

**SIMULACIÓN COMPUTACIONAL DE BIOMOLÉCULAS.
UN PUNTO DE ENCUENTRO ENTRE LA FÍSICO-QUÍMICA Y
LA BIOLOGÍA COMPUTACIONAL**

Marcelo A. Martí

Departamento de Química Biológica e INQUIMAE-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad de Buenos Aires. Pabellón 2 Ciudad Universitaria,
Ciudad Autónoma de Buenos Aires C1428EHA.
E-mail: marti.marcelo@gmail.com

Resumen

La simulación computacional de biomoléculas consiste en la implementación de las bases físico-químicas del comportamiento de sistemas moleculares - como ser las proteínas - en un programa de computadora, para luego simular su comportamiento. En este trabajo comentaremos como a partir de la utilización de esta metodología se logra comprender el funcionamiento de la Nitroforina, una hemoproteína de la vinchuca que transporta óxido nítrico de manera pH dependiente. Los resultados descriptos en el presente trabajo permiten comprender como el óxido nítrico es atrapado por la proteína que se encuentra cerrada como una caja a bajo pH y se abre liberando el gas a un pH mayor. El responsable del cambio conformacional es el Ácido Aspártico 30 que cierra-abre la proteína al cambiar su estado de protonación. En su conjunto, el presente relato ejemplifica el uso de estas metodologías para comprender las bases moleculares del funcionamiento proteico y nos permite reflexionar sobre el potencial futuro de las computadoras cuando sean más veloces.

Palabras Clave: simulación computacional, QM/MM, proteínas, óxido nítrico, cambio conformacional

Abstract

Computer simulation of biomolecules. The meeting point between physical chemistry and computational biology. Computer simulation of biomolecules is based on the implementation of physical chemistry rules describing the behavior of molecular systems, like proteins, in a computer program. In the present work, we shall show how we were able to understand Nitrophorin, a pH dependent nitric oxide transport heme protein from the kissing bug, function using these methodologies. Our results allowed us to understand how nitric oxide is trapped in a closed protein at low pH, which opens and releases the gas upon pH increase. The residue responsible for the conformational changes is Aspartic acid Number 30 which open and closes the protein upon a change in its protonation state. Altogether, the present work is a comprehensive example of the use of these methodologies to understand the molecular basis of protein function.

Key words: computer simulation, QM/MM, proteins, nitric oxide, conformational change.

Introducción

De la interdisciplina a la simulación computacional de biomoléculas. Actualmente en el ámbito científico, es un lugar común de connotación positiva hablar de la interdisciplina y su importancia para resolver los enigmas de la naturaleza y producir avances científico-tecnológicos relevantes. Sin embargo, como pone en evidencia el dicho popular “del dicho al hecho hay mucho trecho”, y para lograr un verdadero y exitoso trabajo científico interdisciplinario es menester adoptar una estrategia que producirá sus resultados a mediano y/o largo plazo y que aparentara estar siempre “fuera de lugar” en los ámbitos académico-científico tradicionales. Realizar trabajo interdisciplinario requiere por un lado tener la humildad de reconocer en el otro aquellos conocimientos que uno no posee y por otro, estar dispuesto ambos a aprender un nuevo lenguaje que permita una comunicación eficiente en ambos sentidos. La simulación computacional de Biomoléculas, es necesariamente una temática científica interdisciplinaria, que integra conceptos de Física, Química, Computación y Biología. En el presente artículo mi intención es contarles, como, junto con un grupo de trabajo interdisciplinario de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (FCEN-UBA), llevamos adelante un proyecto científico de estas características cuyo objetivo es comprender los mecanismos moleculares del funcionamiento proteico. [1-3]

Cuando comencé mis primeras actividades científicas en el grupo del Dr Estrin, allá por el año 2001, siendo estudiante de la carrera de Ciencias Biológicas, nunca imaginé todo lo que iba a tener aún que aprender de Química, Física y Computación para poder responder al problema científico que siempre tuve cerca del corazón, que es comprender el funcionamiento de las proteínas. En estas primeras etapas y ya entrando en el Doctorado, mi atención se centró en comprender la relación entre la estructura y función proteica utilizando métodos de simulación cuánticos (QM del inglés Quantum Mechanics). Estos métodos, también denominados *ab-initio*, surgieron de la Físico-Química teórica a mediados del siglo XX, y consisten en programas de computadora que buscan resolver la ecuación de Schrödinger para un sistema molecular, obteniendo como resultado la estructura electrónica del mismo, y sus propiedades asociadas (geometría molecular, energía, densidad electrónica etc.). Este tipo de metodologías, son centrales para poder describir procesos reactivos (ruptura y formación de enlaces covalentes) y propiedades asociadas a la química de coordinación de metales de transición (estados de oxidación y espín), sin embargo requieren un alto costo computacional y están por lo tanto limitados a simulaciones de sistemas de no mucho más de 100 átomos. Por otro lado, y teniendo su origen en la Mecánica Estadística y Newtoniana, la descripción de la dinámica de sistemas de miles átomos, como una proteína en solución acuosa, se puede realizar utilizando los denominados Métodos Clásicos (MM, del inglés Molecular Mechanics). En estos métodos la energía y fuerza del sistema son descriptas mediante una función, relativamente simple, de las coordenadas atómicas y el movimiento del mismo es realizado utilizando las ecuaciones de Newton. En esta descripción las proteínas son descriptas como un conjunto de “bolas (con carga) y resortes” y si bien es posible simular el comportamiento dinámico de una proteína entera en agua por cientos de nanosegundos, los mismos no permiten describir procesos reactivos. En este contexto el primer objetivo de mi Tesis Doctoral fue desarrollar un método que permitiera incorporar los efectos del entorno proteico al cálculo cuántico del sitio activo, para lo cual combinamos método QM con uno MM, creando un programa de computadora capaz de realizar cálculos híbridos o QM/MM (Figura 1). [1]

Las hemoproteínas como objeto de estudio. Desde el punto de vista de la temática proteica, mi objetivo se focalizó en comprender a las hemoproteínas, que son todas aquellas proteínas que poseen como grupo prostético una porfirina que contiene en el centro un átomo de hierro (Fig. 1). Las hemoproteínas, como la muy conocida hemoglobina, realizan muchas de sus funciones mediante la interacción del metal con moléculas gaseosas pequeñas como el O₂,

NO, CO entre otras, y una de las principales caracterizaciones consiste en determinar experimentalmente la afinidad y la cinética de interacción con los mismos. En otras palabras, determinar por un lado cual debe ser la presión del gas para que 50% de las proteínas se encuentren unidas al mismo (esto es formando un complejo Fe-X) y por otro cual es la velocidad de unión y liberación del mismo. Comprender y ser capaz de determinar estos procesos me llevó a complementar mi formación doctoral también en química experimental, realizando estudios de interacción entre O_2 , NO y HNO con hemoproteínas y metaloporfirinas en solución utilizando técnicas espectroscópicas bajo la dirección del Dr Doctorovich (FCEN-UBA). [1]

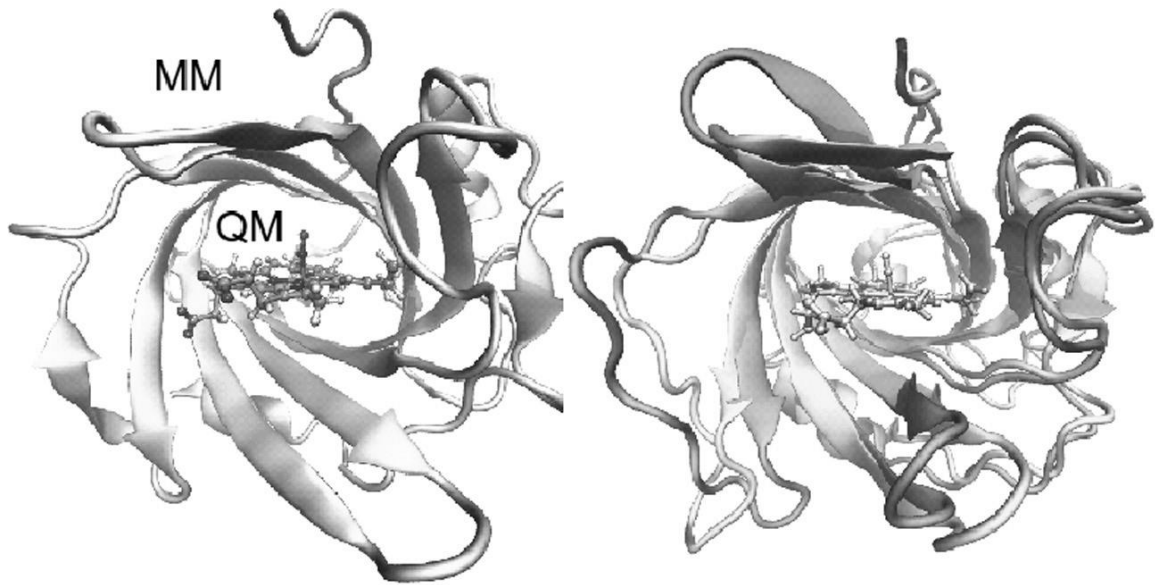


Fig. 1. A) La Nitroforina (NP), mostrando el grupo hemo unido al NO (Sistema QM) en CPK y el resto de la proteína en formato de cintas (sistema MM). B) Comparación de las estructuras de la NP a bajo-pH y alto-pH.

Una de las proteínas más interesantes que estudiamos es la denominada Nitroforina(NP), cuyo nombre combinación de “Nitro” por el óxido nítrico (NO) y “phorin” (transportador en griego), es una concisa descripción de su función, que es - 51 - M.A. Martí. Premio Pedro J. Aymonino en Química transportar al NO desde las glándulas salivales de la vinchuca (*Rhodnius prolixus*) a la cual pertenece, hasta su destino los vasos sanguíneos del hospedador. El NO es un potente vasodilatador y al ser liberado en los capilares, aumenta el flujo de sangre “asegurándole” al insecto un succulento almuerzo (Fig. 2). En la NP el NO es transportado unido al hierro y la pregunta que surge inevitablemente al observar su comportamiento es por qué el mismo es retenido cuando la proteína se encuentra en las glándulas salivales y liberado en el torrente sanguíneo. Las primeras pistas sobre el origen de este comportamiento diferencial surgieron de una combinación de estudios cinéticos y estructurales, realizados por nuestros colaboradores, que mostraron que la NP exhibe un cambio conformacional pH dependiente que es acompañado de un cambio en la velocidad de liberación del NO (Fig. 1B). En otras palabras a un pH de 5.5 como el que se encuentra en las glándulas salivales la proteína libera el NO muy lentamente (horas-días). Dentro del torrente sanguíneo la NP se encuentra expuesta a un pH de 7.4, lo que resulta en que esta cambie de forma y libere el NO en segundos. [2-3]

En este contexto nos propusimos responder utilizando técnicas de simulación computacional las siguientes preguntas:

¿Cuál es la razón estructural que permite la velocidad de liberación diferencial del NO?

- ¿Cuál es el mecanismo físico-químico subyacente que explica este comportamiento?
- ¿Cuáles son los determinantes estructurales y como ocurre el cambio conformacional (de forma) dependiente del pH?
- ¿Cuál es la descripción termodinámica del mismo?

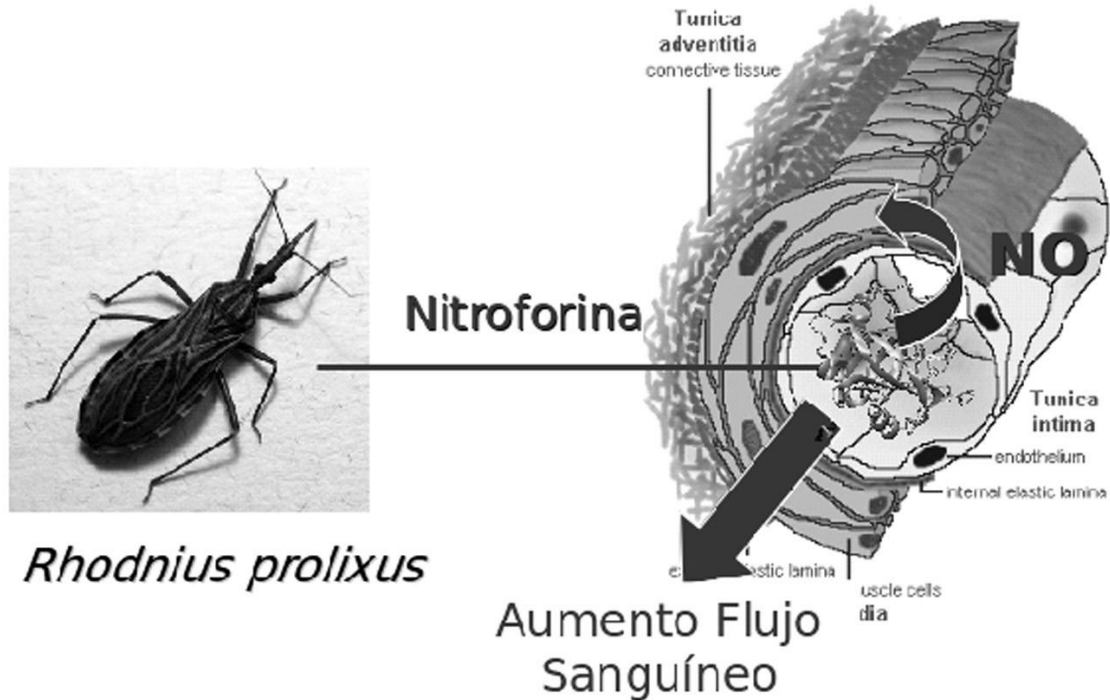


Fig. 2. Esquema del rol fisiológico de la Nitroforina.

Desarrollo de la Hipótesis de Trabajo y Resultados

La coordinación del NO no es la respuesta. Para intentar explicar cual es la razón de la liberación diferencial del NO en las dos formas de la NP (bajo-pH y alto-pH), nuestra primera hipótesis supuso que podría existir una energía de interacción mejor entre la NP y el NO coordinado al metal en la forma de bajo-pH respecto de la forma de alto-pH. La energía de interacción entre el NO y la NP posee dos componentes, por un lado la fuerza de la unión Fe-N y por otro la interacción del NO coordinado con el entorno proteico. La primera interacción es de clara naturaleza cuántica, mientras que la segunda puede ser descrita de manera adecuada con un método clásico que contemple contribuciones electrostáticas y de van der Waals. En este sentido representa un excelente ejemplo para utilizar el código QM/MM desarrollado, considerando al “hemo-NO” como el subsistema QM y al entorno proteico clásicamente. Por lo tanto y para poner a prueba nuestra hipótesis, determinamos la energía de interacción (y sus contribuciones) entre el NO y la NP en las estructuras correspondientes a ambas formas. Sorprendentemente los resultados mostraron que ambas contribuciones, la energía del enlace Fe-NO y la interacción del NO con el entorno proteico eran de una magnitud similar en ambas formas de la proteína, por lo que no existe una estabilización diferencial del NO coordinado en la estructura de bajo-pH que explique la liberación diferencial observada. Este resultado, resulta en un rechazo de nuestra primer hipótesis lo que nos llevó a plantear una hipótesis alternativa [2].

La liberación diferencial de NO es controlada por una “puerta” molecular. Desde el punto de vista microscópico, el proceso de liberación del NO involucra al menos dos pasos. El primero es la ruptura del enlace Fe-NO (estudiado en el punto anterior) y el segundo involucra la migración (o pasaje) del NO por la matriz proteica desde el sitio activo hasta el seno del solvente. Este proceso usualmente está facilitado por la presencia de cavidades y túneles hidrofóbicos que conectan el sitio activo sobre el metal con el solvente. Estas cavidades no representan un camino “libre” hacia el exterior y el NO debe transitar a través de éstos superando picos y valles en la superficie de energía libre asociada al proceso. En este proceso la velocidad con la que el NO es liberado es inversamente proporcional al tamaño de la barrera de energía libre que él mismo debe superar. Por lo tanto si la barrera fuera mayor en la estructura bajo-pH que en la alto-pH, esto podría explicar la velocidad diferencial de liberación. Bajo esta hipótesis decidimos determinar entonces el perfil de energía libre de salida del NO en ambas estructuras [2].

Determinar la energía libre asociada al proceso de migración requirió implementar en el marco de un programa clásico, un método que permitiera forzar al sistema a realizar el proceso deseado (la salida del NO), mientras se calcula la energía libre asociada al mismo. Para ello y en colaboración con el Dr. Roitberg (University of Florida, Gainesville, USA) implementamos un método basado en la Física Estadística, que guía al sistema mediante la aplicación de una fuerza externa, lo que permite calcular el trabajo realizado por el mismo para cada trayectoria. Luego combinando varias trayectorias en la denominada relación de Jarzynski se obtiene la energía libre. En nuestro caso realizamos 20 trayectorias “empujando” al NO desde el sitio activo de la NP hasta el solvente, tanto en la estructura de bajo-pH como la de alto-pH. Los perfiles de energía libre resultantes (Fig. 3A), junto con la visualización de la trayectoria, o camino recorrido por el NO a través de la proteína, hablan por si solos. En la estructura bajo-pH la barrera de energía libre para salir de la proteína es enorme (> 10 kcal/mol) mientras que en la estructura bajo-pH la barrera es muy pequeña (ca 2 kcal/mol) y la trayectoria (Fig. 3B) muestra claramente como el NO sale “por el camino más corto” hacia el solvente, pasando por entre los “loops” que diferencian ambas estructuras. En otras palabras mientras que en la estructura a alto pH la proteína prácticamente no ofrece resistencia a la salida del NO, en la estructura a bajo pH el mismo está atrapado en la proteína y no puede salir. Estos resultados confirman nuestra hipótesis de que la liberación diferencial del NO se debe a que el cambio en la estructura afecta el proceso de migración del mismo a través de la matriz proteica. La NP funciona entonces como una “caja” que se encuentra cerrada en la saliva del insecto y es abierta cuando la proteína se encuentra en el torrente sanguíneo [2].

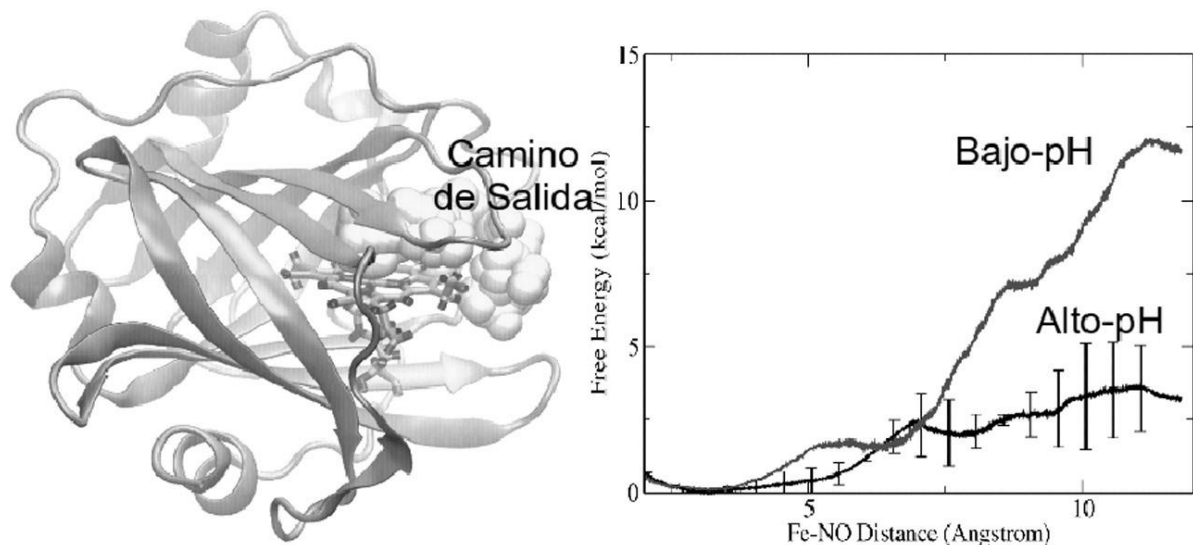


Fig. 3. A) Camino de salida del NO a través de la NP. B) Perfiles de energía libre para la salida del NO de la NP en la conformación bajo-pH y alto-pH.

El cambio de estructura pH dependiente. Finalmente, nos propusimos determinar cómo es que el cambio de pH del medio, resulta en un cambio de forma (conformacional) de la proteína. Para ello nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo: Sabiendo que el cambio de forma ocurre entre un pH de 5.5 a 7.5 debemos encontrar un aminoácido (o residuo) de la NP cuyo estado de protonación cambie en el mismo rango. O en otras palabras, que posea un pKa cercano a 6. Recordemos que el pKa se corresponde con el pH del medio al cual la fracción del residuo que se encuentra protonada es igual la del residuo sin protonar. Además, si el residuo es responsable del cambio conformacional debiera poseer interacciones diferenciales en una y otra estructura. Con esto en mente comparamos las interacciones de cada uno de los posibles residuos titulables de la NP en ambas estructuras. Si bien observamos varios candidatos, el más prometedor resultó el Ácido Aspártico Numero 30 (Asp30). Este residuo, se encuentra mirando hacia adentro de la proteína en la estructura a bajo-pH o “cerrada”, formando una interacción de tipo puente de hidrógeno con el carbonilo de la Leu129, mientras que está expuesto al solvente en la estructura de alto-pH o “abierta”. Nos propusimos entonces determinar el pKa del Asp30, para ello utilizamos una estrategia de simulación denominada “Dinámica Molecular a pH constante” que permite fijar el pH de la solución en un valor deseado, y deja que el sistema explore cuál es su estado de protonación más probable, variando la misma de acuerdo a cual posee menor energía libre. Realizamos entonces simulaciones fijando el pH del entorno respectivamente en valores que van desde 3 a 10 (espaciados cada 1), y determinamos en cada caso la población (que se corresponde con la fracción del tiempo) de los estados protonado y desprotonado. Los resultados que se muestran en la Fig. 4, evidencian que el pKa del Asp30 es 6.5 lo que coincide con lo esperado para ser el residuo responsable del cambio estructural. Más aún, el análisis detallado de las estructuras a lo largo de las trayectorias muestra que existe una relación casi biunívoca entre el estado de protonación del Asp30 y la estructura. O sea, siempre que la proteína se encuentra protonada la estructura se cierra y adopta la de bajo-pH, mientras que cuando el ácido está cargado (desprotonado) éste se expone al solvente y la NP se abre adoptando la estructura alto-pH [3].

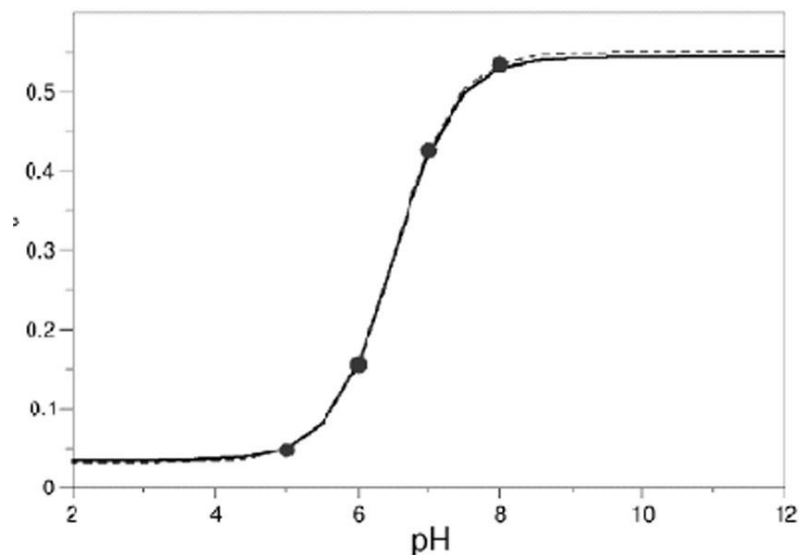


Fig. 4. Fracción de la proteína con el Asp30 desprotonado en función del pH del medio.

Como funciona entonces la NP? Los resultados conjuntos de los tres puntos anteriores permiten entonces explicar el funcionamiento de la NP a nivel molecular. Cuando la proteína es sintetizada en las glándulas salivales de la vinchuca donde el pH es cercano a 5,

la proteína se encuentra cargada con el NO, que también es sintetizado en este compartimiento, ya que el mismo es “retenido” dentro de la NP que está cerrada. Cuando la NP es liberada al torrente sanguíneo, enfrenta ahora un entorno con un pH superior, lo que dispara la desprotonación del Asp30 que al quedar cargado negativamente pierde su capacidad de interacción con la Leu130 y se expone al solvente, resultando en la apertura de la proteína. La proteína ahora abierta, presenta una vía libre para la salida del NO, que entonces es liberado, produciendo el efecto fisiológico deseado [2-3].

Conclusión

En este trabajo espero haberles podido transmitir mediante el ilustrativo ejemplo de la Nitroforina, como la Simulación Computacional de Biomoléculas, integrando conceptos de la Física y la Química en un programa de computadora, permite responder de manera precisa a preguntas relacionadas con el funcionamiento de las proteínas con detalle atómico-molecular, proceso que continúa siendo uno de los principales interrogantes de la Química Biológica moderna. Y si esta pequeña historia no ha sido suficiente para convencerlos del potencial impacto de estas metodologías, no puedo dejar de mencionar la enorme satisfacción personal que fue para nosotros enterarnos que el Premio Nobel de Química 2013, fue otorgado a Karplus, Levitt y Warshel “por el desarrollo de métodos de simulación computacional multiescala para el estudio de sistemas químicos complejos”, que entre otras cosas comprenden los descriptos en este trabajo. Por último y pensando en el futuro, no debe escaparse a nuestra atención, que el continuo incremento en la capacidad de procesamiento de las computadoras nos permitirá simular cada vez sistemas biológicos más grandes y más complejos prometiéndonos develar los secretos de la Química de la Vida.

Referencias

- [1] L. Capece, L. Boechi, L.L. Perissinotti LL, P. Arroyo-Mañez, D.E. Bikiel, G. Smulevich, M.A. Marti, & D.A. Estrin, *Biochim Biophys Acta* **1834**, 1722 (2013).
- [2] M.A. Martí, M.C. González Lebrero, A.E. Roitberg & D.A. Estrin, *J Am Chem Soc.* **130**, 1611 (2008).
- [3] N.V. Di Russo, D.A. Estrin, M.A. Martí & A.E. Roitberg, *PLoS Comput Biol.* **8**, e1002761 (2012).

Manuscrito recibido el 28 de marzo de 2014.

Aceptado el 25 de abril de 2014.