



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

DINÁMICA MOLECULAR DE LA
ENTRADA DEL SUSTRATO Y DE LA
SALIDA DE LOS PRODUCTOS DE LA
CATALASA-1 DE *NEUROSPORA CRASSA*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :
LAURA DOMÍNGUEZ DUEÑAS



Tutor: DR. ALEJANDRO SOSA PEINADO

MÉXICO, D. F.

Noviembre 2011



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.

DINÁMICA MOLECULAR DE LA ENTRADA DEL SUSTRATO Y DE LA SALIDA DE LOS PRODUCTOS DE LA CATALASA-1 DE NEUROSPORA CRASSA

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. Alejandro Sosa Peinado en el laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Alejandro Sosa Peinado	Facultad de Medicina, UNAM
Dr. Wilhelm Hansberg Torres	Facultad de Medicina, UNAM
Dr. Arturo Rojo Domínguez	Facultad de Medicina, UNAM

Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

Se reconoce la asesoría del Dr. Wilhelm Hansberg Torres del Instituto de Fisiología Celular para el desarrollo del proyecto.

Esta tesis fue defendida en examen presentado en noviembre del 2011.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Lorenzo Segovia Forcella	Facultad de Medicina, UNAM
Vocal	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres	Facultad de Medicina, UNAM
Vocal	Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Miguel Costas Basín	Instituto de Química, UNAM
Secretario	Dra. Adela Rodríguez Romero	Instituto de Biotecnología, UNAM

Índice general

Índice general	2
1 Introducción	7
1.1. La catalasa-1	12
1.2. Dinámica Molecular	14
2 Planteamiento del Problema	19
3 Hipótesis y Objetivos	21
4 Métodos	23
5 Resultados	25
6 Discusión	27
6.1. Estabilidad de las simulaciones	27
6.2. Generalidades del H ₂ O ₂ en la Catalasa-1	27
6.3. Canal Principal	31
6.4. Tiempos de residencia	33
6.5. Análisis de componentes principales y análisis de correlación	34
6.6. Intercambio de solvente y compuertas en el canal principal	41
6.7. Entradas y Salidas	49
6.8. Mutantes <i>in silico</i>	51
6.9. Cavidades <i>in silico</i>	52
6.10. Salida del O ₂ del sitio activo	55
7 Conclusiones	57
8 Perspectivas	59
A Réplicas	61
B Dinámica Molecular	63
B.1. Condiciones Periódicas de Frontera	63

B.2. El potencial del sistema, campo de fuerza.	63
B.3. La Dinámica molecular dirigida (SMD)	65
B.4. La desviación cuadrática media (RMSD)	65
B.5. Distribución Radial (RDF)	66
B.6. Análisis de Correlación	66
B.7. Análisis de componentes principales (PCA)	66
C Campo de fuerza del H₂O₂	69
D Programas desarrollados para el análisis del movimiento de H₂O o H₂O₂ en los canales de la CAT-1	71
D.1. Tiempos de residencia	71
D.2. Número de moléculas	71
D.3. Trenes de H ₂ O o H ₂ O ₂	71
D.4. Intercambio de H ₂ O o H ₂ O ₂	72
D.5. Entradas y salidas	72
Bibliografía	73

Resumen

Catalasa-1 es una enzima que cataliza la dismutación de H_2O_2 para dar O_2 y H_2O . Es homo-tetramérica y tiene sus sitios activos enterrados en el núcleo de la proteína. El peróxido de hidrógeno viaja por un canal de 45 Å de largo para llegar al sitio activo. A su vez el O_2 y el H_2O deben encontrar el camino de salida. Para encontrar el mecanismo de entrada y salida de reactivos y productos de la Catalasa-1 se realizaron simulaciones de dinámica molecular del tetrámero de la catalasa en diferentes condiciones: en agua, en una concentración 6 M de H_2O_2 y con los productos en el sitio activo. En las simulaciones se observó que la Catalasa-1 concentra H_2O_2 en la entrada y a lo largo del canal principal debido a que el H_2O_2 tiene una particular atracción a diferentes aminoácidos que se encuentran estratégicamente localizados en la puerta y a lo largo del canal principal.

En las simulaciones, se observó que el canal principal es la entrada de H_2O_2 al sitio activo y que el H_2O sale principalmente por el canal intercomunicante y el canal interfacial. Encontramos moléculas de agua saliendo del canal principal por el canal lateral pero este flujo no es lo suficientemente grande para sacar a las moléculas de agua que la catalasa requiere.

Encontramos un mecanismo de compuerta formado por dos pares de aminoácidos hidrofóbicos (V133-F170 and L134-F171) que impiden el flujo de moléculas que se dirigen al sitio activo. En la parte superior del canal principal, se localiza un asa con mucha movilidad y es responsable del movimiento de aguas en esta región. Al eliminar esta asa disminuye el flujo de aguas en la sección media del canal.

Abstract

Catalase has its heme active site deeply buried inside the protein. Its only substrate, hydrogen peroxide (H_2O_2), reaches the heme through a 45 Å long channel. Large-subunit catalases but not small-subunit catalases, have a loop that interrupts the major channel. Two accesses lead to a loop that opens the final section of the channel to the heme: gates from the R-related subunits are interconnected. Using molecular dynamic simulations of the tetramer of *Neurospora crassa* catalase-1 in a box of water or 6 M H_2O_2 , The number of H_2O_2 molecules increases at the surface of the protein and in the access to the gate and the final section of the channel. Accumulation of H_2O_2 in the channel and at the gates is caused by the distribution of amino acids that attract more H_2O_2 than water, which are localized at the protein surface, the gates and the channel.

In the simulations, we observed that the main channel is the entrance of H_2O_2 to the active site and that H_2O exits mainly by the interconnecting and interfacial channels. We found water molecules leaving the main channel through the lateral channel but this flow is not big enough to provide the turnover rates that have been observed experimentally.

We found a gate mechanism at the final section of the main channel—right before the active site—formed by two pair of hydrophobic amino acids (V133-F170 and L134-F171). This gate-mechanism will determine the flow of H_2O and H_2O_2 to the active site. When the gate is opened H_2O and H_2O_2 can access the active site and when it is closed any molecule can enter or exit the active site. In the upper part of the main channel we found a very flexible loop that may be responsible of move the solvent inside the channel.

Abreviaturas

- CAT-1 Catalasa-1
- ERO Especies reactivas de oxígeno
- PMF Potencial de Fuerza Promedio
- PCA Análisis de Componente Principal
- ns Nanosegundos
- TR Tiempo de residencia
- VDW Vaan der Waals
- LJ Lennard Jones
- SMD Dinámica molecular dirigida

Capítulo 1

Introducción

La molécula de dioxígeno, O_2 , es esencial para el metabolismo aeróbico. Sin embargo, esta molécula vital puede formar especies que son más reactivas que el dioxígeno en su estado basal de energía. Estas especies reactivas del oxígeno (ERO) son el superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($\cdot OH$), el oxígeno diatómico en singulete y el ozono (O_3) [1]. Algunas de estas EOR provocan daños a los componentes celulares y también juegan un papel importante en diferentes patologías y en el envejecimiento. En los organismos se han seleccionado múltiples sistemas antioxidantes que evitan la oxidación de las EOR. Entre ellos están las enzimas antioxidantes como las superóxido dismutasas, las peroxidasas y las catalasas [1]. Hay evidencia creciente de que algunas de estas EOR también son esenciales para la célula, pues tienen funciones relacionadas con la proliferación celular, la diferenciación celular, la traducción de señales y la apoptosis [1]. El laboratorio del Dr. Hansberg en el Instituto de Fisiología de la UNAM ha sustentado la hipótesis de que la diferenciación celular en microorganismos es una respuesta al estrés oxidante. Las catalasas son enzimas que se encargan de dismutar el H_2O_2 en O_2 y H_2O [24]. Las catalasas se encuentran entre las enzimas más eficientes a pesar de que enfrentan dos dificultades importantes para llevar a cabo su función: manejar un intermediario que es reactivo (el complejo I) y evitar la competencia del agua (55 M) con un sustrato a concentraciones milimolares.

¿Cómo se evita la competencia de las moléculas de agua con la del H_2O_2 ? ¿por qué se requiere un canal tan largo y estrecho para llevar las moléculas de H_2O_2 al sitio activo de la catalasa? ¿cómo entran y salen los productos de la reacción? La dinámica molecular es la mejor herramienta que tenemos hasta el momento para estudiar el funcionamiento a nivel molecular de proteínas. Por ello, estudiamos con este método las interacciones de la CAT-1 con las moléculas de agua, de H_2O_2 y de O_2 .

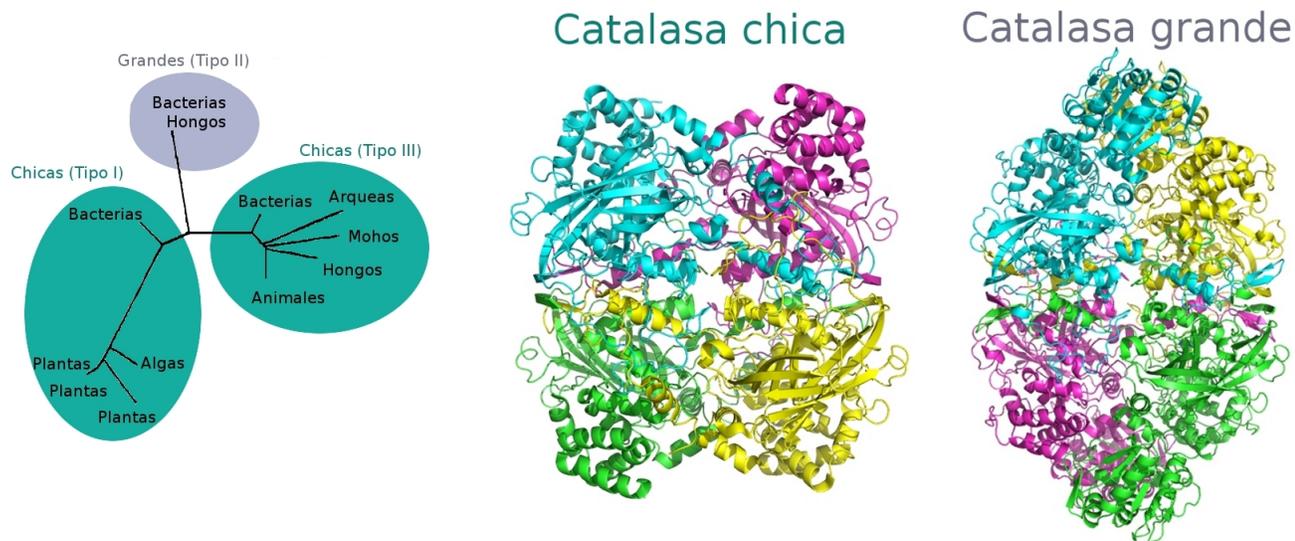


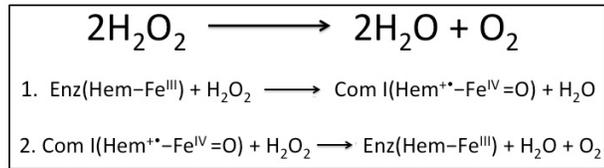
Figura 1.1: Clasificación de las catalasas. Árbol filogenético de las catalasas y su clasificación en base al número de aminoácidos que tienen —catalasas grandes en azul y catalasas chicas en verde—. A la derecha se muestran dos estructuras obtenidas mediante cristalografía de una catalasa chica de humano la de una catalasa grande de *Neurospora crassa*. Cada una de las subunidades de las catalasas se representan en diferentes colores.

Catalasas

Las catalasas se pueden clasificar en tres grupos basándonos en su filogenia: Las del primer grupo se encuentran en algas verdes y plantas, y tienen entre 55 y 69 kDa. las del segundo grupo se encuentran en archaea, bacterias y hongos, tienen un dominio adicional en el carboxilo terminal de 150 o más aminoácidos, el cual tiene parecido con la flavodoxina [24], por lo que resultan de entre 75 y 86 kDa. El tercer grupo de catalasas se encuentran en archaea, bacteria, hongos y animales y también tienen entre 55 y 69 kDa. Por consiguiente, con base en su tamaño se pueden clasificar a las catalasas del primer y tercer grupo como catalasas chicas y a las del segundo grupo como catalasas grandes. Las catalasas de subunidad grande a diferencia de las de subunidad chica no se inactivan con sustrato [4, 5].

Las catalasas llevan a cabo la disociación del H_2O_2 en dos pasos:

1. Una molécula de H_2O_2 se reduce, tomando dos electrones del grupo hemo para formar una molécula de agua y el compuesto I, que está formado por el ferroxilo y un radical catiónico porfirínico: (Hem-FeIV).



2. En el segundo paso, una segunda molécula de H_2O_2 se oxida al ceder dos electrones al compuesto I para formar una molécula de agua y una de oxígeno, restituyendo así el hem-FeIII.

Todas las catalasas tienen una estructura similar, son homotetraméricas y tienen un grupo hemo en el centro de cada subunidad. Las catalasas de subunidad chica, tienen una región de unión a NADPH. La estructura secundaria de las catalasas está muy conservada y sus estructuras cristalográficas se aprecia que su estructura terciaria y cuaternaria también están conservadas, particularmente alrededor del sitio activo. El hemo del sitio activo se encuentra enterrado en la proteína, de manera que el sustrato debe recorrer una distancia considerable para llegar a él.

Estructura de las catalasas

La estructura terciaria de las catalasas chicas se puede dividir en cuatro regiones y aumenta en una región más para las catalasas grandes por el dominio tipo flavodoxina del C terminal.

- La primer dominio consta de la región del amino terminal, tiene entre 50 y 120 aminoácidos según el tipo de catalasa. En todas las catalasas se pueden encontrar hélices α en este dominio.
- El segundo dominio está formado por una región de hebras β antiparalelos que forman el centro de cada subunidad. Las primeras cuatro hebras β se encuentran continuas y están separadas de las últimas hebras β por tres α hélices. Consta de ~ 250 aminoácidos. En las catalasas chicas esta región es la zona de unión de NADPH.
- Al tercer dominio se le llama wrapping domain o dominio enlazante, tiene ~ 110 aminoácidos y como su nombre lo dice enlaza dos subunidades de la catalasa. La estructura secundaria de este dominio es pobre.
- El cuarto dominio se llama α -helical domain, tiene 60 aminoácidos formando cuatro α -hélices continuas que junto a las hélices de la región de barriles- β estabilizan en gran parte su estructura. Esta región contiene al carboxilo terminal de las catalasas de subunidad chica.

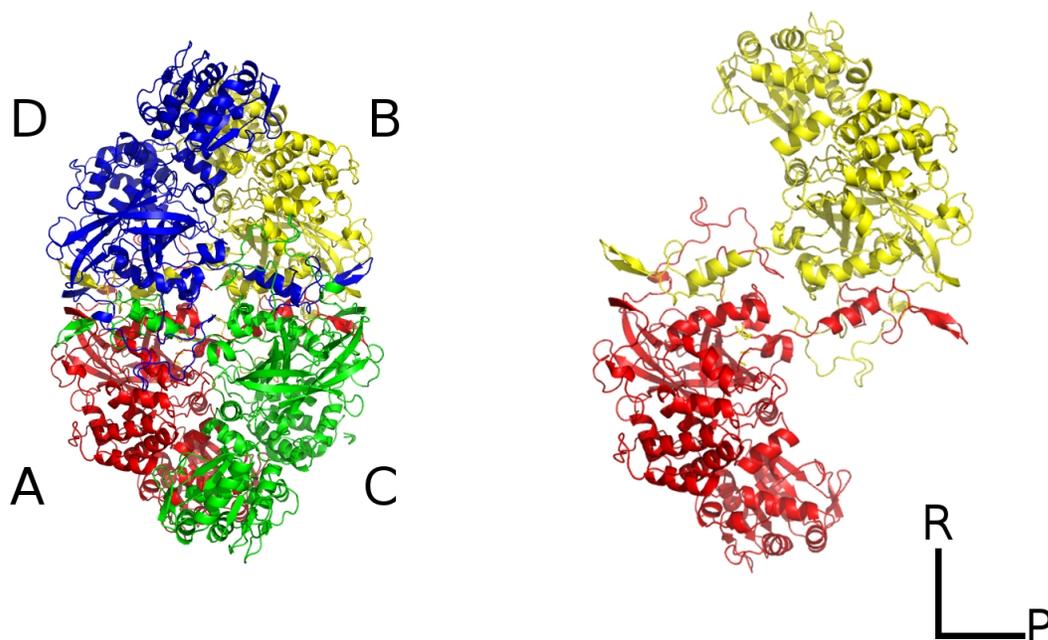


Figura 1.2: Estructura de las catalasas. A la izquierda se muestra la estructura cristalográfica del tetrámero de la CAT-1. Cada subunidad se representa en diferente color —A, B, C y D en rojo, amarillo, verde y azul—. A la derecha se representa la unión de dos dímeros. Como en otras catalasas, se definieron los ejes moleculares R y P.

- Las catalasas de subunidad grande tienen un último dominio con una estructura parecida a la flavodoxina que consiste en una estructura compleja de cuatro α -hélices y ocho hebras- β . Hasta la fecha, a este dominio sólo se le ha encontrado la función de estabilizar y proteger contra proteasas.

La estabilidad de las catalasas tiene que ver con la forma de enlace entre dos subunidades adyacentes. Estos dímeros están muy fuertemente asociados por el brazo del amino terminal de cada subunidad y el dominio enlazante de la subunidad adyacente.

Se han encontrado canales relacionados con la entrada del sustrato [1, 6] y con la salida de los productos de las catalasas siguiendo los trenes de moléculas de agua continuas y cercanas al sitio activo del cristal de la CAT-1. Estos cuatro canales se encuentran en todas las estructuras cristalográficas de catalasas determinadas a la fecha. En la figura 1 se muestra un croquis de los canales determinados en la catalasa-1.

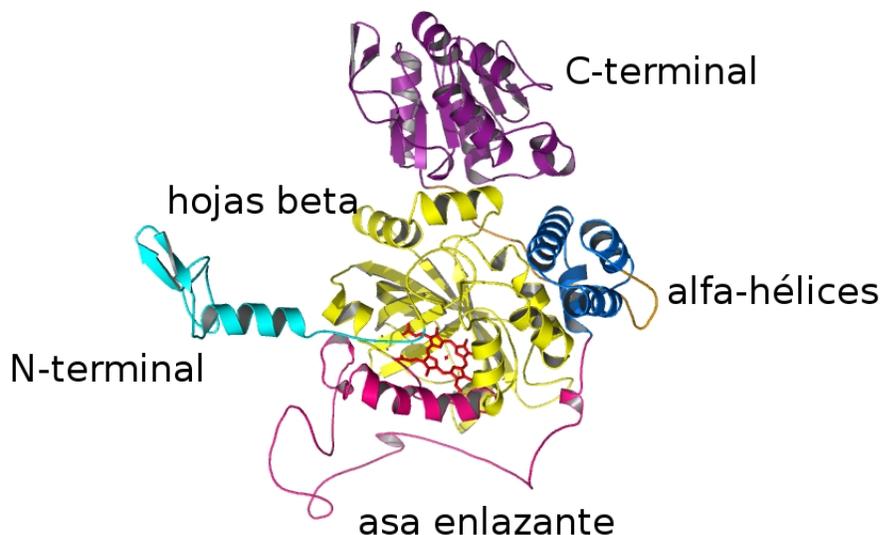


Figura 1.3: Dominios de un monómero de la CAT-1, N-terminal, asa enlazante, alfa-hélices, hojas beta y C-terminal —en cian, rosa, azul, amarillo y morado respectivamente—.

- El *canal principal* va del sitio activo a la superficie de la proteína y se ha propuesto como el canal que lleva el H_2O_2 al sitio activo. La modificación de aminoácidos en este canal principal afecta la cinética enzimática de las catalasas. Además, se han detectado moléculas de H_2O_2 en la entrada del canal principal y en el sitio activo en la densidad electrónica obtenida mediante cristalografía de variantes inactivas de la catalasa HP11 de *Escherichia coli* [16].
- El *canal central* va del sitio activo, pasando por la región cercana a uno de los propionatos del grupo hemo hasta la cavidad central del tetrámero de la enzima. En las estructuras obtenidas por cristalografía de distintas catalasas, este canal no se encuentra totalmente conectado al sitio activo [8].
- El *canal lateral* va de una región cercana al lado proximal del hemo hacia el sitio de enlace del NADPH en algunas catalasas pequeñas, este canal tampoco se observa conectado al sitio activo [8].
- El *canal menor* conecta la sección media del canal principal con la superficie de la proteína, pero no es permeable en todas las estructuras de catalasas [8].

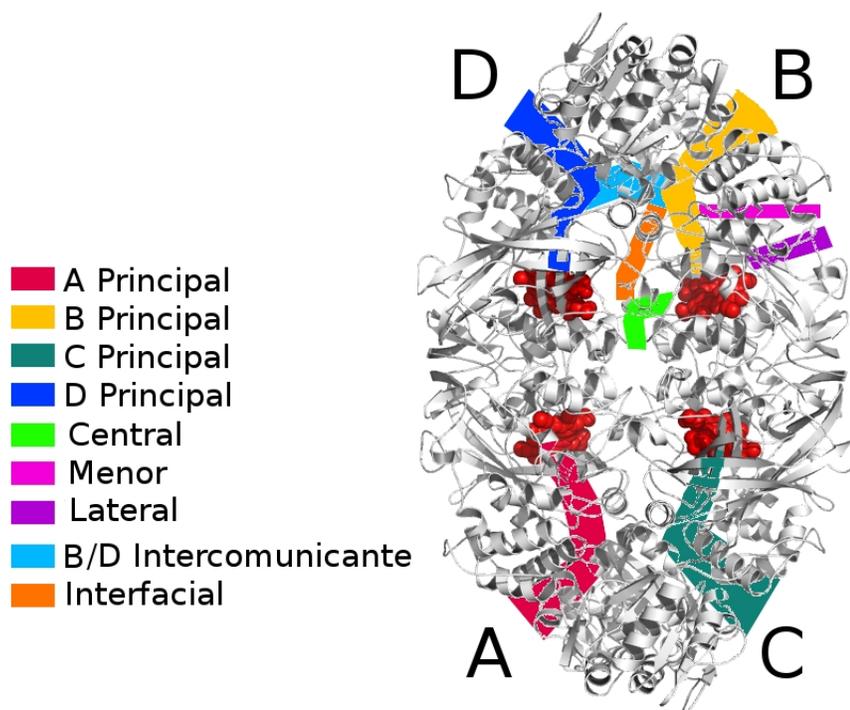


Figura 1.4: Croquis de los canales de la catalasa-1. El *canal principal* en cada subunidad se muestra en rojo, amarillo, verde oscuro y azul —para la subunidad A, B, C y D, respectivamente—. Los pequeños canales: *central*, *menor*, *lateral* e *interfacial* —en verde claro, rosa, morado y anaranjado, respectivamente— únicamente se muestran en la subunidad B. Y el canal *intercomunicante* entre B y D se muestra en color cian.

- En la estructura de la CAT-1 y de la CAT-3 se han descrito otros canales, como el *canal intercomunicante*, el cual comunica dos subunidades relacionadas en P y el canal interfacial localizado en la interface de las cuatro subunidades.

La función de estos canales se desconoce, salvo la del canal principal como la entrada del sustrato. No se sabe tampoco por dónde salen los productos. Es posible que salgan por varios canales [8].

1.1. La catalasa-1

La catalasa-1 (CAT-1) es una de las cuatro catalasas que se encuentran en *Neurospora crassa*. Es una catalasa de subunidad grande que está asociada con células que no crecen, como las de la fase de crecimiento estacionario y las esporas asexuales (los conidios) [9]. Se acumula en gran cantidad en los conidios,

por lo que se piensa que es particularmente importante para la germinación de los mismos sobre sustratos vegetales que generan superóxido y peróxido de hidrógeno.

La CAT-1 tiene una resistencia inusual a la inactivación con temperatura o con diferentes agentes desnaturalizantes [4, 8]. A diferencia de las catalasas chicas que se inactivan con el sustrato [4, 9], la CAT-1 presenta actividad incluso a concentraciones molares de peróxido de hidrógeno. Al incrementar la concentración del H_2O_2 la cinética de la CAT-1 muestra un comportamiento no Michaeliano con dos componentes y cooperatividad al menos en el segundo componente (Hill1.7) [9]. Es poco activa por debajo de 10 mM y no parece que se llegue a saturar a concentraciones molares de H_2O_2 . Las catalasas de subunidad grande a diferencia de las de subunidad chica tienen un asa adicional de cuatro aminoácidos a la entrada del canal principal [9].

La estructura de la CAT-1

La estructura cristalográfica de la CAT-1 [8] es típica de las catalasas grandes, el hemo se encuentra parcialmente oxidado y la tirosina, que hace enlace con el hierro del hemo, está unida covalentemente con una cisteína vecina. En la CAT-3 el hemo no se encuentra oxidado y la tirosina no forma un aducto equivalente. En la estructura cristalográfica de CAT-1 se localizaron cuatro canales —principal, auxiliar, lateral y central—. El canal principal es particularmente largo —45 Å— y es el encargado de llevar H_2O_2 al sitio activo [8], mutantes que incrementan la anchura del canal principal en *Sacharomices cerevisiae* disminuyen su actividad de catalasa e incrementan su actividad de peroxidasa [21]. Se ha descrito que el canal principal puede tener un potencial eléctrico que orienta a las moléculas de H_2O_2 hacia el sitio activo [5]. En la CAT-1, la entrada a este canal principal se interrumpe a nivel de la SER198 por su grupo hidroxilo. En la estructura cristalográfica de la CAT-3 el canal principal también se interrumpe en el mismo sitio con una treonina en vez de la SER198. Se ha propuesto [8] que: un grupo hidroxilo en esta posición puede funcionar como la compuerta hacia el sitio activo que impida el paso de H_2O_2 cuando su concentración sea muy baja y entonces se podría evitar la formación del compuesto I. Esta hipótesis está sustentada también en que se han detectado en los cristales inactivos de HPII moléculas de H_2O_2 en el sitio activo y en un asa que conforma la entrada a la última sección del canal principal. El canal central en la CAT-1 mide 16.8 Å y ha sido propuesto como el canal de salida del O_2 del sitio activo. El canal lateral en la CAT-1 tiene una longitud de 35.5 Å y su función permanece incierta.

El cristal de la CAT-1 tiene aguas cristalográficas en el canal principal. Las

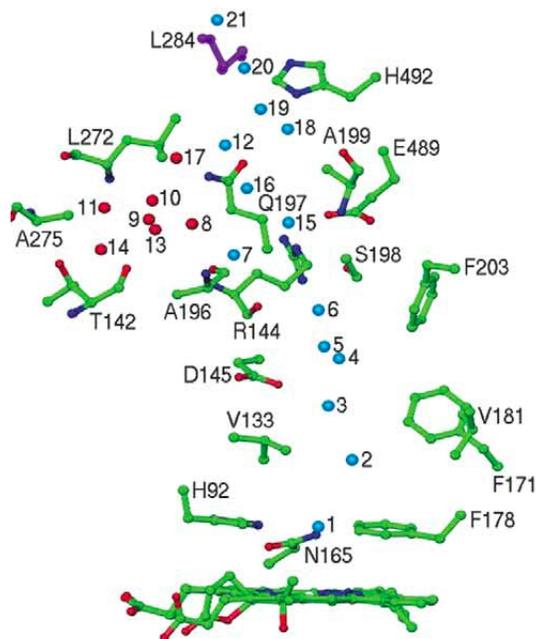


Figura 1.5: Aguas cristalográficas de la CAT-1 detectadas dentro del canal principal y numeradas conforme a su distancia al grupo hemo.

aguas W1, W2, W3 y W6 se han encontrado en otras estructuras de catalasas [16]. Las aguas W3, W4 y W5 están rodeadas por los aminoácidos F171, V133 y F170 se encuentran en una zona muy estrecha e hidrofóbica. El agua W6 se encuentra cerca del D145 y del asa donde se encuentra la S198. Las aguas marcadas en rojo son las aguas que se encuentran en una pequeña cavidad rodeada por los aminoácidos L272, A275, T142, A196 y Q197. La S198 interrumpe la continuidad del tren de aguas entre W6 y W7. Al mojar un cristal inactivo —de la catalasa grande de HPII— con H_2O_2 no se detectan las aguas W1, W2, W4 y W5 [16].

1.2. Dinámica Molecular

Las simulaciones de dinámica molecular son cálculos que se utilizan para estimar equilibrios y propiedades dinámicas de sistemas complejos que no se pueden calcular analíticamente [12, 13]. En una dinámica molecular se integran las ecuaciones de movimiento de Newton para obtener posiciones y velocidades de las partículas de un sistema con respecto al tiempo:

$$\frac{\partial^2 x_i}{\partial t^2} = \frac{F_{x_i}}{m_i} \quad (1.1)$$

La ecuación 1.1 describe la aceleración de una partícula x con una masa m y, por tanto, su futuro movimiento según la fuerza que se le aplique F . La fuerza F , que actúa sobre cada uno de los átomos, será la responsable del movimiento total del sistema y en dinámica molecular se obtiene a partir de fuerzas físicas que conocemos: Van der Waals, electrostática y enlaces químicos simulados mediante funciones de resortes clásicos. A la suma de estas interacciones que siente un átomo se le llama el **potencial del sistema** V . La fuerza se obtiene de la derivada del potencial (ecuación 1.2):

$$F = \frac{\partial V}{\partial x} \quad (1.2)$$

En la dinámica molecular de proteínas se usan las posiciones atómicas de la estructura cristalográfica como posiciones iniciales, las velocidades iniciales se establecen con la distribución de Boltzman y, posteriormente, se trata cada uno de los átomos como partículas clásicas.

Una vez establecidas las condiciones iniciales se calcula el potencial del sistema, se determina la fuerza, se resuelven las ecuaciones de movimiento para cada átomo de la proteína que van a determinar a su vez las nuevas posiciones y velocidades correspondientes al transcurso de un intervalo de tiempo. Estas nuevas posiciones y velocidades serán tomadas como iniciales para regresar a calcular el potencial del sistema. Esta secuencia de pasos hay que seguirla durante el tiempo que se quiera considerar en la dinámica.

El campo de fuerza

El potencial del sistema determina la calidad en una dinámica molecular pues representa a las interacciones físicas que se pueden observar experimentalmente y que comúnmente se denomina campo de fuerzas.

En dinámica molecular se consideran modelos atomísticos es decir, las contribuciones al potencial son debidas únicamente a las posiciones de los átomos. Esta suposición se basa en la aproximación de Born-Oppenheimer, la cual considera que los movimientos electrónico y el nuclear se encuentran desacoplados. Debido al tamaño de los sistemas y a que no se incluyen reacciones químicas en las dinámicas moleculares, esta aproximación se considera apropiada para describir al sistema [18].

El potencial del sistema se reduce a ecuaciones que se calculan como función de su posición en tres dimensiones (R). Estas ecuaciones deben incluir términos

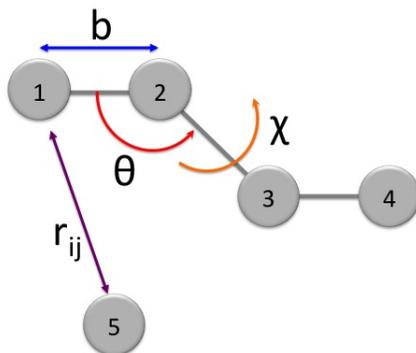


Figura 1.6: Representación de las interacciones de enlace entre pares, ángulos y dihedros (b , θ y χ en azul rojo y amarillo respectivamente) y las interacciones de no enlace: van der Waals y Coulómbicas entre los átomos 1 y 5 como función de la distancia r_{ij} (en morado)

que describan las interacciones físicas del sistema por lo cual se dividen en dos: interacciones de enlace e interacciones de no enlace.

$$V_{total} = \sum_{i=1}^N (V_{enlace} + V_{noenlace}) \quad (1.3)$$

Las **interacciones de enlace** son aquellas que describen átomos unidos y se calculan con la siguiente ecuación:

$$V(R)_{enl} = \sum_{pares} K_b(b-b_0)^2 + \sum_{angulos} K_\theta(\theta-\theta_0)^2 + \sum_{dihedros} K_\chi[1+\cos(\eta\chi-\sigma)] \quad (1.4)$$

en donde el enlace químico entre pares, b , está definido como un resorte, al igual que los ángulos entre tercias de átomos, θ . Las interacciones entre dihedros, χ , serán definidas con una función periódica [18].

Las **interacciones de no enlace** (Figura 1.6) dependen de la distancia entre los pares de átomos no enlazados (r_{ij} de la figura 1.6) y se dividen en dos partes: interacciones de van der Waals basada en la atracción-repulsión química entre dos átomos y que se describen con el potencial de Lenard-Jones representado en la ecuación 1.5 y las interacciones Coulómbicas o electrostáticas que se observan

entre átomos cargados (ecuación 1.6)[18].

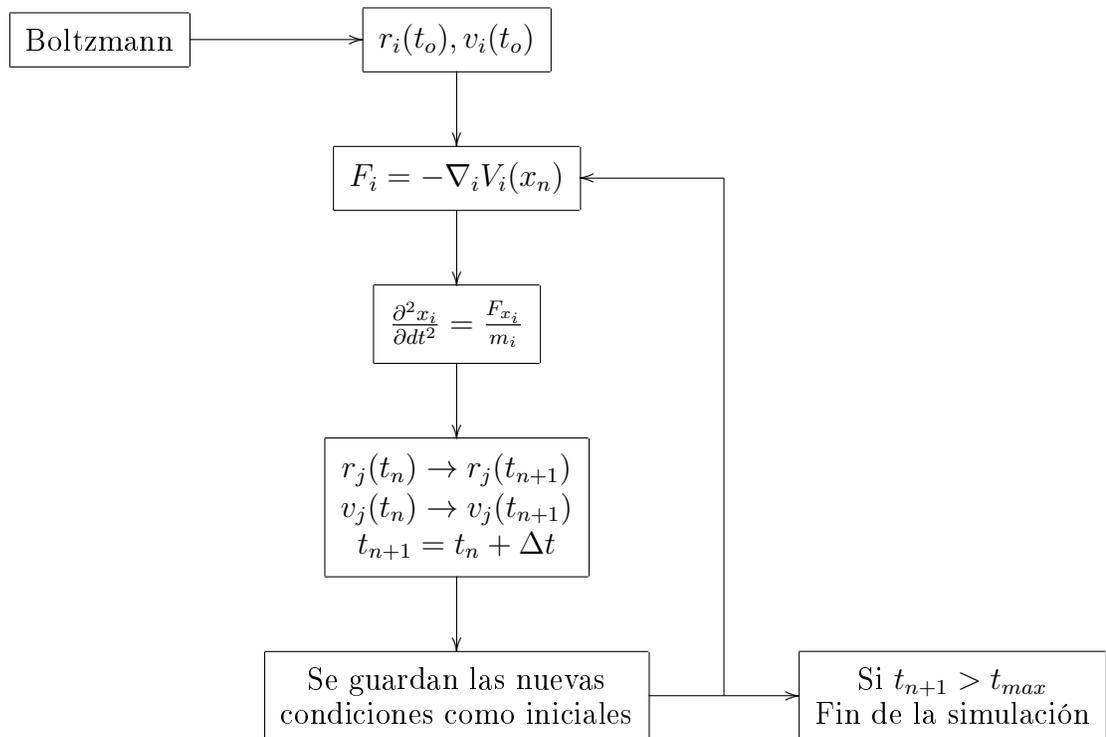
$$V_{vdW} = \sum_i \sum_{j>i} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (1.5)$$

$$V_{Coul} = \sum_i \sum_{j>i} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (1.6)$$

Estas interacciones de no enlace son muy importantes ya que constituyen la mayor parte de las interacciones del sistema, definen los puentes de hidrógeno y, por tanto, la estabilización de estructura secundaria en las proteínas.

Diagrama de una Dinámica Molecular

Una vez que se calcula la fuerza F a partir del potencial V , se resuelven las ecuaciones de movimiento para cada átomo de la proteína y, de esta forma, obtener para cada paso de tiempo las nuevas posiciones y velocidades del sistema.



El diagrama anterior muestra los pasos principales de una dinámica molecular: Es necesario establecer las posiciones y velocidades iniciales utilizando la distribución de Boltzmann, una vez que tenemos las condiciones iniciales, se calcula el potencial del sistema completo. Con este potencial V se calcula la fuerza

que actúa sobre el sistema y entonces se resuelven las ecuaciones de movimiento que van a determinar las nuevas posiciones y velocidades en un intervalo de tiempo. Estas nuevas posiciones y velocidades serán tomadas como iniciales para volver a calcular el potencial V . Esta secuencia de pasos se repiten para el tiempo que se quiera hacer la dinámica [18].

Capítulo 2

Planteamiento del Problema

La catalasa es una enzima que trabaja con una gran eficiencia y que lleva a cabo una reacción muy sencilla, sin embargo, su estructura es muy grande y compleja. Gracias a la estructura cristalográfica de la catalasa sabemos que sus sitios activos se encuentran enterrados profundamente dentro de la proteína, de forma que los reactivos tienen que viajar por largos y estrechos canales para que se lleve a cabo la catálisis. En cada subunidad de la catalasa encontramos un canal principal que se encarga de concentrar peróxido hacia el grupo hemo. No se ha entendido cómo es que la catalasa enfrenta dos dificultades para llevar a cabo su función:

1. Evitar que el compuesto I (que es un intermediario muy reactivo) reaccione con otras moléculas o con aminoácidos de la proteína para formar el compuesto II con lo que se inactivaría el sitio catalítico.
2. Evitar la competencia del agua que se encuentra a una concentración 55 M con un sustrato a concentraciones milimolares.

En este trabajo queremos entender:

- ¿Cómo entra el sustrato al sitio activo? ¿Cómo se selecciona el H_2O_2 sobre el H_2O ? ¿Cómo sale el agua de la última sección del canal principal? ¿Cómo salen los productos del sitio activo?

Capítulo 3

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

- El canal principal es fundamental para regular la entrada del sustrato al sitio activo de la catalasa-1, este canal principal deberá compensar la competencia de las moléculas de agua y evitar la formación del complejo I cuando no hay una segunda molécula de H_2O_2 disponible para que complete la reacción.
- Para evitar la competencia de las moléculas de agua, debe haber un mecanismo para sacar las moléculas de agua del canal principal y retener de manera preferente las moléculas de H_2O_2 . Para evitar la formación improductiva del compuesto I debe haber un mecanismo que regule la entrada del H_2O_2 al sitio activo.
- Dada la estrechez y longitud del canal principal y la velocidad de catálisis de la catalasa, los productos de la reacción saldrán por otros canales, como por el canal central o el canal menor.

Objetivos

El objetivo general de este proyecto es estudiar la entrada de su sustrato, el H_2O_2 , y la salida de sus productos, el O_2 y el H_2O de la Catalasa-1 de *Neurospora crassa*.

Los objetivos específicos son:

- Hacer simulaciones de la CAT-1 en una caja de moléculas de agua o de 6 M de H_2O_2 para identificar la conformación de los residuos del canal principal que conduce las moléculas de H_2O_2 al sitio activo.
- Hacer simulaciones de la CAT-1 en presencia de una concentración menor de H_2O_2 (30 mM) e identificar la conformación de los residuos del canal.
- Identificar el movimiento del sustrato dentro del canal y realizar un análisis de poblaciones para identificar las interacciones relevantes con las moléculas del sustrato y del agua.
- Hacer una simulación con dioxígeno en el sitio activo para identificar por dónde sale éste de la proteína.
- Realizar mutantes in silico de la catalasa para sustentar los mecanismos que se propongan para la entrada del sustrato y la salida del O_2 .

Capítulo 4

Métodos

Se construyeron los sistemas del tetrámero de la CAT-1 en H₂O y en 6 M de H₂O₂ con base en la estructura cristalográfica [8]. El sistema en H₂O quedó formado por 2,792 residuos (28,576 átomos en la proteína), 44 iones Na⁺ para neutralizar el sistema y 59,931 moléculas de H₂O, un total de 208,601 átomos en una caja triclínica con dimensiones de 11.99, 17.00 y 11.05805 (nm) —en x, y, z—. El sistema en 6 M de H₂O₂ se construyó de la misma forma y tiene 48,613 moléculas de agua y 5,468 de H₂O₂ en una caja de 11.932, 16.783 y 11.060 (nm) —en x, y, z—.

Los cálculos de dinámica molecular se realizaron en GROMACS 4.0.5 [20]. Se utilizó el campo de fuerza GROMOS(53a6) [17] y el modelo de agua *simple point charge* (SPC) [23]. Los iones Na⁺ se agregaron para neutralizar el sistema y moléculas de H₂O₂ en el exterior de la proteína a se pusieron a dos concentraciones: 0.03 M y 6 M. En todas las simulaciones se establecieron condiciones periódicas de frontera, presión constante de 1 atm controlada con el algoritmo de Berendsen [4] y una temperatura de 300 K controlada también con el termostato de Berendsen[4] con unas constantes de acoplamiento de 0.1 *ps*. Las interacciones de largo alcance se calcularon utilizando un radio de corte dual de 1.1 *nm* y 1.4 *nm*. Las interacciones electrostáticas a mayor distancia de 1.1 nm se calcularon con el algoritmo de *Particle Mesh Ewald* (PME). La constante dieléctrica empleada fue de 78 ϵ . Se minimizó el sistema utilizando el método de *Steepest Descent*. Se equilibró el solvente con la proteína fija durante dos nanosegundos antes de comenzar la simulación. Las velocidades iniciales se asignaron aleatoriamente, con una distribución de Boltzmann a 300 K. Las ecuaciones de movimiento se integraron utilizando el método *leap-frog* con un paso de tiempo de 2 fs. Todos los ángulos y las distancias de enlace se restringieron —a valores ideales— con el algoritmo LINCS.

Se utilizarlos las coordenadas correspondientes al *ns* 120 de la simulación en

H_2O_2 6 M —considerando que es una estructura en equilibrio— como la configuración inicial para construir tres mutantes: Mutamos las PHE170 y PHE171 por alaninas (Mutante FF) y truncamos el asa de la entrada a la última sección del canal principal: GLN195, ALA196, GLN197 y SER198 (mutante ASA) e hicimos una combinación de las dos mutantes anteriores (FF + ASA).

Para obtener los cálculos del potencial de fuerza promedio (PMF) se orientó el canal principal sobre un eje (x , y o z) de cada monómero equilibrado, se resolvió parcialmente cada sistema y en cada canal principal se llevó a cabo una dinámica molecular dirigida (SMD) de ~ 3000 ps a lo largo de la cual se recorrió una molécula de H_2O_2 y una molécula de agua que se encontrara cerca de la entrada a la sección final del canal principal [14]. A partir de la trayectoria de la SMD se generó la serie de configuraciones iniciales con las moléculas de H_2O o de H_2O_2 a lo largo del canal principal y separadas 1 Å. Posteriormente, se utilizó cada una de estas estructuras para iniciar una simulación de 3 ns con la posición de la molécula de H_2O o de H_2O_2 restringida, finalmente se extrajo la fuerza utilizada y se realizó un análisis de weighted histogram analysis method —WHAM— para obtener la curva de PMF.

Se realizaron cinco réplicas de 20 ns de la simulación en 6 M de H_2O_2 , utilizando como configuración inicial las coordenadas del sistema a los 90, 100, 110, 120 y 130 ns. Y además tres réplicas de 20 ns de la simulación en H_2O utilizando las coordenadas de la simulación a los 100, 110 y 120 ns. En todas las réplicas se reestablecieron las velocidades iniciales con base en una distribución de Boltzmann a 300 K.

Una parte del análisis de las simulaciones se realizó con la utilería de GRO-MACS. Para la visualización se utilizó VMD [11] y programas desarrollados en *tcl*, sin embargo, fue indispensable el desarrollo de varios programas en Python con las librerías de *Scipy*, *Numpy*, *Biopython* y *MdAnalysis* [22] para llevar a cabo la parte esencial del análisis de los resultados. El **Apéndice D** contiene el diagrama de flujo de los programas desarrollados.

Capítulo 5

Resultados

Se obtuvieron simulaciones de dinámica molecular del tetrámero de la CAT-1 en diferentes sistemas de H_2O y de H_2O_2 :

- 150 ns en agua
- 150 ns en concentración 6.2 M de H_2O_2
- Cinco réplicas de 20 ns del sistema 6M de H_2O_2 utilizando como configuraciones iniciales cuadros a 90, 100, 110, 120 y 130 ns y reasignando velocidades iniciales
- 50 ns en concentración 0.03 M de H_2O_2
- Tres réplicas de 20 ns del sistema de la CAT-1 en agua
- Para las curvas de PMF se obtuvieron simulaciones de 2 ns de la CAT-1 con una molécula de H_2O_2 o de H_2O fija a lo largo de la última sección del canal principal
- 7.20 ns de cada una de las 3 mutantes (FF, asa y FF+asa)

Capítulo 6

Discusión

6.1. Estabilidad de las simulaciones

Las **desviaciones cuadráticas medias** (RMSD) representan una medida de la diferencia entre los valores observados de las posiciones atómicas de una estructura durante la simulación con respecto a un valor de referencia [18]. Este cálculo se utilizó para analizar la estabilidad estructural de la proteína durante la simulación. En las simulaciones de CAT-1 sin y con H_2O_2 el RMSD se observa estable después de los 50 ns (figura 6.1).

Las **fluctuaciones cuadráticas medias** por aminoácido (RMSF) son medidas de la desviación estándar de las posiciones atómicas durante la simulación [18]. De esta forma se pueden comparar las vibraciones de la simulación con las vibraciones (factores B) obtenidos de la cristalografía de rayos X. Los cambios en el RMS o RMSF causados por agregar H_2O_2 son muy pequeños.

6.2. Generalidades del H_2O_2 en la Catalasa-1

En las simulaciones de CAT-1 con H_2O_2 la distribución radial (RDF, ver anexo A) del H_2O_2 es distinta a la distribución radial de H_2O . La concentración de H_2O_2 alrededor de la proteína es mucho mayor que en el bulto de agua, este resultado era esperado dado que se ha observado experimentalmente que el H_2O_2 es atraído hacia ambientes proteicos [6].

El H_2O_2 se colocó inicialmente en el exterior de la proteína. En la simulación se puede observar cómo se da la entrada de H_2O_2 en diferentes secciones del canal principal. La entrada en el acceso principal es casi inmediata: en menos de 5 ns la relación $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ aumenta casi el doble (~ 0.2) que en el bulto de la

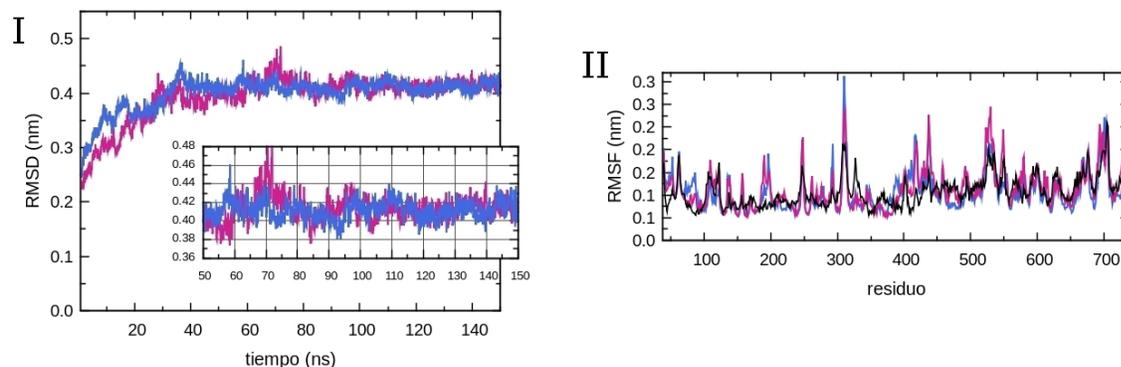


Figura 6.1: Estabilidad de las simulaciones. En la gráfica A, el RMSD de las simulaciones muestra que las simulaciones han llegado al equilibrio a los 50 ns. En la gráfica B, el RMSF de los carbonos-alfa muestra que las vibraciones atómicas de las simulaciones son similares a las vibraciones que se obtienen de los factores B del cristal. En azul se muestra la simulación de CAT-1 en agua, en magenta la CAT-1 en 6.2 M de H₂O₂ y en negro los factores B de la cristalografía.

simulación (0.12). En el acceso auxiliar al canal principal esta relación también se estabiliza a ~ 0.2 a los 20 ns. Para la última sección del canal principal la entrada es más lenta; sin embargo, a los 80 ns observamos la misma relación ~ 0.2 en todas las subunidades (estos resultados se describen detalladamente en el artículo publicado que se anexa al final de esta tesis [7]).

La mayoría de los aminoácidos atraen más al H₂O₂ que el agua; en particular los aminoácidos cargados GLU, ARG, LYS y ASP —que se encuentran en gran proporción en los canales— atraen más al H₂O₂ que al agua. Las HIS, PRO, TRP, MET y CYS también atraen más al H₂O₂ que al agua y son aminoácidos que se encuentran en gran proporción en la superficie de la proteína y en las entradas al canal principal. CAT-1 tiene más histidinas que la mayoría de las proteínas, por ejemplo, tiene cinco veces más HIS que cualquier proteína de *E. Coli* de las cuales el 78 % se encuentran en la superficie de la proteína y la entrada al canal principal.

Al mismo tiempo que el H₂O₂ es atraído más fuertemente hacia la proteína y en especial hacia sus canales, el recambio de moléculas de H₂O₂ dentro del canal principal de la CAT-1 es más lento que el recambio de moléculas de H₂O en el mismo canal [7]. Se desarrolló un programa en tcl para VMD que cuenta las aguas dentro del canal principal a lo largo de la simulación. Los resultados se resumen en la figura A.

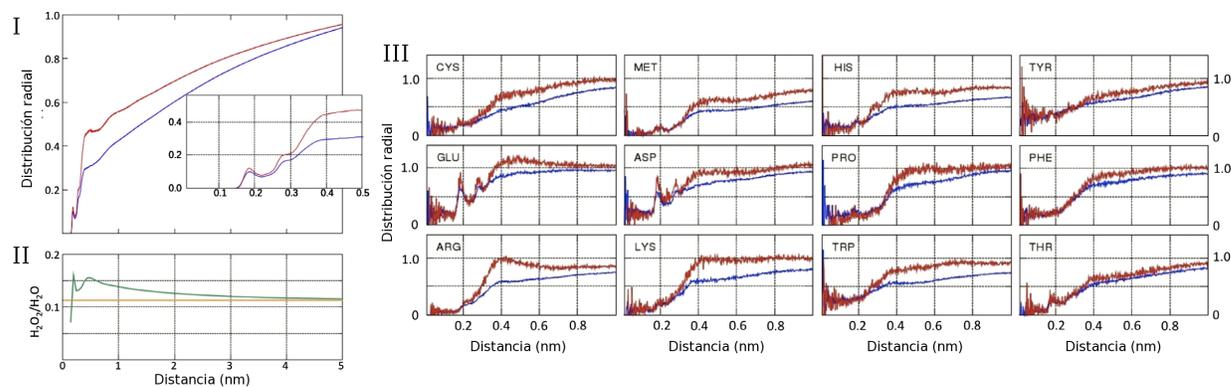


Figura 6.2: El H_2O_2 se concentra cerca (~ 0.4 nm) de la proteína. En la gráfica A se muestra la distribución radial de H_2O —en azul— y del H_2O_2 —en rojo—. En la gráfica B se muestra la relación $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ como función de la distancia a la proteína. En el conjunto de gráficas C se muestra la distribución radial de H_2O_2 y H_2O en algunos aminoácidos. —en todos los casos se muestra el promedio durante la simulación en equilibrio—.

Se ajustó una curva exponencial para calcular el tiempo de residencia y la vida media de agua y H_2O_2 en el canal. Para el H_2O el recambio es de 4.16 moléculas por nanosegundo y para el H_2O_2 de 20.19 moléculas por nanosegundo. Los tiempos de vida media ($t_{1/2}$) corresponden a 6.05 ns para el agua y 29.13 ns para el H_2O_2 . Esto indica que las moléculas de H_2O_2 se recambian cinco veces más lento que las moléculas de agua.

La distribución radial del agua en la última sección del canal principal tiene un comportamiento más particular, se observaron diferencias entre el RDF del agua y el del H_2O_2 . Encontramos que el agua se acerca más al sitio activo (2.5 \AA) que el peróxido (4 \AA) y que tanto el agua como el H_2O_2 no se encuentran distribuidas homogéneamente a lo largo del canal. La región sobre el canal principal que va de los 6 a los 8 \AA de distancia al Fe del grupo hemo no se encuentra poblada de aguas o de H_2O_2 .

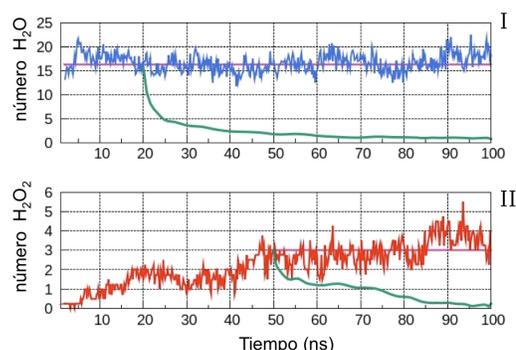


Figura 6.3: Recambio de H_2O y H_2O_2 . En la gráfica A se muestra el número de aguas en el canal principal en azul —promedio de todos los monómeros de la simulación con H_2O_2 —. La línea rosa corresponde al valor a los 3 ns de simulación y la línea verde la salida de las moéculas de agua que se encontraron a los 20 ns, es decir, de las moléculas de aguas que había cuántas quedan. En la gráfica B, se muestra —en rojo— el promedio de moléculas de H_2O_2 en el canal principal y, en verde, su salida a prtir de los 50 ns.

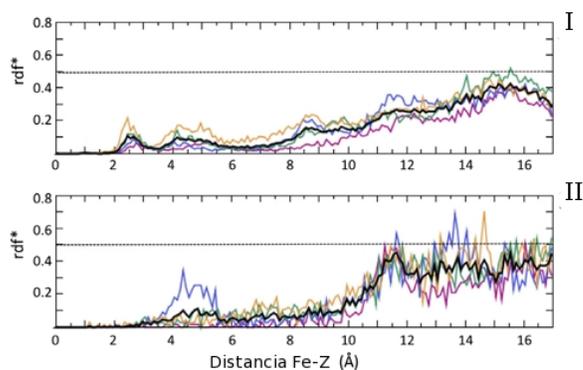


Figura 6.4: Moléculas de solvente en la última sección del canal principal. Para cada subunidad (A, B, C y D en rojo, amarillo, verde y azul respectivamente) y para el promedio de las cuatro subunidades (en negro) se muestra la localización de moléculas de H_2O (en el canal principal), como función de su distancia al Fe del grupo Hemo, durante la simulación 6 M de H_2O_2 en equilibrio —gráfica superior—. En la gráfica inferior se muestra la localización de moléculas de H_2O_2 también para cada subunidad y el promedio de las cuatro subunidades en la simulación en 6 M de H_2O_2 .

6.3. Canal Principal

En la hipótesis planteamos la existencia de compuertas que regulan la entrada del H_2O_2 al sitio activo. Estas compuertas tendrían que estar localizadas en el canal principal al final del cual se encuentra el sitio activo. Se ha propuesto el canal principal como el canal de entrada del sustrato al sitio activo [8].

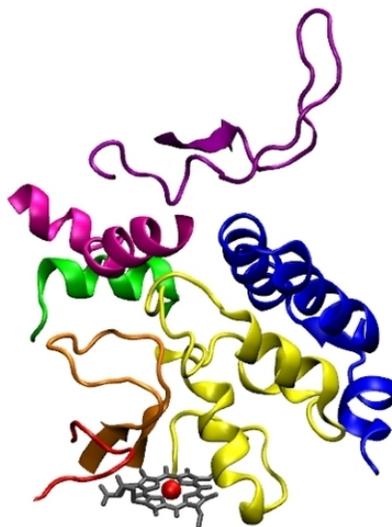


Figura 6.5: Canal principal. Estructura de los aminoácidos que conforman el canal principal, cada sección de aminoácidos contínuos esta representado en distintos colores —rojo, anaranjado, amarillo, verde, azul, rosa y morado— y los aminoácidos pueden ser localizados en la barra de colores de la parte superior de la gráfica de RMSF 6.6.

En este trabajo utilizamos un conjunto de aminoácidos que conforman al canal principal para hacer el análisis y al fondo se encuentra el hemo del sitio activo —imagen de la figura 6.5. En el asa en color rojo —del aminoácido 85 al 98— se encuentra la H92 que participa en la catálisis. En el asa en color anaranjado —del aminoácido 130 a 150— se encuentra la V133 y a la L134 que son parte de la sección hidrofóbica del canal y en su parte más alejada del sitio activo se encuentra la S132 que forma la entrada al canal intercomunicante y el canal interfacial. En la parte superior del canal se encuentra la α -hélice en verde —del aminoácido 265 al 280— que conforma la cara opuesta de la S132 y de la S198. En amarillo, se muestra del aminoácido 165 al 225, los primeros aminoácidos conforman la parte baja del canal, donde se encuentran la F170 y la F171, después se encuentra una α -hélice que forma parte de una pared del canal y al final se encuentra el asa de la entrada principal al canal, en esta asa se encuentra la S198. Después de esta asa siguen dos α -hélices que junto con las

α -hélices en azul forman las paredes de la región media del canal principal. En magenta y lila se muestran aminoácidos de la subunidad relacionada en el eje molecular P del cristal y que forman la boca del canal principal.

En la figura 6.6 se muestra el **RMSF** de los aminoácidos que conforman al canal principal para la simulación en H_2O_2 , en H_2O y la diferencia entre ambos. Se puede observar que la simulación en H_2O_2 tiene más movimiento que la simulación en H_2O .

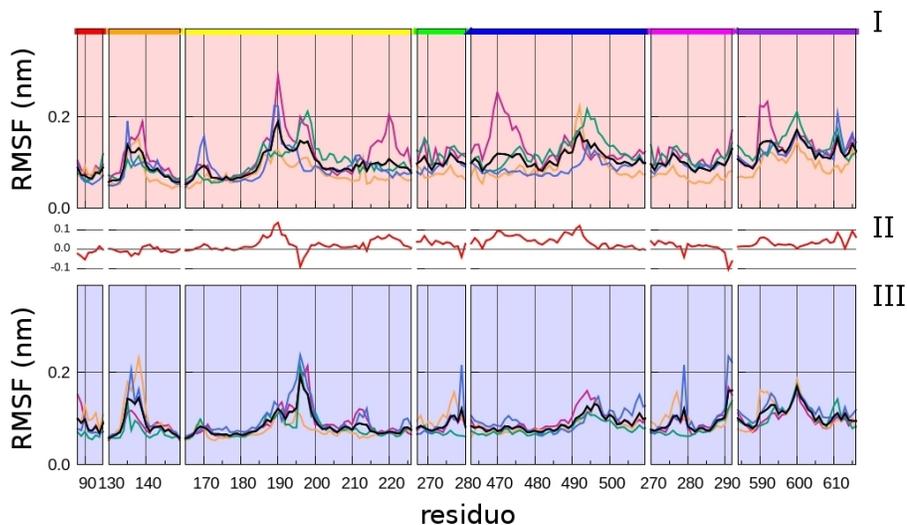


Figura 6.6: RMSF del canal principal. Las gráficas I y III muestran el RMSF de los últimos 100 ns de cada subunidad del canal principal para la simulación en H_2O_2 y en H_2O . Cada subunidad se muestra en distintos colores —rojo, amarillo, verde y azul para la subunidad A, B, C y D respectivamente— y en negro el promedio de las cuatro subunidades. La gráfica III muestra la diferencia de los promedios de ambas simulaciones. La barra superior en colores —rojo, naranja, amarillo, verde, azul, rosa y morado— representa al conjunto de aminoácidos mostrados en los colores de la figura 6.5.

En las gráficas de RMSF las regiones en donde se observa más movimiento corresponden a las asas. Estas asas además se encuentran en las posibles entradas o salidas al canal principal.

La diferencia del RMSF (gráfica II de la figura 6.6) muestra que el asa no se mueve igual en las simulaciones para H_2O_2 y para H_2O . En H_2O_2 se mueve más la primera parte del asa, HIS190 y en agua se mueve más en el GLN195. Una diferencia importante en el RMSF de las simulaciones también se observa cerca de la LEU490 en una pequeña asa que conforma la entrada al canal principal.

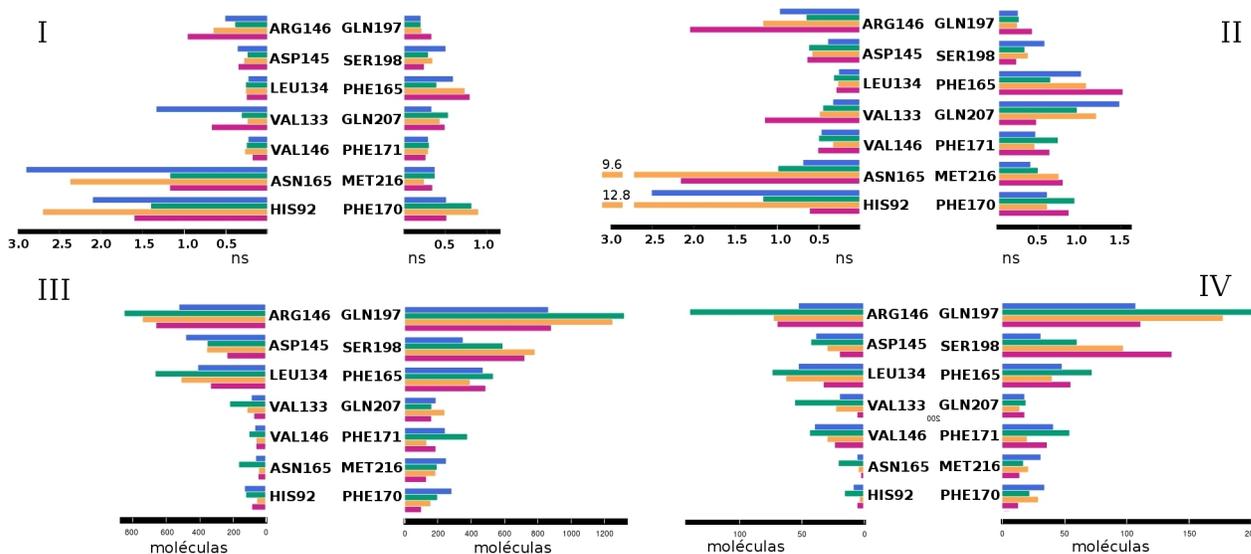


Figura 6.7: Las gráficas I y II muestran los tiempos de residencia de las moléculas de H_2O y de H_2O_2 , respectivamente, en las esferas de solvatación de los aminoácidos de la última sección del canal principal. Las diferentes subunidades (A, B, C y D) están representadas en colores rojo, amarillo verde y azul, respectivamente. Las gráficas III y IV muestran el número de moléculas que visitaron las esferas de solvatación con el mismo código de colores. La marca en rojo, al centro de cada gráfica, identifica zonas del canal donde se observa discontinuidad en el tiempo de residencia o el número de moléculas que visitan esa zona del canal.

6.4. Tiempos de residencia

Se calcularon los tiempos de residencia (TR) y el número de moléculas (NM) que visitan algunos aminoácidos del canal principal. El TR se define como el tiempo promedio que una partícula permanece asociado a un aminoácido. Para calcular el TR se desarrolló una programa en Python en el cual se buscan las aguas en la primer esfera de hidratación (4.0 \AA) de diferentes aminoácidos y se calcula su tiempo promedio de permanencia. Por otra parte, el número de moléculas que visitan la esfera de solvatación nos dice cuántas moléculas pasaron por ellas y nos puede dar una idea de la accesibilidad del solvente en distintos aminoácidos.

Los resultados de TR y de NM obtenidos en la simulación se muestran en la figura 6.7 donde se puede observar que los TR del H_2O_2 son en general mayores a los del agua. El comportamiento observado en el TR y NM era esperado,

ya que (como describimos en el primer artículo derivado de este trabajo [7]) el H_2O_2 es atraído más fuertemente que el agua hacia algunos aminoácidos, en especial hacia HIS, PRO, TRP, ARG, LYS CYS ASP y GLU. Estos aminoácidos, además, se encuentran en una gran proporción a lo largo del canal principal [7]. Experimentalmente también se ha observado que el peróxido de hidrógeno tiene mayores tiempos de residencia que el agua en ambientes proteicos; sin embargo, no se había detectado cuáles aminoácidos eran los responsables de este comportamiento [6].

De la gráfica de TR destacan los tiempos largos en la región del sitio activo: ASN165 e HIS92. El número de moléculas que visitan los aminoácidos indica dónde podrían existir algún tipo de selección o de compuerta. Por ejemplo, el número de aguas que visitaron por abajo de la LEU134 y la GLN207 (~ 200) es casi la mitad de las que visitaron la región de la ASP145-LEU134 y la SER198-PHE165 (~ 450). En cambio, arriba del asa de la SER198, en la región de la ARG146 y la GLN197, el número de moléculas que pasan es casi el doble que en el resto del canal. Para la simulación en H_2O_2 se observa una disminución del número de moléculas que visitan la última sección del canal pero no se ve tan marcada la diferencia como en la simulación con agua. Estos resultados coinciden con la hipótesis planteada: la compuerta es más permeable al H_2O_2 .

De la gráfica de TR destacan los tiempos largos en la región del sitio activo: ASN165 e HIS92. El número de moléculas que visitan los aminoácidos indica dónde podrían existir algún tipo de selección o de compuerta. Por ejemplo, el número de aguas que visitaron por abajo de la LEU134 y la GLN207 (~ 200) es casi la mitad (~ 450) de las que visitaron la región de la ASP145-LEU134 y la SER198-PHE165. En cambio, arriba del asa de la SER198, en la región de la ARG146 y la GLN197 el número de visitas es casi el doble. Para la simulación en H_2O_2 se observa una disminución del número de moléculas que visitan la última sección del canal, pero no se ve tan marcada la diferencia como en la simulación con agua. Estos resultados coinciden con la hipótesis planteada: la compuerta es más permeable al H_2O_2 .

6.5. Análisis de componentes principales y análisis de correlación

Las proteínas alostéricas son aquellas en las que un evento en un sitio de la proteína modifica su función o dinámica en otro sitio. Esta definición incluye, por ejemplo, las proteínas que sin sufrir un cambio conformacional sustancial muestran cooperatividad [7] [15]. En la CAT-1 se propone un movimiento coor-

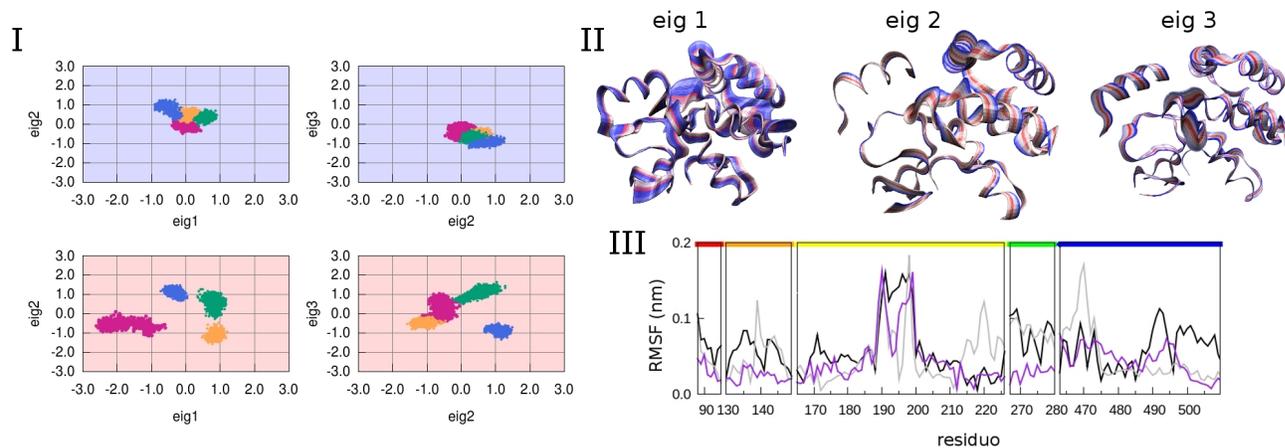


Figura 6.8: Análisis de componente principal. En la gráfica I se muestra la proyección en dos dimensiones de los primeros tres vectores normales o *eigen*-*vectores* de la simulación en agua (fondo azul) y en peróxido (fondo rojo) para cada subunidad en distintos colores A, B, C y D en rojo, amarillo, verde y azul, respectivamente. En la gráfica II se muestra el RMSF de los tres primeros componentes principales en rojo, azul y verde. Estos tres componentes representan el $\sim 60\%$ del movimiento del canal principal. En la parte superior de la gráfica se muestra la trayectoria de cada uno de los vectores normales o *eigen*-*vectores* en tonos de rojo para los primeros tiempos cambiando a blanco y a tonos de azul para los últimos tiempos de la simulación en equilibrio (del 50 al 150 nanosegundo).

dinado que abra o cierre una compuerta en la sección del canal principal, el cual se vería modificado por la presencia de H_2O_2 . No se observa un cambio sustancial en la estructura, sin embargo, sí hay pequeñas diferencias en el movimiento de las cadenas laterales del canal principal.

Para encontrar el movimiento coordinado o correlacionado en dinámicas moleculares de la CAT-1 utilizamos dos métodos: el primero es el **análisis de componentes principales** (PCA) [13] [19], el cual resuelve los movimientos correlacionados de la cadena principal de la proteína. El segundo es el **análisis de correlación** del movimiento de los ángulos en las cadenas laterales. Este análisis nos será de gran utilidad ya que se ha observado que un cambio en el rotámero de una fenilalanina puede impedir el flujo de H_2O o H_2O_2 en los canales estrechos [22].

El PCA descompone el movimiento en sus armónicos, lo cual permite identificar los componentes del movimiento con frecuencias distintas en sus vibraciones en un conjunto discreto de grupos vibracionales con frecuencias semejantes y

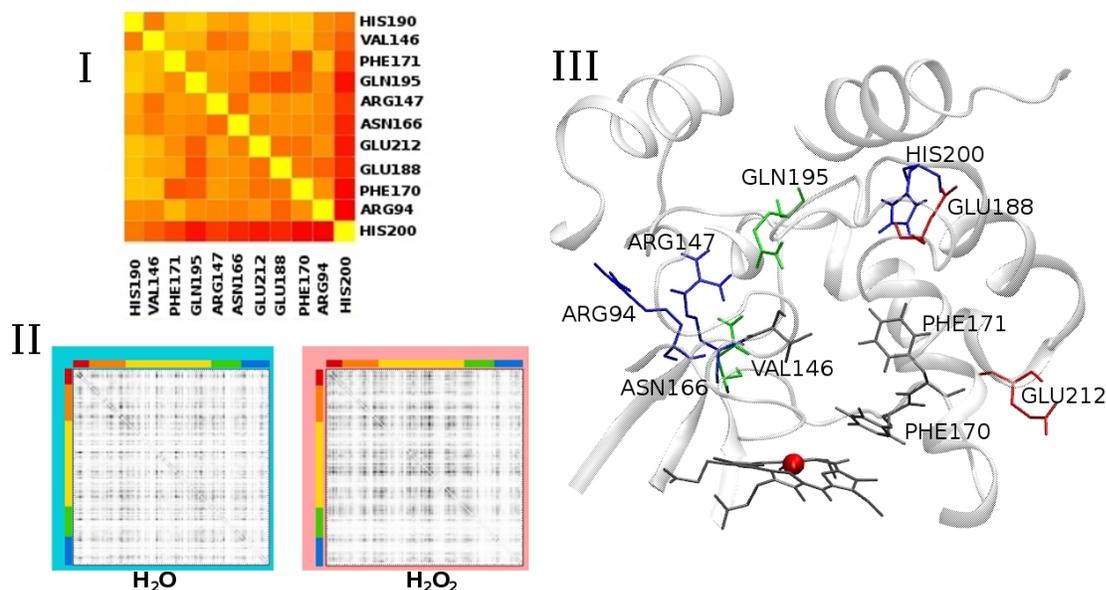


Figura 6.9: Análisis de correlación. En la gráfica II se muestran las matrices de correlación para agua (fondo azul) y peróxido (fondo rojo) alineadas por estructura. En la figura I se muestra la matriz con los diez aminoácidos más correlacionados en la simulación en H₂O₂. En tonos de rojo a amarillo se representan aminoácidos que muestran de mayor a menor correlación respectivamente. En la imagen III se muestra la estructura del canal y los 10 aminoácidos con mayor correlación.

que ocurren, por tanto, de manera cuasi sincrónica. La proyección del movimiento sobre estas frecuencias describe a las trayectorias de dinámica molecular en menos variables con la finalidad de simplificar el movimiento [19]: se determinan los modos de mayor amplitud, aquellos que describen la mayor cantidad de movimiento y, sobre ellos se proyectan las trayectorias obtenidas. Con este método se eliminan los movimientos estocásticos o no coordinados y que no contribuyen en el cambio de conformación que se quiere observar. Se calcularon los componentes principales del movimiento del canal y se escogieron los tres primeros porque representan la mayor cantidad de movimiento (figura 6.8).

En el **análisis de correlación** se analiza el movimiento de los ángulos diedros de la proteína durante la simulación —en equilibrio— para identificar aquellos pares de aminoácidos que tienen un movimiento relacionado. Jacobson *et. al.* [15] desarrollaron *MutInf* para identificar estadísticamente en una dinámica molecular la correlación del movimiento (rotámeros y ángulos) de los diferentes aminoácidos de una proteína (figura 6.9).

Los resultados del análisis del movimiento en el canal principal —figuras 6.8 y 6.9— nos indican que la mayor parte del movimiento del canal se concentra en la región del asa de la entrada y que además las cadenas laterales con mayor correlación también corresponden a aminoácidos del asa de la entrada (HIS200, GLU212, GLN195 y ARG147) con otros aminoácidos cercanos al sitio activo (ARG94, PHE170 y PHE171).

Los resultados de este análisis del movimiento del canal principal son:

- La simulación de la catalasa-1 en 6M de H_2O_2 tiene más movimiento que la simulación de la misma en H_2O .
- Se observa más correlación en los aminoácidos de la simulación en 6 M de H_2O_2 que en la simulación en H_2O .
- Los aminoácidos que muestran mayor correlación en el canal, también fueron identificados como los esenciales para el movimiento del solvente en la región del canal principal.
- El movimiento de los rotámeros de la PHE170 y la PHE171 —en ambas simulaciones— se encuentran muy correlacionados con el movimiento de los rotámeros de HIS162, GLU150 y GLN157, que pertenecen a la región del asa de la entrada al canal principal.
- Se encontró correlación entre los dos monómeros relacionados en el eje molecular P (lo cual puede hablar de cooperatividad entre canales vecinos).

Potencial de fuerza promedio (PMF)

A la energía de enlace $\delta G_{(enlace)}$ de un compuesto expresada a lo largo de una coordenada (ζ) se le llama potencial de fuerza promedio (PMF) [2]. Se calcula de una serie de simulaciones —que tienen como configuración inicial al compuesto en distintas posiciones a lo largo de ζ — en las que se restringe con un potencial armónico el movimiento del compuesto hacia la dirección de ζ con la finalidad de muestrear el espacio conformacional sobre la coordenada y la fuerza necesaria para mantener al compuesto en cada configuración. Con el Weighted Histogram Analysis Method (WHAM) [10] [2] [12] se extrae el PMF a lo largo de ζ :

$$W(\zeta) = -k_{BT} \ln \pi(\zeta) \quad (6.1)$$

donde ζ es la coordenada y π es la probabilidad de tener un valor particular.

Se calculó el perfil de energía para el paso de una molécula de H_2O por la última sección del canal principal de la subunidad C y la subunidad D —en verde y azul, respectivamente, en la gráfica II de la figura 6.10—. En ambas

curvas se puede observar una zona de mayor energía: entre los 4 y los 10 Å para la subunidad C y entre los 5 y 11 Å para la subunidad D. Esta zona de mayor energía en ambos casos corresponde a la sección hidrofóbica que se forma entre la F170-V133 y la F171-L134. Este tipo de análisis utiliza muchos recursos computacionales, es por eso que únicamente se calculó el PMF del paso de una molécula de H_2O en dos subunidades y en tres subunidades para moléculas de H_2O_2 .

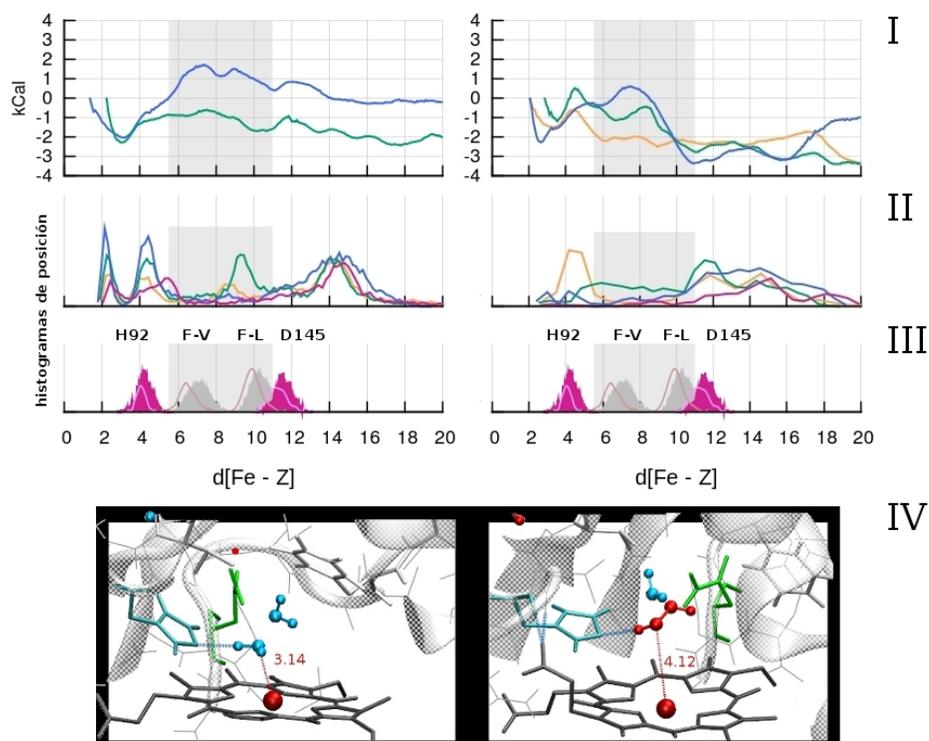


Figura 6.10: Potencial de fuerza promedio. En la gráfica II —izquierda— se muestra el PMF de H_2O para las subunidades C y D. A la derecha se muestra el PMF de H_2O_2 para las subunidades B, C y D. La gráfica III —izquierda— muestra el histograma de distancias de moléculas de H_2O al Fe del grupo hemo en el canal principal durante la simulación en equilibrio (para cada subunidad A, B, C y D, en rojo, amarillo, verde y azul, respectivamente) y a la derecha los mismos histogramas para las moléculas de H_2O_2 . En la gráfica C se muestra el histograma de distancia al Fe del grupo hemo de la H92, y de los pares F170-V133 y F171-V133 y del D145. En la imagen en I se representan las coordenadas de la región del sitio activo en presencia de H_2O y H_2O_2 (izquierda y derecha respectivamente).

El perfil de energía para el paso de H_2O_2 se calculó en las subunidades B, C

y D —amarillo, verde y azul, respectivamente en la gráfica II de la figura 6.10— en estas curvas se encontró que también la zona de mayor energía corresponde a la sección hidrofóbica de la última sección del canal principal.

Para relacionar estos resultados con la presencia de H_2O o H_2O_2 en el canal, se localizaron las moléculas de H_2O o H_2O_2 en esta última sección del canal principal para cada paso de tiempo y se calculó su distancia al Fe del grupo hemo (Fe-Z). Con estos datos de distancia se construyeron los histogramas de posición de H_2O o de H_2O_2 durante la simulación. Estos resultados se muestran en las gráficas B1 y B2 —para H_2O y H_2O_2 , respectivamente— en la gráfica III de la figura 6.10.

Los histogramas de posición de los aminoácidos H92, F170, F171, V133 y L134 se muestran en la gráfica IV de la figura 6.10. Estos histogramas se realizaron calculando la distancia mínima entre cada uno de estos aminoácidos al Fe del grupo hemo durante la simulación en equilibrio. Con esta información podemos relacionar la presencia de los aminoácidos hidrofílicos H92 y D145 con la presencia de agua en la gráfica de histogramas de posición de moléculas de H_2O y H_2O_2 . Y de la misma manera la posición de aminoácidos hidrofóbicos F170, F171 V133 y L134 coincide con la ausencia de H_2O y H_2O_2 en la última sección del canal principal y también con la zona de mayor energía en las curvas de PMF.

El análisis basado en el potencial de fuerza promedio sugiere que,

- Existe relación entre los perfiles de energía, los histogramas de posición de moléculas de H_2O y H_2O_2 y con la posición de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos en la última sección del canal principal: la zona encontrada con mayor energía para el paso de H_2O o H_2O_2 es poco afín a estas moléculas y además esta rodeada de aminoácidos hidrofóbicos.
- La región de menor energía en el sitio activo para el agua es más grande que la misma para el H_2O_2 . En concordancia en la gráfica de población de H_2O y H_2O_2 se observa una gran cantidad de agua en la región del sitio activo.

Puentes de hidrógeno a lo largo del canal principal

El H_2O_2 es una molécula más grande que el H_2O y forma puentes de hidrógeno más fuertes que el agua [1]. La formación de una red distinta de puentes de hidrógeno entre el H_2O y el H_2O_2 modifica de manera importante sus energías de unión a los canales de CAT-1.

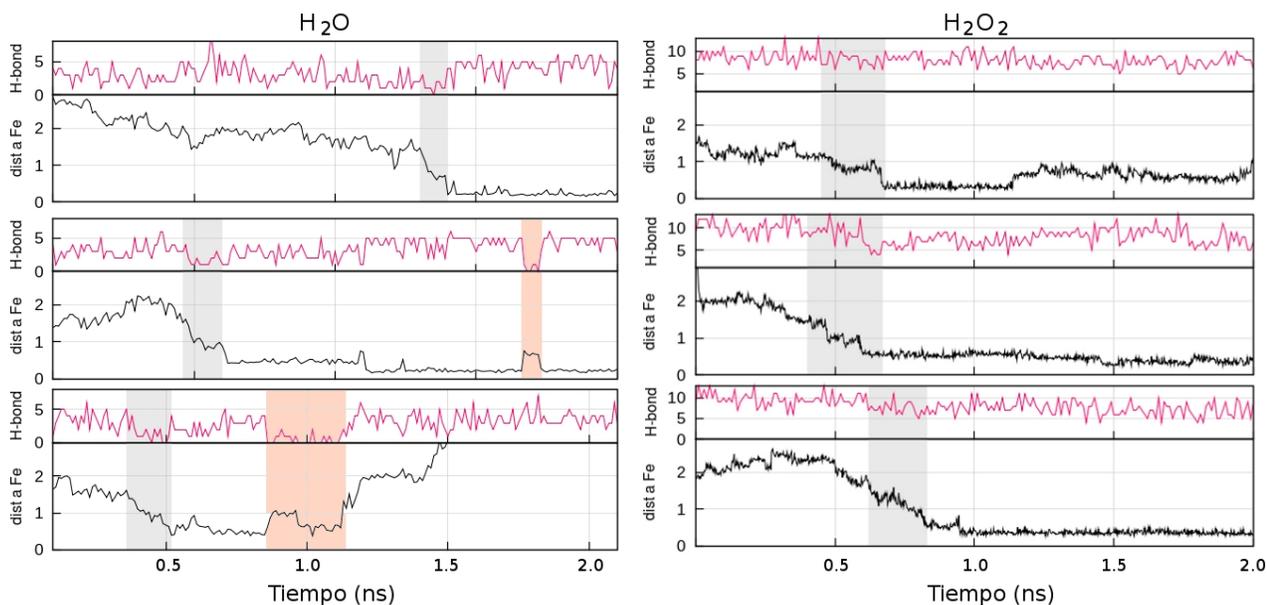


Figura 6.11: Capacidad para formar puentes de hidrógeno con el entorno. Los tres pares de gráficas del conjunto I corresponden a tres moléculas de agua que llegan al sitio activo. En la gráfica en rojo, se muestra el número de puentes de hidrógeno que puede formar cada agua con el resto del sistema y en negro la distancia, en nm, del agua al Fe que le corresponde. En las gráficas del conjunto II se muestra el mismo análisis en tres moléculas de peróxido que llegan al sitio activo. Las gráficas tienen la misma escala de tiempo (2 ns). El paso de moléculas por la sección hidrofóbica del canal se muestra en fondo gris. En fondo coral se muestran otros momentos donde las aguas pasan por la sección hidrofóbica. En cada gráfica, la imagen a la derecha muestra la trayectoria que recorre el agua o el H_2O_2 para llegar al sitio activo.

Hicimos el seguimiento de la capacidad para formar puentes de hidrógeno de una molécula de H_2O al pasar por el canal principal; los resultados se muestran en la figura 6.11. En la gráfica para agua, se puede observar que cuando la molécula de agua cruza la sección hidrofóbica —sección en fondo gris— disminuye su capacidad para formar puentes de hidrógeno, en cambio, cuando la molécula de agua se encuentra en el sitio activo, la capacidad para formar puentes de hidrógeno es mayor, los cuales, además se observan más estables que en el resto de su trayectoria por el canal. En la segunda molécula de agua ocurre lo mismo, y también se puede identificar un momento —en fondo color coral— en el que el agua intenta salir del sitio activo y pierde sus puentes de hidrógeno al acercarse a la sección hidrofóbica. En el seguimiento de la tercer molécula de agua (última gráfica para agua de la figura 6.11) se repite lo observado en las dos primeras: cuando cruza la sección hidrofóbica pierde puentes de hidrógeno.

En este caso también observamos la salida de la molécula de agua por el canal principal y que, cuando ésta vuelve a cruzar la sección hidrofóbica —en fondo color coral—, se repite la pérdida de puentes de hidrógeno. Estos resultados son esperados ya que en la región hidrofóbica las moléculas de agua no tienen cerca átomos donadores o aceptores para poder formar puentes de hidrógeno.

En el conjunto de gráficas II de la figura 6.11 se muestran los resultados del seguimiento de tres moléculas de H_2O_2 . Se puede observar que el H_2O_2 incrementa en un 25 % su capacidad para formar puentes de hidrógeno con respecto al H_2O ; esto se debe a que tiene un átomo de oxígeno más con gran capacidad para formar puentes de hidrógeno, también a que las cargas parciales de sus átomos son más grandes y además es más grande que el agua. Las moléculas de H_2O_2 pasan más lento por la sección hidrofóbica del canal y a su paso no pierden su capacidad para formar puentes de hidrógeno como se observó para el H_2O —como se observa más adelante en la figura 6.16—.

6.6. Intercambio de solvente y compuertas en el canal principal

Se construyó una aplicación en Python que localiza las moléculas de H_2O_2 o de H_2O dentro del canal y calcula su distancia al Fe del grupo hemo en cada paso de tiempo. Al graficar estos resultados como función del tiempo se obtienen las gráficas de **trenes de agua**. La gráfica de trenes de agua, se esquematiza y describe en la figura 6.12, cada círculo de la gráfica representa cada agua localizada a cierta distancia del Fe y en el canal principal.

En las figuras 6.14 y 6.15 se muestran los trenes de H_2O o H_2O_2 en el interior del canal y, el momento en el que se bloquea su paso al sitio activo. Estos resultados nos dieron la clave de cuál es la región que bloquea la continuidad de las aguas en el canal: la zona que se encuentra entre las F170 y F171, la V133 y la L134. Estos aminoácidos conforman una región hidrofóbica que puede impedir el flujo del solvente hacia el sitio activo.

Se calculó la distancia mínima entre los pares de aminoácidos V133-F170 y L134-F171 (Estos aminoácidos se esquematizan en la imagen de la figura 6.13). La distancia entre los dos pares de aminoácidos fluctúa en el límite de dejar o no dejar pasar una molécula alineada de agua ($\sim 5.2 \text{ \AA}$). Cuando la distancia entre los pares de aminoácidos —que llamamos compuerta de fenilalaninas— toma un valor menor a 5.2 \AA es decir, el acercamiento entre los pares de aminoácidos es máximo, definimos que la compuerta de fenilalaninas se encuentra **cerrada**.

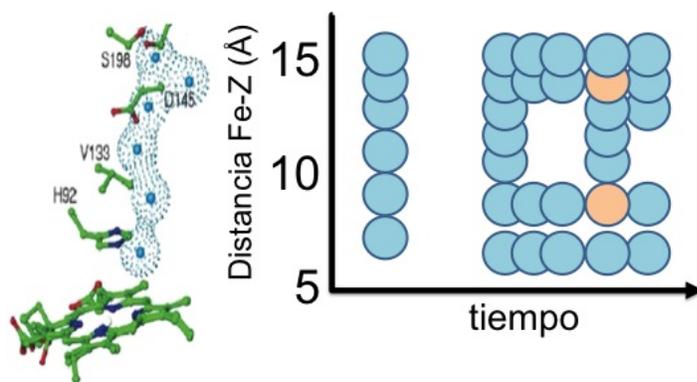


Figura 6.12: Trenes de agua. En la imagen se representa la orientación sobre el eje Z del canal y las aguas que se encuentran dentro. Cada círculo de la gráfica representa cada molécula (H_2O o H_2O_2) que se encuentra en el canal y, a la distancia al Fe que se muestra sobre el eje de las ordenadas (Y) en la gráfica. Cada punto en las abscisas, corresponde a las aguas que se encuentran en la última sección del canal principal a un tiempo determinado.

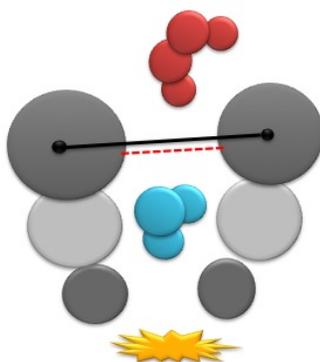


Figura 6.13: Análisis de distancias. Representación del cálculo de la distancia mínima entre los pares V133-F170 y L134-F171, los cuales definen una compuerta en el sitio activo.

En cambio, cuando esta distancia toma valores mayores de 5.2 \AA es decir, el acercamiento es menor, entonces definimos que la compuerta de fenilalaninas se encuentra **abierta**.

Las ocasiones en la simulación donde la compuerta se encuentra cerrada, coincide con la discontinuidad del solvente en la gráfica de trenes de agua (gráfica de trenes de agua y distancias en la figura 6.14). Es necesario que ambas compuertas —pares de aminoácidos (V133-F170 y L134-F171)— se encuentren *abiertas* —su distancia sea mayor a 5.2 \AA — para dejar libre el paso del solvente

hacia el sitio activo.

En el conjunto de gráficas de distancia (figuras 6.14 y 6.15) se puede observar que el movimiento de las dos compuertas de fenilalaninas está correlacionado, lo cual, además coincide con los resultados de correlación descritos previamente. En la estructura cristalográfica la compuerta de fenilalaninas se encuentra abierta.

Para cerciorarse que la entrada del solvente al sitio activo se da por la compuerta de las fenilalaninas, se calculó el *intercambio del solvente* en el canal. Para esto, se desarrolló un programa que cuenta el número de moléculas que entraron o salieron en diferentes regiones: la primera es la región del sitio activo —que definimos como el área que se encuentra pasando las compuertas de fenilalanina—. Cuando se observa intercambio en esta región, también se puede identificar que las compuertas de las fenilalaninas se encuentran abiertas (figuras 6.14 y 6.15). La segunda región, identifica el intercambio de solvente en la sección media del canal —definida como la sección que va de la parte superior de la compuerta de fenilalaninas a el asa de la SER198—.

El intercambio de moléculas en la región media del canal, es mayor al intercambio de moléculas en el sitio activo y, entre ellas, no se encuentra completamente relacionado excepto en algunas ocasiones, es decir, al aumentar el intercambio de moléculas en la región media del canal no necesariamente aumenta el intercambio de moléculas en el sitio activo. También se pueden identificar tiempos en los que si hay correlación en los intercambios, por ejemplo, en la simulación en H_2O en el monómero C entre los 5 y 15 ns, aumenta el intercambio en la región media del canal y también aumenta el intercambio en el sitio activo. Al mismo tiempo, la distancia entre las compuertas es mayor de 5.2 Å y el tren de H_2O es continuo a lo largo de la última zona del canal principal. Lo mismo se puede observar en el monómero D entre los 20 y los 40 ns y en el monómero A entre los 80 y los 120 nanosegundos.

En el conjunto de gráficas de trenes de solvente en la simulación en H_2O y en 6 M de H_2O_2 (Figuras 6.14 y 6.15) se observa un comportamiento similar: en algunos casos se observa continuidad en el solvente —compuertas en estado abierto— por ejemplo la mayor parte de la simulación en agua de la subunidad A —en rojo— o en la subunidad C en la simulación en H_2O_2 entre los 90 y los 150 ns. En otros casos se puede observar una discontinuidad en los trenes de agua —compuertas cerradas— por ejemplo, la subunidad B —amarilla— de la simulación en H_2O después de los 90 ns, en la subunidad C —verde— de la simulación con H_2O_2 entre los 20 y los 43 ns o de nuevo en la simulación con H_2O_2 pero para la subunidad A —roja— entre los 95 y 110 ns o para la subunidad D

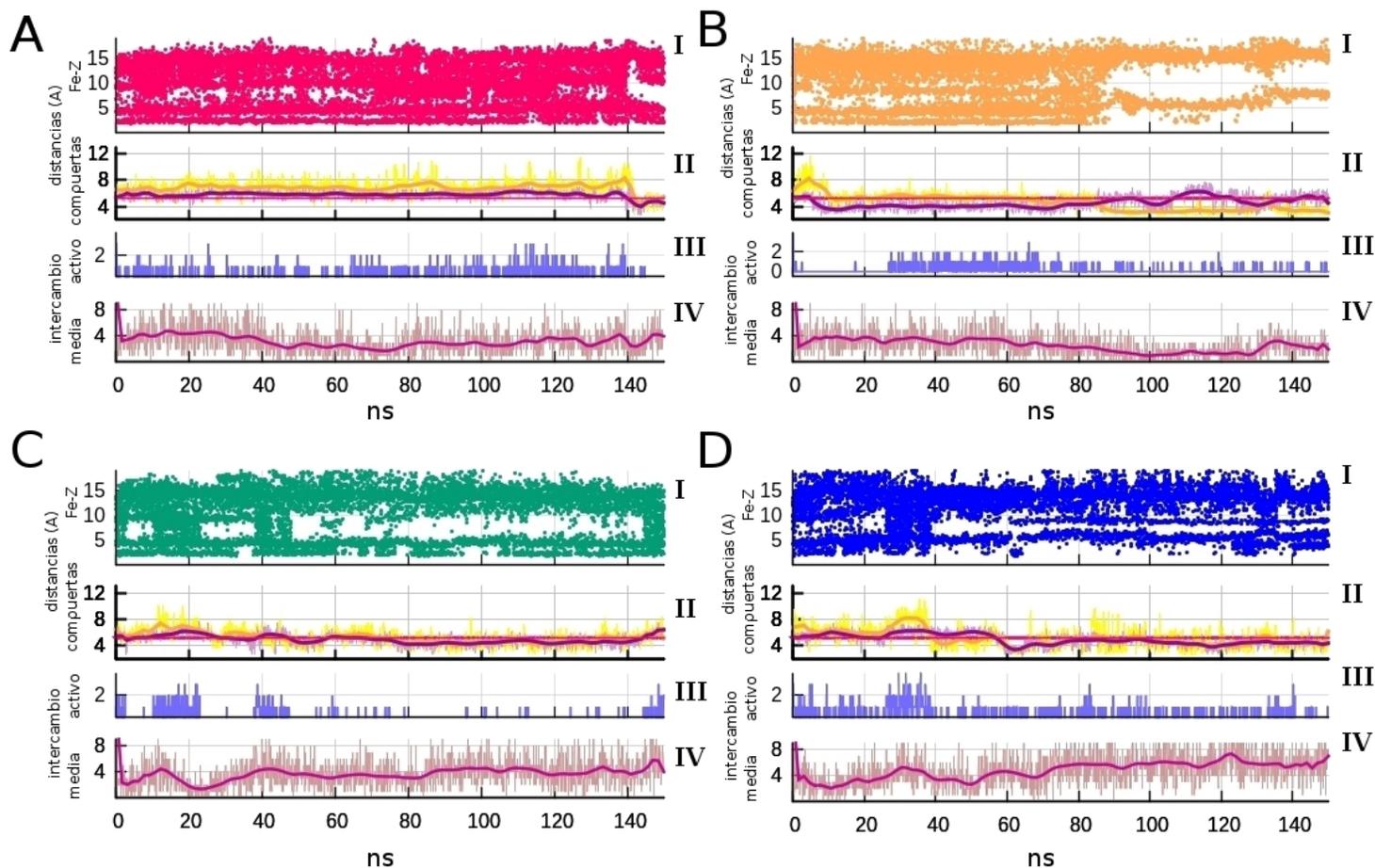


Figura 6.14: Trenes de agua, distancia en la sección hidrofóbica del canal y recambio de solvente en la simulación en H_2O . La gráfica I, muestra la distancia al sitio activo de las moléculas de agua que se encontraron en el canal principal con respecto al tiempo, cada punto representa una molécula de agua. Con esta gráfica se puede identificar si hay continuidad en el tren de aguas dentro del canal y también el momento en el que esta distribución cambia. La gráfica II, muestra la distancia de dos pares de aminoácidos que se encuentran en el canal, en amarillo el par V133-F170 y en magenta el par L134-F171. En la misma gráfica II la línea roja muestra la distancia a 5.2 \AA (la distancia mínima para dejar pasar una molécula de agua por el canal). La gráfica III muestra —en azul— el número de moléculas de solvente que se intercambiaron en cada paso de tiempo. Las gráficas IV muestran el intercambio de solvente en la sección media del canal. El mismo conjunto de gráficas se realizó para los diferentes monómeros A, B, C y D —en amarillo, verde y azul, respectivamente—. Todas las gráficas de la figura corresponden a la simulación de CAT-1 en agua.

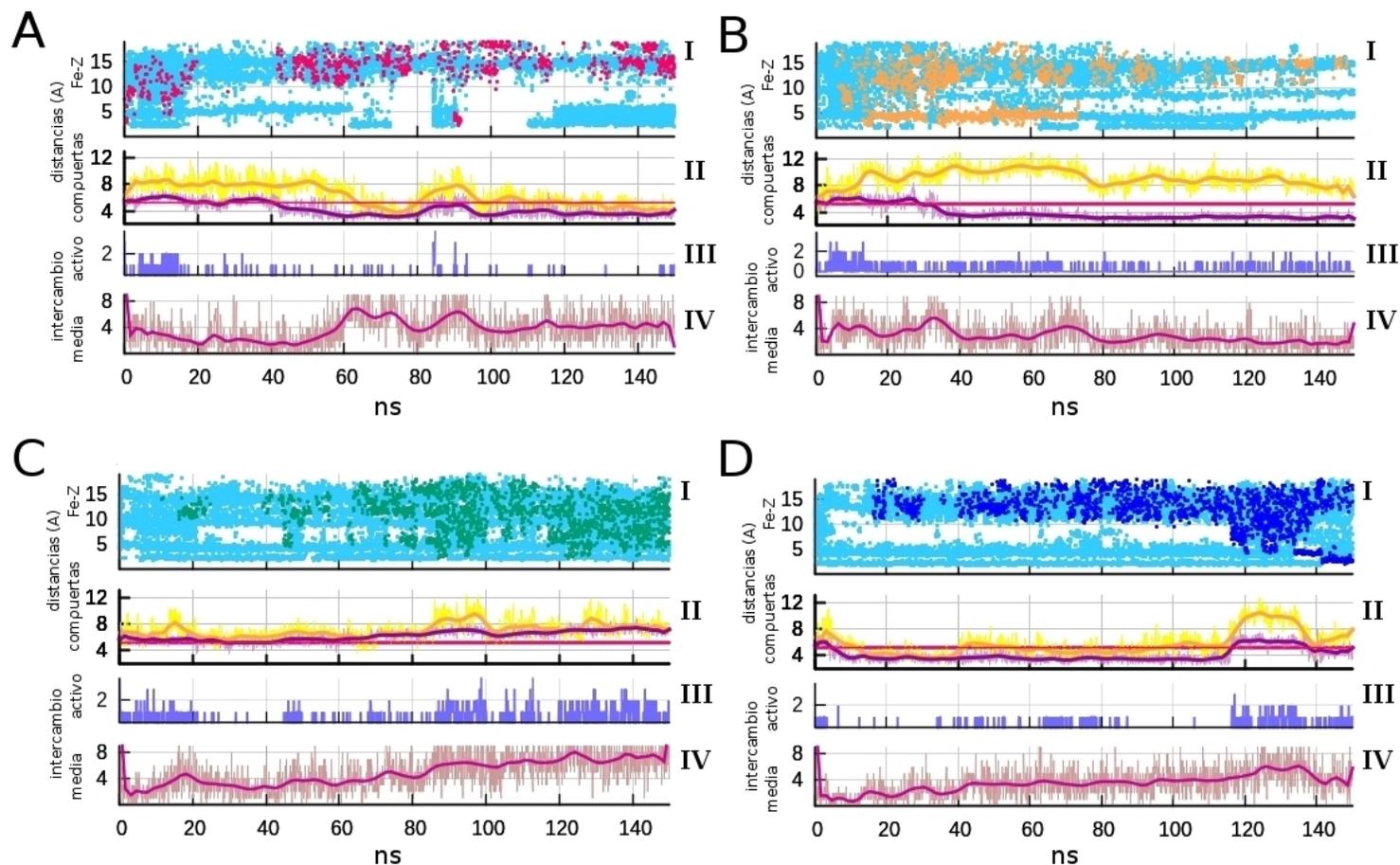


Figura 6.15: Trenes de agua (I), distancia en los pares V133-F170 y L134-F171 (II) y recambio de H_2O o H_2O_2 en el sitio activo y en la sección media del canal en la simulación en H_2O_2 . Este conjunto de gráficas muestra el análisis que se presentó en la figura 6.14 para la simulación de la CAT-1 en H_2O_2 . Las gráficas de trenes de agua ahora tienen dos colores: en azul claro se representan las aguas y en colores rojo, amarillo, verde el H_2O_2 en cada subunidad (A, B, C y D, respectivamente).

—en azul— entre los 10 y los 120 ns—.

La mínima distancia entre los pares F170-V133 y F171-L134 presenta más diferencias: en la simulación en agua el estado abierto o cerrado está muy cerca del límite; mientras que en el caso de 6 M de H_2O_2 se observan fluctuaciones grandes, en la simulación con agua éstas no aparecen —por ejemplo, entre los 90 y 110 ns en la subunidad roja, 80 y 110 ns en la subunidad amarilla o 120 y 140 ns en la subunidad azul—. Los estados abiertos y las distancias entre los aminoácidos hidrofóbicos grandes dan lugar al recambio de moléculas del sitio activo. El intercambio de moléculas de H_2O y H_2O_2 en la sección media del canal principal también está relacionado con la apertura y cierre de las compuertas.

En los recuadros I, II, III y IV de la figura 6.16 se muestran diferentes imágenes de la estructura del canal en la simulación en H_2O_2 con la compuerta de las fenilalaninas cerradas. En el recuadro IV se muestra cómo la apertura de una sola de las compuertas no es suficiente para que el agua pase hacia el sitio activo. En la misma figura (6.16) en los recuadros V, VI, VII y VIII se muestran otros cuadros de la simulación donde con las compuertas abiertas. En las imágenes, también se puede observar la red de puentes de hidrógeno que se forman en presencia de H_2O_2 y que atraviesa la sección hidrofóbica de las compuertas. Esta red de puentes de hidrógeno empieza en el ASP145 —en verde—, pasa por la sección hidrofóbica y termina en el sitio activo.

El ASP145 en casi todos los casos mostrados en la figura 6.16 queda atrás de la F171. EL ASP145 es un aminoácido importante para el alineamiento del H_2O_2 , es un aminoácido con carga negativa y como se ha mostrado experimentalmente [24], al mutar este aminoácido por otros no cargados, la actividad de la catalasa disminuye en un $\sim 90\%$. A lo largo de las simulaciones se puede observar cómo este ASP145 atrae al H_2O_2 hacia la región hidrofóbica de las compuertas de fenilalanina, y forma puentes de hidrógeno con el H_2O_2 y el H_2O capaces de atravesar la región hidrofóbica del canal. En la figura 6.17 se muestra la última sección del canal principal rotada 180° —con respecto a las imágenes de la figura 6.16— con la finalidad de mostrar la posición del ASP145 y la red de puentes de hidrógeno que forma con las compuertas abiertas —imágenes I y II— y cerradas —imágenes III y IV—.

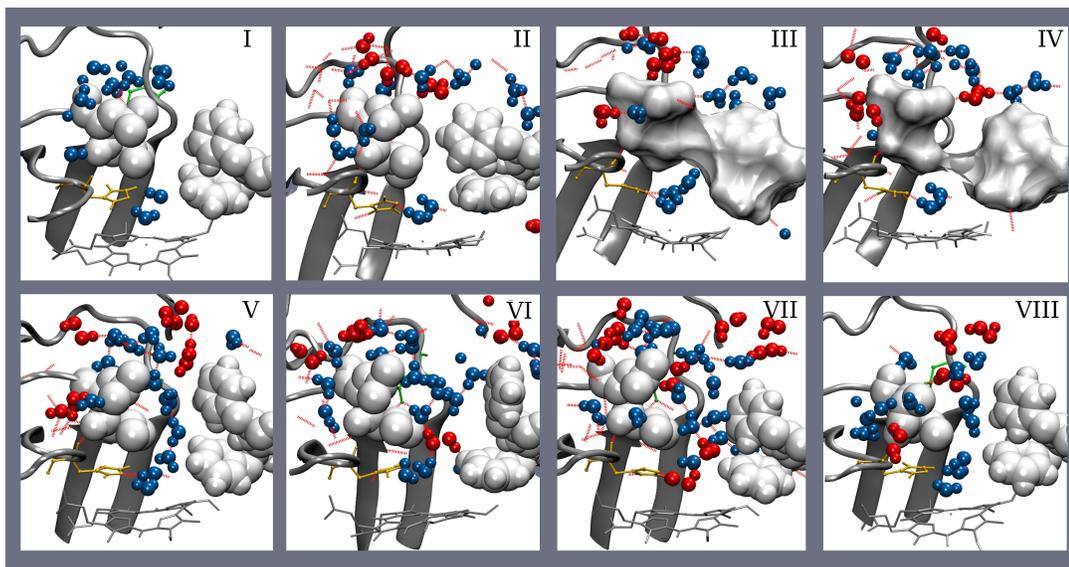


Figura 6.16: En las imágenes I, II, III y IV se muestran diferentes cuadros de la simulación donde se puede encontrar a las compuertas F170-V133 y F171-L134 cerradas. En la imagen IV se muestra un cuadro en el que la compuerta FV se encuentra cerrada y la FL abierta para mostrar que es necesario que ambas compuertas se encuentren abiertas para dejar el fácil acceso de moléculas de H_2O o H_2O_2 al sitio activo. En las imágenes V, VI, VII y VIII se muestran diferentes cuadros en los que se observa continuidad en los trenes de aguas y las compuertas se encuentran abiertas. El H_2O_2 favorece los puentes de hidrógeno que atraviesan la sección hidrofóbica. Los aminoácidos que se muestran en esferas o superficie en blanco corresponden a los aminoácidos de las compuertas F170-V133 y F171-L134, en amarillo se muestra la H92 del sitio activo y en verde en los cuadros I, VI y VII se alcanza a ver el D145 en color verde. Las aguas se muestran en azul y el peróxido en rojo. Parte de la estructura secundaria del resto del canal se muestra en gris.

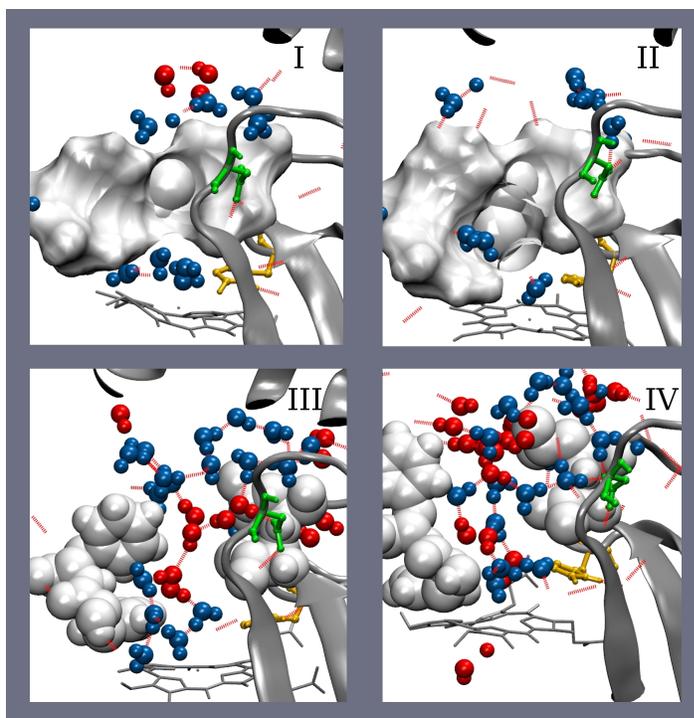


Figura 6.17: En las imágenes I, II, III y IV se muestran diferentes cuadros de la simulación con el eje X del canal rotado 180° con la finalidad de mostrar el D145 —en verde— formando puentes de hidrógeno con el H_2O o H_2O_2 . Las imágenes I y II corresponden al canal con las compuertas cerradas y las imágenes III y IV al canal con las compuertas abiertas.

6.7. Entradas y Salidas

Se desarrollaron dos programas para analizar por dónde entran o salen moléculas de H_2O o H_2O_2 al canal. El principal objetivo de estos programas es identificar qué moléculas de solvente entran o salen del canal principal en cada paso de tiempo y localizar al aminoácido más cercano por el que entraron o salieron para definir las puertas. Los resultados se muestran en la figura 6.18.

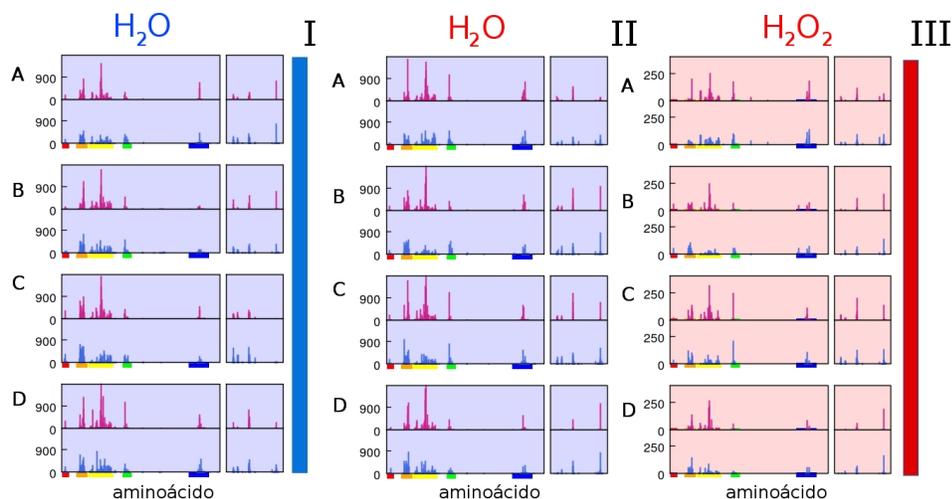


Figura 6.18: Análisis de entradas y salidas. Los pares de gráficas en I muestran el número de moléculas que entraron —en magenta— o salieron —en azul— cerca de cada aminoácido para la simulación en H_2O . Cada par de gráficas corresponde a los monómeros A, B, C y D —en ese orden de arriba hacia abajo—. Los pares de gráficas en II muestran las mismas gráficas pero para entrada y salida de H_2O en la simulación en 6 M de H_2O_2 . Y finalmente los pares de gráficas en III muestran también las entradas y las salidas de H_2O_2 en la simulación en 6 M de H_2O_2 . El corte en la continuidad de las gráficas representa los aminoácidos que corresponden a la subunidad relacionada en el eje molecular P, y que también son parte del canal principal. La barra de colores identifica los aminoácidos que forman al canal principal en el mismo código de colores que se mostró en la figura 6.5.

En el conjunto de gráficas de la figura 6.18 se puede observar que las entradas y las salidas de H_2O y H_2O_2 en ambas simulaciones son muy parecidas. Se resumieron los datos en la gráfica I de la figura 6.19. En la representación del canal en la imagen II de la figura 6.19 se muestran los aminoácidos con mayor número de ocasiones de entradas o salidas.

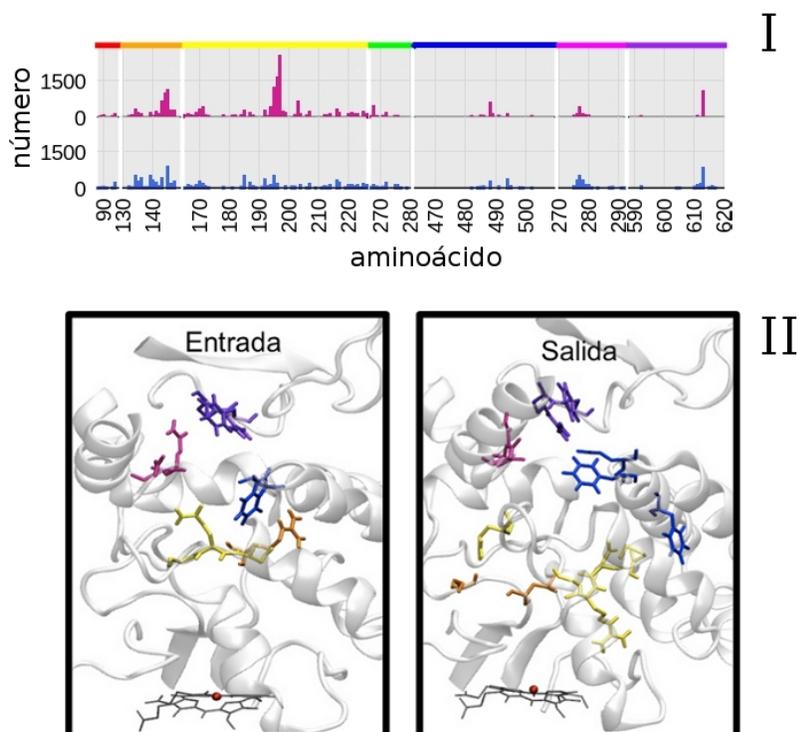


Figura 6.19: Entradas y salidas. Los pares de gráficas en I muestran el número de moléculas que entraron —en magenta— o salieron —en azul— cerca de cada aminoácido en promedio para todas las subunidades de ambas simulaciones. La barra de colores identifica los aminoácidos que forman al canal principal en el mismo código de colores que se mostró en la figura 6.5. En la figura II se muestran los aminoácidos que tuvieron mayor número de ocasiones de entrada o salidas.

El segundo programa, identifica las aguas que llegaron al sitio activo y escribe un archivo PDB con la trayectoria de entrada y de salida. Los resultados coinciden con los resultados de las figuras 6.18 y 6.19:

- Las regiones que sirven de entrada también pueden servir de salida, sin embargo el número de entradas o salidas para cada región es diferente.
- La mayoría de las moléculas de agua y de H_2O_2 entran por el canal principal pasando por la región del asa de la entrada a la sección final. También, entra solvente por el canal intercomunicante —el canal que comunica las subunidades relacionadas en P—.
- Las salidas se observan más distribuidas que las entradas, y se ve un mayor número de salidas hacia el canal intercomunicante y hacia el canal

interfacial (SER136).

- Se encontró una salida interesante entre las hélices en azul cerca de la PHE486.
- No se observan diferencias en la distribución de entradas y salidas en la simulación en agua y en peróxido.

6.8. Mutantes *in silico*

Para caracterizar la importancia de las fenilalaninas 170 y 171 y del asa de entrada a la sección final del canal principal, se hicieron las siguientes mutantes *in silico* (figura 6.20):

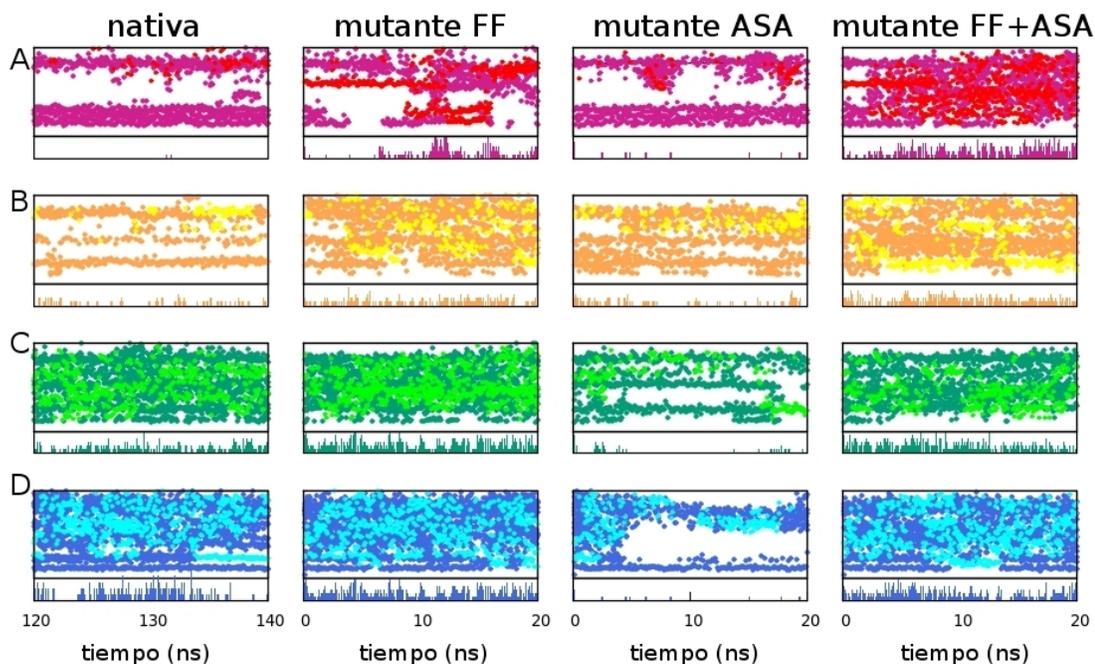


Figura 6.20: Análisis de las mutantes. Se muestran las gráficas de trenes de agua (en la parte superior de cada cuadro) y el intercambio de solvente (en la parte inferior del mismo) para la CAT-1 en la simulación con H_2O_2 para las subunidades A, B C y D —en rojo amarillo verde y azul respectivamente—. En la primera columna para la simulación nativa con 6 M de peróxido, en la segunda para la mutante de las fenilalaninas (mutante FF), en la tercera columna para la mutante del asa (mutante ASA) y finalmente en la cuarta para la triple mutante (mutante FF+ASA).

La mutante de las fenilalaninas (FF) surgió con base en el mecanismo de compuertas propuesto entre F170-V133 y F171-L134. Al eliminar las dos fenilalaninas el flujo de solvente a la región del sitio activo aumenta y se observa una densidad continua de aguas a lo largo del canal —segunda columna de la Figura 6.20—. Experimentalmente se ha estudiado la mutación de a F170 y F171 en la Catalasa A de *Sacharomices cerevisiae* [21] donde se observó que al mutar la F171 la actividad de la catalasa se reduce a un 29% de la actividad original. Al mutar la F170 no se encontró al grupo hemo ensamblado a la proteína por lo que se asigna, a este aminoácido, únicamente la función de estabilizar el sitio catalítico.

La mutante del asa (ASA) de la entrada al canal principal se realizó pensando en una segunda compuerta en esta región. Al eliminar el asa el flujo en el sitio activo disminuye, en cambio aumenta el número de moléculas de agua o H₂O₂ en la sección media del canal. La distancia de los pares F171-L134 y F170-V133 es muy chica, las compuertas se quedan mayoritariamente cerradas, es por eso que el flujo en el sitio activo no aumenta —como se observa en la tercer columna (ASA) de la figura 6.20—. El asa tiene mucha movilidad y puede ser la responsable del movimiento de aguas en el canal: al no haber movimiento de esta región, el solvente se queda atascado en el canal, el flujo al sitio activo disminuye y, por tanto, disminuirá la actividad.

En la triple mutante (FF+ASA) —columna FF+ASA de la figura 6.20—se observa un aumento en el intercambio de moléculas del sitio activo. Este aumento se debe a la ausencia de las compuertas F171-L134 y F170-V133. Al eliminar los aminoácidos del asa, el solvente se paraliza en la sección media del canal, aunque no necesariamente se observa lo mismo en el sitio activo ya que sigue habiendo recambio entre las moléculas que se quedan entre el asa y los pares F171-L134 y F170-V133.

6.9. Cavidades *in silico*

Teniendo la información de los tiempos en los que el canal principal se encuentra abierto, se utilizó el programa CAVER [3] para caracterizar al canal principal y se comparó con el canal principal de la estructura cristalográfica.

En la estructura de la catalasa-1 obtenida por cristalografía y en diferentes estructuras obtenidas de la simulación —con la compuerta de fenilalaninas abiertas— se localizó fácilmente el canal principal que se muestra en la imagen de la figura 6.21). Comparamos el diámetro del canal principal encontrado en la estructura cristalográfica y en la simulación. Los resultados se muestran

en la gráfica de la figura 6.21.

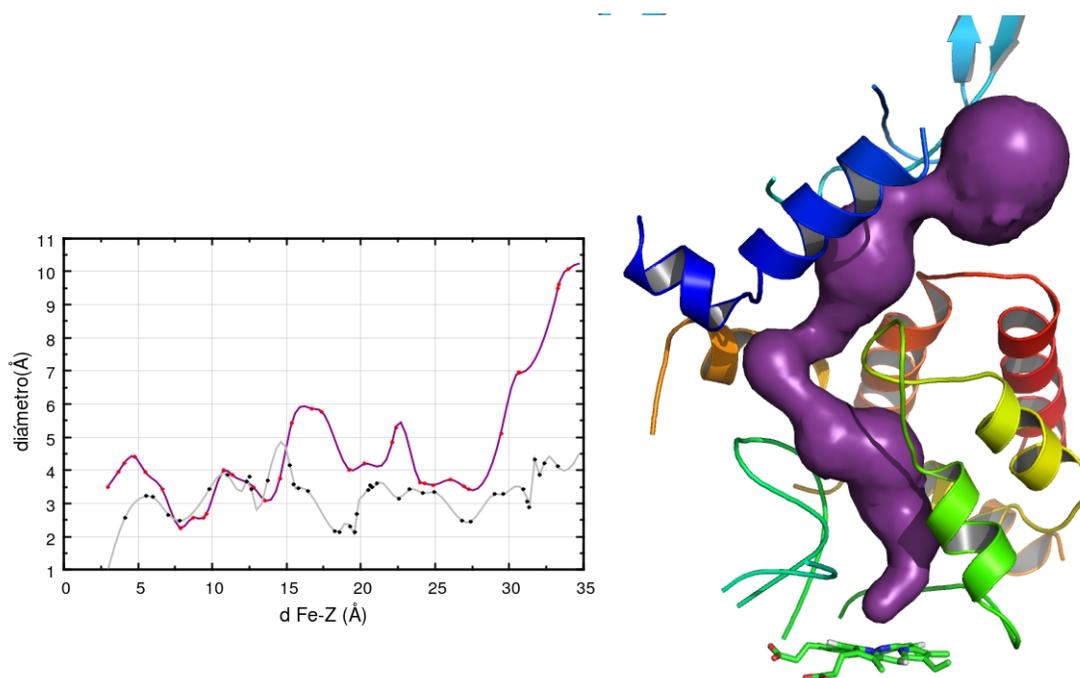


Figura 6.21: Análisis del canal principal utilizando CAVER. A la derecha se muestra la imagen del *canal principal* encontrado por CAVER y a la izquierda la gráfica del diámetro del canal principal como función de su distancia al Fe del grupo hemo. En gris se muestra el diámetro del canal en la estructura obtenida mediante cristalografía y en morado también el diámetro del canal encontrado en un cuadro de la simulación (subunidad D, ns 146).

Las diferencias en la amplitud del *canal principal* en la estructura cristalográfica y en la simulación son evidencia de cómo cambió la estructura en la simulación. El diámetro del canal en la simulación es más ancho de lo que se observa en la estructura cristalográfica además, no coinciden exactamente los picos de máxima o mínima amplitud debido a que en la simulación la estructura está más relajada, el canal se *expandió* al menos $\sim 0.5 \text{ \AA}$.

El mismo análisis utilizando CAVER se realizó en varios cuadros de la simulación con las compuertas abiertas, y en las mutantes. Los resultados se muestran en la figura 6.22 donde se puede ver el efecto que causan las mutantes en la amplitud del canal. En la mutante FF —en morado—, se puede ver que la amplitud entre los 5 y los 10 \AA aumenta $\sim 2 \text{ \AA}$ con respecto a la nativa —rosa—. En la mutante del ASA (amarillo), la amplitud del canal se modifica entre los ~ 16 y $\sim 25 \text{ \AA}$ toda esta zona coincide con las posiciones del loop de la SER198.

Finalmente la triple mutante (en verde) muestra modificaciones en la amplitud del canal en ambas regiones.

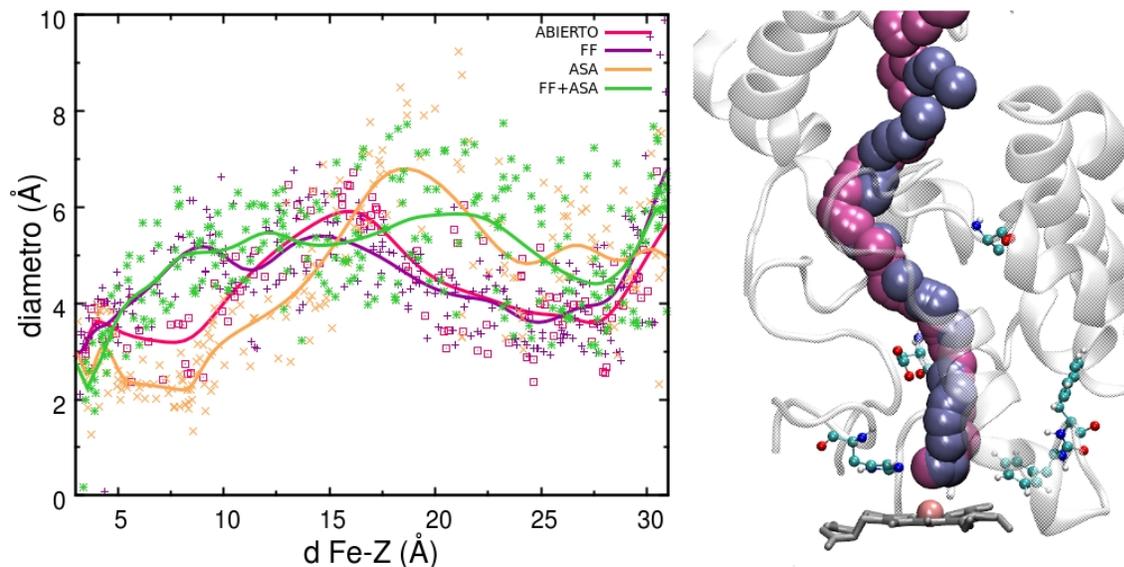


Figura 6.22: Análisis del *canal principal* en las simulaciones utilizando CAVER. A la derecha se muestra la trayectoria del *canal principal* encontrado por CAVER para el canal principal en la subunidad D y abierto —rosa— y la misma trayectoria para el canal en la subunidad D de la mutante FF —morado—. Únicamente se muestran estas dos trayectorias A la izquierda se muestra la gráfica del diámetro del canal principal como función de su distancia al Fe del grupo hemo. En rosa se muestra la subunidad D con las compuertas abiertas, en morado la mutante FF, en amarillo la mutante del ASA y en verde la triple mutante (FF+ASA).

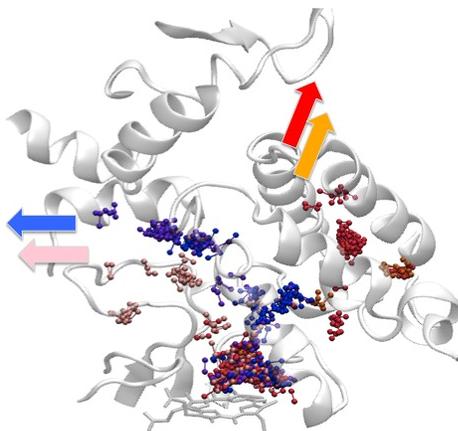


Figura 6.23: Salida del O₂. En la imagen se muestra la trayectoria de las cinco moléculas de O₂ que han salido del sitio activo en rosa, azul, morado rojo y anaranjado.

6.10. Salida del O₂ del sitio activo

Para estudiar la salida de O₂ del sitio activo se realizaron simulaciones con cuatro moléculas de O₂ en el sitio activo. La salida es poco frecuente y, en cuatro simulaciones independientes —de 20, 10, 10 y 10 ns— sólo ocurrió para cinco moléculas de las dieciséis posibles (cuatro moléculas para cada simulación= 16 moléculas totales). Las trayectorias correspondientes se muestran en la figura B.1 . Salida de O₂. En la imagen se muestra la trayectoria de las cinco moléculas de O₂ que han salido del sitio activo en rosa, azul, morado rojo y anaranjado. Los detalles de las trayectorias indican que:

- Tres moléculas saliendo por el canal intercomunicante/interfacial —mostrado en rosa, morado y azul—.
- Dos moléculas saliendo por una región hidrofóbica de 2 hélices del canal principal, entre los aminoácidos MET512 y PHE209 —mostrado en rojo y anaranjado—.
- No se observaron moléculas de O₂ saliendo por el canal principal.

Capítulo 7

Conclusiones

En las catalasas el sustrato llega al sitio activo principalmente por el canal principal. Este canal es largo y angosto y, en su parte más cercana al sitio activo, es hidrofóbico. En este trabajo mostramos que en todo el canal principal predominan los aminoácidos que atraen con mayor fuerza a las moléculas de ceH_2O_2 que a las de agua.

La región del asa de entrada a la última sección del canal principal tiene mucha movilidad. Al eliminar esta asa disminuye el intercambio de solvente en la última sección del canal principal y en el sitio activo. En las simulaciones con H_2O_2 , pero no en las simulaciones en agua, el movimiento del asa está correlacionado con el movimiento de los aminoácidos cercanos al sitio activo.

Existe una selección adicional del H_2O_2 sobre el H_2O en la última sección del canal principal formada por dos compuertas entre V133-F170 y entre L134-F171. Las dos fenilalaninas de estas compuertas se mueven más en presencia de H_2O_2 y regulan la entrada de solvente hacia el sitio activo. Al eliminar las dos fenilalaninas aumenta el intercambio de moléculas de solvente en el sitio activo.

Los cálculos de PMF mostraron que el paso de las moléculas de H_2O_2 por el canal principal es energéticamente más favorable que el paso de moléculas de agua por el mismo —al mostrar valores de energía menores que las del H_2O —.

Estas características del canal principal contribuyen a seleccionar el H_2O_2 sobre el H_2O . Diferentes aminoácidos en lugares estratégicos concentran a las moléculas de H_2O_2 agilizando la actividad catalítica de CAT-1.

La salida del solvente ocurre principalmente a través del canal intercomunicante, entre las subunidades relacionadas en el eje molecular P, y a través del canal interfacial. Aunque no fue analizado en este trabajo, el intercambio

de moléculas de H_2O_2 entre las subunidades relacionadas en el eje molecular P puede dar lugar a cooperatividad entre subunidades.

Las interacciones del agua —o del solvente en general— con las proteínas en las simulaciones de dinámica molecular son complejas y muchas veces se ignoran cuando en realidad son parte esencial del funcionamiento de las proteínas. Los programas de cómputo que se desarrollaron para el análisis del agua y del H_2O_2 en los canales de la CAT-1 pueden adaptarse fácilmente para estudiar otros sistemas.

Capítulo 8

Perspectivas

En este trabajo estudiamos los mecanismos de entrada y salida del H_2O_2 , H_2O y O_2 del sitio activo de la CAT-1 y cómo pasan estas moléculas por el canal principal. La CAT-1 es un sistema grande y complejo, describimos el funcionamiento de una parte pero el sistema da cabida a una gran cantidad de análisis que sería muy interesante continuar:

- Estudiar a nivel atómico el sitio activo en conjunto con la última sección del canal principal para encontrar la fuerza del campo eléctrico generado por el ASP145 y los aminoácidos del sitio activo (HIS92 y ASN127). Este análisis habría que hacerlo con las compuertas propuestas en este trabajo (F179-V131 y F171-L134) en un estado abierto y en un estado cerrado para sustentar nuestro trabajo y observar las diferencias.
- Un problema importante en las catalasas que permanece incierto es explicar cómo ocurre la cooperatividad que se observa en la cinética de CAT-1. Para poder abordar este problema sería necesario profundizar el análisis del canal intercomunicante y del canal interfacial de la CAT-1. ¿Qué condiciones determinan qué moléculas se mueven a la subunidad relacionada en el eje molecular P? Este estudio deberá incluir también análisis de correlación entre subunidades relacionadas.
- El O_2 que se genera en la reacción podría aumentar la movilidad de la compuerta de las fenilalaninas. Una simulación con las mismas condiciones de H_2O_2 y H_2O que se presentan en este trabajo que incluyera además moléculas de O_2 a una concentración de $200 \mu\text{M}$ (concentración fisiológica) podría ayudar a comprobar esta hipótesis.
- Una limitante en nuestras simulaciones es que no simulamos la reacción química. Las moléculas de H_2O_2 presentes en el sitio activo pero que aún no hayan reaccionado, tendrían el efecto de estancar al sistema, desestimando el intercambio real de H_2O y H_2O_2 del sitio activo. Una simulación

de QM/MM que permita calcular con detalle cuántico el sitio activo sería fundamental para observar lo que pasa con los productos en el sistema de CAT-1.

Se propone realizar otras mutantes experimentales en la F170 y la F171 por aminoácidos grandes e hidrofóbicos como el TRP el cual bloqueará el paso de moléculas de H_2O o H_2O_2 hacia el sitio activo y por tanto disminuirá la actividad catalítica de la CAT-1. El problema que han tenido al realizar mutantes en estas fenilalaninas es el ensamble del grupo hemo en el sitio activo, el cual quizá si pueda darse con un TRP. Otra mutante experimental que se propone es bloquear — también con aminoácidos grandes e hidrofóbicos— el canal intercomunicante, esta mutación disminuirá el movimiento de moléculas en el canal principal y va a disminuir también la actividad catalítica sin bloquearla completamente.

Apéndice A

Réplicas

A pesar de que nuestras simulaciones en H_2O y H_2O_2 son suficientemente largas (150 ns), su pertinencia se confirmó mediante la realización de las siguientes réplicas:

- Cinco réplicas de 20 ns de la simulación en H_2O_2 utilizando como configuración inicial las coordenadas del sistema a los 90, 100, 110, 120 y 130 ns luego de restablecer las velocidades iniciales con la distribución de Boltzmann.
- Tres réplicas de 20 ns de la simulación en H_2O utilizando como configuraciones iniciales las coordenadas del sistema a los 100, 110 y 120 ns, restablecidas con la distribución de Boltzmann.

Se realizó el análisis de trenes de agua, distancias F171-L134 y F170-V133 y recambio de solvente en el sitio activo y en la sección media del canal. En todas las réplicas se encontraron los mismos resultados. Únicamente se muestran en este trabajo las gráficas de trenes de agua en la simulación de H_2O_2 para evitar ser redundante.

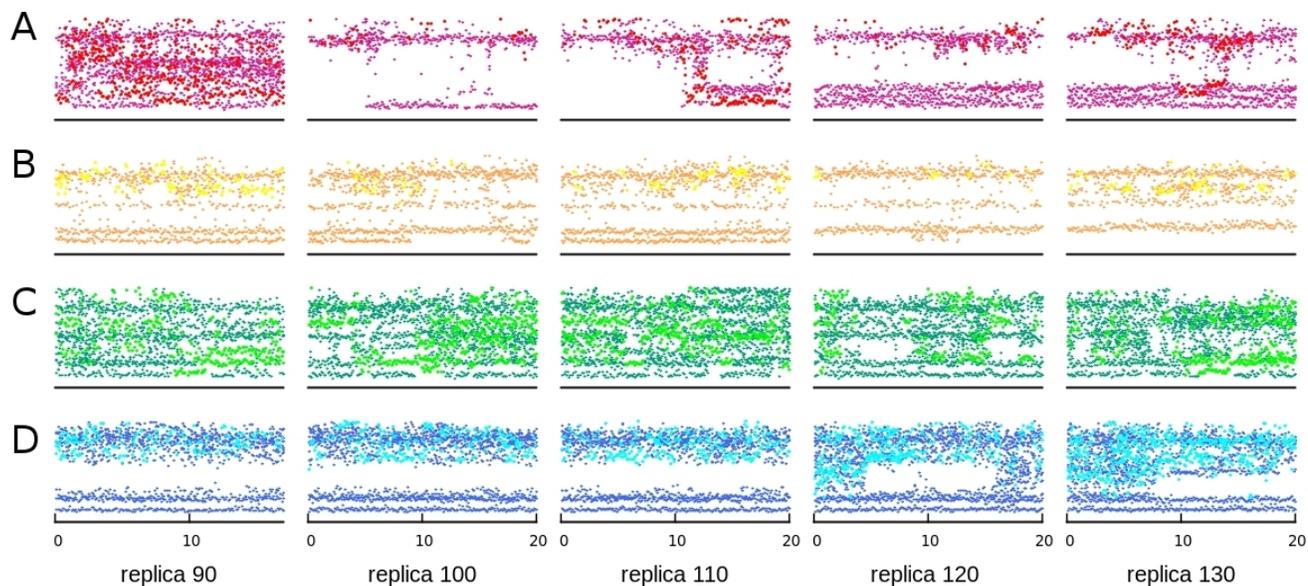


Figura A.1: **Réplicas.** Análisis de trenes de aguas de las réplicas en la simulación con 6 M de H_2O_2 empezando con las coordenadas del sistema a los 90, 100, 110, 120 y 130 ns y reestableciendo las velocidades iniciales con una distribución de Boltzmann. Los colores —rojo, amarillo, verde y azul— indican las diferentes subunidades —A, B, C y D, respectivamente— para cada simulación. Los mismos tonos en color claro corresponde a los datos de H_2O_2

Apéndice B

Dinámica Molecular

B.1. Condiciones Periódicas de Frontera

Con el fin de eliminar efectos de superficie y de dimensión del sistema se establecen condiciones periódicas de frontera; las partículas se introducen en una celda que es replicada al infinito por traslaciones periódicas. Una partícula que se sale de la celda de un lado es reemplazada por una copia que entra a la celda en el lado opuesto, cada partícula es sujeta al potencial formado por las partículas que se encuentran cercanas a ésta.

Las interacciones de Van der Waals se truncan a una distancia específica. En el caso de las interacciones de largo alcance, las interacciones electrostáticas, se usa el método *Particle-mesh Ewald* (PME)

B.2. El potencial del sistema, campo de fuerza.

Las interacciones de enlace (pares, ángulos y diedros) en una dinámica molecular se calculan en base a una lista fija de vecinos con las ecuaciones descritas en la introducción. La ecuación que describe el enlace entre pares está representado por un potencial armónico al igual que la descripción de ángulos mediante el ángulo θ . Las interacciones de enlace entre cuatro átomos, diedros, son comúnmente expresadas como un polinomio.

Las interacciones de no enlace son las que contribuyen con la mayor parte de interacciones del sistema y por tanto contribuyen más a la energía del sistema.

Las interacciones de van der Waals (VDW) son descritas con la ecuación de Lennard-Jones (LJ) donde el término $1/r^{12}$ representa la fuerte repulsión entre átomos debido al solapamiento de densidades electrónicas (principio de exclusión de

Pauli). En cambio, las fuerzas de dispersión de London son favorables y están representadas en la ecuación de LJ por el término negativo que va como $1/r^6$. Estas interacciones de VDW son de corto alcance y en la dinámica molecular únicamente se calculan para los átomos contenidos en un radio definido para el sistema. Para calcular estas interacciones se define el radio de cálculo de interacciones de VDW y se hacen listas de átomos vecinos que serán actualizadas con respecto al tiempo y cada 5 o 10 pasos de simulación.

Como se describió en la introducción, las interacciones electrostáticas forman parte del potencial de las partículas en el sistema. Estas interacciones electrostáticas han sido bien estudiadas y descritas en las Leyes de Coulomb: La interacción $V(r_{ij})$ entre dos cargas en el vacío se describe en la ecuación B.1

$$V(r_{ij}) = \kappa \frac{q_1 q_2}{r_{ij}} \quad (\text{B.1})$$

Donde q_1 y q_2 son las magnitudes de dos cargas, r es la distancia que las separa y κ corresponde a una constante de proporcionalidad conocida como la Constante de Coulomb que equivale a $\kappa = \frac{1}{4\pi\epsilon_0}$.

Las cargas en un medio real —fuera de condiciones de vacío— interactúan más débilmente. Esto se debe a que el medio se puede polarizar, es decir, las partículas del medio se orientan según las cargas del sistema y las apantalla. Este apantallamiento se describe en la ecuación de interacción entre cargas (ecuación B.2) mediante una constante dieléctrica, D , la cual depende del medio de nuestro sistema. Entre más polarizable sea el medio, más grande es la constante dieléctrica, es decir más apantalla las cargas en nuestro sistema.

$$V(r_{ij}) = \kappa \frac{q_i q_j}{D r_{ij}} \quad (\text{B.2})$$

La fuerza (F) derivada del potencial de interacción entre dos partículas cargadas se puede describir como:

$$F_i(r_{ij}) = \frac{\partial V}{\partial r} = \kappa \frac{q_i q_j}{D r_{ij}^2} \frac{r_{ij}}{r_{ij}} \quad (\text{B.3})$$

Las interacciones Coulómbicas decrecen como r^{-1} lo cual las categoriza como interacciones de largo alcance. El análisis matemático de las interacciones de *largo alcance* y *corto alcance* es distinto. Una partícula que interactúa mediante interacciones de *corto alcance* únicamente siente a sus vecinos cercanos, por tanto, para calcular su energía basta con buscar a sus vecinos más cercanos y obtener los números. Cuando las interacciones en un sistema involucran cargas los vecinos lejanos también contribuyen a la energía del sistema, por tanto, las

matemáticas para calcularlas se vuelven algo más sofisticadas.

Para calcular las interacciones electrostáticas de largo alcance en dinámica molecular se define una cierta distancia en la cual se calculan las interacciones electrostáticas totales, después de dicha distancia, se calculan las interacciones electrostáticas de forma aproximada.

El método de *Sumas de Ewald* es el método más conocido para calcular interacciones de largo alcance. Esta idea fue usada para calcular interacciones de largo alcance en imágenes periódicas de cristales. Y la idea esta basada en convertir el término que converge lentamente de la ecuación en dos términos que converjan rápidamente y una constante.

$$V = V_{dir} + V_{rec} + V_0 \quad (\text{B.4})$$

En el método de sumas de Ewald, además, el sistema se representa como una rejilla tridimensional y el campo electrostático se calcula en cada nodo de la rejilla, con lo cual se estiman los efectos electrostáticos en el resto del sistema, sin tomar en cuenta una por una todas las combinaciones posibles.

B.3. La Dinámica molecular dirigida (SMD)

En una dinámica molecular dirigida —SMD por sus siglas en ingles: *steered molecular dynamics*— se asume una reacción en la coordenada ζ y un potencial armónico externo:

$$U = \frac{1}{2}K(\zeta - \zeta_0 - vt)^2 \quad (\text{B.5})$$

donde K es la rigidez de la fuerza y ζ_0 es la posición inicial del resorte moviéndose a una velocidad constante v . La fuerza externa que se ejerce en el sistema se puede expresar como:

$$F = K(\zeta_0 + vt - \zeta) \quad (\text{B.6})$$

Esta ecuación corresponde a la de un resorte armónico de rigidez K con un extremo fijo y el otro moviéndose a una velocidad v .

B.4. La desviación cuadrática media (RMSD)

Se calcula alineando la estructura a una estructura de referencia ($t_2 = 0$)

$$RMSD(t_1, t_2) = \left[\frac{1}{M} \sum_{i=1}^N \|m_i r_i(t_1) - m_i r_i(t_2)\|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (\text{B.7})$$

Donde $M = \sum_{i=1}^N m_i$ y $r_i(t)$ es la posición del átomo i al tiempo t .

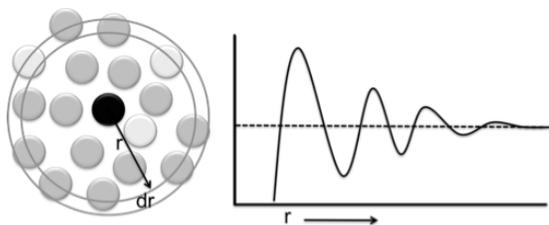


Figura B.1: Imagen del cálculo de distribución radial.

B.5. Distribución Radial (RDF)

La función de distribución radial describe cómo la densidad de una partícula B varía como función de la distancia a una partícula A .

Por ejemplo para calcular la función de distribución radial de partículas A y B . Se localizan las partículas A , se divide al sistema en rebanadas esféricas (dr) alrededor de cada partícula A y se calcula un histograma con el número de partículas B como función de la distancia radial (r) a la partícula A . Este procedimiento se promedia para todas las partículas A del sistema. Y para todos los tiempos a lo largo de la simulación.

B.6. Análisis de Correlación

La función correlación en el tiempo analiza cualquier variable $A(t)$ como longitudes de enlace o los ángulos diedros y esta definida como:

$$CA(t) = \langle A(t)A(0) \rangle \quad (\text{B.8})$$

Esta función mide la correlación de la propiedad $A(t)$ a ella misma a dos diferentes tiempos separados por un intervalo de tiempo t y promediado a lo largo de toda la trayectoria. La función de correlación cruzada entre dos variables dinámicas $A(t)$ y $B(t)$ es definida de una manera similar:

$$C_{AB} = \langle A(t)B(0) \rangle \quad (\text{B.9})$$

B.7. Análisis de componentes principales (PCA)

Este análisis consiste en calcular la matriz de covarianzas C de las posiciones atómicas.

$$C = \langle M_{ii}^{\frac{1}{2}}(x_i - \langle x_i \rangle) M_{jj}^{\frac{1}{2}}(x_j - \langle x_j \rangle) \rangle \quad (\text{B.10})$$

M es la matriz unitaria que puede contener las masas de los átomos. La matriz de covarianza C es simétrica y tiene $3N \times 3N$ elementos y puede ser diagonalizada con la matriz ortonormal R :

$$R^T C R = \text{diag}(\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_{3N}) \dots \lambda_1 \lambda_2 \dots \geq \lambda_{3N} \quad (\text{B.11})$$

Las columnas de R son vectores normales (*eigenvectores*) o modos principales. R define una transformación a un nuevo sistema de coordenadas y cada columna de la matriz R contiene a los modos esenciales del movimiento. Los valores normales o *eigenvalores* asociados a cada vector normal (*eigenvector*) corresponden a la amplitud con la que cada modo normal contribuye a la dinámica. Por tanto la trayectoria puede ser proyectada sobre los modos principales para obtener una película de cada modo $p_i(t)$.

$$p(t) = R^T M^{\frac{1}{2}} x(t) - \langle x \rangle \quad (\text{B.12})$$

Y también la trayectoria puede filtrarse sobre algún modo principal para ver únicamente el movimiento que corresponde a dicho modo.

Apéndice C

Campo de fuerza del H₂O₂

La parametrización del H₂O₂ para GROMACS se construyó con una mezcla de datos experimentales y teóricos reportados en la literatura.

Se realizó la dinámica molecular de una molécula de H₂O₂ en agua, se calcularon las distribuciones radiales de O_{H₂O₂} - H_{H₂O} y de H_{H₂O₂} - O_{H₂O} y se observó que coincidieran con los datos reportados [23]. También, se verificó que la variación del ángulo diedro HOOH coincidiera con los datos reportados en la literatura[23].

Campo de Fuerza para el H ₂ O ₂		
Átomo	Carga parcial	Masa(uma)
H	0.46	1.008000
O	-0.46	15.99940
Enlace	Distancia Å	Fuerza $\frac{kcal}{mol\text{Å}^2}$
H-O	0.96	462308
O-O	0.146	294440
Átomos	Ángulo(Deg)	Fuerza $\frac{kcal}{molRAD^2}$
HOO	98.72	414.6
Átomos	Diedro(Deg)	Fuerza $\frac{kcal}{molRAD^2}$
HOOH	107.7	6.8

Cuadro C.1: Parámetros del campo de fuerza para el H₂O₂. Las unidades son las que utiliza GROMACS comunmente en sus campos de fuerza.

Apéndice D

Programas desarrollados para el análisis del movimiento de H_2O o H_2O_2 en los canales de la CAT-1

Se utilizó Python y las librerías (MDAnalysis, Numpy y Scipy) para programar el análisis del movimiento de H_2O o H_2O_2 en las simulaciones. El diagrama de flujo de los programas se describe a continuación.

D.1. Tiempos de residencia

- Identifica a las moléculas de H_2O o H_2O_2 en la esfera de solvatación del aminoácido a analizar
- Cuenta cuánto tiempo permanece cada molécula de H_2O o H_2O_2 en la esfera de solvatación y se almacena en la lista K
- Calcula el promedio de todos los tiempos de la lista K

D.2. Número de moléculas

- Cuenta a las moléculas distintas de H_2O o H_2O_2 que pasaron por la esfera de solvatación durante el tiempo en equilibrio para el aminoácido de interés

D.3. Trenes de H_2O o H_2O_2

- Identifica las moléculas de H_2O o H_2O_2 que se encuentran en el canal principal
- Se calcula la distancia del Fe a cada molécula encontrada

- Escribe para cada tiempo el número de molécula y su distancia al Fe
- Se repiten los pasos para cada subunidad

D.4. Intercambio de H₂O o H₂O₂

- Se almacena en la lista A las moléculas de H₂O o H₂O₂ en una región definida y a un paso de tiempo t1
- Se identifica en el tiempo (t1+dt) las moléculas de H₂O o H₂O₂ en la misma región y se almacenan en la lista B
- Se compara la lista A con la lista B
- Se cuentan diferencias (las que entraron más que las que salieron)
- Esto se hace para cada paso de tiempo

D.5. Entradas y salidas

- Se almacena en la lista A las moléculas de H₂O o H₂O₂ en el canal principal y a un paso de tiempo t1
- Se identifica de nuevo en el tiempo (t1+dt) las moléculas de H₂O o H₂O₂ en el canal principal y se almacenan en la lista B
- Se compara la lista A con la lista B
- Se identifica a las moléculas de agua que entraron y se busca el aminoácido más cercano el cual se almacena en la *lista de aminoácidos de entrada*
- Se identifica a las moléculas de agua que ya no están en la lista B y se busca el aminoácido más cercano el cual se almacena en la *lista de aminoácidos de salida*
- Esto se hace para cada paso de tiempo

Bibliografía

- [1] Ríos-Momberg M. Hewitt D. Hansberg W. Aguirre, J. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends in Microbiology*, 13(3):111–118, 2005.
- [2] F. Avbelj. Use of a potential of mean force to analyze free energy contributions in protein folding. *Biochemistry*, 31(27):6290–6297, 1992.
- [3] Petr Beneš, Chovancová Eva, Kozlíková Barbora, Pavelka Antonín, Strnad Ondřej, Brezovský Jan, Šustr Vilém, Klvaňa Martin, Szabó Tibor, Gora Artur, Zamborský Matúš, and Biedermannová Lada.
- [4] Postma-J.P.M. Van Gunsteren W.F. Dinola A. Haak J.R. Berendsen, H.J.C. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics*, 81(8):3684–3690, 1984.
- [5] Carpena-X. Fita I. Loewen P.C. Chelikani, P. An electrical potential in the access channel of catalases enhances catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(33):31290–31296, 2003.
- [6] Xia J. Margulis C.J. Chung, Y.-H. Diffusion and residence time of hydrogen peroxide and water in crowded protein environments. *Journal of Physical Chemistry B*, 111(46):13336–13344, 2007.
- [7] Sosa-Peinado A. Hansberg W. Domínguez, L. Catalase evolved to concentrate h₂o₂ at its active site. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 500(1):82–91, 2010.
- [8] Horjales-E. Rudiño-Piñera E. Arreola R. Hansberg W. Díaz, A. Unusual cys-tyr covalent bond in a large catalase. *Journal of Molecular Biology*, 342(3):971–985, 2004.
- [9] Rangel-P. Montes de Oca Y. Lledías F. Hansberg W. Díaz, A. Molecular and kinetic study of catalase-1, a durable large catalase of *neurospora crassa*. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(11):1323–1333, 2001.

- [10] Andrec-M. Felts A.K. Levy R.M. Gallicchio, E. Temperature weighted histogram analysis method, replica exchange, and transition paths. *Journal of Physical Chemistry B*, 109(14):6722–6731, 2005.
- [11] Dalke-A. Schulten K. Humphrey, W. Vmd: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1):33–38, 1996.
- [12] Keyes-T. Straub J.E. Kim, J. Communication: Iteration-free, weighted histogram analysis method in terms of intensive variables. *Journal of Chemical Physics*, 135(6), 2011.
- [13] Bruno-W.J. Koshi, J.M. Major structural determinants of transmembrane proteins identified by principal component analysis. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 34(3):333–340, 1999.
- [14] Bevan-D.R. Lemkul, J.A. Assessing the stability of alzheimer’s amyloid protofibrils using molecular dynamics. *Journal of Physical Chemistry B*, 114(4):1652–1660, 2010.
- [15] Friedland-G. Mobley D.L. Amirkhani H. Jacobson M.P. McClendon, C.L. Quantifying correlations between allosteric sites in thermodynamic ensembles. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 5(9):2486–2502, 2009.
- [16] Bravo J. Carpena X. Switala J. Maté M.J. Fita I. Loewen P.C. Melik-Adamyan, W. Substrate flow in catalases deduced from the crystal structures of active site variants of hpii from escherichia coli. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 44(3):270–281, 2001.
- [17] Villa A. Mark A.E. Van Gunsteren W.F. Oostenbrink, C. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The gromos force-field parameter sets 53a5 and 53a6. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13):1656–1676, 2004.
- [18] Tamar Schlick. *Molecular Modeling and Simulation*. Springer, August 2002.
- [19] Martinez A. Reuter N. Skjaerven, L. Principal component and normal mode analysis of proteins; a quantitative comparison using the groel subunit. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 79(1):232–243, 2011.
- [20] Lindahl E. Hess B. Groenhof G. Mark A.E. Berendsen H.J.C. Van Der Spoel, D. Gromacs: Fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16):1701–1718, 2005.
- [21] Herzog Ch. Nykyri L.M. Koller F. Zamocky, M. Site-directed mutagenesis of the lower parts of the major substrate channel of yeast catalase a leads to highly increased peroxidatic activity. *FEBS Letters*, 367(3):241–245, 1995.

- [22] McCammon J.A. Zhou, H.-X. The gates of ion channels and enzymes. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(3):179–185, 2010.
- [23] J. Zielkiewicz. Erratum: Structural properties of water: Comparison of the spc, spce, tip4p, and tip5p models of water (journal of chemical physics (2005) 123 (104501)). *Journal of Chemical Physics*, 124(10), 2006.
- [24] Koller F. Zámocký, M. Understanding the structure and function of catalases: Clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 72(1):19–66, 1999.