



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

Tesis de Doctor en Bioquímica

**INTERACCIONES BIOFISICAS DE FABPs DE MAMÍFEROS CON  
MEMBRANAS BIOLÓGICAS.**

**ESTUDIO COMPUTACIONAL DE LOS MECANISMOS INVOLUCRADOS.**

**Fernando Zamarreño**

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2014





**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

Tesis de Doctor en Bioquímica

**INTERACCIONES BIOFISICAS DE FABPs DE MAMÍFEROS CON  
MEMBRANAS BIOLÓGICAS.**

**ESTUDIO COMPUTACIONAL DE LOS MECANISMOS INVOLUCRADOS.**

**Fernando Zamarreño**

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2014

## **PREFACIO**

Esta tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Bioquímica, de la Universidad Nacional del Sur, y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Grupo de Biofísica, dependiente del Departamento de Física, durante el período comprendido entre el 4 de mayo de 2010 y el 17 de octubre de 2014, bajo la dirección del Dr. Prof. Marcelo D. Costabel, Profesor Adjunto del Departamento de Física, en la materia Laboratorio I y la codirección de la Dra. Cecilia B. Bouzat, Profesora adjunta de la cátedra de Farmacología e investigadora Principal del CONICET.

**Fernando Zamarreño**

Bahía Blanca, 17 de octubre de 2014

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

*Secretaría General de Posgrado y Educación Continua*

La presente tesis ha sido aprobada el...../...../..... , mercedo la  
calificación de .....(.....)

## AGRADECIMIENTOS

*“Cuando bebas agua, recuerda la fuente.”*

Antiguo proverbio chino.

Llegado el momento cúlmine, me encuentro con la extraña alegría de tener tanto para agradecer y tan poco espacio para hacerlo. Me he esforzado por no olvidar a nadie. Mis más sinceras disculpas si, sabiéndose merecedor, no se encuentra en estas páginas. En todo caso, agradezco su comprensión...

A mi director, Marcelo, por abrirme las puertas al mundo científico, por dirigir mi trabajo con dedicación y empeño. Por tolerar mis idas y vueltas, por respetar mis formas y convicciones. Por sus valores y conocimientos que comparte sin egoísmo. También por los buenos momentos compartidos, por la buena comida, la buena bebida y las risas hasta las lágrimas. Porque al finalizar esta tesis quizás pierda un director, pero gane a cambio un amigo.

A Cecilia Bouzat, por acceder a codirigir esta tesis de forma desinteresada.

Agradezco a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por las becas doctorales que permitieron el desarrollo de esta tesis. A la Universidad Nacional del Sur, por haberme formado en mis estudios de grado y posgrado. Al Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. Sobre todo a su personal administrativo, que trabajó más allá de sus obligaciones para que esta tesis cumpla a término con todos los requisitos establecidos. Al Departamento de Física por el lugar de trabajo. A la Secretaria de Ciencia y Tecnología de la UNS que financió una estadía en el laboratorio de la Dra. Betina Córscico.

A Betina, por haberme recibido tan amablemente, por haber dirigido mi trabajo y haber puesto su laboratorio y recursos a mi disposición. A Gisela, por haber codirigido y supervisado paso a paso todo mi trabajo en el lugar y por tener la mejor actitud y buen humor. Por su buena disposición aún en momentos difíciles.

A los chicos del laboratorio 10, Flor, Edu, Lu, Vale, Jorge, Marina, Natalia chica, Natalia grande y Lisandro, por mostrarse siempre dispuestos a ayudarme y por compartir su lugar de trabajo y recursos sin el más mínimo egoísmo.

A Apu, Ale y Eze, por haberme abierto las puertas de la casona de calle 64.

A todos, por haberme ayudado a sobrellevar la distancia en un momento muy especial.

A mis compañeros de docencia, Cecilia, Pilar, Fabio, Fernanda, Sole V., Sole L., Silvia, Mariana, Eliana, Romina y un largo etc. Por los buenos momentos compartidos y por tener paciencia a mi escasa memoria. Agradezco especialmente a Cristina, por oficiar de mi madre en el área I de Química. Por los mensajitos de domingo por la noche recordándome el horario del laboratorio del lunes.

A mis compañeros de investigación, Juan y Maju. Por su invaluable ayuda en los aspectos físicos de nuestro trabajo. Por la enorme ayuda con esta tesis, que de otra manera no se hubiera terminado a tiempo. Por los buenos momentos compartidos en la oficina y fuera de ella.

A Néstor. Por guiarme en mis primeros pasos con la dinámica molecular. Por compartir sus muchos conocimientos de forma gratuita. Por sus críticas constructivas y la infinidad de bibliografía compartida. Por contagiarme su humor único. Por los buenos momentos acompañados de buenos vinos y buenos platos.

A Fernando Herrera, por compartir sin mezquindad sus profundos conocimientos sobre dinámica molecular y por auxiliarme cuando las moléculas no se movían. Por su sincera amistad y por ser un muy buen guía de turismo.

A Alejandro Giorgetti, por enseñarme todo lo que sé sobre bioinformática, por sus consejos y su buena predisposición.

A mis amigos. A los de la vida, Lucas, Juan, Seba, Gato y Rafa. Por su amistad. Sobre todo a Fede y Adri, porque no sé si son amigos o hermanos. Por ser el refugio de mi infancia y adolescencia. A los del colegio, Ale, Ana, Andre, Gaby, Jor y Lu. Por su amistad y cariño sincero.

A mis amigos de la Universidad. Por compartir los buenos momentos y los brotes de locura que trae aparejados esta carrera. A la Vichy, por su humor y amistad. A Leo, por ser otro hermano. Por haber confiado en mí.

A Aldo y Silvia (porque “suegros” no les gusta), por tratarme (y sospecho que quererme) como a un hijo. Por estar siempre al pie del cañón, sobre todo en momentos difíciles. Por ser tan buenos abuelos. A Memo, Clari y Sole, por tratarme como a un hermano. Por abrirme sus corazones. Por ser unos tíos geniales. A Aldo y Memo por esos asados increíbles.

A mis padres. Por haberme inculcado sus valores y el amor por la lectura. Por enseñarme a ser tolerante. Por quererme sin condiciones y por tenerme paciencia. A mi Madre, por su humor, compañerismo y amor infinito. A mi Padre, por su absoluta carencia de egoísmo.

A Ceci, a quien debo gran parte de mis logros académicos y a quien admiro profundamente. Por su amor y apoyo. Por compartir nuestras vidas y proyectos. Por su sonrisa. Por Agustín, la luz de mis ojos.

A Agustín, por esa luz.

## RESUMEN

Las proteínas que unen ácidos grasos o FABPs (*Fatty Acid Binding Proteins*), componen una familia de proteínas citosólicas ubicuas, de aproximadamente 15 KD de peso molecular, con una estructura terciaria altamente conservada en toda la familia. En todos los casos, la estructura terciaria se compone de láminas beta antiparalelas empaquetadas formando un barril beta elipsoide y dos segmentos alfa-helicoidales cortos que formarían parte de un pequeño portal en uno de los extremos del barril. Es de destacar que, a pesar de la gran similitud de su estructura terciaria, la estructura primaria de FABPs de distintos tejidos no presenta una semejanza comparable.

Las FABPs son capaces de unir ácidos grasos transportándolos desde y hacia las membranas celulares dentro de una cavidad hidrofóbica formada por el barril beta antes mencionado. Sin embargo, experiencias empíricas han evidenciado que existen diferencias en los mecanismos por los cuales desarrollan su labor. Por un lado, un grupo de estas proteínas interactuarían con las membranas celulares colisionando con las mismas para transferir sus ligandos, mientras que otras lo harían por una difusión acuosa del ligando. No obstante, publicaciones recientes proponen que la transferencia por difusión implicaría un contacto directo con la membrana, aunque con una conformación distinta y sin penetración en la bicapa lipídica.

Los distintos mecanismos propuestos para la transferencia de ligandos desde la proteína hacia las membranas han resultado en la división teórica de la familia FABP en los grupos *colisionales* y *difusionales*.

Distintos trabajos experimentales han demostrado que el dominio  $\alpha$ -helicoidal de IFABP (perteneciente al grupo colisional) y LFABP (difusional) desempeña un rol crítico en la determinación del mecanismo de transferencia de los ácidos grasos, aún cuando la composición de las hélices es muy distinta.

Tomando como base estas diferencias estructurales, de unión y de cinética de transferencia del ligando, se ha propuesto que las FABPs colisionales y difusionales tendrían funciones diferentes, tal vez contribuyendo al transporte diferencial y compartimentación de los lípidos.

Si bien los mecanismos propuestos fueron y son intensamente estudiados, no se ha propuesto aún una diferencia estructural de estas proteínas que explique acabadamente la existencia de los mismos.

En la presente tesis, utilizando diferentes técnicas de la biología computacional, se estudiaron distintos aspectos de la interacción de FABP con membrana con el objetivo de describir los distintos mecanismos. Las técnicas utilizadas permitieron el estudio estructural de FABP, la comprobación de la influencia de la energía electrostática en la interacción, la importancia de residuos conservados y la descripción de la dinámica del sistema.

Del estudio estructural de las FABPs de mamíferos, se desprende la existencia de residuos de carga neta distinta de cero, conservados en polos opuestos de las proteínas. Los resultados señalan la conservación del signo de la carga en regiones determinadas para FABPs con igual mecanismo de interacción descripto.

El análisis electrostático determinó que es esta energía la que dirige la interacción. Se confirmó además, que los aminoácidos cargados altamente conservados poseen un rol fundamental en la selección del mecanismo, ya que su mutación por residuos de carga opuesta resulta en una inversión del perfil electrostático.

La dinámica de los mecanismos señala nuevamente a los residuos cargados conservados como los primeros en tomar contacto con la membrana durante la interacción, confirmando nuevamente los resultados de los estudios estructurales.

En suma, los resultados obtenidos permitieron generar un modelo computacional que explica en detalle la existencia de los mecanismos colisional y difusional para FABPs de mamíferos.

## ABSTRACT

Fatty Acid Binding Proteins (FABP) are a huge family of ubiquitous cytosolic proteins of 15 KD of molecular weight, with a highly conserved tertiary structure. In all cases, tertiary structure is composed by antiparallel beta strands that form an elliptic barrel and two alpha helices on one end of the barrel, forming a putative gate. It is a significant fact that, in spite of highly conserved tertiary structure, FABPs from different tissues have no primary structure similarity.

FABPs are able to bind fatty acids and to carry them from and to cellular membranes into a hydrophobic cavity in their beta barrel. Nevertheless, empirical evidence suggests that FABP-membrane interaction takes place through two different mechanisms. On one hand, some FABPs interact with membrane by a collisional mechanism, while other group interacts by aqueous diffusion of ligand. However, recent bibliography suggests that diffusional mechanism also implies a direct contact with the membrane but without penetration of lipid bilayer.

Proposed mechanisms have resulted in theoretical segregation of FABPs in collisional or diffusional groups.

Several empirical researches have shown that despite of being structurally different, alpha helices have a critical role in mechanism selection for both groups.

Considering structural, ligand binding and ligand kinetic transfer differences, it has been proposed that collisional and diffusional FABPs may have different functions, contributing with lipid compartmentalization and lipid differential transport.

Although both mechanisms have been and are still deeply studied, a detailed explanation of the relationship between structural differences and different mechanisms is still missing.

Different computational biology techniques were used in this thesis in order to describe distinct aspects of FABP-membrane interaction. Employed techniques allowed structural analysis of FABP, the study of electrostatic as driving force of FABP-membrane interaction and the description of the system dynamic.

Mammals FABP structural analysis shows that highly conserved charged residues are found in defined regions. Charge sign conservation in defined regions is equal for same mechanism FABPs.

Electrostatics analysis pointed this very energy as driving force for the interaction. The relevance of the highly conserved charged amino acid for mechanism selection was confirmed. Reverse mutation of them caused inversion in the electrostatic interaction landscape.

Molecular Dynamics results pointed to conserved residues as the first residues to contact lipid bilayer, in this way, structural results were confirmed.

In summary, obtained results allowed the generation of a computational model that explains in detail the existence collisional and difusional mechanisms for mammals FABP.

# CONTENIDO

	<i>Pág.</i>
Índice General	1
Índice de Tablas y Figuras	5
Abreviaturas	9
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>11</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>28</b>
<b>1. Bioinformática</b>	<b>29</b>
1.1. Generalidades	30
1.2. Modelado por homología	30
1.2.1. Búsqueda de identidad de secuencias con SSearch	31
1.2.2. Alineamiento y diseño de Hidden Markov con PROMALS	32
1.2.3. Identificación de templates de homólogos con HHsearch	33
1.2.4. Construcción del modelo tridimensional con MODELLER	34
1.2.5. Validación del modelo	38
1.3. Generación de Árboles Filogenéticos	39
<b>2. Estructura de moléculas biológicas</b>	<b>40</b>
2.1. Obtención de estructuras de moléculas biológicas	40
2.1.1. Cristalografía de rayos X	41
2.2.1. Resonancia magnética nuclear	42
2.2. Banco de datos de estructura de proteínas	43
2.3. Archivos <i>.pdb</i>	44
2.3.1. Descripción de archivos <i>.pdb</i>	44
2.3.2. Obtención de archivos <i>.pdb</i>	46
2.4. Mutación <i>in silico</i> de proteínas	46
2.4.1. PyMOL	46
2.5. Obtención de estructuras de membranas biológicas	47
<b>3. Modelos de cargas puntuales</b>	<b>49</b>
3.1. Archivos <i>.pqr</i>	50
3.1.1. Descripción de archivos <i>.pqr</i>	50
3.1.2. Generación de archivos <i>.pqr</i>	50
3.1.2.1. <i>pdb2pqr</i>	50
3.1.2.2. PropKa	50
3.2.1. Modelo de cargas puntuales de membranas biológicas	51
3.2.1.1. Asignación de cargas	51
3.2.1.2. Consideraciones de pH	52
<b>4. Interacciones electrostáticas</b>	<b>52</b>
4.1. Introducción a la electrostática de biomoléculas	52
4.1.1. Electrostática: definición	52
4.1.2. Aplicación en el campo biológico	53
4.2. Resolución del problema electrostático	54
4.2.1. Ecuación de Poisson-Boltsman	54

4.2.2. Métodos resolutivos de la ecuación de Poisson-Boltzman	58
4.2.2.1. Métodos numéricos	58
4.2.2.2. Métodos analíticos	59
4.2.3. APBS	59
4.2.3.1. Funcionamiento	60
4.2.3.2. Parámetros	62
4.2.4. Software esup.f	62
4.2.4.1. Descripción	62
4.2.4.2. Funcionamiento	62
<b>5. Dinámica molecular</b>	63
5.1. Introducción a la Dinámica Molecular	63
5.1.1. Métodos de Mecánica Cuántica	63
5.1.2. Métodos de Mecánica Molecular	64
5.2. Programas de Dinámica Molecular	70
5.3. GROMACS	71
5.3.1. ¿Por qué GROMACS?	71
5.4. <i>Inputs</i> de GROMACS	72
5.4.1. Archivo <i>.gro</i>	72
5.4.2. Archivo <i>.tpr</i>	73
5.4.3. Archivo <i>.mdp</i>	73
<b>RESULTADOS</b>	77
<b><i>Capítulo 1. Estudio filogenético de la familia FABP.</i></b>	78
<b>1. Superfamilia de Proteínas que unen lípidos</b>	79
1.1. Filogénesis de la superfamilia	79
1.2. Alineamiento de la familia FABP	80
1.3. Alineamiento de FABP de mamíferos	81
1.4. Árbol filogenético FABPs de mamíferos	84
1.5. Filogénesis de Hélices $\alpha$ y Barriles $\beta$	85
<b>Conclusiones del capítulo 1</b>	86
<b><i>Capítulo 2. Modelos tridimensionales de FABPs de mamíferos y membranas</i></b>	87
<b>2.1. Modelado por homología</b>	88
2.1.1. Modelos tridimensionales	88
2.1.2. Validación de los modelos	88
<b>2.2. Modelos obtenidos de bases de datos</b>	92
2.2.1. Modelos por difracción de rayos X	92
2.2.2. Modelos por Resonancia Magnética Nuclear	93
<b>2.3. Modelos de membranas</b>	94
2.3.1. Membranas neutras	94
2.3.2. Membranas aniónicas	94
2.3.3. Membranas a distintos pH	94
<b>2.4. Modelos de proteínas mutadas</b>	95
<b>Conclusiones del Capítulo 2</b>	98

<b>Capítulo 3. Estudio de la componente electrostática de proteínas y de la interacción electrostática FABP-Membrana.</b>	99
<b>3.1. Estudio de la electrostática en FABPs de mamíferos</b>	100
3.1.1. Superficie accesible al solvente	100
3.1.2. Isocontorno	102
<b>3.2. Interacción Proteína-Membrana</b>	105
3.2.1. Interacción de FABPs de mamíferos con una membrana aniónica	105
3.2.2. Efecto de la distancia en la interacción. Distancia óptima de interacción.	111
3.2.3. Efecto del pH en la interacción	112
3.2.4. Efecto de la fuerza iónica del medio en la interacción	115
3.2.5. Interacción de FABP Intestinal y Hepática de rata con membranas de distinta carga aniónica	116
3.2.6. Efecto de las mutaciones puntuales de aminoácidos cargados en la interacción FABP-Membrana	124
3.2.7. Breve análisis de las Interacciones de FABPs pertenecientes a otros géneros y/o tejidos	136
<b>Conclusiones del Capítulo 3</b>	137
<b>Capítulo 4. Estudio de la interacción Proteína-Membrana por Dinámica molecular.</b>	138
<b>4.1. Estudio de la interacción de FABP <i>wild type</i> Intestinal y hepática de rata con una membrana aniónica</b>	139
4.1.1. Consistencia de los modelos de las proteínas y membranas	139
4.1.2. Análisis del sistema FABP-Membrana en la interacción	141
4.1.2.1. Análisis energético	142
4.1.2.2. Análisis estructural	144
<b>4.2. Estudio de la interacción de FABP Intestinal y hepática mutadas de rata con una membrana aniónica</b>	149
4.2.1. Consistencia de los modelos de las proteínas mutadas	149
4.2.2. Análisis del sistema FABP-Membrana en la interacción	149
4.2.2.1. Análisis estructural	149
<b>Conclusiones del Capítulo 4</b>	153

<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b>	154
<i>Capítulo 1. La electrostática como driving force en la selección del mecanismo de interacción</i>	155
<i>Capítulo 2. El rol de los aminoácidos cargados altamente conservados en la orientación inicial de la interacción FABP-membrana</i>	158
<i>Capítulo 3. El rol de los aminoácidos cargados altamente conservados en la dinámica del mecanismo de interacción</i>	159
<i>Capítulo 4. ¿Colisional o difusional? ¿Es esa la cuestión?</i>	160
<i>Capítulo 5. Palabras Finales.</i>	161
<b>REFERENCIAS</b>	162
<b>PRODUCCIÓN CIENTÍFICA</b>	167

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla I.	Nomenclatura y origen tisular de las FABPs.	16
Tabla II.	A. Porcentajes de identidad de secuencia entre diferentes FABPs Humanas.	18
	B. Porcentajes de identidad de secuencia entre FABPs de diferentes especies.	18
Tabla III.	Programas de DM.	70
Tabla IV.	Parámetros del archivo <i>.mdp</i> .	73
Tabla V.	FABPs modeladas por homología.	88
Tabla VI.	Estadísticas del Gráfico de Ramachandran de MIB	91
Tabla VII.	Valores de DIFRE para los modelos MIB obtenidos por homología.	92
Tabla VIII.	Resumen de estructuras obtenidas en bases de datos.	93
Tabla IX.	Cargas netas de fosfolípidos de membrana según pH del medio.	94
Tabla X.	Esquema de mutaciones de distintas FABPs.	96
Tabla XI.	Mutaciones en hélice $\alpha$ II de FABPs de mamíferos.	97
Figura 1.	Modelos de IFABP y LFABP de rata.	18
Figura 2.	Modelos de IFABP y LFABP con ligando.	20
Figura 3.	A. Incremento de estructuras publicadas en PDB.	23
	B. Incremento de proteínas publicadas en UniProt.	23
Figura 4.	Diagrama simplificado del proceso de obtención de estructuras por rayos X.	41
Figura 5.	Diagrama simplificado del proceso de obtención de estructuras por RMN.	42
Figura 6.	Captura de pantalla de <i>Protein Data Bank</i> .	44
Figura 7.	Visualización de archivo <i>.pdb</i> .	45
Figura 8.	Captura de pantalla de Pymol.	47
Figura 9.	Red en dos dimensiones análoga a la empleada para resolver la ecuación de PB.	60
Figura 10.	Funcionamiento de ESUP.f.	63
Figura 11.	Contribuciones enlazantes a los campos de fuerza.	66
Figura 12.	Árbol filogenético de la superfamilia iLBP.	79
Figura 13.	Alineamiento de la familia FABP.	80
Figura 14.	Alineamiento de la familia FABP.	81
Figura 15.	Alineamiento de FABPs de mamíferos.	82
Figura 16.	A. IFABP de Rata con aminoácidos cargados altamente conservados.	83
	B. IFABP Humana con aminoácidos cargados altamente conservados.	83
	C. LFABP de Rata con aminoácidos cargados altamente conservados.	83
	D. IFABP de Rata con aminoácidos cargados altamente conservados.	83
Figura 17	Árbol filogenético de FABPs de mamíferos.	84
Figura 18.	Árbol filogenético de barriles $\beta$ de FABPs de mamíferos.	85
Figura 19.	Árbol filogenético de hélices $\alpha$ de FABPs de mamíferos.	86

Figura 20.	A. Resultados Anolea, GRMOS y Qmean para modelo MIB.	89
	B. Error predicho en Å para MIB.	89
	C. Error por residuo para MIB.	89
Figura 21.	A. QMEAN Z-score para MIB.	90
	B. Densidad de QMEANscore para MIB.	90
	C. Valores de componentes de Z-score.	90
Figura 22.	Gráfico de Ramachandran para MIB.	91
Figura 23.	A. Estructura de POPC.	95
	B. Estructura de SOPS.	95
	C. Vista lateral de membrana 50%POPC - 50%SOPS.	95
	D. Vista superior de membrana 50%POPC - 50%SOPS	95
Figura 24.	A. Superficie accesible al solvente de IFABP de rata.	101
	B. Superficie accesible al solvente de LFABP de rata.	101
	C. Superficie accesible al solvente de IFABP mutada de rata.	101
	D. Superficie accesible al solvente de LFABP mutada de rata.	101
Figura 25.	A. Isocontorno de IFABP WT de rata.	103
	B. Isocontorno de IFABP mutada de rata.	103
	C. Isocontorno de LFABP WT de rata.	103
	D. Isocontorno de LFABP Mutada de rata.	103
Figura 26.	A. Isocontorno de 1IFB_K28E.	104
	B. Isocontorno de 1IFB_K50E.	104
	C. Isocontorno de 1IFB_R29E.	104
	D. Isocontorno de 1IFB_K30E.	104
Figura 27.	Perfiles electrostáticos de la interacción de 1IFB y 2JU3 con membrana.	106
Figura 28.	Posiciones de mínima y máxima energía para IFABP y LFABP.	106
Figura 29.	A. Perfiles electrostáticos de la interacción de IFABPs con membrana.	107
	B. Perfiles electrostáticos de la interacción de BFABPs con membrana.	107
Figura 30.	A. Perfiles electrostáticos de la interacción de HFABPs con membrana.	108
	B. Perfiles electrostáticos de la interacción de AFABPs con membrana.	108
Figura 31.	Perfiles electrostáticos de la interacción de LFABPs con membrana.	109
Figura 32.	Perfiles electrostáticos de 10 estructuras de 2JU3 obtenidas por RMN.	110
Figura 33.	Energía electrostática vs distancia.	111
Figura 34.	Energía electrostática vs pH para posiciones de mínima energía.	113
Figura 35.	Energía electrostática vs pH para posiciones de máxima energía.	114
Figura 36.	Energía electrostática vs fuerza iónica del medio.	116
Figura 37.	A. Perfiles electrostáticos de 1IFB vs membranas de distinta concentración aniónica.	118
	B. Perfiles electrostáticos de 2JU3 vs membranas de distinta concentración aniónica.	118

Figura 38.	A. $\Delta E$ para posiciones de mínima y máxima energía de 1IFB vs distintas membranas.	119
	B. $\Delta E$ para posiciones de mínima y máxima energía de 2JU3 vs distintas membranas.	119
Figura 39.	A. $\Delta E$ para posiciones de mínima energía de 1IFB y 2JU3 vs distintas membranas.	120
	B. $\Delta E$ para posiciones de máxima energía de 1IFB y 2JU3 vs distinta membranas.	120
Figura 40.	A. Perfiles electrostáticos de 1KZW vs distintas membranas.	121
	B. Perfiles electrostáticos de 2PY1 vs distintas membranas.	121
	C. Perfiles electrostáticos de MIB vs distintas membranas.	122
	D. Perfiles electrostáticos de MLB vs distintas membranas.	122
	E. Perfiles electrostáticos de MIM vs distintas membranas.	123
	F. Perfiles electrostáticos de MLM vs distintas membranas.	123
Figura 41.	Perfiles energéticos de 1IFB_WT, 1IFB_R29A y 1IFB_R29E.	125
Figura 42.	Perfiles energéticos de 1IFB_WT, 1IFB_K28A y 1IFB_K28E.	126
Figura 43.	Perfiles energéticos de 1IFB_WT, 1IFB_K30A y 1IFB_K30E.	126
Figura 44.	Perfiles energéticos de 1IFB_WT, 1IFB_E44K.	127
Figura 45.	Perfiles energéticos de 2JU3_WT, 2JU3_E26A y 2JU3_E26K.	127
Figura 46.	Perfiles energéticos de 2JU3_WT, 2JU3_D27A y 2JU3_D27K.	128
Figura 47.	Perfiles energéticos de 2JU3_WT, 2JU3_K46A y 2JU3_K46E.	128
Figura 48.	Perfiles energéticos de 2JU3_WT, 2JU3_K47A y 2JU3_K47E.	129
Figura 49.	Perfiles energéticos de 1IFB_WT, 2JU3_WT y 1IFB_R29E_K30E_E44K.	129
Figura 50.	Perfiles energéticos de 1IFB_WT, 2JU3_WT y 2JU3_E26D27K-K46-47E.	130
Figura 51.	Perfiles energéticos de MBR_WT, MBR_R29A y MBR_R29E.	130
Figura 52.	Perfiles energéticos de MAR_WT, MAR_R31A y MBR_R31E.	131
Figura 53.	Perfiles energéticos de MHR_WT, MHR_R29A y MHR_R29E.	131
Figura 54.	Perfiles energéticos de MML_WT, MLM_E26D27A y MLM_E26-D27K.	132
Figura 55.	Perfiles energéticos de MLB_WT, MLB_E26D27A y MBR_E26-D27K.	132
Figura 56.	Perfiles energéticos de 2PY1_WT, 2PY1_E28E29A y MBR_E28-E29K.	133
Figura 57.	Perfiles energéticos de 1IFB con mutaciones en aminoácidos negativos.	134
Figura 58.	Perfiles energéticos de 1IFB con mutaciones en aminoácidos positivos.	134
Figura 59.	Perfiles energéticos de 2JU3 con mutaciones en aminoácidos negativos.	135
Figura 60.	Perfiles energéticos de 2JU3 con mutaciones en aminoácidos positivos.	135
Figura 61.	Perfiles energéticos de 1IFB, 2JU3 y As-p18.	136
Figura 62.	Perfiles energéticos de 1IFB, 2JU3 y 4BVM.	137
Figura 63.	A. DCM de WT 1IFB comparado con 1IFBs mutadas.	140

	B. DCM de WT 2JU3 comparado con 2JU3s mutadas.	140
	C. Energía total de WT 1IFB comparado con 1IFBs mutadas..	140
	D. Energía total de WT 2JU3 comparado con 2JU3s mutadas	140
Figura 64.	Energía total del sistema de membranas utilizadas.	141
Figura 65.	A. Energía total de los sistemas WT 1IFB y MUT 1IFB en diferentes posiciones iniciales vs membrana.	143
	B. Energía total de los sistemas WT 2JU3 y MUT 2JU3 en diferentes posiciones iniciales vs membrana.	143
Figura 66.	A. DCM de WT 1IFB y MUT 1IFB en diferentes posiciones iniciales vs membrana.	144
	B. DCM de WT 2JU3 y MUT 2JU3 en diferentes posiciones iniciales vs membrana.	144
Figura 67.	Imágenes de la DM de la interacción 1IFB WT en posición de mínima energía vs membrana.	145
Figura 68.	Imágenes de la DM de la interacción 1IFB WT en posición de máxima energía vs membrana.	146
Figura 69.	Imágenes de la DM de la interacción 2JU3 WT en posición de mínima energía vs membrana.	147
Figura 70.	Imágenes de la DM de la interacción 2JU3 mutada en posición de máxima energía vs membrana.	148
Figura 71.	Imágenes de la DM de la interacción 1IFB mutada en posición de mínima energía vs membrana.	150
Figura 72.	Imágenes de la DM de la interacción 2JU3 mutada en posición de máxima energía vs membrana.	151
Figura 73.	Imágenes de la DM de la interacción 1IFB mutada en posición de máxima energía vs membrana.	152
Figura 74.	Imágenes de la DM de la interacción 2JU3 mutada en posición de mínima energía vs membrana.	153

## ABREVIATURAS

TG	Triglicéridos
PL	Fosfolípidos
AG	Ácidos Grasos
TBP	Testosterone Binding Protein
EBP	Estrogen Binding Protein
PBP	Progesterone Binding Protein
PM-FABP	<i>Membrane Fatty Acid Binding Protein</i>
FAT/CD36	Trasnlocasas de Ácidos Grasos
FATP	Fatty Acid Transport Proteins
SLBP	Soluble Lipid Binding Proteins
FABP	Fatty Acid Binding Proteins
IFABP	Intestinal Fatty Acid Binding Proteins
LFABP	Liver Fatty Acid Binding Proteins
LbFABP	Liver basic Fatty Acid Binding Proteins
KFABP	Keratinocyte Fatty Acid Binding Proteins
HFABP	Heart Fatty Acid Binding Proteins
AFABP	Adipocyte Fatty Acid Binding Proteins
BFABP	Brain Fatty Acid Binding Proteins
ACBP	<i>Acyl CoA Binding Protein</i>
kD	Kilo Dalton
CRBP	<i>Cellular Retinol Binding Protein</i>
CRABP	<i>Cellular Retinoic Acid Binding Protein</i>
IBABP	<i>Intestinal Bile Acid Binding Protein</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
DM	Dinámica Molecular
MM	Mecánica Molecular O <i>Molecula Mechanics</i>
QM	<i>Quantum Mechanics</i>
PROMALS	<i>PROfile Multiple Alignment with predicted Local Structure</i>
HMM	<i>Hidden Markov Model</i>
CASP	<i>Critical Assessment of protein Structure Prediction</i>
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
FDP	Densidad de Probabilidad
Kcal/mol	Kilocaloría / mol
KJ/mol	Kilojoule/mol
DSSP	<i>Definition of Secondary Structure of Proteins</i>
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
SOPS	1-stearoil-2-oleoil-fosfatidilserina
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina
BMRB	<i>Biological Magnetic Resonance Bank</i>
GROMACS	<i>GRONingen MACHine for Chemical Simulations</i>
APBS	<i>Adaptive Poisson-Boltzmann Solver</i>
FDPB	<i>Finite-Difference Poisson-Boltzmann</i>

<b>MNDO</b>	<i>Modified Neglect of Diatomic Overlap</i>
<b>MINDO</b>	<i>Modified Intermediated Neglect of Differential Overlap</i>
<b>PBC</b>	<i>Periodic Boundary Conditions</i>
<b>AMBER</b>	<i>Assisted Model Building wuth Energy refinement</i>
<b>CHARMM</b>	<i>Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics</i>
<b>MLM</b>	<i>Modeled Liver Mouse</i>
<b>MIM</b>	<i>Modeled Intestinal Mouse</i>
<b>MBR</b>	<i>Modeled Brain Rat</i>
<b>MLB</b>	<i>Modeled Liver Bovine</i>
<b>MBM</b>	<i>Modeled Brain Mouse</i>
<b>MHR</b>	<i>Modeled Heart Rat</i>
<b>MBB</b>	<i>Modeled Brain Bovine</i>
<b>MHM</b>	<i>Modeled Heart Mouse</i>
<b>MAR</b>	<i>Modeled Adipocyte Rat</i>
<b>MAB</b>	<i>Modeled Adipocyte Bovine</i>
<b>WT</b>	<i>Wild Type</i>
<b>LYS ó K</b>	Lisina
<b>GLU ó E</b>	Glutamato
<b>ASP ó D</b>	Aspartato
<b>ALA ó A</b>	Alanina
<b>DCM</b>	Desviación Cuadrática Media

# INTRODUCCIÓN

*“Todas la cosas ya fueron dichas,  
pero como nadie escucha,  
es preciso comenzar de nuevo.”*

André Gide.-

## 1. LÍPIDOS

Con una composición sumamente heterogénea, los lípidos comparten su escasa solubilidad en agua como característica general. Su diversidad estructural permite a estos compuestos hidrofóbicos cumplir con funciones de distinta índole, como la de principal reserva de energía de tejidos animales y vegetales en el caso de los triglicéridos (TG). Los fosfolípidos (PL), en cambio, cumplen un rol estructural en la formación de membranas biológicas al igual que los esteroides que, a su vez, funcionan como cofactores de transcripción, hormonas y agentes emulsionantes en el tracto digestivo (sales biliares). Otros lípidos funcionan como cofactores de enzimas (grupo hemo, porfirinas), aceptores de electrones en cadenas de transporte de electrones (quinonas), pigmentos fotosensibles (clorofilas, xantonas y carotenos), “chaperonas” de proteínas de membrana y segundos mensajeros (derivados de ácidos grasos poli-insaturados y PL). El aislamiento térmico, eléctrico y mecánico de estructuras celulares o subcelulares; la lubricación e impermeabilización de superficies; características de antioxidantes naturales, detergentes, pigmentos, feromonas y hasta un rol fundamental en la flotabilidad de algunos organismos son también funciones de los lípidos.

Estudios recientes muestran que el rol de los lípidos en la fisiología celular es mucho más amplio de lo que se creía. Se ha observado que actúan como moduladores de factores de transcripción de genes relacionados con el metabolismo lipídico. Lisofosfolípidos, esfingolípidos y ácidos grasos (AG) o sus derivados, intervienen en procesos celulares tan diversos como la regulación del metabolismo, la diferenciación, la proliferación, la senescencia y la muerte celular, la inmunomodulación, la angiogénesis y la vasoconstricción entre otros (Duplus *et al.*, 2000; Chawla *et al.*, 2001; Funk *et al.*, 2001; Hla *et al.*, 2001; Merrill *et al.*, 2002; Hannun *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2008; Vallim *et al.*, 2010). Así, los mensajeros lipídicos resultan fundamentales para la correcta coordinación de los procesos celulares, orgánicos y sistémicos. En este contexto y dado que los organismos se componen mayoritariamente de agua, que las reacciones químicas y el transporte de sustratos y productos se desarrollan en medios acuosos, la hidrofobicidad de los lípidos representa un escollo que las células deben salvar para que los lípidos puedan cumplir las diversas funciones anteriormente descritas. Así, las células han desarrollado en

su extenso camino evolutivo, un conjunto de proteínas con capacidad de unir lípidos, reconocerlos, transportarlos y modificarlos.

## 2. PROTEÍNAS QUE UNEN LÍPIDOS (LBP)

### 2.1. Generalidades

Distintos órganos y tejidos de los vertebrados presentan rutas metabólicas que requieren un importante transporte de lípidos, especialmente AG. Son las proteínas transportadoras de lípidos las que cumplen la función de trasportarlos desde los tejidos en los que son sintetizados y/o modificados y desde el intestino de donde son absorbidos hasta los tejidos que los requieren.

El transporte extracelular se desarrolla por el torrente sanguíneo y se encuentra a cargo de proteínas que unen lípidos extracelulares. La albúmina, por ejemplo, transporta los AG no esterificados, drogas y otros lípidos (Glatz *et al.*, 1996; Zunszain *et al.*, 2003; Cupp *et al.*, 2004; Black *et al.*, 2008) por el plasma sanguíneo y los fluidos intersticiales de mamíferos

Asimismo, una gran variedad de proteínas específicas que unen hormonas lipídicas como la proteína que une testosterona (*Testosterone Binding Protein*, TBP), la proteína que une estrógeno (*Estrogen Binding Portein*, EBP) o la proteína que une progesterona (*Progesterone Binding Protein*, PBP) se encuentran también presentes en este fluido.

El transporte de triacilglicéridos y ésteres de colesterol se lleva a cabo bajo la forma de estructuras especializadas formadas por un centro de triacilglicerol, ésteres de colesterol recubiertos de PL y colesterol libre denominadas lipoproteínas. Cada partícula lipoproteica está asociada con una o más moléculas proteicas, las apolipoproteínas que se encuentran en su superficie.

Una vez que estos transportadores de lípidos alcanzan el tejido blanco, los lípidos deben ingresar a las células que los componen. Si bien se creía que la entrada de los AG de cadena larga a las células eucariotas se producía exclusivamente por difusión simple a través de la membrana plasmática, existe en la actualidad amplia evidencia que demuestra la presencia de un mecanismo saturable de incorporación de AG de cadena larga en distintos tejidos,

que coexistiría con la difusión simple (Stahl *et al.*, 2001). De lo que se deduce la existencia de proteínas de membrana que unen lípidos.

Se han caracterizado al menos tres grupos de proteínas receptoras y transportadoras de AG existentes en membranas: Las proteínas que unen AG de membrana plasmática (*Plasmatic Membrane Fatty Acid Binding Protein*, PM-FABP) (Stremmel *et al.*, 1985), las translocasas de AG (FAT/CD36) (Abumrad *et al.*, 1981) y las proteínas transportadoras de AG (FATP, *Fatty Acid Transport Proteins*) (Schaffer *et al.*, 1994). Sin embargo, éste último grupo ha sido recientemente asociado a estructuras microsomales y no sólo a membrana plasmática, aunque son capaces de trastocar a membrana bajo ciertos estímulos (Stahl *et al.*, 2002; Gimeno *et al.*, 2003).

Por último, un grupo de proteínas tiene la tarea de transportar los lípidos en el citosol. Dado que las proteínas protagonistas de esta tesis forman parte de este grupo, se les dedicará un párrafo aparte.

## **2.2. Proteínas citosólicas que unen ácidos grasos**

Como se dijo antes, la naturaleza hidrofóbica de los lípidos implica la presencia de un conjunto de proteínas solubles que los unan y faciliten su movilización entre distintos compartimientos subcelulares, rutas metabólicas o el sitio de almacenamiento (gotas de lípidos) en un entorno acuoso como el citoplasma. Las proteínas solubles que unen lípidos (*Soluble Lipid Binding Proteins*, SLBP) intracelulares desempeñan dichas labores haciendo posibles procesos metabólicos en los sistemas biológicos que de otra manera serían inviables. Ejemplos de SLBP son las proteínas que unen AG (*Fatty Acid Binding Protein*, FABP) (Storch *et al.*, 2008) y las proteínas que unen acilos-CoA (*Acyl CoA Binding Protein*, ACBP) (Kragelund *et al.*, 1999), Dentro del conjunto de familias de SLBP se han incluido recientemente proteínas de origen helmíntico, algunas pertenecientes a familias ya conocidas, como las FABP, pero con motivos estructurales exclusivos.

Entre las SLPB más reconocidas y estudiadas, se encuentran las FABP. Las FABP son miembros de una gran familia multigénica que expresan proteínas citosólicas pequeñas (14-15 kD) con capacidad de unión a AG intracelulares (Vogel Hertzell *et al.*, 2000). Desde que Ockner y colaboradores las descubrieran en 1972 hasta la actualidad, se han sumado

numerosos representantes de esta familia pertenecientes a distintos grupos del reino animal.

Otras proteínas transportadoras de lípidos, como las proteínas que unen retinol (*Cellular Retinol Binding Protein*, CRBP) y ácido retinoico (*Cellular Retinoic Acid Binding Protein*, CRABP) están estrechamente relacionadas con las FABP a través de una estructura terciaria notablemente similar. Esta elevada conservación de la estructura terciaria entre los miembros de ésta familia, aún con identidades de secuencia que llegan tan solo al 20% en algunos casos, es una de las características más llamativas de estas proteínas.

### **2.2.1. FABP: Evolución y especificidad de tejido**

Los genes caracterizados de las FABPs presentan una estructura muy similar, consistente en cuatro exones con tres intrones intercalados con variación de longitud, pero similar posición en la secuencia (Glatz *et al.*, 1996). Tal similitud sugiere la existencia de un gen ancestral común, el cual, mediante el proceso denominado duplicación génica, habría dado origen a todas las secuencias de esta familia proteica (Hauerland *et al.*, 2004).

Hace alrededor de 1.200-1.000 millones de años atrás, el reino animal se escindió de los de plantas y hongos, generando la aparición de distintos genes y, con ellos, de nuevas proteínas. Entre ellas, una proteína capaz de unir una gran variedad de ligandos hidrofóbicos. A partir de este hipotético gen ancestral, las FABPs se habrían diversificado y especializado con respecto a su afinidad a ligando, dando lugar a los distintos tipos de FABPs que conocemos hoy día (Schaap *et al.*, 2002).

La especificidad de ligando y el hecho de que las FABPs purificadas parecían ser exclusivas del tejido del cual se las obtenía por vez primera, sugirió a los investigadores que se trataba de proteínas tejido-específicas. Es por ello que la primera denominación que recibieron incluye el nombre del tejido del cual fueron purificadas originalmente.

Actualmente, se conoce que un tejido determinado puede expresar varios homólogos de la proteína, con la particularidad de hacerlo en mayor proporción para alguno de ellos, lo que explica la confusión original (Storch *et al.*, 2010) (**Tabla I**).

Tejido donde se purificó originalmente	Nombre Original	Nombre actual	Tejidos en los que se conoce su expresión
Hígado	LFABP	FABP1	Hígado, intestino, riñón, pulmón y páncreas
	LbFABP	FABP10	Hígado (peces y aves)
Intestino delgado	IFABP	FABP2	Intestino, hígado
	IBABP ó ILBP	FABP6	Intestino, ovario
Corazón	HFABP	FABP3	Músculo esquelético, corazón, cerebro, riñón, pulmón, glándulas adrenales, mamas, gónadas y estómago
Tejido adiposo	AFABP ó aP2	FABP4	Tejido adiposo, macrófagos, piel y placenta
Piel	EFABP ó KFABP	FABP5	Piel, tejido adiposo, pulmón, cerebro, corazón, músculo esquelético, retina, intestino, testículos, y riñón
Cerebro	BFABP	FABP7	Cerebro, células de la glia y retina
Células de la vaina de Mielina	MFABP	FABP8	Cerebro y células de Schwann, bulbo olfativo, medula espinal.
Testículo	TFABP	FABP9	Testículo, glándula salival y mamas

**Tabla 1.** Se muestran los nombres de FABP recibidos según el tejido donde se la purificó por primera vez juntamente con la nomenclatura actual y los tejidos de donde se han purificado a los distintos homólogos. Salvo que se aclare lo contrario, los tejidos pertenecen a mamíferos. Adaptado de Hauerland et al., 2004, Chmurzyńska 2006, Storch et al., 2008 y Storch et al., 2010.

### 2.2.2. Estructura y especificidad de ligando

Las características estructurales de las FABPs son complejas. Si bien el nivel de identidad de secuencia de la estructura primaria es moderado (20% - 70%) (Banaszak et al., 1994), su estructura terciaria se encuentra altamente conservada. Compuesta por 10 cadenas antiparalelas (A en extremo N-terminal hasta J en C-terminal) y dos  $\alpha$ -hélices cortas que se ubican entre A y B (denominadas  $\alpha$  I y  $\alpha$  II) posee una forma de “barril con tapa” que es característica de toda la familia (**Figura 1**)

El llamado “barril” se encuentra formado por las 10 cadenas que se agrupan en dos hojas  $\beta$  de 5 cadenas cada una, opuestas en forma perpendicular. La unión entre las cadenas  $\alpha$  I y  $\alpha$  II es el motivo hélice-giro-hélice; el resto de las cadenas presentan giros entre sí.

Todos estos elementos de estructura secundaria se pliegan en una estructura de un solo dominio con un radio de giro de aproximadamente 14 Å (Banaszak *et al.*, 1994).

Por otro lado, los ortólogos de vertebrados presentan una identidad de secuencia notablemente elevada de alrededor del 90%, mientras que los homólogos de la misma especie de vertebrado presentan cifras que van desde alrededor del 20% hasta cerca del 70% (Santomé *et al.*, 1998)(Tabla II).

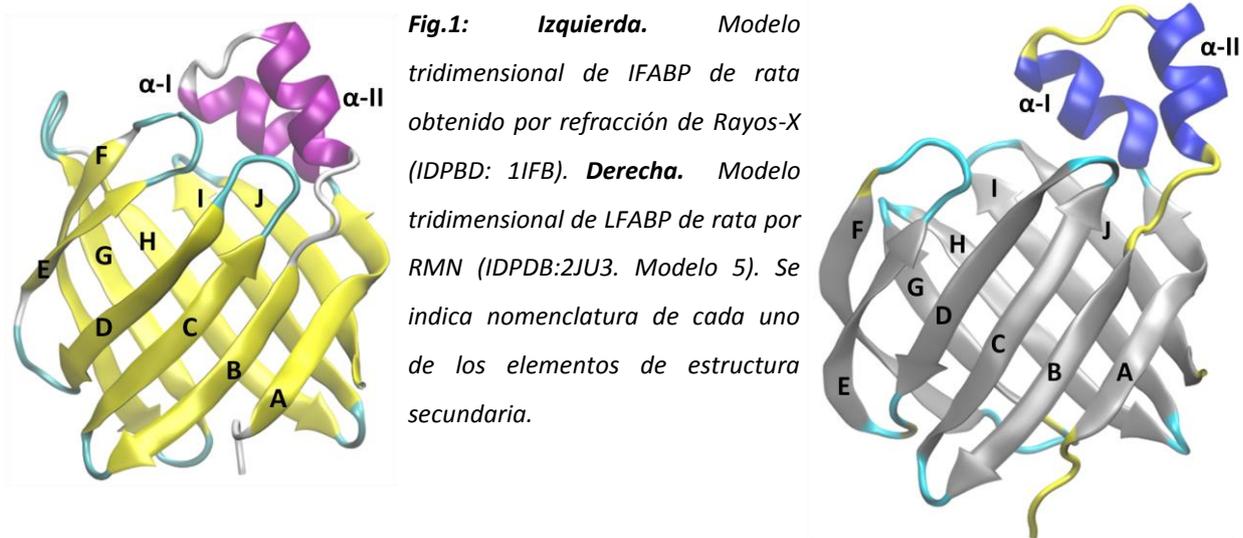
Esta segregación de las proteínas de acuerdo al tejido en el que presentan una alta expresión es acompañada por su especificidad de ligando. Si se analiza la evolución de secuencias de FABPs de vertebrados, se observa una filogénesis separada en cuatro grupos o *clusters* (Schaap *et al.*, 2002). Por un lado se encuentran IBABP, LFABP y LbFABP, con capacidad de ligar AG de cadena larga, sales biliares, colesterol y grupo hemo. En segundo lugar, con capacidad de unir derivados de la vitamina A (retinol, ácido retinóico, etc.), se encuentran las CRBP/CRABP. HFABP, AFABP, BFABP, KFABP, etc.; con sus ligandos AG de cadena larga, retinoides y eicosanoides se encuentran formando el tercer grupo. El último grupo, en cambio, contiene solo a IFABP, que presenta una elevada afinidad por su ligando, los AG de cadena larga.

La ubicación de los ligandos en estas proteínas se encuentra sin excepción dentro del denominado “barril  $\beta$ ” donde existe un gran número de residuos hidrofílicos que conforman una intrincada red de puentes salinos y puentes de hidrógeno. Desplazado del centro proteico, existe también un pequeño núcleo hidrofóbico con poca conservación de secuencia pero alta conservación de residuos hidrofóbicos.

Con esta estructura, el acceso del ligando a la cavidad no es fácil de explicar, puesto que si bien existen poros por donde se puede dar un intercambio de molécula de agua, ninguno parece lo suficientemente grande como para dejar pasar un ácido graso (Banaszak *et al.*, 1994). Sin embargo, se hipotetiza que un cambio conformacional permitiría el acceso de ligandos a la cavidad que los contiene. Aunque la naturaleza del cambio conformacional es aún desconocida, la hipótesis de un “portal” (Hodsdon *et al.*, 1997) que sugiere el ingreso del ligando a través de un área dinámica, constituida por la hélice  $\alpha$ II y residuos de los giros entre las cadenas  $\beta$ C y  $\beta$ D, y las cadenas  $\beta$ E y  $\beta$ F (Sacchettini *et al.*, 1989; Friedman *et al.*, 2006) es ampliamente aceptada. Estudios cristalográficos y de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) sustentan esta hipótesis, ya que determinaron que la forma apo de la

proteína IFABP se encuentra más abierta al solvente al tiempo que presenta una región discreta de desorden; la región C-terminal de  $\alpha$  hélice II y el giro entre las cadenas C-D (Scapin *et al.*, 1992; Sacchettini *et al.*, 1992; Hodsdon *et al.*, 1997).

En contraposición, estudios *in silico* por Dinámica Molecular proponen puntos de entrada a través de distintas regiones para distintas FABP, incluso por fuera de la región portal (Friedman *et al.*, 2005).



**Tabla II A.** Porcentajes de identidad de secuencia entre diferentes FABPs Humanas. Adaptado de Chmurzyńska, 2006.

	LFABP	IFABP	HFABP	AFABP	EFABP	IIFABP
IFABP	23.6					
HFABP	18.9	31.8				
AFABP	18.9	31.8	64.4			
EFABP	18.1	25.0	48.9	52.3		
IIFABP	36.2	27.3	21.1	27.3	20.3	
BFABP	27.6	66.7	66.7	56.8	44.7	18.0

**Tabla II B.** Porcentajes de identidad de secuencia entre HFABPs de diferentes especies. Resultados propios.

	<i>H. sapiens</i>	<i>B. taurus</i>	<i>M. musculus</i>	<i>R. norvegicus</i>
<i>H. sapiens</i>	100	93.4	92.6	93.4
<i>B. taurus</i>		100	90.4	88.2
<i>M. musculus</i>			100	96.3
<i>R. norvegicus</i>				100

### 2.2.3. IFABP y LFABP

LFABP (*Liver Fatty Acid Binding Protein*) puede ligar AG con muy alta afinidad, grupo hemo, bilirrubina, lisofosfolípidos, sales biliares, acil-CoA y prostaglandinas entre otros (Thompson *et al.*, 1999). IFABP (*Intestinal Fatty Acid Binding Protein*) en cambio, solo es capaz de unir AG. Considerando exclusivamente los AG, LFABP presenta una estequiometría que le es única en la familia ya que es capaz de unir dos de estos lípidos al mismo tiempo mientras que IFABP sólo puede unir uno. Además, la orientación en la que los AG se unen a estas dos proteínas es también diferente (**Figura 2**). Asimismo, IFABP de rata presenta una afinidad a AG inversamente proporcional al número de insaturaciones del ligando. LFABP, por otra parte, mostró una gran afinidad tanto por los AG saturados como por los insaturados. El segundo sitio de unión descrito para LFABP mostró también altas afinidades por los distintos ligandos probados, siendo equivalentes en el caso de los AG saturados pero 10 veces más débiles que el primer sitio para el caso de los AG insaturados (Richieri *et al.*, 1994).

Además LFABP presenta una región más laxa en el barril por la falta de la malla de puentes de hidrógeno que se forman entre  $\beta F$  y  $\beta G$ . En comparación con el resto de los miembros de la familia el giro- $\beta$  entre  $\beta G$  y  $\beta H$  tiene dos residuos menos. Así, sólo LFABP presenta una segunda hendidura en el barril- $\beta$  además de la existente entre  $\beta D$  y  $\beta E$  (Thompson *et al.*, 1999). Esta particularidad resulta en que la cavidad hidrofóbica de LFABP sea la mayor de la familia con un volumen aproximado de  $610 \text{ \AA}^3$ . La cavidad de IFABP, por otra parte, es mucho menor presentando un volumen aproximado de  $353 \text{ \AA}^3$ . Estas diferencias en el volumen de la cavidad pueden ser las responsables de las diferencias en el tipo y cantidad de ligandos que unen I y LFABP.

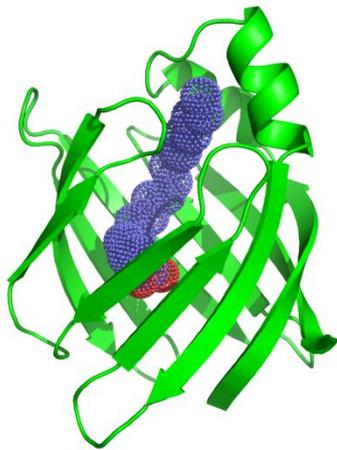
A pesar de presentar un bajo nivel de homología de secuencia, correspondiente con un 24% (Banaszak *et al.*, 1994), las estructuras terciarias son casi superponibles. Sin embargo, a las diferencias descritas en el barril, se le suma la presencia en IFABP de una hélice anfipática en el segmento  $\alpha II$ .

Por otro lado, se ha propuesto que distintas FABPs poseen diferentes mecanismos para unir su ligando. Mientras que IFABP y otras parecen tomar contacto directo con la membrana a través de sus hélices  $\alpha$  en un proceso denominado "colisional", LFABP lo haría por medio de la difusión acua del ligando, en un proceso denominado "difusional".

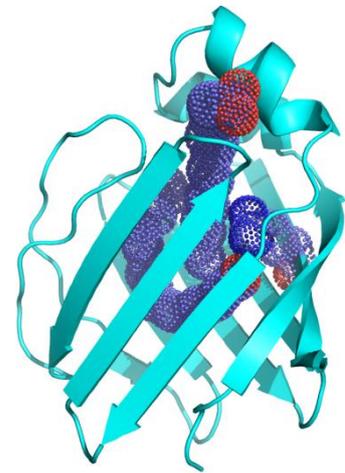
Actualmente se encuentra en discusión si el segundo proceso prescinde o no contacto directo con la membrana (Davies *et al.*, 2002; Villareal *et al.*, 2008; Zamarreño *et al.*, 2012).

Conociendo que LFABP e IFABP captan sus ligandos por mecanismos distintos, y que presentan diferencias estructurales, surge una pregunta obvia: ¿Serán estas diferencias las responsables de la existencia de distintos mecanismos de interacción con la membrana lipídica en el proceso de unión al ligando?

Se ha establecido ya que la hélice  $\alpha_{II}$  es fundamental para la interacción IFABP-membrana (Franchini *et al.*, 2008). Sin embargo, conociendo la existencia de diferencias en el barril  $\beta$ , cabe preguntarse si el segmento helicoidal de la proteína es el único responsable de los mecanismos de interacción elegidos por las distintas FABPs. Dilucidar esas incógnitas es uno de los principales objetivos de esta tesis.



**Fig.2:** *Izquierda.* Modelo de IFABP de rata conjugado con ácido oleico. Obtenido por refracción de Rayos-X (IDPBD: 1ICN). *Derecha.* Modelo de LFABP conjugado con 2 ácidos oleicos (IDPBD: 1LFO). Nótese la diferente orientación de los ligandos y la diferente relación de número de ligandos/proteínas.



### 3. MÉTODOS COMPUTACIONALES EN EL ESTUDIO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

#### 3.1. Generalidades

En física molecular, todos los fenómenos son considerados como el resultado de interacciones entre partículas. En esta línea de pensamiento se puede establecer uno de los nuevos paradigmas para el estudio de sistemas biológicos, en el que sus componentes no son considerados como cuerpos aislados, sino formando redes de interacción complejas;

donde las numerosas biomoléculas que los conforman realizan un trabajo coordinado y desarrollan funciones celulares específicas.

Uno de los primeros objetos estudiados desde este punto de vista son las interacciones entre proteínas, proteínas-ligandos o proteínas-membranas. Descifrar el interactoma (el conjunto de todas las interacciones posibles para un determinado conjunto de moléculas) es una tarea extremadamente ardua. No obstante, resulta de sumo interés e importancia analizar diferentes etapas de esta red compleja de manera de coordinar las mismas y determinar su efecto en el conjunto completo.

Las técnicas computacionales son en la actualidad una herramienta de gran utilidad para encarar estos problemas, complementando la parte experimental y como punto de inicio donde el experimento resulta dificultoso.

Las técnicas computacionales proveen un camino para explorar patrones estructurales, dinámicos o termodinámicos de manera sistemática; para testear o desarrollar hipótesis; para interpretar o guiar datos experimentales y para conocer de manera más acabada la relación estructura/función de las moléculas bajo estudio.

Debido a que la resolución de los cálculos matemáticos que plantean los sistemas biológicos estudiados desde la física se realizan en computadoras, y a que el principal componente de los semiconductores de los mismos es el sílice, estos métodos de estudio de la biología se han denominado *in silico*, emulando a sus contrapartes *in vivo*, para el estudio en organismos vivos e *in vitro*, para el estudio de fenómenos biológicos en laboratorio por fuera de organismos vivos.

A continuación se describen brevemente los fundamentos de las técnicas computacionales utilizadas en la presente tesis.

## **3.2. Técnicas de estudio *in silico***

### **3.2.1. Bioinformática**

El estudio de genomas y estructura de proteínas tiene su origen a mediados del siglo pasado, sin embargo, no fue hasta éste siglo que se generó una masa de información tan grande que su solo manejo planteó un problema en sí mismo (**Figura 3 A yB**).

Conjuntamente con el incremento de información disponible, la informática mejoró sustancialmente la velocidad de cálculo y la capacidad de manejo de grandes cantidades de

datos. Estos avances en las ciencias de la computación permitieron el desarrollo de herramientas de análisis que revolucionaron el campo de la biología y dieron a luz a una nueva ciencia interdisciplinaria, la *bioinformática*.

El *Oxford English Dictionary* define: “*la bioinformática es la conceptualización de la biología en términos de moléculas (en el sentido de la físico-química) y la aplicación de "Técnicas informáticas" (derivados de disciplinas como las matemáticas aplicadas, la informática y la estadística) para comprender y organizar la información asociada con estas moléculas, a gran escala. En resumen, la bioinformática es un sistema de información de gestión para la biología molecular y tiene muchas aplicaciones prácticas.*”

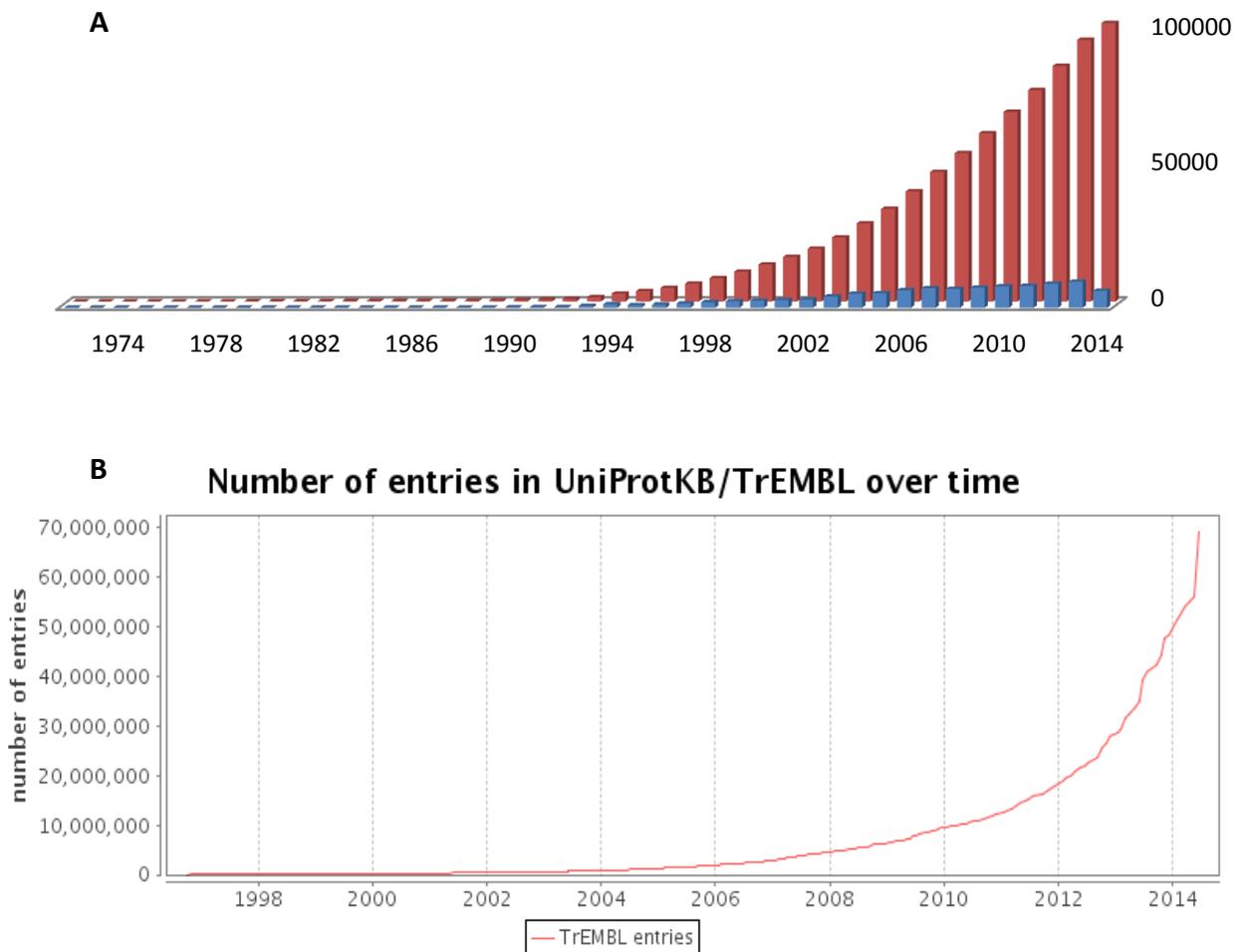
En otras palabras, la Bioinformática es una disciplina científica que combina biología, computación y tecnologías de la información con el objetivo de facilitar nuevas percepciones biológicas y crear una perspectiva global que permita identificar los principios unificadores de la biología. Inicialmente, se ocupaba sobre todo de la creación de bases de datos de información biológica, especialmente secuencias, y del desarrollo de herramientas para la utilización y análisis de los datos contenidos en esas bases de datos. Eventualmente será imprescindible unificar toda esta información si se desea visualizar el cuadro completo de la biología de la célula. Por eso, la Bioinformática ha evolucionado para ocuparse cada vez con mayor profundidad del análisis e interpretación de los distintos tipos de datos (secuencias de genomas, proteomas, orfeomas, dominios y estructuras de proteínas, etc).

Las principales áreas de la Bioinformática se relacionan con, **1)** el desarrollo de herramientas que permitan el acceso, uso y actualización de distintos tipos de información biológica y **2)** el desarrollo de nuevos algoritmos y soluciones estadísticas para analizar grandes conjuntos de datos y resolver problemas biológicos complejos, tales como predecir la estructura de un gen en una secuencia genómica, determinar la estructura de proteínas, identificar familias de proteínas por su similitud de secuencia, etc.

La predicción de las estructuras de proteínas a través de su similitud de secuencia se denomina modelado por homología y se trata de la determinación de la estructura tridimensional a partir del conocimiento de su secuencia aminoacídica. Este método se basa en el hecho de que diferentes proteínas que derivan de un ancestro común tienen estructuras terciarias similares. En otras palabras, se basa en la observación que la estructura terciaria de las proteínas se conserva mejor durante la evolución que la

estructura primaria, según se ha visto en proteínas de estructura terciaria conocida por métodos experimentales.

De esta manera, la estructura de una proteína de interés (blanco) puede ser modelada a partir de los datos estructurales de otra proteína evolutivamente correlacionada de proteína conocida.



**Fig.3: A.** Incremento de estructuras publicadas en Protein Data Bank. En azul, publicaciones anuales. En rojo, número de publicaciones acumuladas. Fuente: Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>). **B.** Incremento de proteínas publicadas en UniProt desde su inicio hasta la actualidad. Fuente: UniProt (<http://www.uniprot.org/statistics/TrEMBL>)

### 3.2.2. Análisis electrostático

En las últimas dos décadas ha habido un interés renovado por la Electrostática en la biología (Honig *et al.*, 1995, Uhdman *et al.*, 1999, Juffer *et al.*, 1991) debido básicamente a tres factores:

1- El importante rol que juegan dichas interacciones en la caracterización de las propiedades estructurales y funcionales de las macromoléculas.

2- Los avances en la resolución numérica de las ecuaciones básicas que gobiernan estos fenómenos.

3- El incremento del poder de cálculo que hizo factible crear herramientas computacionales que implementen los algoritmos numéricos en tiempos de cálculo razonables.

La relevancia de estas interacciones es particularmente notable para las moléculas con carga neta no nula, como es el caso del ADN, proteínas y otros polielectrolitos.

Asimismo, en el caso de las proteínas han sido reconocidos efectos funcionales de importancia producidos por los dipolos correlacionados de las hélices alfa. La interacción electrostática entre partículas coloidales y macromoléculas a menudo desempeña un rol crucial en la estabilidad de estos sistemas (Neves-Petersen *et al.*, 2003).

En problemas que involucran la presencia de una membrana biológica también ocurre este fenómeno. Muchas de las propiedades estructurales de las membranas (rigidez, estabilidad, transición lateral de fase y dinámica) dependen sustancialmente de las interacciones electrostáticas (Andelman, 1995; Verwey y Overbeek, 1948; Israelachvili, 1992).

Por otra parte, la relación de tamaño entre la proteína en estudio y la membrana celular, ocasiona que la bicapa lipídica actúe como un plano al que la proteína se enfrenta, conformando un sistema ideal para el estudio de interacciones electrostáticas.

En la presente tesis, se utiliza el análisis electrostático como enfoque inicial de la interacción entre las FABPs y membranas lipídicas.

### 3.2.3. Dinámica molecular

A principios del Siglo XIX, Boltzmann teorizó que la materia está constituida de partículas en movimiento e interacción. Más tarde, en 1963, Richard Feynman expresó que "*...todas las cosas están hechas de átomos, y ... todo lo que las cosas vivas hacen puede ser comprendido en términos de agitaciones y movimientos de los átomos.*" (*Lectures on Physics, Vol I*)

No fue hasta 1977 que la primera simulación por Dinámica Molecular (DM) de un modelo atómico detallado de una proteína fue reportada (McCammon *et al.*, 1977). Desde entonces la aplicación de distintos enfoques teóricos y computacionales ha contribuido significativamente al entendimiento de sistemas biomoleculares complejos tales como proteínas, ácidos nucleídos y bicapas lipídicas. Al proveer datos pormenorizados del comportamiento dinámico de distintos sistemas biomoleculares, la DM aporta información que ayuda a comprender la relación estructura-función de biomacromoléculas. Por esta razón, hoy día se la considera un componente esencial de la investigación en biología moderna, bioquímica y biofísica.

La DM es una herramienta poderosa en la biología computacional que nos permite entender la dinámica de sistemas complejos a escalas donde la trayectoria del movimiento atómico puede ser rastreada, ya que considera a los materiales y las moléculas no como entidades rígidas, sino como cuerpos animados.

Originalmente fue concebida dentro de la física teórica, aunque hoy en día se le utiliza sobre todo en biofísica y ciencia de materiales. Su campo de aplicación va desde superficies catalíticas hasta sistemas biológicos. Aunque sobra aclararlo, la DM pertenece a un campo netamente interdisciplinario. Sus leyes y teorías provienen de las Matemáticas, Física y Química. Emplea algoritmos de las Ciencias de la Computación y Teoría de la información. Por si esto fuera poco, se aplica para entender problemas químicos y bioquímicos.

Como los sistemas biológicos consisten en un gran número de partículas, resultaría imposible analizar sus propiedades de forma analítica. Es por ello que la DM utiliza métodos numéricos. Esta técnica presenta un compromiso entre costo computacional y fiabilidad en los resultados, ya que utiliza las Ecuaciones de Newton, que son menos costosas que las de la mecánica cuántica. Es, por lo tanto, un modelo de Mecánica Molecular (MM, *Molecular Mechanics*)

Por ello, los fenómenos como la formación o ruptura de enlaces no puedan ser estudiados mediante este método ya que no contempla estados excitados o reactividad. Una catálisis enzimática, por ejemplo, no podría ser representada en su totalidad por DM.

Los métodos de Mecánica Cuántica (QM, *Quantum Mechanics*) en cambio, permiten estudiar los orbitales moleculares y, por lo tanto, el desarrollo de reacciones químicas.

En un intento por optimizar recursos de cálculo, se desarrollaron los métodos híbridos QM/MM, en los que un centro reactivo es tratado de modo cuántico mientras que el ambiente que lo rodea se trata de modo clásico. El desafío en este tipo de métodos resulta en la definición de manera precisa de la interacción entre las dos formas de describir el sistema. Estos dos últimos métodos se describen brevemente en Materiales y Métodos aunque no se utilizaron para el desarrollo de la presente tesis.

Para concluir, se desea aclarar que, si bien las técnicas utilizadas en el presente trabajo pertenecen en su origen al campo de la física y la matemática, se han restringido los parámetros de todos los sistemas analizados de manera que simulen un entorno con características sino *in vivo*, al menos *in vitro*. Se pretendió de esta manera, emular la interacción proteína-membrana en un entorno cuyas características se encuentren en las proximidades de lo que se espera para un sistema biológico.

**OBJETIVO GENERAL:**

- Estudiar y determinar, mediante la utilización de métodos computacionales, los mecanismos que dirigen la interacción de FABP de distintos tejidos de mamíferos con membranas celulares.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Analizar si la componente electrostática dirige la interacción FABP-membrana.
- Determinar la elección del mecanismo de transferencia del ligando de distintas FABPs en relación a la componente electrostática.
- Determinar la posible existencia de patrones estructurales comunes en las proteínas que comparten un mismo mecanismo.
- Formular un marco teórico que explique la existencia de los mecanismos de interacción a través de la existencia de patrones estructurales.
- Determinar la influencia de patrones estructurales en la dinámica de los distintos mecanismos de interacción.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

# 1. BIOINFORMÁTICA

## 1.1. Generalidades

El plegamiento o, en inglés, *folding* de una proteína se encuentra determinado por su secuencia primaria y, por lo tanto, la mutación de un solo aminoácido podría afectar su estructura secundaria y terciaria.

Por otro lado, observando el perfil energético del plegamiento de proteínas, se puede ver que la estabilidad de la estructura de proteínas funcionales depende sólo de un reducido número de puentes hidrógeno. Esto sugiere que el perfil energético del plegamiento de proteínas puede ser fácilmente alterado por una mutación puntual, dando como resultado una proteína sin plegamiento o con un plegamiento incorrecto respecto a la proteína original.

Sin embargo, las proteínas funcionales de la actualidad descienden de ancestros funcionales, de lo que se puede deducir que la evolución produjo mutaciones que mantuvieron la relación estructura-función. En consecuencia, se deduce que las proteínas actuales sólo contienen mutaciones que no alteraron significativamente el perfil energético de su plegamiento con respecto al de sus ancestros evolutivos.

Considerando lo anterior, se concluye que las proteínas relacionadas evolutivamente, divergen de un ancestro común por acumulación de pequeños cambios que causan reordenamientos locales y, por lo tanto, deben tener estructuras similares.

Si la distancia evolutiva es grande, la acumulación de cambios puede afectar la estructura de la proteína generando distorsiones significativas. Pero aun así, el plegamiento y la arquitectura general de la proteína deberían conservarse.

Por otro lado, si dos proteínas provienen de un ancestro común, se espera que exista una similitud en sus secuencias tal que permita determinar su relación evolutiva a partir de un análisis comparativo. Por lo tanto, si se puede asegurar que dos proteínas son homólogas y que están relacionadas evolutivamente, la estructura de una puede usarse de modelo para construir la estructura de la otra.

Actualmente, esto se conoce como Modelado por Homología (Tramontano, 2006) y tuvo sus orígenes en la publicación de Chothia y Lesk de 1986 en la que, luego de alinear las

secuencias de todas las proteínas con estructura terciaria conocida, encontraron una correlación entre la distancia evolutiva y las diferencias estructurales entre proteínas relacionadas.

Dicho trabajo sentó las bases de las técnicas de modelado por homología, utilizando como modelo una proteína de la familia proteica en estudio, cuya estructura tridimensional es conocida. Si se asume que el alineamiento de las secuencias de una proteína o proteínas de estructura terciaria conocida (modelo o *template*<sup>1</sup>) y otra con estructura terciaria desconocida (blanco) refleja la relación evolutiva entre sus aminoácidos, también podemos suponer que la mayoría de los residuos se conservarán en las mismas posiciones relativas y las coordenadas espaciales de los residuos del modelo podrían utilizarse como coordenadas del blanco (Tramontano, 2006). Acto seguido, debería modelarse las cadenas laterales y los reordenamientos locales producidos por las sustituciones aminoacídicas (Tramontano, 2006).

## 1.2. Modelado por homología

### 1.2.1. Búsqueda de identidad de secuencias con SSearch

El primer paso en el modelado por homología es la selección de proteínas relacionadas evolutivamente que puedan ser usadas como *template* para modelar la proteína en estudio. La identificación de *templates* adecuados se logra usualmente explorando bases de datos de estructuras de proteínas, tales como *Protein Data Bank* (PDB, Berman, 2000) con la proteína estudiada como secuencia blanco.

Este paso se basa en la comparación entre la estructura primaria de la proteína incógnita y las secuencias de la base de datos. Las similitudes encontradas son usualmente cuantificadas en términos de identidad de secuencia o medidas estadísticas, como *E-value* o *z-score*, dependiendo del método usado (Eswar *et al.*, 2006).

SSearch (Ropewski *et al.*, 2004) es un programa desarrollado para realizar una rigurosa búsqueda de similitudes entre una secuencia dada y un grupo de secuencias del mismo tipo. El método utilizado es el de Smith-Waterman según la implementación de William Pearson

---

<sup>1</sup> Para no confundir la proteína “modelo” que se tiene como referencia, con la estructura obtenida por homología, que recibe el mismo nombre por tratarse de un “modelado”, se utilizara el vocablo ingles *template* para hacer referencia a la primera.

(Pearson, 1981) y permite buscar similitudes entre cadenas proteicas y también nucleicas. SSearch cuenta con el método más sensible de búsqueda de similitudes, lo que lo hace un programa computacionalmente costoso.

El algoritmo empleado consiste en la búsqueda de similitudes entre una secuencia blanco y un grupo de secuencias *template*. Durante el proceso, el programa utiliza una matriz de puntuación que contiene criterios de penalización y recompensa. La penalización se aplica en aquellos casos donde la proteína blanco y las proteínas *template* presentan diferentes aminoácidos en iguales posiciones o ante la generación de espacios vacíos entre los alineamientos, producto de proteínas de distinto tamaño. Cabe aclarar que la penalización es proporcional al tamaño del espacio vacío. Por otro lado, el programa recompensa a las coincidencias entre aminoácidos y posiciones entre la proteína blanco y las *template*.

De esta matriz surge una puntuación denominada Puntuación de Smith-Waterman. Una vez determinada la Puntuación de Smith-Waterman, SSearch utiliza una regresión lineal simple contra el logaritmo natural del largo de las secuencias de búsqueda para calcular y normalizar el valor  $z$  ( $z$ -score) para un par de secuencias (Pearson *et al.*, 1995). El valor  $z$  tiende a aproximar estrechamente la distribución de valores extremos. Usando esta distribución, el programa estima el número de secuencias que se producirán puramente por azar, con un valor  $z$  mayor o igual al obtenido en la búsqueda. Esto se conoce como valor  $e$  ( $e$ -score).

Una vez que el total de las secuencias han sido comparadas con la proteína incógnita, el programa muestra una lista de las mejores puntuaciones, así como los alineamientos en caso que sea requerido.

Según los autores, para la búsqueda en una base de datos con 10.000 secuencias, valores  $e$  iguales y por debajo de  $10^{-2}$  resultan en homologas. En tanto valores entre 1 y 10 pueden tener alguna relación.

En este trabajo, el alineamiento de secuencias se creó retirando primero las secuencias y sus familias de Uniprot y utilizando SSearch según describió Ropelewski *et al.*, 2004. Con el objetivo de realizar un refinamiento exhaustivo de las secuencias, se consideró un valor  $e$  de corte de  $10^{-4}$  corriendo un total de 3 iteraciones.

Luego, las secuencias homólogas fueron alineadas con un programa especializado, como se detalla a continuación.

### 1.2.2. Alineamiento y diseño de Hidden Markov con PROMALS

Se trata del paso más crítico y difícil del procedimiento de modelado. La secuencia de la proteína incógnita y las secuencias *template* son alineadas para identificar las regiones que presentan similitud, que puede ser debido a una relación funcional, estructural o evolutiva. Dependiendo de las similitudes entre las secuencias, se utilizan diferentes métodos.

PROMALS (Pei y Grishin, 2007), acrónimo en inglés para *PROfile Multiple Alignment with predicted Local Structure*, es un método progresivo para el alineamiento de múltiples secuencias proteicas, con gran rendimiento en la búsqueda en bases de datos y predicción de estructura secundaria.

El alineamiento de PROMALS se desarrolla por la construcción de un árbol utilizando un método de conteo *k*-mer (Edgar, 2004). Utiliza dos instancias de alineamiento distintas, una para alineamientos sencillos y otra para los alineamientos dificultosos.

En primera instancia, secuencias de gran similitud son alineadas, rápida y progresivamente, con una medida ponderada de la suma de pares de las puntuaciones asignadas por BLOSUM62 (Henikoff y Henikoff, 1992), que utiliza una matriz de sustitución de bloques de aminoácidos.

Si dos grupos de vecinos en el árbol tienen una identidad de secuencia media superior a un determinado umbral (por defecto: 60%), se alinean en forma rápida. El resultado de la primera etapa de la alineación es un conjunto de secuencias o grupos de pre-alineados que son relativamente divergentes uno de otro. En la segunda etapa de la alineación, una secuencia representativa (la más larga) se selecciona a partir de cada grupo de pre-alineada.

Por cada representante, se utiliza PSI-BLAST (Atschul *et al.*, 1997) para buscar homólogos de la base de datos de secuencia UniRef90 (Wu *et al.*, 2006). PSI-BLAST busca posibles homólogos en organismos muy lejanos entre ellos, filogenéticamente hablando. Se encuentra disponible sólo para secuencias de aminoácidos y se trata de un programa iterativo que calcula sus propias matrices de sustitución en cada iteración. La alineación PSI-BLAST se procesa para eliminar resultados divergentes.

En este trabajo, el control de los archivos por PSI-BLAST después de 3 iteraciones se utiliza para predecir las estructuras secundarias por PSIPRED (Jones, 1999). Para cada par representativo, los perfiles que se derivan de las alineaciones de PSI-BLAST, la estructura secundaria predicha por PSIPRED en conjunto con un algoritmo del modelo oculto de

Markov (HMM, *Hidden Markov Model*) de alineamiento de perfiles se utilizan para obtener una matriz de probabilidades de coincidencias entre posiciones.

A continuación, las matrices se utilizan para calcular los índices de consistencia probabilísticos como se describe en Do y colaboradores (2005). Los representantes son luego alineados progresivamente de acuerdo con la función de puntuación basada en la consistencia y los grupos pre-alineados obtenidos en la primera etapa se fusionan a la alineación múltiple de los representantes de la segunda etapa. Por último, el posicionamiento de los espacios vacíos se refina para hacer los patrones más realistas.

La utilización de los homólogos de búsquedas en bases de datos y de predicción de estructura secundaria hace que PROMALS sea más preciso que otros alineadores autónomos para secuencias divergentes. Sin embargo, esto también hace que el programa más lento al momento de alinear un gran número de secuencias.

El alineamiento múltiple de secuencias se utilizó luego para el desarrollo del perfil de HMM para cada secuencia blanco.

Un proceso de Markov es un fenómeno aleatorio dependiente del tiempo para el cual se cumple una propiedad específica: la propiedad de Markov. En teoría de probabilidad y estadística, la propiedad de Markov se refiere a la propiedad de ciertos procesos estocásticos por la cual "carecen de memoria", lo que significa que la distribución de probabilidad del valor futuro de una variable aleatoria depende de su valor presente, pero es independiente de la historia de dicha variable.

El HMM es un modelo estadístico en el que se asume que el sistema a modelar es un proceso de Markov de parámetros desconocidos. El objetivo es determinar los parámetros desconocidos (u ocultos, de ahí el nombre) de dicha cadena a partir de los parámetros observables. Los parámetros extraídos se pueden emplear para llevar a cabo sucesivos análisis, por ejemplo en aplicaciones de reconocimiento de patrones.

### **1.2.3. Identificación de templates de homólogos con HHsearch**

Los perfiles HMM fueron luego canalizados a través del programa HHsearch (Söding *et al.*, 2005) para identificar los homólogos estructurales plausibles. Dicho procedimiento es actualmente uno de los mejores según el experimento CASP9 (*Critical Assessment of protein Structure Prediction*) (Mariani *et al.*, 2011). CASP es un experimento para la predicción de estructuras de proteínas que se lleva a cabo cada dos años desde 1994 y

compara la capacidad de distintos programas de predecir dichas estructuras. El experimento se desarrolla asignando a los distintos grupos de investigación una secuencia aminoacídica cuya estructura terciaria ha sido dilucidada por métodos experimentales aunque aún no publicada. Al momento de finalizar, los modelos propuestos se comparan a la estructura obtenida experimentalmente.

La secuencia de alineamiento múltiple obtenida por HHsearch se utilizó como referencia para la predicción estructural de diferentes blancos por modelado por homología.

#### **1.2.4. Construcción del modelo tridimensional con MODELLER**

Existen principalmente tres métodos para la generación de modelos tridimensionales de proteínas (Eswar *et al.*, 2006): i- Modelado por ensamble de cuerpos rígidos; ii- Modelado por coincidencia de segmento o reconstrucción de coordenadas; iii- Modelado por restricciones espaciales.

En éste trabajo se utilizó el Modelado por restricciones espaciales tal como lo aplica el programa MODELLER en su versión Modeller9v8 (Eswar *et al.*, 2006). El procedimiento es conceptualmente similar al utilizado en la determinación de estructuras de proteínas por restricciones derivadas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Las características de las restricciones se obtienen a partir de un análisis estadístico de la relación entre varios pares de estructuras homólogas. Estas relaciones se expresan como Funciones de Densidad de Probabilidad (FDP) y pueden ser utilizadas como restricciones espaciales. Las FDP de una variable aleatoria continua describen la probabilidad relativa según la cual dicha variable tomará determinado valor. La probabilidad de que la variable se encuentre en una región específica del espacio de posibilidades estará dada por la integral de la densidad de esta variable entre dos límites de dicha región.

Un aspecto a resaltar del método es que las restricciones espaciales son obtenidas empíricamente, de las bases de datos de estructura de proteínas. Esto lo convierte en un método teórico pero con base empírica.

A continuación, términos de energía CHARMM (ver *campos de fuerza*, inciso 5 de ésta sección) que fuerzan a una estereoquímica apropiada (MacKerell *et al.*, 1998) se conjugan con las restricciones espaciales en una función objetivo, que es una ecuación que será optimizada dadas las limitaciones o restricciones determinadas y con variables que

necesitan ser minimizadas o maximizadas, usando técnicas de programación lineal o no lineal.

Finalmente, el modelo se obtiene por optimización de la función objetivo en el espacio Cartesiano.

**Derivación de las restricciones espaciales.** Una restricción se define como una FDP de forma  $p(f)$  donde  $f$  se encuentra restringida. Puede desarrollar cualquier forma siempre que sea no-negativo y que se integra a 1 en el rango de todos los valores posibles para  $f$ . La probabilidad finita real de un evento  $f_1 \leq f \leq f_2$  se obtiene por integración de  $p$ :

$$p(f_1 \leq f \leq f_2) = \int_{f_1}^{f_2} p(f) df \quad (1.2.1)$$

La expresión de una restricción en el término de una FDP da más información sobre los posibles valores de la función de contención que la media de las mediciones solamente. También es más completa que la medición de los límites inferior y superior en una dada distancia átomo-átomo (Sali y Blundell, 1993).

**Restricciones derivadas de la Homología.** En la primera etapa de la construcción del modelo, las restricciones de distancia y ángulos diedros en la secuencia blanco derivan del alineamiento con las estructuras tridimensionales de los modelos. La forma de estas restricciones se obtiene de un análisis estadístico de la relación entre proteínas con estructuras similares. Por ejemplo, la distribución de distancia ( $d - d'$ ) entre dos Carbonos  $\alpha$  ( $C\alpha$ ) es considerada una función de cuatro variables independientes: (i) la distancia  $C\alpha-C\alpha$  en el *template* ( $d'$ ); (ii) fracciones con identidad de secuencia en un alineamiento; (iii) la accesibilidad al solvente promedio para dos residuos a distancia  $d - d'$  en la estructura conocida y; (iv) la distancia promedio de una brecha que abarca la distancia  $d - d'$ . Se demuestra que la distribución condicional de las diferencias de distancia puede ser aproximada por una función gaussiana con media cero y una desviación estándar que depende de los valores de las variables independientes (Sali y Blundell, 1993). Considerando a los homólogos de estructura conocida (aproximadamente 300) en la base de datos de alineamiento de familias de proteínas, se puede expresar entonces la FDP como:

$$p^d(D_{C\alpha-C\alpha}|a, b, c, d) = \frac{1}{\sigma(a,b,c,d)\sqrt{2\pi}} e^{\left[-\frac{1}{2}\left(\frac{d-d'}{\sigma(a,b,c,d)}\right)^2\right]} \quad (1.2.2)$$

Donde  $\sigma(a, b, c, d)$  es una combinación de las propiedades (i) a (iv) anteriormente mencionadas, con el coeficiente extraído de la base de datos analizada. Por lo tanto, la restricción de la distancia  $C\alpha-C\alpha$  se define en la secuencia blanco una vez que las variables (i), (ii), (iii) y (iv) son especificadas.

**Restricciones Estereoquímicas.** En un segundo paso, las restricciones espaciales y términos de energía CHARMM que fuerzan a una estereoquímica apropiada se combinan en una función objetivo. Todas las restricciones estereoquímicas se obtienen de la secuencia aminoacídica de la proteína. Las restricciones geométricas como las longitudes de enlace, los ángulos de enlace y los ángulos diedros se expanden por medio de funciones gaussianas. Los valores medios y las desviaciones estándar se obtienen del set de parámetros de CHARMM. Los términos de energía de Coulomb y van der Waals son los mismos que para este campo de fuerza.

**Longitud de enlace, ángulos de enlace y ángulos diedros.** Las bases de una FDP  $f$  para las características geométricas tales como longitud de enlace, ángulo de enlace y ángulo diedro describen una función gaussiana:

$$p^f(f) = \frac{1}{\sigma_f\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{f-\bar{f}}{\sigma_f}\right)^2} = N(\bar{f}, \sigma_f) \quad (1.2.3)$$

Se necesitan solo dos parámetros para describir esta distribución,  $\bar{f}$  y la desviación estándar  $\sigma_f$ .

La restricción correspondiente  $c$  es:

$$c = \ln p = -\frac{1}{2} \left( \frac{f - \bar{f}}{\sigma_f} \right)^2 - \ln \frac{1}{\sigma_f\sqrt{2\pi}} \quad (1.2.4)$$

Donde  $c$  se encuentra escalado por RT en Kcal/mol con un  $R = 297,15$  K para permitir a estos valores ser sumados con las energías de CHARMM.

**Restricciones de Coulomb.** Para:

$$c = \frac{1}{\epsilon_r} \frac{q_i q_j}{f} s(f, f_1, f_2) \quad (1.2.5a)$$

$$s(f, f_1, f_2) = \begin{cases} 1; & f \leq f_1 \\ \frac{(f_2 - f)^2 (f_2 + 2f - 3f_1)}{(f_2 - f_1)^3}; & f_1 < f \leq f_2 \\ 0; & f > f_2 \end{cases} \quad (1.2.5b)$$

donde  $q_i$  y  $q_j$  son las cargas atómicas de los átomos  $i$  y  $j$ , obtenidos de los archivos de topología de CHARMM, que se encuentran a distancia  $f$ ;  $\epsilon_r$  es el dieléctrico relativo.

La función  $s(f, f_1, f_2)$  es una función de conmutación que suaviza el potencial hasta cero en el intervalo de  $f_1$  a  $f_2$  ( $f_2 \leq f_1$ ). La energía de coulomb total para una molécula resulta de la suma de las energías de todos los pares de átomos que no se encuentran unidos.

**Restricciones de Lennard-Jones.** Usualmente utilizada para distancias entre átomos no unidos:

$$c = \left[ \left( \frac{A}{f} \right)^{12} - \left( \frac{B}{f} \right)^6 \right] s(f, f_1, f_2) \quad (1.2.6)$$

Los parámetros  $f_1$  y  $f_2$  de la función de conmutación pueden ser diferentes a aquellos de la ecuación 1.2.6. Los parámetros A y B se obtienen de los archivos de parámetros de CHARMM. La energía de Lennard-Jones total para una molécula resulta de la suma de las energías de todos los pares de átomos que no se encuentran unidos.

**Optimización de la función objetivo.** Finalmente, el modelo es obtenido optimizando la función objetivo en el espacio cartesiano. MODELLER minimiza la función objetivo  $F$  con respecto a las coordenadas cartesianas como sigue:

$$F = F(R) = \sum_i c_i(f_i, p_i) + F_{symm} \quad (1.2.7)$$

Donde  $R$  son las coordenadas cartesianas de todos los átomos,  $c_i$  es la restricción para  $i$ ,  $f$  es la geometría de una molécula,  $p$  los parámetros y  $F_{symm}$  es un término de simetría opcional definido como:

$$F_{symm} = \sum_{i < j} \omega_i \omega_j (d_{ji} - d'_{ij})^2 \quad (1.2.8)$$

Donde la suma se ejecuta sobre todo par de átomos equivalentes  $ij$ .

### 1.2.5. Validación del modelo

Las estructuras de proteínas obtenidas por modelado por homología pueden contener errores. Por ello se debe ser cauto con su utilización y recurrir a distintas herramientas que permitan su validación.

**Identidad de secuencia.** En general, el porcentaje de identidad de secuencia entre la proteína blanco y el *template* es un buen predictor de la exactitud del modelo. Sin embargo, en el caso particular de las FABP, este método de validación de modelo no es el más adecuado, ya que estas proteínas son reconocidas por su conservada estructura terciaria aún cuando presenten un bajo porcentaje de identidad de secuencia.

**Verificación estereoquímica.** Esta verificación incluye la verificación de la longitud de enlace, los ángulos de unión, etc. Para ello se utilizó PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993).

Otra verificación estereoquímica muy utilizada en proteínas es el gráfico de Ramachandran, en el que se puede visualizar todas las posibles combinaciones posibles para los ángulos diedros  $\Psi$  contra  $\Phi$  en los aminoácidos de un polipéptido.

Debido a los efectos estéricos entre las cadenas laterales de los residuos, no todos los pares de ángulos son posibles dentro de las estructuras. Con las excepciones del aminoácido glicina (por poseer una cadena lateral conformada por sólo un H) y del aminoácido Prolina (que presenta isomería geométrica), la presencia repetida de pares ángulos prohibidos en

un gráfico de Ramachandran indica probables errores en la construcción de la estructura secundaria del modelo.

**Estimación global de la calidad del modelo.** Los indicadores globales comúnmente utilizados son: DFIRE (Zhou y Zhou, 2002), que calcula un potencial estadístico dependiente de la distancia para distintos modelos atómicos de una misma estructura y QMEAN (Benkert *et al.*, 2008), una función de puntuación compuesta.

Cabe aclarar los potenciales estadísticos son funciones de energía que se basan en las estructuras publicadas en bases de datos para asignar una puntuación a los modelos bioinformáticos. Energías elevadas implican estructuras poco probables y por lo tanto, un modelado de baja calidad.

**Estimación local de la calidad del modelo.** En este caso se analizan la fiabilidad del modelo residuo a residuo. DSSP (*Definition of Secondary Structure of Proteins*) (Kabsc y Sander, 1983), por ejemplo, es una base de datos que trabaja comparando la estructura obtenida con las depositadas en PDB. Permite estimar la superficie de accesibilidad al solvente y la tendencia a ciertas estructuras secundarias. ANOLEA (Melo y Feytmans, 1998) es un potencial estadístico que analiza las interacciones atómicas con distintas regiones del modelo a una distancia Euclidiana de 7 Å (alrededor de 11 residuos) y GROMOS (Christen *et al.*, 2005), campo de fuerza empírico utilizado para calcular la energía de cada residuo (ver sección 5.1.2 de este capítulo).

### 1.3. Generación de árboles filogenéticos

El árbol filogenético se generó utilizando el programa MEGA5.0 (Tamura K. *et al.*, 2011), caracterizando la familia proteica con un algoritmo *Neighbor-Joining*, o método de unión de vecinos, es un método de agrupación creado por Naruya Saitou y Masatoshi Nei en 1987. Por lo general, se utiliza para árboles de secuencias de ADN o de proteína, para lo cual, el algoritmo requiere del conocimiento de la distancia que existe entre cada par de taxones (por ejemplo, especies o secuencias) para formar el árbol.

En particular, el árbol que describe la distancia evolutiva de las proteínas de mamíferos se confeccionó utilizando el método de corrección de Poisson (Zuckerandl *et al.*, 1965) y las

unidades se expresan en número de aminoácidos sustituidos por sitio. El árbol de evolución mínima se desarrolló utilizando algoritmo de intercambio cercano de vecinos (*close-neighbor-interchange*) (Nei y Kumar, 2000) en un nivel de búsqueda de 1. El algoritmo de cercanía de vecinos (Saitou y Nei, 1987) fue utilizado en la generación del árbol inicial. Todas las posiciones que contenían huecos fueron eliminadas de los datos analizados, por lo que finalmente se generó un conjunto de 39 proteínas. El análisis filogenético se llevó a cabo utilizando MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007). La validación del árbol se desarrolló teniendo en cuenta el trabajo de Schaap y colaboradores de 2002 y Zanzoni y colaboradores de 2011.

## 2. ESTRUCTURA DE MOLÉCULAS BIOLÓGICAS

El protagonismo de las estructuras tridimensionales de biomacromoléculas ha crecido en el ámbito científico desde que se conoce la relación estructura-función de las mismas. Desde el célebre descubrimiento de la estructura del ADN a la fecha, se han publicado innumerables artículos que proponen la estructura de diversas moléculas. Sin lugar a duda, las proteínas son las moléculas biológicas cuya estructura ha sido más estudiada. Solo hace falta analizar el incremento de estructura publicadas en bases de datos para descubrir el aumento exponencial de las mismas (**Figura 3 A y B**).

### 2.1. Obtención de estructuras de moléculas biológicas

En esta tesis se han empleado diversas estructuras de proteínas y membranas biológicas. En el caso de las membranas, sus estructuras fueron modeladas *de novo* a partir de los fosfolípidos 1-stearoil-2-oleoil-fosfatidilserina (SOPS) y 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina (POPC), como se explica más adelante.

Las proteínas, en cambio, se obtuvieron de dos formas distintas. Algunas fueron descargadas desde bancos de datos específicos, mientras que otras fueron modeladas para éste trabajo por métodos explicados en la sección 1.2.

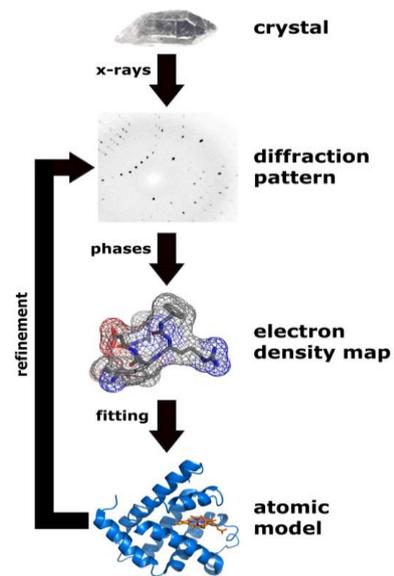
Las bases de datos de estructuras de proteínas de donde se descargaron las FABPs utilizadas, se conforman de estructuras determinadas por distintos grupos de investigación que incorporan sus datos a las mismas, permitiendo un acceso libre a la información.

Existen dos técnicas muy popularizadas al momento de determinar la estructura de proteínas: La espectroscopia de rayos X y la Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Si bien

ninguna de estas técnicas se utilizó para el desarrollo de ésta tesis, se trata de los métodos más utilizados para determinar estructuras de proteínas y, por lo tanto, a partir de los cuales se obtuvieron las estructuras de las proteínas descargadas de bases de datos. Por ende, se torna necesaria la resumida descripción de los métodos que sigue a continuación.

### 2.1.1. Cristalografía de rayos X

La Cristalografía de rayos X es el principal método de obtención de información estructural en el estudio de proteínas y otras macromoléculas orgánicas. El análisis de moléculas tan complejas requiere el procesamiento y análisis de un gran cúmulo de información, obtenida a partir de una muestra (proteína) en estado cristalino que se expone a radiación que proviene de un generador de rayos X (Figura 4). Esa complejidad molecular aporta un volumen de información que hace necesario, para este tipo de estudios, el empleo intensivo de cálculo computacional.



**Fig.4:** Diagrama simplificado de los procesos que requieren la obtención de una estructura por difracción de rayos X. De Thomas Splettstoesser ([www.scistyle.com](http://www.scistyle.com))

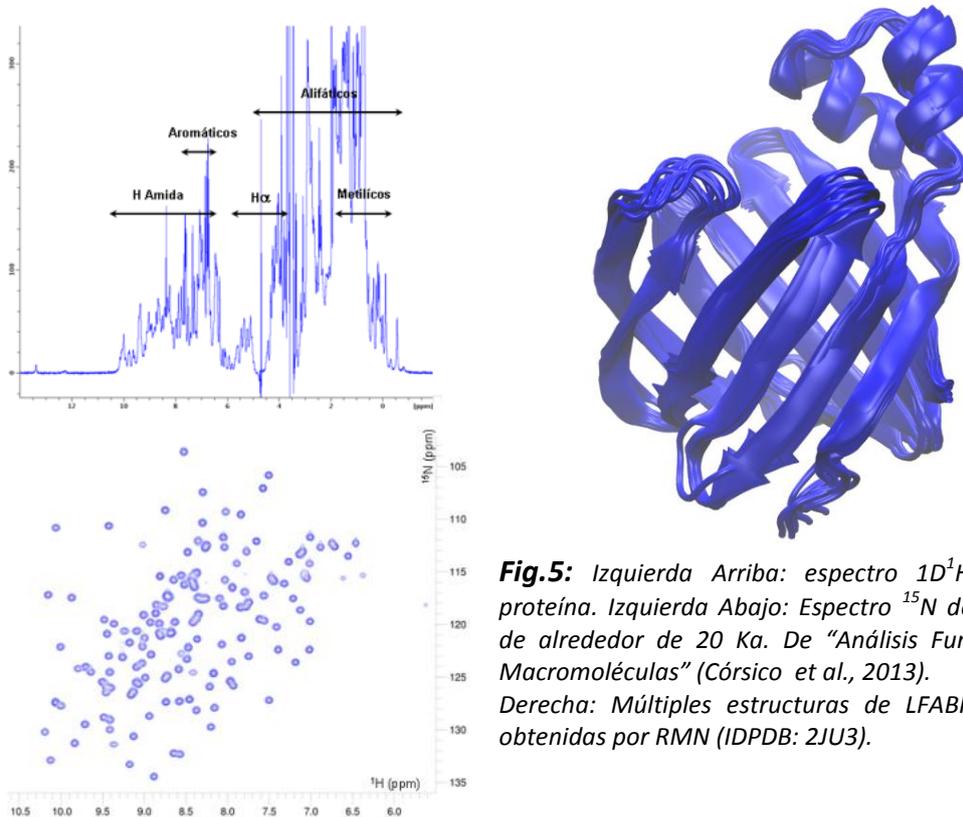
El análisis de la información experimental, mapa de densidad electrónica que se obtiene a partir de la imagen de difracción de un monocristal constituido por moléculas ordenadas de la proteína cuya estructura se desea conocer, consiste en ajustar a esa densidad electrónica un modelo teórico (calculado u obtenido a partir de un modelo similar) de la estructura atómica de la proteína estudiada. Cuando ese ajuste es estadísticamente satisfactorio y el modelo atómico posee una estereoquímica adecuada para los aminoácidos constituyentes de la proteína, se dice que “la estructura está resuelta” y se puede, entonces, analizar y (eventualmente) comprender la función biológica de la macromolécula. Las proteínas cuyas estructuras se han resuelto por rayos X (junto a las obtenidas por RMN) se encuentran en el banco de datos de acceso libre denominado *Protein Data Bank*, y que se detalla más adelante (Sección 2.2).

### 2.2.1. Resonancia magnética nuclear

La espectroscopia mediante resonancia magnética nuclear de proteínas (RMN de proteínas) es un campo de la biología estructural en el que se obtiene información sobre la estructura y -a diferencia de la espectroscopia de Rayos X- la dinámica de las proteínas en solución. La determinación de la estructura de las proteínas mediante espectroscopia RMN consiste en fases sucesivas en las que la muestra es preparada, se asignan las resonancias, se generan las restricciones y se calcula y valida la estructura.

Básicamente, la RMN de proteínas consiste en la medir la energía liberada al relajarse núcleos de Nitrogeno 15, Carbono 13 y Deuterio luego de ser retirado un campo magnético que los orientaba en una dirección. Esto implica medir tiempos de relajación como  $T_1$  (relajación espín-entorno) y  $T_2$  (relajación espín-espín) para determinar parámetros de orden, tiempos de correlación y tasas de intercambio químico.

La relajación es una consecuencia de los campos magnéticos locales que fluctúan en una molécula, generados por movimientos moleculares. De este modo, las medidas de los tiempos de relajación pueden aportar información de los movimientos dentro de una molécula a nivel atómico.



**Fig.5:** Izquierda Arriba: espectro  $1D^1H$  de una proteína. Izquierda Abajo: Espectro  $^{15}N$  de proteína de alrededor de 20 Ka. De “Análisis Funcional de Macromoléculas” (Córsico et al., 2013). Derecha: Múltiples estructuras de LFABP de rata obtenidas por RMN (IDPDB: 2JU3).

Los tipos de movimientos que pueden ser detectados son aquellos que ocurren en una escala de tiempo de entre 10 picosegundos y 10 nanosegundos. Además, pueden estudiarse movimientos más lentos que tienen lugar en un rango temporal de entre 10 microsegundos y 100 milisegundos. No obstante, puesto que los átomos de nitrógeno se encuentran principalmente en el esqueleto de la proteína, los resultados reflejan principalmente los movimientos del esqueleto, que es la parte más rígida de la proteína. Por lo tanto, los resultados obtenidos por la medida de relajación del nitrógeno-15 pueden no ser representativos de la proteína entera. De ahí que, recientemente, se hayan desarrollado técnicas que utilizan medidas de relajación de carbono-13 y deuterio, lo que permite estudios sistemáticos de los movimientos de las cadenas laterales de aminoácidos.

A diferencia de la difracción de rayos x, la RMN permite obtener varios modelos de una misma estructura (**Figura 5**).

## **2.2. Banco de datos de estructura de proteínas**

Con el nombre de *Protein Data Bank* (PDB), se conoce a la mayor base de datos digital de estructuras de moléculas biológicas (**Figura 6**). No obstante su nombre, allí no solo se encuentran disponibles las coordenadas tridimensionales de los átomos que conforman proteínas, sino también de los que conforman a los ácidos nucleicos y ligandos de diferentes clasificaciones químicas.

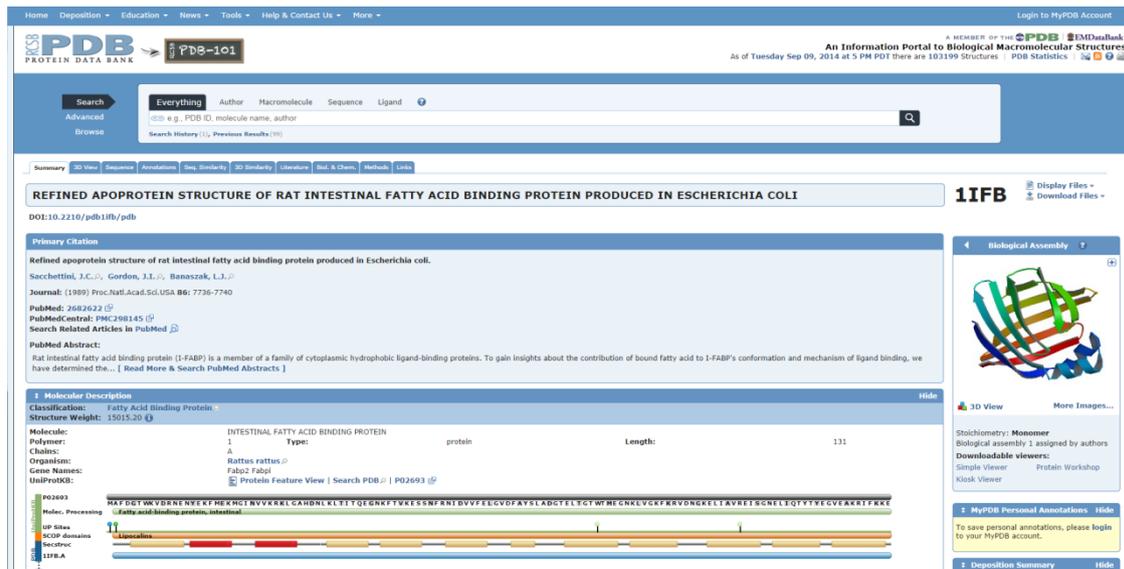
PDB tuvo sus orígenes a finales de la década de 1960, cuando Walter Hamilton y Edgar Meyer desarrollaron un programa que permitía el almacenamiento de las coordenadas atómicas de proteínas, en un formato que hiciera posible el análisis gráfico y geométrico de las mismas. Más adelante, Meyer desarrolla SEARCH, un programa que permite el acceso remoto a la información almacenada en PDB, lo que hizo del banco de datos una herramienta extremadamente útil para biólogos estructurales del mundo entero.

Hoy día, PDB se encuentra conformado por PDBe de origen europeo, RCSB en Estados Unidos, PDBj en Japón y, desde 2006, el *Biological Magnetic Resonance Bank* (BMRB), un banco de datos para estructuras obtenidas por RMN.

EL crecimiento de PDB ha sido incesante, desde sus orígenes a la fecha, el número de estructuras almacenadas ha crecido de manera exponencial (**Figura 3 A**). Esto obedece a dos hechos muy relevantes. En primer lugar, PDB no se limita solo al almacenamiento de datos

de estructura, sino que también toma parte en la validación de los mismos, sometiendo a los datos adquiridos a estrictos protocolos de análisis. Tales son las exigencias que PDB plantea, que las editoriales científicas de mayor renombre exigen a los científicos cargar los resultados estructurales en PDB antes de ser publicados.

En segundo lugar, PDB ofrece la posibilidad de publicar, someter a validación y descargar las coordenadas atómicas de moléculas biológicas de forma libre y gratuita (**Figura 6**).



**Fig.6:** Captura de pantalla de Protein Data Bank. Se observa la información disponible para IFABP de rata (IDPDB: 1IFB).

## 2.3. Archivos .pdb

El formato en el que se archivan los datos estructurales de las biomoléculas en PDB es, justamente, un archivo de extensión *.pdb*. A continuación se desarrolla una breve explicación del formato y la obtención de los mismos.

### 2.3.1. Descripción de archivos *.pdb*

Los archivos *.pdb* constan básicamente de los datos estructurales de la molécula biológica en un formato de columnas (**Figura 7**). En las primeras tres columnas se encuentran el átomo de la proteína cuyos datos se describen, la cadena y el residuo al que pertenece. Las siguientes tres columnas describen la posición relativa del átomo en el espacio, en un sistema cartesiano de coordenadas. Finalmente, las últimas tres columnas describen la ocupancia, el factor de temperatura o *B-Value* y el símbolo químico del

átomo en cuestión. Tanto la ocupancia como el factor de temperatura son datos que provienen de la resolución de las estructuras mediante difracción de rayos X. La ocupancia permite estimar la cantidad de veces que se repite cierta configuración en el cristal (estos están compuestos por muchas moléculas dispuestas en un arreglo simétrico), en la cual 1 significa que la misma configuración es vista en todos los ejemplares del cristal. Por otro lado, el factor de temperatura está relacionado con el movimiento de los

átomos que genera distribuciones de densidad electrónica difusas. Valores cercanos a 10 suponen modelos muy precisos mientras que valores mayores a 50 indican que el átomo se mueve demasiado como para ser visto con claridad, fenómeno que suele ocurrir con los átomos de la superficie de las proteínas.

**Fig.7:** Visualización de archivo .pdb en la que se observan el formato de columnas del mismo.

		1	2	3	4	5	6	7	8		
1	ATOM	1	N	ALA	1	-14.035	5.855	-64.613	0.00	0.00	N
2	ATOM	2	CA	ALA	1	-14.378	5.521	-63.271	0.00	0.00	C
3	ATOM	3	C	ALA	1	-13.286	4.740	-62.573	0.00	0.00	C
4	ATOM	4	O	ALA	1	-13.289	3.512	-62.617	0.00	0.00	O
5	ATOM	5	CB	ALA	1	-15.673	4.717	-63.212	0.00	0.00	C
6	ATOM	6	HA	ALA	1	-14.544	6.376	-62.743	0.00	0.00	H
7	ATOM	7	HB1	ALA	1	-15.461	3.742	-63.252	0.00	0.00	H
8	ATOM	8	HB2	ALA	1	-16.254	4.964	-63.987	0.00	0.00	H
9	ATOM	9	HB3	ALA	1	-16.151	4.919	-62.359	0.00	0.00	H
10	ATOM	10	H1	ALA	1	-14.460	5.208	-65.260	0.00	0.00	H
11	ATOM	11	H2	ALA	1	-14.353	6.785	-64.841	0.00	0.00	H
12	ATOM	12	H3	ALA	1	-13.035	5.822	-64.744	0.00	0.00	H
13	ATOM	13	N	PHE	2	-12.418	5.493	-61.873	0.00	0.00	N
14	ATOM	14	CA	PHE	2	-11.340	4.915	-61.108	0.00	0.00	C
15	ATOM	15	C	PHE	2	-11.787	4.463	-59.739	0.00	0.00	C
16	ATOM	16	O	PHE	2	-11.104	3.704	-59.088	0.00	0.00	O
17	ATOM	17	CB	PHE	2	-10.230	5.929	-60.951	0.00	0.00	C
18	ATOM	18	CG	PHE	2	-9.440	6.042	-62.213	0.00	0.00	C
19	ATOM	19	CD1	PHE	2	-9.574	7.157	-63.038	0.00	0.00	C
20	ATOM	20	CD2	PHE	2	-8.554	5.029	-62.593	0.00	0.00	C
21	ATOM	21	CE1	PHE	2	-8.829	7.259	-64.209	0.00	0.00	C
22	ATOM	22	CE2	PHE	2	-7.778	5.130	-63.753	0.00	0.00	C
23	ATOM	23	CZ	PHE	2	-7.949	6.246	-64.561	0.00	0.00	C
24	ATOM	24	HN	PHE	2	-12.602	6.518	-61.940	0.00	0.00	H
25	ATOM	25	HA	PHE	2	-11.033	4.086	-61.605	0.00	0.00	H
26	ATOM	26	HB1	PHE	2	-9.631	5.622	-60.241	0.00	0.00	H
27	ATOM	27	HB2	PHE	2	-10.633	6.800	-60.763	0.00	0.00	H
28	ATOM	28	HD1	PHE	2	-10.202	7.884	-62.792	0.00	0.00	H
29	ATOM	29	HD2	PHE	2	-8.472	4.210	-62.020	0.00	0.00	H
30	ATOM	30	HE1	PHE	2	-8.936	8.070	-64.795	0.00	0.00	H
31	ATOM	31	HE2	PHE	2	-7.123	4.413	-63.985	0.00	0.00	H
32	ATOM	32	HZ	PHE	2	-7.425	6.325	-65.419	0.00	0.00	H
33	ATOM	33	N	ASP	3	-12.985	4.881	-59.352	0.00	0.00	N
34	ATOM	34	CA	ASP	3	-13.610	4.610	-58.074	0.00	0.00	C
35	ATOM	35	C	ASP	3	-13.633	3.155	-57.667	0.00	0.00	C
36	ATOM	36	O	ASP	3	-14.076	2.300	-58.408	0.00	0.00	O
37	ATOM	37	CB	ASP	3	-15.035	5.227	-58.024	0.00	0.00	C
38	ATOM	38	CG	ASP	3	-15.005	6.727	-58.231	0.00	0.00	C
39	ATOM	39	OD1	ASP	3	-14.914	7.530	-57.303	0.00	0.00	O
40	ATOM	40	OD2	ASP	3	-15.119	7.095	-59.475	0.00	0.00	O1-
41	ATOM	41	HN	ASP	3	-13.476	5.466	-60.103	0.00	0.00	H

### **2.3.2. Obtención de archivos .pdb**

En el desarrollo de esta tesis, para las proteínas de estructura conocida, los archivos .pdb se obtuvieron directamente de la base de datos de PDB. En algunas ocasiones se debió modificar el archivo por tratarse de cristalizaciones en dímeros, para eliminar moléculas de agua que formaban parte del cristal o ligandos no naturales con los que se cristalizó la proteína. En el caso de las estructuras obtenidas por RMN, se utilizó una estructura que represente el promedio de todas las publicadas.

En todos los casos se respetó la estructura publicada sin modificar la posición de las cadenas laterales por medio de relajación del sistema.

Para las proteínas con estructura desconocida, el archivo .pdb se obtuvo como se describió en la sección bioinformática.

Las coordenadas para los archivos .pdb de las membranas se describe detalladamente más adelante.

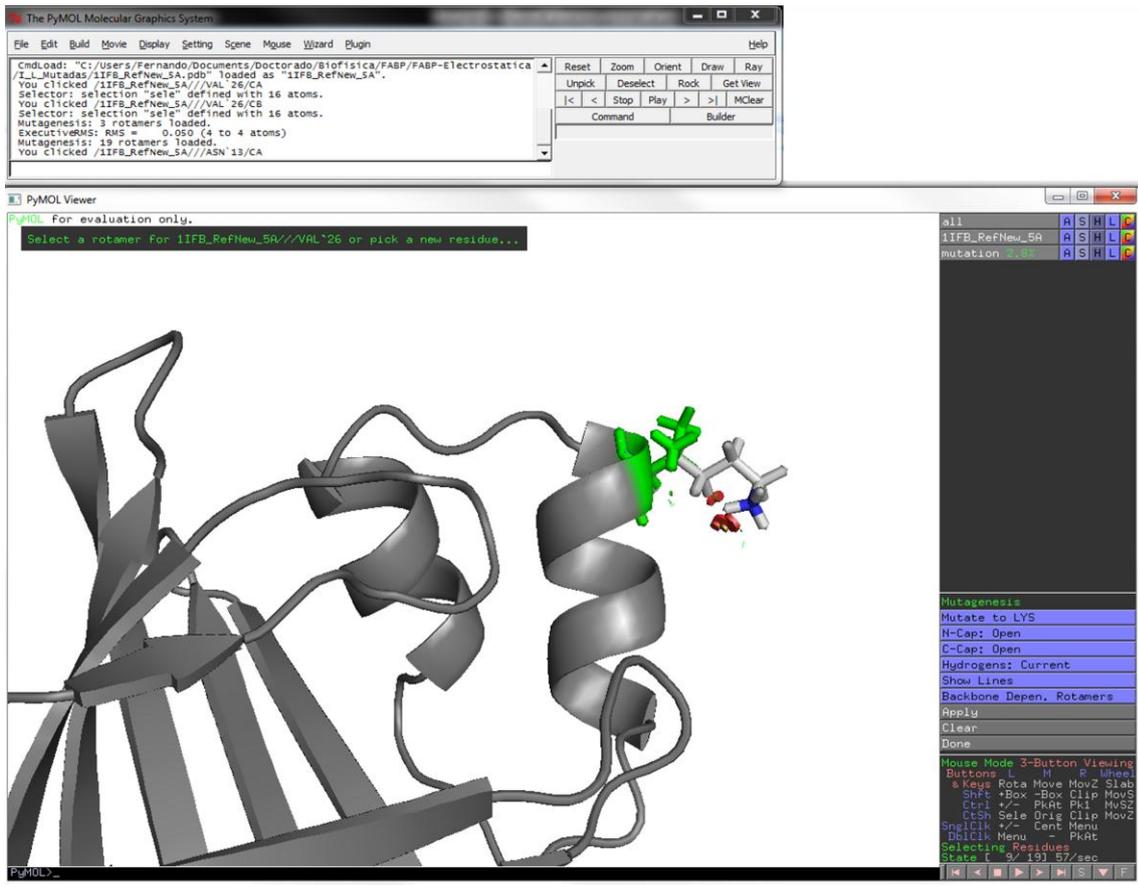
## **2.4. Mutación *in silico* de proteínas**

### **2.4.1. PyMOL**

Aunque existen gran cantidad de programas que presentan una interfase gráfica para visualizar los archivos de coordenadas atómicas, *PyMOL* se trata de uno de los más difundidos. Probablemente esto se deba a que es un visor molecular de código abierto.

Este programa, creado por Warren Lyford Delano, es ampliamente utilizado en biología estructural ya que permite producir imágenes tridimensionales de alta calidad de biomacromoléculas como proteínas y membranas lipídicas, entre otras. Además, mediante la utilización del lenguaje de programación *Python*, puede ser extendido para realizar análisis complejos de estructuras moleculares utilizando bibliotecas disponibles para *Python* como *NumPy* o *pylab*.

En el caso de las proteínas, las aplicaciones de *PyMOL* incluyen la posibilidad de reemplazar aminoácidos de la estructura de la proteína de tipo salvaje, por otros residuos distintos, manteniendo la estructura secundaria original. Asimismo, *PyMOL* permite seleccionar diferentes rotámeros del residuo, teniendo en cuenta el porcentaje en el que se encuentran en la naturaleza y el impedimento estérico que la cadena lateral del aminoácido encontrará en determinada posición (**Figura 8**). Es por esta opción que fue elegido para desarrollar las mutaciones puntuales estudiadas en el presente trabajo.



**Fig.8:** Captura de pantalla de *PyMOL*. Se observa mutación de una Valina (verde) por una Lisina (blanco y azul) en una IFABP de Rata (IDPDB: 1IFB). En rojo se observa impedimento estérico que presentan las cadenas laterales vecinas para ese rotámero.

## 2.5. Obtención de estructuras de membranas biológicas

Las coordenadas atómicas de las membranas son imágenes instantáneas generadas computacionalmente y equilibradas por dinámica molecular. Como componente unitario de la membrana neutra se utilizó 1-palmitoil-2-oleoil-fosfaatidilcolina (POPC) y para las formas aniónicas, una mezcla de POPC y 1-stearoil-2-oleoil-fosfatidilserina (SOPS) en distintos porcentajes. Con el objetivo de obtener membranas de carga variable, e construyeron cinco

sistemas distintos: 100% POPC–0% SOPS (POPC1-SOPS0), 75% POPC–25% SOPS (POPC3-SOPS1), 50% POPC–50% SOPS (POPC1-SOPS1), 25% POPC–75% SOPS (POPC1-SOPS3) y 0% POPC–100% SOPS (POPC0-SOPS1). Con la única excepción de la proporción de lípidos utilizada, en todos los casos se siguió el mismo protocolo.

- a) **Ensamblado de monocapa de grano grueso:** con el objetivo de crear una bicapa lipídica con estructura azarosa se utilizó una representación molecular de grano grueso. El grano grueso es una técnica de DM que consta en reemplazar un grupo de átomos de una macromolécula por un ente que posee características similares al grupo reemplazado. La disminución del número de átomos redundante en una notable disminución del tiempo de cálculo. Una explicación más detallada del método se encuentra en la sección de DM.

En éste caso, Lípidos y moléculas de agua en su representación de grano grueso fueron insertados aleatoriamente en la caja de simulación. Dependiendo del sistema, se utilizaron distintos porcentajes de POPC o SOPS, siendo 100 el número total de lípidos en todos los casos. Para todo el sistema, se emplearon unas 1500 moléculas de agua de grano grueso. Para los sistemas con SOPS, la carga total se neutralizó con el agregado de Na como contra-iones.

- b) **Finalización de la bicapa de grano grueso:** Una vez construida la monocapa de 100 lípidos, se replicó el sistema, obteniendo así una monocapa de 200 residuos lipídicos. Este procedimiento se repitió de manera de obtener un total de 400 lípidos por membrana. Luego, se rotaron 200 lípidos en el eje Y, generando entonces una bicapa con una distribución simétrica de residuos lipídicos con 200 fosfolípidos en cada cara de la membrana, rodeadas por unas 6000 moléculas de agua de grano grueso.
- c) **Equilibrado de la membrana:** Con el objetivo de asegurar el correcto equilibrado del sistema, se desarrolló una DM de grano grueso de unos 1,5 ms de duración. Cabe aclarar que los tiempos de dinámica de grano grueso representan tiempos de DM mucho mayores debido a la economía de cálculo que supone la disminución en el número de átomos del sistema.
- d) **Construcción de la membrana con detalle atomístico:** Una vez equilibrado el sistema de grano grueso, se transformó a un sistema con detalle atomístico, utilizando una versión modificada de GROMACS (Spoel *et al.*, 2005). Con el objetivo de descartar la creación de artefactos en el proceso de transformación, se realizó

una DM de solo 1ns. La composición final del sistema resultó en 400 lípidos y alrededor de 24.000 moléculas de agua.

- e) **Condiciones de corrida para las dinámicas de grano grueso y con detalle atomístico:** Las simulaciones se desarrollaron a una temperatura de 300K° y una presión de 1 bar, ambos controlados por el uso del termostato y barostato semiisotrópico de Berendsen (Berendsen *et al.*, 1984), ambos con un parámetro de acoplamiento de 3 ps para la simulación de grano grueso y 1 ps para la de detalle atomístico. La compresibilidad se fijó en  $6 \times 10^{-5} \text{bar}^{-1}$  en todas las direcciones para ambas simulaciones. Dado que corresponde con la compresibilidad del agua de grano grueso (Marrink *et al.*, 2004).

El intervalo temporal mínimo se fijó en 30 fs para el cálculo de grano grueso y en 2 fs para el de detalle atomístico. La escala de tiempo de la simulación de grano grueso se adaptó con el coeficiente de difusión de agua multiplicando el tiempo en la simulación con un factor de 4. Para las simulaciones de grano grueso, se utilizó el campo de fuerza MARTINI (Marrink *et al.*, 2007), mientras que para las simulaciones con detalle atomístico, el campo de fuerza Berger (Berger *et al.*, 1997) fue el escogido.

Si bien se utilizó una versión modificada de GROMACS para las simulaciones en grano grueso, el resto de las simulaciones se desarrollaron con el paquete 4.5.3 del programa original.

### **3. MODELOS DE CARGAS PUNTUALES**

Para el estudio de las interacciones de tipo electrostático planteadas en ésta tesis, se requirió la asignación de cargas puntuales a los modelos atomísticos obtenidos tanto de bases de datos, como por modelado por homología y diseñados *de novo* por DM. Si bien los programas de DM pueden generar archivos de salida que incluyen los valores de carga de cada átomo, en el caso particular del trabajo realizado, se hizo indispensable contar con las cargas puntuales de manera exclusiva, sin incluir otras consideraciones que pudieran interferir en los cálculos propuestos.

El tipo de archivo necesario es generado por un programa denominado *pdb2pqr* que, básicamente, asigna cargas puntuales a los archivos *.pdb* anteriormente descriptos.

### 3.1. Archivos *.pqr*

#### 3.1.1. Descripción de archivos *.pqr*

Un archivo *.pqr* posee prácticamente la misma estructura que un archivo *.pdb*, con la diferencia que las columnas del factor de temperatura y la ocupancia se encuentran reemplazados por columnas que contienen la carga puntual de cada átomo y el radio atómico respectivamente. Las cargas son necesarias para formar la distribución de cargas de la biomolécula que será utilizada para resolver la ecuación de PB, mientras que con los radios se construyen las funciones de accesibilidad iónica y dieléctrica.

Los archivos *.pqr* se usan en muchos paquetes de programas para biología computacional.

#### 3.1.2. Generación de archivos *.pqr*

##### 3.1.2.1. *pdb2pqr*

*pdb2pqr* (Dolinsky *et al.*, 2004) es un programa que convierte archivos estándar *.pdb* al formato *.pqr* asignando un radio y una carga parcial a cada átomo en su centro geométrico como se describió arriba. Para ello se vale de una biblioteca que contiene valores de cargas parciales para los átomos que componen ácidos nucleicos. Asimismo, el programa implementa un algoritmo para resolver conflictos estéricos, optimizar la red de puentes de hidrógeno que circunda la proteína (titulación de la biomolécula), agrega átomos pesados que pudieran faltar y completa hidrógenos faltantes de acuerdo al campo de fuerza seleccionado. Para este trabajo, el campo de fuerza seleccionado fue PARSE (Sitkoff *et al.*, 1994).

##### 3.1.2.2. *PropKa*

La obtención empírica de los valores de pKa de biomoléculas es una tarea compleja, es por ello que se han desarrollado diversos programas que los predicen basados en la estructura de la proteína. *pdb2pqr* utiliza un programa anexo denominado *PropKa* (Li *et*

al., 2004), que computa los valores de pKa de los residuos ionizables de una proteína mediante la introducción de una perturbación, debido al medio proteico, al valor de pKa modelo (pKa de un grupo de titulación en un compuesto modelo libre de otros grupos):

$$pK_a = pK_{\text{model}} + \Delta pK_{\text{DS}} + \Delta pK_{\text{HB}} + \Delta pK_{\text{CC}} \quad (3.1.1)$$

El primer elemento de la corrección, es el término de desolvatación que representa el cambio en la energía libre durante la reacción de protonación, debido a la posibilidad de que el residuo esté inmerso en la proteína, un medio con baja constante dieléctrica. El segundo corresponde a la existencia de puentes de hidrógeno tanto en la cadena principal como en las laterales, mientras que el tercero expresa la interacción con otros grupos cargados.

### 3.2.1. Modelo de cargas puntuales de membranas biológicas

Dado que el programa *pdb2pqr* no fue desarrollado para trabajar con lípidos, la asignación de cargas y el estado de protonación de los fosfolípidos se llevó a cabo de forma manual. A continuación se describe el procedimiento en detalle.

#### 3.2.1.1. Asignación de cargas

La asignación de cargas para los átomos que componen a los dos fosfolípidos utilizados en la construcción de la membrana se obtuvo mediante la combinación de dos programas distintos y a partir de datos empíricos. En principio, las cargas puntuales se obtuvieron del archivo *.tpc* de *GROMACS* (se explica en DM). Dado que éste programa combina los hidrógenos no polares con sus respectivos carbonos formando superátomos, se buscó asignar las cargas por otro método, de manera de obtener datos más consistentes. Para ello, se utilizó el programa *ArgusLab* (Mark Thompson, [www.arguslab.com](http://www.arguslab.com)), un software de libre acceso que, además de ser un visualizador molecular, permite realizar cálculos de minimización energética y distribución de cargas puntuales a un muy bajo costo computacional. Los valores obtenidos fueron consistentes con los de *GROMACS*.

### 3.2.1.2. Consideraciones de pH

En un intento de emular condiciones biológicas o (al menos) *in vitro*, se decidió realizar los cálculos de interacción electrostática a distintos valores de pH. Como se describió anteriormente, la protonación de las proteínas no presentó inconvenientes gracias a la utilización de *PropKa*. Sin embargo, no existe a la fecha de escritura de esta tesis, un programa que asigne un estado de protonación a lípidos de acuerdo al pH del sistema de trabajo. Más aún, resulta sumamente difícil desarrollar uno que lo haga, considerando que gran parte del lípido en cuestión se encuentra en un medio hidrofóbico, rodeado por otros lípidos, mientras que los átomos que componen su cabeza polar se encuentran con distintos grados de exposición a un solvente polar. Por ello, se recurrió a los datos empíricos recabados de bibliografía existente (Francis *et al.*, 1986).

Tomando en consideración los valores de pKa calculados para fosfatidilcolina y fosfatidilserina contenidas en membranas fosfolipídicas, se estimó el estado de protonación y la distribución de carga de POPC y SOPS para los distintos pH de trabajo.

Los valores estimados se asignaron de forma manual para todos los lípidos que componen a las membranas.

## 4. INTERACCIONES ELECTROSTÁTICAS

### 4.1. Introducción a la electrostática de biomoléculas

#### 4.1.1. Electrostática: definición

La electrostática es la rama de la Física que estudia los efectos mutuos que se producen entre los cuerpos como consecuencia de su carga eléctrica cuando estos se encuentran en reposo en un sistema inercial, es decir, un sistema de referencia en que se cumplen las Leyes de Newton, en particular el Principio de Acción y Reacción de la Mecánica, lo que asegura que no es un sistema acelerado. Cabe recordar que todo sistema que se mueve con velocidad constante respecto de un sistema inercial, es a su vez inercial.

La carga eléctrica es la propiedad de la materia responsable de los fenómenos electrostáticos, cuyos efectos aparecen en forma de atracciones y repulsiones entre los

cuerpos que la poseen. Idealmente, se considera, que las cargas puntuales son cuerpos cargados cuyas dimensiones son despreciables frente a otras dimensiones del problema.

A pesar de su aparente irrealdad (ya que una carga no puede mantenerse inmóvil flotando en el espacio), la electrostática posee una gran aplicación ya que no solo describe aproximadamente situaciones reales, sino porque sirve de fundamento para otras situaciones electromagnéticas.

#### **4.1.2. Aplicación en el campo biológico**

Las interacciones electrostáticas en sistemas biológicos cumplen un rol fundamental en la definición de sus propiedades estructurales y funcionales a través de su influencia en el plegamiento, estabilidad conformacional, actividad enzimática e interacciones proteína-proteína. Esto se debe principalmente al largo alcance del potencial electrostático y a que tanto los aminoácidos como los ácidos nucleicos y algunos lípidos poseen una carga neta. Asimismo, muchas de las propiedades estructurales de las membranas celulares como la rigidez, estabilidad, transición lateral de fase y dinámica dependen sustancialmente de las interacciones electrostáticas. En relación a la función de proteínas, han sido reconocidos efectos de importancia producidos por los dipolos correlacionados de las hélices alfa (Hol *et al.*, 1978; Berendsen *et al.*, 1986).

La interacción electrostática entre partículas coloidales y macromoléculas a menudo desempeña un rol crucial en la estabilidad de estos sistemas (Harries *et al.*, 1998) (Israelachvili *et al.*, 1992). Sus orígenes provienen de distintas fuentes: la presencia de cargas locales, la polarización originada por la distribución no esférica de la densidad de electrones alrededor de los átomos, la redistribución de electrones causada por campos eléctricos locales (polarización electrónica) y la reorientación de grupos polares en el soluto y el solvente en respuesta a la presencia de un campo eléctrico.

Los modelos de cálculo electrostático deben adecuarse a los datos experimentales, describir correctamente el rol que cumplen estas fuerzas en la determinación de la estructura y funciones de biomacromoléculas y, en especial, permitir la predicción de dichas propiedades.

La distribución del potencial electrostático en macromoléculas influye directamente su funcionalidad y estabilidad. La forma de representar el potencial electrostático es

dibujando superficies en las cuales es constante; éstas se denominan superficies equipotenciales.

Desde el punto de vista computacional, los avances en la resolución numérica de las ecuaciones básicas que gobiernan estos fenómenos y el incremento del poder de cálculo, que hizo factible crear herramientas computacionales implementando algoritmos numéricos en tiempos de cálculo razonables, generó un gran interés en este campo en las últimas décadas.

Los algoritmos aplicados en estos sistemas resuelven la ecuación de Poisson-Boltzmann, cuyos componentes y resolución se describen a continuación.

## 4.2. Resolución del problema electrostático

### 4.2.1. Ecuación de Poisson-Boltzman

En una visión simplificada podría decirse que toda la materia es una mezcla de protones con carga positiva y electrones con carga negativa que se atraen y repelen con una gran fuerza. Cada carga genera fuerzas que actúan en el resto de las cargas en una cierta región a su alrededor. Esta fuerza, la fuerza de Lorentz, depende únicamente en la posición de la carga, de su velocidad y su valor:

$$\vec{F} = q(\vec{E} + \vec{v} \times \vec{B}) \quad (4.2.1)$$

donde  $\vec{E}$  es el campo eléctrico y  $\vec{B}$  el campo magnético en el punto donde se encuentra ubicada la carga. Estos campos son generados por las N-1 cargas circundantes, calculados como la suma vectorial de los campos individuales.

La teoría clásica del electromagnetismo se encuentra contenida completamente en las ecuaciones de Maxwell:

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{E} = \rho / \epsilon_0 \quad \text{Ley de Gauss} \quad (4.2.2)$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{E} = -\partial \vec{B} / \partial t \quad \text{Ley de Faraday} \quad (4.2.3)$$

$$c^2 \vec{\nabla} \times \vec{B} = \partial \vec{E} / \partial t + \vec{j} / \epsilon_0 \quad \text{Ley de Ampere} \quad (4.2.4)$$

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{B} = 0 \quad \text{Ley de Gauss para el campo magnético} \quad (4.2.5)$$

donde  $\rho$  es la densidad de carga eléctrica,  $\vec{j}$  es la densidad de corriente eléctrica y  $\epsilon_0$  es la constante de permitividad en el vacío.

Para cierta clase de análisis se adopta la siguiente simplificación: el comportamiento de una molécula en solución es descrito en términos de promedios temporales y espaciales de una estructura estática. Por lo tanto, el análisis será dentro del campo de la electrostática, es decir considerando cargas con velocidad nula. Entonces:

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{E} = \rho / \epsilon_0 \quad (4.2.6)$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{E} = 0 \quad (4.2.7)$$

$$\vec{B} = 0 \quad (4.2.8)$$

De la ecuación 4.3.7, es claro que el campo eléctrico puede expresarse como el gradiente de un potencial escalar; entonces se define al potencial electrostático como el campo escalar  $\varphi$  tal que:

$$\vec{E} = -\vec{\nabla} \cdot \varphi(\vec{r}) \quad (4.2.9)$$

O expresado en forma integral:

$$\varphi(\vec{r}) = - \int_{r_0}^r \vec{E} \cdot \vec{dl} \quad (4.2.10)$$

Es la energía potencial que tendría una carga unidad al ser trasladada al punto  $r$  desde el punto  $r_0$  de referencia.

Con la definición de esta nueva magnitud, se puede modificar la ley de Gauss (4.2.2) para obtener la ecuación de Poisson:

$$\nabla^2 \varphi(\vec{r}) = -\rho / \epsilon_0 \quad (4.2.11)$$

que es la ecuación que dará origen a aquella que rige la descripción de biomoléculas en un solvente acuoso. Por lo tanto, todo problema electrostático puede ser resuelto mediante el cálculo del potencial a partir de la distribución de cargas para luego obtener el campo eléctrico a partir de la ecuación 4.3.9.

Para proseguir en la deducción de la ecuación de Poisson-Boltzmann es necesario definir el sistema que será descrito por esta ecuación, así como también las simplificaciones y condiciones que se adoptarán. A diferencia de las simulaciones de dinámica molecular que realizan una descripción a nivel atómico, se pueden emplear modelos que resuelven el problema en el continuo. Es decir, se tratará a solutos y solventes como medios dieléctricos homogéneos donde las cargas se distribuyen en forma discreta o continua.

Existen distintas formas de describir la polarización electrónica; se recurrirá al modelo de dieléctrico uniforme en el cual se asume que todos los núcleos y dipolos se mantienen fijos en sus posiciones y por lo tanto la respuesta a un campo externo estará determinada únicamente por la polarización electrónica.

Se consideran dos regiones, la de la proteína y la del solvente, con distintas constantes dieléctricas. La constante dieléctrica refleja la reorientación de los dipolos debido a los campos eléctricos locales. El agua líquida, que posee una constante dieléctrica de 78.5 a 298 K, tiene cierta libertad en sus movimientos que le permite acomodarse. En cambio, los dipolos permanentes en las proteínas se encuentran fijos y la orientación de los dipolos inducidos deriva en una constante dieléctrica pequeña entre 2 y 4.

Las cargas del solvente se toman como un promedio. Si hay iones presentes en la fase acuosa, según la teoría de electrolitos de Debye-Huckel, su distribución está afectada por las cargas de la proteína y este efecto se traduce en la aparición una región con carga opuesta rodeando a la proteína. Este efecto se encuentra determinado por el potencial electrostático y la fuerza iónica de la solución.

La descripción de macromoléculas en medios acuosos implica entonces que la polarización en el medio no es uniforme y por lo tanto se puede encontrar una densidad de carga de polarización volumétrica  $\rho_{pol}$ . Esta se relaciona con el vector de polarización  $\vec{P}$  mediante:

$$\rho_{pol} = -\vec{\nabla} \cdot \vec{P} \quad (4.2.12)$$

Introduciendo esta ecuación en 4.3.11 y recordando que se puede expresar al vector de polarización como  $\vec{P} = \chi \epsilon_0 \vec{E}$ , donde  $\chi$  es la susceptibilidad lineal del material, se obtiene la ecuación de Poisson para medios dieléctricos en coordenadas Gaussianas:

$$\vec{\nabla}[\varepsilon(\vec{r})\vec{\nabla} \cdot \varphi(\vec{r})] + 4\pi\rho(\vec{r}) = 0 \quad (4.2.13)$$

donde  $\varepsilon(\vec{r}) = (1 + \chi)\varepsilon_0$  es la constante dieléctrica.

El último paso antes de encontrar la ecuación de Poisson-Boltzmann consiste en considerar la presencia de los iones en solución. La teoría de Debye-Huckel propone que la densidad de iones de un determinado tipo, por unidad de volumen, en una dada región del espacio depende exponencialmente de la carga del ión  $q_i$  y del potencial electrostático en esa región  $\varphi(r)$ :

$$n_i = n_i^0 e^{-\frac{q_i\varphi(r)}{kT}} \quad (4.2.14)$$

donde  $n_i^0$  es la densidad de electrones en el seno de la solución,  $k$  es la constante de Boltzmann y  $T$  es la temperatura.

Incorporando el efecto de los iones, la ecuación 4.3.13 puede expresarse ahora como:

$$\vec{\nabla}[\varepsilon(\vec{r})\vec{\nabla} \cdot \varphi(\vec{r})] + 4\pi\rho(\vec{r}) + 4\pi \sum_i q_i n_i^0 e^{\left[\frac{-q_i\varphi(r)}{k_B T}\right]} = 0 \quad (4.2.15)$$

Por último, se supone que la sal presente en el sistema es univalente, es decir, los cationes tienen carga  $e$  y los aniones  $-e$ . Si la concentración es de  $n$  Molar la densidad de carga debido a la sal es:

$$4\pi \sum_i q_i n_i^0 e^{\left[\frac{-q_i\varphi(r)}{k_B T}\right]} = en e^{\left[\frac{-e\varphi(r)}{k_B T}\right]} - en e^{\left[\frac{e\varphi(r)}{k_B T}\right]} = -2en \sinh\left[\frac{e\varphi(r)}{k_B T}\right] \quad (4.2.16)$$

Finalmente, incorporando esta densidad se obtiene la deseada ecuación de Poisson-Boltzmann:

$$\vec{\nabla}[\varepsilon(\vec{r})\vec{\nabla} \cdot \varphi(\vec{r})] + 4\pi\rho(\vec{r}) - \kappa^2(\vec{r})\varepsilon(\vec{r}) \sinh\left[\frac{\varphi(\vec{r})e}{Tk_B}\right] = 0 \quad (4.2.17)$$

donde  $\kappa^2 = \frac{8\pi eI}{\varepsilon(r)k_B T}$  es la longitud de Debye recíproca. Ésta es una ecuación diferencial parcial de segundo orden no lineal que relaciona el potencial electrostático ( $\varphi$ ) con las propiedades dieléctricas del soluto y del solvente ( $\varepsilon$ ), la fuerza iónica ( $I$ ) de la solución, la accesibilidad de los iones al interior del soluto ( $\kappa$ ), y la distribución de cargas parciales atómicas del soluto ( $\rho$ ). Así es como, a partir de la aparentemente simple ecuación de Poisson, se obtiene una ecuación de mayor complejidad que permite analizar las propiedades electrostáticas de biomoléculas en un medio acuoso (Petersen y Petersen, 2003).

#### **4.2.2. Métodos resolutivos de la ecuación de Poisson-Boltzman**

##### *4.2.2.1. Métodos numéricos*

El análisis numérico o cálculo numérico es la rama de la matemática encargada de diseñar algoritmos que permiten, mediante el uso de la aritmética, simular procesos matemáticos complejos que describen eventos físicos reales.

El advenimiento de los procesadores permite un profundo y rápido desarrollo de la aplicación de métodos numéricos al campo de la biología estructural y la biofísica, dado que pueden desarrollar cálculos matemáticos extremadamente complejos, utilizando números binarios y operaciones matemáticas simples.

Desde este punto de vista, el análisis numérico proporcionará todo el andamiaje necesario para llevar a cabo todos aquellos procedimientos matemáticos susceptibles de expresarse algorítmicamente, basándose en algoritmos que permitan su simulación o cálculo en procesos más sencillos.

Las operaciones matemáticas pueden resolverse a través de la generación de una serie de números que a su vez retroalimentan de nuevo el algoritmo. De esta manera, el procesador alcanza un poder de cálculo y refinamiento importantísimo que a medida que completa ciclos o iteraciones se aproxima a la solución. La dificultad reside en determinar cuántos ciclos deben realizarse y/o si con cada ciclo agregado el resultado se aleja de la solución del problema.

Otro concepto importante para el análisis numérico es el de la representación, tanto de los números como de otros conceptos matemáticos como los vectores, polinomios, etc. Para

la representación en computadoras de números reales, por ejemplo, se emplea el concepto de coma flotante que dista mucho del empleado por la matemática convencional.

En general, estos métodos se aplican cuando se necesita un valor numérico como solución a un problema matemático, y los procedimientos analíticos (manipulaciones algebraicas, teoría de ecuaciones diferenciales, métodos de integración, etc.) son incapaces de dar una respuesta. Es por ello que estos métodos son de uso frecuente en la física y en todas las ciencias donde las soluciones aproximadas son aplicables. Debe recordarse que tanto en la física experimental como en la biología, nunca se obtienen valores exactos, sino intervalos que engloban la gran mayoría de resultados experimentales obtenidos. Se conoce que en las experiencias empíricas de estas ciencias dos medidas del mismo fenómeno raramente arrojan valores exactamente iguales.

#### *4.2.2.2. Métodos analíticos*

Los métodos analíticos operan y valoran las expresiones matemáticas con lógica simbólica, al contrario de los numéricos que lo hacen sobre las expresiones numéricas. Si bien se espera de los métodos analíticos resultados de mayor exactitud, en muchos casos el volumen de cálculos requiere un tiempo de resolución tal que no resulta factible desde el punto de vista práctico.

Por otro lado, algunas expresiones matemáticas no encuentran su resolución por métodos analíticos.

#### **4.2.3. APBS**

*Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS)* (Baker *et al.*, 2001) es un paquete de programas para modelar biomoléculas en solución a través de la resolución de la ecuación de Poisson-Boltzmann (PB), unos de los más renombrados modelos para describir las interacciones electrostáticas entre moléculas en un medio de solución salina.

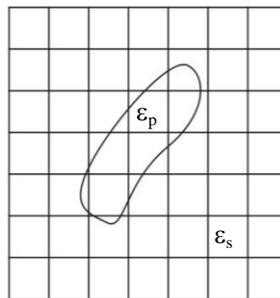
La electrostática del continuo juega un rol importante en muchas áreas de la simulación de biomoléculas, como por ejemplo: la simulación de procesos difusionales para determinar la cinética de interacción proteína-ligando y proteína-proteína; Dinámicas moleculares de biomoléculas con solvente implícito; cálculos de energía de solvatación para

determinar las constantes de equilibrio de unión entre proteína-ligando y proteína, ayudando así al diseño racional de drogas y; estudios de biomoléculas tritadas.

APBS ha sido diseñado para evaluar la electrostáticas en simulaciones que van desde las pocas decenas, hasta los millones de átomos en soluciones salinas y en solventes no polares.

#### 4.2.3.1. Funcionamiento

Debido a la complejidad que presentan las proteínas, la ecuación de PB no puede ser resuelta analíticamente y es por ello que se recurre a métodos numéricos, siendo el método de diferencias finitas el más usado. Este método, denominado FDPB (*Finite-Difference Poisson-Boltzmann*) consiste en determinar una grilla tridimensional de espaciado  $h$  que caracteriza una porción del espacio continuo, sobre la cual debe satisfacerse la ecuación de PB (**Figura 9**).



**Fig.9:** Ejemplo de red en dos dimensiones análoga a la empleada para resolver la ecuación de PB.

Las funciones continuas tales como densidad, potencial y constante dieléctrica son reemplazadas en las ecuaciones por sus valores en los puntos de la red, mientras que las derivadas se expresan como diferencias finitas en cada celda:

$$\frac{\partial \varphi}{\partial x} = \frac{1}{h} [\varphi_{i,j,k} - \varphi_{i-1,j,k}] \quad (4.2.18)$$

Reemplazando en la ecuación 4.2.17 se encuentra una formula en la cual el potencial en cualquier punto de la grilla depende de la carga y el valor de la longitud reciproca de Debye en ese punto, del espaciado  $h$  y de los valores del potencial y constantes dieléctricas en los 6 puntos vecinos:

$$\varphi_0 = \frac{(\sum_{i=1}^6 \varepsilon_i \varphi_i) + 4\pi q_0/h}{(\sum_{i=1}^6 \varepsilon_i) + (\bar{\kappa}_0 h)^2} \quad (4.2.19)$$

Los valores de  $\varepsilon_i$  se obtienen mediante la evaluación de la función  $\varepsilon(\vec{r})$  en los puntos intermedios de la red. Teniendo en cuenta lo dicho anteriormente, se adopta un valor de 2.0 para los puntos internos al espacio ocupado por la proteína y de 78.5 para los puntos correspondientes al solvente.

Se emplean condiciones de frontera de Debye-Hückel, es decir en el borde de la red se impone el valor del potencial previsto por el modelo de Debye-Hückel para una única esfera con una carga puntual. Esta esfera representa a la macromolécula, su carga y radio se encuentran dados por la carga y radio total de la proteína.

Mediante algoritmos iterativos, el cálculo de la energía electrostática en cada punto de la red es refinado hasta alcanzar la convergencia.

La estructura, estabilidad, solubilidad y función de las proteínas depende de su carga neta y el estado de ionización de los residuos individuales. Consecuentemente, es de gran interés conocer los valores de  $pK_a$  de los grupos ionizables en proteínas y como estos valores dependen de las condiciones del medio en el que se encuentran.

Dada una reacción de ionización  $H - A \rightleftharpoons H^+ + A^-$ , la constante de disociación ácida,  $K_a$  se define como:

$$K_a = \frac{(H^+)(A^-)}{(H - A)} \quad (4.2.20)$$

y generalmente se la expresa en forma de logaritmo como:

$$pK_a = -\log K_a \quad (4.2.21)$$

La constante de disociación ácida está relacionada con la energía libre de ionización y por lo tanto, de su valor depende si una reacción es favorable o no.

Ciertas cadenas laterales de aminoácidos contienen grupos que se ionizan a distintos valores de pH. Algunos poseen carga negativa cuando están por encima de su  $pK_a$  y no están cargados por debajo; por el contrario en otros sucede que por debajo están cargados

positivamente y son neutros por encima. Por lo tanto es necesario conocer los pKa de estos residuos insertos en la proteína en estudio. El valor de pKa varía en función de la exposición del residuo al solvente, el grado de inmersión dentro de la proteína, de los puentes de hidrógeno presentes, cargas externas y carga neta de la proteína (Pace *et al.*, 2009 ; Rostkowski *et al.*, 2011)

#### 4.2.3.2. Parámetros

En un intento por emular el sistema *in vivo*, los parámetros se ajustaron a valores correspondientes a los hallados en un ser vivo hipotético. Esto es:

- Concentración salina (NaCl) = 150 mM
- Temperatura = 310,15 °K
- Constante dieléctrica del solvente = 78,54

#### 4.2.4. Software esup.f

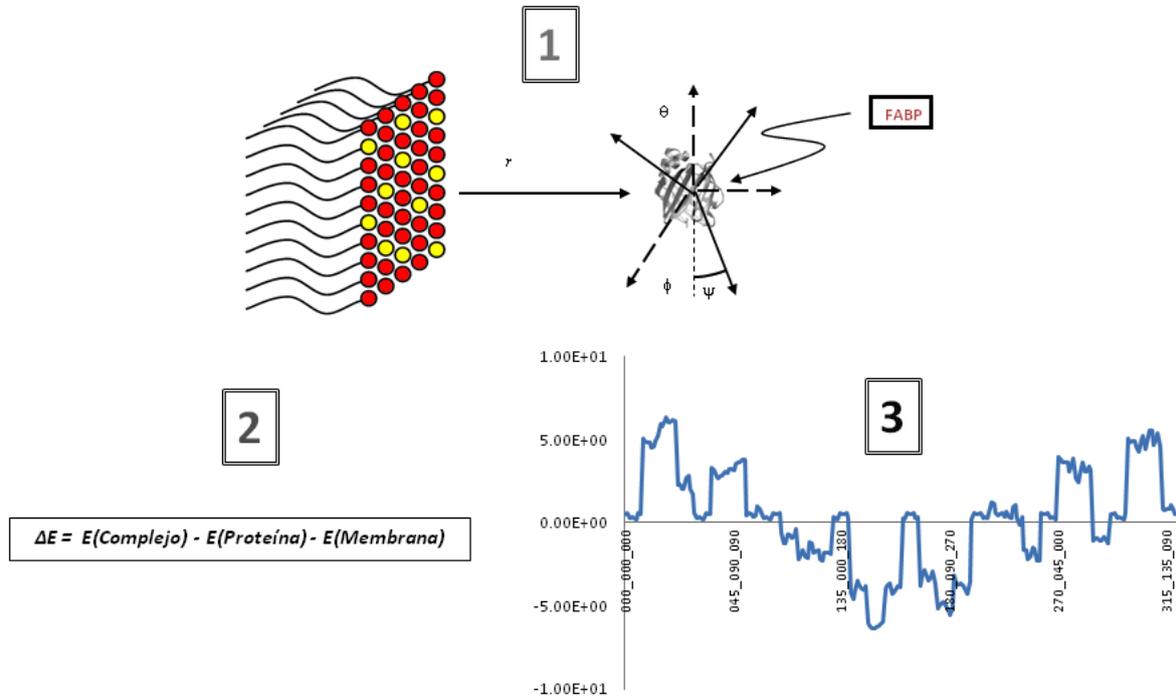
##### 4.2.4.1. Descripción

Para calcular la energía global del sistema proteína-membrana, desarrollamos un programa llamado *ESUP.f* (Vallejo *et al.*, 2009) en estándar *ANSI Fortran 77*. Dicho programa genera archivos *.pqr* de la proteína en distintas posiciones con respecto a la membrana. Los archivos sirven como *input* (archivos de entrada) para APBS. La automatización y el procesamiento de los datos antes, durante y después de correr los programas se llevaron a cabo con los lenguajes *Bash* y *gnuplot*. Para computar la energía de interacción, se muestreó el espacio de configuraciones con intervalos de  $\Delta\phi=\Delta\theta=\Delta\psi=45^\circ$  para  $0^\circ<\phi<360^\circ$ ;  $0^\circ<\theta<180^\circ$ ;  $0^\circ<\psi<360^\circ$  en el incremento de los ángulos de Euler, resultando en un total de 256 posiciones relativas.

##### 4.2.4.2. Funcionamiento

*ESUP.f* calcula, a través de APBS, la energía de los *.pqr* de membranas y proteínas en distintas posiciones relativas de ésta última (**Figura 10**). Para cada posición, se calcula el valor de energía electrostática del sistema para la proteína sola, la membrana sola y el sistema forado por ambas. La diferencia entre el sistema del conjunto menos la energía de los sistemas aislados es calculada como se muestra en la ecuación de la **figura 10**. Valores

inferiores a cero, indican posiciones de baja energía y presuntamente favorables para la interacción.



**Fig.10:** Se muestran los tres pasos del cálculo de la energía electrostática de la interacción proteína-membrana con el programa ESUP.f. **1** Rotación de la proteína en los ángulos de Euler; **2** Cálculo de  $\Delta E$  para las 256 posiciones generadas; **3** Gráfico de  $\Delta E$  vs posiciones relativas de interacción.

## 5. DINÁMICA MOLECULAR

### 5.1. Introducción a la Dinámica Molecular

#### 5.1.1. Métodos de Mecánica Cuántica

Los métodos cuánticos de DM utilizan las leyes de la Mecánica Cuántica (MC) como base, es decir, la energía y otras propiedades se determinan resolviendo la ecuación de Schrödinger. Los distintos métodos de estructura electrónica se caracterizan por sus distintos niveles de aproximación a la solución exacta de la misma. Básicamente se pueden clasificar en:

- 1) Métodos *ab-initio*. Se basan solamente en primeros principios. Sin embargo, esto no significa que las soluciones obtenidas no tengan aproximaciones.
- 2) Métodos semiempíricos. Se basan en el formalismo de Hartree-Fock y utilizan parámetros derivados de resultados experimentales para simplificar los cálculos. El más antiguo de los métodos semiempíricos es el propuesto por Hückel en 1931. Actualmente, los métodos semiempíricos más difundidos son los conocidos con las siglas MNDO, MINDO, AM1, etc.

### 5.1.2. Métodos de Mecánica Molecular

Los métodos de simulación a través de dinámica molecular se basan en la resolución de la ecuación de movimiento de Newton 5.1.1 para cada partícula de un sistema dado a través del tiempo, de esta forma se obtiene una serie de configuraciones sucesivas que exploran el espacio de las fases. Es un método determinístico, es decir, se pueden predecir los estados futuros a partir del estado actual del sistema teniendo en cuenta las fuerzas involucradas.

$$\bar{F} = m\bar{a} \quad (5.1.1)$$

A diferencia de los métodos Cuánticos, en los cuales se representan explícitamente los electrones y por lo tanto son útiles cuando se quiere conocer propiedades que dependan de la distribución electrónica (reacciones químicas), la mecánica molecular adopta la aproximación de Born-Oppenheimer; ignora el movimiento de los electrones y calcula la energía del sistema como función de la posición de los núcleos, llegando a resultados tan precisos como los de los primeros en una fracción de tiempo.

Dado que la fuerza en cada partícula depende de la posición relativa respecto del resto de las  $N-1$  partículas, es imposible, en la mayor parte de los casos, describir en forma analítica el movimiento del sistema. Es por esto que se emplean distintos algoritmos de diferencia finita para integrar las ecuaciones de movimiento. En estos métodos la integración se separa en pequeños pasos separados por un intervalo de tiempo  $\delta t$ . La fuerza total en una partícula se calcula en cada paso como la suma vectorial de la interacción con el resto de los átomos y se toma como constante durante todo el intervalo. En cada paso se obtienen nuevas posiciones y velocidades, con las cuales se calculan las fuerzas

correspondientes a esa configuración y se procede a una nueva integración. Se asume que las posiciones y sus derivadas se pueden aproximar como series de Taylor de manera tal de poder calcular su valor en un tiempo  $t+\delta t$  si se conoce en  $t$ :

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = \mathbf{r}(t) + \delta t \mathbf{v}(t) + \frac{1}{2}\delta t^2 \mathbf{a}(t) + \frac{1}{6}\delta t^3 \mathbf{b}(t) + \dots \quad (5.1.2)$$

$$\mathbf{v}(t + \delta t) = \mathbf{v}(t) + \delta t \mathbf{a}(t) + \frac{1}{2}\delta t^2 \mathbf{b}(t) + \dots \quad (5.1.3)$$

$$\mathbf{a}(t + \delta t) = \mathbf{a}(t) + \delta t \mathbf{b}(t) + \dots \quad (5.1.4)$$

donde  $\mathbf{r}$  es el vector posición de una partícula,  $\mathbf{v}$  es la velocidad o primera derivada,  $\mathbf{a}$  es la aceleración o segunda derivada y  $\mathbf{b}$  es la tercera derivada de la posición respecto al tiempo.

De la gran cantidad de algoritmos existentes, los más empleados son el algoritmo de Verlet y sus variaciones. Entre ellas se encuentra el algoritmo *Leap-Frog*, que es el que se empleó en este trabajo y se caracteriza por las siguientes relaciones:

$$\mathbf{r}(t + \delta t) = \mathbf{r}(t) + \delta t \mathbf{v}\left(t + \frac{1}{2}\delta t\right) \quad (5.1.5)$$

$$\mathbf{v}\left(t + \frac{1}{2}\delta t\right) = \mathbf{v}\left(t - \frac{1}{2}\delta t\right) + \delta t \mathbf{a}(t) \quad (5.1.6)$$

Con el objetivo de disminuir el número de fuerzas que actúan sobre una partícula se emplean dos conceptos, por un lado el de *cut off*  $r_s$ , que provee un radio a partir del cual no se tomarán en cuenta las interacciones de largo alcance. Por otro, se genera una lista de vecinos que se encuentran a una distancia menor a un valor  $r_n$ , y sólo estos se usarán para computar las interacciones de corto alcance.

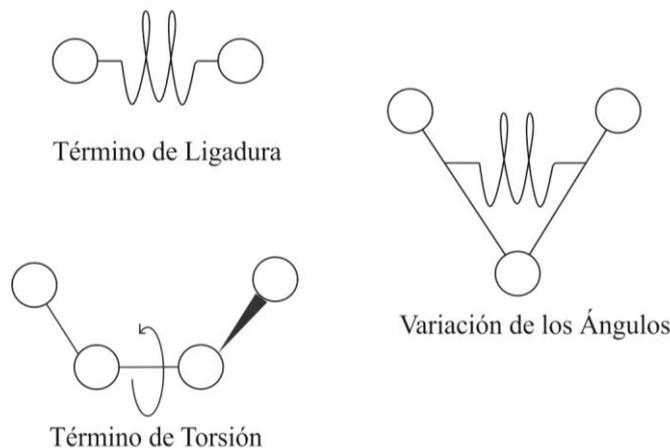
De manera tal de tener una visión más realista se emplean condiciones periódicas de borde (PBC, *Periodic Boundary Contitions*), en las cuales la celda de simulación es repetida infinitas veces a lo largo de las tres dimensiones cartesianas. Así se elimina todo efecto de superficie debido a las dimensiones finitas de la celda. El número total de partículas es constante, si una partícula deja la celda vuelve a entrar desde el lado opuesto.

Las interacciones se encuentran descriptas a partir de campos de fuerza empíricos. Su característica más destacable es su capacidad de transferencia, ya que se pueden desarrollar y probar en sistemas simples para luego ser aplicados en problemas más complejos. Si bien

existen diferentes campos de fuerza, su forma básica comprende interacciones a distancia y entre átomos unidos:

$$\begin{aligned}
 \mathcal{V}(r^N) = & \sum_{\text{enlaces}} \frac{k_i}{2} (l_i - l_{i0})^2 + \sum_{\text{ángulos}} \frac{k_i}{2} (\theta_i - \theta_{i0})^2 + \sum_{\text{Torsiones}} \frac{V_n}{2} (1 + \cos (n\omega + \gamma)) \\
 & + \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \left( 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right) \quad (5.1.7)
 \end{aligned}$$

Este es un ejemplo típico de campo de fuerzas, en el cual se describe la energía potencial que depende de la posición de las N partículas. El primer término de la derecha modela la interacción entre pares de átomos enlazados a través de un potencial armónico, tal que aumenta la energía si la distancia de enlace se desvía respecto de su valor de referencia. El segundo término, nuevamente representado como un potencial armónico, muestra la variación de los ángulos de valencia (ángulo formado entre tres átomos A-B-C, con A y C unidos a B). La tercera contribución representa el cambio de energía a medida que rota un enlace (potencial torsional) (**Figura 11**). Por último, el cuarto término representa las interacciones a distancia, calculado entre todos los pares de átomos del sistema separados al menos por tres uniones. Generalmente se emplea el potencial de Coulomb para las interacciones electrostáticas y el de Lennard-Jones para las interacciones de Van der Waals.



**Fig.11:** Representación esquemática de las principales contribuciones del tipo enlazante a los campos de fuerza.

Los campos de fuerza pueden clasificarse de acuerdo al detalle con el que se representan los sistemas. Se denominan Atomísticos (*All Atoms*) a aquellos que representan explícitamente todos los átomos, Átomos Unidos (*United Atoms*) a los que no describen explícitamente a los hidrógenos no polares (se modifican los parámetros de los átomos pesados a los que está unido el hidrógeno ya que se los toma como un solo átomo, generalmente el carbono) y Grano Grueso (*Coarse Grain*), modelos mucho más simplificados en el que un grupo de átomos es reemplazado por una esfera que posee cualidades similares al promedio de los átomos simplificados.

En este trabajo se utilizó el campo de fuerza 53A6 (Oostenbrink *et al.*, 2004) con modificaciones para lípidos de Berger (Berger *et al.*, 1997).

Las simulaciones de DM generan trayectorias en el espacio de las configuraciones, estos estados microscópicos son relacionados, a partir de la aplicación de la mecánica estadística, con propiedades macroscópicas como temperatura y presión. Existen distintos ensambles en los cuales se puede realizar la simulación: el ensamble microcanónico (NVE), el canónico (NVT) y el isotérmico-isobárico (NPT) entre otros. En todos los casos el número de moléculas del sistema es una constante, además, se conservan en el primero el volumen y la energía interna, en el segundo el volumen y la temperatura y, en el último, presión y temperatura. Cada uno posee su propia densidad de probabilidad del sistema que conlleva un desarrollo teórico particular. En este trabajo se empleó tanto el canónico como el isotérmico-isobárico; este último es de particular interés ya que muchos trabajos experimentales se realizan bajo estas condiciones.

#### *Control de la presión y la temperatura*

Existen diversos métodos para controlar la temperatura y la presión del sistema, y su cálculo suele ser muy demandante en términos computacionales. En este trabajo se adoptaron el baróstato y termostato de Berendsen, ya que poseen un buen balance entre precisión y tiempo de cómputo.

El termostato de Berendsen mantiene la temperatura constante mediante el acoplamiento del sistema a un baño térmico externo que actúa como una fuente de energía térmica. Esto se logra re-escalando las velocidades en cada paso de tiempo de manera tal que el cambio de temperatura sea proporcional a la diferencia en temperatura entre el baño y el sistema:

$$\frac{dT(t)}{dt} = \frac{1}{\tau} (T_{BT} - T(t)) \quad (5.1.8)$$

donde  $\tau$  es un parámetro de acoplamiento elegido por el usuario.

El factor de escala para las velocidades puede calcularse teniendo en cuenta que la temperatura se encuentra relacionada con la energía cinética a partir del principio de equipartición:

$$\langle \mathcal{K} \rangle_{NVT} = \frac{3}{2} N k_B T \quad (5.1.9)$$

Entonces si la temperatura en un tiempo  $t$  es  $T(t)$  y las velocidades se multiplican por un factor  $\lambda$ , el cambio de temperatura se puede calcular como:

$$\Delta T = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \frac{2}{3} \frac{m_i (\lambda v_i)^2}{N k_B} - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \frac{2}{3} \frac{m_i v_i^2}{N k_B} = (\lambda^2 - 1) T(t) \quad (5.1.10)$$

Y el factor de escala en este caso es:

$$\lambda^2 = 1 + \frac{\delta t}{\tau_T} \left( \frac{T_{BT}}{T(t)} - 1 \right) \quad (5.1.11)$$

En las simulaciones que emplean el ensamble isobárico-isotérmico la presión se mantiene constante al modificar el volumen de la celda de simulación. Al igual que en el termostato, en el baróstato de Berendsen la presión se mantiene constante al acoplar el sistema con un baño de presión, re-escalando el volumen en cada paso de tiempo. El cambio en la presión está dado por:

$$\frac{dP(t)}{dt} = \frac{1}{\tau_P} (P_{BP} - P(t)) \quad (5.1.12)$$

siendo  $\tau_P$  nuevamente una constante acoplamiento que depende del sistema en estudio.

Para encontrar el factor de escala empleamos la ecuación anterior y la definición de compresibilidad isotérmica:

$$\kappa = -\frac{1}{V} \left( \frac{\partial V}{\partial P} \right)_T \quad (5.1.13)$$

obteniendo un factor de escala para el volumen de la forma:

$$\lambda = 1 - \kappa \frac{\delta t}{\tau_P} (P - P_{BP}) \quad (5.1.14)$$

Una ventaja de este barómetro es que permite ser aplicado isotrópicamente o anisotrópicamente.

## 5.2. Programas de Dinámica Molecular

Se encuentran disponibles en la red numerosos programas de modelado molecular de distinto origen y con diferentes aplicaciones. Si bien todos ellos se basan en la física newtoniana o en métodos cuánticos, presentan diferentes aproximaciones al momento de resolver las ecuaciones y/o utilizan parámetros obtenidos por distintos métodos. En resumen, la diferencia reside en los campos de fuerza utilizados.

Los programas de mayor difusión junto con una breve descripción de los mismos se puede encontrar en la **Tabla III**.

**Tabla III.** Programas de DM de uso común en la investigación de sistemas bioquímicos. Adaptado de la página oficial de la Red Latinoamericana de Química. [http://www.relaq.mx/RLQ/mecanica\\_molecular.html](http://www.relaq.mx/RLQ/mecanica_molecular.html)

Programa	Desarrollador	Descripción
<b>Amber</b>	Weiner y Kollman, 1981.	<i>Assisted Model Building wuth Energy refinement</i> (AMBER), es un programa de modelado molecular que utiliza campos de fuerza para la simulación de biomoléculas. Su distribución es libre y gratuita.
<b>CHARMM</b>	Brooks <i>et al.</i> , 1983.	<i>Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics</i> (CHARMM). Programa para simulaciones en DM y Monte Carlo desarrollado en la Universidad de Harvard.
<b>GMMX</b>	<i>Serena Software</i>	Minimización de energía estérica con campo de fuerza MMX.
<b>GROMACS</b>	Spoel <i>et al.</i> , 2005.	Se describe en detalle más adelante.
<b>GROMOS</b>	van Gunsteren <i>et al.</i> , 1987.	Desarrolla DM y Dinámica Estocástica para el estudio de biomoléculas en solución o en estado cristalino. De distribución libre y gratuita.
<b>HyperChem</b>	HALLoGRAM Publishing, Aurora CO.	Antiguo programa de DM y MC aún utilizado en el ámbito de la química y el estudio de materiales. Requiere licencia.

<b>Macromodel</b>	SCHRÖDINGER	Paquete de programas para DM y MC en de biomoléculas en solución. Requiere licencia.
<b>NAMD</b>	Phillips <i>et al.</i> , 2005.	Desarrollado en base a CHARMM, permite correr en paralelo.

### 5.3. GROMACS

GROMACS (*GR*oningen *MA*chine for *C*hemical *S*imulations) es un paquete versátil para desarrollar dinámica molecular que utiliza modelos de física clásica para analizar el movimiento de unas centenas a millones de partículas. Se diseñó originalmente para moléculas biológicas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos que poseen numerosas interacciones no covalentes. Aún así, también se utiliza para el análisis de polímeros no biológicos.

#### 5.3.1. ¿Por qué GROMACS?

Existen hoy día una cantidad enorme y creciente de programas para el desarrollo de simulaciones de dinámica molecular, sin embargo, por cuestiones de tiempo y economía de recursos, se hace indispensable reducir las opciones drásticamente. En el caso de ésta tesis en particular, se eligió desarrollar las dinámicas con un solo programa. De esta manera, queda claro que la elección se realizó luego de un concienzudo análisis de las ventajas y desventajas de diferentes programas. A continuación, se enumeran y describen las razones de la elección de GROMACS por sobre el resto de los paquetes existentes.

- 1- Gracias a la optimización de algoritmos constantemente introducidos en el programa, GROMACS es uno de los programas de mayor performance.
- 2- Se trata de un programa “amigable”, que permite el acceso al modelado a aquellos que provenimos de las ciencias naturales con conocimientos básicos de física. Asimismo, los archivos de topología son razonablemente simples aún

cuando contienen gran cantidad de información. Los comandos utilizados son altamente intuitivos.

- 3- Durante la simulación, el programa comunica al usuario el estado del cálculo y el tiempo estimado de finalización lo que permite optimizar y coordinar el tiempo de corrida de numerosos sistemas.
- 4- Los archivos de salida son sencillos de analizar. Todos poseen la información necesaria para realizar un análisis completo y en un formato poco crítico.
- 5- GROMACS corre en paralelo, escalando de manera notable. Además, las últimas versiones permiten utilizarse en GNU, lo que implica una ventaja económica al adquirir equipos.
- 6- Incluye un generador automático de topologías, no sólo para aminoácidos, sino también aminoácidos modificados, nucleótidos y desoxinucleótidos, azúcares, lípidos y otros grupos como grupo hemo y moléculas pequeñas.
- 7- Los desarrolladores de GROMACS permiten a los usuarios sugerir y aplicar cambios y mejoras al programa. Esto permite que miles de expertos a nivel mundial participen de la evolución del programa. Gran cantidad de publicaciones se basan en someter a prueba distintos aspectos de este paquete informático.
- 8- GROMACS es un programa de distribución **libre y gratuita**.

## **5.4. Inputs de GROMACS**

### **5.4.1. Archivo .gro**

El archivo *.gro* es el equivalente al archivo *.pdb* de los visores de estructura. Posee las coordenadas tridimensionales, el número total de átomos y su descripción.

### 5.4.2. Archivo .tpr

Los archivos de extensión *.tpr* contienen la estructura de inicio de la simulación, la topología molecular y todos los parámetros necesarios para la simulación. No se trata de un archivo de lectura.

### 5.4.3. Archivo .mdp

Los archivos *.mdp* contienen la información respecto al termostato, baróstato, tiempo de la dinámica, duración del paso de cálculo, etc. Por lo tanto, es este archivo de entrada el que permite fijar los parámetros en los que se desarrollará la DM. A continuación se presentan dichos parámetros conjuntamente con su descripción y la especificación de las condiciones de corrida que se implementaron en el presente trabajo (**Tabla IV**).

**Tabla IV.** Descripción de los parámetros del archivo *.mdp* utilizado en las DM desarrolladas en el presente trabajo.

Parámetro	Descripción	Condición específica en corrida.
<b>constraints</b>	Fija distancias de unión y ángulos entre átomos.	<i>All-bonds</i> : convierte todas las uniones a los parámetros que tiene según su biblioteca.
<b>integrator</b>	Algoritmo utilizado para integrar la ecuación de Newton.	<i>md</i> : Utiliza el algoritmo <i>leap-frog</i> .
<b>dt</b>	Tiempo mínimo de integración. Especifica la duración de cada "paso" de la DM.	<i>0,002 ps</i> : Basado en la frecuencia de vibración de la unión H-O en la molécula de agua.
<b>nsteps</b>	Número de pasos por corrida.	<i>500.000</i> : Se realizaron corridas relativamente cortas (1000 ps) a efectos de controlar los resultados periódicamente.
<b>nstcomm</b>	Frecuencia (en pasos) en la que el movimiento del centro de masa es actualizado.	<i>10.000</i> : Dada la extensión de la corrida, se eligió un número que permita visualizar las variaciones en el comportamiento del sistema, sin generar archivos
<b>nstxout</b>	Frecuencia (en pasos) en la que las coordenadas	excesivamente grandes.

	atómicas son escritas en el archivo de salida.	
<b><i>nstfout</i></b>	Frecuencia (en pasos) en la que las velocidades atómicas son escritas en el archivo de salida.	0: Se escriben velocidades de todos los pasos.
<b><i>nstfout</i></b>	Frecuencia (en pasos) en la que las fuerzas son escritas en el archivo de salida.	0: Se escriben fuerzas de todos los pasos.
<b><i>nstlist</i></b>	Frecuencia (en pasos) en la que se actualiza la lista de átomos vecinos y, por lo tanto, las interacciones no ligadas.	>0: Se actualiza con la velocidad y la fuerza con los átomos vecinos, permitiendo analizar como son afectadas por las interacciones de átomos de distintas moléculas (membrana y proteína en este caso).
<b><i>nstenergy</i></b>	Frecuencia (en pasos) en la que se actualiza la energía en el archivo de energías.	10.000: de esta manera se equipara con <i>nstcomm</i> y <i>nstxout</i> .
<b><i>Nstlog</i></b>	Frecuencia (en pasos) en la que se escriben las energías en el archivo de salida.	10.000: <i>nstcomm</i> y <i>nstxout</i> .
<b><i>ns_type</i></b>	Método para verificar átomos vecinos no ligandos.	<i>grid</i> : Construye una grilla y calcula las interacciones de los átomos entre celdas vecinas. Se elige por su velocidad.
<b><i>rlist</i></b>	Distancia de corte en nm para las interacciones no ligadas de corto alcance.	1.2: Distancia recomendada para estudio de proteínas por GROMACS.
<b><i>rcoulomb</i></b>	Distancia de corte para las fuerzas coulombianas.	
<b><i>rvdw</i></b>	Distancia de corte para las	

	fuerzas de Lennard-Jones.	
<b>coulombtype</b>	Método para el cálculo de energías electrostáticas	<i>PME (Particle-Mesh Ewald)</i> : Permite calcular las interacciones dividiendo los Potenciales en dos clases, de corto alcance y largo alcance. Los primeros se resuelven empleando una modificación de la ley de Coulomb, mientras que los últimos son resueltos en el espacio recíproco usando una transformada rápida de Fourier.
<b>fourierspacing</b>	Tamaño, en nm, de la grilla utilizada para calcular la fuerza electrostática.	<i>0,12</i> : Distancia seteada por defecto para <i>PME</i> .
<b>pme_order</b>	Orden de interpolación de <i>PME</i> .	<i>4</i> : Interpolación de orden cúbico.
<b>ewald_rtol</b>	Fuerza relativa del potencial de Ewald	$1 \times 10^{-5}$ : Valor seteado por defecto para <i>PME</i> .
<b>Tcoupl</b>	Termostato utilizado	<i>Berendsen</i> : algoritmo que reescala las velocidades de las partículas en la DM de acuerdo a la temperatura del baño térmico.
<b>tau_t</b>	Tiempo en ps en la que las partículas igualan la temperatura del baño térmico.	<i>0,2 ps</i> .
<b>tc-grps</b>	Grupos que componen el sistema para los que el baño térmico acopla la temperatura.	<i>protein</i> : Proteína. <i>SOLION</i> : Agua y electrolitos ( $\text{Na}^+$ y $\text{Cl}^-$ ). <i>Membrane</i> : POPC y SOPS.
<b>ref_t</b>	Temperatura utilizada para cada grupo.	En todos los casos se realizaron los primeros 1000 ps a 100K, luego 1000 ps a

		200K, otros 1000 ps a 300K, para finalizar con 17000ps a 310K. Se evitó así un reordenamiento brusco del sistema.
<b>Pcoupl</b>	Barostato utilizado	<i>Berendsen</i>
<b>tau_p</b>	Tiempo en ps en la que las partículas igualan la presión dada por el baróstato.	<i>2,0 ps</i>
<b>compressibility</b>	Compresibilidad del sistema en $\text{bar}^{-1}$	$4,5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$
<b>ref_p</b>	Presión en bar utilizada para cada eje cartesiano.	<i>1,0</i>
<b>pcoupltype</b>	Acoplamiento de presión.	<i>Semiisotrópico:</i> Acopla las presiones para los ejes X e y de manera independiente a Z. Se utiliza en sistemas de membranas biológicas para mantener la estructura de bicapa.
<b>gen_vel</b>	Generador de velocidades.	<i>yes:</i> Genera velocidades en el sistema de acuerdo a la distribución de Maxwell a la temperatura establecida en <i>gen_temp</i> . Se utilizo en la primera DM de todos los sistemas. Luego se eligió la opción <i>No</i> , que continua con la velocidad que el sistema acarrea de la DM anterior.
<b>gen_temp</b>	Temperatura con la que se generará la velocidad en <i>gen_vel</i> .	<i>100K:</i> Sólo para los primeros 1000 ps, ya que se utiliza exclusivamente si se optó por <i>yes</i> en <i>gen_vel</i> .
<b>gen_seed</b>	Generador aleatorio de velocidades.	Utiliza un número de 5 cifras que define aleatoriamente las direcciones y velocidades con las que si inicia la DM.

# RESULTADOS

*“Evito siempre predecir de antemano,  
porque es mucho más fácil hacerlo a posteriori.”*

Sir Winston L. Churchill.-

---

## **Capítulo 1**

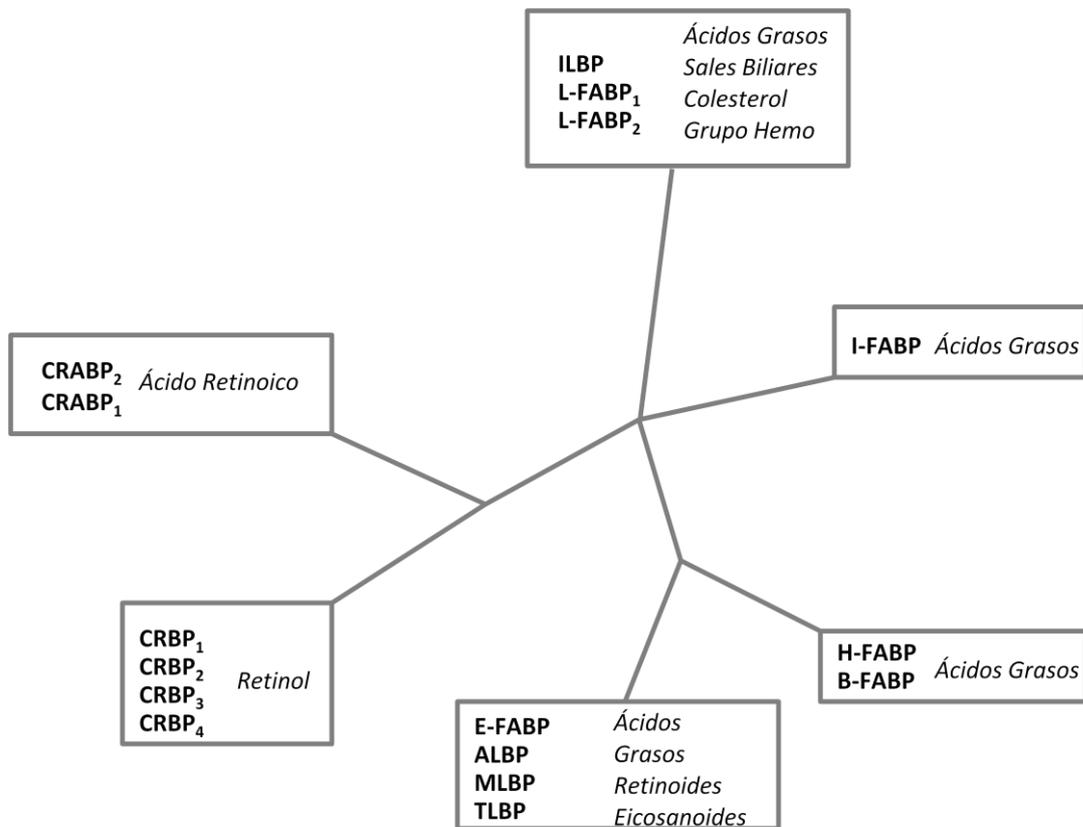
### ***Estudio filogenético de la familia FABP***

---

## 1. SUPERFAMILIA DE PROTEÍNAS QUE UNEN LÍPIDOS

### 1.1. Filogénesis de la superfamilia

La superfamilia de proteínas intracelulares que unen lípidos (*intracellular Lipid Binding Proteins*, iLBP) se compone de un enorme número de proteínas con capacidad de ligar un amplio espectro de lípidos y moléculas derivadas. Schaap y colaboradores mostraron, en 2002, que las iLBP se segregan en *clusters* asociados al tipo de ligando que unen (**Figura 12**).



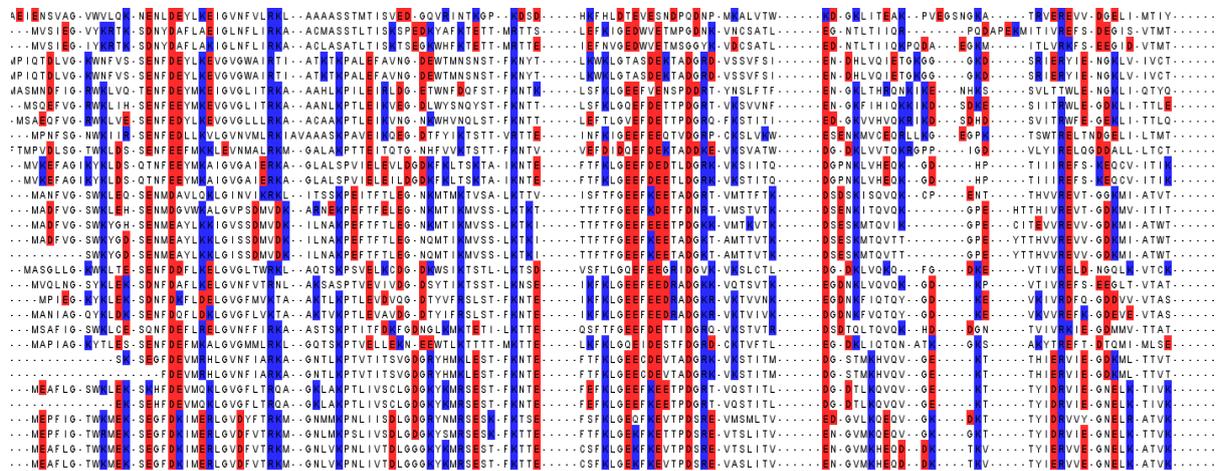
**Fig.12:** Árbol filogenético de la superfamilia de iLBP. Adaptado de Schaap et al, 2002.

De la superfamilia, se tomó la familia FABP para desarrollar el presente trabajo.

**1.2. Alineamiento de la familia FABP**

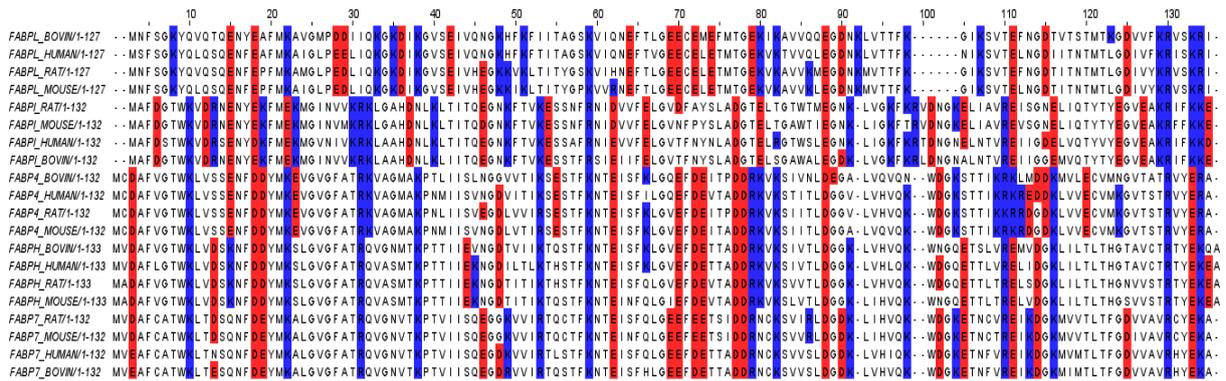
El alineamiento de la familia FABP supone un arduo trabajo computacional debido al gran número de estructuras primarias de FABPs conocidas. Por este motivo, los resultados del alineamiento se muestran por fragmentos que resulten legibles.

En el fragmento del alineamiento mostrado en la **figura 13**, se observa la falta de conservación de aminoácidos cargados en posiciones determinadas. Sin embargo, observando con detenimiento, se descubre que en esta sección de la imagen se encuentran alineadas proteínas cuyo origen pertenece a animales de distinta clase. Cabe aclarar que, si se permite el agregado de espacios en blanco (*gaps*) al programa de alineamiento, algunos residuos cargados parecen alienarse, pero no ocurre lo mismo en el arreglo tridimensional de la proteína. Sin embargo cuando se analiza el alineamiento de las FABP pertenecientes a animales de la misma clase se puede observar una evidente conservación de residuos. (Figura 14).



**Fig.13:** Alineamiento de la familia proteica FABP. Los residuos resaltados en rojo, señalan aminoácidos de carga negativa como ASP y GLU. Los residuos de carga neta positiva, como LYS y ARG, se señalan en azul. Las líneas punteadas indican los gaps. Nótese la falta de conservación de residuos cargados para éste fragmento del alineamiento, donde las proteínas pertenecen a especies de distinta clase.

## Resultados



**Fig.14:** Fragmento del alineamiento de la familia proteica FABP. Los residuos resaltados en rojo, señalan aminoácidos de carga negativa como ASP y GLU. Los residuos de carga neta positiva, como LYS y ARG, se señalan en azul. La imagen muestra gran conservación de aminoácidos cargados para especies de una misma clase.

### 1.3. Alineamiento de FABPs de mamíferos

El alineamiento de FABPs de mamíferos arroja como resultado residuos cargados altamente conservados en FABPs interespecies, que comparten el mismo tejido de origen (**Figura 15**). Es decir, la conservación de la carga de los aminoácidos se presenta en proteínas de distintos animales pero que se originan en los mismos tejidos.

Sin embargo, tal y como se observa en la **figura 15**, la conservación de la carga no parece presentar una conservación estricta de la posición del residuo, sino con la existencia de aminoácidos cargados en una misma región determinada. En otras palabras, se encuentran regiones con residuos de carga conservada, que permiten la permanencia de un signo de carga neta en el arreglo tridimensional de proteínas del mismo tejido y distinta especie (**Figura 16 A y B**).

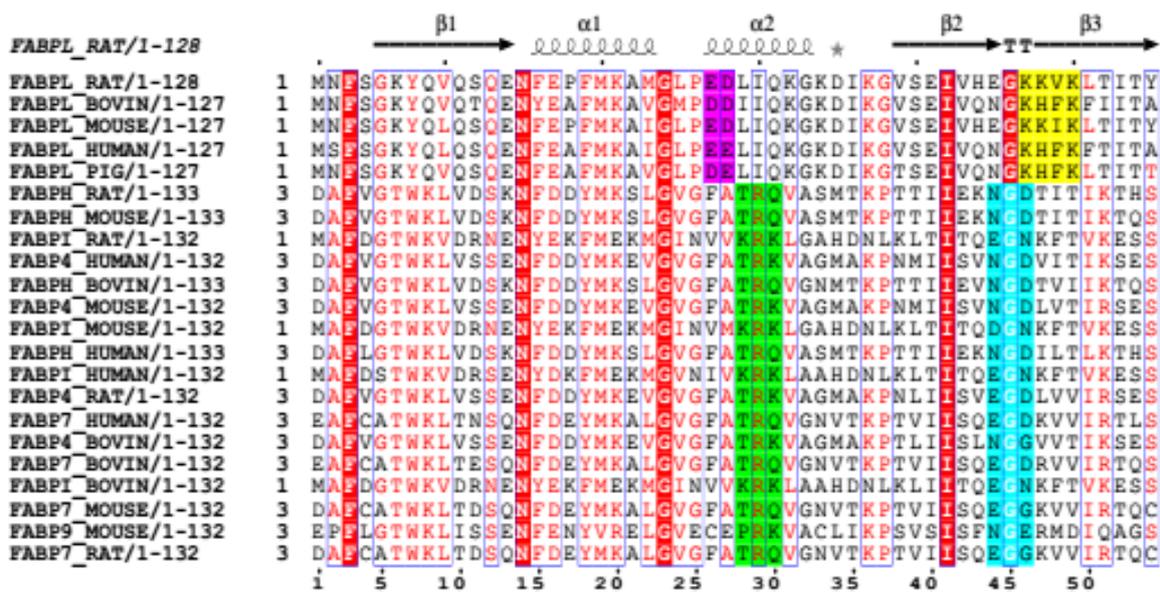
Estas regiones de carga conservada, no presentan necesariamente el mismo número de cargas, sino que en conjunto, presentan una carga de igual signo para cada uno de los grupos proteicos, aunque el número de cargas puede variar.

Esta conservación de regiones cargadas divide a las FABPs de mamíferos estudiadas en dos grandes grupos. Un grupo involucra las FABP de hígado (LFABPs), mientras que por otro

## Resultados

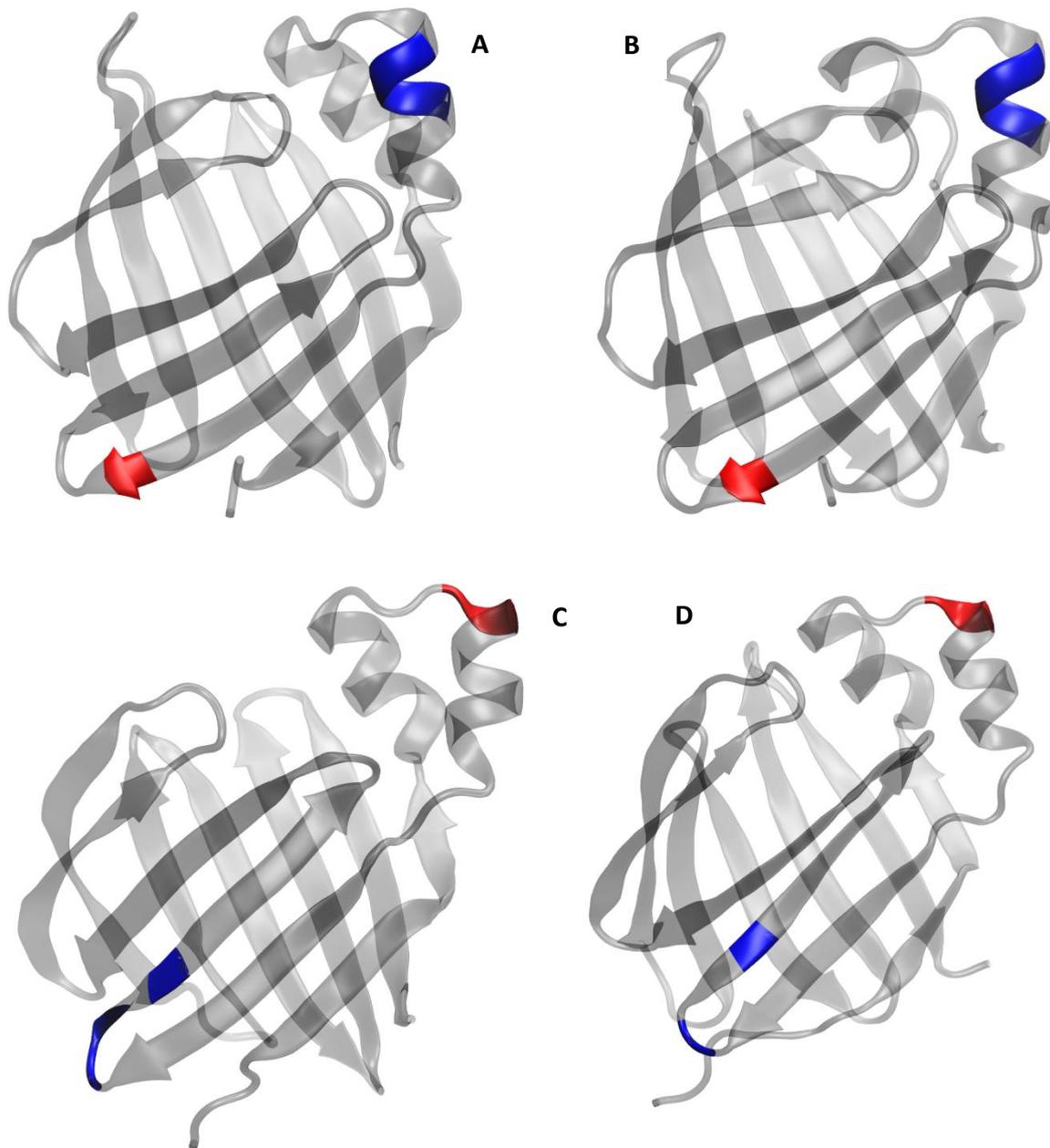
lado, se agrupan las FABP pertenecientes a tejido entérico, adiposo, muscular, etc., tal cual lo muestra la **figura 15**.

De esta manera, la generación de *cluster* descriptos en bibliografía y la segregación de las FABPs según su mecanismo de interacción con membrana, coinciden con la distribución de carga neta en regiones determinadas descriptas en estos resultados.



**Figura 15:** Alineamiento de diferentes FABPs de mamíferos. Aunque se encuentran residuos cargados distribuidos en toda la superficie de diferentes FABPs, aquellos aminoácidos cargados que se encuentran altamente conservados podrían ser los responsables de direccionar la proteína en su interacción con membrana. Se define residuos informativos a aquellos conservados dentro de las subfamilias, pero variables a lo largo de toda la alineación (residuos resaltados). Se observan aminoácidos negativos / positivos en la región de hélice para FABPs difusionales / colisionales (púrpura / verde). Zonas negativas / positivas en la región de barril beta para FABPs difusionales / colisionales (amarillo / cian).

## Resultados

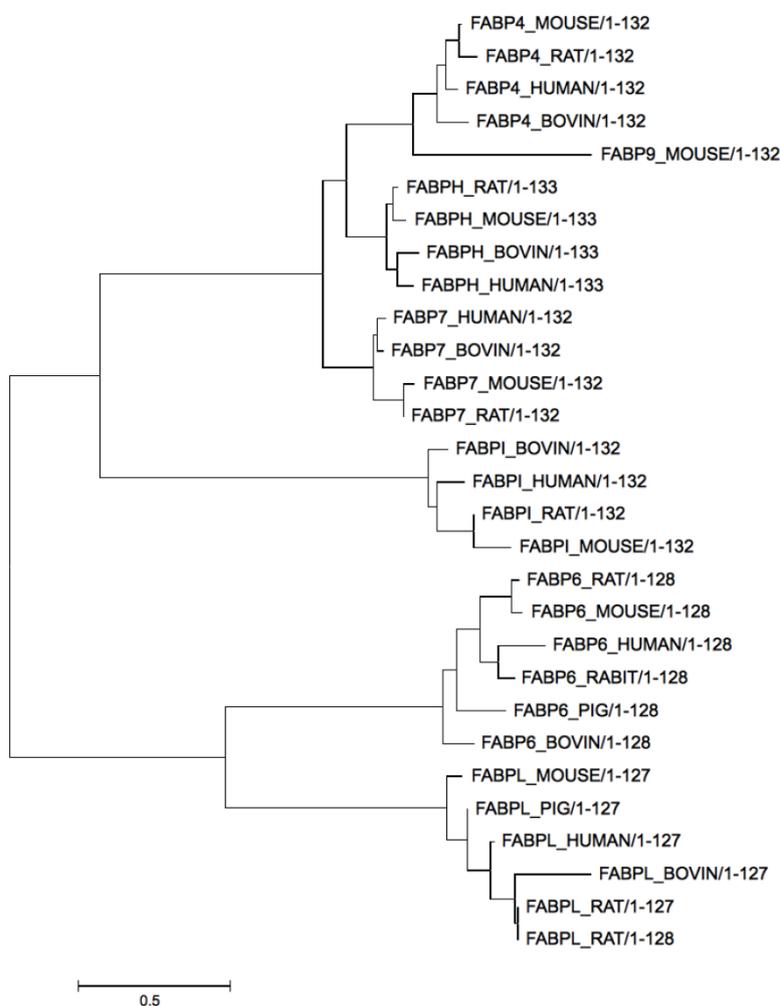


**Fig.16: A y B.** IFABP de Rata y Humano respectivamente (IDPDB: 1IFB y 1KZW). En azul se observan residuos de carga neta positiva. Los residuos negativos se señalan en rojo. Estas proteínas muestran un alto grado de conservación de carga no solo en la región sino también en los aminoácidos puntales. **C y D.** LFABP de Rata y Humano (IDPDB: 2JU3 y 2PY1). Se observa que la conservación de carga no es necesariamente coincidente con la posición de un aminoácido, sino que se distribuye en una región determinada.

#### 1.4. Árbol filogenético de FABPs de mamíferos

Al confeccionar un árbol filogenético que muestra la distancia evolutiva de las FABPs de mamíferos se observa que la formación de los dos grupos de proteínas descritos en el alineamiento, se repite. Las FABPs de tejido hepático se agrupan por separado del resto de las proteínas, aunque no lo hacen en una rama individual (**Figura 17**).

Evolutivamente, se evidencia una diferenciación entre LFABP y otras, en correlación la agrupación funcional y por conservación de residuos cargados.



**Fig. 17:** Árbol filogenético que marca la distancia evolutiva entre distintas FABPs. Se incluyen algunas especies animales cuyas FABPs no se fueron sometidas a los estudios posteriores que se describen en esta tesis, como las FABPs de conejo y cerdo.

Se observa que las LFABPs forman un grupo separado del resto de las proteínas de mamíferos. Sin embargo, su distancia evolutiva no parece ser muy distinta a la que presentan FABPs de otros tejidos entre sí.

## 1.5. Filogénesis de Hélices $\alpha$ y Barriles $\beta$

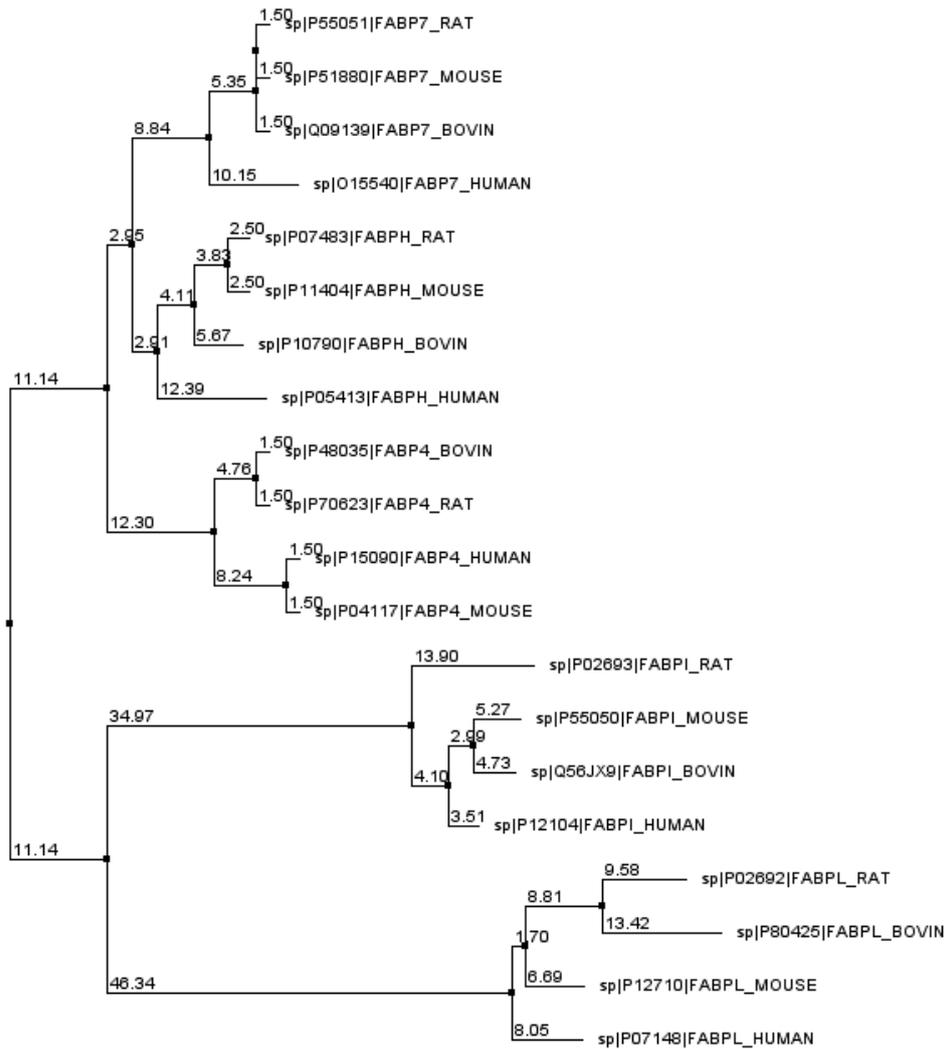
Dado que la bibliografía existente señala a la hélice  $\alpha$ 11 como responsable de direccionar la interacción FABP-membrana (Storch *et al.*, 2000; Córscico *et al.*, 2004), se decidió generar el alineamiento de las proteínas en estudio separadas en sus dos componentes estructurales principales, con el objetivo de determinar si la posible existencia de características estructurales que direccionen la interacción proteína-membrana se encontraban exclusivamente en alguna de las dos componentes de las FABPs.

En primer lugar, se separaron las hélices de los barriles de todas las FABPs en estudio y ambas estructuras se consideraron como proteínas individuales. De esta manera, las estructuras se alinearon y su cercanía evolutiva se calculó como se describe en materiales y métodos.



Los resultados (**Figuras 18 y 19**) muestran que el agrupamiento de ambas estructuras es prácticamente idéntico entre sí y con el de las proteínas completas. Esto hace suponer que el patrón que segrega las proteínas en dos grupos hipotéticos no se encontraría exclusivamente en las hélices, sino también en el barril.

**Fig.18:** Árbol filogenético de los barriles  $\beta$  de las FABPs estudiadas. Se observa por comparación con las **figuras 17 y 19** una gran similitud en su distribución.



**Fig. 19:** Árbol filogenético de los hélices  $\alpha$  de las FABPs estudiadas. Se observa por comparación con las figuras 17 y 18 una gran similitud en su distribución.

## CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 1

Se observa claramente como la conservación de aminoácidos cargados que generan regiones de carga neta distinta de cero, existe en dos grupos diferenciados, aunque con distinto signo de carga (**Figura 15**). Se puede determinar un camino evolutivo que agrupa a las FABPs de manera coincidente con los grupos obtenidos por el alineamiento (**Figura 17**) y con la agrupación según su mecanismo de interacción propuesto por la bibliografía, así como también que los componentes estructurales que dirigen esta selección de mecanismo de interacción no se encuentran exclusivamente en una porción de la proteína (**Figuras 18 y 19**).

---

## **Capítulo 2**

*Modelos tridimensionales de membranas y de FABPs de mamíferos*

---

## 2.1. MODELADO POR HOMOLOGÍA

### 2.1.1. Modelos tridimensionales

Como se explicó anteriormente, para aquellas proteínas cuya estructura terciaria se desconocía al momento de la escritura de la presente tesis, se desarrollaron modelos tridimensionales por homología de secuencias. En la **tabla V** se muestran las FABPs modeladas por éste método, así como también la abreviatura utilizada para cada una de ellas.

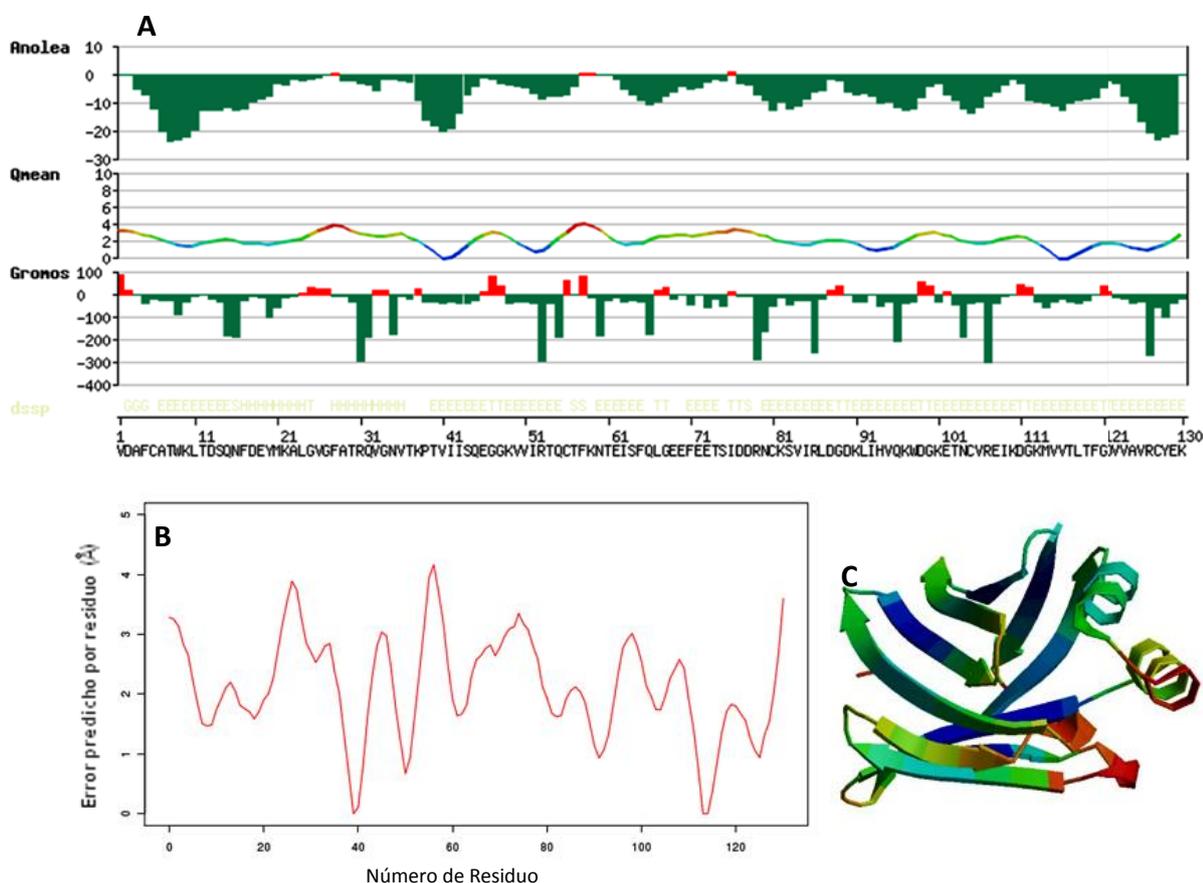
*Tabla V.*

Tejido	Especie	Código de tres letras
Hígado	Bovino ( <i>Bos taurus</i> )	<b>MLB</b>
	Ratón ( <i>Mus musculus</i> )	<b>MLM</b>
Intestino	Bovino	<b>MIB</b>
	Ratón	<b>MIM</b>
Cerebro	Rata ( <i>Rattus norvegicus</i> )	<b>MBR</b>
	Bovino	<b>MBB</b>
	Ratón	<b>MBM</b>
Corazón	Rata ( <i>Rattus norvegicus</i> )	<b>MHR</b>
	Ratón	<b>MHM</b>
Adipocito	Rata ( <i>Rattus norvegicus</i> )	<b>MAR</b>
	Bovino	<b>MAB</b>

### 2.1.2. Validación de los modelos

Debido a que el modelado por homología puede arrojar modelos con errores como superposición de cadenas laterales, estructuras secundarias forzadas de alta energía, etc., la validación de los modelos se hace sumamente necesaria. Esta validación arrojó resultados

consistentes para todos ellos. Dado el gran número de modelos desarrollados, se muestran aquí los valores y gráficos obtenidos para uno de ellos (MIB). Sin embargo, todos los modelos obtuvieron resultados similares y siempre dentro de los valores que determinan estructuras de alta calidad. Como se observa en la **figura 20 A** se observan los resultados del análisis por residuos de tres de los programas de elegidos: 1- *Anolea*, muestra parámetros estadísticos para cada residuo. En verde los valores negativos y por lo tanto favorables. En rojo, los valores positivos que implican un medioambiente desfavorable para el residuo en esa posición. 2- *Qmean*, muestra en una escala del azul (favorable) al rojo (desfavorable) la energía de los residuos en esa posición es calculada como se explico en Materiales y Métodos. 3- *Gromos*, sigue el mismo código cromático que el anterior realizando el análisis a partir de su campo de fuerza

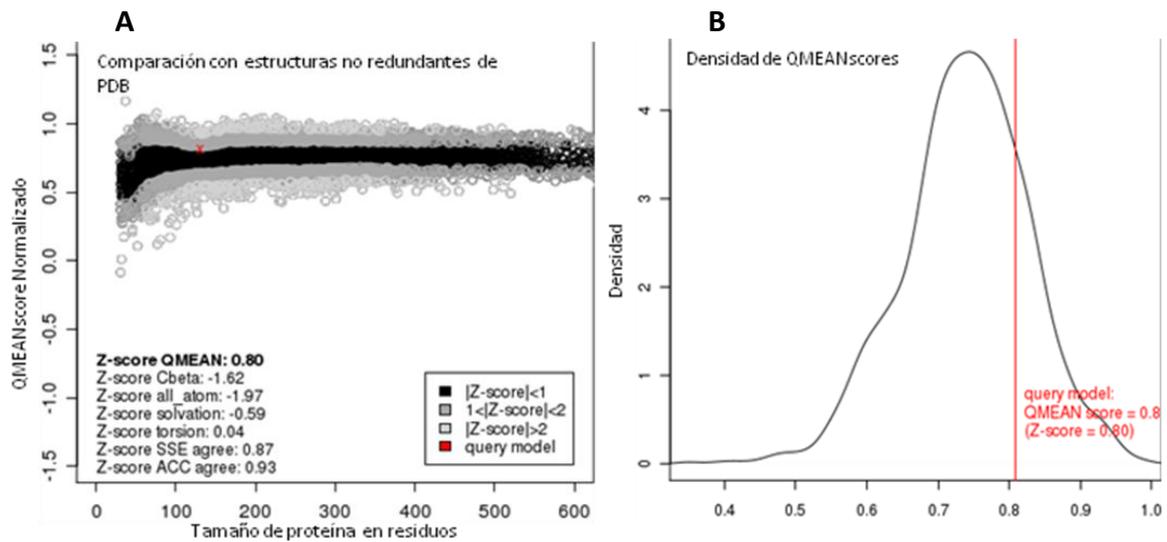


**Fig.20: A.** Resultados de *Anolea*, *Gromos* y *Qmean* del análisis global por residuo del modelo creado. **B.** Error predicho por residuo en Å. Señala la distancia con respecto a la media esperada según estructuras conocida según *QMEAN6*. **C.** Visualización del error por residuo con un gradiente de colores que va del azul (gran exactitud) al rojo (poca exactitud) según lo analizado por *QMEAN6*.

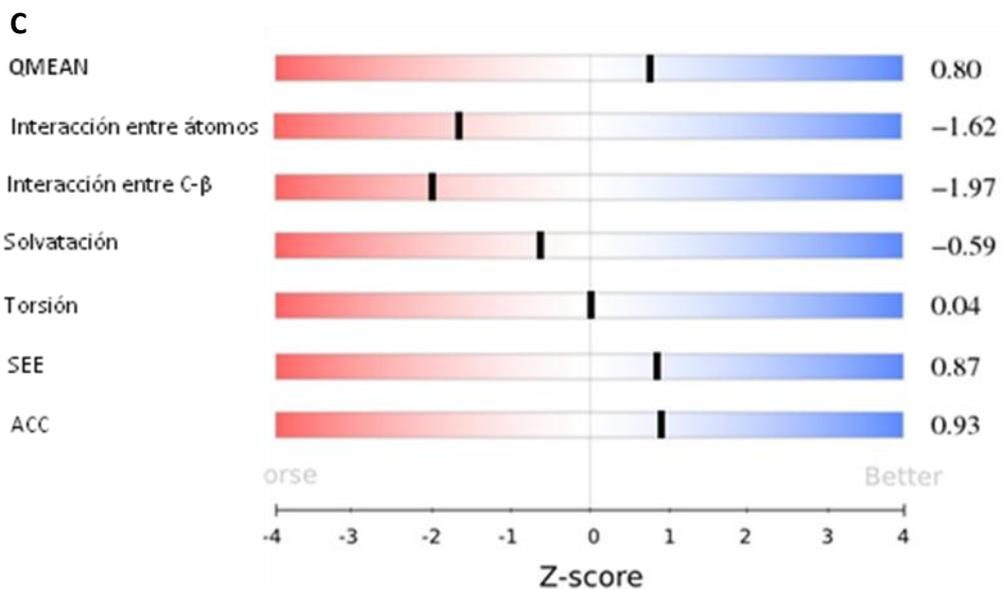
## Resultados

En la estimación global de la calidad del modelo, QMEAN6 arrojó un *QMEANscore* de 0,81. El *QMEANscore* es un valor que estima la exactitud del modelo en un escala de 0 (para modelos de baja calidad) a 1 (para modelos de excelente calidad). El valor 0,81 se considera para modelos de alta calidad.

La calidad absoluta del modelo se estima por comparación del *QMEANscore* con *scores* de estructuras de alta resolución obtenidas por rayos-X, y recibe el nombre de *Z-Score* (Figura 21 A, B y C), cuyo valor medio fue 0,798 para el modelo estudiado.

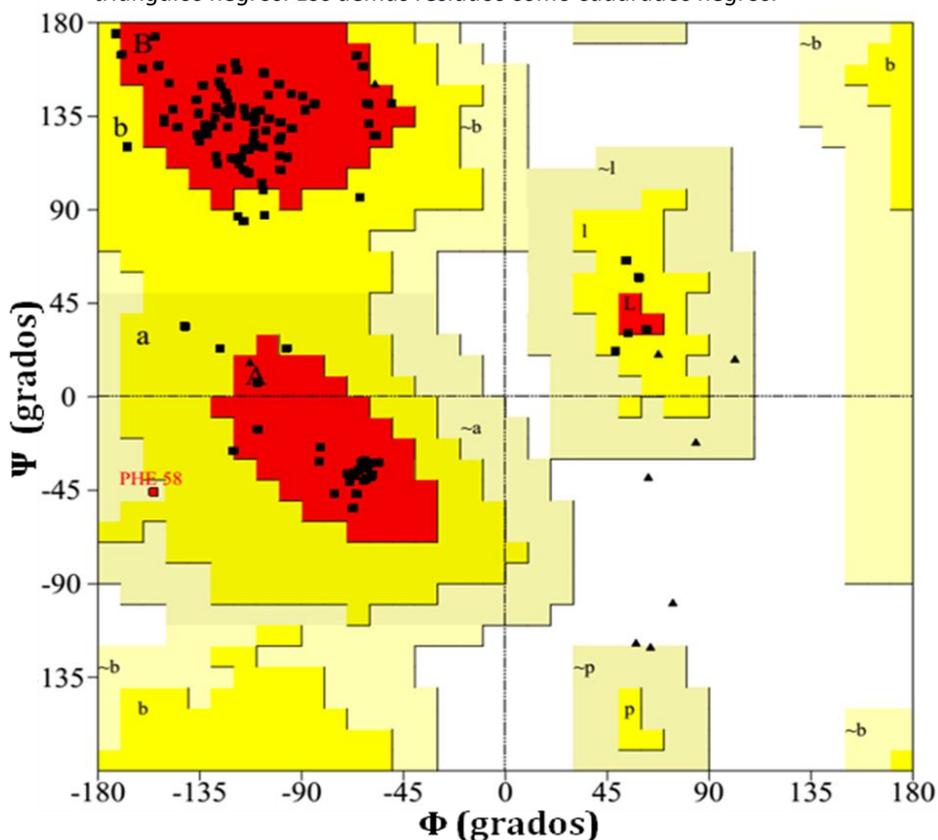


**Fig.21:** A. QMEAN Z-score para el modelo en estudio. La equis roja señala la ubicación del modelo en comparación con el set de proteínas de PDB. B. Densidad de QMEANscores de estructuras de alta resolución de PDB. El modelo en estudio se señala con la línea roja C. Valores de los componentes individuales que conforman el Z-score para el modelo en estudio.



Siguiendo con la estimación global de la calidad del modelo, el gráfico de Ramachandran (Figura 22) muestra a todos los residuos en ángulos permitidos, lo que implica una buena calidad del modelo en cuanto a su estructura secundaria. Un modelo se considera de alta calidad si los residuos con ángulos en las regiones más favorables y permitidas suman más del 90% (Tabla VI).

**Fig.22:** Gráfico de Ramachandran para MIB. Las GLY se muestran como triángulos negros. Los demás residuos como cuadrados negros.



**Tabla VI.** Estadísticas de gráfico de Ramachandran.

Residuos	Número	Porcentaje
En regiones más favorables	103	87,3%
En otras regiones permitidas	14	11,9%
En regiones "generosamente" permitidas	1	0,8%
En regiones no permitidas	0	0,0%
No PRO ni GLY	118	100%
Terminales (Excluyendo PRO y GLY)	2	
GLY	10	
PRO	1	
<b>TOTAL</b>	<b>131</b>	

Por último, el resultado arrojado por DFIRE, un potencial estadístico que analiza la calidad de un modelo comparado con otros modelos de la misma proteína, se ubica entre los -130 y los -160 para todos los diez modelos de MIB obtenidos (**Tabla VII**), con un promedio de -151,94.

De esta manera, se seleccionó el mejor modelo MIB-D siendo el por ser el de menor valor de DFIRE (-163,30). El proceso descrito se aplicó a todos los modelos proteicos obtenidos por modelado por homología.

**Tabla VII.** Valores de DFIRE para todos los modelos MIB obtenidos por homología.

	MIB-A	MIB-B	MIB-C	MIB-D	MIB-E	MIB-F
DFIRE	-142,51	-133,20	-156,10	-163,30	-156,10	-155,11
	MIB-G	MIB-H	MIB-I	MIB-J	Promedio	
	-154,73	-148,25	-151,36	-158,74	-151,94	

## 2.2. MODELOS OBTENIDOS DE BASES DE DATOS

### 2.2.1. Modelos por difracción de rayos X

Para los modelos obtenidos por éste método se tuvieron en cuenta la resolución, la antigüedad del modelo y la existencia de superposiciones de átomos de cadenas laterales. En este último caso, si el modelo elegido presentaba alguna superposición, se sometió la proteína a una minimización energética por DM, de manera de solucionar el inconveniente que generaría un incremento en la energía del sistema.

Asimismo, se evitó la utilización de modelos con mutaciones, agregados de átomos pesados y ligandos, ya sean naturales o sintéticos.

Teniendo en cuenta todas las restricciones descritas, los modelos que no cumplieron con los requisitos establecidos se reemplazaron por obtenidos por RMN.

### 2.2.2. Modelos por Resonancia Magnética Nuclear

Al igual que para los modelos obtenidos por difracción de rayos x, se evitó a aquellos que presentaban átomos pesados, agregados de aminoácidos y/o ligandos.

La RMN se caracteriza por la posibilidad de obtener un gran número de estructuras con diferencia en la posición de las cadenas laterales, lo que motivó un análisis electrostático para estudiar la posible influencia de estas diferencias en la energía electrostática del sistema. Los resultados se muestran en el Capítulo 3. En la **tabla VIII**, se resumen las características de los modelos obtenidos de bases de datos.

En aquellos casos en los que la estructura apo de la proteína no se encontró en base de datos, se utilizó la estructura extrayendo el ligando de la misma. Para determinar si esta modificación altera la interacción electrostática del sistema, se corrió el programa ESUPf en una estructura con el ligando y sin éste. Los resultados se muestran en el capítulo 3.

**Tabla VIII.** Resumen de estructuras de proteínas obtenidas de bases de datos.

TEJIDO	ESPECIE	ID-PDB	MÉTODO	RESOLUCIÓN/Nº DE MODELOS	RESIDUOS
<b>INTESTINO</b>	Rata ( <i>Rattus rattus</i> )	1IFB	X-Ray	1,96 Å	131 (1-131)
	Rata ( <i>Rattus norvegicus</i> )	1IFC	X-Ray	1,20 Å	131 (1-131)
	Humano ( <i>Homo sapiens</i> )	1KZW	NMR	20	131 (1-131)
<b>HIGADO</b>	Humano	2PY1	NMR	10	129 (1-129)
	Rata ( <i>Rattus norvegicus</i> )	2JU3	NMR	10	127 (1-127)
		2JU7	NMR	10	127 (1-127)
<b>CEREBRO</b>	Humano	1JJX	NMR	20	131 (1-131)
<b>CORAZÓN</b>	Humano	1G5W	NMR	20	132 (1-132)
	Bovino	1BWY	NMR	25	132 (1-132)
<b>ADIPOCITO</b>	Humano	1TOU	X-Ray	2,00 Å	131 (1-131)
	Ratón	3HK1	X-Ray	1,70 Å	131 (1-131)

## 2.3. MODELOS DE MEMBRANAS

### 2.3.1. Membranas neutras

Para el desarrollo de membranas fosfolípicas de carga neta nula, se utilizaron exclusivamente POPC (**Figura 23A**) como se describe en materiales y métodos. De esta manera se logró una bicapa neutra que permitió el estudio de interacciones electrostáticas en un entorno de baja carga.

Si bien no existe en la naturaleza una membrana con la composición descrita, este sistema se construyó con el objetivo de someter a la proteína a situaciones extremas que permitan estudiar la influencia de la carga de la membrana a la interacción estudiada.

### 2.3.2. Membranas aniónicas

Con el objetivo de analizar la influencia de las cargas netas en la interacción FABPs-Membranas, se crearon cuatro bicapas con distintos porcentajes de SOPS, un fosfolípido de carga neta -1 (**Figura 23B**). Los porcentajes utilizados fueron: 25%, 50%, 75% y 100%. Cabe aclarar que no existen membranas naturales compuestas en su totalidad por lípidos de carga neta negativa, pero se utilizan para forzar el sistema al extremo y evidenciar así la influencia de la carga de la membrana en la interacción.

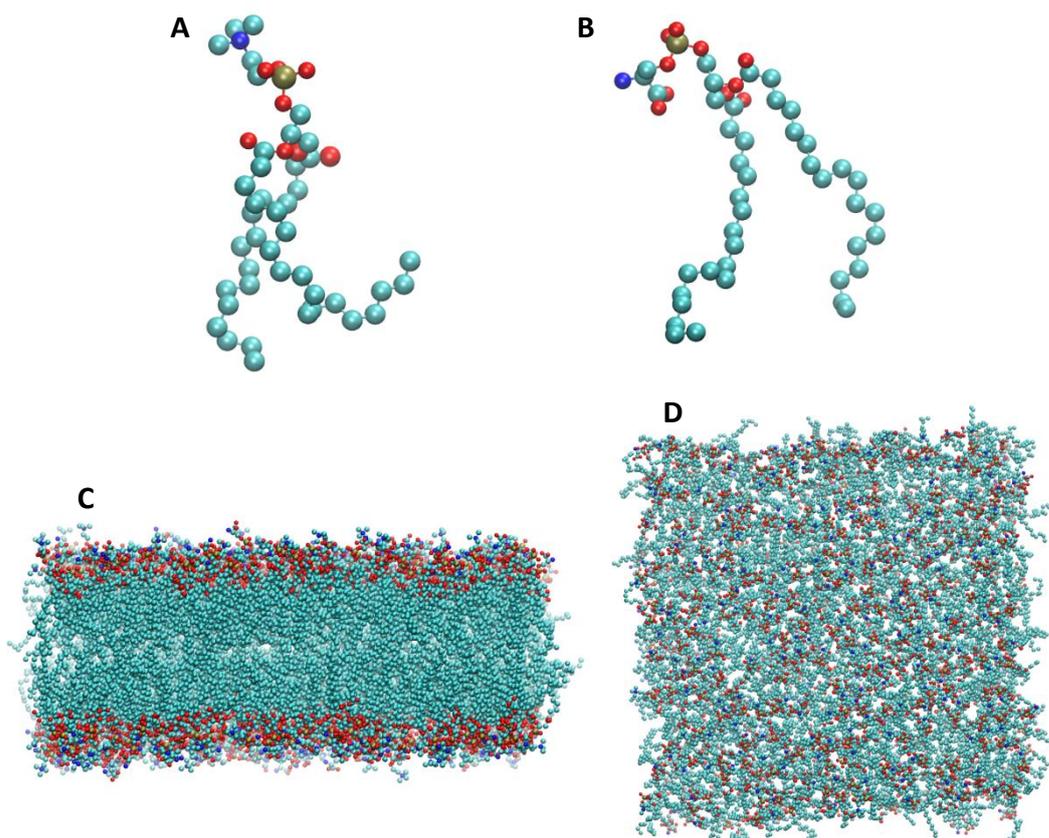
### 2.3.3. Membranas a distintos pH

Los distintos estados de protonación de una molécula producen variaciones en su carga neta. Con el objetivo de estudiar la influencia del pH en la interacción, se desarrollaron modelos de membrana a distintos pH, como se describe en materiales y métodos.

Las cargas netas de los lípidos utilizados para los cálculos a distintos pH se describen en la **tabla IX**.

**Tabla IX**

pH	SOPS	POPC
1,0	1,00	La carga neta de este lípido se considera neutra para todo pH de acuerdo a datos empíricos (Francis <i>et al.</i> , 1986)
1,1	0,50	
1,2	0,00	
4,5	-0,50	
7,4	-1,00	
10	-1,50	
13	-2,00	



**Fig.23:** Estructura de lípidos y membranas utilizadas para los cálculos electrostáticos y DM. En todos los casos los átomos de carbono se señalan en cian, los oxígenos en rojo, el azufre en amarillo y el nitrógeno en azul. **A.** Estructura de POPC. **B.** Estructura de SOPS. **C.** Vista lateral de la bicapa conformada por 50% POPC y 50% SOPS **D** Vista superior de la misma bicapa.

## 2.4. MODELOS DE PROTEÍNAS MUTADAS

Como se describe en materiales y métodos, las mutaciones puntuales de las proteínas se desarrollaron con el programa PyMol. En todos los casos se tuvieron en cuenta las posiciones de las cadenas laterales del residuo mutado y sus vecinos para evitar superposiciones.

A continuación se describen las mutaciones y los nombres asignados a las mismas para una proteína IFABP y otra LFABP (**Tabla X**). La selección de los residuos a mutar se basó en los residuos cargados altamente conservados, en aquellos residuos cuyas mutaciones han sido estudiadas en distintas publicaciones y en aminoácidos que por su ubicación estructural podrían afectar el proceso de interacción. En la **tabla XI**, se muestran las mutaciones, en las hélices alfa, de los residuos cargados altamente conservados para las IFABP de los cinco tejidos en cuatro especies de mamíferos estudiados

Resultados

**Tabla X.** Mutaciones en dos FABPs representativas. Se muestran mutaciones de residuos con cargas altamente conservados y residuos señalados como relevantes en la interacción con membrana por la bibliografía existente.

Prot.	ID-PDB	Posición	WT	Mutado	Codigo
IFABP-RATA	1IFB	4; 67; 97	D	A o K	1IFB_D4A - 1IFB_D4K - 1IFB_D67A 1IFB_D67K - 1IFB_D97A - 1IFB_D97K
		63 y 112	E	A o K	1IFB_E63A - 1IFB_E63K 1IFB_E112A - 1IFB_E112K
		44	E	A	1IFB_E44A
				K	1IFB_E44K
		17; 21; 28 y 92	K	A o E	1IFB_K17A - 1IFB_K17E - 1IFB_K21A - 1IFB_K21E 1IFB_K28A - 1IFB_K28E - 1IFB_K92A - 1IFB_K92E
		29	R	A	1IFB_R29A
				E	1IFB_R29E
		30	K	A	1IFB_K29A
E	1IFB_K29E				
29 y 30	R y K	E	1IFB_R29_K30E		
29; 30 y 44	R, K y E	E, E y K	1IFB_R29_K30E_E44K		
LFABP-RATA	2JU3	16 y 67	E	A o K	2JU3_E16A - 2JU3_E16K - 2JU3_E67A - 2JU3_E67K
		26	E	A	2JU3_E26A
				K	2JU3_E26K
		27	D	A	2JU3_D27A
				K	2JU3_D27K
		34; 88 y 107	D	A o K	2JU3_D34A - 2JU3_D34K - 2JU3_D88A - 2JU3_D88K - 2JU3_D107A - 2JU3_D107K
		20; 31; 33; 36 y 57	K	A o E	2JU3_K20A - 2JU3_K20E - 2JU3_K31A 2JU3_K31E - 2JU3_K33A - 2JU3_K33E 2JU3_K36A - 2JU3_K36E
		46	K	A	2JU3_K46A
				E	2JU3_K46E
		47	K	A	2JU3_K47A
				E	2JU3_K47E
126	R	A or E	2JU3_R126A - 2JU3_R126E		
26 y 27	E y D	K	2JU3_E26_D27K		
46 y 47	K	E	2JU3_K46_47E		
26; 27; 46 y 47	E, D, K y K	K, K, E y E	2JU3_E26_D27K_K46_47E		

Tabla XI. Mutaciones en residuos ubicados en la hélice  $\alpha$ II de las FABPs de mamíferos estudiadas.

Tejido	Especie	ID-PDB o Código de MUT	WT	Posición	Mutado	Código
Intestino	Rata	1IFB	R y K	29 y 30	A o E	1IFB_R29_K30A 1IFB_R29_K30E
	Humano	1KZW				1KZW_R29_K30A 1KZW_R29_K30E
	Ratón	MIM				MIM_R29_K30A MIM_R29_K30E
	Bovino	MIB				MIB_R29_K30A MIB_R29_K30E
Hígado	Rata	2JU3	E y D	26 y 27	A o K	2JU3_E26_D27A 2JU3_E26_D27K
	Humano	2PY1	E			2PY1_E26_27A 2PY1_E26_27K
	Ratón	MLM	E y D			MLM_E26_D27A MLM_E26_D27K
	Bovino	MLB	D			MLB_D26_27A MLB_D26_27K
Cerebro	Rata	MBR	R	29	A o E	MBR_R29A MBR_R29E
	Humano	1FDQ				1FDQ_R29A 1FDQ_R29E
	Ratón	MBM	R			MBM_R29A MBM_R29E
	Bovino	MBB				MBB_R29A MBB_R29E
Rata	MHR	MHR_R29A MHR_R29E				
Humano	1G5W	1G5W_R29A 1G5W_R29E				
Corazón	Ratón	MHM	MHM_R29A MHM_R29E			
	Bovino	1BWY	1BWY_R29A 1BWY_R29E			
	Rata	MAR	MAR_R29A MAR_R29E			
	Adipocito	Humano	1JJX	R y K	29 y 30	1JJX_R29_K30A 1JJX_R29_K30E
Ratón		3HK1	29 y 30		3HK1_R29_K30A 3HK1_R29_K30E	
Bovino		MAB	29 y 30		MAB_R29_K30A MAB_R29_K30E	

## **CONCLUSIONES DEL CAPITULO 2**

Como se observa en los resultados del presente capítulo, los modelos de proteínas desarrollados se ajustan a los estándares requeridos para el estudio computacional de proteínas. Asimismo, se lograron desarrollar modelos estables de membranas con distinta carga aniónica y a diferentes pH.

---

## **Capítulo 3**

*Estudio de la componente electrostática de proteínas y de la  
interacción electrostática FABP-Membrana*

---

### 3.1. ESTUDIO DE LA ELECTROSTÁTICA EN FABPs DE MAMÍFEROS

Los resultados de los estudios electrostáticos de las FABPs y sus interacciones con membrana se realizaron sobre numerosas estructuras, incluyendo proteínas de distintos tejidos. En algunos casos, se utilizaron FABPs de diferentes géneros además del de mamíferos con el objetivo de determinar si los hipotéticos patrones de comportamiento en la interacción se limitan a un género o se extiende fuera del mismo. A menos que se indique lo contrario, se muestra en éste capítulo un grupo representativo compuesto por 2JU3 y 1IFB, debido al enorme volumen de datos obtenidos a partir de los cálculos realizados.

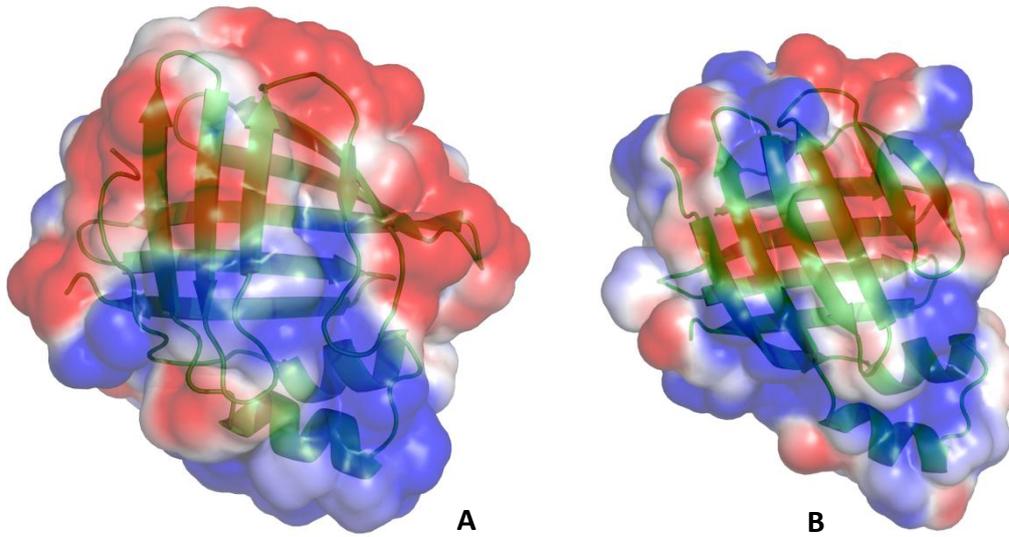
La elección de la FABPs 2JU3 y 1IFB no es azarosa. En primer lugar, se trata de FABPs de origen hepático e intestinal y son consideradas representativas de los mecanismos difusional y colisional respectivamente, siendo las FABPs que más han sido descritas en la bibliografía. En segundo lugar, fueron obtenidas de rata, un animal de laboratorio muy utilizado porque su semejanza metabólica con el ser humano posibilita la extrapolación de los resultados.

#### 3.1.1. Superficie accesible al solvente

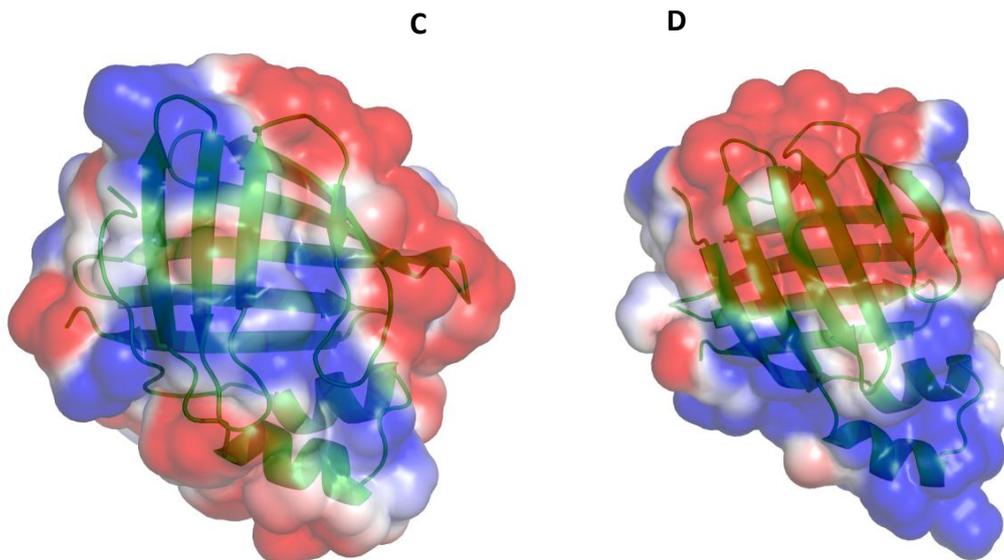
La superficie accesible al solvente se define como la unión de los volúmenes accesibles a esferas del radio de una molécula de agua (0.14 nm) que no se solapen con átomos explícitos. En otras palabras, se trata de la mayor aproximación posible cuando la esfera rodante es tangente a las esferas de *van der Waals* de los átomos de proteína. En la **figura 24 A y B** se muestran las superficies accesibles al solvente superpuestas con el potencial electrostático correspondiente.

Se observa claramente las diferencias de carga que presentan en ambos extremos de la proteína, de manera que se percibe una probable polarización en ambas, aunque con polos invertidos.

En la **figura 24 C y D**, se muestran las superficies accesibles al solvente para las FABPs mutadas 1IFB\_R29E\_K30E\_E44K y 2JU3\_E26K\_D27K\_K46E\_K47E (Ver **tabla X**). Nótese la similitud de distribución de carga entre una FABP WT de un tejido y la FABP mutadas del otro tejido.



**Fig. 24:** Arriba. Superficies accesibles al solvente de IFABP (A) y LFABP (B) de rata. La distribución de carga superpuesta muestra densidad de carga positiva en  $\alpha$  y negativa en barril  $\beta$  para IFABP y vicerversa para LFABP. Abajo, las mutaciones de carga reversa (1IFB\_R29\_K30E\_E44K y 2JU3\_E26\_D27K\_K46\_47E), invierten la polaridad sin mayores cambios en la superficie de accesible al solvente. C, IFABP mutada. D, LABP mutada.



### 3.1.2. Isocontorno

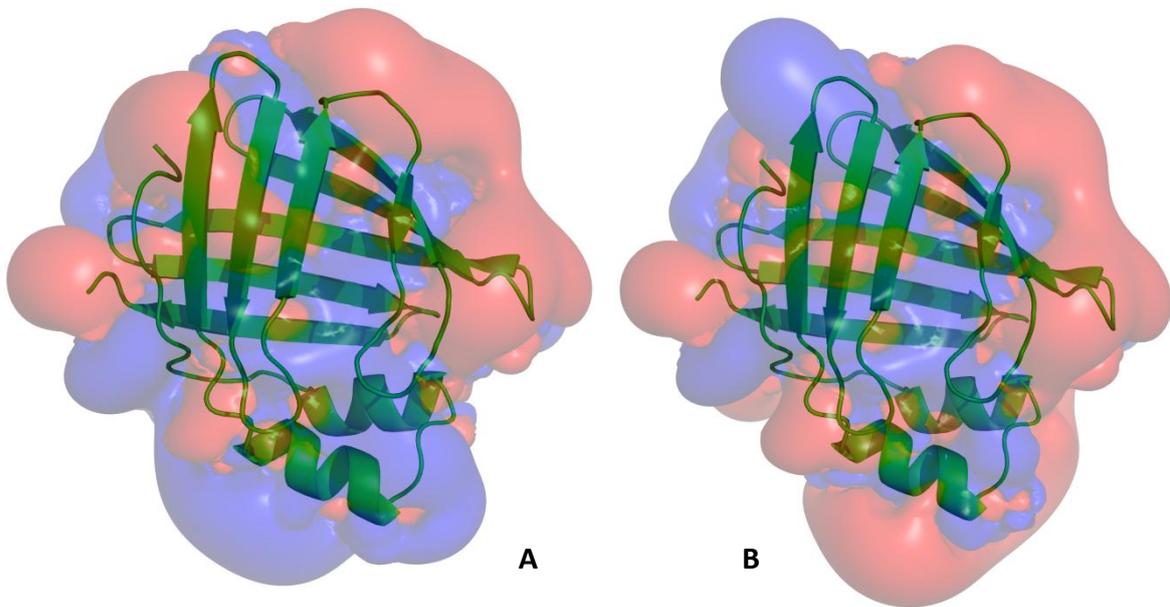
El isocontorno o isosuperficie (*Isosurface*) es una superficie formada por la unión de puntos que representan un mismo valor en un volumen del espacio. Matemáticamente hablando, se trata de funciones de curvas de nivel cuyo dominio es el espacio tridimensional.

En los isocontornos obtenidos a partir de la distribución de cargas calculadas para las distintas FABPs, se observaron superficies de carga neta negativa en las hélices  $\alpha$ II para las proteínas de tejido hepático, independientemente de la especie de origen. Para las mismas proteínas, el fondo del barril  $\beta$  muestra una densidad de carga positiva (**Figura 25 A**).

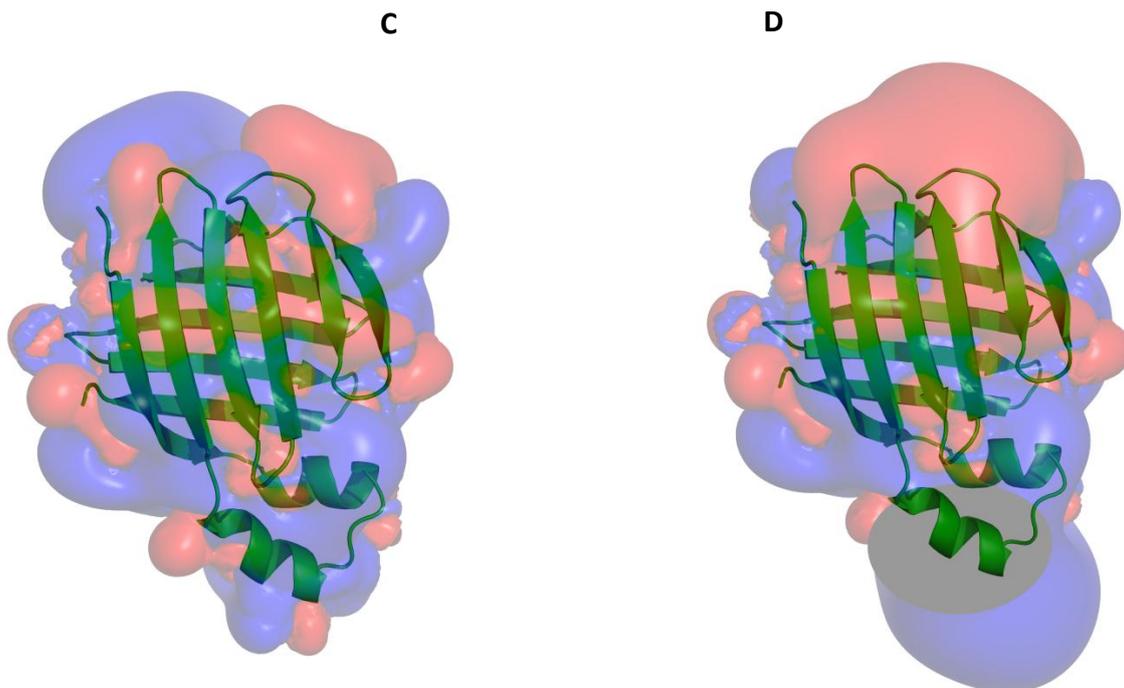
Por otro lado, las FABPs de mamíferos de origen no hepático muestran una distribución de carga invertida, evidenciándose una zona claramente positiva en la región portal y otra negativa en el fondo del barril  $\beta$  (**Figura 25 B**).

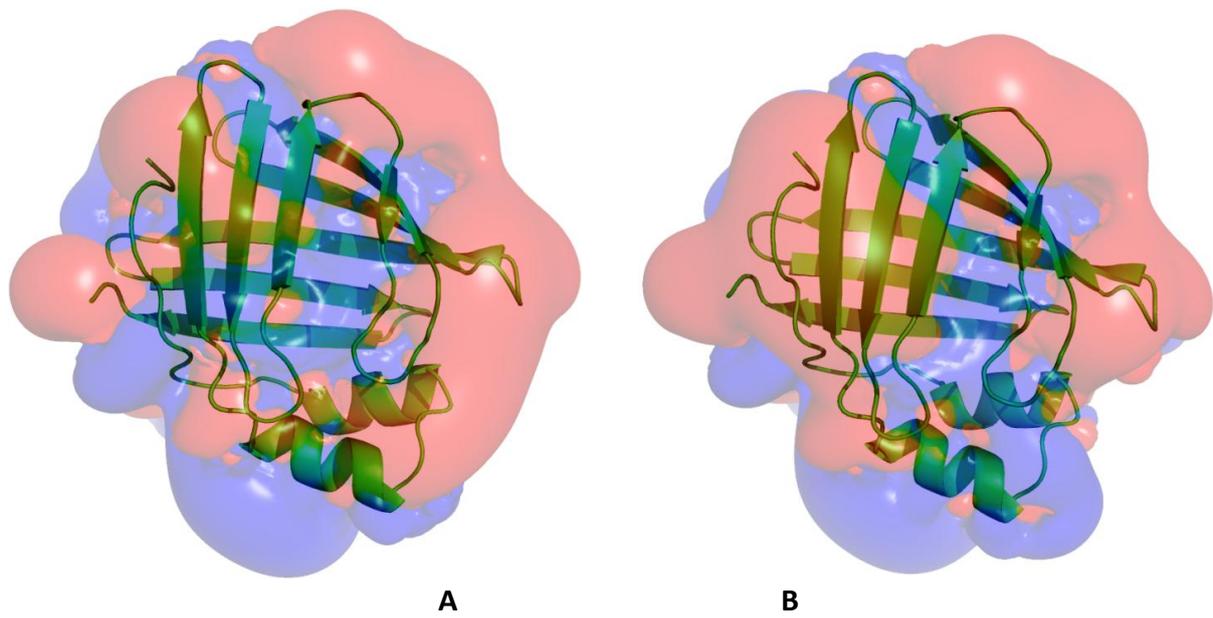
En el caso de las mutaciones puntuales, 1IFB\_R29E\_K30E\_E44K y 2JU3\_E26K\_D27K\_K46E\_K47E se observa una clara inversión de los isocontornos, revelando la importancia de los aminoácidos cargados altamente conservados en la distribución de carga de las proteínas (**Figura 25 C y D**). Es de destacar que no todos los aminoácidos parecen tener la misma relevancia. La mutación puntual de aminoácidos en sectores alejados de las regiones estudiadas en el portal o el fondo del barril  $\beta$ , no revelan un impacto significativo en la distribución de carga de las regiones señaladas como relevantes en la interacción (**Figura 26 A**). Asimismo, algunos aminoácidos ubicados en la región  $\alpha$ II, como la LYS 28 de IFABP de rata, producen cambios sensiblemente menores en la distribución de carga de la zona estudiada (**Figura 26 B**). En este caso, la deducción surge por comparación con las mutaciones de ARG 29 y LYS 30 (**Figura 26 C y E**).

En el caso de una mutación conjunta de aminoácidos en ambos extremos de las proteínas, se observan similitudes notables entre las LFABPs mutadas en posición 26-27 y 46-47 con las IFABP WT. Estas similitudes también se observan al comparar IFABP mutadas en posiciones 30-31 y 44 con LFABPs WT (**Figura 25 A - D**).

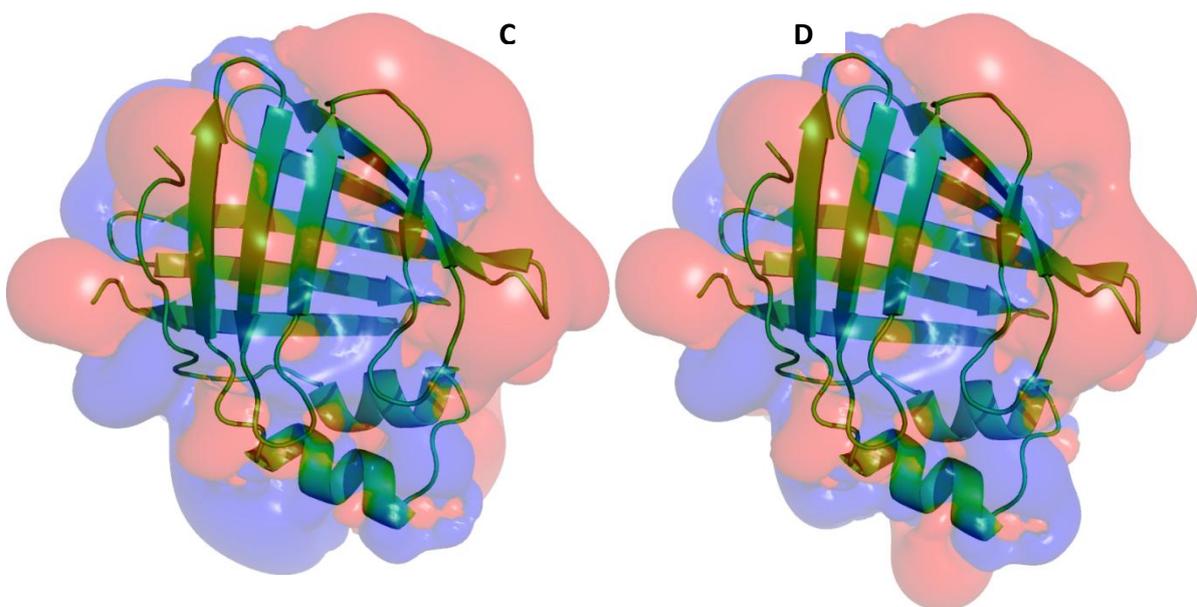


**Fig.25:** Isocontornos de distribución de cargas. En todos los gráficos las superficies azules corresponden a una carga neta positiva de +1, mientras que las superficies rojas a -1. **(A)** WT 1IFB **(B)** 1IFB mutada: 1IFB\_R29E\_K30E\_E44K **(C)** WT 2JU3 **(D)** 2JU3 Mutada: 2JU3\_E26K\_D27K\_K46E\_K47E. Solo estas mutaciones específicas generan esta interconversión de colisional a difusional para el isocontorno.





**Fig.26:** Isocontornos de distribución de cargas. En todos los gráficos las superficies azules corresponden a una carga neta positiva de +1, mientras que las superficies rojas a -1. **A.** 1IFB\_K28E. **B.** 1IFB\_K50E. **C.** 1IFB\_R29E. **D.** 1IFB\_K30E.



## 3.2. INTERACCIÓN PROTEÍNA-MEMBRANA

### 3.2.1. Interacción de FABPs de mamíferos con una membrana aniónica

Dado que las membranas celulares son de carácter aniónico, se realizaron los cálculos de las interacciones electrostáticas proteína-membrana con una membrana de carga negativa. Para esto, se utilizó la membrana POPC3-SOPS1, de manera de obtener un muestreo con una membrana de carga intermedia y poder luego, haciendo uso del resto de las membranas modeladas, someter al sistema a extremos de carga.

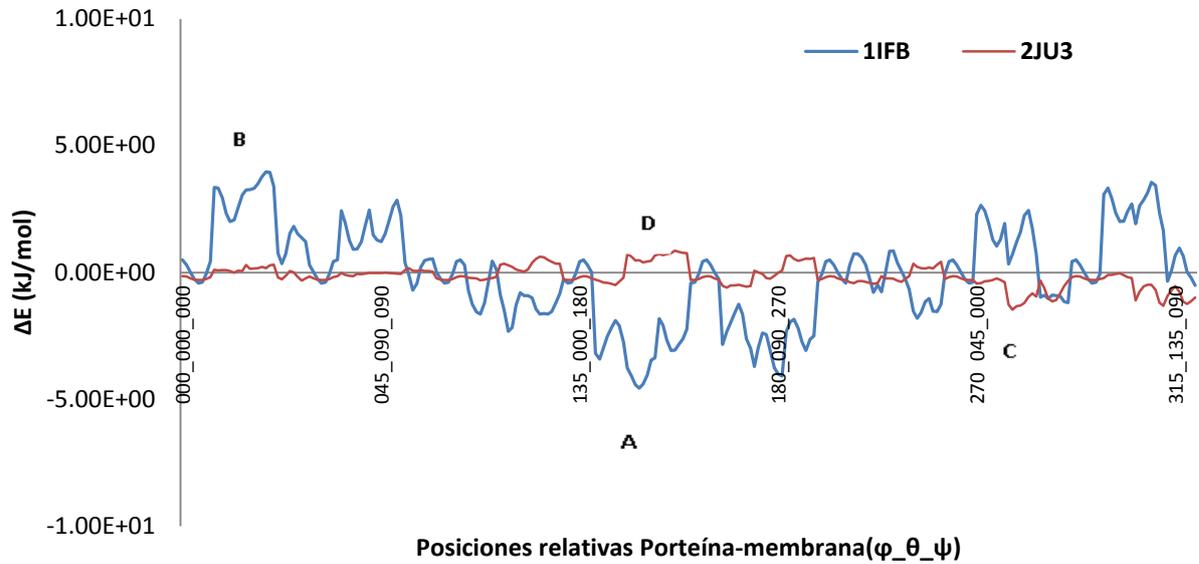
De la interacción FABPs vs POPC3-SOPS1, se obtuvieron resultados consistentes con trabajos experimentales publicados por diversos grupos de investigación.

Observando los gráficos de  $\Delta E$  electrostática vs posiciones relativas de las proteínas con respecto a la membrana, se pueden distinguir dos grupos de proteínas de acuerdo al perfil electrostático que generan. Por un lado, el grupo de las LFABPs muestran interacciones desfavorables cuando la hélice  $\alpha$ II se orienta a la superficie de la membrana, mientras que la interacción de la región opuesta, ubicada en el barril  $\beta$ , genera un mínimo energético y por lo tanto, una conformación favorable.

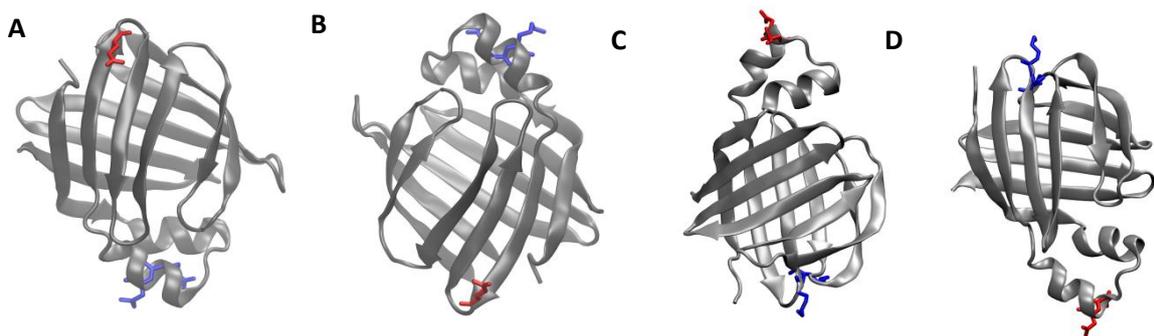
En el caso de las FABPs de los demás tejidos estudiados, la conformación energéticamente más favorable se genera cuando la hélice  $\alpha$ II se orienta hacia la bicapa lipídica. Lo contrario sucede cuando esta interacción se da por parte de la región opuesta, ubicada en el barril  $\beta$ .

La **figura 27** muestra  $\Delta E$  electrostática vs posiciones relativas de las proteínas IFABP y LFABP de rata con respecto a la membrana. En **figura 28 A - D** se observan las posiciones de máxima y mínima energía en su interacción con membrana.

Los perfiles de  $\Delta E$  obtenidos para el resto de las FABPs estudiadas muestran una tendencia clara a repetir el perfil electrostático del grupo y tejido al que pertenece cada una de las proteínas (**Figuras 29- 31**).



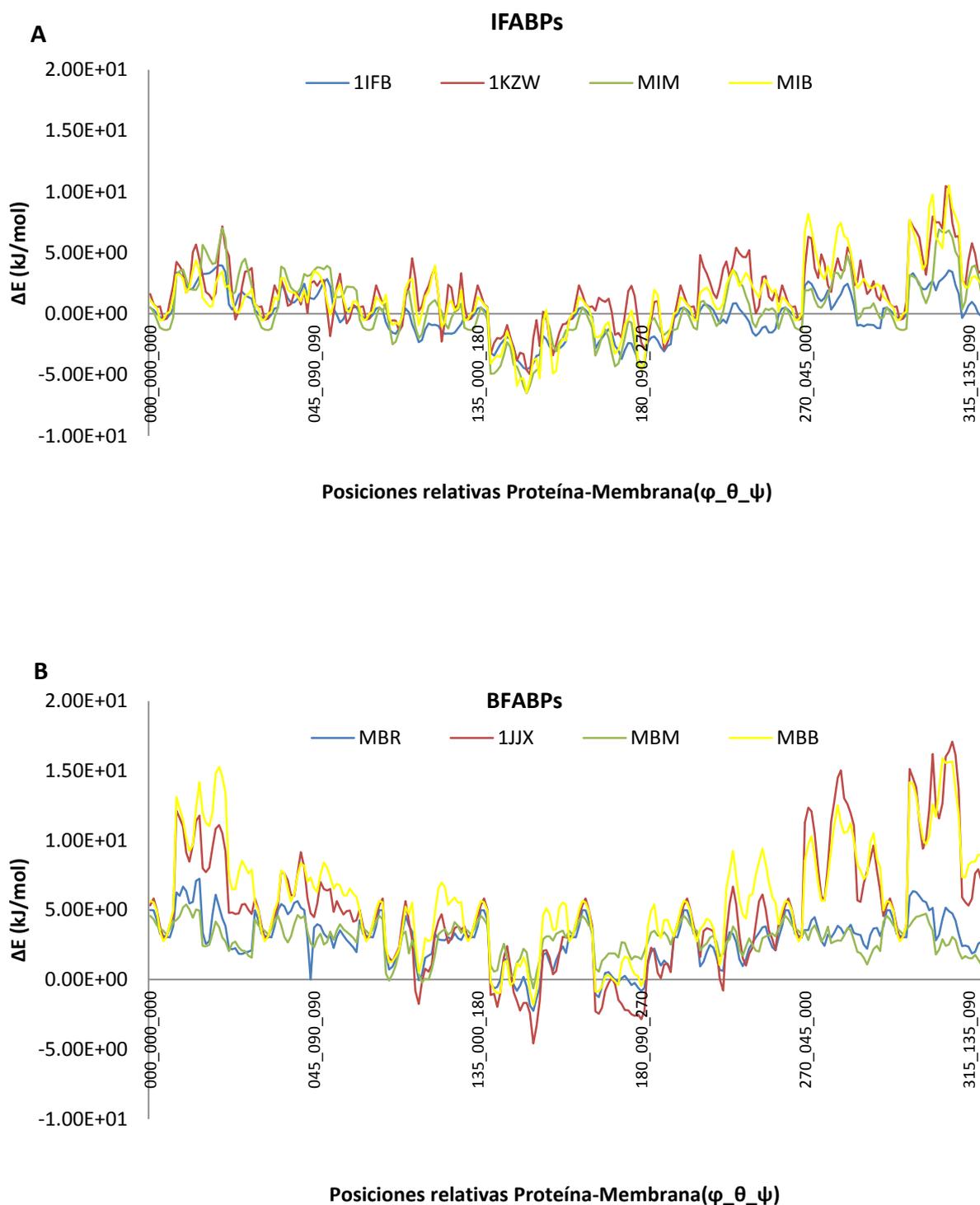
**Fig.27:** Perfiles energéticos de IFABP (línea azul) y LFABP (línea roja) vs membrana. Se observa que LFABP posee una interacción más homogénea, mientras que IFABP presenta variaciones marcadas al explorar el espacio de configuraciones de interacción. **A** y **B** Señalan configuraciones de mínima y máxima energía respectivamente para IFABP. **C** y **D** - Idem para LFABP



## MEMBRANA

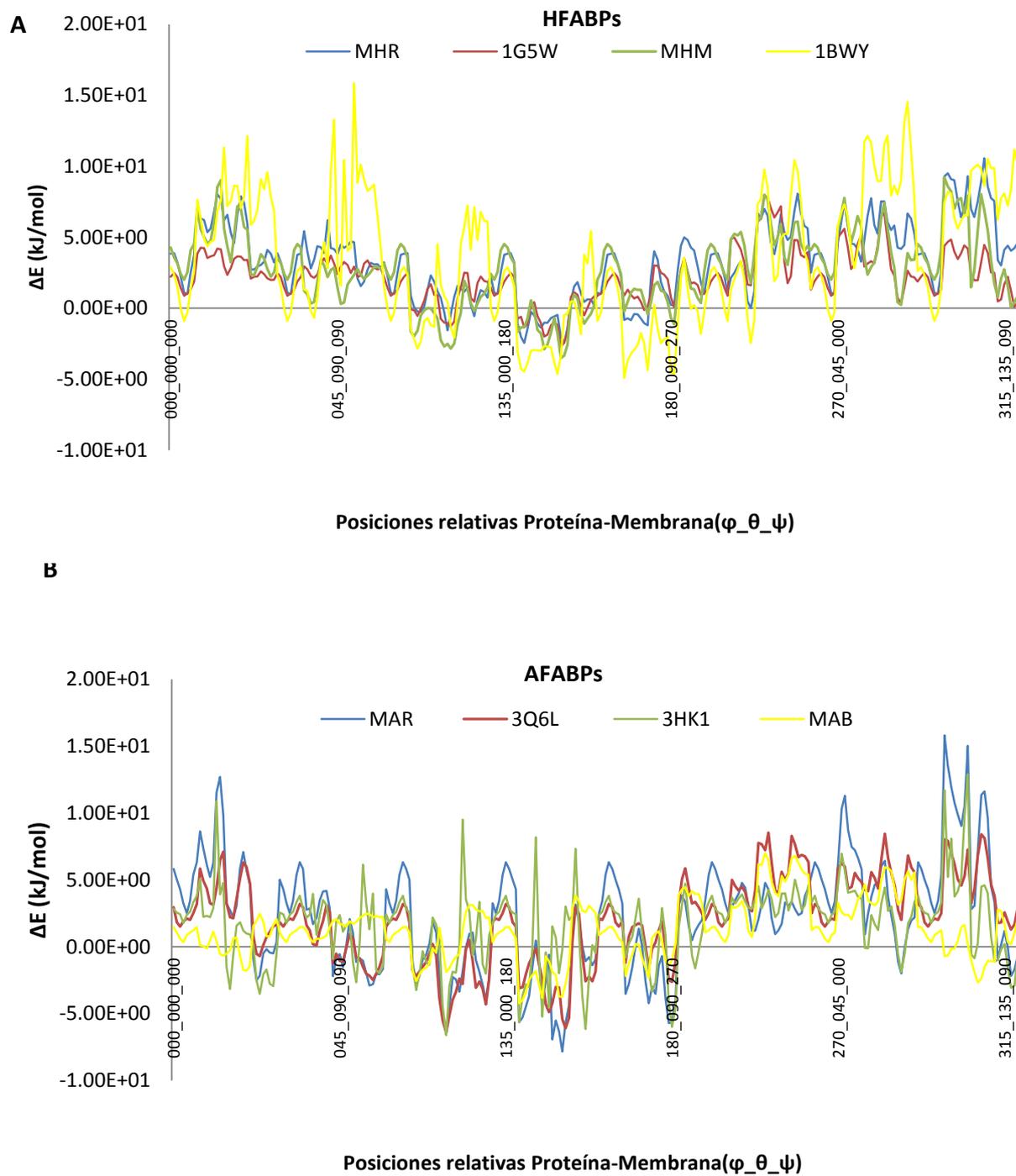
**Fig.28:** La figuras corresponden a posiciones relativas de las proteínas respecto a la membrana. IFABP: **A**-Mínima energía, **B**-Máxima energía. LFABP: **C**-Mínima energía, **D**-Máxima energía. La membrana representada en celeste de manera ilustrativa, ya que los cálculos se desarrollaron contra membrana con detalle atómico.

## Resultados

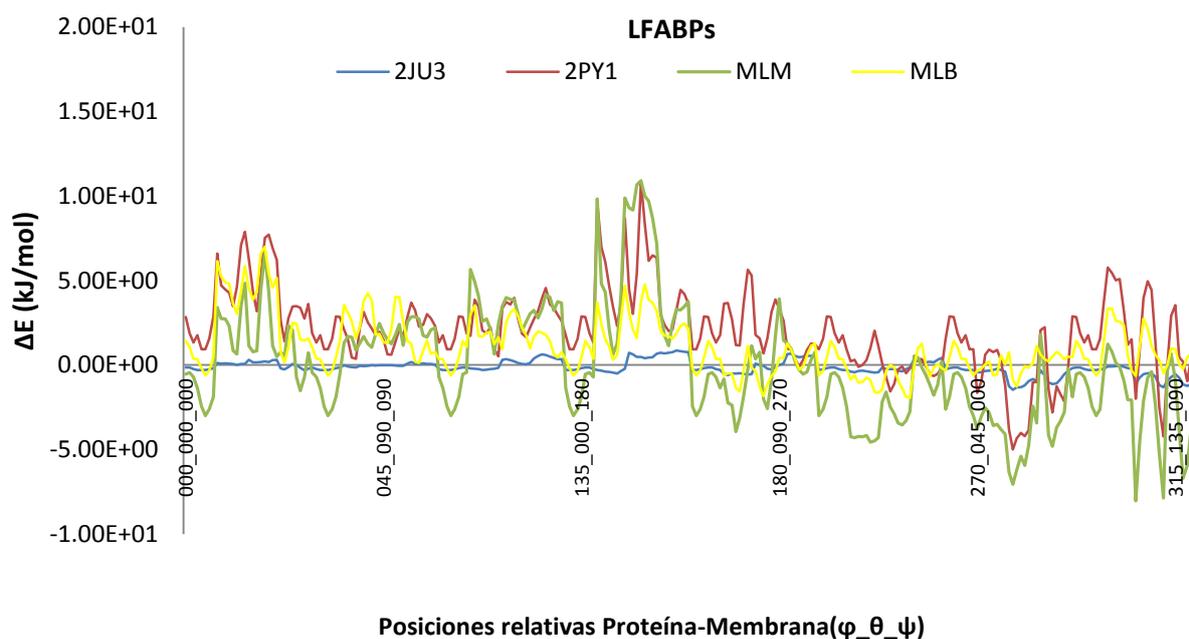


**Fig.29:** Perfiles energéticos de FABPs intestinales (A) y de cerebro (B). Los distintos colores de las líneas representan el perfil electrostático de FABPs de distintas especies e igual tejido en cada cuadro. Se observan, en general, mayores variaciones entre tejidos que interespecies. Sin embargo, los perfiles energéticos siempre indican un mínimo en la interacción de la hélice  $\alpha$ II de la proteína con la membrana, describiendo así FABPs colisionales según bibliografía.

## Resultados



**Fig.30:** Perfiles energéticos de FABPs de músculo cardíaco (A) y de adipocito (B). Los distintos colores de las líneas representan el perfil electrostático de FABPs de distintas especies e igual tejido en cada cuadro. Se observan, en general, mayores variaciones entre tejidos que interespecies. Sin embargo, los perfiles energéticos siempre indican un mínimo en la interacción de la hélice  $\alpha$ II de la proteína con la membrana, describiendo así FABPs colisionales según bibliografía.



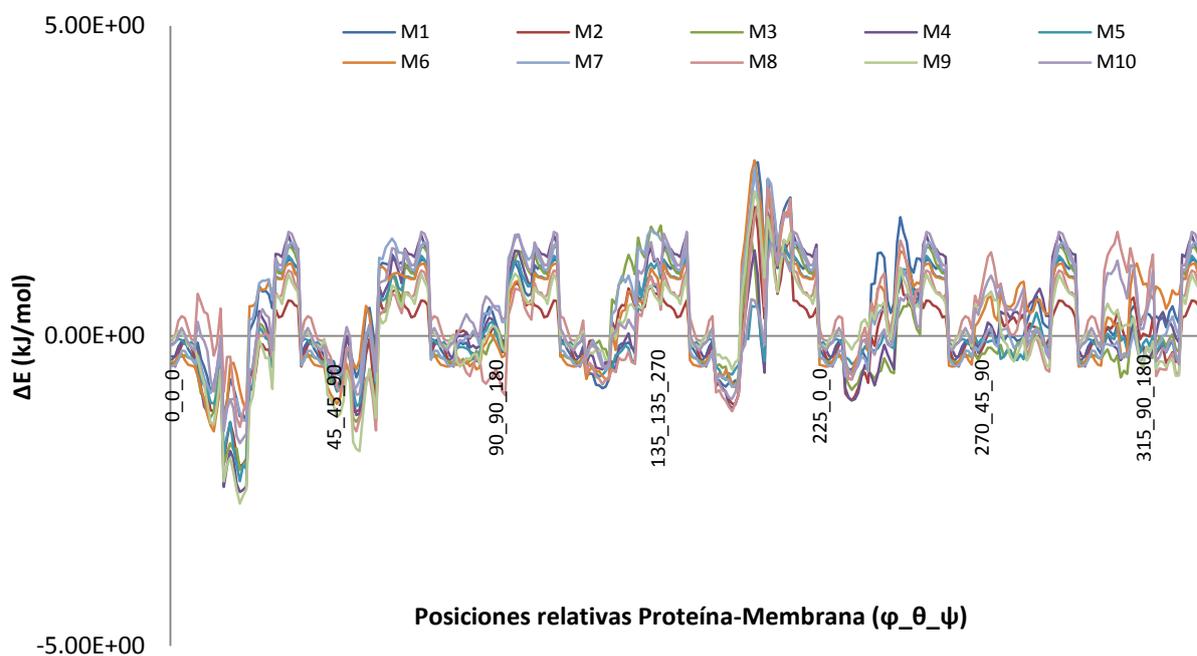
**Fig.31:** Perfiles energéticos de FABPs de hígado. Los distintos colores de las líneas representan el perfil electrostático de FABPs de distintas especies e igual tejido. Los perfiles energéticos siempre indican un mínimo en la interacción en el fondo del barril  $\beta$  de la proteína con la membrana, describiendo así FABPs difusionales según bibliografía.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el capítulo 1, segregando a las LFABP en un grupo aparte no ya por la conservación de residuos cargados ni por filogenética, sino por su mecanismo de interacción con membrana. Asimismo, se ajustan a lo que se conoce hasta el momento sobre el mecanismo de interacción FABP-Membrana.

A pesar de lo anterior, surgió una duda razonable con respecto al método de estudio de la componente electrostática en la interacción estudiada. Dado que las macromoléculas reciben un tratamiento de cuerpos rígidos, se decidió determinar si las distintas estructuras obtenidas en una RMN podrían resultar en perfiles energéticos distintos para una misma proteína debido a los distintos rotámeros posibles para los residuos. Se calculó entonces la energía de interacción para todas las estructuras de RMN de 2JU3 que se encuentran en PDB. Además, se inició el cálculo desde una posición distinta al resto con el objetivo de analizar la posible influencia del orden de las estructuras en el cálculo. Por último, se agregaron 64 posiciones que se descartaron en los cálculos anteriores por considerarlas similares a otras analizadas.

## Resultados

Los resultados obtenidos demuestran que tanto el perfil energético como las estructuras de máxima y mínima energía se conservan, probando que las distintas variables analizadas no afectan significativamente el método (**Figura 32**). En otras palabras, las mismas posiciones relativas de FABP respecto a la membrana arrojan perfiles de  $\Delta E$  prácticamente iguales aún cuando se originen en un orden aleatorio diferente y posean rotámeros distintos en su estructura.

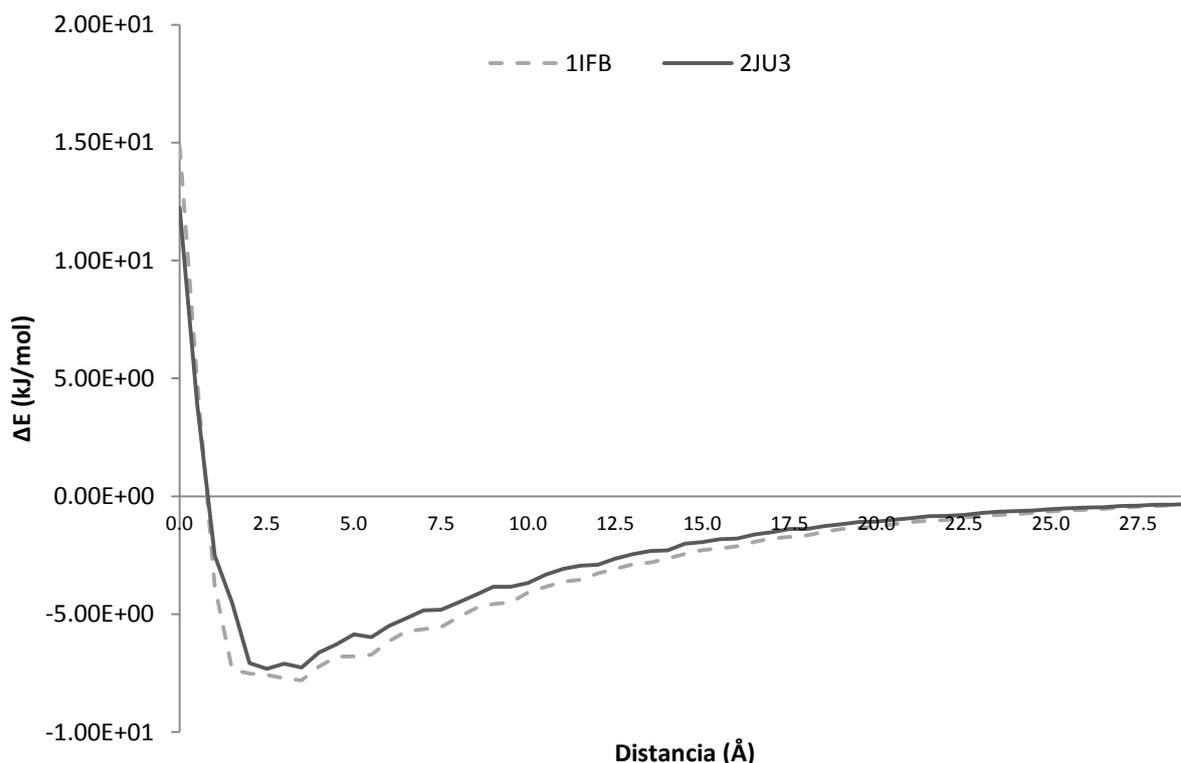


**Fig.32:** Perfiles energéticos de las 10 estructuras 2JU3 obtenidas por RMN.

### 3.2.2. Efecto de la distancia en la interacción. Distancia óptima de interacción

Una vez determinadas las interacciones de mínima energía, la relación de  $\Delta E$  con la distancia entre la superficie de las esferas de van der Waals de las proteínas y la membrana fue analizada para las FABPs representativas de cada grupo. Con el objetivo de evitar la sobrecarga energética del sistema, también se realizó el cálculo contra la membrana POPC3-SOPS1.

Se procedió entonces al cálculo del  $\Delta E$  electrostático de las posiciones de mínima energía desde los 0,00 a los 30,00 Å de distancia con un intervalo de 0,50 Å entre cada punto evaluado. Los resultados arrojan una distancia de interacción óptima alrededor de los  $3.5 \pm 0.5$  Å aunque todavía es significativa a una distancia de 10 Å, correspondiéndose con la distancia de Debye característica, en la cual la magnitud de la interacción electrostática decae a razón de  $1/e$  aproximadamente (**Figura 33**).



**Fig.33:**  $\Delta E$  electrostático vs distancia entre esferas de van der Wals de FABP y membrana.

### 3.2.3. Efectos del pH en la interacción

Una vez obtenidos los estados de protonación de las proteínas y membranas (ver capítulo 2), se procedió a calcular  $\Delta E$  para las posiciones de mínima energía a distintos pH. El criterio empleado para la selección de los valores de pH, fue el de los valores de pKa determinados por bibliografía para los fosfolípidos que componen la bicapa lipídica utilizada (Francis *et al.*, 1986).

Los resultados arrojados por la resolución de la ecuación de Poisson-Boltzmann muestran que el pH óptimo de interacción para las proteínas en su posición de mínima energía es cercano a 7,00 (**Figura 34**). Desde la perspectiva biológica, este valor es significativo dado que es el aceptado para la concentración de protones de sistemas biológicos y el utilizado en las experiencias *in vitro* que intentan emularlo.

En contraste, cuando se calculó la energía de interacción electrostática a distintos pH para las posiciones de máxima energía de interacción, el comportamiento de ambas proteínas se diferencia notablemente (**Figura 35**). LFABP parece presentar un pH óptimo de interacción cercano a 6,00, aunque por comparación con los valores de  $\Delta E$  obtenidos para la posición de mínima energía, se deduce que no es esta la posición más favorable. En cuanto a IFABP, la situación es absolutamente distinta. Pareciera no ser posible determinar un pH óptimo de interacción debido a la relativamente escasa variación de  $\Delta E$  y a que ningún valor es inferior a cero.

Resultados

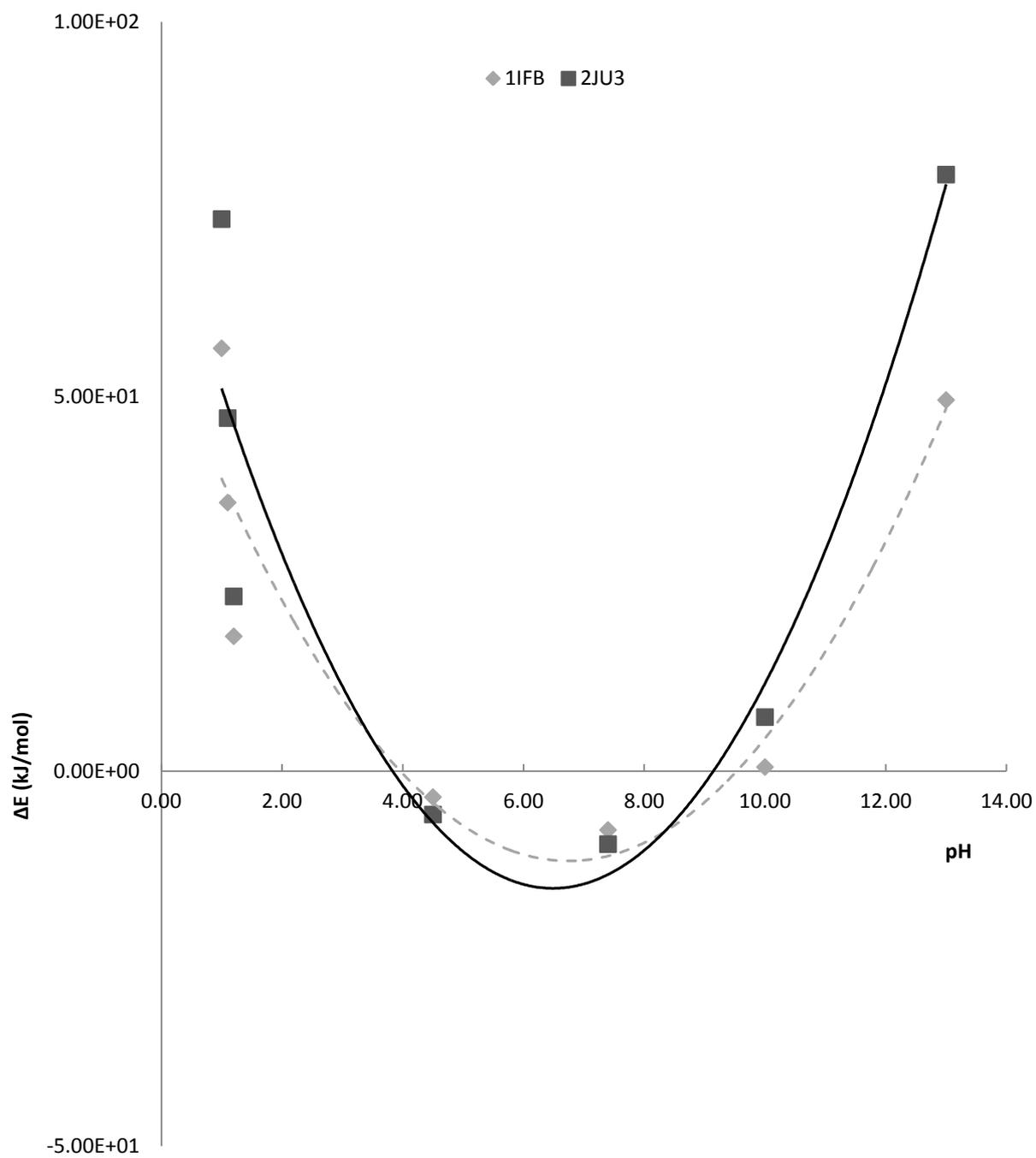
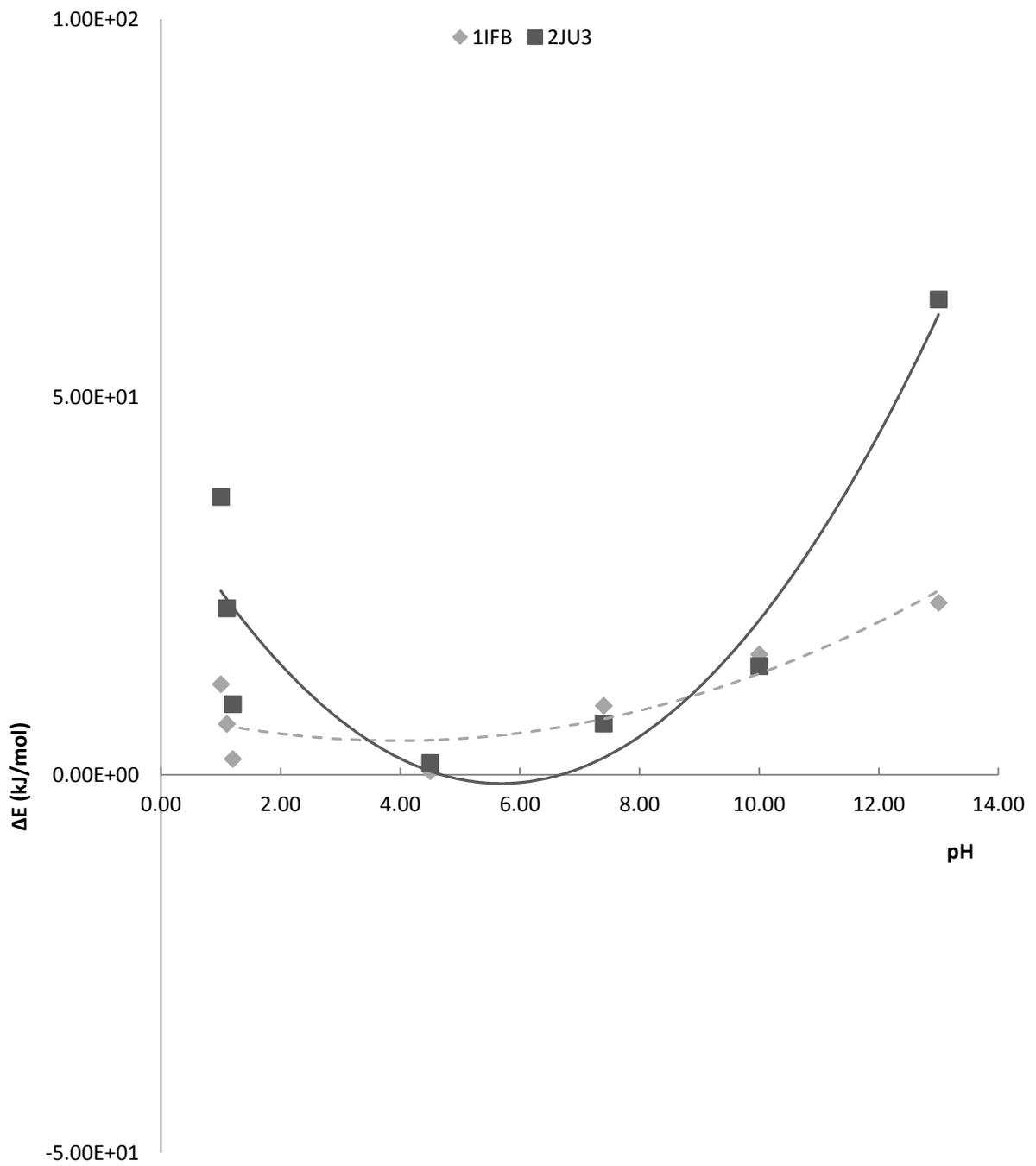


Fig.34:  $\Delta E$  electrostático vs distintos pH para las posiciones de mínima energía.

Resultados



**Fig.35:**  $\Delta E$  electrostático vs distintos pH para las posiciones de máxima energía.

### 3.2.4. Efecto de la fuerza iónica en la interacción

La influencia de la fuerza iónica del medio en la interacción FABP-membrana fue evaluada dada la importante variación de carga que se observa en las moléculas de carga neta distinta de cero cuando se modifica la concentración de iones del medio.

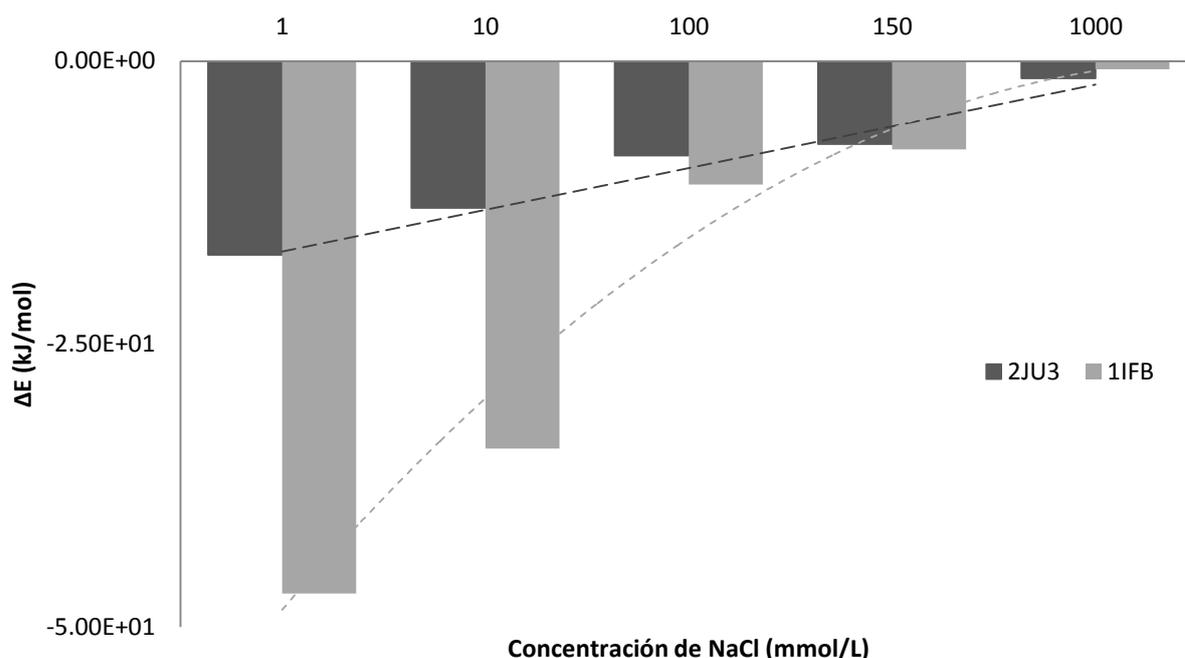
La bibliografía existente muestra como las variaciones de fuerza iónica afectan las cargas superficiales de las membranas aniónicas, influenciando la interacción con aquellas proteínas que lo hacen a través del mecanismo colisional, y de manera sensiblemente menor con las de mecanismo difusional (Hsu y Storch, 1996).

De los cálculos realizados para la interacción de IFABP y LFABP de rata sometidas a entornos de distinta fuerza iónica, se obtuvieron resultados consistentes con los experimentales publicados por distintos grupos de investigación, donde se observó que concentraciones salinas elevadas, disminuyen la carga efectiva de la superficie de las membranas aniónicas (Smith y Storch, 1999); este apantallamiento de carga generaría una reducción en la interacción electrostática entre los aminoácidos de carga positiva y las cabezas negativas de los fosfolípidos.

Para el estudio se procedió a variar las características dieléctricas del continuo de manera de simular concentraciones molares de NaCl con valores de 0.001, 0.01, 0.1 y 1.0. En la **figura 36**, se observa cómo el incremento de la fuerza iónica del medio disminuye las interacciones electrostáticas de IFABP. Esta disminución en las interacciones es sensiblemente inferior en LFABP, mostrando así que la fuerza iónica del medio afecta principalmente a las FABP de origen intestinal y con menor intensidad las hepáticas.

Nuevamente, se produce la segregación entre estos dos grupos, reforzando lo ya publicado sobre FABPs con mecanismos diferentes a la hora de interaccionar con membrana.

## Resultados



**Fig.36:**  $\Delta E$  electrostático vs concentraciones crecientes de fuerza iónica del medio. La línea de tendencia de IFABP (gris claro) muestra como esta proteína se ve afectada drásticamente por el cambio en la variable. Para LFABP (línea de tendencia gris oscuro), el cambio es notablemente menor.

### 3.2.5. Interacción de FABP Intestinal y Hepática de rata con membranas de distinta carga aniónica

Otra de las características determinantes para agrupar a las FABPs según su mecanismo de interacción con membranas, es la influencia de la carga neta de la membrana en su interacción con la proteína. El grupo denominado colisional, se ve altamente afectado por la variación en las cargas de las membranas, favoreciendo su interacción cuando las mismas aumentan. El grupo difusional en cambio, no presentaría alteraciones tan notables (Córsico *et al.*, 1998 y 2005. Falomir-Lockhart *et al.*, 2006).

Para este estudio se calcularon los  $\Delta E$  electrostáticos para las posiciones relativas de IFABP y LFABP de rata, contra membranas de carga aniónica creciente. En concordancia con la bibliografía, para LFABP se observó que el incremento en las cargas negativas de la membrana también afecta la interacción electrostática, aunque de manera sensiblemente menor que a IFABP (**Figura 37 A y B**). El mismo fenómeno que presentó IFABP, se presenta

en FABPs de distintos tejidos y especies de mamíferos estudiadas con la única excepción de LFABP.

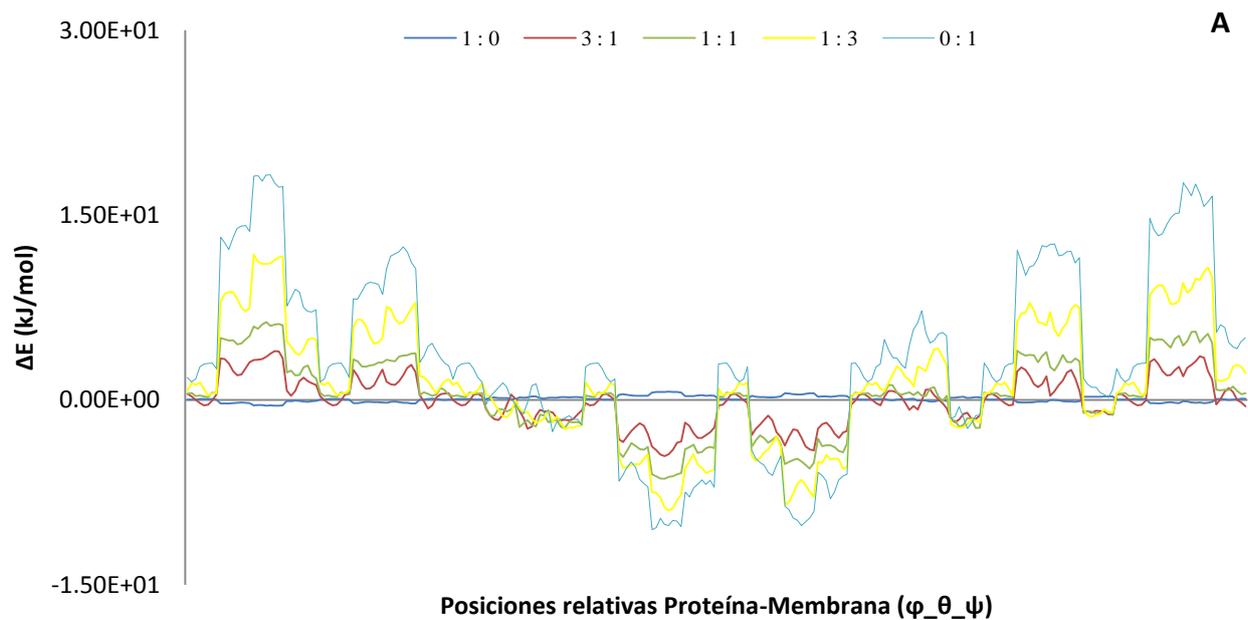
Asimismo, se evidencia que, si bien existe una respuesta de ambas proteínas a las variaciones de carga de la membrana, las respuestas siguen una mecánica distinta (**Figura 38 A y B**). Por un lado, para IFABP el incremento en la carga aniónica de la membrana redundaba en una mayor afinidad por la posición relativa de mínima energía, acompañada de un rechazo proporcional hacia las posiciones de máxima energía (**Figura 38 A**). Para LFABP en cambio, el direccionamiento de la interacción parece estar supeditado más al rechazo de las posiciones de máxima energía que a la afinidad por las de mínima (**Figura 38 B**).

En la **figura 39 A**, se comparan las energías mínimas de interacción de ambas proteínas al incrementar la carga aniónica de la membrana. Se observa que los  $\Delta E$  de las posiciones de mínima energía decaen en una curva con mayor pendiente para IFABP que para LFABP, indicando un incremento en la afinidad de la primera por las membranas de mayor carga aniónica.

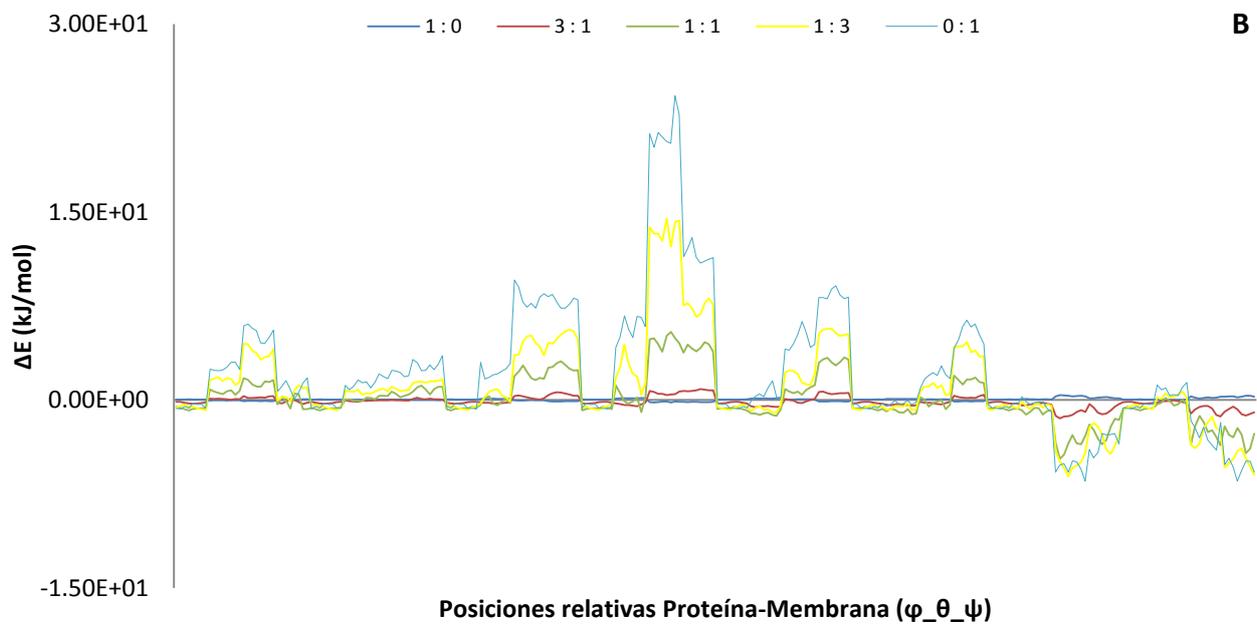
Por otro lado, las posiciones de máxima energía muestran que el incremento de  $\Delta E$  para LFABP no sólo es superior al de IFABP, sino que sigue una curva exponencial, mientras que IFABP muestra un incremento lineal (**Figura 39 B**). Esto refuerza la hipótesis de una selección por rechazo de posiciones desfavorables en el caso de las LFABP y por atracción de posiciones favorables para IFABP.

Al analizar los resultados obtenidos para las demás especies estudiadas, estos perfiles energéticos se descubren característicos para cada grupo de FABPs (**Figura 40 A-F**). Nuevamente, se puede discriminar a estas proteínas en dos grupos donde el mecanismo de interacción es la característica particular de cada uno de ellos.

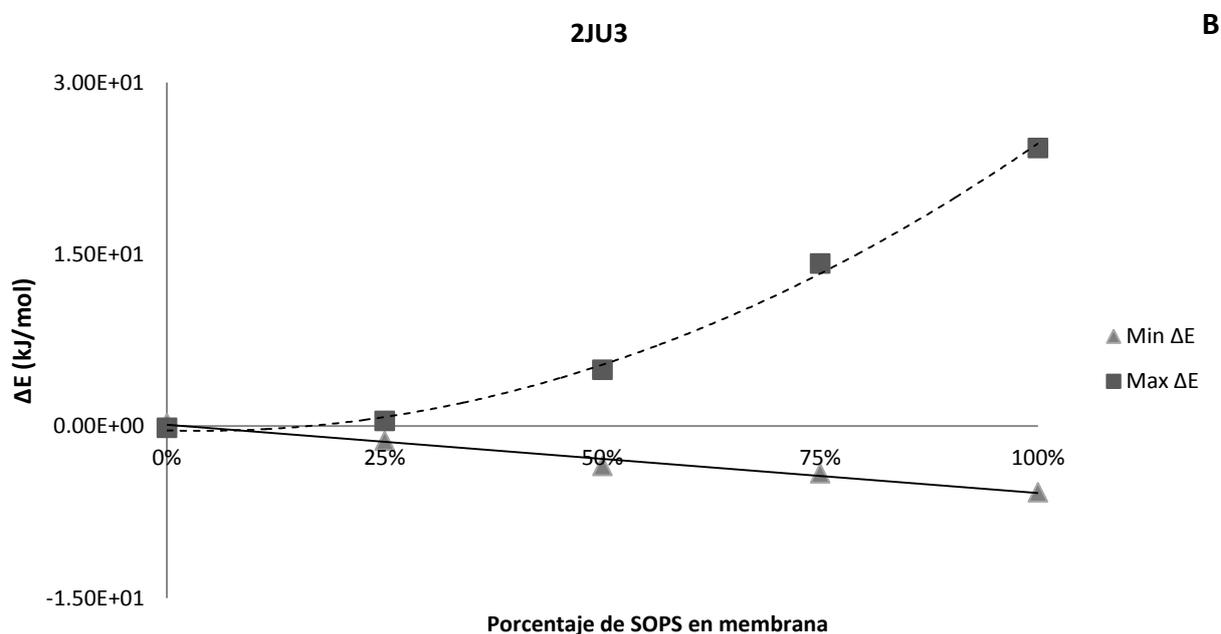
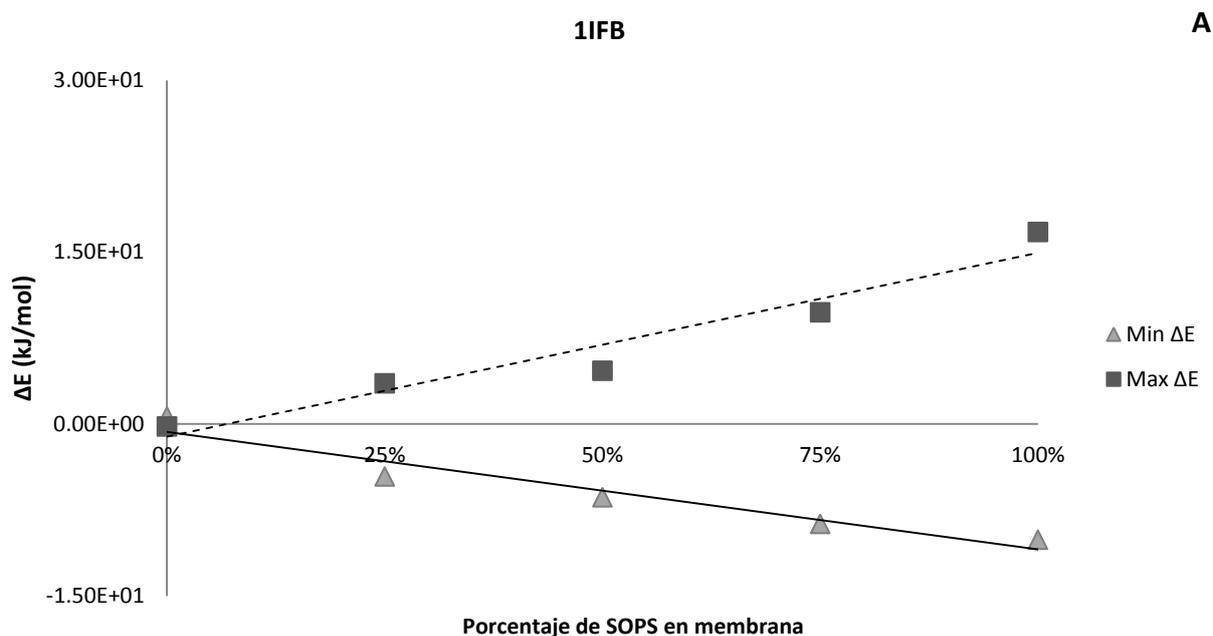
## Resultados



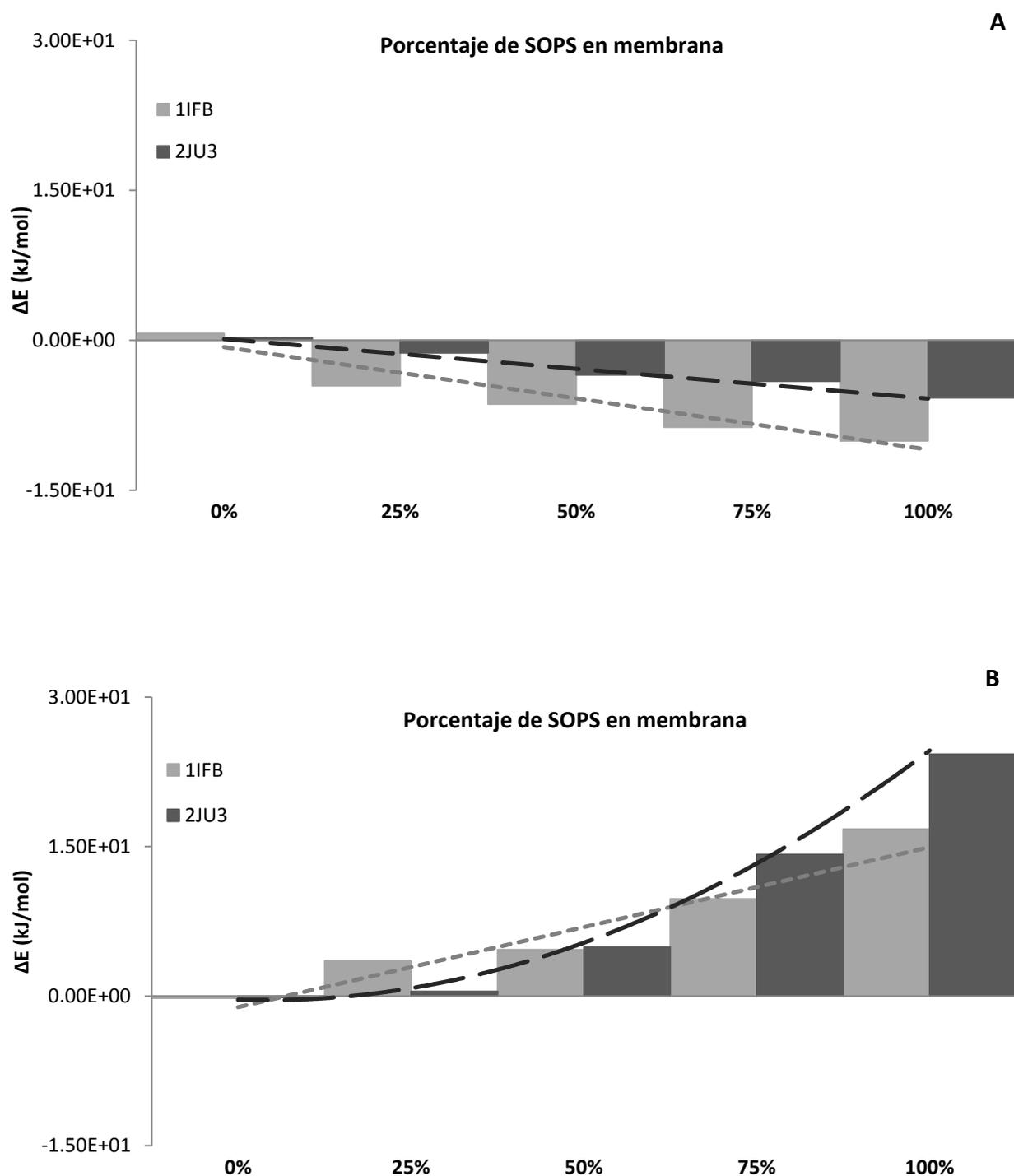
**Fig37. A:** Perfiles electrostáticos de 1FB vs membranas de distinta relación POPC/SOPS. **B:** Perfiles electrostáticos de 2JU3 vs membranas de distinta relación POPC/SOPS. Los valores de los ángulos de las posiciones relativas no se muestran para evitar entorpecer la visión de los perfiles.



## Resultados

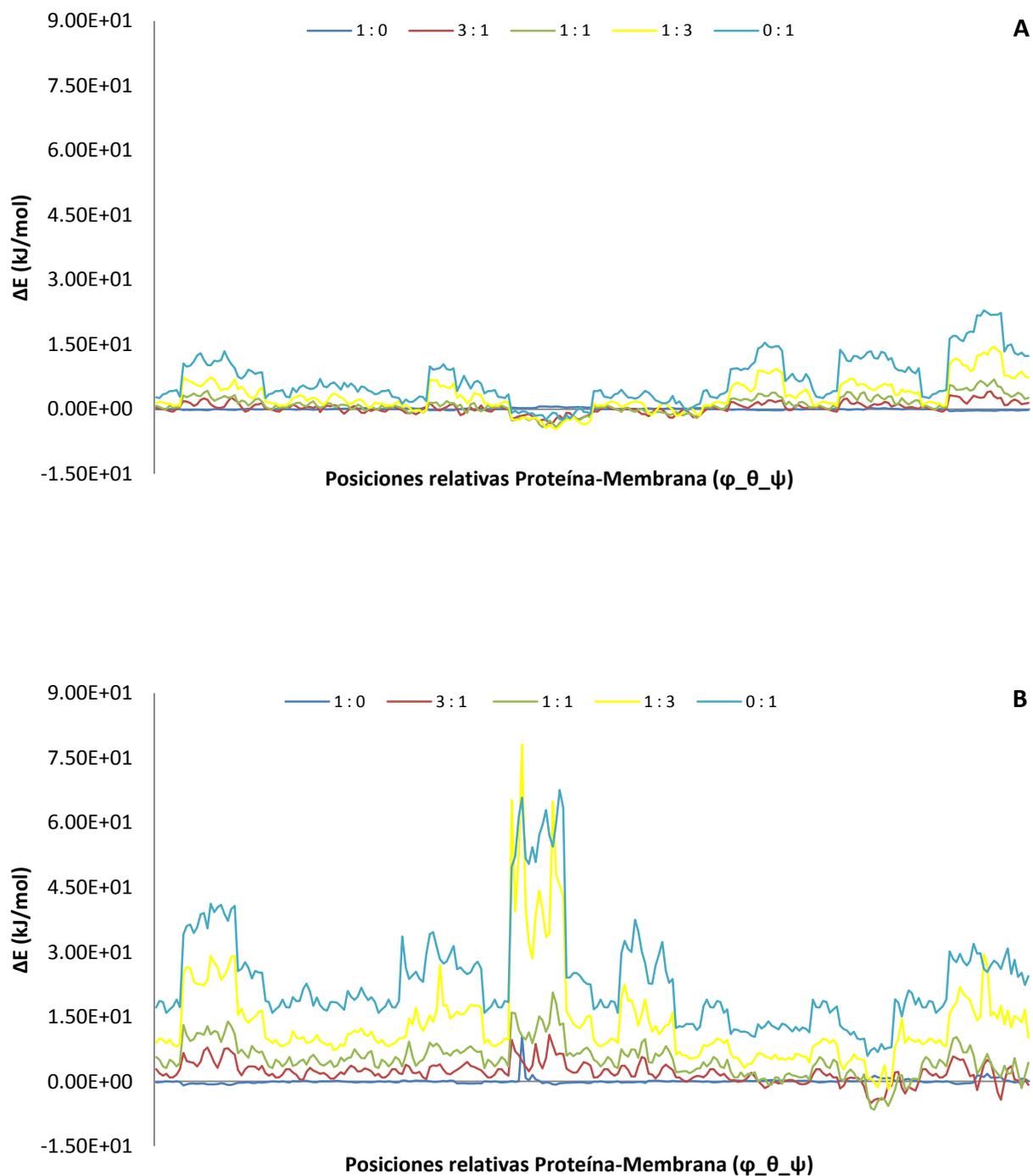


**Fig.38:** Posiciones de máxima y mínima energía contra membranas de distintos porcentaje de SOPS. Para 1IFB (A), nótese que el incremento de energía que acompaña a las posiciones de máxima energía, es similar a la disminución con respecto a las de mínima. Para 2JU3 (B), en cambio, el incremento energético es sensiblemente superior con respecto a la disminución de energía.



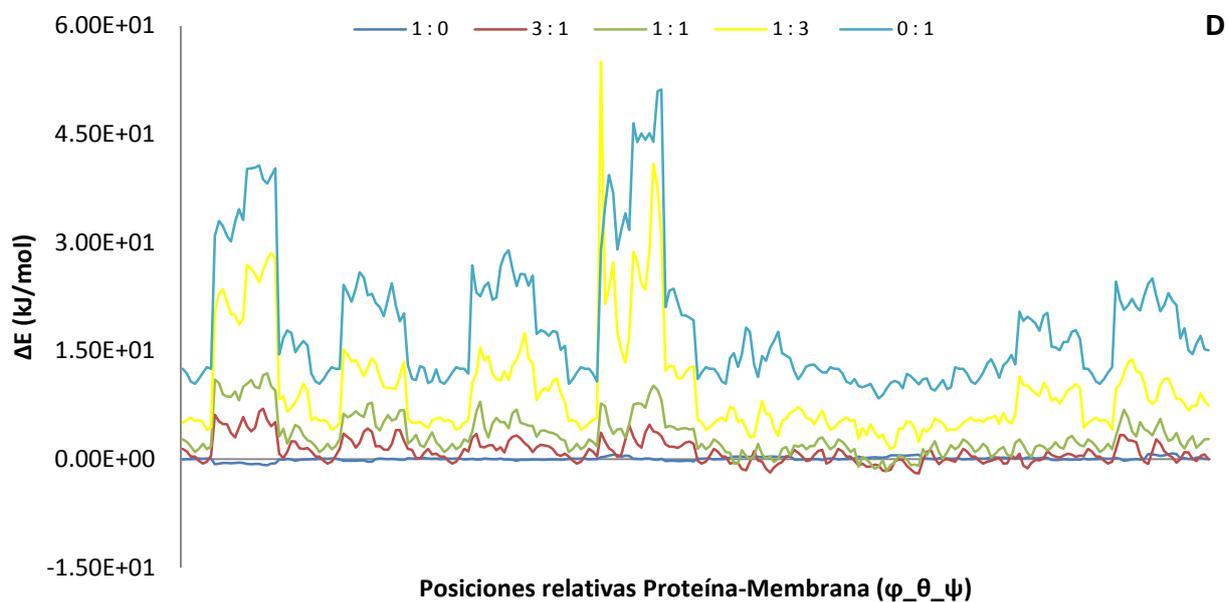
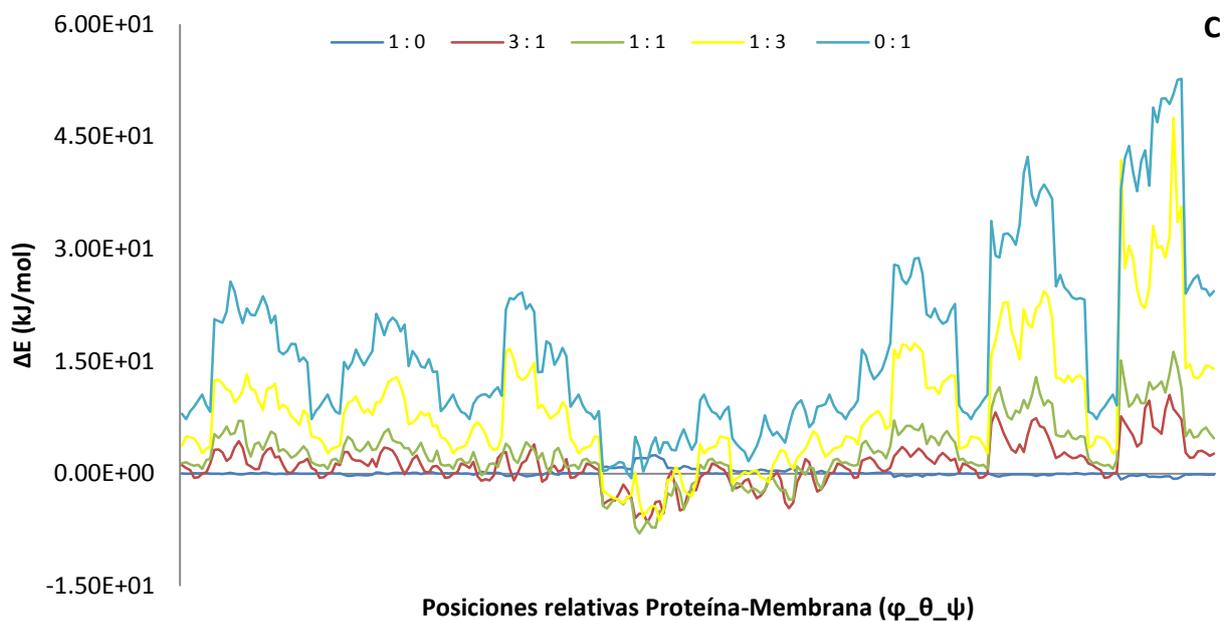
**Fig.39: A.** Se muestra el descenso de los  $\Delta E$  de la interacción de 1IFB y 2JU3 con membranas con distintos porcentajes de SOPS. La tendencia lineal del descenso muestra una pendiente negativa más marcada para la primera proteína que para la segunda. **B.** Se muestra el incremento de los  $\Delta E$  de la interacción de 1IFB y 2JU3 con membranas con distintos porcentajes de SOPS. Mientras que para la primera proteína el incremento es lineal, 2JU3 muestra un crecimiento exponencial.

## Resultados



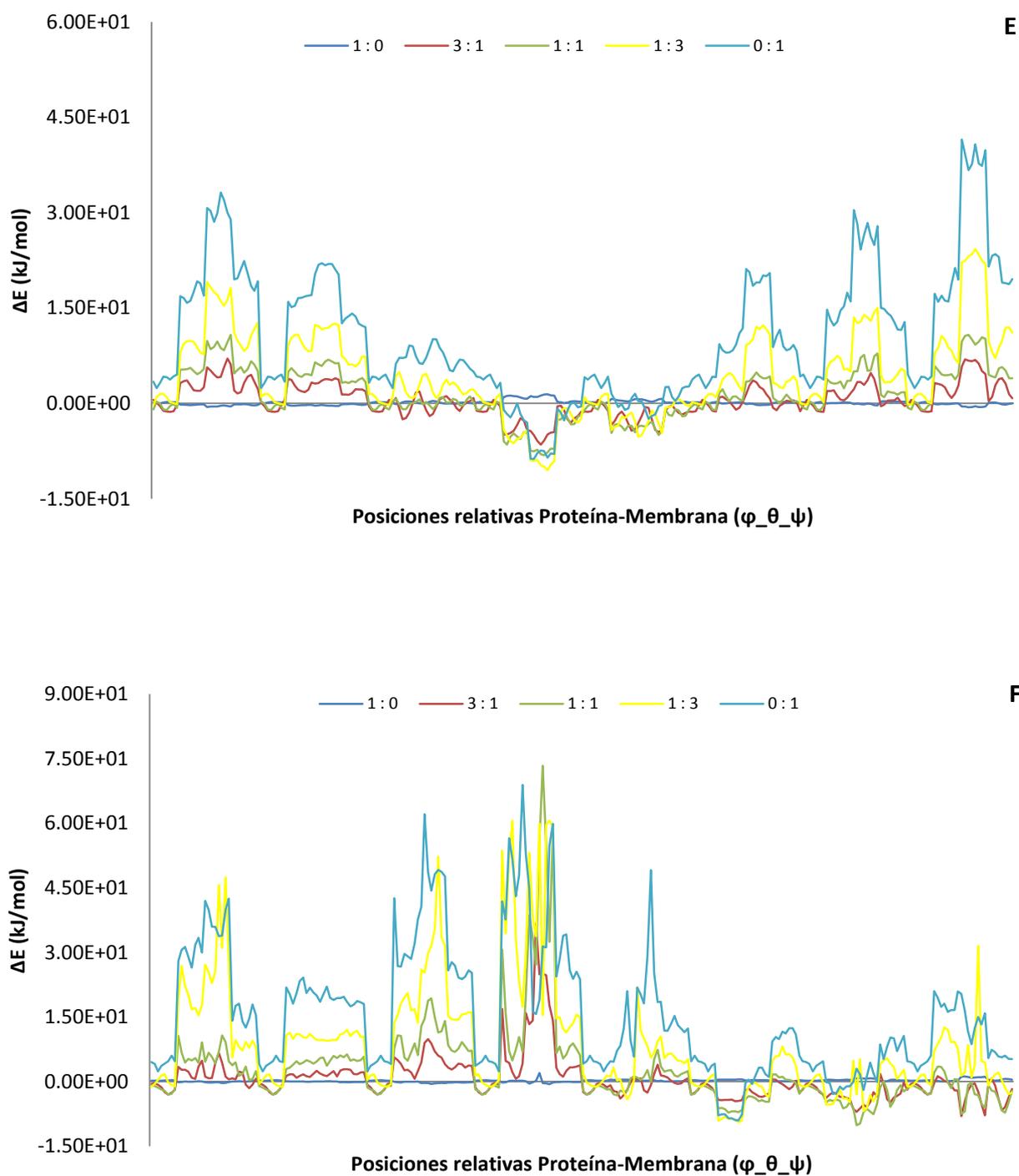
**Fig.40: A.** Perfiles electrostáticos de IFABP Humana (IDPDB: 1KZW) vs membranas de distinta relación POPC/SOPS. **B.** Perfiles electrostáticos de LFABP Humana (IDPDB: 2PY1) vs membranas de distinta relación POPC/SOPS. Nótese que el perfil electrostático de 2PY1 es tan altamente energético comparado con 2JU3, que se debió graficar con otra escala. Sin embargo, el paisaje electrostático guarda gran similitud. Los valores de los ángulos de las posiciones relativas no se muestran para evitar entorpecer la visión de los perfiles.

## Resultados



**Fig.40:** C. Perfiles electrostáticos de IFABP Bovina (MIB) vs membranas de distinta relación POPC/SOPS. D. Perfiles electrostáticos de LFABP Bovina (MLB) vs membranas de distinta relación POPC/SOPS. Nótese que el perfil electrostático de MIB y MLB son altamente energéticos comparados con 1IFB y 2JU3 respectivamente, por lo que se debió graficar con otra escala. Sin embargo, los paisajes electrostáticos guardan gran similitud. Los valores de los ángulos de las posiciones relativas no se muestran para evitar entorpecer la visión de los perfiles.

## Resultados



**Fig.40:** **E.** Perfiles electrostáticos de IFABP Murina (MIM) vs membranas de distinta relación POPC/SOPS. **F.** Perfiles electrostáticos de LFABP Murina (MLM) vs membranas de distinta relación POPC/SOPS. Nótese que el perfil electrostático de MIM y particularmente MLM son altamente energéticos comparados con 1IFB y 2JU3 respectivamente, por lo que se debió graficar con otra escala. Sin embargo, los paisajes electrostáticos guardan gran similitud. Los valores de los ángulos de las posiciones relativas no se muestran para evitar entorpecer la visión de los perfiles.

### 3.2.6. Efecto de las mutaciones puntuales de aminoácidos cargados, en la interacción FABP-Membrana

Como se vio en los resultados del capítulo 2, la familia FABP presenta no solo una estructura altamente conservada, sino también aminoácidos cargados altamente conservados en regiones determinadas para ambos grupos.

Para evaluar la relevancia de la carga de dichos residuos en la interacción proteína-membrana se procedió a calcular los  $\Delta E$  electrostáticos de las posiciones relativas de distintas FABPs con mutaciones puntuales, con respecto a la membrana.

Los resultados muestran que un grupo reducido de aminoácidos cargados altamente conservados son determinantes a la hora de dirigir la interacción con la membrana aniónica.

Para la representante del grupo colisional, se observó que los aminoácidos ARG29 y LYS30 de la hélice  $\alpha$ II dirigen la posición de mínima energía para la interacción (**Figura 41 y 43**), mientras que LYS28 parece no tener tanta relevancia a pesar de su ubicación y carga (**Figura 42**). En el polo opuesto de la misma proteína, la posición de menor afinidad y máxima energía de la misma proteína parece estar determinada por el residuo GLU44 (**Figura 44**).

En el caso de la proteína de hígado de rata, los aminoácidos GLU26 y ASP27 de  $\alpha$ II evidencian ser responsables de un valor desfavorable para la energía de interacción cuando la hélice se orienta hacia la membrana (**Figuras 45 y 46**).

Por otra parte, y para la misma proteína, los aminoácidos LYS 46 y 47, ubicados en el fondo del barril  $\beta$ , generan un  $\Delta E$  electrostático negativo, indicando una configuración favorable (**Figuras 47 y 48**).

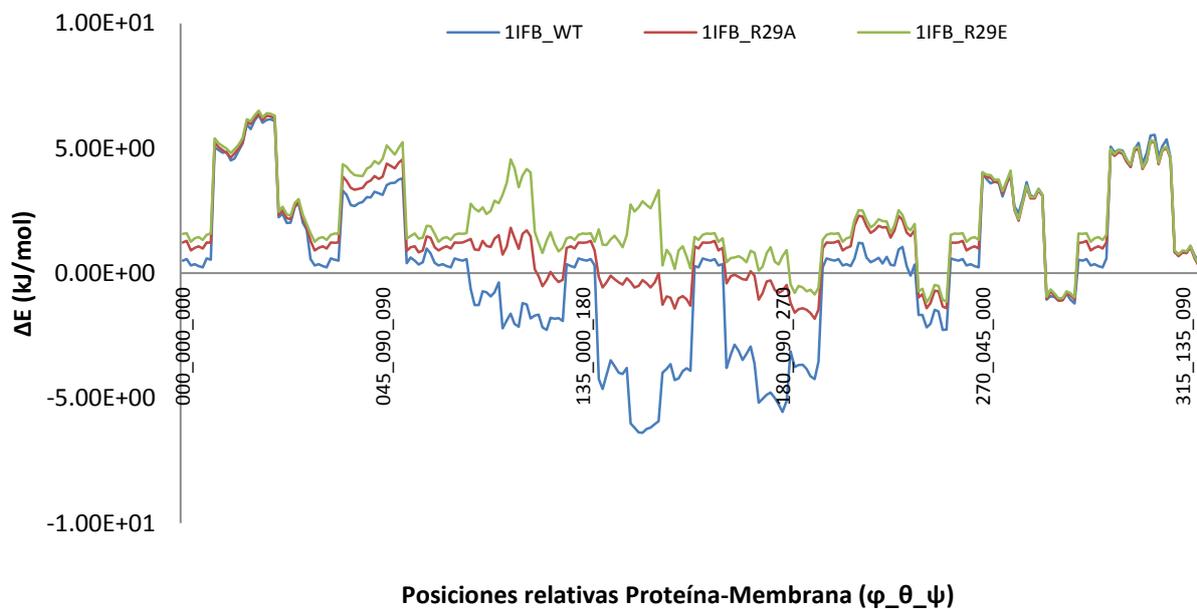
La mutación combinada de los aminoácidos señalados como relevantes en ambas proteínas, genera una inversión en el perfil de la interacción electrostática que semeja la conversión de colisional en difusional y viceversa para ambas FABPs (**Figuras 49 y 50**).

Diversas FABPs de distintos tejidos fueron mutadas en las mismas posiciones que IFABP y LFABP obteniéndose resultados similares en todos los casos (**Figuras 51 - 56**).

En el caso de aminoácidos cargados no altamente conservados o conservados fuera de las regiones de carga conservada de las hélices  $\alpha$ II y del barril  $\beta$ , las alteraciones del perfil

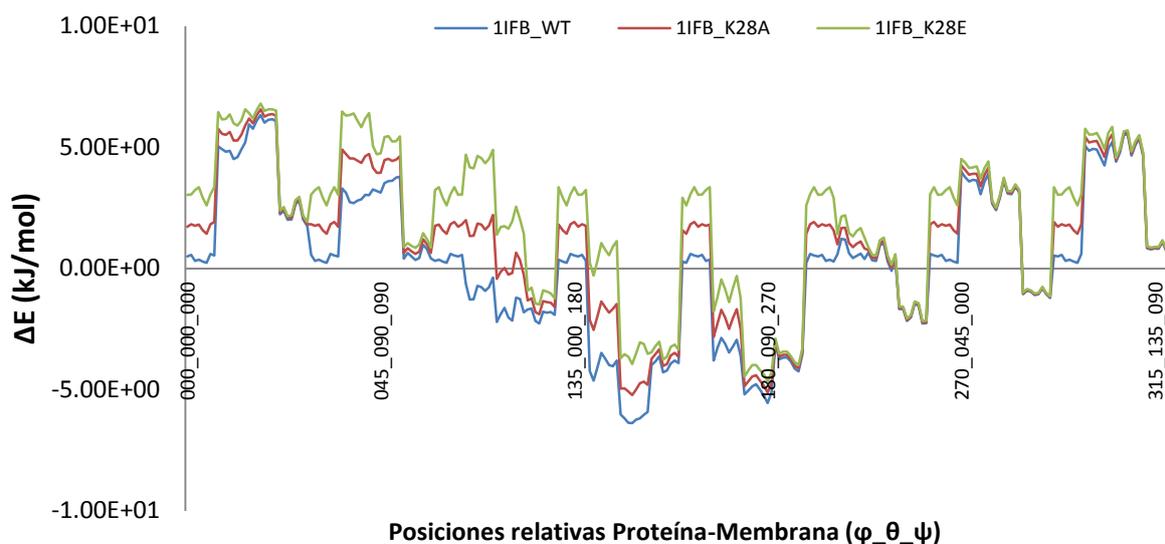
## Resultados

electrostático son despreciables o no se encuentran en las posiciones de mínima y máxima energía (Figura 57 - 60).



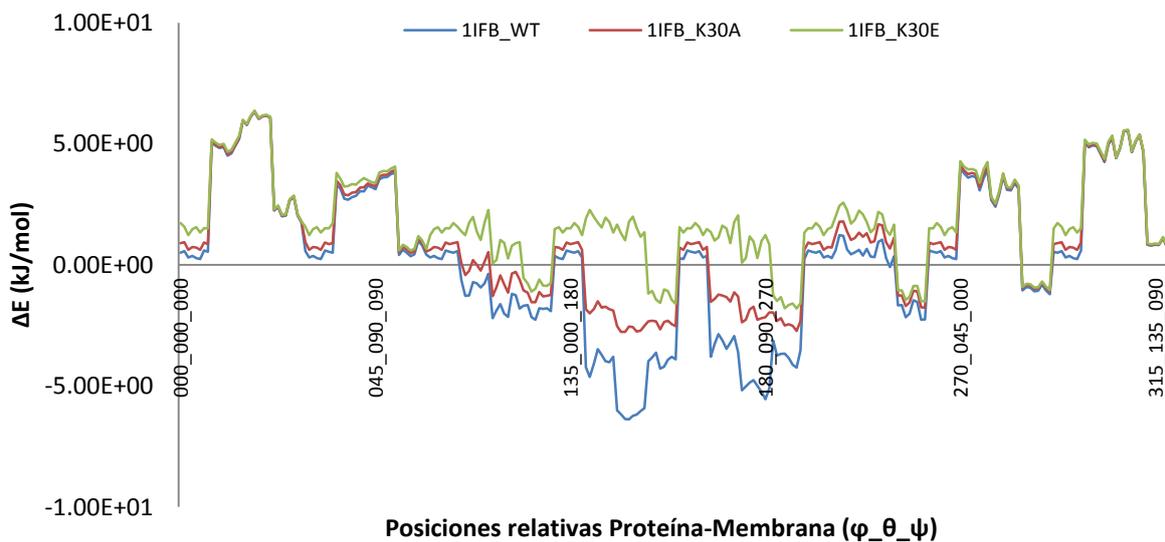
**Fig.41:** Perfil energético de IFABP de rata. En azul se observa la proteína WT. En rojo la mutación de ARG29 ALA neutra. En verde, la mutación de ARG29 por GLU negativo. Se observa un drástico cambio del perfil en la zona de mínima interacción, demostrando la relevancia del residuo ARG29 en la interacción.

## Resultados

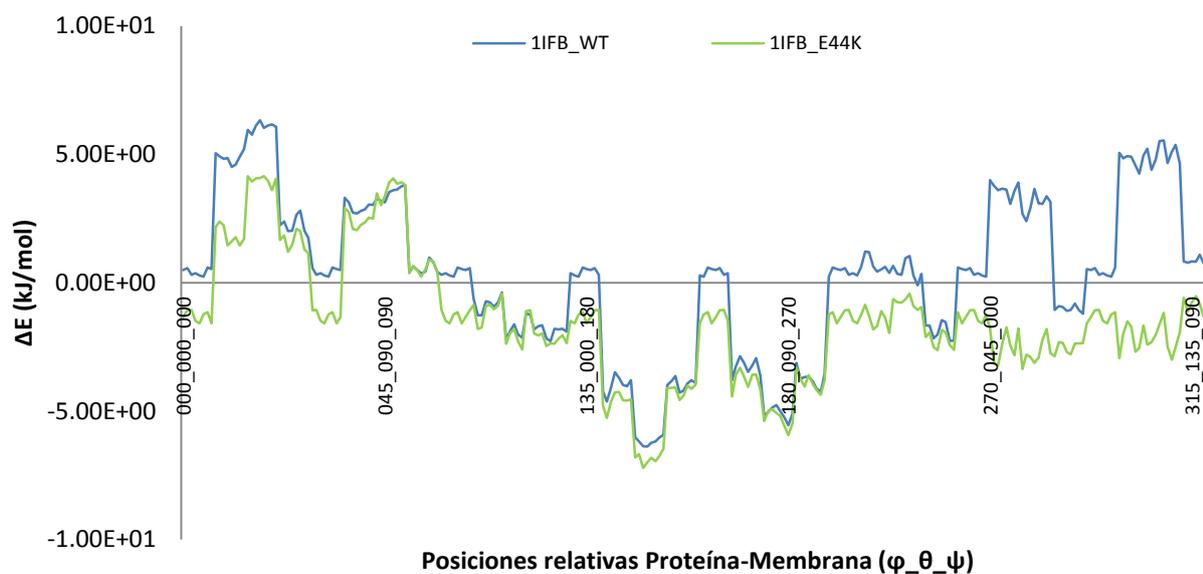


**Fig.42 (Arriba):** Perfil energético de IFABP de rata. En azul se observa la proteína WT. En rojo la mutación de LYS28 por ALA neutra. En verde, la mutación de LYS28 por GLU negativo. Se observa un ligero cambio en el perfil, prácticamente despreciable al comparar con mutación de ARG29.

**Fig.43 (Abajo):** Perfil energético de IFABP de rata. En azul se observa la proteína WT. En rojo la mutación de LYS30 por ALA neutra. En verde, la mutación de LYS30 por GLU negativo. Al igual que en mutación de ARG29, los cambios en el perfil señalan el protagonismo del residuo en la interacción con membrana aniónica.

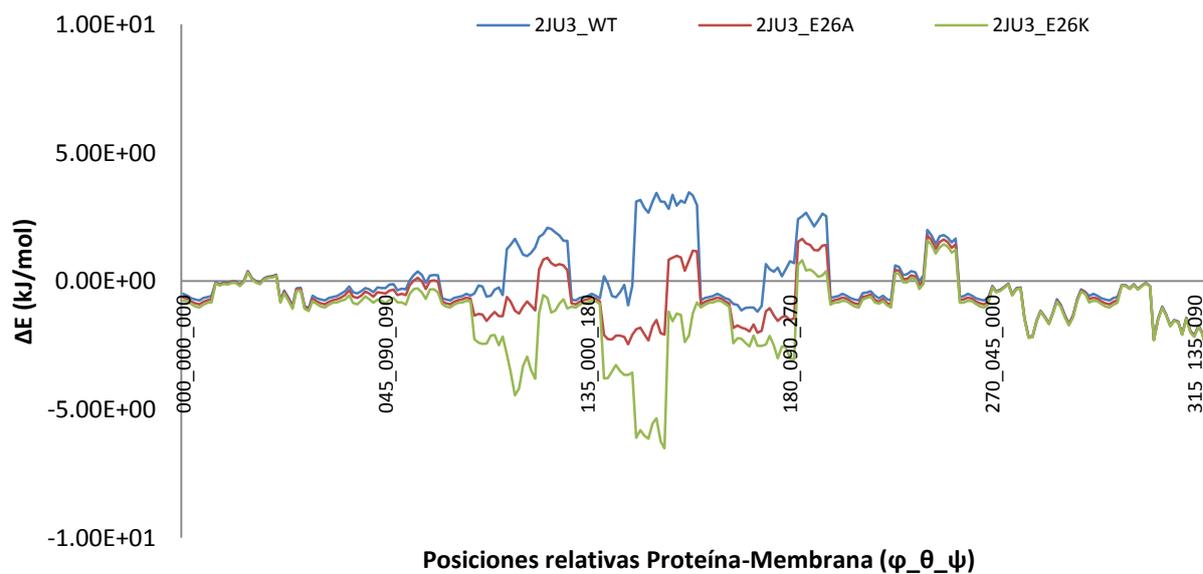


## Resultados

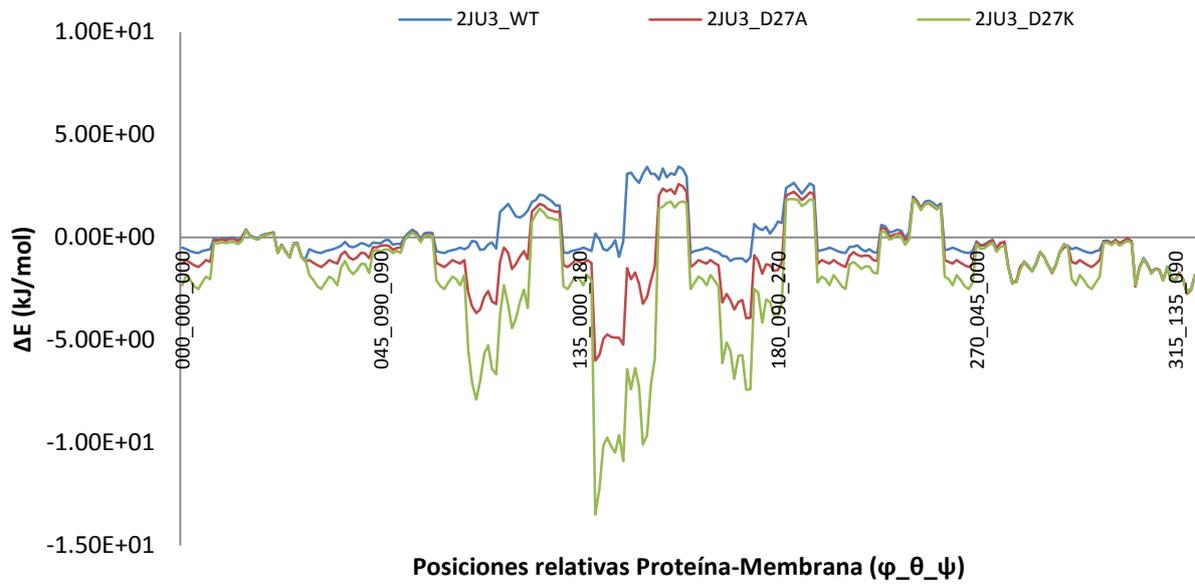


**Fig.44 (Arriba):** Perfil energético de IFABP de rata. La inversión de carga (verde) debido a mutación del GLU44 por una LYS, señala la importancia de este residuo en la interacción de máxima energía. Nótese una pequeña alteración en todo el perfil que incrementa la afinidad en las posiciones de mínima energía.

**Fig.45 (Abajo):** Perfil energético de LFABP de rata. En rojo la mutación de GLU26 por ALA neutra. En verde, la mutación por LYS positiva. Se observa un favorecimiento de la interacción con la región de la hélice all, antes vedada por las repulsión de las cargas de igual signo.

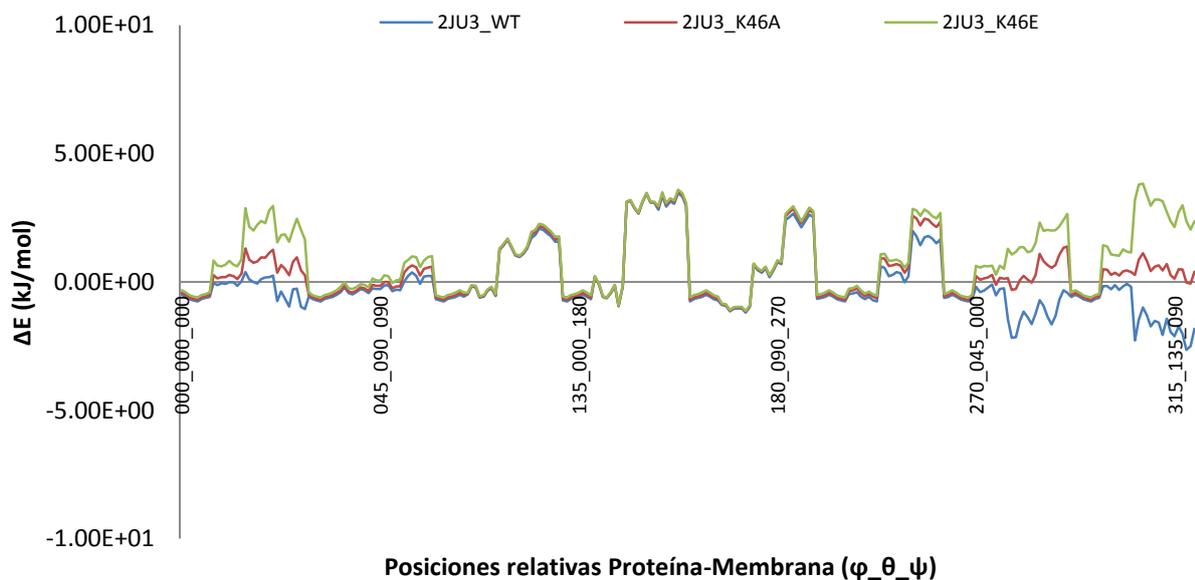


## Resultados

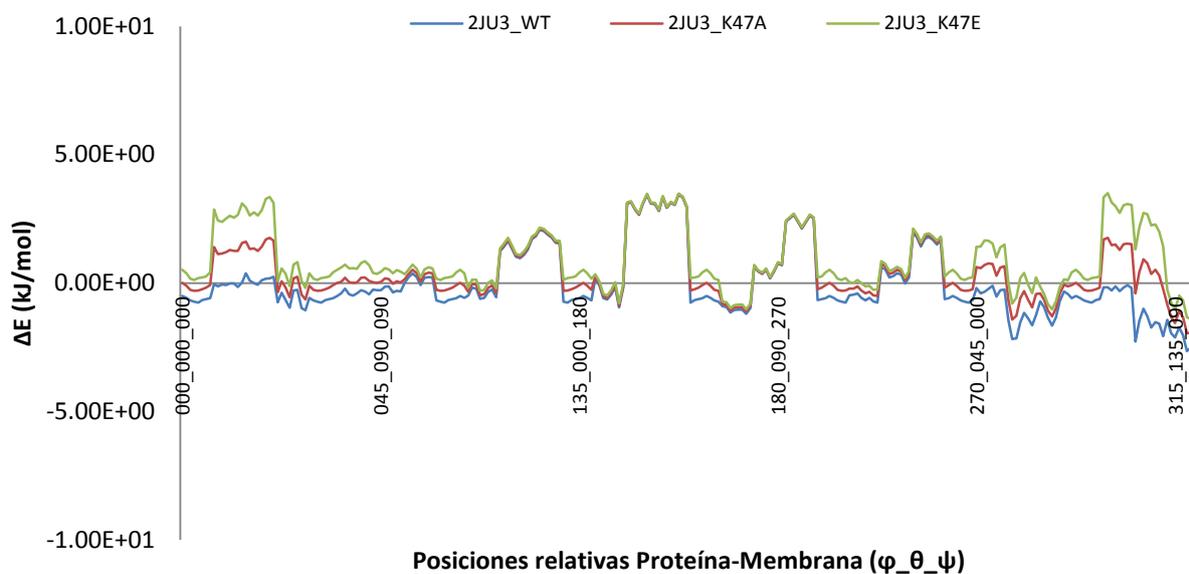


**Fig.46 (Arriba):** Perfil energético de LFABP de rata. El apagado (rojo) y la inversión de carga (verde) por mutación del GLU27 por ALA y LYS respectivamente muestran relevancia de este residuo para la repulsión de la orientación de las hélices all hacia la membrana aniónica.

**Fig.47 (Abajo):** Perfil energético de LFABP de rata. El apagado (rojo) y la inversión de carga (verde) por mutación del LYS46 por ALA y GLU respectivamente señalan el protagonismo de ése residuo en la atracción de la posición de mínima energía. muestran relevancia de este residuo en la interacción de mínima energía.

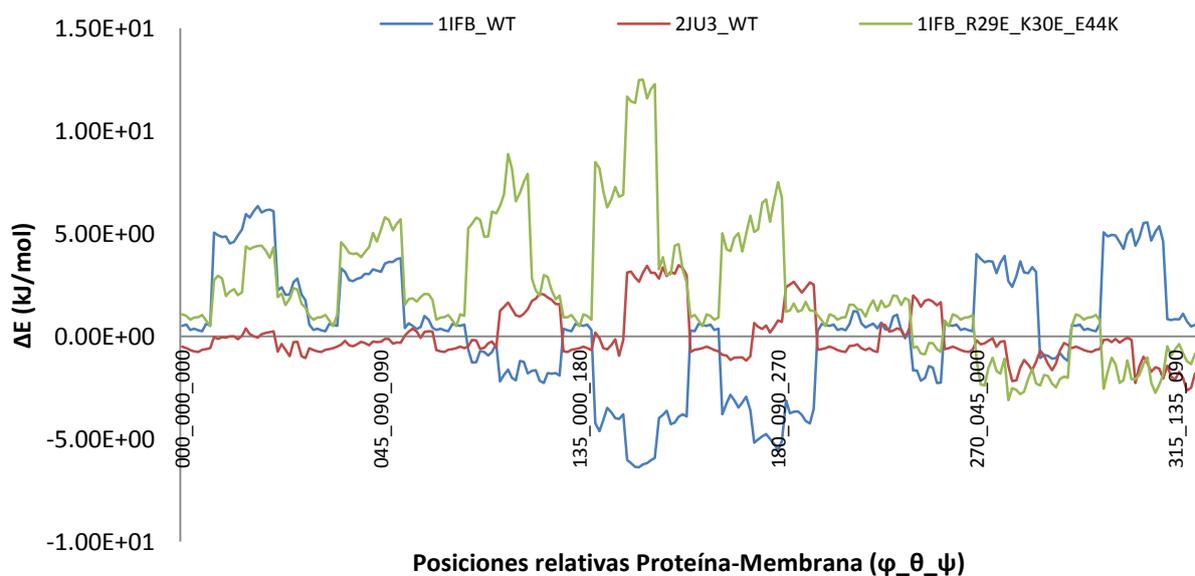


## Resultados

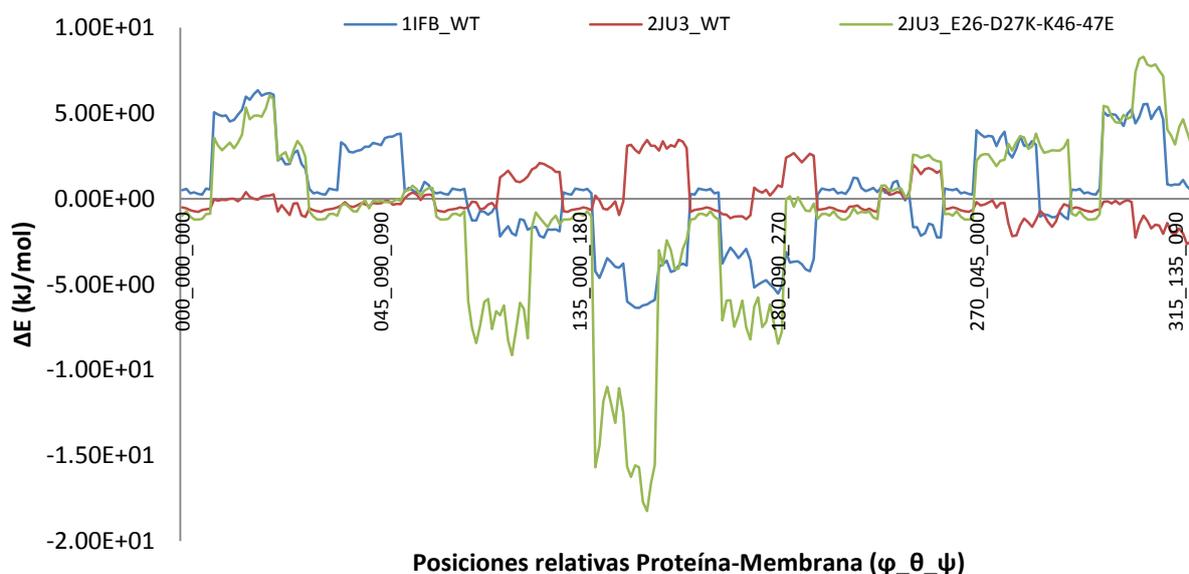


**Fig.48 (Arriba):** Perfil energético de LFABP de rata. El apagado (rojo) y la inversión de carga (verde) por mutación del LYS47 por ALA y GLU respectivamente señalan el protagonismo de ese residuo en la atracción de la posición de mínima energía.

**Fig.49 (Abajo):** Perfil energético de IFABP (azul) y LFABP (rojo) de rata. En verde, las mutaciones combinadas para IFABP. Obsérvese que la similitud entre la proteína mutada y la difusional permiten hipotetizar una reversión en el mecanismo de acción desde el punto de vista electrostático.

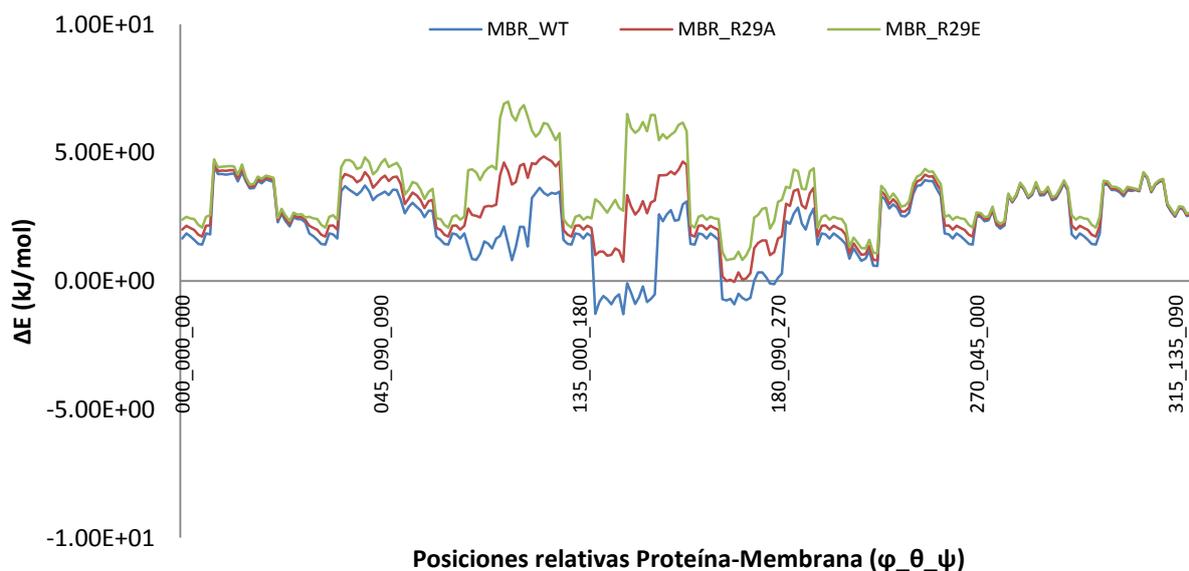


## Resultados

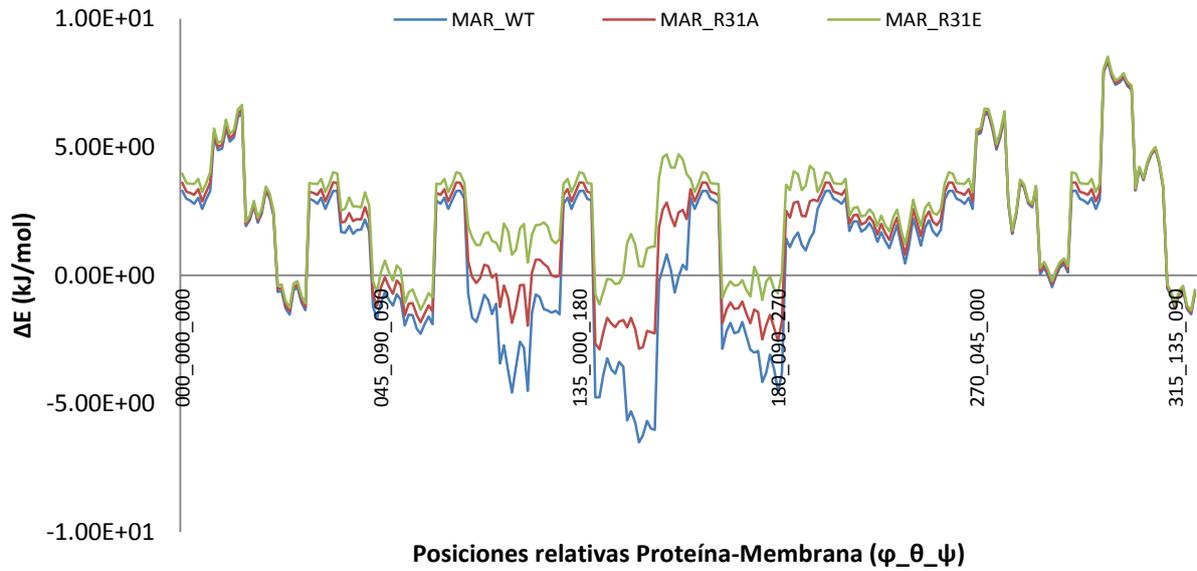


**Fig.50 (Arriba):** Perfil energético de IFABP (azul) y LFABP (rojo) de rata. En verde, las mutaciones combinadas para LFABP. Obsérvese que la similitud entre la proteína mutada y la colisional permiten hipotetizar una reversión en el mecanismo de acción desde el punto de vista electrostático.

**Fig.51 (Abajo):** Perfil energético de B-FABP de rata con carga de ARG29 apagada (rojo) o invertida (verde), por mutaciones con ALA y GLU respectivamente. Se observa la relevancia del residuo para la interacción con membrana en las FABPs de este tejido.

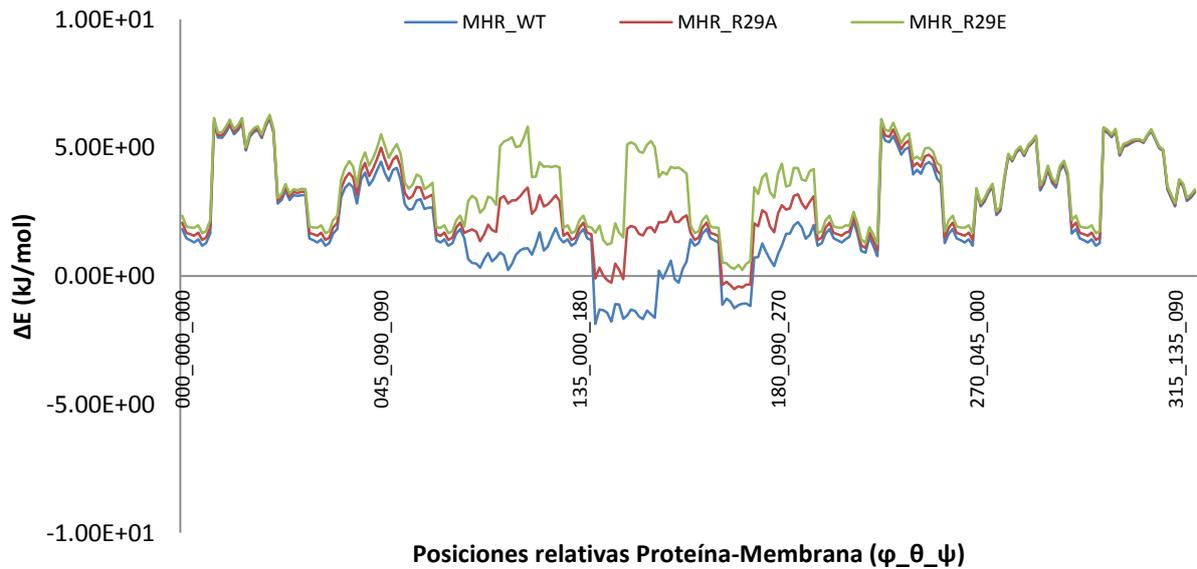


## Resultados

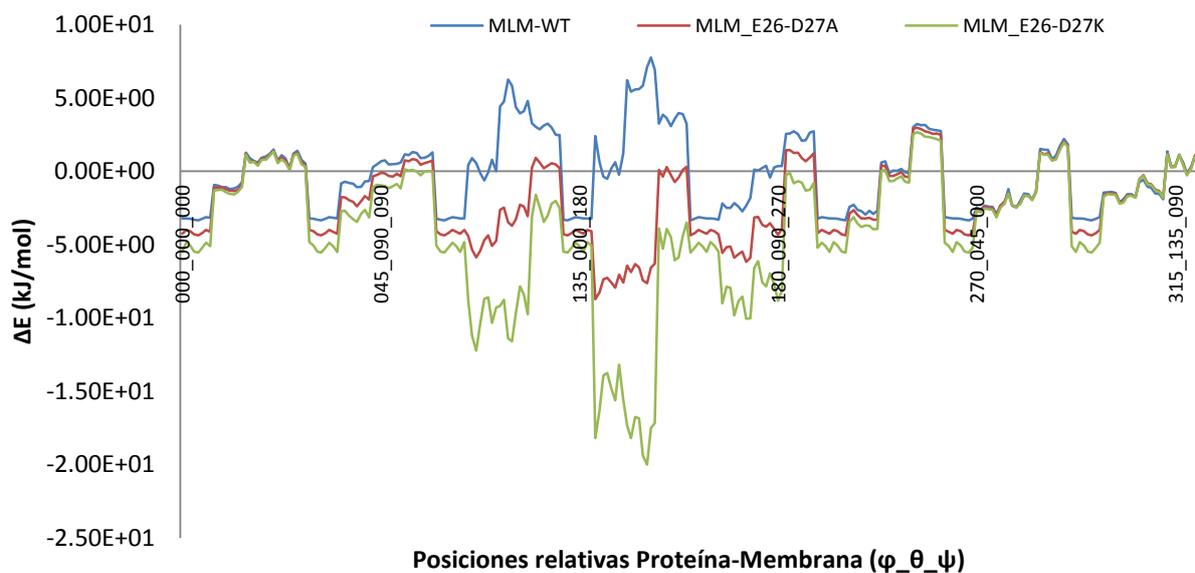


**Fig.52 (Arriba):** Perfil energético de A-FABP de rata con carga de ARG31 apagada (rojo) o invertida (verde), por mutaciones con ALA y GLU respectivamente. Se observa la relevancia del residuo para la interacción con membrana en las FABPs de este tejido.

**Fig.53 (Arriba):** Perfil energético de H-FABP de rata con carga de ARG29 apagada (rojo) o invertida (verde), por mutaciones con ALA y GLU respectivamente. Se observa la relevancia del residuo para la interacción con membrana en las FABPs de este tejido.

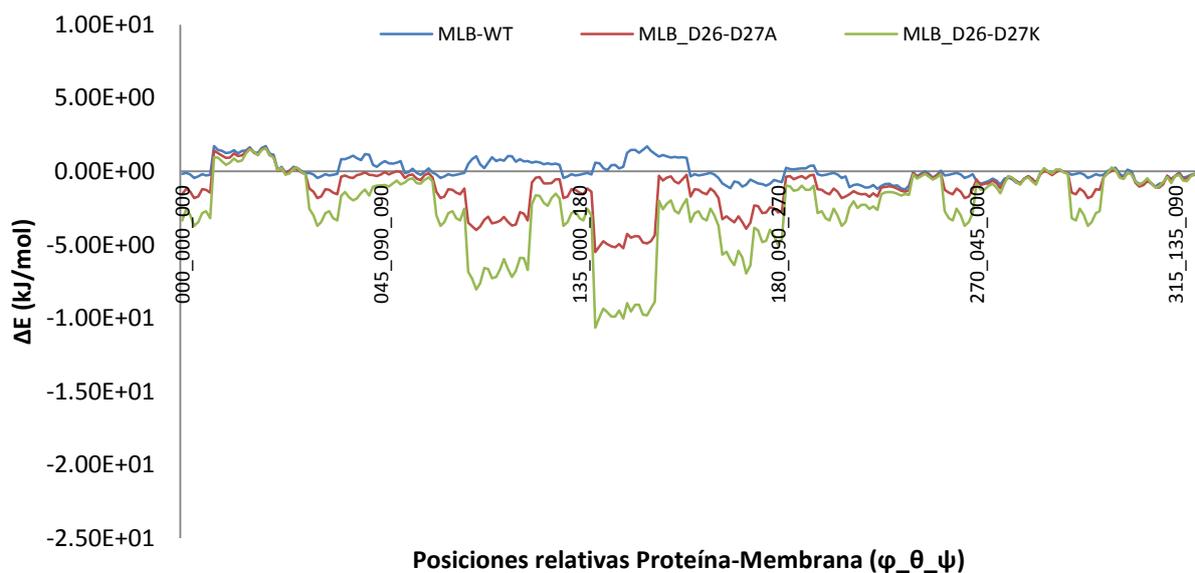


## Resultados

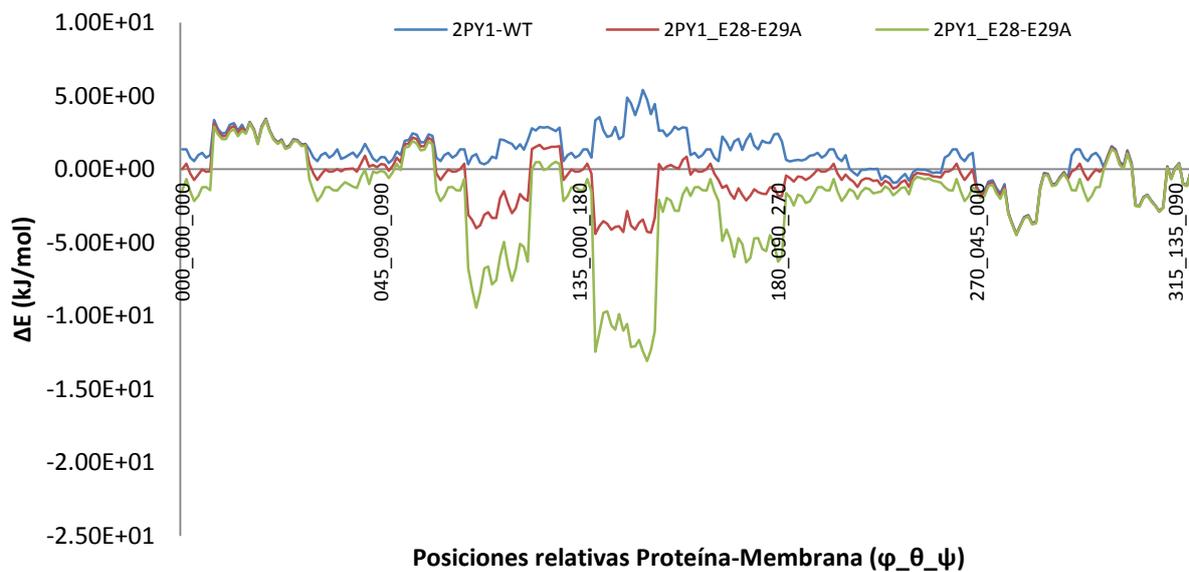


**Fig.54 (Arriba):** Perfil energético de L-FABP murina con carga de ASP26 y GLU27 apagada (rojo) o invertida (verde), por mutaciones con ALA y GLU respectivamente. Se observa la relevancia del residuo para la interacción con membrana en las FABPs de este tejido, como ya se observara para LFABP de rata.

**Fig.55 (Abajo):** Perfil energético de L-FABP bovina con carga de GLU26 y GLU27 apagada (rojo) o invertida (verde). Se observa la relevancia del residuo para la interacción con membrana en las FABPs de este tejido, como ya se observara para LFABP de rata.

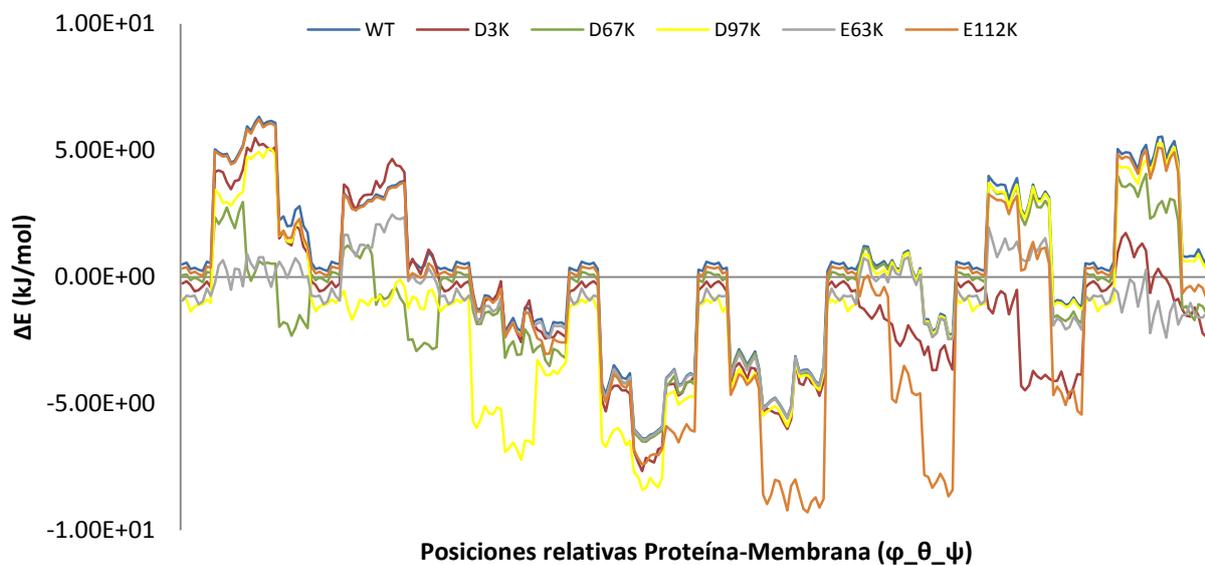


## Resultados



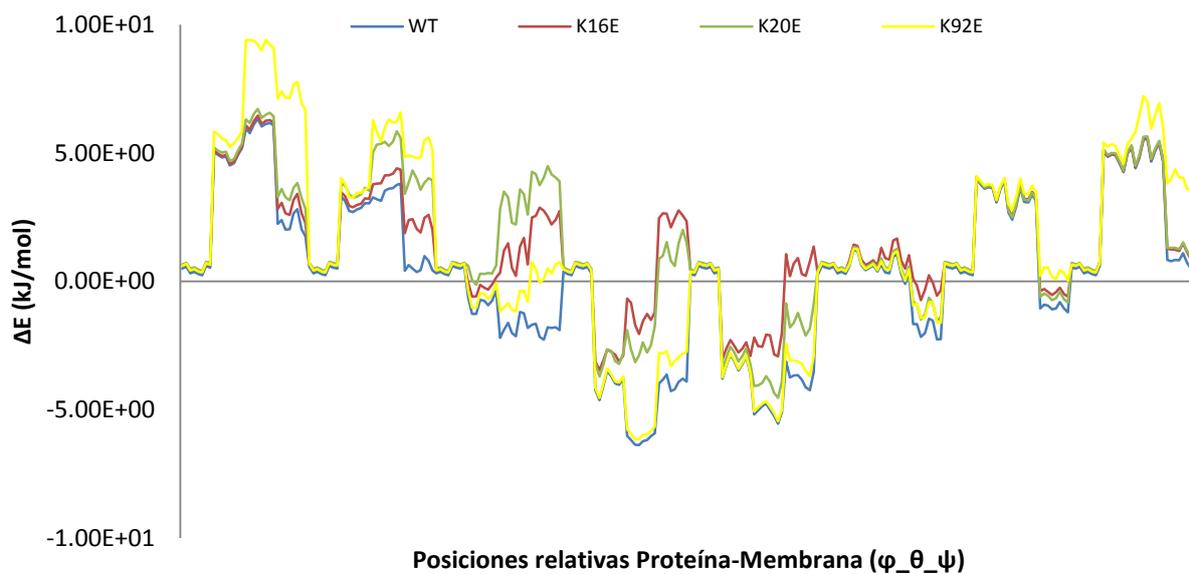
**Fig.56:** Perfil energético de L-FABP de humano con carga de ASP28 y ASP29 apagada (rojo) o invertida (verde). Se observa la misma relevancia del residuo que para todas FABPs de este tejido analizadas.

## Resultados

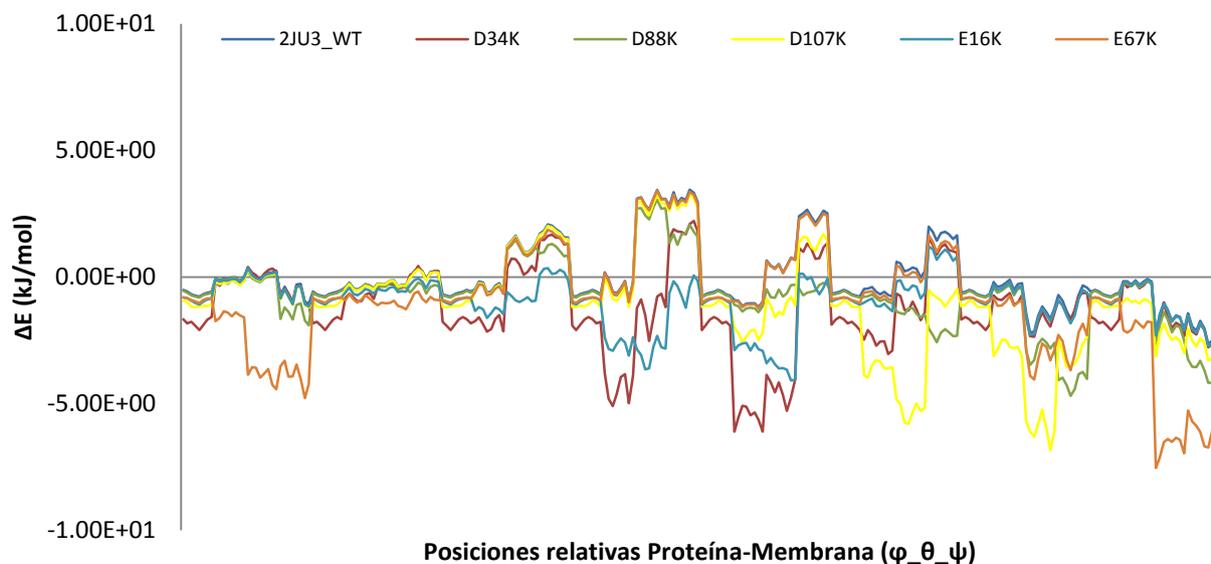


**Fig.57 (Arriba):** Perfil energético de I-FABP de rata con diversa inversiones de carga para residuos negativos. Se observa que las variaciones no alteran el perfil en zonas importantes para los mínimos y máximos de la interacción.

**Fig.58 (Abajo):** Perfil energético de I-FABP de rata con diversa inversiones de carga para residuos positivos. Se observa que las variaciones no alteran el perfil en zonas importantes para los mínimos y máximos de la interacción. Mutaciones K16E y K20E logran cierta alteración sin lograr la inversión de los valores de  $\Delta E$ .

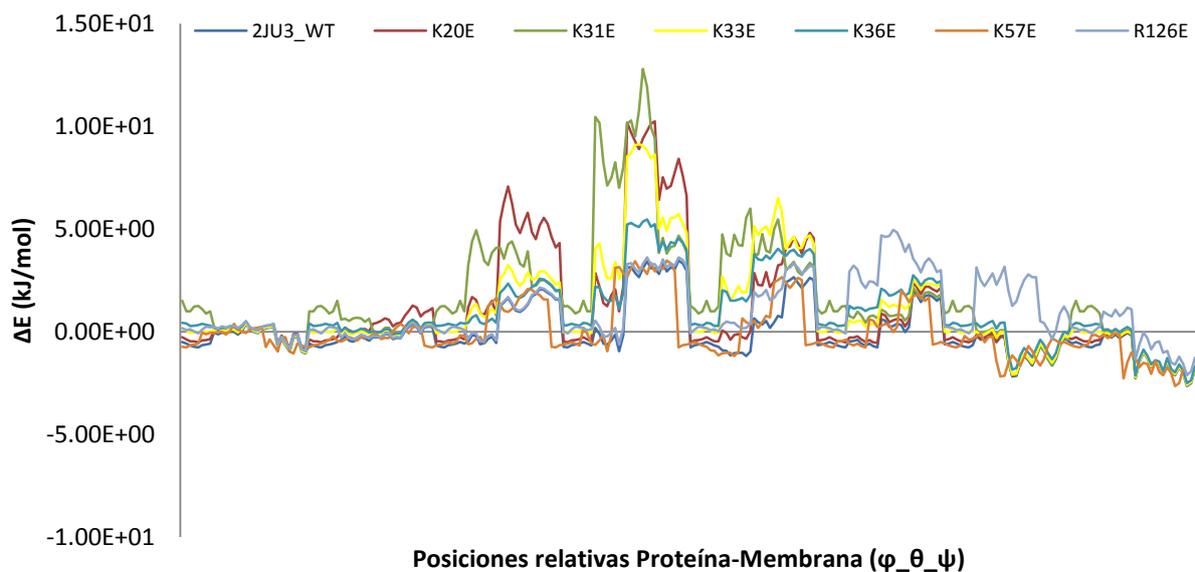


## Resultados



**Fig.59 (Arriba):** Perfil energético de L-FABP de rata con diversas inversiones de carga para residuos positivos. Se observa que las variaciones no alteran el perfil en zonas importantes para los mínimos y máximos de la interacción. La mutación E16K genera un mínimo cercano a la hélice  $\alpha$ II, pero no en la posición de máxima energía.

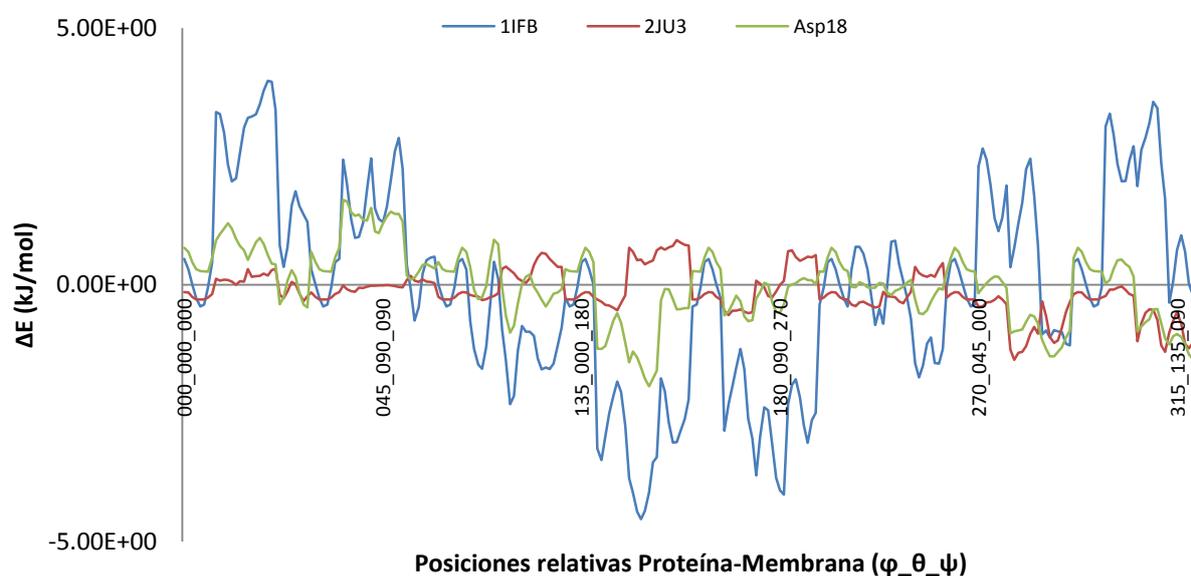
**Fig.60 (Abajo):** Perfil energético de L-FABP de rata con diversa inversiones de carga para residuos negativos. Se observa que las variaciones no alteran el perfil en zonas importantes para los mínimos y máximos de la interacción.



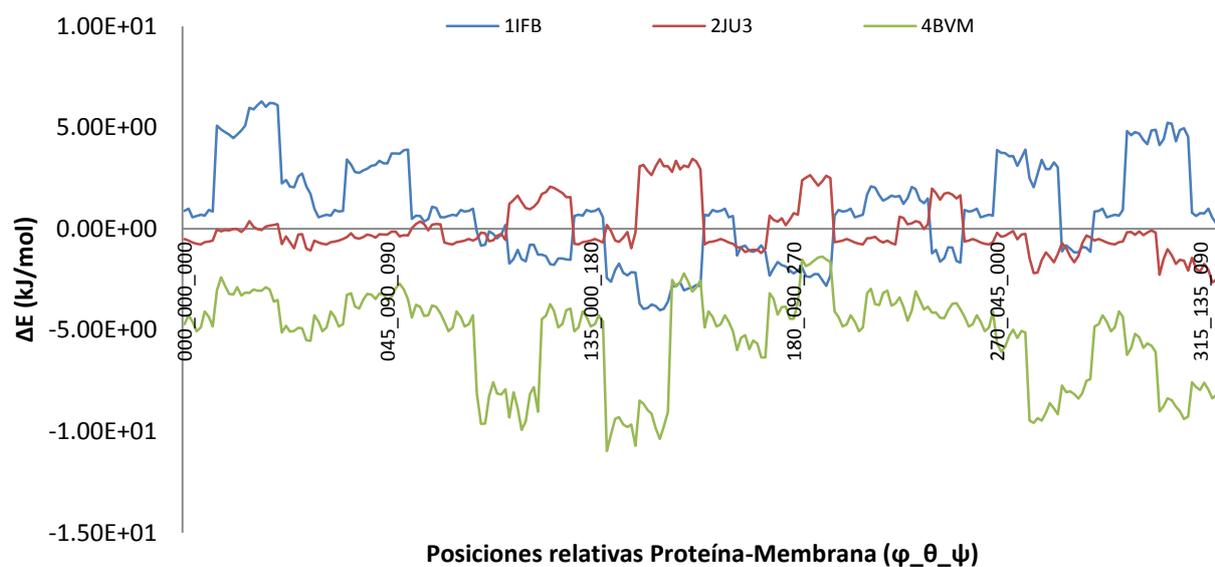
### 3.2.7. Breve análisis de las Interacciones de FABPs pertenecientes a otros géneros y/o tejidos

Dado que la división colisional-difusional parece alcanzar a toda la familia FABP, se decidió analizar la electrostática de interacción de FABPs con estructuras levemente diferentes y/o con información disponible sobre interacciones no ortodoxas. Particularmente, se seleccionó la proteína encontrada en huevos de *Ascaris granulosis* (As-p18) por presentar una estructura con tal característica (Ibáñez-Shimabukuro, *et al.*, 2012. Gabrielsend *et al.*, 2012). La misma presentó un perfil de  $\Delta E$  electrostático que se asemeja a una suerte de combinación entre colisional y difusional al tiempo que presenta un perfil energético menor que I y LFABP de rata (**Figura 61**).

Por otro lado, la proteína FABP de las vainas de mielina humanas (IDPDB 4BMV), células que recubren los axones del sistema nervioso central, presentan una estructura levemente diferente al resto de las FABPs y un gráfico muy similar a la de áscaris, pero con un perfil energético notablemente bajo (**Figura 62**).



**Fig.61:** Perfil energético de I-FABP y L-FABP de rata comparados con As-p18. El perfil muestra similitud al perfil de ambas proteínas, sobre todo en los sectores de mínima energía. El paisaje electrostático se asemeja de alguna manera, a una fusión de ambas proteínas.



**Fig.62:** Perfil energético de I-FABP y L-FABP de rata comparados con 4BVM. Al igual que As-p18, se observan características de ambas proteínas, aunque con valores negativos de  $\Delta E$  para todas las configuraciones estudiadas.

### CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 3

Los resultados de éste capítulo muestran claramente que la direccionalidad de la interacción FABP-membrana está dada por la componente electrostática del sistema. Además, se logró individualizar aquellos residuos que determinan la configuración inicial de interacción y se demostró que son los mismos aminoácidos cargados descritos como altamente conservados en el Capítulo 1.

---

## **Capítulo 4**

*Estudio de la interacción FABP-Membrana por Dinámica Molecular*

---

Los estudios de dinámica molecular se desarrollaron con el objetivo de determinar la estabilidad de los modelos proteicos y lipídicos desarrollados, así como también para evaluar la influencia de aquellas interacciones entre la proteína y la membrana que ocurren luego de la selección de la posición de menor energía por parte de la electrostática del sistema.

Los modelos de DM se desarrollaron para el estudio de los primeros pasos de la interacción proteína-membrana y no del mecanismo de captura del ligando. Es por ello que las DMs se no se extienden demasiado en el tiempo y los resultados son analizados haciendo hincapié en el primer momento de contacto entre ambas macromoléculas. En este marco, se desarrollaron análisis de la conservación de estructuras secundarias de las proteína y de las interacciones atómicas puntuales entre moléculas proteicas y fosfolipídicas.

En todos los casos las condiciones de corrida emulan condiciones biológicas, siendo la presión 1 atmosfera aplicada de igual forma en todos los sentidos, la temperatura 310,15 K° y la concentración salina 150 mM de NaCl.

## **4.1. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE FABP *WILD TYPE* INTESTINAL Y HEPÁTICA DE RATA CON UNA MEMBRANA ANIÓNICA**

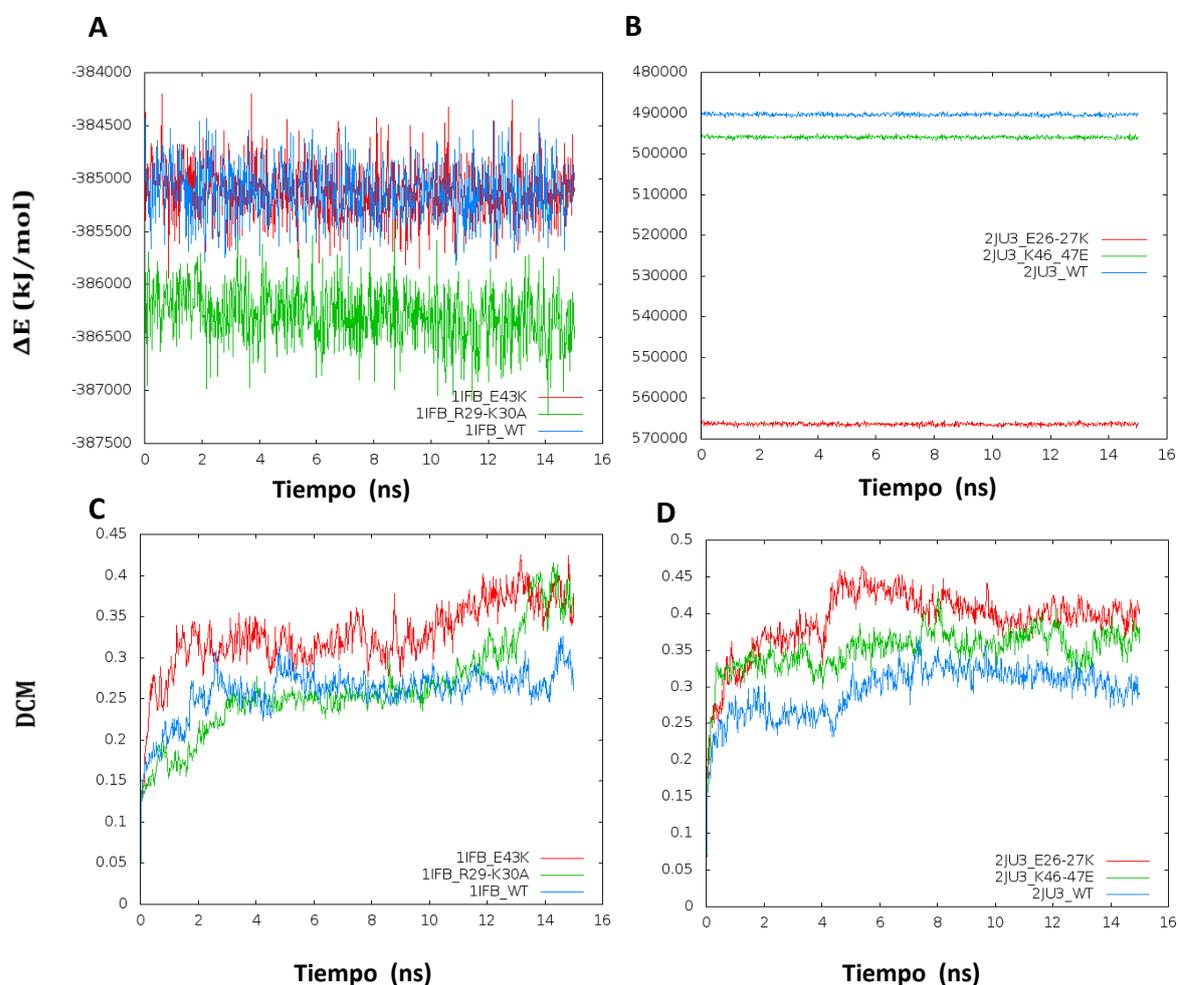
### **4.1.1. Consistencia de los modelos de las proteínas y membranas**

Con el objetivo de evitar la existencia de confórmeros de alta energía por solapamiento de esferas de van der Waals de los átomos de las cadenas laterales de los modelos proteicos, se realizó un relajamiento del sistema. Este método (denominado *steepest descent*) consiste en explorar el paisaje energético de rotámeros de las cadenas laterales de los aminoácidos que conforman la proteína hasta obtener un valor mínimo preestablecido, o hasta alcanzar un valor mínimo luego de determinado número de iteraciones. La disminución de energía del sistema para todos los modelos convergió en todos los casos por debajo de los 500 kJ/mol nm. De esta manera los sistemas proteicos se estudiaron partiendo de estructuras energéticamente estables.

## Resultados

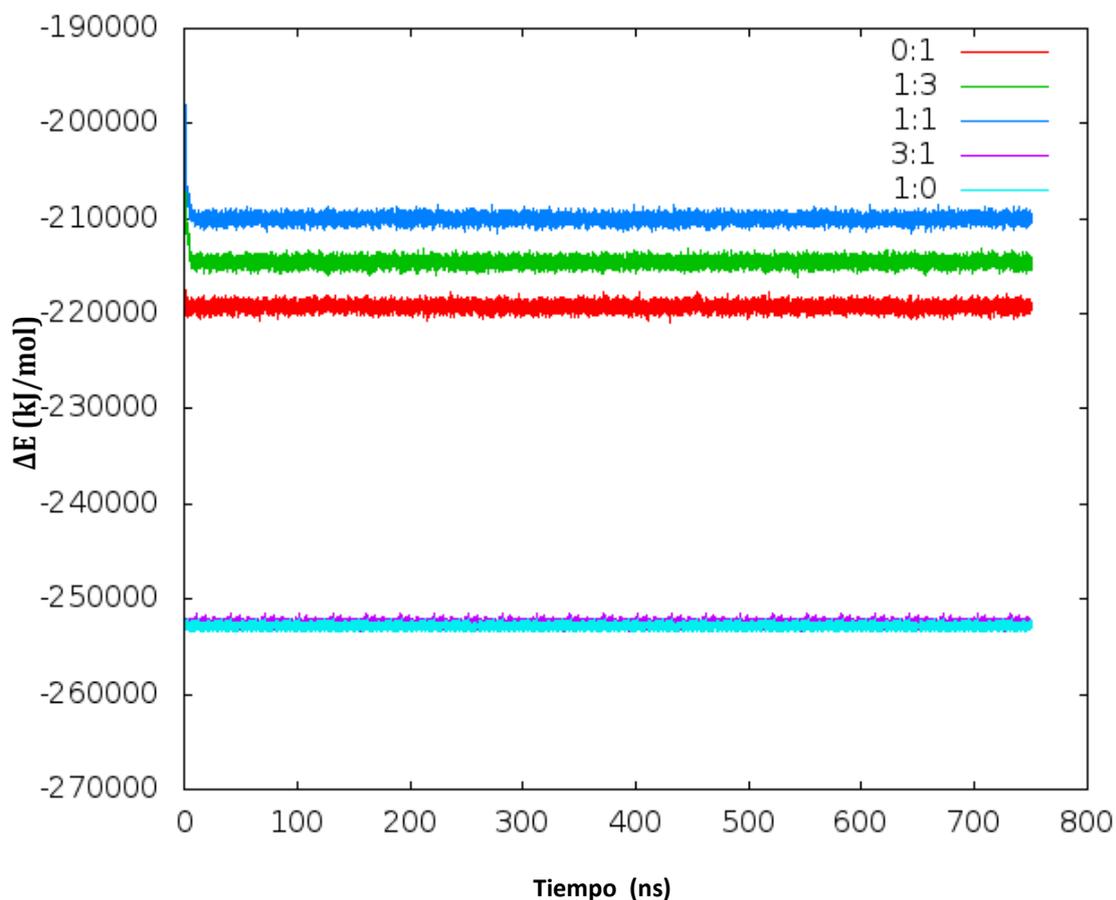
Asimismo, se corrió una dinámica molecular de IFABP y LFABP WT y sus mutaciones (1 IFB, 2JU3, 1IFB\_R29E\_K30E\_E44K y 2JU3\_E26K\_D27K\_K46E\_K47E) con el único objetivo de constatar que las condiciones a las que se los sometió no alterasen sensiblemente la estructura de las proteínas. Los resultados muestran sistemas energéticamente equilibrados (**Figura 63 A y B**) y estructuralmente consistentes por estudio de la desviación cuadrática media (DCM), que indica cuanto varía la estructura del modelo con respecto al inicio de la DM (**Figura 63 C y D**).

En cuanto a las membranas aniónicas, la consistencia del modelo radica en la estabilidad del mismo. Para ello, se estudia la energía del sistema (**Figura 64**) y se observa la consistencia de su estructura.



**Fig.63:** **A.** Energía total de los sistemas WT 1 IFB, 1IFB\_R29E\_K30E y 1IFB\_E43K. DCM de WT 1IFB comparado con 1IFBs mutadas: 1IFB\_R29E\_K30E y 1IFB\_E44K. **B.** Energía total de los sistemas WT 2JU3, 2JU3\_E26K\_D27K y 2JU3\_K46E\_K47E. En todos los casos la convergencia energética muestra sistemas equilibrados. **C.** DCM de WT 1IFB comparado con 1IFB mutadas: 1IFB\_R29E\_K30E y 1IFB\_E43K. **D.** DCM de WT 2JU3 comparado con 2JU3 mutadas: , 2JU3\_E26K\_D27K y 2JU3K46E\_K47E. Se observa convergencia y modelos estructuralmente consistentes.

En todos los casos, las energías totales de los sistemas de las membranas en solución salina muestran convergencia y estabilidad. Los sistemas más energéticos coinciden con los de mayor porcentaje aniónico, como era de esperar.



*Fig.64: Energía total de los sistemas de membranas utilizados. Se observa gran estabilidad en los sistemas.*

#### 4.1.2. Análisis del sistema FABP-Membrana en la interacción

Si bien se analizó en profundidad la interacción FABPs-membrana en el capítulo 3, el análisis se hizo exclusivamente desde la componente electrostática del sistema. En éste capítulo se realiza un estudio de la dinámica de la interacción, de manera que se incluyen otras componentes tales como las interacciones hidrofóbicas y mayor grado de libertad en el movimiento de las moléculas. Esto permite analizar no solo la interacción de superficies,

sino realizar un relevamiento de interacciones interatómicas, permitiendo así determinar los residuos responsables de los primeros pasos de dicha interacción.

La exploración del espacio configuracional del sistema comprendido por una FABP y la membrana POPC1-SOPS1, fue analizado en dinámicas de 20 ns de tiempo de simulación, dado que las FABPs que hicieron contacto con la membrana, ya lo habían hecho antes de cumplirse ese período. Además, como el objetivo es el estudio de los primeros pasos de la interacción, carece de sentido prolongar la DM más allá de ese tiempo.

Con el fin de evitar perturbaciones energéticas del sistema, los primeros pasos de las simulaciones se corrieron a bajas temperaturas, comenzando a 100 °K los primeros 1000 ps, 200 °K los 1000 ps siguientes y finalmente, 310 °K el tiempo restante.

Siguiendo el criterio utilizado para el capítulo anterior, IFABP y LFABP de rata fueron seleccionadas como representantes de los grupos colisional y difusional respectivamente.

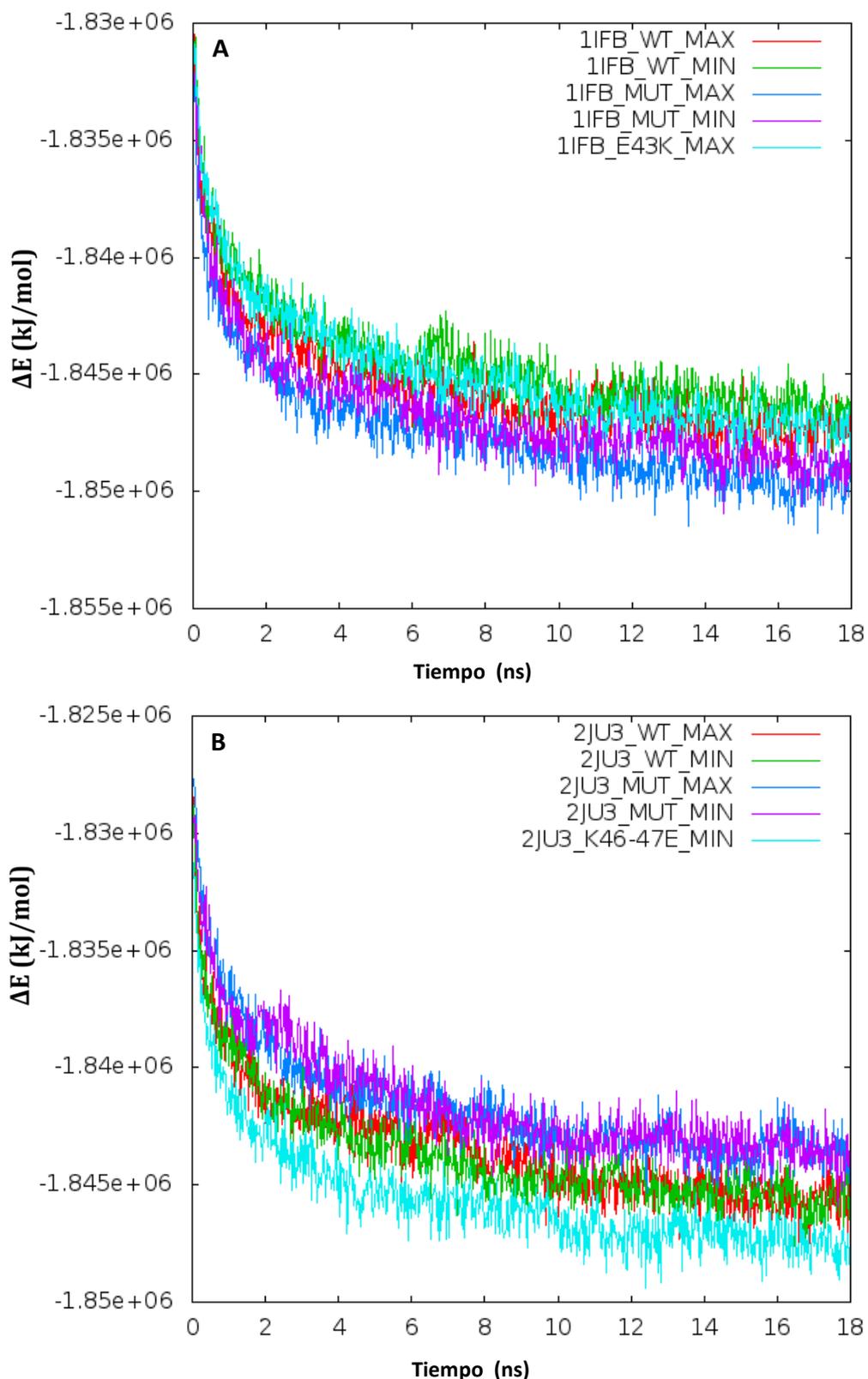
A manera de punto de partida, se seleccionaron los confórmeros de mínima y máxima energía para cada proteína. Como se vio en el capítulo precedente, para IFABP, la posición menos energética consiste en la hélice  $\alpha$ II orientada hacia la membrana, mientras que la de máxima energía tiene el fondo del barril  $\beta$  expuesto a la bicapa lipídica. Para LFABP, las condiciones son exactamente inversas.

#### 4.1.2.1. Análisis energético

Con el objetivo de determinar la estabilidad de los sistemas analizados, se estudió la energía total de los mismos. En los sistemas modelados, la energía mecánica debería mantenerse constante si no existen diferencias de temperatura. Picos de energía, indicarían fallas en el ensamble del sistema.

Como se observa en la **figura 65 A y B**, la convergencia energética demuestra la estabilidad del sistema, indicando la baja probabilidad de la generación de artefactos.

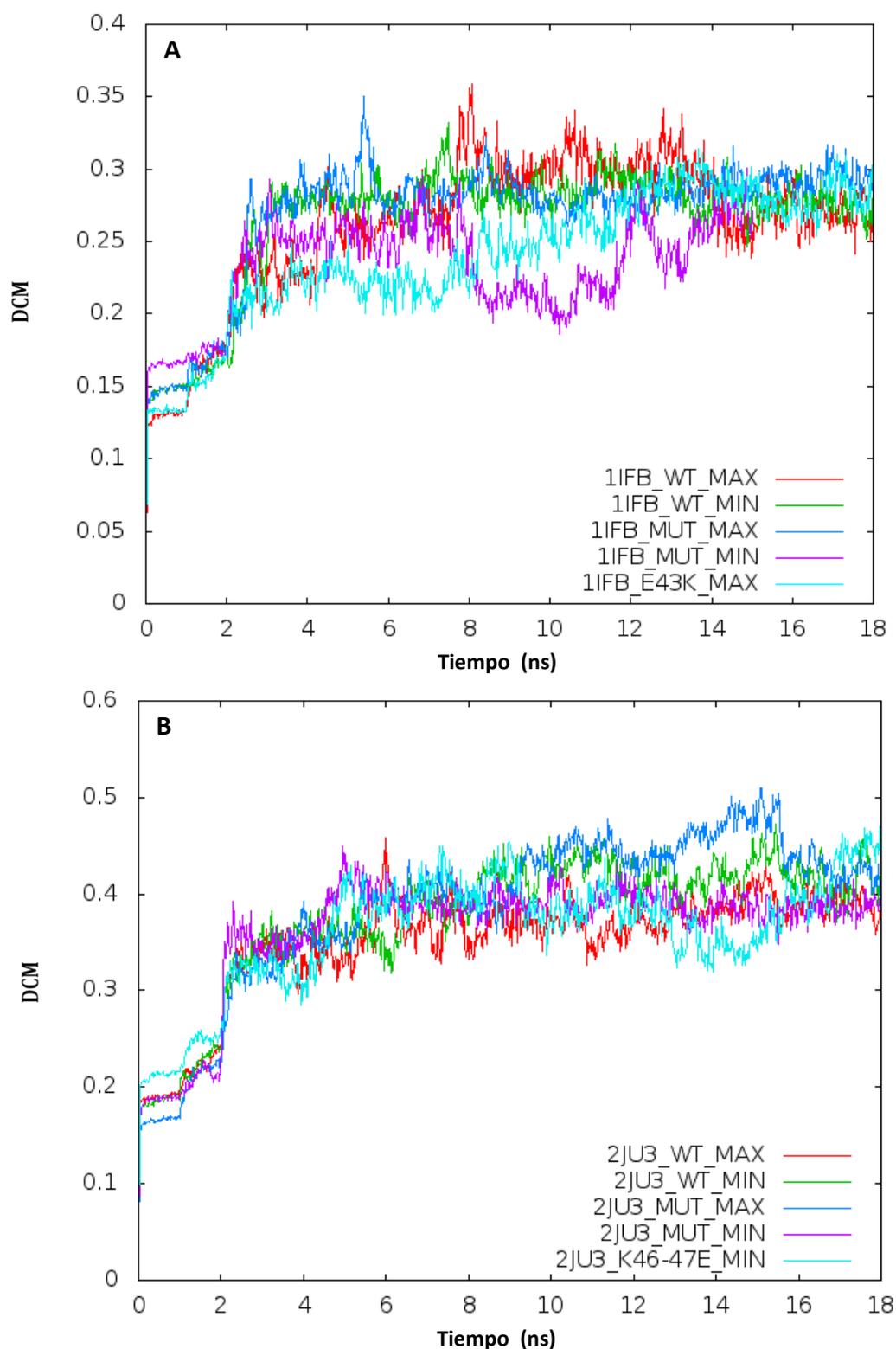
## Resultados



**Fig.65: A.** Energía total de los sistemas WT 1IFB en posiciones de mínima (verde, WT\_MIN) y máxima (rojo, WT\_MAX) energía electrostática vs membrana. Las distintas mutaciones de 1IFB vs membrana (azul, MUT\_MAX; violeta, MUT\_MIN y cyan, E43K\_MAX)

**B.** Energía total de los sistemas WT 2JU3 en posiciones de mínima (verde, WT\_MIN) y máxima (rojo, WT\_MAX) energía electrostática vs membrana. Las distintas mutaciones de 2JU3 vs membrana (azul, MUT\_MAX; cyan, K46-47E\_MIN y violeta, MUT\_MIN )

## 4.1.2.2. Análisis estructural



**Fig.66: A.** DCM de los sistemas WT 1IFB en posiciones de mínima (verde, WT\_MIN) y máxima (rojo, WT\_MAX) energía electrostática vs membrana. Las distintas mutaciones de 1IFB vs membrana (azul, MUT\_MAX; violeta, MUT\_MIN y cyan, E43K\_MAX)

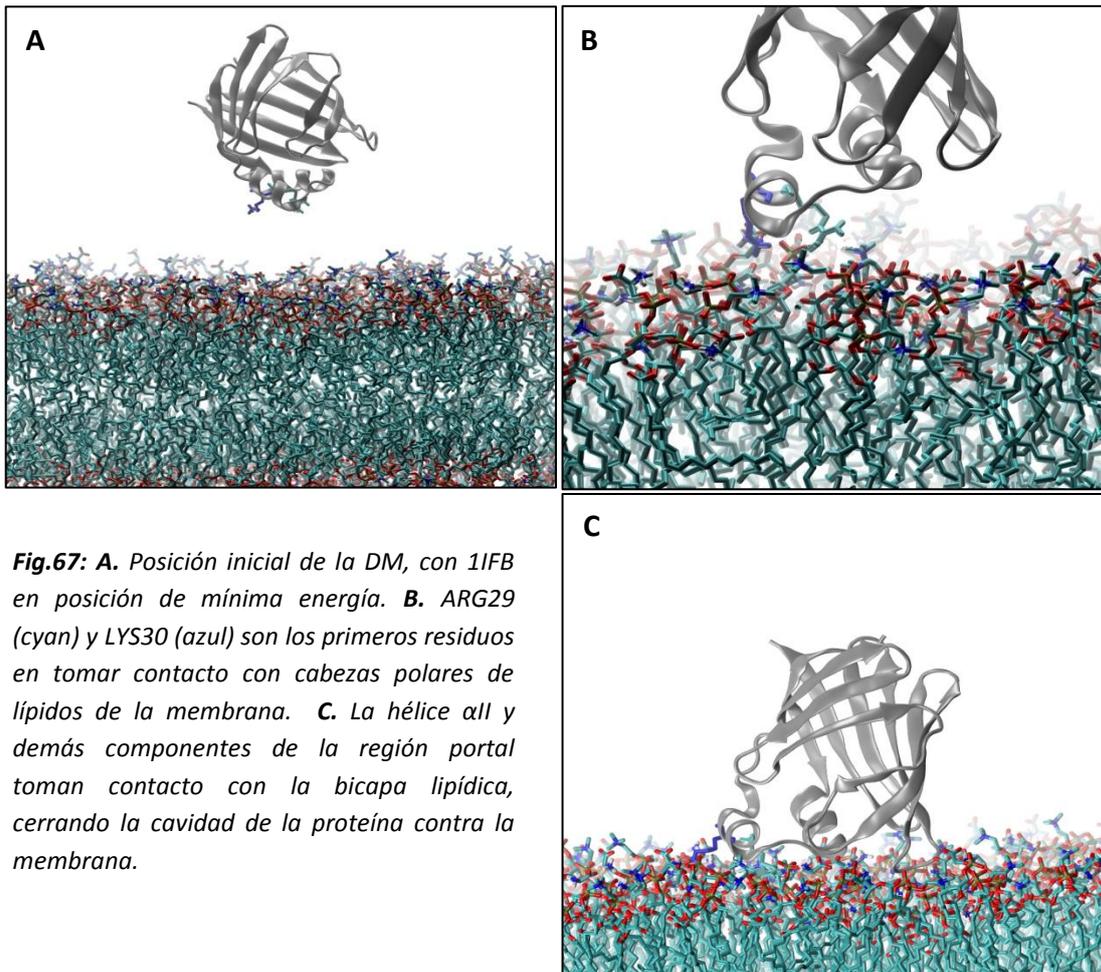
**B.** DCM de los sistemas WT 2JU3 en posiciones de mínima (verde, WT\_MIN) y máxima (rojo, WT\_MAX) energía electrostática vs membrana. Las distintas mutaciones de 2JU3 vs membrana (azul, MUT\_MAX; cyan, K46-47E\_MIN y violeta, MUT\_MIN )

La convergencia de la DCM observada en todos los sistemas demuestra conservación de la estructura inicial. En todos los casos se continuó el análisis de la DCM aún después de generado el primer contacto FABP-membrana. De esta manera se observa que, para los primeros ns de interacción, todas las proteínas conservan su estructura.

### 1IFB WT en posición de mínima energía.

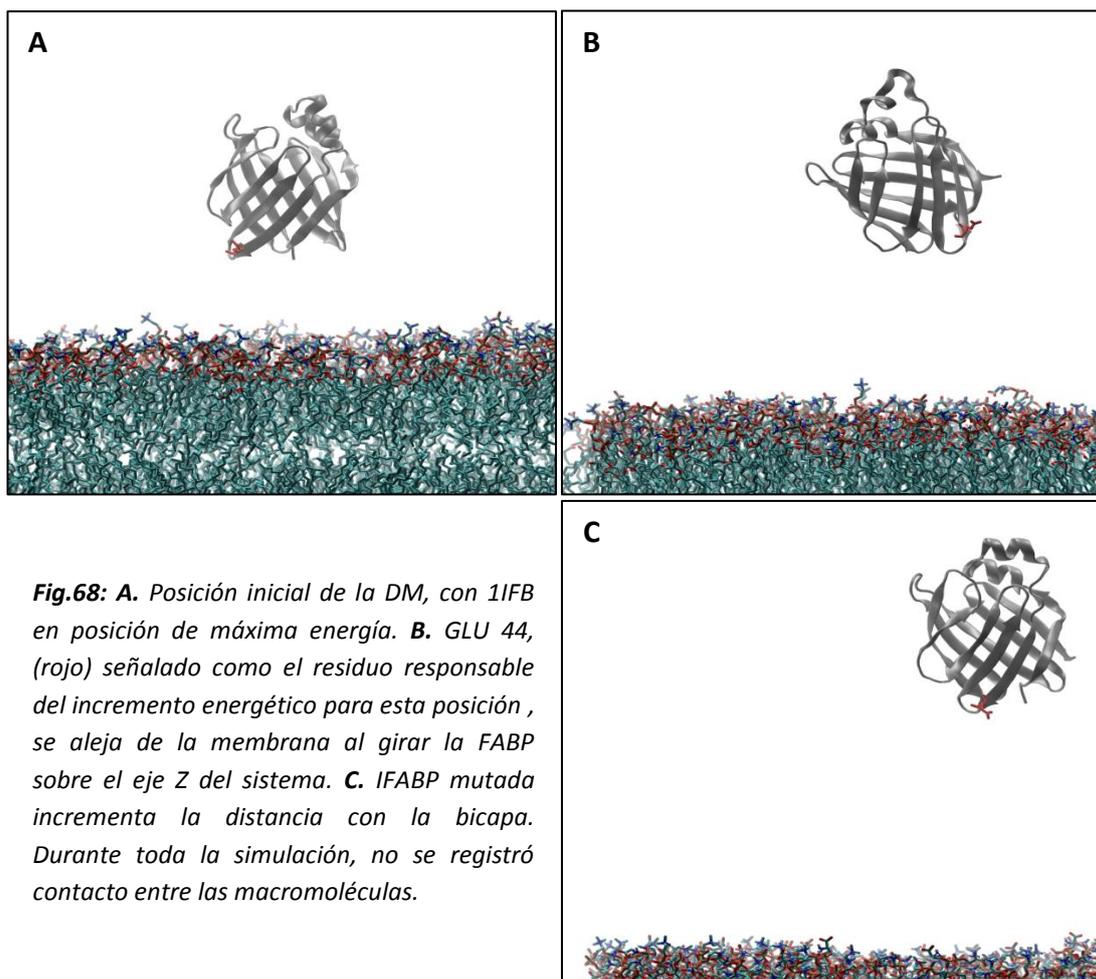
La DM de la interacción de IFABP de rata con la membrana POPC1-SOPS1 muestra que los aminoácidos ARG29 y LYS30 no solo dirigen el posicionamiento en los instantes previos al contacto entre proteína y membrana, sino que también son los residuos que toman contacto con los fosfolípidos en primer lugar. Se aprecia la interacción directa entre ambos aminoácidos positivos con átomos de oxígeno de densidad de carga negativa de ambos lípidos.

En segunda instancia, aminoácidos positivos de la hélice  $\alpha$ II contactan la proteína, cerrando el contacto los aminoácidos que conforman la región del portal (**Figura 67 A – C**).



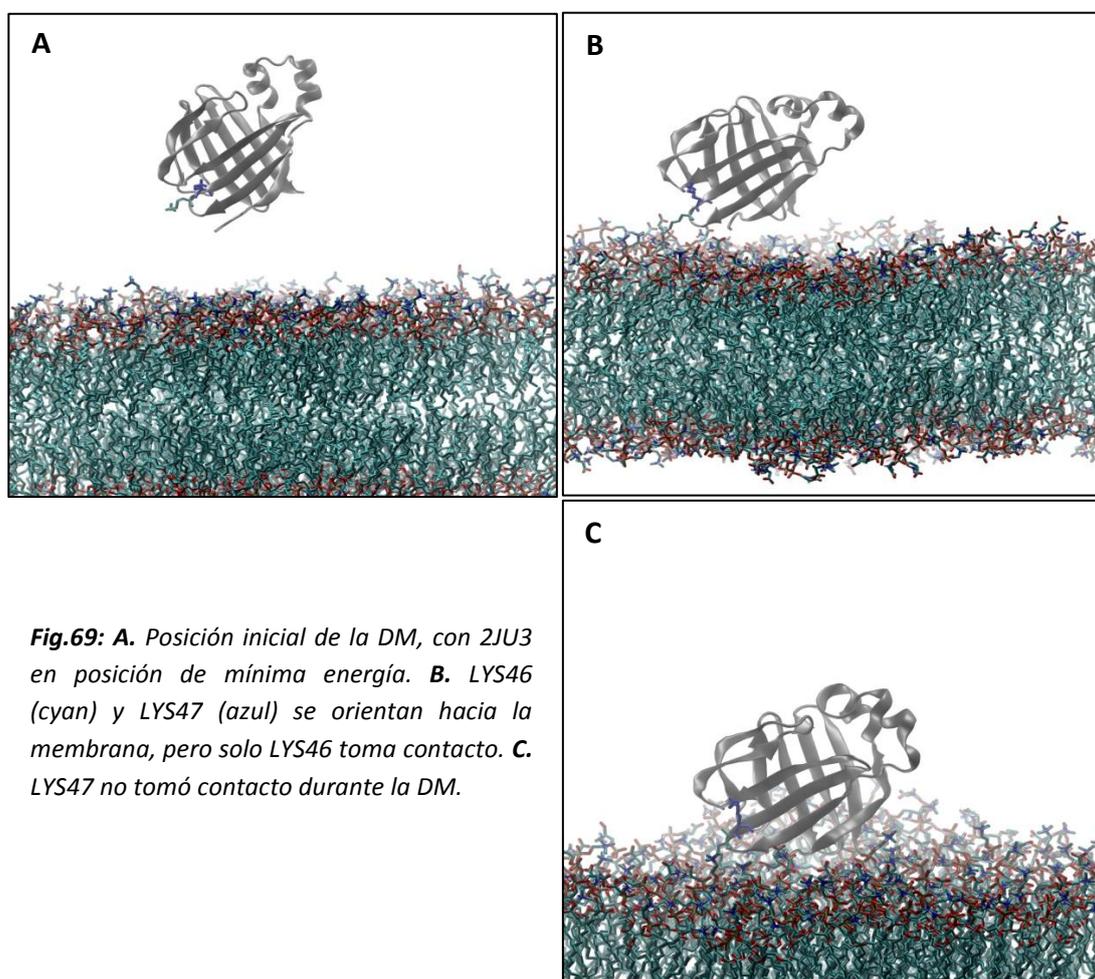
**1IFB WT en posición de máxima energía.**

La DM de la IFABP de rata en posición de máxima energía vs POPC1-SOPS1, nos muestra que la interacción en esta orientación es tan energéticamente desfavorable, que el contacto no se lleva a cabo. Se observa incluso un alejamiento de la proteína con respecto a la membrana (**Figura 68 A – C**).



**2JU3 WT en posición de mínima energía.**

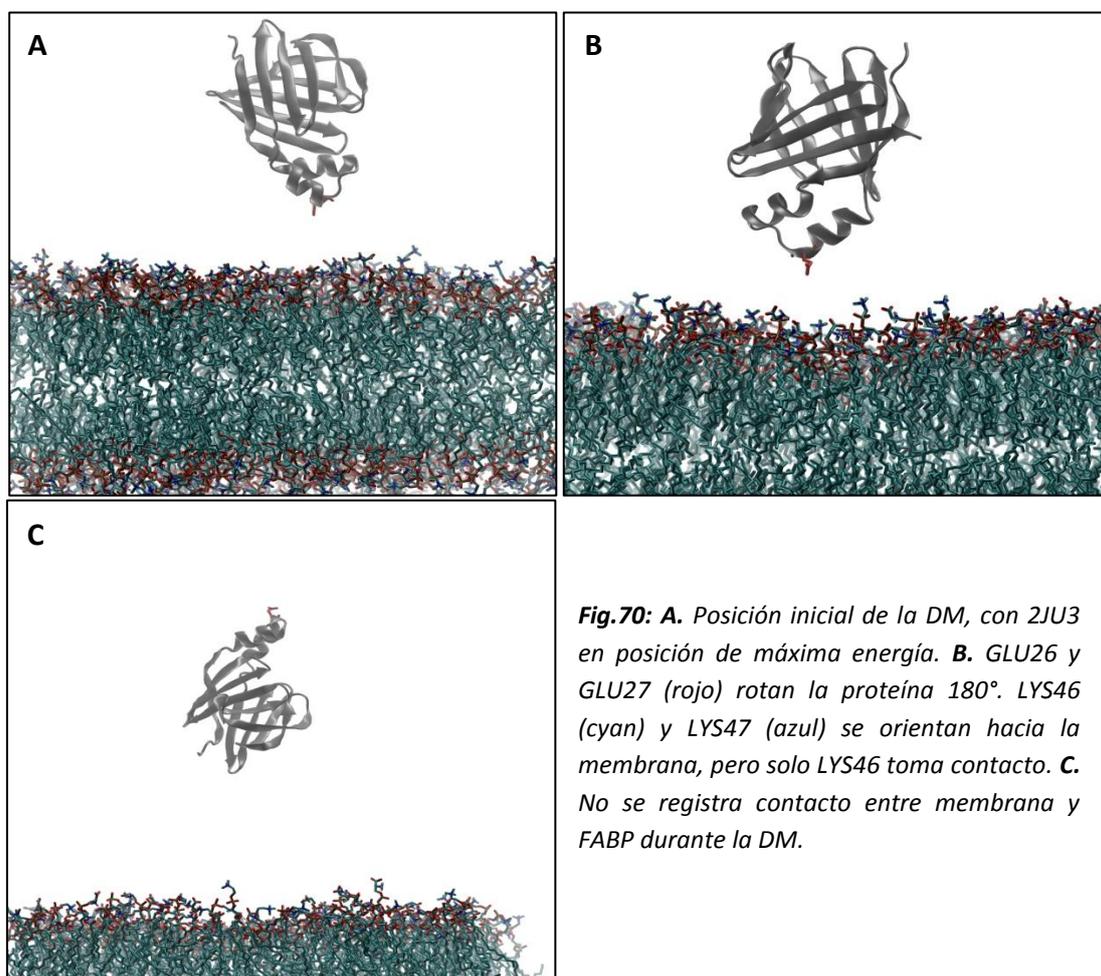
La orientación de mínima energía de la proteína salvaje LFABP de rata es la inversa de la de la IFABP de la misma especie. Como se observa en la **figura 69**, los residuos LYS46 y LYS47 orientan la interacción, sin embargo solo LYS46 toma contacto con la membrana durante la DM y no es el primer aminoácido en hacerlo. Probablemente la diferencia entre los mecanismo difusionales y colisionales no se dé solo por la orientación, sino también por la forma en que los residuos involucrados participan.



### 2JU3 WT en posición de máxima energía.

La interacción POPC1-SOPS1 con LFABP de rata en su orientación de máxima energía resulta en la ausencia de contacto entre las macromoléculas, semejando el resultado a 1IFB en posición de máxima energía (**Figura 70 A – C**).

De este resultado se desprende que la interacción entre membrana y FABP sucede sólo en los confórmeros energéticamente favorables.



## 4.2. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE FABP INTESTINAL Y HEPÁTICA MUTADAS DE RATA CON UNA MEMBRANA ANIÓNICA

Con el objetivo de evaluar la relevancia de los aminoácidos cargados altamente conservados, las mutaciones realizadas para los cálculos electrostáticos también se evaluaron por dinámica molecular. Los sistemas se modelaron y corrieron en idénticas condiciones que los anteriores.

### 4.2.1. Consistencia de los modelos de las proteínas mutadas

Dado que las mutaciones podrían alterar la estructura secundaria y terciaria de la proteína, además de la posible superposición de átomos, se realizó una minimización energética de las proteínas mutadas. Luego, se corrieron 15 ns de dinámica en condiciones idénticas a IFAB y LFABP WT.

Los resultados arrojan un perfil energético y una conservación de la estructura similares a los de las proteínas *wild type* (Figura 63 A –D).

### 4.2.2. Análisis del sistema FABP-Membrana en la interacción

Siguiendo los mismos parámetros que para el análisis de la interacción de FABPs WT con membranas, se estudió la interacción de FABPs mutadas con membranas.

El estudio energético y de DCM, plasmado en las figuras 65 y 66 respectivamente, muestran la convergencia energética del sistema y una conservación de la estructura similar para las proteínas WT y sus mutantes.

A continuación se describe el análisis estructural de la interacción modelada.

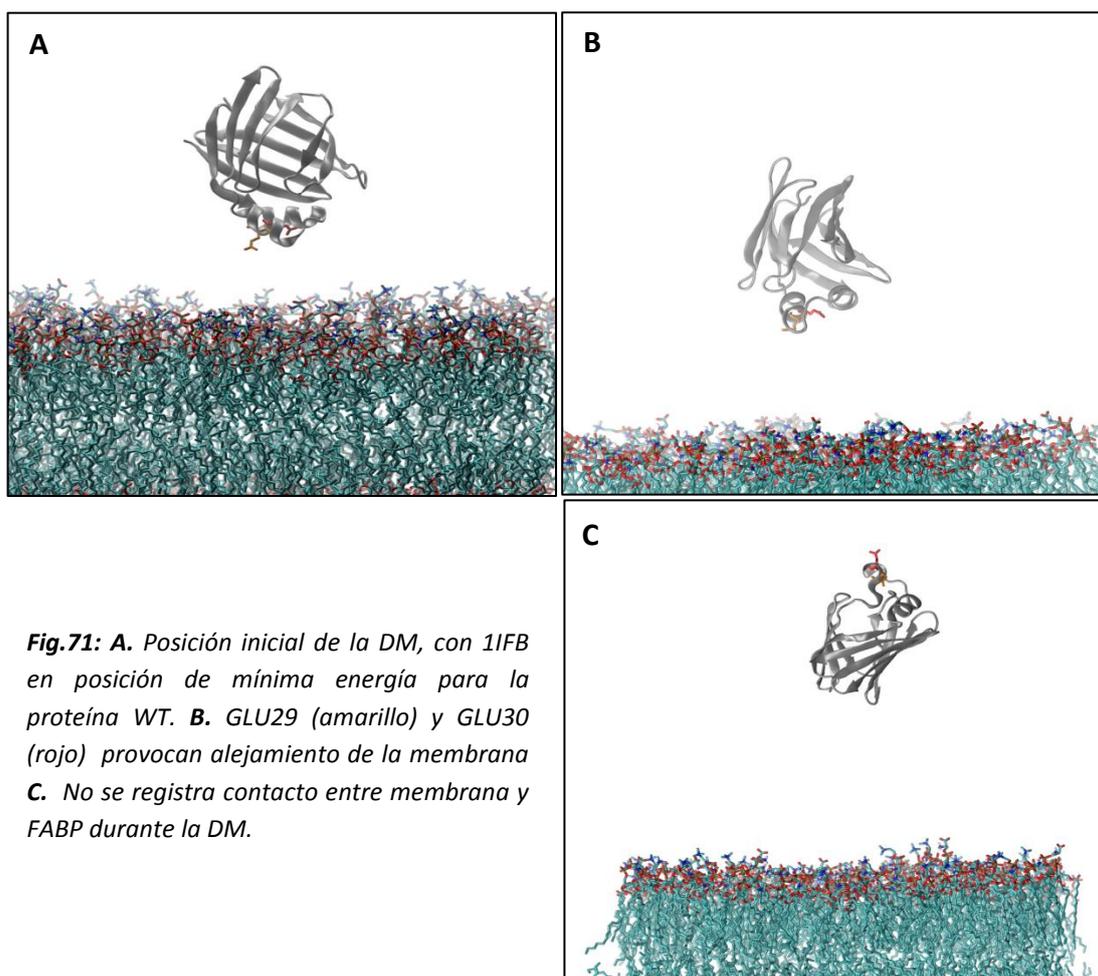
#### 4.2.2.1. Análisis estructural

##### 1IFB Mutada en posición de mínima energía.

El reemplazo de los aminoácidos cargados altamente conservados ARG29 y LYS30 de la hélice  $\alpha$ II, por residuos negativos, genera una orientación energéticamente desfavorable. La

energía electrostática de interacción se incrementa notablemente, de manera que la proteína rota sobre su eje para no exponer la hélice que en su estado WT favorecería la interacción (**Figura 71 A – C**).

En la duración de la DM no se presenta contacto entre proteína y membrana. Las imágenes se capturaron a distinta distancia para que se aprecie la superficie de la membrana y la FABP. De esta forma se percibe el incremento de distancia entre ellas

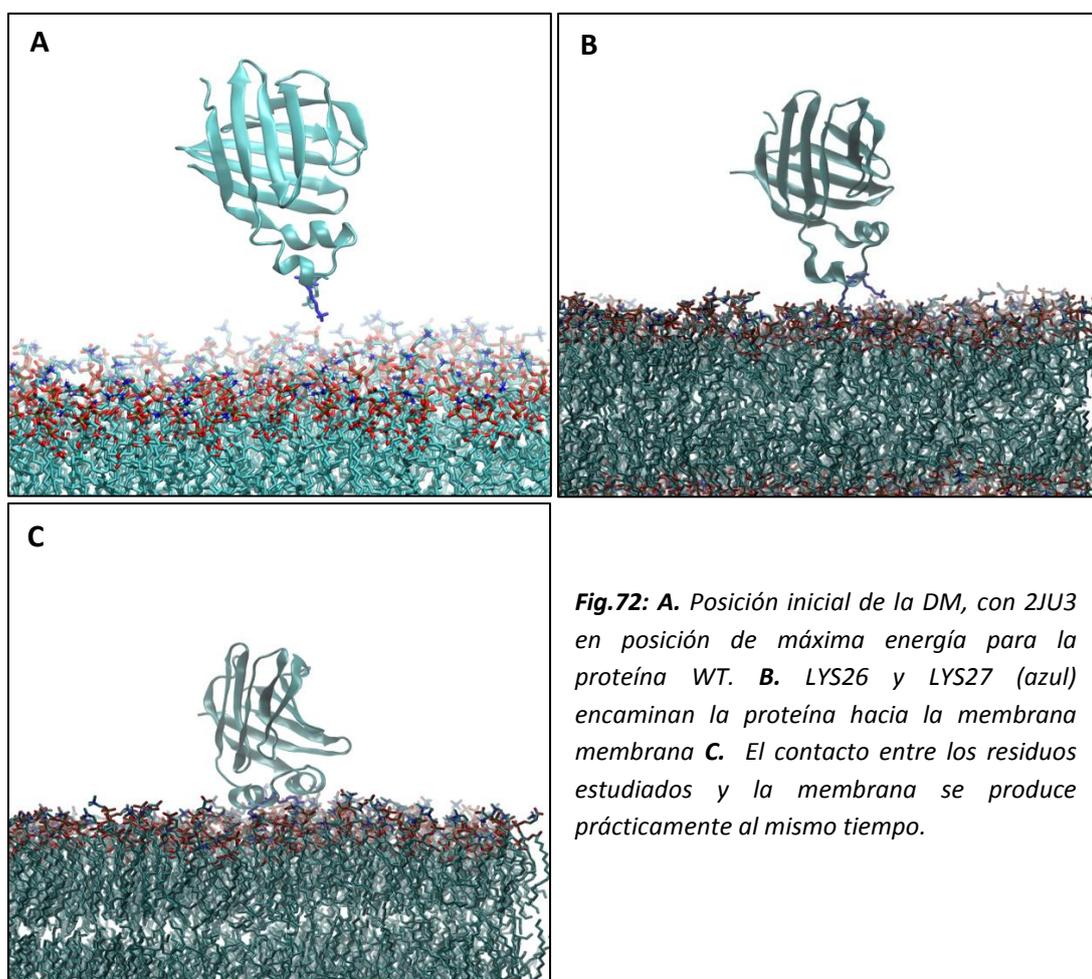


### 2JU3 Mutada en posición de máxima energía.

El reemplazo de los aminoácidos GLU26 y 27 por residuos positivos como la LYS, implica la interacción directa de la proteína 2JU3 con la membrana aún cuando se inicie la DM en la posición de máxima energía para la proteína WT. Al igual que en el proceso para 1IFB, estos aminoácidos no solo dirigen el posicionamiento, sino que también toman contacto con la membrana antes que cualquier otro residuo (**Figura 72 A – C**).

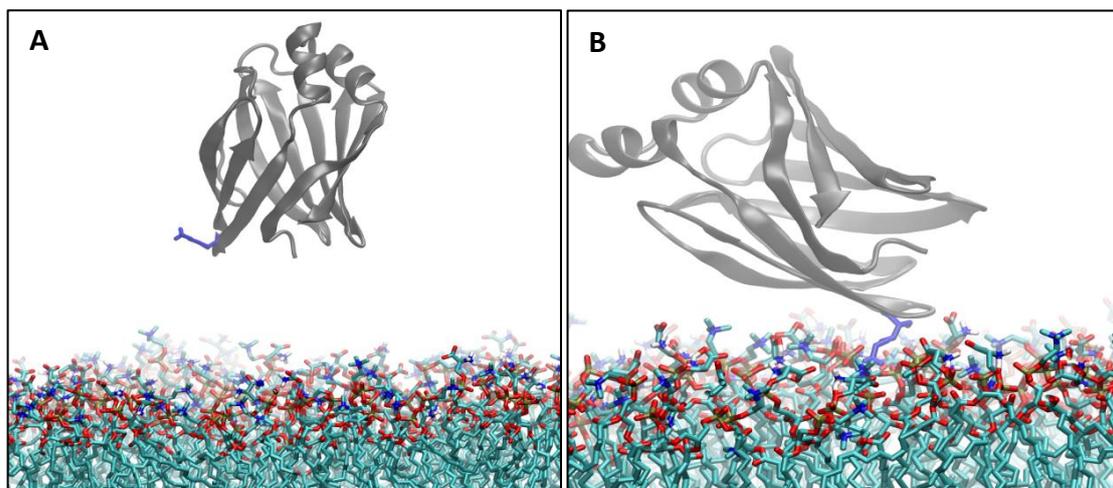
Es evidente que los aminoácidos positivos en esta ubicación no solo intervienen en la interacción electrostática, sino también en el proceso colisional en su totalidad.

Los aparentes cambios de color en los distintos cuadros se deben a diferencias en la iluminación que genera el programa VMD y no a cambios en las macromoléculas utilizadas.



### 1IFB Mutada en posición de máxima energía.

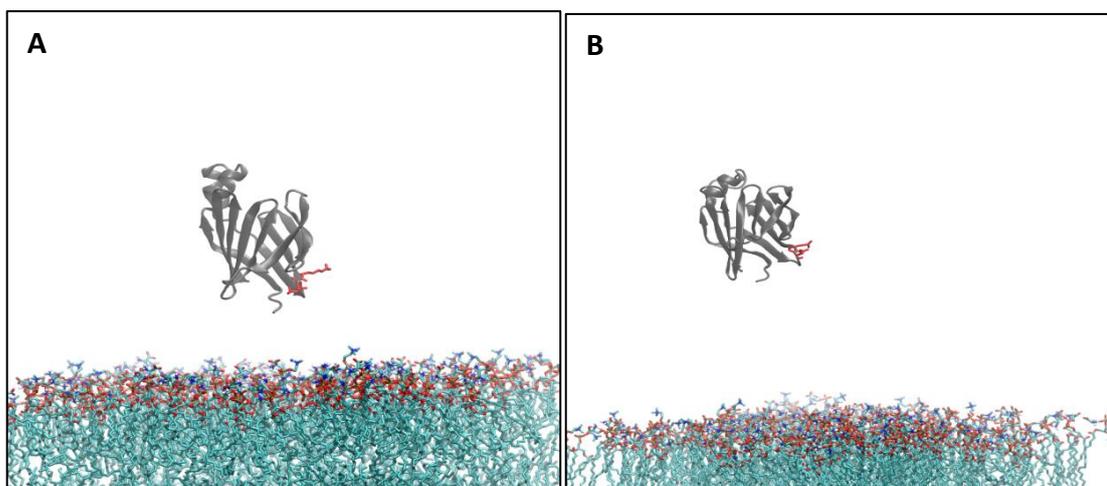
El reemplazo del residuo GLU44 a LYS44, implica la interacción directa de la proteína 1IFB con la membrana aún cuando se inicie la DM en la posición de máxima energía para la proteína WT. (**Figura 73 A y B**). Se demuestra que ese residuo en particular determina la no interacción de la proteína WT en esta posición específica.



**Fig.73:** **A.** Posición inicial de la DM, con 1IFB en posición de máxima energía para la proteína WT. **B.** LYS44 (azul) interacciona directamente con la membrana.

### 2JU3 Mutada en posición de mínima energía.

El reemplazo de los residuos GLU46 y GLU47 por sendas LYS, implica la no interacción de la proteína 2JU3 con la membrana aún cuando se inicie la DM en la posición de mínima energía para la proteína WT. (**Figura 74 A y B**). Se demuestra que ese residuo en particular determina la no interacción de la proteína WT en esta posición específica.



**Fig.74:** **A.** Posición inicial de la DM, con 2JU3 en posición de mínima energía para la proteína WT. **B.** GLU46 y GLU47 (rojo) dirigen la proteína alejándola de la membrana.

## CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 4

Consecuentemente con lo expuesto en los capítulos anteriores, los residuos de carga neta distinta de cero altamente conservados, mostraron ser determinantes para la dinámica de la interacción FABP-membrana.

En todos los casos, el reemplazo de residuos positivos por negativos determinó que no se desarrolle la interacción entre las macromoléculas, aún cuando la proteína estudiada se dispuso en una posición óptima de interacción según los resultados del estudio electrostático.

Asimismo, los residuos conservados demostraron tener un rol protagónico en la dinámica de la interacción, ya que fueron los primeros en interaccionar con la membrana en todos los casos en los que se registró contacto.

# DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

*“Si de algo soy rico  
es de perplejidades  
y no de certezas.”*

Jorge Luis Borges.-

## CAPÍTULO 1. LA ELECTROSTÁTICA COMO *DRIVING FORCE* EN LA SELECCIÓN DEL MECANISMO DE INTERACCIÓN.

---

Las interacciones electrostáticas de membranas de diferentes concentraciones aniónicas con distintas FABPs fueron analizadas computacionalmente. De esta manera, se logró diferenciar a las FABPs colisionales y difusionales con idénticos resultados que los obtenidos por métodos experimentales que se encuentran en la bibliografía disponible (Zamarreño *et al.*, 2012). En todos los casos, sin excepción, las proteínas propuestas como colisionales por la bibliografía, mostraron interacciones fuertes con las membranas de carga aniónica, evidenciando posiciones de mínima energía cuando la hélice  $\alpha$ II se encontró orientada hacia la membrana. Por otra parte, posiciones en las que aminoácidos cargados negativamente (como GLU44, ubicado en el barril  $\beta$  en 1IFB) se orientaron hacia membrana, resultan en energías muy elevadas correspondientes con conformaciones poco favorables para la interacción (**Figuras 27 – 30**).

Las FABPs difusionales, en cambio, muestran un perfil energéticamente menos escabroso, con máximos bien definidos en la zona de interacción hélice  $\alpha$ II-membrana y mínimos menos definidos cuando la cara opuesta se orienta hacia la bicapa (**Figura 31**).

Para ambos mecanismos, el incremento en la carga negativa de la membrana se reflejó en el perfil electrostático, generando mínimos y máximos más marcados, lo que sugiere que la electrostática no solo afecta a la interacción de colisionales, sino también a las difusionales (**Figura 37**) aunque en menor medida.

Sin embargo, se encontró que para cada mecanismo, la reacción a la variación de carga de la membrana es diferente. Para las colisionales, el incremento de carga negativa en la membrana resulta en un incremento en las energías de las posiciones no favorables y una proporcionada disminución en la energía para las posiciones favorables. Se deduce de esto que el mecanismo de interacción selecciona las posiciones por incremento en el rechazo de las desfavorables y en la aceptación de las favorables de manera conjunta (**Figura 38 A**). En el caso de las difusionales, si bien se observa una disminución en la energía de las posiciones favorables, es mucho más notorio el rechazo por las posiciones desfavorables, sugiriendo una selección que implica más un incremento en el rechazo por las orientaciones adversas que una mayor aceptación de la orientación óptima (**Figura 38 B**).

En cuanto al análisis de la influencia de la distancia en la interacción; arroja que la más favorable se observa a  $3.5 \pm 0.5 \text{ \AA}$ , aunque aún es significativa a  $10 \text{ \AA}$ . Esto corresponde a las características de la distancia de Debye en la que la magnitud de la interacción electrostática disminuye aproximadamente con una relación de  $1/e$ .

En lo que respecta a la dependencia de la fuerza iónica del medio, se observa similar comportamiento para ambas, aunque con distinta intensidad. Generalmente, altas concentraciones salinas apantallan las cargas de membrana, generando que la interacción de proteínas que se unen a la membrana disminuya.

Lo que resulta del cálculo de las posiciones de menor energía para ambas proteínas con la membrana, es que tanto 1IFB como 2JU3 manifiestan una menor interacción al incrementar la concentración salina, aunque 1IFB se ve mucho más afectada. Esto coincide con los datos experimentales que señalan a las FABPs colisionales como más susceptibles a las variaciones en las concentraciones salinas del medio (Córsico *et al.*, 2005). Sin embargo, las variaciones para 2JU3 podrían señalar una interacción FABP-membrana que incluya algún tipo de contacto entre las biomoléculas, como ya se ha sido sugerido por algunos grupos de investigación (Villareal *et al.*, 2008)

Al calcular la energía mínima de interacción nos encontramos con que, para las proteínas colisionales, la interacción por parte de la hélice  $\alpha$ II es determinante en obtener la posición de mínima energía tal como lo sugieren trabajos experimentales (Franchini *et al.*, 2008). Asimismo, se determinó que, en concordancia con lo descrito en la bibliografía, las interacciones electrostáticas direccionan esta interacción (Córsico *et al.*, 2005), orientando las hélices de carga neta positiva de cara a la membrana (**Figuras 27 y 28**).

Por otro lado, las proteínas difusionales también deben parte de su direccionamiento a la hélice  $\alpha$ II aunque, en este caso, porque esta posición genera una elevada energía y, por lo tanto, un gran rechazo. De esta manera, la interacción parece estar dirigida más por rechazo a las posiciones desfavorables que por aceptación de las favorables. Lo anterior concuerda con el hecho que las posiciones de energía no poseen mínimos tan marcados como las proteínas colisionales (**Figuras 27 y 28**) y con el hecho que la participación de la hélice  $\alpha$ II en

la interacción con membrana para FABPs difusionales ya ha sido señalada (Córsico *et al.*, 2004).

Por todo lo expuesto se deduce que, aunque con distintos mecanismos, todas las FABPs estudiadas tienen como *driving force* en la interacción con membrana, a la fuerza electrostática.

### Conclusiones:

- La energía electrostática es la fuerza que direcciona la unión de las FABPs colisionales con la membrana, con una interacción directa entre la membrana y la proteína vía el dominio helicoidal  $\alpha$ II.
- El término electrostático también dirige la interacción en las FABP difusionales, aunque mediante un mecanismo sutilmente diferente, donde la región helicoidal no participa en el proceso de unión, pero sí en el de selección de la posición de interacción.
- El incremento del carácter aniónico de la membrana no produce mayores efectos de atracción en las proteínas difusionales, sino más bien un mayor efecto de repulsión por las posiciones menos favorables. En el caso de las colisionales, el rechazo y la atracción se incrementaron de forma proporcionada.
- La distancia de las superficies de van der Waals para una interacción óptima se calculó alrededor de 3.5 Å, consistente con el de otras proteínas previamente estudiada por otros autores (Petersen y Petersen, 2003).
- La disminución en la interacción FABPs-Membrana al aumentar la fuerza iónica del medio, demuestra que la componente electrostática influye en ambos grupos de proteínas, aunque no de la misma forma. Sin embargo, los resultados parecen señalar la posibilidad de un contacto 2JU3-membrana.
- El pH óptimo de interacción calculado es de alrededor de 7,40; lo que muestra una gran capacidad del programa en emular entornos similares a los utilizados en los análisis *in vitro*.

## **CAPÍTULO 2. EL ROL DE LOS AMINOÁCIDOS CARGADOS ALTAMENTE CONSERVADOS EN LA ORIENTACIÓN DE LA INTERACCIÓN FABP-MEMBRANA.**

---

La interacción entre FABPs y membranas de fosfolípidos es un paso necesario y fundamental en el transporte intracelular de lípidos. La importancia de dicho paso reside no solo en la capacidad de depositar lípidos, sino también de extraerlos. Es muy interesante que las FABPs de tejidos específicos interactúen con membrana de formas diferentes, a través de mecanismos identificados como colisionales o difusionales.

Inicialmente, se propuso que el mecanismo colisional se debía a la interacción directa entre la proteína y la membrana, mientras que el difusional incluía la difusión del ligando a través del agua (Thumser y Storch, 2000). Sin embargo, se mostró en este trabajo que la componente electrostática del sistema dirige a ambos grupos de proteínas a posiciones determinadas al momento de interactuar con membrana, haciendo suponer un contacto en ambos casos.

Para responder a la incógnita sobre cuál porción de la estructura de las proteínas dirige hacia estas posiciones específicas, se mutaron distintos aminoácidos cargados altamente conservados.

Los resultados obtenidos nos permiten deducir que si bien la hélice  $\alpha_{II}$  de las FABP colisionales actúa dirigiendo la interacción, no lo hace de manera exclusiva, tomando parte de este mecanismo residuos del barril  $\beta$ , como el GLU44 en el caso de IFABP de rata (**Figuras 41 – 44**) y LYS46 y LYS47 en el caso de LFABP del mismo origen (**Figuras 47 y 48**).

Coincidentemente con la bibliografía consultada (Córsico *et al.*, 2004), se determinó que, si bien la hélice  $\alpha_{II}$  de FABPs difusionales no se orienta hacia la membrana, su participación en la interacción es relevante (**Figuras 45 y 46**). Asimismo, residuos positivos del barril  $\beta$  de estas proteínas demostraron ser determinantes en la orientación de la LFABP de rata respecto a la membrana (**Figura 47 y 48**).

Por último, la mutación conjunta de los aminoácidos altamente conservados resultó en una inversión de los perfiles electrostáticos entre las proteínas de distintos mecanismos (**Figuras 49 y 50**).

### **Conclusiones:**

- Los aminoácidos positivos localizados en la hélice  $\alpha$ II, tales como ARG29 y LYS30 para IFABP de rata, dirigen la interacción en proteínas colisionales. Cabe aclarar que no todas las proteínas de este grupo tienen esos dos aminoácidos, ya que algunas solo presentan uno de ellos. De todas maneras, la mutación de dicho residuo solitario causó el mismo efecto cualitativo que la mutación de ARG29 y LYS30 (**Figuras 51 – 53**), por lo que se deduce que cumplirían el mismo rol.
- Aminoácidos negativamente cargados altamente conservados en la hélice  $\alpha$ II de las proteínas difusionales (como GLU26 y GLU27 en LFABP de rata), también cumplen un rol determinante; aunque en este caso por favorecer el rechazo de ciertas posiciones respecto a la membrana.
- El aminoácido GLU44 de IFABP de rata ubicado en el barril  $\beta$ , produce un efecto similar que los negativos en la hélice  $\alpha$ II de las proteínas difusionales, rechazando las posiciones en las que la proteína se orienta con esta parte hacia la membrana. Las proteínas colisionales poseen aminoácidos de ambas cargas en esta zona, pero siempre con una resultante negativa o nula.
- En la misma zona del barril  $\beta$ , las LFABPs poseen aminoácidos positivos que dirigen la interacción hacia esta zona (LYS46 y LYS47). En este caso, la resultante de carga de esa zona es siempre mayor que cero.
- Un número cercano a los cuatro aminoácidos parecen dirigir los distintos mecanismos de interacción, de manera tal que, si se revierten las cargas de los mismos, se intercambian los mecanismos entre sí.

### **CAPÍTULO 3. EL ROL DE LOS AMINOÁCIDOS CARGADOS ALTAMENTE CONSERVADOS EN LA DINÁMICA DEL MECANISMO DE INTERACCIÓN.**

---

#### **Conclusiones:**

- El análisis de las DM que modelaron la interacción de distintas FABPs con la membrana POPC1-SOPS1, mostraron que la importancia de los aminoácidos cargados altamente conservados trasciende la direccionalidad de la interacción. Los resultados de

las DM de las FABP WT vs membrana, muestran que los residuos señalados son los primeros en interactuar con las cabezas polares de los fosfolípidos (**Figuras 66 – 69**).

- La inversión de carga de los residuos conservados por mutaciones puntuales con aminoácidos de carga reversa implican la no interacción con la membrana, demostrando el rol protagónico de estos residuos en la unión FABP-membrana.

## **CAPÍTULO 4. ¿COLISIONAL O DIFUSIONAL? ¿ES ESA LA CUESTIÓN?**

---

Como se observó en el capítulo 4 de Resultados, no todas las FABPs tienen un mecanismo determinado de interacción limitado a colisional o difusional. Tal es el caso de As-p18 y BVM4, en el que observamos un comportamiento que parece la fusión de los dos mecanismos conocidos.

Sin embargo, al observar alineamientos de numerosas FABPs, se puede distinguir que existen patrones de conservación de residuos cargados que se repiten en determinados grupos de estas proteínas. Cabe preguntarse si existirán otros mecanismos aún no descritos que permitan la interacción de las FABPs con distintas membranas o, incluso, proteínas.

### **Conclusiones:**

- La mayor parte de las proteínas FABPs de mamífero interactúan con membrana por uno de los dos mecanismos descritos.
- Algunas FABPs tienen mecanismos distintos de interacción que parecen ser resultado de la fusión de los anteriores y no un mecanismo distinto y nuevo.
- Éste mecanismo intermedio no puede atribuirse al género y especie que lo sintetiza, ya que las proteínas analizadas provienen de un mamífero (BVM4: Humano) y un nematodo (As-p18). Podría sugerirse que en ciertas circunstancias el entorno molecular condiciona el mecanismo de interacción.
- Es necesario el análisis de FABPs de distintos orígenes para determinar si existen otros mecanismos, pero a priori podría hipotetizarse que existen dos

mecanismos y alguno intermedio que puede sugerirse como resultante de un camino evolutivo diferente.

## **CAPÍTULO 5. PALABRAS FINALES.**

---

Toda tesis es un intento de responder preguntas, de develar incógnitas. En este caso, las preguntas eran claras: ¿Existe un patrón estructural que determine el mecanismo de interacción de distintas FABPs? Y de ser así, ¿De qué manera dicho patrón estructural dirige la interacción FABP-membrana?

Con el objetivo de responder esas preguntas, se atacó el problema con un análisis multimetodológico basado en técnicas computacionales, lo cual constituye en sí mismo un enfoque novedoso y que plantea una posibilidad cierta, con economía de tiempo y recursos, de realizar estudios de sistemas macromoleculares. Además, permitió, en este caso, cubrir un amplio rango de variables que intervienen en la interacción FABP-membrana.

A partir de estas metodologías, basadas en diferentes fundamentos teóricos, se obtuvieron resultados congruentes que señalan un grupo de aminoácidos ubicados en sectores determinados como responsables no solo de la direccionalidad de la interacción, sino también del primer contacto FABP-membrana.

En pocas palabras, la respuesta es: sí, existe un patrón estructural, determinado por aminoácidos cargados altamente conservados en las regiones de la hélice  $\alpha$ II y el extremo opuesto del barril  $\beta$ . Estos aminoácidos direccionan la interacción a través de la componente electrostática del sistema FABP-membrana y, una vez que la proteína posee la orientación correcta, son los primeros en tomar contacto físico con los fosfolípidos de la membrana.-

## REFERENCIAS.

1. Abumrad N.A., *et al.* Mechanism of long chain fatty acid permeation in the isolated adipocyte. *J Biol Chem.* 1981; 256 (17): 9183-91.
2. Altschul, S.F., *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res.* 1997; 25: 3389-402. PMID 9254694.
3. Andelman D., *Electrostatic Properties of Membranes: The Poisson–Boltzmann Theory. Handbook of Biological Physics*, Cap. 12, Vol.1. Ed. Elsevier (2004).
4. Baker N. A., *et al.* Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001; 98: 10037–10041.
5. Banaszak L, *et al.* Lipid-binding proteins: a family of fatty acid and retinoid transport proteins. *Adv Protein Chem.* 1994; 45: 89-151.
6. Benkert, P., *et al.* QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatic.* 2008; 71 (1): 261-277.
7. Berendsen H.J.C. *et al.* Long–range electrostatic forces. *Europhys. News.*1986; 17: 8-10.
8. Berendsen, H. *et al.* Molecular Dynamics with Coupling to an External Bath. *Journal of Chemical Physics.* 1984; 81 (8): 3684–3690.
9. Berger O. *et al.* Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature. *Biophys. J.* 1997; 72: 2002–2013.
10. Berger O., *et al.* Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature, *Biophys. J* 1997; 72: 2002–2013.
11. Black S.L. *et al.* Probing lipid- and drug-binding domains with fluorescent dyes. *Bioorg Med Chem.* 2008; 16 (3): 1162-73.  
Bryson and H.J. Vogel (eds.). *Evolving Genes and Proteins.* 1965: 97-166. *Academic Press*, New York.
12. Cao H., *et al.* Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell.* 2008; 134 (6): 933-44.
13. Chawla A., *et al.* Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science.* 2001; 294 (5548): 1866-70.
14. Christen, M., *et al.* The GROMOS software for biomolecular simulation: GROMOS05. *Journal of computational chemistry.* 2005; 26 (16): 1719–1751.
15. Córscico B., *et al.* Fatty acid transfer from intestinal fatty acid binding protein to membranes: electrostatic and hydrophobic interactions. *Lipid Res.* 2005; 46 (8): 1765–1772.
16. Corsico B., *et al.* The helical domain of intestinal fatty acid binding protein is critical for collisional transfer of fatty acids to phospholipid membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998; 95: 12174–12178.
17. Córscico B., *et al.* The  $\alpha$ -Helical Domain of Liver Fatty Acid Binding Protein Is Responsible for the Diffusion-Mediated Transfer of Fatty Acids to Phospholipid Membranes. *Biochemistry.* 2004; 43: 3600-3607.
18. Cupp D, *et al.* Fatty acid-albumin complexes and the determination of the transport of long chain free fatty acids across membranes. *Biochemistry.* 2004; 43 (15): 4473-81.
19. Davies J.K., *et al.* The effect of charge reversal mutations in the alpha-helical region of liver fatty acid binding protein on the binding of fatty-acylCoAs, lysophospholipids and bile acids. *Mol. Cell. Biochem.* 2002; 239: 55–60.
20. Duplus E., *et al.* Fatty acid regulation of gene transcription. *J Biol Chem.* 2000; 275 (40): 30749-52.
21. Edgar, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32: 1792–1797.

22. Eswar N., *et al.* Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Current Protocols in Bioinformatics*. 2006; 5.6: 1-30.
23. Falomir-Lockhart L.J., *et al.* Protein- membrane interaction and fatty acid transfer from intestinal fatty acid-binding protein to membranes. Support for a multistep process. *J. Biol. Chem.* 2006; 281 (20): 13979-89.
24. Franchini G.R., *et al.* The integrity of the alpha-helical domain of intestinal fatty acid binding protein is essential for the collision-mediated transfer of fatty acids to phospholipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*. 2008; 81 (4): 192–199.
25. Francis C., *et al.* The Intrinsic pKa Values for Phosphatidylserine and Phosphatidylethanolamine in phosphatidylcholine host Bilayers. *Biophys. J.* 1986; 49: 459-468.
26. Friedman R., *et al.* Fatty acid binding proteins: same structure but different binding mechanisms? Molecular dynamics simulations of intestinal fatty acid binding protein. *Biophys J.* 2006; 90(5): 1535-45.
27. Friedman R., *et al.* Molecular dynamics simulations of the adipocyte lipid binding protein reveals a novel entry site for the ligand. *Biochemistry*. 2005. 44 (11): 4275-83.
28. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*. 2001; 294 (5548): 1871-5.
29. Gabrielsen M., *et al.* Useable diffraction data from a multiple microdomain-containing crystal of *Ascaris suum* As-p18 fatty-acid-binding protein using a microfocus beamline. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2012; 68 (8): 939-41.
30. Gimeno R.E., *et al.* Characterization of a heart-specific fatty acid transport protein. *J Biol Chem*. 2003; 278 (18): 16039-44.
31. Glatz J.F. and van der Vusse G.J. Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance. *Prog Lipid Res*. 1996; 35 (3): 243-82.
32. Glatz J.F. and van der Vusse G.J. Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance. *Prog Lipid Res*. 1996; 35 (3): 243-82.
33. Hannun Y.A. and Obeid L.M. The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem*. 2002; 277 (29): 25847-50.
34. Harries D. Solving the Poisson Boltzmann Equation for Two Parallel Cylinders. *Langmuir* 1998; 14: 3149-3152.
35. Haunerland N.H. and Spener F. Fatty acid-binding proteins, insights from genetic manipulations. *Prog Lipid Res*. 2004; 43 (4): 328-49.
36. Henikoff S. Amino Acid Substitution Matrices from Protein Blocks. *PNAS*. 1992; 89 (22): 10915-10919.
37. Hla T., *et al.* Lysophospholipids receptor revelations. *Science*. 2001; 294 (5548): 1875-8.
38. Hodsdon M.E. and Cistola D.P. Discrete backbone disorder in the nuclear magnetic resonance structure of apo intestinal fatty acid-binding protein: implications for the mechanism of ligand entry. *Biochemistry*. 1997; 36 (6): 1450-60.
39. Hol W. G. J. *et al.* The  $\alpha$ -helix dipole and the properties of proteins. *Nature*. 1978; 273: 443-6.
40. Honig B. and Nicholls A. Classical Electrostatics in Biology and Chemistry. *Science*. 1995; 268 (5214): 1144-49.
41. Hsu, K. T., and Storch, J. Fatty Acid transfer from liver and intestinal fatty acid binding protein to membranes occurs by different mechanisms. *J. Biol. Chem.* 1996; 271 (23): 13317-13323.
42. Ibáñez-Shimabukuro M., *et al.* Resonance assignment of As-p18, a fatty acid binding protein secreted by developing larvae of the parasitic nematode *Ascaris suum*. *Biomol NMR Assign*. 2014; 8 (1): 33-36.

43. Israelachvili J., Intermolecular and Surface Forces. 1992; *Academic Press*. Londres.
44. Jones, D.T. Protein Secondary Structure Prediction Based on Position specific Scoring Matrices. *Journal of Molecular Biology*. 2014; 13 (5): 666–73.
45. Juffer A. *et al.*, The electric potential of a macromolecule in a solvent: a fundamental approach. *J. Comp. Phys*. 1991; 97 (1): 144-171.
46. Kabsch W. and Sander C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*. 1983; 22 (12): 2577-2637.
47. Kragelund B.B. *et al.* Acyl-coenzyme A binding protein (ACBP). *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1441 (2-3): 150-61.
48. Laskowski R.A., *et al.* PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst*. 1993; 26: 283-291.
49. Li H., *et al.* Very Fast Empirical Prediction and Rationalization of Protein pKa Values. *Proteins*. 2005; 61: 704-721.
50. MacKerell, A. D., *et al.* All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of ProteinS. *The journal of physical chemistry B*. 1998; 102 (18): 3586–3616.
51. Mariani, V., *et al.* Assessment of template based protein structure predictions in CASP9. *Proteins*. 2011; 79: 37–58.
52. Marrink S.J., *et al.* Mark, Coarse grained model for semi-quantitative lipid simulations. *J. Phys. Chem. B*. 2004; 108: 750–760.
53. Marrink S.J., *et al.* The MARTINI force field: coarse grained model for biomolecular simulations. *J. Phys. Chem. B*. 2007; 111: 7812–7824.
54. McCammon, J.A., *et al.* Dynamics of Folded Proteins. *Nature*. 1977; 267: 585-590.
55. Melo, F. and Feytmans, E. Assessing protein structures with a non-local atomic interaction energy. *JMB*. 1998; 277 (5): 1141–1152.
56. Merrill A.H. Jr. De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. *J Biol Chem*. 2002; 277 (29): 25843-6.
57. Naruya S. and Masatoshi N. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol*. 1987; 4 (4): 406-425.
58. Neves-Petersen M.T. and Petersen S.B. Protein electrostatics: A review of the equations and methods used to model electrostatic equations in biomolecules – Applications in Biotechnology. *Biotechnology Annual Review*. 2003; Volume 9. ISSN 1387-2656.
59. Ockner R.K. *et al.* A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues. *Science*. 1972; 177 (43): 56-8.
60. Oostenbrink C., *et al.* A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. *J Comput Chem*. 2004; 25 (13): 1656-76.
61. Pace C.N., *et al.* Protein Ionizable Groups: pK Values and Their Contribution to Protein Stability and Solubility. *The Journal of Biological Chemistry*. 2009; 284 (20): 13285–13289.
62. Pearson W. *Advances in Applied Mathematics*. 1981; 2: 482-489.
63. Pearson W. *Protein Science* 4; 1145-1160 (1995).
64. Pei, J., and Grishin, N.V. PROMALS: towards accurate multiple sequence alignments of distantly related proteins. *Bioinformatics*. 2007; 23 (7): 802-808.
65. Richieri G.V., *et al.* Equilibrium constants for the binding of fatty acids with fatty acid-binding proteins from adipocyte, intestine, heart, and liver measured with the fluorescent probe ADIFAB. *J Biol Chem*. 1994; 269 (39): 23918-30.
66. Ropelewski, A.J., *et al.* Mathematically complete nucleotide and protein sequence searching using Ssearch. *Curr Protoc Bioinformatics*, Chapter 3, Unit 3.
67. Rostkowski M., *et al.* Graphical analysis of pH dependent properties of proteins predicted using PROPKA. *BMC Structural Biology*, 2011.
68. Sacchettini J.C., *et al.* Refinement of the structure of Escherichia coli-derived rat intestinal fatty acid binding protein with bound oleate to 1.75-Å resolution. Correlation with the

- structures of the apoprotein and the protein with bound palmitate. *J Biol Chem.* 1992; 267(33): 23534-45.
69. Sali A. and Blundell T.L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *JMB.* 1993; 234: 779-815.
  70. Santomé, J.A., *et al.* Fatty acid binding proteins. Chronological description and discussion of hypotheses involving their molecular evolution. *Trends in Comparative Biochem. & Physiol.* 1998; 4: 23-38.
  71. Scapin G., *et al.* Refinement of the structure of recombinant rat intestinal fatty acid-binding apoprotein at 1.2-Å resolution. *J Biol Chem.* 1992; 267 (6): 4253-69.
  72. Schaap F.G., *et al.* Evolution of the family of intracellular lipid binding proteins in vertebrates. *Mol Cell Biochem.* 2002; 239 (1-2): 69-77.
  73. Schaffer J.E. and Lodish H.F. Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell.* 1994; 79(3): 427-36.
  74. Sitkoff D., *et al.* Accurate calculation of hydration free energies using macroscopic solvent models. *J. Phys. Chem.* 1994; 98: 1978–1988.
  75. Smith E. and Storch J. The Adipocyte Fatty Acid-binding Protein Binds to Membranes by Electrostatic Interactions. *JBC.* 1999; 274, (50, 10): 35325–35330.
  76. Söding J. Protein homology detection by HMM-HMM comparison. *Bioinformatics.* 2005; 21 (7): 951–960.
  77. Stahl A., *et al.* Fatty acid transport proteins: a current view of a growing family. *Trends Endocrinol Metab.* 2001; 12 (6): 266-73.
  78. Stahl A., *et al.* Insulin causes fatty acid transport protein translocation and enhanced fatty acid uptake in adipocytes. *Dev Cell.* 2002; 2 (4): 477-88.
  79. Storch J. and Córscico B. The emerging functions and mechanisms of mammalian fatty acid binding proteins. *Annu Rev Nutr.* 2008; 28: 73-95.
  80. Storch J. and Thumser A.E. Tissue-specific functions in the FABP (Fatty Acid-Binding Protein) family. *J Biol Chem.* 2010; 285 (43): 32679-83.
  81. Storch J., Thumser A.E. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000; 1486: 28–44.
  82. T.J. Dolinsky T.J., *et al.* PDB2PQR: an automated pipeline for the setup, execution, and analysis of Poisson–Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32: W665–W667.
  83. Tamura, K., *et al.* MEGA4 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis. *Mol. Biol. Evol.* 2007; 24 (8): 1596-1599.
  84. Tamura, K., *et al.* MEGA5 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011; 28: 2731-2739.
  85. Thompson J., *et al.* The liver fatty acid binding protein-comparison of cavity properties of intracellular lipid-binding proteins. *Mol Cell Biochem.* 1999; 192 (1-2): 9-16.
  86. Tramontano, A. Protein Structure Prediction: Concepts and Applications 2006; Wiley & Sons, Ltd., Weinheim, Germany.
  87. Uhdman. Brownian Dynamics program user's guide and program. 1999; v5.1. *Univ of Houston.*
  88. Vallejo D., *et al.* Prediction of the most favored configuration in the ACBP-Membrane interaction based on electrostatic calculations. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 2009; 1788: 696–700.
  89. Vallim T. and Salter A.M. Regulation of hepatic gene expression by saturated fatty acids. *Prostaglandins leukot essent fatty acids.* 2010; 82 (4-6): 221-8.
  90. Van Der Spoel D, *et al.* GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem.* 2005; 26 (16): 1701–18.

91. Verwey, E.J.W. and Overbeek, J.Th.G. Theory of the Stability of Lyophobic Colloids. 1948; Elsevier, New York.
92. Villarreal M.A., *et al.* Binding and interactions of L-BABP to lipid membranes studied by molecular dynamic simulations. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1778: 1390-1397.
93. Vogel Hertz A. and Bernlohr D.A. The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function. *Trends. Endocrinol. Metab.* 2000; 11: 175–80.
94. Wu, C.H., *et al.* The Universal Protein Resource (UniProt): an expanding universe of protein information. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34: D187–D191.
95. Zamarreño F., *et al.* Similar structures but different mechanisms: Prediction of FABPs-membrane interaction by electrostatic calculation. *Biochim. Biophys. Acta*. 2012; 1818: 1691–7.
96. Zanzoni S., *et al.* Structural requirements for cooperativity in ileal bile acid-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 2011; 286: 39307–17.
97. Zhou, H. and Zhou, Y. SPEM: improving multiple sequence alignment with sequence profiles and predicted secondary structures. *Bioinformatics*. 2005; 21 (18): 3615–3621.
98. Zuckerkandl E. and Pauling L. Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: V.
99. Zunszain P.A, *et al.* Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid. *BMC Struct Biol.* 2003; 3: 6.

#### BIBLIOGRAFÍA

- *Physics in Molecular Biology*. Sneppen K. and Zocchi G. Cambridge University Press. 2005 - New York.
- *Computational Chemistry and Molecular Modeling*. Ramachandran K., Deepa G. and Namboori K. Springer. 2008 - Berlin.
- *Computational Biochemistry and Biophysics*. Becker O.M., MacKerell A.D. Jr., Roux B. and Watanabe M. Marcel Dekker Inc. 2001 – New York.
- *Research in Computational Molecular Biology*. Bafna V. and Cenk Sahinalp S. Springer. 2011 – Berlin.
- *The Art of Molecular Dynamics Simulation. Second edition*. Rapaport D.C. Cambridge University Press. 2005 - New York.
- *Molecular Modeling and Simulation. Second Edition*. Schlick Tamar. Springer. 2010 – New York.
- *From Protein Structure to Function with Bioinformatics*. Rigden, D.J. Springer. 2009 – New York.
- *An Introduction to Computational Biochemistry*. Tsai, C. S. Wiley-liss. 2002 – New York.
- *Handbook of Computational Molecular Biology*. Aluru, S. Chapman & Hall/CRC. 2006 – Boca Raton, FL.
- *Molecular Modelling. Principles and Applications. Second Edition*. Leach, A.R. Prentice Hall. Edimburg Gate – 2001.
- *Understanding Molecular Simulations. From Algorithms to Applications*. Frenkel, D. and Smit, B. Academic Press. 2001 - San Diego.
- *Análisis estructural y funcional de Macromoléculas*. Córscico, B., Falomir Lockhart, L., Franchini G. y Scaglia N. EDULP. 2013. La Plata.
- *The Structure of Biological Membranes*. Second Edition. Yeagle P.L. CRC Press. 2005 - New York.
- *Física, ciencias de la vida*. Kane, J. y Sternheim, M.M. Reverté. 1982 – Buenos Aires.
- *Curso de Física General*. Tomos I, II y III. S. Frish y A. Timoreva. Editorial MIR. 1977 - Moscú.

# PRODUCCIÓN CIENTÍFICA ORIGINADA DURANTE EL PERÍODO DE FORMACIÓN DOCTORAL

## PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTÍFICAS

- **“Prediction of the most favored configuration in the ACBP-Membrane interaction. A proposal based on electrostatic calculations.”** Vallejo, D., Zamarreño, F., Guérin, D.M.A., Grigera, JR, Costabel, M.D. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1788 (2009) 696 – 700. doi:10.1016/j.bbamem.2008.12.007
- **“Similar structure but different mechanisms: Prediction of FABPs-membrane interaction by electrostatic calculation.”** Fernando Zamarreño, Fernando E. Herrera, Betina Córscico, Marcelo D. Costabel. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1818 (2012) 1691 – 1697. doi:10.1016/j.bbamem.2012.03.003.
- **“Circular dichroism and electron microscopy studies in vitro of 33-mer gliadin peptide revealed secondary structure transition and supramolecular organization.”** Herrera M.G., Zamarreño F. Costabel M., Ritacco H., Hütten A., Sewald N., Dodero V.I. *Biopolym.* 101 (2014) 96-106. doi: 10.1002/bip.22288.
- **“IFABP portal region insertion during membrane interaction depends on phospholipid composition.”** De Gerónimo E., Rodríguez Sawicki L., Bottasso Arias N., Franchini G.R., Zamarreño F., Costabel M.D., Córscico B., Falomir Lockhart L.J. *Biochim Biophys Acta.* 1841 (2014) 141-150. Doi: 10.1016/j.bbalip.2013.10.011.
- **“Echinococcus granulosus antigen B: A Hydrophobic ligandbinding protein at the Host-parasite interface”** Valeria Silva-Álvarez, Ana M. Folle, Ana L. Ramos, Fernando Zamarreño, Marcelo D. Costabel, Eduardo García-Zepeda, Gustavo Salinas, Betina Córscico y Ana M. Ferreira. *PLEFA.* 2014. En prensa. DOI: 10.1016/j.plefa.2014.09.008

## CAPÍTULOS DE LIBROS

- **“Análisis estructural y funcional de macromoléculas. Capítulo 5: Cálculos computacionales en macromoléculas biológicas”.** Marcelo D. Costabel y Fernando Zamarreño. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). Año 2013. ISBN 978-950-34-1057-8.

## PRESENTACIONES DE TRABAJOS CIENTÍFICOS EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES

### Comunicaciones Orales

- **“Interaction between FABP and a biological membrane. Computational Study of the Electrostatic contributions to the binding mechanism.”** Zamarreño, F., Falomir, L., Córscico, B., Costabel, M.D. II Latin American Postgraduate Program of Biophysics Course. Del 5 al 9 de Octubre de 2009. Buzios, Brasil.
- **“Interaction FABP- Membrane: The Electrostatic Interactions Could Determine the Choise of Collisional or Diffusional Mechanism in FABPs from Different.Tissues.”** Zamarreño, F., Marcelo D. Costabel. Computational Modelling and Simulations of Biological Systems. Theoretical and Practical Course and Workshop. Del 22 de Febrero al 5 de Marzo de 2010. Instituto Pasteur de Montevideo. Montevideo, Uruguay.

### Posters

- **“Electrostatic interaction between ACBP-membrane. The role of protein mutations in the process.”** Vallejo D.F., Zamarreño F., Picco A., Grigera J.R., Costabel M.D. XXXV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica. 8 al 10 de Noviembre de 2006. Rosario, Santa Fe, Argentina.
- **“The role of mutations in the process of Interaction between FABP- membrane. An Electrostatic study.”** Fernando Zamarreño, Diego F. G. Vallejo, Agustín Picco, Marcelo D. Costabel. VI International Conferences of Biological Physics. V Southern Cone Biophysics Congress. Del 21 al 31 de Agosto de 2007. Montevideo, Uruguay. ISBN 978-9974-8002-2-9.
- **“Cálculo electrostático en el espacio de configuraciones posibles para la interacción ACBP-CPT1.”** Fernando Zamarreño, Natalia Pasqualini, Diego Vallejo, Marcelo Costabel. 93º Reunión Nacional de la Asociación Física Argentina. XI Reunión de la Sociedad Uruguaya de Física. 15 al 19 de Septiembre de 2008. Buenos Aires, Argentina.
- **“Electrostatic Interactions between ACBP and membrane. Proposal based on crystallographic data.”** Diego F. Vallejo, Fernando Zamarreño, Natalia Pasqualini, Agustín Picco, Diego Guérin, J. Raúl Grigera, Marcelo D. Costabel. IV Reunión de la Asociación Argentina de Cristalografía. 29 al 31 de Octubre de 2008. Bahía Blanca, Argentina.
- **“Prediction of the most favorable configuration in protein-membrane interactions based on computational calculations.”** Diego F. Vallejo, Fernando Zamarreño, Diego M.A. Guérin, J. Raul Grigera and Marcelo D. Costabel. 2<sup>nd</sup> Conference on Drug

Development for the Third World: From Computational Molecular Biology to Experimental Approaches. 1 al 5 de Junio de 2009. ICTP – Trieste, Italia.

- **“Interaction between FABP and a biological membrane. Computational Study of the Electrostatic contributions to the binding mechanism.” Zamarreño, F.** Falomir, L., Córscico, B., Costabel, M.D. VII iberoamerican Congress of Biophysics. Del 30 de Septiembre al 3 de Octubre de 2009. Buzios, Brasil.
- **“Electrostatic interaction between AcylCoA Binding Protein and Hepatocyte Nuclear Factor-4. Computational indications of the union mechanism.” Zamarreño, F.** Amundarain, M.J., Costabel, M.D. VII iberoamerican Congress of Biophysics. Del 30 de Septiembre al 3 de Octubre de 2009. Buzios, Brasil.
- **“Electrostatic study of the aggregation of TrV particles.”** María J. Amundarain, **Fernando Zamarreño**, Diego M.A. Guerin, Marcelo D. Costabel. I Iberoamerican Workshop on Chagas Disease, Triatomine vectors, T. cruzi, and Triatoma virus. Del 13 al 16 de Septiembre de 2010. Lisboa, Portugal.
- **“A Fast Electrostatic Study to Determinate Fatty Acid Binding Protein – Membrane Interaction Mechanism.” Fernando Zamarreño,** María J. Amundarain, Nestor E. Sanchez Fornillo, Marcelo D. Costabel. XXXIX Annual Meeting of The Argentinean Biophysical Society 2010 & 3rd Latin American Protein Society Meeting. Del 12 al 16 de Octubre de 2010. Salta, Argentina. ISBN 978-987-26254-0-5.
- **“Electrostatic study of Triatoma virus aggregation mechanism.”** Maria J. Amundarain, **Fernando Zamarreño**, Diego M.A. Guerin, Marcelo D. Costabel. XXXIX Annual Meeting of The Argentinean Biophysical Society 2010 & 3rd Latin American Protein Society Meeting. Del 12 al 16 de Octubre de 2010. Salta, Argentina. ISBN 978-987-26254-0-5.
- **“Acyl CoA Binding Protein-Membrane interaction. A Molecular Dynamic study.” Nestor E. Sanchez Fornillo, Fernando Zamarreño,** Marcelo D. Costabel. XXXIX Annual Meeting of The Argentinean Biophysical Society 2010 & 3rd Latin American Protein Society Meeting. Del 12 al 16 de Octubre de 2010. Salta, Argentina. ISBN 978-987-26254-0-5.
- **“Electrostatic Analysis of the Aggregation of TrV Viral Particles.”** Marcelo D. Costabel, María J. Amundarain, **Fernando Zamarreño**, Rubén Sánchez-Eugenia, Jon Agirre, Diego M. A. Guérin. Biophysical Society 55th Annual Meeting. Del 5 al 9 de Marzo de 2011. Baltimore, Maryland. Estados Unidos.
- **“Análisis de la relación estructura-función en Acyl CoA Binding Protein (ACBP).” F. Zamarreño,** J. F. Viso, N.E. Sánchez Fornillo, M.D. Costabel. XL Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica. Del 5 al 7 de Diciembre de 2011. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. ISBN 978-987-27591-0-0.
- **“Cálculo computacional de la interacción electrostática en la unión de proteínas transportadoras de ácidos grasos con membranas biológicas.” F. Zamarreño,** M.J. Amundarain, J.F. Viso, F. Herrera, M.D. Costabel. XL Reunión Anual de la Sociedad Argentina

de Biofísica. Del 5 al 7 de Diciembre de 2011. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. ISBN 978-987-27591-0-0.

- **“Estructura por modelado computacional del fragmento peptídico 33-mer de la proteína  $\alpha$ -2 gliadina.”** **F. Zamarreño**, M.J. Amundarain, M.G. Herrera, V. Doderó, M.D. Costabel. XL Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica. Del 5 al 7 de Diciembre de 2011. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. ISBN 978-987-27591-0-0.
- **“Estudio del Comportamiento Supramolecular del fragmento peptídico 33-mer de la proteína  $\alpha$ -2 gliadina.”** M. G. Herrera, **F. Zamarreño**, M. J. Amundarain, M. Costabel, N. Sewald, V. I. Doderó. XL Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica. Del 5 al 7 de Diciembre de 2011. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. ISBN 978-987-27591-0-0.
- **“Supramolecular evaluation of 33-mer Gliadin peptide reveals Folding and Self-assembly *in vitro*.”** M. Georgina Herrera, **Fernando Zamarreño**, M. Julia Amundarain, Marcelo Costabel, Andreas Hütten, Norbert Sewald and Verónica I. Doderó. XLI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica. Del 5 al 7 de Diciembre de 2012. San Javier, Tucumán, Argentina. ISBN 978-987-27591-1-7.
- **“A computational analysis of the first steps of the auto-aggregation of the Gliadin peptide p33.”** M.J. Amundarain, **F. Zamarreño**, M. Giménez, J.F. Viso, M.G. Herrera, V.I. Doderó, M.D. Costabel. XLI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica. Del 5 al 7 de Diciembre de 2012. San Javier, Tucumán, Argentina. ISBN 978-987-27591-1-7.
- **“In silico analysis of five-fold axis in TrV capsids.”** J. F. Viso, **F. Zamarreño**, M. J. Amundarain, D. M. A. Guérin, M. D. Costabel. XLI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica. Del 5 al 7 de Diciembre de 2012. San Javier, Tucumán, Argentina. ISBN 978-987-27591-1-7.
- **“Two highly conserved amino acids seem to lead FABP-Membrane interaction. A multimethodological in silico approach.”** **F. Zamarreño**, F. Herrera, N.S. Fornillo, A. Giorgetti, B. Córscico, M. D. Costabel. XLI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica. Del 5 al 7 de Diciembre de 2012. San Javier, Tucumán, Argentina. ISBN 978-987-27591-1-7.
- **“Estudios estructurales en Cápsides de Virus Icosaédricos.”** Viso J.F., **Zamarreño F.**, Amundarain M.J., Guérin Aguilar D.M., Costabel M.D. 98° Reunión Nacional de Física. Asociación de Física Argentina. Del 24 al 27 de Septiembre de 2013. Bariloche, Río Negro, Argentina.
- **“In Silico evaluation of the auto-aggregation of 33-mer Gliadin peptide.”** M.J. Amundarain, **F. Zamarreño**, J.F. Viso, M.G. Herrera, V.I. Doderó, M.D. Costabel. XLII reunion Annual de la Sociedad Biofísica Argentina. Del 2 al 4 de Diciembre de 2013. Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina. ISBN 978-987-27591-2-4.

- **“Ascaris suum’s FABP, AS-p18, shows ambiguous behavior in its interaction with biological membranes.”** Zamarreño F., Ibáñez-Shimabukuro M., Córscico B. and Costabel M.D. XLII reunion Annual de la Sociedad Biofísica Argentina. Del 2 al 4 de Diciembre de 2013. Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina. ISBN 978-987-27591-2-4.
- **“Preliminary results in the hidratation of the hydrophobic region of the 5-fold symmetry axis of TrV.”** Viso J.F., Zamarreño F., Amundarain M.J., Guérin Aguilar D.M., Costabel M.D. XLII reunion Annual de la Sociedad Biofísica Argentina. Del 2 al 4 de Diciembre de 2013. Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina. ISBN 978-987-27591-2-4.
- **“Modelado *in silico* de la interacción entre la proteína VP4 de la cápside de Triatoma Virus y una membrana biológica”.** J.F. Viso, F. Zamarreño, M.J. Amundarain, D.M.A. Guérin and M.D. Costabel. XII TREFEMAC. Del 7 al 9 de Mayo de 2014. Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.
- **“Evaluación computacional de los primeros pasos del proceso de agregación del péptido inmunogénico 33-mer.”** M.J. Amundarain, F. Zamarreño, J:F: Viso, V.I. Doderó y M.D. Costabel. . XII TREFEMAC. Del 7 al 9 de Mayo de 2014. Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.