactúan, así como, los motifs más importantes de unión a cofactores y a herbicidas probados previamente en *AtAHAS* y *ScAHAS*. Por consiguiente la hipótesis alternativa: “La identificación y comparación de las secuencias de las subunidades catalítica y regulatoria de la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS) de *M. tuberculosis* con *ScAHAS* y *AtAHAS*, permiten establecer la estructura tridimensional de la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS) de *Mycobacterium tuberculosis*”, es aceptada, de manera que se rechaza la hipótesis nula.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Se identificó las secuencias codificantes para CSU de *MtAHAS* como YP_177917.1, y para la subunidad pequeña con el código CCP45808.1, para los organismos de planta y levadura se ubicaron los códigos AEE78430.1 y NP_013826.1 (CSUs), NP_850174.1 y NP_009918.1 (RSUs). Con mencionadas secuencias Fasta obtenidas en PDB se realizó el alineamiento múltiple con la herramienta T-coffee.
- Se determinó el modelo 6u9d.1 de la enzima acetohidroxiácido sintasa de *Saccharomyces cerevisiae* como la plantilla con mayor similaridad global de secuencia con *MtAHAS* al ser de 0.4, también se estableció mayor identidad entre las subunidades catalíticas de *ScAHAS* y *MtAHAS* al poseer un valor de 0.41. En tanto, que para las RSUs de ambos organismos es ligeramente menor al otorgar un valor de 0.39.
- Se construyó el modelo de *MtAHAS* con el servidor web bioinformático Swiss-Model, el complejo generado presenta forma de cruz maltesa semejante a sus modelos homólogos en *S. cerevisiae* y *A. thaliana*. La conformación hexadecamérica presenta cuatro dímeros como subunidades catalíticas, con una longitud de cada monómero de 604 aminoácidos, interrelacionados con cuatro dímeros de las subunidades regulatorias, codificando 165 aminoácidos para un monómero.
- El grado de conservación de los motifs de unión a cofactores fue establecido con la comparación del alineamiento múltiple de secuencias generado en Boxshade, las distancias se visualizaron con LigPlot y WinCoot. Con el cotejo entre *ScRSU* y *MtRSU* en los sitios de interacción RSU-CSU, se estableció alta conservación en Arg21, Arg29 y Asp57, mientras que en las tres interacciones restantes existen no conservaciones. Para ATP, los aminoácidos conservados fueron únicamente en Arg87 y Arg159, pero los cuatro lugares de unión faltantes, presentaron cargas

similares en las cadenas laterales de los aminoácidos, y adicionalmente fueron estabilizados con el ion Mg^{+2} (ubicado en las posiciones conservadas Arg87 y Arg159, además de otras dos interacciones no conservadas), por lo que la relación con *Sc*, se mantuvo.

De igual forma, los residuos de la subunidad catalítica, Asp145, Phe147, Gln148, Pro339 e Ile342 (involucrados en la interacción CSU-RSU), son totalmente conservados entre *Mt*AHAS y *Sc*AHAS. Asimismo, los cofactores ThDP y FAD se posicionaron en el sitio activo de la enzima, en la subunidad catalítica, ThDP se ubicó cercano a FAD e interactuó con 10 residuos, de los cuales nueve son altamente conservados en las tres especies. FAD, por otro lado estableció 12 interacciones (la mitad altamente conservados), y presentado la peculiaridad de una ligera curvatura en el anillo de isoaloxacina, observado previamente en *Sc*AHAS.

- Se determinaron los sitios de unión del herbicida MM con *Mt*AHAS en las posiciones conservadas, Trp516, Arg318, Asp317, Lys197, Ala63 y Gly62. Las interacciones varían entre enlaces hidrofóbicos y puentes de hidrógeno, tras analizar dichos contactos se estableció que en el modelo de bacteria se producen más enlaces polares que hidrofóbicos, además de que la superposición con los residuos entre *Sc* y *Mt*, instituyó la marcada no conservación en Leu141 y Gly138.

4.2 Recomendaciones

- Es preciso realizar la cristalización de la enzima AHAS de *Mycobacterium tuberculosis*, y comparar la estructura (en su forma desinhibida) para establecer los sitios de unión a cofactores y de interacción entre CSU y RSU, además de comprobar la conformación que adopta el anillo de isoaloxacina de FAD durante la actividad enzimática.
- Con análisis *in vitro* de cinética enzimática será posible determinar constantes de afinidad por sustratos, y demás ensayos para verificar si K_i en *Mt*AHAS se asemeja en mayor medida a los modelos de *At*AHAS o *Sc*AHAS.

- Es necesario destinar análisis de inhibición a compuestos de la familia de las sulfonilureas, compuestos que han probado su eficacia con anterioridad en *At*AHAS y *Sc*AHAS, para establecer la afinidad experimental de metsulfurón metil en el modelo de *Mt*AHAS. Además, de priorizar su empleo como posible target en cepas MDR y XDR de tuberculosis.

BIBLIOGRAFÍA

- Agnew-Francis, K. A., Tang, Y., Lin, X., Low, Y. S., Wun, S. J., Kuo, A., ... Guddat, L. W. (2020). Herbicides That Target Acetohydroxyacid Synthase Are Potent Inhibitors of the Growth of Drug-Resistant *Candida auris*. *ACS Infectious Diseases*, 6(11), 2901–2912. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00229>
- Benkert, P., Biasini, M., & Schwede, T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*, 27(3), 343–350. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq662>
- Bermejo, M., Clavera, F., Michel de la Rosa, F., & Marín, B. (2007). Epidemiología de la tuberculosis. *Anales Sis San Navarra*, 30(2), 07–19. [https://doi.org/10.1016/s1695-4033\(00\)78628-0](https://doi.org/10.1016/s1695-4033(00)78628-0)
- Bertoni, M., Kiefer, F., Biasini, M., Bordoli, L., & Schwede, T. (2017). Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Scientific Reports*, 7(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09654-8>
- Bocanegra-García, V., Valencia-Delgadillo, J., Cruz-Pulido, W., Cantú-Ramírez, R., Rivera-Sánchez, G., & Palma-Nicolás, J. P. (2011). De la genética a la genómica en el diseño de nuevas vacunas contra la tuberculosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 609–614. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.04.004>
- Brennan, P. J. (2003). Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 83(1–3), 91–97. [https://doi.org/10.1016/S1472-9792\(02\)00089-6](https://doi.org/10.1016/S1472-9792(02)00089-6)
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Caminero, J. A. (2016). Update on the diagnosis and treatment of pulmonary tuberculosis. *Revista Clínica Española*, 216(2), 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.rce.2015.09.005>
- Cardona, P. J. (2018). Patogénesis de la tuberculosis y otras micobacteriosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 36(1), 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.10.015>
- Chang, A. K., & Duggleby, R. G. (1998). Herbicide-resistant forms of Arabidopsis

- thaliana acetohydroxyacid synthase: Characterization of the catalytic properties and sensitivity to inhibitors of four defined mutants. *Biochemical Journal*, 333(3), 765–777. <https://doi.org/10.1042/bj3330765>
- Choi, K. J., Kyoung, M. N., Choi, J. Do, Park, J. S., Won, H. S., Kim, J. R., ... Yoon, M. Y. (2006). Sulfonylurea is a non-competitive inhibitor of acetohydroxyacid synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 27(10), 1697–1700. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2006.27.10.1697>
- Choi, K. J., Yeon, G. Y., Hoh, G. H., Choi, J. Do, & Yoon, M. Y. (2005). Characterization of acetohydroxyacid synthase from *Mycobacterium tuberculosis* and the identification of its new inhibitor from the screening of a chemical library. *FEBS Letters*, 579(21), 4903–4910. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.07.055>
- Cole, S., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., ... Barrell, B. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 394(6694), 651–653. <https://doi.org/10.1038/29241>
- Duggleby, R. G., & Pang, S. S. (2000). Acetohydroxyacid Synthase. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 33(1), 1–36.
- Duggleby, R. G., Pang, S. S., Yu, H., & Guddat, L. W. (2003). Systematic characterization of mutations in yeast acetohydroxyacid synthase: Interpretation of herbicide-resistance data. *European Journal of Biochemistry*, 270(13), 2895–2904. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03671.x>
- Fanlo, P., & Tiberio, G. (2007). Tuberculosis extrapulmonar. *Anales Del Sistema Sanitario de Navarra*, 30(2), 143–162. <https://doi.org/10.4321/s1137-66272007000400011>
- Gagneux, S., DeRiemer, K., Van, T., Kato-Maeda, M., De Jong, B. C., Narayanan, S., ... Small, P. M. (2006). Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), 2869–2873. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511240103>
- Gandhi, N. R., Nunn, P., Dheda, K., Schaaf, H. S., Zignol, M., van Soolingen, D., ... Bayona, J. (2010). Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *The Lancet*, 375(9728), 1830–1843. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60410-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60410-2)
- Garcia, Mario D., Chua, S. M. H., Low, Y. S., Lee, Y. T., Agnew-Francis, K., Wang,

- J. G., ... Guddat, L. W. (2018). Commercial AHAS-inhibiting herbicides are promising drug leads for the treatment of human fungal pathogenic infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(41), E9649–E9658. <https://doi.org/10.1073/pnas.1809422115>
- Garcia, Mario D., Nouwens, A., Lonhienne, T. G., & Guddat, L. W. (2017). Comprehensive understanding of acetohydroxyacid synthase inhibition by different herbicide families. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(7), E1091–E1100. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616142114>
- Garcia, Mario Daniel, Wang, J. G., Lonhienne, T., & Guddat, L. W. (2017). Crystal structure of plant acetohydroxyacid synthase, the target for several commercial herbicides. *FEBS Journal*, *284*(13), 2037–2051. <https://doi.org/10.1111/febs.14102>
- Gedi, V., & Yoon, M. Y. (2012). Bacterial acetohydroxyacid synthase and its inhibitors - A summary of their structure, biological activity and current status. *FEBS Journal*, *279*(6), 946–963. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08505.x>
- González-Martín, J., Garca-Garca, J. M., Anibarro, L., Vidal, R., Esteban, J., Blanquer, R., ... Ruiz-Manzano, J. (2010). Consensus document on the diagnosis, treatment and prevention of tuberculosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *28*(5), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.02.006>
- Grandoni, J. A., Marta, P. T., & Schloss, J. V. (1998). Inhibitors of branched-chain amino acid biosynthesis as potential antituberculosis agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *42*(4), 475–482. <https://doi.org/10.1093/jac/42.4.475>
- Guzmán, A. (2017). Nuevos fármacos para el tratamiento de la tuberculosis. *MOLEQLA*, *27*(1), 32–36.
- Heijne, G. von, Stepphun, J., & Herrmann, R. G. (1989). Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *European Journal of Biochemistry*, *180*(3), 535–545. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1989.tb14679.x>
- Hernández, C., Correa, M., Zamora, F., Rossi, M., González, S., Pedroza, R., & Gómez, M. (2005). Aislamiento e identificación de micobacterias mediante

- métodos bacteriológicos y de biología molecular. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25(2), 203–216.
- Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. (2012). Fichas de agentes biológicos: *Mycobacterium tuberculosis*. Retrieved from <https://www.insst.es/documents/94886/353495/Mycobacterium+tuberculosis.pdf/9d648564-f9f0-41ff-9ae9-6c7af638bb52>
- Jastrzębowska, K., & Gabriel, I. (2015). Inhibitors of amino acids biosynthesis as antifungal agents. *Amino Acids*, 47(2), 227–249. <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1873-1>
- Jiménez-Gracia, A. I., Félix-Ponce, M., & Laniado-Laborín, R. (2019). Inyectables de segunda línea para el tratamiento de la tuberculosis multidrogorresistente: ¿Porqué los seguimos utilizando? *Rev. Am. Med. Respir*, 19(3), 171–174.
- Jung, I. P., Ha, N. R., Lee, S. C., Ryoo, S. W., & Yoon, M. Y. (2016). Development of potent chemical antituberculosis agents targeting *Mycobacterium tuberculosis* acetohydroxyacid synthase. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 48(3), 247–258. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.04.031>
- Lee, Y. T., & Duggleby, R. G. (2001). Identification of the regulatory subunit of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase and reconstitution with its catalytic subunit. *Biochemistry*, 40(23), 6836–6844. <https://doi.org/10.1021/bi002775q>
- Lee, Yu Ting, Cui, C. J., Chow, E. W. L., Pue, N., Lonhienne, T., Wang, J. G., ... Guddat, L. W. (2013). Sulfonylureas have antifungal activity and are potent inhibitors of *Candida albicans* acetohydroxyacid synthase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(1), 210–219. <https://doi.org/10.1021/jm301501k>
- Lonhienne, T., Garcia, M. D., Pierens, G., Mobli, M., Nouwens, A., & Guddat, L. W. (2018). Structural insights into the mechanism of inhibition of AHAS by herbicides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(9), E1945–E1954. <https://doi.org/10.1073/pnas.1714392115>
- Lonhienne, T., Low, Y. S., Garcia, M. D., Croll, T., Gao, Y., Wang, Q., ... Guddat, L. W. (2020). Structures of fungal and plant acetohydroxyacid synthases. *Nature*, 586(7828), 317–321. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2514-3>
- McCourt, J. A., Pang, S. S., Guddat, L. W., & Duggleby, R. G. (2005). Elucidating the specificity of binding of sulfonylurea herbicides to acetohydroxyacid synthase.

- Biochemistry*, 44(7), 2330–2338. <https://doi.org/10.1021/bi047980a>
- McCourt, J. A., Pang, S. S., King-Scott, J., Guddat, L. W., & Duggleby, R. G. (2006). Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(3), 569–573. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508701103>
- McCourt, J., & Duggleby, R. (2006). Acetohydroxyacid synthase and its role in the biosynthetic pathway for branched-chain amino acids. *Amino Acids*, 31(2), 173–210. <https://doi.org/10.1007/s00726-005-0297-3>
- Ministerio de Salud Pública. (2018a). Boletín Anual Tuberculosis 2018. Retrieved April 14, 2021, from https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/03/informe_anual_TB_2018UV.pdf
- Ministerio de Salud Pública. (2018b). Prevención, diagnóstico, tratamiento y control de la tuberculosis. Guía de Práctica Clínica. In *Segunda edición*. Retrieved from <https://www.salud.gob.ec>
- Muller, Y. A., & Schulz, G. E. (1993). Structure of the thiamine- and flavin-dependent enzyme pyruvate oxidase. *Science*, 259(5097), 965–967. <https://doi.org/10.1126/science.8438155>
- Organización Mundial de la Salud. (2019). *Informe Mundial Sobre Tuberculosis*. Retrieved from https://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2019_ExecutiveSummary_sp.pdf?ua=1
- Organización Panamericana de la Salud. (2019). *Tuberculosis en las Américas*.
- Pang, S. S., Duggleby, R. G., & Guddat, L. W. (2002). Crystal structure of yeast acetohydroxyacid synthase: A target for herbicidal inhibitors. *Journal of Molecular Biology*, 317(2), 249–262. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5419>
- Pérez, M., Tuñez, M., García, M., & Lado, F. (2002). Diagnóstico microbiológico de la tuberculosis. *Med Integral*, 39(5), 207–215.
- Poulsen, C., & Stougaard, P. (1989). Purification and properties of dehydropeptidases. *The Journal of Biological Chemistry*, 185(1), 433–439. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)56757-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)56757-0)
- Qu, R. Y., Yang, J. F., Devendar, P., Kang, W. M., Liu, Y. C., Chen, Q., ... Yang, G. F. (2017). Discovery of New 2-[(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)oxy]-6-(substituted phenoxy)benzoic Acids as Flexible Inhibitors of Arabidopsis thaliana

- Acetohydroxyacid Synthase and Its P197L Mutant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(51), 11170–11178. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05198>
- Richie, D. L., Thompson, K. V., Studer, C., Prindle, V. C., Aust, T., Riedl, R., ... Hoepfner, D. (2013). Identification and evaluation of novel acetolactate synthase inhibitors as antifungal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(5), 2272–2280. <https://doi.org/10.1128/AAC.01809-12>
- Singh, V., Chandra, D., Srivastava, B. S., & Srivastava, R. (2011). Biochemical and transcription analysis of acetohydroxyacid synthase isoforms in *Mycobacterium tuberculosis* identifies these enzymes as potential targets for drug development. *Microbiology*, 157(1), 29–37. <https://doi.org/10.1099/mic.0.041343-0>
- Söding, J., & Remmert, M. (2011). Protein sequence comparison and fold recognition: Progress and good-practice benchmarking. *Current Opinion in Structural Biology*, 21(3), 404–411. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2011.03.005>
- Sohn, H., Lee, K. S., Ko, Y. K., Ryu, J. W., Woo, J. C., Koo, D. W., ... Kim, H. J. (2008). In vitro and ex vivo activity of new derivatives of acetohydroxyacid synthase inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis* and non-tuberculous mycobacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31(6), 567–571. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.01.016>
- Steinegger, M., Meier, M., Mirdita, M., Vöhringer, H., Haunsberger, S., & Söding, J. (2019). HH-suite3 for fast remote homology detection and deep protein annotation. *BMC Bioinformatics*, 20(473), 1–15. <https://doi.org/10.1101/560029>
- Tittmann, K., Schröder, K., Golbik, R., McCourt, J., Kaplun, A., Duggleby, R. G., ... Hübner, G. (2004). Electron transfer in acetohydroxy acid synthase as a side reaction of catalysis. Implications for the reactivity and partitioning of the carbanion/enamine form of (α -hydroxyethyl)thiamin diphosphate in a “nonredox” flavoenzyme. *Biochemistry*, 43(27), 8652–8661. <https://doi.org/10.1021/bi049897t>
- Wang, J. G., Lee, P. K. M., Dong, Y. H., Pang, S. S., Duggleby, R. G., Li, Z. M., & Guddat, L. W. (2009). Crystal structures of two novel sulfonylurea herbicides in complex with *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase. *FEBS Journal*, 276(5), 1282–1290. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.06863.x>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., ... Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures

and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296–W303.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky427>

Wessel, P. M., Graciet, E., Douce, R., & Dumas, R. (2000). Evidence for Two Distinct Effector-Binding Sites in Threonine Deaminase by Site-Directed Mutagenesis, Kinetic, and Binding Experiments. *Biochemistry*, 39, 15136–15143.

World Health Organization. (2009). *Global Tuberculosis Control: A Short Update to the 2009 Report*. Retrieved from https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44241/9789241598866_eng.pdf?sequence=1

World Health Organization. (2020). *Global Tuberculosis Report*. Retrieved from <http://marefateadyan.nashriyat.ir/node/150>

Zhou, Q., Liu, W., Zhang, Y., & Liu, K. K. (2007). Action mechanisms of acetolactate synthase-inhibiting herbicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 89(2), 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.04.004>

ANEXOS

6u9d.2	0.95	2 - 165 9 - 600	43.41	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	6 x TPP, 8 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP	3.19	0.41	BLAST / HHblits	0.56
6u9d.2	0.95	2 - 165 9 - 600	43.41	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	6 x TPP, 8 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP	3.19	0.41	BLAST / HHblits	0.56
6u9d.2	0.95	2 - 165 9 - 600	43.41	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	6 x TPP, 8 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP	3.19	0.41	BLAST / HHblits	0.56
6u9d.1	0.94	4 - 161 9 - 600	44.31	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	8 x TPP, 12 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP	3.19	0.42	BLAST	0.71 0.49
6u9d.1	0.94	4 - 161 9 - 600	44.31	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	8 x TPP, 12 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP	3.19	0.42	BLAST	0.71
6u9d.1	0.94	4 - 161 9 - 600	44.31	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	8 x TPP, 12 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP	3.19	0.42	BLAST	0.71
6u9d.1	0.94	4 - 161 9 - 600	44.31	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	8 x TPP, 12 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP	3.19	0.42	BLAST	0.71 0.49
6u9d.2	0.94	4 - 161 9 - 600	44.31	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	6 x TPP, 8 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP	3.19	0.42	BLAST	0.54
6u9d.2	0.94	4 - 161 9 - 600	44.31	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	6 x TPP, 8 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP	3.19	0.42	BLAST	0.54
6u9d.2	0.94	4 - 161 9 - 600	44.31	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	6 x TPP, 8 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP	3.19	0.42	BLAST	0.55
6u9d.2	0.94	4 - 161 9 - 600	44.31	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	6 x TPP, 8 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP	3.19	0.42	BLAST	0.54
6u9d.1	0.95	2 - 165 6 - 604	41.44	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	8 x TPP, 12 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP	3.19	0.40	HHblits	0.73 0.52

6u9d.1	0.95	2 - 165 6 - 604	41.44	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	8 x TPP, 12 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP	3.19	0.40	HHblits	0.73	
6u9d.1	0.95	2 - 165 6 - 604	41.44	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	8 x TPP, 12 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP	3.19	0.40	HHblits	0.73	
6u9d.1	0.95	2 - 165 6 - 604	41.44	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	8 x TPP, 12 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP	3.19	0.40	HHblits	0.73	0.52
6u9d.2	0.95	2 - 165 6 - 604	41.44	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	6 x TPP, 8 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP	3.19	0.40	HHblits	0.57	
6u9d.2	0.95	2 - 165 6 - 604	41.44	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	6 x TPP, 8 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP	3.19	0.40	HHblits	0.57	
6u9d.2	0.95	2 - 165 6 - 604	41.44	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	6 x TPP, 8 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP	3.19	0.40	HHblits	0.57	
6u9d.1	0.94	4 - 161 6 - 604	42.32	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	8 x TPP, 12 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP	3.19	0.41	BLAST / HHblits	0.72	0.52
6u9d.1	0.94	4 - 161 6 - 604	42.32	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	8 x TPP, 12 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP	3.19	0.41	BLAST / HHblits	0.72	
6u9d.1	0.94	4 - 161 6 - 604	42.32	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	8 x TPP, 12 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP	3.19	0.41	BLAST / HHblits	0.72	
6u9d.1	0.94	4 - 161 6 - 604	42.32	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	8 x TPP, 12 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP	3.19	0.41	BLAST / HHblits	0.72	
6u9d.2	0.94	4 - 161 6 - 604	42.32	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	6 x TPP, 8 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP	3.19	0.41	BLAST / HHblits	0.56	0.45
6u9d.2	0.94	4 - 161 6 - 604	42.32	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	6 x TPP, 8 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP	3.19	0.41	BLAST / HHblits	0.55	
6u9d.2	0.94	4 - 161 6 - 604	42.32	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	6 x TPP, 8 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP	3.19	0.41	BLAST / HHblits	0.56	
6u9d.2	0.94	4 - 161 6 - 604	42.32	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	6 x TPP, 8 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP	3.19	0.41	BLAST / HHblits	0.55	

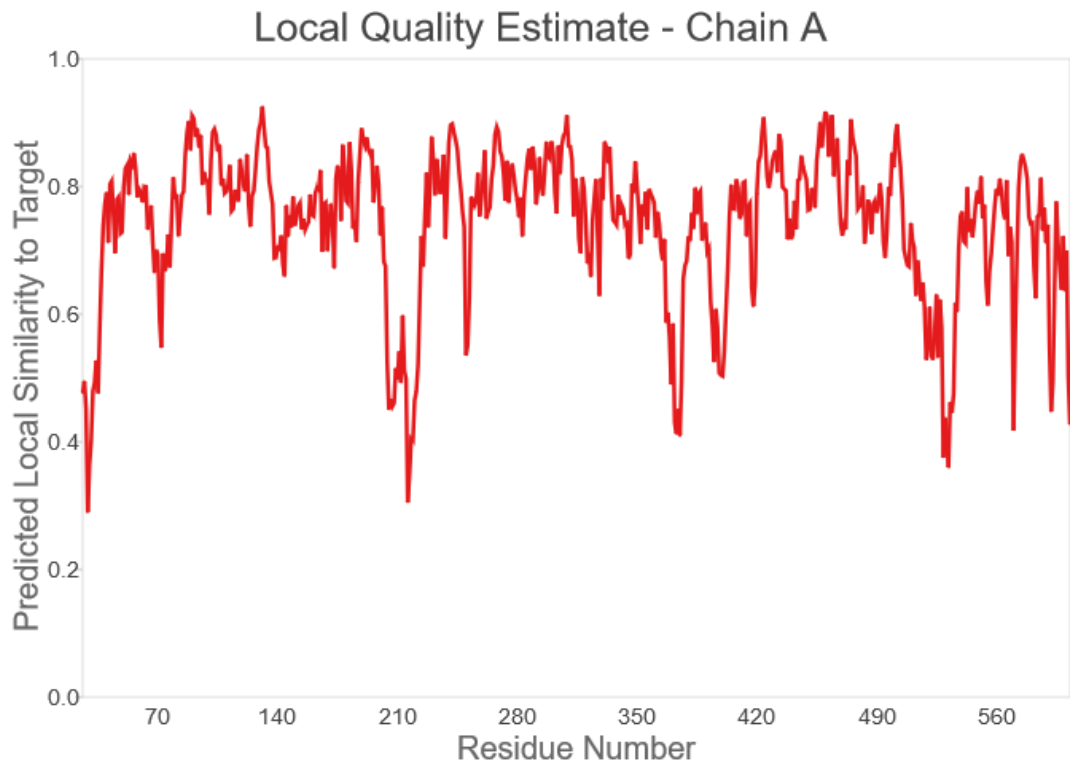
6u9h.1	0.92	1 - 164 36 - 605	47.31	hetero- 8-4-mer	Arabidopsis thaliana acetoxyacid synthase complex	8 x MG, 8 x FAD, 8 x TPP	EM	0.00	0.42	BLAST / HHblits	0.71	0.56
6vz8.1	0.92	1 - 164 36 - 605	47.31	hetero- 8-4-mer	Arabidopsis thaliana acetoxyacid synthase complex with valine bound	8 x MG, 8 x FAD, 8 x TPP, 8 x VAL	EM	0.00	0.42	BLAST / HHblits	0.68	
6u9h.1	0.92	2 - 164 36 - 605	46.97	hetero- 8-4-mer	Arabidopsis thaliana acetoxyacid synthase complex	8 x MG, 8 x FAD, 8 x TPP	EM	0.00	0.42	BLAST / HHblits	0.71	0.56
6vz8.1	0.92	2 - 164 36 - 605	46.97	hetero- 8-4-mer	Arabidopsis thaliana acetoxyacid synthase complex with valine bound	8 x MG, 8 x FAD, 8 x TPP, 8 x VAL	EM	0.00	0.42	BLAST / HHblits	0.69	
6u9h.1	0.92	4 - 163 36 - 605	47.57	hetero- 8-4-mer	Arabidopsis thaliana acetoxyacid synthase complex	8 x MG, 8 x FAD, 8 x TPP	EM	0.00	0.43	BLAST	0.71	
6vz8.1	0.92	4 - 163 36 - 605	47.57	hetero- 8-4-mer	Arabidopsis thaliana acetoxyacid synthase complex with valine bound	8 x MG, 8 x FAD, 8 x TPP, 8 x VAL	EM	0.00	0.43	BLAST	0.68	0.47
6u9h.1	0.93	1 - 164 33 - 602	45.74	hetero- 8-4-mer	Arabidopsis thaliana acetoxyacid synthase complex	8 x MG, 8 x FAD, 8 x TPP	EM	0.00	0.42	HHblits	0.73	0.58
6vz8.1	0.93	1 - 164 33 - 602	45.74	hetero- 8-4-mer	Arabidopsis thaliana acetoxyacid synthase complex with valine bound	8 x MG, 8 x FAD, 8 x TPP, 8 x VAL	EM	0.00	0.42	HHblits	0.71	
6u9h.1	0.93	2 - 164 33 - 602	45.40	hetero- 8-4-mer	Arabidopsis thaliana acetoxyacid synthase complex	8 x MG, 8 x FAD, 8 x TPP	EM	0.00	0.42	HHblits	0.73	0.58
6vz8.1	0.93	2 - 164 33 - 602	45.40	hetero- 8-4-mer	Arabidopsis thaliana acetoxyacid synthase complex with valine bound	8 x MG, 8 x FAD, 8 x TPP, 8 x VAL	EM	0.00	0.42	HHblits	0.71	
6u9h.1	0.92	4 - 163 33 - 602	45.99	hetero- 8-4-mer	Arabidopsis thaliana acetoxyacid synthase complex	8 x MG, 8 x FAD, 8 x TPP	EM	0.00	0.42	BLAST / HHblits	0.73	
6vz8.1	0.92	4 - 163 33 - 602	45.99	hetero- 8-4-mer	Arabidopsis thaliana acetoxyacid synthase complex with valine bound	8 x MG, 8 x FAD, 8 x TPP, 8 x VAL	EM	0.00	0.42	BLAST / HHblits	0.71	0.51

6u9h.1	0.91	4 - 159 36 - 605	47.43	hetero- 8-4-mer	Arabidopsis thaliana acetohydroxyacid synthase complex	8 x MG, 8 x FAD, 8 x TPP	EM	0.00	0.42	BLAST	0.71	
6vz8.1	0.91	4 - 159 36 - 605	47.43	hetero- 8-4-mer	Arabidopsis thaliana acetohydroxyacid synthase complex with valine bound	8 x MG, 8 x FAD, 8 x TPP, 8 x VAL	EM	0.00	0.42	BLAST	0.68	0.50
6u9h.1	0.92	4 - 159 33 - 602	45.84	hetero- 8-4-mer	Arabidopsis thaliana acetohydroxyacid synthase complex	8 x MG, 8 x FAD, 8 x TPP	EM	0.00	0.42	BLAST / HHblits	0.73	
6vz8.1	0.92	4 - 159 33 - 602	45.84	hetero- 8-4-mer	Arabidopsis thaliana acetohydroxyacid synthase complex with valine bound	8 x MG, 8 x FAD, 8 x TPP, 8 x VAL	EM	0.00	0.42	BLAST / HHblits	0.71	0.54
6wo1.1	0.92	4 - 166 34 - 606	43.37	hetero- 1-1-mer	Hybrid acetohydroxyacid synthase complex structure with Cryptococcus neofomans AHAS catalytic subunit and Saccharomyces cerevisiae AHAS regulatory subunit	1 x FAD, 1 x 8GF, 1 x DPO, 1 x MG, 1 x VAL	X-ray	3.30	0.41	BLAST / HHblits	0.68	0.17
6wo1.1	0.91	4 - 166 38 - 599	44.74	hetero- 1-1-mer	Hybrid acetohydroxyacid synthase complex structure with Cryptococcus neofomans AHAS catalytic subunit and Saccharomyces cerevisiae AHAS regulatory subunit	1 x FAD, 1 x 8GF, 1 x DPO, 1 x MG, 1 x VAL	X-ray	3.30	0.42	BLAST	0.67	0.14
6wo1.1	0.92	2 - 165 34 - 606	42.62	hetero- 1-1-mer	Hybrid acetohydroxyacid synthase complex structure with Cryptococcus neofomans AHAS catalytic subunit and Saccharomyces cerevisiae AHAS regulatory subunit	1 x FAD, 1 x 8GF, 1 x DPO, 1 x MG, 1 x VAL	X-ray	3.30	0.41	HHblits	0.69	0.18
6wo1.1	0.91	2 - 165 38 - 599	43.98	hetero- 1-1-mer	Hybrid acetohydroxyacid synthase complex structure with Cryptococcus neofomans AHAS catalytic subunit and Saccharomyces cerevisiae AHAS regulatory subunit	1 x FAD, 1 x 8GF, 1 x DPO, 1 x MG, 1 x VAL	X-ray	3.30	0.42	BLAST / HHblits	0.68	0.15
6lpl.1	0.80	1 - 76 31 - 601	43.17	hetero- 1-1-mer	Crystal Structure of AHAS holo- enzyme		X-ray	2.85	0.41	BLAST / HHblits	0.60	0.50
6lpl.1	0.82	3 - 94 31 - 601	41.80	hetero- 1-1-mer	Crystal Structure of AHAS holo- enzyme		X-ray	2.85	0.40	HHblits	0.62	0.51
6lpl.1	0.79	1 - 76 36 - 600	45.00	hetero- 1-1-mer	Crystal Structure of AHAS holo- enzyme		X-ray	2.85	0.42	BLAST	0.59	0.47
6lpl.1	0.81	3 - 94 36 - 600	43.55	hetero- 1-1-mer	Crystal Structure of AHAS holo- enzyme		X-ray	2.85	0.41	BLAST / HHblits	0.61	0.48

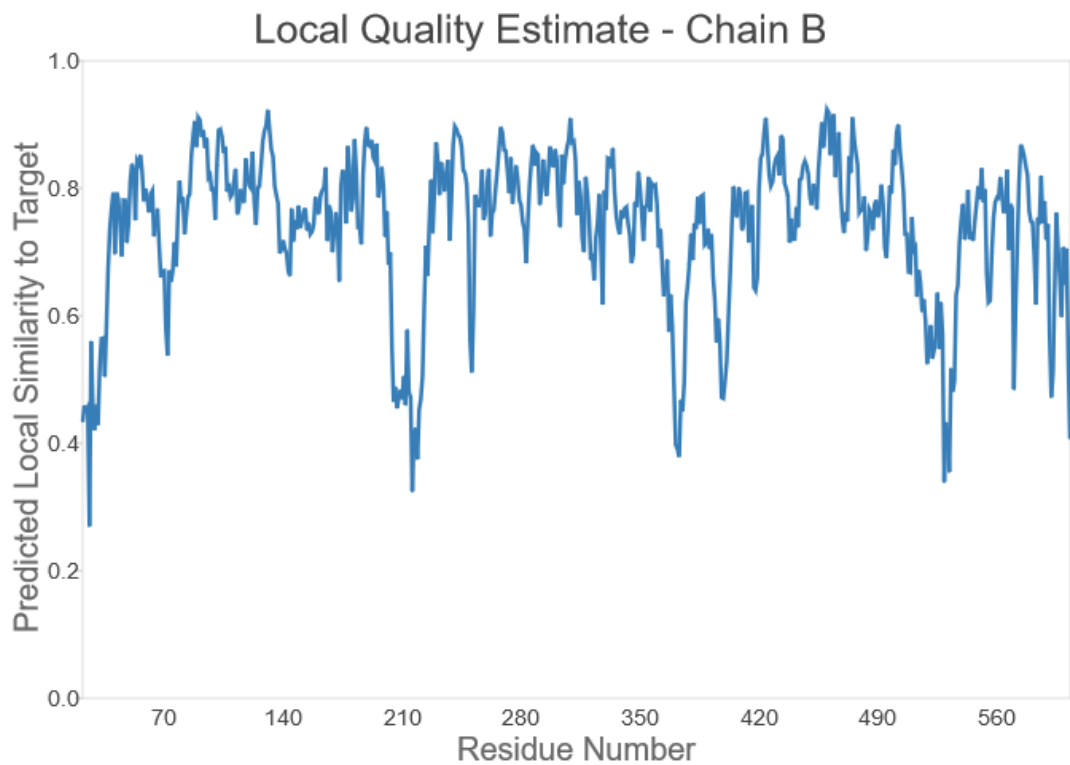
6u9h.1	0.34	1 - 164 458 - 584	32.59	hetero- 8-4-mer	Arabidopsis thaliana acetoxyacid synthase complex	8 x MG, 8 x FAD, 8 x TPP	EM	0.00	0.35	HHblits	0.20
6vz8.1	0.34	1 - 164 458 - 584	32.59	hetero- 8-4-mer	Arabidopsis thaliana acetoxyacid synthase complex with valine bound	8 x MG, 8 x FAD, 8 x TPP, 8 x VAL	EM	0.00	0.35	HHblits	0.20
6wo1.1	0.34	4 - 166 458 - 583	29.89	hetero- 1-1-mer	Hybrid acetoxyacid synthase complex structure with Cryptococcus neofomans AHAS catalytic subunit and Saccharomyces cerevisiae AHAS regulatory subunit	1 x FAD, 1 x 8GF, 1 x DPO, 1 x MG, 1 x VAL	X-ray	3.30	0.34	BLAST / HHblits	0.19
6u9h.1	0.34	2 - 164 458 - 584	31.73	hetero- 8-4-mer	Arabidopsis thaliana acetoxyacid synthase complex	8 x MG, 8 x FAD, 8 x TPP	EM	0.00	0.35	HHblits	0.20
6vz8.1	0.34	2 - 164 458 - 584	31.73	hetero- 8-4-mer	Arabidopsis thaliana acetoxyacid synthase complex with valine bound	8 x MG, 8 x FAD, 8 x TPP, 8 x VAL	EM	0.00	0.35	HHblits	0.21
6u9d.1	0.34	2 - 165 458 - 583	29.52	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetoxyacid synthase	8 x TPP, 12 x MG, 8 x FAD, 8 x 60G, 8 x ATP	X-ray	3.19	0.34	HHblits	0.20
6u9d.1	0.34	2 - 165 458 - 583	29.52	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetoxyacid synthase	8 x TPP, 12 x MG, 8 x FAD, 8 x 60G, 8 x ATP	X-ray	3.19	0.34	HHblits	0.21
6u9d.1	0.34	2 - 165 458 - 583	29.52	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetoxyacid synthase	8 x TPP, 12 x MG, 8 x FAD, 8 x 60G, 8 x ATP	X-ray	3.19	0.34	HHblits	0.20
6u9d.1	0.34	2 - 165 458 - 583	29.52	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetoxyacid synthase	8 x TPP, 12 x MG, 8 x FAD, 8 x 60G, 8 x ATP	X-ray	3.19	0.34	HHblits	0.21
6u9d.2	0.34	2 - 165 458 - 583	29.52	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetoxyacid synthase	6 x TPP, 8 x MG, 8 x FAD, 8 x 60G, 8 x ATP	X-ray	3.19	0.34	HHblits	0.20
6u9d.2	0.34	2 - 165 458 - 583	29.52	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetoxyacid synthase	6 x TPP, 8 x MG, 8 x FAD, 8 x 60G, 8 x ATP	X-ray	3.19	0.34	HHblits	0.20
6u9d.2	0.34	2 - 165 458 - 583	29.52	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetoxyacid synthase	6 x TPP, 8 x MG, 8 x FAD, 8 x 60G, 8 x ATP	X-ray	3.19	0.34	HHblits	0.20
6u9d.2	0.34	2 - 165 458 - 583	29.52	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetoxyacid synthase	6 x TPP, 8 x MG, 8 x FAD, 8 x 60G, 8 x ATP	X-ray	3.19	0.34	HHblits	0.20
6wo1.1	0.35	2 - 165 458 - 583	27.94	hetero- 1-1-mer	Hybrid acetoxyacid synthase complex structure with Cryptococcus neofomans AHAS catalytic subunit and Saccharomyces cerevisiae AHAS regulatory subunit	1 x FAD, 1 x 8GF, 1 x DPO, 1 x MG, 1 x VAL	X-ray	3.30	0.33	HHblits	0.20
6u9h.1	0.34	4 - 163 458 - 584	33.08	hetero- 8-4-mer	Arabidopsis thaliana acetoxyacid synthase complex	8 x MG, 8 x FAD, 8 x TPP	EM	0.00	0.36	BLAST / HHblits	0.20

6vz8.1	0.34	4 - 163 458 - 584	33.08	hetero- 8-4-mer	Arabidopsis thaliana acetohydroxyacid synthase complex with valine bound	8 x MG, 8 x FAD, 8 x TPP, EM 8 x VAL	0.00	0.36	BLAST / HHblits	0.20
6u9d.1	0.34	4 - 161 458 - 583	31.70	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	8 x TPP, 12 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP	3.19	0.35	BLAST / HHblits	0.19
6u9d.1	0.34	4 - 161 458 - 583	31.70	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	8 x TPP, 12 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP	3.19	0.35	BLAST / HHblits	0.19
6u9d.1	0.34	4 - 161 458 - 583	31.70	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	8 x TPP, 12 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP	3.19	0.35	BLAST / HHblits	0.20
6u9d.1	0.34	4 - 161 458 - 583	31.70	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	8 x TPP, 12 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP	3.19	0.35	BLAST / HHblits	0.20
6u9d.2	0.34	4 - 161 458 - 583	31.70	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	6 x TPP, 8 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP	3.19	0.35	BLAST / HHblits	0.19
6u9d.2	0.34	4 - 161 458 - 583	31.70	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	6 x TPP, 8 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP	3.19	0.35	BLAST / HHblits	0.19
6u9d.2	0.34	4 - 161 458 - 583	31.70	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	6 x TPP, 8 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP	3.19	0.35	BLAST / HHblits	0.20
6u9d.2	0.34	4 - 161 458 - 583	31.70	hetero- 8-8-mer	Saccharomyces cerevisiae acetohydroxyacid synthase	6 x TPP, 8 x MG, 8 x FAD, 8 X-ray x 60G, 8 x ATP	3.19	0.35	BLAST / HHblits	0.19
6u9h.1	0.34	4 - 159 458 - 584	32.58	hetero- 8-4-mer	Arabidopsis thaliana acetohydroxyacid synthase complex	8 x MG, 8 x FAD, 8 x TPP EM	0.00	0.35	BLAST / HHblits	0.20
6vz8.1	0.34	4 - 159 458 - 584	32.58	hetero- 8-4-mer	Arabidopsis thaliana acetohydroxyacid synthase complex with valine bound	8 x MG, 8 x FAD, 8 x TPP, EM 8 x VAL	0.00	0.35	BLAST / HHblits	0.20
6lpi.1	0.25	3 - 94 458 - 584	21.61	hetero- 1-1-mer	Crystal Structure of AHAS holo- enzyme	X-ray	2.85	0.30	HHblits	0.12
6lpi.1	0.23	1 - 76 458 - 584	24.59	hetero- 1-1-mer	Crystal Structure of AHAS holo- enzyme	X-ray	2.85	0.31	BLAST / HHblits	0.10

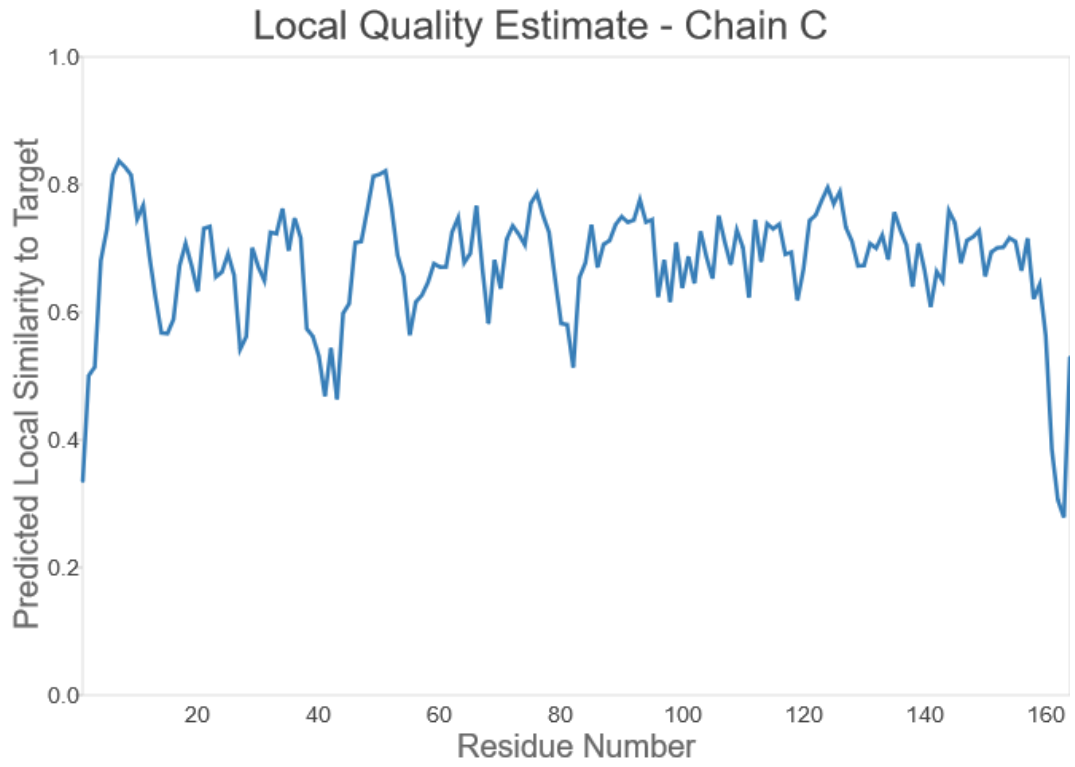
Anexo 1. Reporte de las plantillas. Comparación de la secuencia de *MtAHAS* con 84 modelos, en base a los cuales se realizó la construcción del modelo. Se ubican en orden descendente, en base a QMQE, QSQE, y la cobertura de la secuencia de *MtAHAS*.



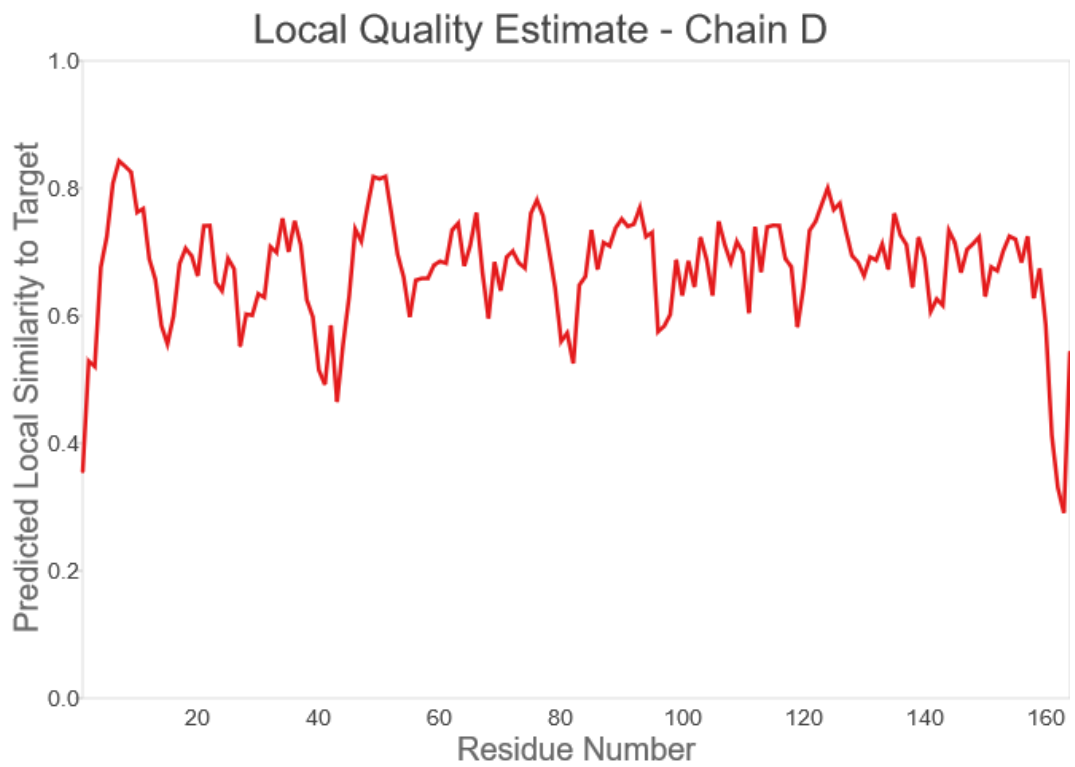
Anexo 2. Estimación de calidad local cadena A. Correspondiente a la subunidad catalítica de *MtAHAS*.



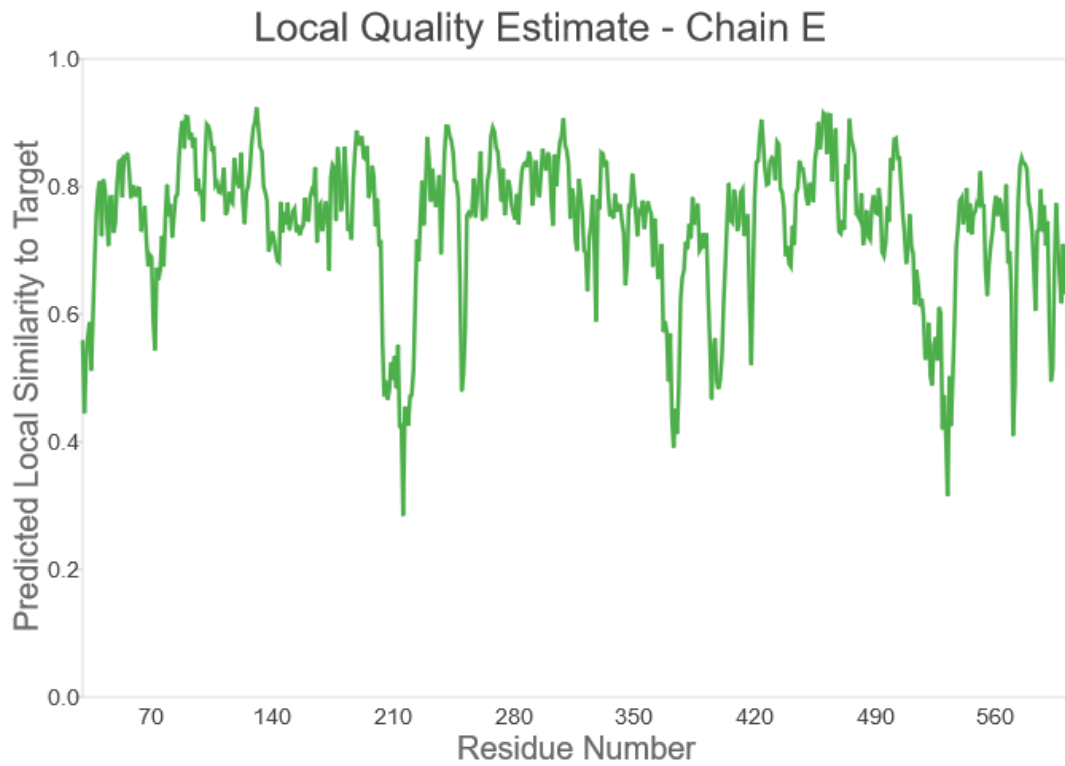
Anexo 3. Estimación de calidad local cadena B. Correspondiente a la subunidad catalítica de *MtAHAS*.



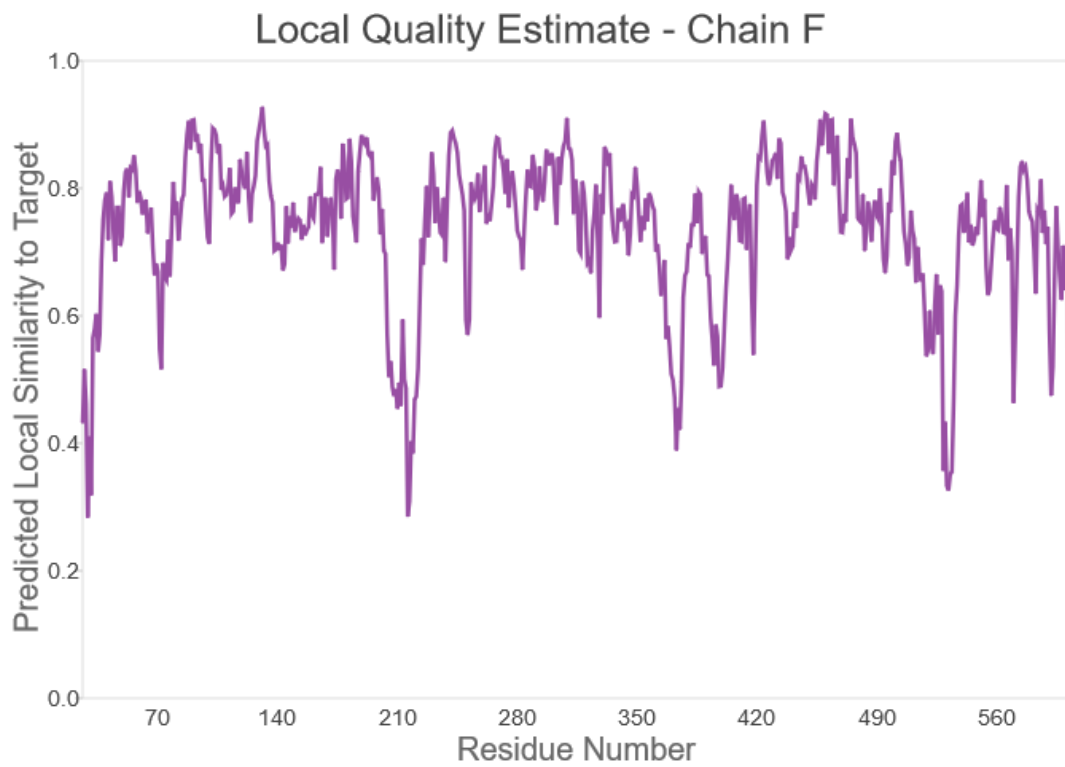
Anexo 4. Estimación de calidad local cadena C. Correspondiente a la subunidad regulatoria de *MtAHAS*.



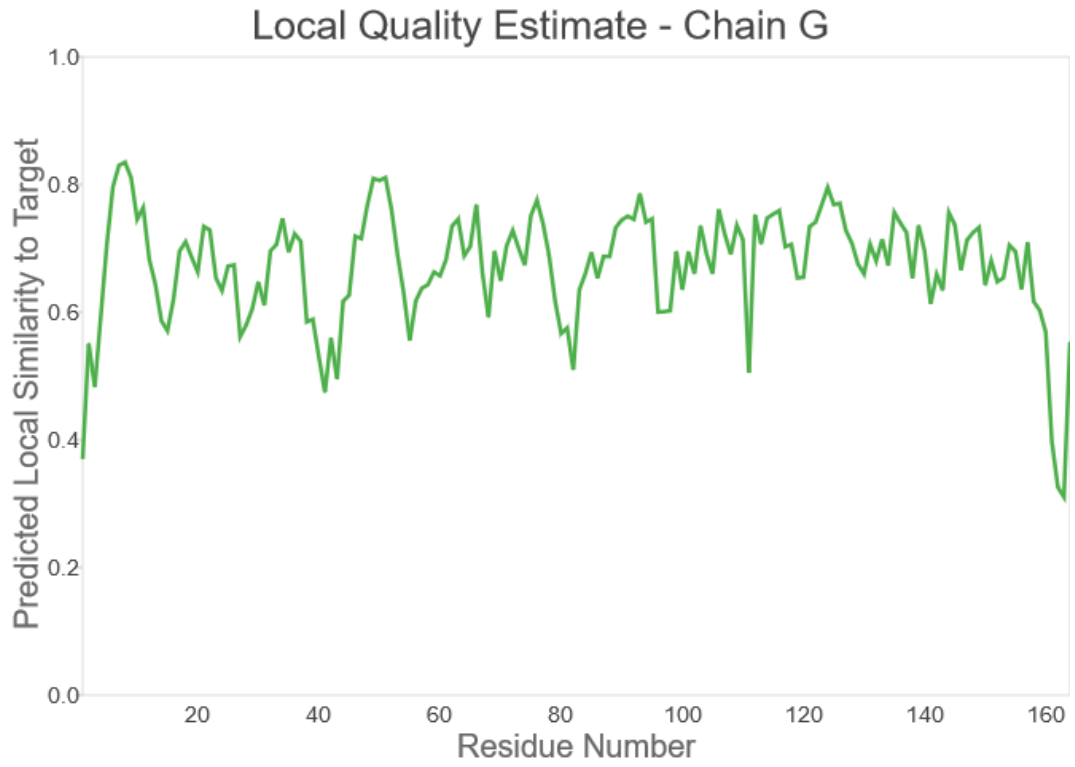
Anexo 5. Estimación de calidad local cadena D. Correspondiente a la subunidad regulatoria de *MtAHAS*.



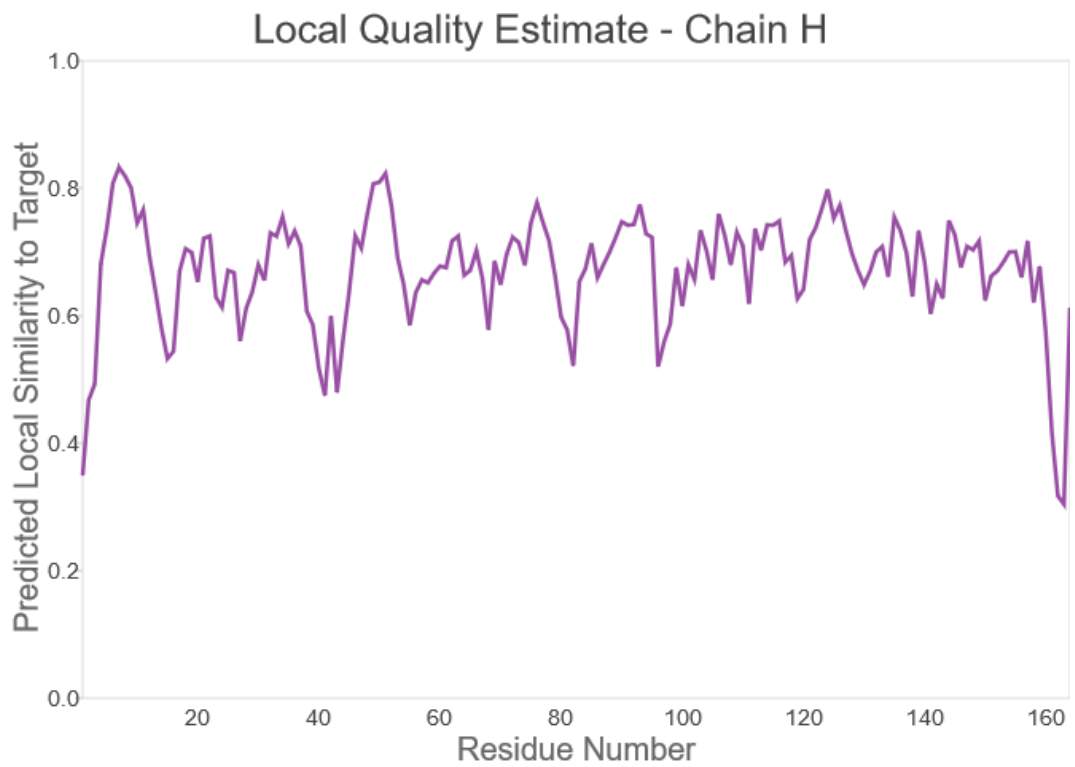
Anexo 6. Estimación de calidad local cadena E. Correspondiente a la subunidad catalítica de *MtAHAS*.



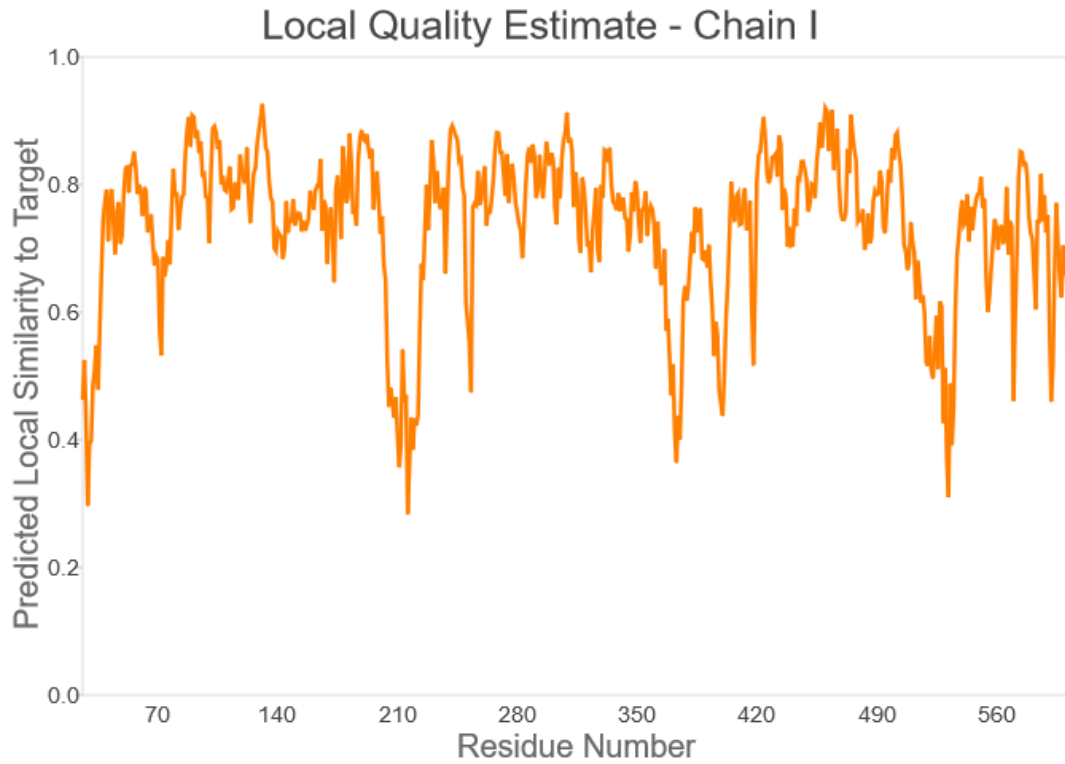
Anexo 7. Estimación de calidad local cadena F. Correspondiente a la subunidad catalítica de *MtAHAS*.



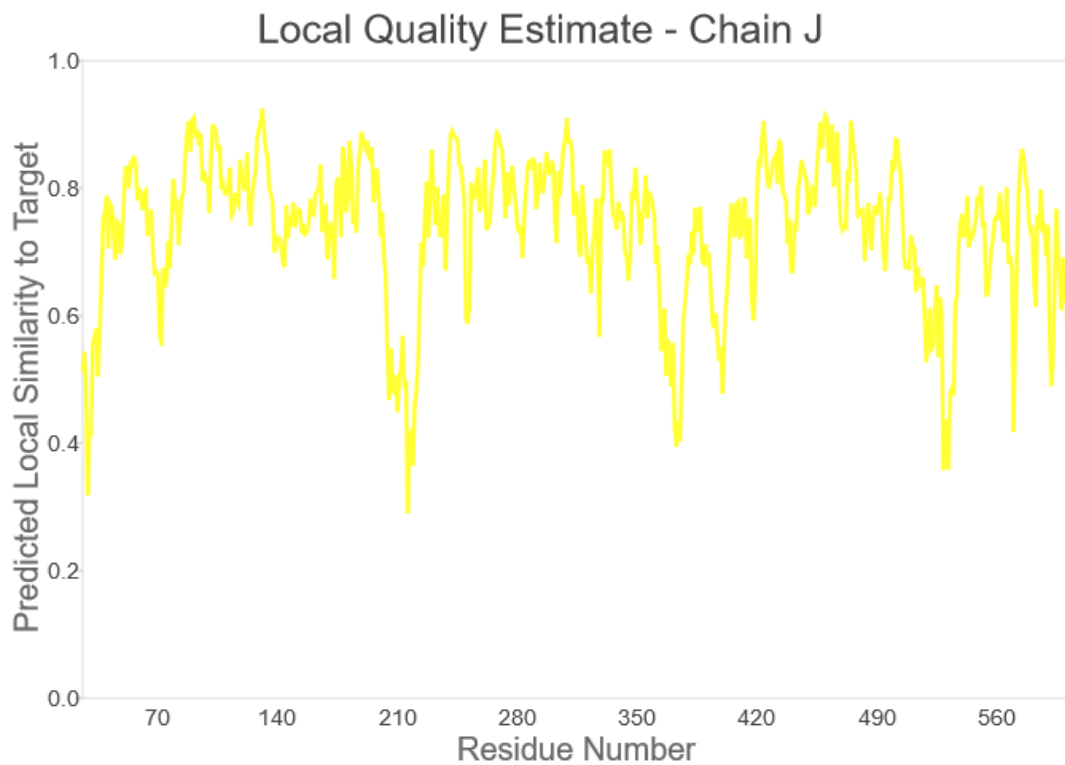
Anexo 8. Estimación de calidad local cadena G. Correspondiente a la subunidad regulatoria de *MtAHAS*.



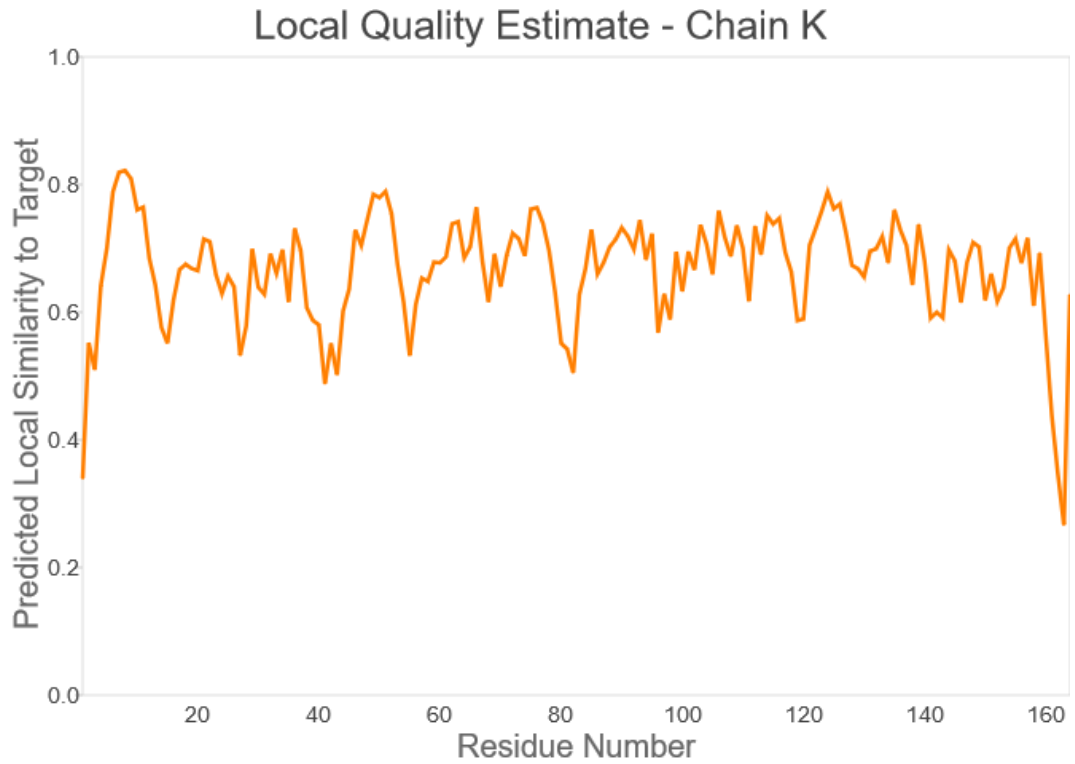
Anexo 9. Estimación de calidad local cadena H. Correspondiente a la subunidad regulatoria de *MtAHAS*.



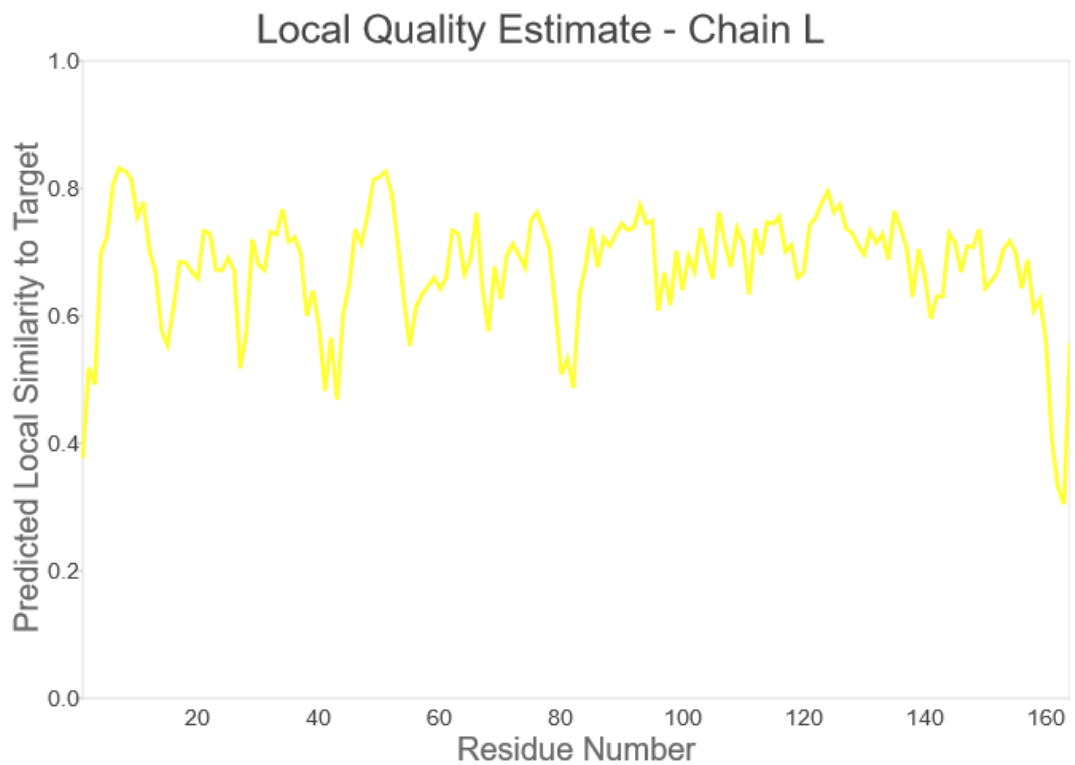
Anexo 10. Estimación de calidad local cadena I. Correspondiente a la subunidad catalítica de *MtAHAS*.



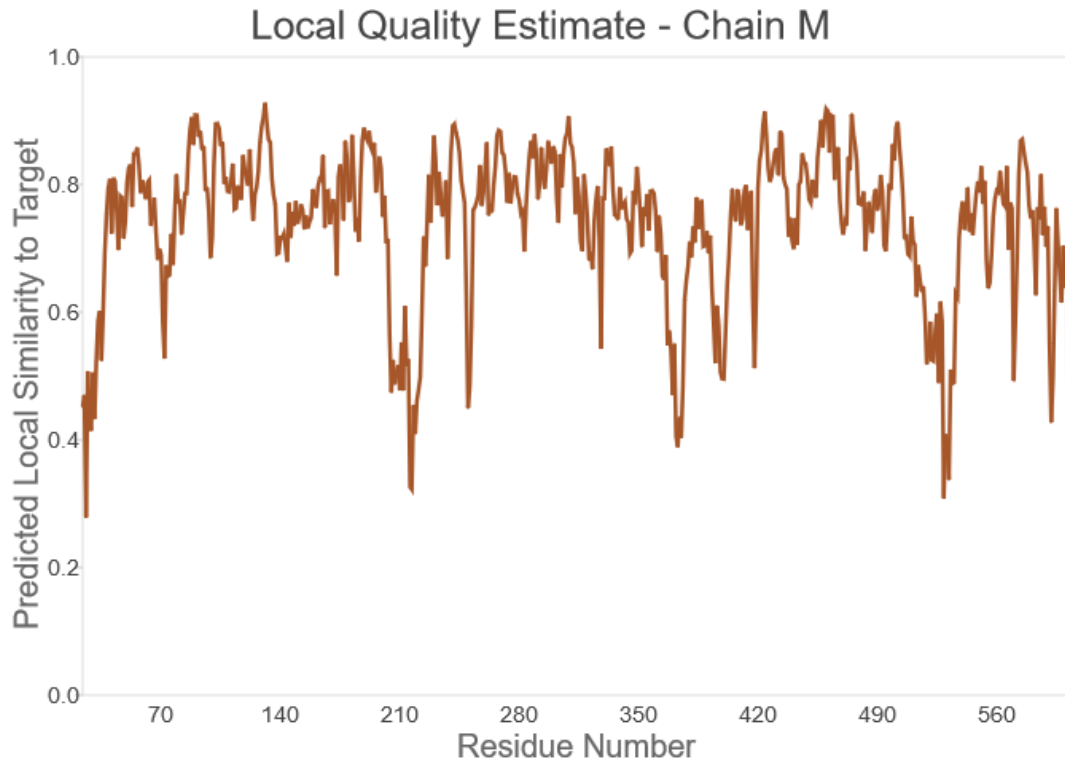
Anexo 11. Estimación de calidad local cadena J. Correspondiente a la subunidad catalítica de *MtAHAS*.



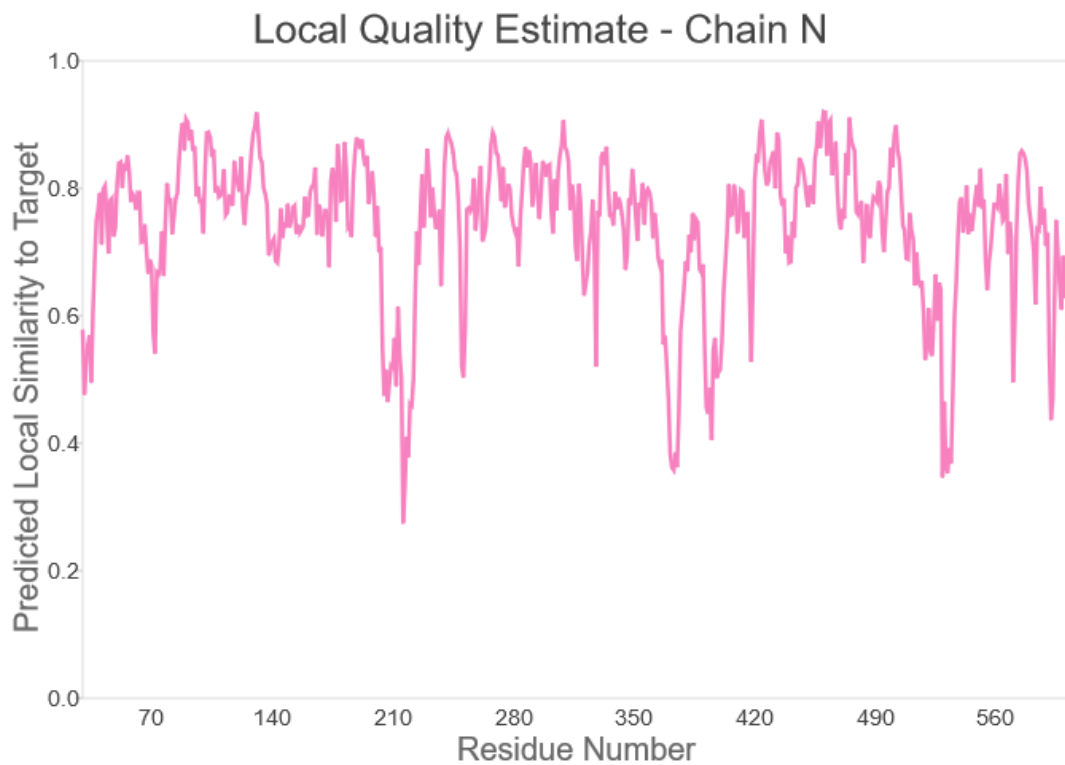
Anexo 12. Estimación de calidad local cadena K. Correspondiente a la subunidad regulatoria de *MtAHAS*.



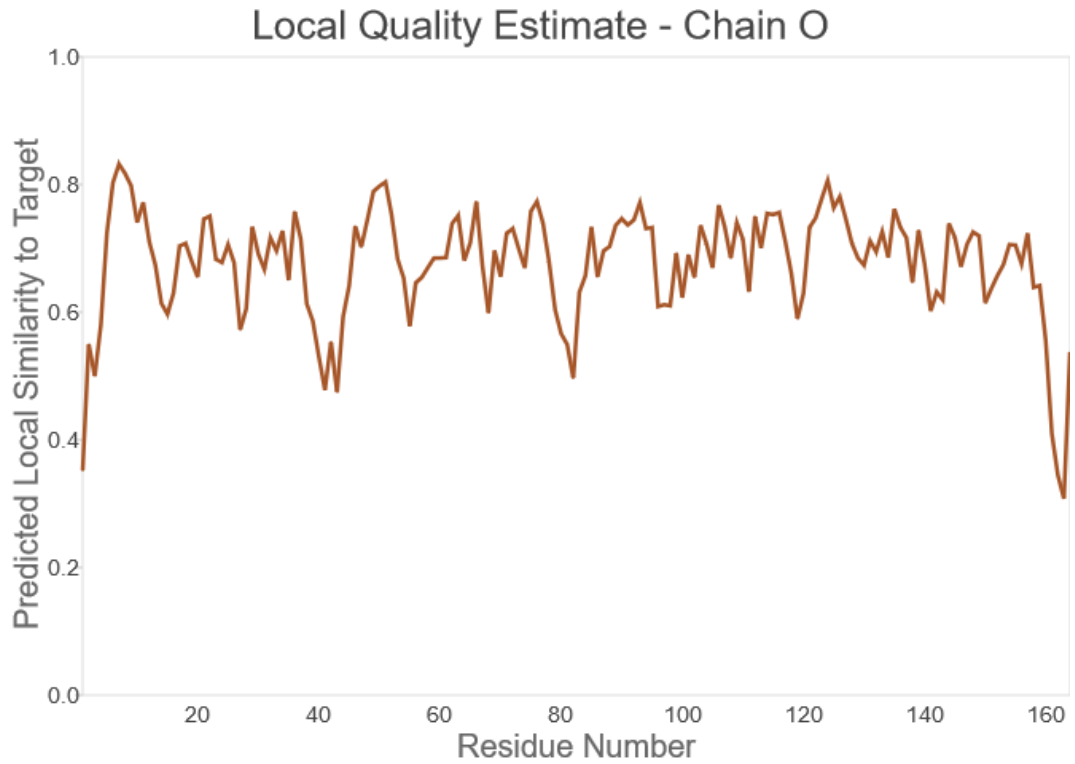
Anexo 13. Estimación de calidad local cadena L. Correspondiente a la subunidad regulatoria de *MtAHAS*.



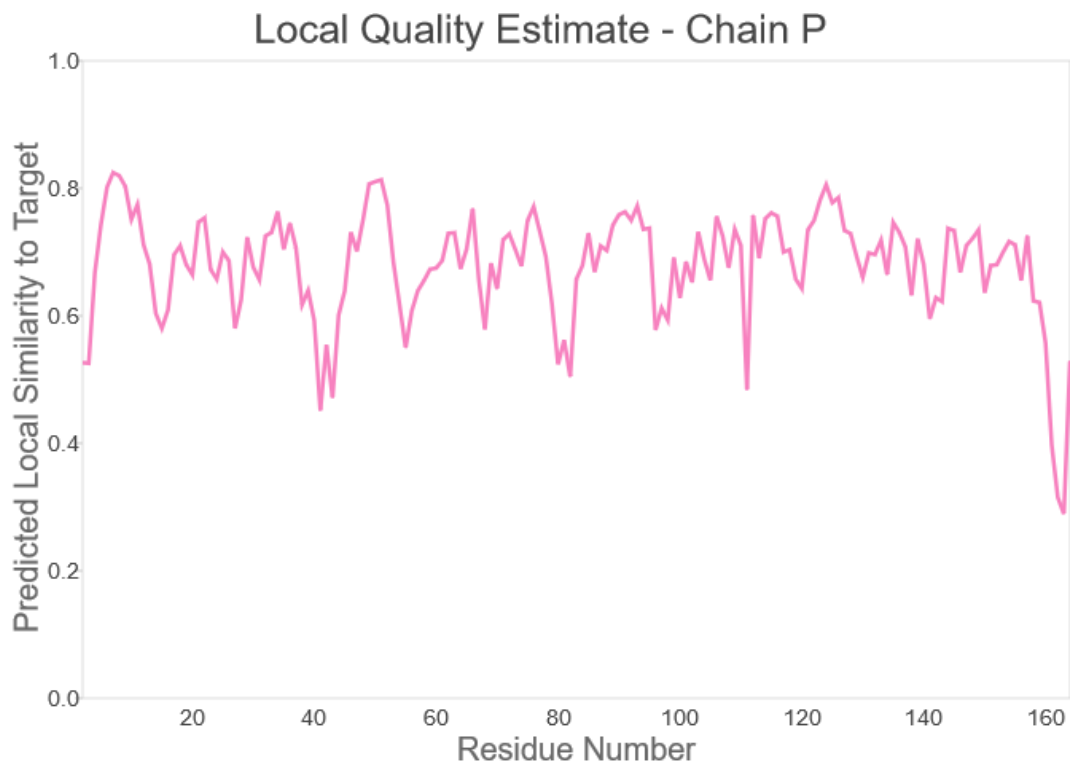
Anexo 14. Estimación de calidad local cadena M. Correspondiente a la subunidad catalítica de *MtAHAS*.



Anexo 15. Estimación de calidad local cadena N. Correspondiente a la subunidad catalítica de *MtAHAS*.



Anexo 16. Estimación de calidad local cadena O. Correspondiente a la subunidad regulatoria de *MtAHAS*.



Anexo 17. Estimación de calidad local cadena P. Correspondiente a la subunidad regulatoria de *MtAHAS*.