

Tesis Doctoral

# Estudio computacional de la relación estructura-función en globinas

Boechi, Leonardo

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Boechi, Leonardo. (2011). Estudio computacional de la relación estructura-función en globinas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Boechi, Leonardo. "Estudio computacional de la relación estructura-función en globinas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física

## **ESTUDIO COMPUTACIONAL DE LA RELACION ESTRUCTURA - FUNCION EN GLOBINAS**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área: Química Inorgánica, Química Analítica y Química Física.

**LEONARDO BOECHI**

Director de Tesis: Prof. Dr. Darío A. Estrin  
Director Asistente: Prof. Dr. Marcelo A. Martí  
Consejero de Estudios: Prof. Dr. Leonardo Slep

Buenos Aires, Marzo de 2011



## *Prólogo*

*La presente tesis doctoral tiene como objetivo fundamental transmitir los conocimientos adquiridos y generados en estos años, a futuras generaciones de estudiantes. Por tal razón, el lenguaje utilizado en muchos casos podrá resultar algo coloquial, ya que lo considero una forma de comunicación escrita mucho más sencilla, cercana y personal, atributos necesarios para lograr la difícil tarea que le estoy encomendando a esta tesis.*

*En algunos casos, aparecerán anécdotas y hasta experiencias personales, que no tienen otro objetivo más que ilustrar al lector sobre las diferentes formas a través de las cuales accedí a este conocimiento. Porque no se trata solamente de organizar resultados de forma elegante y coherente, sino también de mostrar las ramificaciones infinitas de efectos y de causas que propone la ciencia, a quienes se le atreven.*

*Por otro lado, y dado que la ciencia se discute en congresos y revistas internacionales, donde el lenguaje mayoritariamente es el inglés, permitiré a ciertas palabras y expresiones conservar su lengua original, para no caer en traducciones literales forzadas que desconciertan a quien las lee.*

*Leonardo Boechi  
Buenos Aires, 2 de Febrero de 2011*



*A los que no han podido  
cumplir sus sueños*



# ESTUDIO COMPUTACIONAL DE LA RELACION ESTRUCTURA - FUNCION EN GLOBINAS

## Resumen

Las globinas son una familia de proteínas solubles, que poseen un grupo hemo unido generalmente de manera no covalente a la proteína. Sus representantes más famosos son la hemoglobina y la mioglobina, responsables del transporte y almacenamiento de oxígeno en mamíferos. Las globinas se clasifican en varias subfamilias, una de ellas se denominan hemoglobinas truncadas (trHb) y se las ha encontrado en plantas, hongos y bacterias. En muchos casos pertenecen a microorganismos patógenos para el hombre como *M. tuberculosis*, *M. leprae*, y *C jejuni* entre otros.

Las globinas poseen la capacidad de reaccionar frente a ligandos diatómicos ( $O_2$ , NO, etc) que les permite actuar como reservorios de dichos ligandos, transporte o detección de los mismos o realizando reacciones de óxido reducción en procesos fundamentales para la supervivencia de los microorganismos patógenos en los organismos donde se alojan. Por esta razón, en la presente tesis se estudiaron los determinantes moleculares que regulan la reactividad de las globinas (fundamentalmente trHbs) frente a ligandos diatómicos, utilizando métodos de simulación computacional. Por un lado se realizaron estudios de los diferentes mecanismos mediante los cuales se regula la migración de los ligandos hacia el sitio activo. Y por el otro, los mecanismos de estabilización de los ligandos cuando se encuentran coordinados al grupo hemo, dentro de la proteína. El estudio de ambos procesos mencionados, resulta fundamental para comprender la función que estas proteínas desempeña en los organismos a los cuales pertenecen.

Con el objeto de alcanzar una visión global de los fenómenos estudiados, se investigaron diferentes miembros de la misma sub familia, emparentados evolutivamente entre si. De esta forma se logró una comprensión más amplia de cada uno de los fenómenos.

Las herramientas computacionales utilizadas están basadas principalmente en dos metodologías: aquellas basadas en la mecánica clásica para analizar procesos dinámicos de los sistemas, combinado con un novedoso esquema (teorema de Jarzynski) que permite obtener perfiles de energía libre de los procesos; y esquemas híbridos clásico/cuánticos (QM/MM) que permiten simular reactividad química en sistemas grandes como son las hemoproteínas.



Dado que las simulaciones computacionales son herramientas muy poderosas cuando se las encuentran combinadas con resultados experimentales, se ha trabajado en colaboración con grupos experimentales para potenciar los alcances de las simulaciones, y a su vez validar los modelos utilizados.

Los resultados de la presente tesis, permitieron comprender la estructura de canales internos que poseen las globinas; así como también, la dinámica del sitio activo que regula la afinidad y la reactividad en las mismas. En particular, se reconciliaron resultados aparentemente contradictorios, respecto de la relación entre la estructura de canales internos y las constantes cinéticas de asociación; se identificaron residuos críticos altamente conservados en esta familia, que resultan fundamentales para los procesos de migración de ligandos; se encontraron y caracterizaron fenómenos de hexacoordinación interna dual en una trHb de una bacteria antártica; se caracterizó la estabilización de diferentes ligandos (CO, O<sub>2</sub>, SH<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>) en estas proteínas; y finalmente se encontró una relación muy importante entre la protonación de un residuo de histidina y la migración de O<sub>2</sub> en la mioglobina.

Palabras clave: globinas, hemoglobinas truncadas, dinámica molecular, QM-MM, Jarzynski.

# COMPUTATIONAL STUDY OF THE RELATIONSHIP BETWEEN STRUCTURE AND FUNCTION IN GLOBINAS

## Abstract

Globins are soluble proteins that have a heme prosthetic group non covalently bound to the protein matrix. The most important members are hemoglobin and myoglobin, which are responsible for the oxygen transport and storage in mammals. The globin family is classified in different sub-families: one of them is called truncated hemoglobin (trHb) and its members are widely distributed in plants, fungi and bacteria kingdoms. In many cases, these proteins belong to pathogen microorganism like *M. tuberculosis*, *M. leprae*, y *C jejuni* among others.

These proteins are able to react with diatomic ligands like O<sub>2</sub> and NO. This confers upon them the ability to act as storage, transporters or ligand detectors. In many cases they are also involved in redox processes which are critical for the survival of the microorganism in the host organism.

In the present Thesis we studied the molecular basis of globins reactivity (mainly trHbs) with diatomic ligands. Specifically, we studied both the different mechanisms used by these proteins to control ligand migration to the active site, and the stabilization of the coordinated ligand once the ligand is inside. These processes are crucial to understand the role of these proteins in the organisms to which they belong.

In order to reach a global vision of the processes, we studied different members of the same family, which are evolutively related.

The computational tools used in the present Thesis are mainly based on two approaches. Those based on classical mechanics, to study processes associated with the dynamics of the system, combined with "State of the Art" techniques (Jarzynski's equation) that provide us with the free energy profile of the process desired. We also used a novel quantum/classical approach (QM/MM) reactive processes in large systems.

Since computer simulations are very powerful tools combined with experimental results, different collaborations were made with experimental groups to reach a better understanding of the processes, and even as an important way to validate our models.

The overall results provide new insight into the structure of internal tunnels for ligand migration, as well as the active site dynamics. In particular, we conciliated controversial results about the relationship of the structure of internal tunnels and the association kinetic constants; we

identified critical residues highly conserved in this family involved in the ligand migration process; we found internal hexacoordination phenomena in an antarctic bacteria trHb; we also characterized the stabilization of different ligands such as CO, O<sub>2</sub>, SH<sup>-</sup>, F<sup>-</sup> coordinated to the heme group; and finally we found an important relationship between the protonation of a particular histidine and the O<sub>2</sub> uptake in myoglobin.

Keywords: globins, truncated hemoglobins, molecular dynamics, QM/MM, Jarzynski.

# ESTUDIO COMPUTACIONAL DE LA RELACION ENTRE LA ESTRUCTURA Y LA FUNCION EN GLOBINAS

## Indice

<b>Resumen</b>	5
<b>Abstract</b>	7
<b>Capítulo 1. Introducción general</b>	13
Hemoproteínas	13
Globinas	14
Hemoglobinas truncadas	16
Afinidad por ligandos	19
Caracterización cinética y termodinámica de la afinidad	20
Simulaciones computacionales de la afinidad de ligandos	22
Detoxificación de óxido nítrico	22
Referencias	24
<b>Capítulo 2. Metodología general</b>	27
Introducción	27
Métodos basados en la mecánica cuántica	27
Teoría del funcional de la densidad (DFT)	29
Métodos basados en la mecánica clásica	30
Métodos híbridos cuántico/clásicos (QM/MM)	31
Dinámica molecular	32
Integración de las ecuaciones de movimiento	32
Tratamiento de la temperatura	33
Dinámica molecular clásica guiada	34
Método de muestreo sesgado (Umbrella Sampling)	34
Método de Jarzynski (MSMD)	36

Obtención de parámetros para las simulaciones clásicas	38
Proteínas mutantes <i>in-silico</i>	40
Modelado de estructuras	40
Especificaciones de las simulaciones realizadas	41
Referencias	43
<b>Capítulo 3. Migración de ligandos en hemoglobinas truncadas</b>	<b>45</b>
Introducción	45
Metodología	46
Resultados	47
Hemoglobina truncada O de <i>M. tuberculosis</i>	47
Proteínas mutantes del Canal Largo	50
Proteínas mutantes del Canal Corto E7	52
Migración de un segundo ligando	52
Relación entre barreras y constantes cinéticas	53
Modificaciones estructurales en la proteína oxigenada	54
Reacción de detoxificación de NO	55
Hemoglobina truncada O de <i>B. subtilis</i>	57
Perfiles de energía libre	59
Explicación microscópica de las diferencias encontradas	60
Mutante GlnE11->Leu	61
Conclusión	62
Discusión	64
Referencias	65
<b>Capítulo 4. Estabilización de ligandos en Hemoglobinas Truncadas</b>	<b>67</b>
Introducción	67
Resultados	67
Estabilización de CO y O <sub>2</sub> en proteínas del grupo II	67
Introducción	67
Naturaleza química de la coordinación	68
Proteína mutante TrpG8->Leu	72
Discusión	73

Dinámica del sitio activo en una trHb del grupo III	73
Introducción	73
Comportamiento de la proteína wild type	74
Proteínas mutantes	75
Cálculos cuánticos de la interacción proteína-oxígeno	78
Discusión	78
Especies de sulfhídrico en hemoglobinas truncadas	80
Introducción	80
Estabilización de la especie SH <sup>-</sup>	82
Discusión	83
Fluoruro como sonda para estudiar el sitio activo en hemoproteínas	84
Introducción	84
Estabilización de fluoruro	86
Discusión	89
Referencias	91
<b>Capítulo 5. Regulación del ingreso de O<sub>2</sub> en mioglobina</b>	93
Introducción	93
Metodología	96
Resultados	97
Relación entre estado de la HisE7 y su localización	97
Tautomerización $\delta - \epsilon$	99
Perfiles de Energía libre de la interconversión	102
Explicación molecular de las diferencias encontradas	103
Ingreso de oxígeno a la mioglobina	105
Conclusión	109
Discusión	109
Referencias	111
<b>Capítulo 6. Hexacoordinación endógena</b>	113
Introducción	113
Herramientas bioinformáticas empleadas	114
Resultados	115

Diferentes alineamientos y modelos	115
Simulaciones de dinámica molecular	118
Hexacoordinación endógena	120
Conclusión	123
Discusión	124
Referencias	125
<b>Capítulo 7. Conclusiones Generales</b>	<b>127</b>
<b>Capítulo 8. Apéndice</b>	<b>129</b>
Convergencia de las simulaciones clásicas	129
Perfiles de energía libre	132
Parámetros utilizados en las simulaciones clásicas	135
Simulaciones de los diferentes modelos de Ph-trHbO	136
<b>Actividades complementarias</b>	<b>137</b>
Otras publicaciones	137
Revisiones	138
Estudiantes dirigidos	140
Divulgación de los resultados obtenidos	140
<b>Agradecimientos</b>	<b>141</b>

## Capítulo 1. Introducción General.

### Hemoproteínas:

Las hemoproteínas son una familia de proteínas que poseen un grupo hemo unido generalmente de forma covalente a la proteína. Las mismas han sido encontradas en casi todos los organismos vivientes, y realizan una gran variedad de funciones tales como transportar gases como en el caso de la hemoglobina, mioglobina y nitroforinas<sup>1-5</sup>; actuar como sensores de los mismos, como la guanilato ciclasa<sup>6</sup>, Fix-L<sup>7</sup>, y CoxA<sup>8</sup>; participar en reacciones de transferencia de electrones, como el caso de los citocromos; así como también en reacciones redox, como el caso de las peroxidasas; y finalmente catálisis entre especies reactivas de de nitrógeno y oxígeno (flavohemoglobinas, Hemoglobinas Truncadas, etc)<sup>9</sup>.

El grupo hemo posee un átomo de hierro que puede existir típicamente en los estados de oxidación FeII o FeIII. El mismo se encuentra unido a cuatro átomos de nitrógeno de la porfirina (ecuatoriales) (Fig. 1.1) y a un aminoácido ubicado en el entorno proximal (axial) del grupo hemo formándose la pentacoordinación (Fig. 1.2). Se define entorno proximal y distal del grupo hemo, a las dos regiones que quedan delimitadas por el plano que describe el anillo porfirínico. En algunos casos, como en la mioglobina, la leghemoglobina y la neuroglobina, el aminoácido encargado de la coordinación proximal es una histidina (Fig. 1.2)<sup>2,10,11</sup>; otras veces, como en el citocromo p450 o en la óxido nítrico sintasa puede ser una cisteína<sup>12</sup>; y por último en la catalasa de *E. coli* se ha encontrado una tirosina en este sitio<sup>13</sup>.

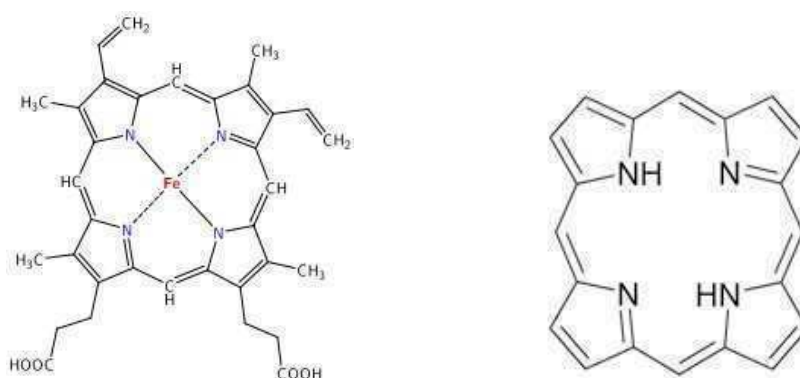


Figura 1.1.- *Izquierda:* Grupo hemo donde se resaltan los nitrógenos que se coordinan al Fe en el centro. *Derecha:* Detalle del tetrapirrol cíclico.



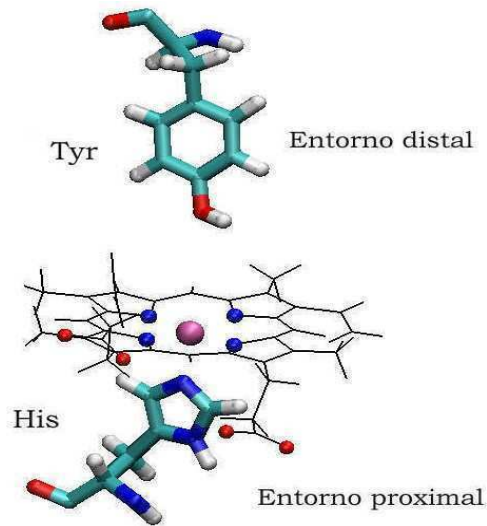


Figura 1.2.- Sitio activo de una globina, donde puede observarse la coordinación del átomo de Fe con los 4 nitrógenos de los pirroles, y con el imidazol de una histidina en el entorno distal.

## Globinas

Dentro del conjunto de las hemoproteínas, existe una superfamilia denominada globinas. Estas proteínas presentan un plegamiento particular de 3 hélices alfa sobre 3 hélices alfa, con el grupo hemo en el centro (Fig. 1.3). Las hélices se denominan A, B, E, F, G y H. Entre la B y la E se encuentra el loopCD que se cree posee un rol importante en la función de estas proteínas. Los miembros más representativos son la mioglobina, la neuroglobina, y la leghemoglobina<sup>2 3</sup>.

Como en las proteínas la estructura se encuentra más conservada que la secuencia de aminoácidos, se le asigna un nombre compuesto por letras y números a las posiciones más relevantes dentro de la estructura de la proteína: Ej TrpG8, AlaE7. En general, consisten en posiciones cercanas al sitio activo que podrían estar implicadas en la actividad de la misma, o simplemente sitios estructurales, donde se ha conservado el aminoácido a través de la historia evolutiva de esa familia. Un determinado sitio estructural no siempre deberá estar ocupado por el mismo aminoácido, pero en general, si está ocupado por uno diferente, es muy común que posea características similares al primero (polaridad, capacidad de formar puentes de hidrógeno, etc). En los casos donde el aminoácido presente en el sitio, posea características fisicoquímicas muy diferentes al aminoácido conservado en el resto de las proteínas de esa familia, existirán

posibilidades de estar en presencia del origen molecular sobre las diferencias que existen entre dichas proteínas. Por esta razón, en adelante no sólo se le dará importancia a la similitudes y diferencias entre los aminoácidos de cada proteína sino también a los sitios de localización de los mismos, dentro de la estructura de la misma.

De todas formas, en ocasiones, aparecen residuos importantes que no se encuentran en un sitio conservado dentro de la estructura de la proteína, por lo tanto, no podrán ser nombrados con la localización en la cual se encuentran. En este caso se identificará al aminoácido con un número que corresponde a la posición que posee dicho aminoácido en la estructura primaria: Ej Met92, Tyr36.

En la gran mayoría de los casos, la afinidad por pequeños ligandos ( $O_2$ ,  $CO$ ,  $NO$ ) resulta fundamental para la función de estas proteínas, por tal razón, el estudio de los mecanismos involucrados en la afinidad de los ligandos resulta muy relevante para comprender el funcionamiento de las mismas

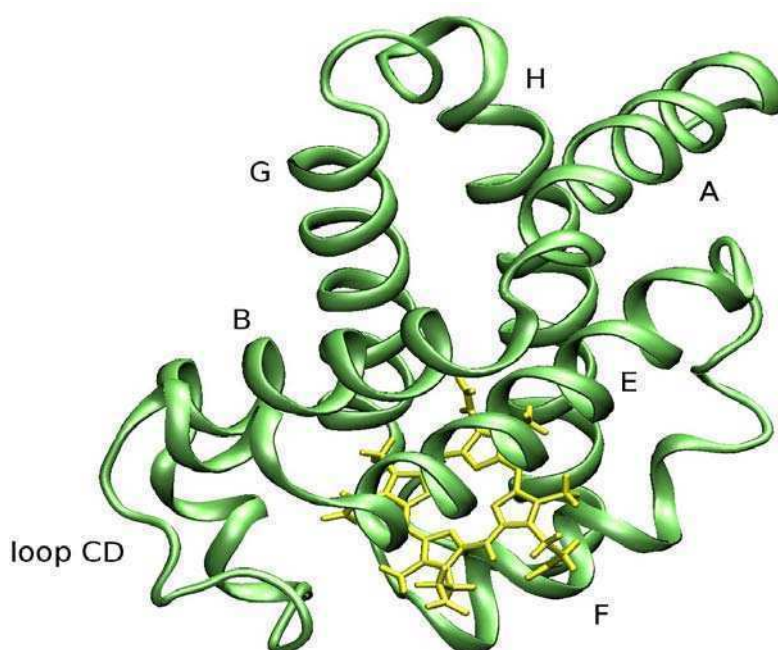


Figura 1.3. Estructura general de una típica globina, con sus 6 hélices (verde) y el grupo hemo (amarillo) con el átomo de Fe en el centro. Las hélices y la región del loopCD se muestran en la figura.

## Hemoglobinas Truncadas

Desde hace unos años se han encontrado una subfamilia de Globinas, que fueron llamadas Hemoglobinas Truncadas (trHb)<sup>9</sup>, ya que comparten un plegamiento muy similar a las globinas, pero poseen 20-40 aminoácidos menos, y carecen de dos de sus hélices. Por lo tanto el plegamiento en este caso resulta ser de 2 hélices sobre 2 hélices (Fig. 1.4)

Se les han asignado funciones que van desde sensores de O<sub>2</sub>/NO, transferencia de electrones, reacciones redox, hasta transporte de oxígeno bajo condiciones de hipoxia, entre otras<sup>14</sup>. A estas más de 200 proteínas encontradas en bacterias, protistas y plantas se las ha clasificado en los grupos I, II y III a partir de análisis filogenéticos (Fig. 1.4). Existen organismos tales como *M. tuberculosis*, *M. avium* y *M. smegmatis* que poseen más de una trHb, donde cada una pertenece a un grupo diferente. Para diferenciar las distintas proteínas que posee un mismo organismo se las identifica con una letra accesoria: la N para la proteína encontrada en el grupo I, la O para la encontrada en el grupo II y la letra P para la encontrada en el grupo III. Así la *M. avium N* pertenece al grupo I y la *M. avium O* pertenece al grupo II. Se postula que los genes de cada grupo (O, N y P) son ortólogos entre sí ya que existen en diferentes organismos y poseen alta identidad de secuencia entre si. Por ejemplo, la identidad de secuencia entre la *M. tuberculosis N* (trHbN) y la *M. tuberculosis O* (trHbO) es de 18% mientras que entre *M. tuberculosis O* y *M. avium O* la identidad es del 84%.

Aunque estructuralmente estas proteínas son muy similares entre si, de forma tal que uno podría superponer las hélices de estas proteínas de forma muy sencilla, y teniendo en cuenta que muchos residuos se encuentran altamente conservados existen ciertos cambios puntuales en residuos del sitio activo que ofrecen un abanico de variantes. Cambios puntuales en posiciones específicas de las proteínas (B10, CD1, E7, etc) modulan la estabilización de los ligandos (O<sub>2</sub>, NO, CO) que se coordinan al Fe (Fig. 1.5). De esta forma, existen comportamientos muy diferentes frente a ligandos diatómicos en algunos miembros de esta subfamilia (Fig. 1.4 y 1.5)<sup>9,14</sup>. Lo mismo sucede en el caso de los canales internos de migración, dado que los mismos se conservan en muchas de estas proteínas, pero debido a cambios puntuales en ciertos residuos, estos desaparecen.

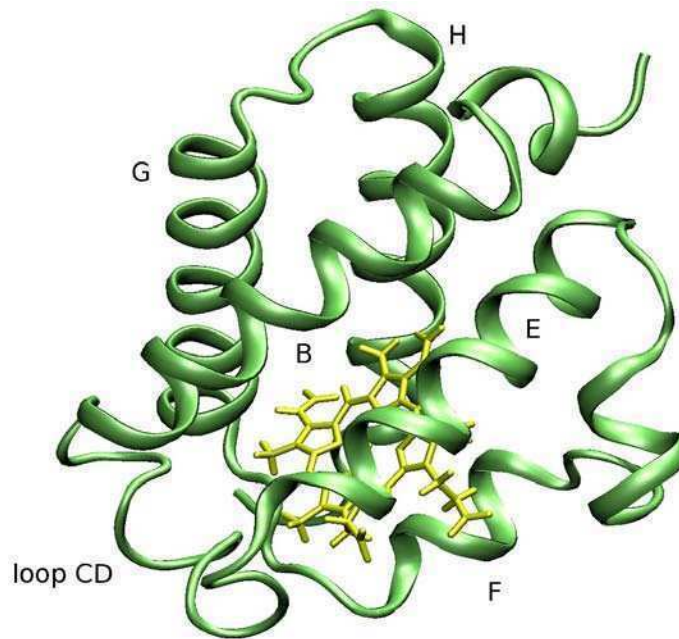


Figura 1.4. Estructura general de una típica Hemoglobina Truncada, con sus 4 hélices (verde) y el grupo hemo (amarillo) con el átomo de Fe en el centro. Si bien la hélice F no es considerada como tal en las Hemoglobinas Truncadas, fue marcada en el esquema para mejorar la comprensión.

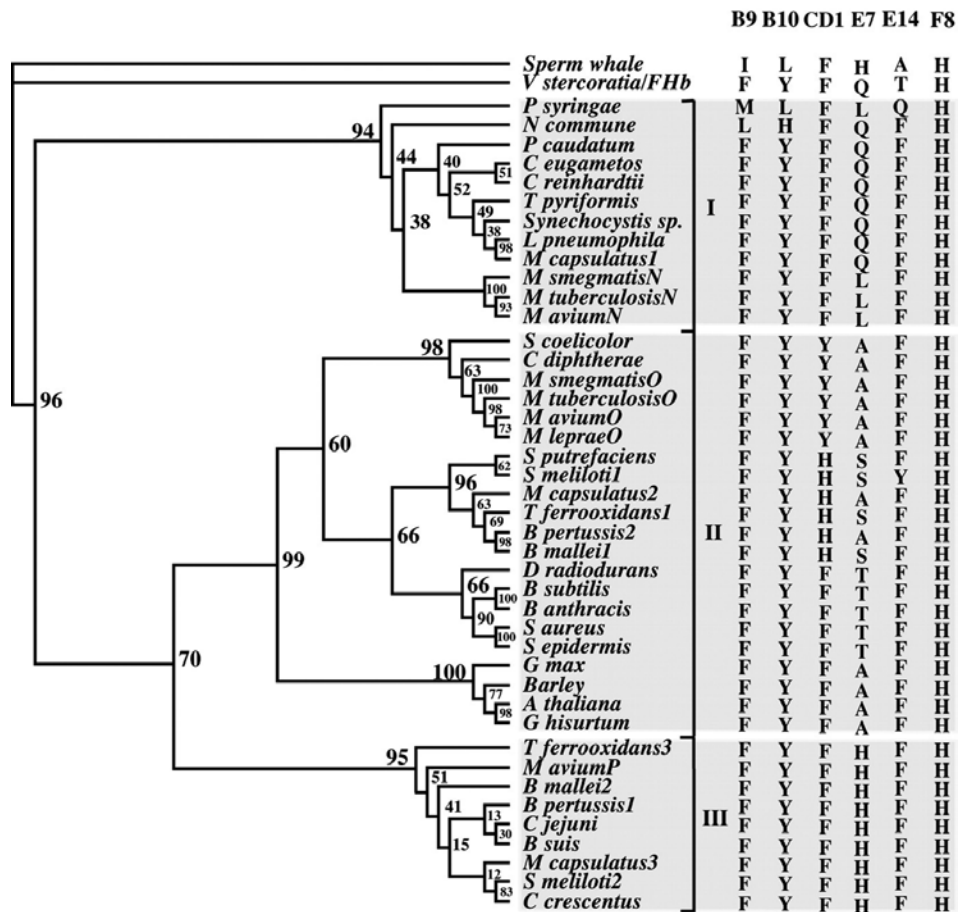


Figura 1.5.- Arbol filogenético de algunos miembros de la familia de Hemoglobinas Truncadas<sup>14</sup>. Las columnas corresponden a los sitios del entorno distal y proximal del grupo hemo. En la parte superior del árbol se encuentra la mioglobina de Cachalote (*Sperm whale*) y la flavohemoglobina de *Vitreoscilla stercoraria* quienes no pertenecen a la sub-familia de hemoproteínas truncadas.

Por todo lo expuesto, las Hemoglobinas Truncadas resultan ser un excelente sistema de estudio para comprender las características fisicoquímicas que regulan las reacciones que ocurren dentro de las hemoproteínas. Cada detalle revelado, podrá ser sometido a evaluación contra el resto de los miembros de esta familia, y de esta forma estudiar no una, sino una familia de proteínas. Esto nos permitiría obtener un panorama más completo de los fenómenos estudiados.

### Afinidad por ligandos pequeños en hemoproteínas:

Experimentalmente la afinidad de los ligandos está caracterizada por la constante de equilibrio ( $K_d$ ), determinada por la relación entre la constante cinética de asociación ( $k_{on}$ ) y la de disociación ( $k_{off}$ ). En la mayoría de las hemoproteínas, la  $k_{on}$  depende de dos procesos: la migración del ligando desde el solvente hasta el sitio activo, y la coordinación al hemo. El primer paso (la migración del ligando) está determinado a su vez por tres factores: la presencia de cavidades internas<sup>15</sup>, la presencia de residuos particulares actuando como *puertas* (gates)<sup>1</sup>, y en algunos casos por la presencia de ligandos endógenos que se coordinan al Fe ocupando la posición disponible para los ligandos<sup>16</sup>. El segundo paso (la coordinación del ligando al hemo) está determinado principalmente por el estado de spin, y la posición relativa al plano del hemo del átomo de Fe. Esto puede observarse en los valores reportados para diferentes hemoproteínas, donde se observa que la  $k_{on}NO$  es mayor que la  $k_{on}O_2$ , y que esta a su vez es mayor que la  $k_{on}CO$ <sup>14</sup>. (Fig. 1.6)

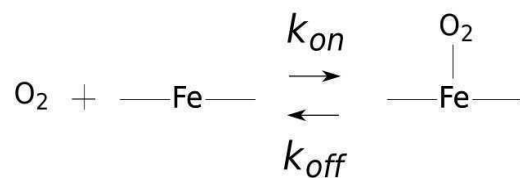


Figura 1.6. Reacción de coordinación entre el  $O_2$  en solución y la hemoproteína, que en el esquema se encuentra representada por el átomo de Fe, en el grupo hemo.

Por lo tanto, cuando se comparan sistemas diferentes (diferentes proteínas, proteínas mutantes, etc) utilizando el mismo ligando ( $O_2$ ,  $CO$  o  $NO$ ) es posible relacionar directamente la constante cinética de asociación ( $k_{on}$ ) con la migración de los ligandos hasta el sitio activo.

Los valores de las  $k_{on}O_2$  van desde  $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  en sistemas con muy poca accesibilidad al sitio activo, hasta valores tales como  $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  donde la constante pasa a estar controlada principalmente por la difusión del ligando desde el solvente hasta el sitio activo. Este último caso puede observarse en estudios de hemos en solución<sup>18</sup>. Por su parte, la  $k_{off}$  está determinada por dos procesos: la ruptura del enlace entre el Fe y el ligando, y la migración del ligando desde el sitio activo hasta el solvente. Tal como sucede con las  $k_{on}O_2$ , las cinéticas de disociación también cubren un amplio rango que va desde  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$  hasta  $10^4 \text{ s}^{-1}$ . En este caso, existen diferencias fundamentales según el tipo de ligando que se encuentre coordinado al Fe. Cuando el ligando es el oxígeno, existe una correlación muy fuerte entre mutaciones del sitio distal y los cambios en las  $k_{off}$ . Sin embargo, dicha correlación no

se observa cuando el CO o el NO es el ligando que se une al FeII. De hecho, independientemente de la modificación de residuos distales, los valores de  $k_{off}CO$  o  $k_{off}NO$  son  $\approx 1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Por esta razón, resulta evidente que la labilidad de la unión Fe-O<sub>2</sub> está determinada en gran medida por los residuos del entorno distal, mientras la unión Fe-CO o Fe-NO está menos influenciada por los residuos distales, y se debe fundamentalmente a la reactividad intrínseca del ligando con el grupo hemo. Por lo tanto en la presente tesis nos ocuparemos de las  $k_{off}$  de O<sub>2</sub>, y en especial sobre cómo esta constante se relaciona con los residuos del entorno distal.

*Caracterización cinética y termodinámica de la afinidad:* Las técnicas más ampliamente utilizadas para los estudios cinéticos de afinidad de ligandos son las de Stopped Flow y de Flash Fotólisis<sup>2</sup>. La primera consiste en realizar mezclas muy veloces de los reactivos, que serán detectados durante la reacción. La segunda consiste en hacer incidir un pulso de luz sobre la proteína que posee el ligando coordinado, logrando que el mismo se libere, y realizando mediciones sobre la recombinación de este ligando al hierro. Los detectores típicamente miden longitudes de onda cercanas a la banda de Soret, donde la diferencia de absorción entre los dos estados del sistema (FeII-O<sub>2</sub>, FeII) es máxima. Ambas técnicas permiten realizar mediciones de las constantes cinéticas  $k_{on}$  y  $k_{off}$  explicadas con anterioridad.

Otra técnica experimental ampliamente utilizada para el estudio biofísico de proteínas es la espectroscopía Raman Resonante. Esta técnica permite estudiar en solución y a temperatura ambiente las vibraciones, en este caso del hemo y sus ligandos<sup>19,20</sup>.

Es ampliamente conocido que el modo de vibración O-O de una molécula de oxígeno coordinada al hemo (FeII) (donde hay una histidina que ocupa la sexta posición de coordinación), típicamente es silenciosa en el espectro de Raman Resonante. Por lo tanto, para estudiar la dinámica estructural del sitio activo en hemoproteínas, se utiliza el CO en lugar de O<sub>2</sub>, que es el ligando natural de estas proteínas. El complejo Fe-C-O en estas hemoproteínas se puede describir mediante dos estructuras de resonancia (Fig. 1.7), que surgen de la retrodonación del metal al ligando. Este ligando devuelve densidad electrónica de sus orbitales  $d$  a los  $\pi$  del CO. Un entorno positivo desestabiliza la forma 1, facilitando la retrodonación con el metal. De esta forma se fortalece el enlace Fe-CO, pero se debilita el enlace C-O<sup>21</sup>. Un entorno negativo estabiliza la forma 2 y produce el efecto contrario en los enlaces mencionados.

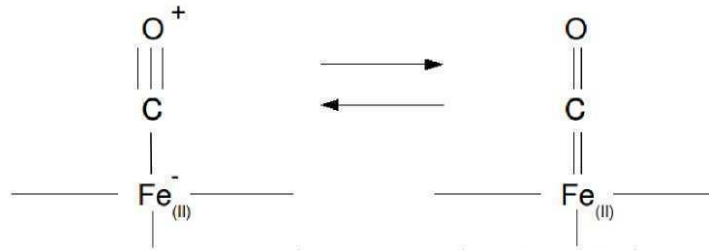


Figura 1.7.- Estructuras de resonancia del complejo hemo-CO. Un entorno negativo favorecerá la forma 1 (*izquierda*), mientras que un entorno positivo favorecerá la forma 2 (*derecha*)<sup>21</sup>.

Por lo tanto, existe una correlación inversa entre estas dos frecuencias (Fe-CO, y C-O) según el entorno del sitio distal que posea la proteína en estudio (Fig. 1.8). Según los valores que presenten nuevas proteínas, podrá inferirse el potencial electrostático que experimenta el CO coordinado al hemo, y de esa forma inferir los residuos que podrían estar interactuando con el ligando.

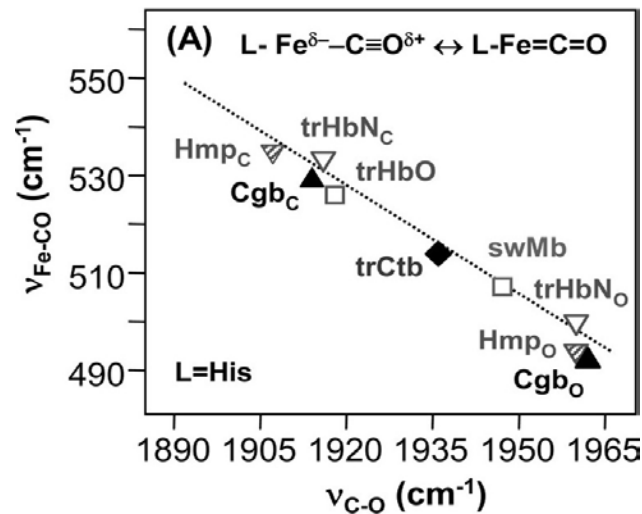


Figura 1.8.- Relación inversa entre la frecuencia de C-O y la frecuencia de Fe-CO, para diferentes proteínas: mioglobina de cachalote (swMb), hemoglobina truncada de *M. tuberculosis* O y N (trHbO y trHbN), hemoglobina truncada de *C. jejuni* (trCtb), globina de *C. jejuni* (Cgb), y flavohemoglobina (Hmp). Los subíndices “o” y “c” corresponden a diferentes conformaciones (open) y (closed)<sup>19</sup>.



Simulaciones computacionales de la afinidad de ligandos: Estudiar la dinámica de los sistemas de interés requiere en muchos casos de esfuerzos compartidos entre diferentes técnicas experimentales tanto como teóricas. De esta forma podrán relacionarse las cinéticas de asociación  $k_{on}$  con los resultados de las simulaciones de migración de ligandos, y por otro lado se podrá relacionar las  $k_{off}O_2$  medidas, con el entorno que presente el sitio activo en los diferentes sistemas.

En la presente tesis se mostrarán algunos resultados que fueron obtenidos en conjunto con grupos experimentales colaboradores, donde se intentó responder una única pregunta atacándola desde diferentes frentes.

*Experimentos in-vivo:* Si bien las técnicas biofísicas resultan herramientas muy poderosas para el estudio de reactividad de hemoproteínas, poseen ciertas limitaciones por realizarse en entornos no fisiológicos (mediciones *in-vitro*). Es necesario por lo tanto, experimentos que confirmen las hipótesis, o que alimenten el diseño de nuevos experimentos biofísicos, realizando mediciones en los microorganismos vivos (mediciones *in-vivo*).

Para estos estudios, se utilizan organismos genéticamente modificados que carecen del gen que expresa la proteína de interés. De esta manera es posible evaluar los efectos que produce la ausencia de dicha proteína, e incluso expresar una variante de esta proteína mutante, para poder estudiar el efecto que la misma produce<sup>22-25</sup>.

### Detoxificación de óxido nítrico:

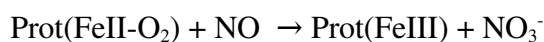
El agente causante de la tuberculosis humana es el microorganismo *Mycobacterium tuberculosis*. Esta es actualmente la enfermedad infecciosa que más vidas cobra en el mundo: mueren anualmente 3.000.000 de personas de esta enfermedad. Se estima que un tercio de la población mundial se encuentra infectada con el bacilo de la tuberculosis, y el 95% de los casos reportados provienen de países subdesarrollados, donde la mitad de los enfermos mueren por la falta de recursos sanitarios<sup>26-28</sup>.

Ante ciertas infecciones parasitarias, como la producida por *M. tuberculosis*, los macrófagos del hospedador responden a la invasión produciendo óxido nítrico (NO) que interfiere con el

metabolismo del patógeno. Se ha reportado que el NO interfiere con las cisteín proteasas, fundamentales en el ciclo celular de los microorganismos<sup>29</sup>. La mayoría de los organismos, como *Leishmania*, *Trypanosoma* y *Plasmodium* no logran sobrevivir al asedio de NO, sin embargo, en los organismos infectados con *M. tuberculosis*, se ha observado que el patógeno logra resistir el ataque oxidativo, aún en altas concentraciones de NO

*Mycobacterium tuberculosis* codifica para dos hemoproteínas truncadas, la Mt-trHbO y la Mt-trHbN, correspondientes a los genes *glnN* y *glnO* respectivamente. La primera se expresa durante la fase estacionaria y la segunda durante la fase de crecimiento de la bacteria, sugiriendo que ambas proteínas deben cumplir roles fisiológicos diferentes. Se ha demostrado que la Mt-trHbN está involucrada en la resistencia del organismo contra los efectos tóxicos del NO<sup>24,30</sup>.

Se ha encontrado que el NO accede al grupo hemo y reacciona con el O<sub>2</sub> que se encuentra coordinado al FeII, produciéndose nitrato, un compuesto inofensivo para el microorganismo, de acuerdo a la siguiente reacción:



Esta reacción puede dividirse en los siguientes pasos: en primer lugar el O<sub>2</sub> debe migrar a través de la matriz proteica, para que luego ocurra la reacción de coordinación del oxígeno al FeII. Luego es el NO quien debe migrar hasta alcanzar al O<sub>2</sub> coordinado, y que ocurra la reacción de oxidación de NO. Después de esta reacción el producto formado (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) debe liberarse al solvente, para que finalmente la proteína pueda ser reducida nuevamente a FeII.

Experimentalmente se mide la constante de asociación de O<sub>2</sub> a la proteína desoxigenada ( $k_{onO_2}$ ) como ha sido explicado anteriormente; y también se mide la oxidación de NO ( $k_{oxNO}$ ) haciendo reaccionar la hemoproteína oxigenada con NO, y registrando la aparición de la especie Prot(FeIII). Existen controles experimentales que ayudan a establecer que la proteína es quien está catalizando la reacción de detoxificación de NO a NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Por un lado, la cantidad de nitrato producida debe ser estequiométrica con la cantidad de proteína oxidada<sup>25</sup>, y por el otro la presencia de nitrito, quien es el principal producto de la reacción no enzimática<sup>31</sup>, debe permanecer debajo de ciertos umbrales.

Si bien se hipotetiza acerca de ciertas proteínas que podrían actuar reduciendo a la hemoproteína oxidada (FeIII), aún no existe evidencia fuerte acerca de los mecanismos a través de los cuales la proteína se recupera para volver a ser operativa en el organismo.

## Referencias:

1. Birukou I, Schweers RL, Olson JS. Distal histidine stabilizes bound O<sub>2</sub> and acts as a gate for ligand entry in both subunits of adult human hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 2010;285(12):8840-8854.
2. Scott EE, Gibson QH, Olson JS. Mapping the pathways for O<sub>2</sub> entry into and exit from myoglobin. *J. Biol. Chem.* 2001;276(7):5177-5188.
3. Vinogradov SN, Moens L. Diversity of globin function: enzymatic, transport, storage, and sensing. *J. Biol. Chem.* 2008;283(14):8773-8777.
4. Andersen JF, Ding XD, Balfour C, et al. Kinetics and equilibria in ligand binding by nitrophorins 1-4: evidence for stabilization of a nitric oxide-ferriheme complex through a ligand-induced conformational trap. *Biochemistry.* 2000;39(33):10118-10131.
5. Martí MA, González Lebrero MC, Roitberg AE, Estrin DA. Bond or cage effect: how nitrophorins transport and release nitric oxide. *J. Am. Chem. Soc.* 2008;130(5):1611-1618.
6. Boon EM, Marletta MA. Ligand discrimination in soluble guanylate cyclase and the H-NOX family of heme sensor proteins. *Curr Opin Chem Biol.* 2005;9(5):441-446.
7. Perutz MF, Paoli M, Lesk AM. Fix L, a haemoglobin that acts as an oxygen sensor: signalling mechanism and structural basis of its homology with PAS domains. *Chem. Biol.* 1999;6(11):R291-297.
8. Ibrahim M, Kuchinskas M, Youn H, et al. Mechanism of the CO-sensing heme protein CooA: new insights from the truncated heme domain and UVRR spectroscopy. *J. Inorg. Biochem.* 2007;101(11-12):1776-1785.
9. Wittenberg JB. Truncated Hemoglobins: A New Family of Hemoglobins Widely Distributed in Bacteria, Unicellular Eukaryotes, and Plants. *Journal of Biological Chemistry.* 2001;277(2):871-874.
10. Sawai H, Makino M, Mizutani Y, et al. Structural characterization of the proximal and distal histidine environment of cytoglobin and neuroglobin. *Biochemistry.* 2005;44(40):13257-13265.
11. Pesce A, Nardini M, Ascenzi P, et al. Thr-E11 regulates O<sub>2</sub> affinity in *Cerebratulus lacteus* mini-hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 2004;279(32):33662-33672.
12. Rowland P, Blaney FE, Smyth MG, et al. Crystal structure of human cytochrome P450 2D6. *J. Biol. Chem.* 2006;281(11):7614-7622.
13. Melik-Adamyany W, Bravo J, Carpena X, et al. Substrate flow in catalases deduced from the crystal structures of active site variants of HPII from *Escherichia coli*. *Proteins.* 2001;44(3):270-281.

14. Milani M, Pesce A, Nardini M, et al. Structural bases for heme binding and diatomic ligand recognition in truncated hemoglobins. *J. Inorg. Biochem.* 2005;99(1):97-109.
15. Savino C, Miele AE, Draghi F, et al. Pattern of cavities in globins: the case of human hemoglobin. *Biopolymers.* 2009;91(12):1097-1107.
16. Brunori M, Vallone B. Neuroglobin, seven years after. *Cell. Mol. Life Sci.* 2007;64(10):1259-1268.
17. Crespo A, Martí MA, Kalko SG, et al. Theoretical study of the truncated hemoglobin HbN: exploring the molecular basis of the NO detoxification mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* 2005;127(12):4433-4444.
18. Laverman LE, Ford PC. Mechanistic studies of nitric oxide reactions with water soluble iron(II), cobalt(II), and iron(III) porphyrin complexes in aqueous solutions: implications for biological activity. *J. Am. Chem. Soc.* 2001;123(47):11614-11622.
19. Lu C, Egawa T, Mukai M, Poole RK, Yeh S. Hemoglobins from *Mycobacterium tuberculosis* and *Campylobacter jejuni*: a comparative study with resonance Raman spectroscopy. *Meth. Enzymol.* 2008;437:255-286.
20. Smulevich G, Feis A, Howes BD. Fifteen years of Raman spectroscopy of engineered heme containing peroxidases: what have we learned? *Acc. Chem. Res.* 2005;38(5):433-440.
21. Egawa T, Yeh S. Structural and functional properties of hemoglobins from unicellular organisms as revealed by resonance Raman spectroscopy. *J. Inorg. Biochem.* 2005;99(1):72-96.
22. Pathania R, Navani NK, Rajamohan G, Dikshit KL. *Mycobacterium tuberculosis* hemoglobin HbO associates with membranes and stimulates cellular respiration of recombinant *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 2002;277(18):15293-15302.
23. Parrilli E, Giuliani M, Giordano D, et al. The role of a 2-on-2 haemoglobin in oxidative and nitrosative stress resistance of Antarctic *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Biochimie.* 2010;92(8):1003-1009.
24. Ouellet H, Ouellet Y, Richard C, et al. Truncated hemoglobin HbN protects *Mycobacterium bovis* from nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(9):5902-5907.
25. Fabozzi G, Ascenzi P, Renzi SD, Visca P. Truncated hemoglobin GlbO from *Mycobacterium leprae* alleviates nitric oxide toxicity. *Microb. Pathog.* 2006;40(5):211-220.
26. MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, et al. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(10):5243-5248.
27. Kochi A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. *Tubercle.* 1991;72(1):1-6.

28. Sudre P, ten Dam G, Kochi A. Tuberculosis: a global overview of the situation today. *Bull World Health Organ.* 1992;70(2):149-159.
29. Ascenzi P, Salvati L, Bolognesi M, et al. Inhibition of cysteine protease activity by NO-donors. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2001;2(2):137-153.
30. Colasanti M, Gradoni L, Mattu M, et al. Molecular bases for the anti-parasitic effect of NO (Review). *Int. J. Mol. Med.* 2002;9(2):131-134.
31. Wink DA, Darbyshire JF, Nims RW, Saavedra JE, Ford PC. Reactions of the bioregulatory agent nitric oxide in oxygenated aqueous media: Determination of the kinetics for oxidation and nitrosation by intermediates generated in the nitric oxide/oxygen reaction. *Chemical Research in Toxicology.* 1993;6(1):23-27.

## Capítulo 2. Metodología general.

### Introducción:

Como toda técnica utilizada en investigación, las simulaciones computacional tienen sus limitaciones. Pero en este caso, existe una que se destaca por sobre todas las demás: el costo computacional de los procesos. Si uno desea utilizar métodos rigurosos, deberá utilizar sistemas pequeños. Por el contrario, si uno desea estudiar sistemas grandes, deberá disminuir la rigurosidad de los métodos. Será mérito del investigador lograr escoger el método más adecuado, realizando un balance entre la calidad de las predicciones y costo de cálculo computacional.

### Métodos basados en la mecánica cuántica:

Cuando se desea predecir las propiedades de sistemas microscópicos, donde los protagonistas son los electrones, se deben resolver las ecuaciones de la Mecánica Cuántica, que tiene como ecuación fundamental a la ecuación de Schrödinger <sup>1</sup> :

$$-\frac{\hbar^2}{2m}\nabla^2\Psi(r,t) + V(r,t) = \frac{i\hbar\Psi(r,t)}{\delta t}$$

Esta es una ecuación diferencial cuya solución consiste en obtener la función de onda, que da la descripción matemática de un sistema de partículas cuánticas, sujetas al potencial. La función de onda contiene toda la información necesaria para calcular las propiedades del sistema. El objetivo básico de la química cuántica es resolver la ecuación de Schrödinger para un sistema molecular.

Resulta imposible resolver de forma exacta esta ecuación para un sistema molecular, y se deben buscar soluciones aproximadas. El primer paso en el camino a la solución consiste en suponer que el potencial es independiente del tiempo (lo cual es cierto si no hay fuerzas externas). A partir de esto se deduce una ecuación independiente del tiempo, cuya solución sólo depende de las coordenadas espaciales de las partículas, que además está unívocamente relacionada con la energía del sistema. Si definimos ahora al operador hamiltoniano como:

$$\hat{H} = -\frac{\hbar^2}{2m}\nabla^2 + \hat{V}$$

la ecuación de Schrödinger se reduce a:

$$\hat{H}\Psi(\mathbf{r}) = E\Psi(\mathbf{r})$$

La ecuación de Schrödinger, es por lo tanto una ecuación diferencial en derivadas parciales de autovalores, en donde un operador actúa sobre la autofunción, obteniendo como resultado a la función multiplicada por un escalar. La segunda simplificación que debemos tener en cuenta es la denominada aproximación de Born-Oppenheimer que consiste en desacoplar el movimiento de los núcleos del de los electrones. Este procedimiento se justifica ya que la velocidad relativa de los núcleos con respecto a la de los electrones es despreciable. Así, se asume que los electrones se mueven en un potencial de cargas positivas estáticas dadas por las posiciones nucleares. El problema queda ahora reducido a obtener la función de onda para el siguiente operador denominado Hamiltoniano electrónico:

$$\hat{H}_{el} = -\sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}}$$

En este operador podemos distinguir ahora tres términos, el primer término representa la energía cinética electrónica, el segundo es el potencial asociado a la interacción núcleo electrón y el tercero es el potencial de la interacción electrón-electrón. Si bien con las aproximaciones mencionadas hemos simplificado el problema en este punto aún carecemos de un método que nos permita resolver la ecuación de Schrödinger. La clave para resolver de manera aproximada ecuaciones diferenciales del tipo que nos concierne es el principio o teorema variacional. El mismo postula que al evaluar la energía con una función de prueba (diferente de aquella que es solución exacta de la ecuación que no conocemos), la energía que se obtendrá será siempre mayor a la energía real (la correspondiente a la función de onda que es solución exacta) del sistema, o sea:

$$\langle \psi'(\mathbf{r}) | H | \psi'(\mathbf{r}) \rangle \geq E_0$$

Donde  $E_0$  representa la energía real del sistema que corresponde a evaluar:

$$\langle \psi(\mathbf{r}) | H | \psi(\mathbf{r}) \rangle = E_0$$

y la función de onda es la función de onda real del sistema, solución exacta de la ecuación de Schrödinger para el estado fundamental. Esto permite proponer como estrategia para encontrar

soluciones aproximadas de la ecuación de Schrödinger, la búsqueda de aquellas funciones que minimicen la energía del sistema. Dado el operador Hamiltoniano, existe un conjunto infinito de soluciones (cada una representada por una autofunción y su autovalor) que se pueden ordenar crecientemente según:

$$\hat{H}|\Psi_i\rangle = \epsilon_i|\Psi_i\rangle \quad i = 0, 1, 2, \dots \quad \epsilon_0 \leq \epsilon_1 \leq \dots \leq \epsilon_i \leq$$

### Teoría del Funcional de la Densidad (DFT)

Un formalismo que se ha popularizado enormemente en los últimos años debido a su eficiencia computacional y a la calidad de los resultados obtenidos, se conoce como teoría del funcional de la densidad (DFT)<sup>1</sup>. La teoría de los funcionales de la densidad se basa en los teoremas de Hohenberg y Kohn formulados en los años 60 que permiten describir el problema electrónico usando la densidad de carga electrónica. El primero de los teoremas establece que la función de onda, y por ende cualquier propiedad del sistema, se halla unívocamente determinada por la densidad electrónica del sistema.

En el contexto de DFT la energía  $E$  en función de la densidad está dada por:

$$E[\rho] = T[\rho] + V_{ee}[\rho] + V_{ne}[\rho]$$

donde los términos corresponden a la energía cinética ( $T$ ), la interacción electrón-electrón ( $V_{ee}$ ) y la interacción núcleo-electrón ( $V_{ne}$ ). Usando diferentes definiciones de cada uno de los términos anteriores, y utilizando la aproximación de Kohn y Sham que considera electrones no interactuantes, la fórmula final para el funcional de la densidad puede escribirse como:

$$E[\rho] = T_s[\rho] + V_{ne}[\rho] + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{r_{12}} dr_1 dr_2 + E_{xc}[\rho]$$

Con esta definición podemos calcular la energía para todos los términos, excepto por la relativamente pequeña contribución de el término de intercambio y correlación ( $E_{xc}$ ), cuya forma funcional no es conocida. La teoría del funcional de la densidad, sumado a la aproximación de Kohn y Sham se basa en un funcional exacto por definición, donde los efectos debidos a la naturaleza cuántica del electrón, el intercambio y la correlación son descriptos por el término  $E_{xc}$ . Sin embargo, como la dependencia funcional de  $E_{xc}$  con la densidad es desconocida, esto implica que la precisión



y calidad de un cálculo basado en DFT estará íntimamente relacionada con la aproximación utilizada para darle forma al funcional de intercambio y correlación. Existen muchos funcionales de intercambio y correlación. Los más utilizados en sistemas bioquímicos son: BLYP, B3LYP, PBE <sup>2-4</sup>.

### Métodos basados en la mecánica clásica

Un tipo de aproximación muy útil al trabajar con sistemas constituidos por miles de átomos como las proteínas, son los métodos basados en la mecánica clásica. En la misma se representa a la proteína como un sistema mecánico en el cual las partículas que lo componen, en nuestro caso los átomos, interactúan entre si a través de potenciales analíticos sencillos. Es decir, los átomos interactúan entre si a partir de ecuaciones matemáticas simples donde se incluyen por ejemplo: la distancia entre ellos, los ángulos, la carga de cada uno, el radio de los mismos, etc. Al conjunto de ecuaciones y parámetros necesarios para evaluar la energía potencial, se lo denomina campo de fuerza y generalmente se encuentran disponibles para el público dentro de paquetes de programas tales como CHARMM <sup>5</sup> , GROMOS <sup>6</sup> , Amber <sup>7</sup>, etc. En el campo de fuerzas AMBER la energía potencial es función de la posición de los N átomos del sistema y su forma funcional es la siguiente:

$$E(r^N) = \sum_{\text{bonds}} K_b (b - b_0)^2 + \sum_{\text{angles}} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{torsions}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(\phi - \gamma)] + \sum_i \sum_{j>i}^N \left[ \frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right]$$

En primer lugar se encuentra el potencial que describe los enlaces covalentes entre los átomos. En este caso  $b_0$  es la distancia de equilibrio,  $b$  la distancia a cada paso de la simulación, y  $K_b$  la constante para ese par de átomos. El segundo término corresponde a los ángulos formados entre tres átomos unidos consecutivos, y el tercero corresponde al ángulo diedro formado entre cuatro átomos consecutivos.

El último término corresponde a interacciones entre átomos que se encuentran a más de tres enlaces covalentes (términos de no unión) que poseen dos contribuciones. Por un lado, la interacción electrostática entre las cargas  $q_i$  y  $q_j$  de los átomos involucrados que se encuentran a una

distancia  $R_{ij}$ . Por otro lado la interacción de Lennard Jones, que representa las fuerzas dispersivas o de London que experimentan dichos átomos.

### Métodos híbridos cuántico/clásicos:

Hasta aquí hemos explicado brevemente los fundamentos teóricos de los métodos cuánticos (QM) y los métodos clásicos (MM). La complejidad y precisión de los métodos QM permite, al describir en detalle la estructura electrónica del sistema y estudiar procesos reactivos. Sin embargo, debido a su alto costo computacional, se hace muy difícil tratar sistemas de más de 100 átomos. Por otro lado los métodos MM permiten tratar de una manera simplificada a sistemas con miles de átomos, como las biomoléculas. Sin embargo son incapaces de describir procesos reactivos. Por lo tanto es deseable poder combinar ambos métodos contruyendo un método híbrido.

Los métodos híbridos QM/MM permiten estudiar reacciones químicas en sistemas complejos como las proteínas o las fases condensadas. Estos métodos describen al soluto o sitio activo de la enzima mediante métodos de estructura electrónica (subsistema cuántico) y al resto del entorno (proteína y/o solvente) por métodos clásicos (subsistema clásico). El Hamiltoniano total y la energía del sistema tiene tres contribuciones:

$$E_{TOT} = E_{QM} + E_{MM} + E_{QM-MM}$$

En este trabajo de tesis, se utilizó el programa Hybrid que ha sido desarrollado en el grupo en que se realizó la presente Tesis<sup>8</sup>. Este programa calcula la contribución cuántica a nivel de DFT, teniendo en cuenta sólo los átomos cuánticos, pero considerando a los electrones inmersos en el potencial generado no sólo por los núcleos de éstos, sino además por el potencial generado debido a las cargas parciales de los átomos clásicos. La contribución clásica es calculada con el campo de fuerzas sin modificaciones. El término crítico es el del acoplamiento cuántico-clásico. Este término también está compuesto por tres contribuciones y se calcula de acuerdo a:

$$E_{QM-MM} = \sum_{i=1}^C q_i \int \frac{\rho(r)}{|r - \tau_i|} dr + \sum_{i=1}^C \sum_{\alpha=1}^Q \frac{q_i Z_{\alpha}}{|R_{\alpha} - \tau_i|} + E_{QM-MM}^{LJ}$$

Siendo  $C$  el número de átomos clásicos con cargas parciales  $q_i$ ,  $Q$ , es el número de átomos cuánticos con índice  $i$ . El primer término representa la interacción entre la densidad electrónica cuántica y las cargas parciales de los átomos clásicos. El segundo representa la interacción entre los núcleos de los átomos cuánticos y las cargas parciales clásicas. Estos dos términos representan la interacción electrostática entre los dos subsistemas. El tercer término representa la interacción de VDW entre los átomos de ambos sistemas y se calcula usando un potencial de Lennard-Jones idéntico al usado en el campo de fuerzas clásico.

### Dinámica molecular

Con la energía potencial encontrada de forma clásica, cuántica o híbrida cuántico/clásica, es posible encontrar la fuerza que experimenta cada átomo. Con esta fuerza y la masa del átomo, e integrando las ecuaciones de movimiento de Newton es posible calcular la nueva posición que tomará el sistema al cabo de un cierto tiempo denominado *time step* ( $dt$ ). Existen diferentes algoritmos para integrar las ecuaciones de movimiento. Es importante notar que el  $dt$  debe ser tan pequeño como para poder describir de manera adecuada el movimiento natural del sistema como si la integración de las ecuaciones de Newton fuera exacta. Sin embargo cuanto menor sea el mismo, deberá realizarse un mayor número de cálculos para simular un tiempo total dado. En general una buena solución de compromiso, es utilizar un  $dt$  que sea un décimo del tiempo característico del modo más rápido del sistema. En proteínas, cuando se mantienen los hidrógenos fijos, el tiempo característico de la vibración de enlaces covalentes ocurre en decenas de fs, por lo tanto el  $dt$  utilizado en estos casos es de 1-2 fs.

*Integración de las ecuaciones de movimiento: Algoritmo de Verlet:* Existen diferentes algoritmos para integrar las ecuaciones de movimiento. En todos los casos, se asume que las posiciones y las propiedades dinámicas (velocidades, aceleración, etc) pueden ser aproximadas como una expansión de Taylor:

$$r(t+dt) = r(t) + dt v(t) + \frac{1}{2} dt^2 a(t) + \frac{1}{6} dt^3 b(t) + \dots$$

$$v(t+dt) = v(t) + dt a(t) + \frac{1}{2} dt^2 b(t) + \frac{1}{6} dt^3 c(t) + \dots$$

El algoritmo de Verlet<sup>9</sup> utiliza una idea muy inteligente, para realizar la integración, a partir de la posición anterior que tomó la partícula  $r(t - dt)$ , donde:

$$r(t+dt) = r(t) + dt v(t) + \frac{1}{2} dt^2 a(t) + \dots$$

$$r(t-dt) = r(t) - dt v(t) + \frac{1}{2} dt^2 a(t) - \dots$$

Sumando ambas ecuaciones, tenemos:

$$r(t+dt) = 2 r(t) - r(t-dt) + dt^2 a(t)$$

Donde las velocidades no se encuentran de forma explícita, sino que la posición de la partícula luego de un tiempo  $dt$  puede encontrarse a partir de la posición y aceleración actual, junto con la posición previa.

Para encontrar las velocidades, existen numerosas formas. Una de ellas es a partir de las diferencias de las posiciones que tomó la partícula en un lapso de tiempo  $2 dt$ :

$$v(t) = [r(t+dt) - r(t-dt)] / 2dt$$

*Tratamiento de la temperatura.* Como las velocidades de los átomos de un sistema determinan la temperatura del mismo, al asignar velocidades iniciales a los átomos, estaremos asignando una temperatura al sistema según la siguiente ecuación:

$$\sum \frac{1}{2} (m v^2) = \frac{1}{2} (3 N k T)$$

El término de la izquierda corresponde a la energía cinética promedio de todos los átomos del sistema, donde  $m$  corresponde a la masa y  $v$  a la velocidad de los átomos. En el término de la derecha se encuentra la constante de Boltzmann  $k$ , la cantidad total de átomos del sistema y la temperatura del mismo  $T$ . Por lo tanto podemos seleccionar una temperatura a la cual deseamos realizar la simulación, y a partir de esta, asignar velocidades a los átomos de forma tal que respeten

la temperatura indicada mediante la ecuación que las relaciona.

Uno de los métodos mas usados para mantener la temperatura cercana a un valor deseado en una simulación de dinámica molecular es el algoritmo de Berendsen<sup>10</sup>. El denominado termostato de Berendsen acopla al sistema a un baño térmico (a la temperatura deseada) que actúa como fuente o sumidero de energía térmica. Las velocidades del sistema (y por lo tanto la energía cinética) son escaladas en cada paso de dinámica, de modo tal que el cambio es proporcional a la diferencia entre la temperatura del sistema y la del baño térmico. El factor de escalamiento se calcula de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\lambda^2 = 1 + \frac{\delta t}{\tau} \left( \frac{T_{\text{bath}}}{T(t)} - 1 \right)$$

Donde  $\tau$  es el parámetro de acoplamiento que regula cuan fuerte es el acoplamiento entre el baño y el sistema. Si  $\tau$  es igual a  $\delta t$  el acoplamiento es máximo y la temperatura del sistema es igual a la deseada en todos los pasos.

### Dinámica molecular clásica guiada

En algunos casos, los procesos que se desean estudiar por dinámica clásica, requieren de tiempos de simulación muy elevados (migración de una hormona a través de una membrana lipídica, migración del oxígeno dentro de la hemoglobina humana, etc). Inclusive si uno realizara simulaciones suficientemente largas como para lograr que el proceso ocurra en el tiempo de simulación, sería insuficiente para obtener parámetros termodinámicos y cinéticos del proceso. Es necesario, en estos casos, utilizar técnicas computacionales que aceleran el muestreo. Algunas de ellas utilizan diferente temperatura para la proteína y el ligando, otras utilizan optimizaciones durante la dinámica molecular<sup>11</sup>, y hay algunas que no utilizan el ligando explícitamente<sup>12</sup>.

### **Método de muestreo sesgado (Umbrella Sampling)**

El perfil de energía libre a lo largo de una coordenada de reacción contiene información valiosa acerca del proceso que se está estudiando. Dicho perfil puede ser también calculado a partir de la siguiente ecuación:

$$G(\xi) = -kT \ln g(\xi) + C$$

Donde  $C$  es una constante,  $G(\xi)$  es la energía libre,  $\xi$  la coordenada de reacción, y  $g(\xi)$  la función de distribución. La función de distribución está relacionada con las veces que el sistema visitó las diferentes configuraciones, a lo largo de la coordenada de reacción establecida  $\xi$ .

En muchos casos, obtener la función de distribución apropiadamente requiere de un elevado costo computacional, dado que las configuraciones poco probables serán poco visitadas durante la simulación. Por tal razón, se emplean métodos que modifican la superficie de energía potencial (véase *Campos de fuerza clásicos*) agregando un término especial que permite que el sistema visite con mayor frecuencia las configuraciones menos probables.

Se denomina Umbrella Sampling<sup>9</sup> al método que utiliza potenciales cuadráticos para modificar el potencial original. En esta técnica, el potencial se agrega a lo largo de la coordenada de reacción, de forma tal de lograr que el sistema la visite de forma completa. Obsérvese en la figura 2.1 la forma de paraguas (*umbrella* en inglés) de los potenciales cuadráticos que se añadirán al potencial total del sistema.

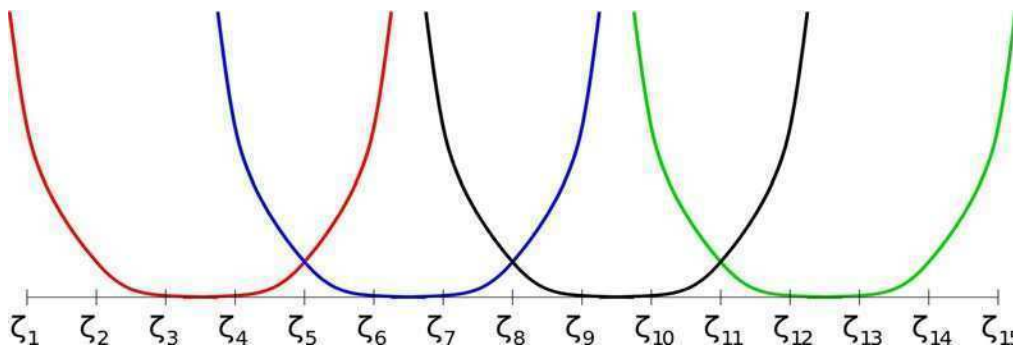


Figura 2.2.- Esquema de los potenciales cuadráticos que se agregan al potencial total, a través de la coordenada de reacción arbitraria  $\zeta$ , en una simulación de Umbrella Sampling.

Se realizan por lo tanto muchas simulaciones independientes, donde en cada una se agrega un potencial diferente, en diferentes porciones de la coordenada de reacción escogida. Estas simulaciones o *ventanas* visitarán diferentes configuraciones a lo largo de la coordenada de reacción escogida, en respuesta al potencial cuadrático que ha sido añadido. Deberá prestarse particular atención al valor que posea la constante del potencial cuadrático, que deberá ser lo suficientemente grande como para que el sistema visite las configuraciones correspondientes a la ventana de interés, pero lo suficientemente chica como para que las ventanas se superpongan.

El problema consiste ahora en cómo combinar las diferentes *ventanas* del perfil (una para

cada potencial utilizado), para así obtener el perfil de energía libre completo. Dado que las ventanas se superponen unas con otras, es posible construir el perfil completo, haciendo coincidir las ventanas unas con otras. Sin embargo existen métodos más precisos para la construcción del perfil. El más conocido es el método WHAM (Weighted Histogram Analysis Method) y es el que se utiliza en la presente tesis<sup>13</sup>.

### Método de Jarzynski (MSMD)

Un método que ha resultado ser muy adecuado para el estudio de migración de ligandos, es el denominado Dinámica Molecular Guiada (MSMD). Esta técnica ha mostrado ser una herramienta muy poderosa para calcular perfiles de energía libre de la migración de ligandos<sup>14-16</sup>.

En los cálculos de Dinámica Molecular Guiada (MSMD) el potencial original se modifica agregando un nuevo término  $V_{add}(t)$ , que es dependiente del tiempo como se muestra a continuación:

$$V_{add}(t) = (1/2) k [\xi - \xi_0(t)]^2$$

donde la constante  $k$  es arbitraria y deberá ser lo suficientemente grande como para que el ligando logre desplazarse a lo largo de la coordenada de reacción, y lo suficientemente pequeña como para que la posición del ligando sea afectada por el entorno. Por otro lado  $\xi$  es la posición actual del sistema en la coordenada de reacción elegida, y  $\xi_0(t)$  es la posición de equilibrio deseada, que se irá modificando a medida que transcurra la simulación, como se muestra a continuación:

$$\xi_0(t) = \xi_i + vt$$

donde  $t$  es el tiempo,  $v$  es la velocidad y  $\xi_i$  corresponde al valor de equilibrio inicial. La idea por lo tanto es guiar al sistema a lo largo de la coordenada de reacción que en nuestro caso será la distancia Fe-ligando.

La fuerza que el sistema realiza en cada paso puede calcularse tomando en cuenta la posición real que tomó el sistema en la coordenada de reacción elegida, y la posición de referencia donde se encontraba fijado el potencial armónico ( $V_{add}(t)$ ) en ese paso.

$$F = -k (\xi - \xi_0(t))$$

Es decir que aunque en un determinado paso exista un potencial armónico centrado en un determinado punto, la posición real que el sistema adoptará estará regulada por el entorno del sistema. Si el entorno no ejerce ningún efecto, la posición real de la partícula coincidirá con el centro del potencial ( $V_{add}$ ) y la fuerza resultará cercana a cero. Si el entorno favorece el movimiento a través de esa coordenada de reacción, ahora la fuerza será negativa.

Utilizando esta metodología, e integrando la fuerza que se realiza en cada paso, es posible calcular el trabajo irreversible ( $W$ ) externo necesario para guiar al sistema (fuera del equilibrio) a lo largo de una determinada coordenada de reacción. Partiendo de diferentes micro-configuraciones iniciales, diferentes perfiles de  $W$  pueden obtenerse para la misma coordenada de reacción. Utilizando la ecuación de Jarzynski<sup>17</sup>, que relaciona los trabajos irreversibles con la energía libre del proceso, es posible construir perfiles de energía libre para un determinado proceso que se desea estudiar, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$e^{-\Delta G/k T} = \langle e^{-W_i/k T} \rangle$$

donde  $k$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura, y  $W_i$  es cada uno de los trabajos calculados de forma independiente para cada uno de los procesos fuera del equilibrio.

La figura 2.2 muestra un ejemplo del uso de esta metodología aplicada a la migración de un ligando hacia el interior de una hemoproteína. Puede observarse que existe una distribución de trabajos ( $W$ ) tal que pocos de ellos poseen valores altos y bajos, mientras que la mayoría se encuentra en valores intermedios. Obsérvese que la estimación de la energía libre ( $\Delta G$ ) se encuentra cercano a los trabajos de menor energía.

En algunos casos, los trabajos irreversibles ( $W$ ) tiene menor energía que  $\Delta G$ . Esto parecería violar la segunda ley de la termodinámica ( $\Delta G \leq W$ ). Sin embargo esta *aparente* violación a la segunda ley de la termodinámica no lo es, dado que en este caso estamos en presencia de fenómenos microscópicos, mientras que las leyes de la termodinámica se cumplen solamente a escala macroscópica.



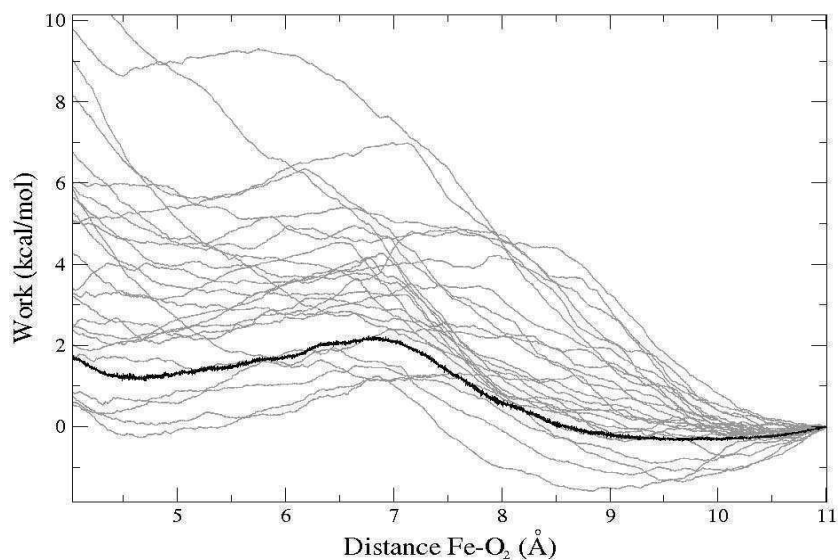


Figura 2.2.- Simulaciones de dinámica molecular guiada (MSMD). Se grafican los diferentes trabajos (W) independientes (gris), realizados para llevar la molécula de oxígeno desde el solvente hasta las cercanías del hierro en el caso de la hemoglobina. También se muestra el promedio obtenido a partir de la ecuación de Jarzynski (negro).

Es importante aclarar que el error del método aumenta a medida que se recorre un camino más largo, a lo largo de la coordenada de reacción escogida. En el caso de la migración de un ligando a través de la matriz proteica, donde se necesita recorrer 10-15 Å, no será posible recorrerlos todos con un simple cálculo de MSMD. En este caso, el perfil completo deberá ser dividido en partes de hasta 6-7 Å como máximo, donde cada parte deberá calcularse por separado. Dado que la ecuación de Jarzynski exige moverse desde un mínimo de equilibrio hasta otro mínimo de equilibrio, cada porción del perfil deberá comenzar y terminar en un mínimo local. Finalmente se hacen coincidir los mínimos de cada porción para obtener el perfil completo.

### Obtención de parámetros para las simulaciones clásicas

Como fue explicado en la sección anterior, los esquemas basados en la mecánica clásica necesitan de una serie de parámetros para poder calcular la energía potencial del sistema. Para el caso de proteínas, ácidos nucleicos, así como para una gran cantidad de azúcares, estos parámetros se encuentran disponibles para el público. Sin embargo, en casos donde las moléculas que se desean

simular son diferentes a las convencionales, estos parámetros deben ser calculados por el usuario. Existen muchas formas de construir estos parámetros, pero la utilizada en la presente tesis resulta sencilla y adecuada para este tipo de sistemas.

Inicialmente se construye un *sistema modelo* de la molécula que se desea parametrizar. Es decir que se realiza un modelo simplificado de la molécula a parametrizar, de forma de que no se superen los 100-200 átomos. Por ejemplo, en caso de querer parametrizar una molécula de sulfhídrico coordinado al hemo, el sistema modelo será la molécula de sulfhídrico la porfirina sin las cadenas laterales, y el imidazol de la histidina proximal. Esto es necesario, debido al elevado costo computacional que presenta este tipo de cálculos cuánticos.

A partir de este sistema modelo, se realiza una optimización de geometrías realizando un cálculo de estructura electrónica. Típicamente se utiliza el método de Hartree-Fock, o la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) explicada en la primera parte.

Este cálculo nos permitirá obtener las distancias, ángulos y diedros de equilibrio que serán necesarias para el campo de fuerzas clásico, ahora modificado por los nuevos parámetros. Para calcular las constantes de estas distancias y ángulos de equilibrio, se realizan diferentes cálculos *single point*, en los cuales se mueve al sistema en la dirección del modo que desea ser parametrizado (distancia, ángulo, diedros) y se realiza un cálculo de energía a estructura fija. Se obtiene un perfil de energía potencial para ese modo, que será fiteado a un potencial armónico simple para obtener así la constante que utilizan los campos de fuerza.

Por otro lado, los parámetros de carga de cada uno de los átomos se obtendrá a partir de la estructura optimizada, realizando cálculos de cargas puntuales. En particular se utilizará el método RESP<sup>18</sup> que consiste en ajustar las cargas atómicas de una molécula, de forma tal de reproducir el potencial electrostático del sistema. Por lo tanto, inicialmente se calcula el potencial electrostático de la molécula de interés, y posteriormente se evalúa el mismo en cada punto de una grilla cuyas dimensiones dependen del sistema de estudio. Las cargas de cada átomo deben reproducir de forma óptima el potencial electrostático calculado. La suma de todas las cargas atómicas deberá ser igual a la carga total del sistema. En todos los casos se deberá prestar especial atención a los diferentes estados de spin que la molécula pueda presentar, de forma de intentar reproducir lo mejor posible la función de energía potencial del sistema real de estudio.

### Proteínas mutantes *in-silico*:

En muchos casos se realizan mutaciones puntuales en ciertos residuos de interés, para poder comprender mejor la relevancia de los mismos. Estas mutantes posteriormente (o previamente) son testeadas por los grupos experimentales. Este ejercicio de contraste con los experimentos es una herramienta muy útil para validar las simulaciones y los parámetros que se utilizan. Es decir, si un ligando nuevo fue parametrizado correctamente, deberá al menos reproducir correctamente el comportamiento de resultados experimentales, tanto para la proteína wild type, como para diferentes proteínas mutantes. De esta forma, podemos validar la metodología empleada, así como los parámetros puntuales que utilizamos en ese caso.

Otra de las razones por las cuales se realizan proteínas mutantes, es para poder comprender la familia de trHb completa. Los miembros de esta familia poseen diferencias puntuales en algunos residuos críticos. Realizando modificaciones en esos residuos, e intercambiándolos por los que poseen otras proteínas de esta familia, permite comprender los fenómenos de forma algo más global.

Las proteínas mutantes *in-silico* fueron construidas tomando en cuenta el entorno del residuo que será mutado, de forma de minimizar las interacciones de repulsión con su entorno. La misma consideración es válida para los ligandos coordinados al grupo hemo (CO, NO, F<sup>-</sup>, SH<sub>2</sub>, etc). En algunos casos las proteínas son cristalizadas con CN<sup>-</sup>, u algún otro ligando coordinado. Por lo tanto resulta más sencillo introducir el ligando deseado.

### Modelado de estructuras:

*Alineamientos de secuencia:* El objetivo de un alineamiento de secuencias de aminoácidos es posicionar cada uno de los residuos de una determinada secuencia de aminoácidos en otra similar. Si las secuencias son exactamente iguales el resultado es único, pero si las secuencias difieren, existirán muchas formas de realizar estos alineamientos. Para realizar estos alineamientos los programas típicamente utilizan funciones de puntuación (scoring), que contemplan la similitud de los aminoácidos de ambas secuencias, así como las inserciones y las deleciones que ambas pueden tener. Por ejemplo, si una secuencia posee un Asp (aminoácido ácido) donde otra posee un Glu (aminoácido ácido), la función de scoring será mayor que si el residuo fuera una Lys

(aminoácido básico). El objetivo es por lo tanto, encontrar la mejor función de scoring para alcanzar el mejor alineamiento posible.

Dado que existen diferentes funciones de scoring que asignan diferente peso a cada una de las variables (diferencia entre aminoácidos, inserciones, deleciones..), existirán diferentes alineamientos posibles según el programa utilizado. Los diferentes programas típicamente presentan diferentes algoritmos de búsqueda con diferentes funciones de scoring.

*Modelado por homología:* En muchos casos la estructura tridimensional del sistema que se desea estudiar no es conocida. Si alguien quisiera realizar simulaciones de este sistema con estructura desconocida, deberá comenzar con una estructura tridimensional construída al azar, y realizar simulaciones muy largas, esperando que la misma adopte la estructura tridimensional que posee el sistema real. Es decir, que la misma se pliegue adoptando la estructura terciaria que tiene en solución. De todas formas, y aunque se ha dedicado mucho esfuerzo a resolver este problema (plegamiento), el estado actual de las simulaciones computacionales hace que este tipo de estudios sea muy costoso. Por esta razón, resulta conveniente que las estructura tridimensionales se construyan por semejanza con otras conocidas. Esto se denomina comúnmente *modelado por homología* y consiste en utilizar una estructura de una proteína conocida como “molde“ para construir la estructura terciaria de la proteína de interés a partir de la primera. Resulta evidente que las proteínas deben ser lo más parecidas entre sí, para que el modelo construído tenga alguna relevancia. En casos donde las proteínas poseen suficiente similitud (como sucede con los miembros de una misma familia de proteínas), resulta posible utilizar esta metodología para construir el modelo.

#### Especificaciones de las simulaciones realizadas en la presente Tesis:

Muchas de las simulaciones de la presente Tesis han sido relizadas bajo los mismos procedimientos. Por esa razón, daremos a continuación detalles técnicos referentes a estas simulaciones.

Todas las simulaciones clásicas fueron realizadas utilizando el campo de fuerzas de Amber ff99, incluido en el paquete de programas de Amber9.0<sup>19</sup>. Las proteínas fueron solvatadas con una

caja de aguas explícitas descritas con el potencial TIP3P<sup>9</sup>, de forma tal de que entre la superficies de la proteína y los extremos de la caja existieran aproximadamente 10-12 Å. Se utilizó el termostato de Berendsen y condiciones periódicas de borde en todos los casos.

Los sistemas se inicializaron utilizando difentes pasos de termalización. Primero se fijaron los átomos de la proteína durante 200ps, para estabilizar las aguas de la caja. Luego se fijaron solamente los carbonos  $\alpha$  (CA) de la proteína, para comenzar a estabilizar la proteína. Y se realizó una rampa de temperatura de 0 a 300K durante 200ps. En estos primeros 3 pasos se utilizó un tiempo de paso ( $dt$ ) de 0.1ps. Finalmente se realizaron simulaciones a 300K, utilizando un  $dt=2ps$ . Dependiendo del sistema y del tipo de estudio, se realizaron 10, 20 hasta 50ns de simulaciones clásicas.

La protonación de las histidinas se realizó de forma tal de respetar las interacciones que presentaban estos residuos en la estructura cristalográfica.

Los cálculos de estructura electrónica (QM) necesarios para la construcción de los parámetros que requieren las simulaciones clásicas fueron realizados utilizando DFT con bases 6-31G\*\*, y con funcionales B3LyP<sup>2</sup> y PBE<sup>3</sup>. En particular, los parámetros del grupo hemo, del hemo-CO y del hemo-O<sub>2</sub> habían sido calculados previamente en nuestro grupo, y fueron utilizados en numerosas oportunidades en diferentes sistemas<sup>14,20-23</sup>.

Los cálculos QM/MM fueron realizados con el programa Hybrid<sup>21</sup> desarrollado en el grupo donde se realizó la presente tesis. El mismo utiliza DFT con el funcional PBE, con bases de calidad doble zeta con polarización. La porción del sistema tratada cuánticamente corresponde a la porfirina sin cadenas laterales, el imidazol de la histidina proximal, y los ligandos involucrados. El resto del sistema es tratado clásicamente. La unión entre ambos sistemas (cuántico/clásico) es tratada con el método del *link* átomo<sup>9</sup>. Los átomos localizados a más de 10 Å del hemo se mantuvieron fijos con el objeto de acelerar tiempos de cómputo.

Para calcular la energía QM/MM a lo largo de una coordenada de reacción, se utilizó el método de búsqueda del camino de reacción, realizando en cada paso una optimización de geometría QM/MM, que fue restringida a lo largo de la coordenada de reacción. Se calculó la energía en cada paso, y de esta forma se obtuvo el perfil de energía del proceso.

Las simulaciones de Dinámica Molecular Guiada (MSMD) se realizaron de la siguiente manera. Todo comienza agregando una molécula de O<sub>2</sub> en diferentes sitios internos de docking, y realizando diferentes simulaciones clásicas (una para cada posición donde se colocó el oxígeno). De esta forma se puede observar los posibles canales y cavidades internas de la proteína, a través de los

cuales va migrando la molécula añadida. Posteriormente se realizan diferentes dinámicas moleculares restringidas, con la molécula de oxígeno fija en los diferentes mínimos que arrojó la dinámica clásica. Se extrajeron fotos de estas simulaciones, que fueron utilizadas como punto de partida para realizar simulaciones de Dinámica Molecular Dirigida (MSMD), utilizando como coordenada de reacción la distancia Fe-O<sub>2</sub>, y con una velocidad de 0,025 Å/ps. Posteriormente se realizaron los promedios según la ecuación de Jarzynski.

En todos los casos los perfiles se realizan hasta 4 Å del Fe, para evitar errores debido a interacciones que no se están teniendo en cuenta por el modelo que se está utilizando. Recordar que en las simulaciones clásicas no se tienen en cuenta la formación del enlace Fe-O<sub>2</sub>, que comienza a ser importante a partir de los 4 Å aproximadamente.

### Referencias:

1. Szabo A, Ostlund N.S. *Modern Quantum Chemistry*. First Edition. New York: Mc Graw-Hill Publishing Company; 1989.
2. Becke AD. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* 1993;98(7):5648.
3. Perdew JP, Burke K, Ernzerhof M. Generalized Gradient Approximation Made Simple. *Phys. Rev. Lett.* 1996;77(18):3865.
4. Ira N. Levine. *Quantum Chemistry*. 5<sup>o</sup> ed. New York - USA: Prentice Hall; 2001.
5. Brooks B, Bruccoleri R, Olafson B, et al. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.* 1983;4(2):187-217.
6. Oostenbrink C, Soares TA, Vegt NFA, Gunsteren WF. Validation of the 53A6 GROMOS force field. *Eur Biophys J.* 2005;34(4):273-284.
7. Cornell WD, Cieplak P, Bayly CI, et al. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *Journal of the American Chemical Society.* 1995;117(19):5179-5197.
8. Crespo A, Martí MA, Estrin DA, Roitberg AE. Multiple-steering QM-MM calculation of the free energy profile in chorismate mutase. *J. Am. Chem. Soc.* 2005;127(19):6940-6941.
9. Andrew Leach. *Molecular Modelling: Principles and Applications*. Second Edition. Prentice Hall; 2001.

10. Eslami H, Mojahedi F, Moghadasi J. Molecular dynamics simulation with weak coupling to heat and material baths. *J Chem Phys.* 2010;133(8):084105.
11. Guallar V, Lu C, Borrelli K, Egawa T, Yeh S. Ligand migration in the truncated hemoglobin-II from *Mycobacterium tuberculosis*: the role of G8 tryptophan. *J. Biol. Chem.* 2009;284(5):3106-3116.
12. Cohen J, Olsen KW, Schulten K. Finding gas migration pathways in proteins using implicit ligand sampling. *Meth. Enzymol.* 2008;437:439-457.
13. Kumar S, Rosenberg JM, Bouzida D, Swendsen RH, Kollman PA. Multidimensional free-energy calculations using the weighted histogram analysis method. *J. Comput. Chem.* 1995;16(11):1339-1350.
14. Martí MA, González Lebrero MC, Roitberg AE, Estrin DA. Bond or cage effect: how nitrophorins transport and release nitric oxide. *J. Am. Chem. Soc.* 2008;130(5):1611-1618.
15. Bidon-Chanal A, Martí MA, Crespo A, et al. Ligand-induced dynamical regulation of NO conversion in *Mycobacterium tuberculosis* truncated hemoglobin-N. *Proteins.* 2006;64(2):457-464.
16. Swails JM, Meng Y, Walker FA, et al. pH-dependent mechanism of nitric oxide release in nitrophorins 2 and 4. *J Phys Chem B.* 2009;113(4):1192-1201.
17. Jarzynski C. Nonequilibrium Equality for Free Energy Differences. *Phys. Rev. Lett.* 1997;78(14):2690.
18. Besler BH, Merz KM, Kollman PA. Atomic charges derived from semiempirical methods. *J. Comput. Chem.* 1990;11(4):431-439.
19. Hornak V, Abel R, Okur A, et al. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins.* 2006;65(3):712-725.
20. Martí MA, Bikiel DE, Crespo A, et al. Two distinct heme distal site states define *Cerebratulus lacteus* mini-hemoglobin oxygen affinity. *Proteins.* 2006;62(3):641-648.
21. Crespo A, Martí MA, Kalko SG, et al. Theoretical study of the truncated hemoglobin HbN: exploring the molecular basis of the NO detoxification mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* 2005;127(12):4433-4444.
22. Martí MA, Capece L, Bikiel DE, Falcone B, Estrin DA. Oxygen affinity controlled by dynamical distal conformations: the soybean leghemoglobin and the *Paramecium caudatum* hemoglobin cases. *Proteins.* 2007;68(2):480-487.
23. Nadra AD, Martí MA, Pesce A, Bolognesi M, Estrin DA. Exploring the molecular basis of heme coordination in human neuroglobin. *Proteins.* 2008;71(2):695-705.

### Capítulo 3. Migración de ligandos en hemoglobinas truncadas.

#### Introducción:

Como fue explicado en la Introducción General, la migración de los ligandos diatómicos (CO, O<sub>2</sub>, NO) a través de canales internos para alcanzar el sitio activo, resulta crucial para regular las funciones en estas globinas, como ocurre en la hemoglobina, en la mioglobina, en la neuroglobina y en la hemoglobina truncada de *M. tuberculosis* (Mt-trHbN), entre otras.

Estudios realizados en los últimos años por diferentes grupos, entre los cuales se encuentra el grupo donde fue realizada la presente tesis, muestran que la Mt-trHbN presenta dos canales a través de los cuales pueden migrar los ligandos desde el solvente hasta el sitio activo (Fig. 3.1). Uno de los dos canales es algo más largo y presenta un residuo capaz de ocluirlo en posición G8, razón por la cual fueron denominados Canal Corto y Canal Largo G8.

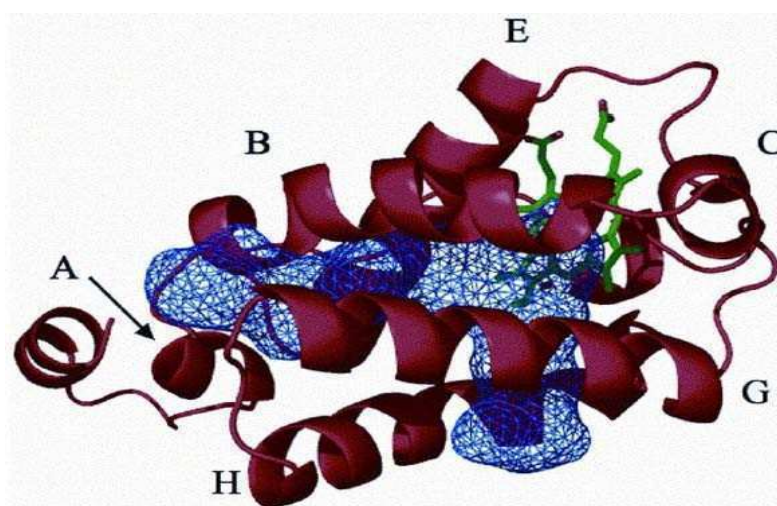


Figura 3.1.- Representación esquemática de la Mt-trHbN, donde pueden observarse la nomenclatura de las hélices, el grupo hemo (en verde), y los dos canales que presenta esta proteína (azul). El *canal largo* orientado de forma horizontal, y el *canal corto* de forma vertical a la página <sup>1</sup>.

Se ha sugerido que en la reacción de detoxificación de NO, el primero de los ligandos migra a través del Canal Corto, mientras que segundo ligando (NO) podría migrar por ambos canales. Esto último es consecuencia de cambios internos que se producen en la proteína por la presencia del oxígeno coordinado al Fe<sup>2+</sup>. Si bien esta proteína había sido intensamente estudiada por diferentes grupos experimentales y teóricos, muy poco se sabía acerca del resto de las proteínas de esta



familia. Por lo tanto, decidimos estudiar dos proteínas pertenecientes al segundo grupo (O), que despertaron nuestro interés, por razones diferentes en cada caso. En primer lugar nos resultó interesante estudiar la otra trHb que presentaba *M. tuberculosis* (Mt-trHbO), dado que estudios *in-vivo* mostraban que esta proteína era incapaz de detoxificar NO eficientemente. Preguntas sencillas surgieron respecto de esta nueva proteína: ¿Por qué esta proteína no puede detoxificar NO eficientemente? ¿Cuáles son los residuos que le impiden a esta proteína funcionar como lo hace la Mt-trHbN? ¿Podemos realizar mutaciones de forma de que logre detoxificar eficientemente NO?

La segunda proteína que nos llamó la atención fue la trHb de *B. subtilis* (Bs-trHbO), ya que existía cierta controversia en los resultados experimentales sobre la migración de ligandos, que aún no había sido posible de conciliar. Esto generaba una crítica respecto de la ya establecida relación que existía entre un elevado valor de  $k_{on}O_2$  y la necesidad de canales internos de migración de ligandos.

El objetivo fue realizar un estudio de los canales internos de migración de ligandos en ambas proteínas (Mt-trHbO y Bs-trHbO), para intentar responder a estos interrogantes.

### Metodología:

#### **Simulaciones de Dinámica Molecular Clásica (MD):**

Partiendo de la estructura cristalográfica de ambas proteínas Mt-trHbO (pdbId: 1NGK) y Bs-trHbO (pdbId: 1UX8), se realizaron simulaciones de dinámica molecular (DM) clásica tal como fueron explicadas en la Metodología General.

#### **Migración del oxígeno (MSMD/Jarzynski):**

Se realizaron simulaciones de dinámica molecular guiada para poder calcular los perfiles de energía libre, tal como fue explicado en la Metodología General. Para el Canal Largo los mínimos fueron encontrados aproximadamente a 8, 11 y 16 Å del Fe, mientras que para el canal corto fueron aproximadamente a 11 y 6 Å del Fe.

## Resultados:

### **Hemoglobina truncada O de *M. tuberculosis***

Partiendo de la estructura cristalográfica de la Mt-trHbO, y realizando simulaciones clásicas logramos identificar dos posibles canales internos de migración. El primero (Canal Largo) es similar al encontrado en la Mt-trHbN, mientras que el segundo es similar a la tradicional vía por la cual ingresan los ligandos en la mioglobina (HisE7 gate o Canal Corto E7) (Fig. 3.2). Estos dos canales posibles de migración, coinciden estructuralmente con los reportados en la estructura cristalográfica (Fig. 3.3). En particular, se observa que el Canal Corto E7 conecta directamente el sitio activo con el solvente, debido posiblemente a la presencia de un residuo pequeño como la Alanina en posición E7 (en lugar de la típica histidina que poseen la hemoglobina, mioglobina, etc). El Canal Largo, presenta a 11 Å del Fe una zona donde el ligando posee gran libertad para moverse, y se encuentra bloqueado en las cercanías del sitio activo por dos residuos: TrpG8 y LeuE11 (Fig. 3.3). Cabe aclarar que estos residuos son diferentes en la Mt-trHbN, que posee en dichas posiciones una valina (ValG8) y una glutamina (GlnE11), respectivamente.

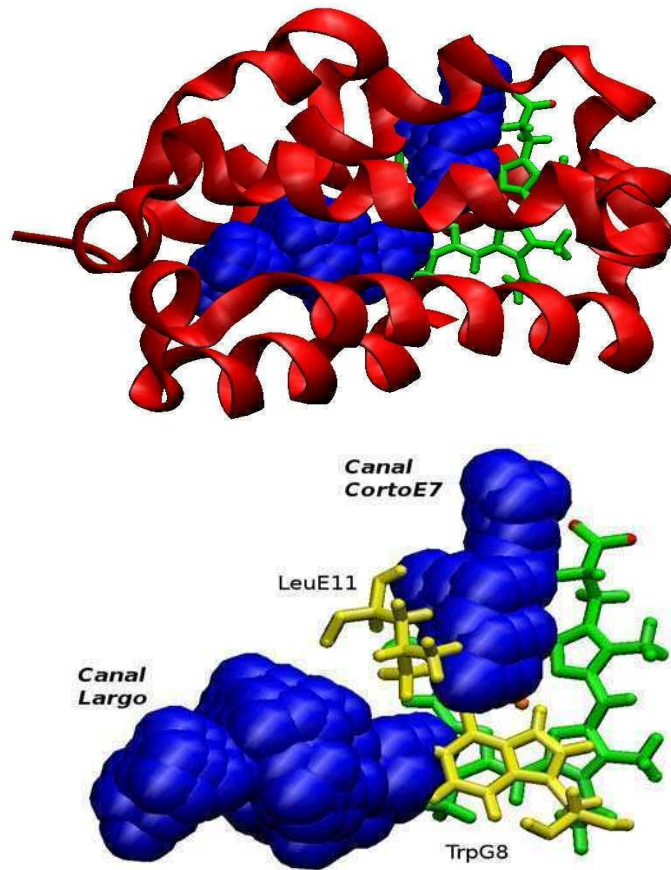


Figura 3.2.- *Arriba*: representación esquemática de la Mt-trHbO, con los dos canales. *Abajo*: detalle de los canales (en azul) y residuos (en amarillo) relevantes que bloquean el Canal Largo.

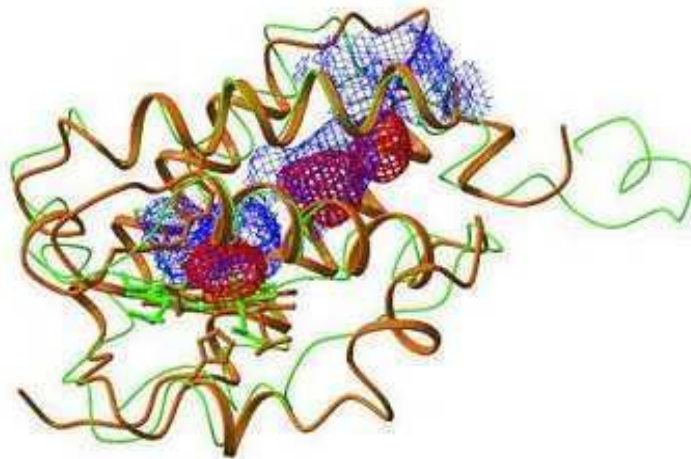


Figura 3.3.- Hemoglobina truncada O de *M. tuberculosis* (trHbO) reportada por Bolognesi et al <sup>2</sup> donde se visualiza la estructura de esta proteína (naranja) y el canal encontrado (rojo). Con el objeto de realizar una comparación estructural, se ha superpuesto la estructura de la proteína Mt-trHbN. En verde y en azul respectivamente se ven las hélices y el canal de esta otra proteína.

Posteriormente se calcularon los perfiles de energía libre correspondientes a la migración de los ligandos en ambos canales, en la proteína desoxigenada (Fig. 3.4). En el perfil correspondiente al Canal Largo, pueden observarse un mínimo de energía entre los 8 y los 13 Å del Fe, que corresponde al sitio de gran libertad al que nos referimos en la sección anterior. Por último el cálculo de energía libre nos muestra la gran barrera que debe atravesar el ligando para acceder al sitio activo de la proteína, (~12kcal/mol). Esta enorme barrera energética corresponde al sitio donde el canal se encontraba interrumpido en el esquema reportado, debido probablemente a la presencia de los dos aminoácidos que habíamos identificado previamente con TrpG8 y LeuE11.

Por otro lado, el perfil del Canal Corto E7 mostró una barrera de aproximadamente 4kcal/mol para el ingreso de los ligandos. Si bien existe una barrera considerable para el ingreso de ligandos, esta es menor que la encontrada para el Canal Largo (Fig. 3.4). Por esta razón, podemos concluir que los ligandos ingresan mayoritariamente por el Canal Corto E7 en la Mt-trHbO.

Si bien es difícil realizar comparaciones entre proteínas, el perfil de migración de oxígeno en la Mt-trHbN presenta barreras menores para la migración del oxígeno hasta el sitio activo<sup>1</sup>. Esto es consistente con la mayor  $k_{on}O_2$  que presenta la Mt-trHbN respecto de la Mt-trHbO (*véase más adelante la Tabla 3.1*).

Cabe aclarar que los cálculos de cada canal se realizaron hasta los 4 Å de distancia del Fe, dado que a menor distancia comienza a cumplir un rol importante la unión química entre el Fe y el oxígeno, que no se tiene en cuenta en el modelo clásico empleado.

El grupo de Victor Guallar, realizó los mismos cálculos de migración de ligandos realizado por nosotros, pero utilizando un método computacional algo diferente<sup>3</sup>. Los autores encontraron una barrera similar a la encontrada por nosotros para el Canal Largo (~13kcal/mol), pero encontraron una barrera mayor que la encontrada por nosotros para el canal corto (~12kcal/mol). Si bien hemos evaluado alternativas para explicar las diferencias en las barreras encontradas en ambos grupos, no hemos logrado identificar a qué se debe esta diferencia.

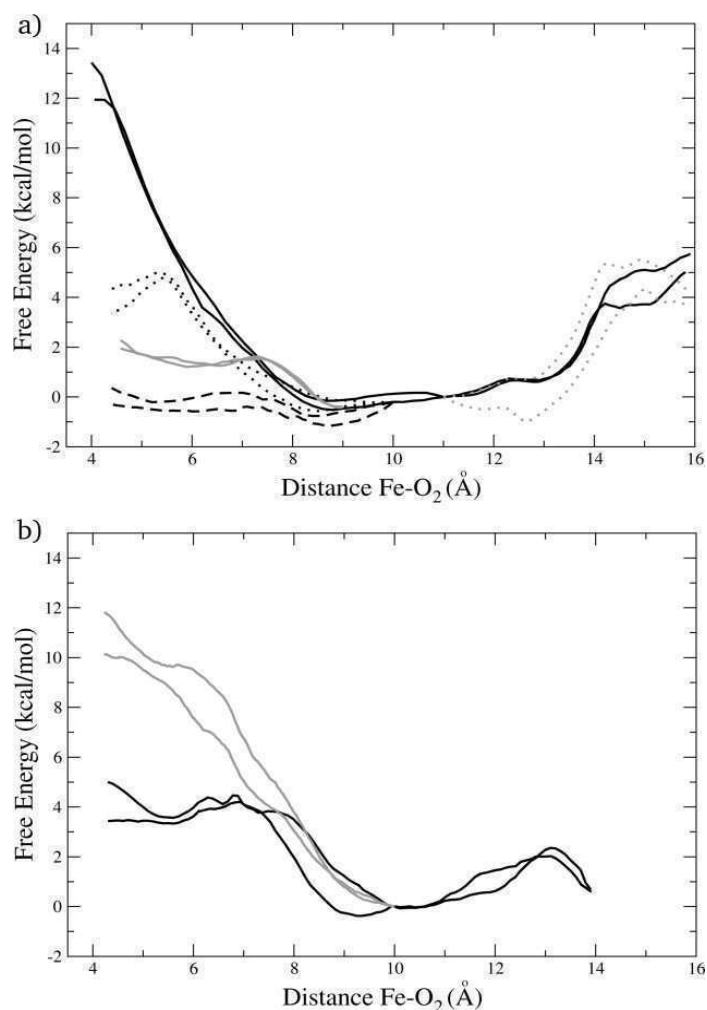


Figura 3.4.- Perfil de energía libre de la migración de oxígeno a través de canales internos en la Mt-trHbO. a) Canal Largo: proteína wt (línea negra llena), TrpG8->Phe (línea punteada), TrpG8->Ala (línea llena gris). b) Canal Corto E7: proteína wt (línea llena negra), y AlaE7->Leu (línea gris llena). En a) también puede observarse la migración del oxígeno en la mutante TrpG8->Ala, a través del nuevo Canal CortoG8 (línea negra rayada). Todos los perfiles fueron realizados por duplicado, para estimar su convergencia.

*Proteínas mutantes del Canal Largo:* Con el objeto de determinar fehacientemente la importancia del triptofano G8 en el bloqueo del Canal Largo, se construyó *in silico* una proteína mutante en la cual se reemplazó este aminoácido por Phe y luego por Ala. Si el TrpG8 juega el importante rol que hemos postulado, la barrera energética correspondiente al ingreso de ligandos al sitio activo deberá disminuir cuando se lo sustituya por estos residuos. La figura 3a muestra el perfil de energía libre correspondiente a la proteína mutante, junto con el perfil de la proteína salvaje. En el mismo puede observarse que la barrera energética disminuye abruptamente desde ~12kcal/mol en la proteína wt, a

~5kcal/mol en la mutante TrpG8->Phe, hasta ¡~2kcal/mol aprox! en el caso de la mutante TrpG8->Ala (Fig. 3.4). Esta gran disminución de la barrera energética evidencia la importancia de este aminoácido en la pronunciada barrera que posee la proteína salvaje. Debido a la naturaleza química de estos residuos, estos resultados muestran que la barrera se debe fundamentalmente a fenómenos estéricos. Es importante subrayar en este momento que el TrpG8 se encuentra altamente conservado en la familia de Hemoglobinas Truncadas, dado que se encuentra en todos los miembros del grupo II y III, y en ningún miembro del grupo I (al cual pertenece la otra trHb que posee *M. tuberculosis*) (véase Fig. 1.4 de la Introducción General).

Dos grupos experimentales realizaron mediciones independientemente de una de estas mutantes (TrpG8->Phe), encontrando un aumento en la  $k_{on}O_2$ . Además de ayudar a comprender microscópicamente los procesos que ocurren en estas proteínas, estos resultados permiten validar los modelos empleados por nosotros para hacer las simulaciones <sup>3,4</sup>. Aún no se han realizado mediciones experimentales de la mutante TrpG8->Ala.

Tan crítico es el TrpG8, que cuando el mismo se reemplaza por un residuo más pequeño como la Ala, aparece un nuevo canal de migración (Fig. 3.5), que es estructuralmente similar al Canal Corto G8 a través del cual migran los ligandos en la Mt-trHbN (véase la Fig. 3.1). El perfil de migración de ligandos a través de este nuevo canal, presenta la barrera más baja encontrada hasta el momento. Por esta razón, esta proteína mutante TrpG8->Ala debería presentar valores de  $k_{on}$  similares a los presentados por la Mt-trHbN.

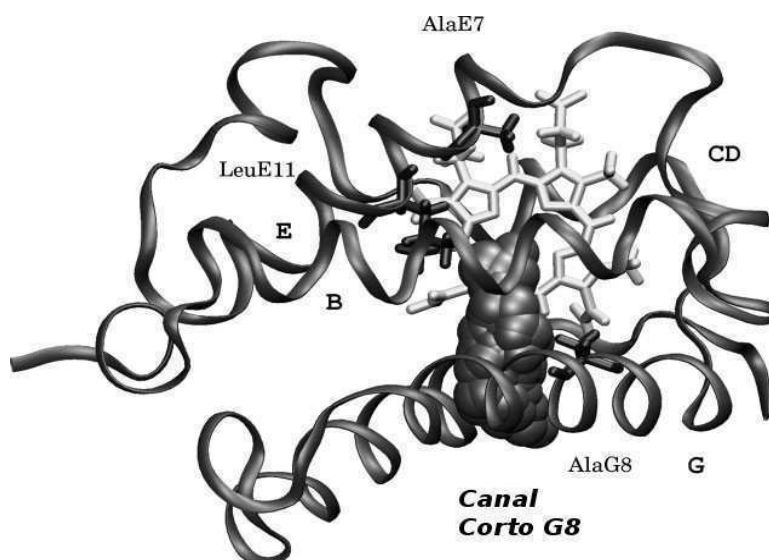


Figura 3.5.- Representación esquemática de la mutante Mt-trHbO TrpG8->Ala, donde se observa el Canal Corto G8 que surge debido a esta mutación, y que es estructuralmente similar al que presenta la Mt-trHbN.

*Proteínas mutantes del Canal Corto E7:* Con el objeto de analizar la relevancia de la AlaninaE7 en la Mt-trHbO, construimos in-silico la mutante AlaE7-> Leu y construimos el correspondiente perfil de energía libre (Fig. 3.3b). La barrera energética aumenta desde ~4kcal/mol, hasta ~10kcal/mol en la proteína mutante. Esto muestra que es posible bloquear el acceso del ligando a través de este canal, modificando las propiedades estéricas del residuo E7.

*Migración de un segundo ligando:* Hasta ahora hemos realizado los cálculos únicamente con la proteína y el oxígeno como el ligando diatómico que migra a través de los canales. De esta forma se estudió la entrada del primer ligando a la proteína desoxigenada. Pero es conocido el hecho de que muchas globinas cambian su estructura luego de la coordinación de un ligando como el oxígeno. En estos casos, el cambio conformacional produce un cambio en la afinidad de la proteína por el segundo ligando que ingresa<sup>1</sup>. Un ejemplo muy común es el efecto alostérico que presenta la hemoglobina cuando se une a moléculas de oxígeno. En este caso, se induce un cambio en la siguiente subunidad, que ahora presenta una mayor afinidad por el oxígeno<sup>5</sup>.

Por lo tanto, el siguiente paso en nuestro trabajo consistirá en estudiar la migración de un segundo ligando, en este caso el óxido nítrico (NO), una vez que la proteína posee una molécula de oxígeno coordinada al Fe del grupo hemo. De esta forma se podrán evaluar los cambios en las barreras energéticas, debido a la incorporación de esta molécula al sitio activo de la proteína.

Cabe aclarar que la utilización de un NO como el ligando que transitará por los canales, en lugar del O<sub>2</sub> utilizado hasta ahora, no representará diferencias significativas en los cálculos de energía libre, ya que los parámetros del NO y del O<sub>2</sub> son casi idénticos (ambas son moléculas gaseosas neutras y el NO posee un momento dipolar muy bajo). Por lo tanto, en caso de encontrar diferencias en las barreras energéticas, estarán dadas exclusivamente por el cambio que sufrió la proteína debido a la molécula de oxígeno que se encontraba coordinada al Fe, y no por realizar los cálculos con una molécula diferente como ligando.

En la figura 3.6 pueden observarse los perfiles de energía libre calculados para la migración de un ligando en la proteína oxigenada, tanto para el Canal Corto E7 como para el Canal Largo (Fig. 3.6). Con el objeto de realizar un mejor análisis comparativo se muestran además los perfiles correspondientes a la proteína desoxigenada, los cuales ya han sido mostrados en la figura 3.4.

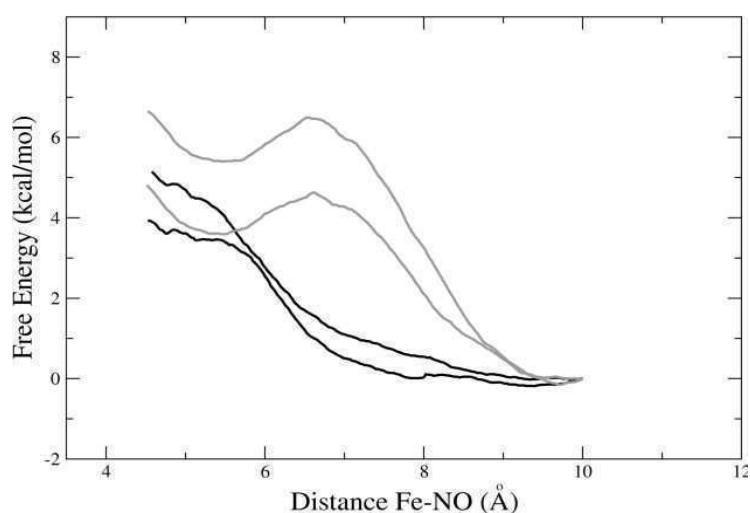


Figura 3.6.- Perfiles de energía libre de la Mt-trHbO oxigenada a través del Canal Largo (negro) y Canal Corto E7 (gris). Los perfiles de energía libre se realizaron por duplicado, como una forma de mostrar la convergencia de los resultados.

Los resultados muestran que el perfil del Canal Corto E7 prácticamente no se ha modificado, mientras que el correspondiente al Canal Largo, ha sufrido una disminución en la barrera hasta ~4-5kcal/mol, lo que significa que el segundo ligando accede al sitio activo con mayor facilidad que el primero. Obsérvese que si bien la barrera del Canal Largo disminuyó a menos de la mitad de su valor, aún continúa siendo mayor o igual que la que presenta el Canal Corto E7. Por lo tanto este cambio en la barrera no generará un cambio notorio en la accesibilidad de los ligandos al sitio activo de la proteína globalmente. La diferencia entre ambos ligandos, parecería ser que para el segundo ligando ambos canales se encuentran operativos.

*Relación entre barreras y constantes cinéticas:* Cuando se miden experimentalmente las constante de asociación o de oxidación entre un ligando y una proteína ( $k_{on}O_2$  y  $k_{ox}NO$ ), que determinan las velocidades con las que ocurren dichas reacciones, no es posible discriminar entre los canales a través de los cuales están migrando los ligandos. Por lo tanto no es posible experimentalmente, realizar mediciones por separado para cada uno de los canales como lo hemos estado haciendo nosotros a lo largo de este experimento de simulación computacional.

En la figura 3.6 puede observarse que el Canal Largo muestra diferentes barreras energéticas para la migración del primer y segundo ligando, por el contrario el Canal Corto muestra barreras



*similares* para la migración del primer y segundo ligando. Por lo tanto, si la  $k_{on}O_2$  (que hemos asumido corresponde a la migración del primer ligando) y la  $k_{ox}NO$  (que hemos asumido corresponde a la migración del segundo ligando) son similares (Tabla 3.1), podremos acercarnos a la idea de que el Canal Corto es el canal principal por el cual migran los ligandos, ya que ambas constantes cinéticas son similares, y consistentes con un canal que no modifica su barrera para la entrada de los dos ligandos. Por otro lado, si la constante correspondiente a la entrada del primer ligando fuera menor a la correspondiente a la entrada del segundo, el Canal Largo estaría jugando un papel mucho más importante en la migración de los ligandos del que hemos postulado hasta ahora (tal como se observa para el caso de la Mt-trHbN). Sin embargo, ciertas consideraciones deben ser tenidas en cuenta para discutir correctamente el razonamiento de párrafo anterior:

Tal como fue explicado en Introducción General, ambas constantes están reguladas por la accesibilidad de ligandos al sitio activo, y por la reactividad de los mismos cuando se encuentran en el mismo. El supuesto de que la  $k_{on}$  puede relacionarse directamente con la migración de los ligandos, vale cuando el ligando utilizado es el mismo ( $O_2$ , CO, NO, etc). En este caso, es posible comparar diferentes proteínas y relacionar la  $k_{on}$  con la accesibilidad. Pero cuando el ligando es diferente, puede ocurrir que las diferencias encontradas en las  $k_{on}$  no estén relacionadas con la migración de ligandos, sino con la reactividad en el sitio activo. Por ejemplo, las constantes cinéticas de asociación de CO ( $k_{on}CO$ ) poseen valores menores que las  $k_{on}O_2$ . Esto no está relacionado con los canales de migración (dado que estos son similares para CO y  $O_2$ ), sino que está regulado por la asociación del ligando al FeII del hemo.

En nuestro caso, la  $k_{on}O_2$  y la  $k_{ox}NO$  pueden tener diferencias en sus valores debidas a diferencias en las reacciones propiamente dichas y no a la migración de los ligandos a través de canales internos.

**Tabla 3.1.- Constantes cinéticas para la asociación del  $O_2$  y la oxidación de NO, para la Hemoglobina truncada O (Mt-trHbO) y para la Hemoglobina Truncada N (Mt-trHbN) <sup>6</sup>.**

	$k_{on}O_2$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_{ox}NO$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )
Mt-trHbO	$1,1 \cdot 10^5 - 8,5 \cdot 10^5$	$6 \cdot 10^5$
Mt-trHbN	$2,5 \cdot 10^7$	$7,5 \cdot 10^8$

*Modificaciones estructurales en la proteína oxigenada:* La observación directa de las simulaciones realizadas ofrecieron una elegante explicación para la abrupta disminución que

presenta el perfil del Canal Largo cuando la proteína se oxigena.

Como se verá en el próximo capítulo, cuando el oxígeno se coordina al grupo hemo, adquiere cierta densidad electrónica que le permite ser aceptor de puente de hidrógeno. El TrpG8 que se encuentra cercano al oxígeno, se acomoda alejándose del hemo, para poder formar un puente de hidrógeno con el oxígeno que se encuentra coordinado. Habíamos mostrado que el TrpG8 era uno de los responsables de la barrera energética que presentaba el perfil de migración en el Canal Largo de la Mt-trHbO. Por lo tanto, al modificarse la posición del TrpG8, se modifica el acceso de los ligandos a través del Canal Largo, y la barrera energética disminuye. En la figura 3.7 se superpusieron dos estructuras representativas de la proteína cuando se encuentra en estado desoxigenada y oxigenada. Puede verse claramente que el TrpG8 debe separarse del grupo hemo para formar correctamente el enlace de hidrógeno con el oxígeno.

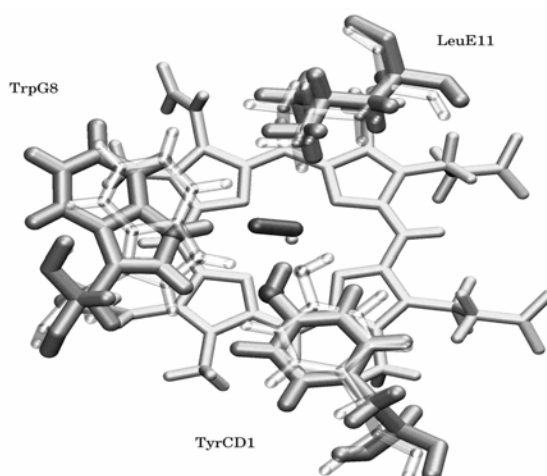


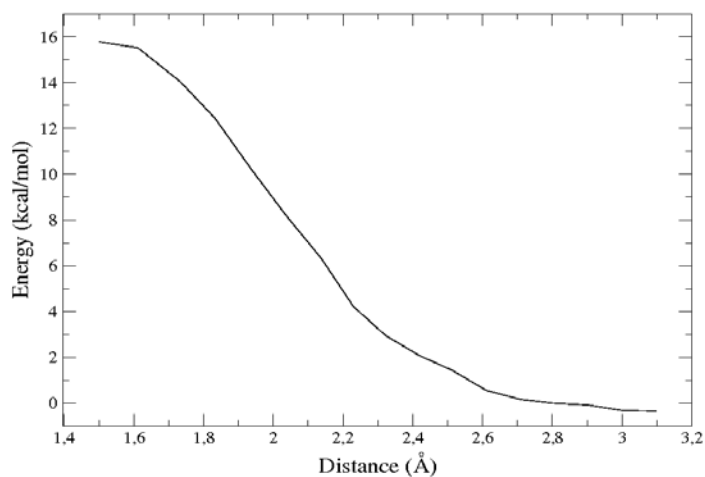
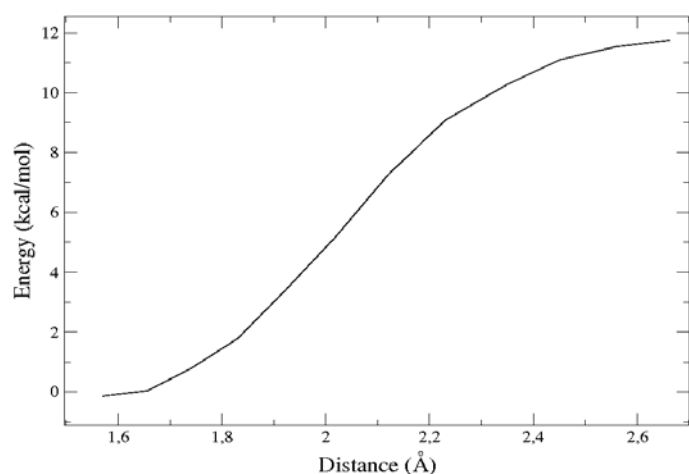
Figura 3.7.- Superposición del sitio activo de Mt-trHbO en los estados desoxigenada (transparente) y oxigenada.

Este movimiento del TrpG8 resulta crítico, no solo para la apertura del Canal Largo, sino también para estabilizar al  $O_2$  cuando se encuentra coordinado al Fe. Fue una enorme satisfacción cuando varios meses luego de que este resultado, apareciera un artículo realizado por uno de los investigadores más importantes en materia de Hemoglobinas Truncadas, demostrando que el TrpG8 era el responsable de la estabilización que poseía el oxígeno en esta proteína <sup>4</sup>.

*Reacción de detoxificación de NO:* Luego del estudio realizado con dinámica molecular clásica, decidimos abordar el problema desde un punto de vista mecánico cuántico. Se realizaron perfiles a

lo largo de la coordenada de reacción, tal como fue explicado en la Metodología General. Los resultados de los estudios con el esquema híbrido QM/MM mostraron que la reacción de detoxificación de NO, cuando la proteína se encuentra oxigenada, ocurre prácticamente sin barrera. Esto había sido observado también en la trHbN, y demuestra que la diferencia entre las constantes cinéticas  $k_{ox}NO$  de ambas proteínas se debe a la migración del segundo ligando y no a la reacción en si misma.

Dado que existen dos canales de migración (Canal Largo y Canal Corto E7), se realizaron cálculos de energía con los ligandos hacia ambos canales por separado. En ambos casos se observa que la reacción ocurre sin barrera, como sucede en el caso de la Mt-trHbN (Fig. 3.8).



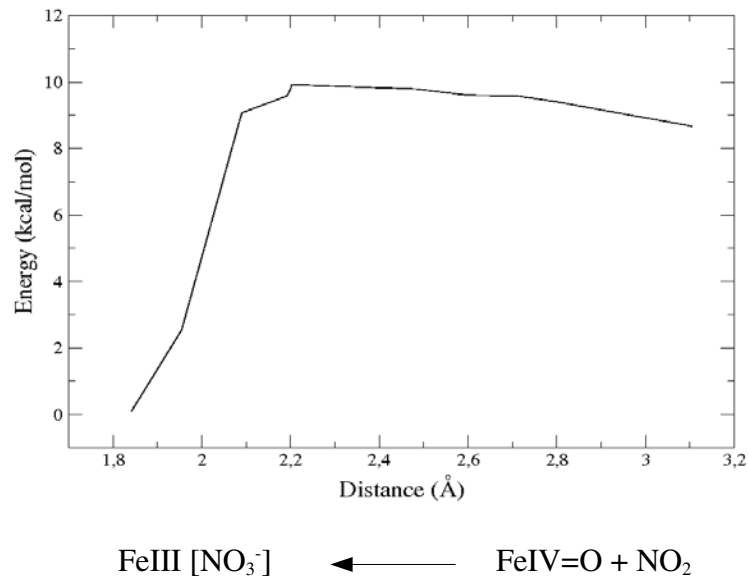


Figura 3.8.- Perfiles de energía de los diferentes pasos en el mecanismo postulado de detoxificación de NO en la Mt-trHbO oxigenada.

### Hemoglobina truncada O de *B. subtilis*

Como se dijo previamente, existía cierta controversia en los resultados experimentales que presentaba Bs-trHbO. Por un lado el cristal de esta proteína no mostraba canales para la migración de ligandos <sup>7</sup>, pero la cinética de asociación de O<sub>2</sub> ( $k_{on}O_2$ ) presentaba un valor muy alto, similar al de la Mt-trHbN, quien sí presenta claros canales de migración de ligandos <sup>8</sup>. Esto generaba una crítica al paradigma que proponía que los elevados valores de  $k_{on}O_2$ , estaban relacionados con sistemas bien definidos de canales internos para la migración de los ligandos.

**Tabla 3.2.- Datos cinéticos de tres hemoglobinas truncadas diferentes: *B. subtilis*-O (Bs-trHbO), *M. tuberculosis*- O (Mt-trHbO), y *M. tuberculosis* N (Mt- trHbN) <sup>6</sup>**

	$k_{on}O_2$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$k_{off}O_2$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )
Bs-trHbO	$1,4 \cdot 10^7$	$2,1 \cdot 10^{-3}$
Mt-trHbO	$1,1 \cdot 10^5 - 8,5 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^{-3} - 5,8 \cdot 10^{-3}$
Mt-trHbN	$2,5 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^{-1}$

Como primera medida realizamos un análisis cualitativo de los posibles canales internos que presentaba esta proteína, haciendo simulaciones de dinámica molecular clásica con una molécula de oxígeno libre. Observando la posición que va tomando el O<sub>2</sub> durante la dinámica, es posible inferir los potenciales canales que la proteína presenta. También es posible, a partir de simulaciones sin ligandos, obtener estructuras promedios y realizar cálculos sencillos sobre cavidades internas.

Ambos estudios nos permitieron encontrar dos potenciales canales de migración, que estructuralmente eran similares a los encontrados en el caso de la Mt-trHbO: Canal Largo y Canal CortoE7 (Fig. 3.9).

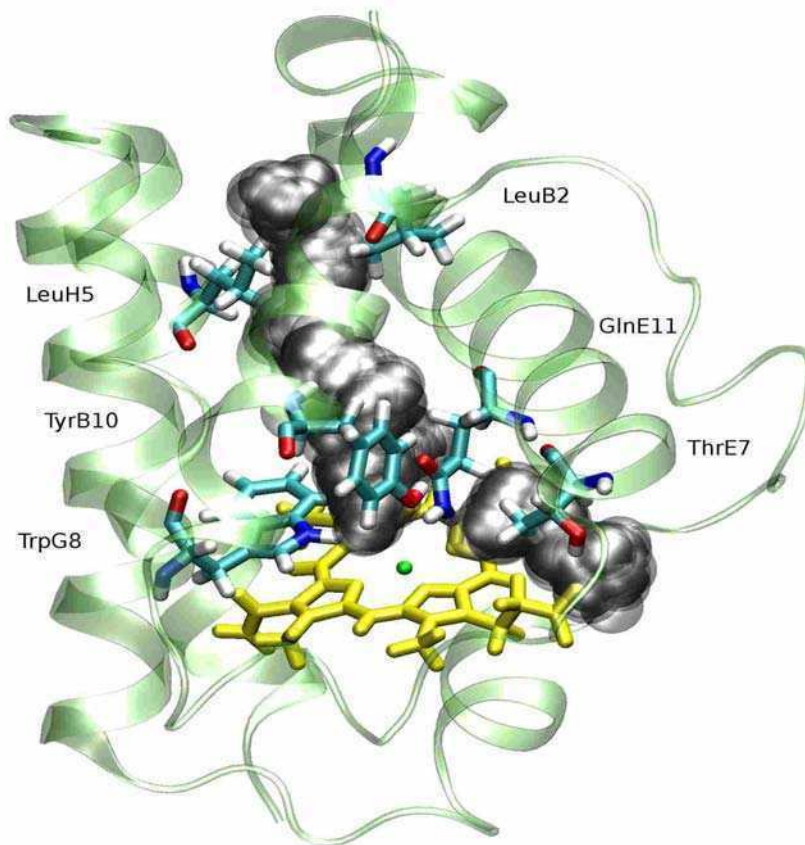


Figura 3.9.- Representación esquemática de la Bs-trHbO, donde pueden observarse los dos potenciales canales (gris) que podría presentar esta proteína. Se muestra el grupo hemo (amarillo), las hélices (verde), y los residuos relevantes: TrpG8, TyrB10, LeuH5, LeuB2, GlnE11, ThrE7.

*Perfiles de energía libre:* Se calcularon los perfiles de energía libre correspondientes los dos canales (Fig. 3.10). Sorpresivamente el perfil del Canal Largo resultó ser muy diferente al presentado por la Mt-trHbO, ya que no presenta grandes barreras para el ingreso de los ligandos. Por su parte el Canal Corto E7 (que posee ThrE7) mostró una barrera similar a la encontrada en Mt-trHbO para ese canal (alrededor de 4 kcal/mol). Podemos concluir que en Bs-trHbO los ligandos ingresan mayoritariamente por el Canal Largo, prácticamente sin barreras energéticas. Es sencillo imaginar por lo tanto, que la Bs-trHbO presente una  $k_{on}$  elevada, similar a la que presenta la Mt-trHbN.

En este caso se utilizó un criterio de convergencia para los perfiles, que consiste en realizar promedios seriados utilizando 5, 10, 15, 20, 15, 30, o 35 trabajos (W) de forma de evaluar la cantidad de trabajos mínimos necesarios hasta alcanzar la convergencia (Fig. 8.5 y 8.6 del Apéndice).

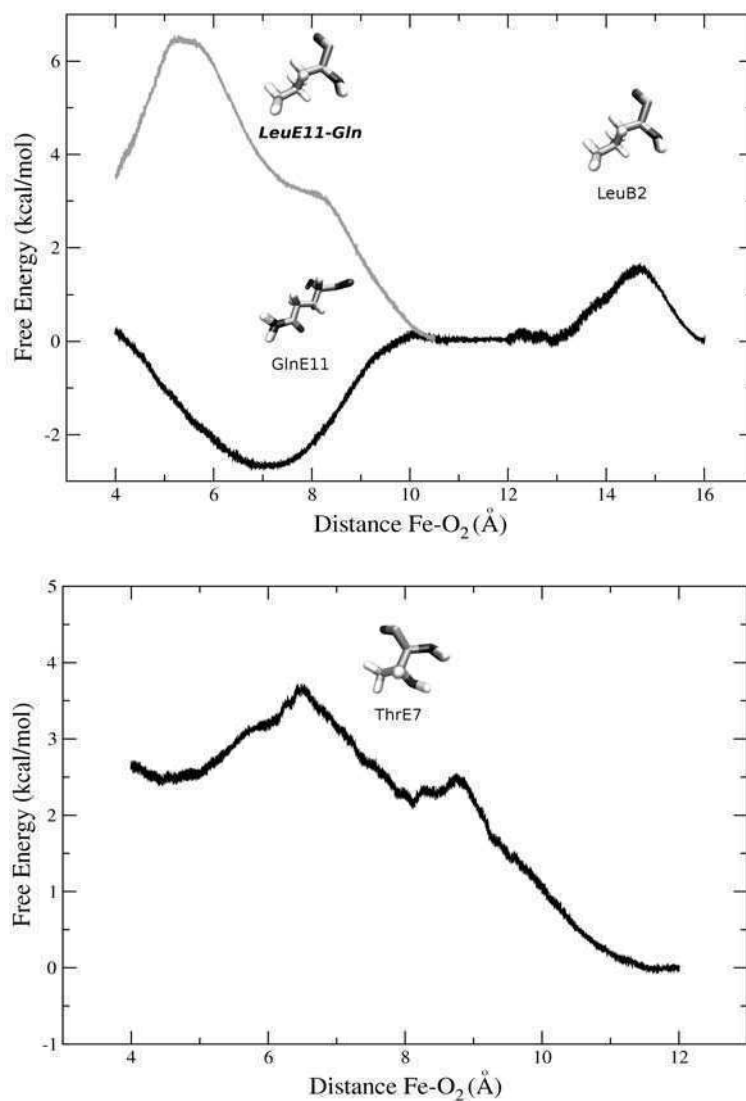


Figura 3.10.- Perfiles de energía libre de la Bs-trHbO wt (línea negra) y de Bs-trHbO mutante GlnE11-LeuE11, a través del Canal Largo (*arriba*) y del Canal Corto E7 (*abajo*). Se muestran residuos importantes y su localización aproximada en referencia al perfil.

*Explicación microscópica de las diferencias encontradas:* Una inspección microscópica de las simulaciones muestra que existe un residuo (la GlnE11) responsable de moverse y abrir el Canal Largo. En la estructura cristalográfica este residuo se encuentra bloqueando el canal, pero en las simulaciones se observa que se coordina a la TyrB10, permitiendo ahora que los ligandos ingresen fácilmente al sitio activo (Fig. 3.9 y 3.11).

Por lo tanto esta nueva conformación que adoptó la GlnE11, que no había sido observada en la estructura cristalográfica de la Bs-trHbO, explica la aparente controversia entre la elevada constante cinética  $k_{on}$  y la estructura cristalográfica.

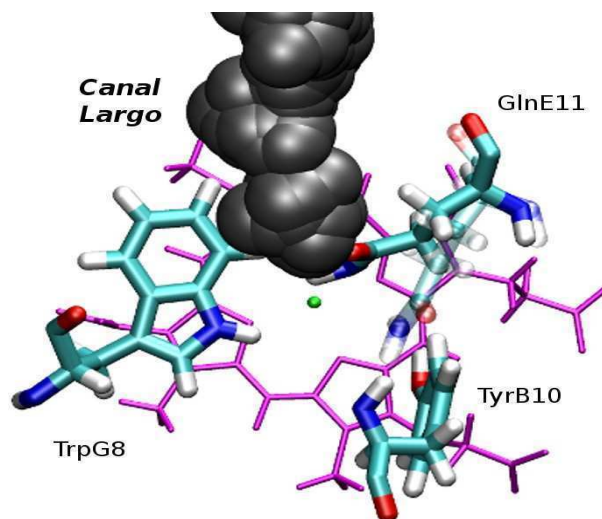


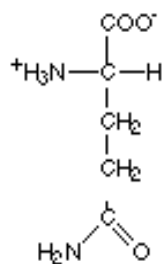
Figura 3.11.- Detalle del sitio activo de la Bs-trHbO, donde pueden observarse el movimiento de la GlnE11 que permite la apertura del canal (negro).

Al estudiar la Mt-trHbO mencionamos que el TrpG8 y la LeuE11 eran responsables de la barrera que presentaba al migración de ligandos a través del Canal Largo. En aquel caso realizamos mutaciones del TrpG8 y probamos que la barrera disminuía al disminuir el tamaño del residuo. Sin embargo en aquel momento no realizamos mutaciones del residuo LeuE11. Los resultados obtenidos con Bs-trHbO muestran que aún conservando el TrpG8, pero teniendo en E11 un residuo capaz de rotar para unirse a la TyrB10 (como el caso de la Gln) es posible encontrar barreras pequeñas para la migración de ligandos.

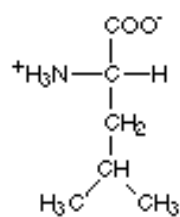
Cabe aclarar que la otra proteína de *M. tuberculosis* (Mt-trHbN) posee Gln en posición E11, que permite el ingreso de ligandos a través del Canal Largo. La diferencia fundamental entre estas dos proteínas, es que en la Mt-trHbN los ligandos ingresan mayoritariamente por el Canal Corto E7, que se encuentra ausente en la Bs-trHbO debido a la presencia del TrpG8.

*Mutante GlnE11->Leu:* Para confirmar fehacientemente nuestras hipótesis acerca del residuo E11 y su importancia en la migración de ligandos a través del Canal Largo, realizamos *in-silico* una proteína mutante de la Bs-trHbO, donde reemplazamos la GlnE11 por Leu. El residuo de leucina es algo más pequeño que la glutamina, pero no podrá moverse para formar un enlace de hidrógeno con la TyrB10:





Glutamina (Gln)



Leucina (Leu)

El perfil de migración de ligandos para esta proteína mutante posee una gran barrera energética (Fig. 3.10a), similar a la encontrada en la proteína Mt-trHbO (Fig. 3.3). Por lo tanto, se logró bloquear el canal con un residuo más pequeño (Leu), demostrando que la capacidad que posee la GlnE11 de rotar y coordinarse a la TyrB10 es la responsable de la apertura del canal.

Estos resultados muestran la importancia de la posición E11 en la regulación de la migración de los ligandos en esta subfamilia de proteínas.

### Conclusión:

Los resultados de las simulaciones muestran que las Hemoglobinas Truncadas presentan una serie de canales bien definidos a través de los cuales migran los ligandos desde el solvente hasta el sitio activo (Fig. 3.12). La funcionalidad de dos de estos canales (Canal Largo y Canal Corto G8) dependen en gran medida de dos residuos fundamentales: TrpG8 y GlnE11 (Fig. 3.13). La ausencia o presencia de alguno de estos, modifica la accesibilidad al sitio activo.

En particular, la simple mutación del TrpG8 por Ala fue suficiente para “fabricar” el canal de migración que presentaba la Mt-trHbN, evidenciando que existen ciertos sitios estructurales que regulan la apertura y cierre de dichos canales.

Si bien las estructuras cristalográficas son fundamentales para las simulaciones computacionales, la información que ofrecen respecto de la dinámica de los sistemas, puede ser limitada en algunos casos. La combinación de técnicas de cristalografía y simulaciones computacionales es una combinación muy poderosa para el estudio estructural de proteínas.

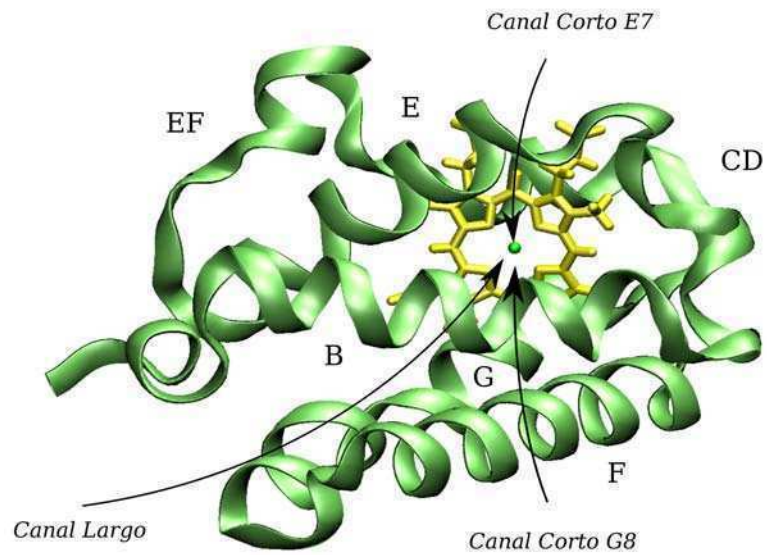


Figura 3.12.- Representación esquemática de una trHb genérica, donde se señalan los tres canales que pueden presentar estas proteínas. En el centro se muestra el grupo hemo con el átomo de Fe en su centro.

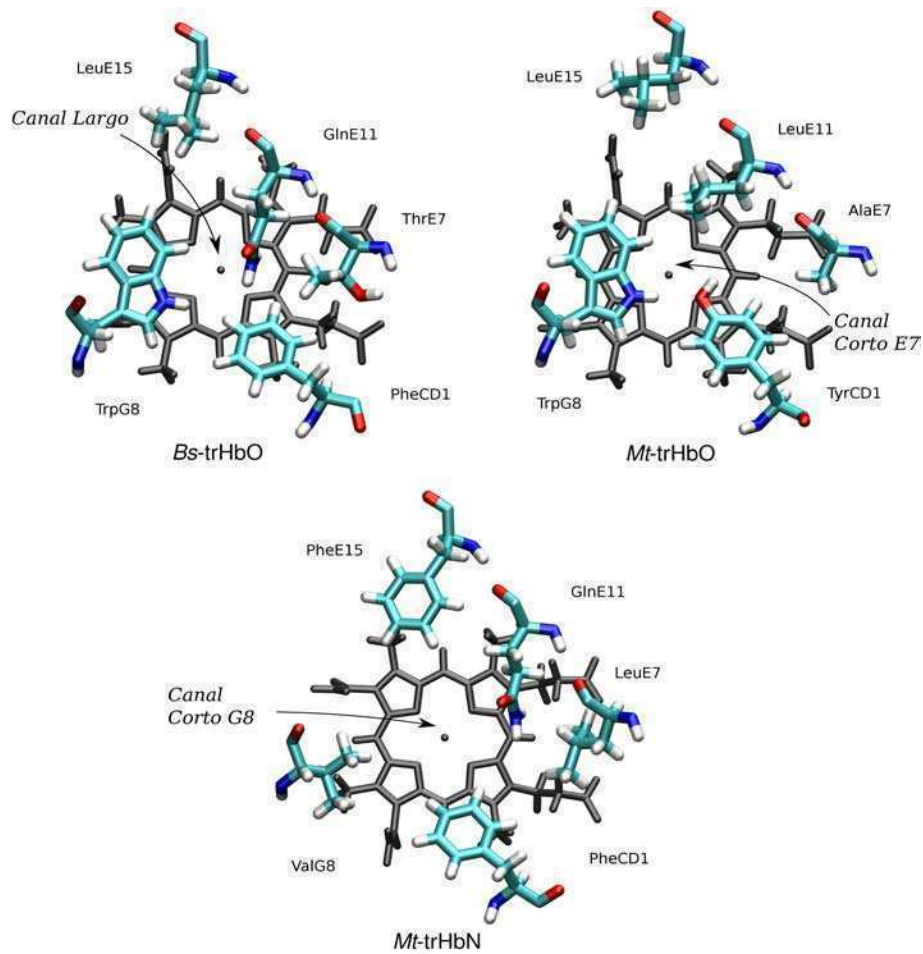


Figura 3.13.- Sitio activo de diferentes trHb (Bs-trHbO, Mt-trHbO, Mt-trHbN), donde se muestra el grupo hemo y algunos residuos relevantes para la migración de ligandos.

Los resultados presentados en este capítulo dieron origen a dos publicaciones. En la primera se encuentran los resultados de Mt-trHbO, y en la segunda los resultados de Bs-trHbO:

- *Boechi L, Martí MA, Milani M, Bolognesi M, Luque FJ, Estrin DA. Structural determinants of ligand migration in Mycobacterium tuberculosis truncated hemoglobin O. Proteins 2008;73(2):372-9.*

- *Boechi L, Mañez PA, Luque FJ, Martí MA, Estrin DA Unraveling the molecular basis for ligand binding in truncated hemoglobins: the trHbO Bacillus subtilis case. Proteins. 2010;78(4):962-70.*

### Discusión:

Existe aún una gran controversia respecto de la función de estas proteínas, que considero importante discutir en este apartado. La evolución ejerce su acción sobre los genomas, y no sobre cada una de las proteínas. No es la proteína la que sobrevive y deja descendencia fértil, sino el organismo completo. Por ejemplo, si varias proteínas realizan conjuntamente una determinada función de forma eficiente, donde cada una contribuye en la medida que puede, entonces el genoma completo es el que pasará a futuras generaciones. En este caso no importará que una de estas proteínas realice su función de forma ineficiente. Porque en su conjunto, el organismo logra sobrevivir.

Por lo tanto, si bien puede parecer descabellado buscar la función de la Mt-trHbO como detoxificadora de NO, teniendo en cuenta que *M. tuberculosis* ya posee una proteína capaz de detoxificar eficientemente NO, que además se expresa en condiciones de estrés de NO, creemos que aún hay un interesante debate que dar. Observando la potencialidad fisicoquímica de la Mt-trHbO de detoxificar NO, vemos que esta proteína presenta canales de migración de ligandos (aunque menos definidos que en la Mt-trHbN), que la reacción de detoxificación ocurre sin barrera, y que posee una gran estabilización del oxígeno coordinado. Suponiendo que ambas proteínas (Mt-trHbN y Mt-trHbO) tienen igual capacidad de reducirse ( $\text{Fe}^{\text{III}} \rightarrow \text{Fe}^{\text{II}}$ ), entonces podemos concluir que esta proteína también es capaz de detoxificar NO, pero probablemente lo realiza de forma menos eficiente.

Investigadores de la Universidad de Roma Tré, probaron un tiempo después de nuestras simulaciones, que la hemoglobina truncada de *M. leprae* (prácticamente idéntica a la Mt-trHbO) es

capaz de aliviar los efectos de NO en el microorganismo<sup>9</sup>. O sea que esta proteína es capaz de reaccionar contra NO y disminuir los efectos negativos en el organismo, pero no alcanza el grado de eficiencia que posee la Mt-trHbN.

Un tiempo después, el mismo grupo italiano mostró que la Mt-trHbO es capaz de participar en reacciones de peroxidación contra especies reactivas de oxígeno<sup>10</sup>. Hacía unos años ya que otro grupo había demostrado que la Mt-trHbO se localizaba en la membrana del organismo, asociada a los citocromos de la cadena respiratoria, participando como reservorio de oxígeno<sup>11</sup>.

Por lo tanto la pregunta entonces ahora es algo más profunda: ¿Estas proteínas realizan muchas funciones en el organismo? ¿Es correcto trazar un paralelo entre las reacciones que estas proteínas realizan *in-vitro*, y la función que finalmente cumplen en el organismo al cual pertenecen? ¿Cuál es el límite de la información que se obtiene estudiando la potencialidad de una hemoproteína frente a un determinado reactivo?

Desde las simulaciones computacionales, interesantes explicaciones atomísticas y predicciones sobre factibilidad pueden hacerse sobre estas proteínas, pero experimentos *in-vivo* deben ser realizados para ayudar en la dirección que toman este tipo de investigaciones.

### Referencias:

1. Bidon-Chanal A, Martí MA, Crespo A, et al. Ligand-induced dynamical regulation of NO conversion in *Mycobacterium tuberculosis* truncated hemoglobin-N. *Proteins*. 2006;64(2):457-464.
2. Milani M, Savard P, Ouellet H, et al. A TyrCD1/TrpG8 hydrogen bond network and a TyrB10TyrCD1 covalent link shape the heme distal site of *Mycobacterium tuberculosis* hemoglobin O. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003;100(10):5766-5771.
3. Guallar V, Lu C, Borrelli K, Egawa T, Yeh S. Ligand migration in the truncated hemoglobin-II from *Mycobacterium tuberculosis*: the role of G8 tryptophan. *J. Biol. Chem.* 2009;284(5):3106-3116.
4. Ouellet H, Milani M, LaBarre M, et al. The roles of Tyr(CD1) and Trp(G8) in *Mycobacterium tuberculosis* truncated hemoglobin O in ligand binding and on the heme distal site architecture. *Biochemistry*. 2007;46(41):11440-11450.
5. Lee AW, Karplus M. Structure-specific model of hemoglobin cooperativity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1983;80(23):7055-7059.

6. Milani M, Pesce A, Nardini M, et al. Structural bases for heme binding and diatomic ligand recognition in truncated hemoglobins. *J. Inorg. Biochem.* 2005;99(1):97-109.
7. Giangiacomo L, Ilari A, Boffi A, Morea V, Chiancone E. The truncated oxygen-avid hemoglobin from *Bacillus subtilis*: X-ray structure and ligand binding properties. *J. Biol. Chem.* 2005;280(10):9192-9202.
8. Bonamore A, Ilari A, Giangiacomo L, et al. A novel thermostable hemoglobin from the actinobacterium *Thermobifida fusca*. *FEBS J.* 2005;272(16):4189-4201.
9. Fabozzi G, Ascenzi P, Renzi SD, Visca P. Truncated hemoglobin GlbO from *Mycobacterium leprae* alleviates nitric oxide toxicity. *Microb. Pathog.* 2006;40(5):211-220.
10. Ascenzi P, De Marinis E, Coletta M, Visca P. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO scavenging by *Mycobacterium leprae* truncated hemoglobin O. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2008;373(2):197-201.
11. Pathania R, Navani NK, Rajamohan G, Dikshit KL. *Mycobacterium tuberculosis* hemoglobin HbO associates with membranes and stimulates cellular respiration of recombinant *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 2002;277(18):15293-15302.

## Capítulo 4. Estabilización de ligandos en Hemoglobinas Truncadas

### Introducción:

Este capítulo presenta resultados de la estabilidad de diferentes ligandos ( $O_2$ , CO,  $SH^-$ ,  $F^-$ ), en Hemoglobinas Truncadas. En cada caso las motivaciones y las preguntas planteadas son diferentes. Por esta razón, los resultados están subdivididos en cuatro secciones diferentes, donde cada uno posee una pequeña introducción, resultados, metodología y discusión.

En primer lugar estudiamos el comportamiento dinámico del sitio activo de la trHb de *B. subtilis* (Bs-trHbO) frente a ligandos como CO y  $O_2$ . En segundo lugar, estudiamos una proteína del tercer grupo de las Hemoglobinas Truncadas (grupo III), que además de ser la primera proteína de ese grupo cristalizada, posee un particular sitio activo, con tres residuos que pueden estabilizar a los ligandos coordinados. En este caso, realizamos cálculos clásicos y cuánticos, que pudieron relacionarse con las cinéticas de disociación de  $O_2$  llevadas a cabo por grupos colaboradores. Finalmente se estudiaron especies de sulfhídrico y el anión fluoruro coordinados a la trHb de *T. fusca* (Tf-trHbO), que pertenece a un organismo termófilo.

### Resultados:

#### **Estabilización de CO y $O_2$ en proteínas del grupo II**

*Introducción:* El microorganismo *B. subtilis* posee una trHb que pertenece al segundo grupo de esta subfamilia (Bs-trHbO). Esta proteína posee varios residuos que pueden estabilizar o desestabilizar al ligando coordinado. Estudios preliminares de Raman Resonante (RR), donde se utilizó CO como sonda coordinada al FeII mostraron dos conformaciones del sitio activo: en la primera existirían probablemente dos donores de puente de hidrógeno con el CO, y en la segunda solamente uno (Tabla 4.2). Basados en el conocimiento general que se tenía hasta ese momento del sitio activo de las Hemoglobinas Truncadas, los autores postularon que en una de las conformaciones tanto la TyrB10 como el TrpG8 serían los ligandos que interactuaban con el CO, mientras que en la segunda, sería solamente la TyrB10 quien interactuaba con el ligando<sup>1</sup>. Los autores hipotetizaban que la TyrB10 se mantenía todo el tiempo unida al CO, mientras que el TrpG8 se acercaba y se alejaba del CO, dando lugar a las dos conformaciones observadas en el Raman Resonante.

**Tabla 4.2.- Frecuencias de Raman Resonante (cm<sup>-1</sup>) para la proteína Bs-trHbO wt y Bs-trHbO mutante (TrpG8->Leu), usando CO como sonda coordinada al FeII <sup>1</sup>.**

<i>Proteína</i>	$\nu$ (FeC)	$\delta$ (FeCO)	$\nu$ (FeC)	<i>Residuo involucrado</i>
<i>Bs-trHbO CO</i>	545	589	1888	TrpG8 - TyrB10
	520		1924	TyrB10
<i>Bs-trHbO CO</i>				
<i>TrpG8-&gt;Leu</i>	524	576	1920	TyrB10
	489		1958	-----

Por otro lado, si bien era interesante determinar los residuos responsables de las dos conformaciones que predecía el RR, para nosotros resultaba aún más interesante conocer el comportamiento del sitio activo cuando una molécula de oxígeno era la que se encontraba coordinada al FeII, dado que el oxígeno es el ligando natural de estas proteínas. En este caso, la simulación resulta una herramienta fundamental, para poder realizar este tipo de estudios, ya que desde un punto de vista experimental resulta muy complicado realizar la asignación de picos en los espectros de Raman Resonante de O<sub>2</sub>.

Por último, estudiar ambos ligandos (CO, O<sub>2</sub>) con la misma proteína, permitiría comprender la diferencia entre ambos, y así aportar evidencia respecto de la efectividad que posee el CO en los estudios de Raman Resonante para *emular* el ligando natural que es el oxígeno.

*Naturaleza química de la coordinación:* Cuando el oxígeno se une al FeII del hemo en una hemoproteína, el mismo adquiere densidad de carga negativa. El hemo cede carga negativa al O<sub>2</sub> que ahora puede funcionar como aceptor de puentes de hidrógeno (pte de H). Por lo tanto, un entorno neutro o negativo desestabiliza la coordinación del oxígeno al Fe, mientras que un entorno positivo la estabiliza. El átomo de oxígeno del CO, por su parte, también recibe carga negativa, pero su carga es menor a la que recibe el O<sub>2</sub>.

Otra de las diferencias entre ambos ligandos es el ángulo formado entre el Fe y los dos átomos. El oxígeno forma un ángulo de aproximadamente 120°, mientras que el CO forma un ángulo de aproximadamente 180° (Fig. 4.3). Estas diferencias entre ambos ligandos cuando se coordinan al FeII, hacen que su entorno se comporte generalmente de manera diferente.



Figura 4.3.- Esquema de la coordinación típica entre los ligandos CO (izquierda) y el O<sub>2</sub> (derecha) en una hemoproteína, donde puede observarse el ángulo que forma el oxígeno al coordinarse.

Partiendo de la estructura cristalográfica de Bs-trHbO (PDB entry: 1ux8.pdb)<sup>2</sup> se realizaron 20ns de simulaciones de Dinámica Molecular (DM) clásica con ambos ligandos (CO y O<sub>2</sub>) alternativamente coordinados al Fe, tal como fue explicado en la Metodología General. Los sistemas mostraron ser estables durante toda la simulación (Fig. 8.1 *del Apéndice*).

Si bien se encontraron las mismas dos conformaciones que mostraba el Raman Resonante, los residuos involucrados en las conformaciones son diferentes de los postulados por los autores que caracterizaron la proteína. La TyrB10, que había sido postulada como el residuo más importante en la estabilización del CO, no mostró ser relevante en nuestras simulaciones. El TrpG8, resultó ser el crítico en esta proteína, dado que se mantiene ligado al CO durante toda la simulación. El residuo que se acerca y se aleja del CO constantemente es la GlnE11, quien tiene la capacidad de moverse para unirse a la TyrB10 generando las dos conformaciones observadas experimentalmente (Fig. 4.4 y 4.5).

Por lo tanto, la GlnE11 tiene la capacidad de permanecer unida a la TyrB10 en las dos conformaciones que presenta la proteína: cuando la TyrB10 tiene su hidrógeno del hidroxilo libre, la GlnE11 se une a ella a través de su grupo carbonilo (Fig. 4.7a), mientras que cuando la TyrB10 tiene su grupo hidroxilo comprometido con el CO, la GlnE11 se une a través del grupo amino (Fig 4.7 a). Por esta razón, la GlnE11 permanece constantemente unida al oxígeno sin importar la conformación que tome la TyrB10. Nuevamente, tal como fue observado en el Capítulo 1, la GlnE11 cumple un papel fundamental en la relación de esta proteína con los ligandos.



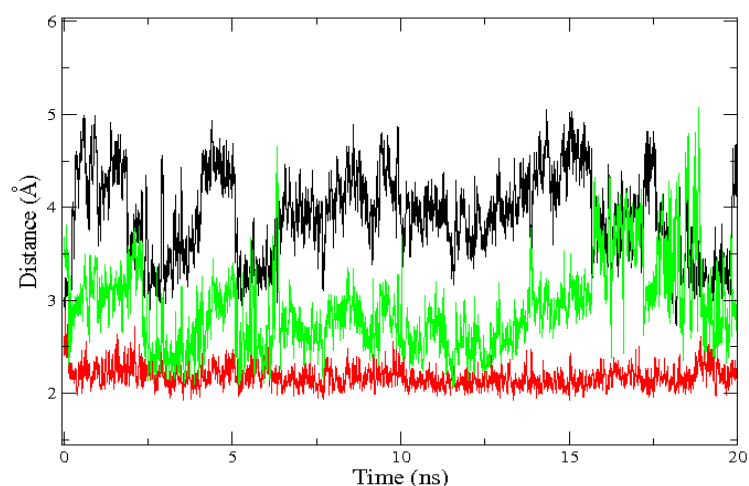


Figura 4.4 .- Distancias en función del tiempo a lo largo de la simulación de Bs-trHbO. Las distancias fueron seleccionadas entre el átomo de oxígeno del CO coordinado al FeII y los residuos del sitio distal: TyrB10 (negro), TrpG8 (rojo), GlnE11 (verde).

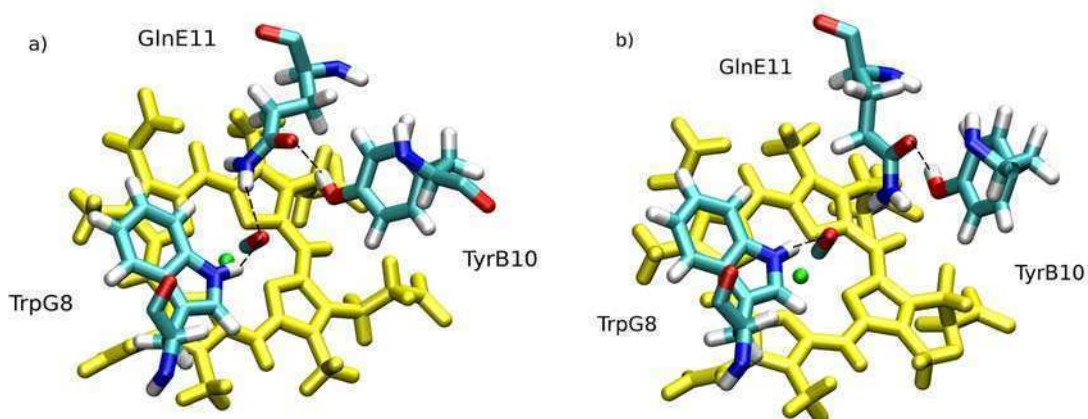


Figura 4.5 .- Estructura del sitio activo de la Bs-trHbO con CO coordinado. Se observan las dos conformaciones que adquirió el sistema a lo largo de las simulaciones. a) El TrpG8 y la GlnE11 estabilizan al CO, mientras la GlnE11 y la TyrB10 forman un enlace entre ellas. b) El TrpG8 solo estabiliza el CO.

Para completar el estudio de la red de puentes de hidrógeno que estabilizan a los ligandos coordinados, realizamos simulaciones con O<sub>2</sub> coordinado al Fe. La figura 4.6 y 4.7 muestran que el oxígeno se encuentra muy estabilizado por los residuos distales, tal como sucedía con la Mt-trHbO. Este resultado es consistente con la pequeña  $k_{off}$  que presentan estas proteínas (véase la Tabla 2 del Capítulo 1).

También se observa que los residuos que estabilizan al  $O_2$  son diferentes de los que estabilizaban al CO (Fig. 4.7). Este resultado es importante ya que aporta evidencia respecto del error que puede cometerse extrapolando resultados de un ligando al otro. Evidentemente las diferencias que poseen ambos ligandos coordinados al Fe son suficientes en este caso para que se forme una red de puentes de hidrógeno diferente en cada caso.

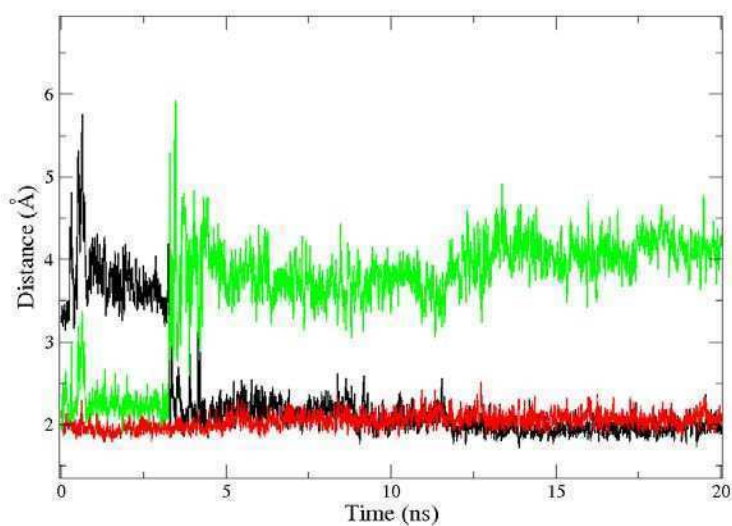


Figura 4.6 .- Distancias en función del tiempo a lo largo de la simulación de Bs-trHbO. Las distancias fueron seleccionadas entre el átomo de oxígeno externo del  $O_2$  coordinado al FeII y los residuos del sitio distal: TyrB10 (negro), TrpG8 (rojo), GlnE11 (verde).

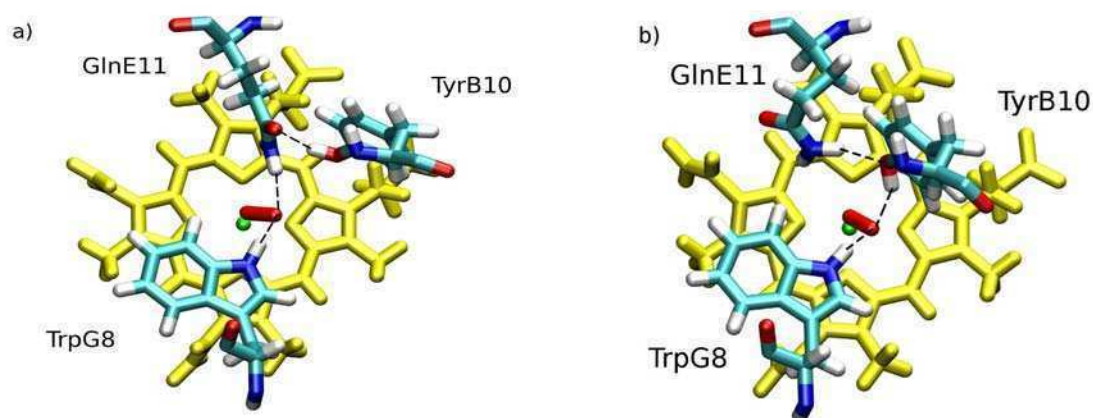


Figura 4.7 .- Estructura del sitio activo de la Bs-trHbO con oxígeno coordinado. Se observan las dos conformaciones que adquirió el sistema. a) El TrpG8 y la GlnE11 estabilizan al oxígeno. b) El TrpG8 y la TyrB10 se coordinan al oxígeno.

*Proteína mutante TrpG8->Leu:* Como ha sido mostrado en las simulaciones anteriores, el TrpG8 resulta crítico en la estabilización del O<sub>2</sub> coordinado al hemo. Para continuar estudiando dicho residuo, y su importancia en la red de puentes e hidrógeno que estabilizan al oxígeno en la Bs-TrHbO, construimos *in-silico* la proteína mutante TrpG8-Leu. Los resultados muestran que la TyrB10 establece un fuerte puente de hidrógeno con el O<sub>2</sub>, mientras que la GlnE11 se une a la TyrB10 (Fig. 4.8). Dado que este residuo contribuye fuertemente a la pequeña  $k_{off}$  que posee esta proteína, es esperable que la mutante TrpG8-Leu posea una  $k_{off}$  mayor a la wild type, por poseer menos puentes de hidrógeno estabilizando al O<sub>2</sub> (Fig. 4.8).

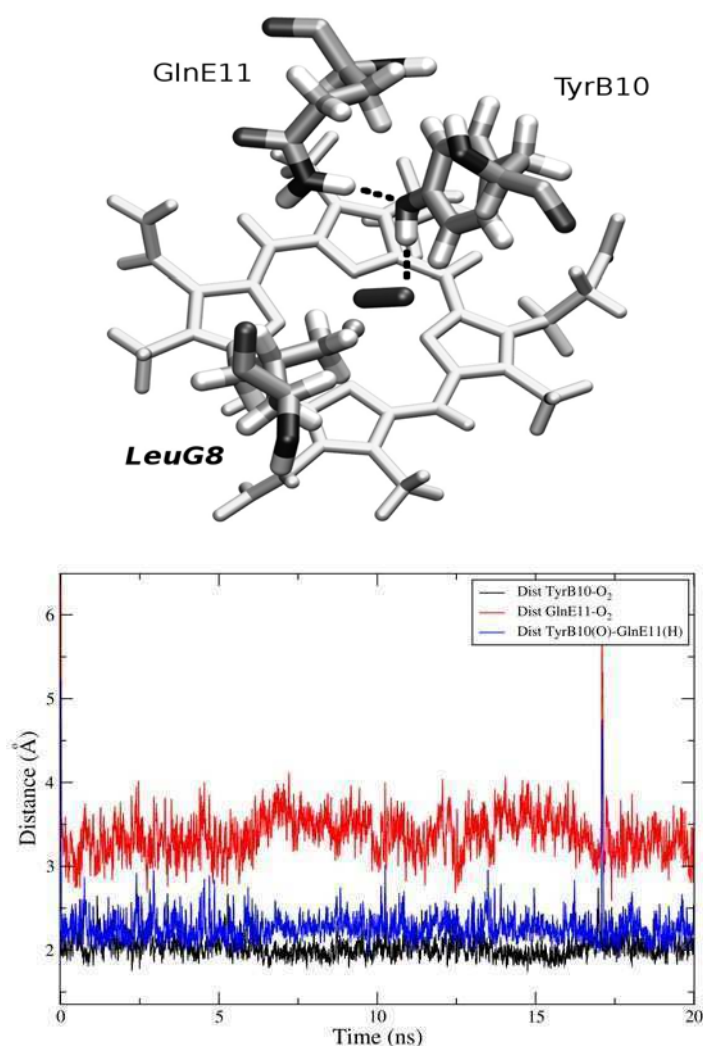


Figura 4.8 .- *Arriba:* Estructura del sitio activo de la Bs-trHbO mutante TrpG8-Leu, con oxígeno coordinado. Se observan la estabilización del oxígeno por parte de la tyrB10. Asimismo se observa que la GlnE11 permanece coordinada a la TyrB10 a través del grupo amino. *Abajo:* Distancias en función del tiempo entre el átomo de oxígeno externo del O<sub>2</sub> y los residuos del sitio distal: TyrB10 (negro), GlnE11 (rojo). En azul se grafica la distancia de puente de hidrógeno entre la GlnE11 y la TyrB10 mostradas en el esquema de la parte superior.

*Discusión:* Las simulaciones computacionales con CO como ligando encontraron las dos conformaciones detectadas con las medidas de Raman Resonante, y permitieron determinar con mayor exactitud los detalles moleculares del proceso. El TrpG8 y la GlnE11 resultaron ser los residuos implicados en las conformaciones, mostrando una vez más la importancia de ciertas posiciones críticas en esta familia de proteínas.

Por otra parte, las diferencias observadas entre ambos ligandos (O<sub>2</sub> y CO) alertan sobre la extrapolación que se realiza normalmente cuando se usa CO como sonda para *simular* O<sub>2</sub>.

Estos resultados tienen gran relevancia en la posible función de esta proteína, dado que si la GlnE11 es capaz de mantenerse unida a la TyrB10, posiblemente el Canal Largo se encuentre accesible también para un segundo ligando como el NO. Tomando en cuenta que el oxígeno se encuentra muy bien estabilizado por los ligandos del sitio activo (TrpG8, TyrB10, GlnE11), es posible que esta proteína tenga la potencialidad fisicoquímica de detoxificar NO tal como lo hace la Mt-trHbN.

Los resultados mostrados en este capítulo han sido publicados conjuntamente con el estudio de los canales del Capítulo 3.

Por otro lado, quisiera mencionar que se realizaron cálculos de CO y O<sub>2</sub> como ligandos coordinados al hemo en trHbO en una proteína perteneciente a un organismo termófilo llamado *T. fusca*. Si bien estos resultados no fueron presentados aquí, puede consultarse el artículo donde se encuentran los resultados de las simulaciones, junto con los experimentos de nuestros colaboradores:

- Droghetti E, Nicoletti FP, Bonamore A, Boechi L, Arroyo Mañez P, Estrin DA, Boffi A, Smulevich G, and Feis A. **Heme pocket structural properties of a bacterial truncated hemoglobin from *Thermobifida fusca***. *Biochemistry*. 2010. 14;49(49):10394-402

### **Dinámica del sitio activo en una trHb del grupo III**

*Introducción:* Hace algunos años se logró cristalizar una hemoglobina truncada que pertenece al organismo *C. jejuni* (Cj-trHbP) el que produce enfermedades intestinales muy importantes para el hombre<sup>3</sup>. Esta proteína es la primera proteína cristalizada del grupo III, por tal razón, el estudio de la misma podía ofrecer un panorama completo de esta sub-familia de proteínas. Sumado a esto, el

sitio activo de la Cj-trHbP presenta características muy interesantes, al poseer tres residuos capaces de formar puentes de hidrógeno con el ligando coordinado: el primero de ellos (TyrB10) típicamente estabiliza el oxígeno en hemoglobinas truncadas del grupo I, como la Mt-trHbN<sup>4</sup>; el segundo (TrpG8) estabiliza al oxígeno en proteínas del grupo II como Mt-trHbO y Bs-trHbO; y el tercero (HisE7) es el responsable de la estabilización del oxígeno en la hemoglobina, citoglobina, neuroglobina y mioglobina<sup>5-8</sup>. Por esta razón, resultaba interesante estudiar la dinámica del sitio activo de Cj-trHbP y el rol de cada residuo en la estabilización del oxígeno coordinado al FeII.

Partiendo de la estructura cristalográfica (PDB: 21G3), se realizaron simulaciones de dinámica molecular clásica de la proteína wild type, así como de diferentes proteínas mutantes, donde los tres residuos claves fueron sustituidos por residuos incapaces de formar enlaces de hidrógeno con el oxígeno. En todos los casos los sistemas fueron simulados con una molécula de oxígeno coordinada al FeII. Posteriormente se realizó un enfriamiento de las estructuras deseadas, y se realizaron cálculos QM/MM para calcular la energía de enlace Fe-O<sub>2</sub>.

Estos resultados fueron contrastados con los obtenidos por el grupo experimental de Syun-Ru Yeh del Albert Einstein College of Medicine de Nueva York, quien realizó las mediciones cinéticas de la proteína wt y de las diferentes mutantes, con el objeto de encontrar una explicación más certera de los fenómenos microscópicos que ocurren en esta proteína.

*Comportamiento de la proteína wild type:* Durante los 50 ns de simulación de DM la proteína permanece estable, es decir que el RMSD se mantiene sin demasiadas oscilaciones alrededor de 1-1,5Å. El análisis de las distancias entre los residuos potenciales de formar enlace de hidrógeno con el ligando y el oxígeno coordinado al Fe revela que la TyrB10 permanece durante todo el tiempo de simulación estabilizando al ligando, mientras que los otros dos residuos se alternan para coordinar al oxígeno uno a la vez. Llamaremos Conf. 1 a la estructura donde la TyrB10 y el TrpG8 se coordinan al O<sub>2</sub>, y Conf. 2 cuando la TyrB10 y la HisE7 se coordinan al O<sub>2</sub> (Fig. 4.9).

Es importante aclarar que en el tiempo de simulación realizado de 50ns, donde estas configuraciones se interconvierten 2 o 3 veces como máximo, no es posible obtener información acerca de la probabilidad de cada una de las conformaciones. Es decir, que no podemos decir nada acerca de cuál de las dos conformaciones encontradas es más probable.

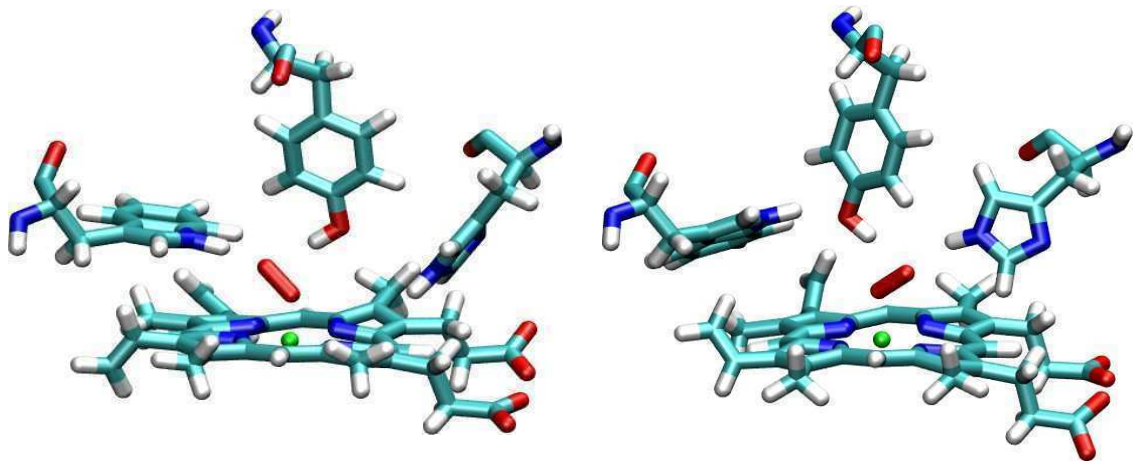


Figura 4.9 .- Estructura del sitio activo de la Cj-trHbP con oxígeno coordinado. Se observan las dos conformaciones que adquirió el sistema a lo largo de las simulaciones. Izquierda: el TrpG8 y la TyrB10 estabilizan al oxígeno (Conf. 1). Derecha: la HisE7 y la TyrB10 estabilizan al oxígeno (Conf. 2).

*Proteínas mutantes:*

Mutante HisE7->Leu: En esta proteína mutante se observa que los residuos TyrB10 y TrpG8 estabilizan al ligando coordinado. Esta estructura es igual a la Conf. 1 que presentaba la proteína wt, mientras que la Conf. 2 no se encuentra en esta proteína mutante por razones obvias (véase Fig. 4.7). Este resultado que parece trivial, deja entrever la estabilidad que poseen estas proteínas a mutaciones puntuales del sitio activo, durante el tiempo en que se desarrollaron las simulaciones (Fig. 4.10).

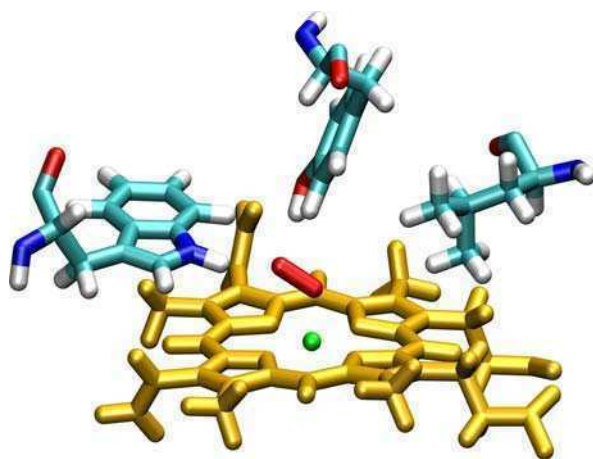


Figura 4.10.- Estructura del sitio activo de la Cj-trHbP HisE7->Phe con oxígeno coordinado. El TrpG8 y la TyrB10 estabilizan al oxígeno.



Mutante TyrB10->Phe: Los resultados muestran que el TrpG8 permanece estabilizando al ligando, y en menor medida la HisE7 (Fig. 4.11). Por lo tanto, aún realizando mutaciones sobre un residuo importante como parecía ser la TyrB10, el ligando continúa siendo estabilizado por residuos del sitio activo. Se observa, por lo tanto, cierta redundancia entre los residuos que estabilizan al ligando coordinado.

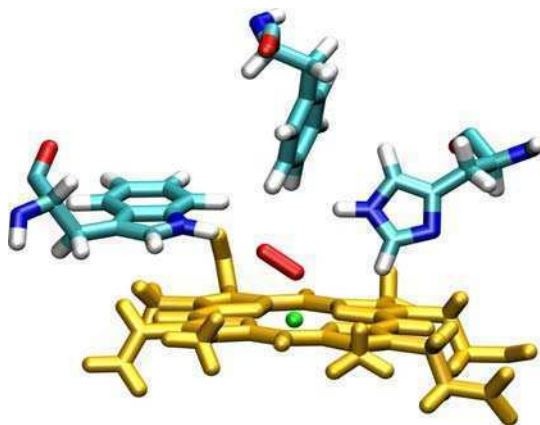


Figura 4.11 .- Estructura del sitio activo de la Cj-trHbP TyrB10->Phe con oxígeno coordinado. Se observa el TrpG8 y la HisE7 estabilizando al O<sub>2</sub>.

Mutante TrpG8->Phe: Aquí se observan dos conformaciones muy interesantes. En la primera (Fig. 4.12 izquierda) la TyrB10 y la HisE7 se encuentran interaccionando con el oxígeno coordinado. En la segunda conformación (Fig. 4.12 derecha) el hidrógeno hidroxílico de la TyrB10 forma un enlace de hidrógeno con el Nδ del imidazol de la HisE7, y liberan al oxígeno. Dependiendo de la proporción de esta última conformación, esta proteína mutante podrá tener un incremento en su  $k_{off}$  debido a la contribución de esta conformación donde el oxígeno no está siendo estabilizado.

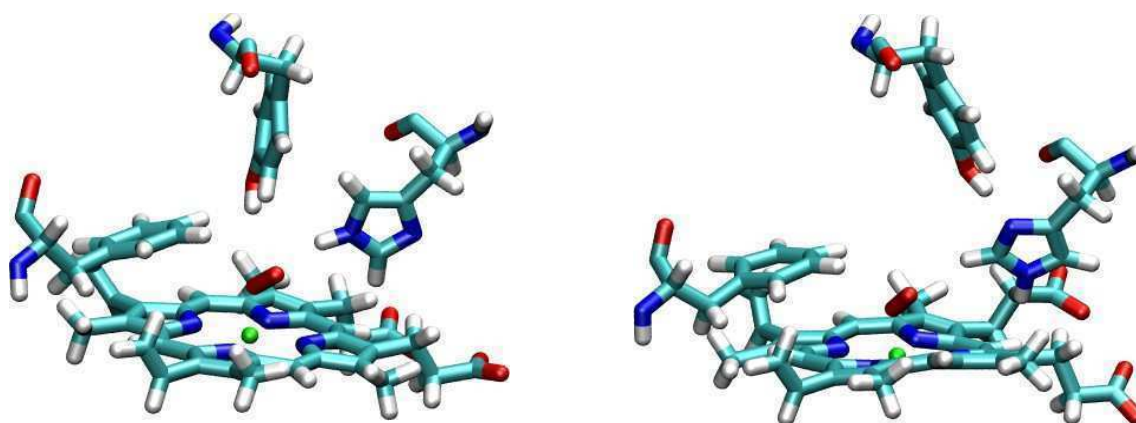


Figura 4.12.- Sitio activo de la Cj-trHbP TrpG8->Phe oxigenada. Se observan las dos conformaciones que adquirió el sistema a lo largo de las simulaciones, donde la TyrB10 y la HisE7 estabilizan al oxígeno (*izquierda*) o interaccionan entre ellos liberándose del oxígeno (*derecha*).

De todas formas, durante el tiempo de simulación empleado, la proteína visitó ambas conformaciones solamente una sola vez. Si bien esto es un indicio de que ambas conformaciones podrían existir, no es suficiente para aseverar que ambas conformaciones son un mínimo de energía de la proteína. Por otro lado, conocer la diferencia de energía ( $\Delta G$ ) entre las dos conformaciones resulta crucial para poder interpretar los resultados experimentales que presenta esta proteína mutante (véase discusión)

Realizamos un perfil de energía libre de esta transición utilizando el método de Umbrella Sampling. En este caso, se utilizó como coordenada de reacción la distancia entre el hidrógeno fenólico de la TyrB10 y el N $\delta$  de la HisE7 (véase la formación y ruptura de este enlace en las dos conformaciones de la Fig. 4.12). Se realizaron ventanas cada 0,1 Å y se utilizó una constante de 40 kcal/molÅ<sup>2</sup>.

Los resultados muestran claramente que las dos conformaciones postuladas corresponden a mínimos de energía para la proteína (Fig. 4.13), y que los mismos se encuentran separados por una barrera de ~4 kcal/mol. Cabe aclarar que dicha barrera podría estar sobreestimada por la dificultad de realizar este tipo de cálculos, en un sistema que necesita un gran reordenamiento para pasar de una conformación a la otra.

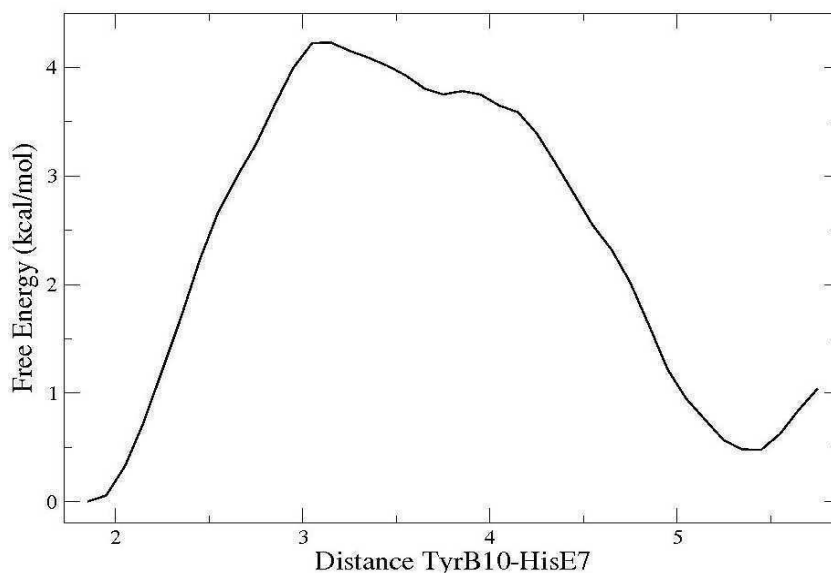


Figura 4.13.- Perfil de energía libre de la interconversión entre las dos conformaciones que presenta la proteína mutante Cj-trHbP TrpG8->Phe. La coordenada de reacción corresponde a la distancia entre el hidrógeno fenólico de la TyrB10 y el N $\delta$  de la HisE7.



*Cálculos cuánticos de la interacción proteína-oxígeno:* Se realizaron cálculos QM/MM tal como fue explicado en la Metodología General. En la tabla 4.3 se muestran los resultados para la proteína wild type y para diferentes proteínas mutantes. Se denominó Conf. 1 y Conf. 2 a conformaciones que fueron encontradas durante la dinámica clásica.

**Tabla 4.3.- Energías de enlace obtenidas a partir de simulaciones QM/MM para la Cj-trHbP wild type y para diferentes mutantes simples (TrpG8-Phe, TyrB10-Phe, HisE7-Leu), y una doble mutante TyrB10->Phe/HisE7->Leu (DobleMut). Se observa la energía de binding ( $\Delta E_{O_2}$ ), parámetros geométricos optimizados, las poblaciones de Mulliken correspondientes al átomo de oxígeno de la molécula de oxígeno coordinada ( $q_{O_2}$ ), y las constantes de disociación  $k_{off}$  medidas por el grupo de Syun-Ru Yeh.**

Proteína	wild type		TrpG8->Phe		TyrB10-Phe	HisE7-Leu	DobleMut
	Cf1	Cf2	Cf1	Cf2	Cf1	Cf1	Cf1
$\Delta E_{O_2}$ (kcal/mol)	34,9	31,9	38,2	27,1	30,5	36,1	30,4
Dist Fe-O(Å)	1,85	1,78	1,78	1,77	1,77	1,77	1,78
Dist O-O(Å)	1,31	1,30	1,31	1,29	1,30	1,31	1,30
Ang Fe-O-O(°)	122	124	123	122	122	122	122
$q_{O_2}$	-0,403	-0,337	-0,388	-0,263	-0,297	-0,367	-0,302
$k_{off}$ (s <sup>-1</sup> )	0,0041		0,0330		0,0088	0,0003	0,0028

La proteína wild type presenta un valor muy pequeño de  $k_{off}$ , que implica una gran estabilización por parte de los residuos distales, tal como fue observado para el caso Bs-trHbO en la sección precedente.

*Discusión:* Los resultados de nuestras simulaciones mostraron comportamientos muy interesantes. El primero corresponde a la proteína mutante HisE7->Leu, donde el sistema perdió un potencial donador de puente de hidrógeno, y sin embargo el oxígeno se encuentra más estabilizado (presenta una  $k_{off}$  aún más pequeña que la proteína wild type). Los resultados de los cálculos QM/MM y las simulaciones ofrecen una explicación a esta aparente contradicción. La proteína wild type posee dos conformaciones (Fig. 4.9) donde la primera de ellas (Conf. 1) es la que presenta mayor energía de enlace. Al reemplazar la HisE7 por Leu desaparece la segunda conformación (Conf. 2) que involucraba a dicho residuo (Fig. 4.10), llevando al sistema general a una menor  $k_{off}O_2$ . Es decir, que

la proteína wt posee la HisE7 que es la responsable de una segunda conformación que desestabiliza ligeramente la interacción entre el Fe y el oxígeno.

Cuando reemplazamos la TyrB10 por Phe, aparece una nueva conformación donde el TrpG8 y la HisE7 (en menor medida) establecen enlaces de hidrógeno con el O<sub>2</sub> coordinado (Fig. 4.11). En este caso, la energía de unión FeII-O<sub>2</sub> resultó ser menor que las conformaciones que presenta la wild type, consistente con un aumento en la  $k_{off}$ . Sin embargo, la diferencia entre los valores de energía de unión y de  $k_{off}$  son muy pequeños como para confirmar esta hipótesis.

El caso de la mutante TrpG8->Phe resulta muy interesante desde el punto de vista de los límites de nuestras simulaciones. Esta proteína mutante presenta un valor de  $k_{off}$  mayor que la proteína wild type (Tabla 1), consistente con los resultados que ofrecieron las demás proteínas mutantes estudiadas del grupo II (Mt-trHbO, Bs-trHbO). Sin embargo, desde el punto de vista de las simulaciones, esto merece una consideración especial. Dicha proteína presenta dos conformaciones: una con dos enlaces de hidrógeno con el oxígeno, cuya energía de enlace FeII-O<sub>2</sub> ( $\Delta E_{O_2}=38,2$ ) es mayor a la que presenta la proteína wild type, y una segunda conformación donde ningún residuo establece enlaces de hidrógeno con el oxígeno coordinado, y consecuentemente presenta una energía de enlace muy baja ( $\Delta E_{O_2}=27,1$ ) (Fig. 4.12). El perfil de energía libre de esta conversión (Fig. 4.13) muestra que ambas configuraciones son probables, pero poco puede decirse acerca de la proporción de cada una de las configuraciones, ya que el error del método se encuentra cercano al  $\Delta G$  entre ambas configuraciones. Por lo tanto, hubiera resultado imposible con estos resultados poder pronosticar los valores de la  $k_{off}$  de esta proteína mutante, porque depende de la proporción de cada configuración. Aún realizando simulaciones más largas (100-200ns) resulta difícil estimar un valor preciso de proporciones de ambas configuraciones y además del campo de fuerzas utilizado. Recuérdese que un  $\Delta G$  de  $\sim 0,5 - 1$  kcal/mol entre ambos estados corresponde a 10 o 20 veces más de una configuración que de otra, y esto podría ser suficiente para explicar el peso que tiene una u otra configuración en la  $k_{off}$  global.

Claro que observando el valor de la  $k_{off}O_2$  medido en esta proteína mutante, resulta sencillo imaginar que la configuración sin enlaces de hidrógeno (Cf1) se encontrará en mayor proporción que la Cf2, dado que una proteína con un valor de  $k_{off}$  mayor que la wild type, debe presentar necesariamente configuraciones que estabilicen menos al oxígeno coordinado. Pero resulta de gran importancia conocer los límites predictivos que presenta este tipo de simulaciones computacionales.

Por otro lado, las distancias Fe-O ( $\sim 1,3\text{\AA}$ ) y O-O ( $\sim 1,8\text{\AA}$ ), así como el ángulo Fe-O-O ( $\sim 120^\circ$ ) son prácticamente idénticas en las diferentes conformaciones (Tabla 4.3). Es decir que el

entorno de la proteína no modifica las distancias y ángulos del oxígeno coordinado al FeII. Este resultado avala el uso de simulaciones clásicas (donde las distancias y ángulos permanecen casi inalteradas) para estudios de la dinámica del sitio activo de hemoproteínas.

Por su parte, la carga en el átomo de O más lejano al hemo, se modificó acorde a la energía de binding Fe-O<sub>2</sub>: a mayor valor (absoluto) de carga, mayor energía de enlace. Este resultado es esperable, dado que tanto la carga del oxígeno como los valores de energía de enlace dependen fuertemente de la interacción con el entorno (en este caso, donores de puente de hidrógeno). Si bien la carga calculada fue diferente (desde aproximadamente -0,3 hasta -0,4) en los diferentes sistemas estudiados (Tabla 4.3), consideramos válido utilizar simulaciones clásicas para estudiar el sitio activo de hemoproteínas (*véase el Apéndice para más información acerca de las cargas utilizadas en las simulaciones clásicas*).

Estos resultados experimentales y teóricos están siendo sujetos a revisión en la revista *Biochemistry*:

- Arroyo Mañez P, Lu C, Boechi L, Martí MA, Shepherd M, Wilson JL, Poole RK, Luque FJ, Yeh SR, and Darío A. *Estrin*. **Role of the Distal Hydrogen-Bonding Network in Ligand Binding in Campylobacter jejuni truncated hemoglobin III.**

## **Especies de sulfhídrico en Hemoglobinas Truncadas**

*Introducción:* El ácido sulfhídrico es una molécula producida de forma endógena en los tejidos de los mamíferos. Tal como sucede con el óxido nítrico (NO) y el monóxido de carbono (CO), el sulfhídrico participa en procesos de señalización, modulando las funciones biológicas en el sistema cardiovascular y nervioso. Ratones transgénicos deficientes de la enzima que sintetiza sulfhídrico en mamíferos (Cistationina gama-liasa) nacen con hipertensión y reducida vasorrelajación<sup>10,11</sup>. Elevadas concentraciones de este transmisor resultan tóxicas, dado que actúan inhibiendo la citocromo c oxidasa de la cadena respiratoria<sup>12</sup>. Desde un punto de vista químico, este transmisor posee los siguientes valores de pKa: pKa1=7,0 y pKa2 ~17, por tal razón, las especies H<sub>2</sub>S y HS<sup>-</sup> son las especies mayormente presentes en condiciones fisiológicas normales.

Si bien la mayor parte de las hemoproteínas, como la mioglobina, no presentan una elevada afinidad por especies de sulfhídrico, se encontró que la globina de *Lucina pectinata* presentaba una elevada afinidad por este compuesto. Muchos estudios se han realizado sobre esta globina debido a

su capacidad para coordinar especies de sulfhídrico<sup>13-15</sup>. Se ha postulado que un sitio activo hidrofóbico es el responsable de la alta afinidad que estas especies tenían por las especies de sulfhídrico, pero la explicación molecular de este fenómeno era desconocida. No se conocía la especie (SH<sub>2</sub>, SH<sup>-</sup>, S<sup>2-</sup>) que más favorablemente migraba desde el solvente hasta el sitio activo, así como tampoco se conocía la especie que mayormente se encontraba coordinada al FeIII.

Resultaba muy interesante para nosotros comprender los determinantes moleculares responsables de la afinidad por especies de sulfhídrico en esta proteína, empezando, por supuesto por lo que sucedía en las Hemoglobinas Truncadas que es un sistema ampliamente estudiado en nuestro grupo.

Sucedió entonces algo asombroso. Un grupo de la Universidad de Florencia dirigido por Giullietta Smulevich, envió un artículo a la revista *Biochemistry* con algunos resultados de reactividad de sulfhídrico con una trHb perteneciente a *T. fusca* (Tf-trHbO). Uno de los revisores (reviewers) respondió que el artículo *necesitaba* de simulaciones computacionales para poder sacar conclusiones de respecto de conformaciones del sitio activo, como cito a continuación:

*“...Molecular dynamics simulations should also be applied to both truncated hemoglobins to further prove the proposed hydrogen bonding hypothesis for H<sub>2</sub>S stabilization. For example, estimated distances from the residues and the bound H<sub>2</sub>S will indeed strengthen the argument.”*

La misma revista que generalmente tiende a rechazar artículos que *solo* cuentan con simulaciones, exigía ahora simulaciones computacionales para corroborar las hipótesis de los grupos experimentales. Nos lanzamos por lo tanto, a estudiar la dinámica del sitio activo de esta trHb en particular (Tf-trHbO) cuando se coordina la especie de sulfhídrico que creíamos más relevante: SH<sup>-</sup>.

Tal como fue explicado en Metodología General, para poder realizar simulaciones de dinámica molecular de SH<sup>-</sup> coordinada al FeIII del hemo, es necesario construir parámetros apropiados. Por lo tanto realizamos cálculos cuánticos con “sistemas modelos” utilizando diferentes especies de sulfhídrico al FeIII. Dicho *sistema modelo* consistía en el grupo hemo, la His proximal, y la especie de sulfhídrico de interés coordinada al FeIII.

Se realizaron posteriormente simulaciones partiendo de la estructura cristalográfica de Tf-trHbO (pdbId: 2BMM), con la especie de sulfhídrico involucrada coordinadas al metal, para

estudiar la estructura del sitio activo. La simulación resultó ser estable como lo indica el análisis de desviación cuadrática media (Fig. 8.2 del Apéndice).

*Estabilización de la especie SH<sup>-</sup>*: Los resultados mostraron que la especie de sulfhídrico forma un estable puente de hidrógeno con uno de los residuos del sitio activo (TrpG8), quien parece ser el responsable de la estabilización de este ligando (Fig. 4.14). Es interesante notar, que dicho residuo también es el responsable de estabilizar al O<sub>2</sub> en este grupo de trHbs, como fue previamente mostrado en el Capítulo 3.

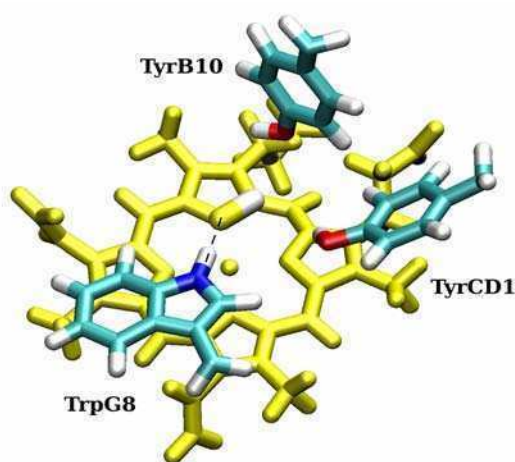


Figura 4.14.- Sitio activo de Tf-trHbO donde se destaca el TrpG8 estabilizando al SH<sup>-</sup> coordinado al grupo Hemo.

Los resultados obtenidos por simulaciones computacionales, acerca de la importancia del TrpG8 en la estabilización del SH<sup>-</sup> coordinado, pueden ser puestos a prueba al compararlos con la constante cinética de disociación ( $k_{off}$ ).

La Tabla 4.4 resume las constantes cinéticas de estas proteínas nativas y de diferentes mutantes. Puede observarse que la constante de disociación ( $k_{off}$ ) es muy baja para ambas proteínas en su estado nativo (Bs-Mt-trHbO-wt y Tf-trHbO-wt) <sup>16</sup>. También puede observarse que solamente cuando el TrpG8 es mutado por Phe, la  $k_{off}$  aumenta notablemente (Tf-TrpG8-F). La proteína mutante donde los tres residuos polares (TyrB10, TyrCD1 y TrpG8) son modificados por fenilalaninas (Tf-TripleMut) presenta prácticamente el mismo resultados presentado por la mutante Tf-TrpG8->Phe, evidenciando que el residuo fundamental en la estabilización del SH<sup>-</sup> es el TrpG8.

**Tabla 4.4.- Datos de constantes cinéticas de Hemoglobinas Truncadas nativas y diferentes mutantes con especies de sulfhídrico. Los datos fueron obtenidos por grupos colaboradores dirigidos por el Prof. Alberto Boffi y la Prof. Giulietta Smulevich.**

	$k_{off} O_2 (s^{-1})$
Bs-trHbO-wt	0,0026
Tf-trHbO-wt	0,0018
Tf-TyrCD1->Phe	0,0011
Tf-TyrB10->Phe	0,0012
Tf-TrpG8->Phe	0,36
Tf-TripleMut	0,22

Por lo tanto el TrpG8 parece ser el principal responsable de la constante de la baja asociación ( $k_{off}$ ) que presenta esta proteína en su estado nativo, tal como había sido postulado por nuestras simulaciones computacionales.

Este resultado experimental, además de demostrar fehacientemente la importancia del TrpG8 en la estabilización de especies de sulfhídrico, sirve como una importante validación de las simulaciones realizadas por nuestro grupo.

Por otro lado, los resultados en su conjunto aportan nueva evidencia respecto a cuál es la especie que se coordina al FeIII en estas hemoproteínas. Dado que un residuo polar (donor de puente de hidrógeno) como el TrpG8, es el principal responsable del cambio en la constante de disociación  $k_{off}$  entre la proteína y el ligando.

*Discusión:* Las simulaciones computacionales mostraron que el TrpG8 es el único residuo que forma enlaces de hidrógeno con el SH<sup>-</sup> coordinado al FeIII. La carga negativa que posee el átomo de azufre coordinado es responsable en gran medida de que esto suceda. Los resultados experimentales de las mutantes individuales confirmaron las predicciones de las simulaciones, avalando una vez más los modelos utilizados en estas simulaciones.

Respecto de la especie de sulfhídrico que se coordina (SH<sub>2</sub>, SH<sup>-</sup>, S<sup>2-</sup>), existe aún un amplio debate. Teniendo en cuenta que el pKa del sulfhídrico en agua es pKa=7, es esperable que la especie de SH<sub>2</sub> no sea relevante cuando el sulfhídrico se coordina al FeIII, debido al aumento de acidez de la especie de sulfhídrico coordinada. Los resultados muestran que el TrpG8 (quien solo puede participar como donador de puente de hidrógeno), es responsable de la estabilización de la especie coordinada que deberá ser negativa para formar enlaces de hidrógeno. Por su parte, nuestros

cálculos con *sistemas modelos* muestran que cuando la especie  $\text{SH}_2$  se coordina al FeIII, el átomo de azufre resulta prácticamente neutro, mientras que cuando se coordina  $\text{SH}^-$ , el S posee una carga negativa. Por lo tanto, poseemos evidencia para suponer que no es  $\text{SH}_2$  la especie que se encuentra mayormente coordinada al FeIII.

Sin embargo poco puede decirse sobre la diferencia entre  $\text{SH}^-$  y  $\text{S}^{2-}$ , dado que ambas especies poseen cargas similares para el átomo de azufre, y resulta difícil afirmar que una o la otra especie es más relevante en este caso. Más estudios, tanto experimentales como teóricos deben realizarse para poder determinar fehacientemente la especie de sulfhídrico que mayoritariamente se coordina al FeIII.

Por otro lado, nos resulta particularmente interesante conocer cuál es la especie que migra desde el solvente hasta el sitio activo en estas proteínas. Quizás existan diferentes canales para cada especie, dado que electrostáticamente son muy diferentes unas de otras. De hecho, si esta especie es diferente a la que se encuentra coordinada, será interesante conocer el mecanismo por el cual pierde o gana protones al coordinarse. En este caso, podemos especular que la presencia de aguas internas resultará crucial en este mecanismo.

Los resultados teóricos y experimentales presentados, fueron publicados conjuntamente en el siguiente artículo:

- Nicoletti FP, Comandini A, Bonamore A, Boechi L, Boubeta FM, Feis A, Smulevich G, and Boffi A. **Sulfide Binding Properties of Truncated Hemoglobins.** *Biochemistry* 2010, 49, 2269–2278  
2269

## **Fluoruro como sonda para estudiar el sitio activo en hemoproteínas**

*Introducción:* Estudiar los procesos dinámicos que ocurren en el sitio activo de las proteínas resulta crucial para comprender en detalle los mecanismos que operan en los mismos. La cristalografía de proteínas provee información atómica estructural muy importante, pero no permite realizar inferencias claras sobre los procesos dinámicos. La cristalografía resuelta en el tiempo ha mostrado resultados prometedores, pero aún se encuentra en etapa de desarrollo<sup>17</sup>. La Espectroscopía Raman Resonante permite estudiar el sitio activo de la proteína utilizando típicamente CO como sonda. De todas formas, el CO no es el ligando natural de estas hemoproteínas, por tal razón, los resultados que se obtienen para esta molécula no necesariamente son extrapolables al ligando natural que es el

oxígeno. De hecho, en la sección anterior se mostró que existen diferencias entre la dinámica del sitio activo cuando el CO o el O<sub>2</sub> se encuentran coordinados al hemo.

Se ha mostrado que la longitud de onda de la transición de transferencia de carga (charge transfer transition) de la porfirina al metal (CT1), que se observa en el espectro UV-Visible de hemoproteínas con F<sup>-</sup> coordinado, es sensible a cambios en los residuos distales de la proteína<sup>18</sup>. Por otro lado, la frecuencia del modo de estiramiento Fe-F<sup>-</sup> puede proveer evidencia directa acerca de los puentes de hidrógeno que estabilizan al anión coordinado. Por lo tanto, es posible correlacionar estos valores experimentales con los residuos donores de puente de hidrógeno que se encuentran estabilizando al F<sup>-</sup> coordinado al FeIII. En colaboración con grupos experimentales que poseen amplia experiencia en técnicas espectroscópicas, se estudió el ion fluoruro como una posible sonda adicional al CO. Esta nueva sonda debería ser capaz de reproducir la dinámica del sitio activo del O<sub>2</sub> más fielmente de lo que lo hace el CO hasta el momento.

Se realizaron simulaciones computacionales utilizando fluoruro como sonda en la trHbO de *T. fusca*, mientras nuestros colaboradores realizaron las medidas espectroscópicas correspondientes. El sistema de estudio fue la trHb de *T. fusca*, debido al amplio conocimiento que ambos grupos poseemos sobre estos sistemas. Se estudió la proteína wild type junto con diferentes proteínas mutantes.

Tal como fue explicado en Metodología General, en algunas ocasiones es necesario construir nuevos parámetros para los cálculos de Dinámica Molecular Clásica. Por lo tanto realizamos cálculos cuánticos con *sistemas modelos* utilizando un fluoruro, el grupo hemo con FeIII, y la histidina proximal. Luego de la obtención de los parámetros, y utilizando la estructura cristalográfica de Tf-trHbO (pdbId: 2BMM.pdb), se realizaron simulaciones de Dinámica Molecular (DM) clásica con el fluoruro coordinado al FeIII. Luego de la correspondiente termalización y equilibración del sistema se realizaron 30ns de dinámica molecular clásica tal como ha sido explicado en la Metodología General. Se realizaron simulaciones de la proteína wt, así como de diferentes mutantes de residuos del sitio activo: TyrB10->Phe, TrpG8->Phe, y la doble mutante TrpG8->Phe / TyrCD1->Phe. Cada mutante fue diseñada especialmente para intentar comprender, de forma global el comportamiento del sitio activo frente a estos cambios. Todos los sistemas resultaron estables en el tiempo de simulación empleado (Fig. 8.4 *del Apéndice*)



*Estabilización de fluoruro:* se realizaron cálculos de mecánica cuántica con sistemas modelos (HisF8-Hem(FeIII)-F), para comprender las propiedades químicas de la coordinación. Encontramos que el fluoruro coordinado se encuentra cargado negativamente, por tal razón, se espera que residuos donores de puente de hidrógeno se ligen a él, tal como sucede con otros ligandos en estas proteínas. La distancia de equilibrio entre el fluoruro y el FeIII resultó ser alrededor de 1,8 Å.

Como fue explicado anteriormente, observando la carga del fluoruro que se encuentra coordinado al FeIII, la dinámica molecular mostró que dos residuos donores de puente de hidrógeno (TrpG8 y TyrCD1) se unen al fluoruro durante los 30ns de simulación realizados. Por otro lado, el tercer residuo que potencialmente podría coordinarse al F (TyrB10) permanece alejado del mismo (Fig. 4.15). Los mismos resultados fueron observados al realizar la mutante TyrB10->Phe (Fig. 4.16), evidenciando el rol menor de la TyrB10 en la estabilización del fluoruro coordinado al FeIII.

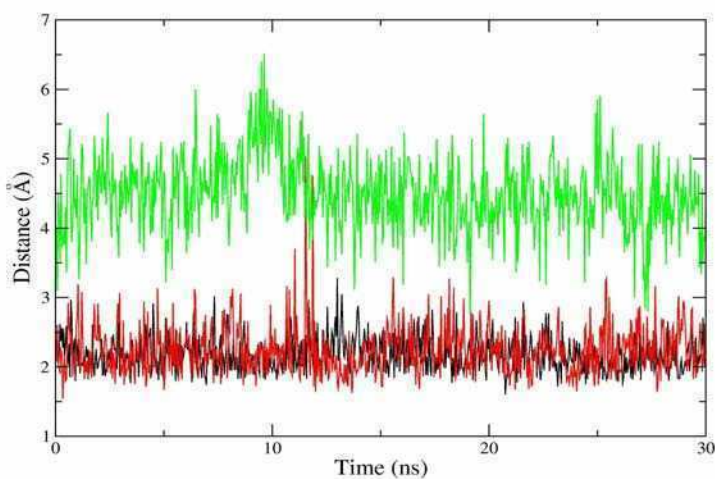


Figura 4.15.- Distancias de puente de hidrógenos en función del tiempo de la simulación para Tf-trHbO wt. Las distancias seleccionadas fueron definidas entre el F<sup>-</sup> coordinado al hemo, y residuos del entorno distal: el Nε del indol del TrpG8 (negro), el hidrógeno hidroxílico de la TyrCD1(rojo), y el hidrógeno hidroxílico de la TyrB10 (verde).

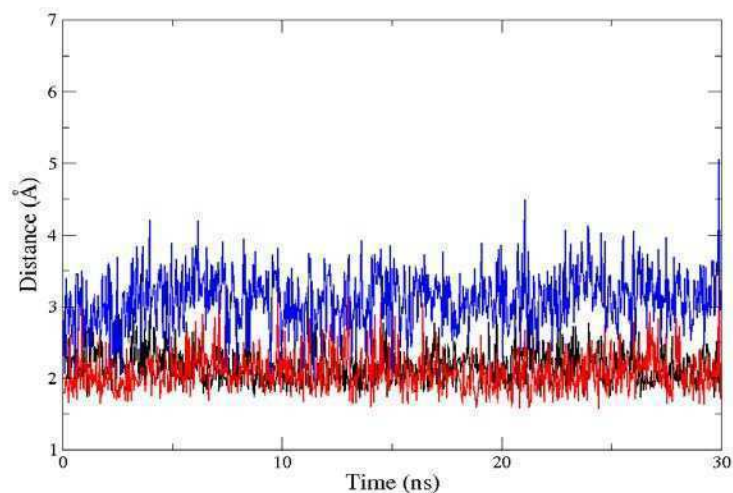


Figura 4.16.- Distancias de puente de hidrógenos en función del tiempo de la simulación para Tf-trHbO YB10->F. Las distancias seleccionadas fueron definidas entre el F<sup>-</sup> coordinado al hemo, y residuos del entorno distal: el Nε del indol del TrpG8 (negro), el hidrógeno hidroxílico de la TyrCD1(rojo), y el Nε del indol del TrpG8 con el oxígeno hidroxílico de la TyrCD1 (azul).

Cuando se realizó la mutante TrpG8 -> Phe, se observaron resultados similares: la TyrCD1 se liga al fluoruro, mientras que la TyrB10 no puede formar un estrecho puente de hidrógeno (Fig. 4.17). Por su parte, la TyrB10 puede coordinarse al fluoruro, únicamente cuando TrpG8 y TyrCD1 se mutan por fenilalaninas, en una proteína doble mutante (TrpG8->Phe / TyrCD1->Phe) (Fig. 4.18).

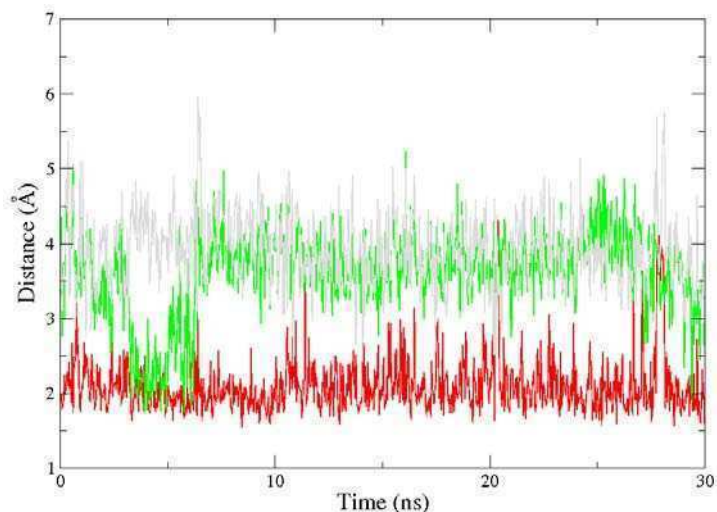


Figura 4.17.- Distancias de puente de hidrógenos en función del tiempo de la simulación para Tf-trHbO WG8->F. Las distancias seleccionadas fueron definidas entre el F<sup>-</sup> coordinado al hemo, y residuos del entorno distal: el hidrógeno hidroxílico de la TyrCD1(rojo), el hidrógeno hidroxílico de la TyrB10 (verde) y el hidrógeno hidroxílico de la TyrCD1 con el oxígeno hidroxílico de la TyrB10 (gris).

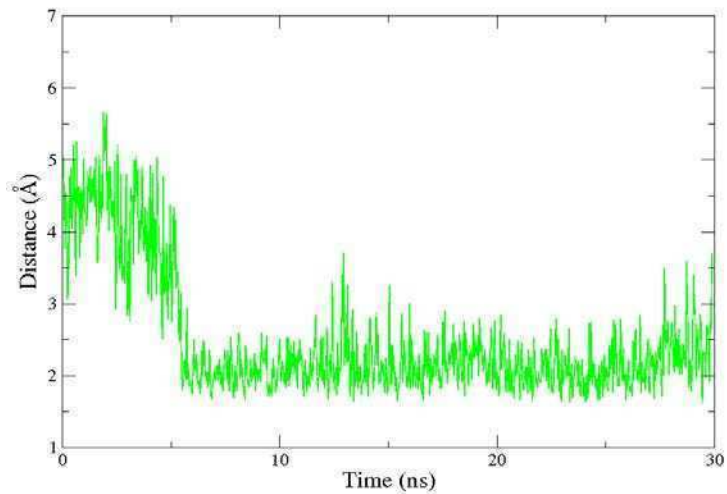
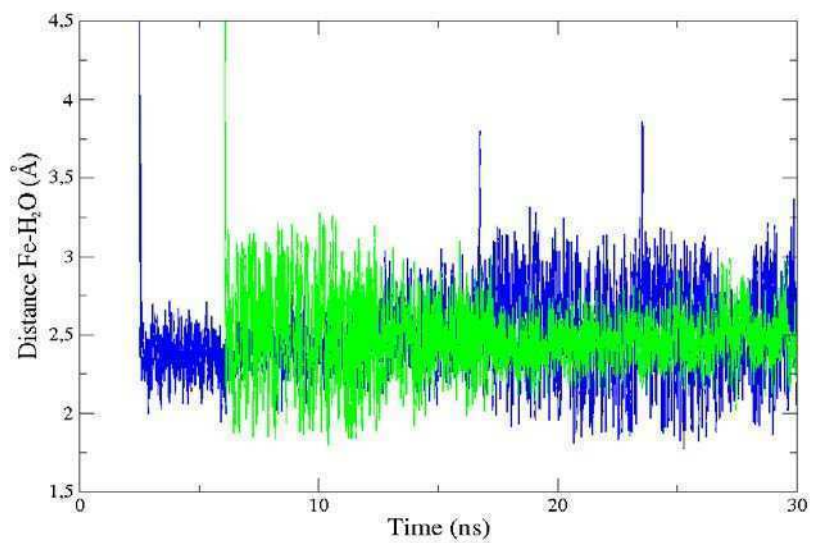
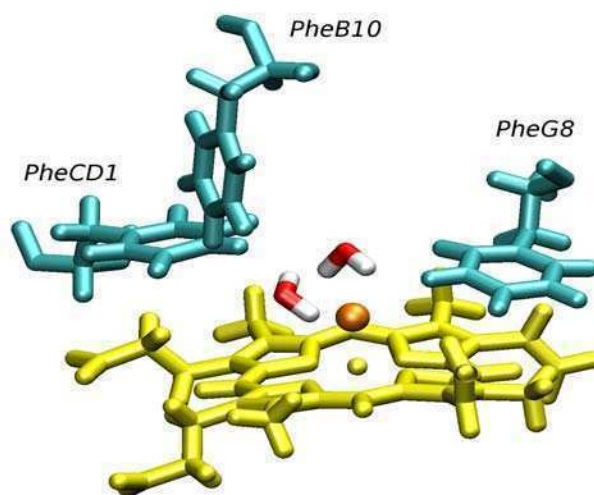


Figura 4.18.- Distancia de puente de hidrógeno en función del tiempo de la simulación para TrpG8->Phe/TyrCD1->Phe Tf-trHbOWT. La distancia seleccionada fue entre el  $F^-$  coordinado al FeIII y el hidrógeno hidroxílico de la TyrB10.



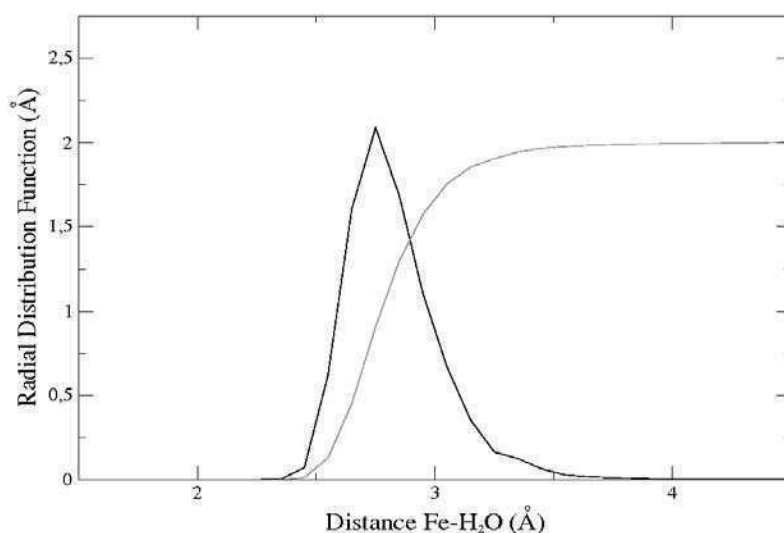


Figura 4.19.- Triple Mutante Tf-trHbO (TrpG8->Phe/TyrCD1->Phe/TyrB10->Phe). *Arriba:* Representación esquemática del sitio activo luego de 30ns de sinámica molecular clásica. Se observa el grupo hemo (amarillo) con el F<sup>-</sup> (naranja), los residuos distales (cyan) y las dos moléculas de agua internas. *Medio:* Distancias de puente de hidrógenos entre el átomo de oxígeno de las dos moléculas de agua observadas en las simulaciones y el F<sup>-</sup> coordinado al Fe. *Abajo:* Función de distribución radial para el átomo de oxígeno de las moléculas de H<sub>2</sub>O, centrado en el F<sup>-</sup> (negro). Para el cálculo fueron utilizados los últimos 20ns de dinámica molecular, para permitir que las aguas se estabilicen. La integral (gris) de la función se muestra como una forma de cuantificar la cantidad de moléculas de agua en promedio que se encuentran cercanas al anión F<sup>-</sup>.

*Discusión:* Los resultados de las simulaciones mostraron ser consistentes con los valores espectroscópicos para el estiramiento Fe-F<sup>-</sup> y para la transición de transferencia de carga (CT1), medidos por los grupos colaboradores. Por un lado la proteína wild type y la proteína mutante sin la TyrB10 mostraron valores experimentales consistentes con un entorno muy positivo, mientras que las simulaciones encontraron dos residuos responsables de establecer enlaces de hidrógeno fuertes con el anión coordinado. Por otro lado, la proteína mutante sin el TrpG8 presenta resultados espectroscópicos consistentes con algo más de un puente de hidrógeno estabilizando al anión. Las simulaciones, por su parte mostraron que la TyrCD1 y, muy débilmente, la TyrB10 podían estabilizar al F<sup>-</sup>. Finalmente, la proteína mutante que no posee el TrpG8 ni la TyrCD1 presenta una frecuencia muy alta (428 cm<sup>-1</sup>) y un valor de CT1 muy bajo (606 nm), consistente con simulaciones donde la TyrB10 es el residuo que interacciona con el F<sup>-</sup>.

El resultado más extraño resultó ser el presentado por la triple mutante (donde los tres residuos distales son reemplazados por fenilalaninas), dado que el anión parece *sentir* un entorno

levemente positivo según los estudios espectroscópicos. Las simulaciones mostraron que si bien ningún residuo se acerca para establecer puentes de hidrógeno con el anión fluoruro, dos moléculas de agua ingresan en la cavidad distal y permanecen allí formando puentes de hidrógeno con el F<sup>-</sup> (Fig. 4.19). Por lo tanto, el entorno positivo que se observa en los resultados experimentales, se debe al ingreso de moléculas de agua que interactúan directamente con el anión coordinado. Esta hipótesis ha sido postulada para la mioglobina (FeIII) a pH neutro con F<sup>-</sup> coordinado, para explicar la presencia de una banda a 460 cm<sup>-1</sup> 19-21.

La banda CT1 por su parte resultó ser un excelente sensor del entorno del anión, dado que responde a todos los cambios sutiles de esta proteína y sus mutantes.

**Tabla 4.5.- Resultados de la espectroscopía Raman Resonante realizados por el grupo de la Prof. Giulietta Smulevich, para la Tf-trHbO con F<sup>-</sup> coordinado al FeIII. La banda de Soret, el UV-Vis CT1, frecuencia RR Fe-F<sup>-</sup> y posibles residuos involucrados en la estabilización del F<sup>-</sup> se muestran en la tabla.**

Proteína	Soret (nm)	CT1 (nm)	$\nu$ Fe-F <sup>-</sup> (cm <sup>-1</sup> )	Potenciales residuos
Wild type	405	613	383	TrpG8 - TyrCD1
Tf-TyrB10->Phe	405	614	381	TrpG8 - TyrCD1
Tf-TrpG8->Phe	406	609	419	TyrCD1 - (TyrB10)*
Tf-TrpG8->Phe/TyrCD1->Phe	404	606	428	TyrB10
Tf-TripleMut	404	603	436	<i>Aguas internas</i>

\*La TyrB10 interactuaría de forma débil con el F<sup>-</sup>.

Por otra parte, los resultados de las simulaciones con F<sup>-</sup> coordinado al FeIII, fueron similares a los encontrados utilizando oxígeno, evidenciando que el F<sup>-</sup> puede actuar perfectamente como una sonda de oxígeno, a diferencia de lo que ocurría con el CO (véase *Estabilización de CO y O<sub>2</sub> en proteínas del grupo II*).

Por lo tanto podemos afirmar que además de encontrar una sonda que reproduzca fielmente el comportamiento del oxígeno, se lograron validar una vez más los modelos empleados para realizar las simulaciones.

Estos resultados experimentales y teóricos son parte del siguiente artículo que se encuentra en preparación:

- Nicoletti FP, Droghetti E, Boechi L, Estrin DA, Bonamore A, Boffi A, Feis A, and Smulevich G. **Fluoride ion as a probe to study the distal site environment in *Thermobifida fusca* truncated hemoglobin.** (Submitted to *Biochemistry*)

## Referencias:

1. Feis A, Lapini A, Catacchio B, et al. Unusually strong H-bonding to the heme ligand and fast geminate recombination dynamics of the carbon monoxide complex of *Bacillus subtilis* truncated hemoglobin. *Biochemistry*. 2008;47(3):902-910.
2. Giangiacomo L, Ilari A, Boffi A, Morea V, Chiancone E. The truncated oxygen-avid hemoglobin from *Bacillus subtilis*: X-ray structure and ligand binding properties. *J. Biol. Chem.* 2005;280(10):9192-9202.
3. Nardini M, Pesce A, Labarre M, et al. Structural determinants in the group III truncated hemoglobin from *Campylobacter jejuni*. *J. Biol. Chem.* 2006;281(49):37803-37812.
4. Yeh SR, Couture M, Ouellet Y, Guertin M, Rousseau DL. A cooperative oxygen binding hemoglobin from *Mycobacterium tuberculosis*. Stabilization of heme ligands by a distal tyrosine residue. *J. Biol. Chem.* 2000;275(3):1679-1684.
5. Birukou I, Schweers RL, Olson JS. Distal Histidine Stabilizes Bound O<sub>2</sub> and Acts as a Gate for Ligand Entry in Both Subunits of Adult Human Hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(12):8840 -8854.
6. Fago A, Hundahl C, Dewilde S, et al. Allosteric regulation and temperature dependence of oxygen binding in human neuroglobin and cytoglobin. Molecular mechanisms and physiological significance. *J. Biol. Chem.* 2004;279(43):44417-44426.
7. De Angelis F, Jarzecki AA, Car R, Spiro TG. Quantum chemical evaluation of protein control over heme ligation: CO/O<sub>2</sub> discrimination in myoglobin. *J Phys Chem B*. 2005;109(7):3065-3070.
8. Scott EE, Gibson QH, Olson JS. Mapping the pathways for O<sub>2</sub> entry into and exit from myoglobin. *J. Biol. Chem.* 2001;276(7):5177-5188.
9. Crespo A, Martí MA, Kalko SG, et al. Theoretical study of the truncated hemoglobin HbN: exploring the molecular basis of the NO detoxification mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* 2005;127(12):4433-4444.
10. Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J*. 2001;20(21):6008-6016.
11. Yang G, Wu L, Jiang B, et al. H<sub>2</sub>S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science*. 2008;322(5901):587-590.
12. Hill B C, Woon T C, Nicholls P, et al. Interactions of sulphide and other ligands with cytochrome c oxidase. An electron-paramagnetic-resonance study. 1984.
13. Pietri R, Lewis A, León RG, et al. Factors controlling the reactivity of hydrogen sulfide with heme proteins. *Biochemistry*. 2009;48(22):4881-4894.

14. Fernandez-Alberti S, Bacelo DE, Binning RC, et al. Sulfide-binding hemoglobins: Effects of mutations on active-site flexibility. *Biophys. J.* 2006;91(5):1698-1709.
15. Nguyen BD, Zhao X, Vyas K, et al. Solution and crystal structures of a sperm whale myoglobin triple mutant that mimics the sulfide-binding hemoglobin from *Lucina pectinata*. *J. Biol. Chem.* 1998;273(16):9517-9526.
16. Ouellet H, Juszczak L, Dantsker D, et al. Reactions of *Mycobacterium tuberculosis* truncated hemoglobin O with ligands reveal a novel ligand-inclusive hydrogen bond network. *Biochemistry.* 2003;42(19):5764-5774.
17. Cho HS, Dashdorj N, Schotte F, et al. Protein structural dynamics in solution unveiled via 100-ps time-resolved x-ray scattering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010;107(16):7281-7286.
18. Neri F, Kok D, Miller MA, Smulevich G. Fluoride binding in hemoproteins: the importance of the distal cavity structure. *Biochemistry.* 1997;36(29):8947-8953.
19. Asher SA, Adams ML, Schuster TM. Resonance Raman and absorption spectroscopic detection of distal histidine-fluoride interactions in human methemoglobin fluoride and *Sperm whale* metmyoglobin fluoride: measurements of distal histidine ionization constants. *Biochemistry.* 1981;20(12):3339-3346.
20. Asher SA, Schuster TM. Resonance Raman examination of axial ligand bonding and spin-state equilibria in metmyoglobin hydroxide and other heme derivatives. *Biochemistry.* 1979;18(24):5377-5387.
21. Desbois A, Lutz M, Banerjee R. Low-frequency vibrations in resonance Raman spectra of horse heart myoglobin. Iron-ligand and iron-nitrogen vibrational modes. *Biochemistry.* 1979;18(8):1510-1518.

## Capítulo 5. Regulación del ingreso de O<sub>2</sub> en mioglobina

### Introducción:

La mioglobina y la hemoglobina fueron las primeras proteínas en ser cristalizadas <sup>1,2</sup>. Debido a que la mioglobina es muy estable a temperatura ambiente, y que además es una proteína monomérica, se la ha estudiado incansablemente desde su cristalización en 1960 hasta nuestros días. Por esta razón, siempre se ha utilizado la mioglobina como sistema de referencia en el estudio de hemoproteínas. Cualquiera sea el estudio que se realiza, existe el valor de referencia de la mioglobina.

Típicamente se estudian mioglobinas que pertenecen a tres organismos diferentes: la mioglobina de cachalote (sperm whale myoglobin), la de corazón de caballo (horse heart myoglobin), y por supuesto la hemoglobina humana (human myoglobin). Las 3 proteínas tienen entre ellas prácticamente un 90% de identidad de secuencia de aminoácidos, y en general presentan comportamientos muy similares entre sí. Por tal razón, los diferentes estudios que se encuentran en la literatura de esta proteína se han realizado indiferentemente con cualquiera de las tres proteínas mencionadas. Desde un punto de vista funcional, la mioglobina participa como reservorio de O<sub>2</sub> ayudando a la cadena respiratoria de las células del músculo esquelético principalmente. Por su parte la hemoglobina viaja por la sangre dentro de los glóbulos rojos transportando oxígeno y CO entre los pulmones y los tejidos del organismo.

Si bien la hemoglobina es tetramérica y posee diferentes efectos relacionados con su estructura cuaternaria (Bohr, Root,...), la estructura general de cada subunidad aislada es muy similar a la que presenta la mioglobina. En particular los residuos que componen el sitio activo son muy similares a los que presenta la mioglobina. Por esta razón, la comprensión de fenómenos microscópicos que existen en la mioglobina, pueden tener influencia en la comprensión del funcionamiento de la hemoglobina, y viceversa.

Volviendo a la función de estas proteínas, mencionamos que el oxígeno debe migrar desde el solvente hasta el sitio activo para coordinarse al grupo hemo. Perutz mismo propuso en 1966 una explicación para el ingreso de O<sub>2</sub> en la hemoglobina <sup>3</sup>. Copio en su lengua original, una parte del artículo:



*“... we discussed it with Dr Britton Chance, who was visiting our laboratory while this work was in progress. One attractive solution is that histidine E7 (...) might act as a gate which has to swing out to admit the ligand.”*

A partir de ese momento se conocería el residuo más famoso de todas las hemoproteínas: “la Histidina E7 gate” (Figura 5.1). La nomenclatura E7 hace referencia a que dicha His se encuentra en la hélice E en la posición número 7.

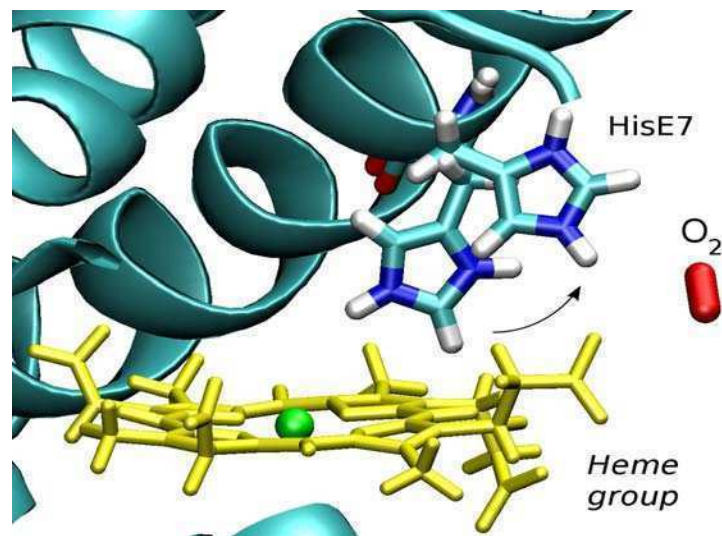


Figura 5.1.- Representación esquemática del movimiento de la HisE7 que permitiría el ingreso del O<sub>2</sub> en la mioglobina. En amarillo el grupo hemo y en verde el átomo de FeII. La dirección de la flecha y los protones de la histidina fueron colocados de forma arbitraria.

Como sucede con toda hipótesis, no tardaron en llegar las críticas. Experimentos de cristalografía con Xe a muy alta presión, evidenciaron la presencia de varias cavidades internas que se interconectaban entre sí. A estos sitios se los llamó sitios de Xenón y se postuló que podrían ser importantes en la migración de ligandos, rechazando a la HisGate como el sitio principal de ingreso de ligandos. Cristales con Xe<sup>4</sup>, simulaciones de dinámica molecular<sup>5</sup> junto con medidas cinéticas de rebinding de CO, mostraron que las cavidades se encuentran interconectadas y que un ligando como el CO puede migrar a través de todas ellas.

Sin embargo, un grupo de la Universidad de Rice, liderado por John Olson, continuó sosteniendo la teoría de la migración del ligando a través de la HisE7, a partir de mediciones de asociación de ligandos diatómicos (NO, O<sub>2</sub> y CO). Uno de los experimentos más claros que le permitieron seguir sosteniendo la antigua teoría de Perutz, son los resultados de los experimentos de asociación de ligandos (Stopped Flow), donde sometieron al sistema a una gran presión de Xe, para llenar los llamados *sitios de Xe* con el gas y así observar las modificaciones que se producían en las constantes de asociación ( $k_{on}$ ). Si el ligando “debía” atravesar los llamados sitios de Xe para alcanzar el sitio activo, el valor de la constante se verá afectado por el gas Xe. Los resultados pueden verse en la Tabla 1, donde se muestra que los valores de las constantes de asociación con y sin el Xe son muy similares entre si. Este resultado, junto con las mediciones cinéticas de diferentes (¡90!) mutantes mantienen en pie la antigua teoría de la HisGate, como sitio principal de acceso de ligandos.

Sumado a los estudios de Olson, existían estudios de  $k_{on}$  realizados a diferentes pH, donde se observaba que los valores de  $k_{on}$  aumentaban ligeramente con la disminución del pH. Sabiendo que el pKa de la His en solución se encuentra entre 6 y 7, se postuló que el aumento de dicha constante podría estar relacionado con la apertura de la HisE7 por la protonación de este residuo.

Recientemente, se logró cristalizar la mioglobina a pH ácido (pH=4), donde se observa la apertura de la HisE7 como había sido propuesto anteriormente. Cabe aclarar que aunque el pH del buffer en el cual se realizó la cristalización haya sido 4, no es cierto que la estructura cristalizada mantenga ese pH, ya que durante la cristalización (según el método que se emplee) el pH puede cambiar.

Basados en todos los resultados mencionados, y en la discusión acerca de la HisE7 gate, el ingreso de oxígeno, y el pH, decidimos realizar un estudio computacional del comportamiento de esta HisE7 y la relación que posee con la migración del oxígeno a través de este canal.

La pregunta que perseguíamos era tan ambiciosa como simple: ¿La protonación de la HisE7 es “suficiente” para controlar su apertura/cierre? ¿Es “necesaria”? ¿El movimiento de esta histidina implica necesariamente una apertura del canal para el ingreso del O<sub>2</sub>?

Realizamos para tal fin, simulaciones de Dinámica Molecular con la HisE7 en diferentes estados de protonación y de tautomerización: tautómero  $\epsilon$  (HIE), tautómero  $\delta$  (HID) y la histidina protonada (HIP) (ver Fig 5.2). Luego se estimaron los correspondientes perfiles de energía libre para el movimiento de esa histidinaE7 y para el ingreso de oxígeno.

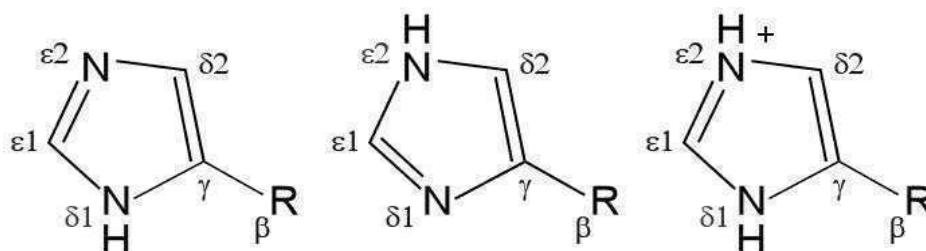


Figura 5.2.- El residuo histidina (His) tiene dos tautómeros naturales donde el átomo de hidrógeno se encuentra unido al nitrógeno  $\delta$  (HID) o al nitrógeno  $\epsilon$  (HIE) (*izquierda y centro respectivamente*), y posee además la variante protonada (HIP) (*derecha*).

Es importante aclarar que en este caso, no se están realizando simulaciones a bajo pH, ya que no se está teniendo en cuenta la protonación de los demás residuos de la proteína. En nuestro caso, nos propusimos sencillamente estudiar el comportamiento de un residuo específico, para saber si es suficiente y/o necesario para controlar la migración del oxígeno hacia el interior de la mioglobina.

### Metodología:

#### **Simulaciones de dinámica molecular clásica (MD)**

Partiendo de la estructura cristalográfica de la mioglobina a pH=4 (pdbId: 1SPE) donde la HisE7 se encuentra en las dos conformaciones que a partir de ahora denominaremos Afuera y Adentro, se realizaron simulaciones de dinámica molecular (DM) clásica con la HisE7 en los distintos estados: tautómero  $\delta$  (HID), tautómero  $\epsilon$  (HIE) y variante protonada (HIP), partiendo de las dos estructuras cristalográficas mencionadas.

Se realizaron 50 ns de simulaciones de dinámica molecular clásica como fue explicado en Metodología general. Los sistemas fueron estables durante el tiempo de simulación empleado (*véase la Fig. 8.5 del Apéndice*).

#### **Migración del oxígeno (MSMD/Jarzynski):**

Inicialmente se añadió una molécula de O<sub>2</sub> al sistema, previamente parametrizada. Dicha molécula fue especialmente localizada en la “entrada” del canal E7, y en un sitio de docking

encontrado a 5 Å del Fe. Se realizaron 10ns de dinámica molecular con dicha molécula restringida a 11 Å y a 5 Å del Fe y se extrajeron 40 fotos de los últimos 6ns. Utilizando estas fotos como punto de partida se realizaron simulaciones de dinámica molecular dirigida (MSMD), utilizando como coordenada de reacción la distancia Fe-O<sub>2</sub>, y con una velocidad de 0,025 Å/ps. Los ligandos que se encontraban a 11 Å fueron dirigidos hasta los 4 Å del Fe. Los ligandos que se encontraban a 5 Å del Fe fueron llevados hasta 4 Å y hasta 9.5 Å del Fe. Posteriormente se realizaron los promedios según la ecuación de Jarzynski para cada uno de los trayectos por separado, y se construyeron los perfiles de migración de oxígeno. Cda uno de estos perfiles se realizó para cada uno de los diferentes estados de la HisE7: HIE, HID, HIP.

## Resultados:

### **Relación entre estado de la HisE7 y su localización**

Como fue explicado en la sección anterior, se realizaron simulaciones de dinámica molecular clásica partiendo de diferentes configuraciones para la HisE7 (Afuera y Adentro), para los diferentes estados de la HisE7: HIE, HID y HIP. Por lo tanto se realizaron 6 simulaciones diferentes: HIE Afuera, HID Afuera, HIP Afuera, HIE Adentro, HID Adentro, HIP Adentro. En todos los casos, se evaluó el ángulo diedro C-CA-CB-CG como parámetro de la posición de la HisE7.

Algunos de los resultados fueron evidentes, otros algo sorprendidos. La HIE Adentro se mantuvo en esta posición durante toda la dinámica, mientras que la HIE Afuera se cerró a los pocos ps de simulación. Por su lado, la HIP Afuera se mantuvo en esa conformación durante la escala de tiempo de la simulación, mientras que la HIP Adentro se abrió a los pocos ns de simulación (Fig. 5.3).

Por lo tanto, sin importar el punto de partida, los estados HIE y HIP adquieren diferentes posiciones durante la escala de tiempo de la simulación: Adentro y Afuera respectivamente.

Cabe aclarar que en las simulaciones cruzadas (HIE Afuera y HIP Adentro) se simularon tiempos cortos de DM, dado que la proteína adquirió la misma conformación simulada previamente: HIE Afuera adquirió la estructura HIE Adentro, mientras que HIP Adentro adquirió la estructura de HIP Afuera.

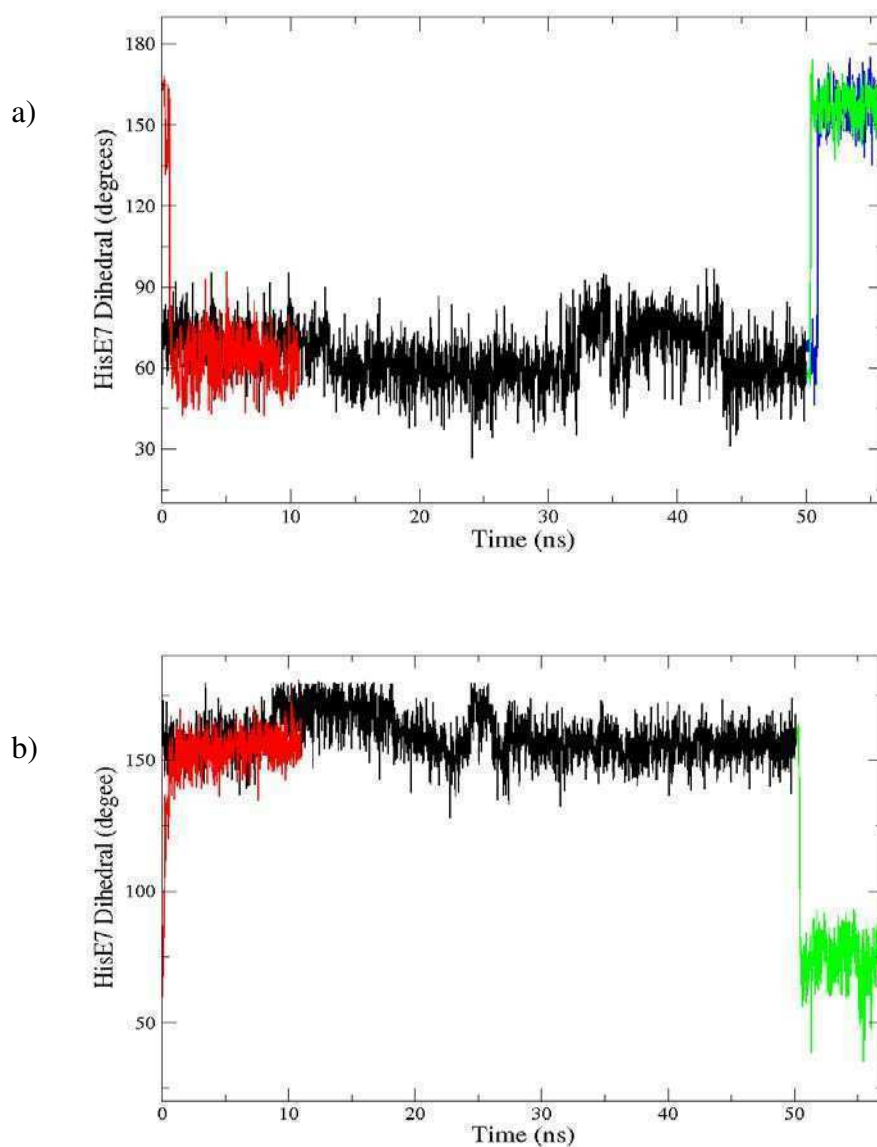


Figura 5.3.- Angulo diedro de la HisE7 en función del tiempo de simulación. a) Tautómero HIE partiendo de la configuración Adentro (negro) o Afuera (rojo). A partir de la última foto de la dinámica, se intercambió el tautómero HIE por HIP (verde), o por HID (azul). b) Tautómero HIP partiendo de la configuración Afuera (negro) o Adentro (rojo). Utilizando la última foto de la dinámica, se intercambió el tautómero HIP por HIE (verde).

Con el objeto de realizar más controles a las simulaciones realizadas, se realizaron dos simulaciones más: tomando como estructura de partida la última foto de la dinámica de la HIE Adentro, se procedió a protonar la HisE7 (HIE->HIP) para observar si la misma volvía a orientarse hacia afuera; por otro lado, partiendo de la última foto de la HIP Afuera, se desprotonó la HisE7 (HIP->HIE), para ver en este caso si la histidina se orientaba hacia adentro. También se realizó un

cambio HIE->HID (Fig. 5.4a *línea azul*) que será explicado en la próxima sección.

Consistentemente con lo que se venía observando, la histidina mantuvo el comportamiento postulado: la HIE se orientó Adentro, mientras que la HIP se orientó Afuera a los pocos ps de producido el cambio (Fig. 5.3 *línea verde*)

Los resultados hasta aquí mostrados evidencian que la protonación parece ser condición *suficiente* para regular la posición de equilibrio de la HisE7. Cuando se encuentra protonada (HIP) adquiere la conformación Afuera que se observaba en el cristal (pdbId: 1SPE), si la HisE7 se encuentra desprotonada (HIE), la misma se orientará hacia el sitio activo, como se observa en prácticamente todos resto de los cristales de mioglobna y hemoglobina.

### **Tautomerización $\delta$ - $\epsilon$**

De la misma forma en que anteriormente se realizaron simulaciones con la histidina E7 en estados HIE y HIP, se realizaron ahora simulaciones utilizando el tautómero  $\delta$  (HID). Sorpresivamente, aunque el tautómero  $\delta$  no es el estado protonado (HIP), se observó que el tautómero HID es estable en la configuración Afuera. Esto puede observarse en la figura 5.4, donde se muestra que aún tomando como punto de partida la configuración Adentro, la HisE7 rota hacia el exterior de la proteína tomando la configuración Afuera durante al menos 40ns (Fig. 5.4). Este resultado muestra que la protonación de la histidina es suficiente, pero no es necesaria para el movimiento de la HisE7, ya que este residuo es capaz de rotar, simplemente debido al cambio de estado tautomérico. También en la figura 5.4a (*línea azul*) se ve que el cambio de tautómero (HIE->HID) resulta suficiente para que en pocos ps la HisE7 cambie a la configuración Afuera.

De todas formas, la figura 5.4 muestra que el tautómero HID también es estable en la configuración Adentro, dado que de los 60ns de dinámica molecular clásica, se mantiene ~45ns Afuera, y ~15ns Adentro. Como fue explicado anteriormente este tiempo de simulaciones no es suficiente para estimar probabilidades de ambos estados. Por un lado, debido al tiempo de simulación, y por el otro debido al campo de fuerza que puede determinar la población de los tautómeros.

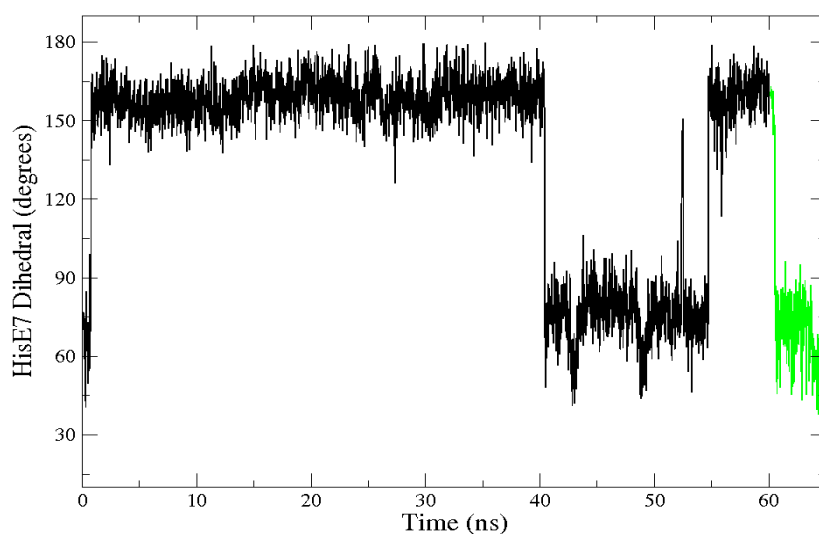


Figura 5.4.- Angulo diedro de la HisE7 en función del tiempo de simulación para el tautómero HID, partiendo de la configuración Adentro (negro), y partiendo de la última foto de la simulación con HIE, donde se realizó el cambio HIE->HID (verde).

Como se verá más adelante en la figura 5.6, cuando la HisE7 se encuentra en la conformación Afuera, moléculas de agua pueden ingresar al sitio activo a través del canal E7 gate. Para estudiar el efecto que las moléculas de agua interna pueden tener en el comportamiento de la HisE7, realizamos simulaciones de dinámica molecular clásica para el tautómero HIP de la HisE7, partiendo de la configuración Adentro en presencia de aguas internas. Es decir, que a diferencia de lo que se observa en la figura 5.3b, la estructura inicial ahora posee una molécula de agua en el sitio activo. El resultado es contundente así como importante: la HisE7 se mantiene durante 50ns en la conformación Adentro, evidenciando el importante rol que cumplen las aguas internas en el comportamiento de la HisE7 (Fig. 5.5a). La simulación mostró una interacción de puente de hidrógeno muy fuerte entre el HNE de la HisE7 y el átomo de oxígeno de la molécula de agua (Fig. 5.5b).

Estos resultados (la interacción entre la HIP y las aguas internas) no fueron observados previamente en las simulaciones realizadas, ya que el residuo HIP no tuvo ocasión de visitar en ningún momento la conformación Adentro mientras moléculas de agua se encontraban en el sitio activo.

Cabe aclarar que la simulación con aguas internas realizada para HIP no fue necesaria realizarla para los estados HIE y HID. En el primer caso (HIE) la HisE7 conserva su conformación Adentro, aún cuando existen aguas internas. En el segundo caso (HID), la HisE7 visitó la configuración Adentro como se observa a los 40ns en la figura 5.4, evidenciando que en este caso fueron evaluadas las diferentes configuraciones posibles..

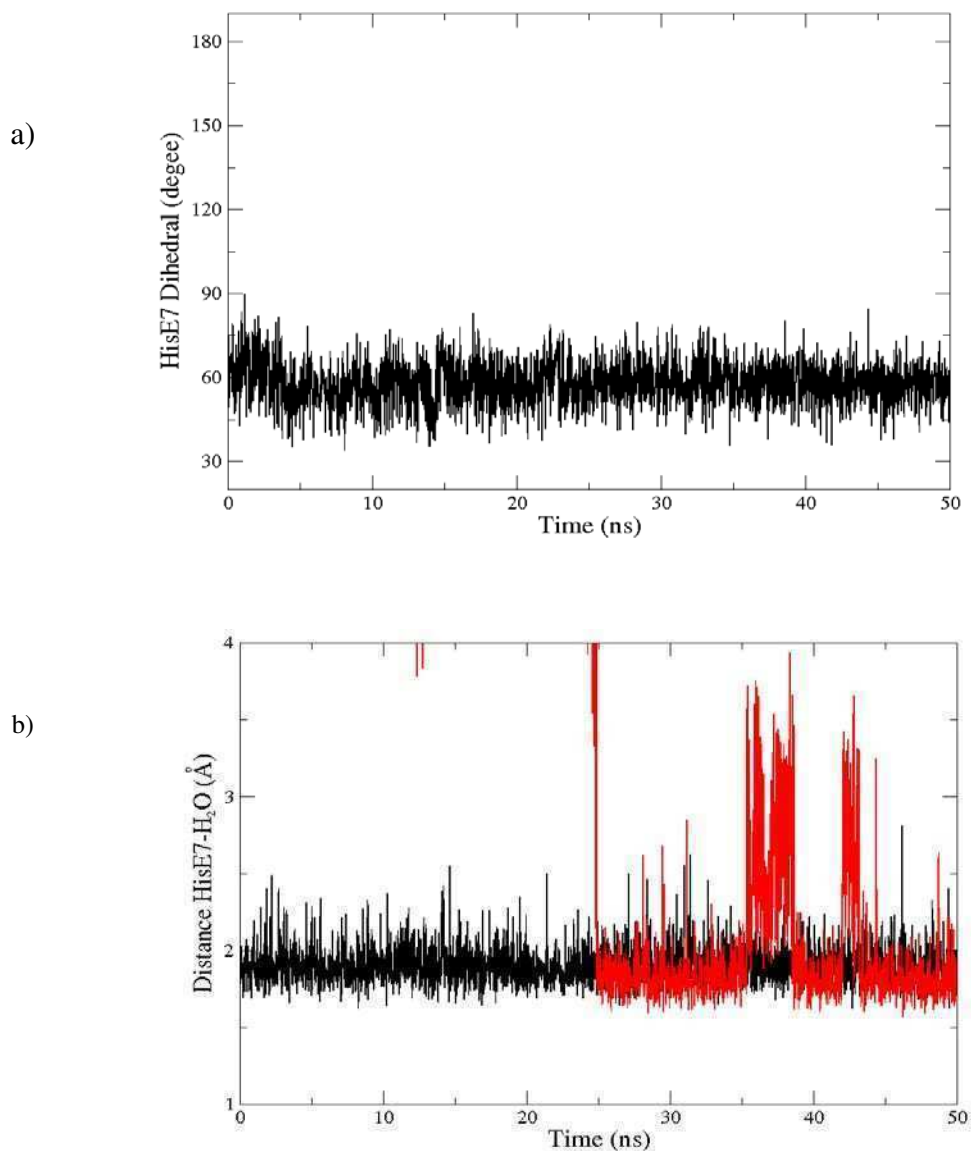


Figura 5.5.- a) Angulo diedro de la HisE7 en función del tiempo de simulación para el tautómero HIP, partiendo de la configuración Adentro en presencia de aguas internas. b) Distancia en función del tiempo de simulación, entre el átomo de O de la molécula de agua interna y el HN $\epsilon$  de la HisE7 (negro), o entre el átomo de O más cercano de los propianatos y el HN $\delta$  de la HisE7.



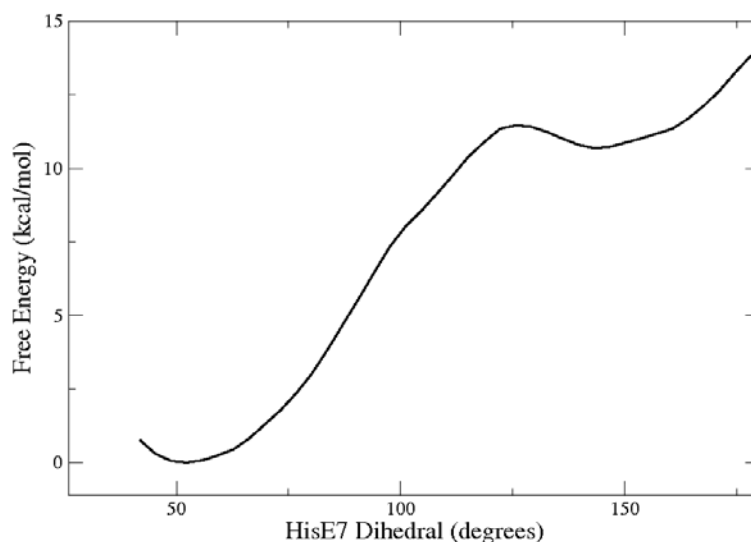
## Perfiles de Energía Libre de la interconversión

Como fue explicado anteriormente, el tiempo de simulación en muchos casos puede ser escaso para encontrar todas las configuraciones que las proteínas visitan. Por tal razón, para obtener información termodinámica confiable y así poder concluir fehacientemente, es necesario en muchos casos contar con perfiles de energía libre de los procesos involucrados.

Existen varios métodos para estimar estos perfiles, y una gran discusión acerca de cuál es el mejor método. Sin embargo, en los casos donde se deben formar interacciones de puentes de hidrógeno en particular, o donde hay reordenamientos de aguas, el método de muestreo sesgado resulta ser el más adecuado.

Por lo tanto, calculamos perfiles de energía libre de la apertura/cierre de la HisE7 en los distintos estados del residuo: HIE, HIP, HID, para así tener parámetros termodinámicos y cinéticos de este proceso. La coordenada de reacción elegida fue el mismo ángulo diedro que se utilizó para testear la posición de la HisE7 previamente (C-CA-CB-CG).

Los resultados arrojaron los mismos resultados que las simulaciones de dinámica molecular clásica: el tautómero HIE es más estable en la configuración Adentro, mientras que HID es más estable en la configuración Afuera (Fig. 5.4). El residuo protonado (HIP) es igualmente estable en la ambas configuraciones.



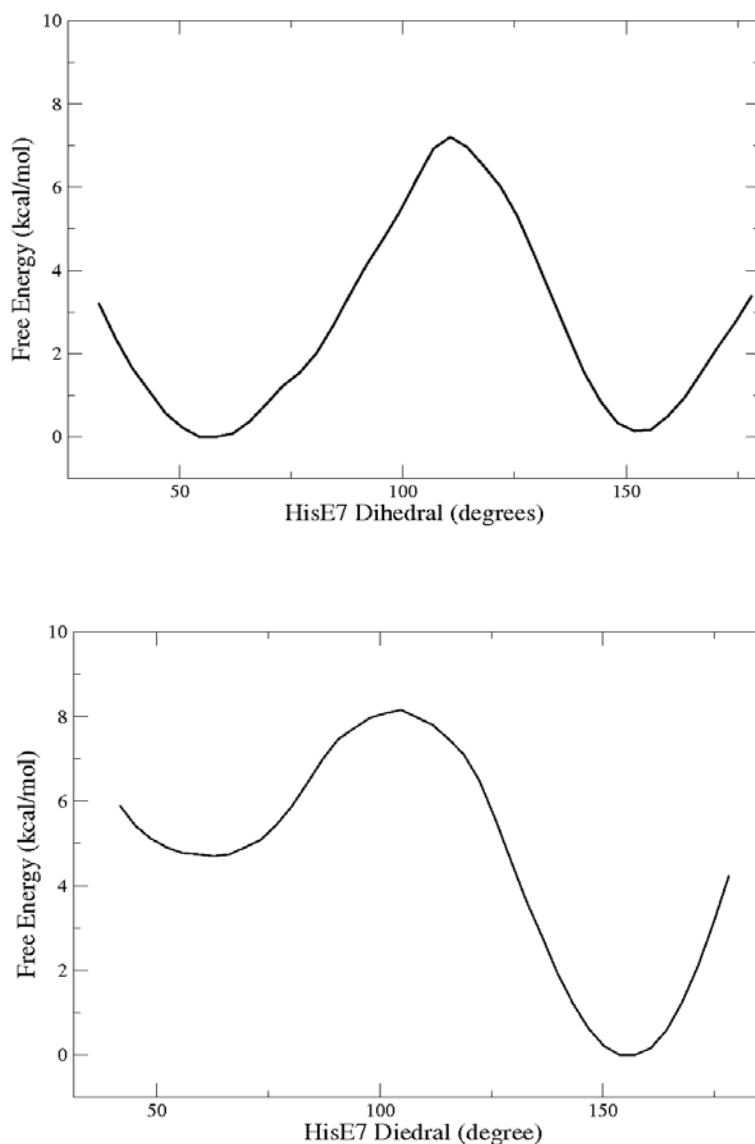


Figura 5.4.- Perfiles de energía libre para la apertura/cierre de la HisE7. a) Tautómero  $\epsilon$  (HIE). b) Histidina protonada (HIP). c) Tautómero  $\delta$  (HID). En todos los casos se utilizó el ángulo diedro C-CA-CB-CG como coordenada de reacción.

### Explicación molecular de las diferencias encontradas

Una de las ventajas que posee la simulación computacional por sobre otras técnicas, es la posibilidad de un acercamiento microscópico a los fenómenos macroscópicos.

En este caso, el objetivo fue explicar las diferencias encontradas para HID, HIP y HIE. En particular, intentar comprender por qué los estados HIP y HID permanecen Afuera, mientras que HIE permanece Adentro.

La observación directa de las simulaciones con la histidina en estados HID y HIP muestra que estos residuos se encuentran estabilizados en el estado Afuera, gracias a un puente de H que forman con el carbonilo de la cadena principal de un residuo de asparagina (Asp142). Este puente de H no puede ser formado en el caso HIE, debido a la orientación que presenta el hidrógeno en este tautómero. En el caso de la histidina protonada (HIP) se observaron también interacciones entre el HN $\delta$  de la HisE7 y los átomos de oxígeno de los propionatos del grupo hemo, que podrían contribuir también a la estabilidad de dicha conformación.

El residuo de Asparagina 142 resulta entonces muy importante para esta regulación, aunque nunca antes había sido mencionado en la literatura. Esto puede tener una explicación aventurada, pero interesante también. En general, la relevancia de un residuo en una proteína se evalúa realizando mutaciones del mismo y observando los resultados. Sin embargo en este caso la interacción se realiza a través del carbonilo de la cadena principal.

Realizamos, por tal razón, la proteína mutante Asp142->Ala para la HisE7 protonada, de forma de corroborar la hipótesis planteada (Fig. 5.6). Los resultados mostraron que la HisE7 protonada conservó la conformación Afuera durante los 50ns de simulación realizados, al igual que en el caso de la proteína wild type. Este resultado muestra que no resulta posible relizar una proteína mutante para desestabilizar dicha conformación (*Afuera*).

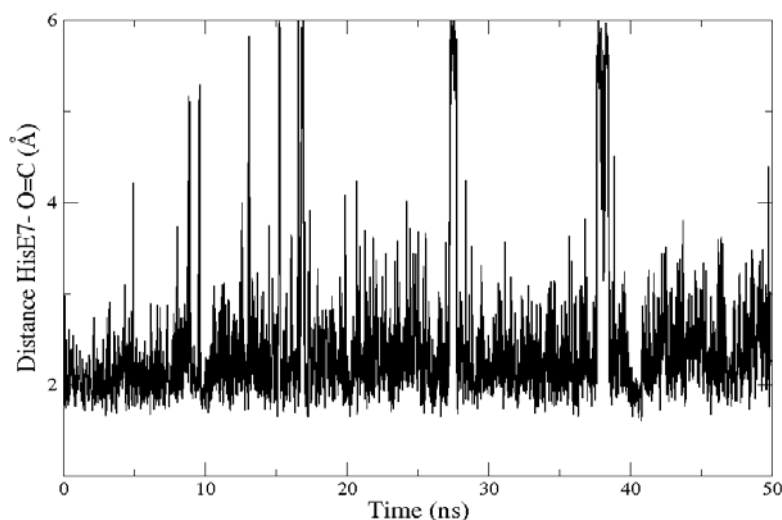


Figura 5.6.- Distancia en función del tiempo de simulación, entre el átomo de O del carbonilo de la Ala142 y el HN $\delta$  de la HisE7, para la mioglobina mutante Asp142->Ala.

## **Ingreso de oxígeno a la mioglobina**

En las secciones anteriores se estudió de qué manera el estado HIE, HID y HIP, regulan el movimiento de la propia HisE7. Sin embargo, nada se ha dicho sobre la “apertura” o “cierre” del canal de acceso de ligandos. La pregunta es: ¿La histidina Afuera implica la apertura del canal?

Más y nuevas simulaciones debían ser realizadas para poder definir con total certeza la existencia de un canal. Por lo tanto, y como primera medida, realizamos un análisis cualitativo de la superficie de la proteína promedio en cada caso. En la figura 5.7 puede observarse que cuando la HisE7 se encuentra Afuera (caso HIP), aparece un evidente canal por el cual migran aguas hacia el sitio activo. Por otro lado, cuando la HisE7 se encuentra Adentro (caso HIE), la superficie de la proteína es continua y no se observan canales en esta zona.

Por lo tanto, desde una aproximación cualitativa observamos que en el caso HIP aparece un canal a través del cual migran aguas desde el solvente hacia el sitio activo.

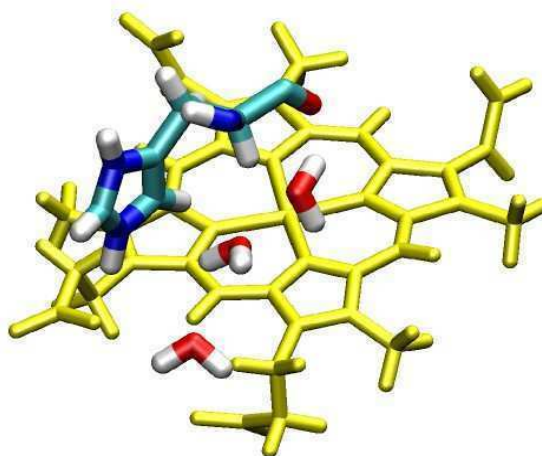
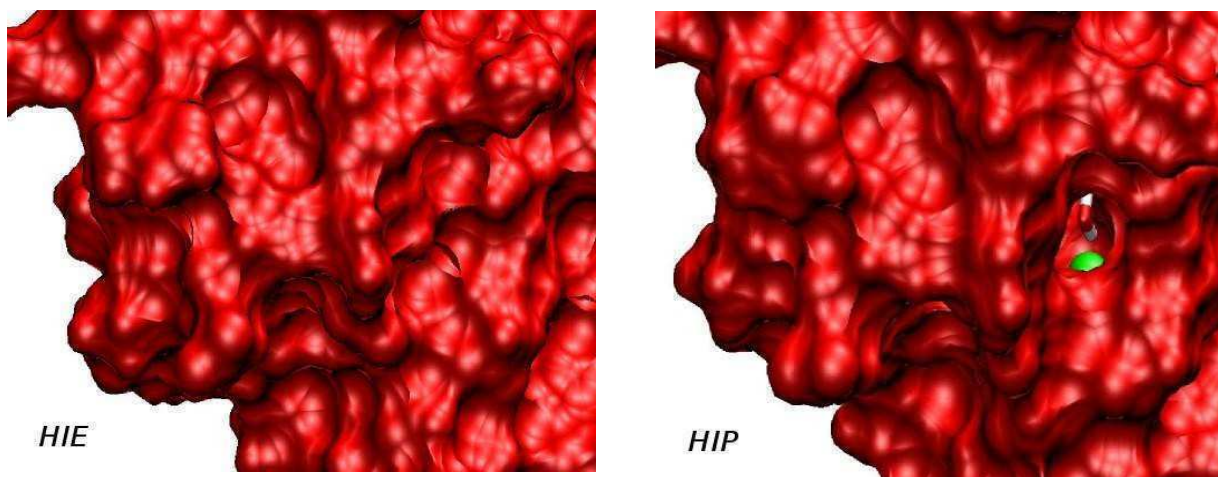


Figura 5.7.- Superficie de contorno de estructuras representativas de la mioglobina con la histidina E7 en estados HIE (arriba derecha), HIP (arriba izquierda). Obsérvese el canal a través del cual migran aguas en el estado HIP (abajo)

De todas formas, si bien se observan aguas migrando hacia el sitio activo, aún no sabemos si este canal es accesible para la migración de una molécula de oxígeno.

Para responder a este interrogante, realizamos un estudio de migración de oxígeno a través del canal E7 para los diferentes estados de la histidina E7. Para esto realizamos cálculos de Dinámica Molecular Guiada de 40 simulaciones independientes, junto con el teorema de Jarzynski, para calcular los perfiles de energía libre de migración del oxígeno.

Se realizaron dos perfiles de energía libre partiendo desde los dos mínimos encontrados. Por un lado, se comenzó con el ligando a 11 Å del Fe, y se forzó al ligando a llegar hasta los 4 Å (40

simulaciones independientes) (Figura 5.8 *arriba*). Por otro lado, se partió de los 5 Å del Fe y se hizo migrar al ligando hasta los 4Å, y también hasta los 9.5 Å (40 simulaciones independientes) (Figura 5.8 *abajo*).

Sorprendentemente los resultados muestran que en los tres casos (HIE, HIP y HID), el oxígeno puede ingresar con barreras bajas o prácticamente sin barrera hasta los 4 Å del hierro (Fig. 5.8). Es decir, que incluso en el caso en que la HisE7 se encuentra Adentro (HIE) el perfil de migración de oxígeno no encuentra una barrera considerable para su ingreso al sitio activo. Puede compararse este resultado con el Canal Corto de la Bs-trHbO que posee un residuo muy pequeño (AlaE7) y sin embargo presenta una barrera de ~4kcal/mol para el ingreso de oxígeno, por ese canal.

La única diferencia relevante que presentan los sistemas donde la HisE7 se encuentra Afuera (casos HID y HIP), es la presencia en el perfil de un mínimo de energía de 2 o 3 kcal/mol cuando el ligando se encuentra a 5 Å del Fe. Este mínimo puede actuar preconcentrando oxígeno, facilitando su ingreso en la mioglobina. Es decir, que cuando la HisE7 se encuentra Afuera, se genera un mínimo local que puede preconcentrar ligando, y puede modificar la velocidad de ingreso de ligando.

Estos resultados muestran que el movimiento de la HisE7 modifica la velocidad de ingreso de ligando, pero no a través de barreras, sino de la creación de un mínimo que permite preconcentrar oxígeno en las inmediaciones del sitio activo.

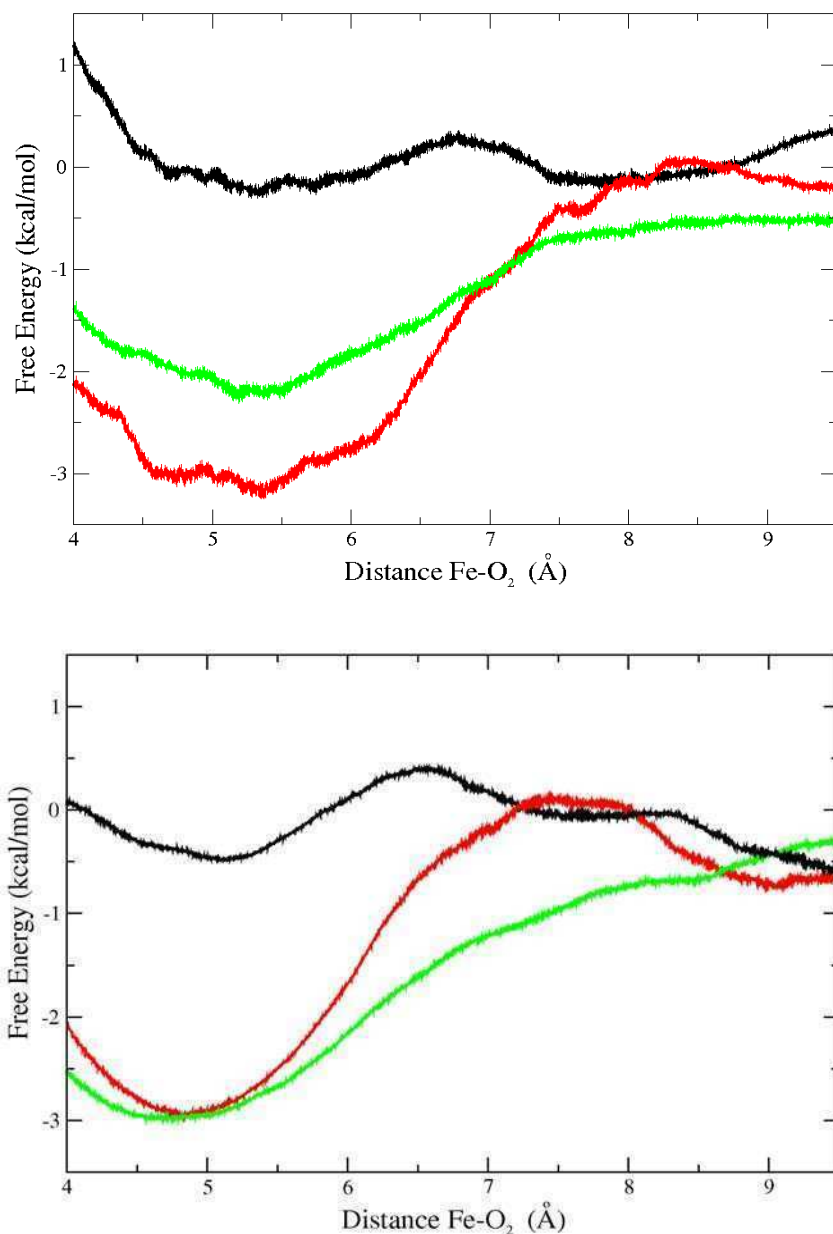


Figura 5.8.- Perfiles de energía libre para la migración del oxígeno en mioglobina a través de la puerta E7, para los cada uno de los estados HIE (negro), HIP (rojo) y HID (verde). Los perfiles fueron construídos partiendo de los 11 Å (*arriba*), o partiendo desde los 5 Å (*abajo*). En ambos casos se muestra la distancia desde 4 Å hasta 9.4 Å para facilitar la comparación.

Como fue explicado anteriormente a partir de 4Å comienza a ser importante la interacción entre el Fe y el O<sub>2</sub>, por tal razón resulta incorrecto calcular el perfil de energía libre con este método a distancias menores. También es importante recordar que el error del cálculo aumenta con la longitud de la distancia que recorren los ligandos. Por esta razón, la porción del perfil más cercana

al Fe (4 – 6Å) posee un gran error en el perfil con los ligandos partiendo desde 11 Å, que en el perfil con los ligandos partiendo de 5 Å.

### Conclusión:

Los resultados presentados hasta aquí muestran que la posición de los protones en la HisE7 puede regular su comportamiento. Si la HisE7 se encuentra deprotonada pero en el tautómero  $\epsilon$  (HIE), la misma se encontrará mayoritariamente hacia adentro del sitio activo, mientras que si se encuentra en el tautómero  $\delta$  (HID) la misma se encontrará mayoritariamente hacia afuera del mismo. Si por el contrario se encuentra protonada (HIP), el residuo es estable en ambas configuraciones, y dependerá de las aguas que ingresen en el sitio activo de la proteína, .

También se observó que cuando la HisE7 se encuentra hacia afuera de la proteína, aparece un canal a través del cual pueden migrar aguas desde el solvente hasta el sitio activo. Este canal no se observa cuando la HisE7 se encuentra hacia adentro (caso HIE), y el canal de acceso de moléculas de agua parecería estar completamente bloqueado.

La migración de oxígeno a través del gate E7 motró resultados muy interesantes. En primer lugar se demostró que cuando la HisE7 está hacia adentro (HIE), el oxígeno puede migrar perfectamente hasta el sitio activo sin encontrar barrera alguna. Esto implica que el canal de acceso no se encuentra bloqueado como originalmente se pensaba, o incluso como parecían indicar los análisis cualitativos de superficie, sino que por el contrario, prácticamente no existe barrera alguna para la migración del oxígeno hasta el sitio activo. Por otro lado, cuando la HisE7 se encuentra hacia afuera (HID, HIP), tampoco existen barreras energéticas para la migración del oxígeno, pero en este caso aparece un gran mínimo de energía libre (~3 kcal/mol) que puede favorecer el ingreso de los ligando actuando como reservorio.

Este trabajo se realizó en colaboración con el Prof. Adrián Roitberg de la Universidad de Florida, Estados Unidos, y se encuentra actualmente en preparación y pronto a ser enviado para su publicación.



## Discusión:

Retomando la antigua discusión planteada por Perutz y continuada por Brunori, Olson y otros en la actualidad, acerca de las vía de ingreso de ligandos a la mioglobina, podemos afirmar que el canal E7 es un canal accesible para el ingreso de ligandos, dado que en ningún caso existen barreras para la migración de ligandos, sin importar la posición que tome la HisE7. Podemos agregar además que cuando la HisE7 se encuentra hacia afuera, aparece un mínimo de energía en el perfil de migración (a 5 Å del Fe), que puede generar fenómenos de preconcentración facilitando el ingreso del oxígeno. Esto sucede en casos donde la His se encuentra protonada (HIP), o incluso cuando se encuentra desprotonada (HID). Estos fenómenos de preconcentración pueden pensarse como una cinética de dos pasos, donde el ligando accede desde el solvente hasta dicho mínimo, y posteriormente desde este mínimo al Fe. La velocidad de ingreso del segundo paso estará determinada en gran medida por la concentración de ligando que se encuentre en dicho mínimo.

Por lo tanto, el movimiento de la HisE7 modifica el ingreso de los ligandos, pero no a partir de barreras o bloqueos del canal, sino a partir de fenómenos de preconcentración generado por un mínimo locales que surge cuando la HisE7 se encuentra hacia afuera.

Los resultados experimentales apoyan la idea de un canal que no presenta bloqueos para el ingreso de ligandos, dado que el valor de la  $k_{on}O_2$  de mioglobina es  $10^7 M^{-1} s^{-1}$ , uno de los valores reportados más altos para el ingreso de oxígeno. Este valor es similar al reportado para la Mt-trHbN que presenta un canal de migración de ligandos prácticamente sin barreras.

Por otro lado, la  $k_{on}O_2$  aumenta al disminuir el pH<sup>6</sup>, de acuerdo con nuestros resultados de la histidina protonada (HIP). Sin embargo es interesante que este aumento no alcanza un orden de magnitud, pasando desde 7 hasta 4,6 en la escala de pH. Esto muestra que si bien la protonación de la histidina “ayuda” al ingreso del oxígeno, no resulta imprescindible. Sino que por el contrario, si la His se encuentra en los tautómeros HID y HIE, es suficiente para lograr una velocidad apreciable de oxígeno en la mioglobina.

Respecto de los demás canales de migración que podría tener esta proteína, nada podemos decir al respecto. Nuestro objetivo se centró en estudiar uno de estos canales, y logramos demostrar que efectivamente funciona como tal. Sin embargo no podemos descartar que esta proteína posea más de un canal para el ingreso/egreso de oxígeno.

Finalmente resulta interesante extrapolar estos resultados al caso de la hemoglobina, que si bien es una proteína tetramérica con todos los efectos que la misma posee, su estructura terciaria es

muy similar a la mioglobina, y es conocido que el ingreso de oxígeno se encuentra regulada por pH. Un estudio detallado en esta proteína debe realizarse para poder concluir finalmente acerca de las hipótesis planteadas por Perutz hace más de 50 años.

### Bibliografía:

1. Perutz MF, Rossman MG, Cullis AF, et al. Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature*. 1960;185(4711):416-422.
2. Kendrew JC, Dickerson RE, Strandberg BE, et al. Structure of myoglobin: A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature*. 1960;185(4711):422-427.
3. Perutz MF, Mathews FS. An x-ray study of azide methaemoglobin. *J. Mol. Biol.* 1966;21(1):199-202.
4. Tilton RF, Kuntz ID, Petsko GA. Cavities in proteins: structure of a metmyoglobin-xenon complex solved to 1.9 Å. *Biochemistry*. 1984;23(13):2849-2857.
5. Bossa C, Anselmi M, Roccatano D, et al. Extended molecular dynamics simulation of the carbon monoxide migration in sperm whale myoglobin. *Biophys. J.* 2004;86(6):3855-3862.
6. Tian WD, Sage JT, Champion PM. Investigations of ligand association and dissociation rates in the "open" and "closed" states of myoglobin. *J. Mol. Biol.* 1993;233(1):155-166.



## Capítulo 6. Hexacoordinación endógena

### Introducción:

Tal como fue mencionado en la Introducción General, otro de los mecanismos que regulan la afinidad por ligandos es la hexacoordinación endógena. En estos casos, un residuo de la proteína ocupa la sexta posición de coordinación del Fe, compitiendo con el ligando externo. Existen numerosos ejemplos de hexacoordinación endógena en hemoproteínas ampliamente estudiados, tales como la neuroglobina humana, en hemoglobinas de peces antárticos, y en algunos miembros del grupo N de las Hemoglobinas Truncadas<sup>1-3</sup>. En estos casos, el residuo responsable de la hexacoordinación es típicamente la HisE7 en neuroglobina y hemoglobina, o la HisB10 en *Synechocystis sp* (trHbN). La unión de la His al Fe(II) se puede explicar en términos de donación  $\sigma$  del ligando al metal y de retrodonación  $\pi$  del metal al orbital  $\pi^*$  de la His. Cuando el metal se encuentra en estado FeIII, son tirosinas típicamente las que se coordinan en lugar de histidinas. Sin embargo, en ciertas hemoglobinas de peces antárticos, se encontraron histidinas unidas al FeIII formando un compuesto denominado *hemicromo*<sup>2</sup>.

Grupos colaboradores de la Universidad de Nápoles dirigidos por Cinzia Verde y Guido di Prisco encontraron en el genoma de la bacteria antártica *Pseudoalteromonas haloplanktis*, secuencias codificantes para tres Hemoglobinas Truncadas: dos de ellas pertenecen al segundo grupo (O), y una de ellas pertenece al primero (N)<sup>4</sup>. La inactivación de la primera de estas proteínas (Ph-trHbO) en el microorganismo antártico produce una cepa más sensible a elevadas concentraciones de O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y NO, sugiriendo que la Ph-trHbO participa en mecanismos de estrés oxidativo y nitrosativo<sup>5</sup>.

Resultaba muy interesante estudiar una proteína que cumple sus funciones cercanas a 0°C, para comenzar a entender las diferencias que presentan las proteínas de organismos adaptados a la temperatura. Grupos colaboradores realizaron estudios de Espectroscopía Raman, EPR, UV y cinéticas de asociación y disociación de ligandos, que permitieron caracterizar esta proteína.

Todos los resultados coincidían en que esta proteína presentaba hexacoordinación endógena de bajo spin. Inclusive, los experimentos coincidían en que esta proteína tenía un comportamiento nuevo, con dos conformaciones diferentes de hexacoordinación endógena de bajo spin. Pero al no existir un cristal de la proteína, la interpretación de los resultados no resultaba sencilla. Un alineamiento de secuencias que había sido realizado por el grupo italiano, había predicho que un

residuo de His se localizaba en posición CD1, y que este sería el residuo responsable de la hexacoordinación endógena observada <sup>4</sup>. Sin embargo este tipo de alineamientos no se encontraba acompañado de modelos tridimensionales, ni de simulaciones de dinámica molecular que avalaran dichas estructuras.

Decidimos, por lo tanto encarar el problema para mejorar la interpretación de los resultados experimentales. Comenzamos realizando varios alineamientos de secuencias, construimos modelos por homología y finalmente realizamos simulaciones de dinámica molecular clásica y cálculos cuánticos para estudiar la dinámica del sitio activo de esta proteína.

### Herramientas bioinformáticas empleadas

Se realizaron alineamientos utilizando los programas Modeller <sup>6</sup>, BLAST <sup>7</sup>, y ClustalX <sup>8</sup>. Los modelos se construyeron utilizando el programa Modeller, con los parámetros provistos en los programas por default. Todas las simulaciones se realizaron tal como fue explicado en Metodología general.

Para construir las estructuras hexacoordinadas, se realizaron simulaciones guiadas (MSMD) hasta acercar la tirosina al FeIII. Cuando la distancia entre la Tyr el Fe fue la esperada, se realizó una nueva simulación de dinámica molecular añadiendo al campo de fuerzas el enlace de coordinación entre la Tyr y el FeIII. Realizamos este proceso para dos tirosinas: la TyrCD1-O<sup>-</sup> y para la TyrB10-O<sup>-</sup> alternativamente.

Se construyó un sistema modelo conformado por un hemo simplificado con FeIII bajo spin, el imidazol correspondiente a la HisF8 proximal, y un metil-fenol que actúa como tirosinato. Estos cálculos fueron realizados utilizando diferentes estructuras iniciales como punto de partida, donde en todos los casos se alcanzó la misma estructura de equilibrio final (Fig. 6.1). Este *sistema modelo* sirvió como primera aproximación para conocer la naturaleza estructural y electrónica del sistema completo. Por otro lado, los parámetros utilizados en las simulaciones clásicas (distancias de equilibrio, ángulos de equilibrio, constantes de los potenciales armónicos, cargas de los átomos, etc), fueron determinados a partir de dicho modelo, como fue explicado en Metodología General.

Si bien la secuencia de Ph-trHbO reportada posee una extensión de ~20 aminoácidos en su extremo amino terminal, tenemos conocimiento de que los diferentes secuenciamientos realizados mostraron diferentes resultados en muchos casos: algunas veces se encontraron solamente 12 aminoácidos, otras veces solamente 6, y hasta en ocasiones no se ha encontrado dicha extensión.

Por lo tanto, dado que no existe aún certeza de que el extremo N terminal se encuentre presente en la proteína activa, todas las simulaciones fueron realizadas sin esta porción de la proteína.

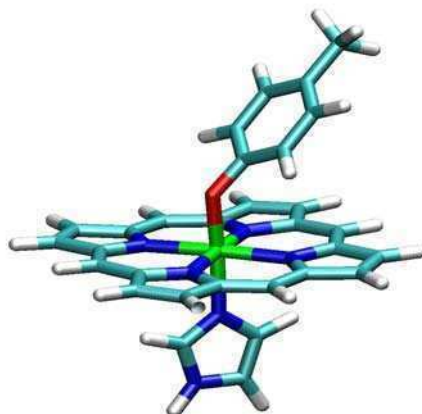


Figura 6.1.- Sistema modelo empleado para realizar los cálculos cuánticos. Se observa el hemo simplificado, el imidazol correspondiente a la HisF8 proximal, y un metil-fenol que actúa como tirosinato. Obsérvese el ángulo que forma el metil-fenol con el plano del hemo.

### Resultados:

*Diferentes alineamientos y modelos:* Se realizaron diferentes alineamientos de secuencia, utilizando diferentes miembros del grupo I y del grupo II de esta subfamilia. Se utilizaron diferentes programas como fue mencionado anteriormente, alcanzando muchos alineamientos diferentes. Los resultados mostraron diferencias localizadas mayormente en el loopCD, que es una región donde Ph-trHbO posee una inserción de residuos en comparación con sus homólogas (Fig. 6.2). También se encontraron diferencias en el loopGH, especialmente en el caso de la Mt-trHbO.

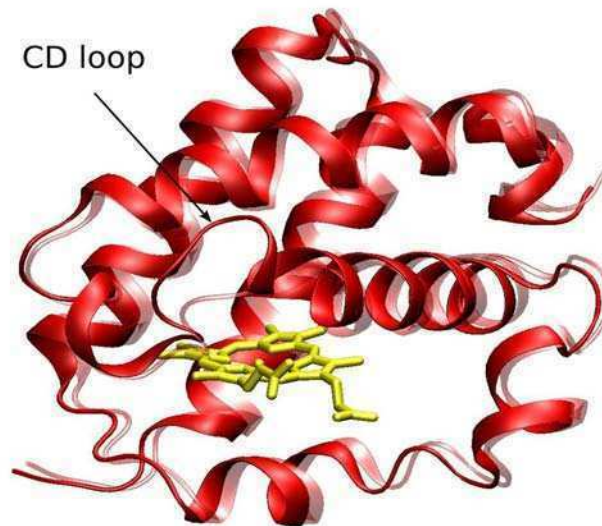


Figura 6.2.- Superposición del modelo de la Ph-trHbO, y el templado (Bs-trHbO) a partir del cual fue construido. Se muestra el grupo hemo en amarillo, y se destaca el CDloop donde aparece la inserción de 3 residuos que presente Ph-trHbO respecto de Bs-trHbO

De todas formas, el común denominador de estos alineamientos fue la presencia de una tirosina en la posición CD1, que difiere de la histidina que había sido postulada por el grupo italiano para ocupar esa posición. Esta fue la primera evidencia de que el sitio activo era algo diferente del postulado hasta el momento, y que la interpretación de los experimentos podía estar tomando caminos equivocados.

Sabiendo que la estructura se conserva más que la secuencia, y teniendo en cuenta que los diferentes cristales que existen para las proteínas de este grupo poseen estructura terciaria (backbone) casi idéntica, decidimos construir modelos 3D a partir de cristales de las ampliamente estudiadas por nuestro grupo Bs-trHbO y Mt-trHbO. Se utilizaron para estos modelos, los alineamientos explicados en la sección anterior, así como también diferentes alineamientos sesgados que fueron tomados de la literatura<sup>9</sup>, y de nuestro conocimiento de esta subfamilia de proteínas. También se utilizó, por supuesto, un alineamiento donde la His ocupaba la posición CD1.

Para poder evaluar la estabilidad de los modelos y darle credibilidad a los mismos, realizamos simulaciones de dinámica molecular de cada uno de los modelos construidos. Algunos modelos comenzaron a desnaturalizarse en los primeros nanosegundos de simulación, evidenciando las fallas en las estructuras generadas (*véase la Fig. 8.7 del Apéndice*). Teniendo en cuenta que la estructura terciaria de estas proteínas está altamente conservada, descartamos los modelos que perdían alguna

de sus hélices principales, o que perdían la típica estructura del sitio activo. Los modelos donde la His se encontraba en la posición CD1, perdieron la estructura típica del sitio activo en los primeros 5ns de simulación. Otros modelos, permanecieron estables a lo largo de la dinámica molecular, y en algunos casos resultaron estructuralmente muy similares entre ellos. Por lo tanto, se utilizó uno de estos modelos como estructura de partida para realizar 40ns de dinámica molecular clásica, y comenzar a estudiar el sistema.

El modelo seleccionado para esta simulación, fue obtenido utilizando *B. subtilis* trHbO como molde, y alineando con cinco secuencias de trHb pertenecientes al grupo II de esta subfamilia, con el programa ClustalX (Fig. 6.3). Las proteínas seleccionadas para realizar el alineamiento fueron: *Mycobacterium tuberculosis* (*Mt*-trHbO), *Bacillus subtilis* (*Bs*-trHbO), *Geobacillus stearothermophilus* (*Gs*-trHbO), *Termobifida fusca* (*Tf*-trHbO) y *Shewanella oneidensis* (*So*-trHbO). Las primeras cuatro presentan estructuras cristalográficas e incluso fueron simuladas durante la presente Tesis, mientras que la última fue incluida en el alineamiento por poseer el extremo N terminal similar al que posee *Ph*-trHbO. La identidad de secuencias entre estas proteínas y la *Ph*-trHbO es: 34%, 37%, 34%, 33% and 39%, respectivamente.

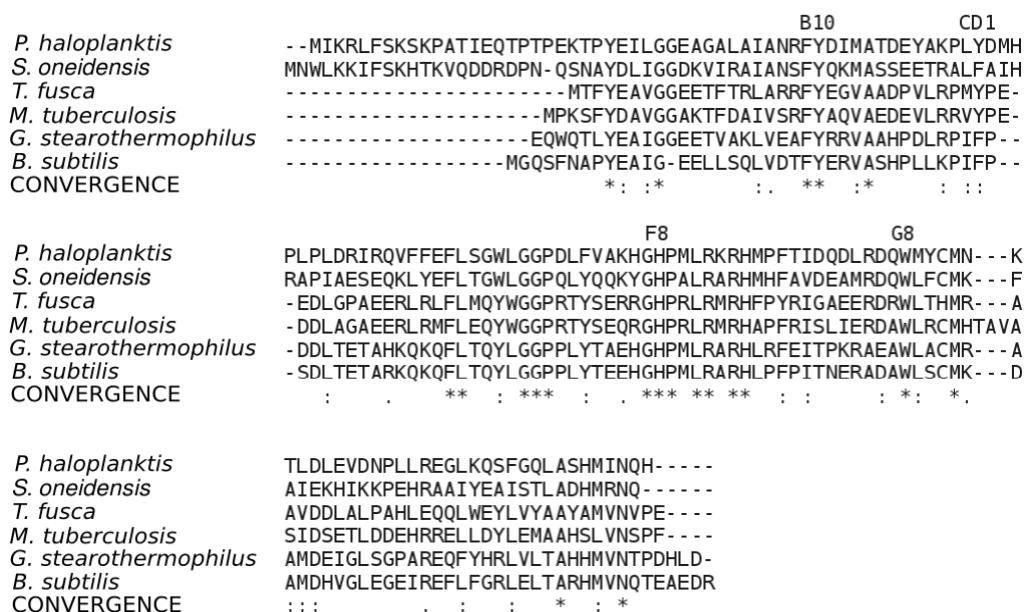


Figura 6.3.- Alineamiento entre la la Hemoglobina Truncada de *P. haloplanktis* y diferentes miembros del grupo II de la misma subfamilia de proteínas. Se destacan posiciones conservadas: B10, CD1, F8, G8.



En este modelo los residuos conservados ocupan sus posiciones habituales: TrpG8, TyrB10, HisF8, LeuE15, LeuE11, TyrCD1, tal como fue propuesto por Wittenberg et al. <sup>11</sup> y confirmado por Vuletich<sup>9</sup> para el grupo II. Este modelo mostró una vez más que el residuo localizado en la posición CD1 es una tirosina (TyrCD1), mientras que la histidina postulada para encontrarse dicha posición se encuentra en la posición CD4, con su cadena lateral hacia el solvente (Fig. 6.4). Esta histidina parecería tener ahora un rol casi despreciable respecto de los procesos que ocurren en el sitio activo, mientras que la TyrCD1 se encuentra en una posición crucial, cercano al átomo de Fe .

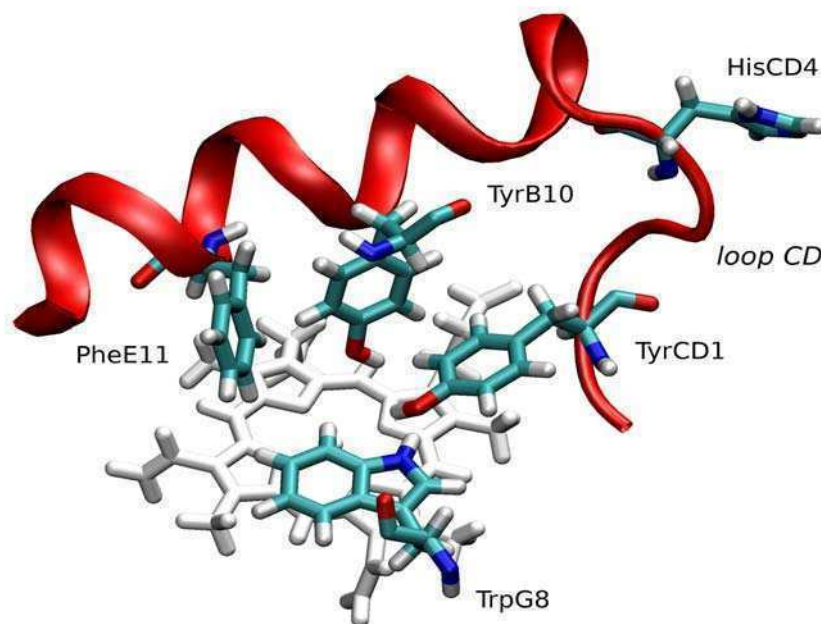


Figura 6.4.- Detalle del sitio activo del modelo de Ph-trHbO luego de simulaciones de dinámica molecular. En medio se destaca el grupo hemo, y alrededor los residuos del sitio activo: PheE11, TrpG8, TyrB10 y TyrCD1. También se muestra la hélice E (rojo), y la HisCD4.

*Simulaciones de Dinámica molecular:* Como mencionamos previamente el modelo más estable fue sometido a 40ns de Dinámica molecular clásica, que fueron analizadas para encontrar el o los posibles residuos involucrados en la hexacoordinación endógena. El modelo resultó ser estable durante los 40ns de simulación, como muestran los resultados de la desviación cuadrática media para este sistema (Fig. 6.5).

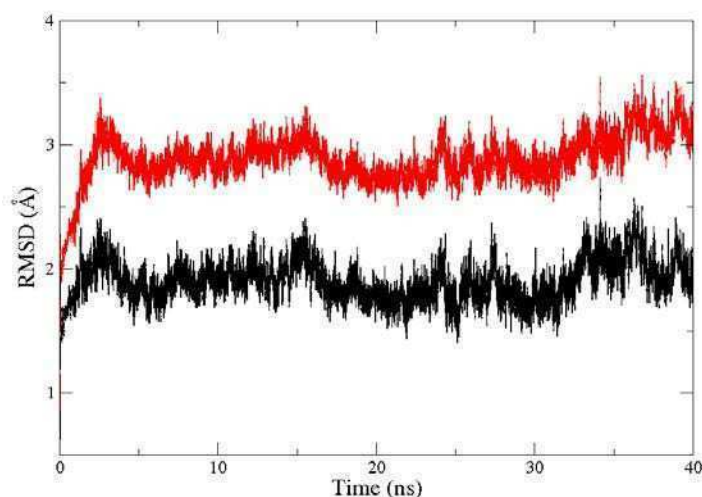


Figura 6.5.- Desviación cuadrática media (RMSD) del backbone (negro) o del total de la proteína (rojo) a lo largo de la dinámica molecular para Ph-trHbO.

El análisis de la dinámica del sitio activo de esta proteína mostró que TyrCD1 y la TyrB10 pueden acercarse al Fe lo suficiente como para poder formar un enlace de coordinación con él (Fig. 6.6). Dado que en este caso las simulaciones son clásicas (donde, en principio, no es posible la formación de enlaces covalentes) la formación del enlace entre las tirosinas y el Fe nunca se dará. Pero la simulación nos muestra que la proteína posee la flexibilidad suficiente como para acercar los residuos al hemo. El hecho de que en una simulación clásica, un residuo se acerque hasta  $\sim 3 \text{ \AA}$  del átomo de hierro (Fig. 6.6 *línea negra*), es evidencia muy fuerte de una interacción entre este residuo y el FeIII del hemo. Sumado a esto, las tirosinas fueron simuladas con el protón del oxhidrilo. Por lo tanto, aún sin la carga del fenolato (que es la especie que finalmente se coordinará al FeIII), las tirosinas lograron acercarse al Fe.

Los resultados anteriormente descriptos son evidencia suficiente para postular a la TyrCD1 y a la TyrB10 como responsables de la hexacoordinación interna que presenta esta proteína, cuando se encuentra oxidada (FeIII).

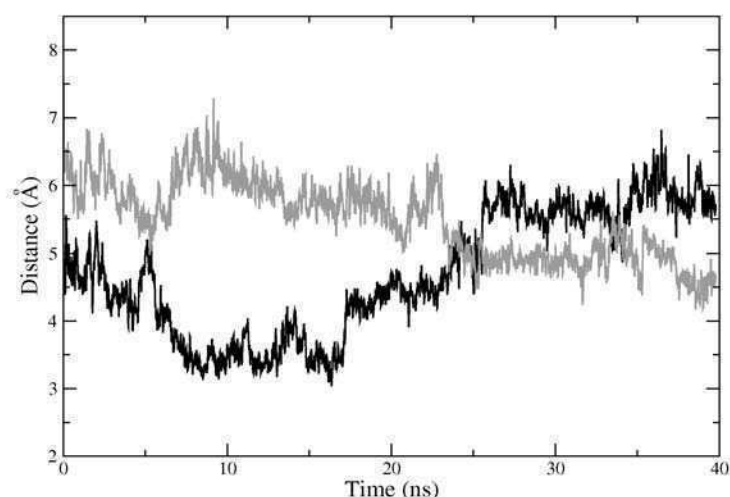


Figura 6.6.- Distancias entre el átomo de Fe y los oxígenos de las TyrCD1 (negro) y TyrB10 (gris), durante los 40ns de simulación de dinámica molecular clásica.

*Hexacoordinación endógena:* Para confirmar si estas dos tirosinas pueden coordinarse al hemo, se realizaron simulaciones donde se coordinaron alternativamente las dos tirosinas (TyrCD1 y TyrB10) al átomo de FeIII. Se realizaron 20ns de simulaciones de dinámica molecular de cada una de las nuevas estructuras, para estudiar la estabilidad de las mismas. En ambos casos las tirosinas fueron unidas en forma de tirosinatos, utilizando los parámetros obtenidos de los cálculos de mecánica cuántica (Fig. 6.1). Tal como lo muestran los análisis de RMSD (Fig. 6.7), ambas estructuras son muy estables durante el tiempo de simulación, confirmando que ambas tirosinas pueden coordinarse alternativamente al átomo de Fe del grupo hemo.

Las simulaciones ofrecieron información adicional acerca de la estructura dinámica del sitio activo: cuando la TyrCD1 se coordina al Fe, el TrpG8 forma un puente de H con ella, mostrando una vez más la importancia de este residuo en esta subfamilia de proteínas (Fig. 6.8). Por otro lado, cuando la TyrB10 se coordina al Fe, se observa una interesante red de puentes de H entre el TrpG8, la TyrCD1 y la TyrB10 coordinada (Fig. 6.9).

Ambas tirosinas coordinadas (FeIII-TyrCD1 y FeIII-TyrB10) presentan entornos diferentes, que generan dos conformaciones bien diferenciadas.

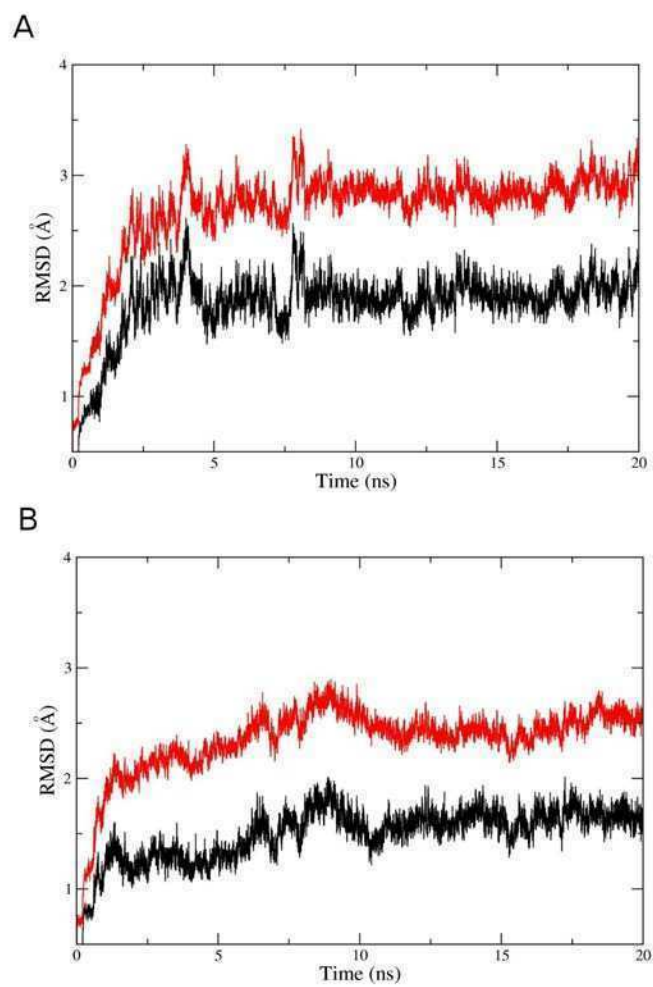


Figura 6.7.- Desviación cuadrática media (RMSD) de la cadena principal (negro) o del total de la proteína (rojo) a lo largo de la DM para los diferentes sistemas: a) Ph-trHbO con la TyrCD1 coordinada al Fe. b) Ph-trHbO con la TyrB10 coordinada al Fe.

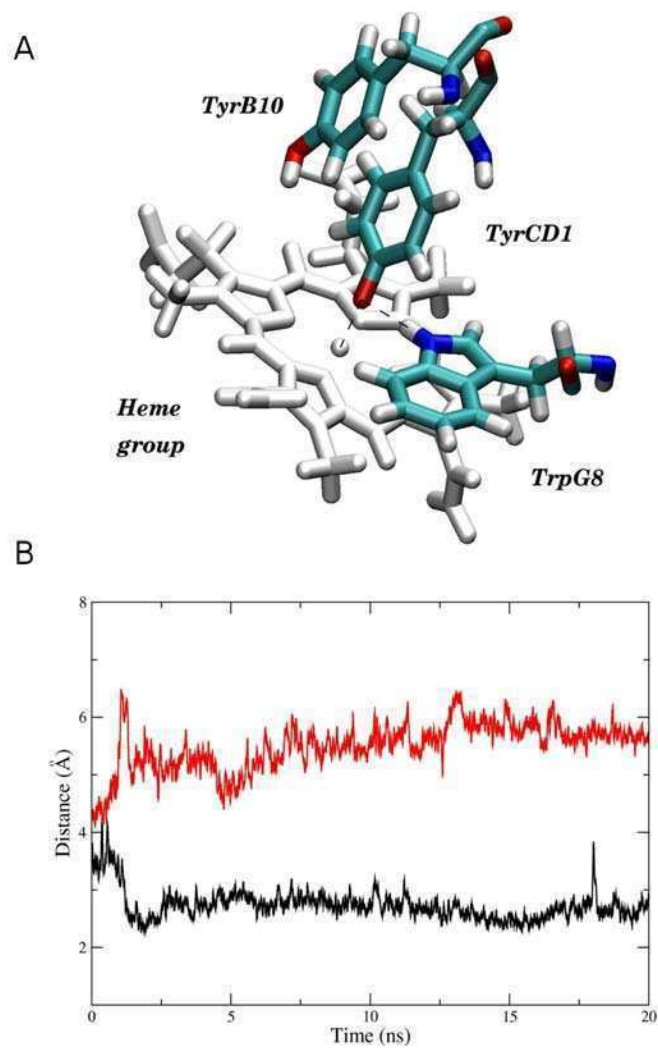


Figura 6.8.- a) Estructura del sitio activo de la Ph-trHbO cuando la TyrCD1 se coordina al Fe. b) Distancias entre el hidrógeno del Ne del TrpG8 y el oxígeno hidroxílico de la TyrCD1 (negro), y el hidrógeno hidroxílico de la TyrB10 y el oxígeno hidroxílico de la TyrCD1 (rojo).

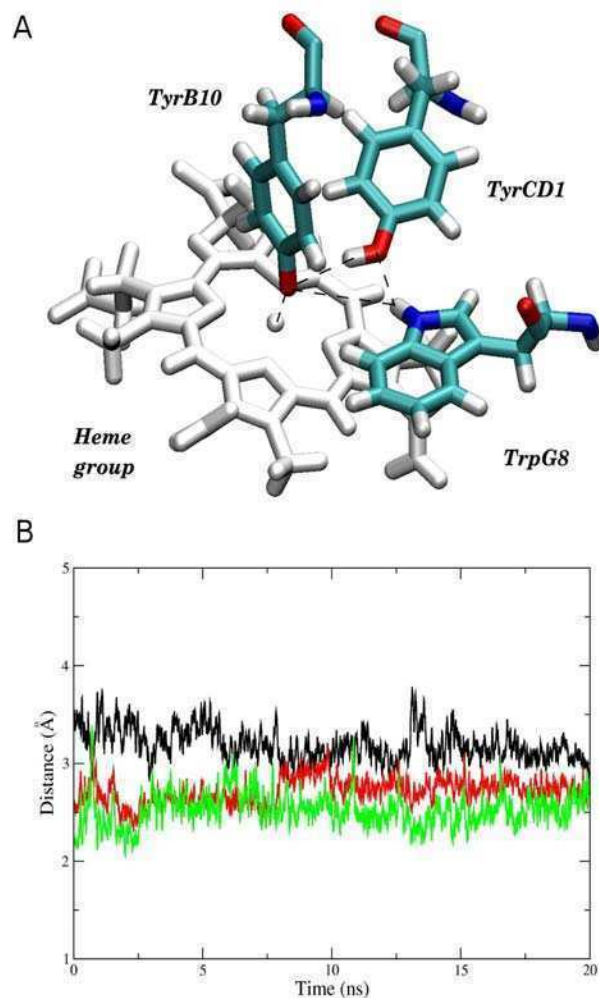


Figura 6.9.- a) Estructura del sitio activo de la Ph-trHbO cuando la TyrB10 se coordina al Fe. Se observa el pte de H entre la TyrB10, el TrpG8 y la TyrCD1. b) Distancias entre los ptes de H que se forman entre la TyrB10 y el TrpG8 (negro), la TyrB10 y la TyrCD1 (rojo), y el TrpG8 con la TyrCD1, durante la escala de tiempo de la simulación.

### Conclusión:

Los resultados de las simulaciones se encuentran fuertemente de acuerdo con los resultados experimentales de UV, Raman Resonante, EPR y cinéticos, donde se observan dos poblaciones diferentes de hexacoordinación endógena de bajo spin. En particular los resultados de la espectroscopía Raman Resonante reconocen la presencia de R-O<sup>-</sup>, como responsables de la doble hexacoordinación, que coincide con nuestra propuesta de TyrB10 y TyrCD1 coordinadas al Fe<sup>III</sup> con diferente entornos en cada caso. Por lo tanto, las simulaciones junto con los resultados

experimentales, realizados por los grupos colaboradores, permiten concluir que ambas tirosinas (TyrCD1 y TyrB10), participan alternativamente de la hexacoordinación endógena que experimenta esta proteína psicrófila cuando se encuentra en estado férrico. Ambos residuos presentan diferente entorno cuando se encuentran coordinados, lo que permite explicar las dos conformaciones que se observan en los resultados experimentales.

Esta proteína tiene particularidades respecto de las demás Hemoglobinas Truncadas estudiadas. Por un lado, es la primera hemoproteína reportada que presenta alternativamente dos residuos capaces de formar hexacoordinación endógena, y por el otro posee una anorme flexibilidad en los residuos del sitio activo, que le permite acercar las tirosinas alternativamente al hemo. Esta última característica ha sido ampliamente reportada para proteínas pertenecientes a organismos adaptados a las temperaturas extremas.

El siguiente artículo, donde se encuentran todos los resultados explicados en el presente capítulo, fue publicado en conjunto con los resultados experimentales:

- Howes BD, Giordano D\*, Boechi L\*, Russo R, Mucciacciaro S, Ciaccio C, Sinibald F, Fittipaldi M, Martí MA, Estrin DA, di Prisco G, Coletta M, Verde V, and Smulevich G. **The Peculiar Heme Pocket of the 2/2 Hemoglobin of Antarctic cold-adapted *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125**. *JBIC*. 2010 16(2):299-311.

\*These authors contributed equally to this work

### Discusión:

Es bien conocido que en los casos donde no existe gran cantidad de inserciones o deleciones en la secuencia, la estructura de los modelos depende casi exclusivamente del alineamiento. Aún ligeras modificaciones en el alineamiento de algunos residuos modifica drásticamente el modelo. En nuestro caso, cambios sutiles en los alineamientos de secuencia, generaron modelos ligeramente diferentes, pero que poseían comportamientos completamente diferentes en las simulaciones de dinámica molecular. El cambio en la posición de un residuo en el alineamiento, significó que la proteína pierda estabilidad en los primeros nanosegundos de simulación, o que permnezca 40ns estable.

Por todo esto, consideramos que diferentes alineamientos deben ser realizados, utilizando la bibliografía y el conocimiento propio que se tiene de la familia de proteínas a modelar, además de

los resultados que arrojan los programas. Además de esto, creemos que la construcción de modelos 3D y simulaciones de dinámica molecular debe realizarse para confirmar los resultados de los alineamientos, y así concluir respecto de la estructura del sitio activo de una determinada proteína.

Si bien no se ha entrado en detalle sobre los diferentes alineamientos, modelos y simulaciones realizadas, la cantidad total de simulaciones realizada ha sido elevada. La construcción de un *buen* modelo tridimensional resulta costosa computacionalmente, pero los tiempos se aceleran si uno posee un amplio conocimiento del sistema a modelar.

### Referencias:

1. Lecomte JTJ, Vu BC, Falzone CJ. Structural and dynamic properties of *Synechocystis* sp. PCC 6803 Hb revealed by reconstitution with Zn-protoporphyrin IX. *J. Inorg. Biochem.* 2005;99(8):1585-1592.
2. Vergara A, Franzese M, Merlino A, et al. Structural Characterization of Ferric Hemoglobins from Three Antarctic Fish Species of the Suborder Notothenioidei. *Biophys J.* 2007;93(8):2822-2829.
3. Pesce A, De Sanctis D, Nardini M, et al. Reversible hexa- to penta-coordination of the heme Fe atom modulates ligand binding properties of neuroglobin and cytoglobin. *IUBMB Life.* 2004;56(11-12):657-664.
4. Giordano D, Parrilli E, Dettai A, et al. The truncated hemoglobins in the Antarctic psychrophilic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Gene.* 2007;398(1-2):69-77.
5. Parrilli E, Giuliani M, Giordano D, et al. The role of a 2-on-2 haemoglobin in oxidative and nitrosative stress resistance of Antarctic *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Biochimie.* 2010;92(8):1003-1009.
6. Sali A, Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 1993;234(3):779-815.
7. Tatusova TA, Madden TL. BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999;174(2):247-250.
8. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(24):4876-4882.
9. Vuletich DA, Lecomte JT. A Phylogenetic and Structural Analysis of Truncated Hemoglobins. *J Mol Evol.* 2006;62(2):196-210.



10. Milani M, Pesce A, Nardini M, et al. Structural bases for heme binding and diatomic ligand recognition in truncated hemoglobins. *J. Inorg. Biochem.* 2005;99(1):97-109.
11. Wittenberg JB. Truncated Hemoglobins: A New Family of Hemoglobins Widely Distributed in Bacteria, Unicellular Eukaryotes, and Plants. *Journal of Biological Chemistry.* 2001;277(2):871-874.

## Capítulo 7. Conclusiones Generales

Las herramientas computacionales han mostrado ser muy poderosas para comprender fenómenos microscópicos. Por un lado, permiten interpretar mejor los resultados experimentales para comprender microscópicamente los fenómenos observados, y por el otro, permiten predecir resultados de forma veloz y confiable.

En nuestro caso llegamos a conocer el rol de residuos críticos altamente conservados en esta familia. Inclusive, parecería posible realizar ciertas mutaciones puntuales para quitarle o darle una determinada función a una proteína de esta familia. Claro que sería necesario en estos casos, realizar mediciones experimentales *in-vitro*, y sobre todo *in-vivo* de estas proteínas mutantes.

Los cálculos de energía de unión nos enseñaron que es necesario acudir inicialmente a cálculos de dinámica molecular de forma de mapear el espacio de configuraciones de la proteína, para poder evaluar todas las conformaciones posibles, y así sacar conclusiones adecuadas.

Hemos mostrado además, que la combinación de simulaciones computacionales y experimentos biofísicos, es sumamente útil para alcanzar el grado de detalle y credibilidad necesarios en la ciencia actual.

Por otro lado, al estudiar diferentes miembros de una misma familia, es posible alcanzar una visión más global de la estructura, dinámica y reactividad de estas proteínas. Sabiendo que la estructura se encuentra altamente conservada en miembros de la misma familia, resulta crucial tener un sólido conocimiento acerca del conjunto, para poder extrapolar cuidadosamente los fenómenos encontrados en uno de sus miembros, al resto de la familia.

El objetivo final de la presente tesis ha sido contribuir a la comprensión de las bases moleculares que operan en las globinas, para llegar a comprender algún día los mecanismos que regulan la reactividad en todas las proteínas. El contraste de nuestras simulaciones con resultados experimentales, nos permitió alcanzar un mayor grado de confiabilidad en los resultados obtenidos, así como poner a prueba los modelos utilizados para continuar mejorándolos continuamente.



## Capítulo 8. Apéndice.

### Convergencia de las simulaciones clásicas:

Una forma de evaluar la estabilidad de los sistemas sometidos a simulaciones clásicas, consiste en evaluar las fluctuaciones medias del sistema (RMSD) en función del tiempo de simulación. Típicamente este parámetro alcanza valores de entre 1-2 Å durante la fase de termalización y equilibración, y en caso de mantenerse sin demasiadas fluctuaciones alrededor de ese número, diremos que la simulación es estable. Las figuras 8.1, 8.2, 8,3 y 8.4 muestran los RMSD para la Bs-trHbO, Tf-trHbO con HS<sup>-</sup>, Tf-trHbO con F<sup>-</sup>, y mioglobina respectivamente.

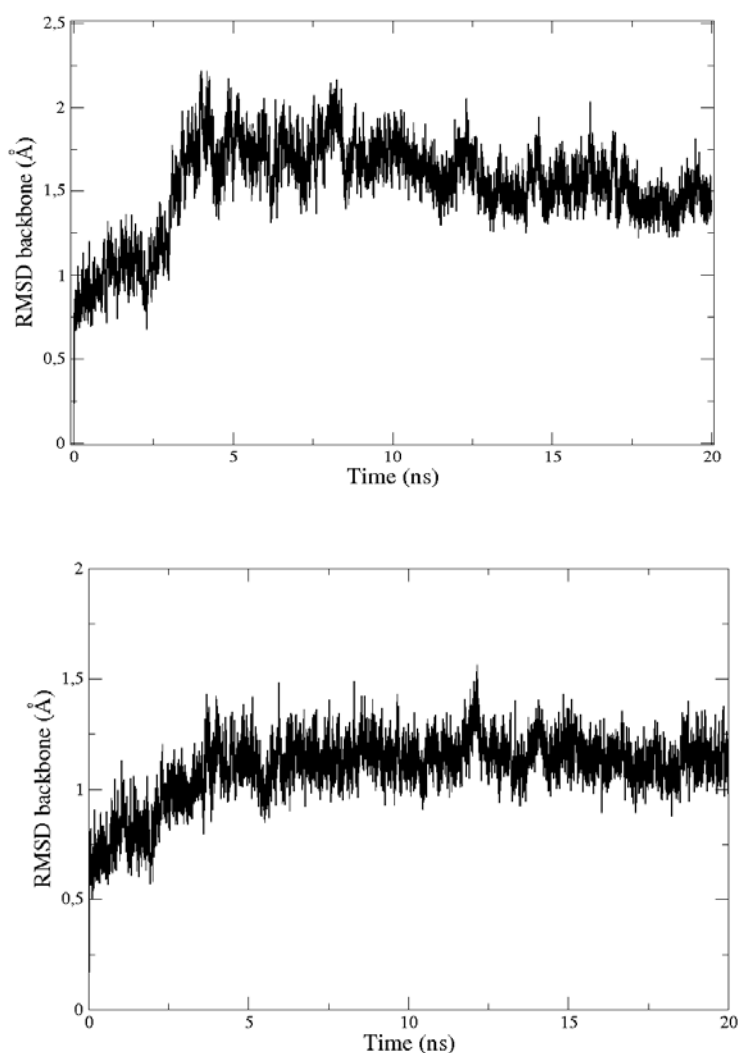


Figura 8.1.- RMSD de backbone de la Bs-trHbO en función del tiempo de simulación (20ns).

*Arriba:* proteína wild type carboxigenada. *Abajo:* proteína wild type oxigenada.

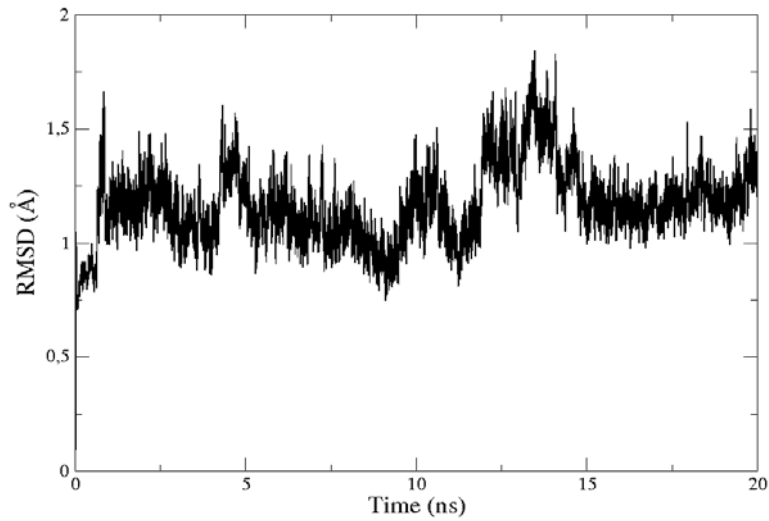


Figura 8.2.- RMSD del backbone de la Tf-trHbO con  $\text{SH}^-$  coordinado al  $\text{FeIII}$  en función del tiempo de simulación (20ns). Las simulaciones corresponden a la proteína wild type (negro), y a diferentes proteínas mutantes: TyrB10->Phe (rojo), TrpG8->Phe (verde), TrpG8->Phe/TyrCD1->Phe (azul), y TrpG8->Phe/TyrCD1->Phe/TyrB10/Phe (marrón)

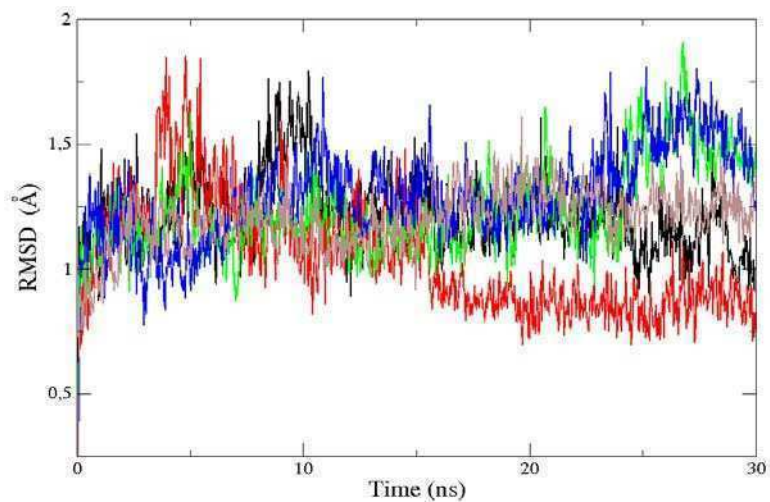
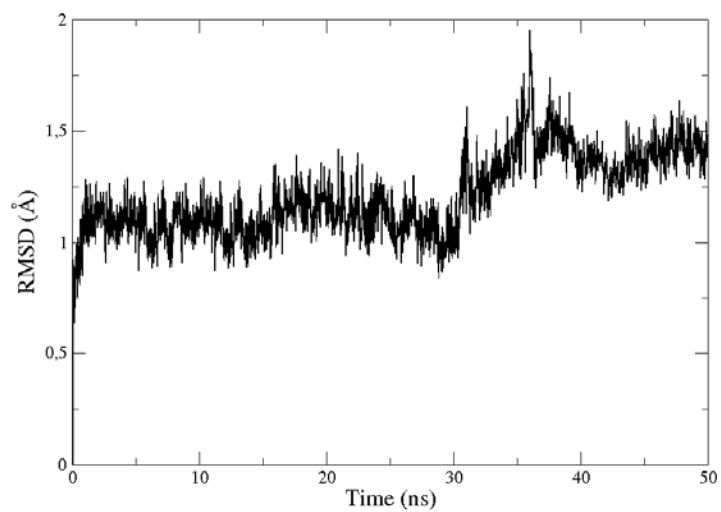
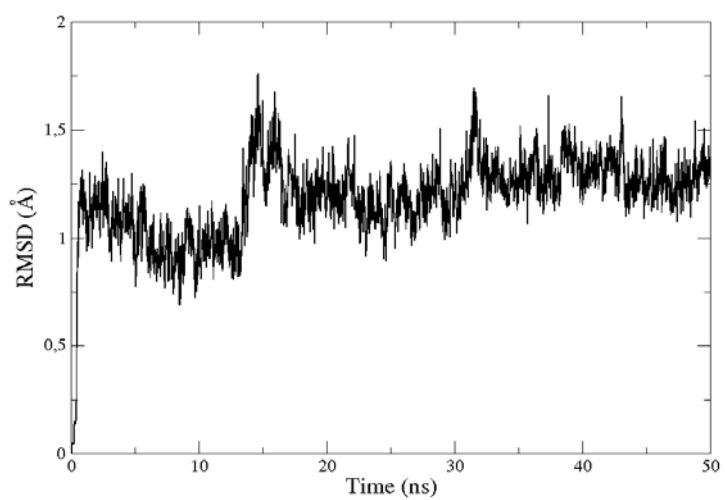


Figura 8.3.- RMSD del backbone de la Tf-trHbO con  $\text{F}^-$  coordinado al  $\text{FeIII}$  en función del tiempo de simulación (30ns). Las simulaciones corresponden a la proteína wild type (negro), y a diferentes proteínas mutantes: TyrB10->Phe (rojo), TrpG8->Phe (verde), TrpG8->Phe/TyrCD1->Phe (azul), y TrpG8->Phe/TyrCD1->Phe/TyrB10/Phe (marrón)

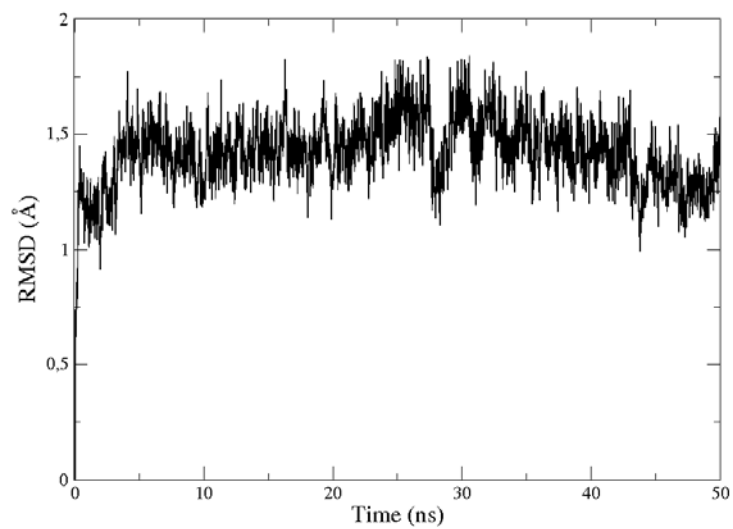
a)



b)



c)



d)

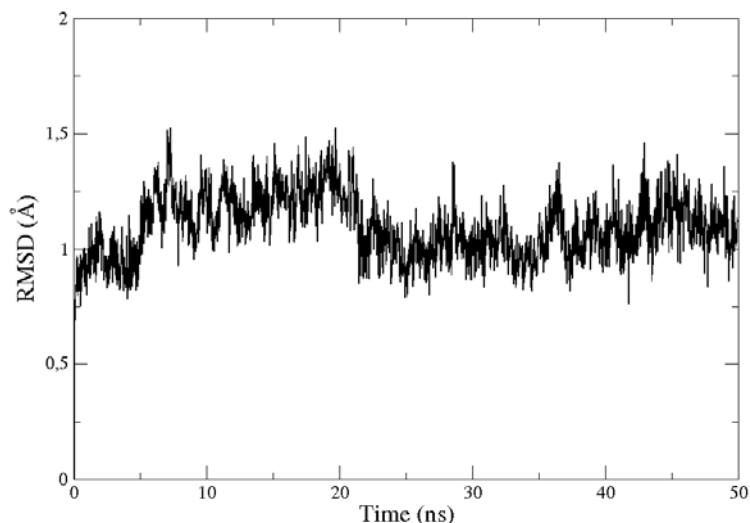
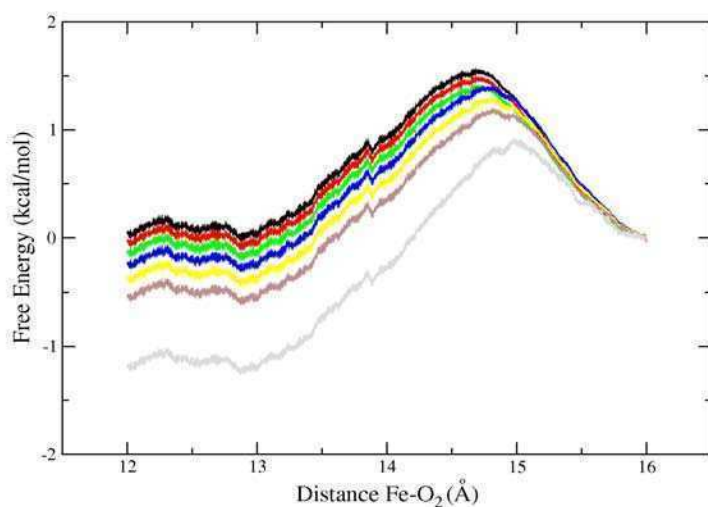


Figura 8.4.- RMSD del backbone de la mioglobina en función del tiempo de simulación (50ns), con la HisE7: a) en su tautómero  $\epsilon$ , b) con el tautómero  $\delta$ , c) con la HisE7 protonada, y d) la mutante Asp142->Ala.

### Perfiles de energía libre:

Una forma de mostrar la convergencia de los resultados de los perfiles de energía libre utilizando el método de Jarzynski consiste en realizar promedios seriados de los diferentes trabajos (W) obtenidos. Se realiza el promedio de Jarzynski sobre 5 trabajos escogidos al azar, luego sobre 10, luego sobre 15, y así hasta obtener convergencia. Se ejemplificará con el caso de Bs-trHbO wild type (Fig. 8.5) y la Bs-trHbO mutante GlnE11->Leu (Fig. 8.6), a través del *canal largo* de esta proteína.



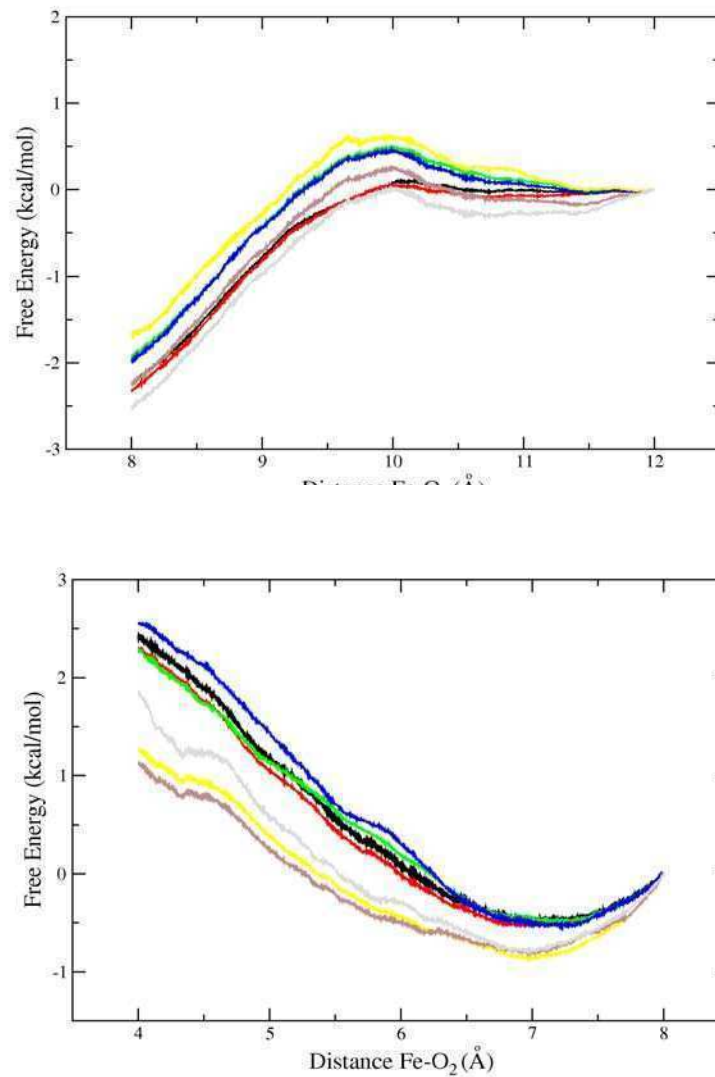


Figura 8.5.- Promedios de Jarzynski para trabajos (W) correspondientes a la migración de oxígeno a través del *canal largo* en la Mt-trHbO wild type. *Arriba*: desde 16Å hasta 12Å. *Medio*: desde 12Å hasta 8Å. *Abajo*: desde 8Å hasta 4Å. Se promediaron 5 (gris), 10 (marrón), 15 (amarillo), 20 (azul), 25 (verde), 30 (rojo), o 35 (negro) trabajos en cada caso.



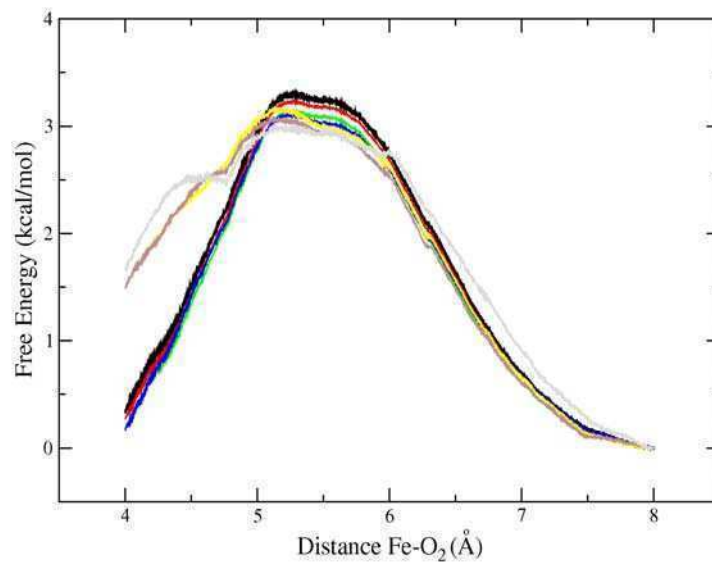
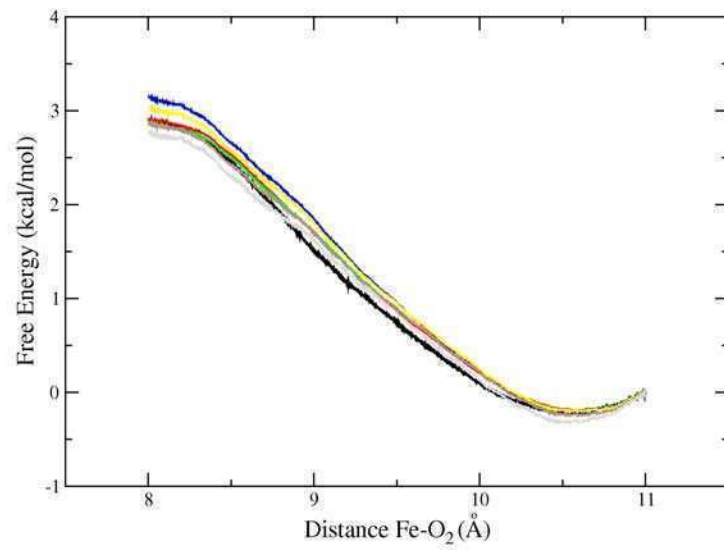


Figura 8.6.- Promedios de Jarzynski para trabajos (W) correspondientes a la migración de oxígeno a través del *canal largo* en Mt-trHbO mutante GlnE11->Leu. *Arriba*: desde 11Å hasta 8Å. *Abajo*: desde 8Å hasta 4Å. Se promediaron 5 (gris), 10 (marrón), 15 (amarillo), 20 (azul), 25 (verde), 30 (rojo), o 35 (negro) trabajos en cada caso.

Parámetros utilizados en las simulaciones clásicas:

Sistema	Atomo	Carga (e <sup>-</sup> )
His-Hem(FeII)-O <sub>2</sub>	FE	0,37
	O1	-0,17
	O2 *	-0,34
His-Hem(FeII)-CO	FE	0,25
	C	0,28
	O	-0,23
His-Hem(FeIII)-SH <sup>-</sup>	FE	0,37
	SH	-0,24
	HS	0,08
His-Hem(FeIII)-F <sup>-</sup>	FE	0,21
	F <sup>-</sup>	-0,36
His-Hem(FeIII)-TyrO <sup>-</sup>	Fe	0,05
	O	-0,24

\* O2 corresponde al átomo de O más lejano al hemo.

Sistema	Atomos involucrados	Angulo de equilibrio (°)	Constante (kcal/mol rad <sup>2</sup> )
His-Hem(FeII)-O <sub>2</sub>	FE-O-O	121	35
His-Hem(FeII)-CO	FE-C-O	180	35
His-Hem(FeIII)-SH <sup>-</sup>	FE-S-H	100	36.5
His-Hem(FeIII)-F <sup>-</sup>	N*-FE-F	90	44
His-Hem(FeIII)-TyrO <sup>-</sup>	Fe-O-C	133	20

\* El átomo N pertenece a los pirroles del hemo que coordinan al Fe.

## Simulaciones de los diferentes modelos de Ph-trHbO:

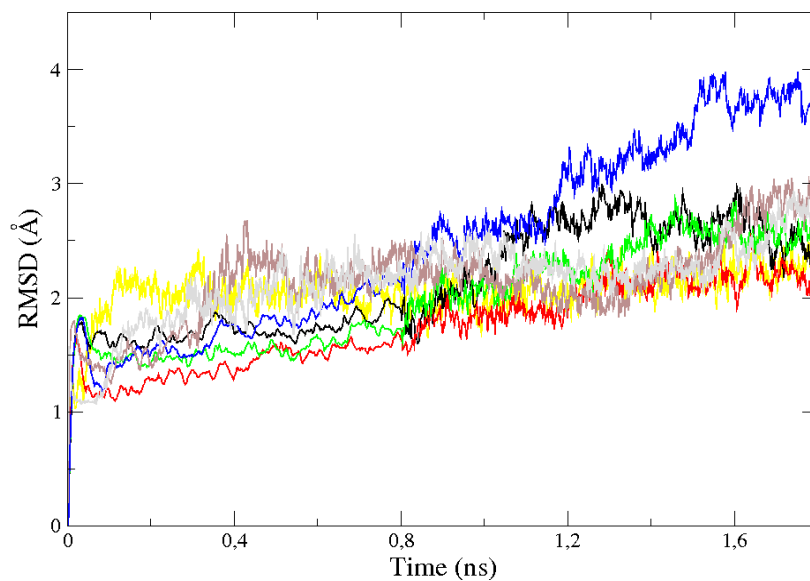


Figura 8.7.- RMSD del backbone de la Ph-trHbO en función del tiempo de simulación. En diferentes colores se muestran los diferentes modelos construidos. Si bien el tiempo simulado fue diferente para cada modelo, el gráfico se truncó en 1,8ns para lograr mayor claridad.

## Actividades complementarias

Paralelamente al trabajo de tesis, se llevaron a cabo otros proyectos de investigación que no fueron presentados en los capítulos anteriores, por exceder al plan de trabajo propuesto. Sin embargo, dado que todos ellos contribuyeron a mi formación profesional, considero importante mencionarlos aunque sea de forma breve.

### Otras publicaciones

- *Moreno DM, Martí MA, De Biase PM, Estrin DA, Demicheli V, Radi R, and Boechi L\*. **Exploring the molecular basis of human manganese superoxide dismutase inactivation mediated by tyrosine 34 nitration** *Arch. Biochem Biophys* 2010. (En prensa)*

\* *Corresponding Author*

- Boechi L, Martí MA, Vergara A, Sica F, Mazzarella L, Estrin DA, Merlino A. **Protonation of Histidine 55 affects the oxygen access to heme in the alpha chain of the Root effect hemoglobin from the Antarctic fish *Trematomus bernacchii***. *IUBMLife* 2011 (En prensa)

- Borón I, Russo R, Boechi L, Cheng C, Di Prisco G, Verde C, Estrin DA, Nadra A. **Structure and dynamics of Antarctic fish neuroglobin assessed by computer simulation**. *IUBMLife* 2011 (En prensa)

- Giordano D, Boechi L, Vergara A, Martí MA, Samuni U, Dantsker D, Grassi L, Estrin DA, Friedman JM, Mazzarella L, di Prisco G, Verde C. **The hemoglobins of the sub-Antarctic fish *Cottoperca gobio*, a phylogenetically basal species oxygen-binding equilibria, kinetics and molecular dynamics**. *FEBS J.* 2009;276(8):2266-77.

- Droghetti E, Nicoletti FP, Bonamore A, Boechi L, Arroyo Mañez P, Estrin DA, Boffi A, Smulevich G, and Feis A. **Heme pocket structural properties of a bacterial truncated hemoglobin from *Thermobifida fusca***. *Biochemistry.* 2010. 14;49(49):10394-402.

- Forti F, Boechi L, Estrin DA, Martí MA. **Combining Implicit ligand sampling (ILS) with Multiple Steered Molecular Dynamics (MSMD) to study ligand migration processes in heme proteins** *JCC* 2011 (En prensa)

- Forti F, Boechi L, Bikiel D, Martí MA, Nardini M, Bolognesi M, Estrin DA and Luque FJ. **Small molecule migration in *Methanosarcina Acetivorans* Protoglobin: Effect of ligand binding and quaternary structure** (Enviado a *Proteins*)

## Revisiones:

Junto con miembros de nuestro grupo y de grupos colaboradores, se escribieron algunas revisiones (review) que se listan a continuación:

- Arroyo-Mañez P, Bikiel D, Boechi L, Capece L, Di Lella S, Martí MA, Moreno DM, Nadra A, Petruk A and Estrin D. **Proteins dynamics and ligand migration interplay as studied by computer simulation.** *Biochem. Biophys Acta.* 2010 (En prensa)

- Arroyo-Mañez P, Boechi L, Bikiel D, Capece L, Nadra AD, Forti F, Bidon-Chanal A, Luque FJ, Marti MA, and Estrin DA. **Structure, Dynamics, and Reactivity of Heme-Proteins from the Globin Superfamily Investigated through Computer Simulation.** *A chapter in Hemoglobin: Recent Developments and Topics.* 2010 (En prensa)

- Bikiel DE, Boechi L, Capece L, Crespo A, De Biase PM, Di Lella S, Gonzalez Lebrero MC, Marti MA, Nadra AD, Perissinotti LL, Scherlis DA, Estrin DA. **Modeling heme proteins using atomistic simulations.** *Phys Chem Chem Phys.* 2006;8(48):5611-28.

- Martí MA, Crespo A, Capece L, Boechi L, Bikiel DE, Scherlis DA, Estrin DA **Dioxygen affinity in heme proteins investigated by computer simulation.** *J Inorg Biochem.* 2006; 100(4):761-70.

## Mediciones experimentales de constantes cinéticas:

A partir de las investigaciones realizadas con grupos experimentales extranjeros, se decidió a realizar experimentos cinéticos de estas proteínas. Inicialmente, y para evaluar las potencialidades de los equipos a utilizar y de los usuarios involucrados, realizamos mediciones cinéticas conocidas, como las cinéticas de  $k_{on}O_2$ ,  $k_{off}O_2$  y  $k_{on}CO$  de mioglobina de corazón de caballo (HH Myoglobin). Las mediciones fueron realizadas en el equipo de Flash Fotólisis del INQUIMAE/DQIAYFQ bajo la dirección del Prof. Pedro Aramendía, y también en el equipo de Stopped Flow del grupo de Rafael Radi de la Universidad de la República, en la ciudad hermana de Montevideo-Uruguay.

Los resultados encontrados resultaron ser muy similares a los reportados en la bibliografía (Tabla 1), por tal razón decidimos avanzar en el estudio de mediciones de Mt-trHbN mutantes que fueron sintetizadas por grupos colaboradores de la Universidad de Chandigarh, India y de la Universidad de Sheffield, Inglaterra.

**Tabla 1.- Mediciones de constantes cinéticas realizadas en equipos de Stopped Flow y Flash Fotólisis a 20°C y pH=7.4 de mioglobina de corazón de caballo comercial (HH Myoglobin). Se presentan los valores medidos de la proteína wild type junto con los valores reportados en la bibliografía <sup>1</sup>.**

HH Myoglobin	Medido	Reportado
$k_{on} O_2 (M^{-1} s^{-1})$	1,1 10 <sup>7</sup>	1,7 10 <sup>7</sup>
$k_{on} CO (M^{-1} s^{-1})$	8,1 10 <sup>5</sup>	5,1 10 <sup>5</sup>
$k_{off} O_2 (s^{-1})$	15	15
$p50 O_2$	0,911 10 <sup>-6</sup> M	1,364 10 <sup>-6</sup> M.*

\* El valor de  $p50$  reportado fue estimado desde  $p50=1/K_{eq}=k_{off}/k_{on}$

Si bien los resultados son aún muy preliminares, los mismos estarían mostrando que mutaciones en el Canal Largo de la Mt-trHbN no afectan el ingreso del ligando en la proteína (Tabla 2). Este resultado es consistente con los resultados reportados durante los últimos años donde se ha demostrado que el oxígeno ingresa a través del Canal Corto G8 de esta proteína <sup>2</sup>.

**Tabla 2.- Mediciones cinéticas de rebinding de CO realizadas en un equipo de Flash Fotólisis a 20° y pH=7,4 de la proteína Mt-trHbN. En las diferentes mutantes medidas el residuo crítico del Canal Largo (PheE15) fue reemplazado por residuos de diferente tamaño: Ala, Ile y Tyr. Se muestra el valor reportados en la bibliografía para la proteína wild type <sup>1</sup>**

HH Myoglobin	$k_{on} CO (M^{-1} s^{-1})$ medida	$k_{on} CO (M^{-1} s^{-1})$ reportada
Mt-trHbN wt	1,08 10 <sup>7</sup>	0,675 10 <sup>7</sup>
Mt-trHbN PheE15->Ala	0,51 10 <sup>7</sup> – 0,68 10 <sup>7</sup> *	
Mt-trHbN PheE15->Ile	0,49 10 <sup>7</sup>	
Mt-trHbN PheE15->Tyr	0,48 10 <sup>7</sup> – 0,56 10 <sup>7</sup> *	

\* Los dos valores corresponden a dos mediciones independientes.

### Bibliografía

1. Milani M, Pesce A, Nardini M, et al. Structural bases for heme binding and diatomic ligand recognition in truncated hemoglobins. *J. Inorg. Biochem.* 2005;99(1):97-109.
2. Bidon-Chanal A, Martí MA, Crespo A, et al. Ligand-induced dynamical regulation of NO conversion in *Mycobacterium tuberculosis* truncated hemoglobin-N. *Proteins.* 2006;64(2):457-464.

### Estudiantes dirigidos:

Junto con el Prof. Darío Estrin, participé de la dirección de algunos estudiantes de Licenciatura. El primero de ellos, Juan Pablo Bustamante, realizó su tesis *a distancia* mientras concluía sus estudios de Lic. en Bioinformática de la Universidad Nacional de Entre Ríos. Con gran esfuerzo de ambos lados, logramos llevar a cabo su formación, y concluir satisfactoriamente su tesis de licenciatura que fue defendida el 26 de noviembre de 2010 en la ciudad de Oro Verde.

El segundo estudiante es Fernando Martín Boubeta, que se encuentra actualmente cursando la Lic en Química en la FCEyN. Fernando ha participado en el artículo sobre las especies de sulfhídrico del capítulo 2, y en estos momentos se encuentra cursando el “Laboratorio de química” en el DQIAyQF de la FCEyN-UBA.

Por otro lado, participé de diferentes actividades de divulgación dentro de la facultad, como la Semana de las Ciencias, Talleres de Química y Experiencias Didácticas. El objetivo fundamental es lograr que estudiantes de escuelas secundarias se interesen por carreras científicas. Una alumna de estas experiencias, Agustina Petruccelli, realizó una pasantía de 3 meses bajo mi dirección, y en estos momentos se encuentra cursando exitosamente la Licenciatura en Ciencias Químicas de la FCEyN.

### Divulgación de los resultados obtenidos:

Los resultados obtenidos en la presente tesis fueron presentados en forma de *pósters* o *presentaciones orales* en una gran cantidad de conferencias nacionales e internacionales. En algunos casos los resultados se comunicaron en seminarios dictados por invitación, que se listan a continuación:

Università degli studi di Firenze. “*Simulazione computazionale della reattività chimica in emoproteine*”. Julio 2009. Florencia, Italia. (Seminario para estudiantes de doctorado)

Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC). “*Simulaciones Computacionales en hemoproteínas*”. Septiembre 2009. Bogotá, Colombia.

Universidad de Entre Ríos. “*Simulaciones computacionales de hemoproteínas*”. Septiembre 2009. Paraná, Argentina.

University Roma Trè “*Structure and dynamics of TrHb investigated through Computer Simulation*”. Septiembre 2010. Roma Italia. (Seminario para estudiantes de doctorado)

---

## Agradecimientos

En primer lugar quisiera agradecer a los tres jurados: Munir, José y Gustavo, que han aceptado ser jurados de esta tesis, aún teniendo en algunos casos que viajar desde lejos.

A los investigadores del DQIAyQF/Inquimae: Pedro Aramendía, Sara Bari, Fabio Doctorovich, y Daniel Murgida, por haberme brindado todo su apoyo para realizar los experimentos cinéticos. Con enorme paciencia, me han enseñado a manejar en las mediciones experimentales, permitiéndome hacer uso y abuso de los recursos de sus laboratorio. También a Seba, Damián B, Juan y Karina por la ayuda.

Asimismo quisiera agradecerle a los profesores que han dictado con enorme paciencia y entusiasmo los cursos de doctorado: Daniel Laria y Roberto Fernandez Prini.

A Nano y Pablo De Biase por ocuparse desinteresadamente de instalar, mantener y optimizar las facilidades informáticas que tenemos en nuestro laboratorio, y que han hecho posible la realización de todos los cálculos de esta tesis. Porque aunque su trabajo sea silencioso, ya que no existe publicación en la cual quede plasmado este tipo de trabajo, ellos son los responsables de que contemos con las herramientas para que los proyectos se puedan llevar adelante.

A la ANPCyT, al CONICET y a la Universidad de Buenos Aires, por el apoyo en becas, equipamiento y congresos a los que asistí. Al DQIAyQF y al INQUIMAE por el espacio concedido. También a la Unión Europea (FP7) por financiar en gran medida los viajes internacionales realizados.

Alejandra y Alberto por la enorme eficiencia en su trabajo, y por lo necesario que esto resulta para llevar adelante los proyectos.

Quisiera agradecer a todos los grupos extranjeros que amablemente me recibieron en las pasantías que realicé en sus laboratorios: Cinzia Verde y Guido Di Prisco (Nápoles-Italia), Javier Luque (Barcelona-España), Adrián Roitberg (Gainesville-USA), Rafael Radi (Montevideo-Uruguay), Giulietta Smulevich (Florencia-Italia), Robert Poole (Sheffield-Inglaterra).

A Mehrnoosh por las incansables traducciones hacia y desde el inglés. Por el diseño de pósters, presentaciones, y por todos los colores que nacieron.

A mis directores, Darío y Marcelo por la paciencia, el apoyo, la confianza, el cariño y el mundo que abrieron ante mí.

A mis dos compañeros de tesis: Lula y Santiago, por todos los hermosos momentos compartidos, por la amistad que nos une, y por haber sido siempre mejores que yo.



A Damián Sherlis por ser una ayuda constante y presente. A Pau por todo el trabajo que hemos hecho juntos. A Vero, Laura, Ezequiel, Stefie, Diego G., Diego M., Pablo, Nano, Adrián T, Matías, Mija, Ariel, Charly, Dardo, Fer, Uriel, Diego H, Flavio Forti, Lucía, Nacho, Ale Nadra...en síntesis, a todos los que pertenecieron durante estos años a este tren imparable del Grupo de Modelado Molecular.

También fuera del ámbito de la facultad quisiera agradecer a toda mi familia desplegada por Flores, Ciudad Jardín y Rafaela. Y en particular a mis sobrinos/as por haber abierto este nuevo mundo que nos toca vivir desde que llegaron.

A mis amigos: Fatu, Jaime, Pecker, Paz, Negro, Chuky, Pichi, Pandy, Gato, Sergio, Fer, Agus, Carina. Por soportarme, por quererme, por todas las maldades que hemos hecho juntos, las aventuras, los peligros, las alegrías y tristezas. Y en especial, porque los voy a extrañar cuando este lejos.

A mi abuela por todo el alimento y el apoyo en estos años de universidad, y por esa necesidad imperiosa de que su nieto sea doctor.

Y a la persona más inteligente que conozco, a quien debo todo lo que soy, todo lo que hago y todo lo que represento, y a quien intento imitar todos los días de mi vida: mi mamá.