



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina

**“Estudio *in silico* de los potenciales
electrostáticos en la proteína periplásmica de
Salmonella typhimurium que une lisina,
arginina y ornitina”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

BÁSICA

PRESENTA:

DANIEL ADRIANO SILVA MANZANO

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALEJANDRO SOSA PEINADO

MÉXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mi Madre...

Ha tomado tanto tiempo y han sido tantas las personas involucradas en que este trabajo finalmente llegara a cabo, que dar agradecimientos en algún orden específico y/o por ciertas contribuciones individuales sería infructuoso y ciertamente injusto, pues los eventos se mezclan en mi mente y me es muy difícil contextualizar los distintos sucesos que han ocurrido durante este tiempo. Sin embargo, tengo muy claro que hay tres personas a las que debo agradecer de manera muy especial: mi Madre, Alejandro Sosa y Luis T., ya que sin su apoyo y “fe ciega” es muy probable que este momento (de haber ocurrido) hubiera tardado mucho más tiempo en llegar.

Pero también quiero agradecer a las otras personas. Así que escribiré algunos nombres, y pido de antemano una disculpa para quien se pueda sentir ofendido si olvido mencionarlo, pero tenga la seguridad de que forma parte de las líneas invisibles que se encuentran al final de siguiente párrafo:

Raquel (*alias* La Güera), Rosalba (*alias* Chava), José Manuel, D. Octavio, Alejandro F., Héctor, Álvaro, David, Paco, Yurira, María L., Naima, Karen, Arturo H., Arturo R. (*alias* el Jefe Rojo), Tatiana, Mario C., Georgina, Mariana, Lenin, Luis B., Martín, David B., Meiller, Cinthia, Eduardo, Marcos, Nuria, Blanca (*alias* La Vaquita), José L. T., Razhiel, Daniel P., Omar, Daniel M., Fernando, Mario (mi compadre), Lorena (*alias* Argentina Mentirosa), David T. (*alias* Vito), Marco, Adelaida, Enrique G., J. Pablo, Gabriel, E. Lamoyi, Ileana, Paula, Roberto R., Yazmín, Alejandro A., Consuelo, Pablo R., Bernardo, Sergio, Gilberto, L. Padilla, Tzipe G., Antonio, Valeria, Fabián, Ceceña.

"And then in one unanimous mass they swept along, and in another moment were clinging fast to the magnet on every side. Then the magnet smiled—for the steel filings had no doubt at all but that they were paying that visit of their own free will"

Oscar Wilde.

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABREVIATURAS	3
INTRODUCCIÓN	4
- PERMEASAS Y TRANSPORTADORES ABC	4
- LA PROTEÍNA PERIPLÁSMICA QUE UNE L-LISINA, L-ARGININA Y L-ORNITINA: LAO	6
- LA PROTEÍNA QUE UNE L-HISTIDINA (HisJ) Y SU RELACIÓN CON LAO	11
- QUIMERAS DE LAS PROTEÍNAS HisJ-LAO	12
- LA ENERGÍA ELECTROSTÁTICA Y LA UNIÓN DE LIGANDOS	14
- LA ENERGÍA ELECTROSTÁTICA	15
- PENALIDAD DE LAS INTERACCIONES ELECTROSTÁTICAS POR DESOLVATACIÓN	15
- CÁLCULOS ELECTROSTÁTICOS Y CUERPOS RÍGIDOS	16
- EL DISEÑO DE PROTEÍNAS	18
- EL ALGORITMO ROSETTA PARA EL DISEÑO DE SECUENCIAS	19
- CRITERIOS PARA EL DISEÑO DE PROTEÍNAS	22
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS	24
- OBJETIVOS GENERALES	24
- OBJETIVOS PARTICULARES	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
- ESTRUCTURAS PROTEICAS	25
- CÁLCULOS ELECTROSTÁTICOS	27
- CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES IN SILICO	28
- VISUALIZACIÓN	28
- RECURSOS COMPUTACIONALES	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	30
- EL ESTADO ABIERTO	30
- EL ΔG ELECTROSTÁTICO DE UNIÓN EN EL ESTADO ABIERTO	33
- EL ΔG ELECTROSTÁTICO VS. LA DISTANCIA (EL PROCESO DE DIFUSIÓN)	37
- EL ESTADO CERRADO	42
- LA MUTANTE IN SILICO LTLV	45
CONCLUSIONES	50
- EL POTENCIAL ELECTROSTÁTICO EN LA PROTEÍNA LAO	50
- EL ESTADO ABIERTO, EL ESTADO CERRADO Y EL PROCESO DE DIFUSIÓN	50
- LAO, HisJ Y ROSETTA	52
- LOS POTENCIALES ELECTROSTÁTICOS COMO CRITERIO DE EVALUACIÓN DE DISEÑOS IN-SILICO PARA LA PROTEÍNA LAO	52
APÉNDICE	53
- MÉTODOS CONTINUOS (POISSON-BOLTZMANN) Y CONTRIBUCIONES ELECTROSTÁTICAS A LA AFINIDAD DE UNIÓN .	53
- TABLAS	56
BIBLIOGRAFÍA	59

RESUMEN

En este trabajo se presentan los resultados del estudio *in silico* de las interacciones electrostáticas y sus repercusiones en la unión de los ligandos L-arginina, L-lisina y L-histidina, a la proteína periplásmica de *Salmonella typhimurium* que une lisina, arginina y ornitina (LAO). Estos resultados provienen del cálculo de los mapas de potencial electrostático de esta proteína.

Los datos sugieren que la carga formal de los ligandos debe ser positiva para generar una interacción favorable con LAO y apuntan hacia que esta proteína es capaz de discriminar a los ligandos por el simple hecho de la ausencia de un protón en la cadena lateral. El estudio de la proteína en el estado abierto muestra que la interacción de los ligandos en este estado es muy importante para la afinidad. El estudio de una trayectoria de difusión de los ligandos nos permite proponer que existe un componente de difusión de los ligandos hacia el sitio de unión que es dirigido por la energía electrostática. Asimismo, el estudio del estado cerrado de LAO sugiere que la interacción de los ligandos con éste estado juega principalmente un papel de estabilidad del complejo ligando-proteína.

Basado en estos resultados, se presenta el análisis de algunas posibilidades de diseño del sitio de unión para modificar su afinidad por los distintos ligandos.

ABREVIATURAS

ABC.- Casete de unión a ATP.

HisJ.- Proteína que une histidina (HisJ).

HisQ/HisM/HisP.- Complejo transportador de membrana para LAO e HisJ.

HSD y HSE.- Histidina con carga formal de 0e.

HSP.- Histidina con carga formal de +1e.

K_d.- Constante de disociación.

LAO.- Proteína Periplásmica de *Salmonella typhimurium* que une L-lisina, L-arginina y L-ornitina.

PBP.- Proteína Periplásmica de Unión (bacteriana).

PDB.- Protein Data Bank.

r.m.s.d.- Desviación media de los cuadrados.

INTRODUCCIÓN

La “Proteína Periplásmica de *Salmonella typhimurium* que une L-lisina, L-arginina y L-ornitina” (por sus siglas en inglés LAO), es una proteína de especificidad múltiple que pertenece a la familia de las “proteínas periplásmicas de unión” bacterianas (PBP por sus siglas en inglés), las cuales forman parte del sistema de transporte periplásmico bacteriano (permeasas). Estos sistemas transportan una amplia gama de sustratos como: aminoácidos, péptidos, azúcares, iones y vitaminas^(1,2).

- Permeasas y transportadores ABC

Las permeasas bacterianas están conformadas por una proteína de unión (PBP) que une al sustrato (ligando) y por un complejo membranal, que a su vez está compuesto de dos proteínas integrales de membrana y dos proteínas que hidrolizan ATP⁽³⁾. En estos sistemas, las proteínas periplásmicas de unión generalmente tienen una alta afinidad por el sustrato. Estas proteínas de unión interactúan con el complejo de membrana, desencadenando la activación de un mecanismo de acoplamiento de energía y cambios conformacionales que dan como resultado la translocación del sustrato a través de la membrana (**Figura 1**). Las permeasas periplásmicas obtienen la energía para translocar el sustrato de la hidrólisis del ATP o del GTP. Las proteínas asociadas a la membrana responsables de este tipo de transporte son conocidas como transportadores ABC (ATP Binding Cassete)⁽³⁾.

Las PBP tienen dos funciones: unir el sustrato e interactuar con el complejo de membrana. Se ha observado que estas funciones están localizadas en distintas regiones de la proteína, como se ha demostrado en experimentos de mutagénesis dirigida, en los que se observó que hay regiones que solamente afectan la capacidad de las PBP de interactuar con el complejo de membrana sin afectar la capacidad de unir el ligando y viceversa^(1,4).

En trabajos previos se ha calculado que existe una concentración elevada de las PBP en el periplasma (milimolar) y usualmente se encuentran en exceso molar en comparación con el receptor de membrana (transportador ABC).

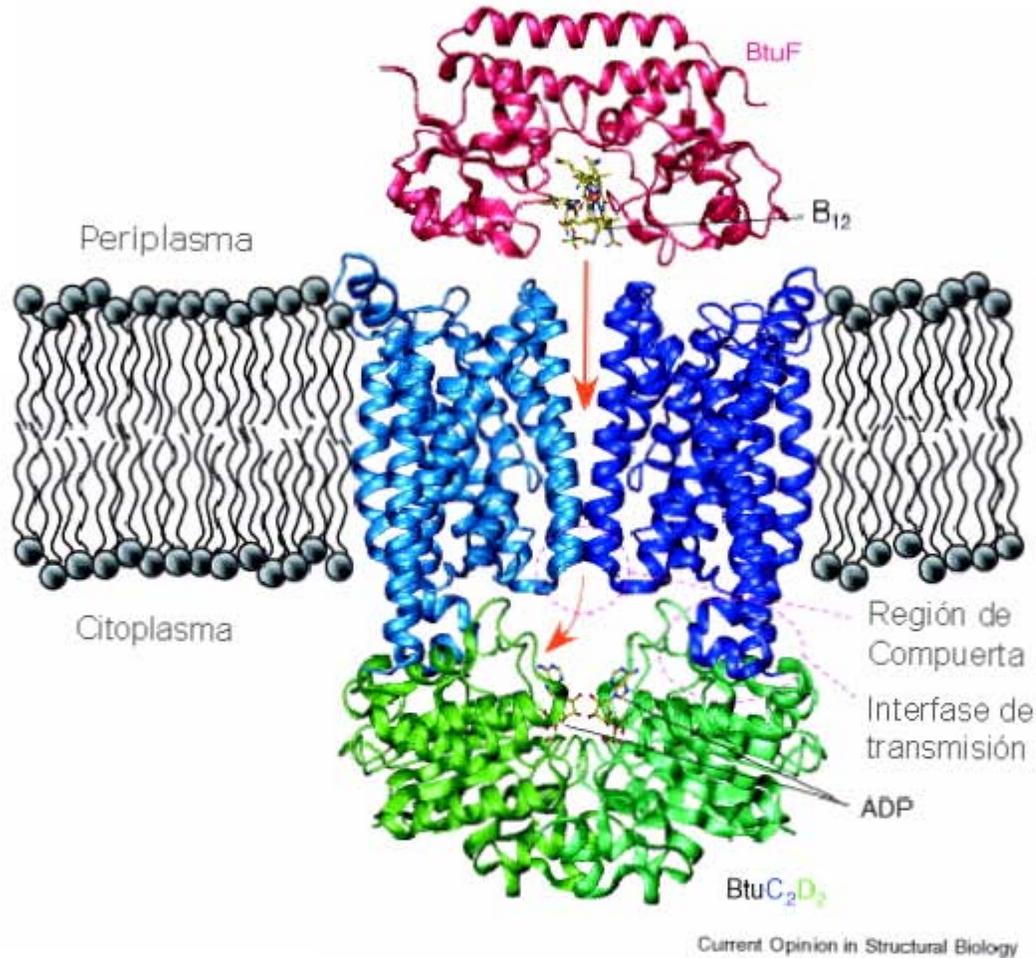


Figura 1. Diagrama de listones que ejemplifica el mecanismo de acción de los transportadores ABC. En este caso el importador de vitamina B₁₂ de *Escherichia coli*. El ligando vitamina B₁₂ se encuentra unido a la proteína periplásmica de unión BtuF y el sustrato hidrolizado (ADP) se encuentra unido al complejo BtuC₂D₂. En el estado libre de nucleótido o el estado con ADP unido, el transportador se encuentra abierto hacia el periplasma pero cerrado hacia el citoplasma por la región de compuerta. Para que el transporte pueda ocurrir, la vitamina B₁₂ es liberada de su sitio de unión, viaja a por el canal de transporte, atraviesa la compuerta y sale a través del espacio que se encuentra entre las proteínas de membrana BtuCD (líneas naranja). (Figura modificada de la referencia 3).

Se conoce la estructura cristalográfica de alrededor de 100 PBP de varios organismos⁽⁵⁾. Aunque en general no se ha encontrado una alta conservación en su estructura primaria, estas proteínas comparten un arquitectura muy similar en su estructura terciaria^(1, 6, 7).

Las PBP tienen una estructura tridimensional que consiste en dos dominios globulares conectados por una región de bisagra. Las PBP pueden adoptar al menos dos conformaciones: una forma libre de ligando (estado abierto) y una forma unida al ligando (estado cerrado). El paso entre un estado y otro está dado por un movimiento relativamente grande de la bisagra que conecta estos dominios^(8, 9).

Se han identificado dos subclases de PBP que difieren en la topología de los dominios⁽¹⁰⁾. La clase I tiene seis hebras- β y la clase II tiene cinco hebras- β en cada uno de los dominios.

Se cree que la capacidad de esta superfamilia de proteínas para unir una gran cantidad de ligandos emerge de dos características: el sitio de unión al ligando se encuentra en la interfase entre los dominios y el gran cambio conformacional mediado por el ligando que ocurre en la proteína. Estas dos características combinan propiedades fisicoquímicas que se consideran deseables: el posicionamiento de los ligandos en sitios que excluyen al solvente y que por lo tanto son regiones de baja constante dieléctrica. Además, el cambio conformacional permite el desarrollo de funciones asociadas a diferentes estados conformacionales. En la ingeniería de proteínas se ha tomado ventaja de estas propiedades de las PBP para diseñar biosensores, elementos de control alostérico, receptores biológicamente activos e inclusive el diseño de enzimas⁽⁵⁾.

- La proteína periplásmica que une L-lisina, L-arginina y L-ornitina: LAO

LAO es una proteína de 238 aminoácidos, con un puente disulfuro entre los residuos 38 y 45, una masa molecular es de 26 kDa y con una absorbencia a 280 nm ($A_{280}^{0.1\%}$) de 0.85⁽¹¹⁾. Su estructura tridimensional se encuentra resuelta a 2.7 Å de resolución⁽¹⁾ (**Figura 2**).

LAO está compuesta por dos lóbulos que se encuentran conectados a través de una bisagra y pertenece a la clase II de las PBP (tiene cinco hebras- β y cuatro hélices- α en cada lóbulo). El dominio A (lóbulo II) contiene 90 residuos del extremo NH_2 -terminal y 48 del extremo COOH -terminal, mientras que el dominio B (lóbulo I) contiene los residuos 91-190. El COOH -terminal está localizado cerca de la bisagra. Todas las hebras- β son paralelas, con excepción de una que es antiparalela en cada lóbulo. Las hélices- α rodean las hojas- β en cada dominio. A diferencia de otras proteínas periplásmicas de unión, LAO sólo tiene dos segmentos de la cadena polipeptídica que forman la bisagra, en lugar de tres, como la mayoría de las PBP. Se piensa que esta diferencia está relacionada con el tamaño de LAO, ya que en general las PBP tienen un tamaño de entre 306-370 residuos y cuentan con un subdominio COOH -terminal que está conectado al resto de la proteína por un tercer segmento polipeptídico.

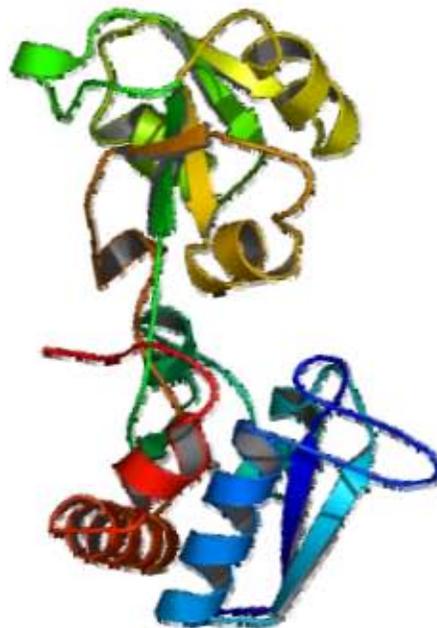


Figura 2. *LAO en el estado abierto.* Representación en listones. En la imagen se aprecia: el lóbulo I que corresponde al dominio superior de la proteína; el lóbulo II correspondiente al dominio inferior de la proteína y la región de bisagra que une a los dominios (pdb 2LAO).

Se conocen cuatro ligandos (todos de alta afinidad) para la LAO: L-lisina, L-arginina, L-ornitina y L-histidina, con constantes de disociación de 15, 14, 30 y 500 nM. respectivamente⁽¹¹⁾. En estudios de competencia, se han probado compuestos similares a estos aminoácidos como: el ácido L-arginínico, L-glutamina, y los enantiómeros en su forma D de los ligandos de alta afinidad. Todos han mostrado ser sustratos de baja afinidad⁽¹¹⁾ (en el orden de concentraciones mM). Esto indica que el reconocimiento del ligando está determinado no sólo por interacciones polares sino también por el tamaño y la forma.

Se han encontrado diferencias en los espectros de absorción en UV entre la proteína en el estado abierto (sin ligando) y el estado cerrado (con ligando). También se han encontrado diferencias en el espectro de absorción de LAO en presencia de los distintos ligandos⁽¹¹⁾. Se ha propuesto que estas diferencias pueden ser explicadas por los distintos estados conformacionales que adopta la proteína al unir a sus ligandos.

Ya que se conocen las estructuras tridimensionales de la proteína unida a los 4 ligandos de alta afinidad, LAO es un excelente modelo para estudiar las bases de la afinidad por ligandos múltiples (**Figura 3**). Estos cuatro ligandos difieren en tamaño y número de átomos, pero comparten la característica de tener carga positiva en ciertos intervalos de pH. Estos intervalos coinciden con los valores de pH a los que la proteína tiene mayor afinidad, sugiriendo una importante contribución electrostática para la unión de los ligandos.

Al comparar las estructuras tridimensionales de LAO con los distintos ligandos se encuentra que, entre cualquier par de estas estructuras, la desviación media de los cuadrados (r.m.s.d.) de las posiciones de los C α entre los residuos 5-235 es menor a 0.18 Å⁽¹²⁾. La superposición de los C α de estas cuatro estructuras muestra que los grupos amino y carboxilo para los cuatro ligandos están posicionados esencialmente en el mismo lugar. Por lo tanto, globalmente la conformación de la proteína LAO es la misma para las cuatro formas ligadas. La superposición también muestra que los

residuos que están involucrados en la unión del ligando no cambian su localización espacial entre las cuatro formas, a excepción de los residuos: Asp-11, Tyr-14, Phe-52, Asp-30, Ser-69, Ser-70, Ser-72, Arg-77, Leu-117, Thr-121 y Asp 161 ^(1,12).

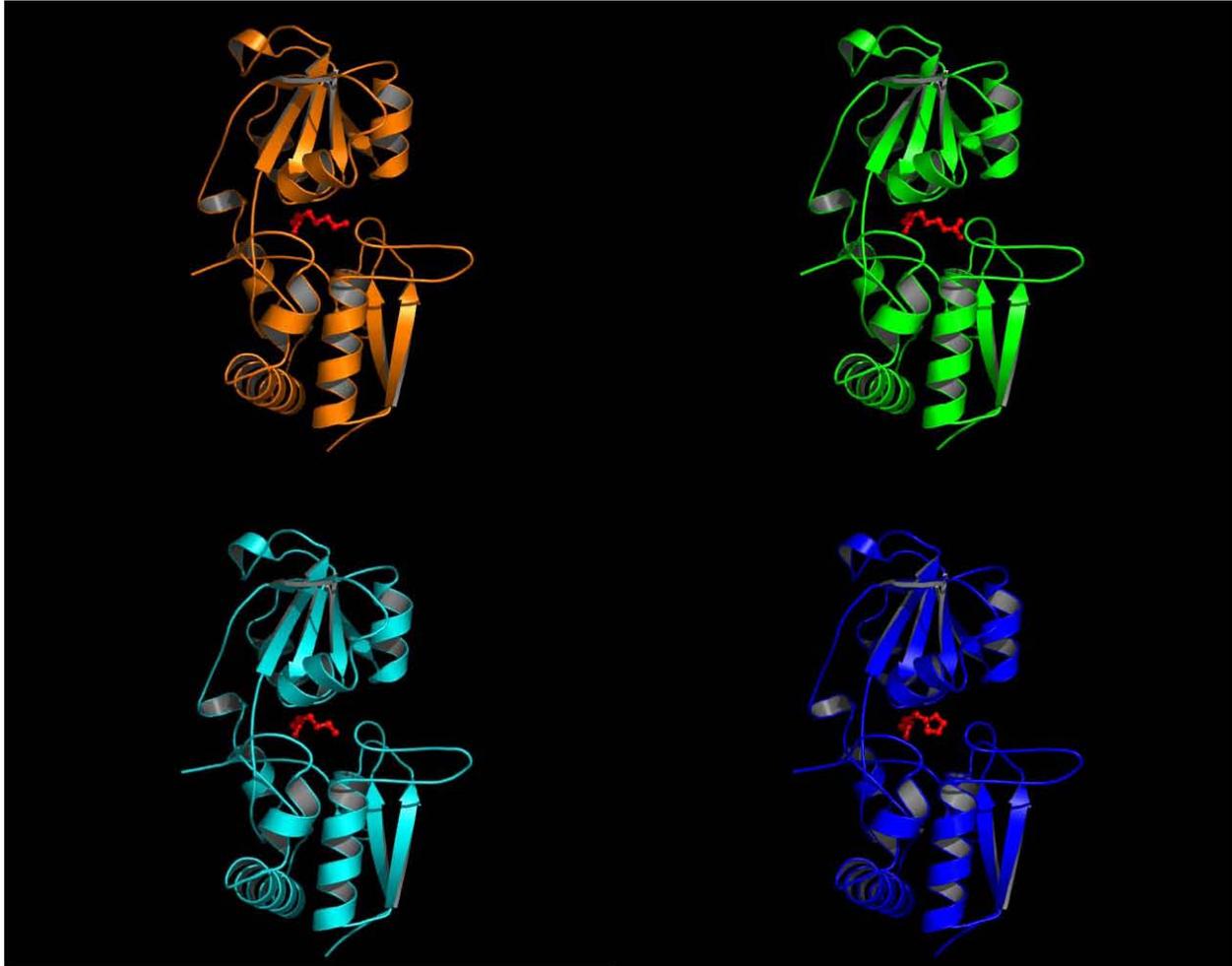


Figura 3. *La proteína LAO en el estado cerrado con sus distintos ligandos.* Representación de listones. En la parte superior izquierda el ligando L-lisina; en la parte superior derecha el ligando L-arginina; en la parte inferior izquierda el ligando L-orbitina; y en la parte inferior derecha el ligando L-histidina.

En las estructuras tridimensionales de LAO se encuentran invariablemente dos moléculas de agua (Wat 401 y 402), que están fuertemente unidas a la proteína y se piensa juegan un papel crucial en la unión del ligando⁽¹²⁾. Probablemente el papel de estas moléculas de agua sea el de neutralizar las cargas parciales de los átomos de la proteína. Además, existe otra molécula de agua (Wat 403) que

participa directamente en la unión de la histidina⁽¹²⁾ y se especula que sirve para neutralizar cargas parciales. Debido al tamaño del sitio de unión, los ligandos lisina, ornitina e histidina caben sin modificación alguna en la cavidad de unión. En el caso de la arginina, su alojamiento está acompañado por el desplazamiento de una molécula de agua. En resumen, la “cavidad” de unión de LAO es lo suficientemente grande para alojar el volumen de cualquiera de los cuatro ligandos más 2 ó 3 moléculas de agua (Wat 401, 402 y 403) (**Figura 4**).

Todos los residuos de la cavidad de unión (con excepción de Asp-11 en la unión de ornitina) sufren pequeños cambios conformacionales para adoptar una geometría adecuada e interacciones favorables con los distintos ligandos.

A diferencia de otras PBP como GBP, ABP o LIV-BP que presentan afinidades en el orden mM, LAO tiene una afinidad nanomolar por sus ligandos que se ha atribuido a las múltiples interacciones iónicas⁽¹²⁾ y creemos que es posible que también esté relacionada con la velocidad de apertura y cierre de esta proteína.

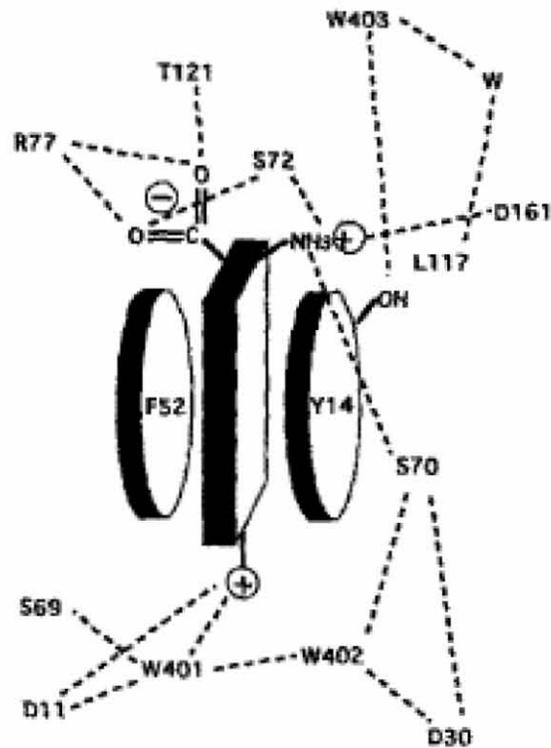


Figura 4. Esquema en 2D del sitio de unión de la proteína LAO. En la figura aparecen los principales residuos involucrados en la unión del ligando y las moléculas de agua W401, W402 y W403. (Figura modificada del artículo de la referencia 12).

- La proteína que une L-histidina (*HisJ*) y su relación con LAO

La proteína que une histidina (*HisJ*) es homóloga a LAO, y al igual que ésta, usa el complejo de membrana HisQ/HisM/HisP para transportar aminoácidos con carga positiva al interior de la célula⁽¹⁾. Sin embargo, *HisJ* tiene un orden inverso de afinidades por los mismos ligandos de alta afinidad: L-histidina con una K_d de 40 nM; L-ornitina, L-lisina y L-arginina con una K_d de aproximadamente 700 nM⁽⁹⁾. La estructura tridimensional de *HisJ* con el ligando histidina se encuentra disponible en el Protein Data Bank (PDB)⁽¹³⁾.

HisJ tiene la misma masa molecular y longitud de secuencia que LAO (26 kDa y 238 aminoácidos) y una identidad de secuencia del 70%. Si se toman en cuenta las sustituciones conservativas, estas

proteínas comparten el 83% de similitud y en dos regiones peptídicas (aa. 53-94 y 146-173) son casi 100% idénticas.

La estructura terciaria del esqueleto peptídico de la proteína HisJ es esencialmente la misma que la de LAO. El r.m.s.d. de la superposición de los C α es de 0.62 Å.

Se ha propuesto que los residuos que participan en la neutralización de cargas en la proteína LAO juegan el mismo papel en HisJ; además, las interacciones hidrofóbicas entre la histidina y la proteína HisJ son muy similares a las que presenta LAO con la lisina⁽⁹⁾.

- Quimeras de las proteínas HisJ-LAO

Dado que tanto las secuencias de aminoácidos de las proteínas LAO e HisJ, así como sus estructuras tridimensionales son similares, y ya que utilizan el mismo sistema de transporte para translocar sus ligandos, se han hecho estudios para tratar de entender cuales son los residuos cruciales que determinan la afinidad por los ligandos. Dentro de estos estudios se construyeron dos proteínas quiméricas entre HisJ y LAO; ambas proteínas son funcionales en el transporte y tienen la misma afinidad por los ligandos que la proteína nativa LAO⁽¹⁾. La proteína quimérica *His9084* está compuesta por los residuos 1-27 de HisJ y 28-238 de LAO⁽¹⁾. Los residuos 28-33 son idénticos en las proteínas LAO e HisJ, por lo que los residuos responsables de reconocer específicamente a la arginina (o desde otro punto de vista a la histidina), deben estar más allá del residuo 33. La otra proteína quimérica *His5643* es el resultado del entrecruzamiento entre la mitad del amino-terminal de la proteína LAO y el carboxilo-terminal de HisJ, dando lugar a una fusión en el residuo 200 de estas proteínas⁽¹⁾. Combinando los datos de ambas quimeras se deduce que los residuos importantes para conferir el reconocimiento específico de la arginina o histidina deben estar localizados entre los aminoácidos 33 y 200. En esta región, al comparar los aminoácidos que se encuentran en el sitio de unión, se encuentra que solamente son distintos los residuos: 52 (Phe en LAO, Leu en HisJ), 120

(Ser en LAO, Thr en HisJ), 190 (Tyr en LAO, Leu en HisJ), y 193 (Asp en LAO, Val en HisJ) (Figura 5).

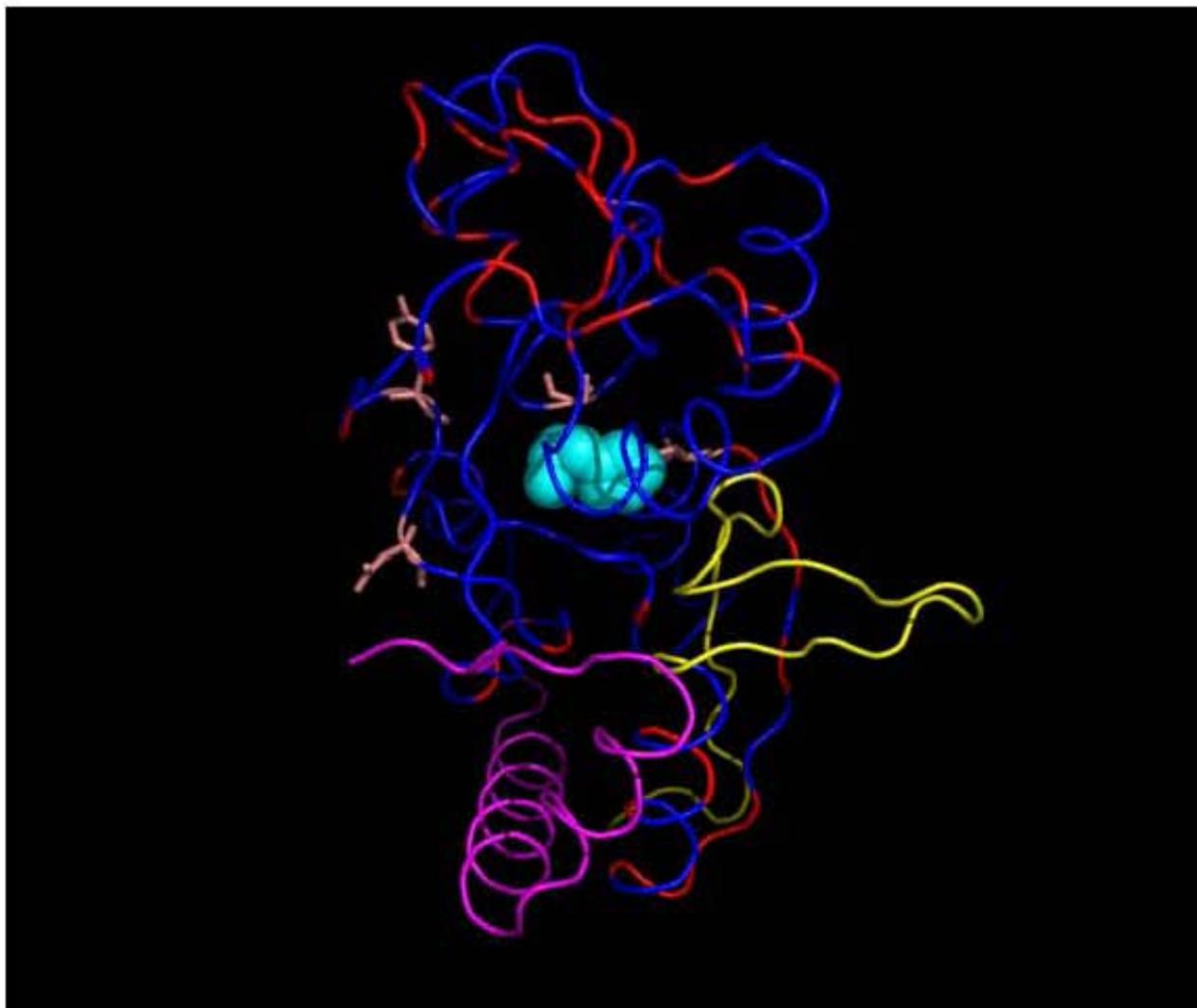


Figura 5. Diferencias entre LAO e His-J. Representación de listones y sticks de la proteína LAO con el ligando histidina. En **amarillo** se muestran los residuos 1-30; en **rosa** los residuos 200-238; en **rojo** los residuos que son distintos entre LAO e His-J; y en **salmón** los residuos distintos entre LAO e His-J que se encuentran en el sitio de unión.

De los residuos mencionados, solamente el 52 (Phe en LAO, Leu en HisJ) interactúa claramente con el ligando, pero es posible que uno o más de los otros tres residuos que no están en contacto directo con el ligando contribuyan de manera indirecta a la afinidad⁽⁹⁾. La diferencia en el residuo 52 podría explicar la baja afinidad de HisJ por los ligandos arginina, lisina y ornitina, ya que la Leu-

52 proporciona interacciones hidrofóbicas débiles con estos ligandos⁽⁹⁾. Sin embargo, no es clara la participación del residuo 52 para conferir una selectividad preferencial por la histidina en HisJ, ya que no parece proveer mejores interacciones que la Phe-52 en LAO. Una posibilidad es que ocurran cambios conformacionales en el sitio de unión a pH ácidos (donde la afinidad por la histidina es mayor⁽⁹⁾). Estos cambios podrían involucrar el movimiento de la cadena lateral del Asp-11 hacia el anillo de imidazol protonado de la histidina, que en conjunto con pequeños ajustes de la posición del ligando podría resultar en interacciones iónicas favorables y por lo tanto en una afinidad por la histidina más alta.

- La energía electrostática y la unión de ligandos

Identificar las interacciones responsables en la unión específica de ligandos es un requisito esencial para el diseño de las proteínas. La unión de ligandos está dada por una gran cantidad de factores, como: la geometría del sitio de unión, las interacciones polares, las interacciones hidrofóbicas y las energías de solvatación, entre otros.

El proceso de unión ligando-proteína puede ser descrito en 3 etapas consecutivas: 1) la difusión del ligando al sitio de unión en la superficie proteica; 2) la difusión del ligando a través de la proteína hasta el sitio de unión y la consecuente deshidratación de este (en algunos casos el sitio de unión está localizado en la superficie proteica y el paso de difusión a través de la proteína no es necesario); 3) el rearreglo del ligando en el sitio de unión hacia la orientación de unión. Aunque la fuerza motriz para este proceso generalmente es el efecto hidrofóbico, las interacciones electrostáticas también son importantes, tanto para los residuos polares como los apolares⁽¹⁵⁾.

En el caso de la PBPs se puede definir una cuarta etapa, consistente en el paso de la estructura abierta a la estructura cerrada.

- La energía electrostática

La tendencia general de las cargas en una molécula es la de preferir un ambiente en el que la constante dieléctrica sea elevada (debido a que provee una energía favorable de solvatación y a que las cargas contrarias se atraen). Esto se ve reflejado en la estructura de las proteínas globulares, en las que la mayor parte de las cadenas laterales cargadas se encuentran, por lo general, en la superficie de la proteína interactuando con el solvente, y las cargas atrapadas en el núcleo proteico se compensan formando puentes salinos con cargas opuestas.

La importancia de las interacciones electrostáticas en las tasas de difusión de los sustratos hacia los sitios activos se encuentra bien establecida^(15, 16). La “guía electrostática” es de gran importancia para las enzimas controladas por difusión, debido a que ésta es uno de los factores principales que determinan la tasa de catálisis. Aunque las interacciones electrostáticas son determinantes en la especificidad hacia el sustrato, se tiene evidencia de que en los sistemas biológicos contribuyen desfavorablemente a la energía libre de unión⁽¹⁷⁾. Sin embargo, en el complejo proteico Barnasa-Barstar y algunas otras proteínas^(17, 18) se ha mostrado que un rediseño cuidadoso de la distribución de las cargas en uno de los reactantes puede llevar a una contribución electrostática favorable a la energía libre.

- Penalidad de las interacciones electrostáticas por desolvatación

En general, las contribuciones energéticas de las interacciones electrostáticas en los procesos de plegamiento y asociación resultan de un balance entre dos efectos separados: 1) una contribución desestabilizante al proceso de asociación debido a la pérdida de interacciones favorables de solvatación entre los residuos cargados o polares y la fase acuosa altamente dieléctrica y 2) un cambio en las interacciones de los pares de Coulomb como resultado del plegamiento o de la asociación de dos cuerpos. El signo y la magnitud de estos efectos depende de las posiciones de las

cargas que interactúan. Los cálculos basados en electrostática continua sugieren que, para los pares aislados de los grupos polares y los pares ionizados que están interactuando, las interacciones de Coulomb generalmente no son lo suficientemente fuertes para compensar el efecto desfavorable de la desolvatación⁽¹⁹⁾. Entonces, se espera que la contribución general de las interacciones electrostáticas a un proceso de ensamblaje sean desfavorables. De lo anterior se deduce que se puede esperar una gran contribución de este efecto desfavorable mientras haya más aminoácidos cargados y grupos polares en la superficie de unión. Esto da lugar a la pregunta: ¿de donde viene la energía que lleva a la formación de los complejos? En ciertos estudios se ha encontrado que, en efecto, las interacciones electrostáticas tienden a oponerse a la formación de los complejos, mientras que la fuerza que tiende a unirlos proviene principalmente de las interacciones no polares⁽¹⁹⁾. Sin embargo, Lee y Tidor⁽²⁰⁾ han hecho observaciones que indican que la interfase de la proteína Barstar está electrostáticamente optimizada para interactuar con la Barnasa, aunque esto no implica que todas las interfases estén optimizadas de esta manera.

- Cálculos electrostáticos y cuerpos rígidos

Los cálculos electrostáticos generalmente suponen casos hipotéticos donde no existe cambio conformacional alguno después de la unión, es decir, los cálculos se llevan a cabo suponiendo que la estructura de los monómeros, o del monómero y el ligando, son iguales tanto en el complejo como en la forma libre⁽¹⁹⁾. Aunque esta observación sin duda es una gran simplificación de la realidad, ofrece una aproximación efectiva para la solución del problema.

La energía electrostática total de un sistema macromolecular se define como el trabajo necesario para ensamblar todas sus cargas y se calcula como⁽¹⁹⁾:

$$\Delta G_{elec}^{todo} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N q_i \phi(r_i)$$

En esta ecuación q_i es la carga del cuerpo i , $\phi(r_i)$ es el valor del potencial electrostático en la posición del cuerpo i , y la suma se lleva acabo sobre todas las cargas atómicas parciales de un sistema molecular. La expresión dada en la ecuación anterior corresponde a la energía libre de un sistema relativo a una estructura de forma idéntica pero sin cargas en él. Esta expresión puede utilizarse para definir la contribución electrostática de los procesos de ensamblaje macromolecular. Para una asociación proteína-proteína (o proteína ligando) se tiene que⁽¹⁹⁾:

$$\Delta G_{elec}^{todo} = \frac{1}{2} \sum_{i \in A:B} q_i \phi^{complejo}(r_i) - \frac{1}{2} \sum_{i \in A} q_i \phi^{libre}(r_i) - \frac{1}{2} \sum_{i \in B} q_i \phi^{libre}(r_i)$$

La suma en cada uno de los tres términos de esta ecuación se lleva acabo para las cargas parciales en las proteínas A y B por separado y en su complejo A:B. Con la aproximación de un sistema macromolecular con una conformación fija y en un estado de protonación dado, la ecuación describe todos los efectos electrostáticos que contribuyen a la unión del complejo, incluyendo las interacciones intramoleculares de Coulomb y las interacciones electrostáticas del solvente modificado tras la unión.

Cuando la forma linealizada de la ecuación de Poisson-Boltzmann se usa para calcular los potenciales electrostáticos, el potencial en cualquier punto puede expresarse como la suma de las contribuciones de las cargas individuales (i.e. $s_j(r_i) = \sum_{N \rightarrow j=1} s_j(r_i)$, donde $s_j(r_i)$ es el potencial electrostático en la posición i debido a la carga q_j).

Existen pocas soluciones analíticas de la PBE para geometrías realistas de biomoléculas con sus distribuciones de cargas. Sin embargo, esta ecuación se resuelve numéricamente por distintos métodos computacionales, los cuales transforman la solución continua en un conjunto dimensional-finito de funciones básicas. En el caso de la PBE linealizada, las ecuaciones resultantes se pueden arreglar en la forma de matriz-vector y ser resueltas directamente. Sin embargo, las ecuaciones no

lineales obtenidas de la ecuación completa de PBE requieren de técnicas más especializadas como los métodos de Newton⁽²¹⁾.

- El diseño de proteínas

El diseño de moléculas con una estructura y características funcionales dadas depende de manera crítica de nuestro entendimiento de la relación entre la secuencia, la estructura y la energía. Las herramientas predictivas para el diseño de proteínas también tienen una serie de aplicaciones en el campo de la biotecnología, materiales y sistemas a nano-escala⁽²²⁾.

Dado que las proteínas son estructuras complejas y son muchos los factores que intervienen en su estructura y plegamiento, el diseño de nuevas secuencias se enfrenta a grandes retos. Estrategias de diseño como “Dead End Elimination” o el “Alineamiento Simulado”, que en el pasado algunos han considerado como poco viables⁽²⁴⁾ dado que no consideran de manera explícita el estado desplegado de la proteína, recientemente han demostrado una gran precisión para diseñar proteínas de hasta 100 o inclusive más residuos⁽²⁵⁾.

El diseño de proteínas por computadora, utilizando algoritmos de búsqueda de secuencias y funciones de energía, se conoce hoy en día como “diseño racional de proteínas”, por su capacidad de generar resultados en términos de unas pocas secuencias que presuntamente contienen las características deseadas.

Para diseñar secuencias de aminoácidos (proteínas) que adopten una conformación determinada se requiere evaluar la capacidad de una cantidad enorme de secuencias para adquirir la estructura terciaria deseada. Dado que es imposible analizar todo el espacio muestral, todos los algoritmos de búsqueda necesariamente hacen un compromiso entre la velocidad de la búsqueda y su profundidad, y se sabe que existen importantes dependencias entre la elección del algoritmo de búsqueda, la forma en que el espacio muestral se representa y las funciones de evaluación utilizadas.

- El algoritmo ROSETTA para el diseño de secuencias

Una estrategia para el diseño de proteínas fue descrita por Kuhlman y Baker⁽²⁶⁾ e implementada en el programa ROSETTA. Este algoritmo pone uno a uno todos los tipos de aminoácidos en las posiciones deseadas de una estructura proteica mientras mantiene fijas todas las otras cadenas laterales. Las estructuras resultantes se evalúan utilizando una función de energía semiempírica. Con esta aproximación los autores fueron capaces de diseñar secuencias que mantenían una gran identidad con las secuencias nativas. Posteriormente, estos mismo autores, utilizando búsquedas repetidas de secuencias por Monte Carlo y con la ayuda de una función de energía ponderada (que incluye términos de potencial de enfoque atómico y términos derivados de bases de datos de rotámeros) diseñaron una proteína de novo con una estructura terciaria que no se encuentra en la naturaleza⁽²⁷⁾ (Top7). La energía de la proteína resultante se evalúa como la suma lineal de 11 términos y cada uno de ellos se encuentra sujeto a un factor de ponderación (W):

$$E_{\text{protein}} = W_{\text{rot}}E_{\text{rot}} + W_{\text{aa|phi..psi}}E_{\text{aa|phi..psi}} + W_{\text{rama}}E_{\text{rama}} + W_{\text{atr}}E_{\text{atr}} + W_{\text{solv}}E_{\text{solv}} + W_{\text{pair}}E_{\text{pair}} + W_{\text{bb_hbond}}E_{\text{bb_hbond}} + W_{\text{sc_hbond}}E_{\text{sc_hbond}} + W_{\text{sc_bb_hbond}}E_{\text{sc_bb_hbond}} + W_{\text{pair}}E_{\text{pair}} - E_{\text{ref}}$$

Para calcular la energía de solvatación (E_{solv}) y la energía de Lennard-Jones (E_{atr} y E_{rep}), los distintos átomos de los 20 aminoácidos se separan en tipos. Un potencial estándar de Lennard-Jones se utiliza con una modificación que hace que después de una distancia de corte el potencial se extrapole linealmente. Las energías favorables se agrupan en el término E_{atr} y las energías desfavorables en E_{rep} :

$$E_{\text{atr}} = \sum_i^{\text{natom}} \sum_{j>i}^{\text{natom}} \left[\left(\frac{r_{ij}}{d_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_{ij}}{d_{ij}} \right)^6 \right] e_{ij} \quad \text{si} \quad \frac{r_{ij}}{d_{ij}} < 1.12$$

$$E_{rep} = \sum_i^{natom} \sum_{j>i}^{natom} \left[\left(\frac{r_{ij}}{d_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_{ij}}{d_{ij}} \right)^6 \right] e_{ij} \quad \text{si} \quad 1.33 > \frac{r_{ij}}{d_{ij}} > 1.12 + \sum_i^{natom} \sum_{j>i}^{natom} y_{int\,ercept} - d_{ij} * slope \quad \text{si}$$

$$\frac{r_{ij}}{d_{ij}} > 1.33$$

$$slope = -12e_{if} (1.33^{13} - 1.33^7) * \left(\frac{1}{r_{ij}} \right)$$

$$y_{int\,ercept} = slope * \left(\frac{r_{ij}}{1.33} \right) + e_{if} (1.33^{12} - 2(1.33)^6)$$

$$r_{ij} = r_i + r_j$$

$$e_{ij} = \sqrt{e_i + e_j}$$

Donde: “d” es la distancia de los elementos no-unidos, “r” es el diámetro de Lennard-Jones, y “e” es la profundidad del pozo de dispersión.

Para evaluar la energía de solvatación (E_{solv}) se usa un modelo de solvatación implícita desarrollado por Lazaridis y Karplus⁽²⁸⁾:

$$E_{solv} = \sum_i^{natom} \sum_{j>i}^{natom} \left\{ \frac{-2\Delta G_i^{free}}{4\pi\sqrt{\pi}\lambda_i r_{ij}^2} \exp(-d_{ij}^2) V_j - \frac{-2\Delta G_j^{free}}{4\pi\sqrt{\pi}\lambda_j r_{ij}^2} \exp(-d_{ij}^2) V_i \right\}$$

donde, d_{ij} y r_{ij} representan a las mismas variables que en E_{atr} . El término ΔG_{free} está relacionado con la energía de solvatación del átomo completo, λ_i es una medida de correlación y V es el volumen atómico. Los valores de los parámetros han sido tomados de Lazaridis y Karplus, con excepción de algunos de los valores de ΔG_{free} que se han perturbado para reproducir mejor las frecuencias relativas de los aminoácidos en el núcleo.

La energía de cada rotámero (E_{rot}) se calcula con la siguiente ecuación:

$$E_{rot} = \sum_i^{nres} -\ln(P(rot(i) | phi(i), psi(i)))$$

donde E_{rot} representa la energía interna de un rotámero, derivada de estadísticas del “Protein Data Bank” (PDB), en las que se observa la probabilidad de un rotámero/aminoácido en particular para un ángulo phi o psi dado⁽²⁹⁾. Durante la fase final de la simulación, se penaliza mediante una distribución gaussiana alrededor del promedio a los rotámeros con ángulos chi que se alejan ± 0.5 desviaciones estándar de los ángulos comúnmente observados.

$E_{aa|phi,psi}$ se refiere a las preferencias de los aminoácidos por regiones particulares del espacio phi o psi. Para determinar este componente, un grupo no-redundante de archivos PDB se usa para determinar las probabilidades de observar cada uno de los 20 aminoácidos en un espacio phi, psi ($P(aa|phi,psi)$). La energía se calcula como el $(-\log)$ de las probabilidades.

E_{rama} es el potencial de torsión dependiente de phi y psi para los aminoácidos. Para este término se ha determinado la frecuencia de los pares phi-psi.

E_{pair} está determinado por la probabilidad de encontrar a dos aminoácidos a cierta distancia en el espacio. Los datos se derivan de la base de datos PDB y el término se evalúa para aminoácidos polares considerando dos ambientes: aminoácidos atrapados en un ambiente no polar y aminoácidos expuestos. La ecuación utilizada es:

$$E_{pair} = \sum_i^{nres} \sum_{j>i}^{nres} \frac{P(aa_i, aa_{jj} | d_{ij}, env_i, env_j)}{P(aa_i | d_{ij}, env_i)P(aa_j | d_{ij}, env_j)}$$

E_{bb_hbond} , E_{sc_hbond} , $E_{bb_sc_hbon}$. En cada uno de estos parámetros se suma un término de puentes de hidrógeno dependiente de la orientación: energía esqueleto – esqueleto; cadena lateral – esqueleto; y cadena lateral – cadena lateral, respectivamente, que están evaluados a partir de los ángulos y las distancias observadas en las proteínas nativas.

E_{ref} es la energía de referencia con respecto al estado desplegado de la proteína y está dada por:

$$E_{ref} = \sum_i^{nres} W_{ref}(aa(i))$$

Para calcular esta función a cada aminoácido se le asigna una energía de referencia calculada empíricamente.

Funciones de peso W. Los pesos para los términos y las 20 energías de referencia fueron determinados por la maximización del producto de: $\exp(-E(aaobs))/\exp(-E(aai))$ sobre un grupo de referencia de 30 proteínas usando un método de optimización de gradiente-conjugado, donde $E(aaobs)$ es la energía del aminoácido nativo en una posición dada y la función de partición en el denominador es sobre los 20 aminoácidos en cada posición. En este proceso, un residuo fue cambiado a la vez y los otros residuos se mantuvieron fijos en la conformación nativa. Subsecuentemente los parámetros se refinaron basándose en los cálculos del rediseño de las proteínas del grupo de referencia.

- Criterios para el diseño de proteínas

Creemos que es importante considerar que desde la perspectiva del diseño de proteínas, las proteínas resultantes deberían parecerse a las que existen en la naturaleza, por lo que es importante decidir qué criterios son los más indicativos de una estructura nativa. La estabilidad termodinámica (ΔG) es probablemente un mal criterio para evaluar esto, ya que se puede obtener una mayor estabilidad mediante degeneración estructural con el objetivo de obtener una estructura parecida a la nativa⁽³¹⁾. Al respecto, $\alpha 4$ (la primera proteína de cuatro hélices diseñada) es extremadamente estable aunque no tiene el núcleo ordenado asociado a las proteínas nativas⁽³⁰⁾. Medir cambios en la entalpía podría ser un mejor parámetro. Probablemente el mejor criterio sean las tasas de intercambio protónico entre las amidas, ya que dan pistas acerca de la estructura dinámica de la proteína⁽³¹⁾. En el caso del diseño de sitios de unión, una geometría correcta y una alta afinidad en el sitio diseñado pueden ser los criterios más importantes.

HIPÓTESIS

Dada la afinidad de la proteína LAO por residuos con carga positiva, el panorama de los mapas electrostáticos debe reflejar un ambiente predominantemente negativo en el sitio de unión.

Además de la existencia de una cavidad de unión con la geometría correcta para la unión de los ligandos L-arginina, L-lisina y L-histidina, en la proteína LAO, las cargas deben jugar un papel fundamental para la alta afinidad (de orden nanomolar) por sus ligandos. Este papel se debe ver reflejado en el ΔG^{elec} de unión para los distintos ligandos, tanto en el estado abierto de la proteína como en el cerrado.

Dado que el aminoácido 52 es el único distinto entre las proteínas LAO e HisJ que interactúa de manera directa con el ligando, debería tener un gran peso en el ΔG^{elec} de unión para el ligando histidina.

OBJETIVOS

- *Objetivos Generales.*

Determinar *in silico*, mediante la ecuación de Poisson Boltzmann, en la proteína LAO de *Salmonella typhimurium*, el papel de las contribuciones electrostáticas a la afinidad de unión por los ligandos: L-arginina, L-lisina y L-histidina.

Estudiar la contribución electrostática de los residuos del sitio de unión que difieren entre las proteínas LAO e HisJ (aa. 52, 120, 190 y 193) con la ayuda del algoritmo computacional ROSETTA para diseñar las mutantes *in silico*.

- *Objetivos Particulares.*

- Calcular y analizar el “panorama” de los mapas de potencial electrostático de la proteína LAO en los estados abierto y cerrado.
- Calcular las contribuciones electrostáticas en la interacción proteína-ligando y la posibilidad de usar estos resultados como parámetro para evaluar re-diseños *in silico*.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Estructuras proteicas.

Se usaron cuatro estructuras cristalinas de la proteína LAO del organismo *Salmonella tiphymorium*:

La estructura de la proteína LAO en su estado abierto y tres estructuras del estado cerrado correspondientes a los ligandos: arginina, lisina e histidina. Todas las proteínas se encuentran disponibles en el RCSB Protein Data Bank⁽¹²⁾. Los códigos de identificación son: 2LAO para el estado abierto⁽⁸⁾; 1LAF para el estado cerrado con el ligando arginina⁽⁸⁾; 1LST para el estado cerrado con el ligando lisina⁽⁸⁾; 1LAG para el estado cerrado con el ligando histidina⁽⁸⁾. Las resoluciones y factores R para cada uno de estos PDB son: 2LAO: 1.9 Å, R=0.197; 1LAF: 2.06 Å, R=0.161; 1LST: 1.8 Å, R=0.165; 1LAG: 2.06 Å, R=0.162.

Los átomos faltantes de la estructura 2LAO se construyeron automáticamente con el programa Swiss PDB Viewer, versión 3.7⁽³²⁾.

La estructura cristalina de la proteína LAO en el estado abierto no contiene a ninguno de los ligandos, por lo que se construyeron las estructuras de este estado con los diferentes ligandos de la siguiente manera: ya que la estructura del esqueleto del lóbulo 2 es casi idéntica en los estados abierto y cerrado de la proteína, con el programa PyMol (versión 0.97⁽³⁵⁾) se realizó un alineamiento de estos lóbulos entre las estructuras correspondientes a LAO en el estado abierto (2LAO) y en el estado cerrado con los diferentes ligandos (1LAF, 1LST y 1LAG). De estas estructuras se extrajeron las coordenadas de los diferentes ligandos y se insertaron en el archivo de estructura del estado abierto (2LAO), obteniéndose los archivos de la estructura en estado abierto con los ligandos arginina, lisina e histidina (2LAO-LAF, 2LAO-LST y 2LAO-LAG, respectivamente). Posteriormente se analizaron estos archivos para comprobar que no existieran impedimentos

estéricos. Finalmente, se realizó un ajuste manual ($<1 \text{ \AA}$ en x, y, z) de las coordenadas del ligando para eliminar dichos impedimentos estéricos de acuerdo con los radios de van der Waals (VDW).

Las posición de todos los archivos de estructura se optimizó para que la proteína ocupara el cubo del menor volumen mediante el programa MMTSB⁽³³⁾.

Los átomos de hidrógeno para los diferentes archivos de estructura PDB de la proteína se construyeron mediante el programa en línea PDB2PQR⁽³⁴⁾ utilizando el campo de fuerza de CHARMM. El pH de protonación al que fueron sometidas las estructuras fue de 7.0 (único parámetro de protonación disponible al momento de realizar el estudio).

La proteína y los ligandos se sometieron (por separado) al algoritmo de protonación PDB2PQR y posteriormente se insertaron las coordenadas de los ligandos en las estructuras respectivas. Obteniendo de esta manera 3 archivos de estructura distintos para cada caso: 2LAO-LAF.pqr (LAO en el estado abierto con el ligando arginina), LAF.pqr (ligando arginina) y 2LAO.pqr (LAO en el estado abierto sin ligando); 2LAO-LST.pqr (LAO en el estado abierto con el ligando lisina), LST.pqr (ligando lisina) y 2LAO.pqr.

Para el caso de la histidina se construyeron tres diferentes estados para tener en consideración los estados tautoméricos más comunes de la histidina: 2LAO-HSP (LAO en el estado abierto con el ligando histidina en su forma protonada con carga formal de +1e), HSP.pqr (ligando histidina en su forma protonada con carga formal de +1e) y 2LAO.pqr; 2LAO-HSE (LAO en el estado abierto con el ligando histidina en su forma no protonada con carga formal de 0e), HSE.pqr (ligando histidina en su forma no protonada con carga formal de 0e); y 2LAO.pqr; 2LAO-HSD (LAO en el estado abierto con el ligando histidina en su forma no protonada con carga formal de 0e), HSD.pqr (ligando histidina en su forma no protonada con carga formal de 0e) y 2LAO.pqr. Para el estado cerrado se construyeron los mismos archivos, pero usando como base los archivos PDB de los distintos estados cerrados con sus ligandos.

Los archivos para la trayectoria arbitraria de 13.8 Å de difusión del ligando se realizaron mediante la función de translación del programa PyMol (versión 0.97), construyendo de esta manera 10 estados trasladados del ligando arginina a lo largo de una trayectoria lineal, luego los otros ligandos se alinearon mediante el mismo programa a la trayectoria seguida por la arginina.

- Cálculos Electrostáticos

Los potenciales electrostáticos se calcularon solucionando numéricamente la ecuación linealizada de los elementos finitos de Poisson-Boltzmann mediante el programa APBS versión 0.3.2⁽³⁶⁾.

La constante dieléctrica del solvente se definió como 78.0. La constante dieléctrica de la proteína se definió como 2.0. El límite entre el solvente y la proteína se definió por un algoritmo de superficie molecular suavizada contenido en el programa APBS⁽³⁶⁾, usando un radio de prueba de la molécula de agua igual a cero⁽³⁸⁾. Es decir, debido a que en el estado cerrado la cavidad de interacción con la molécula no está accesible al solvente y el asignar un radio para la molécula del agua provocaría que la cavidad no quedara solvatada (haciendo imposible comparar los cálculos del estado cerrado con los del estado abierto), se utilizaron los radios de VDW de los átomos como la superficie molecular. La fuerza iónica del solvente se asignó como cero (sin especies iónicas presentes en el medio). La temperatura se fijó en 298.15 K.

Los potenciales electrostáticos se calcularon usando cubos rectangulares de 68 X 66 X 106.0 Å. Para cada proteína se calculó primero el potencial electrostático con una malla gruesa de 65 X 65 X 100 Å (estos cálculos se utilizaron para extraer los mapas de potencial electrostático con motivos de visualización). Posteriormente, a partir de la malla gruesa se obtuvieron las condiciones del límite para una malla fina de 35 X 35 X 55 Å, y se calculó el potencial electrostático de los diferentes archivos de estructura (enfoque electrostático). La malla gruesa siempre se encontró centrada en el complejo proteína ligando y la malla fina en el ligando. Para las trayectorias de los ligandos en el

estado abierto, se utilizaron los mismos parámetros de centrado de las dos mallas, pero la malla fina siempre estuvo centrada en el sitio original del ligando.

El ΔG electrostático se calculó de la siguiente manera:

$$\Delta G^{\text{elec}} = G^{\text{elec}}_{\text{holoproteína}} - G^{\text{elec}}_{\text{apoproteína}} - G^{\text{elec}}_{\text{ligando}}$$

y el ΔG de Coulomb se calculó:

$$\Delta G^{\text{coul}} = G^{\text{coul}}_{\text{holoproteína}} - G^{\text{coul}}_{\text{apoproteína}} - G^{\text{coul}}_{\text{ligando}}$$

donde G^{coul} es el resultado del cálculo de la energía electrostática de la proteína en el vacío (es decir con una constante dieléctica del solvente igual a la de la proteína).

- Construcción de mutantes *in silico*

Las mutantes *in silico* se diseñaron utilizando el programa ROSETTA⁽³⁷⁾, en su modalidad de diseño de sitios de unión para ligandos (publicación pendiente, colaboración con el laboratorio de Dr. Baker D. University of Washington), utilizando como entrada del programa el archivo de estructura PDB 1LAG, correspondiente al estado cerrado con el ligando histidina y restringiendo el diseño a la mutación puntual de los siguientes modificaciones: 52 (Phe→Leu), 120 (Ser→Thr), 190 (Tyr→Leu), y 193 (Asp→Val).

- Visualización

La visualización de los archivos de estructura PDB y PQR, así como de los archivos correspondientes a los mapas de potencial electrostático, se realizó mediante el programa PyMol versión 0.97.

- *Recursos computacionales*

Todos los cálculos y figuras se realizaron en un CPU de un solo procesador Athlon 3500+ (2200 Mhz.) de 64 bits corriendo de forma nativa el sistema operativo Linux (distribución Fedora Core 3) de 32 bits.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para determinar el ΔG electrostático de unión de la proteína LAO a sus ligandos, se calcularon por separado los mapas de potencial electrostático para los estados abierto y cerrado.

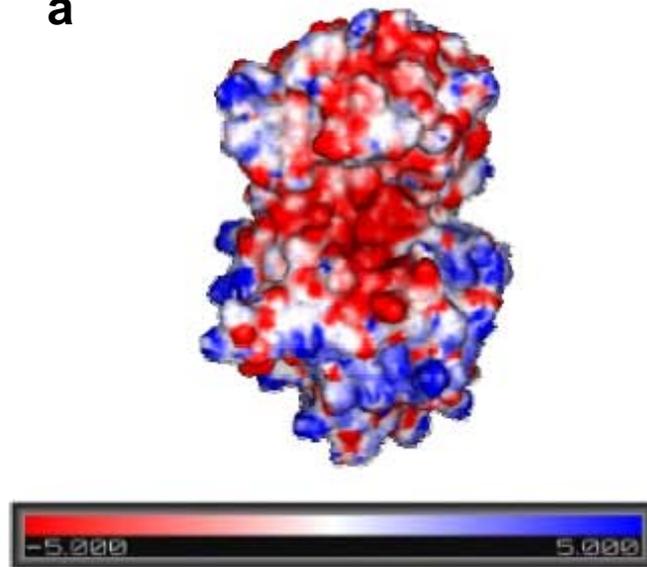
Calcular el ΔG electrostático asociado a la transición estado abierto estado cerrado requiere conocer datos que solo se pueden obtener de manera experimental y que desconocemos, por lo que el ΔG electrostático de dicha transición no fue incluido en este trabajo.

- El estado abierto

Los resultados de los cálculos de potencial electrostático muestran que la proteína tiene una superficie negativa en el sitio de unión (**Figura 6a**), así como un contorno de potencial electrostático negativo (**Figura 6b**). Este resultado es congruente con la capacidad de LAO para unir aminoácidos con carga formal positiva. Los resultados indican que el lóbulo II de LAO presenta una carga más positiva que la del lóbulo I; los mapas de contorno electrostático delimitado a ± 2 kJ indican que la region de potencial con carga negativa se encuentra localizada más allá de la superficie de la cavidad de unión del ligando.

Los cálculos electrostáticos para los distintos ligandos de LAO muestran predominantemente una superficie electrostáticamente positiva (**Figura 7**). Sin embargo, los contornos de potencial electrostático a valores de ± 2 kJ muestran que las formas tautoméricas de la histidina con carga formal de 0e, hse y hsd (**Figuras 7d y 7e**), tienen un mayor contorno electrostático negativo con respecto a la forma con carga formal de +1e (hsp), y presentan una disminución en su contorno electrostático positivo.

a



b

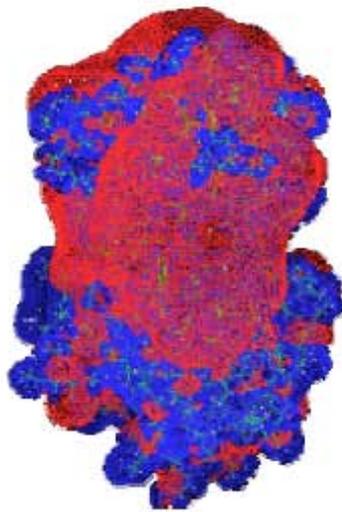


Figura 6. Estado Abierto de la proteína LAO. En la parte de **arriba** se muestra la superficie coloreada por gradiente de potencial electrostático, **rojo** = -5kJ/mol, **azul** = +5kJ/mol; en la parte de **abajo** se muestran los contornos de potencial electrostático, **rojo** = -2kJ, **azul** = +2kJ. (El lóbulo II corresponde a el dominio inferior de la proteína en ambos casos).

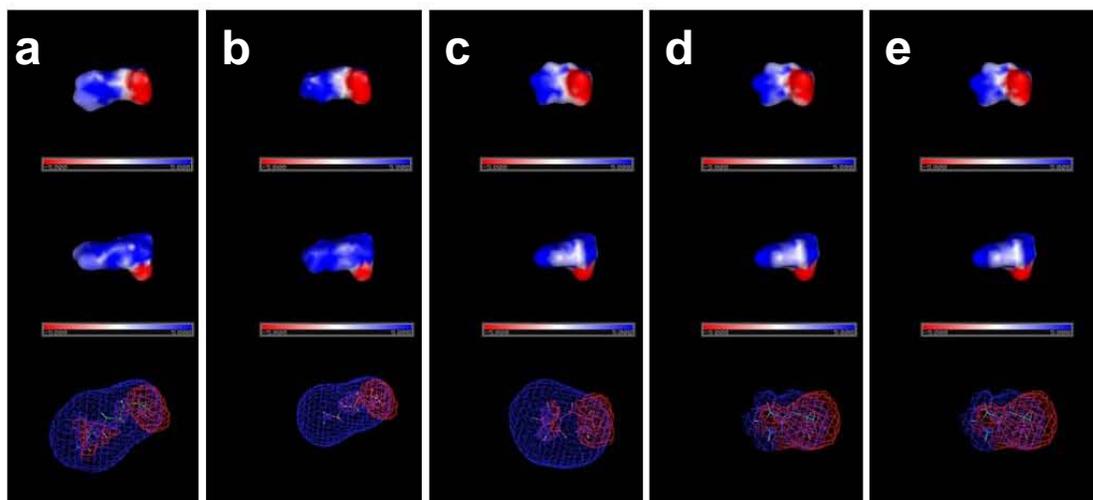


Figura 7. Ligandos de la proteína LAO utilizados para el estudio: a) arginina, b) lisina, e histidina en 3 de sus estados tautoméricos; c) hsp (estado protonado con carga formal de +1e) y dos estados no protonados d) hse y e) hsd. **Parte superior.** Vista “frontal” de los ligandos, con el extremo carboxilo al lado derecho y la cadena lateral del lado izquierdo, representación de superficie coloreada por gradiente de colores respecto al potencial electrostático. Rojo=-5kJ/mol, azul =+5kJ/mol. **Parte media.** Vista lateral del ligando, rojo=-5kJ/mol, azul =+5kJ/mol. **Parte inferior.** Contorno de potencial electrostático, rojo =-2kJ, azul l=+2kJ.

Cuando los mapas de potencial electrostático se calcularon en presencia del ligando, se observó un reordenamiento de las cargas que provoca que la región positiva y negativa de los diferentes aminoácidos quede en contacto con regiones de carga complementaria en la proteína (**Figura 8a**). También se puede observar una disminución en la extensión del área negativa en la superficie de la proteína, que se explica por la compensación de las cargas provocada por el acercamiento del ligando al sitio de unión. De la misma manera, en el ligando se puede observar una redistribución de las cargas. Si se analizan los contornos de potencial electrostático, se encuentra al ligando inmerso en una región de potencial electrostático negativo (**Figura 8b**), así como una considerable disminución en la extensión de éste potencial con respecto al estado sin ligando. La explicación a

este fenómeno está relacionada con el efecto de compensación de cargas que se explicó en el la introducción.

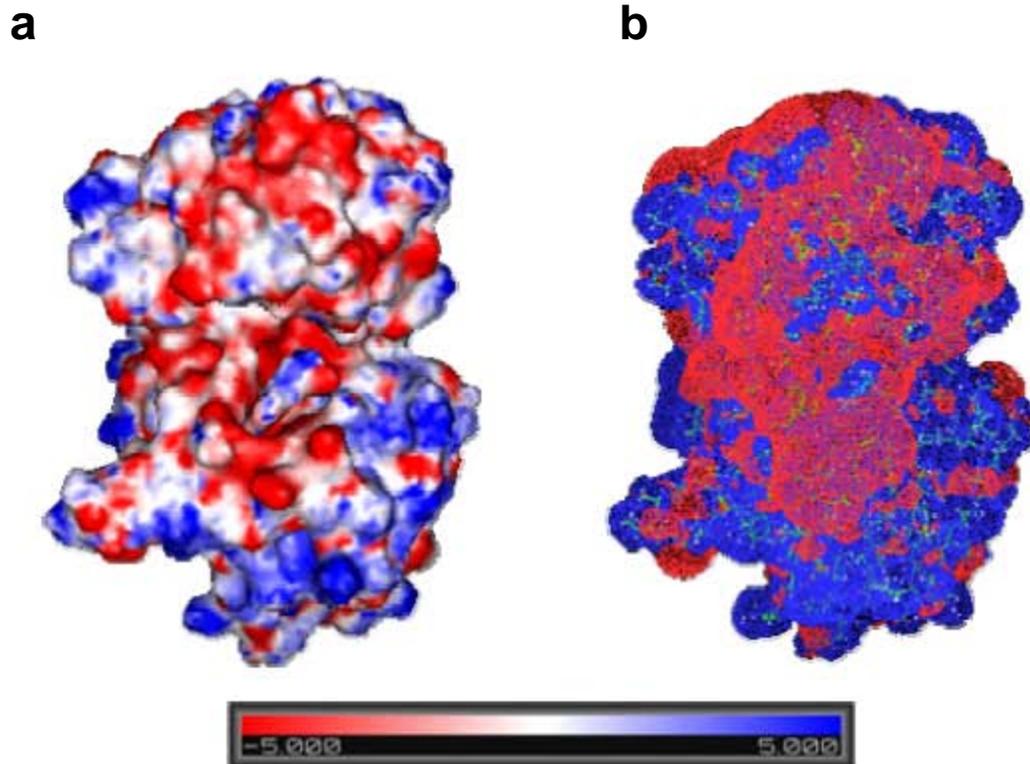


Figura 8. *LAO en el estado abierto con el ligando arginina.* a) Representación de la superficie tanto de la proteína LAO como del ligando arginina en la cavidad de unión, coloreados por potencial energía electrostática, rojo=-5kJ/mol, azul =+5kJ/mol; b) Contorno de potencial electrostático de la proteína LAO con su ligando, rojo=-2kJ/mol, azul =+2kJ/mol.

- El ΔG electrostático de unión en el estado abierto

Los resultados obtenidos muestran que el ΔG electrostático para la unión de los ligandos estudiados es negativo (Tabla 1 y Figura 9) y por lo tanto favorable para la unión. Este resultado es inusual ya

que de acuerdo a lo reportado en la literatura^(17, 39), el ΔG electrostático de unión tiende a ser desfavorable (tiene un valor positivo) en la formación de los complejos proteína-ligando y proteína-proteína cuando hay una pérdida de superficie accesible al solvente, sin embargo se han reportado casos de proteínas que se encuentran optimizadas electrostáticamente para la interactuar con otras proteínas⁽¹⁸⁾.

	k_d (nM)	$\Delta G^{4^\circ C}$ (kcal/mol)	ΔG^{elec} (kcal/mol)	ΔG^{coul} (kcal/mol)	SAS (\AA^2)	ΔSAS (\AA^2)
Sin Ligando	--	--	--	--	11369.55	--
arg	14	-9.97	-5.32	-215.52	11327.65	-41.9
lys	15	-9.93	-5.13	-212.61	11332.59	-37.0
hsp	500	-8.0	-4.77	-194.27	11356.49	-13.1
hse			-1.70	-69.07	11358.74	-10.8
hsd			-1.58	-58.72	11358.74	-10.8

Tabla 1. *Parámetros de interacción* experimentales (k_d y $\Delta G^{4^\circ C}$) y teóricos (ΔG^{elec} , ΔG^{coul} , SAS (superficie accesible al solvente), ΔSAS) de la proteína LAO con sus diferentes ligandos [arginina (**arg**), lisina (**lys**) e histidina (**hsp**, **hse** y **hsd**, según el estado tautomérico)]. El signo negativo en ΔSAS significa pérdida de superficie accesible al solvente.

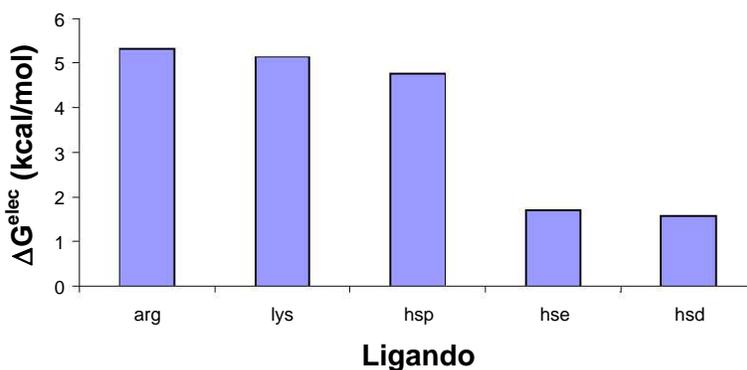


Figura 9. *Gráfica del ΔG electrostático de unión de la proteína LAO con sus distintos ligandos en el estado abierto.* Es notable la diferencia que se observa entre los ligandos protonados (con carga formal de +1e) y los ligandos sin carga (hsd y hse) (nótese que las unidades de ΔG son negativas).

Para los ligandos arginina y lisina se encontró una correlación entre el valor del ΔG electrostático de unión y la afinidad. En el caso particular de la histidina, esta correlación no es evidente. La forma protonada de este aminoácido (hsp, carga formal +1e) tiene un ΔG electrostático negativo muy parecido al de los otros 2 ligandos. Sin embargo, las dos formas no protonadas hse y hsp, tienen ΔG 's electrostáticos negativos pero menos favorables que para los otros ligandos.

Dado que a pH's fisiológicos se encuentran mezclas de los distintos tautómeros de la histidina, la afinidad medida experimentalmente es el resultado de la afinidad promedio de las poblaciones. Esta hipótesis está respaldada por el hecho de que a pH ácido (donde la población de la histidina protonada es mayor) se encuentra la mayor afinidad de la proteína LAO por este aminoácido. Este cambio en la afinidad en función del pH no ocurre en la Arg y la Lys, que siempre se encuentran protonadas a pH fisiológico. Se ha reportado que la afinidad de 500 nM por la histidina se obtiene a un pH de 6.0, mientras que a pH de 8.0 se sabe que la afinidad es bastante menor (aproximadamente de un 7% con respecto a un pH de 6.0), sin embargo no se ha reportado la k_d .⁽¹¹⁾

Aplicando la ecuación de Henderson-Hasselbach para estos valores de pH y considerando un pK de 6.04 para la cadena lateral de la histidina, se pueden calcular los porcentajes de las diferentes formas iónicas y por lo tanto ponderar los valores de ΔG electrostático para este ligando (**Tabla 2, ver columna ΔG^{elec} ponderado**). Después de aplicar estos cálculos, se encuentra una mejor correlación entre el ΔG electrostático calculado y la afinidad de la proteína LAO por la histidina (**Tabla 3 y Figura 10**).

	pH	K _d (nM)	$\Delta G^{4^\circ C}$ (kcal/mol)	% de la especie	ΔG^{elec} (kcal/mol)	ΔG^{elec} ponderado (kcal/mol)	Suma del ΔG^{elec} ponderado (kcal/mol)
hsp	6.00	500	-8.0	48	-4.77	-2.29	-3.14
hse				52	-1.64	-0.85	
hsd							
hsp	8.00	---	---	1	-4.77	-0.05	-1.67
hse				99	-1.64	-1.63	
hsd							

Tabla 2. Ponderación del ΔG^{elec} de interacción de la proteína LAO con el ligando histidina en el estado abierto, con respecto a los porcentajes de las poblaciones tautoméricas de la histidina presentes a dos diferentes pH (6.0 y 8.0).

Ligando	K _d (nM)	$\Delta G^{4^\circ C}$ (kcal/mol)	ΔG^{elec} Estado abierto (kcal/mol)
Arg	14	-9.97	-5.32
Lys	15	-9.93	-5.13
His (pH = 6.0)	500	-8.0	-3.14
His (pH = 8.0)	---	---	-1.67

Tabla 3. Comparación del ΔG^{elec} de interacción de la proteína LAO con sus diferentes ligandos.

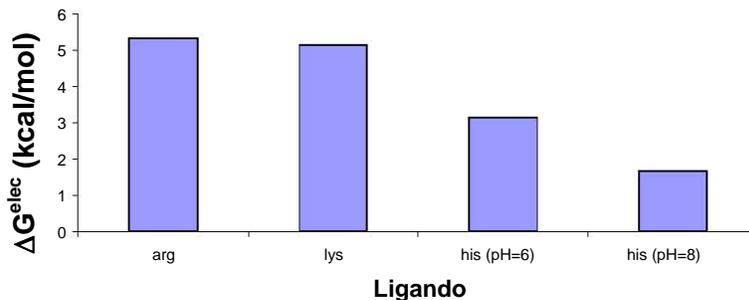


Figura 10. Grafica del $-\Delta G$ electrostático de unión de la proteína LAO con sus distintos ligandos en el estado abierto. El ligando histidina se encuentra ponderado por sus poblaciones tautoméricas a dos pH distintos (6.0 y 8.0).

En conjunto, estos resultados sugieren que LAO en el estado abierto une de manera muy selectiva a los aminoácidos con carga formal positiva. Es notable que la presencia (o ausencia) de un sólo protón en la histidina provoca una diferencia considerable en el ΔG electrostático de unión (3 kcal/mol).

La alta afinidad que tiene LAO por sus ligandos (en el orden nM) podría explicar los valores de ΔG electrostático negativos y sugiere que el papel electrostático se encuentra optimizado de manera natural, jugando un papel muy importante en la unión a los distintos ligandos.

- El ΔG electrostático vs. la distancia (el proceso de difusión)

Dado que las cargas electrostáticas en el estado abierto parecen estar optimizadas para favorecer la interacción con el ligando, se intentó determinar si este fenómeno también ocurre para posiciones cercanas a la cavidad de unión. Con este fin, se propuso una trayectoria de difusión arbitraria de 13.8 Å del sitio de unión hacia el exterior de la cavidad de unión (**Figura 11**). Esta trayectoria se dividió en 11 pasos, en los cuales el ligando se traslado sin rotación y se calculó el ΔG electrostático para cada uno de estos estados (**Tablas 3, 4 y 5: apéndice**).

Los resultados sugieren que, para los ligandos con carga positiva, el ΔG electrostático se hace más favorable a menor distancia (**Tablas 3, 4 y 5: apéndice**); además, en un gráfico de ΔG electrostático en función de la distancia se observan varias pendientes, que pueden interpretarse como diferentes regiones involucradas en la difusión del ligando por energía electrostática (**Figuras 12 y 13**). Estos datos sugieren la existencia de cargas electrostáticas que favorecen la difusión del ligando hacia el sitio de unión.

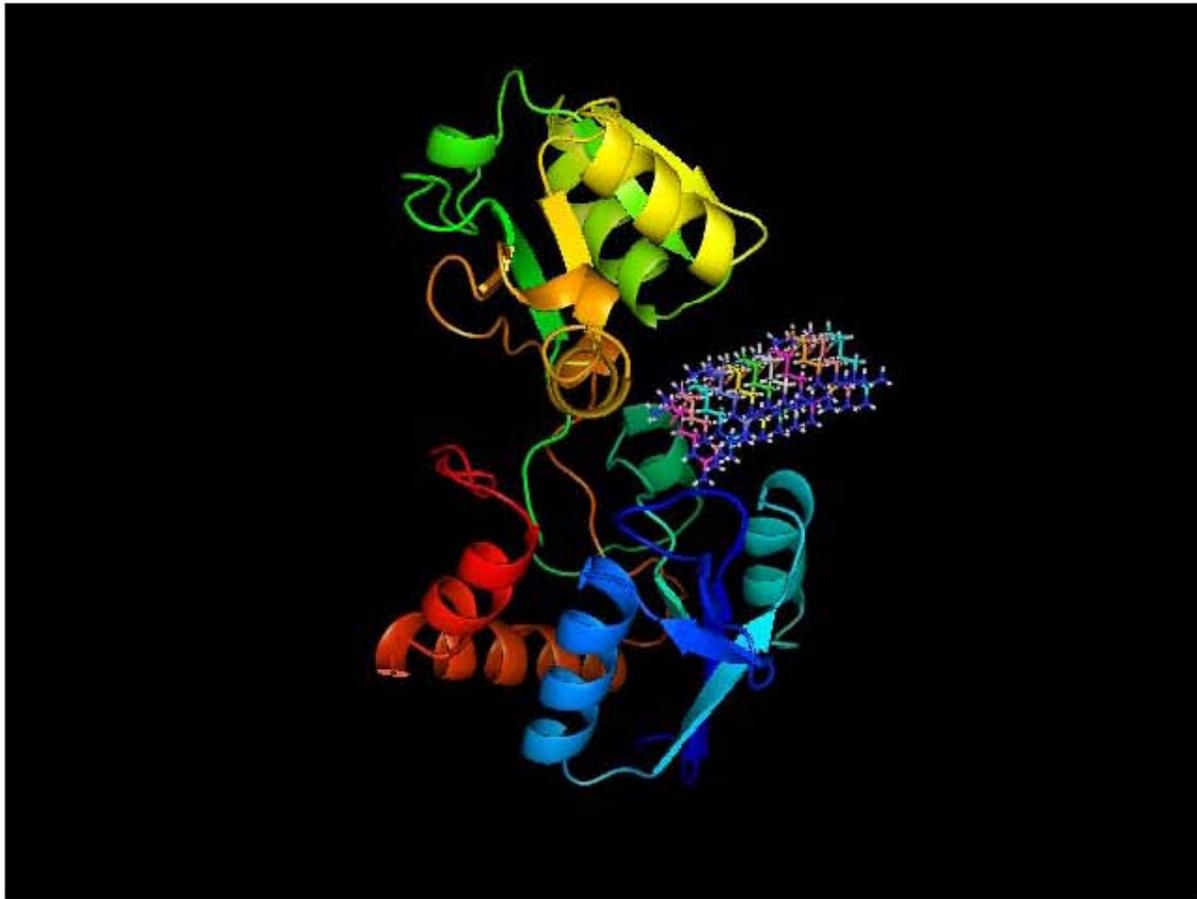


Figura 11. *Representación de listones de la proteína LAO en su estado abierto, y representación en líneas del ligando arginina en las 11 posiciones de la trayectoria arbitraria de 13.8 Å que se eligió para el ligando. Las trayectorias para los otros ligandos (lisina e histidina) se generaron mediante el alineamiento de los C α y sus átomos adyacentes con la trayectoria seguida por la arginina.*

Para los ligandos con carga formal positiva la difusión es pronunciada desde una distancia de 5 Å del sitio de unión, entre los 5-10 Å tiende a ser lineal y moderadamente pronunciada entre los 10 y 13.8 Å.

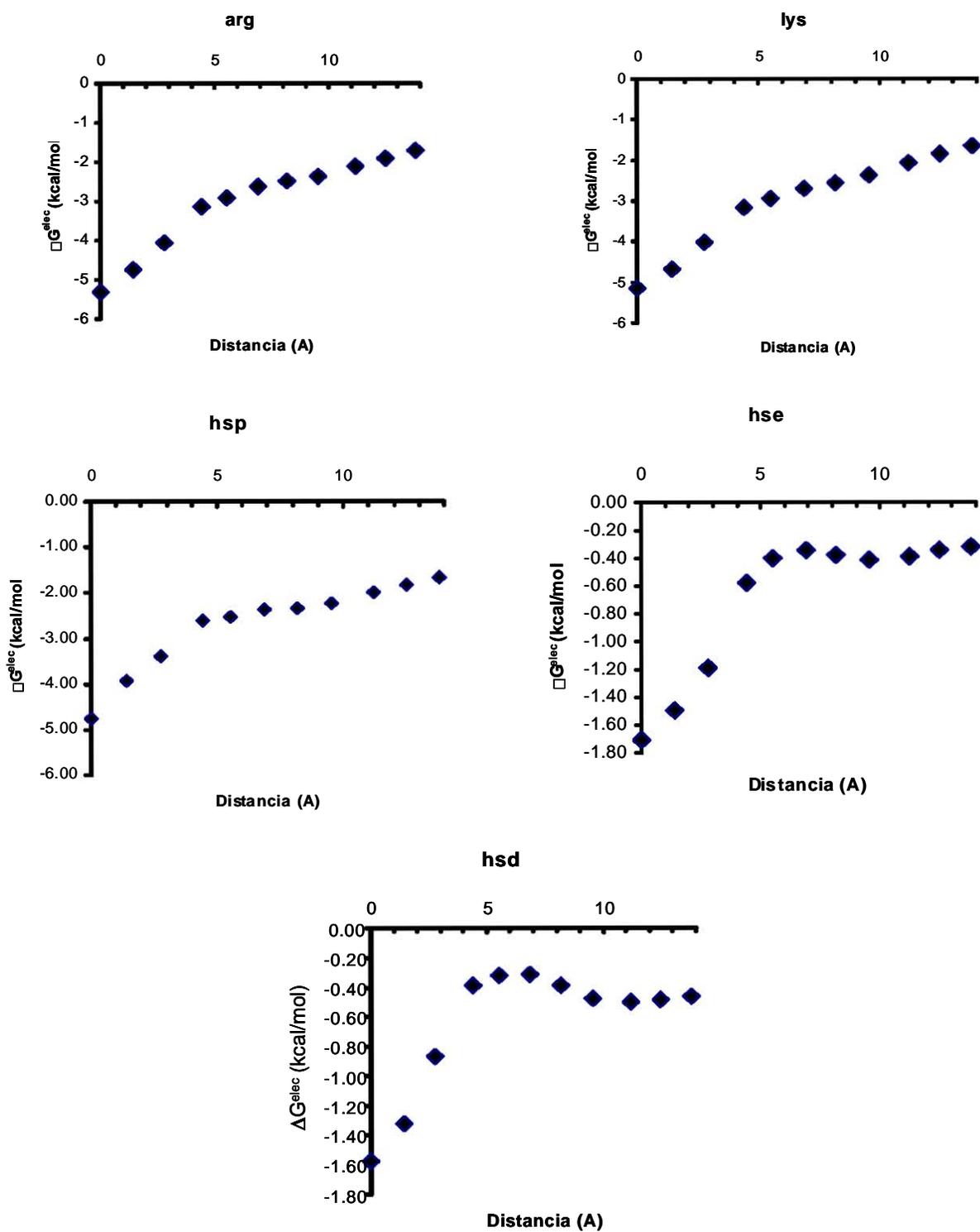


Figura 12. Gráficas de interacción electrostática (ΔG electrostático) de la proteína LAO en el estado abierto con sus diferentes ligandos, a través de una trayectoria de 13.8 Å desde el sitio de unión y hacia la entrada de la cavidad (como se muestra en la figura 6, datos de las Tablas 3, 4 y 5).

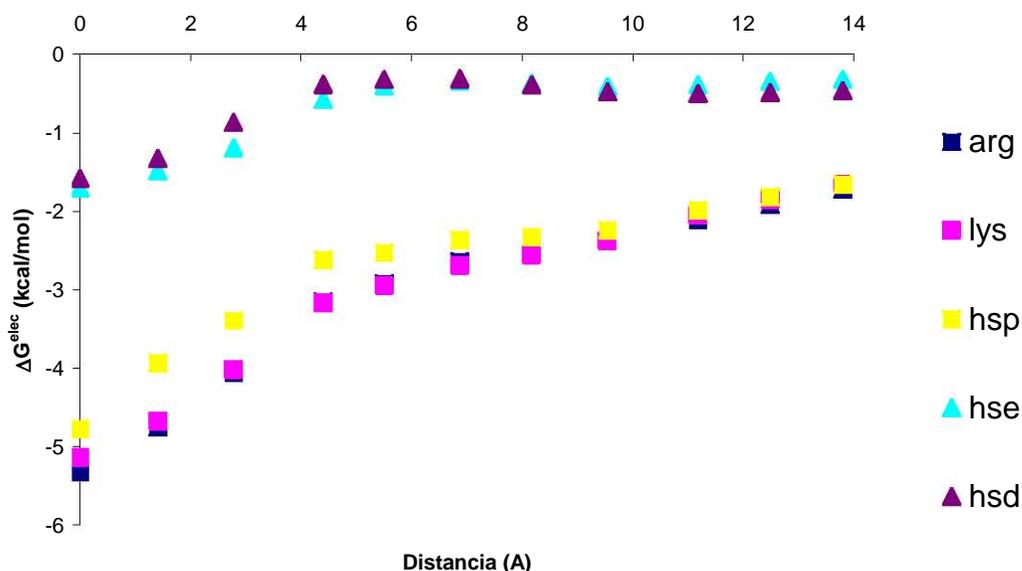


Figura 13. *Graficas de interacción electrostática (ΔG electrostático) de la proteína LAO en el estado abierto con sus diferentes ligandos, a través de una trayectoria de 13.8 Å.* (Graficas de la figura 11 superpuestas).

Estos resultados sugieren que la unión del ligando a la proteína LAO en el estado abierto es un proceso dinámico que involucra varios pasos. Los aminoácidos que participan electrostáticamente con mayor fuerza para la difusión del ligando hacia el sitio de unión son los residuos que se encuentran a una distancia menor a 5 Å con respecto al ligando, aunque, en esta región no parece haber diferencia en la atracción por los distintos ligandos con carga positiva. La región que se encuentra entre 9 y 13.8 Å (Figura 6) pareciera estar involucrada en el reconocimiento de ligandos con cargas formales positivas. La región que se encuentra entre 9 y 6 Å presenta particularmente una contribución electrostática muy baja en el proceso de difusión de los ligandos con carga formal positiva, y para las dos formas no protonadas de la histidina estos residuos muestran una pequeña barrera energética de alrededor de 0.2 kcal/mol, que no pareciera ser determinante para la difusión

pero podría estar disminuyendo la probabilidad del acercamiento exitoso de los tautómeros sin carga formal al sitio de unión.

Estas evidencias sugieren que algunos aminoácidos cercanos al sitio de unión, participan de manera importante en la difusión del ligando y en la selectividad. Estos datos también sugieren que los aminoácidos que se encuentran a una distancia entre 9 y 6 Å tienen un papel relevante en la selectividad hacia las formas iónicas de los ligandos. Estas conclusiones se ven apoyadas por los datos que se muestran en la **(figura 14)**, en los que se grafica el cociente del $\Delta G^{\text{elec}}/\Delta G^{\text{coul}}$ contra la distancia, reflejando por lo tanto la cooperatividad de la carga neta de los átomos (atracción de cargas contrarias) *versus* su contribución electrostática, por lo que un aumento en los valores significa una compensación electrostática con respecto a las interacciones de las cargas en el vacío, una disminución significa que la energía electrostática desfavorece la interacción.

Como se puede apreciar, los ligandos protonados presentan una contribución electrostática más grande al acercarse al sitio de unión **(Figura 14a, b y c)**, que reafirma la idea de que los residuos que se encuentran a menos de 8Å del sitio de unión, son los que participan de manera más importante en la difusión del ligando hacia el sitio de unión. Por otra parte, las formas no protonadas de la histidina tienen un efecto electrostático compensatorio muy grande en las regiones de entre 5 y 9 Å con respecto al sitio de unión **(Figura 14d y e)**, favoreciendo la idea de que los residuos localizados en esta región participan activamente en la selectividad hacia el ligando.

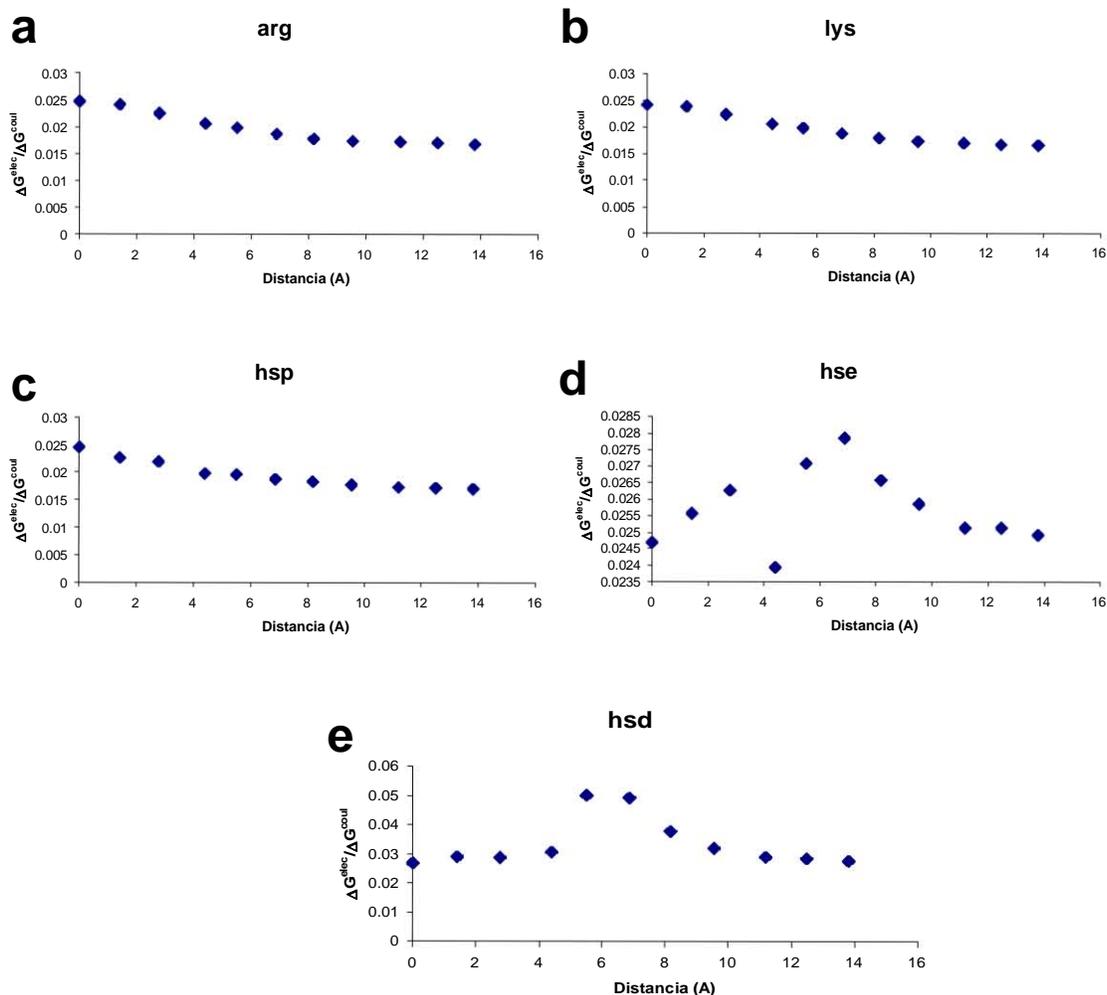


Figura 14. Graficas de “ ΔG electrostático”/” ΔG Coulomb” de la proteína LAO en el estado abierto con sus diferentes ligandos, a través de una trayectoria de 13.8 Å desde el sitio de unión y hacia la entrada de la cavidad.

- El estado cerrado

Con el fin de determinar las contribuciones electrostáticas para la interacción del ligando con el estado cerrado de la proteína LAO, se calculó el valor de ΔG electrostático de unión para LAO con los distintos ligandos en este estado. Todos los valores de ΔG electrostático fueron negativos y aún más favorables que en el estado abierto, con excepción de los ligandos hsd y hse (**Tabla 6**). Estos

resultados refuerzan la idea de que esta proteína se encuentra electrostáticamente optimizada en lo que se refiere a la unión de los ligandos.

Ligando	$\Delta G^{4^\circ C}$ (kcal/mol)	ΔG^{elec} estado cerrado (kcal/mol)	ΔG^{elec} estado abierto (kcal/mol)	ΔG^{coul} estado cerrado (kcal/mol)	ΔG^{coul} estado abierto (kcal/mol)
Arg	-9.97	-9.37	-5.32	-358.56	-215.52
Lys	-9.93	-11.51	-5.13	-344.01	-212.61
Hsp	-8.0	-11.50	-4.77	-343.98	-194.27
Hse		-0.92	-1.70	-156.27	-69.07
Hsd		-1.23	-1.58	-148.04	-58.72

Tabla 6. *Tabla comparativa de los parámetros de interacción electrostática de la proteína LAO con sus diferentes ligandos* (arginina, lisina e histidina en sus tres formas tautoméricas) en el estado cerrado vs. el estado abierto.

Para estos cálculos se aplicaron las proporciones de las formas iónicas de la histidina y se obtuvieron los siguientes resultados que muestran nuevamente el efecto del pH en la unión del ligando histidina:

	pH	$\Delta G^{4^\circ C}$ (kcal/mol)	% de la especie	ΔG^{elec} (kcal/mol)	ΔG^{elec} ponderado (kcal/mol)	Suma del ΔG^{elec} ponderado (kcal/mol)
Hsp	6.00	-8.0	48	-11.5	-5,52	-6.079
Hse			52	-1.075	-0.559	
Hsd						
Hsp	8.00	---	1	-11.5	-0.115	-1.849
Hse			99	-1.075	-1.734	
Hsd						

Tabla 7. *Ponderación del ΔG^{elec} de interacción de la proteína LAO estado cerrado con el ligando histidina en la cavidad de unión.*

A continuación se presenta el resumen de los resultados, ponderados para el ligando histidina, en comparación con sus valores en el estado abierto:

Ligando	$\Delta G^{4^\circ C}$ (kcal/mol)	ΔG^{elec} Estado cerrado (kcal/mol)	ΔG^{elec} Estado abierto (kcal/mol)
arg	-9.97	-9.37	-5.32
lys	-9.93	-11.51	-5.13
his (pH=6.0)	-8.0	-6.079	-3.14
his (pH=8.0)	---	-1.849	-1.67

Tabla 8. *Tabla comparativa del ΔG electrostático de unión de la proteína LAO con sus distintos ligandos en el estado cerrado.* El ligando histidina ha sido ponderado de acuerdo a sus poblaciones tautoméricas en dos pH distintos.

Los datos mostraron una buena correlación entre la afinidad y el valor del ΔG electrostático, con valores más parecidos a los $\Delta G^{4^\circ C}$ experimentales que los valores del estado abierto (**Tabla 8**). Nuevamente los ligandos que no tienen carga formal mostraron los ΔG electrostáticos menos favorables.

Estos resultados sugieren que en el estado cerrado las fuerzas electrostáticas también son una contribución energética muy importante para la afinidad. Resulta razonable sugerir que la afinidad de la proteína LAO por estos ligandos (en lo que se refiere a la energía electrostática), se encuentra determinada por un balance entre el ΔG electrostático del estado abierto y el del estado cerrado. Aunque la correlación del ΔG electrostático en el estado cerrado no es tan evidente como la del estado abierto, si se considera que las diferencias de afinidades entre estos dos ligandos (Arg y Lis) tan solo es de 1 nM, la falta de correlación en estos datos podría deberse al error inherente al algoritmo usado para calcular las energías o al balance que se genera entre las energías del estado abierto y el cerrado u ambas cosas. Estos valores “altos” de ΔG son congruentes con el hecho de que la proteína no libera al ligando una vez que lo ha unido.

Los resultados también sugieren que la afinidad por los ligandos sin carga formal (hse, hsd) está dada de manera importante por el balance de las contribuciones electrostáticas en el estado abierto,

el estado cerrado y el proceso de difusión. Dado que para estos ligandos sin carga formal los valores ΔG electrostático son más pequeños en el estado cerrado que en el estado abierto. Resulta razonable pensar que la proteína no adoptara la conformación cerrada con estos ligandos.

- La mutante *in silico* LTLV

Como se discutió en la introducción, la proteína LAO y la proteína HisJ son homólogas, tanto en su secuencia de aminoácidos como en su estructura. Estas proteínas unen los mismos ligandos pero en un orden inverso de afinidades. Estudios realizados con quimeras entre las proteínas LAO e HisJ sugieren que los aminoácidos involucrados en esta diferencia de afinidades deben ser los aminoácidos: 52 (Phe en LAO, Leu en HisJ), 120 (Ser en LAO, Thr en HisJ), 190 (Tyr en LAO, Leu en HisJ) y 193 (Asp en LAO, Val en HisJ); sin embargo, no se ha reportado la construcción de la mutante en estos residuos. En este estudio, con la ayuda del programa ROSETTA se modeló *in silico* dicha mutante para determinar la contribución electrostática de estos residuos en la capacidad de la proteína LAO para unir el aminoácido histidina.

Para realizar la mutante *in silico*, se tomó el archivo de estructura PDB correspondiente a la proteína LAO en su forma cerrada con la histidina unida (1LAG) y se alimentó al programa ROSETTA pidiéndole que mutara solamente los residuos 52, 120, 190 y 193 por los residuos presentes en la proteína HisJ, sin modificar la estructura del esqueleto proteico. El archivo de estructura resultante se nombró 1LAG-LTLV.

Dado que el programa ROSETTA modificó la orientación de algunas cadenas laterales que no se mutaron, se reconstruyó el PDB de la estructura cerrada original con estas modificaciones en la orientación de las cadenas laterales, al cual se nombró 1LAG-NoMut. Los resultados muestran que ROSETTA encontró una mejor orientación para las cadenas laterales, de manera que la contribución electrostática mejoró considerablemente para todos los ligandos. Nuevamente los

residuos sin carga formal muestran la menor contribución electrostática en el estado cerrado, muy por debajo de la obtenida para la histidina con carga formal positiva (**Tabla 9**).

Los resultados también muestran que la mutante 1LAG-LTLV no mejoró considerablemente con respecto a la proteína nativa en cuanto a su interacción con la histidina en su forma protonada (-0.1 kcal/mol). Sin embargo, los residuos sin carga formal mejoraron -1.65 kcal/mol en promedio. Dada la magnitud de las contribuciones electrostáticas para los otros ligandos, este cambio no explica la diferencia entre las proteínas HisJ y LAO, pero sí supone un aumento en la afinidad.

Ligando	1LAG ΔG^{elec} (kcal/mol)	1LAG-NoMut ΔG^{elec} (kcal/mol)	1LAG-LTLV ΔG^{elec} (kcal/mol)
arg	-9.37	-14.96	-15.16
lis	-11.51	-13.47	-14.64
hsp	-11.50	-12.85	-12.95
hse	-0.92	-2.62	-3.83
hsd	-1.23	-5.08	-6.00

Tabla 9. *Tabla comparativa del ΔG electrostático de unión de la histidina en tres de sus formas tautoméricas con respecto a la estructura nativa de la proteína LAO en el estado cerrado (1LAG); la mutante en los residuos 52, 120, 190 y 193 (1LAG-LTLV); y la estructura nativa reconstruida a partir de la estructura de la mutante (1LAG-NoMut, ver texto).*

Usando como parámetro de normalización las proporciones de las poblaciones de la histidina obtuvimos los resultados que se muestran en las siguientes tablas (**Tablas 10 y 11**):

1LAG-NoMut	pH	$\Delta G^{4^\circ C}$ (kcal/mol)	% de la especie	ΔG^{elec} (kcal/mol)	ΔG^{elec} ponderado ΔG^{elec} (kcal/mol)	Suma del ΔG^{elec} ponderado ΔG^{elec} (kcal/mol)
hsp	6.00	-8.0	48	-12.85	-6.168	-8.17
hse			52	-3.85	-2.002	
hsd						
hsp	8.00	----	1	-12.85	-0.1285	-3.94
hse			99	-3.85	-3.811	
hsd						

1LAG-LTLV	pH	% de la especie	ΔG^{elec} (kcal/mol)	ΔG^{elec} ponderado (kcal/mol)	Suma del ΔG^{elec} ponderado (kcal/mol)
hsp	6.00	48.00	-12.95	-6.22	-8.77
hse		52.00	-4.92	-2.56	
hsd					
hsp	8.00	1.00	-12.95	-0.13	-5.00
hse		99.00	-4.92	-4.87	
hsd					

Tablas 10 (superior) y 11 (inferior). Ponderación del ΔG^{elec} de interacción de la histidina con 1LAG-NoMut (Tabla 10) y la mutante 1LAG-LTLV (Tabla 11), en el estado cerrado, con respecto al porcentajes de las poblaciones tautoméricas presentes a dos diferentes pH (6.0 y 8.0).

Estos resultados sugieren que la capacidad de HisJ para unir con mayor afinidad a la histidina está dada en parte por una mejor interacción de ésta con la histidina en sus formas no protonadas. Sin embargo, el papel geométrico, tanto de complementariedad como torsional (entre otros), no puede ser despreciado y creemos que también debe jugar un papel importante en la diferencia de afinidades.

La contribución electrostática de cada uno de los diferentes residuos mutados a la capacidad de la proteína mutante para unir a la histidina fue evaluado como la diferencia resultante de los ΔG electrostáticos calculados para cada una de las cuatro mutantes independientes en los residuos 52, 120, 190 y 193, con respecto a 1LAG-NoMut (Tabla 12).

Ligando	1LAG-LTLV $\Delta G^{\text{elec}} - \Delta G^{\text{elec}}_{\text{NoMut}}$ (kcal/mol)	1LAG- LXXX $\Delta G^{\text{elec}} - \Delta G^{\text{elec}}_{\text{NoMut}}$ (kcal/mol)	1LAG- XTXX $\Delta G^{\text{elec}} - \Delta G^{\text{elec}}_{\text{NoMut}}$ (kcal/mol)	1LAG- XXLX $\Delta G^{\text{elec}} - \Delta G^{\text{elec}}_{\text{NoMut}}$ (kcal/mol)	1LAG- XXXV $\Delta G^{\text{elec}} - \Delta G^{\text{elec}}_{\text{NoMut}}$ (kcal/mol)
hsp	0.10	-0.70	1.48	0.02	-0.51
hse	1.21	0.66	0.53	0.01	-0.15
hsd	0.92	0.34	0.57	0.01	-0.21
TOTAL	2.23	0.31	2.57	0.04	-0.86

Tabla 12. *Contribución electrostática de cada uno de los diferentes residuos mutados a la capacidad de la mutante para unir a la histidina*, calculada como $\Delta G^{\text{elec}}_{\text{Mutante}} - \Delta G^{\text{elec}}_{\text{NoMut}}$.

Los resultados sugieren que el residuo 120 (mutación Ser/Thr) es quien contribuye individualmente de manera más importante a la unión de la histidina. Este resultado es inesperado, ya que se ha sugerido que el residuo 52 es quien podría contribuir mayoritariamente a la diferencia de las afinidades⁽⁹⁾. El residuo 190 presentó una contribución despreciable y el residuo 193 presentó una contribución electrostática incluso desfavorable.

Sin embargo, ponderando las contribuciones electrostáticas mediante el uso de las poblaciones de los tautómeros de la histidina, se puede observar que: si bien a un pH de 6.0 la mutante individual del residuo 120 (1LAG-XTXX) muestra ser aún más favorable que la mutante en todos los residuos y la única favorable con respecto a 1LAG-NoMut. A pH 8.0 las mutantes independientes en los residuos 52 y 120 (1LAG-LXXX y 1LAG-XTXX) son significativamente más favorables que la proteína nativa, pero ninguna de estas mutantes independientes muestran ser tan favorable como la mutante en todos los residuos (1LAG-LTLV). Esto resalta la importancia de las diferentes interacciones electrostáticas provocadas por la presencia simultánea de los residuos 52, 120, 190 y 193 (**Tablas 13, 14, 15 y 16: apéndice; Figura 15**).

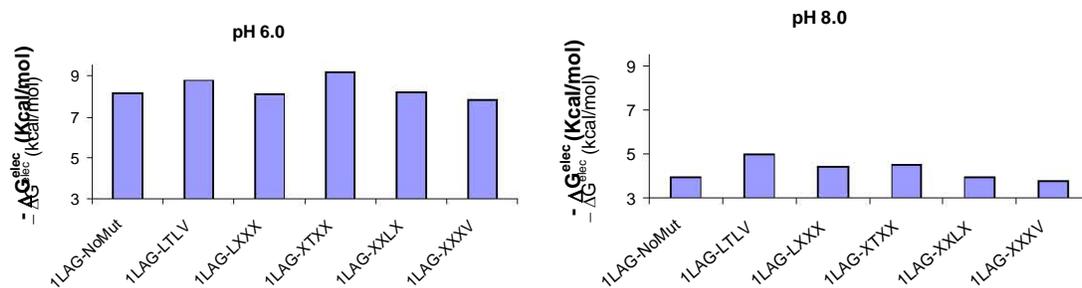


Figura 15. Gráficas comparativas de los ΔG electrostáticos de unión con la histidina de 1LAG-NoMut y las diferentes mutantes que se diseñaron in silico (nótese que las unidades de ΔG son negativas), los valores de ΔG han sido ponderados de acuerdo a sus poblaciones tautoméricas en dos pH distintos (6.0 y 8.0). (Datos provenientes de las Tablas 9, 10, 12, 13, 14 y 15).

CONCLUSIONES

- El potencial electrostático en la proteína LAO

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que los mapas de potencial electrostático de la proteína LAO corresponden a lo esperado para una proteína que une moléculas con carga formal positiva, es decir, que el sitio de unión y regiones contiguas presentan un potencial electrostático negativo que es complementario a la carga del ligando y que además parece formar una red de interacciones electrostáticas optimizada para la unión de los ligandos arginina, lisina e histidina. Esta característica se ve reflejada en valores de ΔG^{elec} favorables para la unión del ligando, que es una característica inusual para la interacción de proteínas con otras moléculas y podría ser parte de la explicación de las afinidades de orden nanomolar que presenta LAO por sus distintos ligandos.

- El estado abierto, el estado cerrado y el proceso de difusión

Este estudio apunta hacia que, a nivel electrostático, la interacción exitosa de los distintos ligandos con LAO está dada por un balance entre tres interacciones: la interacción con el estado abierto, las diferentes interacciones a lo largo del proceso de difusión y la interacción con el estado cerrado. Sin embargo, la correlación de los cálculos electrostáticos con las afinidades de unión por los distintos ligandos sugiere fuertemente que la interacción del ligando con la proteína en el estado abierto es fundamental para llevar a cabo el proceso global de unión del ligando y por lo tanto para la afinidad del mismo.

Las energías electrostáticas de los distintos ligandos en el estado cerrado presentan una buena correlación con los $\Delta G^{4^\circ\text{C}}$ correspondientes a las K_d reportadas experimentalmente (con excepción de los tautómeros de la histidina sin carga formal). Estos datos nos sugieren que la energía

electrostática del estado cerrado es determinante para la afinidad de unión de los ligandos y que su participación principal podría encontrarse en estabilizar el complejo “ligando-LAO^{estado_cerrado}”.

El papel de la difusión del ligando al sitio de unión parece no jugar un papel determinante en las distintas afinidades de unión de los ligandos con carga formal positiva, ya que las energías que se pueden observar a lo largo del proceso para los distintos ligandos es muy parecida. Sin embargo, este proceso de difusión es completamente distinto para las formas tautoméricas sin carga de la histidina, ya que, además de ser de menor energía, presenta una pequeña barrera energética que podría disminuir la tasa de difusión exitosa al sitio de unión de estos tautómeros sin carga, de manera que permite un punto de control adicional para el reconocimiento de los ligandos con la carga correcta.

Como conclusión de estos datos, podemos decir que, a nivel electrostático, el proceso de unión de los ligandos en LAO es un proceso que se ajusta al modelo electrostático discutido en la introducción:

- 1) Difusión exitosa del ligando hacia el sitio de unión.
- 2) Interacción favorable con el sitio de unión.
- 3) Estabilización exitosa del complejo proteína-ligando.

Este modelo podría explicar por qué LAO tiene una menor afinidad por la histidina con respecto a los otros L-aminoácidos con carga positiva, ya que quienes disminuirían la afinidad serían las formas tautoméricas de la histidina que no tienen carga y que en estas tres etapas mencionadas muestran energías mucho menos favorables en sus interacciones con respecto a su contraparte con carga formal positiva.

- LAO, HisJ y ROSETTA

ROSETTA en conjunto con el cálculo de los potenciales electrostáticos del estado cerrado nos ha permitido evaluar *in-silico* el efecto de mutaciones que no se han reportado en la literatura para la proteína LAO. Los resultados muestran una correlación que indica que es posible que la contribución de las mutaciones en LAO de los residuos 52, 120, 190 y 193 por los presentes en HisJ, sea la de una mejor interacción con los tautómeros de la histidina que no tienen carga. Los datos obtenidos, aunque de manera discreta, nos han permitido evaluar los papeles en conjunto y por separado de estas mutantes, dándonos pistas acerca del papel de estos residuos. Podemos concluir de estos resultados que la mutación de los cuatro residuos podría favorecer la unión de los tautómeros de la histidina sin carga, efecto que no se observa con la mutación independiente de cada uno de estos residuos. No obstante, estos datos no explican una afinidad menor por los ligandos arginina y lisina, por lo que es necesario implementar otras técnicas *in-silico* para poder evaluar el papel de estas mutantes en el estado abierto y en la difusión.

- Los potenciales electrostáticos como criterio de evaluación de diseños *in-silico* para la proteína LAO

Los resultados indican que los potenciales electrostáticos nos permiten evaluar a distintos niveles la interacción del ligando con la proteína, es decir: en el proceso de difusión, en la unión al estado abierto y en la interacción del estado cerrado. En conjunto muestran un patrón de congruencia en estos tres procesos para los ligandos de alta afinidad, por lo cual, proponemos que los potenciales electrostáticos pueden ser usados como parámetro de evaluación fino para diseños *in-silico* de la proteína LAO, sin embargo sería necesario realizar experimentos basados en las mutaciones analizadas para poder determinar la validez de estos resultados.

APÉNDICE

- *Métodos continuos (Poisson-Boltzmann) y contribuciones electrostáticas a la afinidad de unión*

La consideración de continuidad en la solvatación es uno de los métodos mas usados en años recientes para el cálculo de los potenciales electrostáticos. Su éxito se debe a su riguroso marco teórico que incluye la topología biomolecular y los efectos de las fuerzas iónicas.

La expresión canónica del potencial electrostático en una forma continua es la ecuación de Poisson:

$$-\nabla \cdot \varepsilon(x) \nabla \phi(x) = \zeta(x)$$

Donde $\varepsilon(x)$ es un coeficiente espacial variable de la dieléctrica, $\phi(x)$ es el potencial electrostático y $\zeta(x)$ es la distribución de carga que genera $\phi(x)$. El coeficiente dieléctrico $\varepsilon(x)$ típicamente asume diferentes valores para el soluto y el solvente, con el fin de reflejar las capacidades de polarización relativas de los medios. Para biomoléculas en un ambiente acuoso, generalmente se le asignan valores a ε para el soluto que van de 2 a 20 y de 80 para el solvente (si se considera que este es agua).

La distribución de las cargas $\zeta(x)$, normalmente tiene una definición discontinua que puede provocar dificultades numéricas para la solución de la ecuación de Poisson. En la ausencia de contra-iones móviles se trata a $\zeta(x)$ como una colección de funciones delta de Dirac, que modelan las cargas atómicas parciales del soluto N_f :

$$\zeta(x) = \zeta_f(x) = 4\pi e_c^2 \beta \sum_i^{N_f} z_i \delta(x - x_i)$$

Donde e_c es la carga del electrón, $\beta = 1/(\kappa_B T)$ es el inverso de la energía térmica, κ_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura, z_i son las magnitudes de las cargas atómicas parciales (en unidades de e_c), y x_i son las posiciones de las cargas parciales. La función delta de Dirac es una

distribución puntual con la propiedad $\int f(x)\delta(y-x)dx = f(y)$. La colección de constantes escalando las funciones delta asume implícitamente adimensionalidad en $\phi(x) = e_c\beta\Phi(x)$, donde $\Phi(x)$ es el potencial electrostático con las unidades deseadas.

La ecuación de Poisson-Boltzmann (PBE por sus siglas en ingles) es una variante de la ecuación de Poisson, donde se introducen cargas móviles de contra-iones a la función de distribución de las cargas en una forma de Campo Medio, $\zeta(x) = \zeta_f(x) + \zeta_m(x)$, donde $\zeta_m(x)$ denota la distribución de las cargas móviles. El Campo Medio o teoría de los electrolitos de Debye-Hückel, describe la distribución de cada una de las especies de los contra-iones i como $\rho_i(x) = \bar{\rho}_i e^{-z_i\phi(x)-V_i(x)}$, donde $\bar{\rho}_i$ es la concentración de las especies i , $z_i\phi(x)$ es la energía (adimensional) resultante de colocar un contra-ion con una carga parcial z_i en la posición x dentro del potencial $\phi(x)$, y $V_i(x)$ es la función estérica (adimensional) de energía que previene que las cargas móviles penetren en el interior del soluto. Esta representación permite que la función de distribución de cargas móviles de las especies de los contra-iones N_m , se escriba como:

$$\zeta_m(x) = 4\pi e_c^2 \beta \sum_i^{N_m} z_i \rho_i(x) = 4\pi e_c^2 \beta \sum_i^{N_m} z_i \bar{\rho}_i e^{-z_i\phi(x)-V_i(x)}$$

En el caso de una distribución monovalente 1:1 de los iones donde $V_1 = V_2$, la ecuación anterior se puede simplificar a $\zeta_m(x) = -\bar{\kappa}^2(x) \sinh \phi(x)$, donde el $\sinh x = (e^x - e^{-x})$ y el coeficiente está definido como $\bar{\kappa}^2(x) = \varepsilon_s e^{-V(x)} \kappa^2$. Aquí κ es el parámetro de Debye-Hückel definido para un

componente general N_m -electrolítico de la solución como $k = \frac{4\pi e_c^2 \beta}{\varepsilon_s \sum_i^{N_m} \bar{\rho}_i z_i^2}$ donde ε_s es la

constante dieléctrica del solvente. La función $\varepsilon^{-V_i(x)}$, es usualmente tratada como una función

característica discontinua, que es unitaria con el volumen accesible a los iones (típicamente un poco más grande que el volumen proteico). Por lo tanto la PBE para un electrolito monovalente es:

$$-\nabla \cdot \varepsilon(x) \nabla \phi(x) + \kappa^2(x) \sinh \phi(x) = 4\pi e_c^2 \beta \sum_i^{N_f} z_i \delta(x - x_i)$$

Para valores suficientemente pequeños de $\phi(x)$, la aproximación de $\sinh \phi(x) \sim \phi(x)$ es usualmente aplicada a esta ecuación para obtener la forma lineal de la PBE:

$$-\nabla \cdot \varepsilon(x) \nabla \phi(x) + \kappa^2(x) \phi(x) = 4\pi e_c^2 \beta \sum_i^{N_f} z_i \delta(x - x_i)$$

Todas estas ecuaciones se resuelven en conjunto con la condición de Dirichlet, que especifica el valor del potencial en el horizonte de algún dominio. Para un dominio lo suficientemente grande esta condición es típicamente cero o alguna forma asintótica de la solución.

La PBE define una energía electrostática que puede ser derivada de argumentos físico químicos⁽²¹⁾ o de aproximaciones al punto mínimo por teoría de campo. La energía libre es una función del potencial electrostático así como de las posiciones atómicas, cargas y radios. Para un electrolito monovalente 1:1, esta función tiene la forma:

$$G = \int \left[\zeta_f \phi - \frac{\varepsilon}{2} (\nabla \phi)^2 - \kappa^2 (\cosh \phi - 1) \right] dx$$

El primer término $\int \zeta_f \phi dx$ es la energía de insertar las cargas de la proteína en el potencial electrostático y puede ser interpretado como la interacción de las cargas fijas. El segundo término $-\int \frac{\varepsilon}{2} (\nabla \phi)^2 dx$, representa las perturbaciones en el medio dieléctrico. Finalmente, el tercer término incluye los efectos de la configuración de las cargas móviles y puede ser interpretada en términos del exceso de la presión osmótica del sistema. La substracción de una unidad de la exponencial en estos términos provoca un exceso de presión osmótica y es necesario que la energía

se desvanezca en la ausencia de un potencial. Como en la PBE, esta expresión de energía puede ser linearizada para una ϕ suficientemente pequeña, asumiendo que el $\cosh \phi \sim 1 + \phi^2/2$. Esta forma linearizada de la energía provoca una simplificación adicional, la ley de Gauss permite que el segundo término se describa: $-\int \frac{\epsilon}{2} (\nabla \phi)^2 dx = \int \phi / 2 \nabla \cdot \epsilon \nabla \phi dx$ y resulta en dos expresiones equivalentes de la energía:

$$G = \frac{1}{2} \int [\zeta_f \phi] dx = \frac{1}{2} \int [\epsilon (\nabla \phi)^2 + \bar{\kappa} \phi^2] dx$$

Estas expresiones de la energía libre pueden ser usadas para una variedad de cálculos estadísticos en biomoléculas, incluyendo la determinación de constantes de unión, pKa y energías de solvatación. Estos cálculos se realizan usualmente de una serie de evaluaciones de la energía de Poisson-Boltzmann y después son analizados por ciclos de energía libre.

- Tablas

Distancia (Å)	Arg	
	ΔG^{elec} (kcal/mol)	ΔG^{coul} (kcal/mol)
0.00	-5.32	-215.52
1.41	-4.75	-197.13
2.78	-4.05	-180.43
4.40	-3.15	-153.72
5.50	-2.93	-147.62
6.87	-2.64	-140.73
8.17	-2.48	-139.19
9.54	-2.37	-136.82
11.18	-2.11	-122.61
12.48	-1.92	-112.85
13.80	-1.72	-102.38

Tabla 3

Distancia (Å)	Lys	
	ΔG^{elec} (kcal/mol)	ΔG^{coul} (kcal/mol)
0.00	-5.13	-212.61
1.41	-4.67	-196.36
2.78	-4.01	-179.19
4.40	-3.17	-153.94
5.50	-2.95	-148.31
6.87	-2.69	-142.85
8.17	-2.56	-142.43
9.54	-2.37	-137.50
11.18	-2.05	-120.51
12.48	-1.85	-110.23
13.80	-1.66	-100.12

Tabla 4

Distancia (Å)	ΔG^{elec} (kcal/mol)			ΔG^{coul} (kcal/mol)		
	hsp	hse	hsd	hsp	hse	hsd
0.00	-4.77	-1.70	-1.58	-194.27	-69.07	-58.72
1.41	-3.93	-1.49	-1.33	-174.08	-58.27	-45.68
2.78	-3.39	-1.19	-0.87	-154.46	-45.41	-30.11
4.40	-2.62	-0.57	-0.39	-132.78	-23.98	-12.59
5.50	-2.53	-0.41	-0.32	-128.77	-14.97	-6.43
6.87	-2.37	-0.34	-0.31	-126.28	-12.07	-6.34
8.17	-2.33	-0.37	-0.39	-127.63	-13.94	-10.29
9.54	-2.24	-0.41	-0.48	-126.01	-15.80	-14.99
11.18	-1.98	-0.39	-0.50	-114.36	-15.33	-17.28
12.48	-1.82	-0.35	-0.49	-106.20	-13.74	-17.14
13.80	-1.66	-0.32	-0.46	-97.70	-12.86	-16.73

Tabla 5

Tablas 3, 4 y 5. *Parámetros de interacción electrostática de la proteína LAO en el estado abierto con sus diferentes ligandos* (arginina (Tabla 3), lisina (Tabla 4) e histidina en sus tres formas tautoméricas (Tabla 5)), a través de una trayectoria de 13.8 Å desde el sitio de unión y hacia la entrada de la cavidad (como se muestra en la figura 6).

ILAG-LXXX	pH	$\Delta G^{4°C}$ (kcal/mol)	% de la especie	ΔG^{elec}	ΔG^{elec} ponderado	Suma del ΔG^{elec} ponderado
Hsp	6.00	-8.0	48.00	-12.15	-5.83	-8.10
Hse			52.00	-4.35	-2.26	
Hsd						
Hsp	8.0	---	1.00	-12.15	-0.12	-4.43
Hse			99.00	-4.35	-4.31	
Hsd						

ILAG-XTXX	pH	$\Delta G^{4°C}$ (kcal/mol)	% de la especie	ΔG^{elec}	ΔG^{elec} ponderado	Suma del ΔG^{elec} ponderado
Hsp	6.00	-8.0	48.00	-14.33	-6.88	-9.17
Hse			52.00	-4.40	-2.29	
Hsd						
Hsp	8.0	---	1.00	-14.33	-0.14	-4.50
Hse			99.00	-4.40	-4.36	
Hsd						

ILAG-XXLX	pH	$\Delta G^{4^\circ C}$ (kcal/mol)	% de la especie	ΔG^{elec}	ΔG^{elec} ponderado	Suma del ΔG^{elec} ponderado
Hsp	6.00	-8.0	48.00	-12.87	-6.18	-8.18
Hse			52.00	-3.86	-2.01	
Hsd						
Hsp	8.0	---	1.00	-12.87	-0.13	-3.95
Hse			99.00	-3.86	-3.82	
Hsd						

ILAG-XXXV	pH	$\Delta G^{4^\circ C}$ (kcal/mol)	% de la especie	ΔG^{elec}	ΔG^{elec} ponderado	Suma del ΔG^{elec} ponderado
Hsp	6.00	-8.0	48.00	-12.35	-5.93	-7.84
Hse			52.00	-3.67	-1.91	
Hsd						
Hsp	8.0	---	1.00	-12.35	-0.12	-3.76
Hse			99.00	-3.67	-3.63	
Hsd						

Tablas 13 (superior), 14 (media superior), 15 (media inferior) y 16 (inferior). Ponderación del ΔG^{elec} de interacción de la histidina con las distintas mutantes individuales: mutante en el residuo 52 (phe/leu) (**Tabla 13**), mutante en el residuo 120 (ser/thr) (**Tabla 14**), mutante en el residuo 190 (Tyr/leu) (**Tabla 15**), y la mutante en el residuo 193 (Asp/val) (**Tabla 16**), en el estado cerrado, con respecto a los porcentajes de las poblaciones tautoméricas presentes a dos diferentes pH (6.0 y 8.0).

BIBLIOGRAFÍA

1. Kang CH, Shin WC, Yamagata Y, Gokcen S, Ames GF, Kim SH. **Crystal structure of the lysine-, arginine-, ornithine-binding protein (LAO) from Salmonella typhimurium at 2.7-Å resolution.** J Biol Chem. 1991 Dec 15;266(35):23893-9.
2. Ames GF. **Bacterial periplasmic transport systems: structure, mechanism, and evolution.** Annu Rev Biochem. 1986;55:397-425.
3. Locher KP. **Structure and mechanism of ABC transporters.** Curr Opin Struct Biol. 2004 Aug;14(4):426-31.
4. Kustu SG, Ames GF. **The histidine-binding protein J, a histidine transport component, has two different functional sites.** J Biol Chem. 1974 Nov 10;249(21):6976-83.
5. Dwyer MA, Hellinga HW. **Periplasmic binding proteins: a versatile superfamily for protein engineering.** Curr Opin Struct Biol. 2004 Aug;14(4):495-504.
6. Quijcho FA. **Atomic structures of periplasmic binding proteins and the high-affinity active transport systems in bacteria.** Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1990 Jan 30;326(1236):341-51; discussion 351-2.
7. Adams MD, Oxender DL. **Bacterial periplasmic binding protein tertiary structures.** J Biol Chem. 1989 Sep 25;264(27):15739-42.
8. Oh BH, Pandit J, Kang CH, Nikaido K, Gokcen S, Ames GF, Kim SH. **Three-dimensional structures of the periplasmic lysine/arginine/ornithine-binding protein with and without a ligand.** J Biol Chem. 1993 May 25;268(15):11348-55. Erratum in: J Biol Chem 1993 Aug 15;268(23):17648-9.

9. Oh BH, Kang CH, De Bondt H, Kim SH, Nikaido K, Joshi AK, Ames GF. **The bacterial periplasmic histidine-binding protein. structure/function analysis of the ligand-binding site and comparison with related proteins.** J Biol Chem. 1994 Feb 11;269(6):4135-43.
10. Fukami-Kobayashi K, Tateno Y, Nishikawa K. **Domain dislocation: a change of core structure in periplasmic binding proteins in their evolutionary history.** J Mol Biol. 1999 Feb 12;286(1):279-90.
11. Nikaido K, Ames GF. **Purification and characterization of the periplasmic lysine-, arginine-, ornithine-binding protein (LAO) from Salmonella typhimurium.** J Biol Chem. 1992 Oct 15;267(29):20706-12.
12. Oh BH, Ames GF, Kim SH. **Structural basis for multiple ligand specificity of the periplasmic lysine-, arginine-, ornithine-binding protein.** J Biol Chem. 1994 Oct 21;269(42):26323-30.
13. H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne. **The Protein Data Bank.** Nucleic Acids Research. 2000 28; 235-242
14. Kerppola RE, Shyamala VK, Klebba P, Ames GF. **The membrane-bound proteins of periplasmic permeases form a complex. Identification of the histidine permease HisQMP complex.** J Biol Chem. 1991 May 25;266(15):9857-65.
15. Wade RC, Gabdouliline RR, Ludemann SK, Lounnas V. **Electrostatic steering and ionic tethering in enzyme-ligand binding: insights from simulations.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 May 26;95(11):5942-9.
16. Tan RC, Truong TN, McCammon JA, Sussman JL. **Acetylcholinesterase: electrostatic steering increases the rate of ligand binding.** Biochemistry. 1993 Jan 19;32(2):401-3.

17. Kangas E, Tidor B. **Charge optimization leads to favorable electrostatic binding free energy.** Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics. 1999 May;59(5 Pt B):5958-61.
18. Lee LP, Tidor B. **Optimization of binding electrostatics: charge complementarity in the barnase-barstar protein complex.** Protein Sci. 2001 Feb;10(2):362-77.
19. Sheinerman FB, Honig B. **On the role of electrostatic interactions in the design of protein-protein interfaces.** J Mol Biol. 2002 Apr 19;318(1):161-77.
20. Lee LP, Tidor B. **Barstar is electrostatically optimized for tight binding to barnase.** Nat Struct Biol. 2001 Jan;8(1):73-6.
21. Philip E. Bourne, Helge Weissig. **Structural Bioinformatics (Methods of Biochemical Analysis).** Ed. Wiley-liss, Inc., Hoboken, New Jersey. 2003. pp 427-476
22. Pokala N, Handel TM. **Review: protein design--where we were, where we are, where we're going.** J Struct Biol. 2001 May-Jun;134(2-3):269-81.
23. Holst M, Baker N, Wang F. **Adaptive multilevel finite element solution of the Poisson-Boltzmann equation I: algorithms and examples .** J. Comput. Chem. 2000. 21:1319-1342.
24. Park S, Yang X, Saven JG. **Advances in computational protein design.** Curr Opin Struct Biol. 2004 Aug;14(4):487-94.
25. Kortemme T, Baker D. **Computational design of protein-protein interactions.** Curr Opin Chem Biol. 2004 Feb;8(1):91-7.
26. Kuhlman B, Baker D. **Native protein sequences are close to optimal for their structures.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Sep 12;97(19):10383-8. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Nov 21;97(24):13460.

27. Kuhlman B, Dantas G, Ireton GC, Varani G, Stoddard BL, Baker D. **Design of a novel globular protein fold with atomic-level accuracy.** Science. 2003 Nov 21;302(5649):1364-8.
28. Lazaridis T, Karplus M. **Effective energy function for proteins in solution.** Proteins. 1999 May 1;35(2):133-52.
29. Dunbrack RL Jr, Cohen FE. **Bayesian statistical analysis of protein side-chain rotamer preferences.** Protein Sci. 1997 Aug;6(8):1661-81.
30. Handel TM, Williams SA, DeGrado WF. **Metal ion-dependent modulation of the dynamics of a designed protein.** Science. 1993 Aug 13;261(5123):879-85.
31. Desjarlais JR, Clarke ND. **Computer search algorithms in protein modification and design.** Curr Opin Struct Biol. 1998 Aug;8(4):471-5. Revisión.
32. Guex, N. and Peitsch, M.C. **SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling.** Electrophoresis. 1997. 18:2714-2723.
33. Feig M, Karanicolas J, Brooks CL 3rd. **MMTSB Tool Set: enhanced sampling and multiscale modeling methods for applications in structural biology.** J Mol Graph Model. 2004 May;22(5):377-95.
34. Dolinsky TJ, Nielsen JE, McCammon JA, Baker NA. **PDB2PQR: an automated pipeline for the setup, execution, and analysis of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations.** Nucleic Acids Research. 2004. 32:W665-W667.
35. DeLano, W.L. **The PyMOL Molecular Graphics System (2002)** on World Wide Web <http://www.pymol.org>
36. Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA. **Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 10037-10041 2001.

37. Rohl CA, Strauss CE, Misura KM, Baker D. **Protein structure prediction using Rosetta.**
Methods Enzymol. 2004;383:66-93.
38. Nathan Baker, <http://apbs.sourceforge.net/doc/tutorial/index.html>.
39. Sandeep Kumar, Ruth Nussinov. **Close-Range Electrostatic Interactions in Proteins.**
ChemBioChem. 2002;7: 604-617.