Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Estudio del mecanismo de reacción de hemoproteínas con moléculas pequeñas de relevancia biológica

Alvarez, Lucía

2017

Este documento forma parte de las colecciones digitales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en bibliotecadigital.exactas.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the digital collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in bibliotecadigital.exactas.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Alvarez, Lucía. (2017). Estudio del mecanismo de reacción de hemoproteínas con moléculas pequeñas de relevancia biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6254_Alvarez

Cita tipo Chicago:
Alvarez, Lucía. "Estudio del mecanismo de reacción de hemoproteínas con moléculas pequeñas de relevancia biológica". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017. https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6254_Alvarez

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. **Contacto:** bibliotecadigital.exactas.uba.ar
Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física

Estudio del mecanismo de reacción de hemoproteínas con moléculas pequeñas de relevancia biológica

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

Autora

LIC. LUCÍA ÁLVAREZ

Directores de Tesis

DR. MARCELO MARTÍ
DR. FABIO DOCTOROVICH

Consejero de Estudios

DRA. MABEL TUDINO

Lugar de Trabajo

Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía
y Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

Ciudad Autónoma de Buenos Aires
Fecha de Defensa: 26 de mayo de 2017.

Todos nosotros sabemos algo.

Todos nosotros ignoramos algo.

Por eso, aprendemos siempre.

Paulo Freire

RESUMEN

Estudio del mecanismo de reacción de hemoproteínas con moléculas pequeñas de relevancia biológica

Las hemoproteínas son un conjunto ubicuo y extenso de proteínas, con una enorme diversidad funcional relacionada con la versátil reactividad del ion de hierro del grupo hemo. La gran mayoría de sus funciones biológicas involucran la unión de ligandos pequeños al metal, regulada por la identidad y dinámica de los aminoácidos de su entorno. La presente tesis tiene como objetivo aportar información microscópica acerca de los mecanismos de reacción de distintas hemoproteínas con moléculas pequeñas de relevancia biológica, como ser O_2, H_2O_2, NH_2OH e hidropersulfuros, utilizando una combinación de técnicas de simulación computacional y experimentales, que incluyen, por un lado, dinámica molecular clásica (que abarca técnicas de muestreo de múltiples réplicas) e híbridas cuántico-clásicas (para el estudio de fenómenos reactivos), y por otro espectroscopía UV-visible, cinética de reacción utilizando un equipo flujo detenido y un electrodo sensible a HNO, recientemente desarrollado por el grupo donde fue realizada la presente tesis, para el seguimiento de su producción.

En primer lugar fue estudiada —por técnicas de simulación— la unión de sustrato y el mecanismo de reacción de dos dioxigenasas hémicas, la indolamino 2,3-dioxigenasa y triptófano 2,3-dioxigenasa, mostrando cómo la dinámica de un loop flexible modula la actividad enzimática al regular la entrada/salida de sustrato. En segundo lugar, se estudió la producción de HNO debido a la peroxidación de hidroxilamina catalizada por mioglobina. Se utilizaron técnicas experimentales para caracterizar la cinética de reacción, y luego se analizó el mecanismo de reacción a través de métodos computacionales. Por último, se estudió experimentalmente la reacción de hidropersulfuros con mioglobina, mostrando la capacidad de los mismos de regular la reactividad del grupo hemo.

Palabras clave: hemoproteína, O_2, H_2O_2, NH_2OH e hidropersulfuros, dinámica molecular, QM-MM, cinética.

ABSTRACT

Study of the reaction mechanism of heme proteins with small molecules with biological relevance

The hemeproteins comprise a large group of ubiquitous proteins with a great functional diversity related to the versatile reactivity of the iron atom in the heme group. Most of their biological functions involve small ligands binding to the metal atom, regulated by the identity and the dynamics of the aminoacids present in the active site. The main goal of this work is to give microscopic information about the mechanism of reaction of different heme proteins with small molecules of biological relevance such as O_2, H_2O_2, NH_2OH, and hydropersulfides. The employed methodologies consist of both computer simulations and experimental techniques. On one hand classical molecular dynamics simulations were performed, in order to characterize flexible loop dynamics together with hybrid quantum mechanics-molecular mechanics (QM-MM) simulations that allow the analysis of reactive processes inside the protein matrix. On the other hand, experimental methods such as UV-vis were used to characterize the reaction products, and stopped-flow UV-Vis spectrophotometry to describe the reaction kinetics along with an HNO electrode to measure the HNO generation. Firstly, we studied, using computational techniques, the substrate binding and the reaction mechanism of two heme-dioxygenases, tryptophan dioxygenase (TDO) and indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO), showing how a flexible loop modulates the enzymatic activity of the protein by regulating the substrate and product entrance. Secondly, we studied the peroxidation activity of hydroxylamine catalyzed by myoglobin producing HNO. This was studied combining both experimental and computational techniques. Finally, we studied the reaction of hydropersulfides with myoglobin showing the capacity of regulation of the heme proteins by this type of compound.

Key words: hemeproteins, O_2, H_2O_2, NH_2OH, hydropersulfides, molecular dynamics, QM-MM, kinetics.

ÍNDICE GENERAL

Índice general VII

1 Introducción general 1

1.1. Hemoproteínas . . . 2

1.2. Moléculas pequeñas señalizadoras . . . 3

1.2.1. Dioxìgeno . . . 4

1.2.2. Nitroxilo . . . 5

1.2.3. Sulfuro de hidrógeno e hidropersulfuros . . . 7

1.3. Estrategia de trabajo . . . 9

1.4. Objetivos y lineamientos de esta tesis . . . 10

Referencias . . . 11

2 Metodología general 17

2.1. Métodos computacionales . . . 17

2.1.1. Modelos teóricos comúnmente utilizados . . . 17

2.1.2. Métodos de exploración de la superficie de energía potencial . . . 33

2.1.3. Análisis de las simulaciones . . . 42

2.1.4. Energía libre de unión . . . 43

2.1.5. Modelado por homología . . . 45

2.2. Métodos experimentales . . . 47

2.2.1. Espectroscopía UV-visible . . . 47

2.2.2. Cinética rápida de flujo detenido . . . 47

2.2.3. Detección electroquímica de HNO . . . 48

Referencias . . . 50

3 Dioxigenasas hémicas 55

3.1. Mecanismo de dioxigenación de la TDO humana . . . 59

3.1.1. Métodos computacionales . . . 62

3.1.2. Resultados y discusiones . . . 63

3.2. Estudio estructural de la IDO humana . . . 69

3.2.1. Métodos computacionales . . . 70

3.2.2. Métodos experimentales 74
3.2.3. Resultados y discusiones 75
3.3. Conclusiones 86
Referencias 87

4 Formación de HNO mediada por mioglobina 93
4.1. Introducción 93
4.2. Métodos experimentales 97
4.3. Métodos computacionales 99
4.4. Resultados y discusiones 100
4.4.1. Estudio cinético de la reacción de metMb con peróxido de hidrógeno 100
4.4.2. Estudio cinético de la peroxidación de la hidroxilamina 102
4.4.3. Estudio computacional de la peroxidación de hidroxilamina 105
4.4.4. Discusión 110
4.5. Conclusiones 111
Referencias 111

5 Reactividad de hidropersulfuros con mioglobina 117
5.1. Introducción 117
5.2. Métodos experimentales 119
5.3. Resultados 122
5.4. Discusión 127
5.5. Conclusiones 130
Referencias 130

6 Conclusiones generales 135
6.1. Perspectivas futuras 138
Referencias 140

A Unidades atómicas 143

B Aminoácidos 145

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

La química bioinorgánica es una rama de la química en la interfaz entre la química inorgánica y la biología. Si bien, comúnmente, los compuestos que intervienen en procesos biológicos son asociados con la química orgánica, existen numerosos elementos inorgánicos que resultan ser esenciales para la vida. Por ejemplo, el sodio cumple un rol central en la regulación de la presión osmótica en la célula, el calcio se encuentra involucrado en las vías de transducción de señales y el cobre posee una función importante en los procesos de transferencia de carga [1]. La química bioinorgánica estudia, entre otras cosas, los roles que cumplen los iones metálicos en la biología y cómo los mismos son llevados a cabo *in vivo*. Para ello, en numerosos casos, se realiza el desarrollo y estudio de complejos metálicos que mimetizan el comportamiento de sistemas bioinorgánicos. Además, un tópico activo en el campo de investigación de la química bioinorgánica es el mecanismo de acción de fármacos que incluyen metales. Otro tema de estudio de esta área es la toxicidad de especies inorgánicas. Como puede verse, la química bioinorgánica es un campo muy diverso de la química. La figura 1.1 muestra los elementos de central interés en esta área de la química.

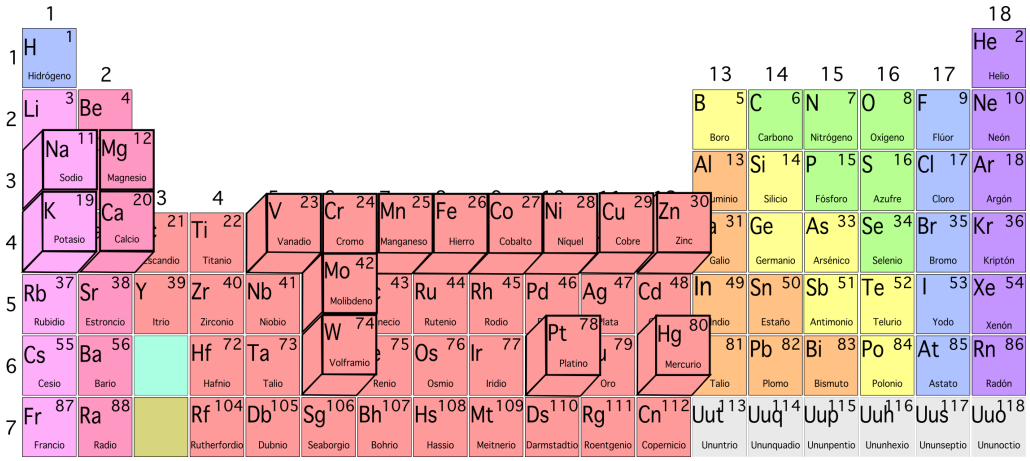


Figura 1.1: Elementos metálicos que se destacan por su implicancia biológica.

En la naturaleza, la gran mayoría de iones metálicos resultan ser cofactores de diversas proteínas, a las que se denominan metaloproteínas. En muchas de ellas, el ion metálico puede facilitar que ocurran reacciones químicas muy distintas, como es el caso del hierro en las hemoproteínas, tema central de la presente tesis.

1.1. Hemoproteínas

Las hemoproteínas poseen una porfirina de hierro como grupo prostético, denominada hemo. Existen diversos tipos de hemos, presentes en hemoproteínas, entre los cuales el tipo b, también llamado protoporfirina IX de hierro, resulta ser el más simple y abundante [2] (ver figura 1.2). El mismo posee grupos metilos en las posiciones 1, 3, 5 y 8, dos grupos propionato en las posiciones 6 y 7 y dos grupos vinilo en las posiciones 2 y 5. Los protones se encuentran presentes en las posiciones meso α, β, γ y δ. La orientación de los grupos vinilo es gobernada por factores estéricos, junto con las interacciones hidrofóbicas de los mismos con los residuos presentes en el sitio activo. Cabe destacar

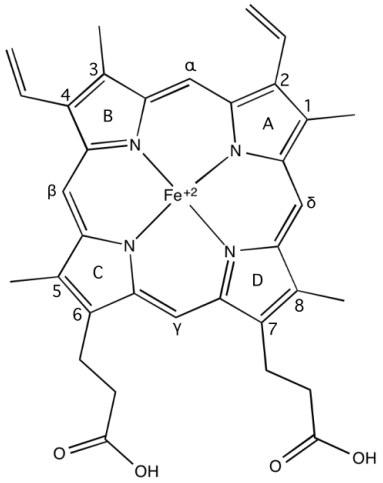


Figura 1.2: Estructura del grupo hemo b.

que, a pesar de que todas las hemoproteínas tienen en común la presencia del grupo hemo, poseen una química muy variada, con funciones que incluyen la transferencia de electrones (citocromo c [3]), la catálisis de reacciones de óxido-reducción de sustratos (catalasa [4]) y el transporte y almacenamiento de O_2 (hemoglobina y mioglobina [5, 6]). Esta gran diversidad en las funciones es reflejo de la flexibilidad química del grupo hemo, que varía sus características reactivas dependiendo del estado de oxidación del hierro, del número de coordinación del mismo, de la identidad de los ligandos y del entorno proteico.

El ion hierro en las hemoproteínas, además de encontrarse unido a cada uno de los cuatro nitrógenos de la porfirina, puede ser hexa o penta coordinado, dependiendo de la ocupación de los sitios axiales por encima y por debajo del plano porfirínico. Estos sitios son denominados distal y proximal respectivamente (ver figura 1.3). Gran parte de los estudios de hemoproteínas señalan al ligando axial como la influencia de mayor peso en la reactividad del grupo hemo [7]. En general, en las hemoproteínas el sitio proximal se encuentra ocupado por un residuo de la proteína, usualmente histidina, tirosina, cisteína o metionina que se coordinan al hierro a través del átomo de nitrógeno o de azufre, según corresponda. El sitio distal, en cambio, puede encontrarse ocupado por un residuo de la proteína o libre para la coordinación del sustrato y los residuos presentes en dicha zona son los responsables de estabilizar al ligando externo. La naturaleza de los ligandos axiales influye también en el estado de espín del ion hierro. Por ejemplo, tanto el hierro hexa o pentacoordinado con una molécula de agua dan lugar a un complejo de alto espín, mientras que la unión de O_2 o de NO en la sexta posición da lugar a complejos de bajo espín. En general, los sustratos de las hemoproteínas son moléculas pequeñas que, al unirse en el sitio activo, son simplemente almacenadas para su transporte (como en el caso de la unión de O_2 a hemoglobina), o producen cambios conformacionales de la proteína (como por ejemplo la unión de óxido nítrico a la guanilato ciclasa soluble [8]) o bien, son modificadas químicamente (por ejemplo las dioxigenasas [9]).

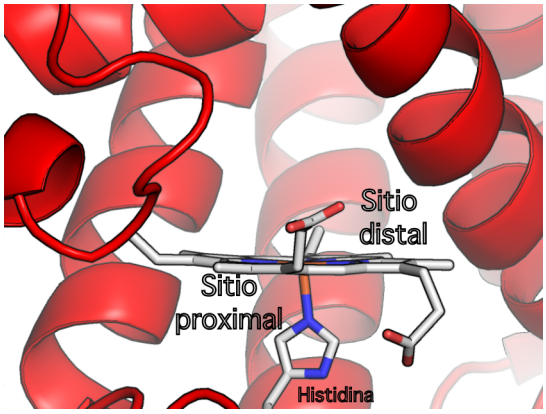


Figura 1.3: Sitio activo de la mioglobina donde se observan los sitios distal y proximal junto con la histidina proximal coordinada al hemo.

1.2. Moléculas pequeñas señalizadoras

El O_2, el NO, el CO y el H_2S, junto con especies que derivan de estas moléculas, han demostrado tener un rol importante en procesos de señalización celular y como efectores biológicos [10, 11]. Estos roles se deben a sus interacciones con proteínas en diversas formas, entre la que se destaca la

unión y reacción con hemoproteínas, tema central de la presente tesis. A continuación se ampliará la información referida a las moléculas que se estudiarán en este trabajo.

1.2.1. Dioxìgeno

El oxígeno molecular (O_2) cumple dos funciones esenciales en la vida aeróbica: ser el último aceptor de electrones en la cadena respiratoria y ser un reactivo biosintético. Las transferencias atómicas de oxígeno más importantes en biología son aquellas en las que se forma un enlace carbono-oxígeno [12]. En general, la formación de este enlace resulta exergónica. Por ejemplo, si se considera la reacción de O_2 con metano para dar metanol, el $\Delta G°$ de la misma es igual a -125,52 kJ/mol; o en el caso de la reacción de O_2 con benzeno para formar fenol, tiene un $\Delta G°$ igual a -179,92 kJ/mol. A pesar del hecho de que estas reacciones tengan una energética sumamente favorable, ninguna de ellas ocurre espontáneamente a temperatura ambiente, a no ser que haya presente un catalizador o un radical libre, que inicie la reacción. El motivo de esto reside en que, además de tener en cuenta los factores termodinámicos de la reacción, deben considerarse las barreras de activación que, en este caso, resultan ser muy altas. Esto se debe al cambio de espín durante la reacción. En el estado fundamental, la molécula de O_2 contiene dos electrones desapareados, lo que corresponde a un estado de espín triplete. En cambio, tanto los típicos sustratos biológicos, como los productos resultantes de estas reacciones, no suelen poseer electrones desapareados; por esto, su estado fundamental de espín resulta singulete. Las reacciones con intercambio de espín (de triplete a singulete), como la reacción R1, están "prohibidas" por la mecánica cuántica y, por ende, son lentas [9, 12]. El choque entre dos moléculas sucede de manera mucho más rápida que una transición de espín y, debido a ello, la reacción no puede ocurrir en un paso concertado,

$$^{3}O_2(\uparrow\uparrow) + {}^{1}X(\uparrow\downarrow) \xrightarrow{\times} {}^{1}XO_2(\uparrow\downarrow) \tag{R1}$$

En la reacción R1 las flechas representan los espines electrónicos. Es decir, $(\downarrow\uparrow)$ representa una molécula singulete con todos los electrones apareados; $(\uparrow\uparrow)$ representa una molécula triplete con dos electrones desapareados y, por último, $(\uparrow)$ representa una molécula doblete o bien un radical libre, ambos con un electrón desapareado.

En un paso elemental de reacción, la multiplicidad de espín debe mantenerse constante, mientras que la transición de espín debe pensarse como un paso elemental separado [12]. Los mecanismos de reacción que no violan la restricción de espín son muy costosos energéticamente debido a que se requiere una gran energía para la formación de un intermediario triplete (ver reacción R2); o si se plantea un mecanismo donde ocurre la reacción con el O_2 singulete (ver reacción R4)—que es más propenso a reaccionar— se requiere de una cantidad considerable de energía para invertir el espín

de triplete a singulete en la molécula de O_2 (22,5 kcal/mol) [9]. Ambos casos son esquematizados a continuación:

$$^3O_2(\uparrow\uparrow) + {}^1X(\uparrow\downarrow) \longrightarrow {}^3XO_2(\uparrow\uparrow) \tag{R2}$$

$$^3XO_2(\uparrow\uparrow) \longrightarrow {}^1XO_2(\uparrow\downarrow) \tag{R3}$$

o bien,

$$^3O_2(\uparrow\uparrow) \longrightarrow {}^1O_2(\uparrow\downarrow) \tag{R4}$$

$$^1O_2(\uparrow\downarrow) + {}^1X(\uparrow\downarrow) \longrightarrow {}^1XO_2(\uparrow\downarrow) \tag{R5}$$

Por los motivos expuestos, muchas de las enzimas que llevan a cabo oxidaciones biológicas sobrepasan la alta barrera energética en cuestión utilizando un metal de transición. Este último, en el estado de oxidación adecuado, puede reaccionar directamente con el oxígeno triplete formando aductos, que luego reaccionarán con el sustrato biológico.

Las enzimas que incorporan átomos de oxígeno a moléculas orgánicas a partir de O_2 se denominan oxigenasas. Estas enzimas se encuentran en plantas, microorganismos y animales. Las oxigenasas pueden dividirse en dos categorías: monoxigenasas y dioxigenasas, dependiendo del número de átomos de oxígeno que incorporan al sustrato [9]. En el capítulo 3 de la presente tesis, se presentarán resultados del estudio del mecanismo de reacción de dos hemoproteínas con actividad dioxigenasa: la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) y la triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO).

1.2.2. Nitroxilo

El óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) es, tal vez, el óxido de nitrógeno más famoso. Debido al descubrimiento de su diversa acción biológica y reactividad, fue considerado la “molécula del año” por la revista *Science* en 1992 [13]. Asimismo, el premio Nobel en medicina del año 1998 fue otorgado a Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro y Ferid Murad por su descubrimiento como molécula señalizadora en el sistema cardiovascular. Entre sus diversos efectos, el óxido nítrico desempeña un papel fundamental en la homeostasis vascular, la agregación plaquetaria y el proceso inflamatorio [14, 15].

Más recientemente, dentro de la familia de los óxidos de nitrógeno ha surgido el interés por la azanona (HNO), también llamada nitroxilo, debido a que es una molécula con una reactividad química muy amplia que, al igual que el $NO^{\bullet}$, ha asociada con procesos como la vasodilatación y la citotoxicidad [16]. Sin embargo, se ha encontrado que posee una actividad fisiológica distinta a la del $NO^{\bullet}$, por ejemplo si se compara la alta reactividad electrofílica del HNO con residuos que poseen

grupos tioles, dado que el NO resulta ser mucho menos reactivo [14]. Químicamente, el HNO posee un leve dipolo con el N teniendo una densidad de carga positiva junto con un par de electrones libres, lo que lo hace electrofílico y nucleofílico a la vez. La combinación de estas dos propiedades conlleva a una rápida dimerización del HNO (8 x 10^6 M^{-1} s^{-1}) [17]. El producto de esta reacción es el ácido hiponitroso (HONNOH), que rápidamente se deshidrata para dar N_2O, en condiciones normales. Esta reacción hace que el HNO no pueda almacenarse y que resulte necesario utilizar compuestos donantes que liberen HNO de manera espontánea para estudiar su reactividad. Sin embargo, el uso de estos compuestos presenta ciertas complicaciones, ya que puede ser el donante y no la molécula liberada la que ejerza o desencadene el efecto biológico. Asimismo, en general, estos compuestos liberan otros productos además del de interés que pueden ser también los que posean el efecto biológico. Debido a esto, resulta importante repetir los experimentos utilizando distintos compuestos donantes para descartar interferencias. Entre los compuestos donantes más conocidos se destaca la sal de Angeli ($Na_2N_2O_3$) debido a que es soluble en agua, su química está bien descripta y resulta fácil de sintetizar [16, 18]. Por otro lado, la alta reactividad del HNO dificulta su detección y se han realizado numerosos estudios para el desarrollo de métodos de detección adecuados [19-22]. En los últimos años, ha existido una gran controversia respecto del valor de pKa para el HNO/NO^-. El HNO tiene un estado basal singulete [23, 24], pero su anión NO^- posee un estado basal triplete [25, 26]. Esto hace que la desprotonación del HNO no sea un simple equilibrio ácido-base, sino que resulta un equilibrio lento prohibido por espín. El valor del pKa para el HNO libre publicado es igual a 11,4 [17], razón por la cual en solución acuosa neutra la forma preponderante es HNO. Para el caso del HNO coordinado fue establecido un valor de pKa de 7,7 [27]. Sin embargo, estudios recientes sugieren que el valor de pKa para la molécula coordinada es alrededor de 11 [28-31].

La coordinación del HNO formando complejos, por ejemplo con hemoproteínas, en sistemas biológicos, puede estar relacionada con sus efectos fisiológicos. La gran mayoría de los complejos de HNO reportados son con metales de transición de configuración d^6 y del tipo MNO^8 (donde 8 es el número total de electrones asociados a los orbitales d del metal, M, y/o de los orbitales π^* del NO) [28, 29, 32].

Un tópico de intensa investigación en el estudio del HNO es la posibilidad de que el mismo sea producido de forma endógena *in vivo*. Existen diversas propuestas acerca de los mecanismos de generación de HNO, aunque ninguna ha sido probada de forma definitiva. Entre ellas se destacan: la oxidación incompleta de arginina por acción de la nítrico óxido sintasa (NOS) en ausencia de la tetrahidrobiopterina [33-35]; la reducción de NO debido a la acción de la superóxido dismutasa o de xantina oxidasa o de alcoholes [36-38]; la reacción de nitrosotioles con exceso de tiol y, por último,

la peroxidación de hidroxilaminas [39]. En el cuarto capítulo de la presente tesis, se estudiará la viabilidad química de que ocurra esta última vía de formación endógena.

1.2.3. Sulfuro de hidrógeno e hidropersulfuros

Hace algunos años, el principal interés del estudio del sulfuro de hidrógeno (H_2S) en biología, se centraba en sus mecanismos de toxicidad [40]. Sin embargo, el descubrimiento de NO como una molécula señalizadora que era producida de forma endógena, generó el interés de estudiar estas cualidades en el caso de H_2S. Como resultado, se estudiaron distintos procesos fisiológicos en los cuales se descubrió que el H_2S estaba involucrado [41-45]. A pesar de esto, los mecanismos químicos a través de los cuales el H_2S lleva a cabo sus funciones, resultan mayoritariamente desconocidos. Más aún, comenzó a aparecer evidencia creciente de que los hidropersulfuros (RSSH)[1], que fueron encontrados en tejido mamario, células y plasma a niveles significativos y mostraron poseer propiedades químicas y biológicas únicas [46], eran las moléculas efectoras, en lugar del H_2S [46]. Sin embargo, aún está la pregunta abierta de cómo los RSSH llevan a cabo sus reacciones y cómo éstas derivan en efectos biológicos. Resulta importante mencionar que el H_2S y los RSSH están químicamente relacionados, ya que hay un proceso reversible que los conecta.

$$\mathrm{RSSR'} + \mathrm{H_2S} \rightleftharpoons \mathrm{RSSH} + \mathrm{R'SH} \tag{R6}$$

Esto quiere decir que si existe H_2S en un sistema biológico (donde existen compuestos disulfuros) es extramadamente probable que haya también RSSH y viceversa [47]. Este hecho hace que la actividad atribuida al H_2S pueda corresponder en realidad a la formación de RSSH.

Por otro lado, la existencia de RSSH en sistemas biológicos puede proveer la generación de polisulfuros, que han sido detectados en sistemas mamíferos y que presentan a su vez propiedades químicas y biológicas importantes. Por ejemplo, la reacción de un dialquiltrisulfuro con un tiol resulta en una reacción de sustitución que da lugar a un hidropersulfuro y un dialquildisulfuro (como en la reacción R7).

$$\mathrm{RSSSR} + \mathrm{R'SH} \rightleftharpoons \mathrm{RSSH} + \mathrm{R'SSR} \tag{R7}$$

Existen diversas vías de generación de RSSH en células. La enzima rodanesa y la 3-mercaptopiruvato sulfo transferasa extraen un átomo de azufre de un tiosulfato generando una enzima con hidropersulfuro [48]. Por otro lado, la enzima cistationina γ-liasa y la cistationina β-sintasa generan RSSH libres a partir de cistinas [46, 49, 50].

[1] En la presente tesis se utilizará el término hidropersulfuro para referirse tanto a la especie protonada como a la desprotonada, salvo que sea indicado específicamente.

Podría esperarse que la química de los RSSH fuera similar a la de los tioles (RSH), ya que sólo difieren en la presencia de un átomo de azufre adicional. Sin embargo, esta pequeña diferencia produce grandes cambios en la química de estos compuestos. Por ejemplo, numerosos estudios demuestran que los hidropersulfuros son más nucleofílicos que los tioles correspondientes [46, 51]. Esta diferencia se debe a la presencia de un par de electrones libres en el átomo adyacente al azufre en cuestión, lo cual produce cambios en la estabilización del estado de transición o la desestabilización del estado fundamental. En cuanto a la química redox, se sabe que el valor del potencial de reducción para la cupla $RS^{\cdot}/RS^{-}$ a pH 7 es de 0,92 V [52], lo cual indica que el radical $RS^{\cdot}$ es un buen oxidante. En contraposición, en el caso de la cupla $RSS^{\cdot}/RSS^{-}$, si bien hay menos información, se ha demostrado que los radicales pertilo ($RSS^{\cdot}$) son mejores reductores [53, 54]. Esto puede deberse a una mayor estabilidad del radical pertilo, debida a la delocalización del radical libre entre los dos átomos de azufre (ver figura 1.4). Un ejemplo de la diferencia de estabilidad es que el radical $RS^{\cdot}$ reacciona con

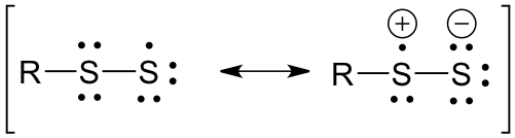


Figura 1.4: Resonancia del radical pertilo.

O_2, mientras que el radical $RSS^{\cdot}$ no [55]. Asimismo, la oxidación por dos electrones de los tioles ha sido bien caracterizada y el hecho de que ocurra puede alterar la función de diversas proteínas [56]. En el caso de los hidropersulfuros, poco se conoce acerca de la oxidación por dos electrones, pero podría esperarse que fueran buenas especies reductoras. Cabe destacar que los hidropersulfuros son especies oxidadas con respecto a los tioles (considerando que el estado de oxidación del átomo de azufre es -2 en los tioles, mientras que es -1 en cada átomo en el caso de los hidropersulfururos). Esta característica puede resultar importante a la hora de considerar su función biológica, dado que la oxidación de tioles a hidropersulfuros resulta en la generación de una especie con un mayor poder reductor. Por último, a diferencia de los RSH, los RSSH pueden ser, además, moléculas electrofílicas cuando se encuentran protonadas. De forma similar a los disulfuros (RSSR), los RSSH reaccionan con nucleófilos blandos ocurriendo la ruptura del enlace S-S [53]. La ruptura nucleofílica del enlace RSSR puede suceder en cualquiera de los átomos de azufre, lo que está determinado tanto por factores estéricos como electrónicos [57].

Teniendo estos factores en cuenta, puede ahora pensarse en la funcionalidad biológica de los hidropersulfuros. Por un lado, los RSSH pueden ser considerados especies de azufre activadas, ya que son mejores nucleófilos y reductores en comparación a los tioles. Además, pueden ser electrófilos, que

es una característica que no poseen los tioles. Por otro lado, está la propuesta de que la generación de un RSSH en proteínas con tioles proteja a dichos tioles de una oxidación irreversible o de una modificación electrofílica [58-61]. Esto se debe a que, al tener los RSSH dos átomos de azufre, uno de ellos sea un átomo de sacrificio, que luego de ser modificado pueda ser reducido convirtiéndose así nuevamente en un tiol con su actividad biológica. En el contexto de esta tesis, resulta interesante responder cómo es el mecanismo de reacción de los RSSH con las hemoproteínas. Este tema se abordará en el quinto capítulo.

1.3. Estrategia de trabajo

Existen numerosos abordajes a la hora de responder una pregunta tan compleja como la de cómo funcionan las hemoproteínas. Entre ellos se puede recurrir a la división del problema desde lo más simple hacia lo más complejo. Por ejemplo, primero buscando comprender la reactividad característica del grupo hemo aislado. Esto se logra, generalmente, estudiando sistemas miméticos como pueden ser las porfirinas de hierro que, al variar los sustituyentes del anillo, la coordinación y el estado de oxidación del centro metálico, cambian sus propiedades químicas. Luego, se continúa el estudio analizando las mismas reacciones para el caso de las proteínas en solución. De esta manera, comparando los resultados obtenidos con los de las porfirinas aisladas, puede tenerse una mayor comprensión de la forma en que la matriz proteica modula la reactividad del grupo hemo con la finalidad de que la proteína lleve a cabo su función. Posteriormente, siempre que sea posible, puede extenderse el estudio en células y/o en sistemas *in vivo*. La presente tesis se centrará únicamente en el estudio de la reactividad de ciertas hemoproteínas analizando los resultados obtenidos considerando la información disponible acerca de la reactividad de sistemas miméticos aislados y de la proteína en un entorno celular. Para lograr una mayor comprensión de los mecanismos de reacción se combinarán técnicas experimentales con técnicas computacionales, siempre que sea posible.

En el caso de las hemoproteínas, para el estudio de las reacciones en solución, resulta una herramienta muy útil el uso de la espectroscopía UV-visible debido a que las mismas poseen un espectro muy característico, dominado por bandas correspondientes a transiciones electrónicas de los ligandos. La banda más intensa, con una absortividad molar (ϵ) de entre 1-2 x 10^5 $M^{-1}cm^{-1}$, se encuentra a alrededor de 400 nm y corresponde a una transición $\pi - \pi^*$ del grupo hemo. Dicha banda es denominada banda de Soret. Alrededor de 500-600 nm se tienen, además, dos bandas de menor intensidad ($\epsilon \sim$ 1-1,5 x10^4 $M^{-1}cm^{-1}$), denominadas bandas Q. Por último, cuando el grupo hemo presenta un átomo de azufre unido al anillo, se tiene una banda entre 600−800 nm correspondiente a una transferencia de carga y posee una intensidad menor ($\epsilon \sim 10^4$ $M^{-1}cm^{-1}$). Debido a esto la espectroscopía UV-vis es una

técnica ampliamente utilizada en el estudio de las hemoproteínas y, en particular, en la presente tesis para una caracterización de la reactividad y de las cinéticas de reacción. Asimismo, para caracterizar los productos de reacción, se recurrió a una técnica electroquímica que permite la detección de HNO (utilizando un electrodo desarrollado por el grupo donde se realizó la presente tesis).

Sin embargo, en muchos casos la información obtenida mediante técnicas experimentales no proveee detalles microscópicos de cómo ocurre la reacción en hemoproteínas, razón por la cual se recurre a los métodos computacionales. Existen dos grandes grupos de técnicas de simulación: las basadas en la mecánica clásica y las que se basan en la mecánica cuántica. Según el tipo de pregunta que se busca responder resulta necesario recurrir a uno u otro tipo de método y la clave para que la pregunta sea contestada correctamente es saber en qué caso se utiliza cada método. Resulta importante tener en mente que mediante los métodos clásicos se pueden analizar las características dinámicas de la proteína (cambios conformacionales entre otras), pero no sirven para el estudio de procesos que involucren cambios químicos. Para ello resulta necesario recurrir a los métodos cuánticos, que no sólo pueden describir reacciones, sino que también sirven para predecir la geometría esperada para un complejo de acuerdo a su estado de oxidación y de espín y para conocer las energías de unión. Cabe destacar que los métodos cuánticos resultan ser muy costosos computacionalmente, razón por la cual se pueden utilizar para un acotado número de átomos. Sin embargo, como fue mencionado anteriormente, a la hora de estudiar la reactividad de una proteína, la matriz proteica cumple un rol muy importante en la modulación de la reactividad química del grupo hemo. Debido a ello, resulta necesario incluirla en los cálculos que involucran reacciones. Con el objetivo de sortear este problema se utilizan métodos híbridos cuántico-clásicos (quantum mechanical-molecular mechanics, QM-MM) para el estudio de la reactividad de las proteínas en los cuales los residuos involucrados directamente en la reacción son tratados cuánticamente, mientras que el resto de la proteína y el solvente se trata de forma clásica. La combinación de los distintos métodos computacionales con las técnicas experimentales potencia el estudio de la reactividad de las hemoproteínas, dado que permite caracterizar las bases moleculares que dan origen a una reacción dada.

1.4. Objetivos y lineamientos de esta tesis

Este trabajo intenta describir a nivel molecular los mecanismos de reacción de distintas hemoproteínas con diferentes moléculas pequeñas. Por un lado, se estudiaron dos dioxigenasas hémicas, la indolamino y triptófano 2,3-dioxigenasa, prestando especial atención en las bases moleculares de la reacción de la triptófano 2,3-dioxigenasa con triptófano para dar N-formilquinurenina y las diferencias que existen con la proteína análoga de bacteria. Además, se realizó un estudio estructural de la indo-

lamino 2,3-dioxigenasa, cuya estructura no ha sido completamente dilucidada experimentalmente. Estos resultados se presentan en el tercer capítulo de la presente tesis.

Por otro lado, se realizó el estudio de la reactividad de la mioglobina con hidroxilaminas e hidropersulfuros, lo que puede dar lugar a diversas funciones de dicha proteína que las comúnmente conocidas. Específicamente, se estudió cómo la mioglobina puede llevar a cabo reacciones de peroxidación de hidroxilaminas, tema que será presentado en el cuarto capítulo de la presente tesis, y la reacción de la mioglobina con hidropersulfuros, cuyos resultados serán presentados en el quinto capítulo.

A lo largo de la presente tesis se utilizaron diversas técnicas que permiten la caracterización de los distintos productos de reacción y de sus parámetros cinéticos. Además, la extensa variedad de métodos computacionales utilizados posibilita estudiar desde fenómenos asociados a la dinámica proteica, que permiten un amplio muestreo del espacio conformacional, a métodos cuánticos que a través de una descripción electrónica detallada del sistema permiten el estudio de la reactividad del mismo.

En el próximo capítulo se presentan los fundamentos teóricos de las metodologías utilizadas. Los resultados obtenidos se presentan en tres capítulos. En cada uno de ellos, se decidió incluir una introducción en la que se desarrolla una descripción de los antecedentes más relevantes del sistema en cuestión y una sección de metodología específica. Luego, se desarrollan los resultados y, finalmente, se incluyen las conclusiones.

Referencias

1. Lippard, S. y Berg, J. M. *Principles of Bioinorganic Chemistry* **2,** 4, 5, 131-132 (1995).
2. Smith, K. M. y Guilard, R. *Contents of Volumes 1–20 A2 - Kadish, Karl M.* (eds. Smith, K. M. y Guilard, R.) Amsterdam, 2003.
3. Simonneaux, G. y Bondon, A. Mechanism of Electron Transfer in Heme Proteins and Models: The NMR Approach. *Chemical Reviews* **105,** 2627-2646 (2005).
4. Nicholls, P., Fita, I. y Loewen, P. C. Enzymology and structure of catalases. *Advances in Inorganic Chemistry* **51,** 51-106 (2000).
5. Olson, J. S. y Phillips Jr., G. N. Myoglobin discriminates between O2, NO, and CO by electrostatic interactions with the bound ligand. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2,** 544-552 (1997).
6. Perutz, M. F., Fermi, G., Luisi, B., Shaanan, B. y Liddington, R. C. Stereochemistry of cooperative mechanisms in hemoglobin. *Accounts of Chemical Research* **20,** 309-321 (1987).

7. Stanford, M. A., Swartz, J. C., Phillips, T. E. y Hoffman, B. M. Electronic control of ferroporphyrin ligand-binding kinetics. *Journal of the American Chemical Society* **102,** 4492-4499 (1980).

8. Underbakke, E. S. *y col.* Nitric Oxide-Induced Conformational Changes in Soluble Guanylate Cyclase. *Structure* **22,** 602-611 (2014).

9. Sono, M., Roach, M. P., Coulter, E. D. y Dawson, J. H. Heme-Containing Oxygenases. *Chemical Reviews* **96,** 2841-2888 (1996).

10. Pryor, W. A. *y col.* Free radical biology and medicine: its a gas, man! *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **291,** R491 LP -R511 (2006).

11. Kashiba, M., Kajimura, M., Goda, N. y Suematsu, M. From O2 to H2S: a landscape view of gas biology. *The Keio Journal of Medicine* **51,** 1-10 (2002).

12. Bertini, I., Gray, H. B., Stiefel, E. I. y Valentine, J. S. *Biological inorganic chemistry : structure and reactivity* 130, 176 (2007).

13. Koshland, D. E. The molecule of the year. *Science* **258,** 1861 LP -1861 (1992).

14. Irvine, J. C. *y col.* Nitroxyl (HNO): the Cinderella of the nitric oxide story. *Trends in Pharmacological Sciences* **29,** 601-608 (2008).

15. Bari, S. E. y Olabe, J. A. *Gasotransmitters in Plants. The Rise of a New Paradigm in Cell Signalling* 289-327 (Springer, 2016).

16. Miranda, K. The chemistry of nitroxyl (HNO) and implications in biology. *Coordination Chemistry Reviews* **249,** 433-455 (2005).

17. Shafirovich, V. y Lymar, S. V. Nitroxyl and its anion in aqueous solutions: spin states, protic equilibria, and reactivities toward oxygen and nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99,** 7340-5 (2002).

18. Basudhar, D., Bharadwaj, G., Salmon, D. J. y Miranda, K. M. *The Chemistry and Biology of Nitroxyl (HNO)* (eds. Doctorovich, F., Farmer, P. J. y Marti, M. A.) 11-36 (Elsevier, Boston, 2017).

19. Ren, M., Dong, B. y Lin, W. *The Chemistry and Biology of Nitroxyl (HNO)* (eds. Doctorovich, F., Farmer, P. J. y Marti, M. A.) 207-224 (Elsevier, Boston, 2017).

20. Suarez, S. A., Morales Vásquez, M. A., Hamer, M. y Doctorovich, F. *The Chemistry and Biology of Nitroxyl (HNO)* (eds. Doctorovich, F., Farmer, P. J. y Marti, M. A.) 53-65 (Elsevier, Boston, 2017).

21. Chavez, T. A. y Toscano, J. P. *The Chemistry and Biology of Nitroxyl (HNO)* (eds. Doctorovich, F., Farmer, P. J. y Marti, M. A.) 255-267 (Elsevier, Boston, 2017).

22. Miao, Z. y Bruce King, S. *The Chemistry and Biology of Nitroxyl (HNO)* (eds. Doctorovich, F., Farmer, P. J. y Marti, M. A.) 225-238 (Elsevier, Boston, 2017).

23. Walsh, A. D. 468. The electronic orbitals, shapes, and spectra of polyatomic molecules. Part III. HAB and HAAH molecules. *Journal of the Chemical Society (Resumed),* 2288-2296 (1953).

24. Orgel, L. E. 255. The electronic structures and spectra of some molecules related to oxygen. *Journal of the Chemical Society (Resumed),* 1276-1278 (1953).

25. Noble, J. T. y J, C. Low-energy electron scattering by the NO molecule. *Journal of Physics B: Atomic and Molecular Physics* **19,** 4025 (1986).

26. Maciag, C. S. y K. Total cross section for electron impact on nitrogen monoxide. *Journal of Physics B: Atomic, Molecular and Optical Physics* **24,** 4273 (1991).

27. Montenegro, A. C. *y col.* Three Redox States of Nitrosyl: NO+, NO., and NO-/HNO Interconvert Reversibly on the Same Pentacyanoferrate(II) Platform. *Angewandte Chemie International Edition* **48,** 4213-4216 (2009).

28. Farmer, P. J. y Sulc, F. Coordination chemistry of the HNO ligand with hemes and synthetic coordination complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry* **99,** 166-184 (2005).

29. Kumar, M. R., Fukuto, J. M., Miranda, K. M. y Farmer, P. J. Reactions of HNO with Heme Proteins: New Routes to HNO-Heme Complexes and Insight into Physiological Effects. *Inorganic Chemistry* **49,** 6283-6292 (2010).

30. Codesido, N. O., Weyhermüller, T., Olabe, J. A. y Slep, L. D. Nitrosyl-Centered Redox and Acid–Base Interconversions in [Ru(Me3[9]aneN3)(bpy)(NO)]3,2,1+. The pKa of HNO for its Nitroxyl Derivative in Aqueous Solution. *Inorganic Chemistry* **53,** 981-997 (2014).

31. Gao, Y., Toubaei, A., Kong, X. y Wu, G. Acidity and Hydrogen Exchange Dynamics of Iron(II)-Bound Nitroxyl in Aqueous Solution. *Angewandte Chemie International Edition* **53,** 11547-11551 (2014).

32. Escola, N., Bikiel, D. E., Baggio, R., Di Salvo, F. y Doctorovich, F. NO+, NO, NO-! Nitrosyl siblings from [IrCl5(NO)]-. *Inorganica Chimica Acta* **374,** 528-539 (2011).

33. Fukuto, J. M., Wallace, G. C., Hszieh, R. y Chaudhuri, G. Chemical oxidation of N-hydroxyguanidine compounds. *Biochemical Pharmacology* **43,** 607-613 (1992).

34. Tantillo, D. J., Fukuto, J. M., Hoffman, B. M., Silverman, R. B. y Houk, K. N. Theoretical Studies on NG-Hydroxy-l-arginine and Derived Radicals:Implications for the Mechanism of Nitric Oxide Synthase. *Journal of the American Chemical Society* **122,** 536-537 (2000).

35. Adak, S., Wang, Q. y Stuehr, D. J. Arginine conversion to nitroxide by tetrahydrobiopterin-free neuronal nitric-oxide synthase: Implications for mechanism. *Journal of Biological Chemistry* **275,** 33554-33561 (2000).

36. Saleem, M. y Ohshima, H. Xanthine oxidase converts nitric oxide to nitroxyl that inactivates the enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **315,** 455-462 (2004).

37. Niketić, V., Stojanović, S., Nikolić, A., Spasić, M. y Michelson, A. M. Exposure of Mn and FeSODs, but not Cu/ZnSOD, to NO leads to nitrosonium and nitroxyl ions generation which cause enzyme modification and inactivation: an in vitro study. *Free Radical Biology and Medicine* **27,** 992-996 (1999).

38. Suarez, S. a. *y col.* Nitric Oxide Is Reduced to HNO by Proton-Coupled Nucleophilic Attack by Ascorbate, Tyrosine, and Other Alcohols. A New Route to HNO in Biological Media? *Journal of the American Chemical Society* **137,** 4720-4727 (2015).

39. Donzelli, S. *y col.* Generation of nitroxyl by heme protein-mediated peroxidation of hydroxylamine but not N-hydroxy-L-arginine. *Free Radical Biology and Medicine* **45,** 578-584 (2008).

40. Reiffenstein, R. J., Hulbert, W. C. y Roth, S. H. Toxicology of Hydrogen Sulfide. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **32,** 109-134 (1992).

41. Yang, G. *y col.* Hydrogen Sulfide Protects Against Cellular Senescence via S-Sulfhydration of Keap1 and Activation of Nrf2. *Antioxidants & redox signaling* **18,** 1906-1919 (2013).

42. Hellmich, M. R. y Szabo, C. Hydrogen sulfide and cancer. *Handbook of Experimental Pharmacology* **230,** 233-241 (2015).

43. Yuvaniyama, P., Agar, J. N., Cash, V. L., Johnson, M. K. y Dean, D. R. NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97,** 599-604 (2000).

44. Mueller, E. G. Trafficking in persulfides: delivering sulfur in biosynthetic pathways. *Nature Chemical Biology* **2,** 185-194 (2006).

45. Abe, K. y Kimura, H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *The Journal of Neuroscience* **16,** 1066-1071 (1996).

46. Winterbourn, C. C. y Hampton, M. B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **45,** 549-561 (2008).

47. Francoleon, N. E., Carrington, S. J. y Fukuto, J. M. The reaction of H2S with oxidized thiols: Generation of persulfides and implications to H2S biology. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **516,** 146-153 (2011).

48. Cipollone, R., Ascenzi, P. y Visca, P. Common themes and variations in the rhodanese superfamily. *IUBMB life* **59,** 51-59 (2007).

49. Cavallini, D., de Marco, C. y Mondovi, B. Cleavage of cystine by a pyridoxal model. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **87,** 281-288 (1960).

50. Yamanishi, T. y Tuboi, S. The Mechanism of the L-Cystine Cleavage Reaction Catalyzed by Rat Liver gamma;-Cystathionase. *The Journal of Biochemistry* **89,** 1913-1921 (1981).

51. Cuevasanta, E. *y col.* Reaction of hydrogen sulfide with disulfide and sulfenic acid to form the strongly nucleophilic persulfide. *Journal of Biological Chemistry* **290,** 26866-26880 (2015).

52. Buettner, G. *The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, alpha-Tocopherol, and Ascorbate Archives of Biochemistry and Biophysics* **300** (1993), 535-543.

53. Saund, S. S. *y col.* The chemical biology of hydropersulfides (RSSH): Chemical stability, reactivity and redox roles. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **588,** 15-24 (2015).

54. Everett, S. A. y Wardman, P. *Biothiols Part A Monothiols and Dithiols, Protein Thiols, and Thiyl Radicals* (eds. Abelson, J. y Simon, M.) 55-69 (1995).

55. Bianco, C. L. *y col.* The chemical biology of the persulfide (RSSH)/perthiyl (RSS) redox couple and possible role in biological redox signaling. *Free Radical Biology and Medicine* **101,** 20-31 (2016).

56. Paulsen, C. E. y Carroll, K. S. Cysteine-Mediated Redox Signaling: Chemistry, Biology, and Tools for Discovery. *Chemical Reviews* **113,** 4633-4679 (2013).

57. Parker, A. J. y Kharasch, N. The Scission Of The Sulfur-Sulfur Bond. *Chemical Reviews* **59,** 583-628 (1959).

58. Millikin, R. *y col.* The chemical biology of protein hydropersulfides: Studies of a possible protective function of biological hydropersulfide generation. *Free Radical Biology and Medicine* **97,** 136-147 (2016).

59. Shibata, A. *y col.* Human serum albumin hydropersulfide is a potent reactive oxygen species scavenger in oxidative stress conditions such as chronic kidney disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **479,** 578-583 (2016).

60. Greiner, R. *y col.* Polysulfides link H2S to protein thiol oxidation. *Antioxidants & redox signaling* **19,** 1749-65 (2013).

61. Dalle-Donne, I. *y col.* Molecular mechanisms and potential clinical significance of S-glutathionylation. *Antioxidants & redox signaling* **10,** 445-473 (2008).

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA GENERAL

La combinación de técnicas experimentales y computacionales enriquece la información que puede ser obtenida a la hora de responder una pregunta química. Es por esto que en la presente tesis fueron utilizados ambos enfoques, con el objetivo de tener un mayor entendimiento de cómo las hemoproteínas llevan a cabo su función. Este capítulo se centrará en la descripción teórica de los principales métodos utilizados.

2.1. Métodos computacionales

El término simulación computacional se refiere al cómputo de una serie de cálculos numéricos con una computadora, cuyo objetivo es estudiar la evolución y propiedades del sistema de interés, en un marco teórico preestablecido. En el área de la química, la simulación computacional es utilizada para predecir el comportamiento termodinámico y cinético a partir de las interacciones interatómicas. Además del poder predictivo, la simulación computacional, en química, permite estudiar el comportamiento de los sistemas a un nivel atomístico, aportando información microscópica que no siempre puede ser abordada desde un punto de vista experimental. Existen dos componentes cruciales en una simulación computacional: los modelos más habituales para describir las interacciones entre los átomos presentes en los sistemas químicos y, en segundo lugar, las diversas estrategias que se utilizan para obtener información relevante.

2.1.1. Modelos teóricos comúnmente utilizados

Como fue mencionado en la introducción, existen diversos modelos teóricos para describir las interacciones entre átomos: los basados en la mecánica clásica, los que se basan en la mecánica cuántica y los modelos multiescala. Dichos modelos describen al sistema con distinto grado de detalle que, según el interrogante que se desee responder, resulta necesario recurrir a una u otra estrategia.

Los modelos basados en la mecánica cuántica son los que predicen las interacciones químicas de manera más exitosa. Sin embargo, resulta imposible la utilización de este método para el estudio de sistemas con miles de átomos (como por ejemplo una proteína) no sólo por el tiempo de cómputo, sino también debido a que muchos resultados que se obtienen presentan errores asociados, que dependen fuertemente del tamaño del sistema.

En contraposición, los modelos basados en la mecánica clásica son utilizados en macromoléculas y tienen la ventaja de que los tiempos de cómputo asociados permiten la observación de eventos temporales del orden de los nano o microsegundos. Sin embargo, debido a que no describen los electrones de forma explícita, no pueden describir procesos en los que haya formación o ruptura de enlaces químicos o cambios en el estado de espín. Debido a esto se han desarrollado los métodos multi-escala cuántico-clásicos (métodos híbridos), los cuales aprovechan las ventajas de cada método. En el caso de los métodos híbridos cuántico-clásicos (QM-MM), se permite la formación y ruptura de enlaces químicos en la porción reactiva del sistema (la cual es considerada bajo un modelo cuántico) y se puede observar la dinámica en el resto de la proteína.

2.1.1.1. Métodos basados en la Mecánica Cuántica

El primer postulado de la mecánica cuántica establece que el estado del sistema está completamente determinado por la función de onda del mismo, $\psi(r,t)$, la cual depende de la coordenada (r) y del tiempo (t). Toda la información posible acerca de este sistema puede extraerse de dicha función (solamente resulta válido para sistemas cuánticos no relativistas), la cual se obtiene de la resolución de la ecuación de Schrödinger dependiente del tiempo:

$$\left\{-\frac{\hbar^2}{2m}\nabla^2 + V\right\}\Psi(r,t) = i\hbar\frac{\partial\Psi(r,t)}{\partial t}, \tag{2.1}$$

donde m es la masa de la partícula, V es la función de energía potencial del sistema, $\hbar$ es la constante de Planck dividido por 2π, i es la raíz cuadrada de -1 y ∇^2 es el operador Laplaciano. Cuando el potencial es independiente del tiempo, la función de onda puede escribirse como el producto de una función espacial y otra temporal: $\Psi(r,t) = \psi(r)T(t)$, lo cual permite utilizar la ecuación de Schrödinger en la forma independiente del tiempo:

$$\left\{-\frac{\hbar^2}{2m}\nabla^2 + V\right\}\Psi(r) = E\Psi(r), \tag{2.2}$$

donde E es la energía de la partícula. Si, además, se define el operador Hamiltoniano como:

$$\hat{H} = -\frac{\hbar^2}{2m}\nabla^2 + V, \tag{2.3}$$

la ecuación 2.2 queda reducida a:

$$\hat{H}\Psi(r) = E\Psi(r). \tag{2.4}$$

La ecuación 2.4 se trata de una ecuación de autovalores en la que ψ son los autovectores y E los autovalores. Por lo tanto, para resolver la ecuación de Schrödinger, resulta necesario encontrar el conjunto de autovectores y autovalores asociados que satisfacen la misma. Sin embargo, sólo puede ser resuelta de forma exacta para unos pocos sistemas, como son el átomo de hidrógeno y moléculas diatómicas monoelectrónicas. Debido a esto, en el caso de sistemas moleculares complejos se recurre a distintas aproximaciones.

Si se considera a los núcleos y a los electrones como masas puntuales y, además, se desprecian las interacciones espín-órbita [1] y otros efectos relativistas, el Hamiltoniano para una molécula de M núcleos y N electrones resulta ser, en unidades atómicas [2]:

$$\hat{H} = -\frac{1}{2}\sum_{i=1}^{N}\nabla_i^2 - \frac{1}{2}\sum_{A=1}^{M}\frac{1}{m_A}\nabla_A^2 - \sum_{i=1}^{N}\sum_{A=1}^{M}\frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^{N}\sum_{j>1}^{N}\frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A=1}^{M}\sum_{B>A}^{M}\frac{Z_A Z_B}{R_{AB}}, \tag{2.5}$$

donde i, j denotan los electrones, A y B los núcleos, los valores de Z y m corresponden a las cargas y a las masa de los núcleos respectivamente, r_{iA}, r_{ij} y R_{AB} representan las distancias electrón-núcleo, electrón-electrón y núcleo-núcleo. Los primeros dos términos corresponden a los operadores energía cinética de los electrones y los núcleos respectivamente, mientras que los últimos tres constituyen el operador energía potencial, $\hat{V}$. El mismo es la suma de la interacción Coulómbica atractiva entre los núcleos y los electrones (tercer término), la interacción repulsiva entre los electrones (cuarto término) y, por último, la repulsión entre las cargas de los núcleos.

Con la finalidad de simplificar la ecuación de Schrödinger, puede desacoplarse el movimiento de los electrones del de los núcleos (aproximación de Born-Oppenheimer). Con esta consideración, la función de onda de todo el sistema puede ser escrita de la siguiente forma:

$$\Psi_{total}(\text{núcleos, electrones}) = \Psi(\text{núcleos})\Psi(\text{electrones}), \tag{2.6}$$

siendo la energía total del sistema equivalente a la suma de la energía nuclear y la energía electrónica. Esto puede suponerse debido a que las masas de los núcleos son mucho mayores que las de los electrones, por lo que los electrones pueden acomodarse de forma instantánea a cualquier cambio en la posición de los núcleos. Entonces, bajo esta aproximación, la función de onda electrónica depende solamente de la posición de los núcleos y no de sus momentos (es decir, se considera que los núcleos están fijos). Con esta consideración se desprecia el término energía cinética de los núcleos y el término de repulsión núcleo-núcleo se vuelve constante. De esta forma, el problema queda ahora reducido a

[1] El acoplamiento espín-orbita representa la interacción del momento magnético asociado al espín de un electrón con el campo magnético generado por el electrón en movimiento

[2] La unidad de masa es la masa del electrón m_e; la unidad de carga es la carga del protón e y la unidad del momento angular es $\hbar$. Esto simplifica la expresión del Hamiltoniano. Las unidades de energía utilizadas son Hartree y las de longitud Bohr. En el apéndice A se presenta una tabla con las unidades atómicas.

obtener la función de onda para el operador Hamiltoniano electrónico:

$$\hat{H}_{el} = \sum_{i=1}^{N} \frac{1}{2}\nabla^2 - \sum_{i=1}^{N}\sum_{A=1}^{M} \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^{N}\sum_{j>1}^{N} \frac{1}{r_{ij}}, \tag{2.7}$$

donde el primer término representa la energía cinética electrónica, el segundo es el potencial asociado a la interacción electrón-núcleo y el tercero es el potencial de la interacción electrón-electrón. Para cada nueva posición de los núcleos, la ecuación de Schrödinger se vuelve a resolver considerando únicamente a los electrones en el campo producido por los núcleos. A pesar de que el problema está simplificado, aún resulta difícil resolverlo. Existen distintas metodologías para su resolución algunas de las cuales serán descriptas en este capítulo. [1]

El método de Hartree

El método de Hartree [2] consiste en considerar al $\hat{H}_{el}$ como suma de Hamiltonianos monelectrónicos con una interacción interelectrónica de campo medio, es decir:

$$\hat{H}_{el} = \sum_{i=1}^{N} \hat{h}_i. \tag{2.8}$$

En esta propuesta se asume que el campo electrostático, sentido por un electrón en un átomo, es debido al potencial del núcleo junto con un campo producido por los otros electrones, que es considerado en forma promediada en el espacio. Cada hamiltoniano monoelectrónico, $\hat{h}_i$, tendrá su propio conjunto de autovalores ϵ_i y autovectores χ_i, llamados espín-orbitales, los cuales incluyen tanto la coordenada espacial, como la de espín en la función de onda, siendo la función de onda el producto de las funciones de onda monoelectrónicas, lo que se denomina producto de Hartree:

$$\Psi H^H(x_1, x_2, ..., x_N) = \chi_i(x_1)\chi_j(x_2)...\chi_k(x_N) \tag{2.9}$$

Teorema variacional

Si se considera un estado fundamental descripto por una función de onda ψ_0 y una energía E_0 que satisface la ecuación de Schrödinger:

$$\hat{H}\psi_0 = E_0\psi_0 \tag{2.10}$$

a la cual se la multiplica por la función conjugada, ψ_0^*, y luego se la integra sobre todo el espacio, se obtiene:

$$E_0 = \int \psi_0^* \hat{H}\psi_0 d\tau \tag{2.11}$$

donde dτ representa un diferencial de volumen.

El teorema variacional establece que si se sustituye la función ψ_0 por una función de prueba ϕ en 2.11 y se calcula la energía correspondiente de acuerdo a:

$$E_\phi = \frac{\int \phi^* \hat{H}\phi d\tau}{\int \phi^* \phi d\tau} \tag{2.12}$$

entonces se obtiene la siguiente desigualdad:

$$E_\phi \geq E_0. \tag{2.13}$$

Mientras mayor sea la similitud entre ϕ y ψ, más cercana resultará Eϕ a E$_0$. Entonces, resulta clave encontrar la función de prueba ϕ que minimice la energía del sistema. Para ello es muy común expandir la función de prueba de la siguiente forma:

$$\phi = \sum_{j=1}^{N} c_j f_j \tag{2.14}$$

donde c_j son los parámetros variacionales y f_j corresponden a las funciones de base elegidas. Una cuestión a tener en cuenta es que los parámetros variacionales deben estar normalizados:

$$\sum_{i=1} c_i^2 = 1. \tag{2.15}$$

Por lo tanto, la minimización de la energía debe realizarse con esa restricción, para lo cual se utiliza el método de multiplicadores de Lagrange.

El método de Hartree-Fock

El método de Hartree-Fock (HF) [2] fue uno de los primeros métodos de estructura electrónica a partir del cual se basaron una gran cantidad de metodologías; es por ello que resulta importante su descripción. En este método, se tiene en cuenta que los electrones son partículas con espín semientero (fermiones), por lo que su función de onda debe ser antisimétrica respecto al intercambio de partículas. Es decir,

$$\Psi(x_1, x_2, ..., x_N) = -\Psi(x_2, x_1, ..., x_N) \tag{2.16}$$

donde x representa las coordenadas espaciales y de espín de cada electrón. No obstante, el producto de Hartree (descripto en la ecuación 2.9) no satisface dicha condición y distingue entre electrones, dado que identifica cada electrón con un espín-orbital. Para evitar este problema en el método HF se utiliza como función de onda un determinante, al que se denomina determinante de Slater, construido de la siguiente forma:

$$\Psi(x_1, x_2, ..., x_N) = \left(\frac{1}{N!}\right)^{1/2} \begin{vmatrix} \chi_1(1) & \chi_2(1) & \dots & \chi_N(1) \\ \chi_1(2) & \chi_2(2) & \dots & \chi_N(2) \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ \chi_1(1) & \chi_2(2) & \dots & \chi_N(N) \end{vmatrix} \tag{2.17}$$

donde $\chi_i(j)$ se refiere al i-ésimo espín-orbital de un electrón (compuesto por un componente espacial y otro de espín condensada en la variable *(j)*). Debido a las propiedades matemáticas de los determinantes queda asegurado que la función de onda sea asimétrica con respecto al intercambio de partículas.

Al minimizar la energía respecto de la función de onda con la forma funcional del determinante de Slater, se obtiene la siguiente expresión:

$$E_{HF} = \sum_{i=1}^{N} h_{ii} + \frac{1}{2}\sum_{i=1}^{N}\sum_{j=1}^{N}\Big(J_{ij} - Kij\Big). \tag{2.18}$$

En esta expresión h_{ii} corresponde a la energía cinética y a la interacción núcleo-electrón, que surge de operar $\hat{h}$ (ver ecuación 2.19) en la función de onda.

$$\hat{h} = \frac{1}{2}\nabla_1^2 - \sum_i \frac{Z_i}{r_{1i}}. \tag{2.19}$$

J_{ij} corresponde al autovalor del operador Coulómbico, $\hat{J}$:

$$\hat{J}_j\chi_i(1) = \left\{\int |\chi_j(2)|^2 \frac{1}{r_{12}} dx_2\right\}\chi_i(1). \tag{2.20}$$

Este término está relacionado con la interacción electrostática (repulsiva) de dos electrones (1 y 2) en los espín-orbitales i y j. Por último, K_{ij} corresponde al autovalor del operador de intercambio, $\hat{K}$:

$$\hat{K}_j\chi_i(1) = \left\{\int \chi_j^*(2)\frac{1}{r_{12}}\chi_i(2)dx_2\right\}\chi_j(1). \tag{2.21}$$

Este operador no tiene analogía en la electrostática clásica, representa una estabilización adicional que proviene de la antisimetría de la función de onda y resulta positivo para dos electrones de igual espín y cero para electrones de espín opuestos. Este operador puede ser interpretado en términos del Principio de Exclusión de Pauli, el cual evita que dos electrones con un mismo espín estén muy cercanos el uno del otro; y como consecuencia, la energía de repulsión Coulómbica está reducida en el caso de espines paralelos con respecto a la situación en la cual los electrones son antiparalelos

El factor $\frac{1}{2}$ que multiplica las integrales de Coulomb y de intercambio asegura que cada par de electrones no sea contado dos veces. Aplicando el teorema variacional, la función de onda del sistema se hallará encontrando al conjunto de espín-orbitales χ_i que minimicen la energía y teniendo en cuenta la condición de ortonormalidad que deben cumplir los espín-orbitales χ_i. De esta forma se obtienen las ecuaciones de Hartree-Fock:

$$\hat{h}\chi_i(1) + \sum_j^N \int |\chi_j(2)|^2 \frac{1}{r_{12}} dx_2\chi_i(1) - \sum_j^N \int \chi_i^*(2)\frac{1}{r_{12}}\chi_i(2)dx_2\chi_j(1) = \sum_j^N \epsilon_{ji}\chi_j(1) \tag{2.22}$$

donde los ϵ_{ji} corresponden a los valores de energía asociados a los N espín-orbitales. Si se define el operador de Fock, $\hat{f}$, teniendo en cuenta las definiciones de los operadores de $\hat{J}$, $\hat{K}$ y $\hat{h}$,

$$\hat{f} = \hat{h}_1 + \sum_j^N \hat{J}_j - \sum_j^N \hat{K}_j, \tag{2.23}$$

la ecuación 2.22 se simplifica quedando expresada de la siguiente manera:

$$\hat{f}\chi_i(1) = \sum_j^N \epsilon_{ij}\chi_j(1). \tag{2.24}$$

Como puede observarse, la ecuación 2.24 no corresponde a un problema de autovalores. Con el objetivo de que lo sea, se realiza una transformación unitaria (que preserva la ortonormalidad y que la matriz de la transformación verifica $U^{\dagger} = U^{-1}$) del conjunto de los espín-orbitales $\{\chi_a\}$ al conjunto $\{\chi'_a\}$. [2]

$$\chi'_i = \sum_j U_{ij}\chi_j \tag{2.25}$$

La función de onda y su transformación unitaria sólo difieren en un factor de fase. Sin embargo, debido a que todos los observables dependen de $|\Psi|^2$, la función de onda original y su transformación resultan idénticas a todos los fines prácticos. Además, el operador de Fock es invariante frente a la transformación de espín-orbitales. La ecuación de Hartree-Fock en términos de los χ'_i adquiere la forma de un problema de autovalores.

$$\hat{f}(1)\chi'_i = \epsilon'_i\chi'_i \tag{2.26}$$

Esta ecuación tiene como solución a un único conjunto $\{\chi_i\}$ al cual se lo conoce como los orbitales canónicos, los cuales no poseen sentido físico, pero sí lo tienen sus energías orbitales. La resolución de estas ecuaciones, para obtener el conjunto de orbitales canónicos, debe realizarse de forma iterativa, ya que, como puede verse en la ecuación 2.23, el operador $\hat{f}$ depende de sus propias autofunciones. Para resolverlo, se realiza la aproximación de escribir al conjunto de orbitales canónicos como combinación lineal de funciones de base de un electrón.

$$\chi'_i = \sum_{\mu=1}^{K} c_{\mu i}\phi_\mu(1) \tag{2.27}$$

donde K corresponde al tamaño de la base, i identifica al orbital molecular y μ a la función. Al reemplazar 2.27 en 2.26 se tiene:

$$\hat{f}(1)\sum_{\nu}^{K} c_{\nu i}\phi_\nu(1) = \epsilon\sum_{\nu}^{K} c_{\nu i}\phi_\nu(1) \quad i = 1,\ldots,K \tag{2.28}$$

Si se multiplica la ecuación 2.28 por $\phi^*_\mu(1)$ y, luego se integran en r_1, se obtienen las ecuaciones de HF integradas:

$$\sum_{\nu}^{K} c_{\nu i}\int dr_1\phi^*_\mu(1)\hat{f}(1)\phi_\nu(1) = \epsilon_i\sum_{\nu}^{K} c\nu i\int dr_1\phi^*_\nu(1)\phi_\nu(1). \tag{2.29}$$

De esta forma, el problema se reduce a un sistema de K ecuaciones lineales donde las incógnitas son los $\{c_\nu i\}$. Si se definen las matrices de solapamiento (S) y de Fock (F), ambas de dimensión K x K:

$$S_{\mu\nu} = \int dr_1\phi^*_\mu(1)\phi_\nu(1) \qquad F_{\mu\nu} = \int dr_1\phi^*_\mu(1)\hat{f}(1)\phi_\nu(1) \tag{2.30}$$

se pueden escribir las ecuaciones de HF integradas sobre las funciones de base:

$$\sum_{\nu}^{K} F_{\mu\nu}c_{\nu i} = \epsilon_i\sum_{\nu}^{K} S_{\mu\nu}c_{\nu i} \qquad i = 1,2,\ldots,K \quad \mu = 1,2,\ldots,K. \tag{2.31}$$

Además, pueden escribirse también de forma matricial:

$$FC = SC\epsilon \tag{2.32}$$

siendo C la matriz de los coeficientes $c_v i$ y ϵ la matriz diagonal de energías orbitales ϵ_i.

Como se dijo anteriormente, este método se resuelve de forma iterativa. Esto quiere decir que se utilizan unas funciones de prueba para calcular los operadores de Fock. Luego, se resuelven las ecuaciones de HF, obteniendo unas nuevas soluciones, las cuales serán utilizadas para la siguiente iteración. Esto se repite hasta obtener soluciones que resulten invariantes con las iteraciones. Este proceso se conoce con el nombre de campo autoconsistente.

Por último, cabe destacar que la calidad de los resultados del método HF dependerá fuertemente del número y tipo de funciones de base usada para expandir los orbitales. Sin embargo, por más grande que sea la base, en el método de HF hay un error intrínseco, el cual se origina en el tratamiento de la repulsión electrón-electrón. Ésta se realiza de forma promediada, a partir de un potencial de campo medio, sin tener en cuenta las repulsiones instantáneas. Este error asociado recibe el nombre de energía de correlación y se define como la diferencia entre la energía exacta dentro de la aproximación de Bohr-Oppenheimer (E_0) y la energía límite de HF, correspondiente a la energía calculada con una base completa:

$$E_{corr} = E_0 - E_{HF}^{lim} \tag{2.33}$$

Existe una gran cantidad de métodos que permiten obtener resultados que estiman la energía de correlación. Entre ellos pueden mencionarse el método de interacción de configuraciones, los métodos basados en la teoría de perturbaciones de Moller-Plesset y la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT). Esta última será desarrollada a continuación dado que fue ampliamente utilizada en esta tesis.

Teoría del funcional de la densidad

La teoría del funcional de la densidad (DFT) [3] establece que la variable fundamental en los problemas polielectrónicos es la densidad de probabilidad electrónica, que se define como:

$$\rho(r) = 2\sum_{i}^{N/2} |\Psi_i(r)|^2. \tag{2.34}$$

Este enfoque resulta muy atractivo dado que reduce la dimensionalidad de un problema de 3N variables (siendo N el número de electrones) a uno de sólo 3. Hohenberg y Kohn [4] formularon y demostraron dos teoremas que dan sustento a esta teoría. El primero de ellos establece que existe una relación unívoca entre el potencial externo (V(r)) al que se encuentran sometidos los electrones y la densidad de probabilidad electrónica del estado fundamental, $\rho_0(r)$. Como consecuencia de esto, la energía del estado fundamental es funcional de $\rho_0(r)$, $E_0 = E_0[\rho]$. El segundo teorema, análogo

al teorema variacional, establece que dada una $\rho'(r)$ positiva, la energía correspondiente a dicha densidad es mayor a la energía del estado fundamental. Esto resulta equivalente a decir que la verdadera densidad de probabilidad electrónica del estado fundamental, minimiza el funcional de la energía $E_0[\rho]$.

Considerando estos dos teoremas, la energía total se expresa de la siguiente manera:

$$E_0 = E_v[\rho_0] = \int \rho_0(r)V(r)dr + \langle T[\rho_0]\rangle + \langle V_{ee}[\rho_0]\rangle, \tag{2.35}$$

donde V(r) es el potencial externo, $T[\rho_0]$ es la energía cinética de los electrones y $V_{ee}[\rho_0]$ es el potencial Coulómbico proveniente de la repulsión electrónica.

Sin embargo, en este desarrollo teórico no queda establecido cómo obtener E_0 y ρ_0 a partir de $v(r)$, ya que no se conoce cómo calcular los últimos dos términos de la ecuación 2.35 para sistemas de electrones interactuantes. Kohn y Sham [5] propusieron un método para obtener ρ_0 y E_0 en el que se considera un sistema de referencia ficticio de electrones no interectuantes, el cual posee una densidad de probabilidad electrónica del estado fundamental, $\rho_s(r)$, que coincide con la del sistema de interés $\rho_0(r)$. De esta manera, la energía puede expresarse como:

$$E_0 = -\sum_i \int \phi_i^*(r)\nabla^2\phi_i(r)dr - \sum_A \int \frac{Z_A}{|R_A - r|}\rho(r)dr + \int\int \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{|r_1 - r_2|}dr_1 dr_2 + E_{IC} \tag{2.36}$$

donde ϕ_i son las autofunciones del Hamiltoniano de un electrón (denominadas de Kohn-Sham). Además, el primer término de 2.36 corresponde al valor medio de la energía cinética de los electrones no interactuantes, el segundo a las interacciones entre los núcleos y electrones, el tercero a la interacción electrón-electrón del sistema no interactuante, y el último — denominado funcional de intercambio y correlación— contiene las correcciones que deben ser tenidas en cuenta en el sistema no interactuante, con el objetivo de recuperar el sistema real. En este último término se incluyen la energía cinética de correlación, que es la diferencia entre el valor medio de la energía cinética del sistema real y el ficticio; la energía de intercambio, que está relacionada con los requerimientos de antisimetría para los fermiones; la energía de correlación Coulómbica, que está asociada a que los movimientos de los electrones están correlacionados entre sí instantáneamente; y, por último, una corrección de autointeracción para enmendar el hecho de que en el término Coulómbico los electrones se describen como densidades continuas de carga negativa, con lo cual interactúan consigo mismo. El método de KS es exacto por definición debido a que incluye este término, que corrige los efectos cuánticos que no son considerados. Sin embargo, la forma exacta del término de intercambio y correlación es desconocida por lo que en la práctica deben realizarse aproximaciones.

La minimización de este funcional de la energía con respecto a las ϕ_i, considerando el requerimiento de ortonormalidad, da lugar a las ecuaciones de Kohn-Sham (KS) presentadas a continuación:

$$\left[-\frac{1}{2}\nabla_1^2 - \sum_{\alpha}\frac{Z_A}{r_{1A}} + \int \frac{\rho(r_2)}{r_{12}} dr_2 + v_{ic}(r_1)\right]\phi_i^{KS}(r_1) = \epsilon_i^{KS}\phi_i^{KS}(r_1). \tag{2.37}$$

Si se define el operador monoelectrónico de Kohn-Sham:

$$\hat{h}_i^{KS} = \left[-\frac{1}{2}\nabla_1^2 - \sum_{\alpha}\frac{Z_A}{r_{1A}} + \int \frac{\rho(r_2)}{r_{12}} dr_2 + v_{ic}(r_1)\right], \tag{2.38}$$

las ecuaciones de KS se pueden escribir como:

$$\hat{h}_i^{KS}\phi_i^{KS}(r_1) = \epsilon_i^{KS}\phi_i^{KS}(r_1), \tag{2.39}$$

Para resolverlo, al igual que en HF, se plantea un Hamiltoniano electrónico, $\hat{h}_i^{KS}$, que depende de los ϕ_i. Luego, de forma iterativa, se parte de un conjunto de ϕ_i que se utiliza para obtener los correspondientes Hamiltonianos. Con ellos se obtiene un nuevo conjunto de ϕ_i y el procedimiento se repite hasta lograr autoconsistencia.

Ahora bien, la exactitud del método depende de cómo se calcula el término de intercambio y correlación. La aproximación de la densidad local (LDA) fue la más comúnmente utilizada en la década de los 90 y calcula este término para un gas uniforme de electrones. Este método resulta una buena aproximación en sistemas donde la densidad electrónica cambia suavemente. Asimismo, existen otros métodos en los que se incorporan las variaciones de la densidad electrónica con la posición, denominados aproximación del gradiente generalizado (GGA). En estos métodos se utilizan funcionales corregidos por gradientes, incorporando un $\nabla\rho(\mathrm{r})$ en la expresión del funcional de intercambio y correlación. El funcional más conocido de este tipo es el denominado PBE (Perdew-Burke-Erzernhof) [6]. Por otro lado, debido a que el método de HF permite obtener el intercambio exacto, se desarrollaron funcionales, llamados híbridos, que incluyen una porción del intercambio de HF con funcionales de intercambio y correlación de gradiente. Entre estos métodos se destaca B3LYP [7], que ha sido utilizado enormemente en la literatura, principalmente por la comunidad química, por su mejora cualitativa en la reproducción de geometrías y energías de unión en sistemas moleculares.

Cabe destacar que el método de DFT posee limitaciones, entre las que se destacan que es una teoría del estado fundamental, por lo que no puede ser aplicada para obtener estados excitados del sistema. Asimismo, describe de forma deficiente las interacciones débiles del tipo de Van der Waals. Por otro lado, debido a que se incluye el término de intercambio y correlación, deja de cumplirse el hecho de que la energía obtenida es una cota superior de la energía real del sistema [3].

Cargas de Mulliken

En numerosos casos resulta de gran utilidad obtener una medida de la carga electrónica sobre cada átomo del sistema. Si bien no existe una única manera de definir la cantidad de electrones "asociados" a cada átomo, una manera de tener una representación de la distribución de carga sobre el sistema consiste en lo que se denomina análisis poblacional de Mulliken [8]. Considerando la definición de la matriz densidad P y de la matriz solapamiento S, puede verse que el número total de electrones N corresponde a:

$$N = \sum_{\mu} \sum_{\nu} P_{\mu\nu} S_{\mu\nu} = \sum_{\mu} (PS)_{\mu\mu}. \tag{2.40}$$

Puede interpretarse entonces $(PS)_{\mu\mu}$ como la cantidad de electrones asociada al orbital ϕ_μ. Si los orbitales utilizados están centrados en los átomos, la cantidad de electrones asociados a cada átomo corresponderá a la suma de los electrones asociados a los orbitales de cada átomo. La carga neta sobre cada átomo se calcula como:

$$q_A = Z_A - \sum_{\mu \in A} (PS)_{\mu\mu} \tag{2.41}$$

donde Z_A corresponde a la carga nuclear del átomo A y el índice indica la suma sobre todos los orbitales centrados en el átomo A. Debe ser tenido en cuenta a la hora de comparar distintas moléculas que el análisis de la población de Mulliken depende de la base utilizada [8].

2.1.1.2. Modelos basados en la Mecánica Clásica

Como fue mencionado al inicio de la presente tesis, existen diversos sistemas que resultan ser demasiado grandes como para utilizar los métodos basados en la mecánica cuántica, ya que su costo computacional excede el alcance de las metodologías de primeros principios. Los métodos basados en la mecánica clásica ignoran la representación explícita de los electrones y la energía es calculada exclusivamente en función de la posición de los núcleos utilizando ecuaciones sencillas. Como consecuencia de esto, estos tipos de cálculos resultan ser menos costosos computacionalmente y pueden ser utilizados para realizar cálculos en sistemas que contienen un número de átomos suficientemente grande como para representar proteínas en su entorno acuoso. En general, estas técnicas pueden responder ciertas preguntas con el mismo nivel de exactitud que los métodos cuánticos en un tiempo significativamente menor. Sin embargo, al no tener en consideración a los electrones internos, estos métodos no pueden utilizarse para responder preguntas que dependan de la distribución electrónica de la molécula. A continuación se describirán las características generales de estas estrategias.

Campos de fuerza clásicos

En este tipo de métodos la energía potencial se describe a partir de las coordenadas nucleares. Para poder hacerlo resulta indispensable realizar la aproximación de Born-Oppenheimer. La función que describe la energía potencial del sistema es denominada *campo de fuerzas*, debido a que el gradiente de esta función permite obtener las fuerzas que actúan sobre cada átomo.

En la gran mayoría de los campos de fuerza las interacciones entre los núcleos son representadas por fórmulas matemáticas sencillas y pueden agruparse en contribuciones de unión y contribuciones de no unión. Las primeras describen la interacción entre átomos que se encuentran formando un enlace o que se encuentren como máximo a 2 átomos de distancia. Las contribuciones de no unión, en cambio, describen las interacciones entre pares de átomos que se encuentran en moléculas diferentes o bien en la misma molécula, pero separados por más de tres enlaces. En la presente tesis se utilizó para realizar todos los cálculos de Mecánica Clásica el campo de fuerza de *Amber* [9, 10], el cual se presenta en la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} V(r^N) = & \sum_{\text{enlaces}} \frac{k_{i,e}}{2}\left(l_i - l_{i,0}\right)^2 + \sum_{\text{ángulos}} \frac{k_{i,\theta}}{2}\left(\theta_i - \theta_{i,0}^2\right) + \sum_{\text{dihedros}} \frac{V_n}{2}\left(1 + cos(n\omega - \gamma)\right) \\ & + \sum_{i=1}^{N} \sum_{j=i+1}^{N} \left(4\epsilon_{ij}\left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}}\right)^{6}\right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}}\right). \end{aligned} \tag{2.42}$$

Los primeros tres términos de la expresión 2.42 corresponden a las contribuciones de unión. El primero hace referencia al aporte del estiramiento de los enlaces a la energía, mientras que el segundo a la contribución dada por las flexiones angulares. En ambos casos, se modelan las contribuciones por un potencial armónico con una constante de fuerza k_i. Dicho potencial produce un aumento de la energía del sistema cuando el valor de distancia o ángulo, según corresponda, se desvía del valor de referencia ($r_{i,0}$ o $\theta_{i,0}$). Dado que la energía necesaria para modificar un ángulo resulta menor que la requerida para variar la distancia entre dos átomos, los valores de $k_{i,\theta}$ suelen ser menores que los $k_{i,e}$. El tercer término de la ecuación 2.42 está asociado al cambio de energía que produce la rotación de los enlaces (torsiones o ángulos diedros) y posee tres parámetros que lo describen: V_n, el cual corresponde a la barrera energética asociada a la rotación entre dos mínimos sucesivos; n, que representa el número de mínimos encontrados entre 0 y 2π; y, por último, γ, el cual determina dónde el ángulo diedro pasa a través de un valor mínimo de energía. El último término de la ecuación 2.42, en cambio, corresponde a las contribuciones de no unión y para su descripción lo dividiremos en dos partes. La primera, entre corchetes, se trata de un potencial de Lennard-Jones, el cual es utilizado para modelar tanto las interacciones dispersivas como la repulsión originada por el principio de exclusión de Pauli a distancias cortas. El parámetro ϵ_{ij} está asociado a la profundidad del pozo de energía, mientras que σ_{ij} se asocia a la distancia entre los átomos en ese mínimo. Por otro lado, la

segunda parte de este término corresponde a un potencial Coulómbico, con el cual son modeladas las interacciones del tipo electrostáticas. En el campo de fuerzas de *Amber*, la distribución de cargas es representada a través de cargas puntuales que se ubican en las coordenadas de cada átomo. Estas cargas se obtienen de manera de reproducir el potencial electrostático de la molécula, obtenido a través de cálculos cuánticos.

Modelos de solvente

En la presente tesis, se estudiaron fenómenos que requieren considerar a las moléculas de interés (proteínas) rodeadas de un solvente, para poder tener así una descripción más realista del sistema experimental, pero en una simulación computacional. Existen diversos modelos para describir al solvente (agua para los efectos de la presente tesis) y la elección de un modelo que lo describa depende en gran parte de la propiedad que se busca reproducir y del grado de precisión deseado.

La utilización de solvente explícito consiste en considerar cada molécula de agua que constituye el sistema. Existen distintos modelos que describen a la molécula de agua de manera diferente. En este trabajo se utilizó el modelo explícito de agua TIP3P [11]. El mismo describe al agua como un cuerpo rígido (sin grados de libertad internos) con tres sitios interactuantes (uno por cada núcleo que la compone) con una distancia interatómica de 0,9572 Å y un ángulo de enlace de 104,52°; dichos valores se corresponden con los observados experimentalmente[8, 11]. Por otro lado, a los átomos de hidrógeno les asigna una carga puntual de 0,417e y al átomo de oxígeno de -0,834e. Además, describe las interacciones de van der Waals entre dos moléculas de agua utilizando una función de Lennard-Jones, con un único punto de interacción centrado en el átomo de oxígeno (con los siguientes parámetros: $\sigma = 3,15061$ Å y $\epsilon = 636,4$ J/mol). En este modelo no se consideran las interacciones de van der Waals que involucren a los átomos de hidrógeno.

Frecuentemente el tratamiento del solvente de forma explícita resulta ser muy costoso computacionalmente y es por ello que se recurre a los llamados modelos de solvente continuo o implícito. En este tipo de tratamiento se considera que el solvente afecta al comportamiento del soluto, debido a sus propiedades dieléctricas. Los modelos de este tipo mayormente utilizados son los de Poisson-Boltzmann (PB) y de Generalized Born (GB). La energía libre de solvatación, en estos modelos, puede descomponerse en tres contribuciones:

$$\Delta G_{\text{solv}} = \Delta G_{\text{elec}} + \Delta G_{\text{cav}} + \Delta G_{\text{vdW}}. \tag{2.43}$$

El primer término corresponde a la contribución electrostática, la cual resulta ser muy importante para solutos polares o cargados debido a la polarización del solvente; el segundo corresponde al trabajo necesario para generar una cavidad para el soluto, en contra de la presión del solvente y

de la penalidad entrópica, asociada a la reorganización de las moléculas de solvente; y el último, corresponde a las interacciones de van der Waals entre moléculas de solvente y las del soluto. La gran mayoría de modelos continuos difieren en la forma de tratar el término electrostático y utilizan, en cambio, parámetros similares a los empleados en mecánica clásica para describir los términos restantes.

El modelo de PB describe la contribución electrostática del soluto inmerso en un solvente con iones [12] de la siguiente forma:

$$\nabla\left[\epsilon(r)\nabla\Psi(r)\right] = -\rho_s(r) - \sum_i c_i^{\infty} z?iq\lambda(r)e^{\frac{z_i q\Psi(r)}{k_B T}}, \tag{2.44}$$

donde ϵ(r) representa el dieléctrico en función de la posición, Ψ(r) representa el potencial electrostático, ρ_s(r) la densidad de carga del soluto, c_i^{∞} la concentración del ion i-ésimo a una distancia infinita del soluto, z_i es la valencia del ion i, q es la carga del protón, k_B es la constante de Boltzmann, T la temperatura y λ(r) es un factor que tiene en cuenta la accesibilidad de los iones en solución en función de la distancia al soluto. Esta ecuación resulta ser computacionalmente muy costosa de implementar sin realizar aproximaciones [13-15].

El modelo de GB se trata de una linealización de la ecuación de PB. En dicho método se representa al soluto como un grupo de esferas cuya constante dieléctrica difiere de la externa propia del solvente [16]. La fórmula es la siguiente:

$$G_s = \frac{1}{8\pi}\left(\frac{1}{\epsilon_0} - \frac{1}{\epsilon}\right)\sum_{i,j}^{N}\frac{q_i q_j}{f_{GB}}, \tag{2.45}$$

$$\text{en donde} \quad f_{GB} = \sqrt{r_{ij} + a_{ij}e^{'D}} \tag{2.46}$$

$$\text{y} \quad D = \left(\frac{r_{ij}}{2a_{ij}}\right)^2, \quad a_i j = \sqrt{a_i a_j} \tag{2.47}$$

siendo ϵ_0 la permitividad del vacío, ϵ la constante dialéctrica del solvente modelado, q_i la carga de la partícula i-ésima, $r_i j$ la distancia entre las partículas i y j y a_n el radio efectivo de Born [16], el cual describe el grado de inmersión del átomo dentro de un soluto. La descripción precisa de estos parámetros es clave a la hora de que el modelo de GB sea exitoso [17].

Condiciones periódicas de contorno

En las simulaciones en fase condensada resulta necesario utilizar *condiciones periódicas de contorno*, las cuales consisten en replicar la caja donde se encuentra el conjunto de partículas a calcular en todas las direcciones, dando como resultado un arreglo periódico. De esta manera, a partir de

una simulación realizada utilizando un pequeño número de partículas, se puede hacer que estas experimenten las mismas fuerzas que sentirían en el seno de un sistema macroscópico.

A pesar de que este arreglo periódico disminuye el costo computacional, aún resulta necesario encontrar una solución práctica al problema de las infinitas interacciones que surgen a partir de este tratamiento. En general, se utilizan dos estrategias para resolver este problema: una para las interacciones dispersivas y otra para las electrostáticas. En el primer caso, se establece un *radio de corte* a partir del cual las interacciones dispersivas no son calculadas. Esto no puede ser implementado para las interacciones del tipo electrostáticas, dado que resultan ser de largo alcance (las interacciones decaen como r^{-1}). Es por ello que, en este caso, se utiliza otra estrategia denominada *sumas de Ewald* [18], la cual es utilizada para calcular las interacciones electrostáticas totales entre todos los átomos presentes en una celda unidad. En esta estrategia, la energía electrostática es calculada en dos partes: en la primera se le agrega a las cargas puntuales una distribución de carga Gaussiana, la cual neutraliza cada carga. Esto es calculado en el espacio real y tiene la ventaja de que la expresión resultante, a diferencia de la suma directa, converge rápidamente. La segunda parte consiste en calcular en el espacio recíproco las correcciones necesarias debido a la incorporación de las densidades neutralizantes de la etapa anterior. De esta forma, se logra considerar las interacciones electrostáticas de una manera eficiente [19].

Ahora bien, para poder calcular la energía potencial a partir de la expresión de un campo de fuerza, resulta necesario conocer los parámetros asociados a cada uno de los sumandos de la expresión 2.42. El campo de fuerza de *Amber* contiene los parámetros asociados a los aminoácidos naturales presentes en la mayor parte de las proteínas. Además, en este campo de fuerza los átomos en cada residuo poseen un nombre y tipo de átomo, el cual contiene información acerca de los enlaces, ángulos y diedros. De esta forma, los parámetros en lugar de darse para cada átomo en particular se determinan a través del tipo de átomo. Debe considerarse que en el caso de querer incluir una molécula no descripta en el campo de fuerza, deben obtenerse los parámetros necesarios previamente a la realización del cálculo. En general, para la obtención de parámetros se utilizan cálculos de mecánica cuántica o datos experimentales.

2.1.1.3. Métodos híbridos Cuántico-Clásicos

Como fue mencionado anteriormente, los métodos basados en la mecánica cuántica, al tener en consideración la distribución electrónica del sistema, resultan imprescindibles a la hora de estudiar procesos que involucran reacciones químicas. Sin embargo, poseen la desventaja de ser muy costosos computacionalmente. En contraposición, los métodos que se basan en la mecánica clásica poseen un menor costo computacional y permiten estudiar fenómenos estructurales asociados a moléculas de una gran cantidad de átomos. La combinación de ambas metodologías resulta de gran utilidad a la hora de describir procesos de naturaleza cuántica que involucran pocos átomos, pero que están rodeados de muchas partículas, como una reacción en solución o que ocurre en el sitio activo de una proteína. Estos métodos del tipo híbridos se denominan cuántico-clásicos o QM-MM. Para su utilización resulta necesario definir la parte reactiva del sistema, a la cual se tratará de forma cuántica y al entorno, que será tratado de forma clásica. Por ejemplo, en el caso de una reacción enzimática, como las que serán estudiadas en el presente trabajo, aquellos átomos del sitio activo, que están directamente involucrados en los procesos de ruptura y formación de enlaces, serán tratados con mecánica cuántica, mientras que el resto de la proteína y todo el solvente se tratará con la mecánica clásica.

Dentro de los métodos QM-MM se pueden distinguir dos clases de métodos: los esquemas aditivos [20] y los sustractivos [21]. En este trabajo se utilizararon solamente los métodos del primer tipo. En los métodos aditivos, el Hamiltoniano consiste en la suma de la contribución del subsistema QM ($\hat{H}_{\text{QM}}$), el MM ($\hat{H}_{\text{MM}}$) y un término de acoplamiento QM-MM ($\hat{H}_{\text{QM-MM}}$):

$$\hat{H}_{\text{total}} = \hat{H}_{\text{QM}} + \hat{H}_{\text{MM}} + \hat{H}_{\text{QM-MM}} \tag{2.48}$$

por lo que

$$E_{\text{total}} = E_{\text{QM}} + E_{\text{MM}} + E_{\text{QM-MM}} \tag{2.49}$$

Para determinar los términos de energía QM y MM se utilizará la teoría del funcional de la densidad (utilizando el embebimiento electrostático que considera tanto las cargas de los núcleos cuánticos como así también el campo electrostático generado por las cargas clásicas) para determinar la densidad electrónica y el campo de fuerza de *Amber*, respectivamente. Ahora bien, el término de acoplamiento resulta ser más complejo de calcular y su definición depende del método QM-MM utilizado. En general, este término incluye interacciones electrostáticas, de van der Waals y de unión de los átomos en la frontera entre los dos subsistemas. En general, la energía QM-MM se escribe de la siguiente

manera:

$$E_{QM-MM} = \sum_{i=1}^{A} q_i \int \frac{\rho(r)}{|r-\tau_1|} dr + \sum_{i=1}^{A}\sum_{i=1}^{B} \frac{q_i Z_j}{|R_j - \tau_i|} + \sum_{i=1}^{A}\sum_{i=1}^{B} 4\epsilon_{ij}\left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{|\tau_i - R_j|}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{|\tau_i - R_j|}\right)^{6}\right] \quad (2.50)$$

donde τ_i corresponde a las posiciones de los núcleos MM, R_j a las coordenadas de los núcleos QM. El primer sumando da cuenta de la interacción electrostática entre la densidad electrónica del subsistema cuántico y las cargas sobre los átomos MM (q_i). El segundo término describe la interacción electrostática entre los núcleos QM, de carga Z_i, y los átomos MM. El tercer término describe las interacciones de van der Waals de la misma forma que en el campo de fuerza clásico. Este término implica que sea necesario determinar los parámetros asociados al potencial de Lennard-Jones (ϵ y σ) para los átomos del subsistema QM, los que normalmente son obtenidos en el campo de fuerza para representar al subsistema MM. El término de van der Wals del término de acoplamiento evita que las cargas MM de signo negativo se aproximen demasiado a los núcleos de la región QM.

En este tipo de métodos existe un problema adicional, que es la necesidad de que el sitio activo mantenga su posición y es por ello que las regiones QM y MM deben tener un vínculo geométrico como lo es un enlace. En el programa utilizado en la presente tesis se utiliza el método SPLAM (*Scaled Position Link Atom Method* [22]. En este método un átomo, denominado *Link* (usualmente se trata de un átomo de H, H_{link}), se ubica en el enlace que atraviesa la frontera. La posición de H_{link} está forzada a mantenerse en el enlace entre el átomo QM y el MM. Para ello, la fuerza sobre el H_{link} se descompone en una contribución perpendicular y otra paralela al enlace. La componente perpendicular se redistribuye en los átomos MM y QM. Los términos para mantener el enlace son computados a través del campo de fuerza clásico. Las interacciones de Lennard-Jones que involucran los tres átomos son anuladas. Por último, para evitar la sobrepolarización de la unión, se anula la carga sobre el átomo MM.

2.1.2. Métodos de exploración de la superficie de energía potencial

La superficie de energía potencial (SEP), teniendo en cuenta la aproximación de Born-Oppenheimer, es una función escalar que define el valor de la energía potencial del sistema en función de las coordenadas de los núcleos. El conocimiento de dicha superficie permite obtener información cinética y termodinámica de un sistema. Sin embargo, a excepción de sistemas simples, resulta imposible conocerla de forma analítica, razón por la cual se requiere de métodos de simulación computacional para explorarla. Dichos métodos permiten concentrar la atención en el sector de la SEP que se desea explorar para poder responder al interrogante químico de interés. A continuación, se describirán las técnicas utilizadas en la presente tesis para la exploración de la SEP de forma eficiente.

2.1.2.1. Minimización de la energía y búsqueda del camino de transformación

En general, cuando se realizan cálculos de modelado molecular hay un especial interés en los puntos mínimos de la SEP. Esto se debe a que, como fue dicho anteriormente, estos puntos corresponden a estados estables del sistema. Para identificarlos se utilizan diversos algoritmos de minimización, los cuales pueden clasificarse en dos grandes grupos: aquellos que utilizan derivadas de la energía con respecto a las coordenadas del sistema y aquellos que no la utilizan. Los primeros tienen la ventaja de que proveen información sobre la forma de la SEP. A la hora de elegir un algoritmo de minimización se busca alguno que sea rápido y, además, que utilice la menor cantidad de memoria. Los algoritmos que emplean las derivadas de la energía son los más ampliamente utilizados. Este tipo de técnica puede ser clasificada en: métodos de primer orden y métodos de segundo orden, de acuerdo al orden de la derivada que se utiliza.

En el trabajo realizado en la presente tesis se utilizaron dos métodos de primer orden, que serán brevemente descriptos a continuación: *Pasos descendentes* y *Gradiente conjugado* [8]. El primer método consiste en realizar variaciones de las coordenadas nucleares en la dirección paralela a la fuerza neta. La longitud de los pasos es arbitraria y se fija previamente al comienzo del cálculo. En el método de *Gradiente conjugado*, en cambio, la dirección con la que se realiza el movimiento del sistema está dada por la suma de la fuerza neta y la dirección que fue utilizada en el paso anterior, a la cual se la multiplica por un factor determinado por el cociente del gradiente del paso actual y el del paso anterior. Esto evita que se produzca un fenómeno del tipo oscilatorio en zonas donde los mínimos son muy *angostos*. En general, se suele utilizar una combinación de ambos métodos, ya que resultan complementarios entre sí. Por ejemplo, primero se suele usar el método de pasos descendentes porque es sabido que funciona mejor cuando la estructura inicial difiere mucho de un mínimo en la SEP. Luego, se usa el método de gradiente conjugado que resulta ser más eficiente para explorar las estructuras cerca del mínimo de energía.

Una desventaja general de ambos métodos es que solamente pueden ir cuesta abajo en la superficie de energía, razón por la cual sólo permiten encontrar el mínimo más cercano al punto de partida (comúnmente llamado mínimo local) y no pueden vencer barreras que conecten mínimos. Para mejorar este hecho, deben o bien minimizarse distintos puntos de partida y así intentar obtener distintos mínimos o bien recurrirse a métodos más complejos de exploración o interrogación de la SEP. En general, en el caso de las proteínas, las estructuras iniciales son obtenidas a partir de resultados de difracción de rayos X o de resonancia magnética nuclear.

Por otro lado, en numerosas ocasiones resulta de gran interés conocer tanto la termodinámica como la cinética asociada a las reacciones químicas. El camino de mínima energía en la SEP, que une

reactivos y productos, es denominado camino de reacción. Con el objetivo de obtener los perfiles de energía asociados a dicho camino, se utilizó una técnica denominada *minimización restringida*. En dicha técnica el sistema es empujado a lo largo de una coordenada, la cual puede consistir en una distancia, un ángulo o distintos parámetros geométricos del sistema; mientras se realiza una minimización en el resto del espacio de conformaciones. Para ello se agrega un potencial armónico al Hamiltoniano del sistema.

$$V_R = k(\epsilon - \epsilon_0)^2, \tag{2.51}$$

donde ϵ_0 corresponde al valor deseado de la coordenada de reacción en un momento determinado de la simulación, y ϵ corresponde al valor de la coordenada de reacción deseado. En cada movimiento de ϵ_0 se realiza una optimización de todo el sistema, sujeto a la restricción dada por el potencial extra. De esta forma se obtiene el camino de mínima energía que se corresponde al perfil de energía para una reacción química.

2.1.2.2. Dinámica Molecular

Los métodos de minimización resultan útiles para obtener configuraciones individuales de mínima energía, lo cual en sistemas simples suele ser suficiente para predecir de manera aproximada ciertas propiedades del mismo. Sin embargo, dichos métodos no consideran las fluctuaciones térmicas y, como consecuencia, tampoco la entropía del sistema, lo cual suele ser esencial a la hora de caracterizar sistemas más complejos como son las proteínas y necesario para determinar energías libres. Debe tenerse en cuenta que en dichos sistemas existen numerosos mínimos y todas las conformaciones relevantes están representadas en el ensamble de moléculas presente en el sistema al momento de realizar una medida experimental. Es por ello que debe recurrirse a otros tipos de métodos de simulación computacional, en los que se obtienen una serie de configuraciones representativas del sistema. De esta forma, las propiedades termodinámicas extraídas se corresponden mejor con los valores experimentales. La *hipótesis ergódica* postula que el promedio de todas las configuraciones del sistema puede ser reemplazado por el promedio temporal. Esto divide al tipo de simulaciones en dos: las basadas en la evolución temporal, asumiendo que el sistema ha evolucionado un tiempo suficiente para haber podido alcanzar las distintas conformaciones posibles, y en aquellas que exploran el colectivo de configuraciones. Entre los métodos del primer tipo, se destaca la dinámica molecular (DM), la cual realiza la reconstrucción de la evolución temporal de la dinámica del sistema a través de la resolución de las ecuaciones de movimiento de Newton:

$$\frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2} = \frac{F_{r_i}}{m_i}, \tag{2.52}$$

en donde se describe el movimiento de una partícula de masa m_i en la coordenada r_i con una fuerza F_{r_i} en esa dirección.

La fuerza sobre cada una de las partículas cambia cuando la partícula modifica su posición, y es función del movimiento de todas las otras partículas. Esto lo convierte en un problema no resoluble analíticamente, por lo que debe recurrirse a métodos numéricos. El método utilizado por el programa *Amber* se denomina algoritmo de Verlet [23]. En dicho método se expresan las posiciones a diferentes tiempos, a partir de sus expansiones de Taylor en $t \pm \Delta t$:

$$r(t+\Delta t) = r(t) + \Delta t v(t) + \frac{1}{2}\Delta t^2 a(t) + \ldots r(t-\Delta t) = r(t) - \Delta t v(t) - \frac{1}{2}\Delta t^2 a(t) + \ldots \tag{2.53}$$

Si se suman estas expresiones y se desprecian los términos de orden mayor a dos, se pueden calcular las coordenadas de las partículas paso a paso a partir de la aceleración a:

$$r(t+\Delta t) = 2r(t) - r(t-\Delta t) + \frac{1}{2}\Delta t^2 a(t) \tag{2.54}$$

Las velocidades, que resultan necesarias para la estimación de la energía cinética, no aparecen de forma explícita, pero se pueden obtener restando las expresiones anteriores:

$$v(t) = \frac{r(t+\Delta) - r(t-\Delta t)}{2\Delta t} \tag{2.55}$$

En cada paso, las fuerzas en los átomos son calculadas como la suma de las interacciones con el resto de las partículas y, a partir de ellas, se calcula la aceleración y las nuevas posiciones. Se asume que la fuerza actuante en cada átomo es constante durante cada Δt. Los átomos, entonces, se mueven a las nuevas posiciones y las fuerzas son actualizadas y calculadas nuevamente. De esta forma, la DM genera una trayectoria que describe cómo las variables del sistema cambian con el tiempo. Este método resulta ser determinístico, ya que a partir del estado presente de un sistema puede predecirse cómo se encontrará a cualquier tiempo futuro.

Condiciones experimentales: temperatura y presión

En general, la práctica mayormente utilizada es explorar la DM en el ensamble canónico (NVT) o isotérmico-isobárico (NPT). Se sabe que la temperatura instantánea está relacionada con la energía cinética (K), a través de la siguiente ecuación:

$$K = \sum_{i=1}^{N} \frac{m_i v_i^2}{2} = \frac{3k_B T}{2} N \tag{2.56}$$

donde v_i y m_i corresponden a la velocidad y la masa de la partícula i y N el número de partículas del sistema.

Para mantener la temperatura constante puede ajustarse a su valor a través de un algoritmo que modula las velocidades (termostato). De esta forma se altera la energía total, pero se mantiene

la temperatura, el volumen y el número de partículas constante (ensamble canónico). Uno de los termostatos más utilizados es el de Berendsen[24]. En dicho termostato se acopla al sistema un baño externo, con la temperatura fija a la deseada, al cual se le va entregando o quitando calor a medida que resulta necesario. En este método, las velocidades son escaladas en cada paso de manera tal que el cambio en la temperatura resulta ser proporcional a la diferencia entre la del sistema y la del baño:

$$\frac{\partial T(t)}{\partial t} = \frac{1}{\tau}\Big[T_{\text{baño}} - T(t)\Big], \tag{2.57}$$

donde τ es un parámetro de acoplamiento que determina cuán acoplado está el baño al sistema. A mayor τ más débil será el acoplamiento y el sistema tenderá a comportarse de manera aislada, mientras que si el valor de τ es pequeño el acoplamiento será fuerte. El cambio de temperatura entre dos pasos sucesivos separados por un Δt corresponde a:

$$\Delta T = \frac{\Delta t}{\tau}\Big[T_{\text{baño}} - T(t)\Big]. \tag{2.58}$$

Por lo cual, el factor de escalamiento para las velocidades es:

$$\lambda^2 = 1 + \frac{\Delta t}{\tau}\left[\frac{T_{\text{baño}}}{T(t)} - 1\right]. \tag{2.59}$$

Otro termostato ampliamente utilizado en la presente tesis corresponde al termostato de Langevin. En dicho termostato, a cada Δt la ecuación de movimiento varía de la siguiente forma:

$$m_i \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2} = -F_i^{fr} + F_i^{col}, \tag{2.60}$$

donde $F_i^{fr} = -\gamma m v$ tiene en cuenta el efecto del rozamiento con el medio y $F_i^{col} = \sqrt{2\gamma m k T}R$ corresponde a la fuerza asociada a los cambios de momento producidos por colisiones contra partículas del medio. Una ventaja de este algoritmo es que permite aumentar el Δt, ya que se estabilizan las ecuaciones del movimiento debido a que se minimizan las fluctuaciones en las velocidades y, por ende, la energía cinética. Sin embargo, al perderse la transferencia de momento, el uso de este termostato no permite el cálculo de coeficientes de difusión.

Por otro lado, se busca realizar las simulaciones a presión constante. Para ello, el sistema debe variar el volumen de la celda en la que se realiza la simulación. Berendsen propuso un esquema similar al de la temperatura [24], en el cual se acopla el sistema a un baño equilibrado a cierta presión. El volumen de la celda se escala a un factor γ que equivale a escalar las coordenadas atómicas en $\gamma^{1/3}$. De esta manera se tiene:

$$\gamma = 1 + \kappa \frac{\partial t}{\tau_P}\big(P - P_{\text{baño}}\big), \tag{2.61}$$

donde $\kappa = -\frac{1}{V}\left(\frac{\partial V}{\partial P}\right)_T$ es la compresibilidad isotérmica y τ_P es el factor de acoplamiento del baño del sistema.

2.1.2.3. Métodos de muestreo avanzado

Como fue mencionado anteriormente, la SEP de las proteínas resulta ser compleja con la presencia de numerosos mínimos de energía. Ésta característica limita la capacidad de que la superficie de energía sea correctamente explorada mediante el uso de métodos de simulación convencionales para tiempos de cómputo accesibles. Esto se debe a que, en estos métodos, las simulaciones suelen quedar atrapadas en el mínimo local de energía correspondiente a la estructura de partida.

Debido a ello se utilizan técnicas de muestreo sesgado, donde se restringe el cálculo de energía a un subespacio del espacio configuracional. Dichas técnicas pueden dividirse en dos grandes grupos: los métodos de no-equilibrio y los de equilibrio. Los primeros evalúan el trabajo (W_i) requerido por el sistema para recorrer la coordenada de transformación, mediante la aplicación de una fuerza externa. A partir de N medidas de trabajo (partiendo de distintas condiciones iniciales) es posible obtener el cambio de energía asociado a la transformación, empleando por ejemplo, la igualdad de Jarzynski [25]:

$$e^{-\beta \Delta G} = \lim_{N \to \infty} \langle e^{-\beta W_i} \rangle_N . \tag{2.62}$$

Ejemplos de este conjunto de métodos son Dinámica Molecular Guiada (sMD), Perturbaciones de Energía Libre (FEP), entre otros [26] que no fueron utilizados en la presente tesis. Los métodos de equilibrio, en cambio, evalúan la energía suponiendo que el proceso global simulado (separado y analizado en sucesivos pasos intermedios del proceso global) se encuentra termalizado y equilibrado en el ensamble termodinámico deseado. Ejemplos de este tipo son los llamados de Integración Termodinámica [27], Umbrella Sampling [28], entre otros que no serán explicados en la presente tesis. Para estos casos, la energía de cada etapa simulada se evalúa a través del factor de Boltzmann asociado a cada método, teniendo en consideración el sesgo impuesto. Por otro lado, dentro de los métodos de equilibrio existen las simulaciones basadas en pesos estadísticos no Boltzmannianos en las que se realiza un camino azaroso en el espacio de energía. Estos caminos al azar permiten que las simulaciones venzan cualquier barrera de energía y, de esta forma, se explore un mayor espacio en comparación con los métodos convencionales. Existen diversos métodos de este tipo, pero tienen la dificultad de que determinar los factores estadísticos es computacionalmente demandante. Sugita y Okamoto [29] desarrollaron un algoritmo de dinámica molecular, denominado *replica-exchange* (REM), en el cual el peso estadístico es esencialmente conocido y, por ende, no existe ninguna complicación en su determinación. En este método se realiza la simulación simultánea de numerosas copias del mismo sistema a distintas temperaturas. El rango de temperaturas seleccionado va desde valores bajos, correspondientes a condiciones nativas, hasta valores altos, en los cuales el sistema tiene la energía suficiente como para vencer barreras potenciales altas. A intervalos regulares de tiempo,

las N réplicas pueden intercambiar su temperatura (siguiendo un criterio que será explicado más adelante). Este intercambio, permite que se realice el muestreo de distintas conformaciones de la superficie de energía libre de manera eficiente, dado que una trayectoria que se encuentra atrapada en un mínimo de energía puede escapar a través del intercambio energético con una réplica que se encuentra a una mayor temperatura. A continuación se explicará la teoría que hay detrás de este método.

Fundamento teórico

Si se considera un sistema de N átomos de masa m_k (k = 1, ..., N) con sus respectivos vectores de coordenada q ≡ (q_1,..., q_N) y de momento (p ≡ p_1,..., p_N). El Hamiltoniano H (q,p) del sistema corresponde a la suma de la energía cinética K(p) y de la energía potencial E(q):

$$H(q,p) = K(p) + E(q) \tag{2.63}$$

donde

$$K(p) = \sum_{k=1}^{N} \frac{p_k^2}{2m_k} \tag{2.64}$$

En el ensamble canónico a temperatura T a cada estado $x \equiv (q,p)$ con un Hamiltoniano H (q,p) le corresponde el siguiente factor estadístico de Boltzmann:

$$W_B(x;T) = e^{-\beta H(q,p)} \tag{2.65}$$

donde β corresponde a $\beta = 1/k_B T$ (siendo k_B la constante de Boltzmann). Asimismo, la energía cinética promedio, a una temperatura T, viene dada por:

$$\left\langle K(p) \right\rangle_T = \left\langle \sum_{k=1}^{N} \frac{p_k^2}{2m_k} \right\rangle_T = \frac{3}{2} N k_B T \tag{2.66}$$

El ensamble generalizado de REM consiste en un número M de réplicas (o copias) no interactuantes del sistema original en el ensamble canónico a M temperaturas diferentes, T_m $(m = 1, ..., M)$. Se ordenan las réplicas para que haya una por cada temperatura. De esta manera hay una correspondencia uno a uno entre réplicas y temperaturas. La etiqueta i (i= $1, ..., M$) para copias es una permutación de la etiqueta m (m=1,...,M) para temperaturas, y viceversa:

$$\begin{cases} i = i(m) \equiv f(m), \\ m = m(i) \equiv f^{-1}(i). \end{cases} \tag{2.67}$$

donde f (m) es la función permutación de m y $f^{-1}(i)$ es su inversa.

A partir de ahora se llamará "estado" a $X = \left(x_1^{[i(1)]}, ..., x_M^{[i(M)]}\right) = \left(x_{m(1)}^{[1]}, ..., x_{m(M)}^{[M]}\right)$, donde el superíndice corresponde a la réplica y el subíndice a la temperatura. El estado X queda definido por los M

conjuntos de coordenadas $q^{[i]}$ y de momentos $p^{[i]}$ de los N átomos en la copia i a una temperatura T_m:

$$x_m^{[i]} \equiv \left(q^{[i]}, p^{[i]}\right)_m. \tag{2.68}$$

Debido a que las réplicas no interactúan, el peso estadístico correspondiente al estado X está dado por el producto de los factores de Boltzmann para cada copia (o para cada temperatura):

$$W_{REM}(X) = exp - \left\{ \sum_{i=1}^{M} \beta_{m(i)} H\left(q^{[i]}, p^{[i]}\right) \right\} = exp - \left\{ \sum_{m=1}^{M} \beta_m H\left(q^{[i(m)]}, p^{[i(m)]}\right) \right\}, \tag{2.69}$$

donde i(m) y m(i) son las funciones permutaciones en la ecuación 2.67.

Si se tienen las réplicas i y j a las temperaturas T_m y T_n, respectivamente, y se realiza un intercambio entre ellas:

$$X = \left(..., x_m^{[i]}, ..., x_n^{[j]}, ...\right) \rightarrow X' = \left(..., x_m^{[j]'}, ..., x_n^{[i]'}, ...\right) \tag{2.70}$$

i, j, m y n están relacionadas a través de la función de permutación en la ecuación 2.67 y el intercambio de réplicas introduce una nueva función permutación denominada f':

$$\begin{cases} i = f(m) \rightarrow \ j = f'(m), \\ j = f(n) \rightarrow \ i = f'(n). \end{cases} \tag{2.71}$$

El intercambio de réplicas puede ser escrito con un mayor detalle como

$$\begin{cases} x_m^{[i]} \equiv (q^{[i]}, p^{[i]})_m \rightarrow \ x_m^{[j]'} \equiv (q^{[j]}, p^{[j]'})_m, \\ x_n^{[j]} \equiv (q^{[j]}, p^{[j]})_n \rightarrow \ x_n^{[i]'} \equiv (q^{[i]}, p^{[i]'})_n. \end{cases} \tag{2.72}$$

donde $p^{[i]'}$ y $p^{[j]'}$ serán definidas dadas más adelante. Debe destacarse que el proceso de intercambio de réplicas es equivalente a intercambiar un par de temperaturas T_m y T_n para las réplicas correspondientes i y j, de la siguiente manera:

$$\begin{cases} x_m^{[i]} \equiv (q^{[i]}, p^{[i]})_m \rightarrow \ x_n^{[i]'} \equiv (q^{[i]}, p^{[i]'})_n, \\ x_n^{[j]} \equiv (q^{[j]}, p^{[j]})_n \rightarrow \ x_m^{[j]'} \equiv (q^{[j]}, p^{[j]'})_m. \end{cases} \tag{2.73}$$

Los cambios en los momentos de las réplicas son asignados de la siguiente manera:

$$\begin{cases} p^{[i]'} \equiv \sqrt{\frac{T_n}{T_m}} p^{[i]}, \\ p^{[j]'} \equiv \sqrt{\frac{T_m}{T_n}} p^{[j]}. \end{cases} \tag{2.74}$$

Esta asignación significa que se rescalan de forma uniforme las velocidades de todos los átomos en cada réplica, satisfaciendo la condición de temperatura establecida por la ecuación 2.64.

Con el objetivo de que el proceso de intercambio converja hacia una distribución de equilibrio, es suficiente con imponer la siguiente igualdad:

$$W_{REM}(X)\,w(X \to X') = W_{REM}(X')\,w(X' \to X). \tag{2.75}$$

donde $w\,(X \to X')$ corresponde a la probabilidad de la transición y $W_{REM}(X)$ corresponde al peso estadístico del estado X.

Reemplazando por las ecuaciones 2.63, 2.64 2.69, 2.74 y 2.75, se tiene:

$$\begin{aligned}
\frac{w(X \to X')}{w(X' \to X)} &= exp\Big\{ -\beta_m \Big[K(p^{[j]'}) + E(q^{[j]}) \Big] - \beta_n \Big[K(p^{[i]'}) + E(q^{[i]}) \Big] \\
&+ \beta_m \Big[K(p^{[i]}) + E(q^{[i]}) \Big] + \beta_n \Big[K(p^{[j]}) + E(q^{[j]}) \Big] \Big\} \\
&= exp\Big\{ -\beta_m \frac{T_m}{T_n} K(p^{[j]}) - \beta_n \frac{T_n}{T_m} K(p^{[i]}) + \beta_m K p^{[i]}) + \beta_n K(p^{[j]}) \\
&- \beta_m \Big[E(q^{[j]} - E(q^{[i]})) \Big] - \beta_n \Big[E(q^{[i]} - E(q^{[j]}) \Big] \Big\} \\
&= exp(-\triangle),
\end{aligned} \tag{2.76}$$

donde

$$\triangle \equiv \Big[\beta_n - \beta_m \Big] \Big(E\big(q^{[i]}\big) - E\big(q^{[j]}\big) \Big), \tag{2.77}$$

e i, j, m y n están relacionadas a través de las funciones de permutación. Esta imposición puede ser satisfecha utilizado el criterio de Metropolis:

$$w\big(X \to X'\big) \equiv w\big(x_m^{[i]} \mid x_n^{[j]}\big) = \begin{cases} 1, \text{ para } \triangle \leq 0, \\ exp(-\triangle), \text{ para } \triangle > 0, \end{cases} \tag{2.78}$$

Teniendo esto en consideración, una simulación de intercambio de réplicas es realizada alternando los dos pasos siguientes:

1. cada réplica en el ensamble canónico es simulada de forma simultánea e independiente a una temperatura fija para un número dado de pasos de dinámica molecular.

2. Un par de copias a temperaturas vecinas, $x_m^{[i]}$ y $x_{m+1}^{[j]}$, son intercambiadas con una probabilidad dada por la ecuación 2.78.

Cabe destacar que, en el paso dos, sólo pueden ser intercambiadas pares de réplicas correspondientes a temperaturas vecinas, debido a que la probabilidad de aceptación del intercambio decrece exponencialmente con la diferencia de βs, por la ecuación 2.78 (asumiendo que $\beta_1 < \beta_2 < ... < \beta_M$). Esto quiere decir que cuanto mayor sea la diferencia entre las temperaturas menos probable resulta que el intercambio entre réplicas suceda.

Resumiendo, una simulación de REM consiste en cálculos de dinámica molecular clásica de réplicas del sistema a distintas temperaturas durante un período fijo de tiempo. Luego, se realiza una comparación de la energía de dos réplicas sucesivas en temperatura y se efectúa el intercambio de temperatura entre ellas dependiendo de la probabilidad que viene dada por 2.78. Si una réplica que se encuentra a una mayor temperatura posee menor energía que su vecina a menor temperatura (por lo que $\Delta \leq 0$), el intercambio se realiza con una probabilidad de 1. En cambio, si esto no sucede, es decir $\Delta > 0$, la probabilidad del intercambio viene dada por exp(- $\triangle$). Una vez evaluado el intercambio y realizado en los casos pertinentes, el ciclo vuelve a comenzar realizando el cálculo de dinámica molecular clásica de las réplicas. Debe tenerse en cuenta que debido a que cada réplica posee dos vecinos, se alterna en cada vuelta del ciclo el vecino con respecto al cual es evaluado el intercambio. El número de ciclos se elije de forma tal que se realicen numerosos intercambios, ya que así se efectúa un muestreo de todo el espacio conformacional.

Asimismo, resulta importante elegir una distribución de temperatura adecuada para que la técnica de REM sea exitosa. Se debe seleccionar el rango de temperatura tal que haya una misma probabilidad de intercambio entre pares adyacentes a lo largo de todo el intervalo de temperatura. Existen diversos sitios web que ofrecen la distribución de temperaturas para tener una corrida exitosa [30], teniendo en cuenta diversos factores entre los que se encuentran: el número de átomos en la proteína y del solvente. Un problema que tiene esta metodología es que se deben realizar los cálculos de las distintas copias en simultáneo, lo cual es muy costoso computacionalmente.

En general, una vez realizada la simulación de REM se analizan las trayectorias correspondientes a las temperaturas más bajas. Sin embargo, debe ser tenido en cuenta, que dichas trayectorias no son continuas, ya que cada cierto intervalo de tiempo sucede un intercambio entre réplicas. Por lo que, no puede ser considerada dicha trayectoria como una evolución temporal del sistema. Por otro lado, en el caso de que uno analice la trayectoria correspondiente a una única réplica, debe ser contemplado que, durante la misma, suceden eventos de intercambio de temperatura. Dichos eventos dan como resultado un muestreo estadístico que no se corresponde con la exploración conformacional, obtenida a partir de una dinámica molecular estándar en el ensamble canónico.

2.1.3. Análisis de las simulaciones

Visualización gráfica

La visualización de los resultados obtenidos por los métodos computacionales anteriormente presentados se realiza a través de algún programa de representación gráfica. Con ellos puede analizarse la evolución de parámetros geométricos claves, como distancias, ángulos, ángulos diedros y otros

parámetros de relevancia estructural como interacciones de puente de hidrógeno e hidrofóbicas. Por otro lado, en el caso de una macromolécula, puede observarse la dinámica de la estructura terciaria, aunque los movimientos globales asociados a ella muchas veces requieren un largo tiempo de simulación para ser observados. El programa de visualización utilizado durante este trabajo fue el programa Visual Molecular Dynamics (VMD), el cual presenta una gran cantidad de herramientas muy útiles para el análisis de una simulación de DM [31].

Raíz cuadrada de la desviación cuadrática media

La desviación cuadrática media (RMSD por sus iniciales en inglés) respecto a una estructura de referencia es un parámetro que permite estudiar la estabilidad de la estructura a lo largo de la simulación y se calcula a través de la siguiente función:

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}\delta_i^2}. \tag{2.79}$$

En la expresión 2.79, N corresponde al número de átomos del sistema, y δ_i a la distancia entre las posiciones del átomo i en dos estructuras distintas, una de las cuales corresponde a la estructura de referencia. Dicha estructura puede corresponder a la estructura cristalográfica o bien la estructura promedio de la dinámica. Si se realiza este cálculo para cada una de las “fotos” de la simulación se obtiene el RMSD en función del tiempo. Esta función otorga noción de la magnitud de las fluctuaciones del sistema a lo largo de la dinámica, es decir, como una función del tiempo.

2.1.4. Energía libre de unión

La unión proteína-sustrato es un fenómeno de gran interés debido a su importancia en la función proteica. Además, su comprensión resulta crucial a la hora de realizar un diseño racional de drogas. En particular, conocer el valor de la energía libre de unión resulta valioso debido a que provee información acerca de los factores energéticos responsables de la afinidad entre la proteína y el ligando.

Existen diversos métodos para calcular estas energías libres, entre los que se destacan: los métodos “de los procesos de unión” y “del estado final”. Los métodos del primer grupo, entre los que se destacan lo métodos *Free Energy Perturbation* e integración termodinámica, a pesar de ser muy rigurosos, son computacionalmente costosos y resulta imposible llevarlos a cabo cuando el tamaño del sistema es muy grande. Esto se debe, primero, a que se trata al solvente de forma explícita y, segundo, a que con el objetivo de alcanzar la convergencia, se determina la diferencia de energía libre entre dos estados utilizando simulaciones que son llevadas a cabo a través de puntos intermedios, a lo largo de una coordenada de reacción que une dichos estados. Los métodos denominados “del estado final”, en

cambio, calculan la diferencia de energía libre a partir de los estados finales, por lo que no resulta necesario calcular estados intermedios, y tienen en cuenta los efectos del solvente de forma implícita utilizando métodos de solvente continuo. Esto trae aparejado una reducción considerable del costo computacional, razón por la cual son ampliamente utilizados.

Los métodos más conocidos de este tipo son: Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area (MM-PBSA) [32] y Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area (MM-GBSA) [33]. Estos métodos, además, poseen la ventaja de que permiten analizar las contribuciones energéticas individuales, a través de la descomposición de los promedios de energía libre, dando una profundidad adicional a la energética del sistema que está siendo investigado.

En estos métodos la energía libre de un estado es estimada como la siguiente suma:

$$G = E_{un} + E_{el} + E_{vdW} + G_{pol} + G_{np} - TS \tag{2.80}$$

donde los primeros tres términos corresponden a las energías dadas por la mecánica molecular, utilizando el campo de fuerza que se emplea (para la unión, las interacciones electrostáticas y las de van der Waals, ver sección 2.1.1.2 para mayor información). Por otro lado, G_{pol} y G_{np} son las contribuciones polares y no polares de la energía libre de solvatación respectivamente. G_{pol} es estimado a través de un modelo de solvente implícito que puede obtenerse al resolver la ecuación de Poisson-Boltzmann (PB), en el caso de MM-PBSA, o utilizando el modelo generalizado de Born (GB), en el caso de MM-GBSA (ver sección 2.1.1.2 para mayor información). El término no polar proviene de la energía libre requerida para la formación de una cavidad para el soluto en el seno del solvente. Esta contribución es estimada a partir del área accesible al solvente (*Solvent Accesible Surface Area*, SASA), la cual fue definida en 1971 por Lee y Richards [34] y existen diversos métodos para calcularla. Uno de los métodos más comúnmente utilizados es el algoritmo de Sharke y Rupley [35], en el cual una esfera con un radio de prueba determinado que depende del solvente (1,4 Åes el valor usado para agua) se hace rodar a lo largo de la superficie de la molécula. Los valores de SASA se expresan comúnmente en $Å^2$. El último término en la ecuación 2.80 corresponde a la temperatura absoluta, T, multiplicada por la entropía, S, la cual es estimada a partir de un análisis de modos normales de las frecuencias vibracionales [36, 37].

A partir de las energías libres calculadas para la proteína, el ligando y el complejo proteína-ligando (utilizando la ecuación 2.80), la energía libre de unión puede ser calculada como la diferencia entre la energía libre del complejo unido y la suma de las energías libres de la proteína y ligando libres, como se muestra en la ecuación 2.81.

$$\Delta G_{\text{unión, solvatado}} = \Delta G_{\text{complejo, solvatado}} - \left[\Delta G_{\text{proteína, solvatado}} + \Delta G_{\text{ligando, solvatado}}\right] \tag{2.81}$$

En la práctica, los cálculos de MM-PBSA o MM-GBSA se realizan luego de una simulación de DM larga, a partir de la cual se colectan un número alto de estructuras (fotos) del sistema de manera

aleatoria. En general, estas simulaciones son realizadas con solvente explícito, pero luego se eliminan las moléculas de solvente (es decir, no son consideradas) y la energía libre es calculada como se explicó anteriormente. La razón por la cual se procede de esta manera es porque las simulaciones calculadas directamente con solvente implícito han demostrado ser menos precisas [38]. El cálculo de energía libre de unión puede realizarse a partir de tres trayectorias diferentes: una para el complejo, otra para la proteína y otra para el ligando, pero en general se utiliza una única trayectoria (la correspondiente al complejo, lo que requiere que su estructura sea conocida sino no podrá ser utilizado) y se calculan las tres energías libres a partir de ella. Esta metodología, si bien tiene la desventaja de no considerar la flexibilidad del ligando y la proteína libre, tiene la ventaja de ser menos costosa computacionalmente. Además, se alcanza la convergencia de los resultados de forma más rápida y estos resultan ser menos ruidosos debido a la cancelación de los parámetros conformacionales en regiones lejanas al sitio de unión. El módulo del paquete *Amber* que realiza este cálculo se encarga de remover automáticamente tanto el solvente explícito como de construir las tres nuevas trayectorias a partir de la DM del complejo. Una vez realizado esto, se calcula el valor de energía libre.

Si bien MM-PBSA funciona mejor para predecir el valor absoluto, MM-GBSA es capaz de predecir mejor la afinidad relativa entre complejos [39] y resulta, además, menos costoso. Esto hace que sea una herramienta muy útil a la hora del diseño racional de fármacos, debido a que puede explicar selectividades diferenciales, según valores de afinidad, lo cual resulta clave a la hora de selección el mejor ligando entre muchos.

Debe tenerse en cuenta que los resultados de estos cálculos en forma aislada pueden resultar en valores no consistentes con los datos experimentales, sin embargo permiten obtener tendencias comparativas muy útiles en el estudio de las interacciones proteína-ligando [39-41].

2.1.5. Modelado por homología

El objetivo del modelado por homología es construir un modelo tridimensional para una proteína de la cual no se conoce su estructura, usando como base proteínas de secuencia similar con estructura conocida [8, 42]. Si la función de la proteína de interés es conocida resulta bastante común utilizar proteínas con la misma función como molde. En cambio, si la función es desconocida se realiza una búsqueda de la familia a la que pertenece a partir de su secuencia en diversas bases de datos.

Con la finalidad de construir un modelo exitoso deben alcanzarse dos condiciones: debe haber similitud de secuencia entre la proteína que se quiere saber la estructura y el molde y, además, ambas proteínas deben estar alineadas correctamente. Está técnica es la única manera de obtener información estructural cuando los métodos experimentales fallan. El modelado por homología

resulta una herramienta útil debido a que cambios pequeños en la secuencia proteica se traducen en pequeños cambios en la estructura tridimensional.

El modelado por homología involucra tres etapas:

- **Alineamiento de secuencia**: el cual es realizado con la expectativa de que la coincidencia en la posición de un grupo de aminoácidos sea reflejo de una estructura similar. Mientras mayor sea el número de secuencias utilizadas como molde, más confiable será el alineamiento y, por ende, el modelo construido. El alineamiento es llevado a cabo utilizando una matriz de sustitución que da un peso probabilístico al alinear dos pares de aminoácidos de cada secuencia. Existen diversos programas que realizan este alineamiento secuencial (Clustal-W [43], BLAST [44] y PSI-BLAST [45]) y que también son capaces de buscar secuencias homólogas a la de interés en base de datos.

- **Construcción del modelo**: el alineamiento anteriormente realizado sirve de entrada para el programa que realiza la construcción del modelo. En general, el proceso de construcción es bastante directo, incluso en muchos casos puede transferirse la estructura desde el molde a la proteína en cuestión. En este trabajo, el programa utilizado fue *Modeller* [42, 46, 47] el cual aplica restricciones espaciales obtenidas a partir del alineamiento y de considerar las restricciones estereoquímicas provenientes del campo de fuerza CHARMM-22 junto con datos estadísticos. Este programa utiliza el gradiente conjugado y DM para optimizar el modelo.

- **Evaluación del modelo**: los modelos obtenidos son evaluados para confirmar que posean sentido físicoquímico. La evaluación puede realizarse a través del gráfico de Ramachandran, donde se determina si hay aminoácidos ocupando regiones energéticamente desfavorables o por comparación de parámetros estadísticos.

Si el modelo construido no resulta satisfactorio puede cambiarse el molde y repetirse estas tres etapas hasta obtener un modelo satisfactorio.

2.2. Métodos experimentales

2.2.1. Espectroscopía UV-visible

En la presente tesis se utilizó espectroscopía UV-visible (UV-vis) para el estudio de reacciones en solución, caracterizando a través de ella tanto reactivos como productos. Esta técnica resulta de gran utilidad en el estudio de las hemoproteínas, ya que poseen un espectro muy distintivo. Para el seguimiento de las reacciones se observaron los cambios en las bandas de Soret ($\epsilon \sim$ 1-2 10^5 $M^{-1}cm^{-1}$), que se encuentran a alrededor de 400 nm y en las bandas Q ($\epsilon \sim$ 1-1,5 10^4 $M^{-1}cm^{-1}$), que se encuentran a alrededor de 500-600 nm.

Los espectros UV-Visible se obtuvieron empleando un espectrofotómetro Hewlett Packard 8453 con arreglo de diodos, termostatizable, disponible en el laboratorio. Además, se utilizaron cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. En el caso de mediciones de soluciones sensibles a oxígeno, se burbujeó nitrógeno a cubetas con cierre a rosca y septos de silicona que permite el agregado de reactivos mediante el uso de una jeringa.

2.2.2. Cinética rápida de flujo detenido

Las reacciones estudiadas experimentalmente en el transcurso de esta tesis eran muy veloces, es por ello que los tiempos de mezclado y de medida resultaron ser parámetros claves a tener en cuenta a la hora de estudiar la cinética de dichas reacciones. Los métodos de flujo detenido minimizan dichos tiempos y es por ello que fueron utilizados en la presente tesis. La característica clave de esta técnica es que logra mezclar pequeñas cantidades de las soluciones de los reactivos en un tiempo muy breve en comparación al mezclado manual. Para lograrlo, estos métodos poseen un dispositivo en el cual se inyectan las soluciones en un lugar de mezclado, el cual se ajusta con un émbolo que se mueve hacia atrás a medida que los fluidos entran. El flujo cesa cuando el émbolo alcanza un tope y la reacción continúa en las soluciones mezcladas que son trasladadas a la cubeta de medición. Sobre la mezcla se hacen medidas espectroscópicas en función del tiempo [48].

La figura 2.1 muestra el esquema básico del equipo de flujo detenido utilizado (SFM-300 Bio-Logic). Las soluciones con los reactivos son depositadas inicialmente en las jeringas través de cánulas anaeróbicas de PFTE (Teflon®). Dichas jeringas poseen émbolos accionables por un sistema controlado electrónicamente que permite variar la relación de soluciones a agregar. Las soluciones, al disparar el mecanismo, se impulsan hacia el lugar de mezclado, donde el mismo se realiza en pocos milisegundos. Dependiendo del caso bajo estudio, la mezcla pasa directo a la cubeta que posee ventanas de cuarzo o bien, va hacia otro lugar de mezclado donde es agregado un tercer reactivo. Todo el sistema fue

termostatizado a 25° C. Este equipo posee un detector JyM TIDAS high-speed arreglo de diodos y lámparas de deuterio y tungsteno (200-1015 nm rango de longitud de onda). El sistema se operó usando el software Bio-Kine 4.50, el cual también fue utilizado para el análisis de los datos. Todas las medidas cinéticas se midieron bajo condiciones de pseudo primer orden.

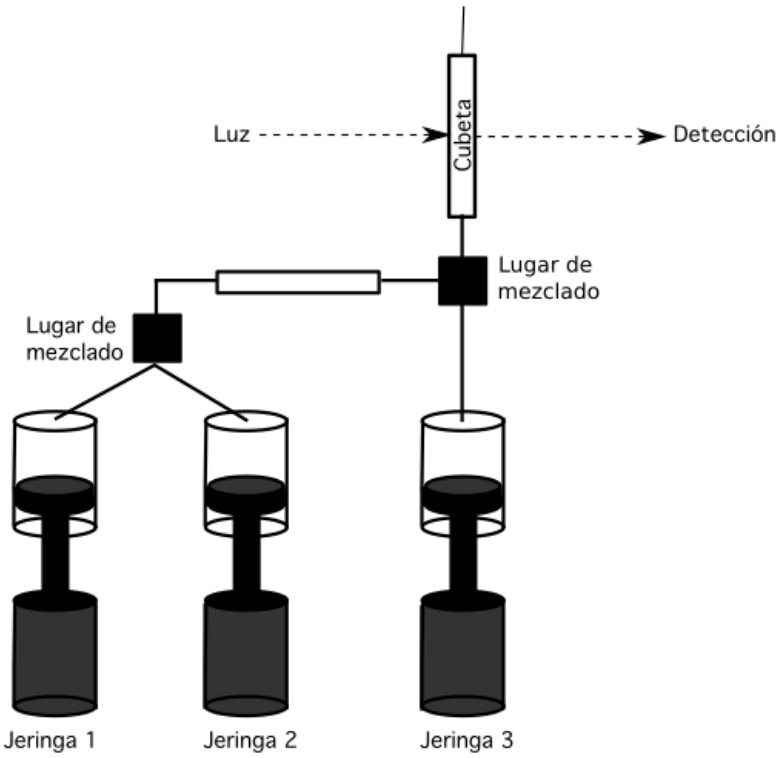


Figura 2.1: Esquema del equipo de flujo detenido SFM-300 utilizado en la presente tesis.

2.2.3. Detección electroquímica de HNO

El HNO, debido a su alta reactividad, resulta ser una molécula de muy difícil detección. Sin embargo, en el grupo donde se realizó la presente tesis fue desarrollado un método amperométrico para su detección [49-51]. En el mismo, se utiliza la porfirina (5,10,15,20-tetrakis [3-(*p*-acetiltiopropoxi)fenil] de cobalto (II) –Co(II)– (ver figura 2.2) con cuatro sustituyentes que poseen átomos de azufre (S), lo cual facilita la inmovilización eficiente de la porfirina en la superfice de oro del electrodo de trabajo (sensor de HNO). La elección de la porfirina de Co se debe a que el HNO reacciona con Co(III), pero no con Co(II), mientras que el $NO^{\cdot}$ se comporta de forma inversa. Estas características hacen que la porfirina sea selectiva a HNO y no a $NO^{\cdot}$. Por otro lado, dicha porfirina puede atrapar al HNO a muy pequeñas concentraciones. El sensor consiste en un electrodo de oro modificado con la porfirina de Co, el cual se utiliza como electrodo de trabajo en un sistema electroquímico de tres electrodos

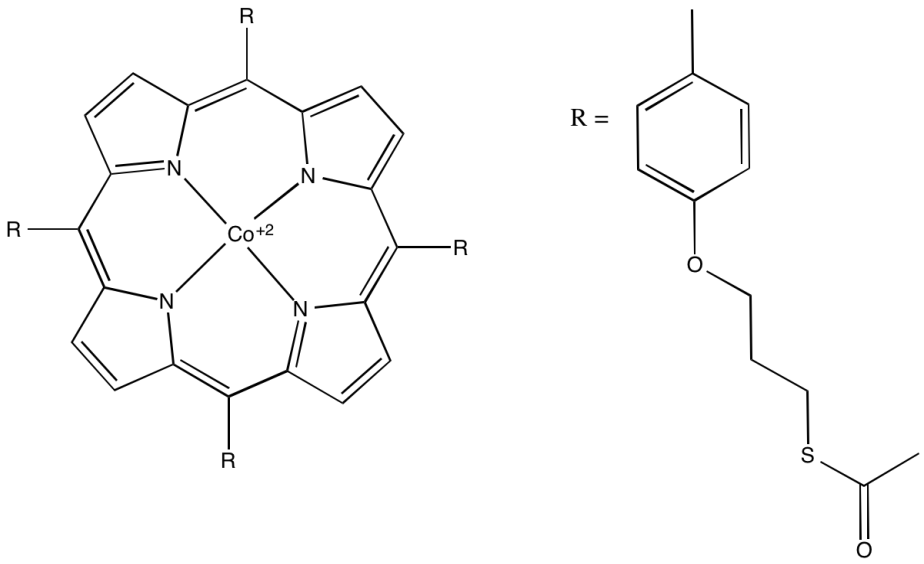


Figura 2.2: Estructura de Co(II)-5,10,15,20-tetrakis [3-(*p*-acetiltiopropoxy)fenil].

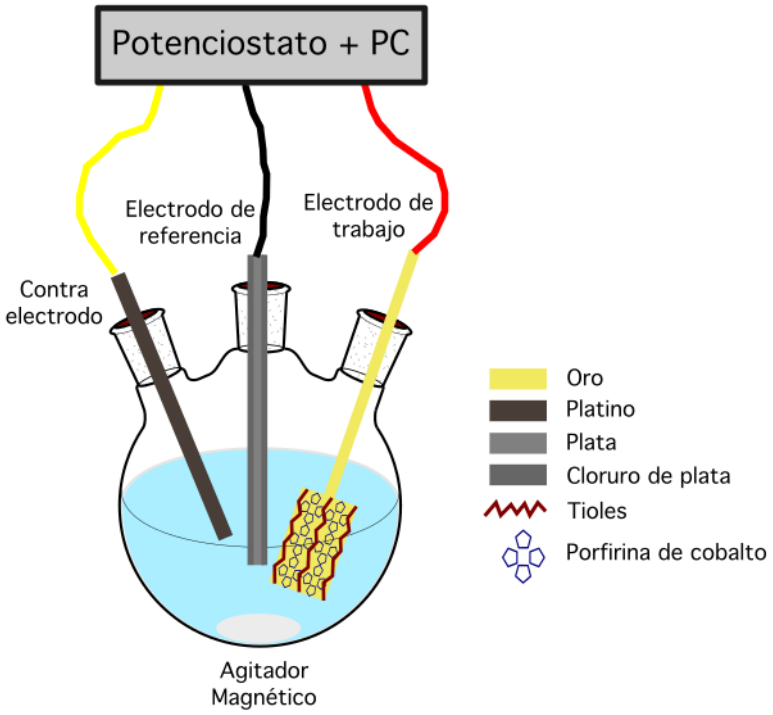


Figura 2.3: Esquema del sistema de tres electrodos utilizado en la medición amperométrica de HNO.

(trabajo, contraelectrodo y referencia), ver la figura 2.3. Se mide, entonces, la intensidad de corriente a un potencial fijado a 0,8 V (potencial en el cual la especie Co(III)P es estable). La reacción de HNO con la porfirina da lugar al complejo nitrosilado, Co(III)PNO$^-$, que al potencial de trabajo es oxidado a la especie Co(III)PNO. Debido a la labilidad de este último complejo, el NO es liberado rápidamente, lo cual permite que el ciclo catalítico se repita (ver figura 2.4). Con el objetivo de evitar la señal debido a

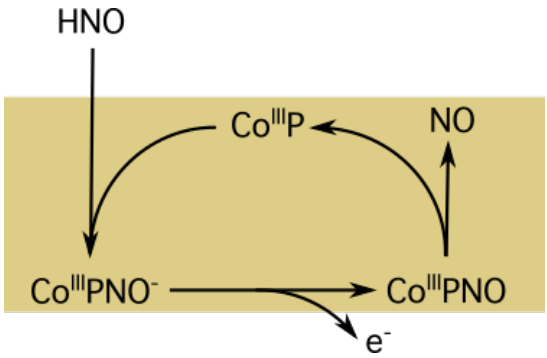


Figura 2.4: Esquema mecanístico de la reacción que ocurre en la superficie del electrodo de HNO, lo que produce una intensidad de corriente que resulta ser proporcional a la concentración de HNO en la solución.

la reacción directa del NO$^{\cdot}$ con la superficie de oro descubierta, luego de unir la porfirina, los huecos remanentes son ocupados por tioles alifáticos. Como control, se ha confirmado que la unión de la porfirina a la superficie no produce cambios en su selectividad al HNO.

Por otro lado, se ha determinado una relación entre la concentración de HNO en solución y la corriente medida

$$I = \frac{nFAD_{\mathrm{HNO}}}{\delta}[HNO] = k_{\mathrm{e,HNO}}[HNO], \tag{2.82}$$

donde n es el número de electrones por mol de HNO, F es la constante de Faraday, A es la superficie del electrodo en cm^2, D_{HNO} es el coeficiente de difusión para el HNO y δ corresponde al grosor de la capa de difusión. Debido a que todos estos términos resultan constantes para un sistema, pueden agruparse en una constante que se denomina $k_{\mathrm{e,HNO}}$. Para un sistema dado, dicha constante se determina mediante el uso de sal de Angeli, donante de HNO con comportamiento bien estudiado. El electrodo ha sido ampliamente utilizado en diversos sistemas [51-54], lo cual confirma su utilidad.

Referencias

1. McQuarrie, D. y Simone, J. *Physical Chemistry. A molecular approach* (University Science Books, 1997).
2. Kohanoff, J. *Electronic Structure Calculations for Solids and Molecules* (Cambridge, 2006).
3. Scherlis, D. *Notas de Química Cuántica* (Curso de Química Cuántica Avanzada, 2012).
4. Hohenberg, P. y Kohn, W. Inhomogeneous Electron Gas. *Phys. Rev.* **136,** B864-B871 (3B 1964).
5. Kohn, W. y Sham, L. J. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Physical Review* **140,** A1133-A1138 (4A 1965).

6. Perdew, J. P., Burke, K. y Ernzerhof, M. Generalized Gradient Approximation Made Simple. *Physical Review Letters* **77,** 3865-3868 (18 1996).

7. Becke, A. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *The Journal of Chemical Physics* **98,** 5648-5652 (1993).

8. Leach, A. R. *Molecular Modelling. Principles and Application* (Longman, 1996).

9. Case, D. A. *y col.* The Amber biomolecular simulation programs. *Journal of Computational Chemistry* **26,** 1668-1688 (2005).

10. Ponder, J. W. y Case, D. A. *Force Fields for Protein Simulations* (ed. in Protein, C. A.) **Volume 66** (Academic Press, 2003), 27-85.

11. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W. y Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics* **79,** 926 (1983).

12. Fogolari, F., Brigo, A. y Molinari, H. The Poisson–Boltzmann equation for biomolecular electrostatics: a tool for structural biology. *Journal of Molecular Recognition* **15,** 377-392 (2002).

13. Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J. y McCammon, J. A. Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98,** 10037-10041 (2001).

14. Lu, B., Zhag, D. y McCammon, J. A. Computation of electrostatic forces between solvated molecules determined by the Poisson–Boltzmann equation using a boundary element method. *The Journal of Chemical Physics* **122,** 214102 (2005).

15. Shestakov, A. I., Milovich, J. L. y Noy, A. Solution of the Nonlinear Poisson–Boltzmann Equation Using Pseudo-transient Continuation and the Finite Element Method. *Journal of Colloid and Interface Science* **247,** 62-79 (2002).

16. Still, W. C., Tempczyk, A., Hawley, R. C. y Hendrickson, T. Semianalytical treatment of solvation for molecular mechanics and dynamics. *Journal of the American Chemical Society* **112,** 6127-6129 (1990).

17. Onufriev, A., Case, D. A. y Bashford, D. Effective Born radii in the generalized Born approximation: The importance of being perfect. *Journal of Computational Chemistry* **23,** 1297-1304 (2002).

18. Ewald, P. P. Die Berechnung optischer und elektrostatischer Gitterpotentiale. *Annalen der Physik* **369,** 253-287 (1921).

19. Darden, T., Perera, L., Li, L. y Pedersen, L. New tricks for modelers from the crystallography toolkit: the particle mesh Ewald algorithm and its use in nucleic acid simulations. *Structure* **7,** R55-R60 (1999).

20. Senn, H. M. y Thiel, W. QM/MM Methods for Biomolecular Systems. *Angewandte Chemie International Edition* **48,** 1198-1229 (2009).

21. Lin, H. y Truhlar, D. G. QM/MM: what have we learned, where are we, and where do we go from here? *Theoretical Chemistry Accounts* **117,** 185 (2006).

22. Eichinger, M., Tavan, P., Hutter, J. y Parinello, M. A hybrid method for solutes in complex solvents: Density functional theory combined with empirical force fields. *The Journal of Chemical Physics* **110,** 10452-10467 (1999).

23. Verlet, L. Computer Experiments on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Phys. Rev.* **159,** 98-103 (1 1967).

24. Berendsen, H., Postma, J., Van Gunsteren, W. F., DiNola, A. y Haak, J. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics* **81,** 3684-3690 (1984).

25. Jarzynski, C. Nonequilibrium Equality for Free Energy Differences. *Physical Review Letters* **78,** 2690-2693 (1997).

26. Cossins, B. P., Foucher, S., Edge, C. A. y Essex, J. W. Protein-Ligand Binding Affinity by Nonequilibrium Free Energy Methods. *Journal of Physical Chemistry B* **112,** 14985-14992 (2008).

27. Kirkwood, J. G. Statistical Mechanics of Fluid Mixtures. *The Journal of Chemical Physics* **3,** 300-313 (1935).

28. Kumar, S., Rosenberg, J. M., Bouzida, D., Swendsen, R. H. y Kollman, P. A. The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method, The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method. *Journal of Computational Chemistry, Journal of Computational Chemistry* **13, 13,** 1011, 1011-1021, 1021 (1992).

29. Sugita, Y. y Okamoto, Y. Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding. *Chemical Physics Letters* **314,** 141-151 (1999).

30. Patriksson, A. y van der Spoel, D. A temperature predictor for parallel tempering simulations. *Physical Chemistry Chemical Physics* **10,** 2073-2077 (2008).

31. Humphrey, W., Dalke, A. y Schulten, K. VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics* **14,** 33-38 (1996).

32. Gouda, H., Kuntz, I. D., Case, D. A. y Kollman, P. A. Free energy calculations for theophylline binding to an RNA aptamer: Comparison of MM-PBSA and thermodynamic integration methods. *Biopolymers* **68,** 16-34 (2003).

33. Gohlke, H., Case, D. a., Biology, M., Scripps, T. y Rd, N. T. P. Converging Free Energy Estimates: MM-PB (GB) SA Studies on the Protein - Protein Complex Ras -Raf. *Journal of Computational Chemistry* **25,** 238-250 (2003).

34. Lee, B. y Richards, F. M. The interpretation of protein structures: Estimation of static accessibility. *Journal of Molecular Biology* **55,** 379-400 (1971).

35. Shrake, A. y Rupley, J. A. Environment and exposure to solvent of protein atoms. Lysozyme and insulin. *Journal of Molecular Biology* **79,** 351-371 (1973).

36. Brooks, B. R., Janežič, D. y Karplus, M. Harmonic analysis of large systems. I. Methodology. *Journal of Computational Chemistry* **16,** 1522-1542 (1995).

37. Karplus, M. y Kushick, J. N. Method for estimating the configurational entropy of macromolecules. *Macromolecules* **14,** 325-332 (1981).

38. Oehme, D. P., Brownlee, R. T. C. y Wilson, D. J. D. Effect of atomic charge, solvation, entropy, and ligand protonation state on MM-PB(GB)SA binding energies of HIV protease. *Journal of Computational Chemistry* **33,** 2566-2580 (2012).

39. Hou, T., Wang, J., Li, Y. y Wang, W. Assessing the Performance of the MM/PBSA and MM/GBSA Methods. 1. The Accuracy of Binding Free Energy Calculations Based on Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling* **51,** 69-82 (2011).

40. Kongsted, J., Soederhjelm, P. y Ryde, U. How accurate are continuum solvation models for drug-like molecules? *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **23,** 395-409 (2009).

41. Swanson, J. M. J., Henchman, R. H. y McCammon, J. A. Revisiting Free Energy Calculations: A Theoretical Connection to MM/PBSA and Direct Calculation of the Association Free Energy. *Biophysical Journal* **86,** 67-74 (2004).

42. Marti-Renom, M. A. *y col.* Comparative Protein Structure Modeling of Genes and Genomes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **29,** 291-325 (2000).

43. Thompson, J. D., Higgins, D. G. y Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22,** 4673-4680 (1994).

44. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215,** 403-410 (1990).

45. Altschul, S. F. *y col.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25,** 3389-3402 (1997).

46. Fiser, A. y Sali, A. *Macromolecular Crystallography, Part D* (ed. in Enzymology, B. T. .-.-. M.) 461-491 (Academic Press, 2003).

47. Eswar, N. *y col.* *Current Protocols in Bioinformatics* (John Wiley & Sons, Inc., 2006).

48. Beckwith, P. M. y Crouch, S. R. Automated stopped-flow spectrophotometer with digital sequencing for millisecond analyses. *Analytical Chemistry* **44,** 221-227 (1972).

49. Suarez, S. a., Bikiel, D. E., Wetzler, D. E., Marti, M. a. y Doctorovich, F. Time-resolved electrochemical quantification of azanone (HNO) at low nanomolar level. *Analytical Chemistry* **85,** 10262-10269 (2013).

50. Suarez, S. a. *y col.* A surface effect allows HNO/NO discrimination by a cobalt porphyrin bound to gold. *Inorganic Chemistry* **49,** 6955-6966 (2010).

51. Suarez, S. A., Muñoz, M., Bikiel, D. E., Marti, M. A. y Doctorovich, F. *The Chemistry and Biology of Nitroxyl (HNO)* (eds. Doctorovich, F., Farmer, P. J. y Marti, M. A.) 239-253 (Elsevier, Boston, 2017).

52. Loas, A., Radford, R. J., Deliz Liang, A. y Lippard, S. J. Solid-phase synthesis provides a modular, lysine-based platform for fluorescent discrimination of nitroxyl and biological thiols. *Chemical Science* **6,** 4131-4140 (2015).

53. Heinecke, J. L. *y col.* Nitrite Reduction Mediated by Heme Models. Routes to NO and HNO? *Journal of the American Chemical Society* **135,** 4007-4017 (2013).

54. Suarez, S. A. *y col.* Nitric Oxide Is Reduced to HNO by Proton-Coupled Nucleophilic Attack by Ascorbate, Tyrosine, and Other Alcohols. A New Route to HNO in Biological Media? *Journal of the American Chemical Society* **137** (2015).

CAPÍTULO 3

DIOXIGENASAS HÉMICAS

La indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) y la triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO) son las únicas dos dioxigenasas hémicas que han sido detectadas en humanos. Estas proteínas catalizan la ruptura oxidativa del triptófano (Trp)[1] en el caso de la TDO o de otros compuestos con un anillo indólico en el caso de la IDO, para dar N-formilquinurenina (Nfk), agregando los dos átomos de la molécula de O_2 al enlace C2=C3 del anillo indólico del triptófano (ver esquema 3.1).

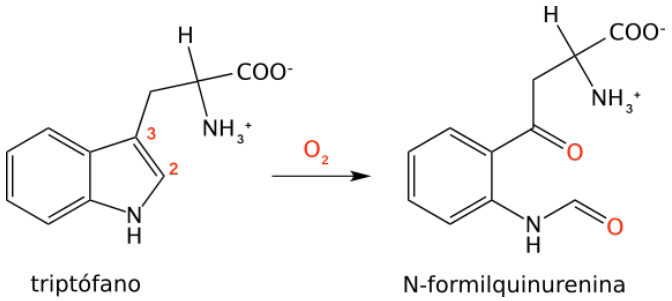


Figura 3.1: Esquema de la reacción de dioxigenación de triptófano para dar N-formilquinurenina.

Esta reacción consiste no sólo en el primer paso, sino también en el limitante de la ruta de la quinurenina, a través de la cual el 95% del L-Trp incorporado en la dieta es convertido en la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD). El Trp restante es utilizado para la síntesis de serotonina, melatonina y de proteínas. Otro de los puntos relevantes relacionados con la función de estas enzimas es el rol que tienen en la regulación del sistema inmune. El metabolismo del Trp puede causar una supresión inmunológica, detectada en diversos tipos de cáncer. Esto se debe a que las células T, responsables de coordinar la respuesta inmune celular, sensan los bajos niveles de Trp y activan una respuesta que da lugar a la detención del ciclo celular y su posterior muerte [1]. Otros estudios proponen que esta no es la única vía por la cual ocurre la inmunosupresión, debido a la

[1] En la presente tesis se utilizará Trp para referirse al L-Trp, salvo que sea indicado específicamente.

degradación de Trp, sino que sus metabolitos se unen a un receptor de hidrocarburos de arilo (AhR), dando como resultado la reprogramación de la diferenciación de las células T helpers (Th) a células T regulatorias (Treg) [2]. Esto disminuye la efectividad de la respuesta inmune contra el antígeno. Lo dicho anteriormente, sumado al hecho de que la expresión de la IDO y de la TDO se ve exacerbada en células tumorales, hace pensar que ambas proteínas cumplen un rol clave en el escape tumoral del sistema inmune. Debido a esto son consideradas posibles blancos para la terapia anticancerígena [1, 3-6]. Cabe destacar que tanto inhibidores de la IDO, como de la TDO, mostraron la reducción del crecimiento tumoral en modelos con ratones [7-9]. En este contexto, resulta importante entender los mecanismos de funcionamiento de estas enzimas, para poder aportar desde la descripción atomística más y mejores inhibidores, así como también una mejor comprensión de la función de estas enzimas en homeostasis.

Si bien ambas proteínas catalizan la misma reacción, existen diversas diferencias entre ellas. Como sus nombres indican, la IDO y la TDO poseen distinta selectividad hacia el sustrato. Mientras que la TDO es específica para L-Trp, la IDO reacciona con diversos compuestos que poseen anillo indólico, como ser L- y D-Trp, triptamina, serotonina, melatonina 5-hidroxitriptófano y 5-hidroxitriptamina [10], aunque la importancia biológica de la oxidación de estos sustratos es aún desconocida. Además, la IDO se encuentra solamente en mamíferos, en los cuales es expresada en diversos tejidos [11, 12]. La TDO, en cambio, es expresada en varios organismos (incluidas bacterias) y, en humanos, es expresada predominantemente en hígado, placenta y cerebro [11, 13].

Las estructuras de la TDO humana (hTDO) [14, 15], *Drosophila melanogaster* TDO [16], *Ralstonia metallidurans* TDO [17] y *Xanthomonas campestris* TDO [18] (xcTDO), muestran que se trata de una proteína homotetramérica con un grupo hemo por monómero y con un peso molecular de alrededor de 167 kDa (ver figura 3.2) [10-12, 18, 19]. Las estructuras de la hTDO, recientemente publicadas [15], resultan muy importantes por tener cristalizados al sustrato y al producto en el sitio activo. La estructura cristalina de la IDO humana (hIDO), en cambio, ha sido obtenida en la forma sin sustrato [20, 21] y muestra que se trata de una proteína monomérica con un peso molecular de alrededor de 45 kDa (ver figura 3.2). A pesar de que los monómeros de ambas proteínas tienen una baja identidad de secuencia entre sí (16 %, ver panel D de la figura 3.2), las estructuras cristalinas revelan alta similitud no sólo en el plegado, sino también en el sitio activo. En particular, ambas proteínas contienen un gran número de residuos aromáticos en el bolsillo distal del hemo. La razón de esto se basa en que debe acomodarse, en el sitio activo, un sustrato hidrofóbico, como es el triptófano. Además, hay residuos presentes en las posiciones equivalentes, como ser la R219 en la hIDO (R144 en la hTDO), F214 (F140 en la hTDO) y F151 (F72 en la hTDO) que, como se mostrará más adelante, están

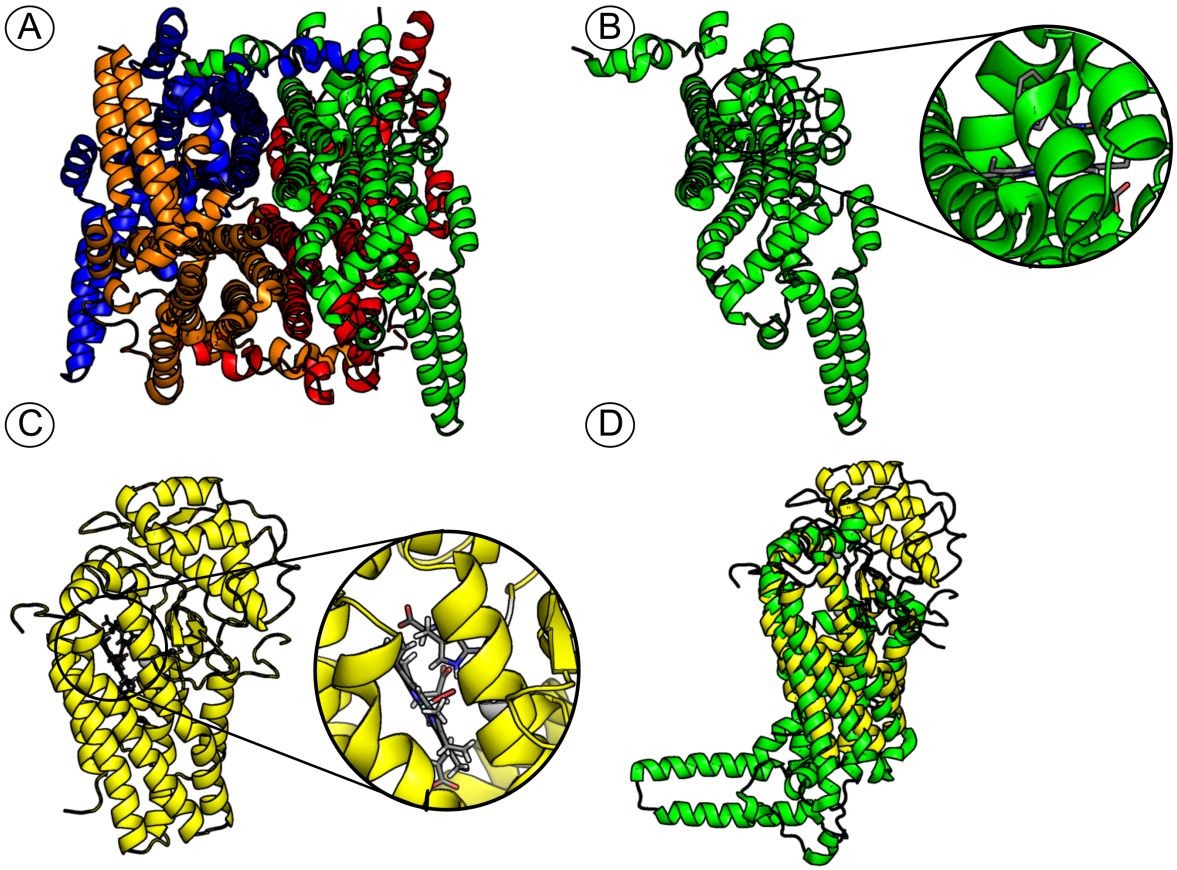


Figura 3.2: (A) Estructura tridimensional cristalizada de la hTDO; (B) cadena A de la hTDO, donde puede verse el grupo hemo y el Trp en el sitio activo; (C) estructura tridimensional cristalizada de hIDO, donde puede verse el grupo hemo y el Trp en el sitio activo y (D) estructuras de la hIDO y la hTDO alineadas por estructura.

directamente involucrados en la unión del sustrato.[2]

Resulta interesante destacar una gran diferencia entre ambos sitios activos, que reside en el hecho de que, en la TDO, hay presente una histidina distal, que es reemplazada por una serina en la hIDO. El sitio activo de la IDO está casi desprovisto de residuos polares (ver figura 3.3). Finalmente, un punto clave que diferencia a ambas enzimas concierne a la unión de los ligandos. Mientras que la IDO forma complejos estables con O_2, independientemente de la presencia de L-Trp, TDO es incapaz de unir O_2 en ausencia de L-Trp [22, 23]. Sin embargo, hace unos años se mostró la existencia de un estado intermediario del complejo oxi de la hTDO en ausencia de L-Trp, que se autooxida rápidamente a la enzima férrica. En el caso de la hIDO, en cambio, este proceso es muchísimo más lento [24]. Sumado a esto, en un trabajo previo del grupo donde se realizó la presente tesis doctoral [25], se encontró —utilizando técnicas de docking y de dinámica molecular— la presencia de dos conformaciones distintas del Trp en el sitio activo de la hIDO denominadas: conformación 1 (Cf1) y conformación 2

[2]En la presente tesis se utilizará el código de una letra para referirse a los aminoácidos, excepto para el triptófano cuando es considerado sustrato de la reacción enzimática bajo estudio. El mismo se encuentra en el apéndice B.

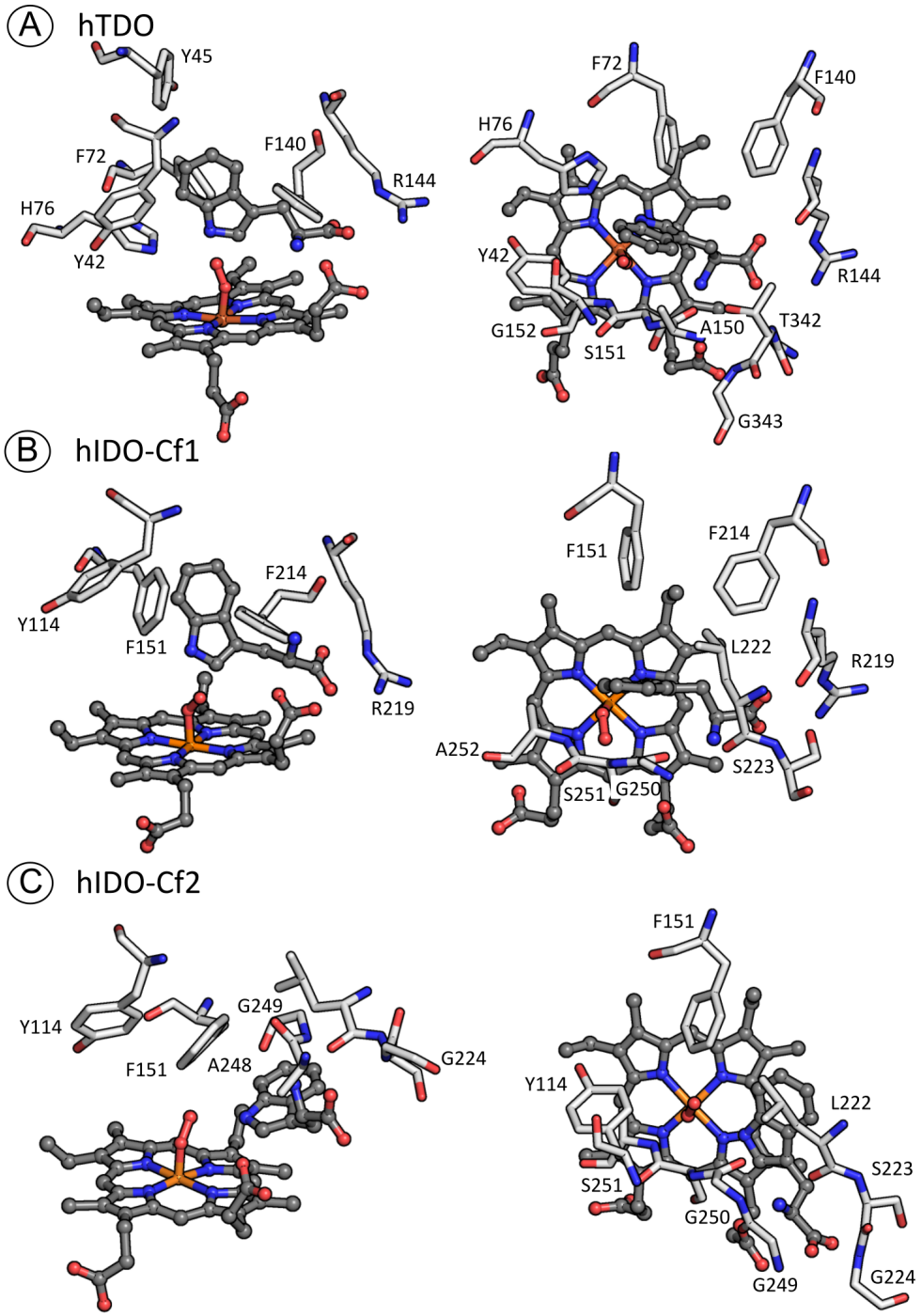


Figura 3.3: Interacciones principales en el sitio activo de (A) la hTDO; (B) la hIDO en la conformación 1 (Cf1) y (C) la hIDO en la conformación 2 (Cf2). Estas figuras provienen de fotografías de la dinámica realizada para cada caso. Para tener una mejor visualización se omitió mostrar los átomos de hidrógeno.

(Cf2) (ver figura 3.3 B y C). Un análisis comparativo de ambas conformaciones con la estructura del complejo terciario de la xcTDO mostró que Cf1 es equivalente al complejo terciario de la xcTDO, el cual, como ha sido demostrado anteriormente, corresponde a la estructura reactiva [25, 26]. Por el contrario, el rol de la Cf2 no se conoce con precisión. La propuesta para este último es que se trataría

de un primer sitio de unión de Trp, para luego ir a Cf1 y también un sitio de unión del producto Nfk, en su migración hacia el solvente. Cabe resaltar que la presencia de dos conformaciones para el Trp, en el sitio activo de la IDO, y de tan sólo una para el sitio activo de TDO, da también una idea de que el sitio activo de la hIDO es más voluminoso y flexible que el de xcTDO.

Este capítulo se centrará en el estudio de estas dos dioxigenasas hémicas con el objetivo de tener un mayor entendimiento de su funcionamiento. Por un lado, se presentarán los resultados del estudio del mecanismo de reacción de la TDO humana y, por otro lado, se presentará el estudio estructural de la IDO humana. Con el objetivo de facilitar la lectura se dividirá el capítulo en dos secciones, una por cada interrogante.

3.1. Mecanismo de dioxigenación de la TDO humana

A pesar de que tanto la IDO como la TDO han sido estudiadas durante décadas, el mecanismo a través del cual los dos átomos de oxígeno son agregados a la molécula de Trp resultó ser desconocido hasta hace pocos años. Tal como se resaltó anteriormente, los sitios activos de ambas proteínas poseen una gran cantidad de residuos equivalentes, que interaccionan con el sustrato, lo que hizo pensar que ambas dioxigenasas llevaban a cabo su función de manera similar [22, 27]. Una de las primeras hipótesis postulaba que la reacción comenzaba con la desprotonación del grupo indolamino del Trp por una base presente del sitio activo, lo cual disparaba la adición electrofílica del oxígeno al enlace C_2 =C_3 dando lugar a un intermediario 3-indolenilperoxo. Luego, dicho intermediario se convertía en Nfk, a través de la formación de un dioxetano o de un arreglo de Criegee (ver figura 3.4 para mayor información). Esta hipótesis era sustentada por diversos resultados experimentales, entre los cuales se destaca el hecho de que la reacción de oxidación de Trp en agua por O_2 singulete daba lugar a un dioxetano [28]. Además, estudios cristalográficos de xcTDO mostraban que había una distancia muy pequeña entre la H55 (H76 en el caso de la proteína humana) y el grupo indolamino del Trp, lo que hizo pensar que este residuo podría tratarse de la base que abstraía el protón y daba comienzo a la reacción [27]. Sin embargo, en el caso de la IDO, la H55 era reemplazada por una serina (S167), residuo que no puede actuar como base a pH fisiológico en el sitio activo [20, 29], por lo que, en este caso, se postuló que era el O_2 unido al grupo hemo la base que iniciaba la reacción [20, 29, 30]. No obstante, surgieron evidencias experimentales que ponían en duda esta hipótesis. Por ejemplo, al realizar en la TDO la mutación de la histidina por alanina (residuo que no puede actuar como base), la TDO, si bien se veía afectada, seguía manteniendo parte de su actividad enzimática [31-33]. El mismo efecto era observado al reemplazar al Trp por el 1-metil-Trp (compuesto que no poseía un protón que pudiera ser abstraído) [34, 35]. Por último, tanto estudios computacionales del grupo hemo en

vacío [36] como en el seno de la proteína [25, 37, 38], mostraron que este mecanismo presentaba una muy alta barrera de activación. Más aún, utilizando una combinación de técnicas experimentales y computacionales [25, 26], se determinó que ni la histidina en la TDO, ni el O_2 en la IDO son capaces de desprotonar al grupo indolamino del Trp.

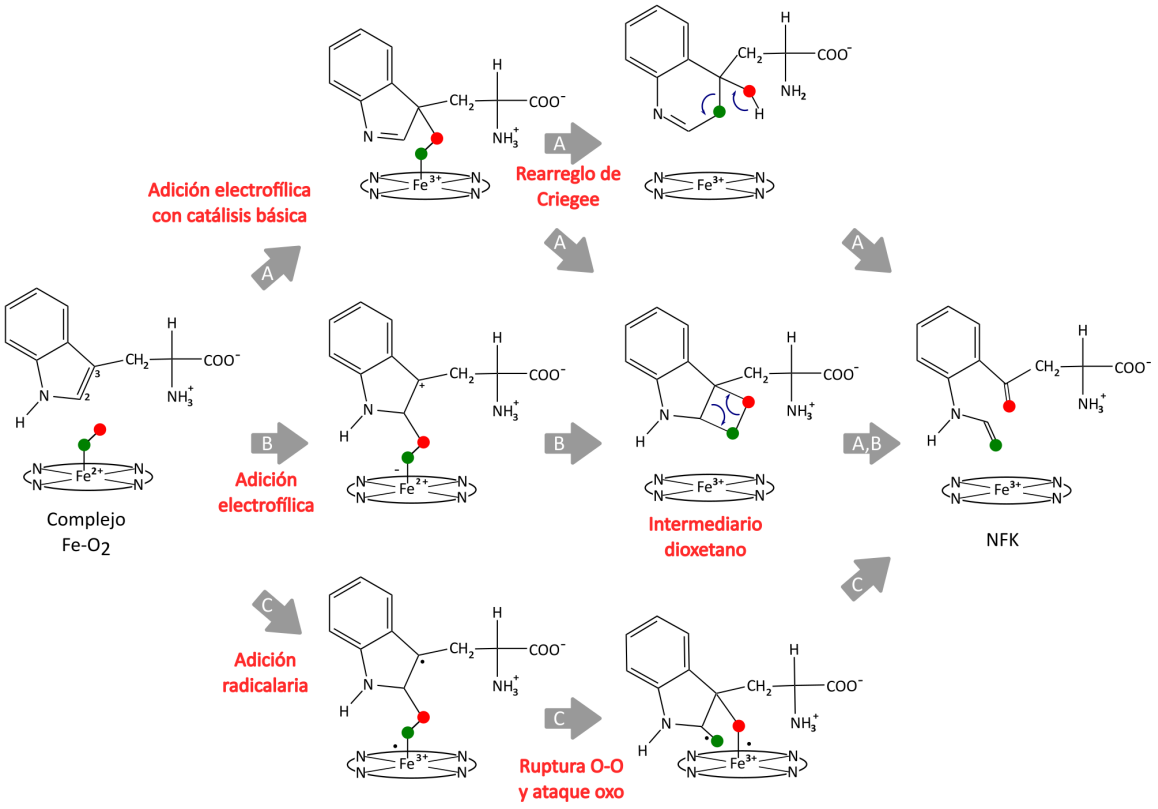


Figura 3.4: Mecanismos propuestos para la reacción de dioxigenación en TDO e IDO.

Con esta información, se postuló otro mecanismo de reacción representado en la figura 3.5. En este mecanismo se propone que la reacción es iniciada por un ataque directo del oxígeno terminal (con un carácter superóxido) al C_2 rico en electrones, sin la previa desprotonación del Trp. Este carácter superóxido estaba sustentado por un valor de la frecuencia de vibración del enlace O-O de 1137 cm^{-1} y es debido a una transferencia electrónica del grupo hemo al O_2. Este superóxido se une al enlace C_2 =C_3 del Trp formando un radical peroxo de estado de transición que, luego, dispara la ruptura del enlace O-O dando lugar a un intermediario ferrilo en el grupo hemo y a un epóxido en el sustrato. La presencia del intermediario ferrilo fue detectada en el caso de la IDO [39] experimentalmente por espectroscopía Raman resonante. El intermediario epóxido fue detectado de forma indirecta a través de la detección de un aminoácido cíclico como producto secundario de la reacción de TDO [40]. Estudios computacionales muestran que en ambas proteínas ocurre la apertura del epóxido, iniciada por la transferencia de un protón del grupo amino al oxígeno del heterociclo, seguida por el ataque

del ferrilo al C_2 del Trp. Esto da lugar a un intermediario, que luego se convierte al Nfk, debido a la ruptura del enlace C_2-C_3 y a la transferencia de vuelta del protón desde el oxígeno al grupo amino.

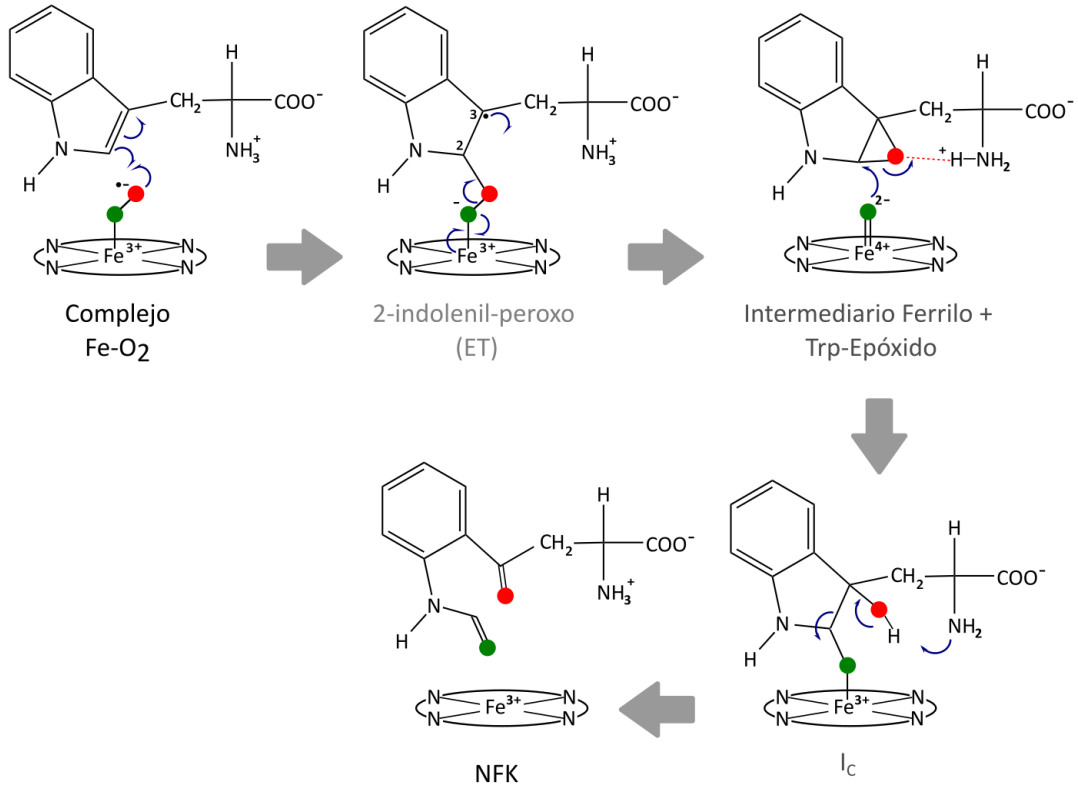


Figura 3.5: Mecanismo para la reacción de dioxigenación en la TDO y en la IDO.

Existe una diferencia entre ambas proteínas y es que en el caso de la xcTDO, luego del primer ataque del oxígeno, no se detecta densidad de espín al realizar el análisis de población, razón por la cual el carácter radical del superóxido no está perfectamente establecido. Asimismo, el segundo estado de transición observado en la hIDO es estabilizado en la xcTDO, por lo cual se convierte en un intermediario. Estas sutiles diferencias resaltan el hecho de que la IDO y la TDO son distintas.

Al comienzo de esta tesis la estructura de la TDO humana era desconocida y es por ello que el mecanismo de reacción había sido estudiado utilizando la estructura de la proteína bacteriana (xcTDO). La obtención reciente del cristal de la TDO humana por parte de colaboradores, abrió las puertas al estudio del mecanismo de reacción utilizando esta estructura, haciendo uso de las mismas técnicas que fueron utilizadas para la hIDO y la xcTDO. En este capítulo se presentarán dichos resultados y se tendrá especial atención en las diferencias moleculares que existen entre dicha proteína y la proteína de bacteria anteriormente estudiada.

3.1.1. Métodos computacionales

Estructuras de partida

En el caso de las simulaciones de la TDO humana, la estructura de partida se obtuvo a partir de la estructura de rayos X (código PDB 5TI9, [15]). Como fue mencionado anteriormente, la TDO es una proteína tetramérica y posee la particularidad de que los primeros 15 residuos cristalizados de cada subunidad (del 39 al 55) forman una hélice que penetra en la subunidad adyacente. Debido al alto costo computacional que implica realizar los cálculos para el tetrámero, se generó un modelo consistente en una única subunidad (la subunidad A) pero a la que se le agregó la hélice de la subunidad B, que penetra en la estructura en una zona cercana al sitio activo, y se eliminó la misma hélice propia (ver figura 3.6). Esta estructura fue utilizada para los cálculos de dinámica molecular y QM-MM descriptos a continuación.

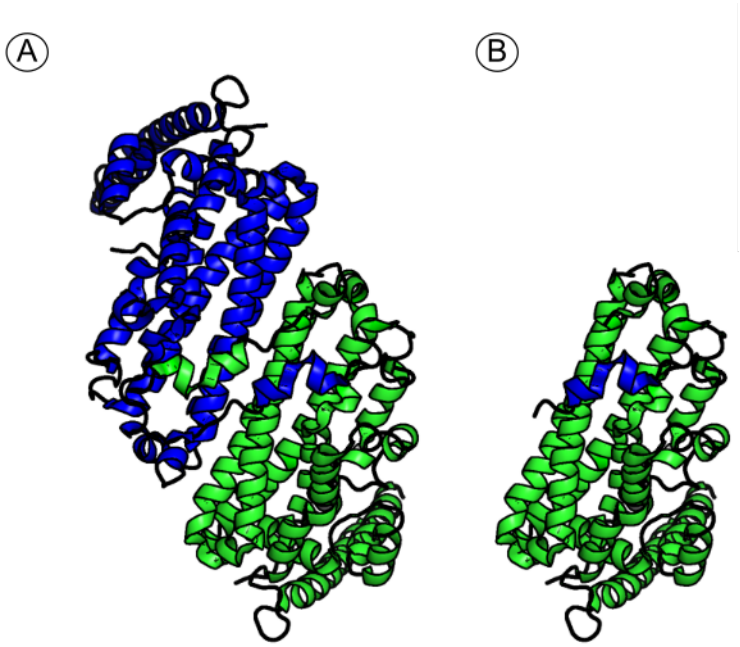


Figura 3.6: (A) Estructuras de las cadenas A (verde) y B (azul) de la hTDO. (B) Estructura de partida de las simulaciones de la hTDO.

Simulación de dinámica molecular clásica

5-ns-long MD simulations of the ternary com- plex (Fe2?–O2–L-Trp) of xcTDO built by adding O2 in silico to a monomeric model of the L-Trp-bound deoxy derivative of xcTDO (see

La estructura de partida del complejo ternario (Fe^{2+}-O_2-L-Trp) fue inmersa en una caja octaédrica de moléculas de agua del tipo TIP3P. Todas las simulaciones fueron realizadas con el programa PMEMD del paquete *Amber14* [41] usando condiciones periódicas de contorno, las sumas de Ewald para tratar las interacciones electrostáticas de largo alcance [42, 43] y el algoritmo de SHAKE, para mantener los

enlaces que involucran átomos de hidrógeno en sus distancias de equilibrio. El tiempo de integración utilizado fue de 2 fs para las ecuaciones de Newton [44] y se utilizó el termostato de Langevin [45] para controlar la temperatura del sistema. Los cálculos de equilibrio consistieron en una minimización de energía de las estructuras iniciales, seguido por un calentamiento lento a 300 K a volumen constante. Se utilizó una distancia mínima de 10 Å entre la superficie de la proteína y la caja de agua. Se realizó una simulación de 25 ns de duración.

Cálculos QM-MM

Para la realización de los cálculos QM-MM se utilizaron como punto de partida las estructuras obtenidas de las simulaciones de dinámica molecular. Los cálculos se realizaron utilizando la implementación de *Hybrid* [46], que utiliza el programa SIESTA [47] para el subsistema cuántico. En este subsistema se incluyó al grupo hemo (sin sus cadenas laterales), el imidazol de la cadena lateral de la histidina proximal y de la H55 y al Trp en su integridad. Este subsistema fue tratado a nivel DFT empleando bases doble zeta con polarización y el funcional PBE [48]. Se utilizó un radio de corte de 10 Å, tomado desde el centro del subsistema QM, para permitir el movimiento de los átomos. El resto de la proteína, que no estaba incluida en el subsistema QM, y las moléculas de agua fueron tratadas en forma clásica utilizando el campo de fuerzas de Amber99 [49]. La interfase entre el sistema QM y el MM fue tratada con el método del *Link Atom* (ver sección métodos para mayor información) [50]. En particular, se utilizaron diez *Link Atoms*, dos de ellos separando a los imidazoles de las histidinas incluidas en la región QM del resto de la cadena principal de la proteína, y los ocho restantes separando el anillo porfirínico de las cadenas laterales del grupo hemo. Los detalles del método utilizado se encuentran en el capítulo 2.

3.1.2. Resultados y discusiones

En esta sección, se describe el estudio del mecanismo de reacción realizado utilizando simulaciones híbridas QM-MM. Primero, se determinó la estructura optimizada para el complejo enzima-sustrato oxigenado en la hTDO, utilizando la estructura cristalina recientemente publicada [15]. En segundo lugar, se estudió la viabilidad de que el mecanismo sea el mismo que el de la xcTDO. Por último, se estudiaron las bases moleculares que diferencian a la reacción de la hTDO a la de la xcTDO.

Simulación QM-MM del complejo ternario del Trp y O_2 en la hTDO

Con la finalidad de estudiar el mecanismo de reacción, se obtuvo la estructura optimizada del complejo oxigenado de la hTDO en presencia de Trp (Fe^{2+}-O_2-L-Trp), para los distintos estados de espín posibles (singulete, triplete y quintuplete), dado que en la reacción de dioxigenación pueden

intervenir distintas superficies de espín, al cambiar el estado de oxidación y coordinación del hemo. En la figura 3.7 se muestra dicha estructura para el estado singulete y en la tabla 3.1 pueden observarse los parámetros geométricos más relevantes que la caracterizan. Al igual que lo observado para el caso

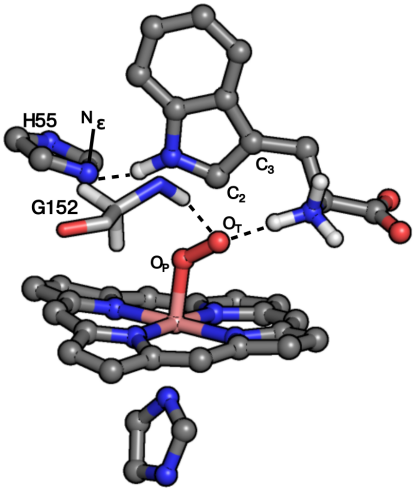


Figura 3.7: Estructuras optimizadas QM-MM del complejo oxigenado con Trp de la hTDO. Se muestra la glicina 152. Para tener una mejor visualización se omitió mostrar los átomos de hidrógeno que no participan en las interacciones de puente de hidrógeno.

Tabla 3.1: Parámetros geométricos obtenidos para las estructuras optimizadas QM-MM de los complejos ternarios de la hTDO. Distancias (d) y ángulos (<) en Angstroms y grados, respectivamente. Los subíndices p y t en los átomos de oxígeno corresponden al oxígeno proximal y terminal respectivamente como puede verse en la figura 3.7. $C_{2,Trp}$, $C_{2,Trp}$, $H_{NH,Trp}$ y $N_{NH,Trp}$ corresponden a los átomos C_2, C_3 y el nitrógeno e hidrógeno del grupo amino indólico del L-Trp; $N_{\epsilon,prox}$ y $N_{\epsilon,H55}$ corresponden a los N_ϵ de la histidina proximal y de la H55 en la hTDO respectivamente.

	Singulete	Triplete	Quintuplete
d_{Fe-O_p}	1,79	1,84	1,90
$d_{O_p-O_t}$	1,33	1,33	1,32
$< Fe\text{-}\ O_p\text{-}O_t$	125,02	125,47	124,49
$d_{C_{2,Trp}-O_p}$	3,25	3,08	2,98
$d_{C_{2,Trp}-O_t}$	2,63	3,14	3,20
$d_{N_{\epsilon,H55}-H_{NH,Trp}}$	1,72	1,75	1,73
$< N_{Trp,NH}\text{-}\ H_{Trp,NH}\text{-}\ N_{\epsilon,H55}$	159,91	158,75	158,84
$d_{Fe-N_{His,Prox}}$	2,12	2,14	2,33

de la xcTDO [25], estos resultados muestran que el grupo Fe-O-O se ubica paralelamente al doble enlace C_2-C_3 del Trp. Asimismo, se observa que el O_2 se encuentra interaccionando a través de una interacción de puente de hidrógeno, tanto con el grupo amino del Trp, como con el de la G152.

En cuanto a las características electrónicas descriptas en la tabla 3.2, el estado singulete corresponde al estado de espín de menor energía, aunque el estado triplete presenta un valor de energía muy cercano ($\Delta E_{espín}$= 0,934 kcal/mol). El estado quintuplete, sin embargo, posee una energía mucho mayor ($\Delta E_{espín}$=18,385 kcal/mol). Al analizar las cargas de Mulliken se observa que el O_2 posee un

carácter superóxido, lo que se debe a una transferencia de carga desde el grupo hemo (el cual posee una densidad de carga positiva) al O_2 (el cual posee una densidad carga negativa). Realizando el mismo análisis se observa que ocurre una transferencia de carga de la H55 al Trp, lo que confirma la fuerte interacción que existe entre ambas partes. En cuanto a la densidad de espín, en el estado triplete se observa que las densidades de espín del hierro y del superóxido son similares en magnitud y paralelas. Como puede observarse, las cargas de Mulliken no son sensibles al estado de espín.

Tabla 3.2: Parámetros energéticos, cargas de Mulliken y poblaciones de espín para los complejos ternarios de la hTDO en los tres estados de espín. $\Delta E_{espín}$ (kcal/mol) es la diferencia de energía con respecto al estado de espín singulete. His_{prox} corresponde a la histidina proximal.

	Singulete	Triplete	Quintuplete
$\Delta E_{espín}$	0	0,935	18,385
	Cargas de Mulliken		
Fe	0,781	0,802	1,092
O_2	-0,3777	-0,432	-0,432
Trp	-0,07	-0,137	-0,146
Hemo+His_{prox}	0,231	0,359	0,384
His55	0,22	0,207	0,191
	Poblaciones de espín		
Fe	-0,001	1,024	3,576
O_2	0,001	0,746	0,128
Trp	0	0,261	0,184
Hemo+His_{prox}	0	0,997	0,366

Mecanismo de reacción de dioxigenación en la hTDO

Una vez obtenidas las estructuras iniciales optimizadas, se calculó el perfil de energía potencial para el mecanismo de dioxigenación de la hTDO en los dos estados de menor energía (singulete y triplete). Se decidió utilizar, basándonos en los resultados presentados anteriormente para la xcTDO [25, 51], una coordenada de reacción que explorara la ruptura del enlace O-O (asociada a la distancia O_p-O_t) junto con el ataque del oxígeno al Trp (asociado a la distancia O_t-C_2). De manera similar que en el caso de la xcTDO, se observó que el O_2 puede insertarse en el doble enlace C_2 =C_3, uniéndose al C_2 y resultando en un intermediario 2,3-alquilepóxido y un grupo ferrilo del tipo compuesto II en el grupo hemo. Esto ocurre con la ruptura del enlace O-O, obteniéndose una barrera de activación de 7,6 kcal/mol, como se observa en la figura 3.8 A. Los datos asociados a los parámetros energéticos, a las poblaciones de Mulliken y a las de espín se muestran en la tabla 3.3 para el estado triplete, que resultó ser 7,8 kcal/mol más estable que el estado singulete. Esto resulta consistente con el hecho de que el Compuesto II en hemoproteínas típicamente muestra al triplete como el estado fundamental [52, 53]. Durante la reacción el Trp se mantiene en su posición debido a la interacción del tipo puente de H entre la H55 y el grupo indolamino del Trp. Asimismo, la G152 interacciona, a través de una

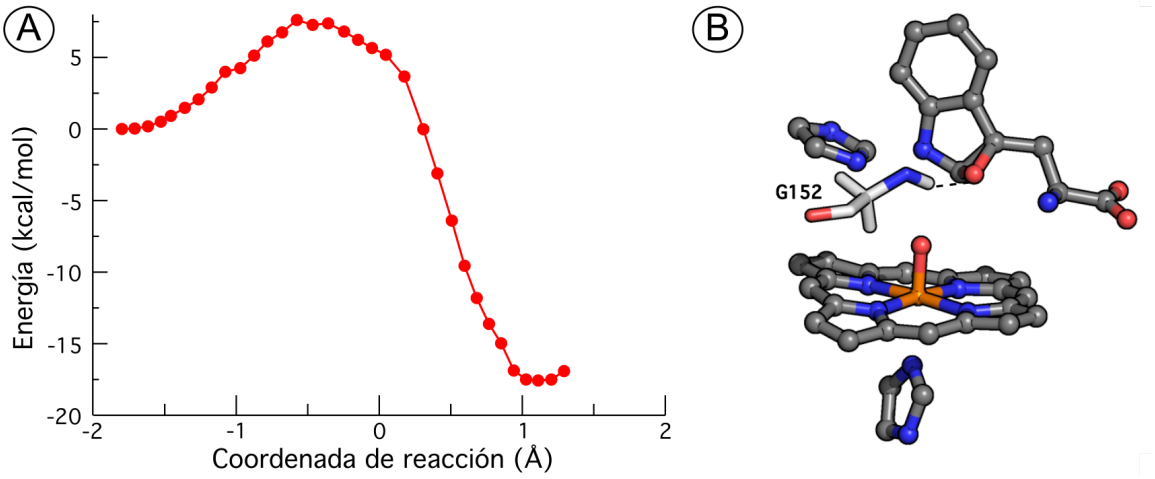


Figura 3.8: A) Perfil de energía para la adición del primer oxígeno al Trp. B) Estructura optimizada del intermediaro 2,3-alquilepóxido para el estado triplete. Se omitieron los átomos de hidrógeno, salvo el de la G152 para una mejor visualización.

Tabla 3.3: Parámetros energéticos, cargas de Mulliken y poblaciones de espín para el intermediario 2,3-alquilepóxido de la hTDO en el estado de espín triplete. His_{prox} corresponde a la histidina proximal.

	Cargas de Mulliken
Fe	0,793
O_p	-0,334
2,3-alquilepóxido	-0,235
Hemo+His_{prox}	0,048
His55	0,19
	Poblaciones de espín
Fe	1,238
O	0,834
2,3-alquilepóxido	0
Hemo+Hisprox	0,19

interacción de puente de hidrógeno, con el O_2 durante toda la coordenada de reacción. En la figura 3.8 B puede verse la estructura del 2,3-alquilepóxido optimizada junto con la G152.

Puede observarse que la ruptura del enlace O-O es homolítica, ya que la carga del grupo ferrilo, junto con la histidina proximal, es aproximadamente neutra. Por otro lado, se sigue observando la transferencia de carga desde la H55 al Trp, como se veía en la estructura de partida. Esto quiere decir que se conserva la fuerte interacción, por lo pronto, a lo largo de la primera adición de oxígeno. En el caso de la xcTDO la energía de activación informada para este primer paso es de 11,2 kcal/mol. Este valor es alrededor de 4 kcal/mol mayor al determinado para la hTDO.

Una vez obtenido el intermediario 2,3-alquilepóxido, se calculó el mecanismo a través del cual se forma Nfk. De la misma manera que lo realizado anteriormente, se utilizó una coordenada de reacción que explorara de forma simultánea la apertura del anillo indolamino (asociada a la distancia C_2-C_3),

la apertura del epóxido, a través de la distancia C_2-O_t, y el ataque del oxígeno (asociado a la distancia C_2-O_p). En la figura 3.9 se muestra el perfil resultante para el estado triplete, junto con las estructuras que representan los estados de transición. Durante la reacción, un protón del grupo amino del Trp se

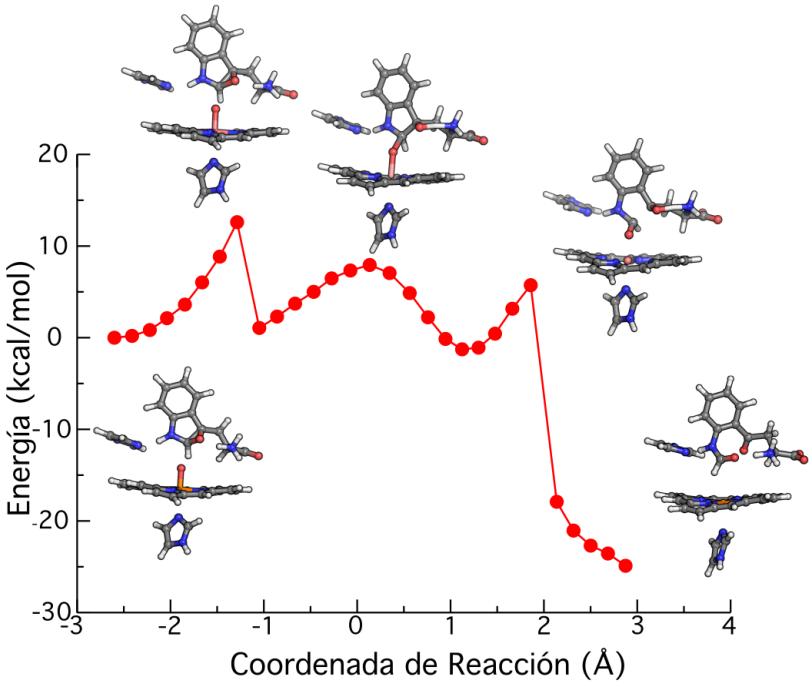


Figura 3.9: Perfil de energía para la adición del segundo oxígeno para el estado triplete de la hTDO.

transfiere al oxígeno del epóxido, ocurriendo así la apertura ácida del mismo. Esto facilita el ataque del oxígeno del ferrilo al C_2 y, por último, la apertura del anillo indolamino dando como resultado el Nfk. La forma de la curva como los estados de transición y los intermediarios de reacción son muy similares a los encontrados en la xcTDO. Sin embargo, la barrera de energía en el caso de la hTDO es 12,6 kcal/mol, lo que resulta ser 9 kcal/mol menor que el valor obtenido para el caso de la xcTDO [51]. Esta diferencia puede deberse a una mayor estabilización de los estados intermedios de la coordenada de reacción o a una menor estabilización del 2,3-alquilepóxido en la hTDO con respecto a la xcTDO. Con la finalidad de entender las bases moleculares de estas diferencias, se realizó un análisis de las características electrónicas del sitio activo de ambas proteínas a lo largo de la reacción, como así también de las interacciones con residuos del sitio activo características. Al realizar una comparación de las características electrónicas se observa que el C_2 tiene un carácter de carbocatión mayor en la hTDO que en la xcTDO durante la segunda adición del átomo de oxígeno. Entonces, la diferencia energética puede provenir de una mayor estabilización de la carga positiva en C_2. Se descartó el hecho de que la mayor estabilización proviniera de una mayor transferencia de carga desde el grupo amino del anillo indólico a la H76, dado que no se observan grandes diferencias entre ambas proteínas. En

contraposición, se detectó una diferencia en la interacción del grupo amino de la G152 con el oxígeno unido al grupo hemo a lo largo de la reacción. La figura 3.10 muestra la variación de la distancia y del ángulo que caracterizan el puente de hidrógeno entre la G152 y el oxígeno a lo largo de la reacción.

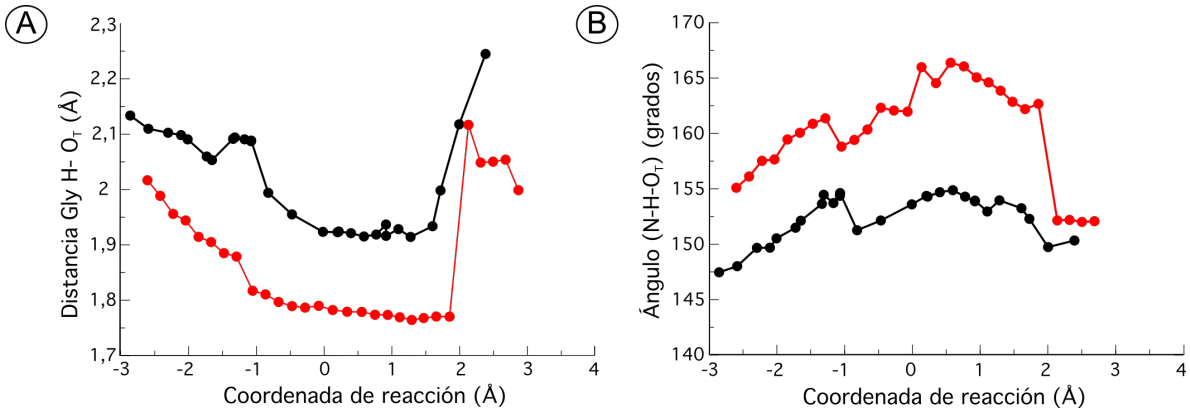


Figura 3.10: Distancia (A) y ángulo (B) que caracterizan al puente de hidrógeno entre la glicina 152 y el oxígeno unido al grupo hemo a lo largo de la coordenada de reacción para la adición del segundo oxígeno. En negro se presenta el resultado para la xcTDO y en rojo para la hTDO.

Como puede observarse, ambos gráficos muestran una interacción de puente de hidrógeno más intensa para el caso de hTDO, que se refuerza a lo largo de la coordenada de reacción. Esta interacción puede estabilizar a los estados de transición y a la carga positiva del C_2. Esta diferencia entre ambas proteínas puede ser la responsable de la menor energía de activación requerida para la reacción en el caso de la hTDO.

Discusión

El estudio del mecanismo de reacción de la hTDO se realizó a través de cálculos híbridos QM-MM, utilizando como punto de partida los resultados obtenidos anteriormente para la xcTDO [25, 51]. Los resultados obtenidos muestran que la reacción se inicia debido al ataque directo del O_2 coordinado al hemo al C_2 del Trp, dando lugar al grupo ferrilo en el hemo y el 2,3-alquilepóxido. La reacción prosigue con la apertura ácida del 2,3-alquilepóxido (debido a la transferencia de protón desde el grupo amino del Trp al átomo de oxígeno del epóxido) y la posterior adición del segundo átomo de oxígeno.

Estos resultados son muy similares a los obtenidos para la xcTDO. Sin embargo, las barreras energéticas resultan ser significativamente más bajas en comparación con el caso de la xcTDO. El estudio de las interacciones en el sitio activo a lo largo de la coordenada de reacción muestra que existe una interacción más intensa de la G152 con el oxígeno para la proteína humana. Esta interacción podría ser la responsable de estabilizar los estados de transición y así disminuir las barreras energéticas en el caso de la hTDO.

3.2. Estudio estructural de la IDO humana

A pesar de que la hIDO fue cristalizada hace varios años, la estructura y la función del loop que conecta las hélices J y K, integrado por los residuos desde el 362 al 388, (ver figura 3.11), denominado loop-JK de ahora en más, se desconoce. Esto se debe a su naturaleza flexible, que hace que la densidad electrónica en la difracción de rayos X sea poco nítida y, por ende, no se le pueda asignar una conformación dada. Sin embargo, dicho loop se encuentra en una zona cercana al sitio activo, por lo cual podría poseer un rol importante, no sólo en la entrada y salida del sustrato o producto según corresponda, sino también en el posicionamiento del Trp en el sitio activo de la proteína.

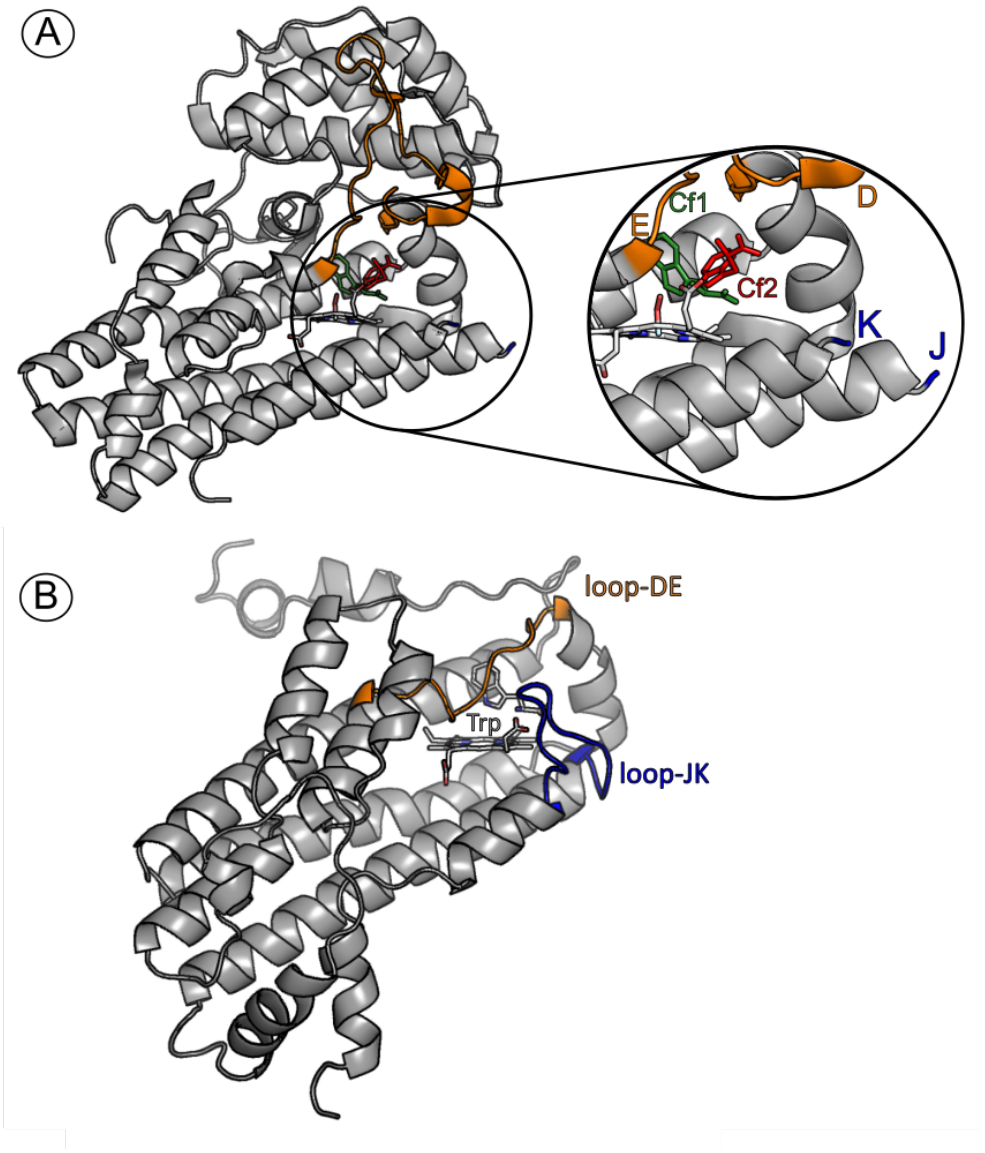


Figura 3.11: (A) Estructura tridimensional cristalizada de la hIDO. Los residuos conectados por el loop JK están coloreados en azul. El Trp está coloreado en verde y en rojo según si se encuentra en la conformación Cf1 o Cf2 respectivamente. El loop DE está coloreado en naranja. (B) Estructura tridimensional cristalizada de la xcTDO. El loop JK se encuentra coloreado en azul, mientras que el loop DE está coloreado en naranja.

Resulta interesante destacar que en la TDO existe un loop en la misma posición, aunque con 20 residuos menos, que pudo ser cristalizado en su totalidad. En particular, en un trabajo previo del grupo [54], fue caracterizado el rol de un residuo específico localizado en dicho loop (T342). Al realizar la mutación de este residuo por alanina (T342A), se obtuvo como resultado la pérdida total de la esteroselectividad de la hTDO hacia el sustrato [54]. Asimismo, llevando a cabo simulaciones de dinámica molecular, se determinó que la mutación afecta no sólo a la interacción específica entre la treonina y el Trp, sino también la posición y la dinámica del loop-JK. Esto se debe a que se verían afectadas las interacciones entre residuos del loop-JK y el loop-DE (residuos 120-125, ver panel B de la figura 3.11) y, como resultado, la posición del esqueleto de Trp se veía afectada y la reacción enzimática altamente inhibida.

Teniendo en cuenta esta información, surge el interés de determinar cuál es la conformación del loop-JK en la hIDO y cómo ésta se relaciona con la presencia y posición del Trp en el sitio activo. En este capítulo se presentan resultados que aportan información para responder dichos interrogantes.

3.2.1. Métodos computacionales

En esta sección se describirá el esquema de trabajo utilizado para responder las preguntas anteriormente descriptas. El abordaje del problema consistió en un primer paso donde se realizó el modelado por homología de la estructura del loop-JK de la hIDO. Para ello, se recurrió tanto la información de la secuencia de dicha proteína, como a estructuras de proteínas similares para ser utilizadas de molde (ver sección 2.1.5 del capítulo 2). Luego, de todos los modelos obtenidos, fueron descartados aquellos que poseían impedimentos estéricos que los hacían físicamente imposibles, obteniendo así las estructuras de partida para el paso siguiente. Sin embargo, dichas estructuras, si bien resultan físicamente posibles, podían no ser alcanzadas por el sistema bajo estudio. Es por ello que resulta necesario realizar un muestreo del espacio conformacional y así obtener las estructuras que corresponden a mínimos de dicha función, que son las estructuras que tienen mayor relevancia para el sistema. Con ese objetivo se utilizó la técnica de REM, cuyo fundamento teórico fue desarrollado en la sección 2.1.2.3). En este caso, cada estructura de partida obtenida en el paso anterior correspondía a una réplica. Luego, se realizó un análisis de los resultados obtenidos y, posteriormente, cálculos de DM de las estructuras principales. Todos estos pasos fueron realizados para cada uno de los sistemas: el complejo oxi (Fe^{2+}-O_2) y para las dos conformaciones del complejo con Trp (Cf1 y Cf2). La figura 3.12 muestra el esquema de trabajo utilizado y cada paso del mismo será desarrollado a continuación con un mayor grado de detalle.

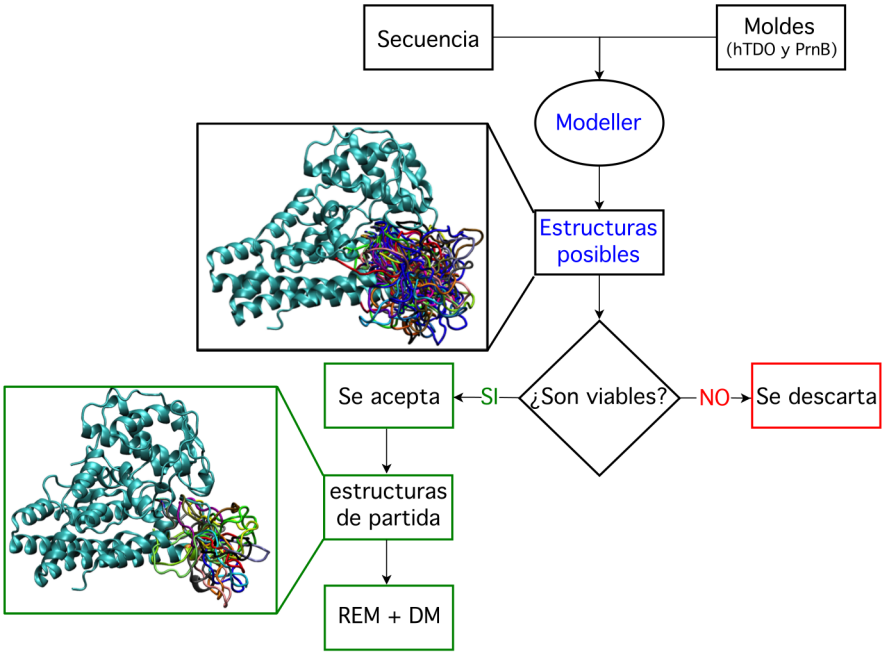


Figura 3.12: Esquema de trabajo utilizado en la presente sección.

Modelado del loop-JK

Las estructuras iniciales de la hIDO fueron construidas a partir de la estructura disponible en el PDB, correspondiente al complejo con el fenil imidazol (2D0T) [20]. Se construyeron las estructuras *in silico* para el complejo oxi y para las dos conformaciones del complejo con Trp (Cf1 y Cf2), eliminando el fenil imidazol del sitio activo. Luego se realizaron 25 ns de dinámica clásica para corroborar que la proteína mantuviera su estructura. Como fue mencionado anteriormente, en las estructuras de hIDO el loop-JK (residuos del 360-380) se encuentra ausente. Por lo tanto, con el objetivo de construir distintos modelos para el loop-JK, que serían luego las distintas réplicas en las simulaciones de REM, se utilizó la técnica de modelado por homología (ver sección 2.1.5 para más información) haciendo uso del programa *Modeller*. Este programa utiliza información de la secuencia de la proteína, junto con unos moldes para construir distintos modelos del loop faltante. Generalmente se elijen como moldes, en el caso que las hubiera, estructuras de la misma proteína y sino, de otras proteínas pertenecientes a la misma familia. En el caso de no contar con una estructura que sirva de molde, se utilizan bibliotecas de loops tomados del PDB que contienen distintas conformaciones dependiendo de la longitud y de los puntos de anclaje. En el caso de la hIDO, se utilizó como molde la estructura de la xcTDO (2NW8), la cual posee el loop-JK totalmente resuelto (aunque de menor longitud) [18]. Con la intención de obtener mejores modelos para el loop-JK de la hIDO, se utilizó, adicionalmente como molde, otra proteína miembro de la familia de las dioxigenasas. Esta proteína, denominada PrnB [55, 56], corresponde a la segunda enzima en la ruta de la síntesis de pirrolnitrina y se encuentra

presente en *Pseudomonas fluorescens*. Su función consiste en catalizar la conversión de 7-Cl-Trp en monocloroamino pirrolinitrina y su estructura fue resuelta tanto para el complejo con cianuro, como para los complejos ternarios con cianuro y L-Trp o 7-Cl-Trp [55]. Esta proteína posee un loop análogo al JK, de 16 aminoácidos, el cual ha sido parcialmente resuelto. Tanto la xcTDO, como la PrnB, presentan un alto grado de similitud con la hIDO.Asimismo, la comparación de secuencia (ver figura 3.13) indica la presencia de un motivo constituido por cuatro aminoácidos, "GT(S)GG", que se conserva en la región del loop-JK más cercana al C terminal de la proteína (que se llamará loop-JK^C de ahora en más). Este motivo conservado produce un giro de glicina [57], que se repite en las distintas estructuras del loop-JK de las proteínas que poseen la estructura resuelta. En contraposición, el segmento N terminal

```
hIDO/1-403      1 ---------------MAHAMENSWTISKEYHIDEEVGFALPNPQENLPDFYNDWM 43
PrnB/1-361      1 --------------------MERTLDRVG--------------------------V 10
xcTDO/1-298     1 MPVDKNLRDLEPGIHT--DLEGRLTYGGYLRLDQLLSAQQPL---SEPAHHDEML 50

hIDO/1-403     44 FIAKHLPDLIESGQLRERVEKLNMLSIDHLTDHKSQ-RLARLVLGCITMAYVWGK 97
PrnB/1-361     11 FAATHAAVAA-SDPLQARALVLQLPGLNRNKDVPGIVGLLREFLPVRGLPSGWGF 64
xcTDO/1-298    51 FIIQHQTSEL-WLKLLAHELRAAIVHLQRDEVWQCRKVLARSKQVLRQLTEQWSV 104

hIDO/1-403     98 ------------------GHGD-VRKVLPRNIAVPYCQLSKKLELPPILVYADCV 133
PrnB/1-361     65 VEAAAAMRDIGFFLGSLKRHGHEPAEVVP-GLEPVLLDLARATNLPPRETLLHVT 118
xcTDO/1-298   105 LETLTPSEYMGF------RDVLGPSSGF-QSLQYRYIEFLLGNK---NPQMLQVF 149

hIDO/1-403    134 LANWKKKDPNKPLTYENMDVLFSFRDGDCSKGFFLVSLLVEIAAAS-----AIKV 183
PrnB/1-361    119 VWNPTAADAQRSYT------------GLPDEAHLLESVRISMAALEAAIALTVEL 161
xcTDO/1-298   150 AYDPAGQARLR-------------------------------------------- 160

hIDO/1-403    184 IPTVFKAMQMQERDTLLKALLEIASCLEKALQVF---HQIHDHVNPKAFFSVLRI 235
PrnB/1-361    162 FDVS------LRSPEFAQRSDELEAYLQKMVESI---VYAYRFISPQVFYDELRP 207
xcTDO/1-298   161 --------EVLEAPSLYE---EFLRYLARFGHAIPQQYQARDWTAAHVADDTLRP 204

hIDO/1-403    236 YLSGWKGNPQLSDGLVYEGFWEDPKEFAGGSAGQSSVFQCFDVLLGIQQTAGGGH 290
PrnB/1-361    208 F---------------YEPIRVGGQSYLGPGAVEMPLFVLEHVLWGSQSDD--QT 245
xcTDO/1-298   205 V---------------FERIYENTDRYWREYS------------------------ 221

hIDO/1-403    291 AAQFLQDMRRYMPPAHRNFLCSLESNPSVREFVLSKGDA-GLR--------EAYD 336
PrnB/1-361    246 YREFKETYLPYVLPAYRAVYARFSGEPALIDRALDEARAVGTRDEHVRAGLTALE 300
xcTDO/1-298   222 -----LC--------------------------------E-DL---------VDVE 230
                                          JK-loop^N          JK-loop^C
hIDO/1-403    337 ACVKALVSLRSYHLQIVTKYILIPASQQPKENKTSEDPSKLEAKGTGGTDLMNFL 391
PrnB/1-361    301 RVFKVLLRFRAPHLKLAERAYEVGQS-GP-------------EIGSGGYAP-SML 340
xcTDO/1-298   231 TQFQ-LWRF--RHMRTVMRVIGF-------------------KRGTGGSSGVGFL 263

hIDO/1-403    392 KTVRSTTEK--------------S----L----------LKEG             403
PrnB/1-361    341 GELLTLTYAAR-SRVRAA---------------------LDES             361
xcTDO/1-298   264 QQALALTFFPELFDVRTSVGVDNRPPQGSADAGKR-------              298
```

Figura 3.13: Alineamiento de secuencia de la hIDO, la xcTDO y la PrnB. El motivo GT(S)GG y los sitios de fosforilación SKL y TSED están resaltados en negro y gris, respectivamente. La región correspondiente al loop-JK de la hIDO se encuentra encuadrada.

del loop (que involucra desde los residuos 359 hasta el 376 en la hIDO, denominado loop-JK^N de ahora en más) muestra una mayor diversidad de secuencia y un mayor número de conformaciones posibles.

Por lo tanto, teniendo en cuenta la identidad de secuencia de la región loop-JK^C y las dos estructuras molde, se construyeron 50 conformaciones iniciales diferentes, utilizando el programa *Modeller*. Luego, se realizó un análisis de cada una de ellas, descartando aquellas que poseían impedimentos

estéricos. A partir de esta selección se obtuvieron 30 estructuras como punto de partida para las simulaciones de REM.

Simulaciones de REM

A partir de las estructuras de partida, se realizaron cálculos de REM. Estas simulaciones fueron realizadas para los complejos oxi de la hIDO en ausencia del L-Trp (LS) y una para cada conformación del L-Trp en el sitio activo de la hIDO (Cf1 y Cf2, ver figura 3.11). Para cada caso, se corrieron 30 réplicas (una por cada estructura de partida del loop-JK obtenida por el modelado por homología a través del programa *Modeller*) barriendo el rango de temperatura que va desde 290 a 472 K. Cada réplica fue simulada durante 50 ns, lo que representa un total de 1,5 μs para cada sistema. Se realizaron 1000 pasos de dinámica entre cada intento de intercambio, repitiendo el ciclo 12500 veces. Las simulaciones fueron realizadas en solvente implícito y utilizando un termostato de Langevin para mantener fija la temperatura. Todas las simulaciones fueron realizadas utilizando la versión GPU (CUDA) del módulo PMEMD del paquete *Amber14* [58-61], utilizando el campo de fuerza Amber99SB.

Se aplicó una restricción de la posición en los carbonos α de toda la proteína (con el objetivo de evitar que ocurriera la desnaturalización de la misma debido a las altas temperaturas utilizadas en las simulaciones de REM) a excepción de los residuos pertenecientes al loop-JK que estaban habilitados a moverse libremente y así asegurarse de que se realice una correcta exploración del espacio conformacional del loop-JK. Una vez realizadas las simulaciones, las tres trayectorias correspondientes a las temperaturas más bajas (290, 295 y 300 K) fueron analizadas. El agrupamiento de los resultados en conjuntos fue realizada utilizando el programa *Cpptraj*, perteneciente al paquete de *Amber14* [62]. Como criterio de agrupamiento se definió que aquellas estructuras con un RMSD menor a 2,5 Å en la región loop-JK pertenecían a un mismo grupo. Los tres grupos mayormente poblados fueron considerados para el análisis posterior.

Simulaciones de dinámica molecular de los complejos de la hIDO

A partir de las estructuras centrales de los tres grupos más populares de cada sistema, se realizaron cálculos de dinámica clásica de 45 ns. Las estructuras fueron solvatadas con una caja octaédrica de moléculas de agua del tipo TIP3P, utilizando una distancia mínima de 10 Å entre la superficie de la proteína y la caja. Todas las simulaciones fueron realizadas con el programa PMEMD del paquete *Amber15* [41] usando condiciones periódicas de contorno. Además, se utilizaron las sumas de Ewald para tratar las interacciones electrostáticas de largo alcance [42, 43] y el algoritmo de SHAKE, para mantener los enlaces que involucran átomos de hidrógeno en sus distancias de equilibrio. Se utilizó un tiempo de integración de 2 fs, para las ecuaciones de Newton [44] y el termostato de Langevin [45], para

controlar la temperatura del sistema. Los cálculos de equilibrio consistieron en una minimización de energía de las estructuras iniciales, seguido por un calentamiento lento a 300 K a volumen constante.

3.2.2. Métodos experimentales

El rol de ciertos aminoácidos pertenecientes al loop-JK en la unión al sustrato y en la catálisis fue también estudiado por métodos experimentales. Este trabajo fue realizado por el laboratorio de la Prof. Syun-Ru Yeh en el Albert Einstein College of Medicine en Nueva York.

Expresión y purificación de la proteína

Las proteínas mutantes se construyeron utilizando el kit *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit*. Las proteínas fueron expresadas y purificadas con el protocolo utilizado por Samelson-Jones y Syun-Ru Yeh [63]. Las proteínas purificadas se guardaron a pH 7,4 en buffer Tris (50 nM) a -80 ºC hasta que fueron utilizadas.

Caracterización espectroscópica

La caracterización espectroscópica se realizó mediante espectroscopia UV-Vis. Todas las muestras fueron preparadas en buffer Tris 100 mM a pH 7,4, en presencia o ausencia de Trp (30 mM). Todos los espectros de absorción fueron tomados en una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico con un espectrofotómetro UV2100 (Shimadzu Scientific Instruments, Inc.) con una apertura óptica de 1 nm.

Ensayo de actividad

La actividad de la enzima se determinó siguiendo la generación del Nfk en función del tiempo de forma espectrofotométrica a 321 nm (ϵ = 3750 $M^{-1}cm^{-1}$). Para ello, se procedió al mezclado de la solución de proteína (100 nM) con concentraciones crecientes de Trp. La reacción fue iniciada con ácido ascórbico, que es utilizado como fuente de electrones, lo cual permite sostener múltiples ciclos de reacción (reduce el Fe^{3+} a Fe^{2+}). Para cada concentración de Trp, se determinó la velocidad inicial, y estos datos fueron utilizados para la realización del gráfico de Michaelis-Menten, que permitió obtener las constantes asociadas k_{cat} y K_M.

3.2.3. Resultados y discusiones

Con la finalidad de obtener información sobre la conformación del loop-JK y su relación con la presencia del Trp, y una vez obtenidas las estructuras de partidas a partir del análisis de los resultados del modelado por homología; se realizaron tres simulaciones independientes de REM: una para el sistema libre de sustrato (LS) y una para cada conformación del Trp en el sitio activo de la hIDO (Cf1 y Cf2, ver figura 3.11). En cada caso se analizaron las corridas realizadas a las tres temperaturas menores.

Como resultado general, se observa que el loop-JK explora una extensa zona del espacio conformacional, con un RMSD del loop con respecto a la estructura promedio mayor a 16 Å. Para realizar un análisis general de todas las conformaciones posibles del loop-JK, se agruparon todas las estructuras obtenidas como resultado de la simulación de REM para los tres sistemas (LS, Cf1 y Cf2), utilizando un criterio de que estructuras con una diferencia en el RMSD del loop menor a 2,5 Å correspondían a un mismo conjunto. Este análisis indica que la región loop-JK^C adopta conformaciones específicas y bien definidas (pocos conjuntos muy poblados). Mientras que la región loop-JK^N es mucho más flexible (con un RMSD mayor a 10 Å), adoptando conformaciones con ciertos elementos de estructura secundaria, pero sin una conformación prevalente (muchos conjuntos muy poco poblados).

El análisis del agrupamiento del loop-JK^C en los tres estados (LS, Cf1 y Cf2) muestra que los conjuntos observados pueden ser clasificados en tres conformaciones que se denominarán: conformación cerrada, intermedia y abierta (ver figura 3.14). Esta nomenclatura se asocia a la accesibilidad al sitio activo como se mostrará más adelante. El criterio utilizado para identificar las distintas conformaciones del loop-JK^C consistió en determinar el valor de la distancia entre el átomo de nitrógeno de la G380 y el átomo de carbono del grupo propionato 7 del grupo hemo (línea punteada de la figura 3.14) en la estructura promedio de cada conjunto. Se consideró que un conjunto formaba parte de la conformación cerrada cuando esta distancia iba de 2 a 5 Å, a la conformación intermedia si el valor de la distancia se encontraba entre 5 a 10 Å y, por último, a la conformación abierta si el valor era superior a 10 Å.

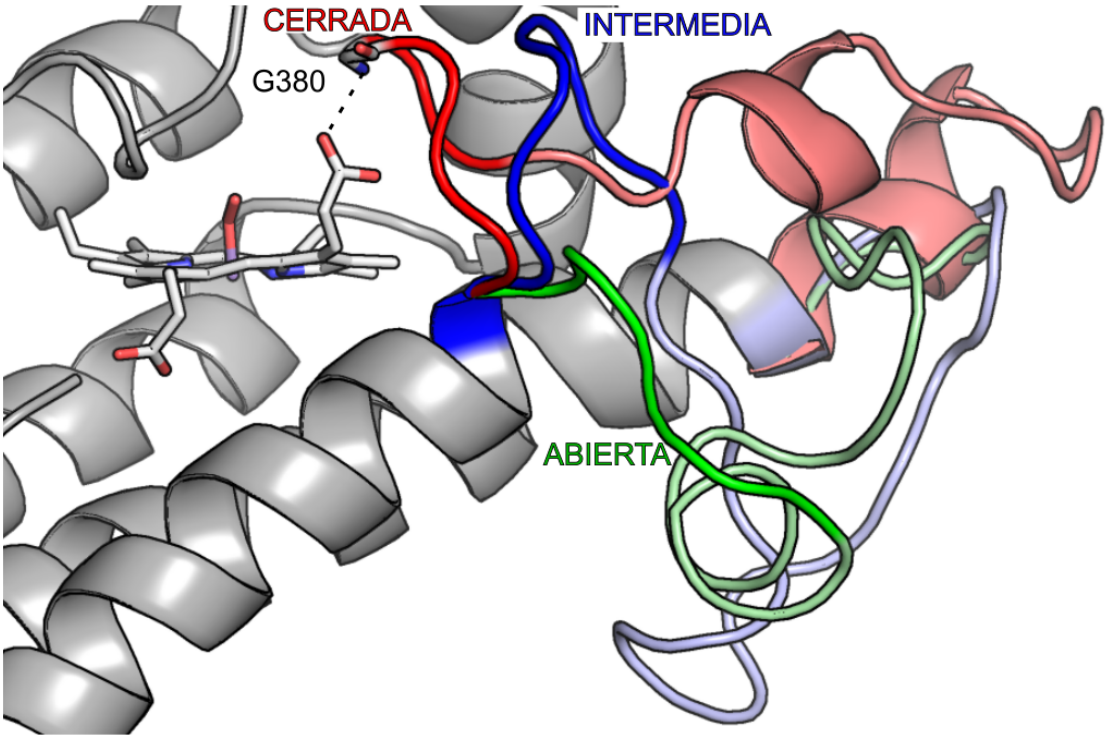


Figura 3.14: Conformaciones del loop-JK^C obtenidas luego del agrupamiento de los resultados para los distintos sistemas LS, Cf1 y Cf2. Las conformaciones cerrada, intermedia y abierta, se encuentran coloreadas en rojo, azul y verde respectivamente. En cada conformación la región correspondiente al loop-JK^C y al loop-JK^N se encuentran resaltadas en colores brillantes o pasteles respectivamente. La línea punteada indica la distancia entre el átomo de nitrógeno de la glicina 80 y el átomo de carbono del grupo propionato 7 del hemo.

Resulta importante señalar que las simulaciones de REM muestran que las tres conformaciones (conformación cerrada, intermedia y abierta) son interconvertibles manifestando así la alta flexibilidad del loop.

Análisis del estado conformacional del loop-JK y su rol en la unión a Trp

Partiendo de las tres conformaciones descriptas anteriormente, se realizó un análisis poblacional, con la finalidad de determinar qué conformación resultaba relevante para cada sistema: Cf1, Cf2 y LS. En la figura 3.15 pueden observarse las estructuras promedio de los tres conjuntos más poblados de cada sistema.

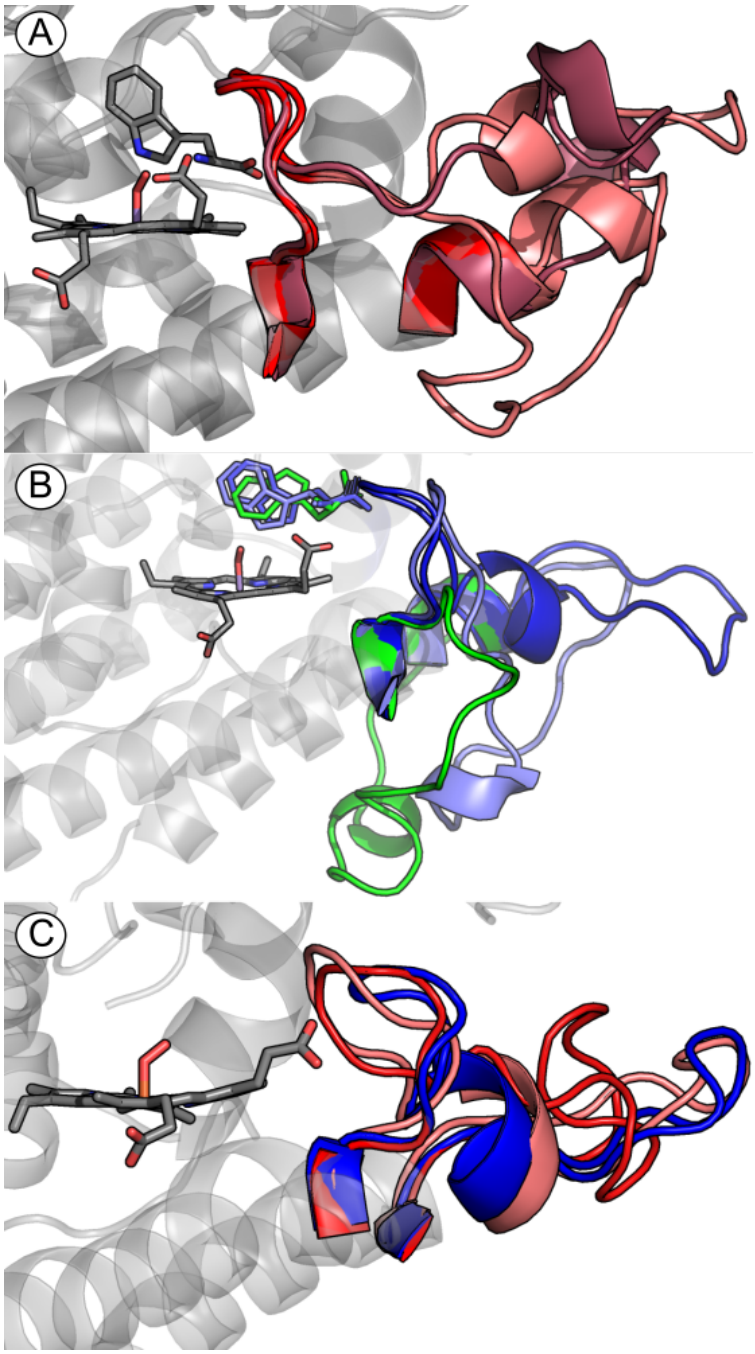


Figura 3.15: Los tres conjuntos más poblados para: (A) Cf1, (B) Cf2 y (C) LS obtenidas del agrupamiento realizado para todo el loop-JK en cada sistema. Los colores del loop representan a las conformaciones representan, siendo rojo la conformación cerrada, azul la intermedia y verde la abierta.

En el caso de Cf1, ver panel A de la figura 3.15, los conjuntos predominantes muestran una gran variabilidad en la región del loop-JK^N (con un RMSD de 12,4 Å), mientras que la región correspondiente al loop-JK^C se mantiene rígida en una misma posición (con un RMSD de 1,6 Å) correspondiente a la conformación cerrada.

En el caso de Cf2, los conjuntos predominantes muestran una gran variabilidad tanto en la

región N como en la C, ver panel B de la figura 3.15. En caso de la región C, la conformación cerrada del loop-JK no es visitada, siendo las conformaciones abierta e intermedia las más visitadas (ver tabla 3.4). Por otro lado, se observa que el Trp en la Cf2 es más móvil que en la Cf1 y adopta múltiples conformaciones (ver panel B de la figura 3.15), mientras que en la Cf1 el Trp se encuentra rígido en una misma conformación.

Por último, para LS (ver panel C de la figura 3.15), a pesar del hecho de que la conformación cerrada está altamente poblada, se observan también configuraciones abiertas e intermedias. Resulta importante destacar que en la conformación cerrada se observa una mayor variabilidad que en el caso de la Cf1, como se evidencia en el valor de RMSD del loop-JK^C (3,9 Å en LS vs. 1,6 Å en Cf1). Este aumento en la flexibilidad de la conformación cerrada es consistente con una pérdida de interacciones específicas entre el sustrato y el motivo GTGG del loop-JK^C que lo fijan en una conformación dada.

Tabla 3.4: Poblaciones de las distintas conformaciones del loop-JK^C en los distintos sistemas LS, Cf1 y Cf2.

Conformación del loop	Población		
	LS	$Cf1$	$Cf2$
Cerrada	96,6	99,9	-
Intermedia	1,8	-	49,7
Abierta	1,6	0,1	50,3

Descripción estructural de las distintas conformaciones del loop-JK

Habiendo determinado las conformaciones mayoritarias del loop-JK y su relación con la unión a Trp, se realizó un análisis de las interacciones responsables de definir estas conformaciones y su impacto en las propiedades funcionales de la hIDO. Para ello se realizaron 45 ns de dinámica molecular clásica para las conformaciones más representativas de cada complejo de la hIDO. El análisis de las interacciones entre el Trp y el loop-JK^C, en el estado cerrado de Cf1, muestra la existencia de interacciones puente de hidrógeno muy intensas entre los grupos -NH y -OH de la T379 del motivo “GTGG” con los grupo amino y carboxil del Trp (ver figura 3.16). De la misma manera, el grupo -OH de T382 y el grupo -NH de la G380 interaccionan fuertemente con el propionato del hemo lo que mantiene al loop-JK^C en la posición cerrada. Estas interacciones se pierden cuando el loop se abre, alcanzando la conformación abierta, dando lugar al Trp para moverse dentro del sitio activo más cerca del solvente, como cuando el mismo se posiciona en la Cf2. En la conformación abierta el motivo “GTGG” se encuentra completamente expuesto al solvente.

Con el objetivo de determinar el rol de T379 en relación con la conformación del loop, se realizó la mutación *in silico* de ese residuo por alanina (ver figura 3.17) y luego se calcularon 70 ns de dinámica molecular para esta mutante, partiendo desde la conformación cerrada de Cf1.

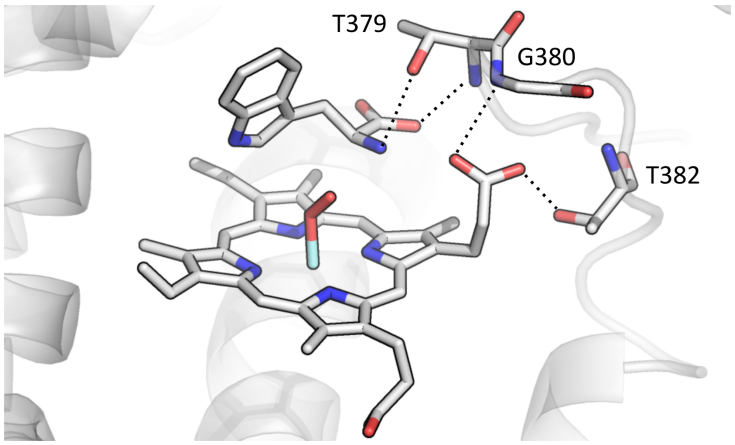


Figura 3.16: Interacciones principales entre residuos del loop y el sitio activo de hIDO en la conformación cerrada en Cf1.

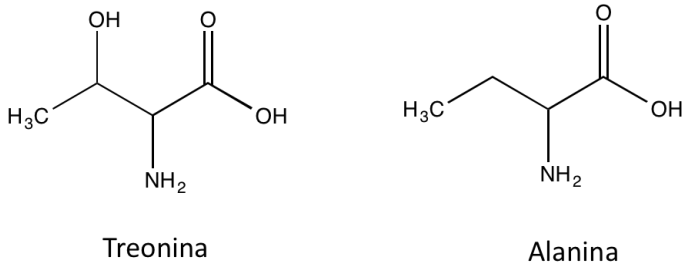


Figura 3.17: Estructura de treonina y alanina.

Los resultados muestran que, si bien durante el tiempo de la simulación las interacciones principales entre los residuos del sitio activo y el Trp se mantienen, éstas se ven significativamente debilitadas con respecto a aquellas encontradas en la enzima nativa (ver tabla 3.5).

Tabla 3.5: Comparación de las interacciones que involucran al Trp y a los principales residuos del sitio activo de la proteína nativa y de la mutante T379A. El valor se refiere al porcentaje de fotos de la dinámica, en las cuales se observa la interacción.

Interacciones		Cf1	Cf1 T379A
R231 HH12	Trp Oxt	99,9	62,2
R231 HH22	Trp O	86,6	49,9
R231 HH21	Trp O	-	85,0
R231 HH22	Trp Oxt	7,2	42,3
R231 HH12	Trp O	0,1	37,4
T/A379 H	Trp O	91,0	48,1
T379 OG1	Trp-NH_3	63,3	-
T/A 379 H	Trp-NH_3	-	31,3
Grupo hemo - O2	Trp-NH_3	69,8	47,5
G262 O	Trp-NH_3	-	34,8

Como puede observarse en la figura 3.17, la gran diferencia entre los aminoácidos treonina y alanina es la ausencia del grupo oxhidrilo en la cadena lateral en este último residuo. Debido a esto, al realizar la mutación T379A se pierde la interacción entre dicho grupo y el Trp. Por otro lado, la interacción entre el Trp y el grupo amino del residuo 379 se ve debilitada, pasando de observarse en el 91 % de la dinámica en la enzima nativa, a un 48 % del tiempo en la mutante (ver tabla 3.5). Estos cambios en la interacción con el residuo en la posición 379 traen como resultado una mayor variación en la ubicación del Trp, lo cual se ve reflejado en las alteraciones de las interacciones entre el Trp y los residuos R231, G262 y el grupo hemo en la mutante (ver tabla 3.5). Además, ya sea como causa o consecuencia de la variación de la ubicación del Trp en el interior del sitio activo, ocurre una mayor alteración en la posición del loop-JK en la mutante lo que puede llegar a promover la apertura del mismo.

Como fue mencionado anteriormente, la inspección visual de los diferentes estados del loop (ver figura 3.15) muestra que cuando el loop-JK^C se encuentra en la conformación cerrada, el sitio activo está aislado del solvente. En contraposición, si la región C del loop se encuentra en la conformación abierta, el sitio activo está totalmente expuesto. Este dato sugiere que el loop-JK^C tiene un rol importante en la migración del Trp y del Nfk.

Con el objetivo de cuantificar esta observación de una manera más formal se determinó el volumen y la forma del bolsillo donde se ubica el Trp para cada conformación del loop-JK utilizando el programa POVME 2.0 [64, 65] que usa la información de las trayectorias calculadas. Los resultados muestran que en la conformación cerrada de Cf1 el volumen promedio del bolsillo es de 1778 Å^3, siendo el volumen del Trp es de 227 Å^3. Además, se observa que la accesibilidad del solvente en el sitio activo está bloqueada, principalmente, debido a la presencia de los residuos T379 y R231 que forman una barrera. Como se puede ver en la figura 3.3B ambos residuos interaccionan muy fuertemente con el Trp. En cambio, en la conformación abierta de la Cf2, el volumen del bolsillo tiene un valor de 5079 Å^3 y el solvente tiene acceso al sitio activo. La figura 3.18 ilustra las diferencias entre la conformación cerrada (nativa y T379A) y abierta, destacando la función de puerta del loop-JK^C.

En el caso de la mutante, resulta interesante destacar que, a pesar de que se mantiene la conformación cerrada, el volumen del bolsillo aumenta a 4399 Å^3, acercándose al valor del volumen en la conformación abierta de la enzima nativa. Como se vio anteriormente, al realizar la mutación T379A no sólo se debilita la interacción entre el residuo A379 y el Trp, sino también se afectan las otras interacciones en el sitio activo. Esto hace que ya no exista la barrera que armaban la T379 y la R231 y, por ende, el bolsillo se agranda y se conecta con el solvente.

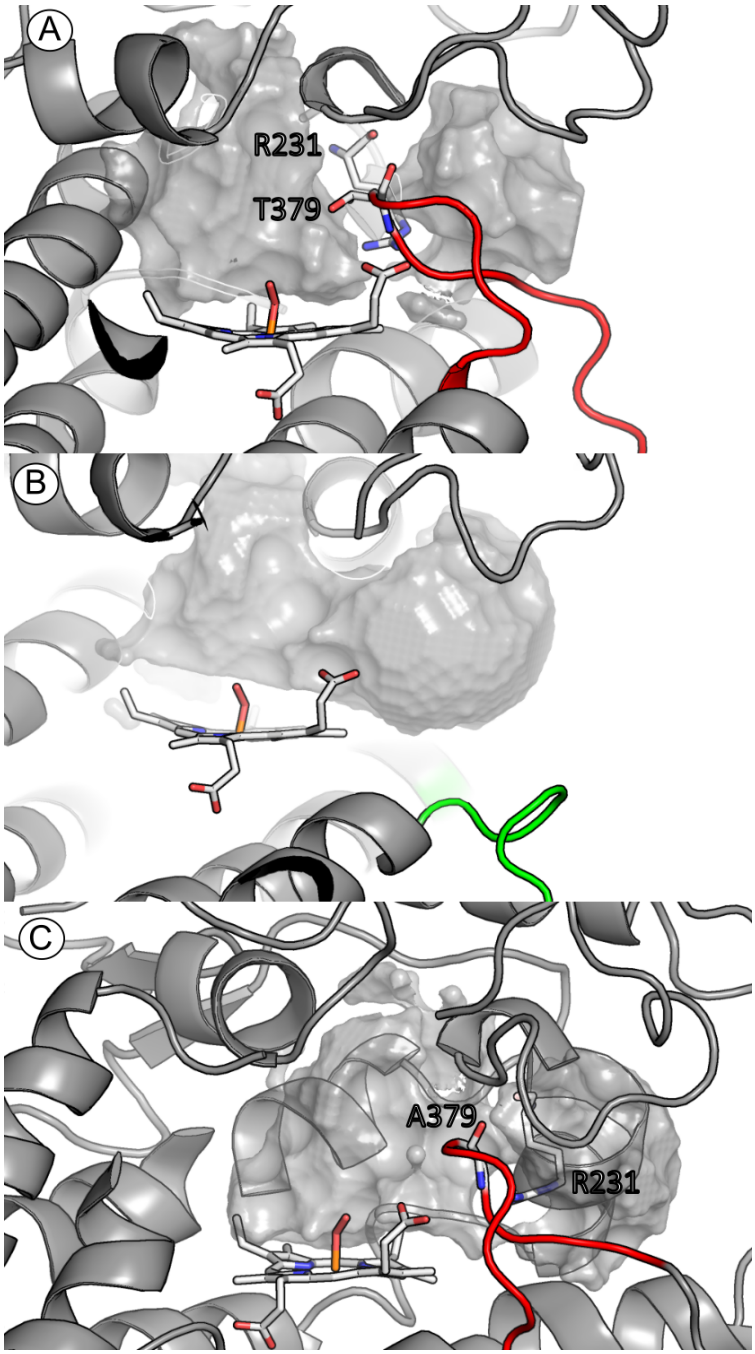


Figura 3.18: Volumen disponible en el sitio activo de la hTDO en (A) el estado cerrado de Cf1 con la R231 y la T379 representadas; (B) el estado abierto y (C) el estado cerrado de Cf1 con la mutación T379A.

Con el objetivo de cuantificar la accesibilidad del Trp al sitio activo en los diferentes estados conformacionales, se calculó utilizando un programa desarrollado por el grupo la superficie accesible al solvente (SASA) tanto para la conformación cerrada de Cf1 y la conformación abierta de Cf2.Los resultados indican que el SASA para el Trp es muy pequeño, 1,8 $Å^2$ en promedio en la conformación cerrada de Cf1, mientras que en la conformación abierta de Cf2 es de 89,2 $Å^2$. Estos datos sugieren que en Cf2 en la conformación abierta, el Trp esté probablemente disociándose de la proteína. Resulta im-

portante destacar que en la mutante T379A el valor de SASA es de 4,2 Å^2 en promedio. Esto demuestra que el sustrato está más expuesto al solvente que en comparación con la enzima nativa. A modo de ejemplo visual, la figura 3.19 muestra la superficie de la proteína en la conformación cerrada de Cf1 y en la conformación abierta de Cf2. Puede observarse que existen grandes diferencias entre ambos casos, dado que en el primero, el Trp está ubicado en el centro de la matriz proteica, mientras que en el segundo se encuentra más expuesto al solvente, debido a la apertura del loop-JK^C. Finalmente, se

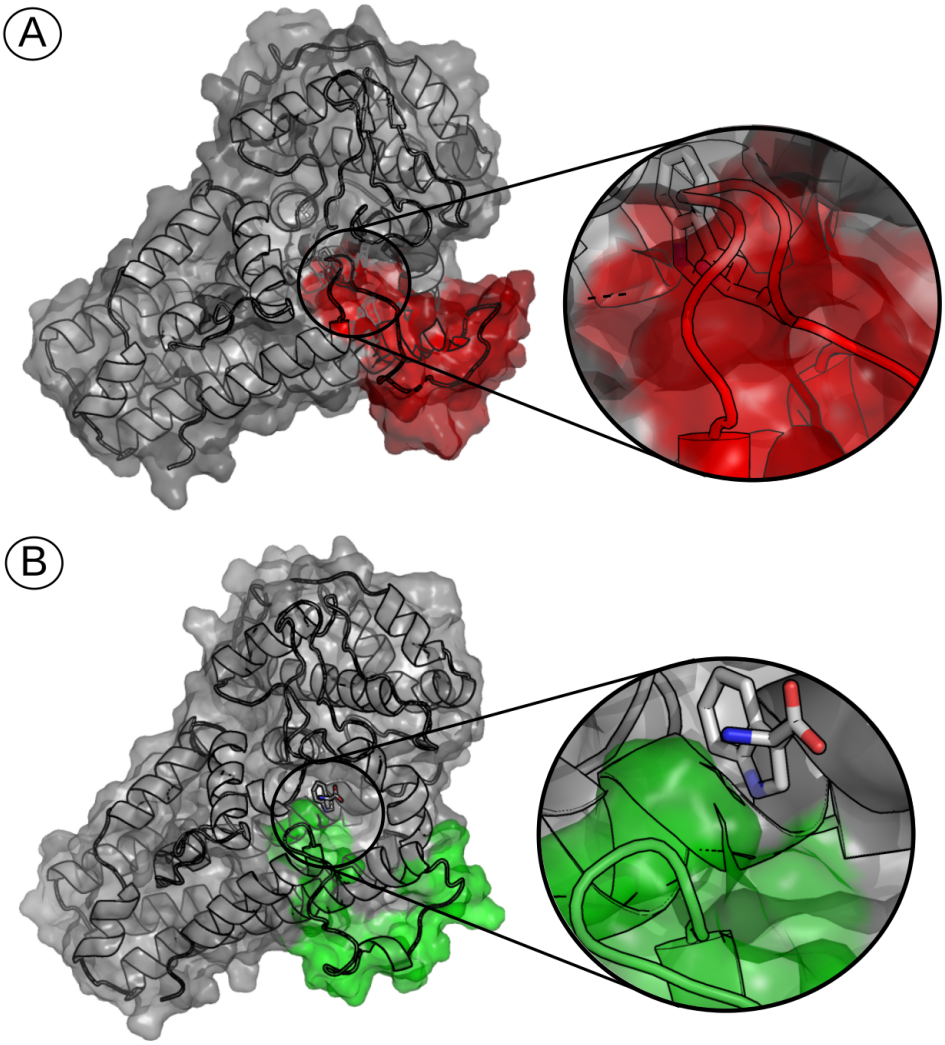


Figura 3.19: Superficie de la proteína de la hIDO de (A) Cf1 y (B) Cf2. Las superficies correspondientes a la región del loop se muestran coloreadas en (A) rojo o (B) verde.

calculó la energía libre de unión junto con la contribución de los residuos destacados anteriormente: T379 y R231, utilizando el método MM-GBSA (ver sección 2.1.4 para un mayor detalle metodológico) con la finalidad de obtener mayor información acerca de la afinidad de unión del Trp en las distintas conformaciones del loop-JK. Los resultados se presentan en la tabla 3.6.

Tabla 3.6: Energía libre de unión del Trp y los conjuntos más poblados de cada sistema terciario de la enzima nativa o de la mutante, expresada en kcal/mol.

	Cf1	Cf2	Cf1 T379A
total	-58 ± 3	-24 ± 3	-51 ± 3
T/A379	-4,9 ± 0,8	-3,5 ± 0,6	-2,8 ± 0,8
R231	-15 ± 1	-0,8 ± 0,7	-13 ± 1

Estos resultados muestran que la energía de unión al Trp se duplica cuando el loop está en la conformación cerrada (el conjunto más poblado en Cf1) en comparación a la conformación abierta del loop observada en Cf2. Esto puede deberse a un debilitamiento de las interacciones entre los residuos del sitio activo (T379 y R231) y el sustrato que desestabilizan el complejo ternario. Asimismo, cuando se comparan los resultados de la mutante y de la proteína nativa, se observa un descenso significativo de la energía de unión a Trp para el primer caso. Este hecho confirma un rol importante de la T379 en la estabilización de dicho complejo. En sintonía con lo observado anteriormente, la variación del valor de la contribución de R231 a la energía libre de unión puede deberse a que la mutación debilita no sólo la interacción con el esqueleto del residuo con el Trp, sino también otras interacciones en el sitio activo, entre ellas la de la R231 (ver tabla 3.5).

Estudio de actividad de las mutantes T379A y R231L

Con la intención de confirmar los roles de los residuos destacados en las secciones anteriores (T379 y R231), el grupo de la Prof. Syun-Ru Yeh realizó las mutantes correspondientes (T379A y R231L) y analizó en colaboración su actividad *in vitro*.

Como puede verse en la figura 3.20 en el estado libre de sustrato, la mutante férrica T379A muestra una banda de Soret a 403 nm y bandas Q a 500 y 533 nm, así como también las bandas correspondientes a las transferencias de carga a 632 nm. Esto es consistente con la presencia de una molécula de agua unida a un grupo hemo hexacoordinado, caracterizado por un estado electrónico mixto de alto espín (6CHS) y un estado de bajo espín (6CLS). La unión de Trp a la mutante férrica produce un corrimiento de la banda de Soret a 407 nm, así como también una disminución de la intensidad de la banda a 500 nm y un aumento de intensidad de las bandas a 533 y 562 nm. Esto está asociado a la desaparición de las bandas de transferencias de cargas a 632 nm. Estos cambios espectrales indican la conversión de la especie unida a agua a una especie 6CLS, la cual es atribuida a la proteína unida a hidróxido en la IDO nativa. Las características espectrales anteriormente descriptas pueden ser observadas en el panel A de la figura 3.20. En cambio, para la mutante R231L (panel B de la figura 3.20) el espectro no presenta grandes cambios cuando se agrega Trp, lo que sería indicativo de una unión incompleta por

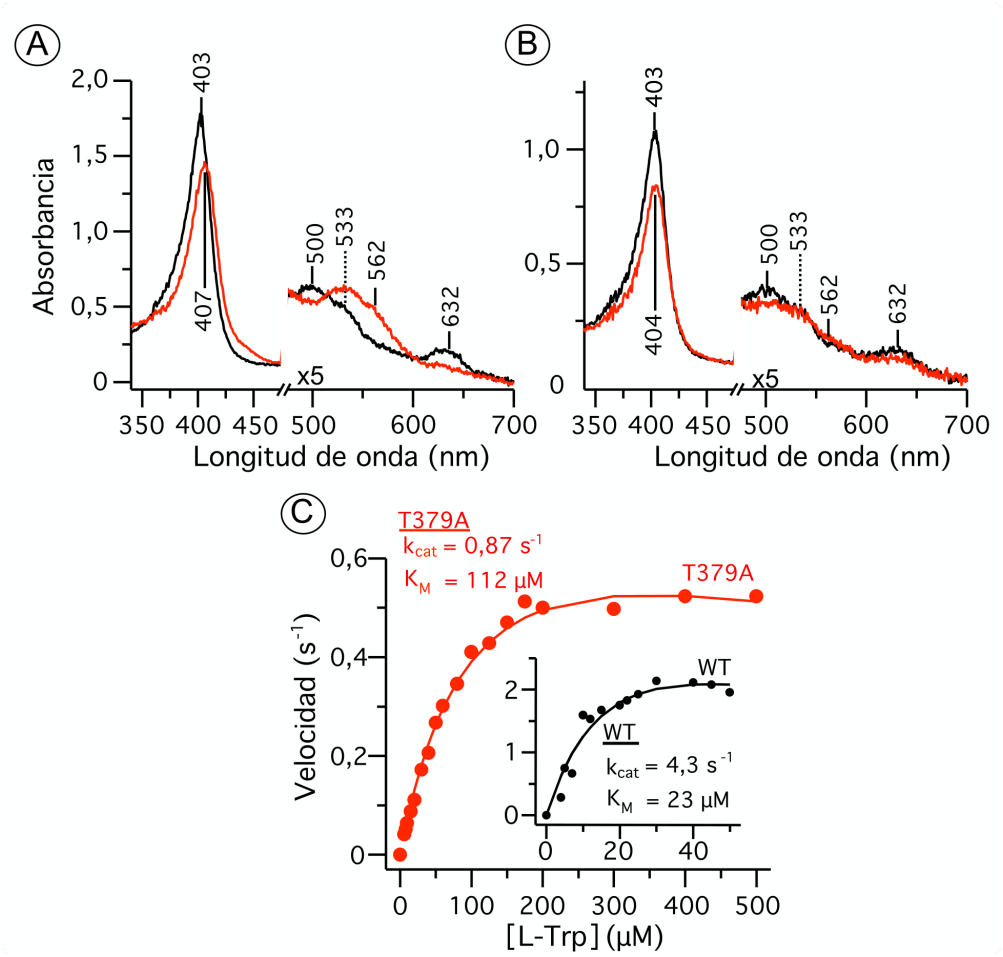


Figura 3.20: Espectro de absorción de las mutantes férricas (A) T379A y (B) R231L de la hIDO y (C) del gráfico de Michaelis-Menten de T379A y de la hIDO nativa. Los paneles (A) y (B) contienen el espectro de absorción en ausencia (línea negra) y en presencia de ~ 30 mM de L-Trp (línea roja). Las bandas en el visible (475-700 nm) fueron aumentadas por un factor de 5. Los espectros fueron generados en una cubeta Raman de cuarzo en presencia de ~ 50 μM de enzima en 100 mM de buffer Tris a un pH 7,4. Los gráficos de Michaelis-Menten fueron generados utilizando 100 nM de enzima. La reacción fue iniciada con el agregado de ascorbato (reductor) en la mezcla de reacción a un pH de 7,4 a 25 ° C.

parte del Trp.

La reacción de dioxigenación catalizada por IDO no consume ningún electrón. Sin embargo, se requiere de una fuente de electrones para sostener los múltiples ciclos de reacción, ya que el complejo ternario activo es propenso a autooxidarse, mediante la liberación de superóxido. Debido a esto, se utilizó ascorbato como reductor para medir la actividad de la enzima en estado estacionario. Los estudios cinéticos fueron ajustados por una ecuación de Michaelis-Menten con inhibición por sustrato. Los resultados muestran que la mutación T379A resulta en una reducción de alrededor de 25 veces de la relación de k_{cat}/K_M de la IDO frente al Trp, evidenciada por la reducción en 5 veces en la k_{cat} (4,3 y 0,87 s^{-1} para la IDO nativa y la mutante respectivamente) y una notoria baja de la afinidad por Trp (aumento de K_M). En contraposición, la mutación R231L elimina totalmente la actividad frente al Trp.

Discusión

Utilizando modelado por homología, simulaciones de REM, junto con experimentos de mutaciones sitio dirigidas, se obtuvo información acerca de la estructura y la dinámica de un loop flexible, cercano al sitio activo que se encuentra ausente en la estructura cristalina de la hIDO. Además, se evaluó cómo varía su comportamiento con la presencia de Trp en el sitio activo. Este loop es significativamente más largo que en otras proteínas de la misma familia, pero se observa un cierto grado de similitud en la secuencia de la región loop-JK^C en la que se destaca el motivo "GTGG". Los resultados muestran que este segmento del loop puede adoptar distintas conformaciones denominadas: abierta, intermedia y cerrada. En contraposición, la región loop-JK^N es más flexible y, a pesar de poder adoptar conformaciones con ciertos elementos de estructura secundaria, no existen conformaciones dominantes. Gracias a los resultados obtenidos, puede afirmarse que el segmento C del loop está asociado a la unión a sustrato. Cuando el Trp se encuentra unido en la conformación reactiva (Cf1), el loop-JK^C adopta una conformación predominantemente cerrada. En cambio, cuando el sustrato se encuentra en la conformación alternativa (Cf2), el loop-JK^C es más flexible y es más probable que se encuentre en la conformación abierta. En este contexto resulta interesante notar que este tipo de mecanismo de apertura y cierre del loop que regula la entrada del sustrato fue anteriormente propuesto para P450Cam, otro tipo de oxigenasas hémicas extensamente estudiado [66-68]. A pesar de que su plegado es diferente, el mecanismo común destaca la relevancia y plasticidad del sitio activo de las hemooxigenasas.

Estos resultados sugieren que la naturaleza dinámica del loop-JK^C permite modular directamente la dinámica del sustrato y del producto. En ausencia de sustrato, la mayor flexibilidad del loop permite al Trp entrar en la proteína. Esta entrada es seguida por el cierre del loop, resultando en una unión fuerte del Trp, que es mantenido en su conformación reactiva por la interacción con la T379 y la R231, permitiendo así que ocurra la reacción enzimática. Luego de la catálisis, es probable que estas interacciones se vean posiblemente debilitadas, dando lugar a la apertura del loop-JK^C y la posible liberación del producto. El rol del loop-JK^C y, en particular, de la T379 en la unión y posicionamiento del sustrato es consistente con los estudios de actividad sobre la mutante T379A que muestra una reducción en 5 veces de la k_{cat} y un aumento de 5 veces en K_M con respecto al Trp. Estos resultados, a pesar de ser variaciones moderadas en los parámetros cinéticos, indican que T379 y, por lo tanto, el loop entero participan en la unión y catálisis de Trp. El aumento de K_M está posiblemente relacionado con una mayor flexibilidad del loop y un aumento de la población de la conformación abierta, que debilita las interacciones proteína sustrato. Estudios previos de la TDO [25] muestran que la barrera energética de la reacción está estrechamente relacionada con el correcto posicionamiento del Trp, el cual se ve perturbado con la mutación T379A.

El rol de loop-JK^N, en contraposición, resulta más difícil de dilucidar. Los resultados obtenidos muestran que posee una gran flexibilidad sin una estructura secundaria que se destaque y, más importante, se observa que se extiende desde el centro de la proteína al solvente. Este comportamiento no resulta poco común en regiones de proteínas que interaccionan con otras y/o se ven modificadas químicamente con fines regulatorios. Con esto en mente, se realizó una búsqueda en la base de datos *Prosite* [69, 70], lo cual resultó en la predicción de dos sitios de fosforilación: ^{367}TSED y ^{372}SKL. La modificación post-traduccional del loop-JK^N, a través de la fosforilación, o su unión a otra proteína, podría evitar que se abriera la región loop-JK^C, lo cual resultaría en una inhibición de la unión al sustrato, dando lugar a una enzima inhibida. Es interesante destacar también que al exponer la enzima a peroxinitrito, la Y353 en la hélice J resultó nitrada, dando lugar a una inhibición de la IDO [71]. Este rol regulatorio es consistente con el hecho de que la región loop-JK^N solo se encuentra presente en la hIDO, proteína que regula el sistema inmune y no en la TDO o sus análogos bacterianos primitivos. Sin embargo, es necesario realizar un mayor número de estudios para confirmar este hecho.

Como conclusión se tiene que el loop-JK es un loop dinámico, que presenta grandes fluctuaciones estructurales, en concordancia con el hecho de que este loop no ha podido ser cristalizado, debido a su estructura desordenada. Las simulaciones de REM muestran que el loop-JK^C puede adoptar estructuras cerradas y abiertas, que están en un equilibrio dinámico. La estructura cerrada, que es predominante en la enzima unida al Trp en la Cf1, ayuda a unir y a posicionar al Trp en la conformación activa y evita el ingreso de solvente al sitio activo, moderando así la actividad de la hIDO. La falta de estructura del loop-JK^N y su dinámica sugiere que puede ser blanco de modificaciones post-traduccionales o interacciones proteína-proteína proveyendo una forma extra de control de la actividad de la IDO.

3.3. Conclusiones

Los resultados presentados en este capítulo comprenden la utilización de diversas técnicas computacionales y experimentales para el estudio de las bases moleculares de las reacciones de dioxigenación de la 2,3-triptófano y 2,3-indolamino dioxigenasa. En el caso de la hTDO, debido a que su estructura cristalina fue publicada recientemente se estudió el mecanismo de reacción y se comparó con lo obtenido para el caso de la xcTDO. En el caso de la hIDO, la estructura cristalina no se encontraba completa, sino que faltaba un loop que conectaba las hélices J y K. Debido a ello, se modeló el loop, se realizó un muestreo del espacio conformacional del mismo y, por último, se analizó la dinámica del loop junto con las bases moleculares que la determinan y su relación con la posición del Trp en el sitio activo.

Considerando que estas proteínas pueden tratarse de blancos terapéuticos para el tratamiento de cáncer, estos resultados otorgan información de la forma de acción lo cual es clave a la hora de desarrollar inhibidores de estas enzimas.

Referencias

1. Vacchelli, E. *y col.* Trial watch: IDO inhibitors in cancer therapy. *Oncoimmunology* **3,** e957994 (2014).
2. Platten, M., von Knebel Doeberitz, N., Oezen, I., Wick, W. y Ochs, K. Cancer Immunotherapy by Targeting IDO1/TDO and Their Downstream Effectors. *Frontiers in Immunology* **5,** 673 (2014).
3. Routy, J.-P., Routy, B., Graziani, G. M. y Mehraj, V. The Kynurenine Pathway Is a Double-Edged Sword in Immune-Privileged Sites and in Cancer: Implications for Immunotherapy. *International Journal of Tryptophan Research : IJTR* **9,** 67-77 (2016).
4. Targeting key dioxygenases in tryptophan–kynurenine metabolism for immunomodulation and cancer chemotherapy. *Drug Discovery Today* **20,** 609-617 (2015).
5. Pilotte, L. *y col.* Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109,** 2497-2502 (2012).
6. Godin-Ethier, J., Hanafi, L.-A., Piccirillo, C. a. y Lapointe, R. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human cancers: clinical and immunologic perspectives. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **17,** 6985-6991 (2011).
7. Muller, A. J., DuHadaway, J. B., Donover, P. S., Sutanto-Ward, E. y Prendergast, G. C. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nature medicine* **11,** 312-319 (2005).
8. Uyttenhove, C. *y col.* Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nature Medicine* **9,** 1269-1274 (2003).
9. Hou, T., Wang, J., Li, Y. y Wang, W. Assessing the Performance of the MM/PBSA and MM/GBSA Methods. 1. The Accuracy of Binding Free Energy Calculations Based on Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling* **51,** 69-82 (2011).
10. Shimizu, T., Nomiyama, S., Hirata, F. y Hayaishi, O. Indoleamine 2,3-dioxygenase. Purification and some properties. *Journal of Biological Chemistry* **253,** 4700-4706 (1978).
11. Hayaishi, O. Properties and function of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Journal of biochemistry* **79,** 13P-21P (1976).

12. Yamamoto, S. y Hayaishi, O. Tryptophan Pyrrolase of Rabbit Intestine: d- and l-tryptophan-cleaving enzyme or enzymes. *Journal of Biological Chemistry* **242,** 5260-5266 (1967).

13. Austin, C. J. D. *y col.* Optimised expression and purification of recombinant human indoleamine 2,3-dioxygenase. *Protein Expression and Purification* **37,** 392-398 (2004).

14. Meng, B. *y col.* Structural and functional analyses of human tryptophan 2,3-dioxygenase. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **82,** 3210-3216 (2014).

15. Lewis-Ballester, A. *y col.* Molecular basis for catalysis and substrate-mediated cellular stabilization of human tryptophan 2,3-dioxygenase. *Scientific Reports* **6,** 35169 (2016).

16. Searles, L. L., Ruth, R. S., Pret, A. M., Fridell, R. A. y Ali, A. J. Structure and transcription of the Drosophila melanogaster vermilion gene and several mutant alleles. *Molecular and Cellular Biology* **10,** 1423-1431 (1990).

17. Zhang, Y. *y col.* Crystal structure and mechanism of tryptophan 2,3-dioxygenase, a heme enzyme involved in tryptophan catabolism and in quinolinate biosynthesis. *Biochemistry* **46,** 145-155 (2007).

18. Molecular insights into substrate recognition and catalysis by tryptophan 2,3-dioxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104,** 473-478 (2007).

19. Greengard, O. y Feigelson, P. The purification and properties of liver tryptophan pyrrolase. *The Journal of biological chemistry* **237,** 1903-1907 (1962).

20. Sugimoto, H. *y col.* Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: catalytic mechanism of O2 incorporation by a heme-containing dioxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103,** 2611-2616 (2006).

21. Tojo, S. *y col.* Crystal Structures and Structure–Activity Relationships of Imidazothiazole Derivatives as IDO1 Inhibitors. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **5,** 1119-1123 (2014).

22. Sono, M., Roach, M. P., Coulter, E. D. y Dawson, J. H. Heme-Containing Oxygenases. *Chemical Reviews* **96,** 2841-2888 (1996).

23. Ishimura, Y., Nozaki, M. y Hayaishi, O. The oxygenated form of L-tryptophan 2,3-dioxygenase as reaction intermediate. *Journal of Biological Chemistry* **245,** 3593-3602 (1970).

24. Batabyal, D. y Yeh, S. R. Human tryptophan dioxygenase: A comparison to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Journal of the American Chemical Society* **129,** 15690-15701 (2007).

25. Capece, L. *y col.* The first step of the dioxygenation reaction carried out by tryptophan dioxygenase and indoleamine 2,3-dioxygenase as revealed by quantum mechanical/molecular mechanical studies. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **15,** 811-823 (2010).

26. Lewis-Ballester, A. *y col.* Evidence for a ferryl intermediate in a heme-based dioxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106,** 17371-17376 (2009).

27. GA Hamilton. Mechanisms of Two- And Four-Electron Oxidations Catalyzed by Some Metalloenzymes. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **32,** 55-96 (1969).

28. Ronsein, G. E., Oliveira, M. C. B., Miyamoto, S., Medeiros, M. H. G. y Di Mascio, P. Tryptophan Oxidation by Singlet Molecular Oxygen [O2 (1Δg)]: Mechanistic Studies Using 18O-Labeled Hydroperoxides, Mass Spectrometry, and Light Emission Measurements. *Chemical Research in Toxicology* **21,** 1271-1283 (2008).

29. Capece, L. *y col.* Substrate stereo-specificity in tryptophan dioxygenase and indoleamine 2,3-dioxygenase. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* **78,** 2961-2972 (2010).

30. Terentis, A. C. *y col.* The Heme Environment of Recombinant Human Indoleamine 2,3-Dioxygenase: structural properties and substrate-ligand interacions. *Journal of Biological Chemistry* **277,** 15788-15794 (2002).

31. Thackray, S. J. *y col.* Histidine 55 of tryptophan 2,3-dioxygenase is not an active site base but regulates catalysis by controlling substrate binding. *Biochemistry* **47,** 10677-10684 (2008).

32. Batabyal, D. y Yeh, S. R. Substrate-protein interaction in human tryptophan dioxygenase: The critical role of H76. *Journal of the American Chemical Society* **131,** 3260-3270 (2009).

33. Chauhan, N. *y col.* The role of serine 167 in human indoleamine 2,3-dioxygenase: A comparison with tryptophan 2,3-dioxygenase. *Biochemistry* **47,** 4761-4769 (2008).

34. Chauhan, N. *y col.* Reassessment of the Reaction Mechanism in the Heme Dioxygenases. *Journal of the American Chemical Society* **131,** 4186-4187 (2009).

35. Lu, C., Lin, Y. y Yeh, S. R. Inhibitory substrate binding site of human indoleamine 2,3-dioxygenase. *Journal of the American Chemical Society* **131,** 12866-12867 (2009).

36. Chung, L. W., Li, X., Sugimoto, H., Shiro, Y. y Morokuma, K. Density Functional Theory Study on a Missing Piece in Understanding of Heme Chemistry: The Reaction Mechanism for Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Tryptophan 2,3-Dioxygenase. *Journal of the American Chemical Society* **130,** 12299-12309 (2008).

37. Guallar, V. y Wallrapp, F. H. QM/MM methods: Looking inside heme proteins biochemisty. *Biophysical Chemistry* **149,** 1-11 (2010).

38. Chung, L. W., Li, X., Sugimoto, H., Shiro, Y. y Morokuma, K. ONIOM study on a missing piece in our understanding of heme chemistry: Bacterial tryptophan 2,3-dioxygenase with dual oxidants. *Journal of the American Chemical Society* **132,** 11993-12005 (2010).

39. Yanagisawa, S. *y col.* Identification of the Fe–O2 and the Fe=O Heme Species for Indoleamine 2,3-Dioxygenase during Catalytic Turnover. *Chemistry Letters* **39,** 36-37 (2009).

40. Basran, J. *y col.* The mechanism of formation of N-formylkynurenine by heme dioxygenases. *Journal of the American Chemical Society,* 16251-16257 (2011).

41. Case, D. A. *y col.* Amber 2015. *University of California, San Francisco* (2015).

42. Salomon-Ferrer, R., Götz, A. W., Poole, D., Le Grand, S. y Walker, R. C. Routine Microsecond Molecular Dynamics Simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit Solvent Particle Mesh Ewald. *Journal of Chemical Theory and Computation* **9,** 3878-3888 (2013).

43. Essmann, U. *y col.* A smooth particle mesh Ewald method. *The Journal of Chemical Physics* **103,** 8577 (1995).

44. Ryckaert, J.-P., Ciccotti, G. y Berendsen, H. J. C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics* **23,** 327-341 (1977).

45. Wu, X. y Brooks, B. R. Self-guided Langevin dynamics simulation method. *Chemical Physics Letters* **381,** 512-518 (2003).

46. Crespo, A. *y col.* A DFT-Based QM-MM Approach Designed for the Treatment of Large Molecular Systems: Application to Chorismate Mutase. *The Journal of Physical Chemistry B* **107,** 13728-13736 (2003).

47. Sánchez-Portal, J. M. S. *y col.* The SIESTA method for ab initio order- N materials simulation. *Journal of Physics: Condensed Matter* **14,** 2745 (2002).

48. Perdew, J. P., Burke, K. y Ernzerhof, M. Generalized Gradient Approximation Made Simple. *Physical Review Letters* **77,** 3865-3868 (18 1996).

49. Wang, J., Cieplak, P. y Kollman, P. A. How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *Journal of Computational Chemistry* **21,** 1049-1074 (2000).

50. Lin, H. y Truhlar, D. G. QM/MM: what have we learned, where are we, and where do we go from here? *Theoretical Chemistry Accounts* **117,** 185 (2006).

51. Capece, L., Lewis-Ballester, A., Yeh, S. R., Estrin, D. a. y Marti, M. a. Complete reaction mechanism of indoleamine 2,3-dioxygenase as revealed by QM/MM simulations. *Journal of Physical Chemistry B* **116,** 1401-1413 (2012).

52. Rovira, C. y Fita, I. The Proximal Hydrogen-Bonded Residue Controls the Stability of the Compound II Intermediate of Peroxidases and Catalases. *The Journal of Physical Chemistry B* **107,** 5300-5305 (2003).

53. Bathelt, C. M., Zurek, J., Mulholland, A. J. y Harvey, J. N. Electronic Structure of Compound I in Human Isoforms of Cytochrome P450 from QM/MM Modeling. *Journal of the American Chemical Society* **127,** 12900-12908 (2005).

54. Capece, L., Lewis-Ballester, A., Marti, M. a., Estrin, D. a. y Yeh, S. R. Molecular basis for the substrate stereoselectivity in tryptophan dioxygenase. *Biochemistry* **50,** 10910-10918 (2011).

55. Zhu, X., van Pée, K.-H. y Naismith, J. H. The Ternary Complex of PrnB (the Second Enzyme in the Pyrrolnitrin Biosynthesis Pathway), Tryptophan, and Cyanide Yields New Mechanistic Insights into the Indolamine Dioxygenase Superfamily. *The Journal of Biological Chemistry* **285,** 21126-21133 (2010).

56. De Laurentis, W. *y col.* The Second Enzyme in Pyrrolnitrin Biosynthetic Pathway Is Related to the Heme-Dependent Dioxygenase Superfamily†. *Biochemistry* **46,** 12393-12404 (2007).

57. Trevino, S. R., Schaefer, S., Scholtz, J. M. y Pace, C. N. Increasing Protein Conformational Stability by Optimizing β-Turn Sequence. *Journal of Molecular Biology* **373,** 211-218 (2007).

58. Pearlman, D. A. *y col.* AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules. *Computer Physics Communications* **91,** 1-41 (1995).

59. Case, D. A. *y col.* Amber 2015. *University of California, San Francisco* (2015).

60. Le Grand, S., Götz, A. W. y Walker, R. C. SPFP: Speed without compromise—A mixed precision model for GPU accelerated molecular dynamics simulations. *Computer Physics Communications* **184,** 374-380 (2013).

61. Götz, A. W. *y col.* Routine Microsecond Molecular Dynamics Simulations with AMBER on GPUs. 1. Generalized Born. *Journal of Chemical Theory and Computation* **8,** 1542-1555 (2012).

62. Roe, D. R. y Cheatham, T. E. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. *Journal of Chemical Theory and Computation* **9,** 3084-3095 (2013).

63. Samelson-Jones, B. J. y Yeh, S.-R. Interactions between Nitric Oxide and Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Biochemistry* **45,** 8527-8538 (2006).

64. Durrant, J. D., De Oliveira, C. A. F. y McCammon, J. A. POVME: An algorithm for measuring binding-pocket volumes. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **29,** 773-776 (2011).

65. Durrant, J. D., Votapka, L., Sørensen, J. y Amaro, R. E. POVME 2.0: An Enhanced Tool for Determining Pocket Shape and Volume Characteristics. *Journal of Chemical Theory and Computation* **10,** 5047-5056 (2014).

66. Lee, Y.-T., Wilson, R. F., Rupniewski, I. y Goodin, D. B. P450cam visits an open conformation in the absence of substrate, *Biochemistry* **49,** 3412-3419 (2010).

67. Skinner, S. P. *y col.* Delicate conformational balance of the redox enzyme cytochrome P450cam. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112,** 9022-9027 (2015).

68. Stoll, S. *y col.* Double electron–electron resonance shows cytochrome P450cam undergoes a conformational change in solution upon binding substrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109,** 12888-12893 (2012).

69. Sigrist, C. J. A. *y col.* New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Research* **41,** D344 (2013).

70. De Castro, E. *y col.* ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Research* **34,** W362 (2006).

71. Fujigaki, H., Seishima, M. y Saito, K. Posttranslational modification of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **403,** 1777-1782 (2012).

CAPÍTULO 4

FORMACIÓN DE HNO MEDIADA POR MIOGLOBINA

4.1. Introducción

La mioglobina (Mb) es una hemoproteína citoplasmática, que es expresada en las células que componen el tejido muscular. Consiste en una cadena polipeptídica única de 154 aminoácidos distribuidos en 8 hélices alfa (designadas con letras de la A a la H, ver figura 4.1). Cabe destacar que la Mb fue la primera proteína cuya estructura tridimensional fue determinada [1].

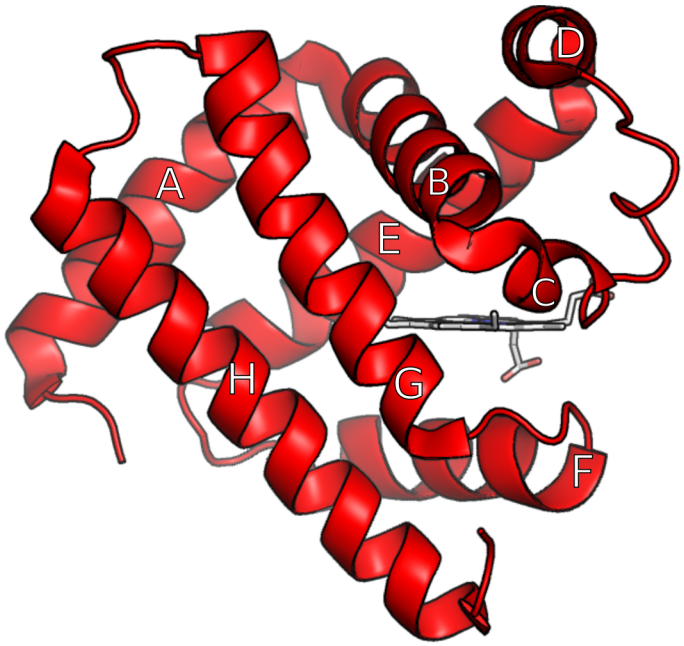


Figura 4.1: Estructura de la mioglobina del corazón de caballo.

La función por la cual se conoce a la Mb es la de ser responsable del almacenamiento de O_2 en el músculo. Sin embargo, ésta no es la única función que posee. Además, actúa como amortiguador de la P_{O_2} intracelular [2, 3]. Esto quiere decir que, cuando la actividad muscular aumenta, la Mb funciona

manteniendo constante la P_{O_2} [4, 5]. Un tercer rol atribuido a la Mb es el de ser facilitador de difusión de O_2. Todos estos roles tienen en común que están asociados a la unión de O_2 al grupo hemo. No obstante, existen otros roles de la Mb que no involucran al O_2, como ser la habilidad de unir NO. Se ha propuesto que Mb puede tener un rol importante en la depuración de NO y de otras especies reactivas de oxígeno y nitrógeno [6-8]. Por último, la Mb es conocida por su actividad peroxidasa [9-11]. Si bien esta actividad no es la primordial, puede ser importante en procesos patológicos, como ser la anemia homolítica o el daño por reperfusión [12, 13].

La función peroxidasa consiste en la catálisis de la oxidación de sustratos utilizando peróxidos como agentes oxidantes. Muchas de las enzimas con esta función utilizan peróxido de hidrógeno (H_2O_2), pero otras utilizan hidroperóxidos orgánicos (ver reacción R8).

$$2\,XH + H_2O_2 \xrightarrow{peroxidasa} 2\,X^{\cdot} + 2\,H_2O \tag{R8}$$

Las proteínas con función peroxidasa más comunes son también hemoproteínas (por ejemplo: la citocromo C peroxidasa y peroxidasa de rábano picante).

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es un agente oxidante muy importante en biología, ya que posee un potencial de reducción de 1,349 V versus el electrodo normal de hidrógeno (ENH) para dar agua a pH 7 y 25 ° C.

$$H_2O_2(ac) + 2\,H^+(ac) + 2\,e^- \longrightarrow 2\,H_2O\,(l) \quad E^{0\prime} = 1{,}349\,V \tag{R9}$$

[14]

A pesar de este valor favorable, la molécula de H_2O_2 resulta ser lo suficientemente estable debido a que la energía de unión O-O es bastante grande (33 kcal/mol). Por este motivo, es necesario un mecanismo de reacción en el cual se supere dicha barrera, se rompa el enlace peroxo O-O, desencadenándose así el poder oxidante del peróxido de hidrógeno. La ruptura de este enlace puede ocurrir de dos maneras: homolítica o heterolíticamente (ver figura 4.2). La ruptura homolítica consiste en que cada átomo de oxígeno se queda con el mismo número de electrones de valencia para dar lugar a dos radicales hidroxilos. En la ruptura heterolítica, en cambio, un oxígeno pasa a formar parte de una molécula de agua, teniendo su capa de valencia con ocho electrones, mientras que el átomo de oxígeno restante, al cual se lo denomina oxeno, contiene solamente seis electrones de valencia. Los radicales hidroxilos son altamente reactivos y pueden causar gran daño a las macromoléculas. Debido a esto, las peroxidasas funcionan a través de un mecanismo de reacción heterolítico evitando así la formación de radicales hidroxilos. El oxeno es estabilizado a través de la unión al grupo hemo presente en las peroxidasas. El mecanismo de reacción de las peroxidasas ha sido ampliamente estudiado utilizando numerosas técnicas experimentales como ser: UV-vis, EPR [15], Mossbauer [15],

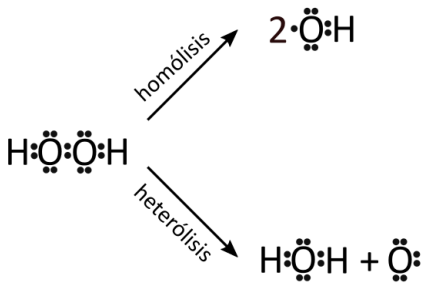


Figura 4.2: El peróxido de hidrógeno puede romperse mediante dos mecanismos: homolítico o heterolítico. Las peroxidasas reaccionan de forma tal que únicamente ocurre la ruptura heterolítica del enlace O-O del peróxido.

absorción de rayos X [16] y cristalografía de rayos X de las proteínas en diferentes estados de oxidación o coordinación [17-19]. Con los datos obtenidos se ha propuesto el siguiente mecanismo de reacción:

$$\textbf{Paso 1} \quad [Fe^{3+}R] + H_2O_2 \longrightarrow \underset{\textbf{Compuesto I}}{[Fe^{4+}{=}OR^{\cdot}]} + H_2O \tag{R10}$$

$$\textbf{Paso 2} \quad \underset{\textbf{Compuesto I}}{[Fe^{4+}{=}OR^{\cdot}]} + AH_2 \longrightarrow \underset{\textbf{Compuesto II}}{[Fe^{4+}{=}OR]} + AH^{\cdot} + H^{+} \tag{R11}$$

$$\textbf{Paso 3} \quad \underset{\textbf{Compuesto II}}{[Fe^{4+}{=}OR]} + H^{+} + AH_2 \longrightarrow [Fe^{3+}] + AH^{\cdot} + H_2O \tag{R12}$$

En el primer paso, el enlace O-O se rompe dejando un átomo de óxigeno con solamente seis electrones de valencia. Este átomo toma un electrón del hierro y otro electrón de la porfirina o de un aminoácido de una cadena lateral (representado por **R** en las reacciones) quedando entonces como un grupo oxo. En la mayoría de las peroxidasas, la porfirina es el catión radical; aunque en la citocromo c peroxidasa el radical se encuentra centrado en un residuo triptófano adyacente al grupo hemo [20]. El complejo $[Fe^{4+}{=}OR^{\cdot}]$ generado, denominado compuesto I, resulta ser bastante estable y ha sido caracterizado ampliamente.

En el segundo paso, un sustrato entrega un electrón al $R^{\cdot}$ dando lugar a un complejo del tipo $[Fe^{4+}{=}OR]$, al que se lo denomina compuesto II, y al sustrato radical. Estos dos primeros pasos son generalmente rápidos con una cinética de segundo orden.

Finalmente, el centro $Fe^{4+}{=}O$ del compuesto II es reducido por una segunda molécula de sustrato. Este paso resulta ser, en general, el paso limitante de la reacción. Se ha detectado que la histidina distal resulta ser un residuo clave para la reacción de peroxidación en las peroxidasas, debido a que sirve como grupo ácido-base que asegura que la ruptura del enlace O-O sea de forma heterolítica. Además, se ha demostrado que durante la reacción, una arginina en el sitio activo se mueve de manera tal de formar un puente de hidrógeno con el centro $Fe^{4+}{=}O$, otorgando una estabilidad adicional a los compuestos I y II.

A pesar de que la química de coordinación de la Mb es similar a la de las otras peroxidasas (con una histidina proximal unida al hemo y otra histidina distal al hemo), tanto la cinética como el mecanismo de la reacción son ligeramente distintos. En ambos casos, luego de la reacción con H_2O_2, se obtienen especies del tipo Fe^{4+}=O y radicales localizados en el anillo porfirínico o en la proteína (denominándose a este compuesto tipo compuesto I). Sin embargo, en el caso de la Mb, la proporción obtenida es distinta a la que se obtiene en las peroxidasas nativas. Aunque se han formulado distintas propuestas, el mecanismo mediante el cual ocurren las reacciones de peroxidación catalizadas por metMb no ha sido dilucidado completamente. Un estudio utilizando técnica de flujo detenido [21], muestra que el compuesto I de la Mb nativa es formado durante la reacción con H_2O_2, lo cual es comprobado mediante la detección del espectro de absorción UV-Vis típico del compuesto I. En este trabajo se demuestra, también, que la MbFe(III) (metMb) lleva a cabo tanto homólisis como heterólisis de H_2O_2. Sin embargo, en la Mb el electrón desapareado presente en el anillo porfirínico es transferido rápidamente a algún residuo proteico de la cavidad distal y es por eso que no se acumula el compuesto I típico de las peroxidasas como una entidad detectable a tiempos largos. Resulta interesante remarcar que la estabilidad del compuesto I típico de las peroxidasas en la Mb aumenta al realizar la mutación de la histidina 64 de la cavidad distal, lo cual sugiere que dicho residuo posee un rol clave en la deslocalización del radical [22, 23]. Las diferencias en el mecanismo de peroxidación de las peroxidasas y de la Mb podrían deberse a la ausencia de un residuo polar como la arginina en la cavidad distal la cual sería responsable de asistir a la ruptura heterolítica del peróxido de hidrógeno.

La hidroxilamina (NH_2OH) es un compuesto endógeno producido debido al normal funcionamiento del metabolismo celular en mamíferos y formado a través de la reducción de nitratos o nitritos o a la oxidación de amoníaco [24]. A su vez, la hidroxilamina puede ser producida a partir de S-nitrosotioles (RSNO) bajo condiciones de estrés nitrosativo [25]. Por otro lado, las hidroxilaminas se producen en el cuerpo a partir de drogas como la anfetamina, efedrina y norefedrina. Sus concentraciones *in vivo* no están bien establecidas, pero la evidencia experimental sugiere que se trata de un metabolito de relevancia en diferentes condiciones fisio-patológicas [24, 26].

En este capítulo se estudiará la reacción de peroxidación de hidroxilaminas catalizada por Mb para dar nitroxilo (HNO). El interés de estudiar estas reacciones surge de la posibilidad de que se trate de una vía de formación endógena de HNO. La hidroxilamina es un sustrato lógico para la formación de HNO por peroxidación, debido a que su nitrógeno se encuentra dos electrones más reducido que

en el HNO. El mecanismo propuesto para dicha reacción es el siguiente:

$$\textbf{Paso 1} \quad [\mathrm{Mb\,Fe^{3+}\,R}] + \mathrm{H_2O_2} \longrightarrow \underset{\text{tipo compuesto I}}{[\mathrm{Mb\,Fe^{4+}{=}O\,R^{\bullet}}]} + \mathrm{H_2O} \tag{R13}$$

$$\textbf{Paso 2} \quad \underset{\text{tipo compuesto I}}{[\mathrm{Mb\,Fe^{4+}{=}O\,R^{\bullet}}]} + \mathrm{NH_2OH} \longrightarrow [\mathrm{Mb\,Fe^{3+}\,R}] + \mathrm{HNO} + \mathrm{H_2O}. \tag{R14}$$

Esta hipótesis fue estudiada en anterioridad por Donzelli y colaboradores [27]. En particular, ellos estudiaron la producción de HNO a partir de NH_2OH y N-hidroxi-L-arginina por peroxidación de hemoproteínas. Resulta importante destacar que en dicho trabajo detectan generación de HNO a partir de hidroxilamina, pero no a partir de N-hidroxi-L-arginina. Por otro lado, observan una mayor generación de HNO en las hemoproteínas que poseen una histidina como ligando proximal. Sin embargo, en dicho trabajo no realizan ningún estudio sobre el mecanismo de reacción ni sobre la cinética de la misma. Es por ello que en este capítulo se estudiará la reacción de peroxidación de hidroxilamina mediada por metMb centrándonos en los aspectos mecanísticos de la misma. Para realizarlo se comenzará con el análisis cinético de la reacción de metMb y H_2O_2. Si bien, esto ha sido anteriormente estudiado [21], las concentraciones de H_2O_2 utilizadas eran del orden 0,025—0,1 M, la cual resulta ser muy elevada en comparación con la concentración fisiológica [28]. Una vez caracterizada dicha reacción, se estudiará tanto experimental como computacionalmente, lo que ocurre con el agregado de la hidroxilamina.

4.2. Métodos experimentales

Reactivos

La mioglobina de corazón de caballo (metMb) y el clorhidrato de hidroxilamina fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. H_2O_2 30 % se obtuvo de Anedra. La metMb fue utilizada directamente sin realizar purificaciones. Las soluciones fueron preparadas diariamente en agua Milli-Q salvo que sea especificado de otra manera. Las soluciones de metMb 5 ó 10 μM se prepararon en una solución amortiguadora de fosfato de sodio (10 mM, pH 7,4) con EDTA (50 μM) para evitar así interferencias de reacciones de cationes divalentes como ser Cu(II). La concentración de dicha solución fue determinada midiendo la absorbancia de la misma a 408 nm (ϵ = 188000 $M^{-1}cm^{-1}$ [29]).

Estudios cinéticos

Los datos cinéticos de los dos pasos de reacción estudiados fueron obtenidos registrando los espectros UV-vis resueltos en el tiempo utilizando un espectrofotómetro de flujo detenido SFM-300 Bio-Logic. Este equipo posee un espectrómetro de arreglo de diodos de alta velocidad J&M Tidas combinado con una lámpara de deuterio y otra de tungsteno (siendo el rango de longitud de ondas

que puede medir de 200-1015 nm). Las soluciones fueron termostatizadas a 25 ° C, purgadas con N_2 y llegan al equipo a través de cánulas anaeróbicas. El sistema fue operado utilizando el programa Bio-Kine 4.50. Las jeringas se controlan electrónicamente con la finalidad de variar la relación entre los reactivos. Los valores presentados corresponden a valores promedio y desviaciones estándar. Todas las medidas cinéticas fueron llevadas a cabo bajo condiciones de pseudo primer orden. El tiempo de observación para cada medición fue de 10 s con un tiempo muerto de 4 ms.

Electrodo de HNO

La detección de HNO fue realizada utilizando el método de tres electrodos (ver sección 2.2.3 para mayor información) que consiste en el contraelectrodo de platino, el electrodo de referencia de Ag/AgCl y el electrodo modificado específico para HNO como electrodo de trabajo. La medida amperométrica fue realizada utilizando un potenciostato TEQ 03. Se midió la variación de corriente en función del tiempo luego del agregado de la hidroxilamina (600 μM) a una celda electroquímica que contenía o bien solución amortiguadora de fosfato de sodio (10 mM, pH 7,4) con EDTA (50 μM) en el caso del control, o bien solución de Mb 10 μM realizada en esa misma solución amortiguadora con EDTA (50 μM) y H_2O_2 200 μM. Además, se verificó el funcionamiento del método de detección agregando sal de Angeli ($Na_2N_2O_3$) a la celda electroquímica con la solución amortiguadora antes descripta. La sal de Angeli es un compuesto que es utilizado comúnmente para la generación *in situ* de HNO. El mecanismo aceptado para la descomposición espontánea para dar HNO y nitrito, implica la monoprotonación del anión de sal de Angeli entre pH 4 y 8, como puede verse en la figura 4.3 [30].

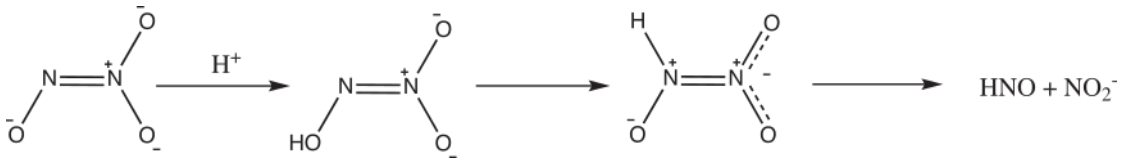


Figura 4.3: Mecanismo de descomposición de la sal de Angeli en pH neutro

La constante de velocidad para esta reacción es de 6,8 x $10^{-4}s^{-1}$ a 25 ° C, con un tiempo de vida media equivalente a 17 minutos, lo cual resulta prácticamente invariable con el cambio de pH entre 4 y 8 [31-33].

En el caso de las mediciones cinéticas realizadas, se midió la variación de corriente en función del tiempo luego del agregado de distintas concentraciones de la hidroxilamina (desde 0,4 mM a 0,8 mM) a una celda electroquímica que contenía una solución de Mb 10 μM y H_2O_2 200 μM en solución amortiguadora de fosfato de sodio (10 mM, pH 7,4) con EDTA (50 μM) .

En todos los casos cada medida fue realizada por duplicado y bajo atmósfera de N_2.

4.3. Métodos computacionales

Cálculos de Dinámica Molecular

Las estructuras de partida para los complejos del compuesto I y las hidroxilaminas fueron construidas a partir de la estructura disponible en el PDB, correspondiente al complejo con NO (código 1NPF, [34]). Se eliminó el NO del sitio activo y se convirtió al hemo en el compuesto ferrilo. Dicha estructura, luego, fue inmersa en una caja octaédrica de moléculas de agua del tipo TIP3P. Todas las simulaciones fueron realizadas con el programa PMEMD del paquete *Amber14* [35] usando condiciones periódicas de contorno, las sumas de Ewald para tratar las interacciones electrostáticas de largo alcance [36, 37] y el algoritmo de SHAKE para mantener los enlaces que involucran átomos de hidrógeno en sus distancias de equilibrio. El tiempo de integración utilizado fue de 2 fs para las ecuaciones de Newton [38] y se utilizó el termostato de Langevin [39] para controlar la temperatura del sistema. Los cálculos de equilibrio consistieron en una minimización de energía de las estructuras iniciales, seguido por un calentamiento lento a 300 K a volumen constante. Se utilizó una distancia mínima de 10 Å entre la superficie de la proteína y la caja de agua. Una vez comprobado que la estructura proteica no se perturbara, se agregó la hidroxilamina correspondiente.

Para ambos casos, se realizó una simulación de 30 ns de duración, en la cual se prestó especial atención en el hecho de que la presencia de la hidroxilamina en la cavidad distal no perturbara la conformación proteica de manera significativa.

Cálculos QM-MM

Para la realización de los cálculos QM-MM se utilizaron las estructuras obtenidas de las simulaciones de DM, para los complejos del complejo del compuesto I y las hidroxilaminas. Los cálculos se realizaron utilizando la implementación de *Hybrid* [40] que utiliza el programa SIESTA [41] para el subsistema cuántico. Dicho subsistema estaba compuesto por el grupo hemo (sin sus cadenas laterales), el imidazol de la cadena lateral de la histidina proximal y las hidroxilaminas según el caso. Este subsistema fue tratado a nivel DFT empleando bases doble zeta con polarización y el funcional PBE [42]. Se utilizó un radio de corte de 10 Å, tomado desde el centro del subsistema QM, para permitir el movimiento de los átomos. El resto de la proteína que no estaba incluída en el subsistema QM y las moléculas de agua fueron tratadas en forma clásica utilizando el campo de fuerzas de Amber99 [43]. La interfase entre el sistema QM y el MM fue tratada con el método del *Link Atom* (ver sección 2.1.1.3 para mayor información) [44]. En particular, se utilizaron nueve *Link Atoms*, uno de ellos separando el imidazol de la histidina proximal del resto de su cadena principal y los ocho restantes separando el anillo porfirínico de las cadenas laterales del grupo hemo. Los detalles del método utilizado se encuentran en la sección 2.1.1.3.

4.4. Resultados y discusiones

4.4.1. Estudio cinético de la reacción de metMb con peróxido de hidrógeno

Con la finalidad de estudiar la reacción de peroxidación de hidroxilamina mediada por metMb, se comenzó analizando la reacción de H_2O_2 con metMb mediante el uso de espectroscopía UV-Vis. Al agregar H_2O_2 a una solución de metMb se observa el corrimiento de la bandas de Soret y Q características del estado férrico de la Mb (408, 504 y 632 nm, [29, 45-47]) hacia las posiciones correspondientes al tipo compuesto I de la Mb (422, 548 y 586 nm, [47, 48]), ver figura 4.4 paneles A y B. Se observan, además, en dichos paneles la presencia de varios puntos isosbésticos (punto para el cual a una misma longitud de onda ambas especies poseen la misma absortividad molar). La existencia de dichos puntos es indicativo de que la estequiometría de la reacción se mantiene invariante durante la reacción y de que no existen reacciones secundarias durante el rango de tiempo considerado [49]. Se estudió la cinética de la reacción, monitoreando el decaimiento monofásico del pico a 408 nm a lo largo del tiempo para distintas concentraciones de H_2O_2 (ver figura 4.4 panel C) y se graficaron los valores de constante de velocidad observada (k_{obs}) en cada caso obteniéndose el gráfico que puede verse en la figura 4.4 panel D. Debido a que el decaimiento de la absorbancia de metMb a 408 nm en función del tiempo puede ajustarse por una función monoexponencial, ver figura 4.4 panel C, puede decirse que el orden de reacción de dicho reactivo es uno. Como puede observarse en la figura 4.4 panel D, los resultados se ajustan de forma satisfactoria a la curva relacionada con una cinética de saturación de dependencia hiperbólica entre k_{obs} y la concentración de H_2O_2 que posee la siguiente expresión:

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{lim}}[H_2O_2]}{K_{0,5} + [H_2O_2]} \tag{4.1}$$

Los parámetros obtenidos son $k_{\text{lim}} = 1,41 \pm 0,2\ \text{s}^{-1}$ y $K_{0,5} = (1,00 \pm 0,04)\text{x}10^{-3}$ M . La k_{lim} es la constante de velocidad de reacción que se tiene cuando la enzima se encuentra saturada. El valor de k_{lim} obtenido en la presente tesis resulta consistente con el resultado presentado por Egawa y colaboradores para mayores concentraciones de peróxido de hidrógeno [21]. $K_{0,5}$ es equivalente a la concentración de sustrato para la cual la constante de velocidad observada de la reacción es igual a la mitad de la constante de velocidad de saturación. Este valor puede ser interpretado como la constante de disociación aparente del complejo enzima-sustrato, la cual puede ser tratada como la constante de disociación total de todas las especies unidas de enzima y sustrato. En el caso de la reacción de metMb con H_2O_2, el valor relativamente bajo de $K_{0,5}$ es indicativo de que el complejo enzima-sustrato está unido muy fuertemente y raramente se disociará sin que el sustrato reaccione dando lugar a producto.

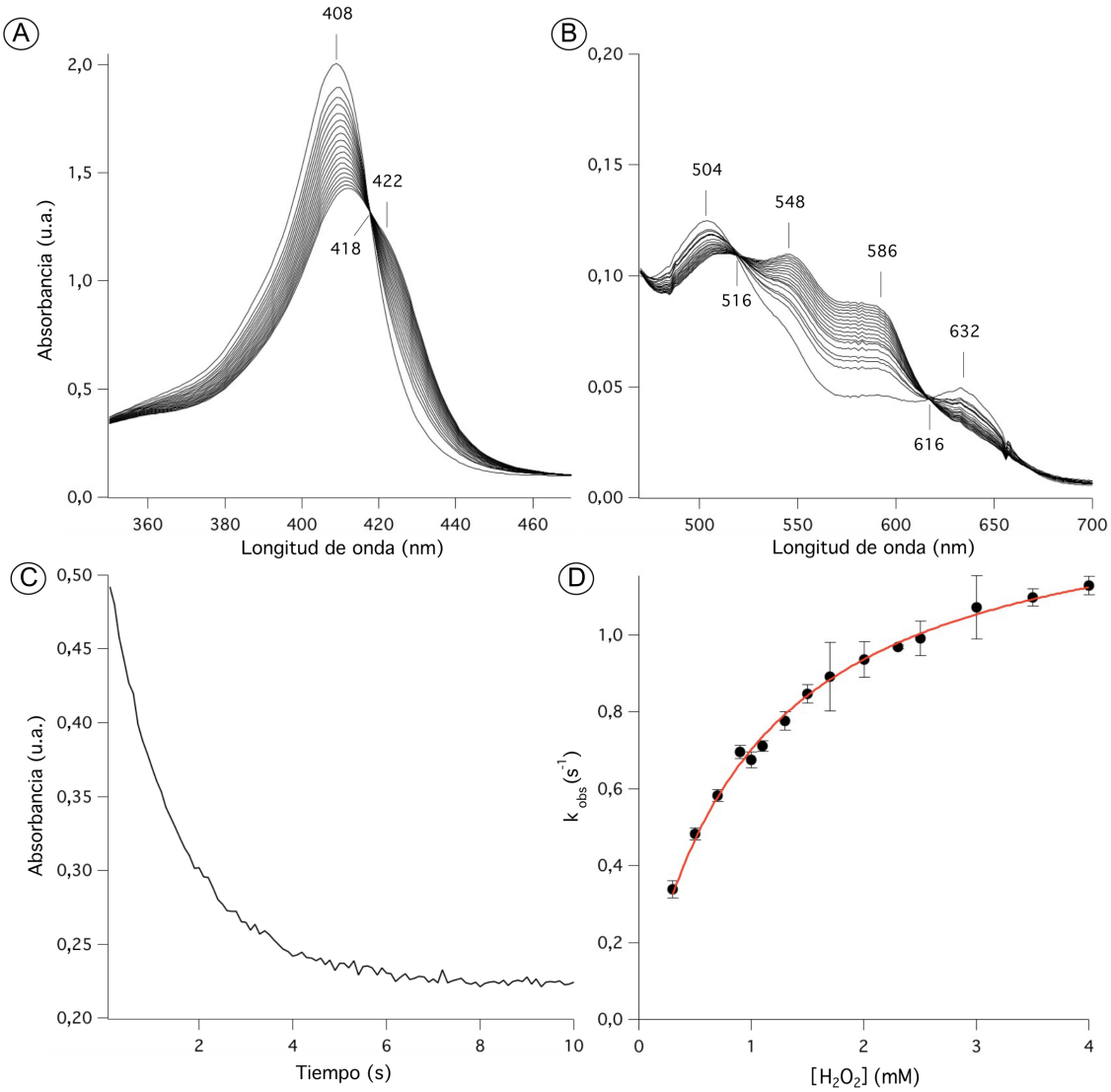


Figura 4.4: (A) Corrimiento de la banda de Soret desde el espectro correspondiente a la metMb (10 μM) hacia el espectro correspondiente al compuesto I de la Mb debido al agregado de 800 μM de peróxido de hidrógeno a pH 7,4 y 25 ° C. (B) Corrimiento de las bandas Q desde el espectro correspondiente a la metMb hacia el espectro correspondiente al compuesto I de la Mb. (C) Traza temporal de la absorbancia a 408 nm para la reacción de metMb (2,7 μM) con peróxido de hidrógeno (1 mM) a pH 7,4 y 25 ° C. (D) Gráfico correspondiente a los valores de constante de velocidad observada (k_{obs}) en función de la concentración de peróxido de hidrógeno para la reacción de metMb (3 μM) a pH 7,4 y 25 ° C.

En base a los resultados obtenidos pueden ser propuestos dos mecanismos de reacción. En un primer caso la metMb interacciona con el H_2O_2 para formar un complejo del tipo enzima-sustrato que luego reacciona para dar lugar al tipo compuesto I de Mb tal como se muestra a continuación:

$$\text{Mb}-\text{Fe(III)} + \text{H}_2\text{O}_2 \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \text{Mb}-\text{Fe(III)}-\text{H}_2\text{O}_2 \tag{R15}$$

$$\text{Mb}-\text{Fe(III)}-\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{k_2} \text{Mb}[\text{Fe}^{4+}{=}\text{O}\,\text{R}^{\cdot}] \tag{R16}$$

En esta propuesta el primer paso de reacción, que corresponde a la asociación bimolecular de H_2O_2

con la Mb junto con la reacción inversa de disociación, alcanzaría un estado de equilibrio de forma rápida. Luego, el segundo paso de reacción sería mucho más lento, tan lento que no afectaría las concentraciones de equilibrio del primer paso, dando lugar al tipo compuesto I.

En el caso de la segunda propuesta la metMb interacciona con el H_2O_2 para formar el compuesto I típico de las peroxidasas cuyo radical pasa de estar deslocalizado en el anillo porfirínico para deslocalizarse en la proteína dando lugar al tipo compuesto I de Mb tal como se muestra a continuación:

$$\mathrm{Mb{-}Fe(III)} + \mathrm{H_2O_2} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \mathrm{Mb[Fe^{4+}{=}OP^{\bullet}]} \tag{R17}$$

$$\mathrm{Mb[Fe^{4+}{=}OP^{\bullet}]} \xrightarrow{k_2} \mathrm{Mb[Fe^{4+}{=}OR^{\bullet}]} \tag{R18}$$

4.4.2. Estudio cinético de la peroxidación de la hidroxilamina

Habiendo caracterizado el primer paso de reacción y detectado la ventana temporal para la cual el tipo compuesto I de la Mb permanece estable, se realizó el estudio cinético de la reacción del mismo con hidroxilaminas. La figura 4.5 A muestra el cambio espectral observado al agregar hidroxilaminas a una solución de tipo compuesto I de Mb. Como puede verse en el espectro ocurre el cambio inverso que para el primer paso de reacción, la banda de Soret varía su posición desde 422 nm (correspondiente al tipo compuesto I de la Mb) hasta 408 nm (correspondiente a la metMb). Debe destacarse que se recupera una menor cantidad de metMb que la concentración de partida. Esto es debido a que, si bien la mayor parte del tipo compuesto I reacciona con hidroxilamina formando metMb, ocurren también otros fenómenos de descomposición del tipo compuesto I, que compiten con dicha reacción. Por un lado, puede ocurrir la protonación del tipo compuesto I que, luego, da lugar a un rearreglo y una posterior unión cruzada de Mb. Asimismo, puede ocurrir la disociación de la ferriprotoporfirina IX de la globina y la degradación del anillo protoporfirínico, dado que la oxidación disminuye la habilidad de retener al anillo porfirínico [50, 51].

A partir de los cambios de la absorbancia a 422 nm a lo largo del tiempo, que resultaron ser monoexponenciales, se determinaron las constantes de decaimiento en cada caso y se graficaron las mismas en función de la concentración de hidroxilamina (ver figura 4.5 panel D). La dependencia observada es de orden uno con una constante de velocidad de (5,1 ± 0,3) x 10^2 $M^{-1}s^{-1}$. Si se observa la figura 4.5 panel D, puede verse que la ordenada al origen es distinta a cero. Esto puede deberse a que a la par de la reacción del tipo compuesto I de la Mb con la hidroxilamina, suceden otras reacciones paralelas que consumen el tipo compuesto I de la Mb, como puede ser la descomposición del mismo. Además, puede estar ocurriendo la reacción inversa a la estudiada.

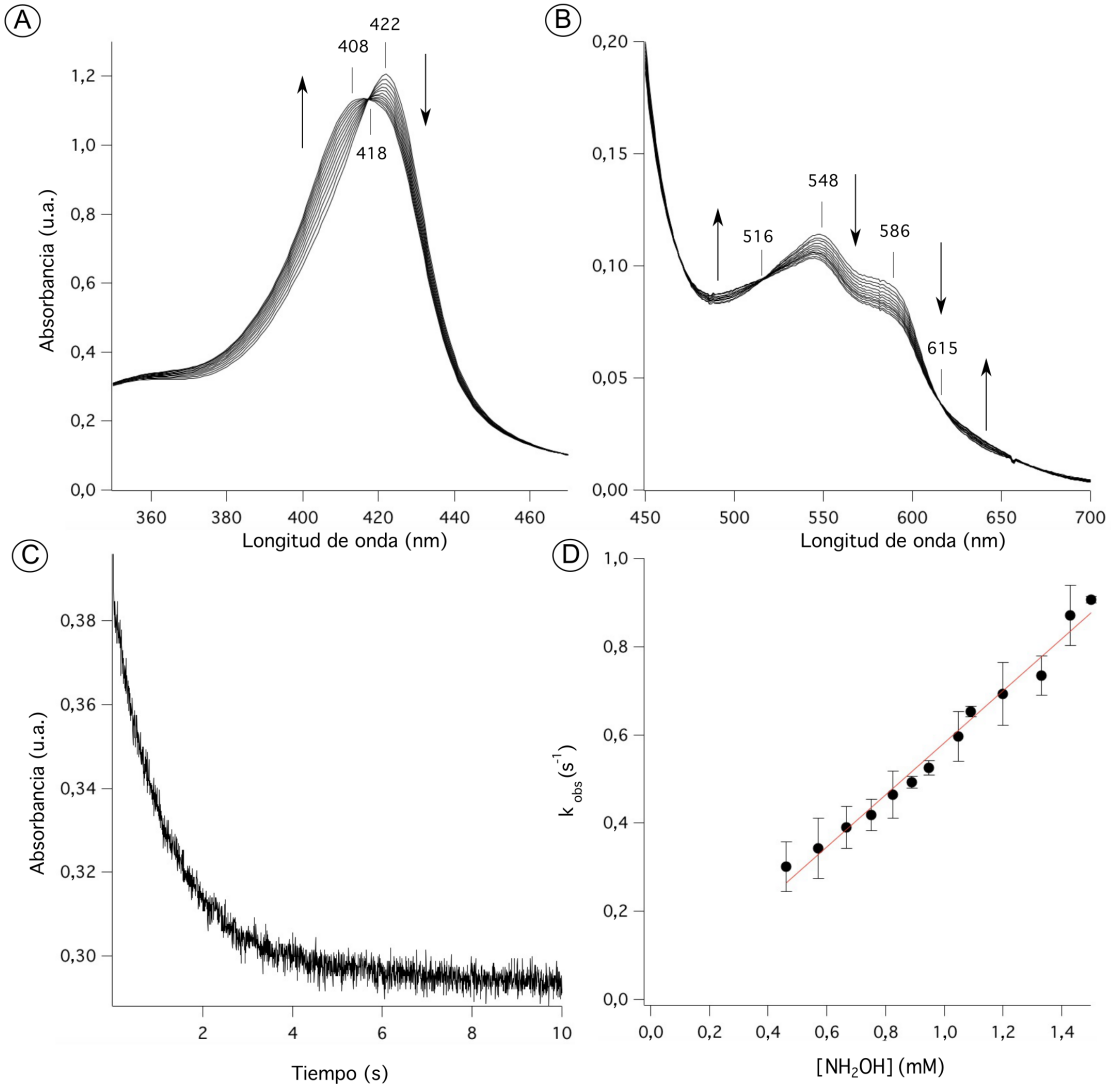


Figura 4.5: (A) Corrimiento de la banda de Soret y (B) de las bandas Q desde el espectro correspondiente al compuesto I de la mioglobina (10 μM, ϵ = 111000 $M^{-1}cm^{-1}$ [52, 53]) hacia el espectro correspondiente a la metMb, debido al agregado de 600 μM de hidroxilamina a pH 7,4 y 25 °C. (C) Traza temporal de la absorbancia a 422 nm para la reacción del compuesto I de la Mb (4 μM) con hidroxilamina (1,4 mM) a pH 7,4 y 25 °C. (D) Gráfico correspondiente a la constantes de velocidad en función de la concentración de hidroxilamina para la reacción de compuesto I de la Mb (4 μM).

Los resultados presentados anteriormente confirman que ocurre una reacción entre el tipo compuesto I y la hidroxilamina, pero queda por verificar que el producto de reacción sea HNO efectivamente. Para ello se utilizó un método electroquímico (ver sección 2.2.3 para una mayor información) que es específico para la detección de HNO. En la celda de medición fueron agregadas las soluciones de Mb y de H_2O_2. Luego de esperar unos minutos que se formara el compuesto I, se realizó el agregado de la hidroxilamina. En la figura 4.6 se observa un aumento abrupto de la concentración de HNO debido al agregado de la misma. Esto es indicativo de que la peroxidación de hidroxilamina mediada por Mb produce HNO. Como control, se comprobó que la hidroxilamina no interferían con el método

electroquímico utilizado agregando a una solución amortiguadora hidroxilamina. En el extremo superior derecho de la figura 4.6 puede observarse que, luego del agregado de la hidroxilamina a la celda con el electrodo, no se registra señal alguna; mientras que cuando se agrega sal de Angeli (donante de HNO), se observa un gran aumento de señal, lo cual indica que el electrodo es sensible al HNO. De

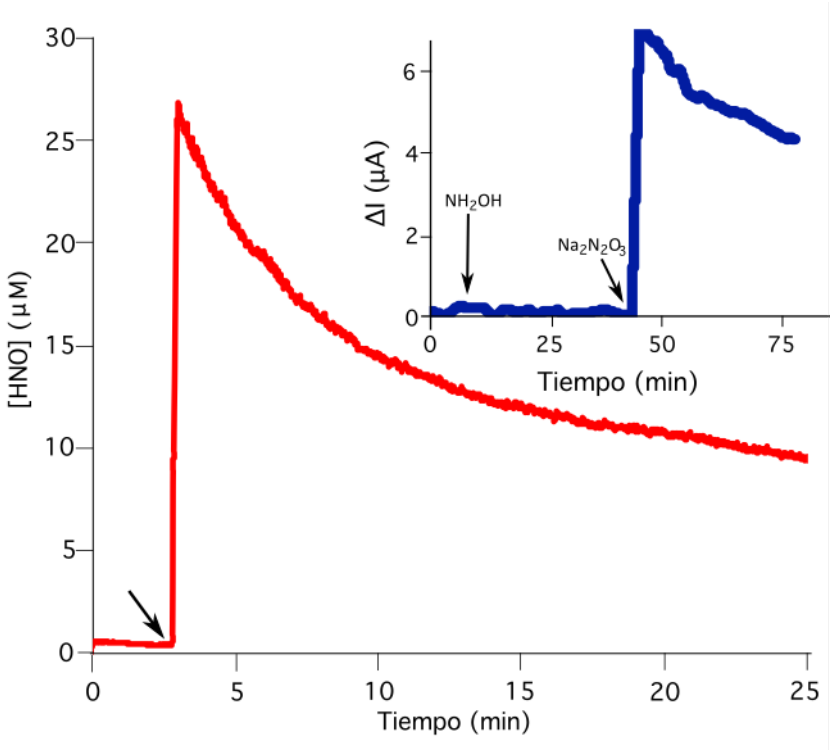


Figura 4.6: Concentración de HNO en función del tiempo. La flecha indica el momento de la adición de 600 μM de la hidroxilamina correspondiente a una solución de metMb 12 μM y H_2O_2 200 μM en una solución amortiguadora de fosfato de sodio(10 mM, pH 7,4) con EDTA (50 μM). En el extremo superior derecho del gráfico puede verse la intensidad de corriente en función del tiempo para el experimento control realizado donde se agregó hidroxilamina (600 μM) o sal de Angeli (120 μM), indicado por la flecha a una solución amortiguadora de fosfato de sodio(10 mM, pH 7,4) con EDTA (50 μM).

esta manera se determinó que la peroxidación de hidroxilamina produce HNO.

Debido a que el tipo compuesto I, además de reaccionar con las hidroxilamina para dar HNO, se descompone; se realizó un análisis electroquímico de la cinética de producción de HNO para así complementar y mejorar los resultados obtenidos por espectroscopía UV-vis. Se analizaron las tres menores concentraciones de las hidroxilamina ya que el electrodo no puede ser utilizado a concentraciones mayores. En el panel A de la figura 4.7 puede observarse a simple vista que la pendiente del gráfico concentración de HNO versus tiempo es mayor al aumentar la concentración de hidroxilamina agregada. Al realizar un análisis de la pendiente de cada curva del panel A de la figura 4.7, se obtienen las constantes de velocidad observadas para cada caso. Si se grafican dichas constantes en función de la concentración de hidroxilamina (ver panel B de la figura 4.7) se obtiene

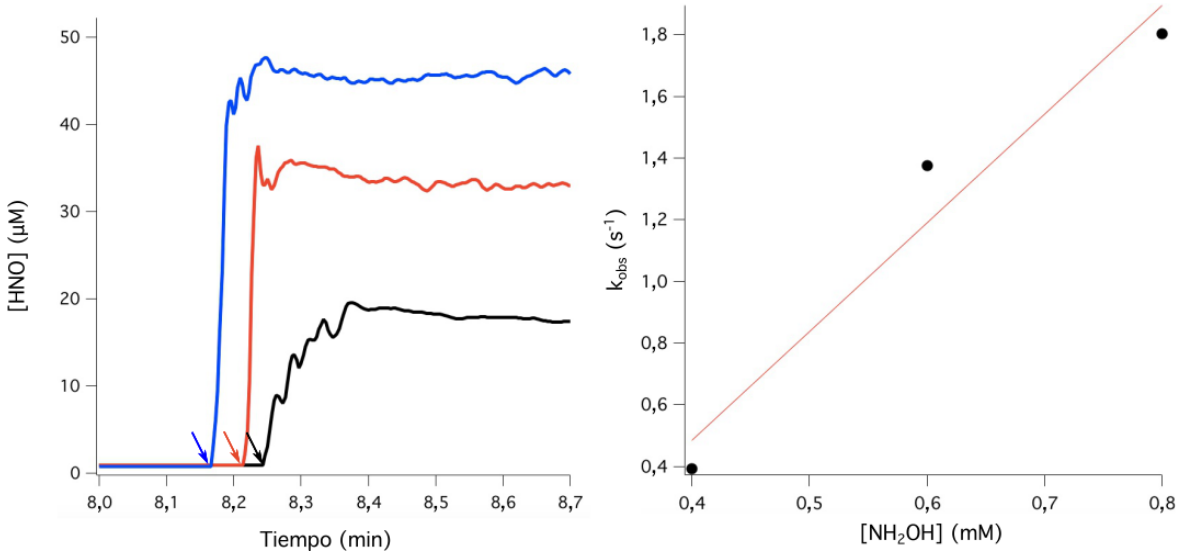


Figura 4.7: (A) Concentración de HNO en función del tiempo medida amperométricamente. La flecha indica el momento de la adición de la hidroxilamina a una solución de metMb 12 μM y H_2O_2 200 μM ena solución amortiguadora de fosfato de sodio(10 mM, pH 7,4) con EDTA (50 μM). Los distintos colores representan la concentración de hidroxilamina agregada (negro: 0,4 mM, rojo: 0,6 mM y azul: 0,8 mM). (B) Gráfico correspondiente a la constantes de velocidad en función de la concentración de hidroxilamina para la reacción de compuesto I de la Mb (6 μM) medido a través del electrodo.

una constante de velocidad de 3,57 x 10^3 $M^{-1}s^{-1}$ para la reacción de peroxidación de hidroxilamina. Este resultado es un orden de magnitud mayor que el obtenido a partir de los datos espectroscópicos. Esta diferencia se atribuye a que, a pesar de que el electrodo es muy sensible, solamente se midieron tres puntos de muy baja concentración, lo que trae un error en la medición.

Con estos resultados se determinó una ley de velocidad para la reacción de peroxidación de hidroxilamina que es de orden dos: orden uno para el tipo de compuesto I y orden uno para la hidroxilamina con una constante de velocidad de (5,1 ± 0,3) x 10^2 $M^{-1}s^{-1}$ que fue determinada espectroscópicamente. Mediante un método electroquímico se confirmó que dicha reacción produce HNO. Sin embargo, quedan varias preguntas por responder acerca de cómo es el mecanismo a través del cual ocurre la reacción de peroxidación.

4.4.3. Estudio computacional de la peroxidación de hidroxilamina

En esta sección nos centraremos en los resultados computacionales obtenidos para la reacción entre el compuesto I y la hidroxilamina.

En los cálculos de DM se observa que la hidroxilamina presenta una gran movilidad dentro del sitio activo. Esto es debido a que no existen interacciones específicas fuertes entre dicha molécula y los residuos presentes en el sitio distal de la Mb. A pesar de este hecho, fueron detectadas dos conformaciones predominantes, en las cuales varía el grupo funcional de la hidroxilamina que interactúa con el

oxígeno del ferrilo a través de interacción del tipo puente de hidrógeno. En el caso de la conformación 1, el grupo amino de la hidroxilamina es el responsable de dicha interacción, mientras que en el caso de la conformación 2 es el grupo hidroxo (ver figura 4.8).

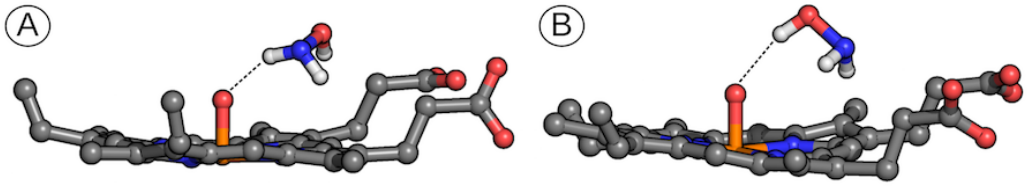


Figura 4.8: Conformaciones predominantes de la hidroxilamina en la cavidad distal (A) conformación 1 y (B) conformación 2.

Se optimizaron ambas conformaciones mediante un protocolo QM-MM (ver la sección 2.1.1.3 para una mayor información) en el estado de espín doblete y cuadruplete. Estas configuraciones de espín resultan ser poblaciones casi degeneradas y de mínima energía para el compuesto I [54]. Los parámetros electrónicos obtenidos luego de esta optimización se muestran en la tabla 4.1.

Tabla 4.1: Características energéticas, de poblaciones de Mulliken y de espín para las conformaciones 1 y 2 y el "estado intermediario de la conformación 1" para el estado de espín doblete (D) y cuadruplete (C).

	Conformación 1		**Conformación 2**		**Conformación 1 Estado intermediario**	
	D	C	D	C	D	C
$\Delta E_{espín}$ (kcal/mol)	0	3,27	0	0,05	0	-8,291
Cargas de Mulliken						
Fe	0,815	0,801	0,914	0,920	0,869	0,913
O/OH	-0,319	-0,335	-0,248	-0,242	-0,272	-0,274
Hemo+Hprox	0,250	0,357	0,183	0,2	0,256	0,196
$NH_2OH/NH_2O^{\cdot}/NHOH^{\cdot}$	0,254	0,18	0,147	0,122	0,148	0,164
Poblaciones de espín						
Fe	1,297	1,391	1,644	1,680	-0,121	1,675
O/OH	0,575	0,819	0,28	0,286	-0,200	0,286
Hemo+Hprox	-0,510	0,519	-0,009	0,038	0,324	0,003
$NH_2OH/NH_2O^{\cdot}/NHOH^{\cdot}$	-0,366	0,27	-0,919	0,998	1	1,012

Al analizar los resultados presentados en la tabla 4.1 se observa que, salvo en el estado intermediario de la conformación I, el estado de espín doblete resulta ser el más estable. Esto coincide con lo esperado, ya que este tipo de compuestos suelen ser de bajo espín [54]. Con respecto a la conformación 1, puede observarse que el hierro posee una densidad de carga positiva y un espín desapareado, mientras que el oxígeno presenta una leve densidad de carga negativa y una capa electrónica llena. Esto coincide con las características electrónicas esperadas para el compuesto I. Por otro lado, debe destacarse que la hidroxilamina presenta una leve carga positiva, lo cual es indicativo

de una transferencia de carga parcial al oxígeno unido al grupo hemo, y una baja densidad de espín lo que coincide con el hecho que de no tenga electrones desapareados. En la misma línea, al analizar la densidad de espín del grupo hemo, se observa que presenta un electrón desapareado lo cual coincide con las características reportadas para el compuesto I de la Mb.

En el caso de la conformación 2, antes de comenzar el análisis debe ser mencionado que durante la optimización del complejo ocurre espontáneamente la transferencia de un átomo de hidrógeno de la hidroxilamina al ferrilo de la Mb, convirtiendo el compuesto I en compuesto II. Dicho compuesto, al igual que lo demostrado por Nilsson y colaboradores [55], se encuentra protonado. Al observar los datos, puede comprobarse que se trata de la transferencia de un átomo de hidrógeno (H) y no de un protón (H^+) porque el $NH_2O^\cdot$ posee una baja densidad de carga junto con una alta densidad de espín (lo que da cuenta de la presencia de un electrón desapareado). Además, el leve aumento observado en la carga del hierro corresponde a que, al ocurrir la unión del hidrógeno al átomo de oxígeno, disminuye la transferencia de carga del oxígeno al hierro. Con respecto al ion de hierro, éste ahora posee dos electrones desapareados, que en el caso del estado doblete se encuentran apareados con el del radical $NH_2O^\cdot$, mientras que para el estado cuadruplete se encuentran paralelos. En cuanto al grupo hemo su densidad de espín resulta ser casi nula en ambos casos. Esto se debe a que al convertirse el compuesto I en compuesto II deja de haber un electrón desapareado.

Con el objetivo de realizar una comparación entre la conformación 1 y 2, se forzó a que ocurriera la transferencia de hidrógeno en el primer caso para dar lugar al compuesto II, para ello se utilizó como coordenada de reacción la disminución de la distancia N-H $\cdots$ O=Fe. La columna denominada "Conformación 1 Estado intermediario " en la tabla 4.1 presenta los resultados correspondientes al producto de dicho proceso. Al igual que en el caso de la conformación 2, se transfiere un átomo de H y no un H^+ debido a que el producto, $NHOH^\cdot$, posee una baja densidad de carga y un electrón desapareado. A diferencia de los casos anteriores, existe una diferencia grande en la carga del hierro entre el estado doblete y cuadruplete. Esto puede explicarse debido a que en este último caso ocurre una transferencia de carga del grupo hemo al hierro y a la histidina proximal (lo que se comprueba al observar un cambio también en la carga de este grupo). En cambio, en el caso doblete o en los casos anteriores esta transferencia de carga es mucho menor. Resulta interesante destacar que la transferencia del átomo de H ocurre sin barrera para el estado doblete y con una barrera de 1,65 kcal/mol para el cuadruplete.

Asimismo, con la finalidad de caracterizar a los radicales obtenidos luego de la transferencia de H en cada caso: $NHOH^\cdot$ o $NH_2O^\cdot$, se realizó un cálculo de estructura electrónica en solvente implícito utilizando el programa *Gaussian09*. En la tabla 4.2 se presentan sus características electrónicas, mientras que en la figura 4.9 sus estructuras. Los resultados obtenidos para la optimización de ambas

Tabla 4.2: Características electrónicas para los radicales obtenidos para cada conformación.

Conformación 1			Conformación 2		
Átomo	**Carga**	**Espín**	**Átomo**	**Carga**	**Espín**
H	0,368	-0,028	**O**	-0,415	0,587
N	-0,387	0,836	**N**	-0,184	0,443
O	-0,258	0,199	**H**	0,300	-0,015
H	0,276	0,007	**H**	0,300	-0,015

especies muestran que el radical $NH_2O^{\cdot}$ es 12,5 kcal/mol más estable que el $NHOH^{\cdot}$. Esto puede deberse a que en este caso la densidad electrónica se encuentra deslocalizada entre los átomos de N y O, mientras que en el radical $NHOH^{\cdot}$ se encuentra enteramente localizada en el átomo de N (ver población de espín en la tabla 4.2). Además, como puede observarse en el valor de la longitud enlace en la figura 4.9, el enlace N-O en el radical más estable posee un carácter de doble enlace.

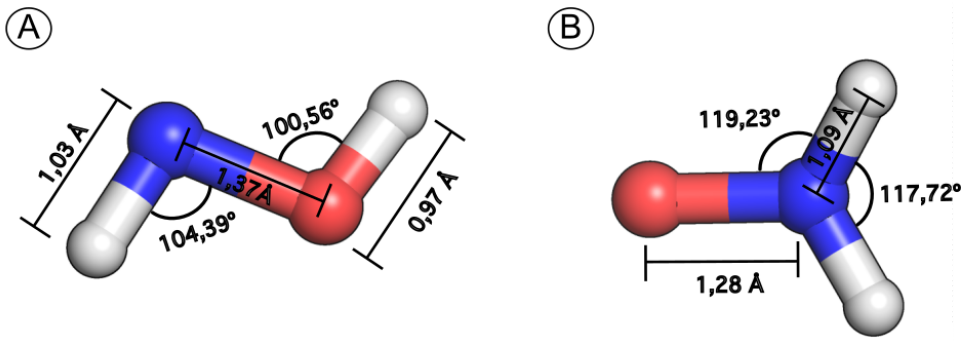


Figura 4.9: Radicales obtenidos luego de la primera transferencia de hidrógeno partiendo de la (A) conformación 1 o de la (B) conformación 2 junto con sus valores de distancia y ángulos de enlace.

A partir de estos resultados, se forzó que ocurriera una segunda transferencia de hidrógeno desde el radical obtenido al compuesto II. En la figura 4.10 se presentan las distintas alternativas para dicha transferencia según el radical del cual se parte. En el caso de $NH_2O^{\cdot}$, el H a transferirse proviene del grupo amino del radical; mientras que para $NHOH^{\cdot}$ existen dos opciones: o bien se transfiere el H del grupo hidroxo o bien el del grupo amino. En todos los casos se utilizó como coordenada de reacción la disminución de la distancia entre el H a ser transferido y el oxígeno (O) del grupo hidroxo del compuesto II de la Mb. Si se parte del $NH_2O^{\cdot}$ se obtiene para dicho proceso una barrera de reacción pequeña para la producción de HNO y del complejo acuoso de Fe (III) (1,76 kcal/mol para el estado doblete y 3,16 kcal/mol para el estado cuadruplete). Al observar la película de la reacción se detecta que gran parte del costo energético se debe a la reubicación del $NH_2O^{\cdot}$ para establecer un puente de hidrógeno apropiado entre el grupo amino y el ferrilo, que luego dará lugar a la transferencia de H deseada.

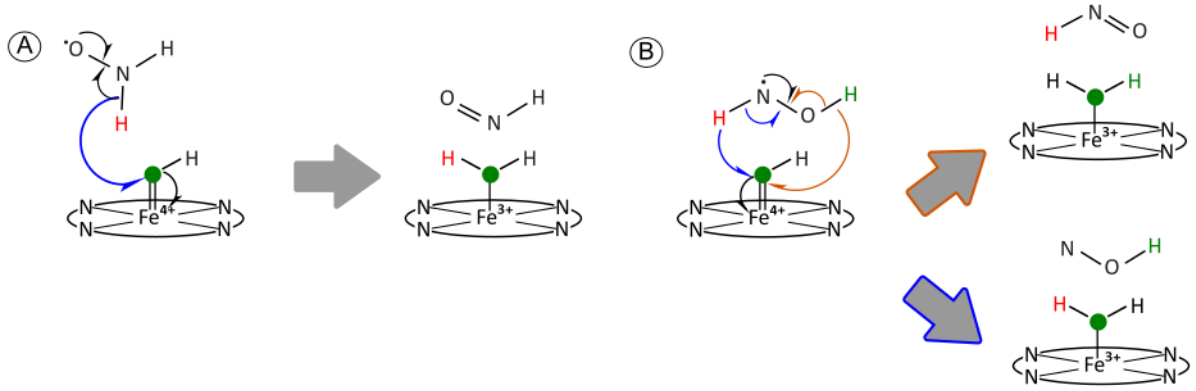


Figura 4.10: Esquema en el que se muestran las distintas posibilidades de reacción luego de transcurrida la primera transferencia de hidrógeno.

En el caso del radical NHOH$^{\cdot}$, cuando la segunda transferencia de hidrógeno involucra al H del grupo hidroxo del radical (opción naranja de la figura 4.10), dando lugar al acuo complejo y HNO, se obtiene una barrera igual a 2,05 kcal/mol para el estado doblete y de 5,67 kcal/mol para el cuadruplete. En cambio, cuando la transferencia de H involucra al H del grupo amino del radical (opción azul de la figura 4.10), las barreras energéticas son significativamente mayores (8,79 kcal/mol para el estado doblete y 14,51 kcal/mol para el cuadruplete). Como producto de dicha reacción se obtiene el acuo complejo de Fe(III) junto con ^{3}NOH. Con el objetivo de comparar ambos productos, se realizó un cálculo de estructura electrónica en solvente implícito utilizando el programa *Gaussian09*, donde se obtuvo como resultado que la especie ^{1}HNO es 19,76 kcal/mol más estable que ^{3}NOH. Este valor coincide con los cálculos previamente realizados [56-58]. Teniendo esto en cuanta, los resultados aquí presentados muestran que la peroxidación de hidroxilamina para dar HNO ocurre por el camino de menor energía dando así como producto el compuesto más estable.

En resumen, puede decirse que la reacción de peroxidación de la hidroxilamina, mediada por mioglobina, ocurre a través de la transferencia de dos átomos de hidrógeno de la hidroxilamina al compuesto I dando lugar al complejo acuoso de la mioglobina y al HNO. Dicha transferencia posee una barrera energética muy pequeña para el caso en el cual los hidrógenos provienen uno del grupo amino y otro del grupo hidroxo, lo cual produce directamente HNO. Mientras que la barrera energética es significativamente mayor cuando los dos átomos de hidrógeno provienen del grupo amino, lo cual da lugar al ^{3}NOH, compuesto que resulta ser además más inestable que el HNO.

4.4.4. Discusión

Los resultados presentados anteriormente confirman que la reacción de peroxidación de hidroxilamina mediada por Mb produce HNO. Para ello, primero debe ocurrir la reacción de Mb con el peróxido de hidrógeno, la cual bajo las condiciones analizadas en la presente tesis muestra seguir una cinética de saturación de dependencia hiperbólica entre k_{obs} y la concentración de H_2O_2. El valor obtenido para $k_{\mathrm{lim}} = 1,41 \pm 0,2\ \mathrm{s}^{-1}$ en la presente tesis resulta consistente con el resultado presentado por Egawa y colaboradores para mayores concentraciones de peróxido de hidrógeno [21]. Por otro lado, se comprueba que la peroxidación de la hidroxilamina es una reacción de orden total dos y de orden uno con respecto a la hidroxilamina y al tipo compuesto I.

Los cálculos computacionales muestran que en todos los casos ocurren dos transferencias de átomos de hidrógeno para que ocurra la peroxidación. Además, se confirma lo observado por Nilsson y colaboradores de que el compuesto II de la Mb se encuentra protonado [55]. Se observa, además, que el proceso ocurre casi sin barrera cuando se produce HNO, por lo que el paso limitante para que la peroxidación ocurra corresponde a la entrada de la hidroxilamina al sitio activo. Sin embargo, cuando la reacción produce ^{3}NOH, se tiene una barrera energética, por lo cual este sería un producto minoritario de la reacción.

Por otro lado, el uso del electrodo permitió no sólo confirmar que la reacción de peroxidación de la hidroxilamina produce HNO, sino también obtener otra estimación de la constante de velocidad para dichas reacciones. El valor obtenido electroquímicamente de un orden mayor obtenido espectroscópicamente, dado que al descomponerse el compuesto I, el método espectroscópico no resultaba ser un método preciso para la correcta determinación.

Una cuestión interesante a tener en cuenta es que una vez ocurrida la reacción podría suceder una nitrosilación reductiva debido a la presencia de HNO en el sitio activo de la metMb [59, 60]. Sin embargo, ocurre la regeneración de metMb y la producción de HNO como es confirmado por los resultados experimentales. El HNO migra de forma eficiente del sitio activo y existen cuatro factores que explican este hecho: la química redox del HNO, la velocidad de disociación del H_2O del sitio activo, la química ácido-base del HNO y la accesibilidad del solvente al sitio activo de la hemoproteína. La oxidación de HNO puede ocurrir vía una transferencia electrónica desde la esfera interna o desde la esfera externa. La constante de velocidad para la primera es de alrededor de $10^6\mathrm{M}^{-1}\mathrm{s}^{-1}$ [29], lo cual resulta dos ordenes de magnitud mayor que las constantes de velocidad para las transferencias de esfera externa de los oxidantes más comunes (como ser ferricianuro). Por otro lado, el grupo de Peter Ford [61] sugiere que la velocidad de adición de NO a hemos férricos está determinada por la velocidad de disociación del agua para dar lugar a un sitio de coordinación disponible. Se

postula que esto mismo ocurre para el caso de la unión de HNO. Asimismo, la deprotonación del HNO es extraordinariamente lenta [62] debido a la diferencia en el estado de espín fundamental para el par ácido-base conjugada (singulete para el HNO, pero triplete para el NO^-). Por último, resulta importante destacar que la accesibilidad al solvente del sitio activo de la hemoproteína puede ser un factor determinante en la generación de HNO. Una estructura abierta facilita la migración del HNO, aumentando así su velocidad de difusión en comparación a la unión al hemo.

4.5. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este capítulo muestran que la peroxidación de hidroxilamina genera HNO. Se realizó una caracterización de la cinética de la reacción, así como también el estudio del mecanismo a través del cual ocurre dicha reacción. El uso del electrodo específico de HNO permite confirmar que ocurre la formación de HNO y también caracterizar la cinética de la reacción.

Estos resultados demuestran que la peroxidación de Mb puede corresponder a una vía de formación endógena de HNO.

Referencias

1. Kendrew, J. C. *y col.* Structure of Myoglobin: A Three-Dimensional Fourier Synthesis at 2 A Resolution. *Nature* **185,** 422-427 (1960).

2. Kooyman, G. L. y Ponganis, P. J. The physiological basis of diving to depth: Birds and Mammals. *Annual Review of Physiology* **60,** 19-32 (1998).

3. Noren, S. R. y Williams, T. M. Body size and skeletal muscle myoglobin of cetaceans: adaptations for maximizing dive duration. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **126,** 181-191 (2000).

4. Hochachka, P. W. The metabolic implications of intracellular circulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96,** 12233-12239 (1999).

5. Meyer, R. A., Sweeney, H. L. y Kushmerick, M. J. A simple analysis of the phosphocreatine shuttle. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **246,** C365 LP -C377 (1984).

6. Brunori, M. Nitric oxide moves myoglobin centre stage. *Trends in Biochemical Sciences* **26,** 209-210 (2001).

7. Brunori, M. y Gibson, Q. H. Cavities and packing defects in the structural dynamics of myoglobin. *EMBO Reports* **2,** 674-679 (2001).

8. Flögel, U., Merx, M. W., Gödecke, A., Decking, U. K. M. y Schrader, J. Myoglobin: A scavenger of bioactive NO. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98,** 735-740 (ene. de 2001).

9. George, P. e Irvine, D. H. A possible structure for the higher oxidation state of metmyoglobin. *Biochemical Journal* **60,** 596-604 (1955).

10. Cadenas, E. Lipid peroxidation during the oxidation of haemoproteins by hydroperoxides. Relation to electronically excited state formation. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* **4,** 208-218 (1989).

11. Khan, K. K., Mondal, M. S., Padhy, L. y Mitra, S. The role of distal histidine in peroxidase activity of myoglobin. *European Journal of Biochemistry* **257,** 547-555 (1998).

12. Galaris, D., Eddy, L., Arduini, A., Cadenas, E. y Hochstein, P. Mechanisms of reoxygenation injury in myocardial infarction: Implications of a myoglobin redox cycle. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **160,** 1162-1168 (1989).

13. Shinar, E. y Rachmilewitz, E. A. Oxidative denaturation of red blood cells in Thalassemia. *Seminars in hematology* **27,** 70-82 (1990).

14. Koppenol, W. H., Stanbury, D. M. y Bounds, P. L. *Electrode potentials of partially reduced oxygen species, from dioxygen to water* 2010.

15. The detection of two electron paramagnetic resonance radical signals associated with chloroperoxidase compound I. *Journal of Biological Chemistry* **257,** 7958-7961 (1982).

16. Chance, B. *y col.* X-ray absorption studies of intermediates in peroxidase activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **235,** 596-611 (1984).

17. Bonagura, C. A. *y col.* High-Resolution Crystal Structures and Spectroscopy of Native and Compound I Cytochrome c Peroxidase. *Biochemistry* **42,** 5600-5608 (2003).

18. Edwards, S. L., Xuong, N. H., Hamlin, R. C. y Kraut, J. Crystal structure of cytochrome c peroxidase compound I. *Biochemistry* **26,** 1503-1511 (1987).

19. Fulop, V. *y col.* Laue diffraction study on the structure of cytochrome c peroxidase compound I. *Structure* **2,** 201-208 (2016).

20. Sivaraja, M., Goodin, D. B., Smith, M. y Hoffman, B. M. Identification by ENDOR of Trp191 as the free-radical site in cytochrome c peroxidase compound ES. *Science* **245,** 738-740 (1989).

21. Egawa, T., Shimada, H. e Ishimura, Y. Formation of Compound I in the Reaction of Native Myoglobins with Hydrogen Peroxide. *Journal of Biological Chemistry* **275,** 34858-34866 (2000).

22. Matsui, T., Ozaki, S.-i. y Watanabe, Y. On the Formation and Reactivity of Compound I of the His-64 Myoglobin Mutants. *Journal of Biological Chemistry* **272,** 32735-32738 (1997).

23. Ozaki, S.-i., Matsui, T. y Watanabe, Y. Conversion of Myoglobin into a Peroxygenase: A Catalytic Intermediate of Sulfoxidation and Epoxidation by the F43H/H64L Mutant. *Journal of the American Chemical Society* **119,** 6666-6667 (1997).

24. Gross, P. y Smith, R. P. Biologic Activity of Hydroxylamine: A Review. *CRC Critical Reviews in Toxicology* **14,** 87-99 (1985).

25. Arnelle, D. y Stamler, J. *NO+, NO., and NO- Donation by S-Nitrosothiols: Implications for Regulation of Physiological Functions by S-Nitrosylation and Acceleration of Disulfide Formation* 1995.

26. Freese, E. y Freese, E. B. The Oxygen Effect on Deoxyribonucleic Acid Inactivation by Hydroxylamines. *Biochemistry* **4,** 2419-2433 (1965).

27. Donzelli, S. *y col.* Generation of nitroxyl by heme protein-mediated peroxidation of hydroxylamine but not N-hydroxy-L-arginine. *Free Radical Biology and Medicine* **45,** 578-584 (2008).

28. Stone, J. R. y Yang, S. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxidants and redox signaling* **8,** 243-70 (2006).

29. Miranda, K. M. *y col.* A biochemical rationale for the discrete behavior of nitroxyl and nitric oxide in the cardiovascular system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100,** 9196-9201 (2003).

30. Miranda, K. M. *y col.* Mechanism of Aerobic Decomposition of Angeli's Salt (Sodium Trioxodinitrate) at Physiological pH. *Journal of the American Chemical Society* **127.** PMID: 15643898, 722-731 (2005).

31. Veprek Sika, F. S. V. Pliska y Vesely, F. Anorganische stickstoffverbindungen I. Zersetzungsmechanismus wassriger losungen des natriumsalzes der nitrohydroxylaminsaure. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **24,** 687-693 (1959).

32. Bonner, F. T. y Ravid, B. Thermal decomposition of oxyhyponitrite (sodium trioxodinitrate(II)) in aqueous solution. *Inorganic Chemistry* **14,** 558-563 (1975).

33. Huges, M. N. y Wimbledon, P. E. The chemistry of trioxodinitrates. Part I. Decompostion of sodium trioxodinitrate (Angelis salt) in aqueous solution. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions,* 703-707 (8 1976).

34. Copeland, D. M., West, A. H. y Richter-Addo, G. B. Crystal structures of ferrous horse heart myoglobin complexed with nitric oxide and nitrosoethane. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **53,** 182-192 (2003).

35. Case, D. A. *y col.* Amber 2015. *University of California, San Francisco* (2015).

36. Salomon-Ferrer, R., Götz, A. W., Poole, D., Le Grand, S. y Walker, R. C. Routine Microsecond Molecular Dynamics Simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit Solvent Particle Mesh Ewald. *Journal of Chemical Theory and Computation* **9,** 3878-3888 (2013).

37. Essmann, U. *y col.* A smooth particle mesh Ewald method. *The Journal of Chemical Physics* **103,** 8577 (1995).

38. Ryckaert, J.-P., Ciccotti, G. y Berendsen, H. J. C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics* **23,** 327-341 (1977).

39. Wu, X. y Brooks, B. R. Self-guided Langevin dynamics simulation method. *Chemical Physics Letters* **381,** 512-518 (2003).

40. Crespo, A. *y col.* A DFT-Based QM-MM Approach Designed for the Treatment of Large Molecular Systems: Application to Chorismate Mutase. *The Journal of Physical Chemistry B* **107,** 13728-13736 (2003).

41. Sánchez-Portal, J. M. S. *y col.* The SIESTA method for ab initio order- N materials simulation. *Journal of Physics: Condensed Matter* **14,** 2745 (2002).

42. Perdew, J. P., Burke, K. y Ernzerhof, M. Generalized Gradient Approximation Made Simple. *Physical Review Letters* **77,** 3865-3868 (18 1996).

43. Wang, J., Cieplak, P. y Kollman, P. A. How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *Journal of Computational Chemistry* **21,** 1049-1074 (2000).

44. Lin, H. y Truhlar, D. G. QM/MM: what have we learned, where are we, and where do we go from here? *Theoretical Chemistry Accounts* **117,** 185 (2006).

45. Bowen, W. J. The absorption spectra and extinction coefficients of Myoglobin. *Journal of Biological Chemistry* **179,** 235-245 (1949).

46. Millar, S. J., Moss, B. W. y Stevenson, M. H. Some observations on the absorption spectra of various myoglobin derivatives found in meat. *Meat Science* **42,** 277-288 (1996).

47. Antonini, E. y Brunori, M. (North-Holland Pub. Co, 1971).

48. Jourdheuil, D., Mills, L., Miles, A. M. y Grisham, M. B. Effect of Nitric Oxide on Hemoprotein-Catalyzed Oxidative Reactions. *Nitric Oxide* **2,** 37-44 (1998).

49. McNaught, A. D. y Wilkinson, A. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology: Gold Book* 1670 (2014).

50. Richards, M. P. Redox Reactions of Myoglobin. *Antioxidants & Redox Signaling* **18,** 2342-2351 (2013).

51. Reeder, B. J., Svistunenko, D. A., Sharpe, M. A. y Wilson, M. T. Characteristics and Mechanism of Formation of Peroxide-Induced Heme to Protein Cross-Linking in Myoglobin. *Biochemistry* **41,** 367-375 (2002).

52. Fenwick, C. W., English, A. M. y Wishart, J. F. pH and Driving Force Dependence of Intramolecular Oxyferryl Heme Reduction in Myoglobin. *Journal of the American Chemical Society* **119,** 4758-4764 (1997).

53. Fenwick, C. *y col.* Rate of Intramolecular Reduction of Oxyferryl Iron in Horse Heart Myoglobin. *Journal of the American Chemical Society* **116,** 3169-3170 (1994).

54. Foote, N., Gadsby, P. M., Greenwood, C. y Thomson, A. J. pH-dependent forms of the ferryl haem in myoglobin peroxide analysed by variable-temperature magnetic circular dichroism. *Biochemical Journal* **261,** 515-522 (1989).

55. The Protonation Status of Compound II in Myoglobin, Studied by a Combination of Experimental Data and Quantum Chemical Calculations: Quantum Refinement. *Biophysical Journal* **87,** 3437-3447 (2004).

56. Bozkaya, U., Turney, J., Yamaguchi, J. y Schaefer, H. The lowest-lying electronic singlet and triplet potential energy surfaces for the HNO–NOH system: Energetics, unimolecular rate constants, tunneling and kinetic isotope effects for the isomerization and dissociation reactions. *The Journal of Chemical Physics* **136,** 164303 (2012).

57. Dutton, A. S., Fukuto, J. M. y Houk, K. N. Mechanisms of HNO and NO Production from Angeli's Salt: Density Functional and CBS-QB3 Theory Predictions. *Journal of the American Chemical Society* **126,** 3795-3800 (2004).

58. Luna, A., Merchán, M. y Ross, B. O. A theoretical analysis of the lowest excited states in HNO/NOH and HPO/POH. *Chemical Physics* **196,** 437-445 (1995).

59. Bazylinski, D. A. y Hollocher, T. C. Metmyoglobin and methemoglobin as efficient traps for nitrosyl hydride (nitroxyl) in neutral aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society* **107,** 7982-7986 (1985).

60. Bari, S. E., Martí, M. A., Amorebieta, V. T., Estrin, D. A. y Doctorovich, F. Fast Nitroxyl Trapping by Ferric Porphyrins. *Journal of the American Chemical Society* **125,** 15272-15273 (2003).

61. Ford, P. C. y Lorkovic, I. M. Mechanistic Aspects of the Reactions of Nitric Oxide with Transition-Metal Complexes. *Chemical Reviews* **102,** 993-1018 (2002).

62. Miranda, K. M. The chemistry of nitroxyl (HNO) and implications in biology. *Coordination Chemistry Reviews* **249,** 433-455 (2005).

CAPÍTULO 5

REACTIVIDAD DE HIDROPERSULFUROS CON MIOGLOBINA

5.1. Introducción

Los hidropersulfuros (RSSH), tal como fue dicho en el primer capítulo de esta tesis, resultan ser muy buenos agentes reductores, lo cual puede hacer que tengan un rol importante en la reducción de metales en metaloproteínas. Francoleon y colaboradores [1] han demostrado que los hidropersulfuros son capaces de reducir al citocromo c férrico, bajo condiciones en la cuales el H_2S o el tiol correspondiente no lo logran. Ahora bien, resulta interesante estudiar qué ocurre con otras hemoproteínas para así entender el alcance de la química de los hidropersulfuros en sistemas biológicos.

En este capítulo, se estudiará la reactividad de los hidropersulfuros con la mioglobina en su estado ferroso formando complejo con el O_2 (MbFe(II)O_2, oxiMb), y en su estado férrico (MbFe(III), metMb). La elección de la mioglobina como proteína modelo se debe no sólo a que la misma fue extensamente estudiada, sino también a que posee un sitio de coordinación abierto, lo cual permite una interacción de esfera interna entre el grupo hemo y los hidropersulfuros.

El sulfohemo es un cromóforo de color verde que ha sido observado en numerosas hemoproteínas como producto de reacción de las mismas con H_2S [2, 3]. Su producción se asocia también a altas concentraciones de drogas como pueden ser acetanilida, dapsona, fenacetina, cimetidina, metoclopramida, paracetamol, ibuprofeno y naproxieno [4-6]. Por otro lado, la formación de sulfhemo es considerada una de las mayores vías de degradación de H_2S en humanos [7]. Los sulfohemos tienen incorporado un átomo de azufre al anillo pirrólico B del grupo hemo, ver figura 1.2, lo cual modifica numerosas propiedades de las proteínas que lo posean. Además, se caracterizan por la presencia de una banda de absorción alrededor de los 620 nm que varía su posición según el estado de oxidación del hierro, la coordinación del mismo y el tipo de isómero del sulfohemo del que se trate [8-13]. Por

otro lado, estos compuestos poseen una menor afinidad por el O_2 en comparación a las proteínas nativas [2, 14], lo cual modifica sus propiedades de transporte y almacenamiento de O_2. Por ejemplo, la concentración de O_2 requerida para saturar la mitad de la sulfMb es 2500 veces superior que para saturar a la proteína nativa. Esto trae como consecuencia que altos niveles de sulfohemo en sangre o en músculo sean perjudiciales para la salud. El tratamiento de una alta concentración en sangre incluye la administración de O_2 y transfusiones de sangre [4].

Existe también un intenso debate en torno a la estructura precisa del sulfohemo. Experimentos de marcación isotópica con ^{35}S determinaron que hay un único azufre incorporado al anillo del hemo [15]. Además, por experimentos de RMN y Raman [8, 10, 13, 15-18], se identificó que el azufre se encontraba ubicado en el doble enlace β-β del anillo pirrólico B. La adición del átomo de azufre en el anillo hémico introduce una distorsión en el mismo que produce cambios en sus propiedades electrónicas, lo que resulta en la activación de transiciones electrónicas anteriormente prohibidas (las transiciones que aparecen alrededor de 620 nm). Por experimentos de RMN y difracción de rayos x (DRX) se determinó que la estructura general de las proteínas con sulfohemos no se ven modificadas [12, 18, 19], razón por la cual los cambios en la unión a O_2 están dados únicamente por la variación en las propiedades electrónicas del anillo del hemo. Estos cambios en la afinidad por O_2 se deben a que, al ocurrir la adición del átomo de azufre al doble enlace, se remueve densidad electrónica en la periferia del átomo de hierro, lo cual produce una disminución en la capacidad del hierro de realizar una retrodonación π al ligando unido.

Existen al menos tres estructuras posibles de sulfohemos: A, B y C (ver figura 5.1). La estructura A consiste en un episulfuro, la B corresponde a un episulfuro abierto (donde X e Y pueden corresponder a dos átomos de hidrógeno u otros grupos funcionales según el caso) y la C a un 2,5-dihidriotiofeno [9, 10].

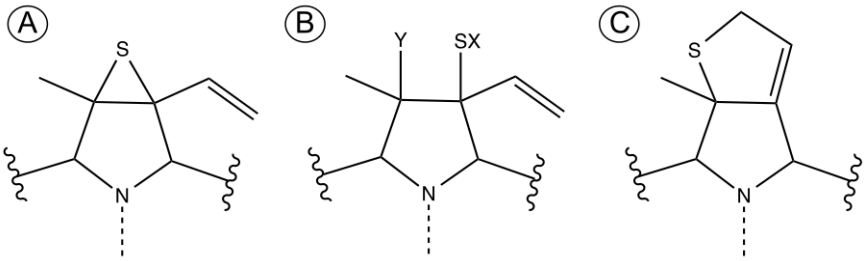


Figura 5.1: Estructuras posibles del sulfohemo.

Si bien todos los isómeros presentan una alteración en el sistema de conjugación del anillo pirrólico B del grupo hemo, los tres poseen propiedades fisicoquímicas distintas. Se sabe que la estructura A puede convertirse en B y en C, pero no se ha visto la transición de B a C. Esto hace pensar

que la estructura A sea la precursora de las otras dos [8, 12]. Por otro lado, se sabe que la estructura C es la más estable y parece ser la estructura predominante a pH fisiológico [9, 10]. Además, se ha observado que la formación de sulfohemo es reversible con el burbujeo de O_2 [14].

El mecanismo a través del cual se genera el sulfohemo es desconocido, pero se sabe que se produce una mezcla de la especie férrica y ferrosa al hacer reaccionar oxiMb con H_2S o cuando se realiza el agregado de compuestos de azufre a metMb en presencia de H_2O_2 [20]. Se observó, además, que hemoproteínas sin histidina en la cavidad distal no forman sulfohemo, por lo que se postula que la misma posee un rol crucial en su formación [21]. Por otro lado, experimentos a pH básico mostraron una disminución en 250 veces de la cantidad de sulfohemo formado, lo cual es indicativo de que la especie reactiva sería H_2S y no HS^- [22]. Esto puede deberse a que los canales de acceso al sitio activo de la Mb son hidrofóbicos, por lo que al HS^- le será más difícil ingresar a través de ellos. Finalmente, también se conoce que en presencia de H_2O_2 el intermediario ferrilo se encuentra implicado en la formación de sulfohemo [21].

En este capítulo se estudiará entonces la reactividad de los hidropersulfuros con mioglobina en sus distintos estados de oxidación analizando, particularmente, su capacidad de formar sulfohemos utilizando principalmente técnicas de UV-Vis.

5.2. Métodos experimentales

Reactivos

El 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina 1-oxil (TEMPOL), la cisteína, la cistina, el Na_2S, el ácido dietilenetriamina pentaacético (DTPA) y la mioglobina de corazón de caballo fueron obtenidas de Sigma-Aldrich. La oxiMb se obtuvo a partir de la reducción de una solución de metMb con exceso de ditionito de sodio (para reducir el hierro al estado ferroso) y una rápida separación a través de una columna de 50 cm de Sephadex G-25 [23]. El donante de persulfuro, S-metoxicarbonil penicilamina disulfuro (MCPD), fue sintetizado a través de un protocolo que será descripto a continuación, junto con la síntesis *in situ* de N-metoxicarbonil penicilamina persulfuro (MCP-SSH).

Generación de hidropersulfuros

Comúnmente los hidropersulfuros son originados a partir de compuestos disulfuros debido a un ataque nucleofílico por H_2S/NaSH/Na_2S. Sin embargo, este método presenta diversas desventajas ya que al tratarse de una reacción en equilibrio siempre hay presente una cantidad apreciable de H_2S junto con el disulfuro de partida, el hidropersulfuro generado y el tiol. Este hecho dificulta analizar la reactividad de la especie en cuestión, debido a que las otras especies presentes pueden interferir. Otra

forma de generar hidropersulfuros es a partir de disulfuros acetilados en presencia de aminas. Esto se debe a que ocurre una transferencia inter o intramolecular, según el caso, del acetilo desde el átomo de azufre al átomo de nitrógeno, quedando así el grupo hidropersulfuro libre [24]. Este método posee la ventaja de no requerir la adición de otro compuesto de azufre, razón por la cual se lo considera un método más limpio.

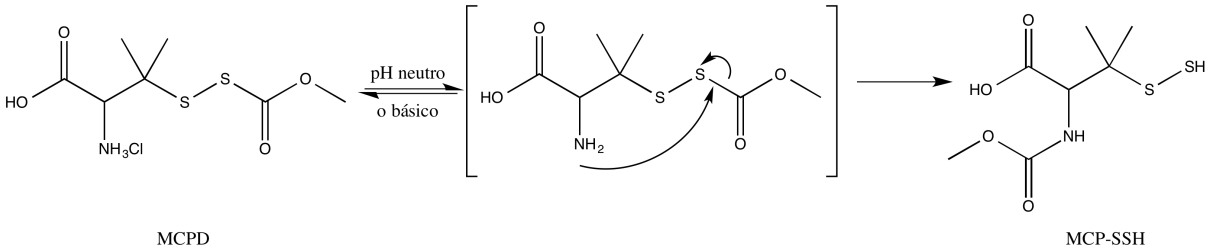


Figura 5.2: Generación de hidropersulfuro a partir del disulfuro a pH 7,4.

En particular en este capítulo se utilizó un compuesto donante de hidropersulfuros denominado N-metoxicarbonil penicilamina disulfuro (MCPD). Se ha comprobado la utilidad de dicho compuesto como donante de hidropersulfuro en numerosos trabajos [24-26]. Para sintetizarlo se agrega lentamente una solución de L-penicilamina (0,001 moles en 1 mL de metanol) a una solución de cloruro de metoxicarbonilsulfénico (0,0011 moles = 100 μL) en 3 mL de dietileter a temperatura ambiente [24]. Luego de una hora de agitación, se evapora el solvente en un evaporador rotatorio y se obtiene un polvo blanco correspondiente a la sal de amonio. Debido a su naturaleza iónica, se trata de un compuesto altamente soluble en agua. Se comprobó que la síntesis fue exitosa caracterizando el producto de reacción mediante RMN y ESI-MS.

A pH fisiológico ocurre la transferencia del grupo acetilo del MCPD, dando lugar al hidropersulfuro (MCP-SSH), ver figura 5.2. La velocidad de la misma depende del pH y aumenta con la alcalinidad de la solución (k_{obs} 1,6; 0,3 y 0,1 min $^{-1}$ a pH 8,5; 7,4 y 6,5 respectivamente [24]). Una cuestión que debe tenerse en cuenta, es que la reacción de MCP-SSH con los compuestos de interés compite con el ataque del MCP-SSH generado al donante produciendo polisulfuros (ver figura 5.3). La descomposición de MCPD a temperatura ambiente en ausencia de un atrapante químico resulta en di-, tri-, tetra- y pentaalquilpolisulfuros. Todas las soluciones de MCPD fueron preparadas frescas cada día en agua destilada.

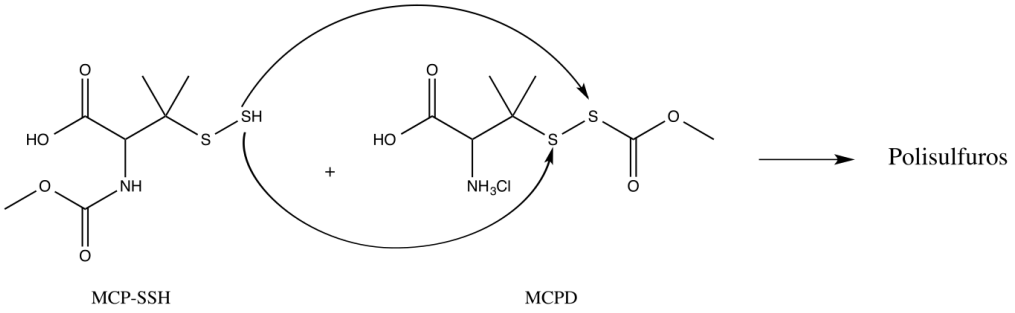


Figura 5.3: Reacción entre el MCP-SSH y el MCPD dando lugar a polisulfuros.

Generación del radical pertiílo

Con el objetivo de generar el radical pertiílo se utilizó TEMPOL. La reducción de este compuesto por el MCP-SSH genera la especie reducida TEMPOL-OH y al correspondiente radical pertiílo, ver figura 5.4 [26].

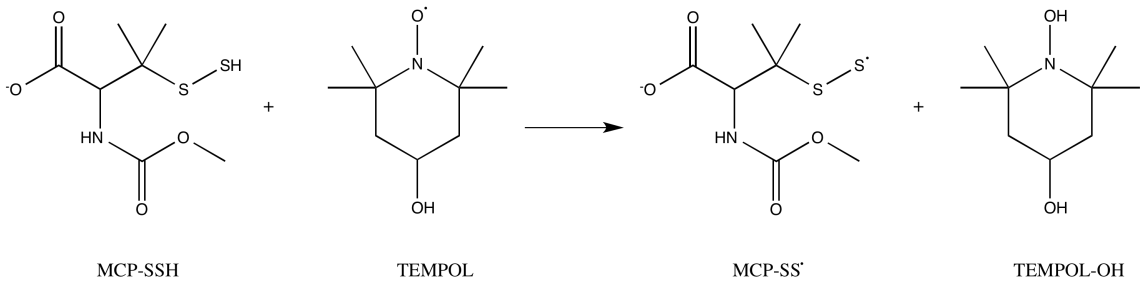


Figura 5.4: Mecanismo de generación del radical pertiílo debido a la reacción de MCP-SSH con TEMPOL.

En todos los casos se utilizó el doble de concentración de TEMPOL que del MCPD, para así asegurar que la especie mayoritaria fuera el radical pertiílo.

Espectroscopía UV-vis

Los espectros UV-vis fueron obtenidos en un espectrofotómetro Shimadzu 2501. Se determinaron las concentraciones de metMb y oxiMb utilizando la absortividad correspondiente al máximo de la banda de Soret en cada caso (408 nm y ϵ = 188000 $M^{-1}cm^{-1}$ para metMb y 417 nm y ϵ = 128000 $M^{-1}cm^{-1}$ para oxiMb, [27])

5.3. Resultados

Con el objetivo de comprender la reacción que ocurre entre la metMb y el MCP-SSH en presencia de oxígeno, se estudió la misma utilizando espectroscopía UV-Vis. En la figura 5.5 puede observarse el corrimiento de la banda de Soret de 409 a 414 nm y, además, el decaimiento de las bandas Q a 504 y 635 nm junto con el crecimiento de otras dos bandas a 542 y 581 nm. Dichos cambios corresponden a la reducción de metMb (Fe(III)) a oxiMb (Fe(II)). Asimismo, puede observarse la aparición de una banda a 616 nm, la cual puede ser asignada al sulfohemo de mioglobina ferrosa (sulfMbFe(II)), de acuerdo al compuesto caracterizado por Berzofsky en 1971 [2].

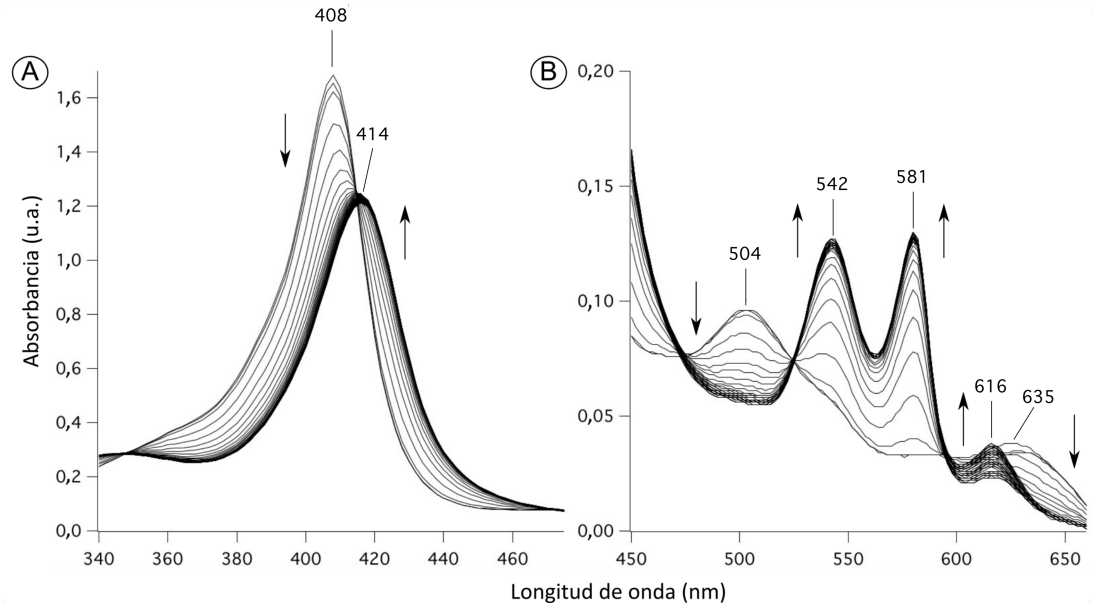


Figura 5.5: Cambio espectral de las bandas de absorción de (A) Soret y (B) de las bandas Q para la reacción de metMb (9,4 μM) con 90 μM de MCPD a pH 7,4 a 25 ° C. El espectro a 0 s se obtuvo para la metMb en ausencia de MCPD y el resto de los espectros se grabaron durante la reacción hasta 1 hora después de haber agregado el MCPD. Las flechas indican la dirección de los cambios en la absorción.

Al realizar la reacción para el caso de la oxiMb y el MCP-SSH, se observa en la figura 5.6 que no ocurren grandes cambios espectrales, excepto por la aparición de la banda anteriormente descripta a 616 nm, la cual fue asignada al sulfMbFe(II).

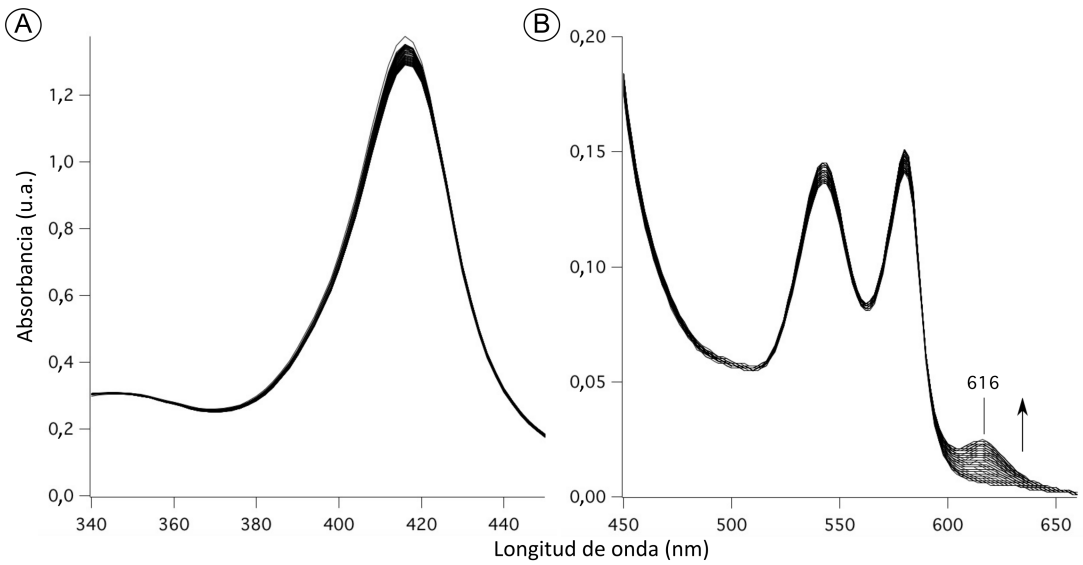


Figura 5.6: Cambio espectral de las bandas de absorción de (A) Soret y (B) de las bandas Q para la reacción de oxiMb (10 μM) con 0,1 mM de MCPD a pH 7,4 a 25 ° C. El espectro a tiempo 0 se obtuvo para la oxiMb en ausencia de MCPD y el resto de los espectros se grabaron durante la reacción hasta 1 hora después de haber agregado el MCPD. Las flechas indican la dirección de los cambios en la absorción.

Debido a que el MCP-SSH generado puede reaccionar con el MCPD o consigo mismo para dar distintos compuestos, tales como los trisulfuros, disulfuros o tioles, no puede afirmarse que la formación del sulfohemo sea causada por la reacción de las Mbs con el hidropersulfuro. Con el objetivo de aclarar esta situación, se realizó la reacción de ambas Mbs (oxi y metMb) con distintos derivados de la cisteína —cisteína (Cys-SH), la cistina (Cys-SS-Cys) y el trisulfuro de la cisteína (Cys-SSS-Cys)—. Como puede ser observado en los paneles A, B y C de la figura 5.7, los agregados de dichos compuestos no producen cambios espectrales en ninguna de los dos estados de la mioglobina.

Además se realizó el agregado conjunto de cisteína y trisulfuro de cisteína, dado que se conoce que existe un equilibrio que relaciona dichos compuestos con los hidropersulfuros y los disulfuros (ver ecuación R19).

$$\mathrm{RSSSR'} + \mathrm{RSH} \rightleftharpoons \mathrm{RSSH} + \mathrm{R'SSR} \tag{R19}$$

En el panel D de la figura 5.7 puede observarse que al realizar el agregado conjunto de cisteína y trisulfuro de cisteína ocurren los mismos cambios espectrales que cuando se agrega solamente MCPD.

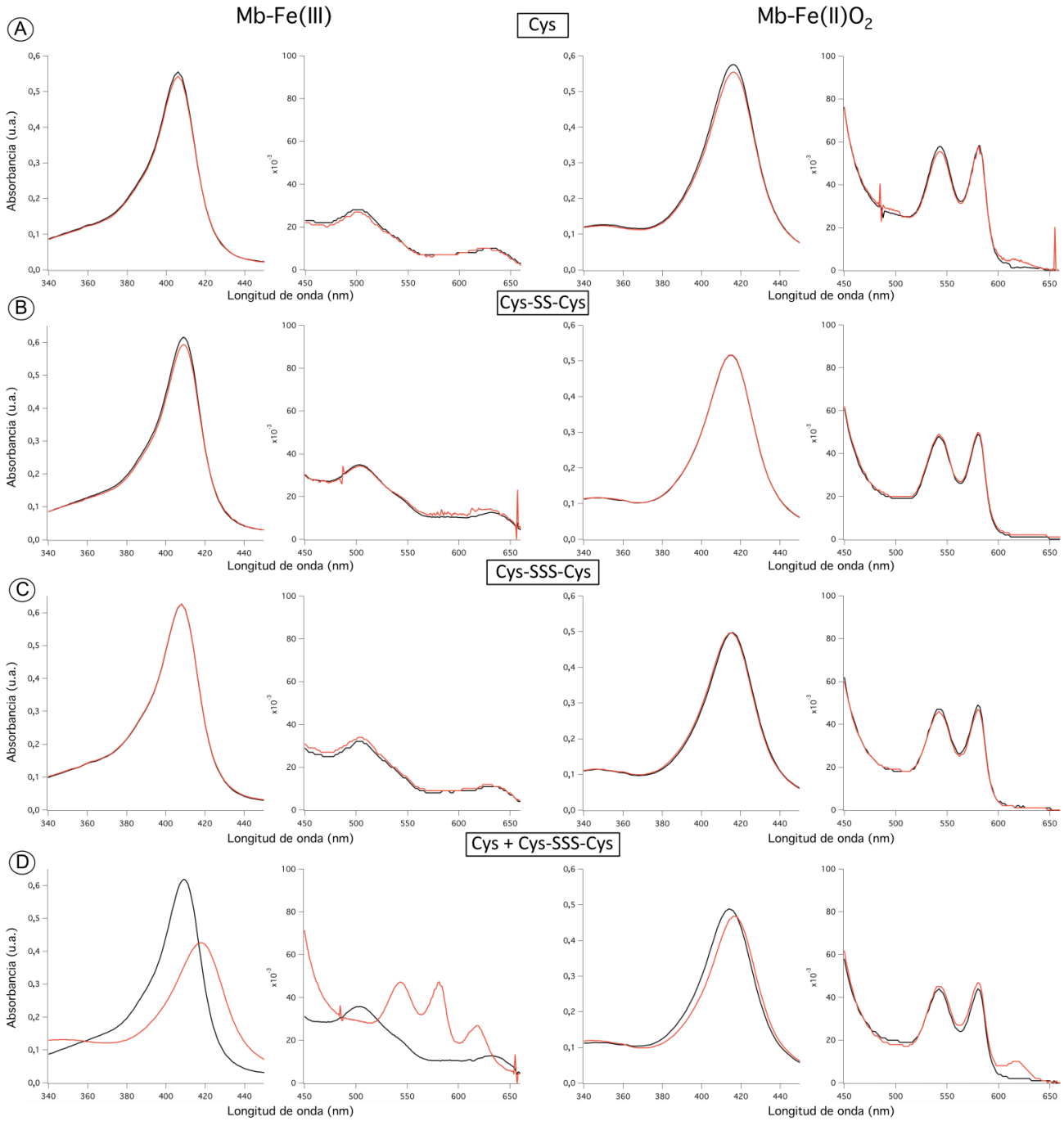


Figura 5.7: Bandas de absorción de Soret y bandas Q inicial (negro) y luego de transcurrida media hora (rojo) para las reacciones de oxiMb (4,5 μM) y metMb (3,5 μM) con los agregados de 50 μM de cisteína (A), cistina (B), trisulfuro de cisteína (C) o de trisulfuro de cisteína junto con cisteína (D).

Por otro lado, se estudiaron con espectroscopía UV-vis las reacciones de metMb u oxiMb con MCPD en presencia de TEMPOL. Como fue mencionado en la sección 5.2, la reducción de TEMPOL por el MCP-SSH genera al radical pertiílo, por lo cual en este experimento se busca determinar si los cambios observados por el agregado de MCPD son debidos a la reacción de la Mb con el radical pertiílo o con el MCP-SSH.

Antes de analizar los resultados debe ser tenido en cuenta que la generación del radical pertiílo (RSS$^{\bullet}$) no es limpia, sino que siempre hay algo de MCP-SSH (aunque una muy baja concentración). Esto hace que en los espectros se observen, además de los cambios debidos a la reacción de Mb (oxi o met, según corresponda) con RSS$^{\bullet}$, los cambios debidos a la reacción de MCP-SSH. Por otro lado, debe tenerse en cuenta que se trabajó con las mismas concentraciones de proteína y de MCPD (9 y 90 μM respectivamente), con el objetivo de poder comparar de mejor manera los resultados obtenidos.

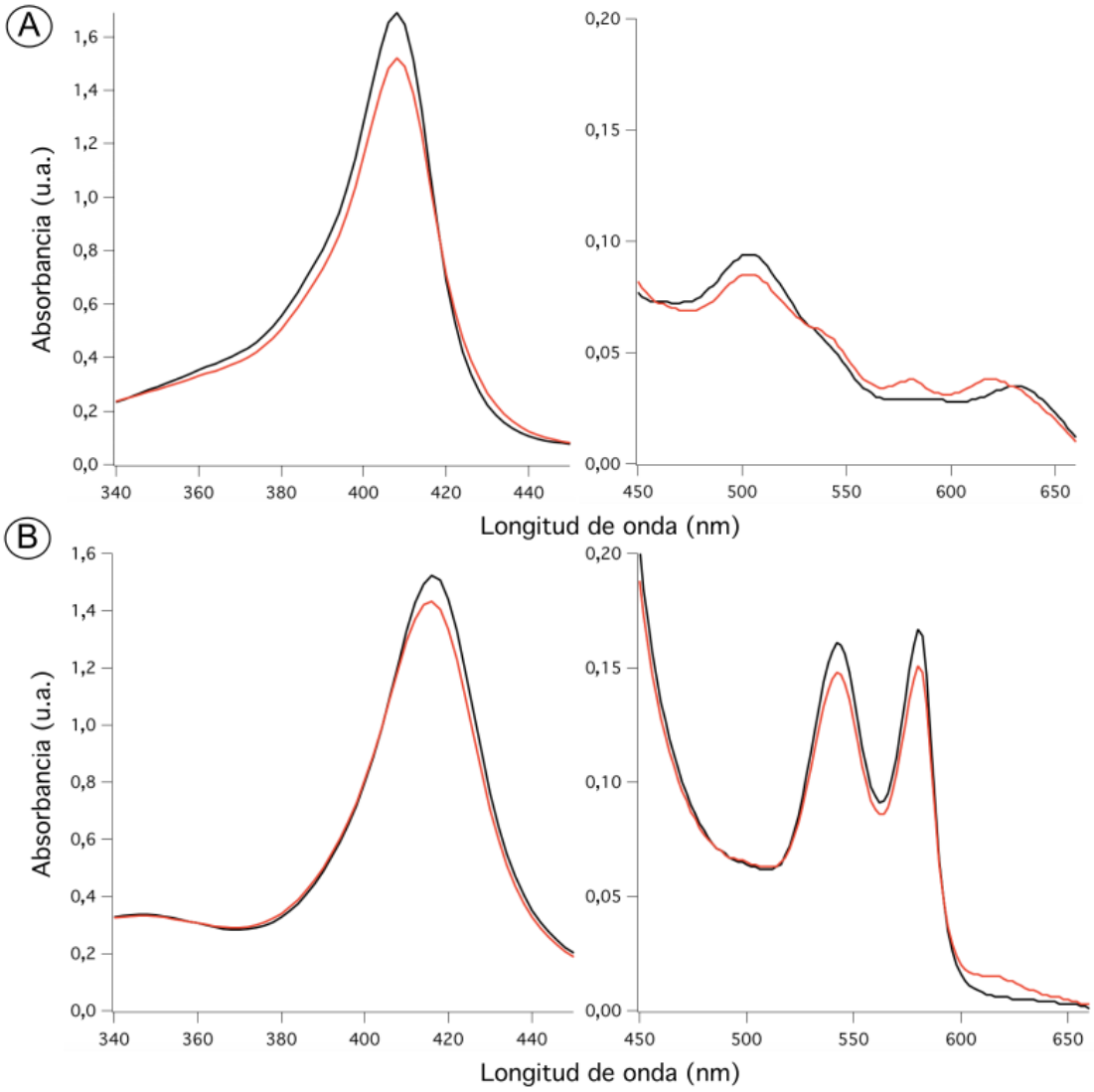


Figura 5.8: Cambios espectrales en las bandas de Soret y en las bandas Q inicial (negro) y luego de transcurrida media hora (rojo) para la reacción de 9 μM de metMb (A) o de oxiMb (B) con MCPD (90 μM) y TEMPOL (180 μM) a pH 7,4 y 25 ° C.

En el caso de la metMb (panel A de la figura 5.8) se observan ciertos cambios espectrales: la leve disminución de la banda de Soret a 408 nm y la banda Q a 504 nm, el tenue crecimiento de dos bandas Q a a 542 y 581 nm y el corrimiento de la banda de 635 nm a 620 nm. En el caso de la oxiMb se observa

el pequeño crecimiento de la banda a 616 nm.

Con el objetivo de poder diferenciar si la especie reactiva es RSSH o RSS^- se realizó la reacción de ambas Mbs con MCPD a pH 8,5, pH al cual habrá una mayor concentración de la especie desprotonada (se estima que el pKa del MCP-SSH se encuentra entre 7 y 9 [28, 29]). Cabe aclarar que, en ambos casos, los espectros obtenidos para la oxiMb y la metMb a pH 8,5 no muestran cambios con los obtenidos a pH 7,4, razón, por la cual se realiza la suposición de que la proteína no sufre grandes alteraciones al cambiar el pH.

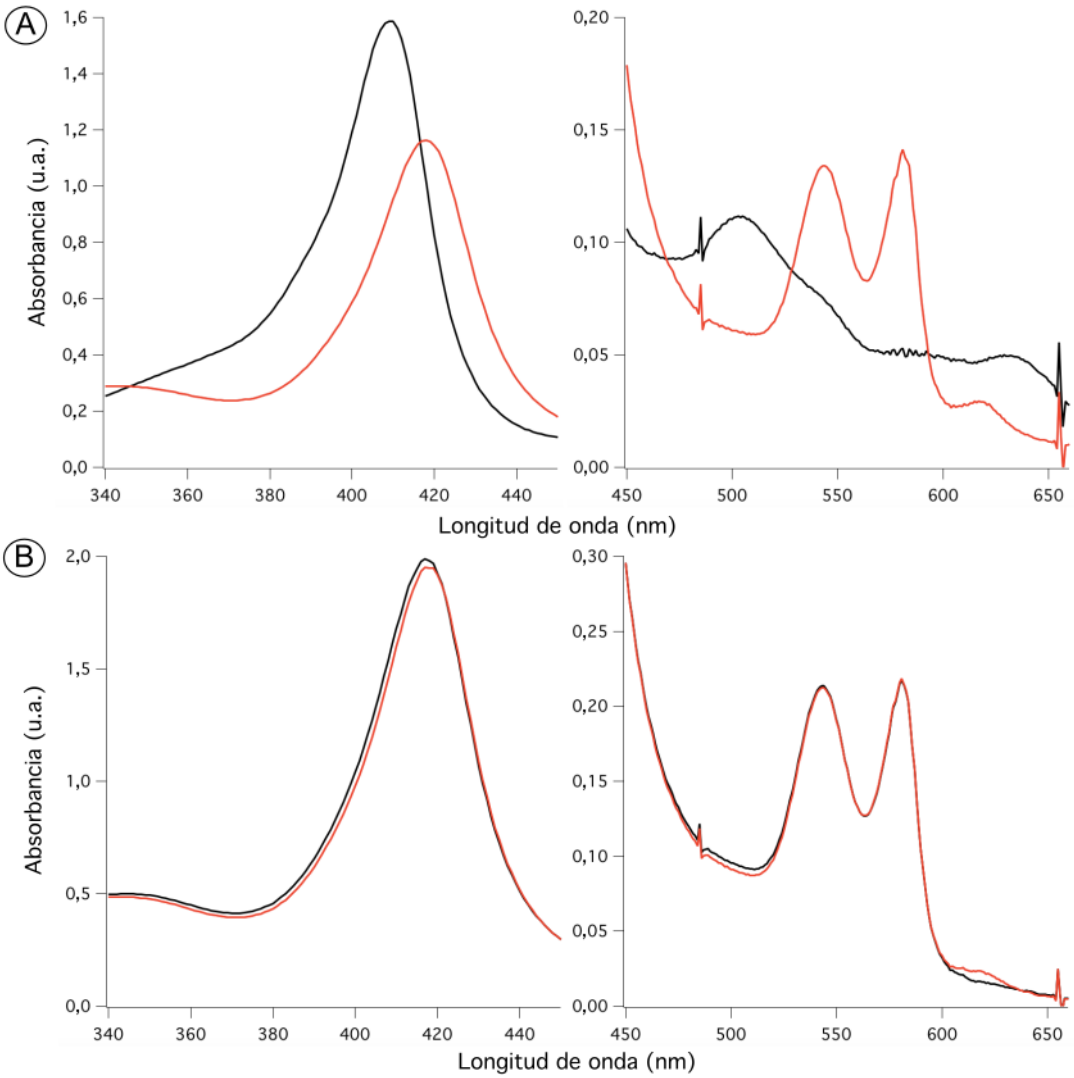


Figura 5.9: Cambios en las bandas de absorción de Soret y Q inicial (negro) y luego de transcurrida media hora (rojo) para la reacción de MCPD a pH 8,5 y (A) oxiMb o (B) metMb 5 μM

A la hora de analizar los resultados, debe ser tenido en cuenta que se trabajó con las mismas concentraciones de proteína y de MCPD, con el objetivo de poder comparar de mejor manera los resultados obtenidos. En el caso de la metMb (panel A de la figura 5.9) puede observarse el corrimiento

de la banda de Soret de 409 a 414 nm y, además, el decaimiento de las bandas Q a 504 y 635 nm junto con el crecimiento de otras dos bandas a 542 y 581 nm. Estos cambios son atribuidos a la reducción de metMb a oxiMb. Esto ocurre de manera similar que a la observada al realizar el agregado de MCPD a la metMb a pH 7,4 (ver la figura 5.5). Asimismo, se observa el crecimiento de la banda a 616 nm correspondiente a la formación de sulfohemo. Sin embargo, al comparar con la figura 5.5 la banda se encuentra disminuida. En el mismo sentido, en el caso de la oxiMb (panel B de la figura 5.9), se observa que la generación de sulfohemo es menor a la obtenida al agregar MCPD a pH 7,4 (ver la figura 5.6).

Además, debido a que en la literatura se proponía que el sulfohemo era formado a través de un intermediario ferrilo de la Mb, se realizó el agregado de peróxido de hidrógeno a una solución de metMb y una vez formado el compuesto I de la Mb se procedió a agregar el MCPD.

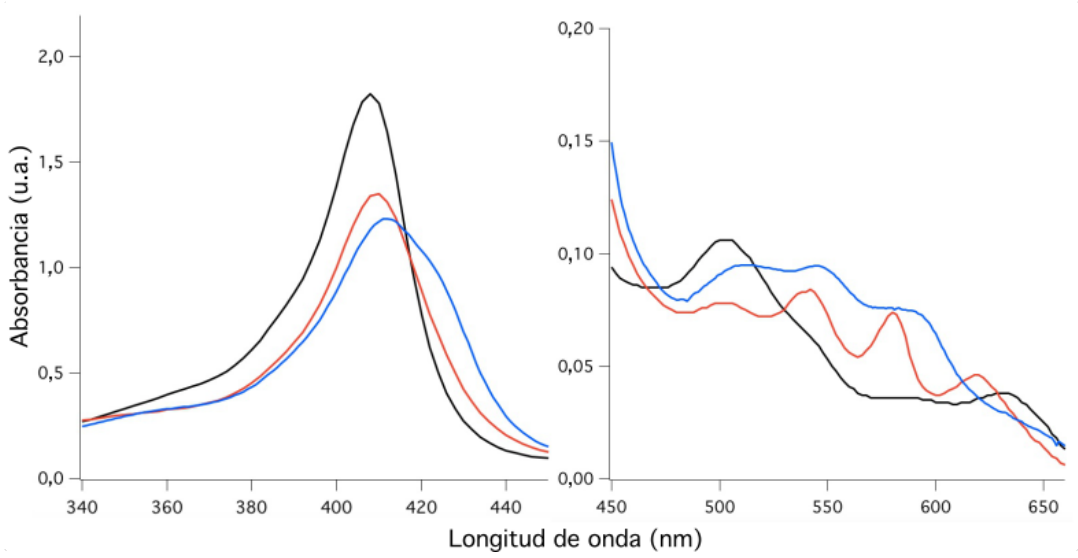


Figura 5.10: Cambios en las bandas de absorción de Soret y bandas Q inicial (negro), una vez formado el tipo compuesto I (azul) y transcurrida media hora del agregado de MCPD (rojo) para la reacción de MetMb (10 μM) con H_2O_2 (7 μM) y MCPD (70 μM).

Si se observa en panel de la derecha en la figura 5.10, puede decirse que ocurre la reducción a oxiMb dado que aparecen las bandas Q características a 542 y 581 nm. Además, se observa el crecimiento de una banda ancha a 620 nm. Si se observa el panel de la izquierda en la figura 5.10, no existen grandes cambios en la banda de Soret.

5.4. Discusión

Como puede ser observado en la figura 5.5, al realizar el agregado de un donante de hidropersulfuros (el MCPD) a una solución de metMb ocurren dos reacciones en simultáneo: por un lado, la

reducción de metMb para dar oxiMb y, por otro lado, la generación de sulfMbFe(II). En cambio, en el caso de la oxiMb (ver figura 5.6) ocurre únicamente esta última reacción. De los resultados aquí descriptos, no puede ser establecido si la generación del sulfohemo a partir de metMb sucede de forma directa debido a la reacción del MCP-SSH con la proteína férrica o bien, si corresponde a la reacción entre la oxiMb, formada por la reacción de reducción de la metMb, y el hidropersulfuro.

Al realizar los agregados individuales de cisteína, cistina o de trisulfuro de cisteína, no se producen cambios espectrales en ninguno de los dos estados de la mioglobina (ver figura 5.7 paneles A, B y C) descartando que dichos compuestos estén involucrados en las reacciones que ocurren al agregar MCPD a la solución de la mioglobina en cuestión. Sin embargo, resulta interesante notar que al realizar el agregado de forma simultánea de la cisteína con el trisulfuro de cisteína, se observan, los mismos cambios espectrales que con el agregado del MCPD, tanto para el caso de la metMb como para la oxiMb. Esto se explica debido al equilibrio que relaciona los tioles y trisulfuros con los disulfuros y los hidropersulfuros (ver reacción R19) confirmando que los cambios espectrales observados se deben exclusivamente a la reactividad de los hidropersulfuros con la metMb o la oxiMb respectivamente.

Entonces, los hidropersulfuros en presencia de O_2 producen la reducción de metMb para dar oxiMb y, a su vez, forman sulfMbFe(II), tanto a partir de metMb como de oxiMb. Esto implica una vía de formación de sulfohemo alternativa a las conocidas hasta la fecha, las cuales involucraban la reacción de oxiMb con H_2S, o bien la reacción de la hemoproteína con H_2O_2 con compuestos de azufre [3, 30]. Además de resultar ser una prueba de la capacidad reactiva de los hidropersulfuros en sistemas biológicos.

Para profundizar el análisis de los mecanismos de reacción subyacentes se analizó el agregado del donante MCPD en presencia de TEMPOL (ver panel A de la figura 5.8) a la solución de metMb, puede observarse que la reducción que da lugar a oxiMb se ve disminuida. Esto era de esperar dado que el radical $RSS^{\cdot}$ tiene un menor poder reductor que el RSSH. Asimismo, tal como fue visto por Bianco y colaboradores [26], los resultados obtenidos confirman el hecho de que los RSSH son buenos compuestos reductores. En cuanto a la generación de sulfohemo, se observa la aparición de un pico ancho a 620 nm. Dicha banda podría corresponder a la generación de distintos sulfohemos, no sólo el sulfMbFe(II) que absorbe a 616 nm, sino también el sulfMbFe(II)O_2 como el sulfMbFe(III), los cuales presentan un máximo de absorbancia a 623 nm [2]. Esto justificaría también el hecho de que no se observa corrimiento en la banda de Soret, dado que tanto el sulfMbFe(II)O_2 como el sulfMbFe(III) absorben a 408 nm [2]. En el caso de la oxiMb (ver panel B de la figura 5.8), se observa una disminución de la generación de sulfMbFe(II).

Estos resultados muestran que la reacción de reducción de metMb a oxiMb se debe exclusivamente a la reacción entre dicha proteína y el MCP-SSH. En cuanto a la formación de sulfMb, la situación

es más compleja, pero puede decirse que la reacción de MCP-SSH con metMb o oxiMb da lugar exclusivamente al sulfMbFe(II), mientras que la reacción del RSS$^{\cdot}$ da lugar a sulfohemos con distintos estados de oxidación y coordinación.

Al realizar el agregado de MCPD a pH 8,5 en el caso de la metMb (ver panel A de la figura 5.9) se observa que ocurre la reducción a oxiMb de igual manera que cuando se realiza la reacción a pH 7,4, mientras que la generación de sulfMbFe(II) se ve disminuida. Esto es indicativo de que la especie que reacciona generando el sulfMb es RSSH y no el RSS^{-}, lo cual puede deberse al hecho de que sea necesaria una transferencia de H como primer paso de reacción. Esto se confirma al analizar la reacción para la oxiMb a pH 8,5 (ver panel B de la figura 5.9) donde se observa un muy leve crecimiento de la banda a 616 nm, lo que corresponde a una muy leve generación de sulfMbFe(II).

Por último, al analizar lo que ocurre al agregar el donante de MCP-SSH al compuesto I de la Mb (ver figura 5.10), se observa que se tiene oxiMb (determinado por las bandas Q características a 542 y 581 nm) y una banda ancha a 620 nm. Dicha banda puede ser asignada a una mezcla de los sulfohemos además del sulfMbFe(II), ya que tanto el sulfMbFe(II)O_2 como el sulfMbFe(III) absorben a 623 nm [2]. Si se observa el panel de la izquierda en la figura 5.10, no existen grandes cambios en la banda de Soret. Esto puede deberse a que tanto el sulfMbFe(II)O_2 como el sulfMbFe(III) absorben a 408 nm [2]. Este resultado muestra que la reacción de MCP-SSH con metMb genera exclusivamente el sulfMbFe(II), mientras que en el caso de la reacción del compuesto I de la Mb y el MCP-SSH genera distintas variedades de sulfohemo.

Todos los resultados anteriormente descriptos se encuentran condensados en el siguiente esquema:

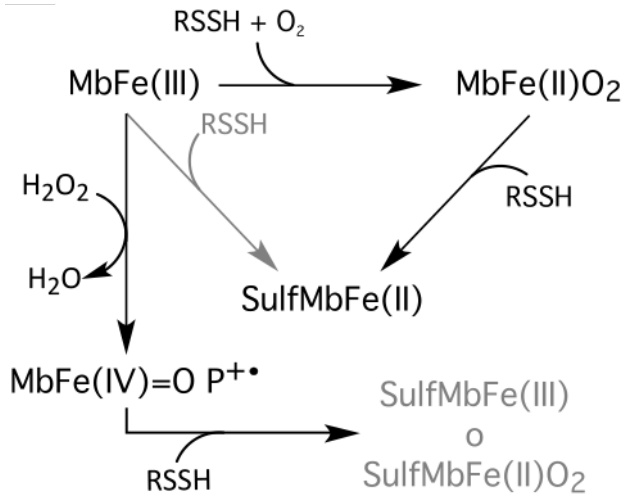


Figura 5.11: Esquema de la reacción de la oxi y metMb con los hidropersulfuros. En gris se encuentran los pasos o compuestos que no pudieron ser establecidos unívocamente

5.5. Conclusiones

Con todos los resultados presentados en el presente capítulo, se ha demostrado una vía de generación de sulfohemo alternativa a las anteriormente conocidas y específica para la generación del sulfMbFe(II), que involucra la reacción de hidropersulfuros con mioglobina. En el caso de la metMb, ocurre, además, la reducción de la misma para dar oxiMb. Dicha reacción impide determinar si la formación del sulfMbFe(II), sucede por reacción directa de la metMb y el hidropersulfuro o si es debida a la reacción de la oxiMb generada con el compuesto de azufre. Además, se descartó la implicancia de otros compuestos de azufres (tioles, disulfuros y trisulfuros) en la generación de sulfMbFe(II). Se verificó, también, que la reacción del $RSS^{\cdot}$ con las Mbs produce distintos sulfohemos. Lo mismo ocurre al realizar la reacción de del compuesto I con el hidropersulfuro. Por último, la disminución en la producción de sulfMbFe(II) a pH 8,5 establece que resulta necesaria la transferencia de un H para su formación.

Estos resultados representan un punto de partida para la comprensión de cómo sucede la generación del sulfohemo. Además, aportan información acerca del rol de los hidropersulfuros como reductores de hemoproteínas.

Referencias

1. Francoleon, N. E., Carrington, S. J. y Fukuto, J. M. The reaction of H2S with oxidized thiols: Generation of persulfides and implications to H2S biology. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **516,** 146-153 (2011).

2. Berzofsky, J. A., Peisach, J. y Blumberg, W. E. Sulfheme proteins. II. The reversible oxygenation of ferrous sulfmyoglobin. *Journal of Biological Chemistry* **246,** 7366-7372 (1971).

3. Nicholls, P. The formation and properties of sulphmyoglobin and sulphcatalase. *Biochemical Journal* **81,** 374-383 (1961).

4. Harangi, M. *y col.* Identification of sulfhemoglobinemia after surgical polypectomy. *Clinical Toxicology* **45,** 189-192 (2007).

5. Szabó, C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nature reviews. Drug discovery* **6,** 917-35 (2007).

6. Whiteman, M., Le Trionnaire, S., Chopra, M., Fox, B. y Whatmore, J. Emerging role of hydrogen sulfide in health and disease: critical appraisal of biomarkers and pharmacological tools. *Clinical Science* **121,** 459-488 (2011).

7. Predmore, B. L., Lefer, D. J. y Gojon, G. Hydrogen sulfide in biochemistry and medicine. *Antioxidants & redox signaling* **17,** 119-40 (2012).

8. Bondoc, L. L., Chau, M. H., Price, M. A. y Timkovich, R. Structure of a stable form of sulfheme. *Biochemistry* **25,** 8458-8466 (1986).

9. Chatfield, M. J., La Mar, G. N., Balch, A. L. y Lecomte, J. T. J. Multiple forms of sulfmyoglobin as detected by 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **135,** 309-315 (1986).

10. Chatfield, M. J. *y col.* Identification of the altered pyrrole in sulfmyoglobin and an extractable sulfhemin: participation of the 4-vinyl group in the saturation of the pyrrole in one form of sulfmyoglobin. *Journal of the American Chemical Society* **108,** 7108-7110 (1986).

11. Berzofsky, J. A., Peisach, J. y Alben, J. O. Sulfheme Proteins: III. Carboxysulfmyoglobin: the relation betwwn electron withdrawal from iron and ligand binding. *Journal of Biological Chemistry* **247,** 3774-3782 (1972).

12. Chatfield, M. J., La Mar, G. N. y Kauten, R. J. Proton NMR characterization of isomeric sulfmyoglobins: preparation, interconversion, reactivity patterns, and structural features. *Biochemistry* **26,** 6939-6950 (1987).

13. Timkovich, R. y Vavra, M. R. Proton NMR spectroscopy of sulfmyoglobin. *Biochemistry* **24,** 5189-5196 (1985).

14. Carrico, R. J., Blumberg, W. E. y Peisach, J. The reversible binding of oxygen to sulfhemoglobin. *Journal of Biological Chemistry* **253,** 7212-7215 (1978).

15. Berzofsky, J. A., Peisach, J. y Horecker, B. L. Sulfheme proteins. IV. The stoichiometry of sulfur incorporation and the isolation of sulfhemin, the prosthetic group of sulfmyoglobin. *Journal of Biological Chemistry* **247,** 3783-3791 (1972).

16. Anderson, L. A., Loehr, T. M., Lim, A. R. y Mauk, A. G. Sulfmyoglobin. Resonance Raman spectroscopic evidence for an iron-chlorin prosthetic group. *Journal of Biological Chemistry* **259,** 15340-15349 (1984).

17. Berzofsky, J. A., Peisach, J. y Blumberg, W. E. Sulfheme proteins. I. Optical and magnetic properties of sulfmyoglobin and its derivatives. *Journal of Biological Chemistry* **246,** 3367-3377 (1971).

18. Chatfield, M., La Mar, G., Smith, K., Leung, H.-K. y Pandey, R. Identification of the altered pyrrole in the isomeric sulfmyoglobins: Hyperfine shift patterns as indicators of ring saturation in ferric chlorins. *Biochemistry* **27** (1988).

19. Evans, S. V., Sishta, B. P., Mauk, a. G. y Brayer, G. D. Three-dimensional structure of cyanometsulfmyoglobin C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91,** 4723-6 (1994).

20. Romero, F. J., Ordonez, I., Arduini, A. y Cadenas, E. The reactivity of thiols and disulfides with different redox states of myoglobin. Redox and addition reactions and formation of thiyl radical intermediates. *The Journal of Biological Chemistry* **267,** 1680-1688 (1992).

21. Román-Morales, E. *y col.* Structural determinants for the formation of sulfhemeprotein complexes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **400,** 489-492 (2010).

22. Libardi, S. H., Pindstrup, H., Cardoso, D. R. y Skibsted, L. H. Reduction of Ferrylmyoglobin by Hydrogen Sulfide. Kinetics in Relation to Meat Greening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61,** 2883-2888 (2013).

23. Di Iorio, E. E. Preparation of derivatives of ferrous and ferric hemoglobin. *Methods in Enzymology* **76,** 57-72 (1981).

24. Artaud, I. y Galardon, E. A Persulfide Analogue of the Nitrosothiol SNAP: Formation, Characterization and Reactivity. *ChemBioChem* **15,** 2361-2364 (2014).

25. Millikin, R. *y col.* The chemical biology of protein hydropersulfides: Studies of a possible protective function of biological hydropersulfide generation. *Free Radical Biology and Medicine* **97,** 136-147 (2016).

26. Bianco, C. L. *y col.* The chemical biology of the persulfide (RSSH)/perthiyl (RSS) redox couple and possible role in biological redox signaling. *Free Radical Biology and Medicine* **101,** 20-31 (2016).

27. Miranda, K. M. *y col.* A biochemical rationale for the discrete behavior of nitroxyl and nitric oxide in the cardiovascular system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100,** 9196-9201 (2003).

28. Friedman, M., Cavins, J. F. y Wall, J. S. Relative Nucleophilic Reactivities of Amino Groups and Mercaptide Ions in Addition Reactions with α,β-Unsaturated Compounds1,2. *Journal of the American Chemical Society* **87,** 3672-3682 (1965).

29. Ono, K. *y col.* Redox chemistry and chemical biology of H2S, hydropersulfides, and derived species: Implications of their possible biological activity and utility. *Free Radical Biology and Medicine* **77,** 82-94 (2014).

30. Romero, F. J., Ordonez, I., Arduini, A. y Cadenas, E. The reactivity of thiols and disulfides with different redox states of myoglobin. Redox and addition reactions and formation of thiyl radical intermediates. *Journal of Biological Chemistry* **267,** 1680-1688 (1992).

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES GENERALES

En la presente tesis se estudiaron reacciones entre distintas hemoproteínas y moléculas inorgánicas pequeñas, permitiendo conocer un poco más acerca de la reactividad del grupo hemo y las hemoproteínas y así entender cómo pueden llevar a cabo reacciones tan diversas.

En particular, en el capítulo III, se estudiaron específicamente las reacciones de dioxigenación mediadas por dos dioxigenasas hémicas: 2,3-triptófano y 2,3-indolamino dioxigenasa. En el caso de la TDO, se estudió el mecanismo de reacción para la proteína humana, recientemente cristalizada. Los resultados obtenidos muestran que la reacción se inicia a través del ataque directo del O_2 coordinado al hemo al C_2 del Trp, lo que da lugar al grupo ferrilo en el grupo hemo y al 2,3-alquilepóxido. Luego, ocurre la apertura ácida del 2,3-alquilepóxido, debido a que sucede una transferencia de protón, desde el grupo amino del Trp al átomo de oxígeno del epóxido, junto con la posterior adición del segundo átomo de oxígeno. Al comparar dichos resultados con los obtenidos para la xcTDO, puede decirse que son muy similares, aunque las barreras energéticas son significativamente menores para la proteína humana. Los resultados de los cálculos de dinámica molecular sugieren que dicha diferencia puede ser atribuida a la interacción entre la glicina 152 (presente en el sitio activo) con el oxígeno coordinado al grupo hemo, la cual resulta ser más intensa en el caso de la proteína humana y podría ser la responsable de estabilizar los estados de transición y disminuir así las barreras energéticas. Estos resultados completan el panorama reactivo de las dioxigenasas humanas. La confirmación de que el mecanismo de reacción sea el mismo para todas las enzimas de la familia estudiadas hasta el momento (xcTDO, hTDO e hIDO), a pesar de las pequeñas diferencias que se encuentran en el sitio activo, subrayan su robustez.

Por otro lado, para el caso de la IDO, debido a que la estructura cristalina publicada no se encontraba completa, se realizó un modelado del loop faltante y luego, un muestreo del espacio conformacional en presencia del Trp en dos conformaciones distintas y en ausencia del mismo, con el objetivo de

comprender qué efecto tenía el Trp en la dinámica del loop. Los resultados obtenidos muestran que el loop presenta un comportamiento diferente según la zona que se analice. Debido a esto se dividió en dos sectores: la región loop-JK^C, cercana a la zona C terminal de la proteína y la región del loop más cercana al N terminal. La primera puede adoptar distintas conformaciones denominadas: abierta, intermedia y cerrada. Mientras que la segunda, es más flexible y, a pesar de poder adoptar conformaciones con ciertos elementos de estructura secundaria, no posee conformaciones dominantes. Un análisis específico para cada tipo de coordinación del loop da como resultado que en presencia del Trp en la Cf1 únicamente se encuentra al loop-JK^C en la conformación cerrada. En cambio, en el caso de la Cf2 resultan las conformaciones abiertas e intermedias las más pobladas. En el caso del sistema sin Trp la estructura mayoritaria es la conformación cerrada, aunque la misma posee mayor variabilidad que en el caso de la Cf1. Con estos resultados se propone un modelo en el cual la región C del loop posee un rol destacado en la unión a sustrato. La falta de estructura del loop-JK^N y su dinámica sugiere que puede ser blanco de modificaciones post-traduccionales o interacciones proteína-proteína proveyendo una forma extra de control de la actividad biológica de IDO. La evaluación de estos resultados en su conjunto otorga evidencia para establecer que la diferencia entre la hIDO y la hTDO no surge necesariamente de la química de la reacción, ni de la identidad de los residuos presentes en el sitio activo, sino de los mecanismos de unión de sustrato y de la potencial regulación por modificaciones post-traduccionales o por interacción proteína-proteína que puede suceder en el caso de la hIDO a través de la región loop-JK^N. Además, toda la información aquí presentada acerca del funcionamiento de estas dioxigenasas, resulta útil a la hora de realizar un diseño racional de drogas, considerando que estas proteínas pueden tratarse de blancos terapéuticos para el tratamiento de cáncer.

Por otro lado, cabe destacar que la metodología utilizada en este capítulo para la determinación de la estructura del loop, es innovadora, ya que hasta nuestro conocimiento no ha sido utilizada anteriormente y resulta una herramienta muy útil para el modelado de zonas de proteínas que no han podido ser cristalizadas. Para el modelado de una estructura desconocida, comúnmente, se utiliza solamente la técnica de modelado por homología, la cual considera tanto la información de la secuencia del sistema bajo estudio, como el uso de estructuras moldes, que consisten en proteínas de la misma familia o con alta identidad de secuencia que poseen la zona de interés cristalizada. La combinación de dicha técnica con una técnica de muestreo avanzado del espacio conformacional, como es *replica-exchange*, permite acotar el número de estructuras posibles del sistema, utilizando un criterio termodinámico. Esto resulta ser muy importante a la hora de buscar la estructura de una zona de la proteína que no ha podido ser cristalizada.

Por otra parte, en el capítulo IV, se estudió la posibilidad de generación endógena de HNO a través de la peroxidación de hidroxilaminas mediadas por mioglobina. Fueron llevados a cabo estudios

cinéticos, tanto para la generación del compuesto I de la Mb, como para la reacción de peroxidación de la hidroxilamina. Además, mediante el uso de un electrodo selectivo a HNO, se comprobó que dicha molécula era efectivamente producto de la reacción y aprovechando esta herramienta se mejoró la estimación de la constante de velocidad para dicha reacción. Por último, se estudió a nivel molecular el mecanismo a través del cual ocurre la peroxidación. La reacción se inicia a través de la transferencia de un átomo de hidrógeno desde la hidroxilamina al compuesto I de la mioglobina. La misma no posee una barrera energética. Luego, ocurre una segunda transferencia de hidrógeno cuya barrera depende del producto de la reacción. Si la reacción da lugar a HNO posee una barrera de 2 o 6 kcal/mol, dependiendo del estado de espín; en cambio si el producto de la reacción es NOH, la barrera es de 9 o 15 kcal/mol. Estos resultados son importantes porque demuestran que la peroxidación de hidroxilamina mediada por hemoproteínas produce HNO y podría tratarse de una fuente endógena de HNO.

Finalmente, en el capítulo V se realizó un estudio de la reactividad de los hidropersulfuros con hemoproteínas, específicamente mioglobina. En este capítulo se confirmó la capacidad reductora de dichos compuestos, dado que producen la reducción de la metMb a oxiMb. Por otro lado, se detectó que son capaces de producir sulfMbFe(II). Dicho compuesto se encuentra en bajas concentraciones en el organismo en personas saludables, y en altas concentraciones en pacientes que sufren sulfhemoglobinemia [1], enfermedad en la cual los pacientes presentan desaturación de oxígeno. Sin embargo, hasta la fecha se desconoce si dicho compuesto posee una función biológica dada. Los resultados presentados confirman que son los hidropersulfuros los responsables de la formación de dicho compuesto, descartando la participación en dicha reacción de los tioles, disulfuros y trisulfuros. Los experimentos realizados a pH 8,5 muestran que para la formación de sulfohemo resulta necesaria la transferencia de un H. En contraposición, la reacción de reducción de metMb para dar oxiMb no se ve modificada por el cambio de pH. Por otro lado, se determinó que la reacción del RSS$^{\cdot}$ con las Mbs produce el sulfMbFe(II), el sulfMbFe(II)O_2 y el sulfMbFe(III). Asimismo, se ha demostrado que la reacción del compuesto I de Mb con el hidropersulfuro genera distintas especies de sulfohemo. Con todos estos resultados, se ha mostrado una vía de generación de sulfohemo alternativa a las descriptas en literatura, la cual resulta específica para la generación del sulfMbFe(II). Además, se ha demostrado que los hidropersulfuros pueden no sólo ser reductores de hemoproteínas, sino que también estar involucrados en reacciones como la generación de sulfohemo que modifica las características proteicas, por lo que podría ser parte de su función.

En la presente tesis, se muestran dos reacciones realizadas por hemoproteínas en las cuales el compuesto I del grupo hemo posee un rol destacado. En el caso de la dioxigenación de triptófano, el compuesto I es un intermediario posterior a la primera adición de un átomo de oxígeno a la molécula

de Trp. En el caso de la peroxidación de hidroxilamina, el compuesto I es un reactivo clave para que ocurra dicha reacción. Estos resultados sugieren que dicho compuesto es el efector de las reacciones de oxidación llevadas a cabo por hemoproteínas. En consecuencia, para que estas reacciones ocurran, requieren de la oxidación del grupo hemo formando el compuesto I, que luego llevará a cabo la reacción de oxidación del sustrato.

Ahora bien, no sólo es la versatilidad química del grupo hemo, en cuanto a sus diferentes estados de coordinación y los distintos estados de oxidación posibles del ion de hierro, lo que le permite a las hemoproteínas llevar a cabo tan diversas reacciones; sino también posee un rol importante el entorno proteico. La identidad de los residuos en el sitio activo puede producir cambios en las características electrónicas del grupo hemo o bien modificar la polaridad del sitio activo, lo cual permite que se alberguen distintos tipos de sustratos.

En resumen, en esta tesis se presentan resultados que aportan información acerca de la reactividad del grupo hemo. Entendiendo cómo son llevadas a cabo las reacciones en las hemoproteínas, puede tenerse una mayor comprensión de cómo —aún compartiendo el mismo grupo prostético— realizan tan diversas funciones.

6.1. Perspectivas futuras

La presente tesis origina nuevas preguntas que necesitarán ser desarrolladas en el futuro. Por un lado, en el caso de la peroxidación de hidroxilaminas, resulta interesante evaluar qué ocurre en el caso de las hidroxilaminas metiladas o en otros sustratos con una unión C-N similar a las moléculas que reaccionan con la NOS y así poder evaluar cómo sucede la producción de HNO a través de la oxido nítrico sintasa (NOS). Si bien la NOS es conocida por su función de producir NO mediante la oxidación de arginina a través de dos pasos de reacción que utilizan O_2 y electrones que provienen de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) según el mecanismo presentado en la figura 6.1, se ha demostrado que en condiciones deficientes de tetrahidrobiopterina (BH_4) [2-5] produce HNO, lo cual resulta de gran interés debido a que se trata del mecanismo de producción endógena de HNO sugerido más aceptado hasta el momento. El primer paso involucra una oxidación de arginina para dar N-hidroxi-L-arginina (NOHA). Para ello el O_2 es activado, a través de la formación del compuesto I de la NOS. Dicho compuesto oxida a uno de los nitrógenos guanidinios de la arginina (marcados en rojo en la figura 6.1) dando lugar a una hidroxilamina. Si se repitiera nuevamente una oxidación por dos electrones se obtendrían, como productos de reacción, la citrulina y HNO en lugar de NO, ya que resulta ser análogo a la peroxidación de hidroxilamina que fue estudiada en la presente tesis. En el mecanismo de la NOS, esto no ocurre debido a que la BH_4 provee un electrón para la activación del

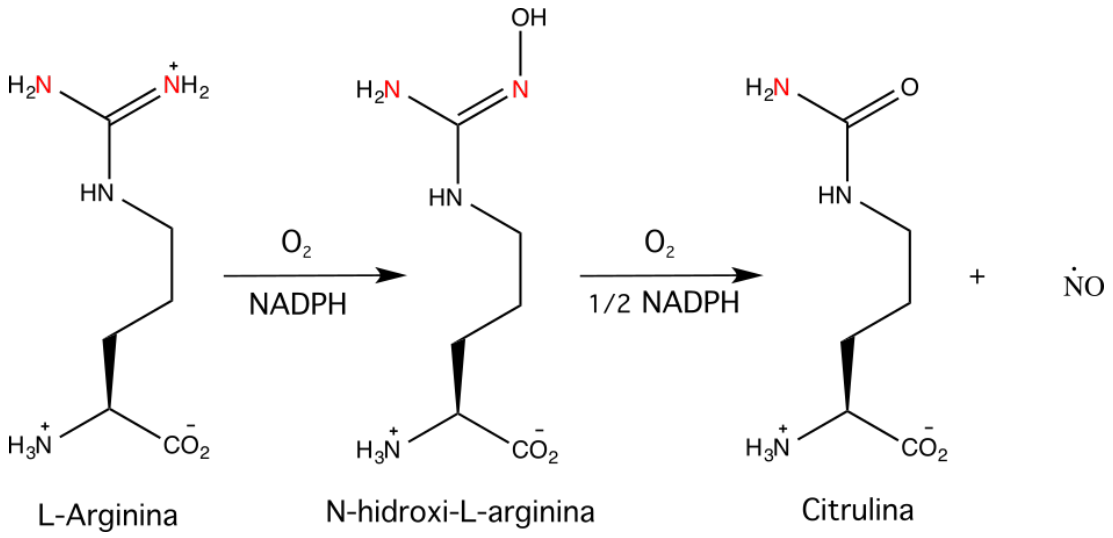


Figura 6.1: Esquema de la reacción de la NOS.

O_2 en cada paso. Como resultado se forma el radical $BH_4^{+\cdot}$, el cual sería el responsable de remover un electrón del último paso de la reacción, produciendo así el NO y la citrulina (ver la figura 6.2).

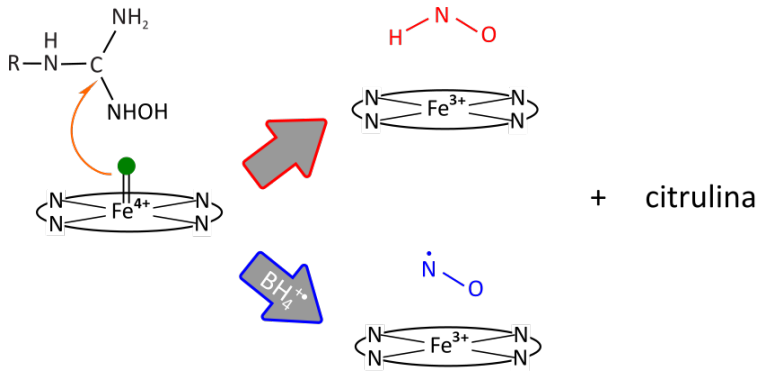


Figura 6.2: Esquema de la reacción de la NOS para dar NO o HNO.

Por otro lado, con el objetivo de tener un mayor entendimiento de una posible función biológica, resulta interesante realizar una caracterización de la reacción de hidropersulfuros y la mioglobina en ausencia de O_2. Esta perspectiva surge del hecho de que las reacciones de producción de sulfohemo descriptas en literatura requerían de la presencia de O_2 o de peróxido de hidrógeno [6-8]. Además, se ha determinado la reversibilidad de la formación de sulfohemo ante el burbujeo de O_2 [9]. Asimismo, resulta importante, con el objetivo de entender el mecanismo de reacción, caracterizar qué es lo que ocurre con el hidropersulfuro una vez adicionado el átomo de azufre en el anillo pirrólico B del grupo hemo para dar el sulfohemo. Por otro lado, resulta importante definir cuál es exactamente la estructura del sulfohemo obtenido mediante la reacción del hidropersulfuro con mioglobina. Esto podría ser llevado a cabo mediante el uso de resonancia magnética nuclear o la difracción de

rayos X, ambas técnicas ampliamente utilizadas en la determinación de la estructura proteica. De forma complementaria, resulta interesante evaluar si es posible la formación de un sulfohemo en porfirinas de hierro. Esto facilitaría el estudio del mecanismo de reacción dado que se trata de sistemas simplificados. Debe tenerse en cuenta que, como fue nombrado anteriormente, la histidina distal resulta clave para la producción del sulfohemo en hemoproteínas. Es por ello que podría evaluarse si el agregado de una base reemplaza el rol de dicho residuo. Una vez obtenida dicha información, resulta interesante realizar cálculos QM-MM para entender la base molecular a través de la cual ocurre la formación del sulfohemo. Por último, dado que la literatura establece que la histidina distal resulta clave para la generación de sulfohemo [7], sería importante realizar los cálculos con dicho residuo, considerado cuántico y variando sus estados de protonación. La formación del sulfohemo podría tratarse de una vía de regulación de la actividad de la mioglobina y hemoglobina, dado que su formación resulta en una disminución de la afinidad de dichas proteínas por O_2, la cual es reversible a altas concentraciones de O_2. La respuesta a los interrogantes aquí planteados aportaría información acerca de la función biológica del sulfohemo.

Referencias

1. Wu, C. y Kenny, M. A. A case of sulfhemoglobinemia and emergency measurement of sulfhemoglobin with an OSM3 CO-oximeter. *Clinical Chemistry* **43,** 162-166 (1997).

2. Adak, S., Wang, Q. y Stuehr, D. J. Arginine conversion to nitroxide by tetrahydrobiopterin-free neuronal nitric-oxide synthase: Implications for mechanism. *Journal of Biological Chemistry* **275,** 33554-33561 (2000).

3. Schmidt, H. H. *y col.* No NO from NO synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93,** 14492-14497 (1996).

4. Tantillo, D. J., Fukuto, J. M., Hoffman, B. M., Silverman, R. B. y Houk, K. N. Theoretical Studies on NG-Hydroxy-l-arginine and Derived Radicals:Implications for the Mechanism of Nitric Oxide Synthase. *Journal of the American Chemical Society* **122,** 536-537 (2000).

5. Fukuto, J. M., Wallace, G. C., Hszieh, R. y Chaudhuri, G. Chemical oxidation of N-hydroxyguanidine compounds. *Biochemical Pharmacology* **43,** 607-613 (1992).

6. Romero, F. J., Ordonez, I., Arduini, A. y Cadenas, E. The reactivity of thiols and disulfides with different redox states of myoglobin. Redox and addition reactions and formation of thiyl radical intermediates. *The Journal of Biological Chemistry* **267,** 1680-1688 (1992).

7. Román-Morales, E. *y col.* Structural determinants for the formation of sulfhemeprotein complexes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **400,** 489-492 (2010).

8. Berzofsky, J. A., Peisach, J. y Blumberg, W. E. Sulfheme proteins. II. The reversible oxygenation of ferrous sulfmyoglobin. *Journal of Biological Chemistry* **246,** 7366-7372 (1971).

9. Carrico, R. J., Blumberg, W. E. y Peisach, J. The reversible binding of oxygen to sulfhemoglobin. *Journal of Biological Chemistry* **253,** 7212-7215 (1978).

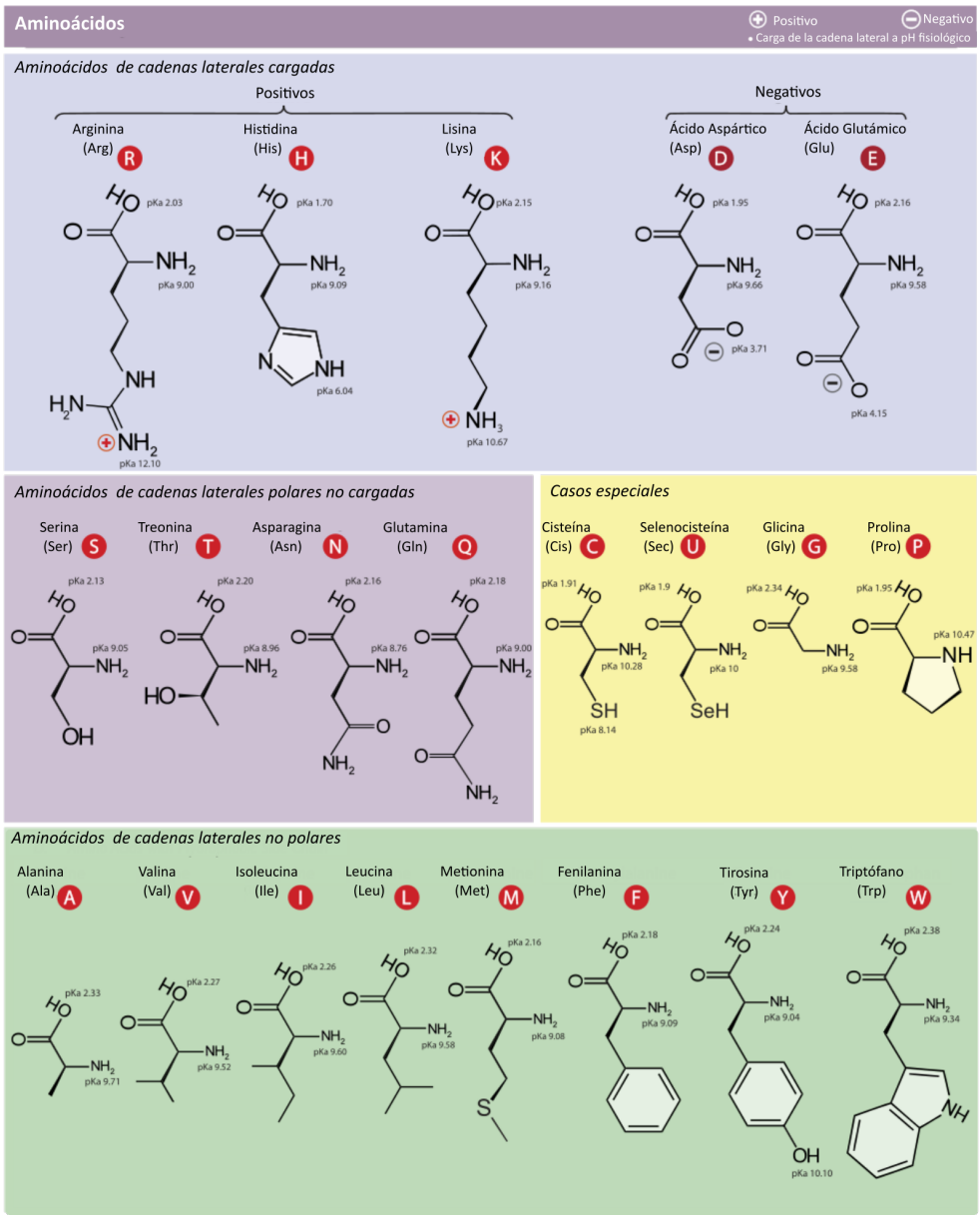
APÉNDICE A

UNIDADES ATÓMICAS

Propiedad	Unidad atómica	Sistema internacional de unidades
masa	masa del electrón, m_e	9,1094 x 10^{-31} kg
carga	carga de un protón, e	1,60224 x 10^{-19} C
momento angular	constante de Planck divido por 2π, $\hbar$	1,0546 x 10^{-34} J.s
distancia	radio de Bohr, $a_0 = \frac{4\pi\epsilon_0\hbar^2}{m_e e^2}$	5,2918 x 10^{-11} m
energía	$E_h = \frac{m_e e^4}{16\pi^2\epsilon_0^2\hbar^2} = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 a_0}$	4,3597 x 10^{-18}J
permitividad	$4\pi\epsilon_0$	1,1127 x 10^{-10} C^2 $J^{-1}m^{-1}$

APÉNDICE B

AMINOÁCIDOS



PUBLICACIONES

1. **Álvarez, L.**; Suarez, S.A; Doctorovich, F. and Martí, M.A. The oxidation of hydroxylamines with H_2O_2 mediated by Myoglobin. *En preparación.*

2. **Álvarez, L.**; Bianco, C.; Toscano, J.P.; Lin, J; Akaike, T. and Fukuto, J.M. The Chemical Biology of Hydropersulfides and Related Species: Possible Roles in Cellular Protection and Redox Signaling. *FORUM ISSUE for ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING on "H_2S & Poysulfide Signaling"* aceptado.

3. Morales Vásquez, M.A.; Pellegrino, J.; **Álvarez, L.**; Neuman, N.I.; Doctorovich, F. and Martí, M.A. Interactions of HNO With Metallated Porphyrins, Corroles, and Corrines. In: *The Chemistry and Biology of Nitroxyl (HNO)* Capítulo de libro, Elsevier (2016), 193-205.

4. Marti, M.A.; **Álvarez, L.**; Suarez, S.A and Doctorovich, F. Is Azanone Endogenously Produced in Mammals? In: *The Chemistry and Biology of Nitroxyl (HNO)* Capítulo de libro, Elsevier (2016), 337-351.

5. **Álvarez, L.**; Lewis-Ballester, A.; Rotiberg A.; Estrin , D. S.; Yeh, S; Martí, M. A. and Capece, L. Structural Study of a Flexible Active Site Loop in Human Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Its Functional Implications. *Biochemistry* (2016), 55(19): 2785-2793.

6. Hamer, M.; Suarez, S. A.; Neuman, N.; **Álvarez, L.**; Muñoz, M.; Martí, M. A. and Doctorovich F. Discussing Endogenous NO/HNO Interconversion Aided by Phenolic Drugs and Vitamins. *Inorganic Chemistry* (2015), 54(19):9342-9350.

7. Suarez, S. A.; Neuman, N.; Muñoz, M.; **Álvarez, L.**; Bikiel, D.; Brondino, C. D.; Ivanovic-Burmazovic, I.; Miljkovic, J. L; Filipovic, M. R.; Martí, M. A and Doctorovich, F. Nitric Oxide Is Reduced to HNO by Proton-Coupled Nucleophilic Attack by Ascorbate, Tyrosine, and Other Alcohols. A New Route to HNO in Biological Media? *Journal of the American Chemical Society* (2015), 137(14), 4720–4727.

8. **Álvarez, L.**; Suarez, S. A.; Bikiel, D. E.; Reboucas, J. S.; Batinic-Haberle, I.; Martí, M. A. and Doctorovich, F. Redox Potential Determines the Reaction Mechanism of HNO Donors with Mn and Fe Prophyrins: Defining the Better Traps. *Inorganic Chemistry* (2014), 53(14):7351-7360.

9. Gauto D.; Modenutti C.; Dumas V.; **Álvarez, L.**; Bustamante J.P.; Turjanski A. G. and Marti M. A. Determining Free Energies of Protein-Ligand binding and association/dissociation processes using computer simulations. *World Research Journal of Peptide and Protein* (2012), 1, 21-32.

Agradecimientos

Finalmente llegó este momento, aquél que parecía tan lejano, aquél que me obliga a mirar atrás y darme cuenta que no llegué a este momento únicamente por mérito propio sino por el apoyo y ayuda de toda la gente que me rodea. Quiero agradecerle a la vida por toda esta gente que se cruzó en mi camino y que me enseñó tantas cosas que hoy me permiten estar acá.

Primero quiero agradecerles a los jurados por aceptar leer este trabajo, que representa el mayor esfuerzo realizado en los últimos cinco años de mi vida. Muchas gracias por tomarse este tiempo y espero que lo disfruten.

Gracias a la Universidad Pública y Gratuita, que me formó como licenciada y ahora como doctora. Haber llegado hasta acá a través de ustedes es un lujo que no todos se pueden dar y del que estoy infinitamente agradecida. Espero poder devolverle a la UBA todo lo que me dio y cuidarla como se merece. Gracias al INQUIMAE y al DQIAyQF por haberme sido mi casa durante estos 5 años. Gracias también por haberme permitido dar mis primeros pasos como docente, tarea que hago muy feliz y de la que aprendo muchísimo día a día.

Gracias a CONICET que me dio el financiamiento que me permitió vivir de este trabajo. Espero que tener beca no se vuelva un privilegio para cada vez menos personas. Gracias también a la Fundación Fulbright y a la Fundación Bunge-Born por la posibilidad que me dio de ir a Estados Unidos a trabajar.

Gracias a todas las mujeres que lucharon para que hoy no sea extraño pensar que una mujer pueda estar escribiendo su tesis de doctorado.

Gracias a Jóvenes Científicos Precarizados (JCP) que lucharon para que tenga muchos de los derechos laborales que tuve durante estos 5 años como becaria. Gracias también por defender mi futuro y gracias por dejarme ahora ser parte de ustedes en esta lucha.

Gracias a Cosensores por abrirme la cabeza y mostrar que existen otras preguntas para responder a través de la ciencia. Gracias a Colectivo desde el Pie (o al *bondi* como me gusta decirle) y a La Brecha por mostrarme que el mundo puede ser diferente y dejarme luchar con ustedes por conseguirlo. Gracias a cada una de las hermosas personas que conocí allí por enseñarme todo lo que estoy aprendiendo con y junto a ustedes.

Gracias a Alejandra, porque sin ella seguro no me hubiese doctorado. Gracias por toda la paciencia, por explicar cada uno de los pasos a seguir infinitas veces y gracias por tener tan presente cada uno de nuestros expedientes. Gracias a Eli también por ocuparse de todos los detalles en ambos laboratorios.

Sobretodo gracias a mis directores, Marcelo y Fabio. Gracias por iluminar este camino que recorrimos juntos. Gracias por las charlas en las que pensábamos qué hacer, gracias por las charlas en las que analizábamos qué resultó y gracias por enseñarme en cada una de las etapas. Gracias a ambos por la paciencia que me tuvieron, por entender que mis tiempos son otros, que siendo insegura me gusta estar muy segura de lo que hago (cosa no muy fácil de conseguir), que soy obsesiva y testaruda (menuda combinación). Gracias por entender que me distraigo con las preguntas que surgen en el camino del saber. Gracias a ambos por confiar en mí. Marce gracias por preguntarme qué era lo que necesitaba para ser feliz en este proceso de doctorarse.

Gracias a Lula, que por más que no aparezca en ningún papel fue una gran directora. Gracias por enseñarme casi todo lo que sé de simulaciones. Gracias por aconsejarme en la carrera cuando tenía ganas de empezar hacer ciencia e introducirme en este mundo de la química computacional. Gracias por hacerme un lugar en el GMM y gracias por bancarte mi toc de separar vida de trabajo (¿te acordás de los mails con temas diferentes en el mismo día?). Gracias también por permitirme pasar tiempo con Manu y Juli a quienes quiero muchísimo.

Gracias a Darío. Él no se acuerda, pero cuando empecé la carrera lo tuve a él de docente y, a pesar de volver llorando durante la primer semana por no entender nada de cuántica, me transmitió su pasión por el conocimiento. Años después tuve el placer de compartir tiempo con vos en laboratorio y te quiero agradecer por generar un clima de trabajo ameno, gracias por tu buen humor y tu interés por cómo estamos cada uno de nosotros Gracias también por el tiempo compartido con vos en docencia, donde también me contagiaste tu entusiasmo y espero gracias esas horas compartidas haber aprendido a ser un poco más didáctica. Gracias también por tus consejos a la hora de escribir esta tesis y por tus ganas de ayudarme. Sobretodo gracias por enseñarme que se puede hacer ciencia y ser una muy buena persona.

Gracias a Jon Fukuto. Los resultados del último capítulo de esta tesis los obtuve en su laboratorio y fue una experiencia inigualable. Aprendí que se puede investigar de otra manera, que tengo que escuchar más mi propia voz y sentir mi instinto químico (que descubrí que lo tengo), a no temer a decir lo que pienso, que confundirse no sólo es un resultado sino la parte más importante del proceso. Gracias también por marcarme que la formación no sólo tiene que ver con el conocimiento, sino también por lo social. Gracias por todas las cenas y catas de vino que hicieron de esos meses lejos de casa algo muy ameno.

Hay dos personas que no creo que sepan lo importante que fueron para llegar acá: Sara Bari y Leo Slep. Ellos cada uno a su manera, pero en el mismo momento, me dieron un sacudón que me permitió hacer *click*, que fue de vital importancia para hoy poder estar escribiendo esto. Me sirvió tanto que me cuesta plasmarlo en palabras. Sara, gracias por tus críticas y las charlas posteriores. Realmente fue de

gran importancia tu rol en la comisión de seguimiento. Me hiciste dar cuenta de tantas cosas. Gracias infinitas. Gracias a Leo, todo ese tiempo que te tomaste, que me aconsejaste, que me escuchaste y me contaste tus cosas, hicieron que cambien muchas cosas y sobretodo gracias porque no tenías por qué hacerlo. Ambos hicieron que hoy esté acá de la mejor forma posible. Muchas gracias a ambos.

Ir a trabajar no es siempre tan grato, pero la gente del E1 hizo que todo fuera mejor. No sólo son unas personas increíbles sino de las más graciosas que conocí en mi vida. Lo que me hicieron reír los años que pasé ahí no tiene nombre, tanto me reí que para poder doctorarme tuve que cambiarme de oficina. Gracias por todas las charlas sobre los temas más bizarros del planeta, por bancarme cuando me ponía en modo sargento con el orden y la limpieza y saber leer mis caras que decían que no había que hablarme. Diego Gauto, Estefi, Ari, Dieguito Hunt, Nico, Fran, Yami, Laia, Elias, Ariel, Mauro, Johny, Ithu y Lucas (sin quien nunca hubiese tenido compu con *Amber*).

Gracias a la gente del labo T33, por todas las veces que iba y no sabía ni dónde estaban ni cómo se usaban las cosas. Gracias Seba por la paciencia a la hora de querer usar el electrodo y por siempre simplicar las cosas. Gracias Migue por todo lo que te fui robando a la hora de hacer cada uno de los experimentos. Gracias a Juan y Cari, gracias por la paciencia, por escuchar las cosas que sólo me pasan a mí, por todos los viajes en el 37 y presentarme a los dos solcitos que forman parte de su familia. Gracias a la gente de la oficina del T33 que cuando me mudé me recibieron con la mejor onda.

Gracias a los amigos que me dio el doctorado. De atrás para adelante: Agos, que si bien te sumaste hace poco, sos una divina, siempre con buena onda y con ganas de reirte. Ana y Meli gracias por adoptarme como amiga al segundo de haberme mudado. Hicieron muy fácil mi inserción en la nueva oficina y ahora que se fueron lo que las extraño es inexplicable. Mención especial a Meli que me hizo todos los trámites de la defensa porque yo estaba lejos, que cambiaba la yerba porque a mi no me gustaba, que entendía cuando yo no quería hablar más o me soportaba si estaba poco sociable.

A JP, gracias por todas nuestras terapias que hicieron de las meriendas un espacio de reflexión. A Fer, gracias por todas nuestras charlas científicas donde buscabas entender más que yo todas mis preguntas. A Facto, gracias por ser como mi hermano, gracias por cantar desafinado, por hacerme reír y por hacer de la docencia los viernes por la noche algo que espere con ansias. A “Los viejos amigos de Flor”, quienes me bancaron cuando quise patear el tablero, me escucharon, me consolaron y me aconsejaron. Gracias por su amistad todos estos años. Gracias Ceci por los mensajes de aliento, por ofrecerte a cocinarme o simplemente venir a darme abrazos. Gracias Juan por tu humor necochense que siempre logra sacarme una sonrisa y por ponerte en el rol de jurado malo y ayudarme a dar mejores charlas. A “Las simuladoras”, cada una en su momento y a su manera fueron vitales, allanándome este camino. Gracias por las juntadas, por las charlas, por los consejos, por entenderme y ayudarme. Gracias a Emi, por prestarme a tus papás estos últimos fines de semana. Gracias Leo y Noosh por

ayudarme a aclarar los panoramas. A Charlie, gracias porque aunque estos últimos años estuviste lejos, siempre estuviste: escuchándome, dándome ideas, en cada momento (inolvidable ese día donde te quedaste en mi casa dormido, mientras yo preparaba un seminario de termo estadística). Gracias también por tener tanta pasión y contagiarle un poco a los que te rodeamos. No se si vos dimensionas lo mucho que te quiero, pero sos importantísimo en mi vida. A mis amigas que sin entender qué es lo que hago, por qué iba los fines de semana, me acompañaron, se alegraron de mis avances y me bancaron en mis retrocesos. Gracias a los exactos, desde hace 10 años que nos conocimos nunca nos separamos. Cada uno a su manera me acompañó en el proceso. Los quiero muchísimo. Gracias especiales a Mica y Pau porque cada mensaje que me mandaron cuando estaba encerrada escribieron que se sintieron como los abrazos que tanto necesitaba.

Gracias a todos mis amigos que soportaron mi alejamiento en estos meses de intensa escritura.

Mención especial se merecen Rolo y Uri sin quienes la escritura hubiera sido, no sólo imposible sino muchísimo más aburrida. Gracias por ser mi sostén todos estos meses, por bancar mis cambios de humor (para nada predecibles). Gracias por dejarme ser yo sin miedo a que se harten de mí y por darme toda la contención que necesité. En serio parte de este logro mio es suyo. Son unos amigos de oro.

Gracias a toda mi familia por siempre estar, por alegrarse de mis logros.

Gracias a mis soles, Santi y Bauti, que con su amor y alegría fueron mi distracción cuando yo estaba agotaba.

Gracias a Blo y a Andre, por querer tanto a esta hermana loca y molesta que les tocó.

Gracias a mi papá y a mi mamá. Gracias por creer en mí y estar orgullosos, sin entender qué es lo que hago. Gracias por todos sus esfuerzos que hicieron que yo no tuviera mayores distracciones y me pudiera dedicar a mi desarrollo personal y sobretodo gracias por todo su amor.

Gracias a todos por todo.

Buenos Aires, Argentina

4 de julio de 2017