



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física

**ESTUDIO DE LA REACTIVIDAD DE  
HEMOPROTEINAS Y MODELOS HEMICOS CON  
LIGANDOS PEQUEÑOS**

Trabajo de tesis para optar por el título de Doctor de la Universidad de  
Buenos Aires en el área Ciencias Químicas

**Marcelo A. Martí**

Directores de tesis: Darío A. Estrin  
Fabio Doctorovich

Lugar de trabajo: Departamento de Química Inorgánica, Analítica y  
Química Física, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de  
Buenos Aires. INQUIMAE-CONICET

Buenos Aires, 2006

# ESTUDIO DE LA REACTIVIDAD DE HEMOPROTEINAS Y MODELOS HEMICOS CON LIGANDOS PEQUEÑOS

## Resumen:

Las hemoproteínas (HPs) son un conjunto extenso de enorme relevancia biológica debido a su ubicuidad y diversidad funcional, íntimamente relacionada con la reactividad del grupo hemo. Las características físico-químicas del entorno del hemo dependen de la identidad, orientación y dinámica de los aminoácidos del mismo. La presente tesis tiene como objetivo comprender la relación entre las características del entorno del hemo y la función de la HP. En particular, nos concentraremos en el estudio de la interacción de las HPs con ligandos pequeños como  $O_2$ , NO, CO, y HNO.

Para comprender el funcionamiento de las HPs es necesario conocer primero la reactividad intrínseca del grupo hemo. En esta tesis se aborda este tema a través del estudio experimental de la reactividad de porfirinas aisladas. El segundo tema de esta tesis comprende el estudio, a través de técnicas de simulación computacional (clásicas, cuánticas e híbridas), de la reactividad de diferentes hemoproteínas frente a las especies mencionadas anteriormente.

En este contexto, hemos estudiado los siguientes problemas: i) el mecanismo de reacción de diferentes metalo-porfirinas frente al HNO/NO<sup>-</sup>; ii) la reactividad de una proteína detectora de NO en un medio aerobio; iii) los mecanismos de regulación de la afinidad por oxígeno.

Palabras clave: hemoproteína, porfirina, NO,  $O_2$ , CO, HNO, QM, DFT, QM-MM, Dinámica molecular, cinética, afinidad.

# REACTIVITY OF HEME PROTEINS AND HEME MODELS WITH SMALL LIGAND

Abstract:

Heme proteins are the widely distributed, biologically relevant, functional diverse proteins that contain a heme moiety as a prosthetic group. The function is mainly determined by the heme's chemical reactivity. The physico-chemical characteristics of the heme environment depend on the nature, position and dynamics of its residues. The main goal of this work is to understand the connection between a heme protein function and its heme environment. We will focus on the heme proteins interaction with small ligands, namely O<sub>2</sub>, CO, NO and HNO.

To understand a heme protein function, it is necessary to know the intrinsic reactivity of the heme group. We treat this issue by performing experimental studies of heme models reactivity. In the second place, we face the study of several heme proteins reactivity through computer simulation techniques based on Quantum (QM) or Classical mechanics (MM) or even hybrid approaches (QM-MM).

Specifically, in this work we have studied: i) the reaction mechanism of HNO with several heme models; ii) the chemical reactivity of an NO sensor protein in an aerobic environment, iii) the mechanisms of oxygen affinity regulation.

Keywords: : heme-protein, porphyrin, NO, O<sub>2</sub>, CO, HNO, QM, DFT, QM-MM, Molecular Dynamics, kinetics, affinity.

*A Veronika, Pepe y Kirk.*

*A mamá, papá, Andrea y Javier.*

# ESTUDIO DE LA REACTIVIDAD DE HEMOPROTEINAS Y MODELOS HEMICOS CON LIGANDOS PEQUEÑOS

## Índice

### 1- Introducción 10

El estudio-físico químico de los sistemas biológicos  
Hemoproteínas y química de coordinación  
¿Cómo encarar el problema?  
Simulación computacional a escala molecular  
Simulación computacional de hemoproteínas

### 2- Métodos computacionales: 18

Química teórica de primeros principios  
La ecuación de Schrödinger  
El método de Hartree-Fock  
Teoría del Funcional de la Densidad  
El método SIESTA  
Métodos Basados en la Física Clásica  
Los campos de fuerza clásicos  
Métodos híbridos QM-MM  
Exploración de la superficie de energía potencial  
Referencias

### 3- Reacciones de Nitroxilo con porfirinas de Hierro y Manganeso 46

Introducción  
El nitroxilo y la química biológica  
Reacciones de óxido nítrico con metaloporfirinas  
Objetivos  
Materiales y Métodos  
Reacción de donores de HNO con porfirinas de Fe<sup>III</sup>/Mn<sup>III</sup>  
Obtención de cristales del complejo Fe<sup>II</sup>TPPNO por reacción entre Fe<sup>III</sup>TPPP con SA y TSHA  
Determinación de las constantes de velocidad  
Resultados  
Reacción de los donores de HNO con Fe<sup>3</sup>-Porfirinas  
Reacciones de los Donores de HNO/NO<sup>-</sup> con porfirinas de Mn  
Estudio cinético de las reacciones  
Discusión  
Mecanismos de reacción y cinética comparativa  
Porfirinas de manganeso como atrapantes selectivos de HNO  
Referencias

<b>4- Discriminacion de NO en medio aeróbico: El caso de la sGC</b>	<b>77</b>
Introducción	
El dominio H-NOX y la guanilato ciclasa soluble.	
El mecanismo de acción de la guanilato ciclasa	
El citocromo c' como modelo para la guanilato ciclasa	
La ruptura del enlace hierro-histidina en las hemoproteínas	
¿Son necesarias una o dos moléculas de NO para activar la sGC?	
Desarrollo de las simulaciones	
Resultados y discusión	
Conclusiones	
Referencias	
<b>5- Exploración de las bases moleculares de la regulación de la afinidad por oxígeno en las hemoproteínas.</b>	<b>98</b>
Introducción	
Caracterización de la afinidad por oxígeno en hemoproteínas	
Características de la unión Fe-O <sub>2</sub>	
La afinidad por oxígeno y la diversidad funcional de las hemoproteínas	
Objetivos	
Metodología computacional	
1-Efectos distales- rol de los puentes de hidrógeno.	
Resultados y discusión	
2- Influencia del entorno de la histidina axial: el efecto proximal	
Resultados y Discusión	
3-Efectos dinámicos	
Resultados y Discusión	
Conclusiones	
Referencias	
<b>6- Conclusiones Generales</b>	<b>128</b>
Desde las porfirinas hasta las hemoproteínas.	
El HNO y la química biológica	
Determinación de la afinidad por oxígeno	
Como detectar NO en un ambiente aeróbico	
La simulación computacional como un método emergente para el estudio de las hemoproteínas	
Perspectivas futuras	
La ubicuidad de las globinas y su diversidad funcional	
<b>7- Publicaciones realizadas relacionadas con el tema de tesis</b>	<b>134</b>
<b>8- Agradecimientos</b>	<b>136</b>

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

# Capítulo 1

## Introducción

### El estudio físico-químico de los sistemas biológicos

Todo sistema biológico posee al menos una función. Gran parte del estudio de los sistemas biológicos, consiste por consiguiente en el estudio de sus funciones. Bajo este abordaje funcional, el objetivo del estudio físico-químico de los sistemas biológicos consiste, por lo tanto, en comprender los mecanismos que determinan cómo y en qué condiciones se lleva a cabo la función biológica característica del sistema.

La unidad de la vida es por definición la célula, que consiste en un objeto de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  de longitud característica. Su límite está definido por medio de una membrana que separa su contenido del medio exterior que la rodea. La célula posee diferentes tipos de máquinas macromoleculares, ácidos nucleicos, lípidos, polisacáridos y proteínas. De todas éstas, las proteínas son las que presentan mayor diversidad estructural y funcional, y es por esto que son las responsables de la mayoría de las funciones necesarias para la vida.

Las proteínas son cadenas lineales no ramificadas de aminoácidos, y cada proteína puede entonces ser definida por su secuencia de aminoácidos. A la secuencia ordenada de aminoácidos de una proteína se la conoce también como la estructura primaria de la misma. Todos los aminoácidos poseen en común la región de los grupos funcionales amino y ácido, más una cadena lateral que los caracteriza. Existen en la naturaleza 20 cadenas laterales y por lo tanto 20 aminoácidos naturales diferentes. Los aminoácidos se unen entre sí mediante uniones peptídicas del tipo amida. (Figura 1)



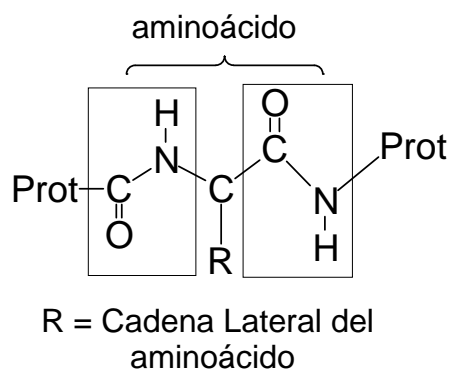


Figura 1. Fórmula general de los aminoácidos en una proteína. Se muestran las uniones peptídicas en los recuadros.

A la cadena continua de uniones peptídicas entre aminoácidos de una proteína se la denomina columna vertebral o “backbone”. Diferentes regiones del backbone adoptan conformaciones espaciales particulares o motivos, estos pueden ser en forma de hélice (hélice- $\alpha$ ), en forma de hoja plana (hoja- $\beta$ ) o sin ningún orden espacial definido (loop). A las regiones de la secuencia que adoptan estos motivos se los conoce como elementos de estructura secundaria. Además, cada proteína adquiere en su medio (agua o en ciertos casos la membrana lipídica) una conformación espacial determinada, que surge del arreglo espacial de las estructuras secundarias y de las orientaciones de las cadenas laterales de los aminoácidos. A esta conformación espacial se la conoce como estructura terciaria. La estructura terciaria de una proteína consiste por lo tanto en el conocimiento de la posición espacial de todos los átomos de la proteína.

La conformación espacial o estructura terciaria de la proteína es, no sólo una propiedad emergente de las características físico-químicas de los aminoácidos que la componen (es decir su secuencia primaria), sino aquella propiedad que regirá las características físico-químicas de la proteína como un todo y por lo tanto determinará su función. Comprender la relación entre la estructura de una proteína y su función es uno de los principales objetivos de la ciencias biológicas hoy en día. Sin embargo, el estudio de las relaciones estructura-función excede el área de las ciencias biológicas y es un campo de investigación multidisciplinario donde conviven y se encuentran la biología, la química y la física. **Uno de los objetivos principales del presente trabajo es comprender desde un punto de vista físico-químico la relación estructura-función de las proteínas, particularmente de las hemoproteínas.**

## Hemoproteínas y química de coordinación

En los últimos años, el estudio del mecanismo de acción molecular de las hemoproteínas ha cobrado un gran auge. Las hemoproteínas (HPs) conforman un conjunto extenso de enorme relevancia biológica, por su diversidad funcional y su ubicuidad. Constituyen el conjunto de proteínas donde el grupo prostético es la protoporfirina IX, denominada comúnmente grupo hemo. El grupo hemo es un monociclo tetrapirrólico aromático con un átomo de hierro coordinado en el centro (Fig 2). El átomo de hierro, debido a su capacidad de encontrarse en diferentes estados de oxidación y coordinación, es el responsable de la reactividad del grupo hemo.

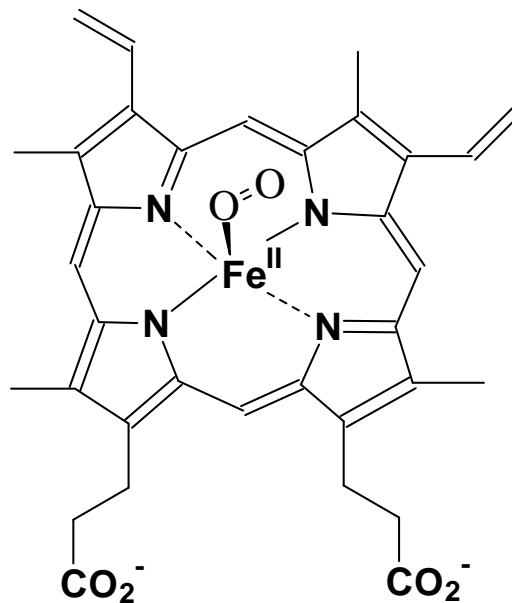


Figura 2. Esquema del grupo hemo coordinado axialmente al oxígeno en su estado ferroso

Una de las características sorprendentes de este grupo de proteínas es que, a pesar de poseer todas el mismo grupo prostético, las HPs realizan una gran variedad de funciones, entre las que podemos citar: la transferencia de electrones (citocromo c), la catálisis de reacciones de óxido reducción sobre sustratos (catalasas, peroxidasas, reductasas, citocromo p450) y el transporte o detección de moléculas pequeñas como el

O<sub>2</sub>, CO u NO. (hemoglobina y mioglobina, guanilato ciclasa soluble, Fix-L, CooA, HemAT).

Como ya mencionamos, la función de una hemoproteína está íntimamente relacionada con la reactividad química del grupo hemo, determinada en gran medida por las propiedades de la química de coordinación del hierro. El hierro en sus estados iónicos estables Fe<sup>2+</sup> y Fe<sup>3+</sup> posee la capacidad de formar 6 enlaces en una geometría del tipo octahédrica. Debido a su ubicación en el plano porfirínico (Figura 1) forma enlaces con cada uno de los cuatro nitrógenos de la porfirina, pudiendo formar además dos enlaces adicionales (axiales), uno a cada lado del plano hémico.

En las hemoproteínas que catalizan reacciones redox sobre sustratos o interaccionan con moléculas pequeñas, uno de estos sitios axiales se encuentra ocupado por un aminoácido. Este aminoácido es denominado generalmente quinto ligando o ligando proximal, y el complejo o la hemoproteína se dice pentacoordinado (5c). Los aminoácidos que comúnmente se ligan axialmente al hierro pueden ser histidinas, cisteínas, metioninas, o tirosinas ya que el átomo unido covalentemente al hierro debe ser electronegativo (O, N o S). Al otro lado del plano se encuentra entonces el denominado sitio distal, que cuando está vacante puede interaccionar con el sexto ligando exógeno. Estas moléculas son generalmente moléculas pequeñas (por ejemplo oxígeno, en el caso de la hemoglobina), que al alojarse en este sitio son modificadas químicamente, o simplemente almacenadas para transporte o uso posterior. También, el ligando al unirse al hemo puede inducir efectos sobre la proteína (cambios de estructura terciaria o conformacionales) que determinan un cambio en la función de la misma. En general si la unión del ligando permite que la proteína realice una función adicional como alguna reacción enzimática, se dice que el ligando activa la hemoproteína en cuestión. En los casos en que la unión del mismo confiere una pérdida de función se dice que el ligando la inhibe. Ejemplos típicos de este comportamiento son la Fix-L, que funciona como una quinasa (transfiere grupos fosfatos del adenosil trifosfato (ATP) a otras proteínas) y es inhibida al coordinar oxígeno, o la guanilato ciclasa que se activa (adquiere la capacidad de ciclar al ATP) al coordinar óxido nítrico. Contrariamente, las hemoproteínas involucradas exclusivamente en el transporte de electrones se encuentran por lo general hexacoordinadas (6c) a dos

aminoácidos de la cadena polipeptídica, uno proximal y uno distal. Un ejemplo es el caso del citocromo c que posee una coordinación His-Fe-Met. Recientemente se han encontrado en mamíferos nuevas hemoproteínas pertenecientes a la familia de las globinas, pero que a diferencia de la hemoglobina o mioglobina se encuentran hexacoordinadas por dos histidinas. La función de estos nuevos miembros de la familia de las globinas (la citoglobina y la neuroglobina) es aún desconocida, aunque los estudios preliminares sugieren que su función estaría relacionada con el oxígeno o el NO.

Son entonces las características diferenciales de los entornos proximal y distal, los que permiten a las hemoproteínas su diversidad funcional. Las características físico-químicas de estos entornos dependen de la identidad, orientación y dinámica de los aminoácidos ubicados en los mismos. Inmersa en este paradigma, la presente tesis tiene como objetivo comprender la relación entre las características físico-químicas de los sitios activos de las hemoproteínas y la función de las mismas. **En particular nos concentraremos en el estudio de la interacción de las hemoproteínas con ligandos pequeños, principalmente el O<sub>2</sub> y el NO, y en menor medida otras moléculas pequeñas relacionadas con ellas (CO, HNO, [NO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, [OONO]<sup>-</sup>, O<sub>2</sub><sup>-</sup> entre otras).**

### ¿Cómo encarar el problema?

Para comprender el funcionamiento de las hemoproteínas es necesario conocer primero la reactividad intrínseca del grupo hemo. El conocimiento detallado de la reactividad del grupo hemo aislado, es el punto de partida para comprender cómo la naturaleza utiliza a la matriz proteica para la regulación fina de la reactividad del hemo con el objetivo de cumplir una determinada función. Para estudiar y comprender la reactividad intrínseca del grupo hemo, se han realizado numerosos estudios sobre la reactividad y estructura de diferentes hemos aislados y metalo-porfirinas sintéticas en solución. En particular se ha estudiado en detalle la reacción de estos sistemas modelos frente al NO, CO, O<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y OONO<sup>-</sup> entre otras especies. **Uno de los temas centrales del presente trabajo es por lo tanto el estudio experimental de la reactividad de porfirinas aisladas. En particular**

**se ha analizado en detalle la reactividad de diferentes metalo-porfirinas frente al HNO/NO<sup>-</sup>.**

El análisis de resultados obtenidos para diversas reacciones con ferro-porfirinas aisladas, y su comparación con los resultados para las mismas reacciones en diferentes hemoproteínas y sus mutantes, sumado al conocimiento estructural de las hemoproteínas, permiten comprender, en una primera aproximación, cuáles son los requerimientos estructurales y las bases físico-químicas que determinan que una hemoproteína dada posea la capacidad de realizar una función en particular. Sin embargo, en muchos casos la información microscópica detallada está fuera del alcance de los métodos experimentales. Para suplir esta deficiencia, en la última década se han utilizado en el estudio de las hemoproteínas diversos métodos basados en la simulación computacional. Estas técnicas se utilizaron inicialmente como herramientas complementarias de los datos experimentales. Sin embargo, en años recientes las mismas han aportado valor agregado a los resultados experimentales con relativo éxito en una variedad de ejemplos. En la actualidad, estos métodos permiten por ejemplo, obtener información estructural, termodinámica, espectroscópica, y dinámica precisa asociada a la función proteica, información que en muchos casos resulta inaccesible por los medios experimentales conocidos.

### Simulación computacional a escala molecular

La simulación computacional consiste en el empleo de modelos matemáticos, implementados en un código o programa de computadora, con el objetivo de realizar predicciones acerca del sistema que se está investigando.

En el caso de sistemas de naturaleza químicos (en la escala atómico-molecular), la simulación computacional se sustenta principalmente en modelos basados en las leyes físico-químicas que rigen el comportamiento de los átomos. Existen dos tipos principales de modelos clasificados según el paradigma físico-químico en el cual estén enmarcados. Hablamos así de simulaciones mecánico-clásicas o mecánico-cuánticas.

En el primer caso cada molécula es descripta como un conjunto de sitios -que representan los átomos- y resortes -que representan los enlaces químicos- junto con un potencial parametrizado *ad hoc*. Este potencial es una función matemática de las coordenadas de los átomos que modela de la manera más precisa posible al sistema real. Este tipo de estudio se aplica básicamente al cálculo de propiedades de sistemas con miles de átomos, como es el caso de las proteínas. Su limitación es que no permite representar una reacción química, ya que, en principio, el modelo excluye la posibilidad de que se formen o rompan enlaces químicos.

Las técnicas basadas en la mecánica cuántica –métodos de estructura electrónica- proporcionan resultados de mayor calidad y permiten analizar procesos en los que hay involucradas reacciones químicas. Sin embargo, su costo computacional es mucho mayor lo que restringe su uso a sistemas de no más de cien átomos. Por eso en la práctica, en el estudio de proteínas por métodos de estructura electrónica, se selecciona un número acotado de átomos (por lo general en proteínas con actividad enzimática sólo el sitio activo es tratado explícitamente). El resto de la proteína se puede incluir empleando una descripción simplificada. En los últimos años se han realizado simulaciones mixtas denominadas híbridas o QM-MM (del inglés *Quantum-mechanical, Molecular Mechanics*), en las cuales el sitio activo es tratado por métodos de estructura electrónica, y el resto de la proteína se describe con potenciales clásicos.

### Simulación computacional de hemoproteínas y hemo modelo

En el estudio de hemoproteínas por simulación computacional se han utilizado tradicionalmente tanto métodos cuánticos como clásicos. Mediante métodos cuánticos es posible predecir la geometría que se espera para los complejos del grupo hemo con NO, CO, O<sub>2</sub> para diferentes estados de oxidación o de espín. Además se pueden obtener energías de unión relativas o analizar la factibilidad de diferentes reacciones asociadas al hierro. Por otro lado, los métodos clásicos permiten analizar las fluctuaciones naturales que se esperan en la conformación de una hemoproteína y como éstas afectan la

interacción con los ligandos. También es posible analizar el movimiento de diferentes residuos o de los mismos ligandos dentro de la proteína.

En general la complejidad y el tipo de reacciones catalizadas por el grupo hemo en las hemoproteínas hace imprescindible el tratamiento mecánico cuántico del mismo en el estudio de las hemoproteínas por técnicas de simulación computacional. Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, en las hemoproteínas es la matriz proteica la que regula de manera precisa la reactividad del grupo para cumplir una dada función. Es por eso que también resulta necesario incluir a toda la matriz proteica en la simulación, para obtener resultados significativos. Dado el tamaño de una hemoproteína tipo (mucho más de 1000 átomos) el tratamiento cuántico de todo el sistema es computacionalmente imposible. La única manera de conciliar estas dos necesidades (precisión mecano cuántica en el grupo hemo e inclusión de toda la proteína en el sistema) es la utilización de una técnica híbrida del tipo QM/MM para la simulación de reacciones en hemoproteínas. En este esquema de trabajo, el grupo hemo más los aminoácidos que intervengan en la reacción serán tratados de manera cuántica, mientras que el resto de la matriz proteica y el solvente serán tratados con modelos clásicos.

**Otro de los objetivos centrales del presente trabajo, ha sido por lo tanto, el estudio por técnicas de simulación computacional (clásicas, cuánticas e híbridas) de la reactividad de diferentes hemoproteínas frente a las especies mencionadas anteriormente.**

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.



## Capítulo 2

### Métodos Computacionales

En el siguiente capítulo se presentan los métodos computacionales utilizados durante el trabajo de tesis. Primero se explican brevemente los fundamentos teóricos en los que se basan cada uno de los métodos de simulación utilizados. Comenzaremos con una descripción cuántica de los sistemas moleculares basada en la resolución de la ecuación de Schrödinger. Discutiremos varios esquemas de cálculo, con especial énfasis en el código SIESTA, usado en este trabajo. Continuaremos con la explicación de las técnicas de simulación clásicas para llegar a una breve descripción de los métodos híbridos o QM-MM y su implementación en el programa SIESTA. Luego exploraremos las metodologías utilizadas para el muestreo y la obtención de parámetros termodinámicos relevantes a partir de la simulación. Finalmente comentaremos la relación entre los parámetros termodinámicos obtenidos y los procesos estudiados.

## Química teórica de primeros principios: la ecuación de Schrödinger

Como sabemos en la Física elemental, si se desea predecir que pasará con un objeto macroscópico, como una piedra al dejarla caer desde un balcón, basta con resolver las ecuaciones de Newton de la mecánica clásica. Si se desea en cambio, predecir las propiedades de sistemas microscópicos, donde los protagonistas son los átomos, se deben resolver las ecuaciones de la Mecánica Cuántica. La Mecánica Cuántica, desarrollada a principios del siglo XX, tiene como ecuación fundamental la ecuación de Schrödinger:

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

Esta es una ecuación diferencial cuya solución consiste en obtener la función de onda  $\Psi(\mathbf{r},t)$ , que da la descripción matemática de un sistema de partículas cuánticas, sujetas al potencial  $V(\mathbf{r},t)$ . La función de onda  $\Psi(\mathbf{r},t)$ , contiene toda la información necesaria para calcular las propiedades del sistema. **El objetivo básico de la química cuántica es entonces resolver la ecuación de Schrödinger para un sistema de núcleos y electrones.**<sup>1</sup>

Lamentablemente resolver de manera exacta esta ecuación para un sistema molecular no es posible, 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 “ $\Psi(\mathbf{r})$ ”, que además está unívocamente relacionada con la energía del sistema  $E$ . Si definimos ahora al operador\* hamiltoniano como:

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

la ecuación de Schrödinger se reduce a:

---

\* Un operador es una entidad matemática que opera, es decir realiza operaciones matemáticas, sobre funciones

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

La ecuación de Schrödinger, es por lo tanto una ecuación diferencial en derivadas parciales de autovalores, en donde un operador  $\mathbf{H}$  actúa sobre la autofunción,  $\Psi(\mathbf{r})$ , obteniendo como resultado a la función multiplicada por un escalar-el autovalor E-.

La segunda simplificación que debemos tener en cuenta es la denominada **aproximación de Born-Oppenheimer**,<sup>1,2</sup> 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 quedó 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**.<sup>1,2</sup> El mismo dice, y esto se demuestra fácilmente, que al evaluar la energía con una función de prueba  $\psi'(r)$  (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:

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

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

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

y  $\psi(r)$  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.<sup>1,2</sup>

Dado el operador Hamiltoniano, existe un conjunto infinito de soluciones (cada una representada por una autofunción  $|\Psi_i\rangle$  y su autovalor  $\epsilon_i$ ) que se pueden ordenar crecientemente según:

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

Aquí si los diferentes  $\epsilon_i$  son los autovalores exactos, entonces  $\epsilon_0$  es la energía del estado fundamental,  $\epsilon_1$  la del primer estado excitado etc. Como el conjunto de autofunciones es lo que se denomina completo, cualquier función  $|\Phi\rangle$  puede ser escrita como una combinación lineal de las autofunciones, siendo el coeficiente correspondiente a cada una, el producto escalar entre la autofunción correspondiente y la función que se desea expresar. En la práctica lo que se hace es construir la función de prueba  $|\Phi\rangle$  como combinación lineal de funciones conocidas. A este conjunto de funciones conocidas se lo denomina base.

Entonces tenemos que nuestra función de prueba en la base  $\{|\phi_i\rangle\}$  viene descrita por:

$$|\Phi\rangle = \sum_i^N c_i |\phi_i\rangle$$

La idea ahora es buscar aquellos coeficientes  $c_i$  que minimicen la energía. Matemáticamente la expresión para la energía usando como función de prueba la combinación lineal de las funciones de la base, se escribe en forma matricial de acuerdo a:

$$\langle \Phi | \hat{H} | \Phi \rangle = \sum_{ij} c_i \langle \phi_i | \hat{H} | \phi_j \rangle c_j = \sum_{ij} c_i c_j H_{ij}$$

y se dice que los  $H_{ij}$  son los elementos de la matriz hamiltoniano en la base  $\{|\phi_i\rangle\}$ .

Como la función de prueba debe estar normalizada los coeficientes deben además cumplir con la siguiente restricción:

$$\langle \Phi | \Phi \rangle = \sum_{ij} c_i c_j \langle \phi_i | \phi_j \rangle = \sum_i c_i^2 = 1$$

Para minimizar la energía con la restricción impuesta por la condición de normalización se utiliza el método de multiplicadores de Lagrange, y se resuelve usando álgebra matricial diagonalizando la matriz Hamiltoniano. El resultado da los coeficientes que determinan cada autofunción, más su autovalor correspondiente. En particular el autovalor de menor valor es la mejor aproximación posible a la energía del estado fundamental para el Hamiltoniano en la base utilizada.<sup>1,2</sup>

Para encontrar la función de onda que minimice la energía del sistema primero debemos ser capaces de construir funciones de prueba  $\psi'(r)$ , que satisfagan ciertos requisitos. Si tenemos en cuenta el espín de los electrones, debemos satisfacer el principio de antisimetría para los Fermiones.\* Este postulado de la mecánica cuántica demanda que la función de onda electrónica sea antisimétrica respecto del intercambio de las coordenadas de dos electrones cualesquiera. En términos matemáticos esto se expresa según:

$$\Psi(x_1, \dots, x_i, \dots, x_j, \dots, x_N) = -\Psi(x_1, \dots, x_j, \dots, x_i, \dots, x_N)$$

donde  $x_i$  representa las coordenadas y espín del electrón “ $i$ ”. (nótese el intercambio de  $i$  x  $j$ ). Esto se logra construyendo la función de onda como un determinante de Slater,<sup>1,2</sup> que es el producto de  $N$  funciones monoeléctricas (dependen de las coordenadas de 1 solo electrón) denominadas espín-orbitales ( $\chi_i$ ). Matemáticamente:

$$\Psi(x_1, x_2, \dots, x_N) = (N!)^{1/2} \begin{vmatrix} \chi_i(x_1) & \chi_j(x_1) & \cdots & \chi_k(x_1) \\ \chi_i(x_2) & \chi_j(x_2) & \cdots & \chi_k(x_2) \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ \chi_i(x_N) & \chi_j(x_N) & \cdots & \chi_k(x_N) \end{vmatrix}$$

Conociendo como construir la función de onda y usando el principio variacional debemos ahora generar un algoritmo que permita encontrar aquella que minimice la energía.

---

\* Fermiones son aquellas partículas con espín semientero como los electrones. Bosones aquellas con espín entero como por ejemplo los protones.

## El método de Hartree-Fock

Basado en los principios y aproximaciones mencionados en los párrafos anteriores, el primer método efectivo utilizado para resolver de manera aproximada la ecuación de Schrödinger para un sistema polielectrónico es el Método de Hartree-Fock.<sup>1,2</sup>

En esta aproximación, usando el Hamiltoniano electrónico y empleando una función de onda del tipo determinante de Slater la expresión de la energía es:

$$E = \langle \Psi | \hat{H}_{el} | \Psi \rangle = \sum_{i=1}^N H_{ii}^{core} + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N (J_{ij} - K_{ij})$$

Donde  $H_{ii}^{core}$  es un hamiltoniano reducido que depende de las coordenadas de “un” sólo electrón y  $J_{ij}$  y  $K_{ij}$  son las integrales de Coulomb e Intercambio que dependen de las coordenadas de dos electrones. Los elementos de matriz  $H_{ii}$ , se escriben entonces en función de los orbitales, de acuerdo a:

$$H_{ii}^{core} = -\frac{1}{2} \langle \chi_i(1) | \nabla_1^2 | \chi_i(1) \rangle - \langle \chi_i(1) | \sum_{\alpha} \frac{Z_{\alpha}}{r_{1\alpha}} | \chi_i(1) \rangle$$

$$J_{ij} = \langle \chi_i(1) \chi_j(2) | r_{12}^{-1} | \chi_i(1) \chi_j(2) \rangle$$

$$K_{ij} = \langle \chi_i(1) \chi_j(2) | r_{12}^{-1} | \chi_j(1) \chi_i(2) \rangle$$

El término  $H_{ii}^{core}$  es un Hamiltoniano reducido que contiene la energía cinética y la interacción coulombiana con los núcleos, para el electrón en el orbital con subíndice  $i$ .  $J_{ij}$ , la integral de Coulomb, representa la repulsión electrostática entre los electrones de los orbitales  $i$  y  $j$ . La integral  $K_{ij}$  de intercambio tiene su origen en la indistinguibilidad de los electrones y justifica la antisimetría de la función de onda. Esta interacción no tiene un análogo clásico.

De acuerdo al teorema variacional debemos buscar aquellos orbitales que minimicen la energía en la expresión anterior. Minimizando la expresión de la energía sujeta a la condición de que los orbitales sean ortonormales y realizando una transformación unitaria, se llega a una ecuación de autovalores para los orbitales conocida como ecuación de Hartree-Fock:

$$\hat{F}(1)|\chi_i(1)\rangle = \varepsilon_i|\chi_i(1)\rangle \quad i = 1, 2, \dots, N$$

Donde las autofunciones de la ecuación son los N-espín-orbitales, también llamados “Orbitales Moleculares” y su energía corresponde al autovalor  $\varepsilon_i$ .  $\hat{F}$  es el operador denominado de Fock definido por su acción sobre el orbital  $\chi_i$ . El operador de Fock tiene tres contribuciones:

$$\begin{aligned} \hat{F}(1) &= \hat{H}^{core}(1) + \sum_{j=1}^N [\hat{J}_j(1) - \hat{K}_j(1)] \\ \hat{H}^{core}(1)\chi_i(1) &= -\frac{1}{2}\nabla_1^2\chi_i(1) - \sum_{\alpha} \frac{Z_{\alpha}}{r_{1\alpha}}\chi_i(1) \\ \hat{J}_j(1)\chi_i(1) &= \left[ \int dx_2 \chi_j^*(2) r_{12}^{-1} \chi_j(2) \right] \chi_i(1) \\ \hat{K}_j(1)\chi_i(1) &= \left[ \int dx_2 \chi_j^*(2) r_{12}^{-1} \chi_i(2) \right] \chi_j(1) \end{aligned}$$

Es interesante notar que el operador de intercambio  $\hat{K}_j$ , es diferente en su estructura a los otros ya que depende del valor de  $\chi_i$  en todo el espacio por lo que se lo identifica como un operador no-local. Lo más importante para notar es que el operador de Fock depende explícitamente de los orbitales, o sea que para resolver la ecuación de autovalores debemos conocer ya su solución. En la práctica como ya mencionamos anteriormente los orbitales se escriben como combinación lineal de funciones conocidas

(Las funciones de base) según:  $|\chi_i\rangle = \sum_{\mu=1}^K C_{\mu i} |\phi_{\mu}\rangle$ .

Reemplazando en la ecuación de autovalores de Fock queda:

$$\sum_{\mu=1}^K C_{\mu i} \hat{F} |\phi_{\mu}\rangle = \varepsilon_i \sum_{\mu=1}^K C_{\mu i} |\phi_{\mu}\rangle.$$

hora aplicando la base  $\langle\phi_{\nu}|$  a ambos lados de la ecuación se obtiene un sistema lineal homogéneo de K ecuaciones:

$$\sum_{\mu=1}^K C_{\mu i} \left( \langle\phi_{\nu}| \hat{F} |\phi_{\mu}\rangle - \varepsilon_i \langle\phi_{\nu}| \phi_{\mu}\rangle \right) = 0 \quad \nu = 1, 2, \dots, K$$

denominadas las ecuaciones de Rootham que nos permiten encontrar los coeficientes  $C_{\mu i}$

Ahora si usamos notación matricial y definimos la matriz  $\mathbf{F}$  (o matriz de Fock) siendo sus elementos

$$F_{\nu\mu} = \langle \phi_\nu | \hat{F} | \phi_\mu \rangle,$$

y la matriz  $\mathbf{S}$  (o matriz de superposición) según

$$S_{\nu\mu} = \langle \phi_\nu | \phi_\mu \rangle,$$

podemos reescribir las ecuaciones de Rootham de acuerdo a:

$$\mathbf{FC} = \mathbf{SC}\boldsymbol{\varepsilon}$$

donde  $\mathbf{C}$  es la matriz de los coeficientes y  $\boldsymbol{\varepsilon}$  la matriz diagonal de los  $K$  autovalores. Para encontrar  $\boldsymbol{\varepsilon}$  debemos resolver la ecuación secular

$$\det|\mathbf{F} - \boldsymbol{\varepsilon}\mathbf{S}| = 0.$$

La diagonalización de la forma matricial de las ecuaciones de Rootham nos permite obtener los coeficientes  $\mathbf{C}$ , con estos construir los orbitales y obtener así la energía. Sin embargo como ya se mencionó, la matriz de Fock depende de los orbitales y por lo tanto de los coeficientes, esto motiva que el sistema deba ser resuelto iterativamente.

Los programas usuales que resuelven la ecuación de Schrödinger por el método de Hartree-Fock, comienzan el cálculo con una matriz  $\mathbf{C}$  elegida, que diagonaliza el Hamiltoniano de un electrón, y partiendo de estos coeficientes iniciales se construye la matriz de Fock. Diagonalizando la forma matricial de las ecuaciones de Rootham se obtiene un nuevo conjunto de coeficientes  $\mathbf{C}_{ui}$ , con los que se construye una nueva matriz  $\mathbf{F}$ . El proceso se repite hasta que los coeficientes de dos pasos sucesivos no difieren de modo significativo, lo que se denomina auto-consistencia.

La calidad de la función de onda y la energía obtenidas por el método de Hartree-Fock están directamente relacionadas con el tamaño y calidad de las funciones de base. Una base de mayor tamaño será mas flexible para expandir los orbitales moleculares obteniéndose un valor menor y por lo tanto mejor para la energía. La debilidad del método Hartree-Fock reside en la descripción de la repulsión electrónica, ya que al ser descripta como la repulsión entre orbitales carece de la correlación debida a la posición instantánea del electrón. Es razonable suponer que la región que rodea a un electrón en un momento dado, excluirá a otros. Al no considerar esta correlación repulsiva entre las posiciones de los electrones el método de Hartree-Fock sobreestima la energía total del



sistema. Esta es la razón por la cual aún usando una base infinita la energía obtenida o Energía de Hartree-Fock ( $E_{HF}$ ) será mayor a la energía real del sistema ( $E_0$ ). A la diferencia entre ambas se la denomina energía de correlación ( $E_{corr}$ )

$$E_{corr} = E_0 - E_{HF}$$

Existen diferentes métodos para corregir la  $E_{HF}$  y acercarse más a  $E_0$ . Los más comúnmente utilizados son el llamado de interacción de configuraciones (CI), en donde se expresa la función de onda como una combinación de diferentes determinantes de Slater surgidos de configuraciones excitadas del sistema, o los métodos basados en la teoría de perturbaciones desarrollados por Møller y Plesset.<sup>1,2</sup>

### Teoría del Funcional de la Densidad

Un formalismo alternativo, 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>1,3</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 ( $\rho$ ), de ahí el nombre de la teoría. 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, que es función de las coordenadas espaciales y se denota  $\rho(x,y,z)$ .<sup>1,3</sup> El teorema muestra además, que el potencial  $V(r)$  y el número de electrones quedan unívocamente definidos por la densidad electrónica. Por otro lado, el hecho de que  $\Psi$  determine la densidad, cierra la relación biunívoca entre ambas:  $\Psi \Leftrightarrow \rho$ . Como  $\rho$  describe y define todas las propiedades del sistema, la energía pasa a ser un funcional<sup>†</sup> de la misma, lo que matemáticamente se escribe como:  $E_0 = E_v[\rho_0(\mathbf{r})]$

En el contexto de DFT la Energía  $E$  (como funcional de la densidad) está dada por:

---

<sup>†</sup> Un funcional es una construcción matemática que relaciona una función con un Número

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

donde los funcionales corresponden a la energía cinética ( $T$ ), la interacción núcleo-electrón ( $V_{ne}$ ) y la interacción electrón-electrón. ( $V_{ee}$ )

El segundo teorema es conocido como el teorema variacional de Hohenberg y Kohn. El mismo se basa en el hecho de que cualquier densidad particular  $\rho'$  que cumpla los requisitos  $\int \rho'(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = N$  y  $\rho'(\mathbf{r}) \geq 0$  (que tenga el número de electrones correspondiente y en ningún lugar del espacio sea menor que cero), debe cumplir con  $E[\rho'] \geq E_0$ . La igualdad es válida si  $\rho'$  es la densidad real del sistema en el estado fundamental  $\rho_0$ . Como vemos al igual que en el caso de usar funciones de onda de prueba lo que buscamos basados en el teorema variacional es aquella  $\rho'$  que minimice la energía. El problema consiste entonces en hallar las expresiones adecuadas para los funcionales  $T$ ,  $V_{ne}$  y  $V_{ee}$ .

En 1965 Kohn y Sham introdujeron una aproximación para la fórmula del funcional de la densidad para obtener la energía cinética  $T[\rho]$ . Esta aproximación considera un sistema de referencia (subíndice  $s$ ) compuesto por electrones que no interactúan entre sí, pero cuya densidad  $\rho_s$  es igual a la real  $\rho_0$ . Al restringir a  $\rho_s$  a ser igual a  $\rho_0$ , esto asegura que el potencial  $V_s(\mathbf{r})$  que actúa sobre el sistema de referencia, (de electrones no interactuantes) produzca la densidad real.<sup>4</sup>

En el sistema de referencia podemos escribir el operador Hamiltoniano ( $H_s$ ) correspondiente según:

$$\hat{H}_s = \sum_{i=1}^N \left[ -\frac{1}{2} \nabla_i^2 + v_s(\mathbf{r}_i) \right] = \sum_{i=1}^N \hat{h}_i^{KS}$$

Al usar electrones no interactuantes, el Hamiltoniano del sistema es la suma de Hamiltonianos monoeléctricos  $h_i^{KS}$  donde solo hay un término de energía cinética y uno, correspondiente a la interacción de cada uno de los electrones con el potencial  $V_s(\mathbf{r})$ .

Usando este Hamiltoniano la densidad se calcula de acuerdo a:

$$\rho_s = \sum_{i=1}^N |\chi_i^{KS}|^2$$

A partir de los espin-orbitales  $\chi_i^{KS}$  Estos orbitales denominados orbitales de Kohn y Sham se encuentran en forma análoga a los de Hartree-Fock, utilizando álgebra matricial.

La utilidad de usar un sistema con electrones no interactuantes es que el funcional de la energía cinética, es simplemente:

$$T_s = -\frac{1}{2} \langle \Psi_s | \sum_i \nabla_i^2 | \Psi_s \rangle = -\frac{1}{2} \sum_i \langle \chi_i^{KS}(1) | \nabla_1^2 | \chi_i^{KS}(1) \rangle$$

que corresponde a la suma de las energías cinéticas de todos los electrones. Usando este funcional para la energía cinética definimos ahora al termino  $\Delta T$  como el funcional que nos permite obtener la diferencia de energía cinética entre el sistema de referencia y la energía cinética del sistema real.

$$\Delta T[\rho] = T[\rho] - T_s[\rho]$$

Por otro lado si usamos una aproximación de tipo clásica para la interacción entre los electrones, podemos definir al termino  $\Delta V_{ee}$  como aquel funcional que nos da la diferencia para la energía de interacción electrón-electrón entre el sistema real ( $V_{ee}$ ) y la expresión clásica para la interacción electrón-electrón de acuerdo a:

$$\Delta V_{ee}[\rho] = V_{ee} - \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(\mathbf{r}_1)\rho(\mathbf{r}_2)}{r_{12}} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2$$

Agrupando ahora ambos términos juntos, se define al llamado funcional de intercambio y correlación  $E_{xc}[\rho]$  como:

$$E_{xc}[\rho] = \Delta T[\rho] + \Delta V_{ee}[\rho]$$

El último termino del funcional que queda por definir corresponde a la expresión para  $V_{ne}$ , que dadas la función de onda o la densidad electrónica y el potencial al que están sujetos los electrones ( $v(\mathbf{r})$ ) es conocida, y se escribe de acuerdo a:

$$V_{ne} = \langle \Psi | \sum_{i=1}^N v(\mathbf{r}_i) | \Psi \rangle = \int \rho(\mathbf{r})v(\mathbf{r})d\mathbf{r}$$

Usando estas definiciones de los funcionales la fórmula final para el funcional de la densidad queda:

$$E[\rho] = T_s[\rho] + V_{ne}[\rho] + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(\mathbf{r}_1)\rho(\mathbf{r}_2)}{r_{12}} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 + E_{xc}[\rho]$$

Con esta definición podemos calcular la energía para todos los términos, excepto por la relativamente pequeña contribución de  $E_{xc}$ , cuya forma funcional no es conocida.

El enfoque de la teoría de la densidad funcional, 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  $E_{xc}[\rho]$** .<sup>1</sup>

A pesar de que la forma exacta de  $E_{xc}$  es desconocida se pueden reconocer al menos cuatro diferentes contribuciones, estas son i)- La correlación cinética debida a que los electrones sí interactúan; ii)- la correlación Coulómbica debido a la repulsión electrón-electrón; iii)-el intercambio que surge del principio de antisimetría para los fermiones y iv)- la corrección debido a que el término Coulómbico incluye la interacción de cada electrón consigo mismo ya que contribuye a la densidad de carga total. Como la densidad se puede calcular a partir de los orbitales, estos permiten, si se conoce la forma funcional, calcular la energía. Por lo tanto si uno tiene una forma para  $E_{xc}[\rho]$  se puede calcular la energía a partir de los orbitales de Kohn y Sham ( $\chi_i^{KS}$ ). El problema se reduce por lo tanto a tener un método que permita encontrarlos. Valiéndonos del teorema variacional de Hohenberg y Kohn y usando la restricción de ortonormalidad para los orbitales se pueden deducir las ecuaciones que deben cumplir los mismos para minimizar la energía. El resultado del proceso es un conjunto de ecuaciones de autovalores denominadas de Kohn y Sham que tienen la siguiente forma:

$$\left[ -\frac{1}{2}\nabla_1^2 - \sum_{\alpha} \frac{Z_{\alpha}}{r_{1\alpha}} + \int \frac{\rho(\mathbf{r}_2)}{r_{12}} d\mathbf{r}_2 + v_{xc}(1) \right] \chi_i^{KS} = \epsilon_i^{KS} \chi_i^{KS}$$

El termino  $v_{xc}$ , llamado potencial de intercambio y correlación es la derivada funcional

de  $E_{xc}$  y se define como: 
$$v_{xc}(\mathbf{r}) = \frac{\delta E_{xc}[\rho(\mathbf{r})]}{\delta \rho(\mathbf{r})}$$

Es importante remarcar que los orbitales de Kohn y Sham están definidos para el sistema de referencia de electrones no interactuantes por lo que no tienen un significado físico mas allá de ser una herramienta que permite calcular la densidad electrónica. Al igual que en el método de Hartree-Fock para encontrar los orbitales de Kohn y Sham, se los

expresa como combinación lineal de funciones de base conocidas, obteniéndose de esa manera un conjunto de ecuaciones equivalentes a las ecuaciones de Rootham que se pueden expresar en forma matricial como  $\mathbf{h}^{KS}\mathbf{C} = \mathbf{S}\mathbf{C}\boldsymbol{\varepsilon}$ , siendo  $\mathbf{h}^{KS}$  la matriz determinada por la forma del funcional de acuerdo con:

$$h_{\nu\mu}^{KS} = \langle \phi_\nu | \hat{h}^{KS} | \phi_\mu \rangle = T_{\nu\mu} + V_{\nu\mu}^{ne} + V_{\nu\mu}^{ee} + V_{\nu\mu}^{xc}$$

$$T_{\nu\mu} = -\frac{1}{2} \int \phi_\nu(\mathbf{r}_1) \nabla_1^2 \phi_\mu(\mathbf{r}_1) d\mathbf{r}_1$$

$$V_{\nu\mu}^{ne} = -\sum_\alpha Z_\alpha \int \frac{\phi_\nu(\mathbf{r}_1) \phi_\mu(\mathbf{r}_1)}{r_{1\alpha}} d\mathbf{r}_1$$

$$V_{\nu\mu}^{ee} = \iint \frac{\rho(\mathbf{r}_2) \phi_\nu(\mathbf{r}_1) \phi_\mu(\mathbf{r}_1)}{r_{12}} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2$$

$$V_{\nu\mu}^{xc} = \int v_{xc}[\rho(\mathbf{r}_1)] \phi_\nu(\mathbf{r}_1) \phi_\mu(\mathbf{r}_1) d\mathbf{r}_1$$

y  $\mathbf{C}$  la matriz de los coeficientes. De manera análoga al método Hartree-Fock, como la matriz  $\mathbf{h}^{KS}$  depende de la densidad y esta depende de los coeficientes, que es lo que buscamos, el sistema debe ser resuelto iterativamente, hasta la autoconsistencia.

¿Cuál es entonces la forma del funcional de intercambio y correlación?. Hohenberg y Kohn introdujeron en principio la siguiente expresión:

$$E_{xc}[\rho] = \int \rho(\mathbf{r}) \varepsilon_{xc}(\rho) d\mathbf{r} = \int \rho(\mathbf{r}) \varepsilon_x(\rho) d\mathbf{r} + \int \rho(\mathbf{r}) \varepsilon_c(\rho) d\mathbf{r}$$

donde  $E_x(\rho)$  y  $E_c(\rho)$  que son los funcionales de intercambio y correlación respectivamente, son completamente separables. Para el término  $E_x(\rho)$  utilizaron la expresión que describe el intercambio de un electrón inmerso en un gas neutral y homogéneo de electrones con densidad  $\rho$  que se expresa de la siguiente forma:

$$\varepsilon_x(\rho) = -\frac{3}{4} \left( \frac{3}{\pi} \right)^{1/3} [\rho(\mathbf{r})]^{1/3}$$

La energía de correlación  $E_c(\rho)$  por otra parte, puede ser descripta mediante la función obtenida por Vosko, Willk y Nusair (VWN) en los años 80.<sup>5</sup> El funcional de intercambio y correlación obtenido combinando estas fórmulas se denomina *Aproximación de la Densidad Local* (LDA). Los funcionales LDA permiten obtener ciertas propiedades moleculares como, geometrías o frecuencias de vibración con cierta precisión aunque por

lo general sobreestiman las energías de enlace. La principal limitación del funcional LDA radica en que está relacionado con un modelo de gas de electrones uniforme, incapaz por lo tanto de describir grandes cambios en  $\rho$ . Este problema se solucionó parcialmente utilizando funcionales que incorporan explícitamente la dependencia con el gradiente de la densidad  $\nabla\rho$ , conocidos como funcionales con Aproximación del Gradiente Generalizado (GGA). Entre los más destacados, basados solamente en consideraciones teóricas se encuentran el funcional de intercambio de Perdew y Wang (PW86),<sup>6</sup> o el funcional de intercambio y correlación propuesto por Perdew, Burke y Ernzerhof (PBE).<sup>7</sup> También se desarrollaron funcionales que incluyen parámetros ajustados para reproducir valores obtenidos por otros métodos para átomos aislados, como el funcional de intercambio de Becke. Entre los funcionales de correlación más utilizados podemos mencionar el de Lee, Yang y Parr (LYP)<sup>8</sup> o el de Perdew y Wang (PW91).<sup>9</sup> Por último y debido a que la aproximación de Hartree-Fock incluye el intercambio de manera exacta, el uso de este término ha permitido generar los funcionales llamados híbridos. En estos casos el intercambio de Hartree-Fock se combina con algún funcional de correlación del tipo GGA. El funcional híbrido más conocido es el B3LYP<sup>10</sup> que combina un porcentaje del intercambio de HF con la correlación de VWN y LYP, dándole a cada término un peso elegido para optimizar los resultados en acuerdo con datos experimentales de energías de atomización, potenciales de ionización y afinidades protónicas para un conjunto de calibración de átomos y moléculas.

### **El método SIESTA**

La mayoría de los cálculos de estructura electrónica realizados en este trabajo fueron realizados con el programa SIESTA (Spanish Initiative for Electronic Structure Simulations of Thousands of Atoms).<sup>11,12</sup> En el siguiente párrafo describiremos las características más relevantes del mismo.

En las implementaciones tradicionales de la teoría del funcional de la densidad (DFT) para la realización de cálculos de estructura electrónica en sistemas moleculares, como el programa Gaussian,<sup>13</sup> es conveniente adoptar funciones de base Gaussianas centradas en el núcleo de cada átomo para los orbitales, debido a que la integración analítica de las

mismas es bien conocida. Sin embargo, el tiempo de cálculo necesario crece en principio con el número de átomos a la cuarta potencia. En cambio el código SIESTA utiliza funciones de base numéricas fijas definidas en una grilla tridimensional finita, lo que permite que todos los cálculos sean realizados de forma numérica. Otra ventajas del uso de funciones numéricas es que la función puede adoptar cualquier forma que uno quiera, lo que da una mayor flexibilidad. En particular, las mismas se ajustan a los llamados “Orbitales Pseudo Atómicos” (PAO), que corresponden a las autofunciones del Pseudopotencial Atómico confinado en una esfera de potencial infinito (o sea que mas allá del radio de la esfera la función de onda vale cero).<sup>14</sup> En este esquema de cálculo el tiempo computacional crece más lentamente con el número de átomos, lo que permite tratar sistemas con un número de átomos relativamente grande, en tiempos razonables. Una consecuencia del confinamiento, es que los PAOs poseen una mayor energía cinética que las autofunciones no-confinadas. Este incremento de energía se mantiene igual para todos los PAOs, obteniéndose así una base balanceada. La magnitud del incremento o “pseudoatomic orbital energy shift ( $\Delta E_{PAO}$ )” es un parámetro variable que debe ajustar el usuario. Para moléculas típicas de tamaño medio, valores de  $\Delta E_{PAO}$  cercanos a 100 meV permiten obtener resultados similares a los obtenidos con bases Gaussinas de tamaño convencional. En el caso de querer utilizar moléculas que contienen metales de transición como Cu, Pt u Fe se requiere usar valores menores, del orden de 30 meV. Por otro lado, el método SIESTA utiliza los denominados pseudopotenciales atómicos, una construcción que incluye al núcleo del átomo junto con los electrones internos, y que permite que solo sea necesario calcular explícitamente las interacciones de los electrones de valencia y que se puedan representar adecuadamente y a bajo costo los efectos relativistas que pueden ser relevantes en átomos pesados. Actualmente el programa SIESTA contiene funcionales de intercambio y correlación del tipo LDA, y el funcional GGA PBE.<sup>7</sup> Otro parámetro importante que debe determinar el usuario es la precisión de la grilla, que se determina eligiendo la energía correspondiente a una onda plana de la máxima frecuencia posible que entra en el mismo espaciamiento de la grilla. Valores de entre 100 – 200 Rydbergs, para este parámetro denominado “Energy cut-off ( $E_{cut}$ )” aseguran una buena precisión. Como comentario general podemos asegurar que el código

SIESTA es extremadamente rápido y eficiente en comparación con programas de Gaussianas o de Ondas Planas para moléculas de tamaño medio (20 –100 átomos).

En resumen un cálculo de estructura electrónica con el SIESTA, dadas las posiciones atómicas, y la cargas del sistema consiste de los siguientes pasos:

- 1) Elección de las funciones de base, de acuerdo a la naturaleza de los átomos del sistema.
- 2) Determinación de los coeficientes iniciales para los orbitales (matriz  $C$ )
- 3) Cálculo de las integrales correspondientes de acuerdo a la forma funcional elegida para  $h^{KS}$ . Esto se realiza sumando numéricamente sobre todos los puntos de la grilla.
- 4) Resolución del problema de autovalores ( $h^{KS}C=SC\varepsilon$ ), para encontrar un nuevo conjunto de coeficientes  $C^{i+1}$ .
- 5) Comparación de la densidad obtenida con los coeficientes  $C^{i+1}$  con la obtenida para  $C^i$ . Si la diferencia entre las densidades es menor que la requerida, se ha alcanzado la autoconsistencia y se continua con el siguiente paso. Si la diferencia de las densidades es mayor a la requerida se vuelve al paso 3.
- 6) Cálculo de la energía y el resto de las propiedades electrónicas.
- 7) Cálculo de las fuerzas sobre los átomos.

Una vez que se tiene la energía y las fuerzas para una configuración particular se puede proceder a mover las posiciones de los átomos y volver a realizar el cálculo. A partir de aquí podemos ver al código SIESTA (u otro programa de estructura electrónico) como una receta tal que dadas las posiciones atómicas nos permite obtener la energía y fuerzas del sistema. A partir de esta información se pueden realizar diversos esquemas de cálculo como se mencionará mas adelante.



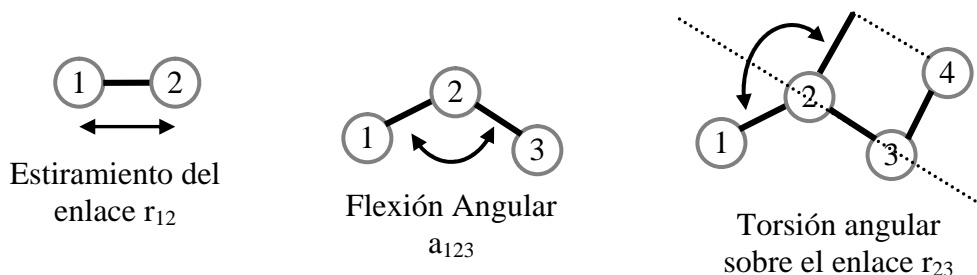
## Métodos Basados en la Física Clásica

El primer paso para estudiar mediante el empleo de modelos fisicoquímicos un proceso biológico relevante, consiste en modelar con precisión las macromoléculas involucradas. Particularmente, y debido a la gran diversidad de procesos que realizan y la eficiencia con la que los llevan a cabo, las proteínas han sido un importante punto de encuentro entre la físico-química y la biología. Sin embargo debido a que el tamaño medio de una proteína es de el orden de los miles de átomos su tratamiento por métodos basados en la mecánica cuántica se hace computacionalmente imposible salvo raras excepciones. Es por eso que tradicionalmente el estudio físico químico de proteínas por métodos computacionales se ha basado principalmente en la mecánica clásica. Los modelos clásicos de moléculas permiten describir eficientemente sistemas de miles de átomos, como una proteína en agua. Su limitación principal radica en la incapacidad de describir procesos reactivos que involucran la ruptura o formación de enlaces, o el tratamiento de diferentes estados electrónicos o de espín, ya que todos estos procesos requieren de una aproximación que considere los electrones explícitamente. A continuación describiremos los fundamentos teóricos y las ecuaciones utilizadas en los métodos clásicos

### Los campos de fuerza clásicos

En los métodos basados en la mecánica clásica, la naturaleza cuántica de los electrones e incluso éstos son ignorados y la energía del sistema depende solamente de las posiciones nucleares. A la función energía potencial (dependiente de las posiciones nucleares) se la denomina campo de fuerzas, ya que el gradiente de la misma permite obtener las fuerzas que actúan sobre cada átomo, también se lo encuentra en la literatura como potencial. Al igual que en los métodos *ab-initio* se halla implícita en esta simplificación la aproximación de Born-Oppenheimer. En los campos de fuerza clásicos las interacciones entre los núcleos, están descritas por ecuaciones simples y de fácil evaluación. Las interacciones entre los núcleos se agrupan en términos de unión, y términos de no unión. Los términos de unión describen de manera aproximada la interacción entre átomos que están unidos entre sí directamente, o a hasta 2 átomos de distancia. Así la energía de los términos de unión se descompone en contribuciones

debido al estiramiento de un enlace, la flexión de un ángulo entre dos enlaces del mismo átomo, o la rotación de los átomos adyacentes sobre el eje de un enlace (Figura 1).



**Figura 1** Esquema de las interacciones de unión en un campo de fuerzas clásico

Los términos de no unión que describen la interacción entre átomos que están en diferentes moléculas o en la misma pero a más de 3 enlaces de distancia, poseen una contribución electrostática y una contribución debido a las interacciones de Van der Waals.(VDW)<sup>15</sup> Actualmente hay disponibles diferentes campos de fuerza clásicos como CHARMM,<sup>16</sup> GROMOS<sup>17</sup> o AMBER.<sup>18</sup> Todos poseen una descripción similar de los términos que contribuyen a la energía aunque difieren en los parámetros que utilizan en las ecuaciones. En esta tesis hemos utilizado el campo de fuerzas de AMBER que describiremos con mayor detalle a continuación

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:

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

Como mencionamos anteriormente en esta ecuación podemos reconocer diferentes términos correspondientes a las interacciones mencionadas anteriormente. El primer término corresponde al **estiramiento de los enlaces** entre pares de átomos. La unión entre los átomos es descrita por un oscilador armónico de acuerdo con la ley de Hooke. El parámetro  $b_0$  corresponde a la distancia de equilibrio de ese tipo de unión en particular, y  $K_b$  es la constante de fuerza del oscilador. Si bien la curva de energía potencial de un enlace real no es exactamente armónica, esta aproximación es razonablemente buena. Es

claro que este tipo de potencial no permite la ruptura del enlace. El segundo término corresponde a la **flexión angular**. La desviación de un ángulo entre dos enlaces respecto de su posición de equilibrio también es descripta por un potencial armónico, donde  $\theta_0$  es el valor de equilibrio del ángulo y  $K_\theta$  la constante de fuerza. Típicamente los ángulos son más susceptibles a deformación que los enlaces, de modo que las constantes de fuerza angulares poseen valores de entre 30 – 80 kcal/mol/Rad mientras que las de enlace poseen valores de entre 200 – 500 kcal/mol/Å

El tercer término corresponde a la **energía de torsión de ángulos denominados diedros** o impropios. Estos ángulos describen la energía potencial a lo largo de un eje de rotación definido por un enlace. En la Figura 1 se esquematiza el ángulo diedro definido para los átomos 1 y 4, a lo largo del eje 23. En la fórmula del campo de fuerzas,  $\phi$  es el valor que toma el diedro que se calcula, de acuerdo al esquema de la figura 1, como el ángulo entre los planos que definen los átomos 123 y 234 entre sí. El término  $V_n$ , está relacionado con la magnitud de la barrera entre dos mínimos adyacentes, “ $n$ ” es la multiplicidad, que describe cuantos mínimos hay para la rotación entre 0 y 360 grados, y “ $\gamma$ ” es la fase que determina donde el ángulo pasa por el primer mínimo. A modo de ejemplo, al término de torsión entre los átomos de carbono para el etano, medido entre dos átomos de H cualesquiera, unidos a carbonos diferentes, le correspondería un valor de 5 kcal/mol para  $V_n$ , que corresponde al máximo de energía cuando los hidrógenos se ubican eclipsados. Un valor de 3 para la multiplicidad, correspondiente a los tres mínimos (60, 180 y 240 grados) y  $\gamma$  sería 60 que es el primer mínimo correspondiente a la conformación alternada.

El último término, el **término de no-unión**, describe a las interacciones entre átomos que están en moléculas diferentes o en la misma pero a más de tres enlaces de distancia. La contribución de éste término depende de las interacciones que tengan los átomos a través del espacio que los separa y por eso suelen tener una dependencia funcional inversamente proporcional con la misma. El término de unión en general se divide en dos contribuciones, la electrostática y la de VDW. La interacción electrostática es consecuencia de la distribución asimétrica de la densidad de carga en las moléculas. En el potencial AMBER el potencial electrostático de cada molécula es representado por un arreglo de cargas fraccionarias puntuales ubicadas en la posición de los átomos de la

molécula. Estas cargas fraccionarias están elegidas de manera que reproduzcan el potencial electrostático generado por la molécula sobre su entorno. Por ejemplo en uno de los modelos de la molécula de agua usado por AMBER, al oxígeno le es asignando una carga de  $-0.8 e$  y a los H una carga de  $0.4 e$  cada uno. Una vez asignadas las cargas a todos los átomos la interacción entre los mismos es calculada usando la ley de Coulomb. Las interacciones electrostáticas no pueden por sí solas describir totalmente las interacciones entre los átomos de moléculas diferentes, por ejemplo en gases nobles donde los momentos multipolares son todos cero aún existen interacciones entre ellos. Por otro lado si solo tuviéramos en cuenta la interacción electrostática dos átomos con carga de signos opuesto se atraerían hasta colapsar en el mismo punto del espacio obteniéndose un valor infinito de energía. El comportamiento de la energía en el ejemplo del gas noble en función de la distancia que separa a dos átomos es el siguiente: cuando los átomos se encuentran infinitamente separados la energía potencial es cero. Cuando empiezan a acercarse la energía disminuye (la interacción es atractiva) hasta llegar a un mínimo (distancia de equilibrio). Si la distancia disminuye aún más la energía crece rápidamente (interacción repulsiva). La formula que describe de manera adecuada a este tipo de interacción, repulsiva a corto alcance y dispersiva a largo alcance, es el potencial denominado de Lennard-Jones 12-6. El potencial de Lennard-Jones posee dos parámetros que dependen del par de átomos del cual se esta describiendo la interacción, estos son: la distancia del mínimo de energía entre ambos átomos ( $R_{ij}^*$ ) y el valor para la energía en ese punto ( $\varepsilon_{ij}$ ). Los parámetros están tabulados según el tipo de átomo, de manera que para encontrar los parámetros correspondientes a la interacción del par de átomos  $i$  y  $j$ , se utilizan las siguientes reglas de combinación:  $R_{ij}^* = (R_i^* + R_j^*)$  y  $\varepsilon_{ij} = \sqrt{\varepsilon_i \varepsilon_j}$ . Luego los términos de la ecuación del campo de fuerzas se calculan como  $A_{ij} = \varepsilon_{ij} (R_{ij}^*)^{12}$  y  $B_{ij} = 2\varepsilon_{ij} (R_{ij}^*)^6$ . El cálculo del término de no unión es el más costoso computacionalmente ya que en el caso ideal involucra computar las interacciones de aproximadamente  $N \times (N-1)$  pares de átomos, mientras que los términos, de enlace, angulares y de torsión escalan con el numero de átomos ( $N$ ). Para disminuir el costo computacional, típicamente las interacciones de no unión sólo son calculadas entre los pares de átomos que se encuentran a una distancia menor que un valor de corte elegido

por el usuario (el radio de corte). Usualmente los valores para el radio de corte son mayores a 10 Å.<sup>15,18</sup>

### Métodos Híbridos QM-MM

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, 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. ¿Qué debemos hacer entonces si deseamos estudiar un proceso reactivo en un sistema con miles de átomos, como la reacción que ocurre dentro de una proteína?-la respuesta es usar un método que combine los beneficios de ambos, o sea un método híbrido.<sup>19,20</sup>

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, la contribución cuántica es calculada al 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:

$$E_{QM-MM} = \sum_{i=1}^C q_i \int \frac{\rho(\mathbf{r})}{|\mathbf{r} - \boldsymbol{\tau}_i|} dr + \sum_{i=1}^C \sum_{\alpha=1}^Q \frac{q_i Z_{\alpha}}{|\mathbf{R}_{\alpha} - \boldsymbol{\tau}_i|} + E_{QM-MM}^{LJ}$$

siendo  $C$  el número de átomos clásicos con cargas parciales  $q_i$ ,  $Q$ , es el número de átomos cuánticos con índice  $\alpha$ . 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.

***El método del “link-atom”*** En el estudio por métodos híbridos de reacciones en solución en general no hay problemas con la partición del sistema en los subsistemas cuánticos y clásicos, ya que por lo general se incluye a las moléculas de soluto completas en el subsistema cuántico y el subsistema clásico es conformado por el solvente. En proteínas muchas veces ciertos aminoácidos del sitio activo de la proteína participan en la reacción química, por lo que deben ser incluidos en el subsistema cuántico. Sin embargo, si no queremos considerar a toda la proteína cuánticamente, debemos considerar en diferentes subsistemas a átomos unidos entre si covalentemente. Existen diferentes métodos para tratar este tipo de fronteras covalentes entre los subsistemas clásico y cuántico. En el presente trabajo de tesis hemos implementado el método SPLAM<sup>21</sup> (scaled position link atom method) adaptado al programa SIESTA. En el método SPLAM un átomo de hidrógeno (el link atom  $H_L$ ) es agregado al sistema en cada unión entre un átomo cuántico ( $C_{qm}$ ) y uno clásico ( $C_{mm}$ ). Este hidrógeno cierra el sistema cuántico y se encuentra siempre ubicado sobre el enlace  $C_{qm}-C_{mm}$ . Las fuerzas que siente el  $H_L$  son trasladadas sobre los átomos  $C_{qm}$  y  $C_{mm}$ . Por otro lado, para mantener el enlace entre  $C_{qm}$  y  $C_{mm}$  los términos de unión, ángulos y diedros que involucran al enlace son considerados por el campo de fuerzas clásico. Las interacciones de Lennard-Jones de los átomos  $H_L$  y  $C_{qm}$  con los átomos clásicos a menos de 3 enlaces de la unión  $C_{qm}-C_{mm}$  son anuladas. Por último, dada la cercanía entre la densidad electrónica del  $H_L$  y la carga parcial del  $C_{mm}$ , la misma se hace cero. El método SPLAM ha demostrado ser eficiente y ha sido probado con éxito en diferentes sistemas de naturaleza biológica.<sup>21,22</sup>

En este trabajo de tesis hemos utilizado la implementación del el método híbrido basado en DFT en el código SIESTA y el campo de fuerzas de AMBER. Los detalles adicionales de la implementación del método QM-MM y su puesta a punto para los cálculos en hemoproteínas se omiten por razones de brevedad.<sup>23</sup>

## **Exploración de la superficie de Energía Potencial**

En esta sección presentaremos tres métodos que permiten, usando diferentes aproximaciones obtener propiedades de interés para un sistema molecular dado. A la función  $3N$  dimensional que describe la energía en función de la posición de los  $N$  átomos, se la conoce como superficie de energía potencial (SEP).<sup>15</sup> Conocer la SEP totalmente nos permitiría obtener todas las propiedades termodinámicas y cinéticas del sistema. Sin embargo ésta es una tarea computacionalmente imposible. Es por eso que se han desarrollado métodos alternativos para explorar la SEP que nos permiten obtener los valores termodinámicos de interés de manera computacionalmente eficiente.

***Minimización de la Energía.*** Las conformaciones espaciales o puntos sobre la SEP más relevantes son aquellos que poseen la menor energía. Los mínimos de energía corresponden a las conformaciones estables del sistema, aquellas en las que es más probable encontrarlo y que por ende son más representativas. La SEP puede poseer muchos mínimos locales y el menor de todos corresponde al mínimo global. Para identificar las conformaciones correspondientes a los puntos de mínima energía usamos un algoritmo de minimización. Los algoritmos de minimización permiten explorar la SEP hasta encontrar un punto donde cualquier movimiento en cualquier dirección haga que la energía del sistema crezca. El problema de encontrar el mínimo de una función multidimensional es un problema matemático complejo y existen diferentes algoritmos que pretenden resolverlo. Entre los algoritmos más usados por los programas de química computacional están el de “steepest descent” y el del gradiente conjugado. En general los métodos de minimización son eficientes para encontrar los mínimos locales o el mínimo global que se encuentra más cercano (en el espacio de coordenadas) al punto de partida

**Búsqueda del camino de reacción.** En los problemas de naturaleza química y bioquímica no sólo importan las propiedades termodinámicas sino también las propiedades cinéticas asociadas con los procesos reactivos del sistema. Mientras que las propiedades termodinámicas están relacionadas con los mínimos de energía y la energía relativa entre éstos, la cinética de un proceso está determinada por la altura de barrera (La energía de activación) que separa los mínimos relevantes del sistema. Los mínimos pueden ser los reactivos y productos de una reacción química o enzimático de interés, o simplemente dos conformaciones alternativas de la proteína. Al camino de mínima energía sobre la SEP que separa ambos mínimos se lo conoce como camino de reacción. Al movernos por el camino de reacción la energía crece hasta llegar a un máximo. A este punto, que corresponde a un máximo de energía a lo largo del camino o coordenada de reacción pero a un mínimo en cualquier otra dirección se lo conoce como punto de ensilladura y corresponde a la conformación del estado de transición.

Muchas veces el camino de reacción puede ser descrito por una coordenada simple relacionada con las distancias interatómicas o con el valor de un ángulo. A la combinación de coordenadas atómicas que permite describir un proceso reactivo se la denomina coordenada de reacción. Una aproximación al camino de reacción se puede obtener usando la técnica denominada de minimización restringida. En esta aproximación el sistema es empujado hacia arriba en la SEP a lo largo de la coordenada de reacción mientras se realiza una minimización en el resto del espacio de conformaciones. Para esto se agrega el siguiente término armónico al Hamiltoniano:

$$V_R = \frac{1}{2}k(\xi - \xi_0)^2$$

Donde  $k$  es una constante de fuerza ajustable, tal que fuerce al sistema a moverse hacia arriba en la SEP,  $\xi$  es el valor de la coordenada que tiene el sistema y  $\xi_0$  el valor de la coordenada de reacción deseado. Al mover  $\xi_0$  a lo largo de la coordenada de reacción, desde reactivos a productos, en pasos fijos y minimizando en cada punto elegido se obtienen los valores de energía a lo largo del camino de reacción. El punto más alto en el camino corresponde al punto de ensilladura y la conformación del mismo es una aproximación al estado de transición para el proceso en estudio.



**Dinámica Molecular.** En sistemas complejos como las proteínas o las soluciones líquidas, debido al gran número de átomos y grados de libertad involucrados, la SEP es en extremo compleja con muchos mínimos locales. Los métodos de simulación molecular nos permiten obtener una serie de configuraciones representativas del sistema de modo que las propiedades termodinámicas extraídas del mismo se correspondan de manera precisa con los valores reales. Una de las técnicas más utilizadas es la de **dinámica molecular**. La dinámica molecular calcula la progresión temporal “real” del sistema. Las posiciones atómicas de los átomos del sistema son propagadas temporalmente integrando las ecuaciones de movimiento de Newton. En cada paso de dinámica la energía y las fuerzas sobre cada átomo son calculadas, y junto con las posiciones y velocidades del paso, se calculan las posiciones en un intervalo de tiempo (el time step “ $dt$ ”) posterior. De esta manera se genera una trayectoria que describe como cambia la conformación del sistema a lo largo del tiempo. La integración de las ecuaciones de Newton se hace de manera numérica y existen diferentes algoritmos, el mas utilizado es tal vez el de Verlet,<sup>24</sup> que es el que utilizamos en todas las simulaciones de dinámica molecular de esta tesis. Es importante notar que el “time step” 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 “time sep” que sea un décimo del tiempo característico del modo mas rápido del sistema. En moléculas, los modos de mayor frecuencia corresponden a la vibración de enlaces, en particular la vibración C-H. Dentro de las propiedades termodinámicas que se pueden calcular usando dinámica molecular para un sistema, tal vez una de las más relevantes sea la temperatura. La temperatura es la manifestación microscópica de la energía cinética promedio de las partículas y está relacionada con la misma de acuerdo a:

$$K = \sum_{i=1}^N \frac{|\mathbf{p}_i|^2}{2m_i} = \frac{k_B T}{2} (3N - N_c)$$

donde  $p_i$  es el momento del átomo  $i$ , y  $3N - N_c$  el numero de grados de libertad. Existen varias razones por las cuales el investigador puede querer controlar la temperatura, en

particular si se desea conocer el comportamiento del sistema al variarla, o simplemente para estudiar reacciones a temperatura constante. Uno de los métodos mas usados para mantener la temperatura fija en un valor deseado en una simulación de dinámica molecular es el algoritmo de Berendsen. El denominado termostato de Berendsen<sup>25</sup> 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:

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

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

## Referencias

- 
- <sup>1</sup> Levine I.N, **Quantum Chemistry, Fifth Edition**, Prentice-Hall, Inc., New Jersey, **2000**.
  - <sup>2</sup> Szabo A, Ostlund N.S, **Modern Quantum Chemistry, First Edition**, Mc Graw-Hill Publishing Company, New York, **1989**.
  - <sup>3</sup> Parr R.G, Yang W, **Density-Functional Theory of Atoms and Molecules**, Oxford University Press, New York, **1989**.
  - <sup>4</sup> Kohn W, Sham L.J, **Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects** *Phys. Rev.* **1965**, 140, A1133.
  - <sup>5</sup> Vosko S. H, Wilk L, Nusair M, **Accurate spin-dependent electron liquid correlation** *Can. J. Phys.* **1980**, 58, 1200.
  - <sup>6</sup> Perdew J.P, Wang Y, **Accurate and simple density functional for the electronic exchange energy: Generalized gradient approximation** *Phys. Rev. B* **1986**, 33, 8800.

---

<sup>7</sup> Perdew J.P, Burke K, Ernzerhof M, **Generalized Gradient Approximation Made Simple** *Phys. Rev. Lett.* **1996**, 77, 3865.

<sup>8</sup> Lee C, Yang W, Parr R, **Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density** *Phys. Rev. B* **1988**, 37, 785.

<sup>9</sup> Perdew J.P, Wang Y, **Accurate and simple analytic representation of the electron-gas correlation energy** *Phys. Rev. B*, **1992**, 45, 13244.

<sup>10</sup> Becke A.D, **Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange** *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 5648.

<sup>11</sup> Soler J.M, Artacho E, Gale J.D, García A, Junquera J, Ordejón P, Sánchez-Portal D, **The Siesta method for ab initio order-N materials simulation** *J. Phys. Condens. Matter* **2002**, 14, 2745.

<sup>12</sup> Sánchez-Portal D, Ordejón P, Artacho E, Soler J.M, **Density functional method for very large systems with LCAO basis sets** *Int. J. Quantum Chem.* **1997**, 65, 453.

<sup>13</sup> Frisch M.J, Trucks G.W, Schlegel H.B, Scuseria G.E, Robb M.A, Cheeseman J.R, Montgomery Jr. J.A, Vreven T, Kudin K.N, Burant J.C, Millam J.M, Iyengar S.S, Tomasi J, Barone V, Mennucci B, Cossi M, Scalmani G, Rega N, Petersson G.A, Nakatsuji H, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Klene M, Li X, Knox J.E, Hratchian H.P, Cross J.B, Bakken V, Adamo C, Jaramillo J, Gomperts R, Stratmann R.E, Yazyev O, Austin A.J, Cammi R, Pomelli C, Ochterski J.W, Ayala P.Y, Morokuma K, Voth G.A, Salvador P, Dannenberg J.J, Zakrzewski V.G, Dapprich S, Daniels A.D, Strain M.C, Farkas O, Malick D.K, Rabuck A.D, Raghavachari K, Foresman J.B, Ortiz J.V, Cui Q, Baboul A.G, Clifford S, Cioslowski J, Stefanov B.B, Liu G, Liashenko A, Piskorz P, Komaromi I, Martin R.L, Fox D.J, Keith T, Al-Laham M.A, Peng C.Y, Nanayakkara A, Challacombe M, Gill P. M.W, Johnson B, Chen W, Wong M.W, Gonzalez C, and Pople J.A, **Gaussian, Inc.**, Wallingford CT, **2004**.

<sup>14</sup>Sankey O.F, Niklewski D, **Ab initio multicenter tight-binding model for molecular-dynamics simulations and other applications in covalent systems.** *J. Phys. Rev. B* **1989**, 40, 3979.

<sup>15</sup> Leach A.R, **Molecular Modeling**. Eds; Addison Wesley Longman, **1997**.

- 
- <sup>16</sup> Brooks B.R, Bruccoleri R.E, Olafson B.D, States D.J, Swaminathan S, Karplus M, **CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations.** *J. Comp. Chem.* **1983**, 4, 187.
- <sup>17</sup> Ott K.H, Meyer B., **Parametrization of GROMOS force field for oligosaccharides and proteins for molecular dynamics simulations,** *J. Comp. Chem.* **1996**, 17, 1068.
- <sup>18</sup> Cornell W.D, Cieplak P, Bayly C.I., Gould I.R, Merz K.M Jr, Ferguson D.M, Spellmeyer D.C, Fox T, Caldwell J.W, Kollman P.A, **A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules** *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 5179.
- <sup>19</sup> Monard G, Merz K. M. Jr., **Combined Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Methodologies Applied to Biomolecular Systems** *Acc. Chem. Res.* **1999**, 32, 904.
- <sup>20</sup> Gao J. **Methods and applications of combined quantum mechanical and molecular mechanical Potentials.** *Reviews in Computational Chemistry*; Lipkowitz K.B, Boyd D. B, Eds. VCH Publishers: New York, **1996**; Vol. 7.
- <sup>21</sup> Eichinger M, Tavan P, Hutter J, Parrinello M, **A hybrid method for solutes in complex solvents: Density functional theory combined with empirical force fields** *J. Chem. Phys.* **1999**, 110, 10452.
- <sup>22</sup> Rovira C, Schultze B, Eichinger M, Evanseck J.D, Parrinello M.J, **Influence of the heme pocket conformation on the structure and vibrations of the Fe-CO bond in myoglobin: a QM/MM density functional study.** *Biophys. J.* **2001**, 81, 435.
- <sup>23</sup> Crespo A, Scherlis D.A, Martí M.A, Ordejón P, Roitberg A.E, Estrin D.A, **A DFT-Based QM-MM Approach Designed for the Treatment of Large Molecular Systems: Application to Chorismate Mutase** *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 13728.
- <sup>24</sup> Verlet L. **Computer "Experiments" on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules** *Phys. Rev.* **1967**, 159, 98.
- <sup>25</sup> Berendsen H.J.C, Postma J.P.M, van Gunsteren W, DiNola A., Haak J.R, **Molecular dynamics with coupling to an external bath.** *J. Chem. Phys.* **1984**, 81, 3684.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

## Capítulo 3

### **Reacciones de nitroxilo con porfirinas de hierro y manganeso**

En el siguiente capítulo se presenta el estudio experimental de las reacciones de nitroxilo (HNO) con diferentes porfirinas modelo de hierro y manganeso. El capítulo comienza con una breve introducción a la química del nitroxilo y su relevancia fisiológica. En segundo lugar presentamos un resumen relacionado con las reacciones del NO con las mismas porfirinas. Luego se presentan los objetivos y los materiales y métodos experimentales correspondientes a esta parte del trabajo de tesis. A continuación, se presentan los resultados para las reacciones del HNO con las porfirinas de ambos metales, seguido de un análisis cinético y una propuesta mecanística para la reacción. Por otra parte se estudia la factibilidad del uso de las porfirinas de manganeso como agentes atrapantes del HNO en un medio fisiológico. Finalmente se presentan las conclusiones relacionando los datos obtenidos para las porfirinas modelo con los datos de literatura para diversas hemoproteínas.

## Introducción

*El nitroxilo y la química biológica.* El óxido nítrico (NO) es tal vez el óxido de nitrógeno más famoso, y si bien fue caracterizado hace más de 200 años por Joseph Priestly<sup>1</sup> recién en 1980 se reconoció su importancia fisiológica debido al descubrimiento de Ignarro, quien demostró que era el mensajero producido por las células endoteliales, responsable de la vasodilatación arterial.<sup>2</sup> A raíz de este descubrimiento de su rol fisiológico, las características reactivas del NO fueron estudiadas detalladamente durante las últimas dos décadas.<sup>1,3,4,5,6</sup> Más recientemente, se sumó a la familia de especies reactivas de nitrógeno biológicamente relevantes el producto de la reducción monoelectrónica del NO, el anión nitroxilo ( $\text{NO}^-$ ) o su ácido conjugado el nitroxilo (HNO).<sup>7</sup> Fisiológicamente es considerado un subproducto de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), que en condiciones fisiológicas normales produce NO.<sup>8</sup> La producción de HNO/ $\text{NO}^-$  debida a la acción de la NOS se cree asociada al estrés oxidativo<sup>9</sup> o a la carencia de cofactores.<sup>10,11</sup> También, se ha propuesto que el HNO/ $\text{NO}^-$  puede ser un subproducto de las reacciones de transnitrosación en tioles.<sup>12</sup> Ha existido en los últimos años una gran controversia respecto del valor del pKa para el HNO/ $\text{NO}^-$ , sin embargo el análisis crítico de los datos de literatura recientes sugieren que a pH fisiológico la especie protonada y neutra (HNO) es la mayoritaria.<sup>13,14,15</sup>

Dada la inestabilidad del HNO/ $\text{NO}^-$  en solución acuosa (la reacción de dimerización para dar  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $2\text{HNO} \Rightarrow \text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$  ocurre a velocidad casi difusional)<sup>14</sup> para estudiar sus efectos se utilizan los comúnmente llamados donores de HNO/ $\text{NO}^-$ . Estos compuestos se descomponen térmicamente para dar HNO u  $\text{NO}^-$ , los más comúnmente utilizados son el trióxodinitrato de sodio ( $\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$ , o sal de Angeli SA),<sup>16,17</sup> o el ácido toluensulfhidroxámico (TSHA), un derivado del ácido de Piloty.<sup>18</sup> La SA es estable a pH alcalinos, y se descompone en medio ácido ( $\text{pH} < 7$ ) para dar HNO y nitrito, aunque a pH muy bajos también se ha sugerido que puede producir NO.<sup>17</sup> El TSHA en cambio es estable a pH ácido y se descompone en soluciones alcalinas para dar toluensulfonato y  $\text{NO}^-$ .<sup>18</sup>

Entre los posibles blancos moleculares del HNO se encuentran las hemoproteínas,<sup>19</sup> (en los estados férrico<sup>20</sup> y ferroso<sup>21,22</sup>), los tioles,<sup>23</sup> el oxígeno molecular, el NO y el HNO mismo.<sup>14</sup> Los estudios más detallados al respecto se han centrado en la reactividad del HNO/NO<sup>-</sup> con la hemoglobina y la mioglobina.<sup>20,21</sup> La mioglobina en su estado ferroso forma un complejo Fe<sup>2</sup>-HNO, coordinado por el nitrógeno, (observado por resonancia magnética nuclear, RMN) que es estable por días a pH alcalinos,<sup>21</sup> lo que sustenta la idea de que el HNO es en realidad un ácido débil. **Dada esta amplia gama de posibilidades, para un entorno particular, la vía predominante de reacción del HNO estará determinada por la velocidad relativa entre las posibles reacciones y la concentración local de los reactivos.** Resultados comparativos realizados con SA sugieren que el HNO reaccionaría preferentemente con proteínas con centros férricos o tioles antes que con oxígeno molecular o consigo mismo, para dar N<sub>2</sub>O.<sup>24</sup>

Paralelamente a los estudios *in-vitro* mencionados en el párrafo anterior, los resultados obtenidos *in-vivo* sugieren que el NO y los donores de HNO/NO<sup>-</sup> poseen actividad farmacológica marcadamente distinta<sup>25,26,27</sup> y que ambas especies podrían coexistir en ciertos tejidos. Los intentos para discriminar los efectos de ambas especies han sido un área de interesantes desarrollos. Entre ellos se destacan el uso de “spin traps” como agentes atrapantes de NO, que sin embargo ha producido resultados controversiales.<sup>23,28</sup> En otros estudios, la cisteína fue utilizada como agente bloqueante de la actividad de HNO o NO, sin embargo en estos casos, es necesario realizar posteriormente un análisis de los productos de reacción para determinar cuál de las dos especies estuvo presente.<sup>29</sup> **La discriminación inequívoca de la presencia de HNO u NO, continúa siendo una de las claves para el análisis e interpretación de la investigación reciente en esta área.**

***Reacciones de NO con metaloporfirinas.*** Los grupos hemo aislados junto con las metaloporfirinas sintéticas nos ofrecen la oportunidad de estudiar la reactividad y cinética del grupo prostético de las hemoproteínas, sin las complicaciones que surgen de la interacción de los ligandos reactivos con la matriz proteica. Como ya se mencionó en la introducción, este tipo de estudios permiten comprender la reactividad intrínseca del grupo hemo frente a los ligandos de interés y es el punto de partida para analizar la función de las hemoproteínas. Los reactivos porfirínicos utilizados son por ejemplo el



grupo hemo aislado (Hemina IX), el hemo péptido microperoxidasa, que provee un modelo de hemo pentacoordinado con una histidina y/o las metalo tetrafenil porfirinas sustituidas en los anillos bencénicos con grupos funcionales cargados, lo cual las hace solubles en agua.

Las reacciones de NO y CO gaseoso o de donores de NO con metaloporfirinas han sido estudiadas durante décadas. Una notación que resulta conveniente para clasificar los complejos nitrosilados con metales en distinto estado de oxidación es la propuesta por Enemark y Feltham.<sup>30</sup> En esta notación el complejo metal-NO es tratado como una unidad caracterizada por el número de electrones resultante de la suma de los electrones *d* del metal y los electrones de los orbitales  $\pi^*$  del ligando. Los resultados de varios estudios muestran que el NO reacciona con las hierro-porfirinas velozmente (las constantes cinéticas para las reacciones de asociación tienen valores  $> 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )<sup>31</sup>, formando los correspondientes complejos nitrosilados para porfirinas tanto férricas como ferrosas, siendo los complejos ferrosos  $\{\text{FeNO}\}^7$  mucho más estables que los férricos  $\{\text{FeNO}\}^6$  lo que se evidencia en la significativamente menor constante de disociación.<sup>31</sup> Otro punto importante en las reacciones de NO con hierroporfirinas, es el hecho de que en los complejos nitrosilados férricos  $\{\text{FeNO}\}^6$ , el NO posee cierta densidad de carga positiva. Esto se explica formalmente, en el contexto del modelo de Lewis, debido a la existencia de las siguientes estructuras de resonancia:  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NO} \leftrightarrow \text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}^+$ . El  $\text{NO}^+$  resultante es por lo tanto propenso a reaccionar con diversos nucleófilos ( $\text{NuCl}^-$ ) (por ejemplo  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{OH}^-$ ), según las siguientes reacciones:



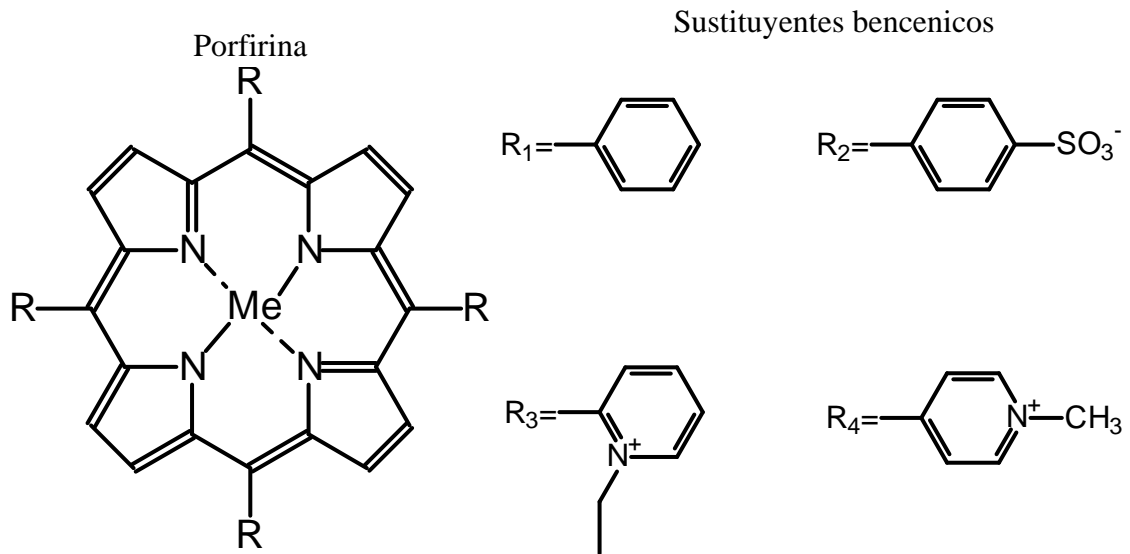
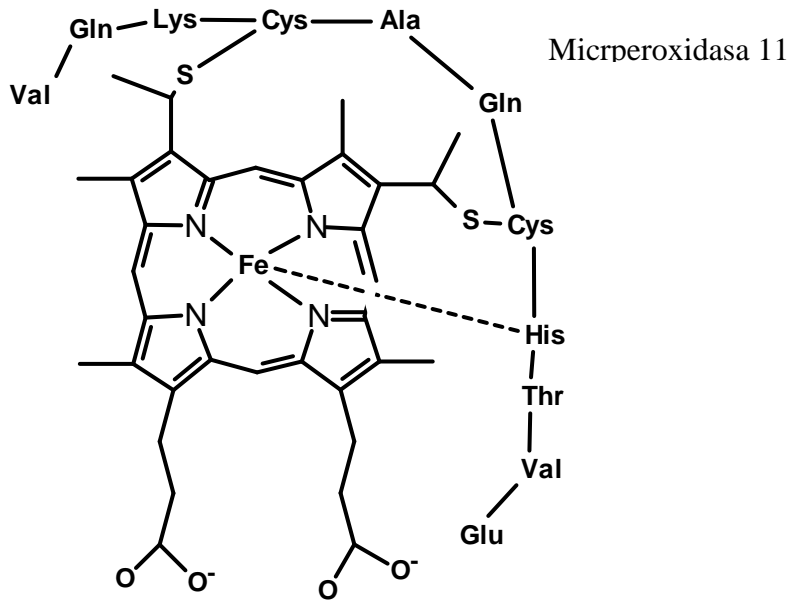
A este proceso se lo denomina nitrosilación reductiva.<sup>32</sup> El complejo  $\text{Fe}^{\text{II}}$  resultante puede reaccionar por lo tanto con otra molécula de NO para dar el correspondiente complejo  $\{\text{FeNO}\}^7$ . Mediante el proceso de nitrosilación reductiva las porfirinas férricas, al reaccionar con NO en exceso o en presencia de nucleófilos, dan como producto complejos nitrosilados ferrosos  $\{\text{FeNO}\}^7$ .<sup>32</sup>

En el caso de porfirinas con manganeso el caso es ligeramente diferente. Las porfirinas de  $\text{Mn}^{\text{II}}$  reaccionan con NO para dar los correspondientes complejos  $\{\text{MnNO}\}^6$  que son

estables por días a temperatura ambiente.<sup>33</sup> Sin embargo las porfirinas de Mn<sup>III</sup> solo reaccionan muy lentamente con NO y la nitrosilación reductiva ocurre sólo con exceso de NO gas y con un tiempo medio de reacción del orden de horas.<sup>33</sup>

## Objetivos

Con el objetivo de analizar detalladamente el mecanismo y la cinética de reacción del HNO/NO<sup>-</sup> con porfirinas de hierro y manganeso, junto con el objetivo adicional de encontrar una reacción que permita discriminar inequívocamente los efectos del HNO/NO<sup>-</sup> de los del NO decidimos estudiar las reacciones de diversos donores de HNO/NO<sup>-</sup> (SA y TSHA) con diferentes porfirinas de hierro y manganeso. Específicamente se utilizaron la microperoxidasa 11 (MP11), las porfirinas sintéticas solubles en medio acuoso con periferia negativa meso-tetrakis(4-sulfonatofenil) porfirinato de Fe(III) (Fe<sup>III</sup>TPPS) o Mn(III) (Mn<sup>III</sup>TPPS) o con periferia positiva meso-tetrakis (N-etilpiridinio-2-il) porfirina de Mn(III) (Mn<sup>III</sup>TEPyP), la meso-tetrakis (N-metilpiridinio-4-il) porfirina de Fe(III) (Fe<sup>III</sup>TMPyP) y la porfirina soluble en medio orgánico de Fe(III) meso-tetrakis-tetrafenil porfirina (Fe<sup>III</sup>TPP). A continuación se muestran las estructuras de las diversas porfirinas.



## Materiales y Métodos

**Reactivos.** MP11, Fe<sup>III</sup>TPPS, Fe<sup>III</sup>TMPyP, Fe<sup>III</sup>TPP y los donores de NO (nitroprusiato de sodio y S-nitroso-N-acetilpenicilamina SNAP) fueron comprados en Sigma-Aldrich Argentina. Mn<sup>III</sup>TEPyP y Mn<sup>III</sup>TPPS fueron comprados en Frontier Scientific. La SA y TSHA fueron sintetizados según los protocolos publicados.<sup>34</sup>

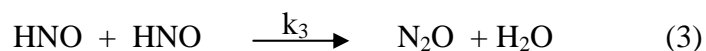
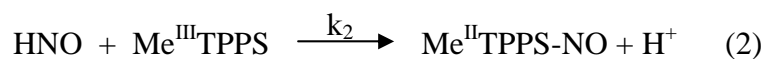
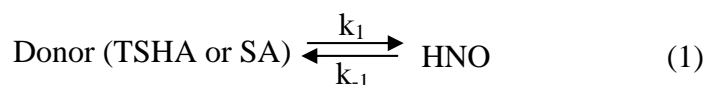
**Reacción de donores de HNO con porfirinas de Fe<sup>III</sup>/Mn<sup>III</sup>.** Todas las reacciones se llevaron a cabo a 25 °C en buffer fosfato 0.1 M con EDTA 10<sup>-4</sup> M. Las concentraciones de porfirina utilizadas se variaron entre 1-10 x 10<sup>-6</sup>M, valores para los cuales la absorbancia de las bandas analizadas estaba entre 0.5-1. Los espectros fueron medidos en un espectrofotómetro UV-visible modelo HP8453 con un arreglo de diodos. Se utilizó una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico sellada con un septum de goma. Todas las reacciones se llevaron a cabo en atmósfera inerte, salvo que se mencione específicamente lo contrario. Las soluciones de SA y TSHA se prepararon nuevas antes de cada set de experimentos y se mantuvieron en hielo para evitar la descomposición térmica del donador. Las concentraciones del donador se midieron espectroscópicamente antes de cada experimento. Las soluciones de TSHA se prepararon en etanol 96% y fueron utilizadas en soluciones finales con una relación etanol/agua menor al 1%. La confirmación de la obtención de los complejos nitrosilados correspondientes se hizo por comparación del espectro UV-Vis con datos de literatura y por comparación con el espectro obtenido para la reacción entre las correspondientes Fe(II) porfirinas y NO gaseoso. Confirmación adicional de la formación de los complejos provino de las espectroscopías IR y Raman-resonante.

**Obtención de cristales del complejo Fe<sup>II</sup>TPPNO por reacción entre Fe<sup>III</sup>TPPP con SA y TSHA.** El complejo Fe<sup>II</sup>TPPNO se obtuvo agregando gota a gota una solución de SA (1.7 mg 0.014 mmoles) en 3 ml de metanol a una solución de Fe<sup>3</sup>TPPCl (10mg 0.014 mmoles) en un mínimo volumen de cloruro de metileno (aprox. 2 ml) con agitación. Durante todo el tiempo de reacción las soluciones se mantuvieron en atmósfera de argón. Luego de aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente se forma un precipitado

rojo-amarronado. El precipitado fue separado por centrifugación y lavado con agua. Luego de la recristalización en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH se obtuvieron 7.9 mg de Fe<sup>2</sup>TPPNO (rendimiento: 80%). El producto fue caracterizado por espectroscopía UV/Visible, FTIR y microanálisis. Todos los datos espectroscópicos coincidieron con los esperados para el complejo según los valores de literatura<sup>35</sup> ( $\lambda_{\text{max}}$  413 nm,  $\nu_{\text{NO}}$  1680 cm<sup>-1</sup>). La reacción de Fe<sup>3</sup>TPPCl con TSHA dio el mismo producto en las mismas condiciones experimentales con la salvedad de que a la solución se le agregó 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) como base orgánica para descomponer el TSHA.

**Determinación de las constantes de velocidad.** Todas las reacciones llevadas a cabo como se menciona en el párrafo anterior se siguieron en el tiempo hasta obtener un espectro constante. Los tiempos de reacción oscilaron entre 60 segundos y 2 horas. Las velocidades iniciales se obtuvieron de las gráficas de concentración de producto/reactivo vs tiempo luego de interpolar la función correspondiente.

La  $k_{\text{obs}}$  correspondiente a las reacciones bimoleculares se obtuvieron de la pendiente del gráfico correspondiente de velocidad inicial vs concentración de donador o HNO, según corresponda, mediante técnicas de regresión lineal. Asumiendo que la coordinación del donador a la porfirina es el paso limitante de la reacción, la  $k_{\text{obs}}$  correspondiente obtenida de esta manera es la constante de asociación ( $k_{\text{on}}$ ) para el donador en cuestión. En los casos en los cuales la descomposición espontánea del donador (producción de HNO/NO<sup>-</sup>) fuera el paso limitante se utilizó el siguiente análisis cinético:



Donde la reacción (1) corresponde a la descomposición reversible del donador, la (2) representa la unión del HNO/NO<sup>-</sup> a la porfirina y la (3) representa la dimerización del HNO. Asumiendo que la reacción (1) es el paso limitante y utilizando la aproximación de estado estacionario para la concentración de HNO [HNO], todo el HNO producido por la

reacción (1) debe ser consumido en las reacciones (2) y (3). En este caso podemos igualar la velocidad de producción de HNO ( $v_1$ ) a su velocidad de consumo ( $v_2 + v_3$ ). O sea  $v_1 = v_2 + v_3$ . Tanto la velocidad de descomposición del donador ( $v_1$ ) como la velocidad de formación de porfirina-HNO son conocidas para cada experimento ( $v_1$  se obtiene a partir de la concentración de donador y  $k_1$ , y  $v_2$  es la que se mide). Por lo tanto, conociendo  $v_1$  y  $v_2$  se puede obtener una estimación de  $v_3$ . La velocidad de dimerización del HNO responde a la ley de velocidad  $v_3 = k_3[\text{HNO}]^2$ . La constante de velocidad para esta reacción ( $k_3$ ) es conocida ( $k_3 = 8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ).<sup>14</sup> Por lo tanto, calculando  $v_3$  (a partir de  $v_1$  y  $v_2$ ) y conociendo  $k_3$  se puede estimar la concentración de HNO en cada caso. La reacción inversa a la reacción (1) no se tuvo en cuenta debido a que su velocidad es insignificante comparada con  $v_2$  o  $v_3$ .<sup>16,17,18</sup> Utilizando los valores estimados de [HNO] se graficaron las velocidades iniciales para la reacción (2),  $v_2$  vs [HNO], y a partir de la pendiente del gráfico se obtuvieron los valores de la constante de asociación bimolecular del HNO con la porfirina correspondiente. ( $k_{\text{on(HNO)}}$ ) El error para cada una de las constantes obtenidas se obtuvo propagando el error de la pendiente obtenida en la regresión, en la cual se incluyó el error estadístico (desvío estándar) para cada uno de los valores medios utilizados.

## Resultados

**Reacción de los donores de HNO con Fe<sup>3</sup>-Porfirinas.** El agregado de donores de HNO/NO- (TSHA o SA) a soluciones de Fe<sup>3</sup>TPPCL, Fe<sup>3</sup>TPPS, Fe<sup>3</sup>TMPyP, Fe<sup>3</sup>MP11 y Hemina IX, dio como resultado en todos los casos la obtención de los complejos Fe<sup>2</sup>-porfirina-NO correspondientes. (las reacciones se realizaron en cada caso como se describe en la sección de Materiales y Métodos). En todos los casos los espectros UV-visible de los productos (Figura 1) fueron los mismos que se obtenían al realizar la siguiente reacción:



que es el método tradicional para obtener los complejos porfirínicos {FeNO}<sup>7</sup> (ferroso). En el caso de las porfirinas solubles (Hemina IX y FeTPPS) se confirmó adicionalmente la identidad del producto de reacción por espectroscopía Raman resonante.

**Figura 1**

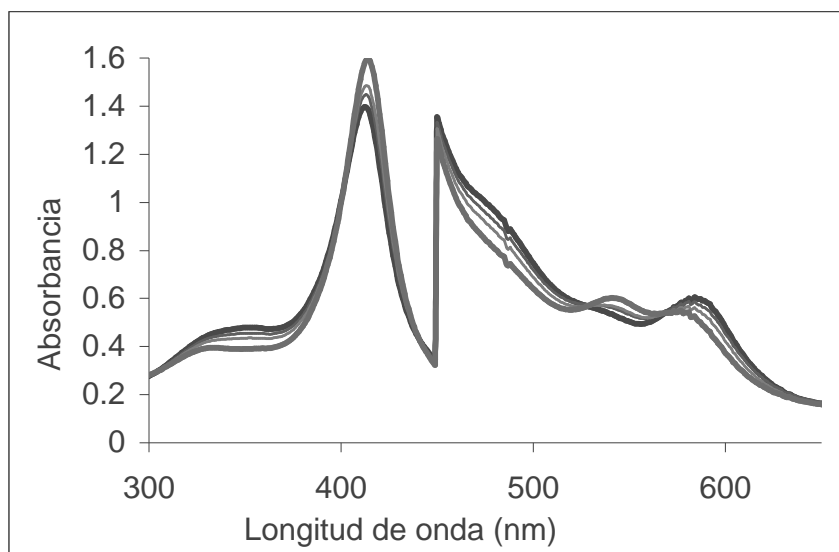


Figura 1A. Cambios espectrales correspondientes a la conversión de Fe<sup>III</sup>TMPyP 5 x 10<sup>-6</sup> M, (trazo negro,  $\lambda_{\text{max}}$ =408nm) a Fe<sup>II</sup>TMPyP-NO (trazo gris  $\lambda_{\text{max}}$ =415nm) en buffer fosfato a 25<sup>0</sup> C. La región 450-700 nm está ampliada 5 veces para observar las bandas Q.

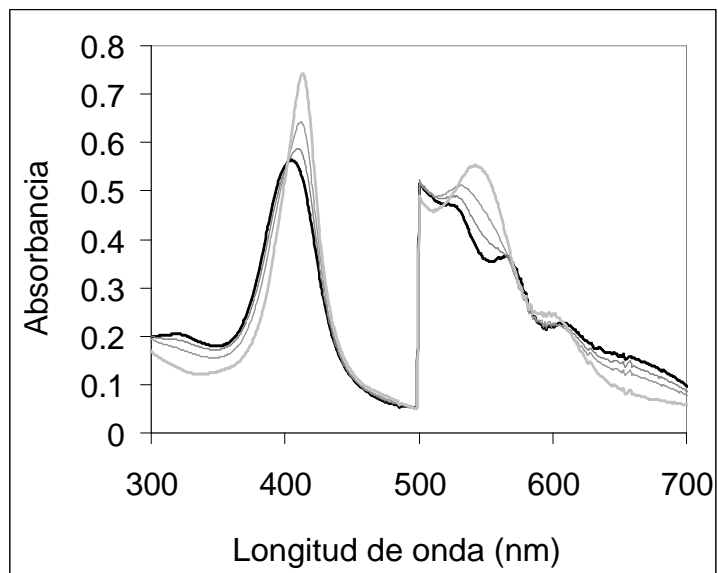


Figura 1B. Cambios espectrales correspondientes a la conversión de  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$   $5 \times 10^{-6}$  M, (trazo negro,  $\lambda_{\text{max}}=403\text{nm}$ ) a  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{TPPS-NO}$  (trazo gris  $\lambda_{\text{max}}=415\text{nm}$ ) en buffer fosfato a  $25^{\circ}$  C. La región 500-700 nm está ampliada 5 veces para observar las bandas Q.

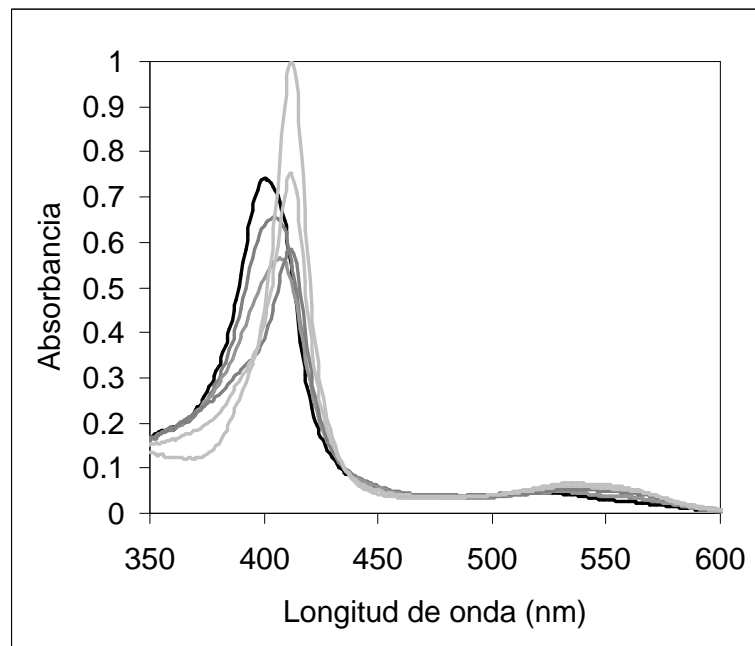


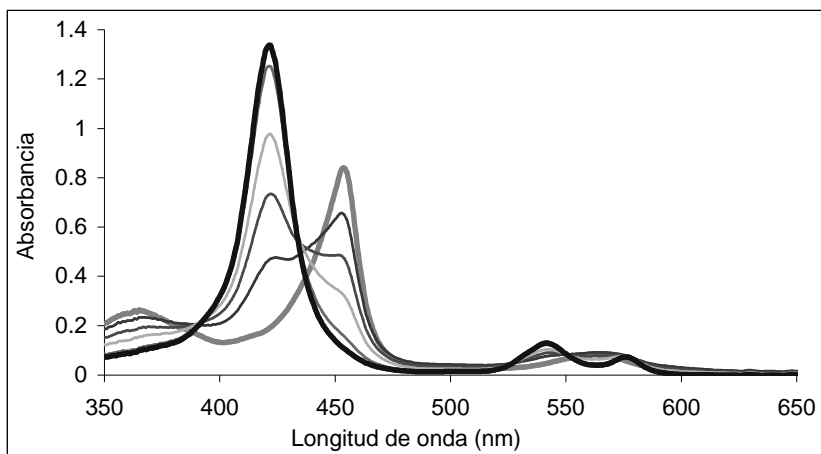
Figura 1C. Cambios espectrales correspondientes a la conversión de  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{MP11}$   $5 \times 10^{-6}$  M, (trazo negro,  $\lambda_{\text{max}}=405\text{nm}$ ) a  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{MP11-NO}$  (trazo gris  $\lambda_{\text{max}}=411\text{nm}$ ) en buffer fosfato a  $25^{\circ}$  C.

La confirmación adicional de la obtención de  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$  porfirinas mediante el uso de donores de HNO provino de la reacción con  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPCl}$ . Esta porfirina soluble en medio orgánico es fácilmente cristizable y se ha utilizado para caracterizar estructuralmente



diversos complejos nitrosilados. Realizando la reacción de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos se obtuvieron cristales del producto de la reacción de TSHA u SA con  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPCl}$ . Los mismos fueron analizados por FTIR obteniéndose una banda para el estiramiento de NO en  $1680\text{ cm}^{-1}$ . Este valor es típico para complejos  $\{\text{FeNO}\}^7$  mientras que los complejos  $\{\text{FeNO}\}^6$  presentan por ejemplo valores para el estiramiento del NO superiores a  $1800\text{ cm}^{-1}$ .

**Reacciones de los Donores de  $\text{HNO}/\text{NO}^-$  con porfirinas de Mn.** De manera análoga a lo observado con las porfirinas de hierro, el agregado de una solución de SA o TSHA a una solución de  $\text{Mn}^{\text{III}}\text{TEPyP}$  en atmósfera inerte produjo los cambios espectrales que se ven en la Figura 2, que corresponden a la conversión de la porfirina libre a  $\text{Mn}^{\text{II}}\text{TEPyP-NO}$ .



**Figura 2.** Cambios espectrales correspondientes a la conversión de  $\text{Mn}^{\text{III}}\text{TEPyP}$   $5 \times 10^{-6}\text{ M}$ , (trazo gris,  $\lambda_{\text{max}}=455\text{nm}$ ) a  $\text{Mn}^{\text{II}}\text{TEPyP-NO}$  (trazo negro  $\lambda_{\text{max}}=422\text{nm}$ ) en buffer fosfato a  $25^{\circ}\text{C}$ .

Cambios espectrales similares se observan para la reacción de SA o TSHA con  $\text{Mn}^{\text{III}}\text{TPPS}$  aunque en este caso por los motivos que se explicarán a continuación se requiere un exceso de donador para completar la reacción.

Para poder utilizar las porfirinas de manganeso como atrapantes de  $\text{HNO}/\text{NO}^-$ , o en ensayos de discriminación frente a los efectos del NO, es imprescindible que estas sean inertes frente al NO gaseoso o sus donadores. Por lo tanto decidimos estudiar el comportamiento de la  $\text{Mn}^{\text{III}}\text{TEPyP}$  frente al NO. El agregado de soluciones de donadores de

NO comúnmente utilizados como el nitroprusiato de sodio o el SNAP, a soluciones de  $Mn^{III}TEPyP$ , en condiciones equimolares o en exceso del donador (hasta 10 veces) en atmósfera inerte no produjo reacción alguna (o sea no se observaron cambios espectrales) luego de más de 30 minutos. Solo se observó formación de  $Mn^{II}TEPyP-NO$  si al medio de reacción se agregaba un agente reductor (ditionito de sodio o ácido ascórbico) en relación equimolar con la porfirina antes o después del agregado del donador. El resultado confirma lo observado por Spajosevich et al.<sup>33</sup> quienes observaron que la nitrosilación reductiva en porfirinas de manganeso sólo ocurre muy lentamente y con exceso de NO gaseoso.

Además de saber que no hay interferencia del NO, el uso de las porfirinas de manganeso como atrapantes o detectoras de HNO en medio biológico requiere el conocimiento del comportamiento de la reacción en medio aeróbico. La reacción de  $Mn^{III}TEPyP$  con SA/TSHA en presencia de oxígeno dió como resultado el derivado nitrosilado con la misma velocidad y rendimiento casi estequiométrico, al igual que en atmósfera de argón. (Figura 3)

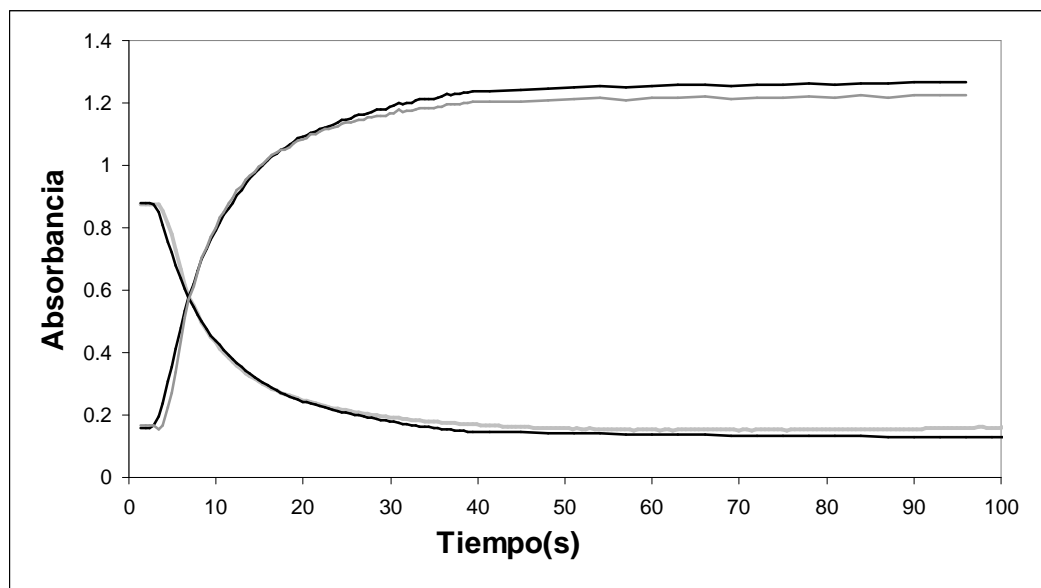
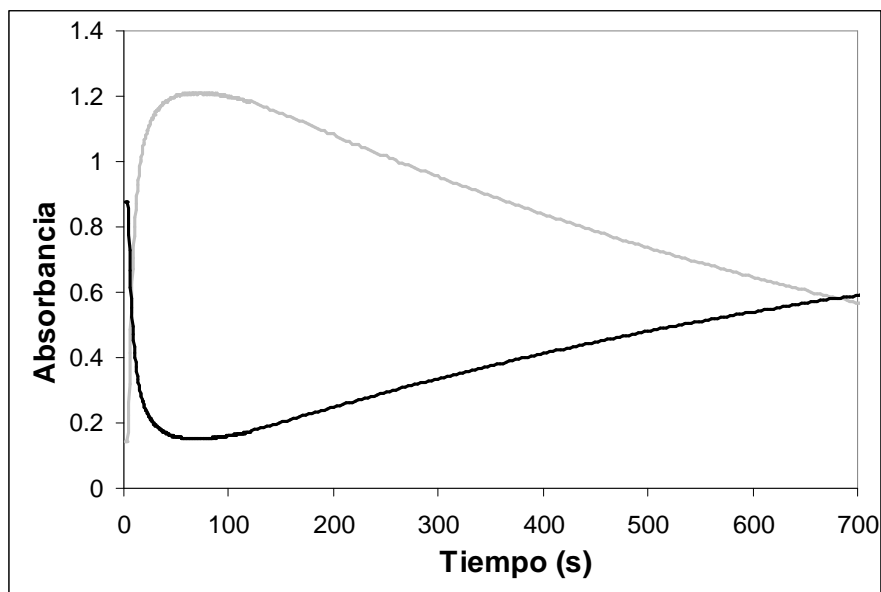


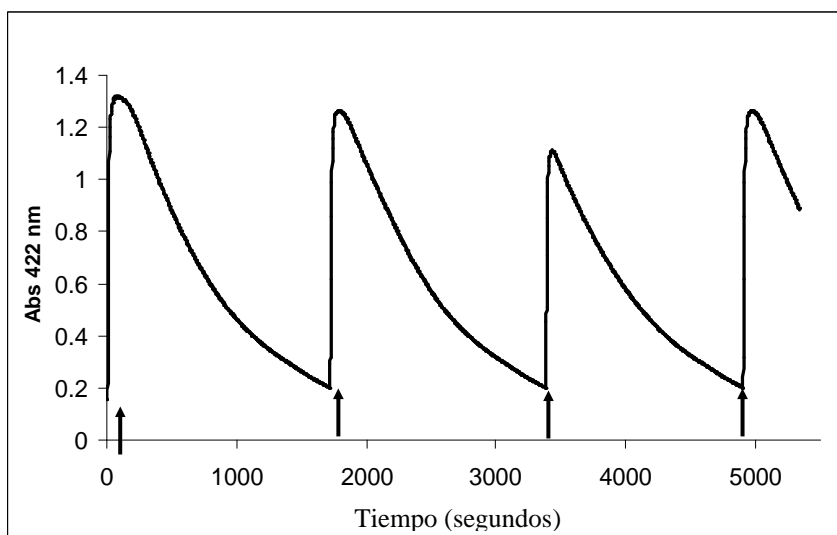
Figura 3. Absorbancia en función del tiempo para  $Mn^{III}TEPyP$  (454 nm) y  $Mn^{II}TEPyP-NO$  (422 nm), en la reacción de  $Mn^{III}TEPyP$  con SA en atmósfera de argón (negro) y en presencia de oxígeno (gris).

Sin embargo, en presencia de oxígeno el producto nitrosilado no es estable y se descompone con un tiempo medio de varios minutos generando nuevamente el espectro de partida asignado a  $Mn^{III}TEPyP$ . (Figura 4)



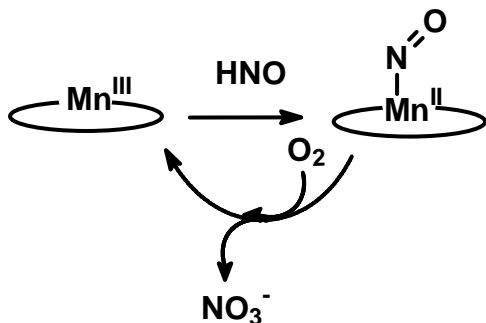
**Figura 4.** Seguimiento de la reacción de SA y  $Mn^{II}TEPyP$  en aire. ( $Mn^{III}TEPyP$ : trazo negro,  $\lambda_{max}= 454$  nm;  $Mn^{II}TEPyP-NO$ : trazo gris,  $\lambda_{max}= 422$  nm).

La confirmación de que el oxígeno reacciona con  $Mn^{II}TEPyP-NO$  para dar de nuevo el complejo de partida se confirma al agregar nuevamente SA al medio de reacción lo que da lugar de nuevo a la formación del complejo nitrosilado. Si la reacción se mantiene en presencia de oxígeno es posible realizar muchos ciclos de reacción consumiendo catalíticamente SA. (Figura 5) El mismo comportamiento se observa con TSHA.



**Figura 5.** Absorbancia de  $Mn^{II}TEPyP-NO$  (422 nm) para la reacción de  $Mn^{III}TEPyP$  con SA/TSHA en aire. Las flechas indican cada agregado de SA.

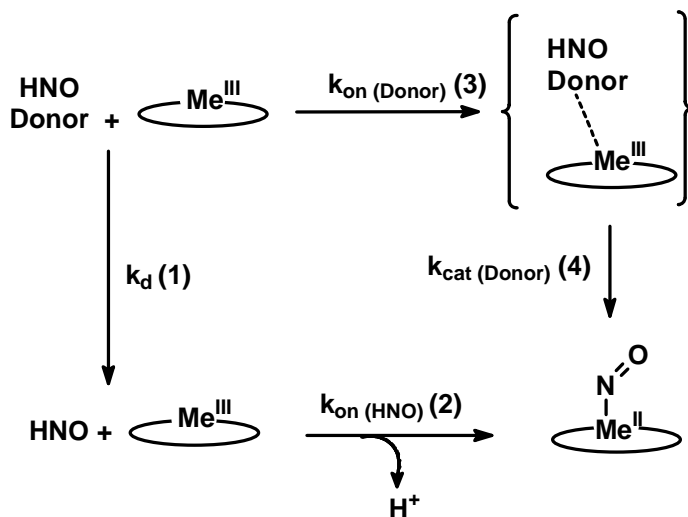
El comportamiento de la reacción en presencia de aire evidenciado en la Figura 5 se explica de acuerdo al siguiente Esquema (2):



Esquema 2: Mecanismo catalítico de reacción de los donores de HNO con porfirinas de Manganeso III en medio aeróbico.

La clave del mecanismo catalítico es el ataque del  $O_2$  al complejo nitrosilado para reoxidar al metal y generar nitrato.

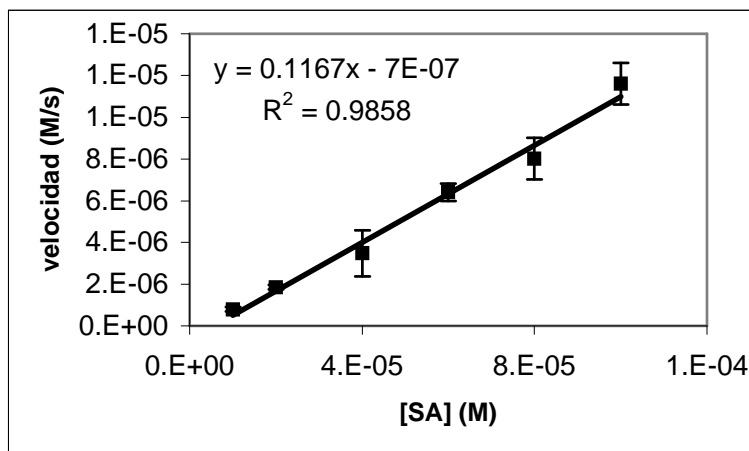
**Estudio cinético de las reacciones.** Los tiempos de vida media para la descomposición espontánea de la SA y el TSHA en las condiciones experimentales utilizadas son del orden de 15-30 min. Sin embargo, dependiendo de la porfirina utilizada, en condiciones estequiométricas de relación donor/porfirina los tiempos medios de reacción varían entre 5 segundos y varias horas. Para conciliar esta observación con un mecanismo de reacción que permita obtener constantes cinéticas relevantes propusimos el mecanismo descrito en el siguiente esquema:



Esquema 3: Mecanismos de reacción de los donores de HNO con porfirinas de  $Fe^{III}$  y  $Mn^{III}$

Donde  $k_d$  es la constante de velocidad de descomposición espontánea del donador,  $k_{cat(Donor)}$  es la constante de velocidad de la descomposición del donador catalizada por la porfirina,  $k_{on(Donor)}$  y  $k_{on(HNO)}$  son las constantes de asociación a la porfirina del donador y el HNO respectivamente. Las reacciones inversas no se consideraron dado que se supuso que sus velocidades son despreciables en las condiciones experimentales utilizadas. Si la formación de producto ocurre debido a las reacciones (1) y (2), entonces la descomposición del donador ( $k_{Donor}$ ) debe ser el paso limitante y el tiempo medio de reacción no puede ser menor que el de producción de HNO debido a la descomposición espontánea del donador. Por otro lado, si la velocidad de reacción supera la velocidad de descomposición del donador, esto indicaría que la formación de producto ocurre a través de las reacciones (3) y (4) y que la coordinación del donador a la porfirina es el paso limitante. En los casos en que la reacción ocurre a través de los pasos (1) y (2)  $k_{on(HNO)}$  se calculó a partir de las gráficas de velocidad inicial vs [HNO] de acuerdo a lo mencionado en Materiales y Métodos. En los casos en que la reacción ocurrió por los pasos (3) y (4), la constante de asociación  $k_{on(Donor)}$  se obtuvo de las gráficas de velocidad inicial vs [donador] como se menciona en Materiales y Métodos.

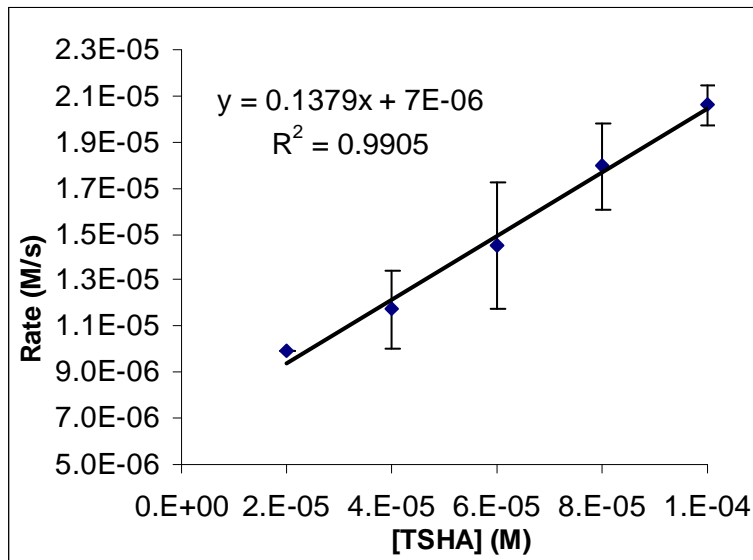
*Reacción de  $Fe^{III}TMPyP$  con SA.* El agregado de una solución de SA a la solución de  $Fe^{III}TMPyP$  a pH 7 en atmósfera inerte en relación equimolar donador/porfirina, produjo la conversión total de  $Fe^{III}TMPyP$  a  $Fe^{II}TMPyP-NO$  en menos de 1 minuto. La vida media de la SA en estas condiciones es de aproximadamente 15 min.<sup>16</sup> Por lo tanto queda claro que la descomposición de SA no es el paso limitante y la reacción puede ocurrir por los pasos (3) y (4). Del gráfico de velocidad inicial vs [SA] (Figura 6) se obtiene por lo tanto la constante de velocidad de coordinación de la SA a esta porfirina ( $k_{on(SA)} = 1.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )



**Figura 6.** Gráfico de velocidad inicial de conversión de  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TMPyP } 5 \times 10^{-6} \text{ M}$  a  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{TMPyP-NO}$  (M/s) vs concentración de SA (M). ( pH 7 buffer fosfato,  $25^{\circ}\text{C}$ ).

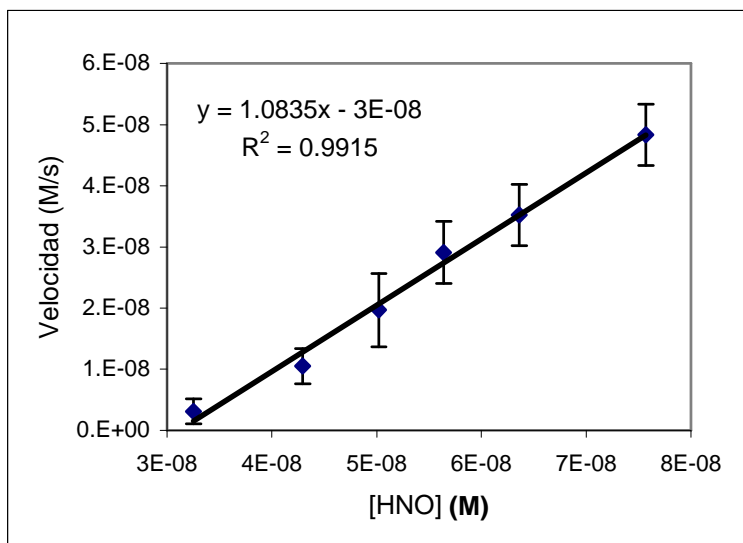
Para confirmar el efecto catalítico de las porfirinas con periferia positiva sobre la descomposición de la SA, decidimos realizar la reacción en buffer fosfato pH 10. A este pH la SA se encuentra principalmente en su estado dianiónico ( $\text{N}_2\text{O}_3^{2-}$   $\text{pka}_2=9.7$ ) que es muy estable ya que la vida media de descomposición es de 120 min.<sup>16</sup> Sin embargo, al igual que en el caso a pH 7, la reacción tuvo un tiempo de vida media cercano a 5 s, indicando que nuevamente la reacción (3) es el paso limitante y la porfirina cataliza la descomposición de la SA.

*Reacción de  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TEPyP}$  con TSHA.* A pH 7, el TSHA se encuentra principalmente en su forma neutra ( $\text{RNHOH}$ ) y se descompone lentamente ( $k_{\text{tsHa}}$  pH < 7,  $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ,  $t_{1/2} = 230$  min). A pHs mayores ocurre la desprotonación que da como resultado un equilibrio entre las especies ( $\text{R-N}^{\ominus}\text{-OH} \rightleftharpoons \text{R-NH-O}^{\ominus}$ ), esto facilita la descomposición del TSHA ( $k_{\text{TSHA}}$ , pH 10 =  $3.5 \times 10^{-4}$ ,  $t_{1/2} = 33$  min).<sup>18</sup> Similarmente a lo observado con SA, el agregado de TSHA a una solución de  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TEPyP}$  en atmósfera inerte a pH 10 produjo la conversión total a  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{TEPyP(NO)}$  en menos de 1 minuto. Como ya mencionamos previamente, en estas condiciones el TSHA se descompone con una vida media de 33 min, lo que nuevamente sugiere que la porfirina acelera la descomposición del TSHA y que la interacción TSHA-porfirina es el paso limitante de la reacción. En este escenario, del gráfico de velocidad de reacción vs [TSHA] (Figura 7) se obtiene el valor para  $k_{\text{on(TSHA)}}$ . =  $6.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .



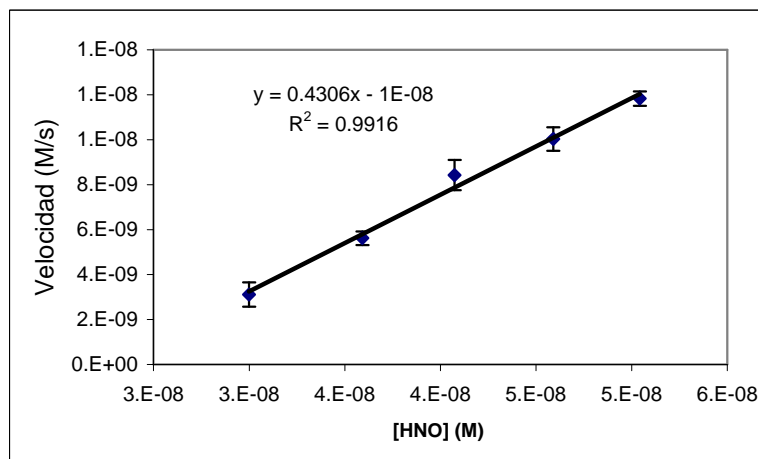
**Figura 7.** Velocidad inicial para la conversión de  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TMPyP } 5 \times 10^{-6} \text{ M}$  a  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{TMPyP-NO}$  (M/s) vs. [TSHA] a pH 10 (buffer fosfato,  $25^{\circ}\text{C}$ ).

*Reacción de SA con MP11.* Para la conversión total de  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{MP11}$  a  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{MP11-NO}$  se requiere un exceso de donador ( $> 20\text{X}$ ) y los tiempos de reacción fueron superiores al tiempo medio de descomposición del donador, indicando que en este caso la descomposición del mismo sería el paso limitante y la reacción ocurre por los pasos (1) y (2) del esquema. Como fue mencionado en Materiales y Métodos conociendo la velocidad de dimerización del HNO, la velocidad de descomposición del donador, y la velocidad de reacción (medida en cada caso) se puede estimar [HNO]. Con esta estimación, a partir de los gráficos de velocidad de formación de MP11-NO vs [HNO] estimada se calcula la constante de asociación bimolecular del HNO al hemopéptido, obteniéndose el valor:  $k_{\text{on}}(\text{HNO}) = 2.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .



**Figura 8.** Velocidad inicial para la conversión de  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{MP } 5 \times 10^{-6} \text{ M}$  a  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{TMPyP-NO}$  (M/s) vs. [HNO] estimado a pH 7 (buffer fosfato,  $25^\circ\text{C}$ ).

*Reacción de MP11 con TSHA.* Similarmente a lo ocurrido con SA, el agregado de TSHA a una solución de MP11 a pH 10 produjo la formación de MP11-NO en tiempos mayores a los de descomposición del TSHA. Usando el mismo análisis que en el caso de SA se obtiene el gráfico de velocidad de reacción vs [HNO] estimada y consecuentemente la constante bimolecular  $k_{\text{on(HNO)}} = 8.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

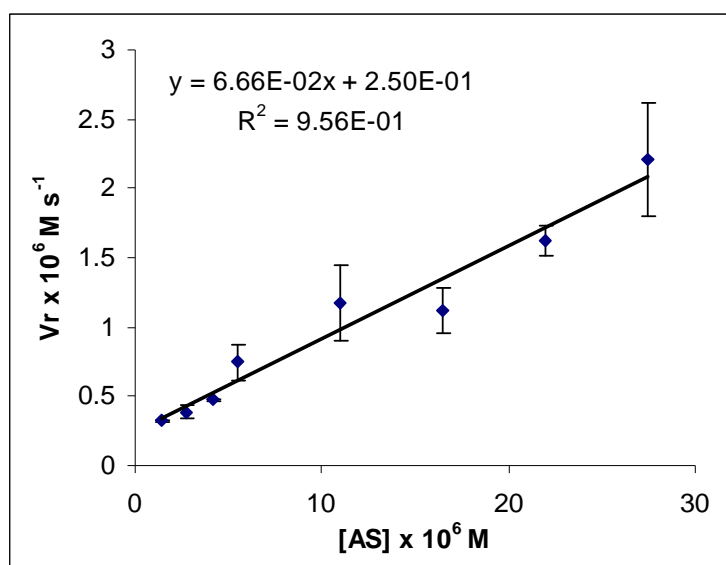


**Figura 9.** Velocidad inicial para la conversión de  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{MP } 5 \times 10^{-6} \text{ M}$  a  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{TMPyP-NO}$  (M/s) vs. [HNO] estimado a pH 10 (buffer fosfato,  $25^\circ\text{C}$ ).

Como era de esperarse las constantes bimoleculares obtenidas para la reacción del HNO con la MP11 usando SA o TSHA son muy similares.



*Reacciones de Mn<sup>III</sup>TEPyP con SA.* Para la reacción de Mn<sup>III</sup>TEPyP con SA en buffer a pH 7, la conversión total a Mn<sup>II</sup>TEPyP-NO para una reacción con relación equimolar donador/porfirina ocurre en un tiempo medio de aproximadamente 5 s (173 veces más rápido que el tiempo de vida media de la SA). El hecho que la velocidad de reacción sea mayor que la descomposición espontánea del donador, implica que el paso limitante es la interacción de la SA con la porfirina (reacción (3)). En estas condiciones se puede obtener la constante de asociación  $k_{on(AS)}$  del gráfico de velocidad inicial vs. [SA], como se menciona en la sección de Materiales y Métodos. (Figura 3)

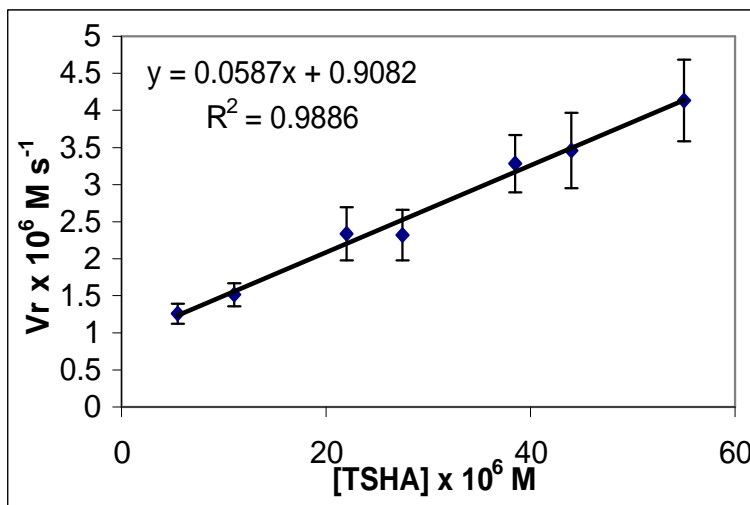


**Figura 10.** Velocidad de reacción inicial observada vs. concentración inicial de AS a pH 7 y 25 °C, para la reacción de Mn<sup>III</sup>TEPyP 5 x 10<sup>-6</sup> M con AS.

Al igual que en el caso de la porfirina Fe<sup>III</sup>TMPyP, para confirmar el efecto catalítico, decidimos realizar la reacción a pH 10 donde la SA es muy estable. Sin embargo, al igual que en el caso a pH 7 y al caso con la porfirina férrica, la reacción tuvo un tiempo medio de sólo 3 a 5 s, indicando que nuevamente la reacción (3) es el paso limitante y la porfirina de manganeso cataliza la descomposición de la SA.

*Reacciones de Mn<sup>III</sup>TEPyP con TSHA.* De manera similar que con SA, el agregado de una solución de TSHA a una solución de Mn<sup>III</sup>TEPyP en atmósfera inerte dio como resultado la obtención de Mn<sup>II</sup>TEPyP-NO. A pH 10 la reacción en condiciones estequiométricas tiene un  $t_{1/2}$  de 3 a 5 segundos, lo que sugiere que al igual que en el

caso de la SA, TSHA interactúa directamente con la porfirina que cataliza su descomposición.

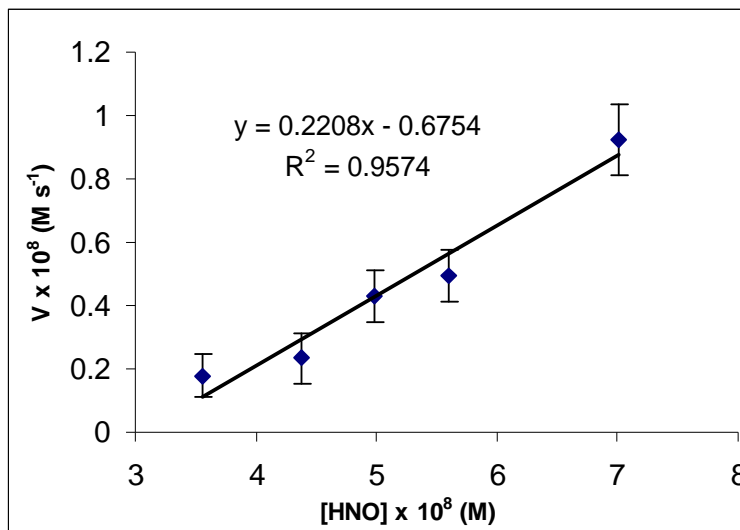


**Figura 11.** Velocidad inicial observada vs concentración inicial de TSHA a pH=10 (buffer fosfato, 25 °C), para la reacción entre TSHA y Mn<sup>III</sup>TEPyP. [Mn<sup>III</sup>TEPyP] = 5.5 x 10<sup>-6</sup> M.

A pH 7 la interpretación de los resultados no es tan directa. La vida media para la reacción equimolar es de solo 33 min, comparado con los 230 min de la descomposición espontánea. El leve aumento de la velocidad aparente de descomposición del donar a pH 7, podría ser una consecuencia de la reversibilidad de la reacción de descomposición del TSHA. La captura del HNO/NO<sup>-</sup> por parte de la Mn<sup>III</sup>TEPyP eliminaría la reacción inversa, produciendo de esa manera un incremento en la velocidad observada. Sin embargo un efecto catalítico de la porfirina como el observado a pH 10 no puede ser descartado.

*Reacción de SA con Mn<sup>III</sup>TPPS.* Aunque los cambios espectrales para la reacción de SA con Mn<sup>III</sup>TPPS (una porfirina con periferia negativa) son similares a los observados con Mn<sup>III</sup>TEPyP, se requiere un exceso de SA para completar la reacción. Para concentraciones equimolares de SA y Mn<sup>III</sup>TPPS a pH 7 la vida media de la reacción es de 117 minutos (mientras que para la descomposición espontánea de la SA es de 15 min). Dado que la reacción es más lenta que la descomposición espontánea del donar y que se requiere un exceso del mismo para completar la reacción es razonable suponer que la descomposición del donar es el paso limitante y la reacción ocurre por los pasos (1) y (2)

del esquema. Como se ha mencionado en Materiales y Métodos conociendo la velocidad de dimerización del HNO la velocidad de descomposición del donador y la velocidad de reacción (medida en cada caso) se puede estimar [HNO]. A partir de los gráficos de velocidad de formación de  $\text{Mn}^{\text{II}}\text{TPPS-NO}$  vs [HNO] se puede calcular la constante de asociación bimolecular para el HNO a la porfirina. ( $k_{\text{onHNO}}$ )

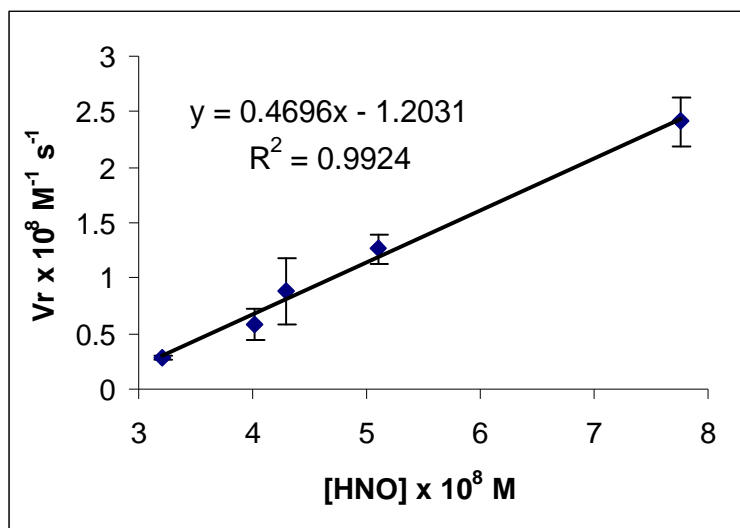


**Figura 12.** Velocidad inicial observada vs [HNO] estimada. (pH 7 buffer fosfato 0.1 M, 25 °C), para la reacción de  $\text{Mn}^{\text{III}}\text{TPPS}$  ( $5 \times 10^{-6}$  M) con AS.

Para confirmar que en el caso de la porfirina negativa TPPS no hay efecto catalítico sobre la descomposición de la SA, realizamos la reacción a pH 10 donde la descomposición de SA es muy lenta ( $t_{1/2}=230$  min). Como era de esperarse, para una relación SA: $\text{Mn}^{\text{II}}\text{TPPS}$  de 2:1 se observó la formación de menos del 2% de  $\text{Mn}^{\text{II}}\text{TPPS-NO}$  al cabo de 2 hs.

*Reacción de  $\text{Mn}^{\text{III}}\text{TPPS}$  con TSHA.* La reacción entre  $\text{Mn}^{\text{III}}\text{TPPS}$  y TSHA a pH 10 muestra los mismos cambios espectrales que la reacción con SA, y al igual que ésta se requiere un exceso de donador (TSHA) para obtener 100% de la porfirina nitrosilada. Para una reacción equimolar, el tiempo de reacción medio es de 115 minutos, mientras que en las mismas condiciones la descomposición espontánea del TSHA tiene una vida media de unos pocos minutos. Dado que los resultados son equivalentes que los obtenidos para la reacción con SA a pH 7, se utilizó el mismo análisis que en este caso. A partir del gráfico de velocidad de reacción inicial vs [HNO] estimada se obtuvo un valor aproximado para

la  $k_{on}(\text{HNO})$ . Como era de esperarse el valor obtenido es similar al obtenido para la reacción con SA.



**Figura 13.** Velocidad inicial observada vs [HNO] estimada. (pH 10 buffer fosfato 0.1 M, 25 °C), para la reacción de  $\text{Mn}^{\text{III}}\text{TPPS}$  ( $5 \times 10^{-6}$  M) con TSHA.

De nuevo, al igual que en el caso de la SA, para confirmar que no hay efecto catalítico de la porfirina sobre la descomposición del TSHA, realizamos la reacción entre  $\text{Mn}^{\text{III}}\text{TPPS}$  y TSHA a pH 7. En estas condiciones la vida media del TSHA es de 120 min. Como era de esperarse para una reacción con relación estequiométrica TSHA:porfirina 2:1 al cabo de 2 hs de reacción se observó una formación de producto menor al 2%.

## Discusión

**Mecanismos de reacción y cinética comparativa** Todas las constantes cinéticas obtenidas para las diferentes reacciones se muestran en la Tabla 1. Como ya mencionamos anteriormente los datos sugieren que existen dos modos alternativos de reactividad para los donores de HNO (SA y TSHA) con las porfirinas en solución acuosa. (Esquema 1)

**Tabla 1** Constantes cinéticas para las reacciones bimoleculares de las porfirinas con los donores o con el HNO.

Porfirina	pH	Donor	$k_{on} (DONOR) (M^{-1}s^{-1})$	$k_{on} (HNO) (M^{-1}s^{-1})$
Mn <sup>III</sup> TEPyP	7	SA	$1.2 \pm 0.1 \times 10^4$	-
Mn <sup>III</sup> TEPyP	10	SA	$3.6 \pm 0.4 \times 10^4$	-
Mn <sup>III</sup> TEPyP	7	TSHA	$8.1 \pm 0.3 \times 10^1$	-
Mn <sup>III</sup> TEPyP	10	TSHA	$1.0 \pm 0.05 \times 10^4$	-
Mn <sup>III</sup> TPPS	7	SA	-	$\sim 4 \times 10^4$
Mn <sup>III</sup> TPPS	10	TSHA	-	$\sim 9 \times 10^4$
Fe <sup>III</sup> TEPyP	7	SA	$5.8 \times 10^3$	-
Fe <sup>III</sup> TEPyP	10	TSHA	$6.9 \times 10^3$	-
Fe <sup>III</sup> MP11	7	SA	-	$\sim 2.2 \times 10^5$
Fe <sup>III</sup> MP11	10	TSHA	-	$\sim 8.6 \times 10^4$

*Interacción directa donor-porfirina.* El primero de los mecanismos de reacción propuestos, comprende la descomposición catalítica del donador, que ocurre debido a una interacción directa del mismo con la porfirina (reacción (3) Esquema 3) y aumenta la velocidad de descomposición (reacción (4)) más de 100 veces. Este tipo de mecanismo se da principalmente con las porfirinas catiónicas y las constantes bimoleculares para la interacción directa del donador con la porfirina (del orden de  $10^3$  a  $10^4 M^{-1}s^{-1}$ ) son ligeramente más bajas que las típicas constantes de asociación de ligandos pequeños con las mismas ( con valores de entre  $10^5$ - $10^9 M^{-1}s^{-1}$ ).<sup>3</sup> Si bien actualmente sólo hemos podido encontrar un estudio en donde se reporta la interacción directa de SA con una hemoproteína (citocromo p450),<sup>36</sup> en vista de los resultados presentados, la interpretación de los datos cinéticos de estudios *in-vitro* con elevadas concentraciones de donores de HNO, debe hacerse con cautela.

*Interacción directa HNO porfirina.* El otro mecanismo propuesto consiste en la reacción de las porfirinas con el HNO libre. Este mecanismo opera principalmente en las

porfirinas con carga negativa, probablemente debido a la repulsión electrostática entre los aniones porfirina y donador que evita que la reacción ocurra por el mecanismo de descomposición catalítica. Las constantes bimoleculares estimadas, para la asociación del HNO con las porfirinas de Fe<sup>III</sup> de Mn<sup>III</sup> presentadas son altas y comparables a los valores obtenidos para las constantes de reacción de NO con porfirinas férricas y de HNO con diversas hemoproteínas como las que se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2**

<b>Blanco</b>	<b>Reactivo</b>	<b>k<sub>on</sub> (M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>)</b>	<b>Ref.</b>
Fe <sup>III</sup> MP	HNO	~ 0.9 - 2.2 x 10 <sup>5</sup>	Este Trabajo
Mn <sup>III</sup> TPPS	HNO	~ 4.0 - 9.0 x 10 <sup>4</sup>	Este Trabajo
Fe <sup>III</sup> MP	NO	1.1 x 10 <sup>6</sup>	31
Fe <sup>III</sup> TPPS	NO	4.5 x 10 <sup>5</sup>	31
metMb	HNO	8 x 10 <sup>5</sup>	24
Catalasa	HNO	3 x 10 <sup>5</sup>	24
Fe <sup>II</sup> TPPS	NO	1.5 x 10 <sup>9</sup>	31
Mb(Fe <sup>II</sup> )	NO	2.2 x 10 <sup>7</sup>	38
Mb(Fe <sup>II</sup> )	HNO	1.4 x 10 <sup>4</sup>	21

A partir del análisis de los datos de la Tabla 2, podemos concluir que a pesar de no poseer la matriz proteica, las porfirinas solubles muestran propiedades reactivas hacia el HNO muy similares a las observadas para las diversas hemoproteínas, que se cree son sus principales blancos biológicos.<sup>24</sup> Esto sugiere que la velocidad de reacción estaría controlada por la reactividad intrínseca del HNO hacia el grupo hemo y no por la modulación que pueda ejercer la matriz proteica. La constante bimolecular de interacción del HNO con los hemos férricos tienen un valor de aproximadamente 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, valor de la misma magnitud que los datos obtenidos para la interacción del NO con los mismos.<sup>31</sup> Sin embargo estas constantes son mas de 1000 veces menores que las correspondientes a la interacción del NO o CO con hemos ferrosos o ferro-hemoproteínas.<sup>31</sup> Esta diferencia en las constantes de asociación para el NO entre las porfirinas férricas y las ferrosas se

debe a que las reacciones ocurren por mecanismos diferentes. Mientras que en las porfirinas ferrosas el mecanismo es asociativo y la casi nula barrera de activación se debe a la formación del enlace Fe-NO, en el caso de las porfirinas férricas el mecanismo es disociativo y la cinética esta determinada por la labilización del agua que se encuentra coordinada al metal.<sup>31</sup> Esta diferencia hace que la asociación con porfirinas férricas sean por lo general más lentas. También se ha demostrado que la labilidad del agua saliente juega un rol fundamental en la asociación de ligandos en diversas hemoproteínas. Teniendo en cuenta estos datos y los valores obtenidos para la asociación del HNO con la Fe<sup>III</sup>MP11 y la Mn<sup>III</sup>TPPS podemos suponer que la misma estaría al igual que en el caso del NO, determinada por la salida del agua. Es interesante notar que, la constante bimolecular para la reacción del HNO con Mb(Fe<sup>II</sup>)<sup>21</sup> es menor que el valor obtenido para la metMb y para la Fe<sup>III</sup>MP en este trabajo. Esto implicaría, que a diferencia de lo que se observa con NO donde la asociación a Fe<sup>II</sup> está controlada fundamentalmente por la difusión, para el HNO, en el caso ferroso, la reactividad intrínseca del hierro hacia el HNO sería el paso limitante.

Por último es importante recalcar que si bien nosotros hemos asumido que las porfirinas reaccionan principalmente por una o otra vía de reacción, con el fin de poder obtener valores para las constantes de velocidad correspondientes, es posible y probable que en muchos casos ambos mecanismos sean operativos.

***Porfirinas de manganeso como atrapantes selectivos de HNO.*** El hecho que las porfirinas de manganeso(III) sean capaces de reaccionar rápida y eficientemente tanto con los donores de HNO, como con el HNO mismo, hace de las mismas excelentes candidatas para su uso como atrapantes del mismo en diversos ensayos químicos y biológicos. Mas aún, al ser inertes frente al NO, a diferencia de sus contrapartes férricas, serían capaces de discriminar ambas especies. Además, el significativo cambio espectral que se produce en la banda de Soret (33nm) es una herramienta valiosa para cuantificar el HNO en sistemas anaeróbicos. Por otro lado el hecho de que la reactividad de las mismas no se vea afectada directamente por la presencia de oxígeno es un punto importante si se desea utilizarlas como bloqueantes de HNO en medios biológicos o ensayos *in-vivo*. La

reactividad del producto frente al O<sub>2</sub> para recuperar la porfirina oxidada y libre puede incluso ser utilizado como mecanismo catalítico que consume HNO.

Desde ya, en un medio biológico el sitio vacante del metal puede ser bloqueado por otras especies, y sería de esperar que un verdadero atrapante selectivo de HNO pudiera “filtrar” la coordinación de otras especies ya sea por impedimento estérico o interacciones electrostáticas. En este sentido las porfirinas con sustituyentes voluminosos (denominadas “capped”) o una matriz proteica recombinada con hemina de manganeso, podría ser de suma utilidad.

Es interesante observar que la reactividad de los complejos de manganeso nitrosilados frente al O<sub>2</sub> es marcadamente diferente a la observada para sus análogos de hierro. La reacción equivalente de los complejos hierro-porfirínicos nitrosilados con O<sub>2</sub>, si bien no ha sido estudiada a fondo con porfirinas modelo, al menos en las hemoproteínas estudiadas hasta hoy pareciera no ocurrir.<sup>37</sup> Más aún, la aparente ausencia de reacción en hemoproteínas entre Fe<sup>II</sup>-NO y O<sub>2</sub> llama aun más la atención sabiendo que las hemo proteínas oxigenadas (con complejos Fe<sup>II</sup>-O<sub>2</sub>) reaccionan con el NO a velocidad difusional para dar como resultado complejos férricos y nitrato.<sup>38</sup> En este contexto, el estudio de la reacción de nitrosil-porfirinas de manganeso, e incluso otros metales, con oxígeno presentado en este trabajo, aporta nuevos elementos para la comprensión de la reactividad del oxígeno y el óxido nítrico mediadas por hemoproteínas.

## Referencias

---

<sup>1</sup> Groves, J.T. Wang C.C.Y. **Nitric oxide synthase: models and mechanisms.** *Current opinión in Chemical Biology* **2000**, 4:687-695.

<sup>2</sup> Ignaro, L.J. Byrns, R.E. Wood, K.S. **Vasodilation: Vascular smooth Muscle, Peptide, Autonomous Nerves and Endothelium.** Vanhoutte, P.M. Raven Press. New York **1988**, p.427.

<sup>3</sup> Ford, P.C. Lorkovic, I.M. **Mechanistic aspects of the reactions of nitric oxide with transition-metal complexes.** *Chem. Rev.* **2002**, 102(4):993-1018.



- 
- <sup>4</sup> Stamler J.S, Singel D.J, Loscalzo J. **Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms.** *Science.* **1992**, 18;258(5090):1898-902.
- <sup>5</sup> McCleverty J.A., **Chemistry of nitric oxide relevant to biology.** *Chem. Rev.* **2004**, 104(2), 403-18.
- <sup>6</sup> Richter-Addo G.B., Legzdins P, Burstyn J. **Introduction: nitric oxide chemistry.** *Chem. Rev.* **2002**, 102(4):857-60.
- <sup>7</sup> Farmer P.J, Sulc. F. **Coordination chemistry of the HNO ligand with hemes and synthetic coordination complexes.** *J. Inorg. Biochem.* **2005**, 1, 166-84.
- <sup>8</sup> Hobbs A.J, Fukuto J.M, Ignarro L.J. **Formation of free nitric oxide from l-arginine by nitric oxide synthase: direct enhancement of generation by superoxide dismutase.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1994**, 91, 23, 10992-6.
- <sup>9</sup> Pufahl R.A, Wishnok J.S, Marletta M.A. **Hydrogen peroxide-supported oxidation of NG-hydroxy-L-arginine by nitric oxide synthase.** *Biochemistry.* **1995**, 14, 34, 1930-41.
- <sup>10</sup> Schmidt H.H., Hofmann H, Schindler U, Shutenko Z.S., Cunningham D.D, Feelisch M. **No NO from NO synthase.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1996**, 93, 14492-7.
- <sup>11</sup> Adak S, Wang Q, Stuehr D.J. **Arginine conversion to nitroxide by tetrahydrobiopterin free neuronal nitric-oxide synthase. Implications for mechanism.** *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 33554-61.
- <sup>12</sup> Wong P.S, Hyun J, Fukuto J.M, Shirota F.N, DeMaster E.G, Shoeman D.W, Nagasawa H.T, **Reaction between S-nitrosothiols and thiols: generation of nitroxyl (HNO) and subsequent chemistry.** *Biochemistry.* **1998**, 37, 5362-71
- <sup>13</sup> Shafirovich V, Lyman S.V, **Spin-forbidden deprotonation of aqueous nitroxyl (HNO).** *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 21, 6547-52.
- <sup>14</sup> Shafirovich V, Lyman S.V, **Nitroxyl and its anion in aqueous solutions: spin states, protic equilibria, and reactivities toward oxygen and nitric oxide.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2002**, 99, 11, 7340-5.
- <sup>15</sup> Bartberger M.D, Fukuto J.M, Houk K.N, **On the acidity and reactivity of HNO in aqueous solution and biological systems.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2001**, 98, 2194-8.
- <sup>16</sup> Bazylynski D.A, Hollocher T.C, **Evidence from the reaction between trioxodinitrate(II) and nitrogen-15-labeled nitric oxide that trioxodinitrate(II)**

---

**decomposes into nitrosyl hydride and nitrite in neutral aqueous solution** *Inorg. Chem.* **1985**, 24, 25, 4285-4288.

<sup>17</sup> Dutton A.S, Fukuto J.M, Houk K.N, **Mechanisms of HNO and NO production from Angeli's salt: density functional and CBS-QB3 theory predictions.** *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 3795-3800.

<sup>18</sup> Bonner F.T, Ko, Y, **Kinetic, isotopic, and nitrogen-15 NMR study of N-hydroxybenzenesulfonamide decomposition: an nitrosyl hydride (HNO) source reaction** *Inorg. Chem.* **1992**, 31, 12, 2514-2519..

<sup>19</sup> Miranda K.M, Nims R.W, Thomas D.D, Espey M.G, Citrin D, Bartberger M.D, Paolucci N, Fukuto J.M, Feelisch M, Wink D.A, **Comparison of the reactivity of nitric oxide and nitroxyl with heme proteins. A chemical discussion of the differential biological effects of these redox related products of NOS.** *J. Inorg. Biochem.* **2003**, 93, 52-60.

<sup>20</sup> Bazylynski, D.A, Hollocher T.C, **Metmyoglobin and methemoglobin as efficient traps for nitrosyl hydride (nitroxyl) in neutral aqueous solution** *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 26, 7982-7986

<sup>21</sup> Sulc F, Immoos C.E, Pervitsky D, Farmer P.J, **Efficient trapping of HNO by deoxymyoglobin.** *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 4, 1096-101.

<sup>22</sup> Sulc F, Fleischer E, Farmer P.J, Ma D, La Mar G.N., **<sup>1</sup>H-NMR structure of the heme pocket of HNO-myoglobin.** *J. Biol. Inorg. Chem.* **2003**, 3, 348-52

<sup>23</sup> Komarov A.M, Wink D.A, Feelisch M, Schmidt H.H, **Electron-paramagnetic resonance spectroscopy using N-methyl-D-glucamine dithiocarbamate iron cannot discriminate between nitric oxide and nitroxyl: implications for the detection of reaction products for nitric oxide synthase.** *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, 28, 5, 739-42.

<sup>24</sup> Miranda K.M, Paolucci N, Katori T, Thomas D.D, Ford E, Bartberger M.D, Espey M.G, Kass D.A, Feelisch M, Fukuto J.M, Wink D.A, **A biochemical rationale for the discrete behavior of nitroxyl and nitric oxide in the cardiovascular system.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2003**, 100, 16, 9196-201.

- 
- <sup>25</sup>Wink D.A, Miranda K.M, Katori T, Mancardi D, Thomas D.D, Ridnour L, Espey M.G, Feelisch M, Colton C.A, Fukuto J.M, Pagliaro P, Kass D.A, Paolocci N, **Orthogonal properties of the redox siblings nitroxyl and nitric oxide in the cardiovascular system: a novel redox paradigm.** *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2003**, 285, 2264-76.
- <sup>26</sup>Paolocci, N, Katori T, Champion, H.C, St John, M.E, Miranda, K.M, Fukuto J.M, Wink D.A, Kass D.A, **Positive inotropic and lusitropic effects of HNO/NO<sup>-</sup> in failing hearts: independence from beta-adrenergic signaling.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2003**, 100, 5537-42;
- <sup>27</sup> Miranda K.M, Katori T, Torres de Holding C.L, Thomas L, Ridnour L.A, McLendon W.J, Cologna S.M, Dutton A.S, Champion H.C, Mancardi D, Tocchetti C.G, Saavedra J.E, Keefer L.K, Houk K.N, Fukuto J.M, Kass D.A, Paolocci N, Wink D.A. **Comparison of the NO and HNO donating properties of diazeniumdiolates: primary amine adducts release HNO in vivo.** *J. Med Chem.* **2005**, 48, 8220-8.
- <sup>28</sup> Xia Y, Cardounel A.J, Vanin A.F, Zweier J.L. **Electron paramagnetic resonance spectroscopy with N-methyl-D-glucamine dithiocarbamate iron complexes distinguishes nitric oxide and nitroxyl anion in a redox-dependent manner: applications in identifying nitrogen monoxide products from nitric oxide synthase.** *Free. Radic. Biol Med.* **2000**, 15, 29, 793-7.
- <sup>29</sup> Pino R.Z, Feelisch M. **Bioassay discrimination between nitric oxide (NO) and nitroxyl (NO<sup>-</sup>) using L-cysteine.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, 201, 54-62
- <sup>30</sup> Enemark J.H, Feltham R.D. **Stereochemical Control of Valence and Its Application to the Reduction of Coordinated NO and N(2).** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1972**, 69, 12, 3534-3536.
- <sup>31</sup> Laverman L.E, Ford P.C, **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, 43, 11614-11622

- 
- <sup>32</sup> Ford P.C, Fernandez B.O, Lim M.D, **Mechanisms of Reductive Nitrosylation in Iron and Copper Models Relevant to Biological Systems.** *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 6, 2439-2456.
- <sup>33</sup> Spasojevic I, Batinic-Haberle I, Fridovich I. **Nitrosylation of manganese(II) tetrakis (N-ethylpyridinium-2-yl)porphyrin: a simple and sensitive spectrophotometric assay for nitric oxide.** *Nitric Oxide.* **2000**, *4*, 5, 526-33.
- <sup>34</sup> Hughes M.N, Cammack R. **Synthesis, chemistry, and applications of nitroxyl ion releasers sodium trioxodinitrate or Angeli's salt and Piloty's acid.** *Methods. Enzymol.* **1999**, *301*, 279-87.
- <sup>35</sup> Scheidt W.R, Ellison M.K, **The Synthetic and Structural Chemistry of Heme Derivatives with Nitric Oxide Ligands.** *Acc. Chem. Res.* **1999**, *4*, 350-359.
- <sup>36</sup> Shibata Y, Sato H, Sagami I, Shimizu T, **Interaction of Angeli's salt with cytochrome P450 1A2 distal mutants: an optical absorption spectral study.** *Biochim. Et. Biophys. Acta.* **1997**, *1343*, 67-75.
- <sup>37</sup> Andersen H.J, Skibsted L.H, **Kinetics and mechanism of thermal oxidation and photooxidation of nitrosylmyoglobin in aqueous solution** *J. Agric. Food. Chem.* **1992**, *40*, 10, 1741-1750.
- <sup>38</sup> Eich R.F, Li T, Lemon D.D, Doherty D.H, Curry S.R, Aitken J.F, Mathews A.J, Johnson K.A, Smith R.D, Phillips G.N Jr, Olson J.S, **Mechanism of NO-induced oxidation of myoglobin and hemoglobin.** *Biochemistry.* **1996**, *35*, 22, 6976-83.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

## Capítulo 4

### **Discriminación de NO en medio aeróbico: el caso de la guanilato ciclasa soluble**

En este capítulo se estudian mediante cálculos híbridos QM-MM, las características o requerimientos estructurales de las hemoproteínas receptoras de NO. Todos los cálculos fueron realizados utilizando el citocromo c' de *Alcaligenes xylosoxidans* (AXCP) como modelo. En la introducción se presentan un resumen del mecanismo de activación y las características que presenta la hemoproteína receptora del NO en los mamíferos, la guanilato ciclasa soluble (sGC), y su relación con AXCP. En la sección de resultados se presentan datos, estructurales y energéticos, sobre los posibles mecanismos de reacción del NO con AXCP. También se presentan los datos relacionados con la reactividad frente al O<sub>2</sub> y CO. Finalmente en las conclusiones los resultados son analizados en relación con el mecanismo de activación de la sGC y las diferencias observadas en el patrón de unión de los ligandos O<sub>2</sub>, CO y NO.

## Introducción

***El dominio H-NOX y la guanilato ciclasa soluble.*** Actualmente se han caracterizado estructuralmente cuatro familias de hemoproteínas receptoras de ligandos gaseosos pequeños (NO, O<sub>2</sub> y CO). Las primeras dos familias corresponde a los detectores de oxígeno presentes en bacterias, representados por las proteínas Fix-L y HemAT pertenecientes a los dominios PAS y las globinas respectivamente. El tercer grupo es representado por el detector de CO CooA, cuya estructura no está relacionada con los dominios mencionados anteriormente. El cuarto grupo comprende a la familia donde se encuentra incluida la guanilato ciclasa soluble (sGC) de los mamíferos, que es el receptor fisiológico del NO.<sup>1,2</sup>

La sGC es un heterodímero compuesto por las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . El grupo hemo se encuentra en la región N-terminal de la subunidad  $\beta$ , y está unido covalentemente a una histidina (la H105 según la numeración en mamíferos).<sup>3</sup> La región N-terminal de la subunidad  $\beta$  de la sGC es homóloga a un grupo proteínas descubiertas recientemente en bacterias, lo que dió lugar a la caracterización de un nuevo dominio denominado H-NOX (Hemo/NO/Oxígeno). Recientemente la estructura tridimensional del dominio H-NOX de la bacteria *Thermoanaerobacter tencogensis* (TtTar4H) fue resuelta utilizando espectroscopía de rayos-X.<sup>4</sup> La confirmación de la existencia de un tipo de plegamiento específico para el dominio H-NOX disparó la caracterización espectroscópica y cinética de diversas proteínas pertenecientes a este grupo revelando diferencias y similitudes con el dominio H-NOX de la sGC.<sup>5</sup>

***El mecanismo de acción de la guanilato ciclasa.*** En la guanilato ciclasa el estado basal inactivo se corresponde con el de un complejo ferroso pentacoordinado (con el hierro unido a los 4 nitrógenos del hemo más la histidina proximal) de alto espín. Se cree que la formación de un complejo nitrosilado pentacoordinado, como consecuencia de la ruptura del enlace hierro histidina tras la unión del NO, es el disparador de un cambio conformacional que activa la enzima y transduce la señal del NO.<sup>6</sup> A pesar de que la hipótesis de la ruptura del enlace hierro-histidina como disparador del efecto del NO

posee un alto grado de consenso en la comunidad científica, como se explicará más adelante aún existe cierto debate sobre el rol preciso jugado por el NO en el mecanismo de activación.

***El citocromo c' como modelo para la guanilato ciclasa.*** Los citocromos c' son una familia de citocromos clase II, que se encuentran en el periplasma de ciertas bacterias.<sup>7</sup> La particularidad de los mismos radica en el hecho de poseer, a diferencia de la mayoría de los citocromos de tipo-c involucrados en el transporte de electrones, un hemo pentacoordinado. Aunque el rol fisiológico del citocromo c' es aún tema de debate, diversos estudios sugieren que su función podría estar asociada al NO.<sup>8</sup> En particular Moir y colaboradores demostraron que bacterias mutantes deficientes del mismo eran más sensibles al estrés nitro-oxidativo sugiriendo además que el citocromo c' podría funcionar como una NO reductasa.<sup>9,10</sup>

El interés adicional por la química de coordinación del citocromo c' proviene de la observación de llamativas similitudes con la sGC, como por ejemplo el hecho de que ambas proteínas formen complejos de nitrosilo pentacoordinados (5c-NO). La caracterización estructural del citocromo c' de *Alcaligenes xylosoxidans* (AXCP) dio como resultado el descubrimiento de la capacidad de los ligandos de unirse a la porfirina por ambos lados del plano.<sup>11</sup> Así, mientras que el CO forma un complejo hexacoordinado con el ligando ocupando el sitio distal, el complejo 5c-NO exhibe una coordinación de tipo proximal con el NO ocupando el sitio originalmente ocupado por la histidina.<sup>11</sup> Otras similitudes entre AXCP y sGC están dadas por los hechos que muestran que ambas proteínas al reaccionar con NO forman intermediarios hexacoordinados con la unión hierro-histidina intacta y el NO en el sitio distal,<sup>6,12,13</sup> y que ambas son incapaces de unir oxígeno.<sup>14</sup>

Claramente la novedosa coordinación proximal del NO en AXCP posee implicaciones potenciales relacionadas con el mecanismo de activación de la guanilato ciclasa convirtiendo al citocromo c' en un modelo clave para su estudio.

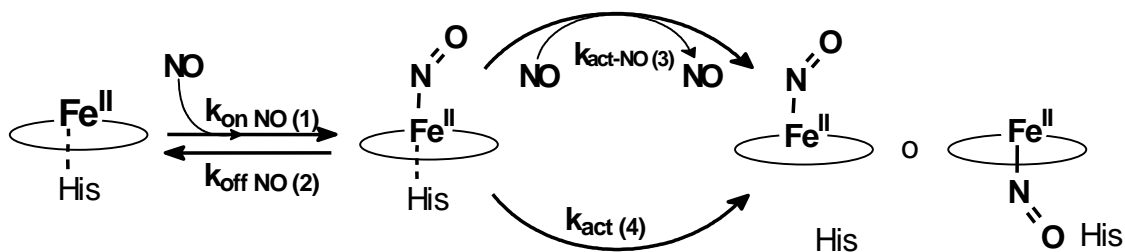
***La ruptura del enlace hierro-histidina en las hemoproteínas.*** El enlace hierro-histidina proximal en el complejo hexacoordinado con NO, no se rompe en todas las



hemoproteínas. Algunas, como la mioglobina (Mb), la peroxidasa de rábano picante (HRP), y las cadenas  $\beta$  de la hemoglobina (Hb  $\beta$ ) permanecen 6c, mientras que otras como el detector de oxígeno Fix-L,<sup>15</sup> las cadenas  $\alpha$  de la hemoglobina (Hb  $\alpha$ ), la sGC y también la AXCP forman complejos 5c-NO.<sup>16</sup> En un trabajo previo a esta tesis mostramos que la fuerza del enlace Fe-His depende principalmente de la capacidad de la histidina de donar carga al metal (capacidad de donación  $\sigma$ ), y que la misma está íntimamente relacionada con la interacción de puente de hidrógeno que posee el H $\delta$  de la histidina. (El H $\delta$ , es el hidrógeno unido al N $\delta$  del anillo imidazólico).<sup>17</sup> Experimentalmente la fuerza del enlace Fe-His puede ser estimada por medio de la frecuencia de vibración del enlace ( $\nu_{\text{Fe-His}}$ ), medido por técnicas de espectroscopía Raman-resonante. Las proteínas que forman complejos del tipo 5c-NO, como la Fix-L o la sGC exhiben por lo general frecuencias  $\nu_{\text{Fe-His}}$  menores a  $210 \text{ cm}^{-1}$ , mientras que aquellas que forman complejos 6c-His-Fe-NO muestran valores en el rango  $220 - 240 \text{ cm}^{-1}$ . Notablemente en AXCP a pesar de formarse un complejo 5c-NO como consecuencia de la ruptura del enlace Fe-His el valor reportado para la vibración  $\nu_{\text{Fe-His}}$  es de  $231 \text{ cm}^{-1}$ .<sup>17</sup>

*¿ Son necesarias una o dos moléculas de NO para activar la sGC?* A pesar de que la cinética de activación de la sGC mediada por el NO ha sido estudiada con sumo detalle, aún existe un debate sobre la base molecular del mecanismo de activación.<sup>18,19,20</sup> En este contexto las semejanzas del comportamiento espectroscópico entre sGC y AXCP hacen de esta última un modelo sumamente útil para comprender las bases moleculares de la interacción del NO con hemoproteínas, en particular la sGC.

Basándose en datos cinéticos Marletta y colaboradores propusieron que el NO, no sólo está involucrado como ligando del grupo hemo, sino que también participaría como un catalizador en la transición del complejo hexacoordinado (His-Fe-NO) inactivo, al complejo pentacoordinado (Fe-NO) activo.<sup>18,19</sup> El mecanismo completo de activación propuesto se muestra en el Esquema 1.



**Esquema 1.** Mecanismo de activación de la sGC por NO propuesto por Marletta et. al.<sup>18,19</sup>

Usando este modelo se obtuvieron las siguientes constantes cinéticas.  $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  para  $k_{on\ NO}$ ,  $2.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  para  $k_{act-NO}$ , y  $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  para  $k_{act}$ . Nótese que en este mecanismo la conversión de la especie 6c (inactiva) a la especie 5c-NO (activa) ocurre por dos vías: por medio de la reacción 3, donde el NO actúa como catalizador de la conversión, o por medio de la reacción 4 no catalizada, y sin la participación de un segundo NO. En la estructura final el NO se encuentra en alguno de los dos lados del grupo hemo.

A pesar de que el modelo ajusta y permite analizar los datos cinéticos, Bellamy y colaboradores,<sup>20</sup> mostraron en base a los mismos resultados que es innecesario postular que el NO está involucrado en la transición de hexa a pentacoordinado, y que los experimentos son consistentes con un modelo simple de activación que involucra un sólo evento de coordinación del NO.<sup>20</sup> En este modelo más simple la reacción 3 estaría excluida y la activación solo ocurriría por medio de la reacción 4. Reanalizando los datos cinéticos con este modelo se obtiene un valor similar al obtenido por Marletta para  $k_{on\ NO}$ , sin embargo el valor obtenido para  $k_{act}$  es de  $1.3 \text{ s}^{-1}$ , un valor significativamente mayor al anterior.

Para determinar la factibilidad del mecanismo propuesto por Marletta en AXCP, nos propusimos como objetivo analizar por medio de técnicas de simulación computacional todos los pasos e intermediarios propuestos en el mismo. Adicionalmente estudiamos las características de los complejos con CO y O<sub>2</sub> en AXCP.

## Desarrollo de las simulaciones

La estructura de partida utilizada para relizar todos los cálculos, fue la del complejo nitrosilado obtenida por cristalografía de rayos-X . (código del protein data bank: 1E85). La proteína fue solvatada en una caja esférica de agua dejando unos 8 Å de agua entre los átomos de la superficie de la proteína y el límite del sistema. El sistema consistió en alrededor de 1800 átomos proteicos y 1800 moléculas de agua. Para relajar la estructura de la proteína solvatada el sistema se calentó hasta unos 300 K, y luego se realizó una dinámica molecular clásica de 500 ps. Luego todo el sistema fue enfriado lentamente hasta 0 K. Todas las simulaciones de dinámica molecular se realizaron usando el programa Amber. Se utilizó un radio de corte de entre 10 -12 Å para los términos de no unión y la temperatura se ajustó utilizando el termostato de Berendsen. Para la integración numérica de las ecuaciones de Newton se utilizó un “time-step” de 2 fs. Las cargas parciales de todos los aminoácidos se utilizaron de acuerdo al programa Amber. Las cargas parciales del grupo hemo en sus diferentes estados de oxidación/coordinación fueron obtenidas con el mismo protocolo utilizado y sugerido en el campo de fuerzas Amber, según menciona el capítulo de métodos computacionales. Este conjunto de cargas para el grupo hemo han sido ampliamente utilizados con éxito en diversas simulaciones de hemoproteínas.

A partir de la estructura a 0 K se realizó una optimización de geometría QM-MM usando el algoritmo del gradiente conjugado con el programa SIESTA. En todos los cálculos QM-MM sólo los átomos localizados a menos de 10 Å del sitio activo (el hemo en este caso) son libres de moverse. El resto de los átomos de la proteína o el solvente se mantienen fijos. Para todos los átomos se utilizaron bases de calidad doble zeta con polarización. Los cálculos fueron realizados utilizando la aproximación PBE para el funcional de intercambio y correlación. En todos los casos se restringió al subsistema cuántico a la ferro-porfirina (sin las cadenas laterales) más los ligandos proximal y distal correspondientes. Las uniones entre el sistema cuántico y clásico fueron tratadas con el método del “link atom” mencionado anteriormente. A modo de ejemplo, en un cálculo de una hemoproteína oxigenada, el sistema cuántico comprende el núcleo porfirínico, el

ligando diatómico y el anillo imidazólico de la histidina proximal lo que da un total de 48 átomos . En este caso se utilizan 9 “link atoms” 8 entre el núcleo de la porfirina y sus cadenas laterales y uno entre el anillo imidazólico y el esqueleto de la histidina proximal.

El grupo hemo en su estado pentacoordinado (por la histidina) ferroso fue calculado en el estado quintuplete (de alto espín), dado que se conoce que este es el estado fundamental del sistema. Los sistemas pentacoordinados con NO, o hexacoordinados fueron calculados en los estados doblete y singulete (de bajo espín) respectivamente, que se sabe son los estados fundamentales correspondientes.

*Cálculo de la energía de unión de ligandos.* La energía de unión de los diferentes ligandos (NO, CO, O<sub>2</sub>) se calculó utilizando la siguiente formula:

$$\Delta E = E_{\text{prot-ligando}} - (E_{\text{ligando}} + E_{\text{prot}})$$

Donde  $E_{\text{prot-ligando}}$  corresponde a la energía de la proteína unida al ligando,  $E_{\text{prot}}$  a la de la proteína libre y  $E_{\text{ligando}}$  es la energía del ligando aislado.

*Cálculo de la energía a lo largo de una coordenada de reacción.* Para calcular la energía a lo largo de una coordenada de reacción se utilizó el método de búsqueda del camino de reacción mencionado en el Capítulo 2, realizando en cada paso una optimización de geometría QM-MM restringida a lo largo de la coordenada de reacción y calculando la energía en cada mínimo a lo largo de la misma. Las coordenadas de reacción elegidas fueron la distancia hierro-histidina para el perfil de la Figura 3, y la diferencia de distancias Fe-NO, Fe-His para el perfil obtenido en la Figura 6.

Los mutantes proximales y distales de AXCP construidos *in-silico* se realizaron cambiando los aminoácidos correspondientes en la estructura de la proteína salvaje.

## Resultados y discusión

**Características estructurales del complejo 6c-His-Fe-NO de AXCP.** La primera especie que se forma al adicionar NO a AXCP (reacción 1) es el complejo 6c His-Fe-NO con el NO alojado en el sitio distal de la proteína. En la Figura 1 se muestra la estructura optimizada correspondiente. Los parámetros estructurales relevantes para el complejo en la proteína, junto con los obtenidos para el mismo complejo en vacío se muestran en la Tabla 1. También se muestran datos experimentales obtenidos por espectroscopía de rayos-X para un complejo típico 6c His-Fe-NO.<sup>21</sup>

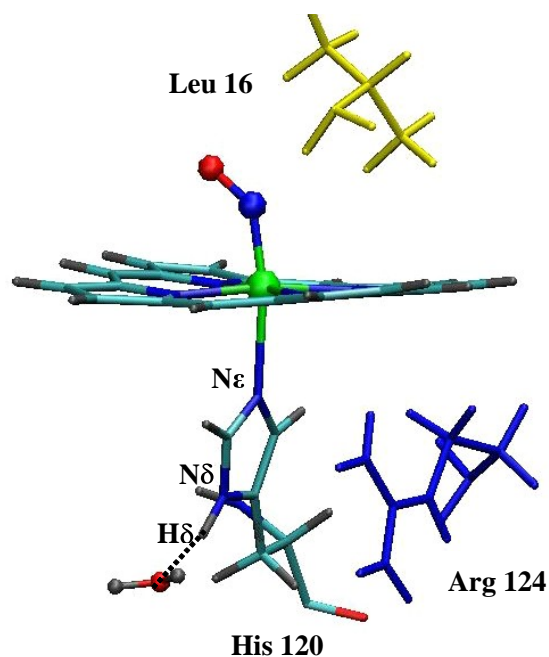


FIGURA 1. Complejo 6c-NO en el sitio activo de AXCP.

Los datos que se muestran en la Tabla 1 confirman que el complejo 6c en AXCP posee las características típicas de un complejo del tipo  $\{FeNO\}^7$ . El ángulo Fe-N-O es ligeramente menor en la proteína que en vacío, probablemente debido a la interacción estérica entre el NO y la Leu 16. En este complejo se evidencia el efecto negativo en trans al NO; este produce un debilitamiento del enlace Fe-His que se evidencia en la mayor longitud de este enlace en el complejo 6c-NO de la proteína nitrosilada, en comparación al complejo 5c-His de la proteína sin nitrosilar.

**Tabla 1.** Parámetros estructurales para el complejo 6c-NO en AXCP (proteína), para un complejo 6c-NO aislado en vacío, y la comparación con los datos experimentales obtenidos para el complejo Fe-tetrafenilporfirina-1-metilimidazol NO (TPP-Im-NO)<sup>21</sup>  $\Delta q_{\text{His}}$  y  $\Delta q_{\text{NO}}$  ( $e$ ) representan la magnitud de carga donada y recibida por la His y el NO respectivamente.

	AXCP	Vacío	TPP-Im-NO <sup>21</sup>
<b>dFe-NO</b>	1.74	1.75	1.75
<b>dN-O</b>	1.21	1.21	1.18
<b>ángulo Fe-N-O</b>	136.9	138.7	137.7
<b>dFe-N<sub>His</sub></b>	2.33	2.24	2.17
<b>dFe-N<sub>His</sub>(sin NO)</b>	2.18	2.16	-
<b><math>\Delta q_{\text{His}}</math></b>	0.080	0.121	-
<b><math>\Delta q_{\text{NO}}</math></b>	-0.071	-0.046	-

*El enlace Fe-His en el complejo 6c.* Como ya se mencionó en la introducción se sabe que el complejo 6c-NO en AXCP posee vida corta, además la estructura obtenida por rayos-X de la proteína nitrosilada, muestra que el NO está alojado en la cavidad proximal donde originalmente está la histidina.<sup>11</sup> También mencionamos que pareciera haber una inconsistencia entre el valor experimental para la frecuencia  $\nu_{\text{Fe-His}}$  de AXCP ( que es de  $231 \text{ cm}^{-1}$ ) y el hecho de que el enlace Fe-His se rompa. En un trabajo previo mostramos que la  $\nu_{\text{Fe-His}}$  correlaciona con la energía calculada para el enlace Fe-his ( $\Delta E_{\text{Fe-His}}$ ) y con la cantidad de carga donada por la histidina al metal ( $\Delta q_{\text{His}}$ ).<sup>17</sup> En la Figura 2 se muestran graficos de los valores experimentales  $\nu_{\text{Fe-His}}$  vs. los valores calculados  $\Delta E_{\text{Fe-His}}$  and  $\Delta q_{\text{His}}$  para cuatro hemoproteínas diferentes además de AXCP (la línea punteada representa el ajuste por regresión lineal).

Lo que se puede ver de la Figura 2 es que el valor experimental para la frecuencia de vibración  $\nu_{\text{Fe-His}}$  de AXCP  $\nu_{\text{Fe-His}}$  es el que más se aparta de la tendencia observada para las otras hemoproteínas. Ambos valores calculados  $\Delta E_{\text{Fe-His}}$  y  $\Delta q_{\text{His}}$  para AXCP sugieren que posee una histidina de carácter neutro similar a la de Fix-L (proteína que también forma complejo 5c-NO). Por lo general las hemoproteínas con valores altos para la frecuencia  $\nu_{\text{Fe-His}}$ , como la HRP o Hb- $\beta$ , poseen histidinas que presentan una interacción

de puente de hidrógeno por medio del H- $\delta$  con aceptores fuertemente electronegativos. (típicamente grupos carbonilo como en las globinas, o ácidos carboxílicos como en la HRP).

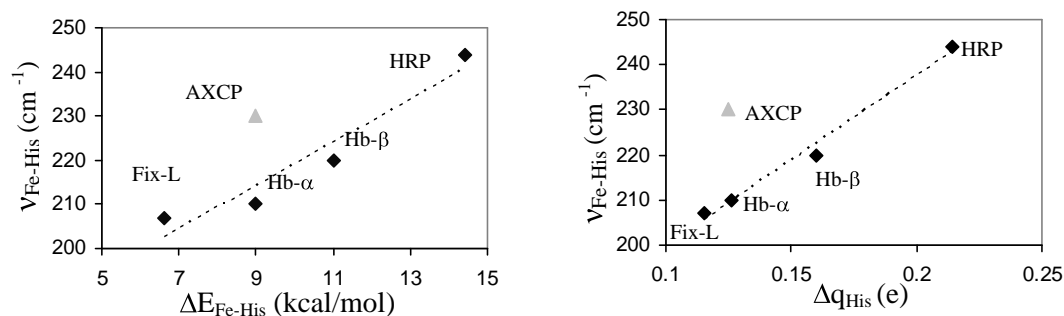


FIGURA 2. Gráficas de la frecuencia de vibración experimental  $\nu_{\text{Fe-His}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) vs los valores de  $\Delta E_{\text{Fe-His}}$  (panel superior) y  $\Delta q_{\text{His}}$  (panel inferior) calculados. Diamantes negros representan los valores correspondientes a las siguientes hemoproteínas Hb- $\alpha$   $\nu_{\text{Fe-His}}$   $207 \text{ cm}^{-1}$ , Fix-L  $210 \text{ cm}^{-1}$ , Hb- $\beta$   $220 \text{ cm}^{-1}$ , HRP  $244 \text{ cm}^{-1}$  <sup>23,24</sup>. Los valores correspondientes a AXCP están representados por los triángulos grises.<sup>17</sup>

En la estructura de AXCP el H- $\delta$  de la histidina se encuentra interactuando con una molécula de agua (Figura 1).<sup>11</sup> Claramente los datos apuntan al hecho que AXCP posee una histidina proximal neutra característica de proteínas que forman complejos 5c-NO. Es interesante notar que extrapolando la frecuencia de vibración  $\nu_{\text{Fe-His}}$ , a partir de  $\Delta E_{\text{Fe-His}}$  o el  $\Delta q_{\text{His}}$  para AXCP se obtiene un valor de entre  $209 - 214 \text{ cm}^{-1}$ , que es lo esperado según la estructura y el hecho que se rompa el enlace Fe-His.

**Conversión del complejo 6c-NO al complejo 5c-NO.** Para caracterizar al proceso de ruptura del enlace Fe-His determinamos el perfil de energía para la reacción de ruptura en el complejo 6c. La coordenada de reacción utilizada fue la distancia de enlace Fe-N $\epsilon_{\text{His}}$  (Ver Figura 1). La Figura 3 muestra el perfil energético correspondiente. Analizando la Figura 3, podemos ver la existencia de un segundo mínimo correspondiente al complejo 5c-NO, y la pequeña barrera (sólo 2 kcal/mol) para la re-unión de la histidina al metal. La existencia de un mínimo local, con la histidina no ligada al hierro, es condición necesaria para que pueda romperse el enlace Fe-His, ya que su ausencia dejaría a la histidina unida al hierro aún con un enlace muy débil. De hecho, la mayoría de las proteínas forman complejos del tipo 6c-NO posiblemente debido a la tendencia de la matriz proteica de

mantener a la histidina proximal en una posición ligada. Además del caso de la AXCP, solamente en la estructura obtenida por rayos-X de la hemoglobina cuaternaria con NO, se ha observado una conformación con la histidina despegada del metal en las cadenas- $\alpha$  que forman complejos 5c-NO. En este caso el complejo presenta a la histidina proximal rotada 180° alrededor del eje formado por los átomos  $C_{\beta}$ -  $C_{\gamma}$  con respecto a la estructura 5c-His libre de NO. En AXCP en el segundo mínimo, la histidina se encuentra en contacto con la Arg124.

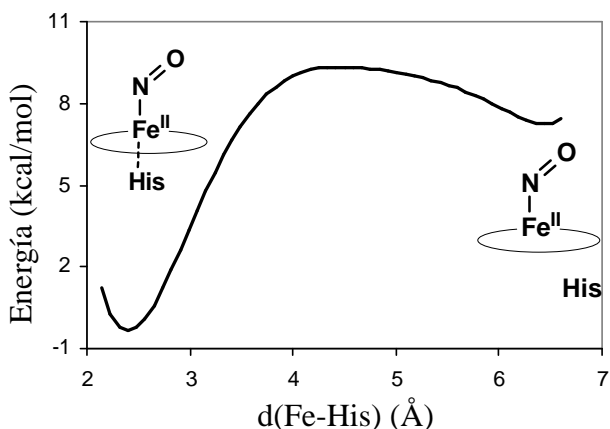


FIGURA 3. Perfil de energía vs coordenada de reacción, para la ruptura del enlace Fe-His. (Energía en kcal/mol y distancia Fe-His en Å)

Para analizar la contribución de esta interacción en el mínimo local, calculamos la energía de interacción entre la His120 y la Arg124 en la disposición espacial en la que estos residuos se encuentran en la proteína. El resultado arrojó una energía de interacción de -9,5 kcal/mol, un valor que sugiere que esta interacción jugaría un rol fundamental en la estabilización del segundo mínimo. Respecto de la posición de la histidina en el segundo mínimo, a diferencia de lo observado en la Hb- $\alpha$ , en AXCP el complejo 5c-NO presenta a la histidina rotada 90° sobre el eje formado por los átomos  $C_{\alpha}$ - $C_{\beta}$ .

La baja barrera (2 kcal/mol) y el valor negativo para el  $\Delta E$  (-7.2 kcal/mol) asociados al proceso de re-unión, llevarían a que la histidina se encuentre mayoritariamente en un estado ligado. Sin embargo, la unión de una segunda molécula de NO al sitio proximal, imposibilitaría la re-unión de la histidina atrapando a la proteína en el complejo 5c-NO proximal como se observa en la estructura obtenida experimentalmente.



**Características estructurales del complejo 6c-di-NO en AXCP.** La unión de una segunda molécula de NO al sitio proximal vacante generaría un complejo con dos NOs uno a cada lado del hemo. Este tipo de complejos dicoordinados con NO, fue observado experimentalmente a bajas temperaturas en porfirinas modelos.<sup>22</sup> La Figura 4 muestra la estructura optimizada correspondiente al complejo dinitrosilado resultante 6c-di-NO.

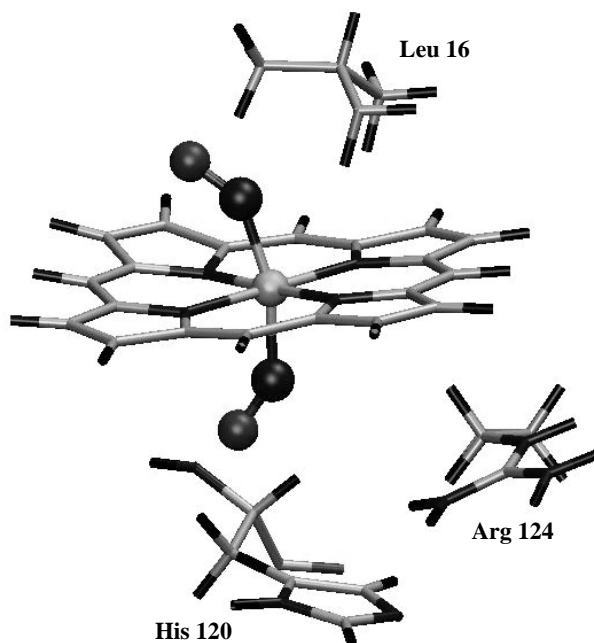


FIGURA 4. Complejo 6c-di-NO en el sitio activo de AXCP.

El complejo 6c-di-NO, posee dos conformaciones posibles cis y trans (la conformación cis corresponde a aquella donde los oxígenos de los nitrosilos están orientados en la misma dirección, mientras que en la conformación trans están orientados en direcciones opuestas). Cálculos previos realizados por el grupo de A. Ghosh,<sup>23</sup> para una porfirina aislada en vacío dieron como resultado que el complejo de bajo espín de conformación cis es el de menor energía. En AXCP el complejo 6c-di-NO con conformación cis presenta al NO distal apuntando hacia fuera de la Leu16 y al NO proximal apuntando en dirección opuesta de la Arg124 (Figura 4). Luego de que el NO distal es liberado, el NO proximal debe rotar para interactuar con la Arg124 y llegar a la conformación observada experimentalmente. Es importante notar que la afinidad por el segundo NO es mucho menor que la del primero (-21.6 versus -47.6 kcal/mol). Esto es consistente con los datos experimentales que muestran que los complejos de porfirinas dinitrosilados son de vida

corta, y sólo se obtienen a bajas temperaturas (179K).<sup>22</sup> mientras que los complejos 5c-NO son extremadamente estables.

***¿ El NO en el complejo 5c-NO se aloja en la cara proximal o distal?***

La evidencia teórica y experimental sugiere que el complejo 6c-di-NO es de vida corta y termina en un complejo 5c-NO, con el NO en alguno de los dos lados del grupo hemo. La estructura obtenida por rayos-X para AXCP muestra que el NO queda alojado finalmente en el sitio proximal. Partiendo del complejo 6c-di-NO nuestros cálculos arrojan resultados significativamente diferentes para la disociación de cada uno de los NOs. La liberación del NO proximal requiere 18.5 kcal/mol, mientras que consistentemente con lo esperado según los datos experimentales, la liberación del NO distal para terminar en el complejo 5c-NO proximal observado por rayos-X es de sólo 6.7 kcal/mol.

Para analizar cuales son las contribuciones que determinan la mayor estabilidad del NO proximal calculamos la diferencia de energía entre ambos tipos de complejos 5c-NO proximal y distal ( $\Delta E_{\text{prox-dis}}$ ) para la enzima salvaje (wt), para las mutantes Leu16xGly, Arg124xGly y la doble mutante Leu16xGly/Arg124xGly los resultados se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Preferencia proximal o distal para la conformación del complejo 5c-NO. El valor  $\Delta E_{\text{prox-dis}}$  es la diferencia de energía entre el complejo proximal respecto del distal, en kcal/mol (Un valor negativo implica que la conformación proximal es mas estable).  $q_{\text{NO}}$  en unidades de la carga del electrón ( $e$ ), ángulo Fe-N-O en grados.

	$\Delta E_{\text{prox-dis}}$	Fe-N-O		$q_{\text{NO}}$	
		<i>dist</i>	<i>prox</i>	<i>Dist</i>	<i>Prox</i>
Salvaje	-11.8	140.6	143.1	-0.066	-0.070
Leu <sub>16</sub> xGly	-0.9	141.4	142.6	-0.058	-0.053
Arg <sub>124</sub> x Gly	-10.5	140.6	143.3	-0.085	-0.013
Leu <sub>16</sub> xGly & Arg <sub>124</sub> xGly	2.5	141.7	143.6	-0.078	-0.015

Los resultados presentados en la Tabla 2 corroboran el hecho experimental de la preferencia proximal por el NO en AXCP. Los resultados también muestran que en la doble mutante, que presenta ambos sitios libres de interacción, la preferencia se invierte aunque la diferencia es mínima. El agregado de la arg124 en el sitio proximal revierte esta situación (ver Leu16xGly) debido a la interacción entre la Arg124 y el NO, aunque el efecto es moderado. En cambio el agregado de la Leu16 en el sitio distal estabiliza la conformación proximal en 10.5 kcal/mol, un valor similar al de la proteína salvaje. Los resultados de la Tabla 2 claramente sugieren que la preferencia de la conformación por el NO proximal es principalmente el resultado de la desestabilización estérica producida por la Leu16 sobre el ligando en la cavidad distal.

#### ***Ataque directo del segundo NO sobre el complejo 6c-NO.***

Como ya se mencionó en la introducción, estudios cinéticos sugieren la participación de una segunda molécula de NO como catalizador de la conversión del complejo 6c-NO al complejo 5c-NO. Esto se produciría por el ataque directo de un NO al enlace Fe-His, produciendo concertadamente la formación del enlace Fe-NO proximal y la ruptura del enlace Fe-His. Para estudiar esta posibilidad calculamos el perfil de energía para esta reacción en AXCP. Como coordenada de reacción se eligió la distancia Fe-N<sub>NO</sub>. El perfil correspondiente se muestra en la Figura 6.

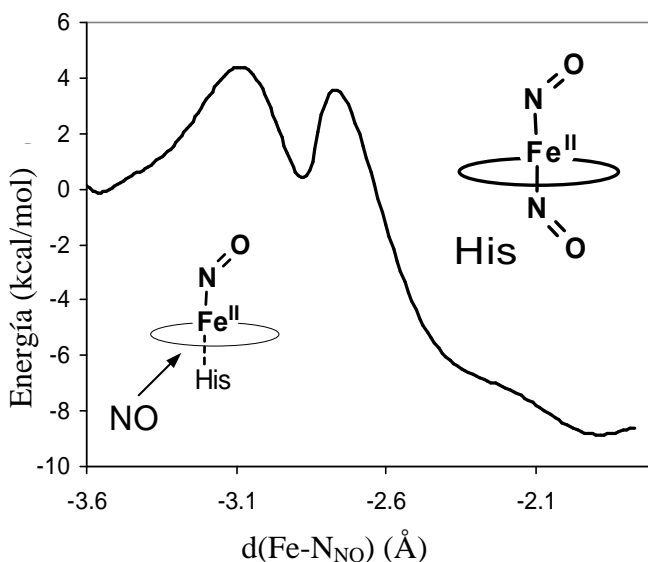


FIGURA 6. Energía potencial vs coordenada de reacción para el ataque directo del NO al complejo 6c-NO.

El perfil muestra que hay dos pequeñas barreras separadas por un intermediario (mínimo local). La primera barrera de 4 kcal/mol esta asociada a la ruptura del enlace Fe-His y la formación del enlace Fe-N<sub>NO</sub>, sin embargo en este intermediario la His esta demasiado cerca de la Arg124. La segunda barrera corresponde a la reacomodación de las posiciones de la Arg124 y la His proximal. Nótese que en este caso la barrera para la re-unión de la histidina es mucho mayor que en el caso anterior (Figura 3) Lo que determinará que la histidina difícilmente vuelva a unirse al hemo desplazando al NO proximal.

**Afinidad de oxígeno en AXCP.** Como ya mencionamos en la introducción otra característica que comparten AXCP y la sGC radica en que ambas son incapaces de unir oxígeno. Para explorar las bases moleculares de este hecho decidimos calcular la energía de unión del oxígeno en AXCP w.t y la mutante distal Leu16xGly. Los resultados se muestran en la Tabla 3

Tabla 3. Energía de unión del oxígeno  $\Delta E$  (kcal/mol).  $\Delta q_{\text{His}}$  y  $\Delta q_{\text{O}_2}$  (*e*) es la magnitud de carga recibida por el oxígeno y donadas por la histidina, respectivamente.

	$\Delta E$	$q_{\text{O}_2}$	$\Delta q_{\text{His}}$
<b>WT</b>	8.4	-0.262	0.124
<b>Leu<sub>16</sub>/Gly</b>	23.3	-0.231	0.106
<b>Hemo aislado</b>	21.4	-0.202	0.158

De la Tabla 3 se ve que como era de esperar, la energía de unión del oxígeno en AXCP es muy baja (menor aún que un hemo aislado) la mutación distal aumenta la energía de unión por oxígeno aunque ésta sigue siendo aún menor que los valores de proteínas que forman complejos oxigenados estables como la Mb y significativamente menor que los valores para proteínas con alta afinidad por el oxígeno. (como se mostro en el capítulo anterior). Es claro que la incapacidad de unir oxígeno en AXCP se debe no sólo a la ausencia de aminoácidos capaces de formar puentes de hidrógeno en la cavidad distal,

sino que la presencia de la Leu16 definitivamente dificulta que el oxígeno se una al metal.

**El complejo 6c His-Fe-CO en AXCP.** Otro hecho interesante mencionado en la introducción que se observa en AXCP, es que en la estructuras experimentales el CO se encuentra unido en el sitio distal mientras que el NO termina como ya se mencionó en el sitio proximal. Para comprender mejor el origen de esta diferencia en el patrón de unión calculamos el complejo 6c His-Fe-CO. Los resultados muestran que por un lado el complejo con CO presenta en contraposición al complejo con NO un efecto trans positivo, o sea la distancia Fe-His en el complejo con CO es menor que en el complejo 5c. Además la energía de unión del CO (41 kcal/mol) es similar a la del NO y significativamente mayor que la del oxígeno.

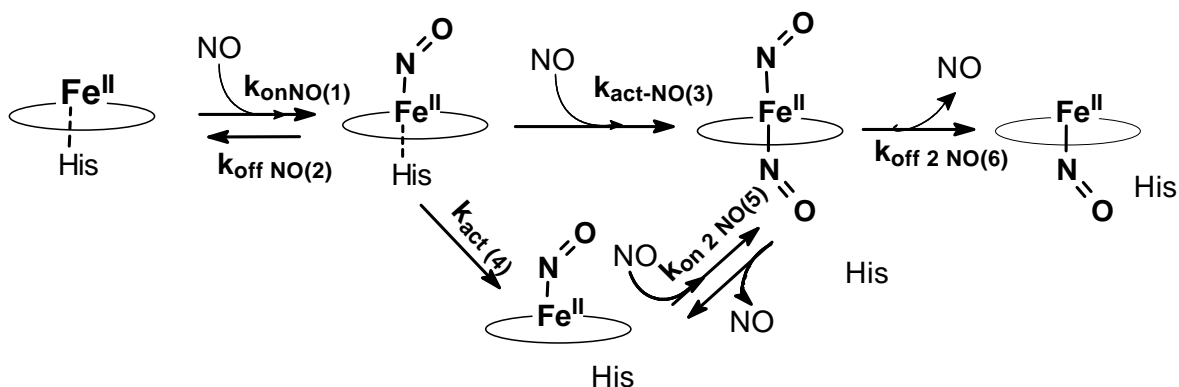
## Conclusiones

Tomando los resultados en conjunto, y asumiendo que los datos de AXCP son extrapolables a la sGC, podemos decir que los mismos concuerdan con el modelo presentado por el grupo de Marletta (Esquema 1).<sup>19</sup> Nuestros datos muestran que todos los pasos propuestos en el mismo son factibles de ocurrir en AXCP. En particular podemos ver que el mecanismo de activación (conversión del complejo 6c-NO al 5c-NO) no catalizado (reacción 4) y el catalizado por NO (reacción 3) son ambos termodinámica y cinéticamente posibles.

Los resultados de este trabajo también muestran que para que en una hemoproteína exista la posibilidad de conversión de un complejo 6c-NO a uno de tipo 5c-NO, se deben cumplir dos requisitos. Primero, el enlace hierro histidina debe ser relativamente débil. Esto se evidencia en la sGC como un atípicamente bajo valor para la frecuencia de estiramiento Fe-His de  $204\text{ cm}^{-1}$ . En segundo lugar debe existir en la superficie de energía potencial un segundo mínimo local, para la conformación 5c-NO con la histidina separada del hemo. En AXCP la conformación de tipo 5c-NO es estabilizada por la

presencia de la Arginina 124, que interactúa favorablemente con la histidina cuando ésta se descoordina del hemo.

En conjunto, los resultados para AXCP apuntan a que el mecanismo de interacción con NO, es aún más complejo que el presentado por Marletta mostrado en el Esquema 1. El mecanismo que proponemos para la interacción de AXCP con NO, que entre otras cosas supone la existencia de un complejo transiente del tipo 6c-diNO se presenta en el Esquema 2.



**Esquema 2.** Mecanismo propuesto para la interacción de NO con AXCP. En la conversión de la especie 6c a la 5c-NO, el NO primero labiliza a la histidina dando como resultado un complejo 6c-diNO, reacción (3). Por otro lado, la reacción (4) representa la ruptura del enlace Fe-His sin participación del NO. La reacción (5) corresponde a la unión de un segundo NO luego de que la histidina se separó del hierro, y la reacción (6) corresponde a la liberación del NO distal en el complejo 6c-diNO

En AXCP solo se midió experimentalmente la constante de pasaje del 6c-NO al 5c-NO catalizada por NO ( $k_{act-NO}$ ), obteniéndose valores entre  $3.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  y  $8.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Estos valores, son un poco menores a los obtenidos por el grupo de Marletta para la sGC ( $2.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ).<sup>18,19</sup> Considerando, una concentración de NO saturante, en el orden de micromolar, los valores resultantes de pseudo primer orden para la activación catalizada, son hasta tres órdenes de magnitud mayores que los estimados para la conversión no catalizada de 6c-NO al 5c-NO ( $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ <sup>18,19</sup> and  $1.3 \text{ s}^{-1}$ <sup>20</sup>).

Nuestros resultados muestran que las energías de activación para la conversión 6c-NO a 5c-NO, catalizada por un segundo NO (reacción 3) y la no catalizada (reacción 4), son

4.0 kcal/mol y 9.2 kcal/mol respectivamente. Asumiendo que la concentración de NO es lo suficientemente alta como para que el ataque del segundo NO sea el paso limitante en la reacción (3), las energías de activación, usando la ecuación de Arrhenius, dan una relación entre las velocidades de conversión 6c-NO a 5c-NO estimada, de unos 3 a 4 órdenes de magnitud, lo que es comparable a las diferencias obtenidas en los datos experimentales, considerando las aproximaciones utilizadas. Por último, es interesante notar que el hecho de que exista una segunda vía de activación de la sGC mediada también por NO, (reacción 4) permite una respuesta más rápida al incremento de la concentración de NO. Esto se debe a que al aumentar la concentración de NO, éste no sólo se coordina más a la proteína libre, sino que además acelera la velocidad de activación al catalizar el paso del complejo 6c-NO al de uno tipo 5c-NO.

*Diferencias en el patrón de unión de los diferentes ligandos.* Analizando los resultados para los tres ligandos NO, CO y O<sub>2</sub> se puede comprender también la diferencia en el patrón de unión para los mismos observada experimentalmente. El sitio distal hidrofóbico y ocluido por la Leu16 previene la unión del oxígeno, ya que este ligando requiere de estabilizaciones adicionales por puentes de hidrógeno para unirse eficientemente a las hemoproteínas. Por otro lado, el CO y el NO se unen fuertemente al hierro y no requieren estabilización adicional para formar los complejos 6c. En el complejo con CO éste produce un efecto trans positivo que refuerza el enlace Fe-His, quedando de este modo la histidina fijada en su posición proximal como se observa en la estructura experimental. De manera opuesta el efecto trans negativo del NO desestabiliza el enlace Fe-His, permitiendo que un segundo NO la desplace generando un complejo dinitrosilado transiente, que debido a la preferencia por el NO proximal (debida a la Leu16) termina en el complejo 5c-NO proximal observado experimentalmente.

Estos resultados muestran que AXCP provee un buen modelo para entender las bases moleculares de la interacción de ligandos pequeños con hemoproteínas. Si los mecanismos que determinan el patrón de unión de los ligandos en AXCP son también operativos en la sGC aún está por demostrarse.

## Referencias

- 
- <sup>1</sup> McCleverty J.A, **Chemistry of nitric oxide relevant to biology.***Chem Rev.* **2004**, 104, 2, 403-18.
- <sup>2</sup> Moncada S, Palmer R.M, Higgs E.A, **Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology.** *Pharmacol Rev.* **1991**, 43, 2, 109-42.
- <sup>3</sup> Zhao Y, Schelvis J.P, Babcock G.T, Marletta M.A, **Identification of histidine 105 in the beta1 subunit of soluble guanylate cyclase as the heme proximal ligand.** *Biochemistry* **1998**, 37, 4504-4509.
- <sup>4</sup> Pellicena P, Karow D.S, Boon E.M, Marletta M.A, and Kuriyan J, **Crystal structure of an oxygen-binding heme domain related to soluble guanylate cyclases.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, 101, 35, 12854-12859
- <sup>5</sup> Karow D.S, Pan D, Tran R, Pellicena P, Presley A. Mathies R.A, and Marletta M.A, **Spectroscopic characterization of the soluble guanylate cyclase-like heme domains from *Vibrio cholerae* and *Thermoanaerobacter tengcongensis*.** *Biochemistry* **2004**, 43, 10203-10211
- <sup>6</sup> Denninger J.W, Marletta M.A, **Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway.** *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1411, 334-350.
- <sup>7</sup> Meyer T.E, Kamen M.D, **New perspectives on c-type cytochromes.** *Adv. Protein. Chem.* **1982**, 35, 105-212;
- <sup>8</sup> Moir J.W.B, **Cytochrome c' from *Paracoccus denitrificans*: spectroscopic studies consistent with a role for the protein in nitric oxide metabolism.** *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1430, 65-72.
- <sup>9</sup> Cross R, Aish J, Patson S.J, Poole R.K, Moir J.W.B, **Cytochrome c' from *Rhodobacter capsulatus* confers increased resistance to nitric oxide.** *J. Bacteriol.* **2000**, 182, 1442-1447.
- <sup>10</sup> Cross R, Lloyd D, Poole R.K, Moir J.W.B, **Enzymatic removal of nitric oxide catalyzed by cytochrome c' in *Rhodobacter capsulatus*.** *J. Bacteriol.* **2001**, 183, 3050-3054.



- 
- <sup>11</sup> Lawson D.M, Stevenson C.E.M, Andrew C.R, Eady R.R, **Unprecedented proximal binding of nitric oxide to heme: implications for guanylate cyclase.** *EMBO J.* **2000**, *19*, 5661-5671.
- <sup>12</sup> Makino R, Matsuda H, Obayashi E, Shiro Y, Iizuka T, Hori H, **EPR characterization of axial bond in metal center of native and cobalt-substituted guanylate cyclase.** *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 7714-7723 .
- <sup>13</sup> George J.S, Andrew C.R, Lawson D.M, Thorneley R.N.F, Eady R.R, **Stopped-flow infrared spectroscopy reveals a six-coordinate intermediate in the formation of the proximally bound five-coordinate NO adduct of cytochrome c'.** *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9683- 9684.
- <sup>14</sup> Stone J.R, Marletta M.A, **Soluble guanylate cyclase from bovine lung: Activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states.** *Biochemistry* **1994**, *33*, 5636-5640.
- <sup>15</sup> Gong W, Hao B.; Mansy, S.S, Gonzalez G, Gilles-Gonzalez M.A, Chan M.K, **Structure of a biological oxygen sensor: a new mechanism for heme-driven signal transduction.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, *95*, 15177-15182.
- <sup>16</sup> Schelvis,J.P.M, Seibold S.A, Cerda J.F, Garavito R.M, Babcock G.T, **Interaction of Nitric Oxide with Prostaglandin Endoperoxide H Synthase-1: Implications for Fe-His Bond Cleavage in Heme Proteins** *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 10844-10850.
- <sup>17</sup> Martí M.A, Scherlis D.A, Doctorovich F.A, Ordejón P, and Estrin D.A, **Modulation of the NO trans effect in heme proteins: implications for the activation of soluble guanylate cyclase.** *J. Biol. Inorg. Chem.* **2003**, *6*, 595-600.
- <sup>18</sup> Ballou D.P, Zhao Y, Brandish P.E, Marletta M.A, **Revisiting the kinetics of nitric oxide (NO) binding to soluble guanylate cyclase: the simple NO-binding model is incorrect.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 12097-12101.

---

<sup>19</sup> Zhao Y, Brandish P.E, Ballou D.P, Marletta M.A, **A molecular basis for nitric oxide sensing by soluble guanylate cyclase.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, 96, 14753-14758.

<sup>20</sup> Bellamy T.C, Wood J, and Garthwaite J. **On the activation of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, 99, 507-510.

<sup>21</sup> Scheidt W.R, Ellison M.K, **The Synthetic and Structural Chemistry of Heme Derivatives with Nitric Oxide Ligands** *Acc. Chem. Res.* **1999**, 32, 4, 350-359.

<sup>22</sup> Lorkovic I., Ford P.C, **Nitric Oxide Addition to the Ferrous Nitrosyl Porphyrins Fe(P)(NO) Gives *trans*-Fe(P)(NO)<sub>2</sub> in Low-Temperature Solutions** *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 6516-6517.

<sup>23</sup> Conradie J, Wondimagegn T, Ghosh A, **Molecular Structure and Conformation of Dinitrosylheme** *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 4968-4969.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

## Capítulo 5

### **Explorando las bases moleculares de la regulación de la afinidad por oxígeno en las hemoproteínas.**

En este capítulo estudiamos por técnicas de simulación computacional las bases moleculares de la afinidad por oxígeno en las hemoproteínas. El capítulo consta de una introducción, en donde se explica cómo se caracteriza la afinidad por oxígeno, y cómo se relaciona la misma con la posible función fisiológica de la proteína. También se presenta en la misma una descripción del enlace Fe-O<sub>2</sub> desde el punto de vista de la química de coordinación. Los resultados están divididos en tres secciones, que corresponden al estudio de tres mecanismos diferentes de regulación de la afinidad por oxígeno. Estas se basan en los efectos distales, los efectos proximales y los efectos dinámicos. Cada una de estas secciones presenta una breve introducción, en donde se mencionan la relevancia fisiológica y las características de las proteínas elegidas. En cada sección se presentan además las conclusiones para cada una. Finalmente damos una discusión integradora de los tres efectos estudiados.

## Introducción

### *Caracterización de la afinidad por oxígeno en hemoproteínas*

Como ya se mencionó en la introducción, muchas hemoproteínas son capaces de reaccionar con ligandos pequeños, principalmente O<sub>2</sub>, CO y NO.<sup>1</sup> De estos tres, el oxígeno molecular es el más abundante y a su vez el que posee la menor afinidad por el grupo hemo libre.<sup>2</sup> En este contexto, la regulación de la afinidad por el O<sub>2</sub> es entonces uno de los determinantes claves para la función de una hemoproteína. La afinidad por oxígeno de una hemoproteína, caracterizada por la constante de equilibrio de la reacción de asociación (K<sub>O<sub>2</sub></sub>), está determinada por el cociente entre las constantes cinéticas de los procesos de asociación (k<sub>on</sub>), y disociación (k<sub>off</sub>) del mismo.<sup>2</sup> Las constantes de asociación en hemoproteínas dependen esencialmente de dos factores: la accesibilidad del ligando al sitio activo, y la velocidad de migración del mismo a través de la matriz proteica.<sup>3</sup> Los valores para la constante bimolecular de asociación cubren un rango de aproximadamente tres órdenes de magnitud, con valores de 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, característicos de proteínas con acceso restringido al sitio activo, hasta valores de 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, valor cercano al límite difusional en solución.<sup>3</sup> En cambio, las constantes de disociación cubren un rango de hasta 7 ordenes de magnitud, con valores entre 10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup> y 10<sup>4</sup> s<sup>-1</sup>,<sup>3,4</sup> y están determinadas por la magnitud de la interacción entre el O<sub>2</sub> y la proteína. Esta interacción se puede descomponer en dos contribuciones: la primera es la fuerza del enlace hierro-oxígeno, que depende de la capacidad del grupo hemo de formar la unión covalente correspondiente. La segunda consiste en la interacción del O<sub>2</sub> coordinado con los aminoácidos de la cavidad distal, principalmente mediante puentes de hidrógeno.<sup>4</sup>

### *Características de la unión Fe-O<sub>2</sub>*

El oxígeno molecular se une al hierro del hemo por uno de los dos átomos de oxígeno adoptando una geometría angular para la tríada Fe-O-O. La unión Fe-O<sub>2</sub> posee cierto carácter de tipo  $\sigma$ , debido a que el par de electrones de los orbitales  $\pi^* 2p$  del oxígeno son donados principalmente al orbital  $d_{z^2}$  del hierro generando un complejo diamagnético. Por otra parte, existe también retrodonación de los orbitales-d del metal a los orbitales  $\pi^*$  vacantes del O<sub>2</sub>. Esta retrodonación- $\pi$  refuerza la unión Fe-O, y resulta

en un O<sub>2</sub> con densidad de carga negativa. Un análisis alternativo para la interacción orbital del O<sub>2</sub> con el hierro, es pensar que en la unión un electrón-*d* del metal es transferido al O<sub>2</sub>. El resultado es entonces un Fe(III) unido a un O<sub>2</sub><sup>-</sup>, ambos con un electrón desapareado, los cuales se encuentran acoplados antiferromagnéticamente. De esta manera, se tiene un complejo diamagnético de acuerdo con los datos experimentales. Independientemente de cual de las dos descripciones sea la más aproximada, el resultado neto es un oxígeno con densidad de carga negativa, lo que lo hace un buen aceptor de puentes de hidrógeno.<sup>5</sup>

### ***La afinidad por oxígeno y la diversidad funcional de las hemoproteínas.***

Como ya se mencionó, la función de una hemoproteína está íntimamente relacionada con su afinidad por el oxígeno. Las hemoproteínas que transportan oxígeno, como la mioglobina o hemoglobina, poseen típicamente una afinidad moderada por el oxígeno ( $K_{O_2} \approx 1 \mu\text{M}^{-1}$ ) y constantes de asociación elevadas ( $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), las cuales aseguran que la misma se cargue fácilmente con oxígeno en regiones de alta presión parcial del mismo.<sup>3,5</sup> Al mismo tiempo, constantes de disociación relativamente altas ( $1 \text{ s}^{-1} - 10 \text{ s}^{-1}$ ), permiten la liberación rápida del oxígeno en zonas de baja presión parcial. Por otra parte las hemoproteínas que actúan como NO dioxigenasas, como la hemoglobina de *Ascaris lumbricoides* (AscHb)<sup>6</sup> o la hemoglobina truncada de *M. Tuberculosis*, (trHb N)<sup>7</sup> poseen una alta afinidad por el oxígeno con constantes de disociación extremadamente bajas ( $0.001 \text{ s}^{-1} - 0.1 \text{ s}^{-1}$ ). Esto permite que la proteína se encuentre cargada de oxígeno aún en condiciones de anoxia, permitiéndole al microorganismo tener una proteína funcional en ambientes anaerobios. Finalmente, podemos mencionar al grupo de hemoproteínas detectoras de ligandos diatómicos, que pueden ser subdivididas en dos grupos. Las detectoras de oxígeno como Fix-L<sup>8</sup> o HemAT,<sup>9</sup> poseen una afinidad por oxígeno finamente regulada que permite una respuesta precisa a una concentración de oxígeno dada. En cambio las proteínas detectoras de CO u NO, como la guanilato ciclasa soluble,<sup>10</sup> tienen una muy baja o nula afinidad por oxígeno. En estos casos, la altísima constante de disociación asegura tener al hemo libre para reaccionar con el NO aún en un medio aeróbico. Es claro entonces que comprender de manera precisa los factores que

determinan la afinidad por oxígeno en una hemoproteína es uno de los tópicos principales en la química y biología de las hemoproteínas.

## Objetivos

El objetivo del siguiente capítulo es comprender de qué manera la estructura de las hemoproteínas regula la afinidad por oxígeno de las mismas. Para ello se utilizarán cálculos de afinidad por oxígeno realizados con técnicas de simulación computacional híbridas basadas en DFT, como se menciona en el capítulo de métodos computacionales. En particular, se analizarán comparativamente y mediante el uso de mutantes generados *in-silico* las contribuciones de determinados aminoácidos conservados topológicamente en las posiciones distales y proximales en diversas hemoproteínas de la super familia de las globinas. También se prestará particular atención a los efectos de la dinámica y conformación de la proteína sobre la afinidad.

## Metodología computacional

*Generación de las estructuras de partida para las TrHb N de Mycobacterium tuberculosis (M.t trHb N), de Chlamydomonas eugametus (C.e. trHb N) y sus mutantes.* Las estructuras de partida para todos los cálculos de M.t y C.e TrHbN fueron las obtenidas por cristalografía de rayos-X de las respectivas proteínas. Los códigos del “protein data bank” son 1IDR y 1DLY para M.t y C.e TrHB N respectivamente. Ambas proteínas fueron solvatadas en una caja de agua dejando unos 8 Å de agua entre los átomos de la superficie de la proteína y el límite del sistema. Para relajar las estructuras de la proteína solvatada el sistema se calentó hasta unos 300 K, y luego se realizaron dinámicas moleculares clásicas de 500 ps. Todas las simulaciones de dinámica molecular se realizaron usando el programa Amber.<sup>11</sup> El radio de corte utilizado fue entre 10-12 Å para los términos de no unión y la temperatura se ajustó utilizando el termostato de Berendsen. Para la integración numérica de las ecuaciones de Newton se utilizó un “time-

step” de 2 fs. Las mutantes se construyeron *in-silico*, a partir de la estructura original reemplazando los aminoácidos correspondientes. En cada caso se procedió luego a hacer una simulación de 2 ns para estudiar la conformación del nuevo aminoácido.

*Generación de las estructuras de partida para la leghemoglobina (Lba), la mioglobina (Mb) y sus mutantes.* Las estructuras de partida para todos los cálculos de la Lba y la Mb fueron las obtenidas por cristalografía de rayos-X de las respectivas proteínas oxigenadas. Los códigos del protein data bank son 2MGM y 2BIN para la Lba y MB respectivamente. La solvatación, el protocolo de termalización y los parámetros de las corridas clásicas fueron equivalentes a los utilizados en las TrHB N.

En ambos casos (Lba y Mb), se estudiaron las proteínas salvajes y 3 mutantes diferentes construidas *in-silico*: una mutante distal, donde se reemplazó la histidina distal E7 por una glicina, una mutante proximal, donde se reemplazó la histidina proximal F8 por una glicina y se agregó una molécula de imidazol reemplazando el anillo de la histidina F8, y la doble mutante que combina las dos mutaciones recién mencionadas.

Las cargas parciales del grupo hemo en sus diferentes estados de oxidación/coordinación fueron obtenidas con el mismo protocolo utilizado y sugerido en el campo de fuerzas Amber según se menciona más adelante.

*Generación de las estructuras de partida para la minihemoglobina de Cerebratulus lacteus (CerHb).* La estructura de partida para todos los cálculos de la CerHb fue la obtenida por cristalografía de rayos-X, código del protein data bank:1KR7. La proteína fue solvatada en una caja octahédrica de agua, dejando 8 Å de agua entre los átomos de la superficie de la proteína y el límite del sistema. Los parámetros de simulación y el protocolo de termalización utilizados fueron los mismos que los mencionados anteriormente.

La mutante ThrE11 x Val se construyó *in silico* reemplazando el grupo OH por un CH<sub>3</sub>. La estructura obtenida es prácticamente indistinguible de la estructura cristalográfica de la proteína mutante (codigo: 1V07).

Las cargas parciales del grupo hemo en sus diferentes estados de oxidación/coordinación fueron obtenidas con el mismo protocolo utilizado y sugerido en



el campo de fuerzas Amber. El protocolo consiste en realizar un cálculo de estructura electrónica del grupo hemo oxigenado aislado, y luego ajustar el valor de las cargas parciales sobre los átomos de manera que reproduzcan el potencial electrostático.<sup>12</sup> Este conjunto de cargas para el grupo hemo ha sido ampliamente utilizado con éxito en diversas simulaciones de hemoproteínas. Sin embargo, como esperamos que el patrón de puente de interacciones con puente de hidrógeno en la CerHb sea muy sensible a la parametrización de las cargas del oxígeno coordinado, decidimos obtener las mismas empleando dos métodos de estructura electrónica diferentes para obtener el potencial electrostático utilizado para el ajuste. Los métodos empleados son Hartree-Fock y DFT con el funcional B3LYP. Es importante notar que el oxígeno se encuentra más polarizado en el cálculo realizado con HF. Las cargas resultantes para los oxígenos son: -0.18e y -0.37e con HF, y -0.12e y -0.18e para B3LYP (donde el primer valor corresponde al oxígeno unido al Fe).

*Perfil de energía libre de interconversión:*

En aquellos casos en los cuales las barreras asociadas a un determinado proceso son de una magnitud similar a las fluctuaciones térmicas del sistema, es posible obtener el perfil de energía libre asociado al proceso directamente de la simulación de dinámica molecular. El perfil resultante se obtiene a partir del cálculo de la distribución de probabilidades  $P(\xi)$  a lo largo de la coordenada de reacción ( $\xi$ ), de acuerdo con:

$$-\beta G(\xi) \approx \ln [P(\xi)]$$

donde  $\beta^{-1} = k_B T$  es la constante de Boltzmann multiplicada por la temperatura y  $G(\xi)$  la energía libre para el valor de  $\xi$  de coordenada. Los perfiles de energía libre de interconversión en la CerHb, para los dos conjuntos de cargas parciales (HF y B3LYP) fueron obtenidos de este modo directamente a partir de la simulación. La coordenada de reacción utilizada fue la diferencia entre las siguientes distancias: el segundo átomo de oxígeno del ligando  $O_2$  y el H fenólico de la tirosina B10; y el H fenólico de la tirosina B10 y el oxígeno- $\gamma$  de la treonina E11:  $\xi = r(O_2 - TyrB10H_{OH}) - r(TyrB10H_{OH} - ThrE11O\gamma)$ .

### *Perfil de energía QM-MM para la interconversión en la CerHb.*

Como fue mencionado en párrafos anteriores, para obtener un perfil de energía libre adecuado es necesario un muestreo extenso, imposible de obtener con métodos híbridos debido a su alto costo computacional. Sin embargo, es posible obtener un perfil de energía potencial para un determinado proceso utilizando la técnica de búsqueda del camino de reacción mencionado en el Capítulo 2, realizando en cada paso una optimización de geometría QM-MM restringida a lo largo de la coordenada de reacción y calculando la energía en cada mínimo a lo largo de la misma. La coordenada de reacción elegida para el perfil de energía de interconversión fue la mencionada anteriormente. En el caso de la CerHb, este cálculo nos permite independizarnos de la parametrización de las cargas.

### *Cálculo de la energía de unión de oxígeno con métodos híbridos QM-MM*

Para realizar los cálculos híbridos QM-MM en todos los sistemas proteicos utilizados, se tomaron diferentes configuraciones de la dinámica molecular clásica y se enfrió el sistema lentamente hasta 0 K. A partir de la estructura a 0 K se realiza una optimización de geometría QM-MM usando el algoritmo del gradiente conjugado con el programa SIESTA. En todos los cálculos QM-MM, solo pueden moverse los átomos localizados a menos de 10 Å del sitio activo (el hemo en este caso). El resto de los átomos de la proteína o el solvente se mantienen fijos. Para todos los átomos se utilizaron bases de calidad doble zeta con polarización. Los cálculos fueron realizados utilizando la aproximación PBE para el funcional de intercambio y correlación. En todos los casos, se restringió al subsistema cuántico a la ferro-porfirina (sin las cadenas laterales) más los ligandos proximal y distal correspondientes. Las uniones entre el sistema cuántico y clásico fueron tratadas con el método del “link atom” mencionado anteriormente. A modo de ejemplo, en un cálculo de una hemoproteína oxigenada, el sistema cuántico comprende el núcleo porfirínico, el oxígeno y el anillo imidazólico de la histidina proximal, resultando en un total de 48 átomos. En este caso se utilizan 9 “link atoms”: 8 entre el núcleo de la porfirina y sus cadenas laterales, y uno entre el anillo imidazólico y el esqueleto de la histidina proximal.

El grupo hemo en su estado pentacoordinado (por la histidina) ferroso fue calculado en el estado quintuplete (de alto espín), dado que se conoce que éste es el estado fundamental del sistema. Las proteínas hexacoordinadas con oxígeno fueron calculadas en el estado singulete (de bajo espín), dado que corresponde al estado fundamental.<sup>13</sup>

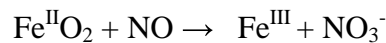
La energía de unión de oxígeno se calculó luego utilizando la siguiente fórmula:

$$\Delta E = E_{\text{prot-O}_2} - (E_{\text{O}_2} + E_{\text{prot}})$$

Donde  $E_{\text{prot-O}_2}$  corresponde a la energía de la proteína oxigenada,  $E_{\text{prot}}$  a la de la proteína libre y  $E_{\text{O}_2}$  es la energía del oxígeno aislado.

### 1-Efectos distales- rol de los puentes de hidrógeno.

La mayoría de las hemoproteínas que poseen una alta afinidad por oxígeno, tienen en común la particularidad de presentar diversos residuos donores de puente de hidrógeno en la cavidad distal. Entre ellas encontramos a la TrHb N de *M. tuberculosis*, con una  $k_{\text{off}}$  de  $0.2 \text{ s}^{-1}$ , y dos residuos donores de puente de hidrógeno en la cavidad distal (tirosina B10 y glutamina E11) (Figura 1A)<sup>14</sup> En esta proteína, se ha demostrado que la alta afinidad por  $\text{O}_2$  esta íntimamente ligada con la función de la misma. La *M.t.trHb N* funciona como una NO-dioxigenasa que cataliza la detoxificación del NO oxidándolo a nitrato que es una especie inocua.<sup>15</sup> La detoxificación ocurre mediante la siguiente reacción:



por lo tanto es esencial mantener a la proteína cargada con oxígeno, ya que la proteína libre puede unir NO fuertemente quedando inhibida para llevar a cabo la reacción de detoxificación. Estudios mutacionales sugieren a la tirosina distal B10 como la responsable principal de la alta afinidad por oxígeno, ya que mutaciones de la misma por aminoácidos incapaces de formar puentes de hidrógeno aumentan la  $k_{\text{off}}$  en al menos dos órdenes de magnitud.<sup>14</sup> Otra proteína de la misma familia de hemoglobinas truncadas, con función desconocida, pero que posee una afinidad por oxígeno aún mayor, ( $k_{\text{off}} = 0.0141 \text{ s}^{-1}$ ) es la tr Hb N de *Chlamydomonas Eugametus* (*C.e.trHb N*). Esta proteína posee además de los aminoácidos distales TyrB10 y GlnE11, una Gln en la posición E7. Si bien no se han caracterizado las afinidades por oxígeno de todos los miembros de las

hemoglobinas truncadas, y aún se desconoce la función de muchas de las mismas, se conoce la naturaleza de los aminoácidos distales en las posiciones mencionadas anteriormente para un extenso conjunto de las mismas. El análisis de las secuencias muestra que la presencia de las ya mencionadas Tyr o Gln pueden ser reemplazadas por aminoácidos hidrofóbicos (Leu, Val o Ile) o incluso por una histidina. Este conjunto de proteínas constituye un interesante conjunto de prueba para analizar los efectos distales sobre la afinidad por oxígeno.

Por otro lado, como ya mencionamos en la introducción, un segundo grupo de proteínas cuya función esta asociada con una afinidad por oxígeno moderada, son las globinas de los organismos superiores. La proteína patrón con estas características es la mioglobina. La mioglobina, al igual que otras hemoproteínas de afinidad moderada, presentan en la cavidad distal solamente un aminoácido donador de puente de hidrógeno, una histidina en la posición E7. Existen además numerosos estudios mutacionales de los residuos distales, sobre la modulación de la afinidad por oxígeno en mioglobinas lo que las convierte en un grupo altamente relevante para el estudio de este efecto.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para los cálculos de optimización de geometría de los complejos oxigenados, y la energía de unión por oxígeno de las diferentes proteínas mencionadas.

## Resultados y discusión

En la Figura 1 se muestran las estructuras optimizadas de los sitios activos oxigenados para la trHb N de *M. Tuberculosis* (M.t trHb) y la tr Hb N de *C. Eugametus*. (C.e trHb)

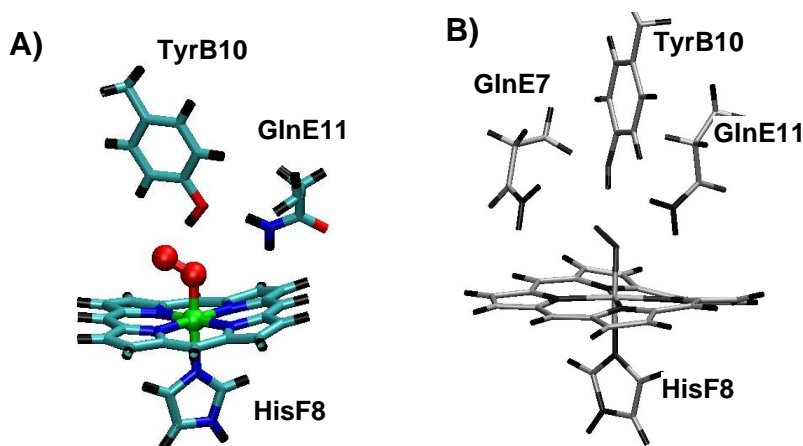


Figura 1. Sitios activos optimizados de A: M.t trHb y B: C.e trHb

Como se ve en la Figura 1A, en la estructura de la oxy-M.t.TrHb ambos residuos distales interaccionan por puente de hidrógeno con el O<sub>2</sub>. El análisis detallado muestra que la TyrB10 se encuentra estrechamente unida a ambos oxígenos, mientras que la GlnE11 interactúa de modo más débil y sólo con uno de los oxígenos del ligando. La GlnE11 contribuye además a fijar la posición de la TyrB10. El análisis de la Figura 1B muestra que en el caso de la oxy C.e. trHb N, la Tyr B10 al igual que en M.t trHb N presenta la interacción más fuerte, en este caso además ambas glutaminas (E7 y E11) contribuyen a fijar la TyrB10 en su posición e interactúan con el O<sub>2</sub> pero en menor medida.

En la Tabla 1A se muestran los parámetros estructurales relevantes, las energías de unión por oxígeno y las constantes de disociación experimentales ( $k_{off}$ ) para las diferentes hemoglobinas truncadas y sus mutantes.

Tabla 1A. Parámetros estructurales (distancias/Angstroms, ángulos/grados), Energéticos ( $\Delta E/\text{kcal mol}^{-1}$ ) y cinéticos ( $k_{\text{off}}/\text{s}^{-1}$ ) para los complejos oxigenados de M.t trHB N y C.e. trHb N salvaje y diversas mutantes.<sup>a</sup>

Proteína	M.t trHb N		C.e trHb N				
	Salvaje	YB10 A	Salvaje	YB10 A	QE11L	QE7LL	Triple mutante
Residuos distales <sup>b</sup>	YLQ	ALQ	YQQ	AQQ	YQL	YLQ	ALL
d Fe-O	1.84	1.86	1.78	1.78	1.78	1.86	1.77
d O-O	1.31	1.31	1.32	1.31	1.31	1.31	1.31
$\Delta q_{\text{O}_2}$	-0.36	-0.35	-0.398	-0.341	-0.347	-0.371	-0.342
d Fe-N $\epsilon_{\text{Prox.His}}$ <sup>c</sup>	2.06 (2.13)	2.09 (2.10)	2.06 (2.18)	2.10 (2.18)	2.10 (2.17)	2.11 (2.17)	2.12 (2.26)
$\Delta E_{\text{O}_2}$	34.0	29.8	41.5	31.3	31.5	35.8	22.5
$k_{\text{off}}$	0.2	45	0.014	n.r	n.r	n.r	n.r

a) La nomenclatura de las mutantes es la siguiente: YB10A indica que la Tirosina B10 (YB10) ha sido reemplazada por Alanina(A) b) Los residuos distales de las posiciones B10 E7 y E11 se encuentran indicados segun el código de 1 letra: Y = tyr, A = ala, Q = Gln, L =Leu. c) Entre paréntesis se indica el valor de la distancia en la proteína desoxigenada.

Los resultados de la Tabla 1A para los cálculos de la energía de unión del oxígeno en M.t.TrHb N (wt y TyrB10xAla) y C.e. trHb N, muestran que la metodología utilizada es capaz de reproducir la tendencia observada experimentalmente para las constantes de disociación, ya que a menor constante de disociación le corresponde una mayor energía de unión.

Los resultados para las mutantes de ambas proteínas permiten además, confirmar el rol de la tirosina B10 como la principal responsable de la alta afinidad por el oxígeno en la trHb N. En el caso de C.e trHb N ambas glutaminas hacen una contribucion significativa generando una proteína con una afinidad mayor aún que la M.t.trHb N.[14]

El análisis de las diferentes mutantes de C.e. trHb N muestra que la mutación de cualquiera de los tres residuos distales QE7, YB10, o QE11 por un residuo incapaz de

formar puentes de hidrógeno, disminuye la afinidad por oxígeno, lo que prueba que la presencia de los tres residuos es necesaria para generar una  $k_{\text{off}}$  muy baja. Para el caso de la triple mutante, donde no queda ningún residuo capaz de formar puente de hidrógeno, como era de esperarse la energía de unión por oxígeno es baja y comparable a la de un hemo aislado (21.0 kcal/mol). Por otro lado, el análisis de las mutantes individuales de glutamina, muestra que las mismas no son equivalentes. La mutación de la QE7L afecta en menor medida a la afinidad que la mutación QE11L. De hecho la energía de unión de C.e. QE7L es similar a la observada para la M.t salvaje que presenta los mismos residuos. Los resultados para las hemoproteínas que presentan solamente una histidina en la cavidad distal (HisE7), como la mioglobina y algunas mutantes, se presentan en la Tabla 1B.

Tabla 1B. Parámetros estructurales (distancias/Angstroms, ángulos/grados), energéticos ( $\Delta E/\text{kcal mol}^{-1}$ ) y cinéticos ( $k_{\text{off}}/\text{s}^{-1}$ ), para la mioglobina oxigenada y dos mutantes. Los residuos distales corresponden a las posiciones E7 y E11.

Proteína	Mioglobina		
	Salvaje	HE7G	VE11N
Residuos distales <sup>a</sup>	HV	GV	HN
d Fe-O	1.84	1.762	1.78
d O-O	1.297	1.285	1.298
$\Delta q_{\text{O}_2}$	-0.214	-0.219	-0.254
d Fe-His <sup>b</sup>	2.183 (2.194)	2.18 (2.190)	2.14 (2.18)
$\Delta E_{\text{O}_2}$	27.0	22.7	30.1
$k_{\text{off}}$	12	1600	0.54

a) Los residuos distales de las posiciones E7 y E11 se encuentran indicados según el código de 1 letra: H = His, V = Val, G = Gly, N = Asn. c) Entre paréntesis se indica el valor de la distancia en la proteína desoxigenada.

Los resultados muestran que, como era de esperarse de acuerdo a la menor afinidad observada experimentalmente, la energía de unión por oxígeno en la mioglobina salvaje es unas 10 kcal/mol menor a la obtenida para las hemoglobinas truncadas N salvajes de la

tabla anterior. Mas aún, la mutación de la HisE7 distal por Gly reduce la energía de unión en unas 7 kcal/mol, obteniéndose un valor comparable al obtenido para un hemo aislado. Por otro lado, el agregar un residuo adicional capaz de formar un puente de hidrógeno con el oxígeno, como una asparagina en posición E11, como era de esperar aumenta la afinidad por el oxígeno.

Entre todos los parámetros estructurales de las Tablas 1A y 1B, el que presenta una mejor correlación con la energía de unión, es la carga negativa sobre el oxígeno. La misma se hace más negativa en aquellas proteínas con mayor cantidad de interacciones puente de hidrógeno reforzando la unión O<sub>2</sub>-proteína sinérgicamente, ya que al estar el O<sub>2</sub> más polarizado todas las interacciones se hacen más fuertes. La otra clara tendencia estructural observada corresponde a la reducción en la distancia de unión Fe-HisF8 al unir oxígeno comparada con la proteína libre. A esta reducción en la distancia Fe-His se la denomina efecto trans positivo y se discutirá en otro capítulo.

En conjunto, los resultados de las Tablas 1A y 1B confirman que la estabilización distal (mediada por la presencia de grupos donores de puente de hidrógeno) es uno de los factores clave que determinan la afinidad por oxígeno. Los mismos también muestran que es posible realizar un estudio comparativo de las contribuciones particulares realizadas por cada aminoácido mediante el uso de mutantes *in-silico* y técnicas de simulación híbridas QM-MM.



## 2- Influencia del entorno de la histidina axial: el efecto proximal

El efecto estudiado en la sección anterior es tal vez el mecanismo más estudiado de regulación de la afinidad por oxígeno en hemoproteínas. La existencia de una correlación entre el número y la intensidad de los puentes de hidrógeno distales y la afinidad por oxígeno ha sido corroborada en numerosos casos. Sin embargo, existen casos donde la afinidad por oxígeno no se corresponde con lo esperado debido a las características de su cavidad distal. Uno de los ejemplos más notables es el caso de las leghemoglobinas (Lbas).<sup>16</sup>

Las Lbas se encuentran en los nódulos de las raíces de las plantas leguminosas y se cree que realizan la función de transportadoras de oxígeno. Al igual que la Mb, poseen una afinidad por oxígeno moderada (aunque algo mayor que la de la Mb) y una histidina en la posición E7. Llamativamente y en oposición a lo observado en la Mb, mutaciones de este aminoácido por residuos hidrofóbicos, muestran que el mismo no contribuye significativamente a la estabilización del oxígeno. La mutación de la HisE7 en Mb por aminoácidos no donores de puente hidrógeno, aumentan la  $k_{\text{off}}$  más de 100 veces en todos los casos, mientras que las mismas mutaciones en Lba tienen un efecto mínimo (la  $k_{\text{off}}$  aumenta menos de 5 veces). Más aún, a pesar de carecer aparentemente de una estabilización distal la constante de disociación de Lba es menor que la de Mb (los valores de  $k_{\text{off}}$  son  $5.6 \text{ s}^{-1}$  y  $15 \text{ s}^{-1}$  respectivamente).<sup>16</sup>

La causa más probable de la ausencia de un marcado efecto distal y una moderada afinidad por oxígeno en la Lba, es la regulación de la afinidad por oxígeno debida al entorno proximal. Los así denominados efectos proximales regulan la interacción de la histidina proximal con el grupo hemo y ésta a su vez repercute sobre la unión Fe-O. El mecanismo de regulación consiste en ajustar la capacidad de donación de carga de la histidina al hierro. Una mayor transferencia de carga, de la histidina proximal al Fe, le permite una mayor retrodonación- $\pi$  al oxígeno reforzando el enlace Fe-O. La capacidad de transferencia de carga de la histidina proximal al metal está determinada por: 1- la basicidad de la histidina, modulada por la interacción de puente de hidrógeno con el H $\delta$ ; 2- la posición rotacional de la histidina, que describe la posición relativa entre el plano del anillo imidazólico, y un eje imaginario que pasa por dos nitrógenos pirrólicos

opuestos del hemo. Si el eje está alineado con el plano, la conformación se denomina eclipsada, mientras que si se encuentra formando un ángulo de cerca de  $45^\circ$  se denomina alternada.; 3-. La distancia entre la histidina y el plano porfirínico determinada por la matriz proteica.

Evidencia adicional de la importancia de los efectos proximales provienen de estudios de mutagénesis en Lba y Mb donde la histidina proximal es reemplazada por glicina y se agrega imidazol. Los resultados muestran que la  $k_{off}$  aumenta 3 veces en Lba, y disminuye 3 veces en Mb.

Para estudiar los efectos proximales de manera comparativa realizamos un estudio de las energías de unión por oxígeno en Lba y Mb y sus mutantes.

### **Resultados y Discusión**

En la Tabla 2 se muestran, para las estructuras de las proteínas salvaje y mutantes optimizadas con el método QM-MM los siguientes datos: parámetros geométricos relevantes para el complejo oxigenado, la carga recibida por el oxígeno ( $\Delta q_{O_2}$ ), la carga donada por el imidazol ( $\Delta q_{im.}$ ) en el complejo, y las energías de unión del oxígeno relativas a la proteína salvaje. Las mutantes son: la mutante proximal, en la que la histidina proximal (F8) es reemplazada por glicina y un imidazol libre; la mutante distal de la Histidina E7, y la mutante doble (HisF8xGly +Im y HisE7xGly).

Tabla 2. Parámetros estructurales (distancias/Angstroms, ángulos/grados), energéticos ( $\Delta E/\text{kcal mol}^{-1}$ ), poblaciones de Mulliken ( $\Delta q/e$ ) y cinéticos ( $k_{\text{off}}/\text{s}^{-1}$ ) para la coordinación de oxígeno a la Mb y la Lba

Mb				
	Salvaje	HisF8xGly + Im.	HisE7xGly	Mutante doble
d Fe-O	1.840	1.832	1.762	1.827
d O-O	1.297	1.299	1.285	1.285
$\angle\text{Fe-O-O}$	120.9	122.8	123.2	120.6
$\Delta q_{\text{O}_2}$	-0.214	-0.286	-0.219	-0.206
d Fe-N <sub>His</sub>	2.183	2.098	2.178	2.094
Diedro <sub>His</sub> <sup>a</sup>	78.4	56.4	76.6	65.3
$\Delta q_{\text{Im}}$	0.146	0.174	0.142	0.156
$\Delta(\Delta E_{\text{O}_2})$	0	1.4	-7.1	-4.7
Lba				
	Salvaje	HisF8xGly + Im.	HisE7xGly	Mutante doble
d Fe-O	1.839	1.834	1.844	1.840
d O-O	1.301	1.300	1.294	1.292
$\angle\text{Fe-O-O}$	121.4	121.6	121.8	121.6
$\Delta q_{\text{O}_2}$	-0.302	-0.302	-0.268	-0.242
d Fe-N <sub>His</sub>	2.041	2.038	2.047	2.066
Diedro <sub>His</sub> <sup>a</sup>	60.1	72.6	58.9	79.4
$\Delta q_{\text{Im}}$	0.196	0.187	0.205	0.178
$\Delta(\Delta E_{\text{O}_2})$	0	-1.6	-3.1	-6.5

<sup>a</sup> Diedro<sub>His</sub> se refiere a la posición rotacional de la Histidina como se la definió anteriormente.

El análisis de las estructuras optimizadas de las proteínas salvajes por sí solas ya revela gran parte de las características del entorno proximal que favorecen en la Lba la unión del oxígeno. En Lba, el N $\delta$  de la histidina proximal F8 está formando un puente de hidrógeno con el carbonilo de la Leucina F4. En Mb, además de interactuar con el carbonilo de la LeuF4, el N $\delta$  de la HisF8 también lo hace con el OH de la serina F7 (Figura 3). Como resultado de estas interacciones, la histidina proximal se encuentra fijada al resto de la proteína por tres puntos: la unión al metal, la unión al “backbone” y la interacción de puente de hidrógeno del N $\delta$  (Figura 3). La posición relativa de estos tres puntos en la matriz proteica determinan la posición rotacional de la histidina y la distancia al plano

porfirínico. Las estructuras optimizadas muestran que en Lba el plano del imidazol se encuentra en una posición alternada respecto a los nitrógenos pirrólicos y una distancia corta entre la histidina y el metal, mientras que en la Mb la histidina se presenta en una posición más cercana a la de tipo eclipsada y a una distancia mayor del hierro (Figura 4). El resultado de una posición relativa diferente para la histidina proximal, se refleja en la conexión His-Fe-O<sub>2</sub> que afecta la unión por oxígeno y consecuentemente la afinidad. Como se puede apreciar en la Tabla 2 el análisis de las poblaciones de Mulliken de las proteínas salvajes revela que efectivamente en Lba la donación de carga de la histidina al metal es mayor (0.196e en Lba vs 0.146e en Mb), con la consecuente mayor retrodonación- $\pi$  hacia el O<sub>2</sub>, lo que se refleja en un oxígeno más negativo en Lba que en Mb ( $\Delta q_{O_2}$  es igual a -0.214e y -0.302e para Mb y Lba, respectivamente).

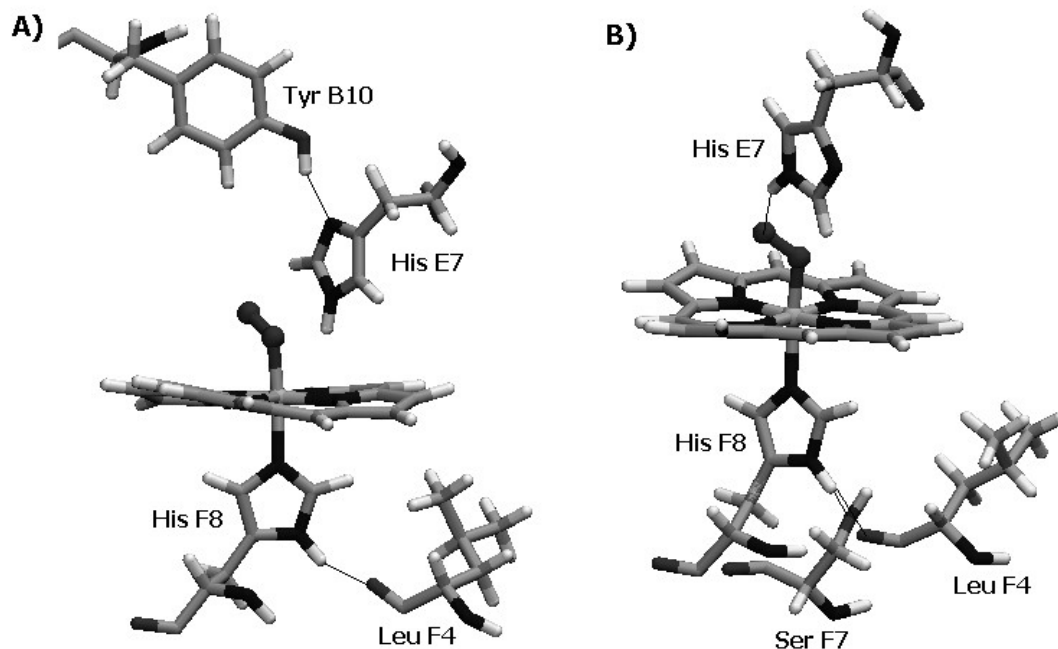


Figura 3. Figura del sitio activo optimizado en Lba A) y Mb B).

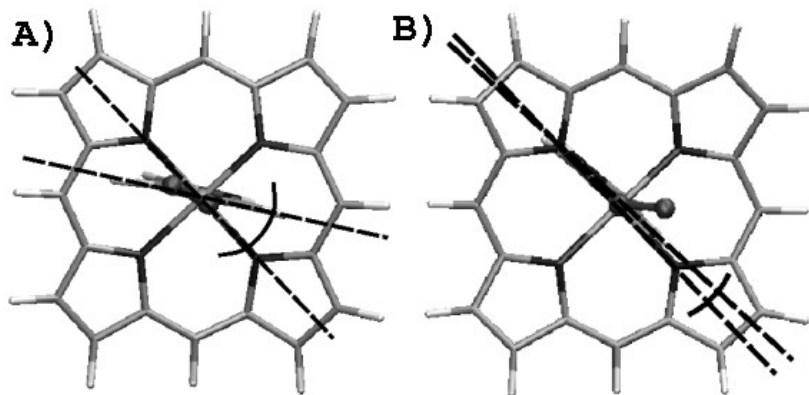


Figura 4. Posición rotacional de la histidina proximal en A) Lba y B) Mb. Las líneas discontinuas marcan la posición rotacional del plano de la histidina y el eje que pasa por los nitrógenos pirrólicos opuestos.

Con el objetivo de cuantificar el efecto proximal sobre la afinidad del oxígeno, realizamos una optimización de geometría para las mutantes proximales HisF8xGly + Im como se menciona en el párrafo anterior. Los resultados se muestran en la Tabla 2. Si comparamos la mutante proximal de Mb con la proteína salvaje, vemos que al liberar al anillo imidazólico de su anclaje a la proteína, ésta gira para ubicarse en una posición más cercana a la alternada (el ángulo rotacional pasa de 78 a 56 grados) y se acerca  $\approx 0.1$  Å al hierro. Como resultado del cambio en la posición de la histidina, ésta se encuentra en una posición más favorable para donar carga a través del eje Im-Fe-O<sub>2</sub>. Esto se ve reflejado en el incremento de donación de carga de la histidina con la consecuente mayor retrodonación al O<sub>2</sub>. Finalmente, y consistentemente con los datos experimentales, la energía de unión del oxígeno se incrementa en 1.4 kcal/mol en la mutante HisF8xGly + Im respecto de la proteína salvaje.

En Lba el panorama es completamente opuesto al que se observa en la Mb. Al liberar al anillo imidazólico, éste rota para reducir la distancia de interacción del puente de hidrógeno H $\delta$  - HisF8 con el CO-LeuF4, ubicándose ahora en una posición rotacional más eclipsada. Este cambio de orientación resulta en una pequeña disminución de la carga donada por la histidina y una disminución de 1.6 kcal/mol en la energía de unión por oxígeno, consistente con lo esperado de acuerdo a los datos experimentales de las constantes de disociación.

Alentados por los resultados obtenidos en las secciones anteriores decidimos estudiar la relación entre ambos efectos usando la Mb y la Lba. Como ya mostramos en la Mb, la

mutación distal (HisE7xGly) reduce drásticamente la energía de unión del oxígeno. Sin embargo la ausencia de la histidina distal no tiene efecto en la regulación proximal, ya que la posición de la histidina F8 no se ve modificada (la distancia Fe-His y el ángulo rotacional permanecen inalterados) y la donación de carga tampoco. En Lba, la mutación distal también produce una reducción en la energía de unión por oxígeno aunque en concordancia con la tendencia de las constantes de disociación, la disminución es significativamente menor que en el caso de la Mb. Por otro lado, al igual que en la Mb, la interacción proximal se ve inalterada por la mutación distal.

Para terminar de confirmar el efecto proximal y la relativa independencia de éste con el efecto distal realizamos ahora las mutantes dobles. Los resultados de la Tabla 2 muestran que los cambios observados al mutar la histidina proximal en la proteína carente de histidina distal, son casi los mismos que se observan al mutar solamente la histidina proximal en las proteínas salvajes. En Mb, por ejemplo, la energía de unión de la doble mutante disminuye en 4.7 kcal/mol respecto de la salvaje, lo que representa un incremento de 2.3 kcal/mol respecto de la mutante distal. Además, en la doble mutante la liberación del anillo imidazólico produce un acercamiento de la histidina al hierro y una rotación del anillo hacia una posición más cercana a la alternada con el correspondiente aumento de la donación de carga. Al igual que en la mutante proximal, nuevamente en Lba se observa el efecto opuesto que en Mb: el anillo imidazólico rota hacia una posición más eclipsada lo que produce una disminución en la energía de la unión respecto de la mutante distal.

En resumen, los resultados de esta sección muestran que los efectos proximales a través de la determinación de la posición relativa de la histidina proximal respecto de la porfirina regulan la interacción hierro-histidina siendo capaces de modular la afinidad por oxígeno. Los resultados también muestran que los efectos proximal y distal son relativamente independientes pudiendo operar en conjunto para determinar la afinidad por oxígeno de una hemoproteína.

### 3-Efectos dinámicos

Uno de los ejemplos más notables recientemente descubierto dentro de la familia de las globinas es la llamada mini hemoglobina de *Cerebratulus lacteus* (CerHb), un gusano del grupo de los nematodos.<sup>17</sup> Esta hemoglobina se expresa en el tejido nervioso del animal y es la más pequeña de las descubiertas hasta hoy. La CerHb está compuesta por solo 109 aminoácidos, pero su estructura terciaria conserva la estructura típica de la familia de las globinas. El hemo se encuentra coordinado por la histidina proximal F8, mientras que en la cavidad distal se encuentran varios aminoácidos capaces de interactuar mediante puentes de hidrógeno, TyrB10, GlnE7 y Thr E11. Los estudios de cristalografía de rayos-X muestran que la TyrB10 y la GlnE11 interactúan directamente con el O<sub>2</sub> coordinado, de manera similar a lo que ocurre en la trHb N. Sin embargo, el rol de la ThrE11 parecería ser el de determinar la orientación precisa del OH de la TyrB10 respecto del ligando.<sup>17</sup>

El aspecto más extraño de la CerHb es que a pesar de poseer en la cavidad distal los clásicos aminoácidos TyrB10 y GlnE11, encontrados en proteínas con alta afinidad por O<sub>2</sub> como la TrHb N, ésta posee una afinidad por oxígeno moderada, lo que se evidencia en una constante de disociación extremadamente alta ( $k_{\text{off}} = 200\text{-}600 \text{ s}^{-1}$ ). Más aún, los estudios de mutagénesis dirigida muestran que la mutación de TyrB10 x Phe da como resultado solamente un incremento de 2 veces en la  $k_{\text{off}}$ , mientras que la mutación de la ThrE11 por Valina produce una disminución dramática (unas 1000 veces) en la misma.<sup>17</sup>

El estudio de las características dinámicas y estructurales que determinan la unión por oxígeno en la CerHb nos permitió, como mostraremos a continuación, descubrir un mecanismo novedoso de regulación de la afinidad por oxígeno en hemoproteínas.

### Resultados y Discusión

*Simulaciones clásicas.* Para analizar la estructura y dinámica de la cerHb w.t en su estado oxigenado, realizamos una simulación de 5 ns de la proteína solvatada. El análisis de la evolución temporal de la distancia entre el hidrógeno fenólico de la TyrB10 y el oxígeno terminal del ligando se muestra en la Figura 5. De la misma, se puede concluir que existen dos conformaciones en equilibrio dinámico. La primera conformación (c1)

muestra que el OH fenólico de la TyrB10 se encuentra dirigido hacia la molécula de O<sub>2</sub> unida al hierro, a distancia de puente de hidrógeno del átomo de oxígeno. (Fig. 6A). En la segunda conformación (c2) la interacción de puente de hidrógeno entre la TyrB10 y el ligando O<sub>2</sub> no esta presente, ya que el OH fenólico se encuentra orientado hacia el átomo OG1 de la ThrE11. (Fig 6B)<sup>12</sup> Es interesante notar que los confórmeros son indistinguibles en la estructura de rayos-X, ya que la mayor diferencia reside en la posición del OH, mientras que el anillo aromático de la TyrB10 permanece prácticamente en la misma posición en ambas.

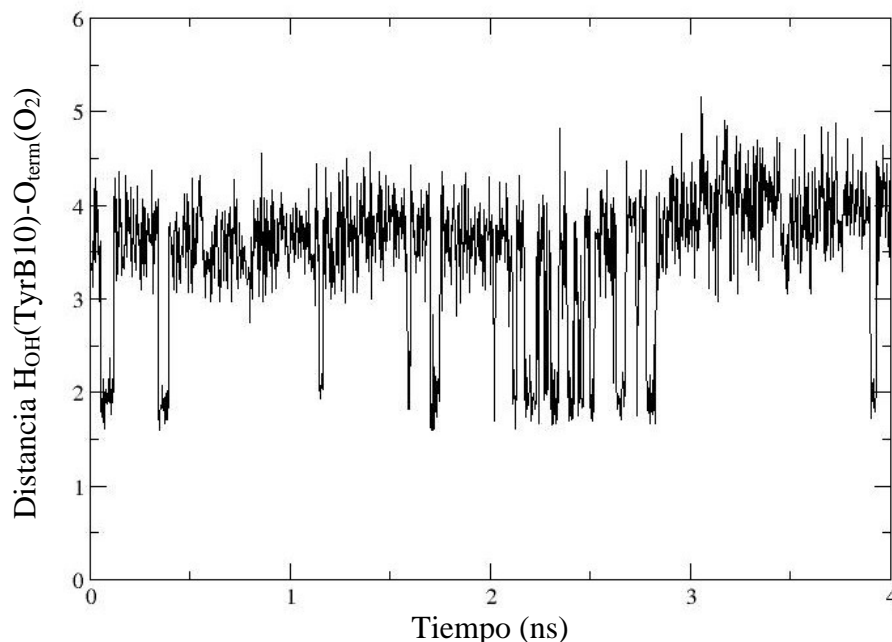


Figura 5. Evolución temporal de la distancia entre el H fenólico de la tirosina B10 y el oxígeno terminal del O<sub>2</sub> unido al hemo.



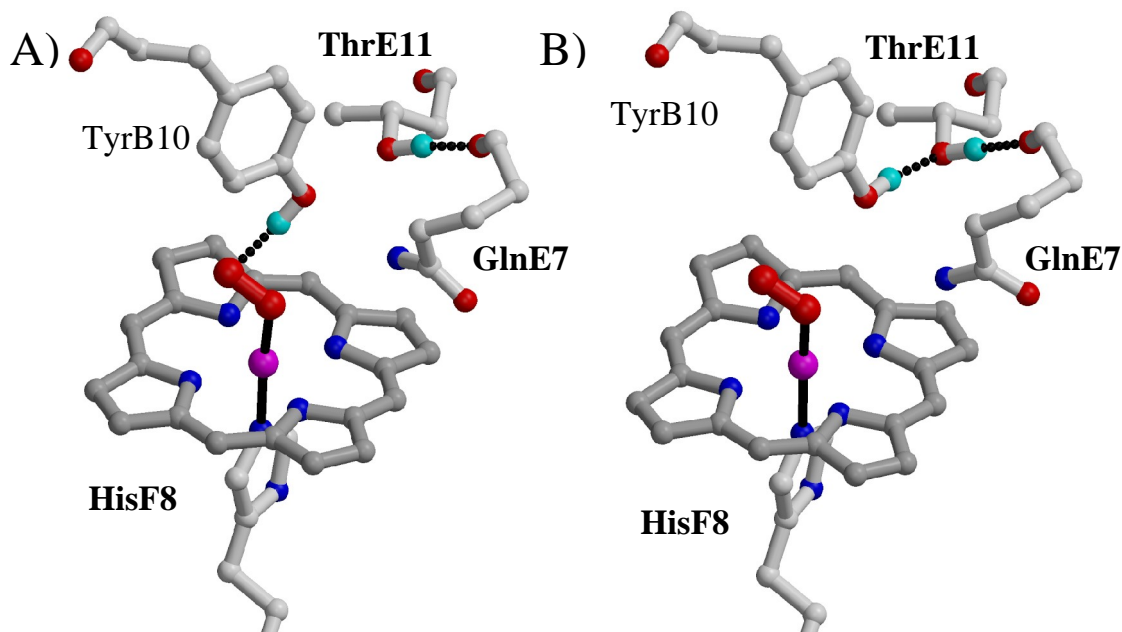


Figura 6. Conformaciones observadas en la CerHb A) Conformación 1; B) Conformación 2.

Como se menciona en la sección de métodos computacionales, el uso de técnicas clásicas de simulación describe la interacción entre átomos de moléculas diferentes mediante los términos de no unión. La magnitud de la interacción de puente de hidrógeno dependerá entonces de las cargas asignadas a los átomos involucrados en la interacción. En este caso, las cargas asignadas al O<sub>2</sub> unido al grupo hemo provienen de un cálculo realizado con una porfirina en vacío utilizando el método de HF, en el que la carga total sobre el O<sub>2</sub> unido resulta en  $-0.5 e$ . Para analizar el efecto de este parámetro sobre los resultados obtenidos, realizamos la misma simulación pero utilizando para el grupo hemo oxígeno otro conjunto de cargas parciales obtenido mediante cálculos a nivel B3LYP. En este caso la carga total sobre el O<sub>2</sub> unido es de aproximadamente  $-0.3 e$ . Los resultados muestran que con este conjunto de cargas parciales también se observan los dos conformeros.

Definiendo la coordenada de interconversión como la diferencia entre las distancias de la interacción (O(2)-H<sub>TyrB10</sub>) y (H<sub>TyrB10</sub>-OG1<sub>ThrE11</sub>), para ambas conformaciones de acuerdo a:

$$\xi = d(\text{O}(2)\text{-H}_{\text{TyrB10}}) - d(\text{H}_{\text{TyrB10}}\text{-OG1}_{\text{ThrE11}})$$

podimos obtener el perfil de energía libre a lo largo de la misma a partir de la simulación para ambos conjuntos de cargas parciales. El mismo se muestra en la Figura 7. La pequeña diferencia de energía libre entre ambas conformaciones y la barrera de interconversión de solo 1-2 kcal/mol, indican que posiblemente ambas conformaciones se encuentren pobladas significativamente a temperatura ambiente.

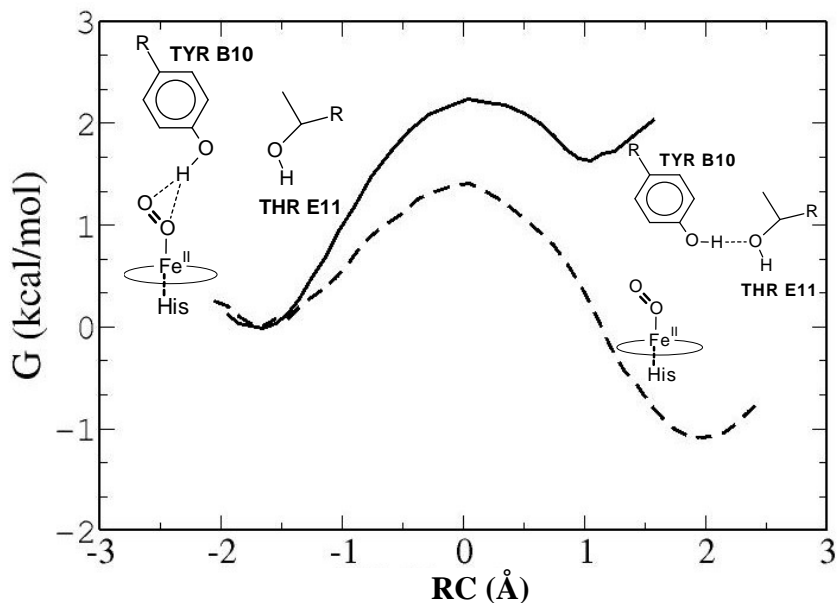


Figura 7. Perfil de energía libre para la interconversión entre las conformaciones 1 y 2 encontradas en la CerHb. Los resultados correspondientes a las cargas obtenidas mediante cálculos HF y B3LYP se muestran en líneas llena y punteada respectivamente.

Consistentemente con el hecho que, para el conjunto de cargas obtenido por HF el O<sub>2</sub> posee una carga más negativa, la conformación 1 (donde el O<sub>2</sub> interactúa con el OH de la TyrB10) es la predominante. Sin embargo, el uso de las cargas obtenidas con B3LYP revierte la preferencia al conformero 2.

La realización del mismo tipo de simulación y análisis con la cerHb mutante ThrE11xVal mostró resultados diferentes. Como era de esperarse, la falta de capacidad de la ValE11 de formar puente de hidrógeno con la TyrB10 no permite la formación del conformero 2, y por eso una estructura de tipo conformero 1, con la interacción entre el O<sub>2</sub> y el OH TyrB10, es observada durante toda la simulación.

### *Cálculo QM-MM de la barrera de interconversión*

Para independizarse del problema de las cargas del oxígeno, y del campo de fuerzas clásico decidimos realizar el perfil de energía potencial para la interconversión utilizando métodos QM-MM. Al igual que en los casos anteriores, el hemo-O<sub>2</sub> y la histidina proximal fueron incluidos en el subsistema cuántico y el resto de la proteína más el solvente fueron tratados de manera clásica. La coordenada de reacción elegida para realizar el perfil fue la misma que la utilizada para calcular la energía libre en las simulaciones clásicas. El resultado del perfil de energía potencial se muestra en la Figura 8. El perfil muestra que en este caso (donde no hay parametrización ad-hoc de las cargas del O<sub>2</sub>) ambas conformaciones son isoenergéticas. Esto implicaría que ambos estados estarían igualmente poblados a temperatura ambiente, siempre y cuando los efectos térmicos y entrópicos sean similares para ambas conformaciones, dato que concuerda de manera cualitativa con lo observado en las simulaciones clásicas.

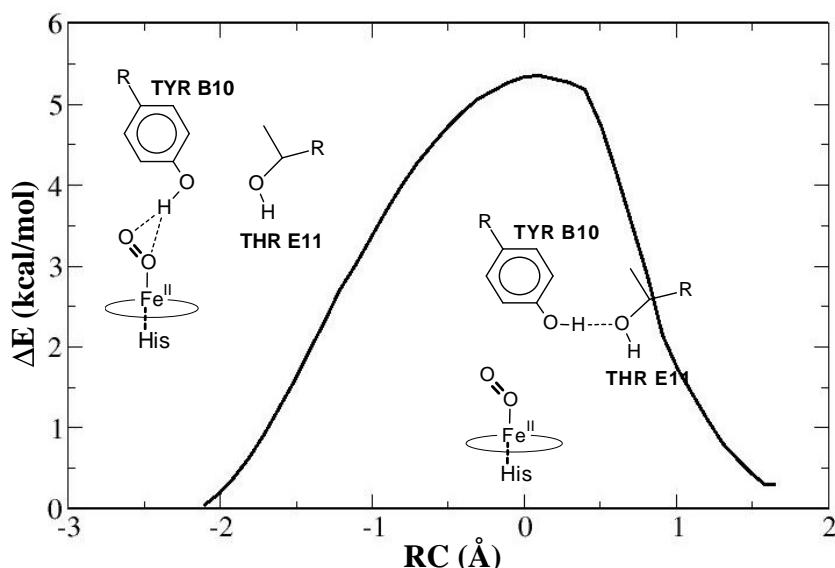


Figura 8. Perfil de energía para el cálculo QM-MM de la barrera de interconversión.

### *Cálculos QM-MM de la afinidad por oxígeno.*

Habiendo observado la existencia de los dos conformeros en la CerHb decidimos calcular la energía de unión por oxígeno para ambas estructuras. Las estructuras optimizadas para ambas conformaciones fueron obtenidas partiendo de una configuración seleccionada de la dinámica, optimizada con una simulación clásica, seguida de una optimización QM-

MM, de acuerdo a lo descrito en la sección de Métodos Computacionales. En la Tabla 3 se presentan los parámetros estructurales relevantes de las estructuras optimizadas.

**Tabla 3.** Parámetros estructurales y energías de unión por O<sub>2</sub> para la CerHb w.t y la mutante ThrE11Va. Las distancias están en Å, los ángulos en grados y las energías en kcal/mol . O(1) y O(2) corresponden respectivamente al átomo de oxígeno coordinado al hierro y al oxígeno terminal en la molécula de O<sub>2</sub>.

	w.t. conf. 1	w.t. conf. 2	mut
Fe-O(1)-O(2)	117.9	119.5	120.8
Fe-O(1)	1.82	1.77	1.84
O(1)-O(2)	1.30	1.29	1.31
LeuF5:O-HisF8:ND1	2.80	2.79	2.81
Fe-HisF8:ND1	2.08	2.11	2.11
TyrB10:OH-O(1)	2.96	3.17	2.99
TyrB10:OH-O(2)	2.77	3.28	2.74
TyrB10:OH- ThrE11:OG1	3.18	2.70	-
TyrB10:OH- ValE11:CG2	-	-	3.28
GlnE7:O-Thr E11:OG1	2.66	2.73	-
GlnE7:O-Val E11:CG2	-	-	3.64
$\Delta E$ union de O <sub>2</sub>	32.8	24.4	32.0

Los valores obtenidos para la energía de unión por oxígeno son de 32.8 kcal/mol para la conformación 1 (donde el O<sub>2</sub> unido al hemo interactúa por puente de hidrógeno con el OH fenólico de la TyrB10) y de 24.4 kcal/mol para la conformación 2. Por otro lado en la mutante, donde se observa una estructura similar a la del conformero 1, la energía de unión, es, como era de esperarse de 32.0 kcal/mol, un valor similar al de la conformación 1. Si consideramos lo observado en las simulaciones clásicas y en el perfil de energía potencial para la interconversión entre ambas estructuras, se podría esperar una población del 50% para cada una de las dos conformaciones para la CerHb salvaje en solución, de

esta manera el valor esperado para la energía de unión de O<sub>2</sub> de la CerHb wt será el promedio de los valores obtenidos para cada conformación. El promedio de la energía de unión de ambas conformaciones arroja un valor estimado de unas -28.6 kcal/mol.

Si analizamos los datos de las constantes de disociación de la CerHb wt y sus mutantes observamos que la mutación ThrE11 a Val disminuye la constante de disociación  $k_{off}$  unas 1000 veces respecto de la proteína salvaje. (los valores son 180 s<sup>-1</sup> y 0.18 s<sup>-1</sup> para la CerHb salvaje y ThrE11xVal respectivamente).<sup>17</sup> Este cambio se corresponde con un cambio en energía de unión de unas 4 kcal/mol, un valor que concuerda perfectamente con la diferencia obtenida al comparar las energías de unión calculadas para la proteína mutante (32.0 kcal/mol) y la proteína salvaje, utilizando el promedio de las dos conformaciones (28.6 kcal/mol).

Para terminar de confirmar que realmente la existencia de las dos conformaciones determina la constante de disociación y por ende la afinidad por oxígeno decidimos calcular la energía de unión de la mutante TyrB10 x Phe. Experimentalmente esta mutación produce un aumento de unas 300 veces en la  $k_{off}$ , lo que indica que el OH de la TyrB10 contribuye positivamente a la unión por oxígeno y que la diferencia de energía de unión esperada es de  $\approx 1$  kcal/mol. El cálculo de la energía de unión del oxígeno para la proteína mutante TyrB10 x Phe da como resultado un valor de 26.1 kcal/mol. Nuevamente, este resultado se ajusta perfectamente a lo esperado considerando que la proteína salvaje posee una energía de unión resultante de la contribución de ambas conformaciones de 28.6 kcal/mol.

Los resultados de los cálculos para la CerHb en este trabajo, además de ser consistentes con los datos de cristalografía de rayos-X y cinéticas de unión de ligandos, demuestran que las constantes de disociación de O<sub>2</sub> observadas, sólo pueden ser explicadas mediante el planteo de un equilibrio dinámico entre estados de alta y baja afinidad en la CerHb salvaje. La existencia del equilibrio dinámico entre dos conformaciones de la cavidad distal que regulan la afinidad por oxígeno, revelado mediante las simulaciones clásicas y que ha pasado inadvertida en los resultados experimentales, se perfila como un nuevo mecanismo sutil de regulación de la afinidad por oxígeno en hemoproteínas.

## Conclusiones

Los datos presentados en este capítulo muestran que los tres efectos estudiados, a) regulación distal por interacción de puentes de hidrógeno, b) regulación proximal mediada por la posición y características de la histidina proximal y c) efectos dinámicos debidas a la presencia de múltiples conformaciones con diferente afinidad, son capaces de regular la afinidad por oxígeno. De éstos efectos, el que posee una mayor capacidad de regulación es el efecto distal. Éste es también el que más fácilmente permite predecir la probable afinidad por oxígeno de una hemoproteína nueva, en base solamente al conocimiento de su estructura primaria (su secuencia) y el plegamiento característico. A modo de ejemplo, podemos suponer que las hemoglobinas truncadas que posean la TyrB10, la GlnE11 y la GlnE7 poseerán una alta afinidad por oxígeno, proteínas con sólo uno o dos de estos residuos poseerán una afinidad menor y proteínas sin ninguno de los tres probablemente tengan una afinidad muy baja. Sin embargo, debido a los otros efectos, en particular debido a la posible presencia de múltiples conformaciones, se debe ser cauto al momento de hacer una predicción. El efecto proximal, es por un lado mucho más sutil que el efecto distal, por lo que permite una regulación más fina de la afinidad. Por otro lado permite lograr una regulación de la afinidad independiente del entorno distal.

Finalmente, es interesante mencionar que la afinidad resultante de una hemoproteína dada estará determinada por la contribución e interrelación de estos efectos. Probablemente el ejemplo más importante de la conjunción de estos efectos se da en la hemoglobina de mamíferos, donde se observa un cambio drástico en la afinidad por oxígeno debido a un cambio conformacional cooperativo en la estructura cuaternaria.

Estudios con hemoglobinas híbridas sustituidas con hemos con diferentes metales muestran que el cambio conformacional desde el estado de T, de baja afinidad, al estado R, de alta afinidad esta acompañado por una reducción en la constante de disociación de unas 50 a 100 veces en la subunidad  $\alpha$ , y unas 20 – 60 veces en la subunidad  $\beta$ .

Por un lado, entonces, es claro que la presencia de dos conformaciones R y T en equilibrio dinámico es uno de los factores clave en la determinación de la afinidad por oxígeno. Más aún, es el desplazamiento del equilibrio T-R lo que resulta en un cambio

neto en la afinidad de la proteína como un todo. Por otro lado, si analizamos cada subunidad individualmente, vemos que en las subunidades  $\beta$  el aumento de la afinidad debido al cambio T-R es atribuido a un reforzamiento de la interacción por puente de hidrógeno entre el O<sub>2</sub> unido y la histidina distal E7. En cambio, en la subunidad  $\alpha$  la modificación se debe probablemente a un efecto proximal. Si analizamos las estructuras de rayos-X de la hemoglobina vemos que en el estado T de baja afinidad, la distancia Fe-His es de 2.6 Å, y que esta distancia se relaja en el estado R a 2.1 Å. Nuestros resultados de la segunda sección, explican como este cambio en la distancia hierro histidinas sería el responsable del aumento de la afinidad por oxígeno en el estado R.

## Referencias

- 
- <sup>1</sup>Jain R, Chan M.K, **Mechanisms of ligand discrimination by heme proteins** *J. Biol. Inorg. Chem.* **2003** 8, 1-11.
- <sup>2</sup> Olson J.S, **Kinetic pathways and barriers for ligand binding to myoglobin.** *J. Biol. Chem.* **1996**, 271(30) 17593-6.
- <sup>3</sup> Scott E.E, Gibson Q.H, Olson J.S, **Mapping the pathways for O<sub>2</sub> entry into and exit from myoglobin.** *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 5177-5188.
- <sup>4</sup> Milani M, Pesce A, Nardini M, Ouellet H, Ouellet Y, Dewilde S, Bocedi A, Ascenzi P, Guertin M, Moens L, Friedman J.M, Wittenberg J.B, Bolognesi M. **Structural bases for heme binding and diatomic ligand recognition in truncated hemoglobins.** *J. Inorg Biochem.* **2005**, 99 1, 97-109.
- <sup>5</sup> **Dioxygen-Binding Proteins** in *Comprehensive Coordination Chemistry II: From Biology to Nanotechnology*. Elsevier Pergamon. Vol 8, Edited by Jon A. McCleverty, January **2004**.
- <sup>6</sup> Kiger L, Rashid A.K, Griffon N, Haque M, Moens L, Gibson Q.H, Poyart C, Marden M.C, **Trematode hemoglobins show exceptionally high oxygen affinity.** *Biophys. J.* **1998**, 75 2, 990-8
- <sup>7</sup> Yeh S.R, Couture M, Ouellet Y, Guertin M, Rousseau D.L, **A cooperative oxygen binding hemoglobin from Mycobacterium tuberculosis. Stabilization of heme ligands by a distal tyrosine residue.** *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 3, 1679-84.

- 
- <sup>8</sup> Gilles-Gonzalez M.A, Ditta G.S, Helinski D.R, **A haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti***. *Nature* **1991**, 350, 170-172.
- <sup>9</sup> Hou S, Larsen R.W, Boudko D, Riley C. W, Karatan E, Zimmer M, Ordal G.W, Alam M, **Myoglobin-like aerotaxis transducers in Archaea and Bacteria**. *Nature* **2000**, 403, 540-544.
- <sup>10</sup> Denninger J. W, Marletta M.A, **Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway**. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1411, 334-350.
- <sup>11</sup> Cornell W.D, Cieplak P, Bayly C.I, Gould I.R, Merz K.M. Jr., Ferguson D.M, Spellmeyer D.C, Fox T, Caldwell J.W, Kollman P.A, **A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules** *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 5179.
- <sup>12</sup> Bayly C.I, Cieplak P, Cornell W.D, Kollman P.A., **A well-behaved electrostatic potential based method using restraints for determining atom centered charges: the RESP model**. *J. Phys. Chem.* **97**, **1993**, 10269.
- <sup>13</sup> Scherlis D.A, Estrin D.A, **Structure and spin-state energetics of an iron porphyrin model: An assessment of theoretical methods**. *Int. J. Quant. Chem.* **2002**, 87, 3, 158-166.
- <sup>14</sup> Milani M, Pesce A, Ouellet Y, Ascenzi P, Guertin M, Bolognesi M. **Mycobacterium tuberculosis hemoglobin N displays a protein tunnel suited for O<sub>2</sub> diffusion to the heme**. *EMBO J.* **2001**, 1; 20, 3902-9.
- <sup>15</sup> Ouellet H, Ouellet Y, Richard C, Labarre M, Wittenberg B, Wittenberg J, Guertin M. **Truncated hemoglobin HbN protects *Mycobacterium bovis* from nitric oxide**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2002**; 99, 5902-7.
- <sup>16</sup> Kundu S, Blouin G.C, Premer S.A, Sarath G, Olson J.S, Hargrove M.S, **Tyrosine B10 inhibits stabilization of bound carbon monoxide and oxygen in soybean leghemoglobin** *Biochemistry* **2004**, 43, 6241-6252.
- <sup>17</sup> Pesce A, Nardini M, Ascenzi P, Geuens E, Dewilde S, Moens L, Bolognesi M, Riggs A.F, Hale A, Deng P, Nienhaus G.U, Olson J.S, Nienhaus K. **Thr-E11 regulates O<sub>2</sub> affinity in *Cerebratulus lacteus* mini-hemoglobin**. *J. Biol. Chem.* **2004**; 279, 33662-33672.



This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

## Capítulo 6

### Conclusiones Generales

#### **Desde las porfirinas hasta las hemoproteínas.**

Como ya se mencionó en la introducción la función de una hemoproteína está íntimamente relacionada con la reactividad química del grupo hemo, determinada en gran medida por las propiedades de la química de coordinación del hierro. Utilizando como punto de partida la reactividad intrínseca del grupo hemo, las hemoproteínas han sido capaces de explotar la infinita diversidad de entornos próximo/distales de la matriz proteica, para generar un conjunto de proteínas con una diversidad funcional inigualable. Al inicio de esta tesis nos pusimos como objetivo principal comprender la relación entre las características físico-químicas de los sitios activos presentes en las diferentes hemoproteínas y la función de las mismas. Para cumplir con nuestro objetivo hemos utilizado el mismo punto de partida que usó la naturaleza para seleccionar las funciones de las hemoproteínas: la reactividad intrínseca del grupo hemo. Luego hemos comparado la misma con los resultados observados para diferentes ejemplos de hemoproteínas y sus sitios activos aislados. En la mayoría de los casos hemos recurrido al estudio comparativo de mutantes puntuales para aislar algún efecto. Todos los resultados los hemos interpretado siempre desde un abordaje físico-químico sostenido en el conocimiento preciso y detallado de la estructura de los sitios activos en estudio. Sin embargo, y dada la gran diversidad de funciones que realizan las hemoproteínas, es imposible abordarlas todas en un trabajo de tesis. Por eso, en este caso nos hemos centrado en algunas de las características reactivas de las hemoproteínas que consideramos mas relevantes. Finalmente es interesante mencionar que la afinidad resultante para una hemoproteína dada estará determinada por la contribución e interrelación de estos efectos.

### ***EL HNO y la química biológica***

El Capítulo 3 muestra un claro ejemplo del estudio de la reactividad intrínseca del grupo hemo frente a ligandos pequeños. Utilizando diferentes porfirinas modelos hemo podido analizar en detalle las características reactivas del HNO frente a porfirinas de hierro y manganeso. Los resultados muestran, en primer lugar, que los comúnmente utilizados donores de HNO pueden reaccionar directamente con las porfirinas, que en algunos casos catalizan su descomposición, para dar los correspondientes complejos nitrosilados. El análisis cinético muestra que la velocidad de reacción del HNO con las Fe<sup>III</sup>/Mn<sup>III</sup> porfirinas es similar a la observada para la reacción del NO con las mismas, y que la misma sería una cota superior a la velocidad de reacción contra hemoproteínas férricas. Por otro lado, el estudio de la reacción de los donores de HNO con las Mn<sup>III</sup> porfirinas sugiere una posible utilización de las mismas en ensayos de discriminación entre el HNO y el NO en un medio fisiológico. Esta posibilidad se basa en la alta eficiencia y velocidad de reacción de las mismas frentes al HNO y la ausencia de reactividad de las mismas frente al NO.

### ***Determinación de la afinidad por oxígeno***

De los tres ligandos pequeños capaces de reaccionar con las hemoproteínas, (O<sub>2</sub>, CO y NO), el oxígeno molecular es el más abundante y a su vez el que posee la menor afinidad por el grupo hemo libre. En este contexto, la regulación de la afinidad por el O<sub>2</sub> es entonces uno de los determinantes claves para la función y relevancia fisiológica de una hemoproteína. Utilizando una combinación de métodos de dinámica molecular, para determinar las conformaciones o estructuras relevantes, junto con cálculos híbridos QM-MM de la energía de unión del oxígeno para un grupo de hemoproteínas seleccionadas, hemos podido analizar las bases moleculares que determinan la afinidad por oxígeno. El estudio comparativo de los ejemplos cuidadosamente seleccionados mencionados en el Capítulo 4, sumado al estudio sistemático de mutaciones puntuales, nos permite clasificar los mecanismos de regulación de la afinidad en tres grupos:

El primero y mas relevante es el efecto distal. La presencia de aminoácidos donores de puentes de hidrógeno (tirosina, histidina y glutamina principalmente) permite, debido a la densidad negativa que adquiere el O<sub>2</sub> coordinado al Fe, formar una unión de

puede de hidrógeno entre el oxígeno y el aminoácido distal, tal que la interacción oxígeno-proteína se ve incrementada significativamente. El incremento neto en la afinidad dependerá del número y naturaleza de los puentes de hidrógeno. El segundo efecto, es el que depende de la interacción de la histidina proximal con el complejo oxigenado. Este efecto es más sutil y difícil de predecir que el primero. En este caso, el aumento de la afinidad se debe a un incremento en la energía de unión Fe-O<sub>2</sub>, modulada por la histidina proximal. Hemos podido detectar tres formas a través de las cuales las proteínas modulan la interacción de la histidina proximal con el Fe. Estas son: la densidad de carga disponible en el anillo imidazólico, la posición rotacional de la histidina y la distancia de la misma al plano porfirínico. La maximización de la energía de unión Fe-O<sub>2</sub> se logra con una histidina con una densidad de carga intermedia, debido a la interacción por puente de hidrógeno del H-δ con un carbonilo, ubicada en una posición rotacional alternada respecto a los nitrógenos porfirínicos y lo más cercana posible al plano porfirínico. El tercer efecto, es un efecto dinámico y se debe a la existencia de múltiples conformaciones con diferente afinidad que pueden coexistir en equilibrio térmico. En estos casos la afinidad neta será un promedio pesado por las poblaciones relativas de la afinidad de cada una de las conformaciones relevantes.

### ***¿Cómo detectar NO en un ambiente aeróbico?***

Como ya mostramos en el Capítulo 4, las hemoproteínas poseen un amplio rango de reactividad frente al oxígeno, esto no es para nada sorprendente si se considera que muchísimas hemoproteínas deben vivir en un medio aeróbico, lo que tal vez si sea sorprendente es que existen hemoproteínas capaces de detectar y responder a la presencia del NO en este tipo de entorno. La proteína que realiza esta función en los mamíferos es la guanilato ciclasa soluble. Debido a que su estructura es desconocida existe mucha especulación sobre los mecanismos moleculares que le permiten realizar su función. En el Capítulo 5 hemos estudiado la capacidad de reaccionar con NO, O<sub>2</sub> y CO de citocromo C' de *Alcaligenes xyloxidans*, una proteína que posee similitudes reactivas y espectroscópicas con la sGC. Los resultados muestran que la ausencia de un residuo donador puente de hidrógeno en un sitio distal estéricamente desfavorable evitan o dificultan la unión del oxígeno. La presencia de una histidina distal débilmente unida al

Fe y la existencia de una conformación estable con la histidina separada del hierro, permiten que el efecto trans negativo del NO rompa la unión Fe-His generando una proteína 5c-NO, con el sitio proximal vacante. Alternativamente, hemos mostrado que un segundo NO es capaz de catalizar la ruptura del enlace Fe-His, en el complejo His-Fe-NO. El estudio termodinámico y cinético de las reacciones mencionadas concuerda con el modelo planteado en base a los datos experimentales, y permite una mayor comprensión de las bases físico-químicas que permiten que el NO sea un eficiente mensajero biológico. Por último, el estudio comparativo con los complejos de CO y O<sub>2</sub>, permite una comprensión mayor de los mecanismos de discriminación de las hemoproteínas por estos ligandos.

***La simulación computacional como un método emergente para el estudio de las hemoproteínas.***

Como ya mencionamos en la introducción, para comprender el funcionamiento de las hemoproteínas es necesario conocer primero la reactividad intrínseca del grupo hemo. Este conocimiento es el punto de partida para comprender cómo la naturaleza utiliza a la matriz proteica para la regulación fina de la reactividad del hemo con el objetivo de cumplir una determinada función. Para esto se han realizado numerosos estudios experimentales con una gran variedad de técnicas de la reactividad de porfirinas aisladas. La comparación de estos resultados, con los obtenidos para las mismas reacciones en diferentes proteínas y sus mutantes, sumado al conocimiento de las estructuras proteicas, se ha convertido en la ruta a seguir en el estudio de la relación estructura-función de las hemoproteínas. Por otro lado, como también hemos mencionado, en la última década los métodos de simulación computacional, tradicionalmente utilizados como herramientas complementarias de los datos experimentales, han aportado resultados independientes del experimento con relativo éxito en una variedad de ejemplos. En la actualidad estos métodos permiten por ejemplo obtener información que en muchos casos resulta inaccesible por los medios experimentales conocidos. En el caso de las hemoproteínas los estudios por simulación computacional tradicionalmente se centraron en dos aspectos 1- el cálculo de la estructura electrónica de complejos porfirínicos con diferentes ligandos aislados en vacío, y 2- cálculos de dinámica molecular para comprender la dinámica de la

proteína. En este contexto, muchas de las técnicas de simulación utilizadas en la presente tesis (principalmente el método QM-MM) han sido desarrolladas y puestas a punto para el cálculo de propiedades relevantes de las hemoproteínas que permiten una mejor comprensión de la relación estructura-función de las mismas. A lo largo de esta tesis hemos demostrado cómo el estudio sistemático de proteínas mutantes (Capítulos 4 y 5) o “sistemas modelos virtuales” (Capítulo 4) permite obtener una mejor comprensión de los factores que determinan las características reactivas en cuestión (afinidad por oxígeno, reactividad frente al NO, etc.).

## **Perspectivas futuras**

### *La ubicuidad de las globinas y su diversidad funcional*

En los últimos diez años la super familia de las hemoglobinas ha crecido de manera significativa por el añadido de por ejemplo un nuevo grupo de proteínas denominadas hemoglobinas truncadas (trHbs) . El nombre se debe a que poseen un tamaño entre un 20 a 30% menor al de las globinas. Los proyectos de secuenciación de genomas completos para todo tipo de organismos, permitieron identificar TrHbs en eubacterias, cianobacterias, eucariotas unicelulares y plantas superiores.<sup>1</sup> Muchos de estos organismos son patógenos, y sus pequeños genomas sugieren un rol crucial para cada una de las proteínas que codifican. Por otro lado los proyectos geonómicos de organismos superiores han permitido encontrar nuevos miembros de la familia de las globinas aún no caracterizadas completamente. Por ejemplo las denominadas citoglobina y neuroglobina<sup>2</sup> descubiertas en mamíferos o la hemoglobina descubierta en *Drosophila*. La clonación y caracterización bioquímica de todas y cada una de estas hemoproteínas con el objetivo de determinar su función es una tarea cíclopea y costosa.

Por tal razón una comprensión detallada de la relación estructura-función en hemoproteínas puede ser un factor clave al momento de proponer hipótesis sobre la función de estas nuevas proteínas, y permitir una mejor elección del sistema experimental. Por otro lado el poder predictivo de los métodos teóricos presentados en el presente trabajo puede complementar, acotar o incluso dirigir los esfuerzos

experimentales, ayudando a poder comprender mejor el funcionamiento de estos sistemas.<sup>3</sup>

## Referencias

<sup>1</sup> Milani M, Pesce A, Nardini M, Ouellet H, Ouellet Y, Dewilde S, Bocedi A, Ascenzi P, Guertin M, Moens L, Friedman JM, Wittenberg JB, Bolognesi M. **Structural bases for heme binding and diatomic ligand recognition in truncated hemoglobins.** *J. Inorg. Biochem.* **2005**, 99(1):97-109.

<sup>2</sup> Hankeln T, Ebner B, Fuchs C, Gerlach F, Haberkamp M, Laufs TL, Roesner A, Schmidt M, Weich B, Wystub S, Saaler-Reinhardt S, Reuss S, Bolognesi M, De Sanctis D, Marden MC, Kiger L, Moens L, Dewilde S, Nevo E, Avivi A, Weber RE, Fago A, Burmester T. **Neuroglobin and cytoglobin in search of their role in the vertebrate globin family.** *J. Inorg. Biochem.* **2005**, 99(1):110-9.

<sup>3</sup> Damián E. Bikiel, Leonardo Boechi, Luciana Capece, Alejandro Crespo, Pablo M. De Biase, Santiago Di Lella, Mariano C. González Lebrero, **Marcelo A. Martí**, Alejandro D. Nadra, Laura L. Perissinotti, Damián A. Scherlis and Darío A. Estrin, **Modeling heme proteins using atomistic simulations.** *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2006** In Press.

**Publicaciones relacionadas con el tema de tesis y realizadas en el transcurso de la misma**

1. Capece L, Marti M.A, Crespo A, Doctorovich F, Estrin D.A, **Heme protein oxygen affinity regulation exerted by proximal effects.** *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 12455-61
2. Bidon-Chanal A, Marti, M.A. Crespo A. Milani M. Orozco M. Bolognesi, M. Luque, F.J, and Estrin D.A, **Ligand-induced dynamical regulation of NO conversion in *Mycobacterium Tuberculosis* truncated-hemoglobin N Proteins: Structure, Function and Bioinformatics.** **2006**, 64, 2, 457-64.
3. Marti M.A, Crespo A, Capece L, Boechi L, Bikiel D.E, Scherlis D.A, Estrin D.A. **Dioxygen affinity in heme proteins investigated by computer simulation.** *J. Inorg. Biochem.* **2006** 100, 4, 761-70.
4. Marti M.A, Bikiel D.E, Crespo A, Nardini M, Bolognesi M, Estrin D.A. **Two distinct heme distal site states define *Cerebratulus lacteus* mini-hemoglobin oxygen affinity** *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics.* **2006**, 15, 62, 641-8.
5. Marti M.A, Bari S.E, Estrin D.A, Doctorovich F, **Discrimination of Nitroxyl and Nitric Oxide by Water-Soluble Mn(III) Porphyrins** *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 13, 4680-4684.
6. Marti M.A, Capece L, Crespo A, Doctorovich F, Estrin D.A, **Nitric Oxide Interaction with Cytochrome c' and Its Relevance to Guanylate Cyclase. Why Does the Iron Histidine Bond Break?** *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 21, 7721-7728.
7. Crespo A, Martí M.A, Kalko S.G, Morreale A, Orozco M, Gelpi J.L, Luque F.J, and Estrin D.A, **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
8. Crespo A, Marti M.A, Estrin D.A, Roitberg A.E, **Multiple-Steering QM-MM Calculation of the Free Energy Profile in Chorismate Mutase** *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 19, 6940-6941.
9. Marti M.A, Crespo A, Bari S.E, Doctorovich F.A, Estrin D.A. **QM-MM Study of Nitrite Reduction by Nitrite Reductase of *Pseudomonas Aeruginosa*** *J. Phys. Chem. B*; **2004**; 108, 46, 18073-18080.



- 10. Martí M.A, Scherlis D.A Doctorovich F.A Ordejón P.A. and Estrin D.A, Modulation of NO Trans Effect in Heme Proteins: Implications in Guanylate Cyclase Activation *J. Biol. Inorg. Chem.* **2003** 6, 595-600.**
- 11. Bari S.E, Marti M.A, Amorebieta V.T, Estrin D.A, Doctorovich F. Fast nitroxyl trapping by ferric porphyrins *J. Am. Chem. Soc.* **2003** 125, 15272-3.**

## Agradecimientos

La realización de esta tesis doctoral no fue una tarea unipersonal, sino que requirió de la colaboración y participación de diversas personas, que me escucharon, aconsejaron y ayudaron a lo largo de estos 4 años. A ellos quiero expresarles mi agradecimiento y decirles que sin su colaboración nada de esto hubiera sido posible.

En primer lugar quiero agradecer especialmente a mis directores Dario y Fabio, quienes además de ser excelentes científicos son excelentes personas, y que más allá del trabajo de esta tesis me han formado científica y profesionalmente. Quienes a lo largo de estos años me han brindado todas las posibilidades y me han escuchado con infinita paciencia.

Quiero agradecer también especialmente a Sara, que aunque no figura como directora tuvo un rol decisivo al enseñarme a realizar el trabajo experimental de esta tesis y a Ernesto Marceca por ser mi consejero de estudios y de otros temas.

A Lula, Ale y Damian B, con quienes realicé gran parte del trabajo de esta tesis, y que además de ser compañeros de trabajo son amigos.

A Nano por solucionarme los problemas informáticos. A Damian S. y Adri por recibirme cuando llegué al grupo y ayudarme en mis primeros pasos. A las chicas de Doctorovich Flor, Cari, María. A Nati, especialmente por cuidar a la mush, A los Marceca's, Gus, Marcos, German y Alvaro por muy divertidos almuerzos. A Santi por hacerme reír tanto. A Ale Nadra por entenderme como biólogo. A Leo por ayudarme a encontrar nuevas maneras de explicar las cosas, para tratar de convencerlo de algo.

A Pablo, mi compañero de emociones en esto del doctorado, y Laura, a quienes les deseo muchas felicidades.

A los que se fueron incorporando, Vero, Cristian, Ezequiel, Lucas, Sebas, Nacho, Diego, Maru, Steffi, Juan y Analuz.

A todos los docentes e investigadores del DQIAyQF-INQUIMAE que directa o indirectamente contribuyeron a este trabajo y a mi formación.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.