

Análisis de la estabilidad del cluster hidrofóbico de una horquilla beta usando el método Monte Carlo

Nicastro, A.¹; Sferco, S.J.^{1,2}

¹- Departamento de Física, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Ciudad Universitaria, Paraje El Pozo, 3000 Santa Fe, Argentina.

²- INTEC (CONICET- UNL), Güemes 3450, 3000 Santa Fe, Argentina.

RESUMEN: Utilizando el método de Monte Carlo se analizó la estabilidad del cluster hidrofóbico de la horquilla beta de la proteína G. Tanto en vacío como en presencia de solvente explícito el cluster hidrofóbico resultó inestable, mientras que se mantuvo el patrón de enlaces de hidrógeno intracatenarios de la horquilla (simulación solo en vacío). Estos resultados sugieren que en el proceso de plegamiento de la horquilla, la estabilidad viene dada principalmente por los enlaces de hidrógeno intracatenarios del esqueleto peptídico y solo adicionalmente por la formación del cluster hidrofóbico. La mutación de un residuo por otro aún más hidrofóbico aumenta la estabilidad de dicho cluster.

Palabras clave: horquilla beta – cluster hidrofóbico – plegamiento – Monte Carlo

SUMMARY: Stability analysis of the hydrophobic cluster of a β -hairpin using monte carlo method. Nicastro, A¹; Sferco, S.J.^{1,2}. Using Monte Carlo method, the hydrophobic cluster stability of a β -hairpin of the protein G was analyzed. Both in vacuo and explicit solvent the hydrophobic cluster proved to be unstable while it preserved its interstrand hydrogen bond pattern in the hairpin (simulation only in vacuo). These results suggest that in the folding process of the hairpin, stability is essentially achieved by formation of backbone hydrogen bonds and only in a complementary way by formation of the hydrophobic cluster. The mutation in a cluster residue for another even more hydrophobic one increases the stability of the cluster.

Key words: β -hairpin – hydrophobic cluster – folding – Monte Carlo.

* Correspondencia

e-mail: alcides_nicastro@yahoo.com.ar

Nota

Los resultados de este trabajo forman parte de la Tesina de Licenciatura en Biotecnología de Alcides Nicastro, FBCB, UNL, 2004.

Recibido: 01-07-04

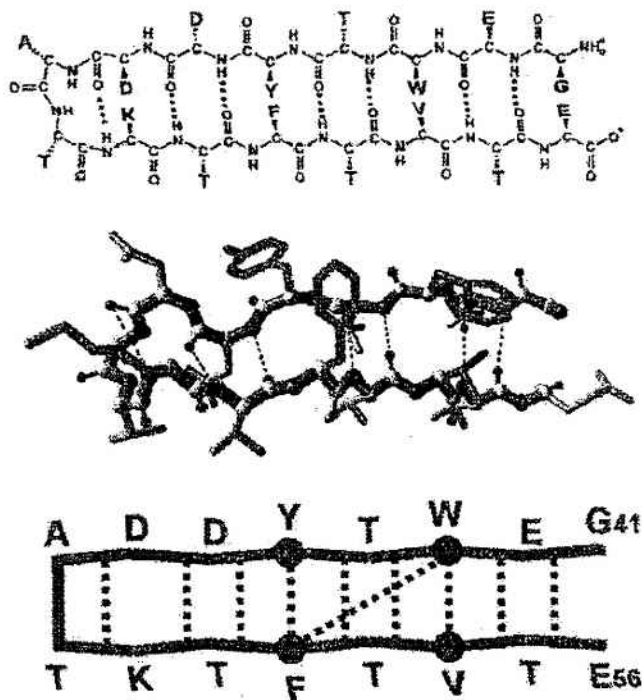
Aceptado: 23-09-04

Introducción

La estructura aminoacídica en estudio es la segunda horquilla del dominio de unión a Ig, de la proteína G de *Streptococcus* (residuos 41 a 56) (Fig. 1). El análisis de tal estructura resulta de particular interés, dada una característica clave: cuando esta horquilla beta es escindida del resto de la proteína, conserva su conformación nativa demostrando independencia en su estabilidad, respecto del resto de la cadena polipeptídica (3, 4). Esta cualidad ha motivado el planteo de diversos estudios, en función de comprender dicha estabilidad. Los estudios realizados, con distintos enfoques metodológicos, indican como una de las razones fundamentales de este fenómeno, la existencia de interacciones hidrofóbicas

efectivas, asignadas a las cadenas laterales aportadas por los residuos W43, Y45, F52 y V54 (Figs. 1 y 2). Estas cadenas laterales están por encima del plano de la horquilla, enfrentadas, situadas en el tercio central, mientras que prácticamente todas las otras cadenas laterales están dirigidas hacia abajo del plano de la horquilla (Fig. 1). Este ordenamiento que normalmente excluye agua, aporta a la estabilidad termodinámica del sistema completo, a través del término entrópico que tiene en cuenta los diferentes estados microscópicos de las moléculas de solvente. De hecho, esta ganancia de entropía en el solvente, es lo que comúnmente se expresa a través de interacciones hidrofóbicas, en este caso, entre las cadenas laterales de los residuos que constituyen el cluster hidrofóbico.

Figura 1: Representaciones química, estructural y esquemática de la horquilla beta en estudio, perteneciente a la proteína G de *Streptococcus* (código PDB (1): 2gb1). Figura tomada de Muñoz et al (2).



En estos estudios sobre estabilidad, se han realizado también análisis cinéticos relativos al camino de plegamiento de la horquilla. Sin embargo no hay acuerdo en la literatura sobre el mecanismo dominante, tal que la comprensión de dicho mecanismo es una cuestión aún abierta. Algunos trabajos indican que, en un primer momento, tendría lugar la consolidación de este cluster hidrofóbico, y en segunda instancia, se conformarían los enlaces de hidrógeno intracatenarios de la horquilla (Fig. 1), para conformar así la estructura termodinámica más estable. Estos resultados fueron obtenidos utilizando métodos mixtos de Dinámica molecular y Monte Carlo (5) en presencia explícita de agua. Otro trabajo, en cambio, plantea el caso inverso: en un primer momento ocurriría la formación de los puentes de hidrógeno desde el quiebre de la horquilla, lo que acercaría las cadenas laterales hidrofóbicas e induciría la formación del cluster hidrofóbico. Estos resultados fueron obtenidos a partir de un modelo termodinámico estadístico (2). Finalmente, otros estudios señalan un proceso mixto, donde en un principio se formaría un cluster hidrofóbico parcial (diferente según cada estudio), seguido del cierre en "cremallera" hacia los extremos por formación de los puentes de hidrógeno, y luego, un establecimiento definitivo de las interacciones hidrofóbicas del cluster otorgarían la estabilidad final. Estos resultados fueron obtenidos a través de cálculos Monte Carlo (6) y de Dinámica Molecular (7), ambos simulando el solvente en forma implícita; así como, resultados de Dinámica Molecular en presencia de solvente explícito (8).

Objetivos

El presente trabajo se propone contribuir al conocimiento ya acumulado sobre este sistema, a través de examinar la estabilidad del cluster hidrofóbico a partir de la estructura nativa, en presencia de solvente explícito e incluyendo el análisis de una mutación específica a fin de comparar resultados con un cluster aún más hidrofóbico.

Método de cálculo

En nuestro trabajo hemos considerado el péptido formado por los 16 residuos de la horquilla beta, con terminadores acetilo (Ace) y N-metilamida (Nme)

en sus terminales N y C respectivamente. Las simulaciones se llevaron a cabo con el método de Metropolis Monte Carlo (MC)(9). Se trabajó a una temperatura de simulación constante de 300 K y se especificó un porcentaje de aceptación del orden del 50 %, que determina una movilidad máxima por átomo de $\delta_{\max} = 0,05 \text{ \AA}$. Las simulaciones se extendieron en 10^6 pasos de MC y se colectaron datos cada $2 \cdot 10^3$ pasos. Al final de cada simulación se efectuó una optimización de geometría (con el método de gradientes conjugados) a fin de encontrar la geometría del mínimo local más cercano al último paso de la simulación. Para el cálculo de la energía total de la molécula, se trabajó con el Campo de Fuerzas AMBER (10). En cada caso se analizaron la energía total de la molécula y tres distancias representativas de las interacciones hidrofóbicas efectivas entre cadenas laterales, durante la evolución la simulación y en la estructura final optimizada (Fig. 2A y 2B).

Los átomos seleccionados para representar estas distancias están indicados en la Fig. 2B. Estas distancias son representativas de la separación entre las cadenas laterales que forman el cluster hidrofóbico. En condiciones nativas estas distancias son: $d1 = 4,00 \text{ \AA}$, $d2 = 5,95 \text{ \AA}$ y $d3 = 4,38 \text{ \AA}$. Analizando la variación de estas distancias, tanto durante la simulación como en la estructura final optimizada, podemos analizar la estabilidad del cluster hidrofóbico. Todas las experiencias se ejecutaron con el programa HyperChem, versión 6.03.

Resultados y Discusión

Sistema horquilla beta en vacío

A fin de comprender en qué medida la estabilidad de la horquilla depende del solvente o de su propia estructura interna, realizamos una primera simulación en vacío, permitiendo que toda la estructura se modifique durante el proceso. La Fig. 3 muestra los resultados de la simulación a 300 K para 10^6 pasos de MC.

Se observa que las distancias $d1$ y $d3$ muestran pequeñas variaciones, conservándose estables en el último tramo de la simulación. La distancia de interacción hidrofóbica que se modificó de manera relevante fue $d2$, que aparece como no estabilizada aún. Un promedio del último tercio de la simulación

Figura 2: Representación esquemática (A) y estructural (B) de la horquilla beta nativa y de las distancias que se analizan en este estudio. Las distancias nativas son: $d_1 = 4,00 \text{ \AA}$, $d_2 = 5,95 \text{ \AA}$ y $d_3 = 4,38 \text{ \AA}$.

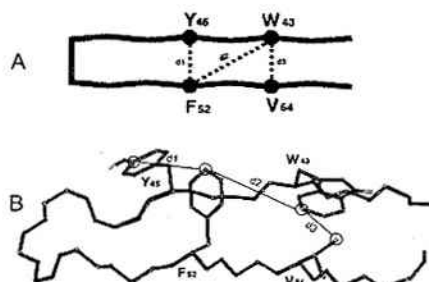
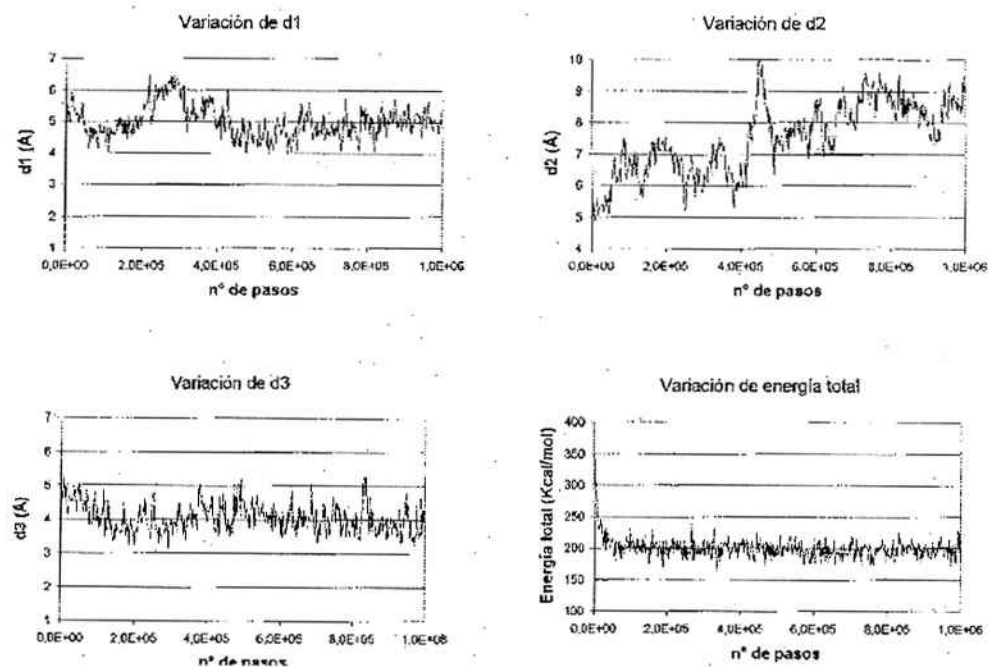


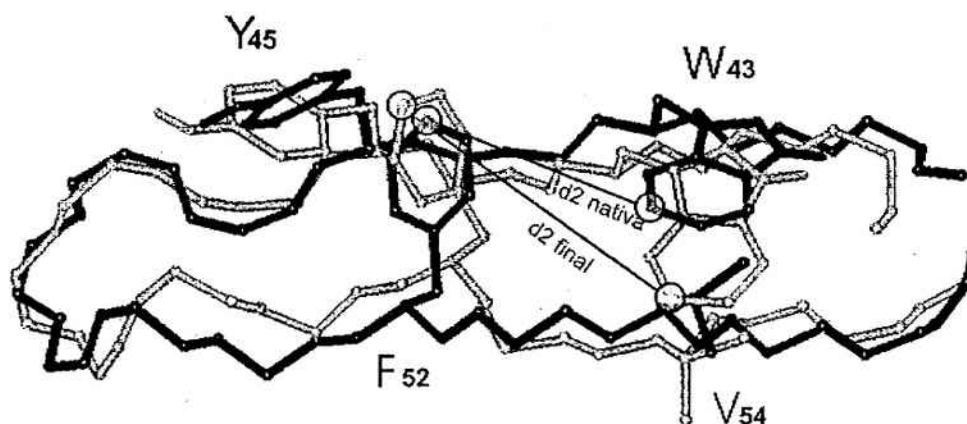
Figura 3: Variación de d_1 , d_2 , d_3 y energía total respecto de los pasos de MC, para la simulación en vacío, donde se permite movilidad a la estructura completa. Los gráficos de d_1 , d_2 y d_3 se dan en la misma escala, para facilitar la comparación visual.



da un valor de 8,57 Å, que se debe comparar con el valor nativo de 5,95 Å. El valor de d_2 luego de la optimización de geometría fue de 8,19 Å, lo que representa un aumento del 37,6% respecto a la distancia nativa. Los valores de d_1 y d_3 luego de la optimización de geometría fueron 4,73 Å y 4,00 Å., respectivamente. Estas variaciones significan para d_1 , un incremento del 18,2% respecto de su valor nativo y para d_3 , una disminución del 8,7% respecto

a su valor nativo. En la Fig. 3 también se observa que la energía total promedio se estabiliza rápidamente después de los primeros pasos de la simulación. Al efectuarse la optimización de geometría, la nueva estructura baja considerablemente su energía, pero mantiene las distancias d_1 , d_2 y d_3 con muy poca variación. La Fig. 4 muestra una superposición entre la horquilla nativa y la estructura final obtenida por optimización de geometría luego de la simulación.

Figura 4: Superposición de la estructura nativa de la horquilla beta (de color negro), con el resultado de la simulación en vacío y su posterior optimización de geometría, donde se permitió movilidad a la estructura completa (de color gris). Solo se muestran los esqueletos y las cuatro cadenas laterales del cluster hidrofóbico. La superposición se obtuvo minimizando la distancia RMS entre todos los átomos del esqueleto de ambas horquillas. Se indica la distancia d_2 para el caso de la estructura nativa (d_2 nativa) y para la estructura final optimizada (d_2 final). Los átomos a partir de los cuales se define d_2 , nativa y final, están encerrados con un círculo.



Esta figura muestra que la estructura nativa no se mantiene estable durante la simulación. Se observa una variación del esqueleto, aunque sin pérdida de la estructura de horquilla beta. La distancia raíz cuadrática media (RMS) en la superposición de la Fig. 4, calculada sobre todos los átomos del esqueleto, es de solo 1,1 Å. Más interesante aún, durante los 10⁶ pasos de simulación y en la estructura final optimizada, la horquilla beta mantiene el patrón de enlaces de hidrógeno intracatenarios mostrados en la Fig. 1 para la horquilla nativa, resultado obtenido a través del análisis con el criterio de Kabsch y Sander (11). El mantenimiento de la estructura de horquilla beta fue además confirmado a través del seguimien-

to de cuatro distancias seleccionadas, que van desde átomos de carbono alfa de una rama del esqueleto de la horquilla hasta átomos de carbono alfa de la otra rama. No hubo variación significativa en ninguna de estas cuatro distancias, confirmando que la estructura de horquilla se mantiene. Por otra parte, en lo que respecta a las cadenas laterales que conforman el cluster, la Fig. 4 muestra que el triptofano (W43) y la valina (V54) desplazaron sus cadenas laterales en la misma dirección, tal que la distancia d_3 entre ellos fue la que mostró menor variación. En cambio, la tirosina (Y45) y la fenilalanina (F52) muestran una rotación en sus cadenas laterales tal que la distancia d_1 entre ellas varió en 18,2%. Sin embar-

go, la distancia d_2 fue la que mostró mayor variación (37,6 %, véase Fig. 3) y en la Fig. 4 se aprecia que esta variación es fundamentalmente debida al desplazamiento del grupo cadena lateral W43-cadena lateral V54 y en menor medida a la rotación de la cadena lateral de F52. Estos resultados sugieren una tendencia según la cual, de las cuatro cadenas laterales involucradas en el cluster, dos quedarían agrupadas por un lado y dos por el otro. Esta desestabilización de la estructura que conduce al desarme, por lo menos parcial, del cluster hidrofóbico era un resultado esperable, ya que en ausencia de solvente acuoso, deja de contribuir a la estabilidad termodinámica la ganancia de energía libre por incremento de la entropía del solvente. Sin embargo, lo que no era un resultado esperable es el mantenimiento del patrón de enlaces de hidrógeno a $T = 300$ K. No hay ninguna razón a priori para que los mismos se mantengan aún en vacío. Este resultado nos permite inferir que los enlaces de hidrógeno contribuirían a la estabilidad de la horquilla beta quizás en mayor medida que el cluster hidrofóbico. Aunque este resultado debiera confirmarse con una simulación que incluya solvente, donde se permita movilidad al sistema completo; esto es, permitir el movimiento simultáneo de todos los átomos de la horquilla y de las moléculas de solvente. Este cálculo se encuentra mas allá de nuestras capacidades computacionales, por lo que haremos algunas aproximaciones a fin de incluir al solvente en forma explícita.

Dada la escasa variación del esqueleto y el mantenimiento del patrón de enlaces de hidrógeno durante la simulación y en la estructura optimizada, podemos pensar que, para nuestro propósito de analizar la estabilidad del cluster hidrofóbico, sería relevante permitir solamente la evolución de las cadenas laterales que forman dicho cluster y dejar "congelado" el esqueleto durante la simulación. Repetimos entonces, la simulación en vacío, pero permitiendo movilidad solamente a las cuatro cadenas laterales de los residuos Y45, W43, F52 y V54 (que forman el cluster hidrofóbico), y dejando fijo el resto de la estructura (esto es, el esqueleto peptídico y el resto de las cadenas laterales no involucradas en la formación del cluster). Los resultados después de la optimización de geometría fueron similares a los de la simulación anterior, dando una figura de superposición que solamente acentúa un poco más los des-

plazamientos según las mismas tendencias obtenidas anteriormente. Este resultado confirma que sería efectivamente innecesario, a los fines de analizar la estabilidad del cluster hidrofóbico, considerar variaciones en los átomos del esqueleto peptídico. Además, nos permitirá realizar otras simulaciones que de otra forma serían computacionalmente prohibitivas. Por lo tanto, en las simulaciones que siguen, solamente se permitirá movilidad en los átomos de las cadenas laterales del cluster hidrofóbico.

Sistema horquilla beta nativa en solvente acuoso

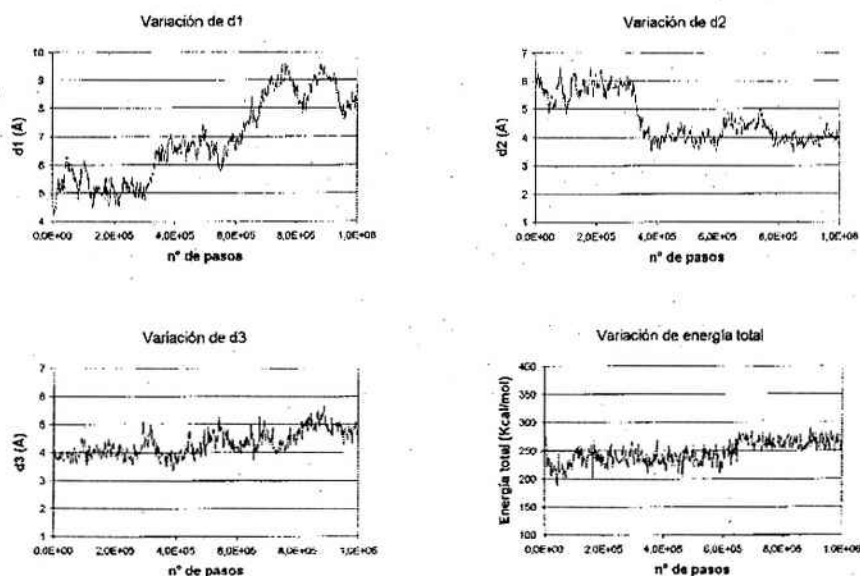
Para analizar la estabilidad del cluster hidrofóbico en presencia de solvente, se han hecho simulaciones en presencia de moléculas explícitas de agua, permitiendo movilidad a las cadenas laterales que definen el cluster, así como a una porción del solvente. Por razones computacionales, se diseñó un modelo de solvente explícito que consta de dos semiesferas concéntricas, centradas en el átomo de carbono carbonílico del residuo T44, y de radios tales que, aunque no encierran a la horquilla completa, sí encierran al cluster hidrofóbico en forma completa. La semiesfera interna (o de reacción) está constituida por un grupo de moléculas de agua móviles (sometidas a la simulación completa) y la externa (o zona de reservorio) por un grupo de moléculas de agua fijas. La semiesfera interior puede considerarse como la porción de la esfera del mismo radio, truncada en el plano de la horquilla y conformada por 50 moléculas de agua alrededor de las cadenas laterales de los residuos involucrados en el cluster de interés. La zona de reservorio puede considerarse como el cascarón esférico truncado que cubre completamente la semiesfera interior. De esta forma, las 125 moléculas de agua de la zona de reservorio rodean completamente a las 50 moléculas de agua de la zona de reacción, así como al cluster hidrofóbico. Resumiendo, las simulaciones MC se realizan sobre las cuatro cadenas laterales y todas las aguas de la semiesfera interior. El resto de la horquilla beta, así como las moléculas de agua de la semiesfera exterior, permanecen fijos durante la simulación. Todas las moléculas de agua utilizadas corresponden al modelo de agua TIP3P (12).

Se analizó a continuación, la estabilidad del cluster hidrofóbico en presencia de nuestro modelo de

solvente explícito a partir de la estructura nativa, monitoreando la energía total y las distancias d1, d2 y d3, definidas anteriormente. La Fig. 5 muestra las variaciones de estas cantidades durante la simulación (10^6 pasos a 300 K). La distancia d3 es la que presentó menor variación con respecto a la distancia nativa. Su promedio en el último tramo de la simulación es de 4,61 Å y luego de realizar la optimización de geometría, el valor de d3 quedó establecido en 4,53 Å, lo que significa un incremento de 3,4% respecto al valor nativo. La distancia d2 exhibe una disminución importante respecto de su valor

nativo. En el último tramo de la simulación d2 toma un valor promedio de 3,91 Å y luego de obtener la estructura optimizada, este valor se ubica en 4,11 Å, lo que equivale a una disminución respecto de d2 nativa de 31%. Sin embargo, la mayor variación fue encontrada en la distancia d1. Esta distancia muestra períodos intermedios de estabilización a lo largo de la simulación realizada. Un promedio tomado en el último tramo resulta en 8,67 Å y en la estructura optimizada esta distancia se sitúa en 8,48 Å. Esto significa un aumento del 112 % respecto de la situación nativa.

Figura 5: Variación de d1, d2, d3 y Etot respecto de los pasos de MC, para la simulación en solvente acuoso explícito de la horquilla beta nativa, donde se permitió mover las cadenas laterales del cluster hidrofóbico y las moléculas de agua de la semiesfera interna o de reacción.



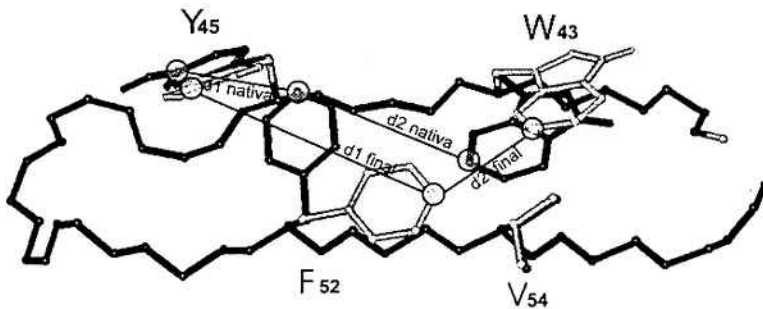
En la Fig. 5 también se observa que luego de un período inicial, la energía total se eleva desde un valor promedio en el tramo central de 237 Kcal/mol hasta un valor de 265 Kcal/mol, promediado en el último tramo. La posterior optimización de geometría produce una importante disminución de la energía total, sin modificarse sustancialmente ninguna de las tres distancias evaluadas. La Fig. 6 muestra

una superposición entre la horquilla nativa y la estructura optimizada posterior a la simulación, donde se observan en detalle los desplazamientos de las cadenas laterales involucradas en el cluster hidrofóbico. Los desplazamientos de las cadenas laterales de W43 y V54 generan la leve variación de la distancia d3. La cadena lateral de Y45 muestra una ligera rotación que altera muy poco (1 Å) la

posición nativa del átomo del anillo a partir del cual se define la distancia d_1 . El desplazamiento más importante que se observa en esta figura es el de la cadena lateral de F52, que ocurre en el sentido de acercarse a las cadenas laterales de W43 y V54, y de alejarse de la cadena lateral de Y45. Este desplazamiento deriva, de acuerdo a la estructura final optimizada, en una disminución apreciable de la distancia d_2 , de un 31%, en simultáneo con un aumento muy significativo de d_1 , en un 112 %. Esta ruptura parcial del cluster hidrofóbico queda evidenciada por la formación de un enlace de hidrógeno entre el gru-

po hidroxilo (que rotó apreciablemente) del residuo Y45 y el oxígeno de una molécula de agua cercana. La disminución de la distancia d_2 , el aumento de la distancia d_1 y la formación de un enlace de hidrógeno de la cadena lateral de Y45 con el solvente, sugieren que el cluster hidrofóbico sufre un ajuste en su constitución, quedando ahora formado básicamente por las cadenas laterales de W43, F52 y V54 y en menor medida por la cadena lateral de Y45 (Fig. 6). La separación de la cadena lateral de Y45 resulta en parte esperable ya que, de los cuatro residuos que constituyen el cluster hidrofóbico, el Y45 es el menos hidrofóbico de todos ellos (13).

Figura 6: Superposición entre la estructura nativa de la horquilla beta (de color negro), con el resultado de la simulación en solvente acuoso explícito y su posterior optimización de geometría (de color gris). Se partió de la estructura nativa y se permitió la movilidad de las cadenas laterales del cluster hidrofóbico y de las moléculas de agua de la semiesfera interna. Se indican las distancias d_1 y d_2 para el caso de la estructura nativa (d_1 nativa y d_2 nativa) y para la estructura final optimizada (d_1 final y d_2 final). Los átomos a partir de los cuales se definen d_1 y d_2 , nativo y final, están encerrados con un círculo. El solvente ha sido eliminado de la imagen para mejorar la comparación visual. Los puntos de coincidencia elegidos para la superposición fueron todos los átomos del esqueleto.



Para comparar estos resultados con los obtenidos anteriormente, recordemos que en la simulación realizada en vacío, el cluster hidrofóbico resultó inestable. La presente simulación reveló también cierta inestabilidad aún cuando se llevó a cabo en condiciones de solvente acuoso explícito. Dicha inestabilidad se pone de manifiesto en el desplazamiento de la cadena lateral de F52 que, por una parte se acerca a las cadenas laterales de W43 y V54 reforzando el cluster hidrofóbico, pero por otra deja muy alejada a la cadena lateral de Y45, debilitando, en este sentido, dicho cluster. La evidente inestabilidad

estructural del cluster hidrofóbico aún en presencia de solvente explícito nos permite inferir nuevamente que, si estudiáramos el proceso de plegamiento, la formación del cluster hidrofóbico sería la contribución final a la estabilidad de la horquilla beta.

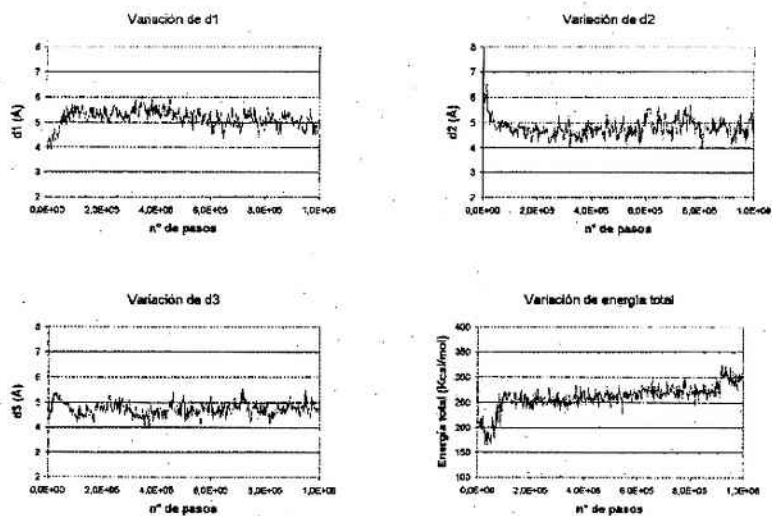
Sistema horquilla beta mutante en solvente acuoso

A los efectos de reforzar la estabilidad del cluster hidrofóbico en presencia explícita de agua, proponemos mutar el residuo menos hidrofóbico (Y45) por un residuo de fenilalanina (que indicaremos como F45) de carácter netamente hidrofóbico y

estructuralmente similar a la tirosina (13). La cadena lateral de F45 se ubicó con la misma orientación que el residuo nativo Y45. Se analizó la estabilidad de esta variante del cluster hidrofóbico, a través de

las distancias d_1 , d_2 y d_3 , cuyas definiciones no se alteran por la mutación (Fig. 2B). La Fig. 7 ilustra los resultados de la simulación a 300 K durante los 10^6 pasos de MC.

Figura 7: Variación de d_1 , d_2 , d_3 y E_{tot} respecto de los pasos de MC, para la simulación en solvente acuoso explícito de la horquilla beta mutada (F en lugar de Y45), donde se permitió movilidad a las cadenas laterales del cluster hidrofóbico y a las moléculas de agua de la semiesfera interna o de reacción.

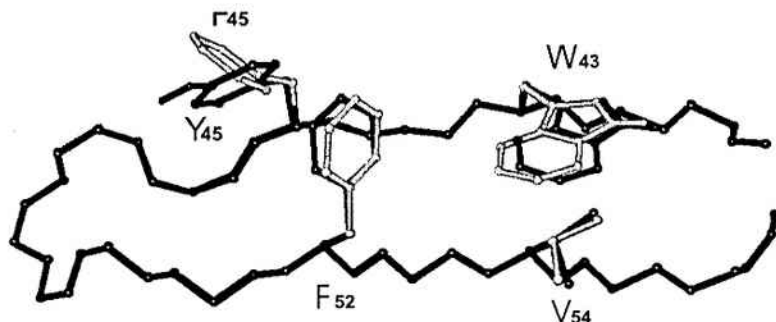


Se observa que, en general, las distancias no sufren grandes cambios. La distancia d_1 tiene un valor promedio en el último tramo de la simulación de 5,06 Å que, luego de realizar la optimización de geometría, se fija en 5,11 Å, lo que significa un incremento del 28,7% respecto de su valor nativo. d_2 promedia en el último tramo un valor de 4,78 Å que, para la estructura optimizada termina en 5,04 Å, esto es, una disminución del 15 % respecto de su valor nativo. La distancia que menos se modificó fue d_3 : su promedio en el último tramo de la simulación fue de 4,74 Å, valor que asciende a 4,85 Å después de la optimización, lo que significa un incremento del 10% respecto de su valor nativo. También se observa en la Fig. 7 que, luego de un período inicial, el valor promedio en la región central de la energía total es de 264 Kcal/mol, aunque al final de la simulación, este valor crece hasta 300 Kcal/mol. La estructura

optimizada muestra una importante disminución en la energía total, aunque este cambio no es acompañado por cambios en las distancias d_1 , d_2 y/o d_3 , respecto de las promediadas al terminar la simulación. La Fig. 8 muestra la superposición de la horquilla beta nativa con el resultado de la estructura optimizada posterior a la simulación.

Se observa que la variación de d_1 responde principalmente a la rotación del anillo bencénico de la cadena lateral de F45 (mutación) y, en menor medida, a la rotación del anillo de la cadena lateral de F52, mientras que la variación de d_2 está generada por una ligera aproximación de la cadena lateral de W43 sobre la cadena lateral de F52. El aumento de d_1 en un 28,7% no implica una separación de la cadena lateral de F45 (mutante) hacia afuera del cluster hidrofóbico. Su cadena lateral simplemente rota produciendo el aumento en d_1 . De hecho, podía espe-

Figura 8: Superposición entre la estructura nativa de la horquilla beta (de color negro), con el resultado de la simulación en solvente acuoso explícito y su posterior optimización de geometría, donde se partió de la estructura mutada y se permitió la movilidad de las cadenas laterales del cluster hidrofóbico y de las moléculas de agua de la semiesfera interna (de color gris). El solvente ha sido eliminado de la imagen para mejorar la comparación visual. Los puntos de coincidencia elegidos para la superposición fueron todos los átomos del esqueleto.



rarse una rotación de este anillo ya que, al no formar enlaces de hidrógeno con el agua, tendría mayor libertad para reubicar su posición en el cluster. Estos resultados muestran que, básicamente, el cluster hidrofóbico mutado se conserva respecto del nativo. En la simulación en solvente acuoso donde se partió de la estructura nativa y se movieron solo las cadenas laterales del cluster hidrofóbico (Figs. 5 y 6) los resultados mostraron una ruptura parcial del cluster, evidenciada por la separación entre las cadenas laterales de Y45 y de F52, y por la formación de un enlace de hidrógeno entre la cadena lateral de Y45 y una molécula de agua cercana. Al comparar la Fig. 8 (horquilla con cluster mutante) con la Fig. 6 (horquilla con cluster nativo) se puede observar que la diferencia más significativa está en la posición final adoptada por la cadena lateral de F52. En la horquilla con cluster nativo, esta última termina formando un cluster hidrofóbico con W43 y V54. Mientras que en la horquilla con cluster mutado, queda reforzada la formación del cluster por los cuatro residuos originales. Si bien los resultados que obtuvimos dependen ciertamente del modelo de solvente elegido y de las movilidades permitidas en la simulación, creemos que expresan una tendencia correcta. Esto es, la mayor hidrofobicidad del residuo mutante (respecto del residuo nativo) determina una mayor estabilidad del cluster hidrofóbico que la obtenida aún con los residuos nativos. Este resultado nos permite inferir

que la mutación analizada en la horquilla beta podría ser estable en la naturaleza. Esto era en parte esperable, tal como también se infiere de los valores de la matriz de probabilidad de mutación PAM1 (9).

Conclusiones

A través de simulaciones con el método de Monte Carlo en 10^6 pasos y a 300 K, realizadas en vacío y con solvente explícito, se exploró el espacio conformacional de la estructura de la segunda horquilla beta de la proteína G, enfatizando el análisis en la estabilidad del cluster hidrofóbico formado por las cadenas laterales de los residuos Y45, W43, F52 y V54.

En la simulación en vacío donde se permitió movilidad a la estructura completa se observó que el patrón de enlaces de hidrógeno intracatenarios no se alteró respecto a la horquilla nativa, mientras que el cluster hidrofóbico experimentó variaciones que tendían a debilitarlo. Cuando se agregó solvente explícito y se "congeló" el esqueleto peptídico (así como el resto de las cadenas laterales no involucradas en el cluster) también se observó un debilitamiento del cluster hidrofóbico al quedar separada la cadena lateral de Y45 del resto de las cadenas laterales y simultáneamente un refuerzo de dicho cluster al disminuir las distancias entre las cadenas laterales de F52, W43 y V54. La simulación del mutante en sol-

vente explícito reveló una mayor conservación del cluster hidrofóbico mutado respecto del cluster hidrofóbico nativo.

Los resultados de las simulaciones del sistema nativo demuestran una manifiesta inestabilidad del cluster hidrofóbico nativo, aún en condiciones de solvente acuoso explícito. Tal inestabilidad permite pensar que, si se estudiara el proceso de plegamiento, la formación del cluster podría no constituir la barrera energética principal en camino de la consolidación de la estructura secundaria de la horquilla beta. Por otra parte, la conservación del patrón de enlaces de hidrógeno intracatenarios, en la simulación en vacío pero donde se permitió movilidad a todos los átomos de la horquilla, sugiere también que serían ellos los responsables primarios de la estabilidad de la horquilla. Dicha estabilidad se vería incrementada por la formación adicional del cluster hidrofóbico. De esta forma, nuestros resultados apoyan las conclusiones de la Ref. 2, en lo que respecta a las contribuciones relativas de los factores que afectan a la estabilidad final de la horquilla.

Además, la mayor estabilidad estructural del cluster hidrofóbico mutado y su tendencia a conservar la posición de las cadenas laterales según la orientación del cluster nativo, demuestra que en la naturaleza, una mutación de este tipo podría ocurrir, aparentemente sin pérdida de la estructura secundaria (y quizás de la funcionalidad) de la horquilla analizada.

Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado con fondos del proyecto CAI+D 19-131/02 de la UNL.

Bibliografía

1. PDB. Protein Data Bank (www.rcsb.org)
2. Muñoz, V.; Henry, E.R.; Hofrichter, J.; Eaton, W.A., 1998. A Statistical Mechanical Model for β -hairpin Kinetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5872-5879.
3. Blanco, F.G. et al, 1993. NMR Evidence for a Short Linear Peptide that Folds into a β -hairpin in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 5887-5888.
4. Blanco, F.G.; Rivas, G.; Serrano, L., 1994. A Short Linear Peptide that Folds into a β -hairpin in Aqueous Solution. *Nature Struct. Biol.* **1**, 584-590.

5. García, A.E.; Sanbonmatsu, K.Y., 2001. Exploring the Energy Landscape of a β -hairpin in Explicit Solvent. *PROTEINS: Structure, Functions, and Genetics* **42**, 345-354.
6. Dinner, A.R.; Lazaridis, T.; Karplus, M., 1999. Understanding β -hairpin Formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9068-9073.
7. Zagrovic, B.; Sorin, E.J.; Pande, V., 2001. β -hairpin Folding Simulations in Atomistic Detail Using an Implicit Solvent Model. *J. Mol. Biol.* **313**, 151-169.
8. Pande, V.J.; Rokhsar, D.S., 1999. Molecular Dynamics Simulations of Unfolding and Refolding of a β -hairpin Fragment of Protein G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9062-9067.
9. Leach, A., 2001. "Molecular Modelling. Principles and Applications, 2nd edition". Prentice Hall (USA).
10. Cornell, W.D.; Cieplak, P.; Bayly, C.I.; Gould, I.R.; Merz, K.M.; Ferguson, D.M.; Spellmeyer, D.C.; Fox, T.; Caldwell, J.W.; Kollman, P.A., 1995. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 5179-5197.
11. Kabsch, W.; Sander, C., 1983. Dictionary of Protein Structure: Pattern Recognition of Hydrogen-Bonded and Geometrical Features. *Biopolymers* **22**, 2577-2637.
12. Jorgensen, W.L.; Chandrosskhar, J.; Madura, J.D.; Impey, R.W.; Klein, M.L., 1983. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **79**, 926-935.
13. Fersht, A., 1999. "Structure and Mechanism in Protein Science". W.H. Freeman and Co (USA), tabla 11.5.