

# Simulaciones con el método de Monte Carlo para estudiar la estabilidad de factores estructurales de una horquilla $\beta$

Nicastro, A.<sup>1</sup>; Sferco, S. J.<sup>1,2</sup>

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:** Se estudió la estabilidad de una horquilla  $\beta$  de la proteína G de estreptococo, a través de simulaciones Monte Carlo en vacío y usando AMBER96. Estos resultados, en conjunto con los de trabajos anteriores, sugieren que los enlaces de H intracatenarios de la horquilla  $\beta$  son más estables que su cluster hidrofóbico, e indican que el primer elemento en formarse en el proceso de plegamiento sería el patrón de enlaces de H mientras que el cluster hidrofóbico se formaría tardíamente, aportando de manera complementaria a la estabilidad del sistema. De los resultados de una simulación mutando el residuo nativo de Valina por uno de Glicina, se observa que el cluster hidrofóbico se desestabiliza, indicando que el residuo de Valina podría jugar un papel relevante en la estabilidad del mencionado cluster. A partir de la coincidencia cualitativa entre nuestros resultados y los de Yoda *et al.* (2004, Chem. Phys. 307, 269-283), se remarca la importancia de elegir un campo de fuerzas en particular, sobre los resultados de las simulaciones.

**Palabras clave:** horquilla  $\beta$  – cluster hidrofóbico – Monte Carlo – AMBER96

**SUMMARY:** Simulations with the Monte Carlo method to study the stability of structural factors of a  $\beta$ -hairpin. Nicastro, A.; Sferco, S.J.. The stability of a  $\beta$ -hairpin of the streptococcal protein G was studied, performing vacuum simulations with Monte Carlo method and AMBER96 force field. These results together with those of previous works suggest that the interstrand H-bonds of the  $\beta$ -hairpin are more stable than its hydrophobic cluster, and indicate that, if we observe the folding process, the first event could be the interstrand H-bonds formation, while the hydrophobic cluster would contribute in a complementary way to the system stability. From results of a mutant  $\beta$ -hairpin simulation, where the Valine residue was replaced with Glycine one, we observe that the hydrophobic cluster turns unstable, which indicates that the Valine residue could be important in order to stabilize this cluster. The qualitative coincidence between our results and those of Yoda *et al.* (2004, Chem. Phys. 307, 269-283) stresses the importance of the particular force field selected for the calculations, in obtaining simulation results.

**Key words:**  $\beta$ -hairpin – hydrophobic cluster – Monte Carlo – AMBER96

---

## \* Correspondencia:

e-mail: alcides\_nicastro@yahoo.com.ar

## Nota

Parte de los resultados expuestos en este trabajo fueron presentados en:

1. "Estudio de la estabilidad del cluster hidrofóbico de la horquilla  $\beta$  de una proteína utilizando el método de Monte Carlo", A. Nicastro y S.J. Sferco.

Reunión Anual de la Asociación Física Argentina, AFA2004, del 20 al 23 de Septiembre de 2004, Bahía Blanca.

2. "Simulaciones Monte Carlo para analizar la estabilidad del cluster hidrofóbico y del esqueleto peptídico de una horquilla  $\beta$ ", A. Nicastro y S.J. Sferco.

Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica, SAB2004, en Congreso Conjunto de Sociedades Biomédicas, del 16 al 20 de Noviembre de 2004, Mar del Plata.

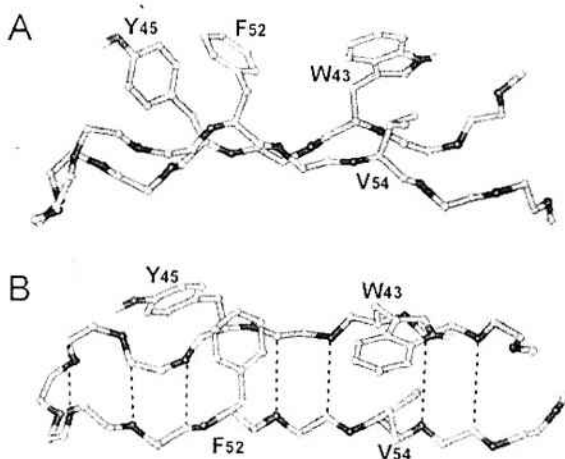
## Introducción

El objeto en estudio de este trabajo es la segunda horquilla  $\beta$  del dominio de unión a Ig, de la proteína G de estreptococo. Esta horquilla está formada por 16 residuos (Fig. 1) y es el extremo C de la proteína G mencionada (56 residuos). Esta horquilla  $\beta$  presenta una característica clave: resulta estable en solución acuosa, aún luego de ser escindida de la proteína original (1). Este mismo trabajo, basado en experiencias de NMR (resonancia magnética nuclear), también revela que los otros dos segmentos de la misma proteína, que forman cada uno estructuras secundarias diferentes (una primera horquilla  $\beta$  y una hélice tipo  $\alpha$ ), no son estables luego de sufrir el mismo proceso de separación de la proteína G. Así, el interés que ha suscitado el análisis de esta segunda horquilla  $\beta$  se relaciona con el estudio de eventos tempranos del plegamiento: la formación de esta horquilla podría ser uno de los primeros pasos en orden de alcanzar la estructura terciaria de la proteína G del estreptococo (1).

Los estudios realizados a posteriori, tanto experimentales como teóricos, han coincidido en que

la estabilidad de la horquilla  $\beta$  estaría dada por la presencia de dos factores estructurales. Ellos son, el patrón de enlaces de H intracatenarios y un cluster hidrofóbico formado por cuatro cadenas laterales (de W43, Y45, F52 y V54) orientadas hacia el mismo lado respecto del plano de la horquilla (Fig. 1). Sin embargo no coinciden en el orden en que estos factores estructurales tendrían lugar en el plegamiento de la horquilla. Muñoz *et al.* (2,3) han encontrado, a través de experiencias de FRET (transferencia de energía resonante por fluorescencia) en combinación con un modelo estadístico, que el proceso de plegamiento de la horquilla  $\beta$  sigue un mecanismo de dos estados, donde en el estado de transición estarían formados los enlaces de H de la región del giro de la horquilla. Bajo este esquema, en el primer momento del plegamiento se formaría el patrón de enlaces de H intracatenarios, mientras que en segunda instancia se formaría el cluster hidrofóbico mencionado. Kobayashi *et al.* (4), por otra parte, demostraron, también usando NMR, que algunas interacciones entre las cadenas laterales de la región del giro son importantes para la estabilidad de la horquilla  $\beta$ .

**Figura 1.** A) Vista lateral de la estructura nativa de la segunda horquilla  $\beta$  de la proteína G de estreptococo (16 residuos). Vista superior de la misma estructura, donde además se esquematizan los enlaces de H intracatenarios en patrón de lámina  $\beta$ . En ambas figuras se muestra únicamente el esqueleto peptídico así como las cadenas laterales que conforman el cluster hidrofóbico (W43, Y45, F52 y V54). La estructura fue tomada de PDB, código: 2gb1.



Existe en la literatura una gran variedad de trabajos teóricos, tendientes a explorar el espacio conformacional de esta molécula, que ejecutan simulaciones con diferentes algoritmos de muestreo, tales como Dinámica Molecular (5-8), Monte Carlo (9-11) y métodos mixtos usando Intercambio de Réplicas (12,13). También se usaron diferentes modelos de solvente implícito (6-9) y modelos de solvente acuoso explícito (5,10-13); así como diferentes conformaciones de partida de las simulaciones: estructura nativa de la horquilla o estructuras desnaturalizadas. Finalmente, estos estudios han utilizado diferentes campos de fuerzas: OPLS (6), OPLS-AA (13), AMBER94 (12), AMBER96 (10,11) y CHARMM19 (5,8). Todas estos trabajos concuerdan con la información experimental, en que se requiere de la presencia de los dos factores estructurales mencionados para dar estabilidad a la horquilla  $\beta$ , pero no concuerdan, ni con los trabajos experimentales ni entre sí, en la secuencia con que estos eventos ocurren en el mecanismo de plegamiento.

Otro punto de discusión es el rol que juega el residuo de Valina (V54, véase Fig. 1) en la estabilidad del cluster hidrofóbico. Kobayashi *et al.* (4) señalan, a través del estudio de mutantes de la horquilla  $\beta$ , que la cadena lateral de V54 no participaría de manera relevante en la conformación de la estructura del mencionado cluster. Resultados de simulaciones hechas por Pande *et al.* (5) acuerdan con este resultado.

En trabajos anteriores hemos realizado simulaciones Monte Carlo de la horquilla  $\beta$ , en condiciones de vacío y de solvente acuoso explícito (10,11). Las simulaciones en vacío se realizaron a 300 K (10) y a 400 K (11) y todas partieron desde la estructura y secuencia nativas de la horquilla. Las simulaciones en solvente acuoso se realizaron a 300 K y partieron, en un caso, desde la estructura nativa (conformación y secuencia), y en otro, desde una estructura mutante donde se reemplazó el residuo nativo de Tirosina por un residuo de Fenilalanina (10). En este trabajo se realizan nuevas simulaciones en vacío con la finalidad de estudiar la estabilidad de los enlaces de H intracatenarios a temperaturas superiores a las ya evaluadas. Asimismo se realiza una simulación en solvente acuoso explícito de una mutante de la horquilla  $\beta$  en la posición de la Valina, a fin de estudiar su importancia en la formación del cluster

hidrofóbico. Finalmente, se realiza una comparación de nuestros resultados con los obtenidos en el reciente trabajo de Yoda *et al.* (14), donde se pone de manifiesto la dependencia de los resultados obtenidos, con el campo de fuerzas utilizado.

### Objetivos

- Estudiar la estabilidad del patrón de enlaces de H de la horquilla  $\beta$ , a través de simulaciones en vacío a altas temperaturas.
- Discutir la importancia del residuo de Valina en la conformación del cluster hidrofóbico.
- Discutir la relevancia que tiene, en los resultados obtenidos, el uso de un campo de fuerzas en particular, comparando nuestros resultados con los obtenidos recientemente por Yoda *et al.* (14).

### Método de cálculo

Con el objeto de eliminar el efecto de la carga en los extremos de la horquilla  $\beta$ , se acoplaron los terminadores Ace y Nme a los extremos N y C respectivamente, quedando definida la secuencia en estudio como: Ace-GEWYDDATKFTVTE-Nme. Las simulaciones se llevaron a cabo con el método de Metropolis Monte Carlo (MC) utilizando el campo de fuerzas AMBER96. Se extendieron en  $10^6$  pasos y se recolectaron datos cada  $2 \times 10^3$  pasos. Se definió una movilidad máxima para los átomos de 0,05 Å, lo que determinó una tasa de aceptación de conformaciones del 50%. Para cada simulación se realizaron optimizaciones de geometría de los últimos  $2 \times 10^4$  pasos y se compararon estas estructuras minimizadas entre sí a través del RMSD (Root Mean Square Distance), concluyendo que básicamente se obtiene la misma estructura optimizada. El resultado que se toma para analizar en cada simulación, es la estructura optimizada final.

Las simulaciones en vacío se realizaron, en un caso, a temperatura constante de 500 K y en otro caso, según un enfriamiento gradual desde 500 K hasta 300 K. La conformación de partida de la simulación a temperatura constante de 500 K fue la estructura nativa (obtenida de PDB, código: 2gb1), mientras que la simulación de enfriamiento desde 500 K a 300 K continuó la simulación de temperatura constante anterior, partiendo desde su resultado. En ambas simulaciones se permitió movilidad a la estructura completa de la horquilla  $\beta$ . Para estudiar la con-

servación de la conformación nativa y del patrón de enlaces de H del péptido, se calculó el RMSD entre la estructura resultante y la estructura nativa y se observó la presencia de los enlaces de H a través del criterio de Kabsch y Sander (15).

La simulación en solvente acuoso explícito se realizó a temperatura constante de 300 K y la estructura de partida fue la conformación nativa de la horquilla  $\beta$  donde se reemplazó el residuo nativo de Valina por un residuo de Glicina. Esta simulación complementa otras realizadas y presentadas en publicaciones anteriores (10,11) donde en todos los casos se permitió movilidad únicamente a las cadenas laterales del cluster hidrofóbico así como a moléculas de agua cercanas a estas cadenas laterales (ver más abajo, modelo de solvente). Esta restricción en la movilidad del esqueleto de la horquilla y de las demás cadenas laterales se fundamenta en los resultados obtenidos en vacío (tanto los que se presentan en este trabajo como los de los trabajos

anteriores (10,11)), que indican que el esqueleto permanece muy estable a 300 K. Las variaciones en el cluster hidrofóbico mutante se estudiaron a través del análisis de distancias entre átomos de las cadenas laterales. En particular, se estudió la distancia entre un átomo de Y45 y un átomo de F52 (d1), cuyo valor nativo es 4,00 Å, y la distancia entre un átomo de F52 y un átomo de W43 (d2), cuyo valor nativo es 5,95 Å. El modelo de solvente acuoso utilizado en esta simulación se muestra en la Fig. 2. Consta de 180 moléculas de agua, distribuidas en una semiesfera interna (o de reacción) de 60 moléculas y una capa (o zona de reservorio) que recubre la semiesfera anterior, de 120 moléculas. Las 60 moléculas de agua pertenecientes a la semiesfera de reacción son las que tienen movilidad, junto con las cadenas laterales del cluster hidrofóbico. Las moléculas de agua del modelo se tomaron de la distribución TIP3P (16).

Todas las simulaciones fueron realizadas con el programa HyperChem 6.03.

**Figura 2:** Modelo semiesférico de 180 moléculas de agua utilizado en este trabajo. La horquilla  $\beta$  se presenta en color oscuro.



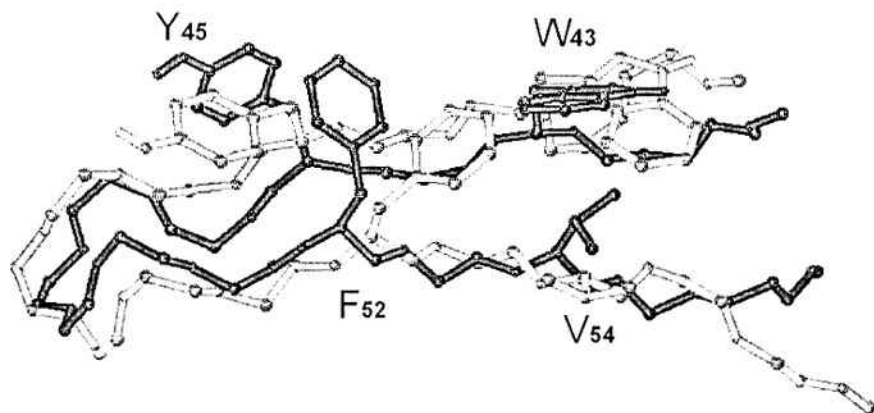
## Resultados y discusión

### Simulaciones en vacío

Con el objeto de poner a prueba la estabilidad de los enlaces de H del esqueleto peptídico de la horquilla  $\beta$ , se realizó una simulación a 500 K en vacío, donde se permitió movilidad a la estructura completa. Esta simulación da continuidad a estudios anteriores, donde se ejecutaron simulaciones en vacío a 300 K (10) y a 400 K (11). La Fig. 3 muestra una superposición entre la estructura de partida (nativa) y el resultado de la simulación, con la posterior optimización de geometría. El valor de RMSD entre

la estructura nativa y el resultado de la simulación en vacío a 500 K es de 2,1 Å. De los siete enlaces de H nativos, los tres más alejados de la región del giro se perdieron a lo largo de los  $10^6$  pasos de MC. Los valores de RMSD para las simulaciones en vacío a 300 K y a 400 K fueron de 1,1 Å (10) y de 1,2 Å (11), respectivamente. La comparación entre estos tres valores de RMSD y la pérdida de tres enlaces de H muestran la importante desestabilización obtenida con esta simulación en vacío a 500 K. No obstante cabe destacar que aún buena parte de la estructura de horquilla  $\beta$  se conserva: la región cercana al giro de la horquilla y el giro mismo parecen ser muy estables.

**Figura 3.** Superposición entre la estructura nativa de la horquilla  $\beta$  (negro) y el resultado de la simulación en vacío a 500 K, con su posterior optimización de geometría (gris). Se partió de la estructura nativa y se permitió movilidad a la estructura completa de la horquilla. Los puntos de coincidencia para superponer las estructuras fueron los átomos del esqueleto.



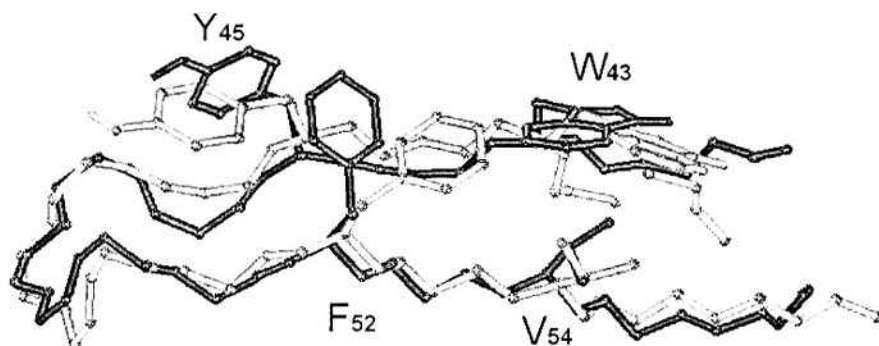
A fin de establecer con mayor detalle la estabilidad de los enlaces de H que se perdieron en la simulación anterior, se realizó una simulación de enfriamiento gradual desde 500 K a 300 K, donde se partió desde la estructura resultante de la simulación a 500 K. Una superposición entre el resultado de esta simulación (con su posterior optimización de geometría) y la estructura nativa se muestra en la Fig. 4. El valor de RMSD entre la estructura nativa y el resultado de la simulación en vacío de enfriamiento

es de 1,8 Å, reflejando, respecto del valor de 2,1 Å del que se partió, una tendencia a recuperar el estado nativo a través del descenso de la temperatura. De los tres enlaces de H perdidos en la simulación a 500 K, dos fueron recuperados. En el momento en que la simulación alcanza los 490 K, el quinto enlace de H (siempre contando desde el giro) empieza a ser recuperado. Con el correr de la simulación se recupera el sexto enlace, quedando sin restablecerse en el resultado final, solo el séptimo enlace de H, el de las puntas de la horquilla.

Las simulaciones anteriores mostraron que a 300 K no se perdía ninguno de los siete enlaces de H nativos (10), mientras que a 400 K se perdía solo uno de ellos (11). De los resultados obtenidos en todas estas simulaciones en vacío (300 K, 400 K, 500 K y enfriamiento gradual desde 500 K a 300 K) es razonable pensar que el patrón de enlaces H de la horquilla

beta resulta muy estable en ausencia de solvente acuoso explícito. Estos resultados difieren de los obtenidos por García *et al.* (12), donde se muestra que el segundo enlace de H contando desde el giro, es poco estable en todo el rango de temperatura estudiado por estos autores (275 K a 525 K). Cabe aclarar, no obstante, que las simulaciones de García *et al.* fueron realizadas en solvente acuoso explícito (12).

**Figura 4.** Superposición entre la estructura nativa de la horquilla  $\beta$  (negro) y el resultado de la simulación en vacío de enfriamiento (500 K a 300 K) con su posterior optimización de geometría (gris). En ambas figuras se muestra únicamente el esqueleto peptídico así como las cadenas laterales que conforman el cluster hidrofóbico (W43, Y45, F52 y V54). La estructura fue tomada de PDB, código: 2gb1.



Los resultados en vacío deben analizarse, sin embargo, a la luz de los resultados de las simulaciones en solvente acuoso realizadas anteriormente (donde se usó el mismo modelo semiesférico aquí descrito) (10). Estos resultados nos habían revelado que el cluster hidrofóbico era inestable. El resultado de una primera simulación cuyo sistema inicial fue la horquilla  $\beta$  nativa mostró que, bajo nuestras condiciones de simulación, el cluster hidrofóbico perdía su conformación nativa, quedando aislada una de las cadenas laterales que conformaban este cluster (10). El resultado de una segunda simulación en la que se reemplazó el residuo nativo de Tirosina por un residuo de Fenilalanina (mucho más hidrofóbico (17) pero estructuralmente similar que el residuo nativo) mostró que al aumentar la hidrofobicidad del cluster, éste mantenía su conformación nativa (10). Estos resultados en solvente acuoso explícito más

los resultados en vacío (tanto de los trabajos citados en las Refs. 10 y 11 como del trabajo actual) indican que a la temperatura de 300 K el patrón de enlaces de H del esqueleto peptídico sería más estable que la estructura nativa del cluster hidrofóbico.

En lo que respecta a las simulaciones en vacío exclusivamente, el cluster hidrofóbico exhibió fluctuaciones crecientes de acuerdo a la temperatura de simulación, aunque en ausencia de solvente acuoso (explícito o implícito) no es esperable que éste conserve su conformación nativa.

#### **Simulación en solvente acuoso: mutante V54/G54**

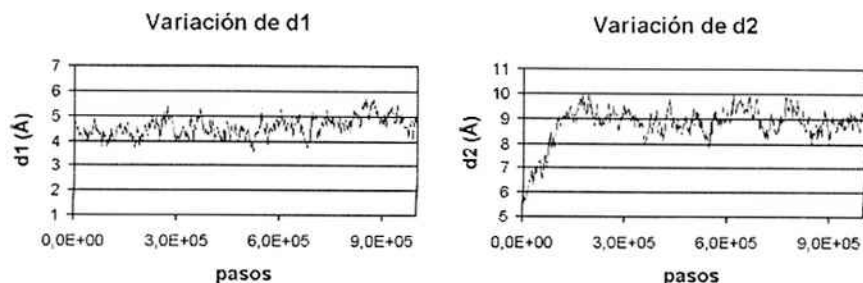
A fin de estudiar la importancia del residuo de Valina en la constitución del cluster hidrofóbico, se realizó una simulación a partir de una estructura mutante de la horquilla  $\beta$ , donde se reemplazó el residuo nativo de Valina por un residuo de Glicina. La



Fig. 5 muestra la evolución de esta simulación. En esta figura se observa que la distancia  $d1$  permanece aproximadamente constante, mientras que la distancia  $d2$  sufre un incremento en el primer cuarto de

la simulación, quedando estable en estos valores superiores a los nativos. Luego de la optimización de geometría,  $d1$  muestra un incremento de 15,25% respecto de su valor nativo, mientras que  $d2$  muestra un incremento de 55,10% respecto de su valor nativo.

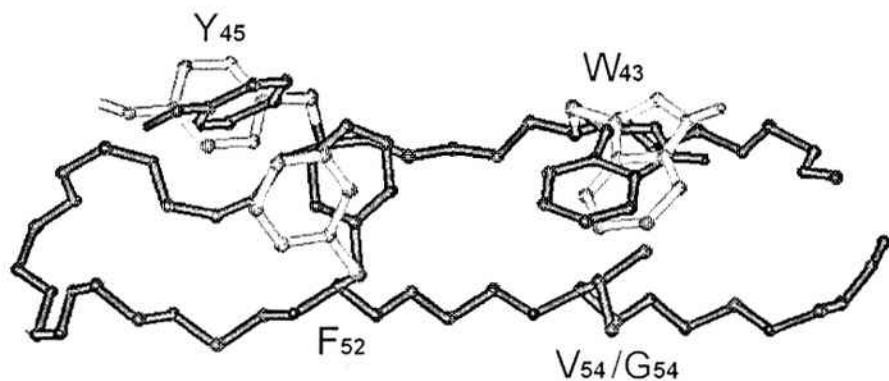
**Figura 5.** Variación de  $d1$  y  $d2$  respecto de los pasos de MC, para la simulación a 300 K de la estructura mutante de la horquilla  $\beta$ , donde se reemplazó el residuo nativo de Valina por un residuo de Glicina y se permitió movilidad solo a las cadenas laterales del cluster hidrofóbico así como a las moléculas de agua de la semiesfera de reacción.



La Fig. 6 muestra la superposición entre el resultado de esta simulación y la estructura nativa. Esta figura muestra que el incremento de  $d2$  calculado anteriormente, de 55,10%, se debe, efectivamente, a un aumento en la separación entre las cadenas laterales

de F52 y W43. Ambas cadenas laterales rotaron apreciablemente a lo largo del enlace  $C\alpha-C\beta$ , en sentido de alejarse una de otra. Esta ruptura parcial del cluster hidrofóbico señala que el residuo de Valina podría jugar un papel importante en la estabilidad del mencionado cluster.

**Figura 6.** Superposición entre la estructura nativa de la horquilla  $\beta$  (negro) y el resultado de la simulación en solvente acuoso explícito con su posterior optimización de geometría (gris). Se partió de la estructura mutante (Glicina en lugar de Valina (nativo)) y se permitió movilidad solo a las cadenas laterales del cluster hidrofóbico así como a las moléculas de agua de la semiesfera de reacción. El solvente ha sido eliminado de la imagen para mejorar la comparación visual. Los puntos de coincidencia para superponer las estructuras fueron los átomos del esqueleto



Nuestra conclusión, sin embargo, contrasta con el resultado obtenido por Kobayashi *et al.* (4), quienes sugieren que la cadena lateral de V54 no tendría importancia en la estabilidad del cluster hidrofóbico. Asimismo, simulaciones de Dinámica Molecular realizadas por Pande *et al.* (5) también sugieren que la cadena lateral de V54 no formaría parte del cluster hidrofóbico consolidado, que colabora a su vez, con la estabilización de la horquilla  $\beta$ . Según nuestros resultados, el residuo de Valina jugaría un rol importante en la estabilización, en acuerdo con los resultados experimentales obtenidos por Muñoz *et al.* (2,3)

### **Discusión y comparación con los resultados obtenidos por Yoda *et al.***

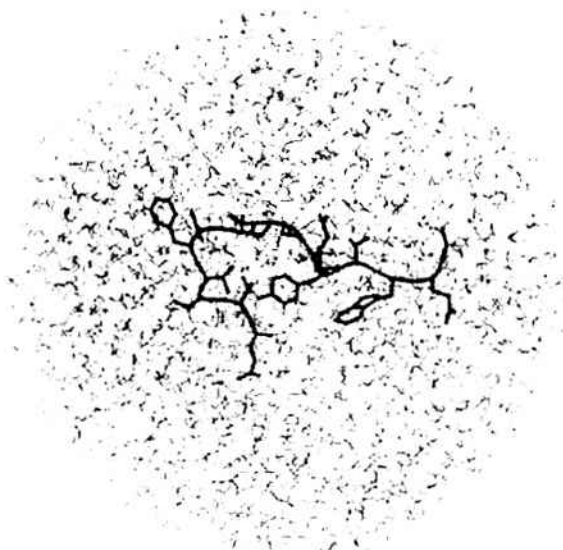
En un trabajo recientemente publicado por Yoda *et al.* (14) se realizaron simulaciones con distintos campos de fuerzas, partiendo de estructuras desnaturalizadas de dos péptidos bien caracterizados experimentalmente: la misma horquilla  $\beta$  estudiada en este trabajo (Fig. 1) y el péptido C de la ribonucleasa A, que se pliega en patrón de hélice  $\alpha$ . Los campos de fuerzas que se utilizaron fueron: AMBER94 (18), AMBER96 (19), AMBER99 (20), CHARMM22 (21), OPLS-AA/L (22,23) y GROMOS96 (24). A posteriori, se compararon estos resultados con las estructuras experimentales de estos péptidos y se observó que los resultados de las simulaciones eran fuertemente dependientes del campo de fuerzas usado. Algunos campos de fuerzas dirigían el plegamiento hacia determinada estructura secundaria mientras que otros lo hacían hacia otra. Los únicos campos de fuerzas capaces de plegar correctamente la horquilla  $\beta$  fueron GROMOS96 y OPLS-AA/L, mientras que los únicos capaces de hacer lo propio con el péptido C fueron AMBER99 y CHARMM22. Así, ninguno de los campos de fuerza estudiados en este trabajo fue capaz de plegar correctamente ambos polipéptidos.

Cuando se comparan ahora, nuestros resultados con los obtenidos por Yoda *et al.*, en lo referente a las simulaciones de la horquilla  $\beta$  usando el campo de fuerzas AMBER96, encontramos un acuerdo cualitativo: para este campo de fuerzas, sus resulta-

dos revelan un plegamiento cuasi-nativo del esqueleto peptídico pero una estructura no nativa del cluster hidrofóbico. No obstante, las únicas coincidencias metodológicas con el trabajo de Yoda *et al.* son el campo de fuerzas utilizado y la fuente de la cual se obtuvieron las moléculas de agua; la distribución TIP3P. Mientras que nosotros hemos usado el método de Metropolis Monte Carlo convencional, Yoda *et al.* han implementado simulaciones de conjunto generalizado usando el método de Intercambio de Réplicas. Nosotros hemos realizado simulaciones con el agregado de terminadores Ace y Nme sobre la secuencia de la horquilla  $\beta$ , mientras que Yoda *et al.* han realizado simulaciones con el péptido en su forma zwitteriónica. Mientras que nuestras simulaciones han comenzado desde la conformación nativa (experimental) de la horquilla, las simulaciones de la Ref. 14 se han realizado partiendo de una estructura desnaturalizada. Nosotros hemos desarrollado un modelo de solvente semiesférico que contiene 180 moléculas de agua en su interior, mientras que el modelo utilizado por Yoda *et al.* es un modelo esférico que contiene 2328 moléculas de agua, tal como se observa en la Fig. 7. Y finalmente, mientras que nuestra estrategia de cálculo consistió en dividir el problema en dos bloques: simulaciones en vacío y simulaciones en solvente acuoso explícito con movilidad solo en las cadenas laterales del cluster hidrofóbico (además de las 60 moléculas de agua de la semiesfera de reacción), las simulaciones de Yoda *et al.* permitieron simultáneamente, movilidad tanto a la estructura completa de la horquilla, como a todo el medio acuoso circundante. Las diferencias en el algoritmo de muestreo del espacio conformacional (Monte Carlo o Intercambio de Réplicas) no debería tener relevancia en el resultado si las simulaciones se extendieran por tiempos suficientemente largos. Las otras diferencias, en cambio, sí podrían afectar significativamente los resultados obtenidos. Sin embargo, a pesar de las diferencias metodológicas mencionadas, nuestros resultados y los obtenidos en el trabajo citado, concuerdan en términos cualitativos.



**Figura 7.** Modelo esférico de solvente acuoso explícito utilizado en las simulaciones de Yoda *et al.*, que contiene 2328 moléculas de agua (14). La horquilla  $\beta$  se presenta en color oscuro.



Cualquier mejora en algunos de los aspectos metodológicos implementados en este trabajo, tendería a las condiciones de simulación del trabajo realizado por Yoda *et al.* Nuestros resultados serían, estimamos, cada vez más cercanos a los expuestos por el trabajo de la Ref. 14, por lo que deberían ser atribuidos esencialmente (aún bajo nuestras condiciones de simulación) al uso del mismo campo de fuerzas.

## Conclusiones

En este trabajo fue estudiada la estabilidad del patrón de enlaces de H de la segunda horquilla  $\beta$  de la proteína G de estreptococo, realizando simulaciones en vacío, con el método de Metropolis Monte Carlo y el campo de fuerzas AMBER96. Los resultados de las simulaciones en vacío que aquí se presentan son complementarios de simulaciones realizadas anteriormente (10, 11) y permiten, en conjunto, realizar inferencias sobre la estabilidad relativa de

dos elementos estructurales de la horquilla  $\beta$ : los enlaces de H del esqueleto peptídico y el cluster hidrofóbico.

De los resultados en vacío (tanto los mostrados en este trabajo como en las simulaciones anteriores (10, 11)) se observa que, para nuestras condiciones de simulación, el esqueleto peptídico de la horquilla  $\beta$  no se altera significativamente respecto de la situación nativa. Los resultados de las simulaciones en solvente acuoso explícito muestran, en cambio, que el cluster hidrofóbico no conforma una estructura estable, pudiendo ser reforzada su estabilidad cuando el residuo menos hidrofóbico (Y45) es reemplazado por un residuo de Fenilalanina. De los resultados en los dos sistemas (vacío y solvente acuoso) puede concluirse que, el patrón de enlaces de hidrógeno intracatenarios sería notoriamente más estable que el cluster hidrofóbico. Si se supone el proceso de plegamiento de esta estructura, como el proceso inverso al de desestabilización, podría pensarse que el primer evento en camino de la forma-

ción de la horquilla  $\beta$  sería la formación del patrón de enlaces de H, quedando el cluster hidrofóbico como un factor de formación posterior y de estabilidad complementaria a la estructura final.

En lo que respecta al estudio del mutante V54/G54, nuestros resultados sugieren que el residuo de Valina jugaría un rol relevante en la estabilización del cluster hidrofóbico, en acuerdo con algunos resultados experimentales.

Finalmente, hemos comparado nuestros resultados con los obtenidos en el trabajo de Yoda *et al.* A pesar de las diferentes metodologías utilizadas entre ambos trabajos, los resultados obtenidos fueron cualitativamente similares, hecho que recalca la importancia del uso del campo de fuerzas AMBER96, respecto del estudio del proceso de plegamiento y de la estabilidad de la horquilla  $\beta$ . Aun usando diferentes algoritmos de muestreo del espacio conformacional (Metropolis Monte Carlo vs. Intercambio de Réplicas), diferentes sistemas de partida (estructura nativa vs. estructura desnaturalizada), diferentes estrategias de simulación (movimiento de átomos específicos vs. movimiento de todos los átomos del sistema) y diferentes modelos de solvente explícito (semiesfera de 180 vs. esfera de 2328 moléculas de agua) los resultados entre ambos trabajos son cualitativamente similares. La razón de esta coincidencia se debe al uso del mismo campo de fuerzas. Así, nuestros resultados enfatizan los resultados obtenidos por Yoda *et al.*, indicando que el particular campo de fuerzas utilizado (en este caso AMBER96) es más determinante en obtener una estructura secundaria en particular (horquilla  $\beta$  en este caso), que cualquiera de los otros aspectos metodológicos. Por ello, aún deben seguir realizándose esfuerzos en trabajos teóricos, para diseñar campos de fuerzas de aplicación más universal. Los campos de fuerzas en uso en la actualidad (entre ellos AMBER96) parecieran favorecer, a priori, el plegamiento de algún tipo de estructura secundaria en particular.

## Agradecimientos

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

## Bibliografía

- 1- Blanco, F.J.; Rivas, G.; Serrano, L., 1994. A short linear peptide that folds into a stable  $\beta$ -hairpin in aqueous solution. *Struct. Biol.* **1**, 584-590.
- 2- Muñoz, V.; Thompson, P.A.; Hofrichter, J.; Eaton, W.A., 1997. Folding dynamics and mechanism of  $\beta$ -hairpin formation. *Nature* **390**, 196-199.
- 3- Muñoz, V.; Henry, E.R.; Hofrichter, J.; Eaton, W.A., 1998. A Statistical Mechanical Model for  $\beta$ -hairpin Kinetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5872-5879.
- 4- Kobayashi, N.; Honda, S.; Yoshii, H.; Munekata, E., 2000. Role of side-chains in the cooperative  $\beta$ -hairpin folding of the short C-terminal fragment derived from Streptococcal protein G. *Biochemistry* **39**, 6564-6571.
- 5- Pande, V.J.; Rokhsar, D.S., 1999. Molecular dynamics simulations of unfolding and refolding of a  $\beta$ -hairpin fragment of protein G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9062-9067.
- 6- Zagrovic, B.; Sorin, E.; Pande, V., 2001.  $\beta$ -hairpin folding simulations in atomistic detail using an implicit solvent model. *J. Mol. Biol.* **313**, 151-169.
- 7- Klimov, D.K.; Thirumalai, D., 2000. Mechanism and kinetics of  $\beta$ -hairpin formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2544-2549.
- 8- Guo, C.; Levine, H.; Kessler, D.A., 2000. How does  $\beta$ -hairpin fold/unfold? Competition between topology and heterogeneity in a solvable model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 10775-10779.
- 9- Dinner, A.R.; Lazaridis, T.; Karplus, M., 1999. Understanding  $\beta$ -hairpin formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9068-9073.
- 10- Nicastro, A.; Sferco, S.J., 2004. Análisis de la estabilidad del cluster hidrofóbico de una horquilla beta usando el método de Monte Carlo. *FABICIB* **8**, 193-203.
- 11- Nicastro, A.; Sferco, S.J., 2004. Estudio de la estabilidad del cluster hidrofóbico de la horquilla beta de una proteína utilizando el método Monte Carlo. *ANALES AFA* **16** (en prensa).
- 12- Garcia, A.E.; Sanbonmatsu, K.Y., 2001. Exploring the Energy Landscape of a  $\beta$ -hairpin in Explicit Solvent. *PROTEINS* **42**, 345-354.
- 13- Zhuo, R.; Berne, B.J.; Germain, R., 2001. The free landscape for  $\beta$ -hairpin folding in explicit water. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 14931-14936.
- 14- Yoda, T.; Sugita, Y.; Okamoto, Y., 2004. Secondary-structure preferences of force fields for proteins evaluated by generalized-ensemble simulations. *Chem. Phys.* **307**, 269-283.
- 15- Kabsch, W.; Sander, C., 1983. Dictionary of protein

structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**, 2577-2637.

**16-** Jorgensen, W.L.; Chandreskhar, 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.

**17-** Fersht, A., 1999. "Structure and mechanism in protein science". W.H. Freeman and Co (USA); 337.

**18-** 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 organics molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 5179-5197.

**19-** Kollman, P.A.; Dixon, R.; Cornell, W.D.; Fox, T.; Chipot, C.; Pohorille, A., 1997. "Computer Simulations of Biomolecular Systems: Theoretical and experimental applications" Elsevier (Amsterdam); 83-96.

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

**21-** MacKerell, A.D. Jr.; Bashford, D.; Bellot, M.; Dumbrack R.L. Jr.; Evanseck, J.D.; Field, M.J.; Fisher, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S.; Joseph-McCarthy, D.; Kuchnir, L.; Kuczera, K.; Lau, F.T.K.; Mattos, C.; Michnick, S.; Ngo, T.; Nguyen, D.T.; Prodhom, B.; Reiher III, W.E.; Roux, B.; Schlenkrich, M.; Smith, J.C.; Stote, R.; Straub, J.; Watanabe, M.; Wiórkiewicz-Kuczera, J.; Yin, D.; Karplus, M., 1998. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B* **102**, 3586-3616.

**22-** Jorgensen, W.L.; Maxwell, D.S.; Tirado-Rives, J., 1996. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetic and properties of organic liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 11225-11236.

**23-** Kaminski, G.A.; Friesner, R.A.; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W.L., 2001. Evaluation and reparametrization of the OPLS-AA force field for proteins via comparison with accurate quantum chemical calculations on peptides. *J. Phys. Chem. B* **105**, 6474-6487.

van Gunsteren, W.F.; Billeter, S.R.; Eising, A.A.; Hünenberger, P.H.; Krüger, P.; Mark, A.E.; Scott, W.R.P.; Tironi, I.G., 1996. "Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide" Vdf Hochschulverlag AG an der ETH Zürich (Zürich).