



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LA PROTEÍNA CRISTALINA γ -D HUMANA
DEBIDO A SU INTERACCIÓN CON IONES

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

JORGE ANTONIO AMADOR BALDERAS

DRA. LAURA DOMÍNGUEZ DUEÑAS
DEPARTAMENTO DE FISICOQUÍMICA, FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LA PROTEÍNA CRISTALINA γ -D HUMANA
DEBIDO A SU INTERACCIÓN CON IONES

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

JORGE ANTONIO AMADOR BALDERAS



Ciudad de México, Septiembre 2022

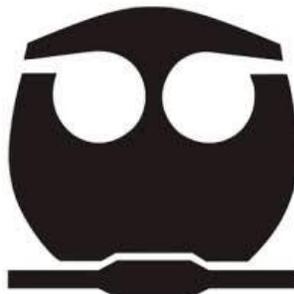
Dedicatorias

- A mis padres, Rosa María Balderas Velasco y Marco Antonio Amador Gómez, por ser mi apoyo infinito en cada etapa de mi vida, por cuidarme y guiar mis pasos, por celebrar mis logros, por todo su cariño y por todas sus enseñanzas para convertirme en un mejor ser humano.
- A mi hermano, Marco Adrián Amador Balderas, porque a pesar de que pasan los años sigues siendo mi amigo fiel con quien siempre puedo contar, mi más grande confidente a quien puedo compartirle lo que sea y mi inspiración para seguir saliendo adelante.
- A mi abuelita, Rosa María Velasco López, y tío, Jorge Balderas Velasco, por ser una parte esencial de mi vida y porque sé que siempre podré contar con ustedes y compartirles mis logros.
- A mi novia, Judith Ballesteros Villascán, por alentarme a siempre dar lo mejor de mí en cada cosa que haga, por impulsarme para llegar cada vez más lejos, por inspirarme con su valiente ejemplo y por hacer mi vida aún más bonita y feliz.

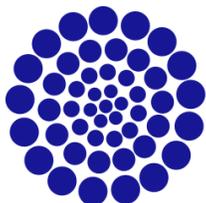
Agradecimientos

- ❖ A mis padres, por siempre darme todo para que me sintiera apoyado, por corregirme cuando hacía falta y porque en cada decisión que he tomado, he sentido su cariño y ayuda incondicional. Gracias por siempre estar conmigo y por educarme para convertirme en un mejor ser humano y por enseñarme a perseguir mis logros.
- ❖ A mi hermano, por siempre estar ahí para mí, ya sea para platicar de las cosas que me gustan o para aconsejarme si tengo algún problema o preocupación. Gracias por tu compañía y que sé que siempre podré contar contigo.
- ❖ A mi abuelita, por su cariño incondicional desde que nací, por todos esos días que me cuidó y procuró que estuviera bien, y porque aún seguimos viéndonos en las tardes a pesar de la pandemia, gracias por nunca dejar de cuidarme.
- ❖ A mi tío Jorge, por todo su apoyo durante mi trayecto, por esos días que llevaba a Ciudad de México para poder cumplir con un trámite o requisito, por cuidar a mi abuelita y por estar al pendiente de nosotros.
- ❖ A mi novia, por impulsarme para conseguir mis metas y para convertirme en la mejor versión de mí cada día. Sin tus apoyos y tus ánimos, probablemente estaría en otro camino, gracias por guiarme con tu cariño.
- ❖ A la Dra. Laura Domínguez Dueñas, por ser mi profesora y tutora, por su indispensable guía y su enorme apoyo durante toda la maestría, a su paciencia para que pudiera aprender y convertirme en un mejor investigador y que, a pesar de las complicaciones por la pandemia, siempre estuvo pendiente de mi proyecto y de lo que necesitara.
- ❖ Al Dr. Ramsés Elías Ramírez Gutiérrez, por haberme guiado al camino de la ciencia computacional y por seguirme apoyando aún después de haber concluido mi licenciatura.
- ❖ A mis sinodales, al Dr. Miguel Antonio Costas Basín, al Dr. Rogelio Rodríguez Sotres, al Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella, a la Dra. Carmen Nina Pastor Colón, y a la Dra. Adela Rodríguez Romero, por sus correcciones y observaciones que ayudaron a mejorar y pulir el presente trabajo.
- ❖ A mis compañeros de grupo de investigación, a Dulce Guzmán, José Luis Velasco, Guillermo Goode, Humberto Flores, Itzel Pérez, Ángel Santiago, Guillermo Leuman, Arsenio Cruz, al Dr. César León, y al Dr. Rodrigo Aguayo, quien ya formó su propio grupo de investigación, no sé dónde estaría sin su apoyo y paciencia, sin esas juntas donde me aconsejaron y guiaron para poder llevar a cabo y consolidar el presente proyecto. A pesar de la distancia por la pandemia, me hicieron sentir bienvenido y como parte del grupo.
- ❖ A mi amigo Raúl Bueno Alonso, porque, a pesar de todos los años que han pasado, seguimos conservando la amistad y seguimos disfrutando de buenos momentos y buenas pláticas a pesar de la distancia.
- ❖ A mis amigos, a quienes no he podido ver, o no he podido ver seguido por culpa de la pandemia, gracias porque seguimos en contacto y poder compartir nuestros logros y nuestras vivencias.

Así mismo, quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por proporcionarme las herramientas y recursos para mi formación académica.



Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría (CVU: 1075208).



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Al Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP 5000-9155), y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IA204716).

Y a la Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC), por la proporción de recursos de supercómputo (LANCAD-UNAM-DGTIC-306).



Índice general

| | |
|---|----|
| 1 Introducción | 1 |
| 1.1 Cataratas..... | 1 |
| 1.2 Estructura de las cristalinas..... | 2 |
| 1.3 Cristalina γ -D | 2 |
| 1.4 Efecto de los metales | 4 |
| 1.5 Predicción de sitios de unión | 5 |
| 1.6 Quantum Mechanics/Molecular Mechanics (QM/MM)..... | 7 |
| 1.7 Metal Center Parameter Builder (MCPB.py) | 8 |
| 1.8 Dinámica Molecular Dirigida (SMD)..... | 9 |
| 2 Hipótesis | 11 |
| 3 Objetivos | 12 |
| 3.1 General: | 12 |
| 3.2 Específicos: | 12 |
| 4 Determinación de los sitios de unión de CRYGD con Zn(II) | 13 |
| 4.1 Metodología | 13 |
| 4.2 Resultados y discusión..... | 14 |
| 4.2.1 Predicción de sitios de unión..... | 14 |
| 4.2.2 Simulaciones QM/MM..... | 26 |
| 4.2.3 Análisis de las energías de unión | 32 |
| 4.3 Conclusiones..... | 34 |
| 5 Estudio de la estabilidad de monómeros de CRYGD al unirse a zinc | 35 |
| 5.1 Metodología | 35 |
| 5.2 Resultados y discusión..... | 35 |
| 5.3 Conclusiones..... | 36 |
| 6 Análisis de formación de dímeros de CRYGD unidos por puente metálico | 37 |
| 6.1 Metodología | 37 |
| 6.2 Resultados y discusión..... | 38 |
| 6.2.1 Dímero CHCD (C18, H22 + C110, D113) | 38 |
| 6.2.2 Dímero CHHD (C18, H22 + H65, D73) | 44 |

| | |
|---|----|
| 6.2.3 Dímero CHCS (C18, H22 + C110, S136)..... | 49 |
| 6.3 Conclusiones..... | 54 |
| 7 Perspectivas | 57 |
| Bibliografía | 58 |
| 8 Anexos | 65 |
| 8.1 Gráficas complementarias a los resultados del capítulo 4..... | 65 |
| 8.2 Figuras complementarias a los resultados del capítulo 5..... | 68 |
| 8.3 Figuras complementarias a los resultados del capítulo 6..... | 70 |
| Índice de figuras | 80 |
| Índice de tablas | 86 |

Página de abreviaturas

PDB – Protein Data Bank

CRYGD – Cristalina γ -D

CRYGC – Cristalina γ -C

CRYGS – Cristalina γ -S

MIB – Metal Ion Binding Site Prediction Server

RMSD – Root Mean Square Deviation

QM/MM – Mecánica Cuántica/Mecánica Molecular

QM – Mecánica Cuántica

MM – Mecánica Molecular

MCPB – Metal Center Parameter Builder

SMD – Dinámica Molecular Dirigida

SP – Single Point Energy

DFT – Teoría de Funcionales de la Densidad

SASA – Área de la Superficie Accesible al Solvente

M1 – Monómero 1

M2 – Monómero 2

CHCD – Denominación del dímero conformado cuyo puente metálico se conforma por C18, H22, C110 y D113

CHHD – Denominación del dímero conformado cuyo puente metálico se conforma por C18, H22, H65 y D73

CHCS – Denominación del dímero conformado cuyo puente metálico se conforma por C18, H22, C110 y S136

Introducción

1.1 Cataratas

De acuerdo con información de la OMS, la enfermedad de cataratas es una de las principales causas de discapacidad visual y ceguera que afecta a más de 94 millones de personas en el mundo [1]. En muchas ocasiones, el deterioro visual en la enfermedad de catarata es predecible y tratable, sin embargo, el único tratamiento actual para el tratamiento de la enfermedad de cataratas es la cirugía, que es costosa e inaccesible para algunos sectores de la población de países en vías de desarrollo [2].

La enfermedad de cataratas ocurre cuando el cristalino del ojo, el cual es la estructura encargada de enfocar la luz en la retina, pierde su transparencia y empieza la opacificación (figura 1.1). El cristalino, para mantener su función, se encuentra desprovisto de organelos celulares y posee una alta concentración de proteínas con la capacidad de refractar la luz: las cristalinas. Estas proteínas son solubles y lo suficientemente estables como para durar toda una vida, ya que el cristalino carece de un sistema de síntesis o degradación proteica [3]. Sin embargo, factores como exposición prolongada a la radiación UVB, consumo de alcohol, nicotina y corticoesteroides, mutaciones congénitas, edad avanzada, diabetes, entre otros, afectan la integridad, estructura y solubilidad de dichas proteínas, generando agregados que vuelven opaco al cristalino [4].

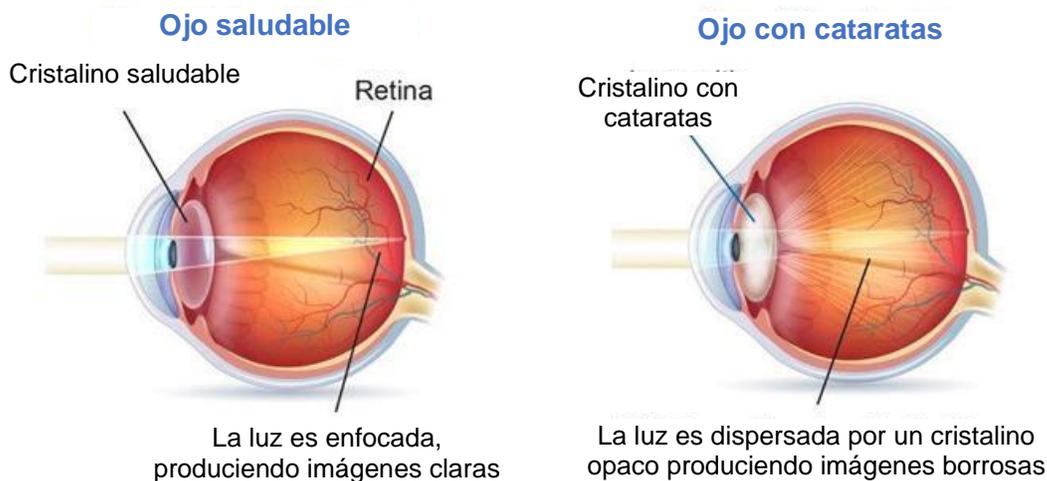


Figura 1.1. Alteración de la vista ocasionada por cataratas. Modificada de [5]

1.2 Estructura de las cristalinas

Las proteínas cristalinas se dividen en dos grandes familias:

1. **α -cristalinas:** Las cuales cumplen con una función de chaperonas, es decir, corrigen el desplegamiento de las proteínas del cristalino y previenen la formación de agregados insolubles. Además, sus regiones promotoras contienen elementos de respuesta al estrés [6].
2. **$\beta\gamma$ -cristalinas:** Su función es la de mantener el índice refractivo del cristalino [7]. Su plegamiento se compone de cuatro motivos de greca organizados en dos dominios. Las β -cristalinas típicamente forman especies diméricas o multiméricas, mientras que las γ -cristalinas sólo se encuentran como monómeros [7].

1.3 Cristalina γ -D

La cristalina γ -D (CRYGD) es una de las γ -cristalinas más abundantes en el ojo humano. Sus dominios homólogos (N-terminal y C-terminal) forman una interfaz hidrofóbica en la región interdominio, que es de suma importancia para mantener la estructura proteica de esta familia de proteínas [8]. Además, se ha demostrado que un núcleo hidrofóbico, presente en cada uno de los dominios, es crucial para la estabilidad de la proteína. Esto puede observarse en la mutación puntual W42R de CRYGD, en la cual un aminoácido hidrofóbico perteneciente a esta región es mutado por un aminoácido con características polares, lo que favorece la entrada de agua al núcleo hidrofóbico que lleva al desplegamiento del dominio N-terminal de la proteína. De forma similar, la mutación del aminoácido análogo a W42 en el dominio C-terminal (W130) a arginina tiene como consecuencia el desplegamiento del dominio correspondiente [9].

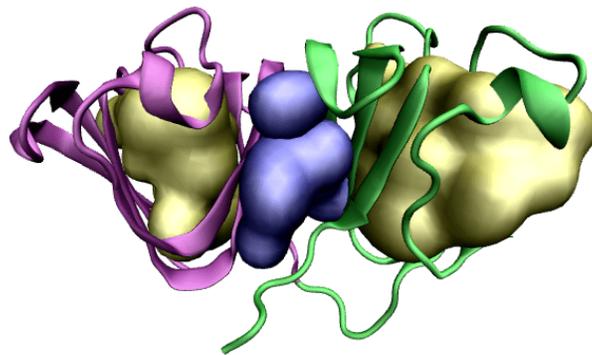


Figura 1.2. Derecha: Estructura tridimensional de la proteína CRYGD (PDB ID: 1hk0), determinada a 1.25 Angstroms de resolución. En color morado se resalta el dominio N-terminal; en verde el dominio C-terminal; en dorado la cavidad hidrofóbica y en azul la región interdominio.

La mutación W42R causa cataratas congénitas en humanos [10] de forma similar, otros ejemplos de mutaciones puntuales que afectan la estructura o la solubilidad de CRYGD y, también, causan cataratas congénitas son P23T [11], E107A [12], R77S [13], W156X [14], R14C [15], R36C [16] y R58H [17].

Otros factores que pueden afectar la estabilidad de CRYGD son las modificaciones post-traduccionales como la desamidación de los residuos Q12, N49 y N160, oxidación de Y45 y W156 (este último es uno de los cuatro triptófanos que protegen a la proteína de daño por UV al absorber la radiación), metilación de C110 y la formación de puentes de disulfuro en C18-C32 y C108-C110 [4].

Se ha propuesto que el mecanismo de desplegamiento de la CRYGD involucra un intermediario con una conformación abierta, es decir, que ha perdido la interfaz hidrofóbica interdominio (figura 1.3), lo que posteriormente lleva al desplegamiento del dominio N-terminal y, posteriormente, al desplegamiento de la estructura completa. Tanto la proteína desplegada, como sus intermediarios, pueden estar involucrados en la formación de oligómeros y agregados proteicos en la enfermedad de cataratas. Fármacos, como la morina, que sean capaces de prevenir la apertura de los dominios (N y C-terminales) de CRYGD a través de la unión a la interfaz hidrofóbica podrían prevenir la formación de agregados y, por ende, prevenir las cataratas [18].

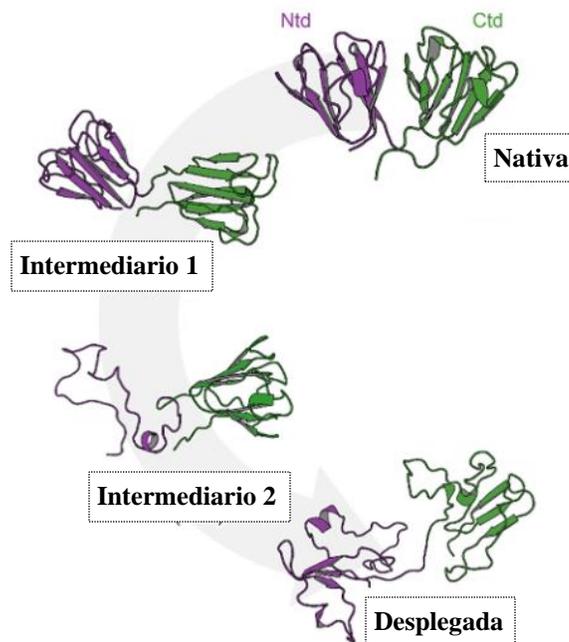


Figura 1.3. Representación esquemática del proceso de desplegamiento de CRYGD a través de intermediarios de conformación abierta. Modificada de [18].

1.4 Efecto de los metales

Se ha demostrado que la concentración de diversos iones metálicos en el cristalino y el humor acuoso se ve incrementada en pacientes con cataratas, por lo que se sugiere un vínculo entre los metales y el desarrollo de esta enfermedad. Entre estos iones metálicos se encuentra el zinc (Zn^{2+}) [19–21], el cual interactúa con la proteína CRYGD, especialmente con residuos de histidinas y cisteínas, alterando su estructura e induciendo la agregación, favoreciendo la opacificación del cristalino [22].

En un medio acuoso, el zinc presenta una geometría de coordinación octaédrica, es decir, se une a seis ligandos (en este caso, moléculas de agua) para satisfacer su esfera de coordinación. Sin embargo, al interactuar con una proteína, el zinc suele unirse únicamente a cuatro ligandos, resultando en una geometría de coordinación tetraédrica (figura 1.4). A través de estudios computacionales se ha observado que, cuando el zinc interactúa con un aminoácido, la transferencia de carga hacia el ligando es mayor que cuando interactúa con una molécula de agua, resultando en una esfera de coordinación estable con un menor número de ligandos. Este efecto es observable cuando el metal se une a dos o más aminoácidos con carga neutra (como la histidina) o cuando se une a uno o más aminoácidos con carga negativa (como una cisteína desprotonada, ácido glutámico o ácido aspártico) [23].

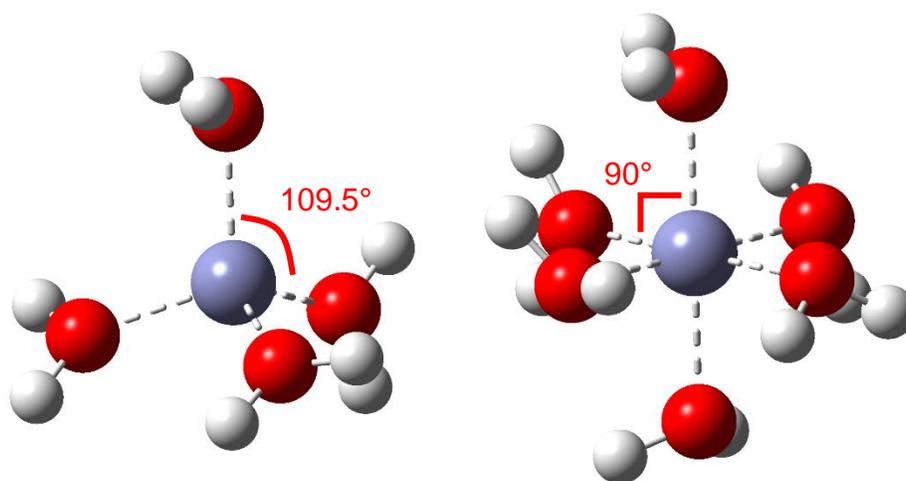


Figura 1.4. Geometría de coordinación tetraédrica (izquierda) y octaédrica (derecha) para el zinc. Para mayor simplicidad, los ligandos se representan únicamente como moléculas de agua. Los ángulos ideales se marcan en rojo.

Los resultados experimentales sugieren que, en el proceso de agregación por zinc de la CRYGD, no hay una pérdida de la estructura tridimensional de la proteína y el metal actúa como una especie de puente, conectando dos monómeros de CRYGD

y formando especies multiméricas. Esta hipótesis se fortalece a través del hecho de que la agregación es reversible en presencia de un quelante como EDTA. Además, se ha descubierto que el sitio conformado por los aminoácidos C18 y H22 es de alta importancia para la agregación de la CRYGD por zinc, ya que, las cristalinas CRYGC y CRYGS no son susceptibles a agregarse en presencia de este metal y análisis de alineamiento de secuencias han demostrado que carecen de la presencia de este sitio. La hipótesis actual del mecanismo de agregación es que el metal se une a los aminoácidos C18 y H22 en una coordinación similar a una proteína con un tipo dedo de zinc C2H2, sin embargo, en estas condiciones, el ion no es capaz de satisfacer su esfera de coordinación, por lo que interacciona con un segundo monómero de CRYGD (figura 1.5), formando un puente metálico [24].

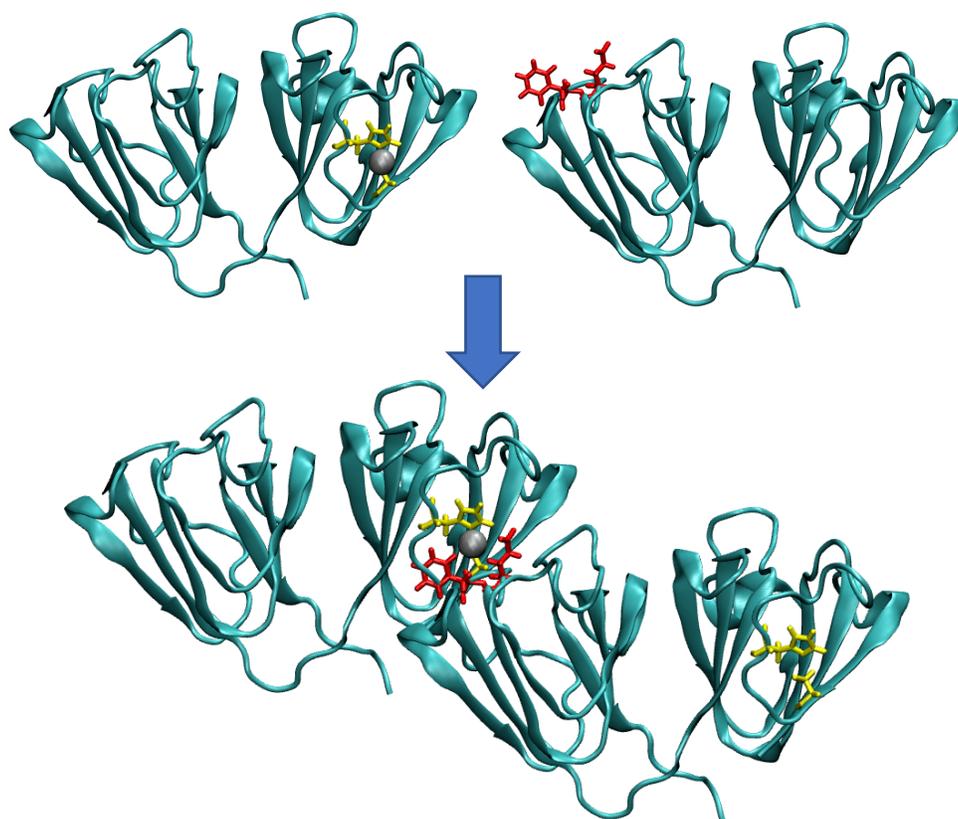


Figura 1.5. Representación esquemática del inicio del proceso de agregación de CRYGD al interactuar con Zn(II). El metal se une al sitio de unión C18, H22 (marcado en amarillo) del monómero 1 (izquierda) e interacciona con un sitio de unión desconocido (marcado esquemáticamente en rojo) ubicado en el monómero 2 (derecha). La interacción resulta en la formación de un dímero unido por puente metálico. El sitio C18, H22 del monómero 2 se encuentra disponible para coordinarse con otro ion de Zn(II), permitiendo la unión de otro monómero y formando un agregado multimérico.

1.5 Predicción de sitios de unión

Para poder analizar computacionalmente la interacción de CRYGD con el metal Zn(II), es conveniente utilizar herramientas de predicción para detectar los posibles aminoácidos implicados.

El servidor MIB (Metal Ion Binding site prediction server) es una herramienta de predicción de sitios de unión a metales basada en la información estructural experimental de diversas metaloproteínas. Para ello, el programa construye plantillas a partir de estructuras registradas en PDB de proteínas unidas a metales y con un porcentaje de identidad menor al 30% entre ellas. Estas plantillas contienen todos los aminoácidos (mínimo 2) ubicados a menos de 3.5 Å del metal. La estructura blanco es comparada con estas plantillas y se realizan alineamientos locales de secuencia (utilizando BLOSUM62) y estructurales (utilizando RMSD de C α) para detectar posibles sitios de unión [25].

BioMetAll es otra herramienta de predicción de sitios de unión y se basa en utilizar parámetros geométricos obtenidos directamente de la cadena principal de una proteína, logrando predecir sitios en los cuales las cadenas laterales de la estructura blanco no se encuentran completamente bien posicionadas. Para realizar la predicción, se genera una “red” de sondas metálicas y se analizan un conjunto de parámetros geométricos (figura 1.6) que se componen de las distancias y ángulos entre las sondas generadas y los aminoácidos que se encuentran cerca de las mismas. Este conjunto se compara con los parámetros de ángulos y distancias obtenidos de un análisis estadístico realizado a partir de las estructuras de metaloproteínas depositadas en la base de datos MetalPDB, para determinar la presencia de un sitio de unión a metales [26].

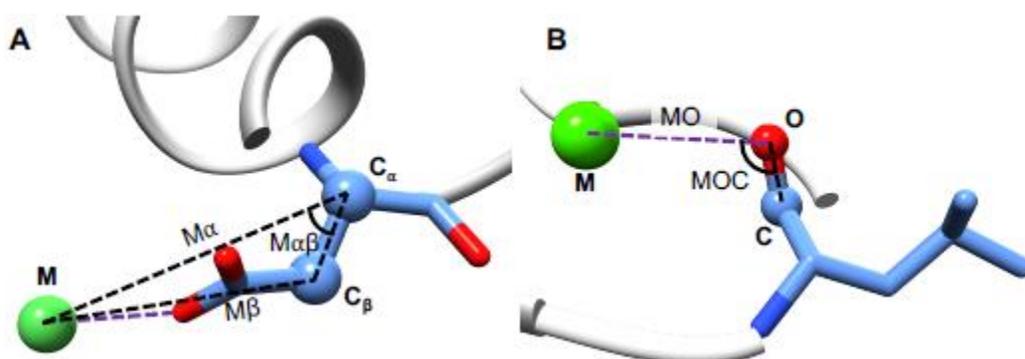


Figura 1.6. Parámetros geométricos analizados en BioMetAll. **A.** Parámetros analizados para el enlace entre el metal y la cadena lateral: $M\alpha$ corresponde a la distancia entre la sonda metálica y $C\alpha$; $M\beta$ corresponde a la distancia entre el metal y el $C\beta$; y $M\alpha\beta$ corresponde al ángulo formado entre la sonda metálica, $C\alpha$ y $C\beta$. **B.** Parámetros analizados para el enlace entre metal y cadena principal a través de C-terminal: MO corresponde a la distancia entre el metal y el oxígeno del carbonilo de C-terminal; y MOC corresponde al ángulo formado entre la sonda metálica, el oxígeno del carbonilo y el carbono de C-terminal. Imagen obtenida de [26].

Aquellas sondas que se encuentran en el mismo ambiente de coordinación se “agrupan” dentro de un mismo sitio, por lo que BioMetAll reporta como resultado una región de la proteína en donde se unen un grupo de sondas y representa una zona en la que un metal tiene la posibilidad de unirse. Cabe destacar que, a diferencia de MIB, la predicción de BioMetAll no es metal-específica, es decir, que los sitios reportados no son únicamente de unión a Zn^{2+} , sino de unión a cualquier metal [26].

Una vez identificados los posibles sitios de unión, se puede analizar la estabilidad del sitio con diferentes metodologías. El primer paso es realizar una simulación de dinámica molecular que permita relajar al ion metálico a partir de la posición de predicción inicial. Debido a que se busca modelar al metal con la mayor precisión posible, nuestra alternativa fue utilizar una metodología QM/MM.

1.6 Quantum Mechanics/Molecular Mechanics (QM/MM)

El esquema QM/MM resulta de gran utilidad cuando los sistemas de estudio son demasiado grandes para ser descritos a través de un enfoque puramente cuántico y los campos de fuerza de mecánica molecular no pueden modelar la formación y el rompimiento de enlaces. Entonces, la metodología descrita como QM/MM consiste en utilizar mecánica cuántica en una región de interés (en este caso, conformada por el metal más los aminoácidos y/o moléculas de agua cercanas) mientras el resto del sistema se modela a través de mecánica molecular (figura 1.7) [27]. Este enfoque permite realizar la relajación del sitio de unión con mayor precisión, mientras se toma en cuenta el ambiente de la proteína que lo rodea.

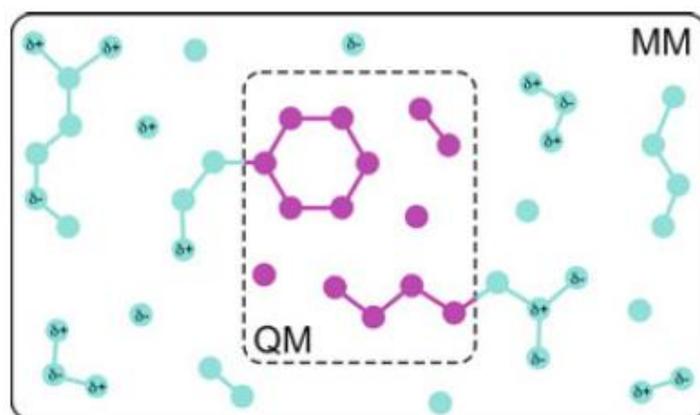


Figura 1.7. Esquema representativo del esquema QM/MM. En magenta se representan los átomos y moléculas que se encuentran en la región QM y serán descritos con mecánica cuántica y en azul se representan los átomos y moléculas que serán descritos con mecánica molecular. Imagen obtenida de [27].

La energía potencial de un sistema QM/MM es descrita con tres términos: La interacción entre los átomos de la región QM (V_{QM}); la interacción entre los átomos de la región de mecánica molecular (V_{MM}); y la interacción entre ambas regiones (V_{QM-MM}). Los primeros dos términos se describen con las técnicas correspondientes para cálculos QM y MM; sin embargo, el tercer término es más complicado de describir debido a la diferencia de teorías utilizadas en ambas regiones, por lo que se han desarrollado varios esquemas para describir esta interacción. El que utilizamos en el presente trabajo es el esquema aditivo.

En el esquema aditivo, la región QM es “incorporada” al resto del sistema y, por lo tanto, la energía es igual a la suma de los tres términos de interacción:

$$V_{QM/MM} = V_{QM}(QM) + V_{MM}(MM) + V_{QM-MM}(QM + MM)$$

El último término es descrito dependiendo el método de inmersión utilizado: mecánico, electrostático o de polarización [27]. Amber18, el software que utilizamos en el presente trabajo, utiliza el método de inmersión electrostático, en el cual las interacciones entre las cargas puntuales de los átomos en la región MM y los componentes atómicos de la región QM (núcleos y electrones) se toman en cuenta explícitamente y, por lo tanto, la densidad electrónica de la región QM es polarizada por las cargas puntuales de los átomos de la región MM [28].

El esquema QM/MM permite simular a la proteína CRYGD con el ion metálico permitiendo observar de manera detallada las interacciones con los diferentes aminoácidos. Sin embargo, QM/MM tiene un costo computacional alto, por lo que, para realizar simulaciones más largas y estudiar el comportamiento de CRYGD cuando se le une el metal, se deben utilizar distintas metodologías.

1.7 Metal Center Parameter Builder (MCPB.py)

MCPB.py es una herramienta, basada en Python, que permite generar nuevos parámetros para los aminoácidos que interactúan con un metal que son utilizables para una simulación de dinámica molecular con campos de fuerza.

Esta metodología consiste en generar dos modelos (pequeño y grande) del sitio de unión. El primero consiste únicamente en las cadenas laterales y/o en los átomos de la cadena principal que estén interactuando con el metal. El segundo consiste en describir a los aminoácidos completos del sitio de unión con *caps* de grupos acetilo y N-metilo (para modelar la continuidad de la cadena principal); y si los aminoácidos que interactúan con el metal se encuentran a cinco o menos residuos de distancia, se agregan también dichos residuos, aunque simplificados a glicinas. Ambos modelos son sometidos a cálculos QM, para obtener los parámetros geométricos del sitio de unión (ángulos y distancias de enlace obtenidos del modelo pequeño) y

parametrizar las cargas parciales (a partir del modelo grande), que se utilizarán para generar los nuevos parámetros para el archivo de topología que será usado en la dinámica molecular. Los aminoácidos unidos al metal son renombrados para diferenciarse de aquellos que no están unidos al metal y que, por lo tanto, no utilizarán los nuevos parámetros generados [29].

MCPB.py puede combinarse con métodos de muestreo acelerado para simular de una manera más adecuada el ensamble estructural de una proteína cuando ésta interactúa con un metal. De esta forma se pueden estudiar diferentes respuestas como el desplegamiento o la formación de dímeros, como es el caso en la interacción de CRYGD con Zn(II).

1.8 Dinámica Molecular Dirigida (SMD)

En una simulación de tipo SMD se aplica una fuerza externa que actúa modificando una serie de coordenadas del sistema. De esta forma se pueden explorar nuevas conformaciones que tomaría mucho más tiempo muestrear [30]. Esto se logra aplicando una restricción a la región de interés, con forma de un potencial armónico, que va a modificar las coordenadas del punto de restricción en una dirección específica y de interés. Como consecuencia, el sitio es forzado a moverse fuera de su conformación de equilibrio en dirección a las nuevas coordenadas del punto de restricción. El potencial armónico aplicado se define a través de la siguiente fórmula:

$$U = \frac{K(x - x_0)^2}{2}$$

K es la rigidez de la constante y x_0 es la posición inicial del punto de restricción, el cual se mueve a una velocidad constante v . La fuerza aplicada sobre el sitio de interés se define como [31]:

$$F = K(x_0 + vt - x)$$

El presente trabajo se divide en tres secciones principales, cada una contiene su respectiva metodología, resultados y conclusiones. En la primera sección se presenta un análisis de los sitios de unión, utilizando servidores de predicción para detectar los aminoácidos que pueden interactuar con el zinc y proponer posibles sitios de unión a metal en CRYGD; y posteriormente utilizando cálculos QM/MM y de teoría DFT para analizar su estabilidad. En la segunda sección se presenta el análisis de la estabilidad de CRYGD en su forma monomérica al unirse el zinc a los sitios propuestos, empleando herramientas de dinámica molecular clásica y de reparametrización. Finalmente, en la tercera sección se presenta el análisis de formación de dímeros de CRYGD a través de puentes metálicos que involucran los sitios propuestos, utilizando simulaciones de dinámica molecular dirigida y clásica junto con QM/MM y herramientas de parametrización. Las técnicas utilizadas en cada sección se resumen en la tabla 1.1.

Tabla 1.1. Resumen general de los métodos utilizados en cada sección del presente trabajo.

| Sección I | Sección II | Sección III |
|---|--|--|
| Predicción de sitios de unión con el servidor MIB | Reparametrización de cada sitio de unión utilizando MCPB.py | Análisis de una simulación de grano grueso de dímeros de CRYGD |
| Predicción de sitios de unión con BioMetAll | Simulaciones de dinámica molecular clásica de monómeros de CRYGD utilizando el sitio reparametrizado | Reparametrización de cada sitio de unión utilizando MCPB.py en los dímeros propuestos |
| Simulaciones QM/MM de cada sitio propuesto | Cálculo de estructura secundaria, superficie accesible al solvente y contactos nativos a partir de las simulaciones clásicas | Simulaciones de dinámica molecular dirigida |
| Cálculo de energías de unión utilizando DFT | | Simulaciones QM/MM de los dímeros formados |
| | | Reparametrización de cada puente metálico utilizando MCPB.py |
| | | Simulaciones de dinámica molecular clásica de dímeros de CRYGD formados por puente metálico |
| | | Cálculo de estructura secundaria, superficie accesible al solvente y contactos nativos a partir de las simulaciones clásicas |

Hipótesis

La unión del ion metálico Zn^{2+} a la proteína humana cristalina gamma-D no induce desplegamiento ni pérdida de estructura secundaria y permite la formación de dímeros estables unidos a través de puente metálico, propiciando la agregación de CRYGD en el cristalino humano.

Objetivos

3.1 General:

Comprender el mecanismo de agregación de CRYGD inducido por la presencia de Zn^{2+} utilizando herramientas *in silico*.

3.2 Específicos:

- Identificar los aminoácidos implicados en la interacción con Zn^{2+} utilizando herramientas de predicción de unión a metales.
- Analizar la estabilidad de la interacción de los sitios predichos utilizando simulaciones QM/MM y cálculos de energía de unión.
- Analizar la estabilidad de la proteína a través de simulaciones de dinámica molecular utilizando herramientas de parametrización.
- Analizar la formación de un dímero de CRYGD unido por un puente metálico utilizando SMD, QM/MM y herramientas de parametrización.

Determinación de los sitios de unión de CRYGD con Zn(II)

4.1 Metodología

La estructura utilizada como base para el análisis computacional es la obtenida a través de cristalografía de rayos X para CRYGD y registrada en PDB con el ID: 1HK0 [32]. Las simulaciones de producción de dinámica molecular se realizaron utilizando Amber18 [33] y a 300K de temperatura, utilizando una concentración de CaCl_2 de 0.15 M y una réplica de duración de 500 ns con un paso de tiempo de 2 fs. Utilizamos Ca para simular un ambiente de carga parecido al que produciría la presencia de Zn alrededor de la proteína y elegimos 0.15 M para mantener la misma concentración de iones de cloro que en un ambiente intracelular normal (NaCl 0.15 M). Utilizamos el campo de fuerza ff14SB [34] para la proteína y TIP3P [35] para las moléculas de agua. Para el control de la temperatura se utilizó el termostato de Langevin; y para mantener la presión constantes a 1 atm se utilizó el baróstato de Berendsen, implementados en Amber18 [33]. Las interacciones electrostáticas y de Lennard-Jones se calcularon para un valor de corte de 8 Å utilizando el método PME (Particle Mesh Ewald).

Para el análisis de los posibles sitios de unión, se tomaron 20 conformaciones a lo largo de la simulación de 500 ns y se mandaron al servidor MIB: Metal Ion-Binding Site Prediction and Docking Server [25]. Adicionalmente, se analizaron las mismas conformaciones con la herramienta BioMetAll [26]. Únicamente se tomaron como significativos aquellos sitios encontrados en cuatro o más de las 20 conformaciones analizadas.

Aquellos sitios que, de acuerdo con lo registrado en la bibliografía, pudieran tener un impacto relevante en la estabilidad de CRYGD se analizaron con simulaciones cortas de equilibramiento QM/MM de 2 ns con un paso de tiempo de 1 fs; en la región cuántica se modelaron los aminoácidos que conforman el sitio propuesto, al ion metálico y al menos dos moléculas de agua (las más cercanas al sitio) utilizando el nivel de teoría PM6 [36]. El resto de la estructura se modeló con mecánica molecular (ff14SB y TIP3P [34, 35]). Estas simulaciones se realizaron con Amber18 [33]. Para el control de la temperatura se utilizó el termostato de Langevin; y para el de la presión se utilizó el baróstato de Berendsen. Las interacciones electrostáticas y de Lennard-Jones se calcularon para un valor de corte de 8 Å utilizando el método PME (Particle Mesh Ewald).

Para estimar la estabilidad del metal en cada uno de los sitios propuestos, se calculó la energía de unión en el vacío utilizando la siguiente fórmula [37]:

$$E_{unión} = E_{SU-Zn} - E_{SU} - E_{Zn}$$

$E_{unión}$ es la energía de unión en el vacío; E_{SU-Zn} corresponde a la energía del sitio de unión con Zn unido; E_{SU} corresponde a la energía del sitio de unión sin el metal y E_{Zn} es la energía del metal. El sitio de unión se construyó utilizando los aminoácidos unidos directamente al metal, añadiendo a su extremo N-terminal un grupo acetilo y a su extremo C-terminal un grupo N-metilo para simular el efecto de la unión de aminoácidos con el resto de la proteína; y una o dos moléculas de agua (las más cercanas al sitio) para completar la esfera de coordinación del metal. El nivel de teoría utilizado fue B3LYP/6-31+G(d, p) y se realizaron cálculos de optimización y de energía SP (*Single Point Energy*) utilizando Gaussian16 [38].

Con la finalidad de evitar que en la optimización de energía se realizaran movimientos de los aminoácidos que serían imposibles de observar en la proteína, se utilizaron restricciones en los átomos que componen la cadena principal (N de N-terminal, C α y C de C-terminal). Las coordenadas iniciales para la construcción de cada sitio de unión se tomaron a partir del resultado de las simulaciones QM/MM previamente descritas.

4.2 Resultados y discusión

4.2.1 Predicción de sitios de unión

En la tabla 4.1, se muestran los resultados de la predicción de los sitios de unión a metal en la proteína CRYGD utilizando la herramienta BioMetAll.

Tabla 4.1. Resultados de BioMetAll para los posibles sitios de unión a metales a CRYGD. El número de repeticiones indica el número de conformaciones (máx. 20) en los que la herramienta detectó el sitio mencionado. La tercera columna indica el número de sondas que BioMetAll logró colocar en dicho sitio y que presentan interacciones con los aminoácidos que lo componen.

| SITIO DE UNIÓN | NÚMERO DE REPETICIONES | PROMEDIO DE SONDAS |
|----------------|------------------------|--------------------|
| E95, H121, | 20 | 103.75 |
| E119, H121 | 20 | 94.85 |
| H15, E17 | 20 | 92.4 |
| H87, E127 | 20 | 78.8 |
| H83, D171 | 20 | 73.85 |
| E93, H121 | 20 | 73 |
| H87, E106 | 20 | 61.4 |
| E93, E119 | 20 | 55.45 |
| E7, H15 | 20 | 49.85 |
| E95, D96 | 20 | 46.6 |
| C18, H22 | 20 | 44.15 |
| E7, D8 | 20 | 38.7 |

| | | |
|------------|----|-------|
| E106, D107 | 20 | 37.65 |
| H83, H87 | 5 | 37.2 |
| C41, H83 | 19 | 34.78 |
| E17, D38 | 17 | 33.59 |
| H22, C78 | 20 | 33 |
| H65, D73 | 7 | 32.57 |
| D64, H65 | 20 | 32.5 |
| E119, E134 | 10 | 29 |
| E17, H22 | 5 | 27 |
| E46, D73 | 9 | 26.89 |
| E46, H65 | 8 | 26.5 |
| E93, E95 | 13 | 25.15 |

El resultado se comparó con los sitios de unión detectados con la herramienta MIB (tabla 4.2). Es interesante observar que ambas herramientas detectaron el sitio **C18**, **H22**, el cual está reportado en la bibliografía como un sitio de alta importancia para la agregación de CRYGD [24].

Tabla 4.2. Resultados de MIB para los posibles sitios de unión a Zn(II) de HyD. La tercera columna indica el promedio de los scores de cada sitio para cada una de las repeticiones en las que se presentó.

| SITIO DE UNIÓN A ZN(II) | NÚMERO DE REPETICIONES | SCORE |
|-------------------------|------------------------|-------|
| C110, S136 | 12 | 1.174 |
| C18, C78 | 7 | 1.132 |
| C110, D113 | 19 | 1.127 |
| E7, H15 | 4 | 1.104 |
| E93, H121 | 4 | 1.000 |
| C18, H22, C78 | 14 | 0.992 |
| H65, D73 | 12 | 0.992 |
| H22, C78 | 7 | 0.965 |
| C108, C110 | 8 | 0.921 |
| D64, H65 | 5 | 0.902 |
| H83, D171 | 4 | 0.901 |
| E95, H121 | 4 | 0.879 |
| E7, Q26 | 4 | 0.871 |
| D38, D61 | 4 | 0.868 |
| C108, C110, R114 | 7 | 0.860 |
| H15, E17 | 6 | 0.848 |
| S34, D64, H65 | 4 | 0.848 |
| E7, Q12, H15 | 4 | 0.846 |
| C18, H22 | 5 | 0.843 |

Los sitios conformados por los aminoácidos **E93**, **H121**; **E7**, **H15**; **H83**, **D171**; **H15**, **E17**; y **H65**, **D73** también fueron detectados por ambas herramientas. En general,

la herramienta BioMetAll detectó una mayor cantidad de sitios, con una alta cantidad de sitios conteniendo histidina, especialmente la histidina **H121**. En cambio, MIB detectó menos sitios, **H121** es menos prominente y un aminoácido bastante notable es la cisteína **C110**, el cual no fue detectado por BioMetAll.

C110 es un aminoácido que puede ser importante para el proceso de agregación inducido por Zn(II), ya que, en un trabajo experimental, se detectó un cambio en los valores de CSP (Chemical Shift Perturbation) alrededor de los aminoácidos **H22**, **D38**, **D61**, **H83**, **H87**, **C110** y **D113**, lo que indica que hay una alta probabilidad de que el metal se una a ellos. Adicionalmente, en la sección computacional del mismo trabajo, se destaca que otros aminoácidos que forman posibles sitios de unión son: **S20**, **D21**, **H22**, **G40**, **C41**, **I81**, **H83**, **D113** y **D171** [39]. Utilizando BioMetAll, MIB, o ambas herramientas, fue posible detectar la mayoría de los posibles candidatos de sitios de unión indicados en la bibliografía.

4.2.2 Simulaciones QM/MM

Comparando lo obtenido con ambas herramientas (haciendo énfasis en MIB debido a que el score ayuda a indicar la significancia del sitio) y la bibliografía, se seleccionaron seis posibles sitios de unión, para los cuales se realizó una primera simulación con la metodología QM/MM para analizar su viabilidad y las interacciones entre el metal y los aminoácidos presentes. Es necesario mencionar que la posición inicial del metal fue modificada manualmente en algunos sitios para favorecer la coordinación en el sitio predicho por MIB.

Se seleccionaron seis sitios de unión (figura 4.1):

- Sitio 1: **C18**, **H22**
- Sitio 2: **C110**, **D113**
- Sitio 3: **C110**, **S136**
- Sitio 4: **H65**, **D73**
- Sitio 5: **H83**, **D171**
- Sitio 6: **C18**, **C78**

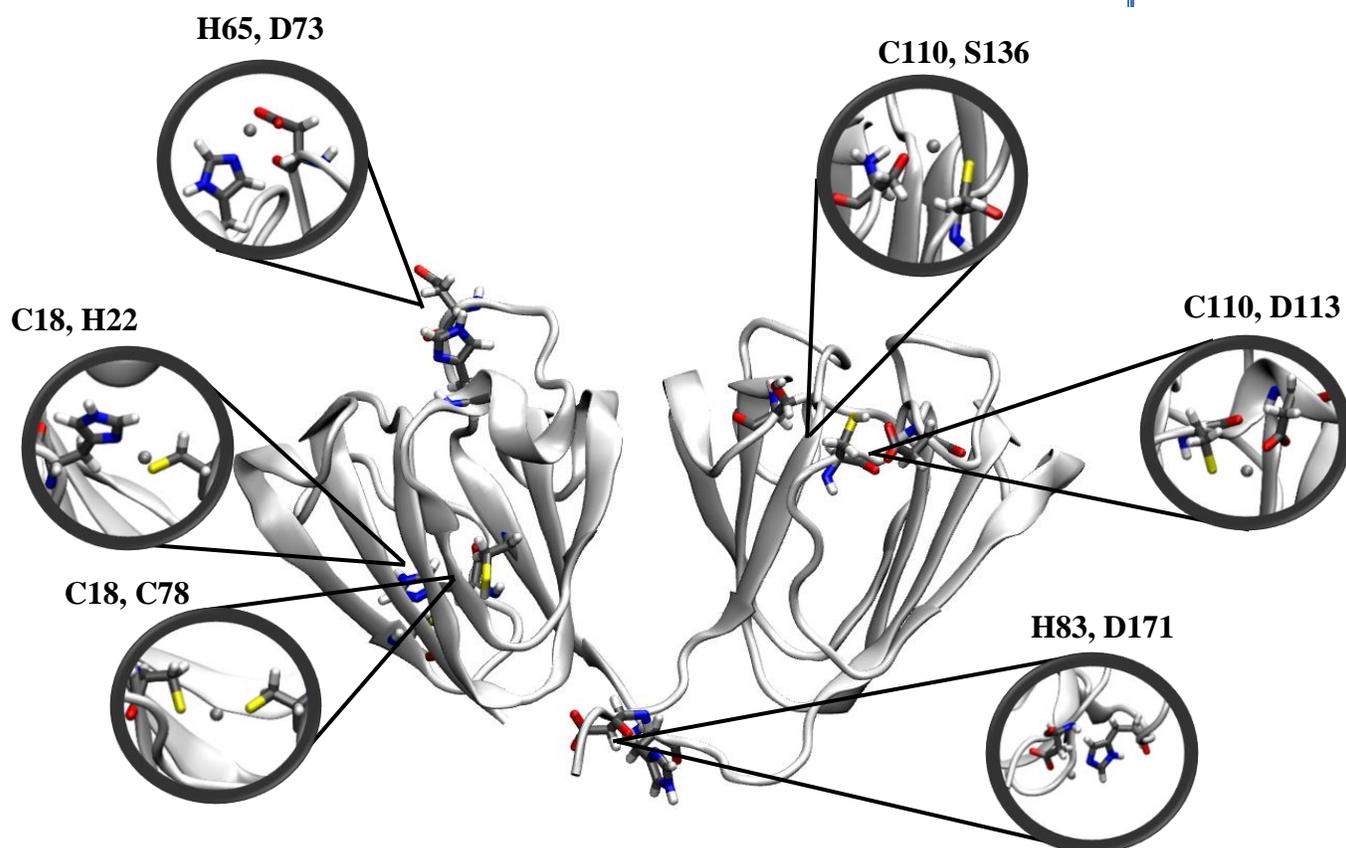


Figura 4.1. Distribución y vista general de los seis sitios seleccionados de unión a zinc en una representación tridimensional de la proteína cristalina gamma-D.

C18, H22 fue seleccionado como el sitio 1 debido a que su rol en la agregación de CRYGD por Zn(II) ha sido demostrada experimentalmente [24].

Como puede observarse en la figura 4.2, el metal se coordina con las cadenas laterales de la cisteína y la histidina de manera similar a un dedo de Zn(II) y completa su esfera de coordinación con dos moléculas de agua. La geometría resultante del sitio es similar a la tetraédrica.

El sitio coordinando el Zn(II) se mantiene estable a lo largo de la simulación realizada, lo cual concuerda con lo reportado por Domínguez-Calva *et. al.* [24] donde C18 y H22 funcionan como punto de anclaje para el metal y completa su esfera de coordinación con dos aminoácidos provenientes de otro monómero de CRYGD, formando oligómeros unidos por el zinc.

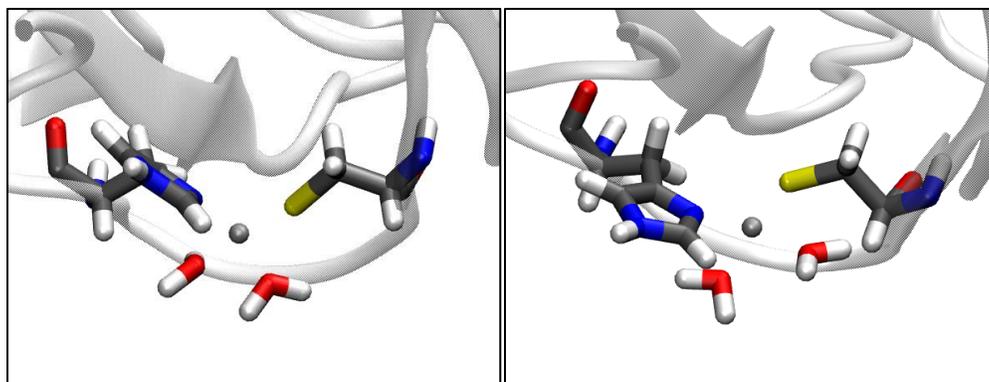


Figura 4.2. Conformación inicial (izquierda) y Conformación final (derecha) de la simulación QM/MM para el sitio de unión **C18, H22**. Puede observarse el mantenimiento del sitio de unión con una geometría similar a la tetraédrica a lo largo de la simulación. Se observa que la cadena lateral de la histidina se expone ligeramente más al solvente, sin embargo, no se observan cambios conformacionales importantes.

El sitio **C110, D113** fue analizado debido a que resalta entre los sitios más observados en MIB con mayor score, además, se reporta como un posible sitio de interacción con el metal en el trabajo de *Fernández-Silva et. al.* [39]. En su posición inicial, el metal interactúa con la región C-terminal de C110 y la cadena lateral de C110 y D113 (figura 4.3). Sin embargo, conforme avanzó la simulación, se observó un ligero cambio de posición del Zn(II) ya que interactúa con la cadena lateral de ambos aminoácidos y las dos moléculas de agua más cercanas, resultando en una geometría similar a la tetraédrica, en la cual el metal se mantiene estable.

Debido a la geometría observada y la posición de los aminoácidos en la proteína, el sitio **C110, D113** se convierte en un candidato interesante de segundo sitio de anclaje, completando la esfera de coordinación del zinc cuando se encuentra unido a **C18, H22**, iniciando la oligomerización de CRYGD.

La unión al metal generó un ligero cambio conformacional alrededor del D113, ya que promueve una conformación de hélice sobre la conformación de asa. Para determinar si este cambio genera modificaciones mayores en el resto de la estructura proteica, se realizó una simulación más larga, de 500 ns utilizando MCPB.py, cuyos resultados se expondrán más adelante.

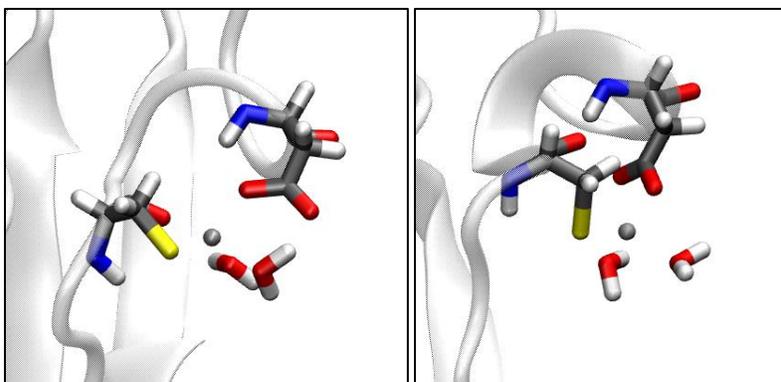


Figura 4.3. Conformación inicial (izquierda) y Conformación final (derecha) de la simulación QM/MM para el sitio de unión **C110, D113**. Se puede observar la transición a un sitio con coordinación tetraédrica que se mantiene estable a lo largo de la simulación. También, se observan ligeros cambios conformacionales en el asa donde se encuentra D113, dándole características más similares a las de una hélice.

En el sitio **C110, S136** se observa la desprotonación de la S136 (figura 4.4) para favorecer la coordinación con el metal. El N-terminal de S136 es el aceptor del protón; sin embargo, no se descarta la posibilidad de que el aceptor sea una molécula de agua, lo cual no fue posible visualizar en la simulación realizada debido a que las únicas moléculas de agua en la región QM se encontraban coordinando al metal.

La geometría del sitio es similar a la tetraédrica y el sitio se encuentra expuesto al solvente, por lo que es también candidato interesante para el segundo sitio de anclaje.

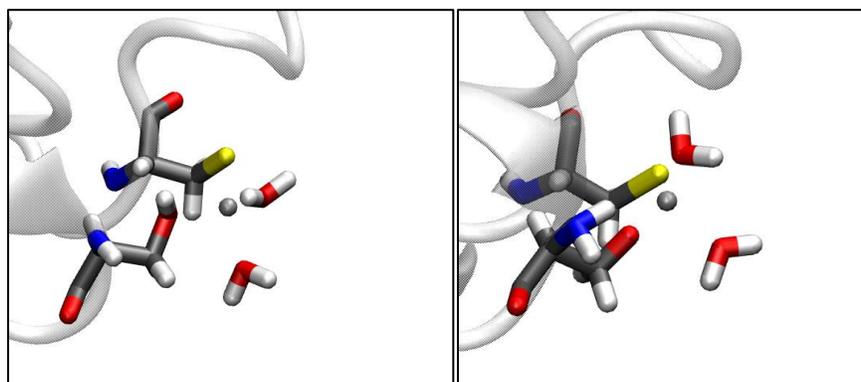


Figura 4.4. Conformación inicial (izquierda) y Conformación final (derecha) de la simulación QM/MM para el sitio de unión **C110, S136**. Se puede observar la desprotonación de la cadena lateral de S136 y la protonación de su N-terminal. La geometría similar a la tetraédrica se mantiene estable a lo largo de la simulación.

Para el sitio **H65, D73** fue necesario realizar una simulación corta con mecánica molecular (duración de 1 ns) con el campo de fuerza ff14SB, con la finalidad de

minimizar la energía del sistema antes de realizar la simulación QM/MM debido a que la posición inicial del Zn(II) (tanto la sugerida por MIB como la alterada manualmente) no fue adecuada. De tal forma, la simulación QM/MM fue extendida a un total de 4 ns. Adicionalmente, para favorecer la interacción de H65 con el metal, se cambió el estado de protonación a la posición delta de la histidina.

Como resultado, se obtuvo un sitio con geometría similar a la tetraédrica. Interesantemente, el sitio inicial considera la unión a D73 a través de su C-terminal y, conforme progresa la simulación, su cadena lateral interactúa con el metal y termina desplazando al C-terminal (figura 4.5). Se pueden observar ligeros cambios conformacionales en el asa en donde se encuentran ambos aminoácidos, especialmente alrededor de la H65 en la cual se observa la formación de una estructura tipo hélice (similar a lo ocurrido en el sitio **C110, D113**).

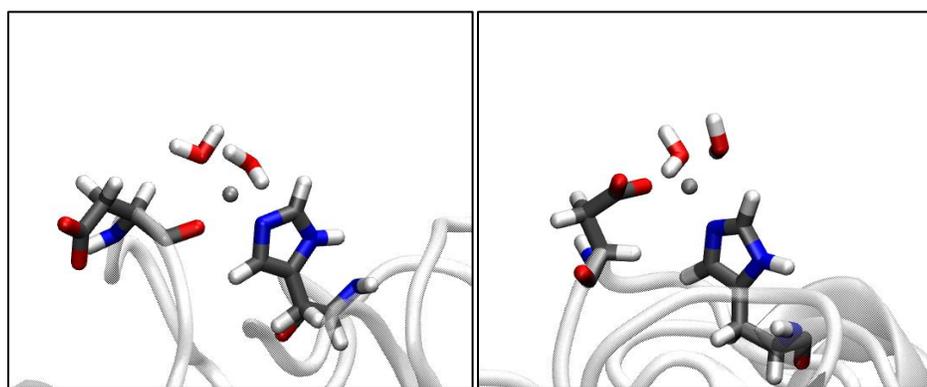


Figura 4.5. Conformación inicial (izquierda) y Conformación final (derecha) de la simulación QM/MM para el sitio de unión **H65, D73**. Se observan ligeros cambios conformacionales especialmente en el asa donde se encuentra H65, dándole características más similares a las de una hélice.

En el sitio de unión **H83, D171** se observan ligeros cambios conformacionales en el dominio N-terminal, donde regiones sin estructurar que unen elementos de hebra- β , adquieren una conformación de hebra alargando su tamaño (figura 4.6). Con los datos de la simulación QM/MM, se desconoce si dichos cambios pueden afectar la estabilidad del dominio N-terminal, por lo que será necesario hacer una simulación más extendida.

La geometría del sitio de unión es similar a la tetraédrica y se mantiene a lo largo de la simulación. **H83, D171**, aunque es un sitio interesante debido a que se encuentra unido a un residuo ubicado en una región muy cercana al extremo C-terminal y a un residuo que se encuentra en el asa que une a los dos dominios de la proteína, es poco probable que actúe como sitio de anclaje debido a la flexibilidad de las regiones en las cuales se encuentran los aminoácidos implicados. Sin

embargo, no se descarta que la unión en dicho sitio provoque cambios importantes en la estructura secundaria de CRYGD.

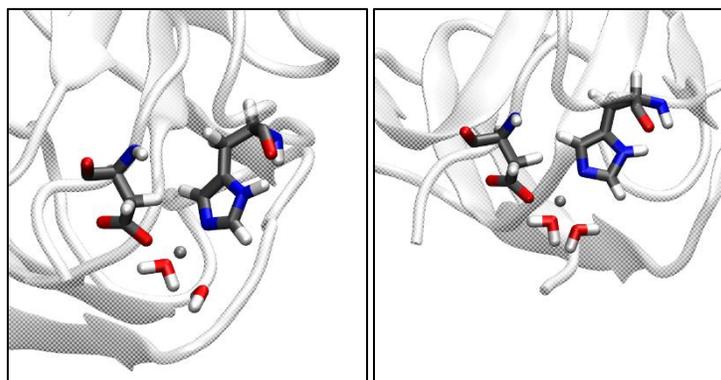


Figura 4.6. Conformación inicial (izquierda) y Conformación final (derecha) de la simulación QM/MM para el sitio de unión **H83, D171**. Se observan ligeros cambios conformacionales en las asas que unen elementos de hebra- β en el dominio N-terminal.

El sitio **C18, C78** es un caso inusual, ya que no se genera un sitio de coordinación tetraédrico. **C78** se encuentra cerca del núcleo hidrofóbico, por lo tanto, no hay moléculas de agua cercanas al metal para completar la esfera de coordinación, y los aminoácidos más cercanos que pudieran coordinarse son H22 (a través de su N-terminal) y W42. Sin embargo, ninguno de ellos interacciona con el metal a lo largo de la simulación. El número de coordinación del Zn(II) en este sitio es 3, que corresponde a las cadenas laterales de **C18, C78** y al C-terminal de **S20** (figura 4.7). Interesantemente, el metal se mantuvo estable en el sitio.

Debido a que el metal no se encuentra en una región expuesta, es muy poco probable que el sitio **C18, C78** sea un sitio de anclaje que permita la oligomerización de CRYGD por puente metálico.

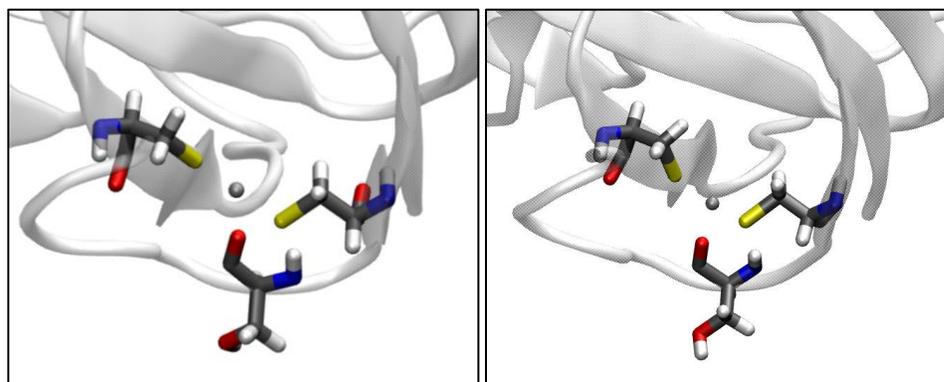


Figura 4.7. Conformación inicial (izquierda) y Conformación final (derecha) de la simulación QM/MM para el sitio de unión **C18, C78**. Se puede observar el mantenimiento de un sitio de unión donde el número de coordinación es 3 y los ángulos entre los átomos coordinantes son más similares a un sitio con geometría octaédrica.

4.2.3 Análisis de las energías de unión

Para analizar la estabilidad de cada uno de los sitios propuestos, se realizaron cálculos de energía de unión en el vacío utilizando teoría DFT en el software Gaussian16. Se calcularon dos energías: una con la estructura optimizada con el nivel de teoría B3LYP/6-31+G(d, p) y otra energía de unión sin modificar la estructura obtenida por QM/MM utilizando energías de tipo *Single Point* (SP).

Como puede observarse en la figura 4.8, la energía de unión calculada con SP es mayor que la energía calculada después de una optimización. Interesantemente, la mayor diferencia de energía se observa para el sitio **C110, S136**, el cual es uno de los sitios a los que se agregaron restricciones adicionales a las moléculas de agua para que no se movieran durante la optimización; mientras que uno de los sitios con menor diferencia de energía es **C18, C78**, el cual no contiene moléculas de agua. Esto se debe ya que, al realizarse la optimización de energía en el vacío, las moléculas de agua tienden a interactuar entre sí mismas y no con el ion metálico, lo que conlleva agregar restricciones de posición adicionales para el mantenimiento del sitio de unión y afecta el valor de la energía calculada.

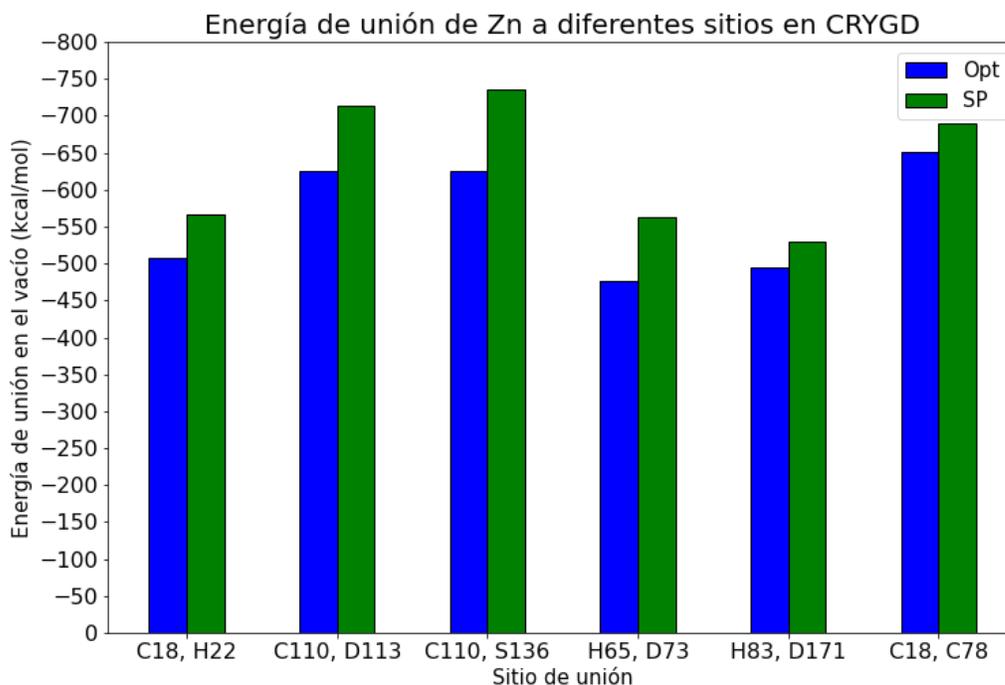


Figura 4.8. Gráfica de la energía de unión en el vacío para los sitios elegidos calculada a través de una optimización de estructura (azul) y con energía SP (verde). Se observa que para todos los sitios la energía de unión calculada con SP es mayor.

Aquellos sitios de unión que contienen dos aminoácidos cargados negativamente (**C110, D113; C110, S136; C18, C78**) son mucho más estables que aquellos que contiene a un aminoácido neutro y sólo uno cargado negativamente (**C18, H22; H65, D73; H83, D171**). Esta tendencia era de esperarse para aquellos sitios en los que se interactúa con **C110**, sin embargo, no concuerda para **C18, C78** debido a que en dicho sitio el metal no completa su esfera de coordinación. Además, la diferencia de energía observada es mayor a 100 kcal/mol, por lo que puede sugerirse que el cálculo de energía en el vacío sobreestima la interacción del ion metálico con los sitios que contienen dos aminoácidos cargados negativamente.

Con la finalidad de comprobar si hay una sobreestimación de energía, realizamos el cálculo de la energía SP para los sitios de unión **C18, H22; H65, D73; H83, D171**, pero con la histidina desprotonada, y se protonó a **D113** en el sitio de unión **C110, D113** y a **S136** en el sitio **C110, S136**.

Como puede observarse en la figura 4.9, para los sitios en los que se realizó la desprotonación de la histidina, la energía aumentó en una proporción similar a la disminución en la energía de unión para el sitio donde se protonó el aspartato y donde se protonó la serina, permitiendo realizar una mejor comparación de la estabilidad de cada sitio propuesto.

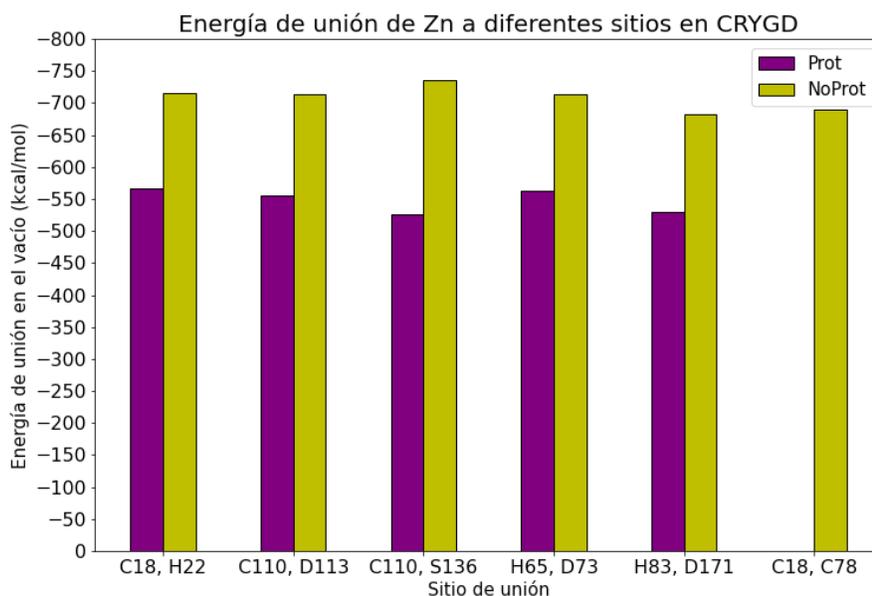


Figura 4.9. Gráfica de las energías SP de unión para los sitios con dos aminoácidos cargados negativamente (amarillo) y los sitios con un aminoácido cargado negativamente (morado). Se observa que, al realizar dicha modificación, las diferencias de energía entre cada sitio se reducen drásticamente.

El sitio de unión **C110, S136** es el sitio con mayor energía de unión, seguido de los sitios **C18, H22; C110, D113; y H65, D73**, los cuales tienen energías de unión muy similares. Con el cambio realizado en los estados de protonación se realizó la importancia de **C18, H22**, el cual se conoce por información experimental que es crucial para el proceso de agregación mediado por Zn(II) [24]. También, se realizó la importancia de la desprotonación de la serina para **C110, S136**, el cual pasó de tener la energía de unión más alta a la energía más baja. Los sitios con menor valor de energía de unión son **C18, C78 y H83, D171**, en los cuales, para el primero se observa que el metal no completa su esfera de coordinación y el segundo se encuentra en una región muy flexible, lo cual podría afectar su capacidad para coordinar al metal.

Debido a que el sitio **C18, C78** no se encuentra lo suficientemente expuesto al solvente y su energía de unión es menor que las de los sitios 1-4, decidimos descartarlo para los análisis subsecuentes. Por lo tanto, en los capítulos siguientes sólo realizamos simulaciones con los sitios de unión 1-5.

4.3 Conclusiones

Utilizando herramientas y servidores de predicción, junto con información experimental reportada en la literatura [39], detectamos seis posibles sitios de unión a Zn(II): **C18, H22; C18, C78; C110, D113; C110, S136; H65, D73 y H83, D171**; de los cuales analizamos su estabilidad a través de simulaciones QM/MM. Observamos que la mayoría de los sitios mantienen una geometría de coordinación tetraédrica (la más favorecida en un entorno proteico [23]) coordinando con los dos aminoácidos del sitio y dos moléculas de agua. El único sitio de unión que carece de una coordinación tetraédrica es **C18, C78**.

Para estimar la energía de unión de cada sitio, utilizamos Gaussian16. Al realizar los cálculos de energía en el vacío a través de una optimización, en algunos casos las moléculas de agua preferían interactuar entre ellas en lugar de con el metal, forzando la introducción de restricciones adicionales para favorecer la coordinación con zinc, por lo que optamos por utilizar cálculos de energía SP.

Adicionalmente, observamos una sobreestimación de la energía de unión para los sitios con mayor carga negativa, por lo que modificamos la carga de los sitios propuestos a través de la adición o remoción de un protón. Con ello, los sitios con mayor energía de unión son los sitios **C110, S136; C18, H22; y C110, D113**, de los cuales destacan **C18, H22** debido a que su importancia en la agregación de CRYGD inducida por Zn ha sido demostrada experimentalmente [24], y **C110, S136** ya que en la simulación QM/MM correspondiente se observó la desprotonación de la serina para favorecer la interacción con el metal. Con los datos observados, concluimos que, debido a su ubicación y la inusual geometría de coordinación, el sitio **C18, C78** no será considerado para los siguientes análisis.

Estudio de la estabilidad de monómeros de CRYGD al unirse a zinc

5.1 Metodología

Para estudiar cambios en la estabilidad de la CRYGD al unirse al metal Zn(II), se realizó una simulación de 500 ns a una temperatura de 300 K con AMBER18 [33], utilizando una concentración de CaCl₂ de 0.15 M y con un paso de tiempo de 2 fs utilizando el campo de fuerza ff14SB [34] para la proteína y TIP3P [35] para las moléculas de agua. La parametrización de los iones metálicos de Zn(II) se realizó con la herramienta MCPB.py [29] dentro de la suite de Amber.

Para todas las simulaciones realizadas se utilizó el termostato de Langevin para el control de temperatura; el baróstato de Berendsen para el control de la presión; y las interacciones de no-enlace se calcularon considerando un valor de corte de 8 Å utilizando el método PME (Particle Mesh Ewald).

Para analizar los resultados obtenidos, se realizaron cálculos de RMSD, se midieron los ángulos de coordinación para las simulaciones QM/MM, del área de la superficie accesible al solvente (SASA) y de contactos nativos de cada uno de los dominios de la proteína para las simulaciones de 500 ns. Para el cálculo de contactos nativos, se realizó un análisis de clústering de la simulación sin metal utilizando un algoritmo jerárquico, y la estructura más representativa del clúster más poblado fue utilizada como referencia para todas las simulaciones. Estos análisis se realizaron con cpptraj [40].

Adicionalmente, se utilizó el comando gmx sasa dentro de la suite de GROMACS (versión 2020.1) [41] para el análisis de SASA por residuo de las simulaciones de 500 ns de la presente sección.

5.2 Resultados y discusión

Para caracterizar el efecto de la unión del ión Zn(II) en el resto de la estructura de la CRYGD, para cada uno de los sitios de unión (figura 5.1), se realizaron simulaciones de 500 ns en las que la parametrización de los aminoácidos unidos al metal se realizó con la herramienta MCPB.py, la cual utilizó como estructura inicial la conformación final de la simulación QM/MM correspondiente para cada sitio.

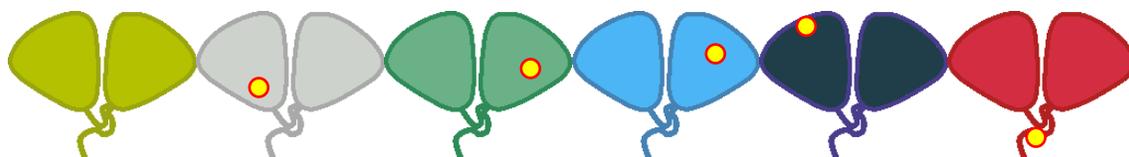


Figura 5.1. Representación esquemática de los sistemas monoméricos a estudiar en la presente sección. Cada sistema se representa de un color diferente para una mayor claridad, con la posición aproximada del metal denotada con un círculo amarillo. De izquierda a derecha: CRYGD nativa (sin unión a metal); CRYGD con el metal unido al sitio 1 (**C18, H22**); CRYGD con el metal unido al sitio 2 (**C110, D113**); CRYGD con el metal unido al sitio 3 (**C110, S136**); CRYGD con el metal unido al sitio 4 (**H65, D73**); CRYGD con el metal unido al sitio 5 (**H83, D171**).

Con la finalidad de determinar si hubo cambios conformacionales que afectaran la estabilidad proteica debido a la interacción con el Zn(II) en cada uno de los sitios se realizó un análisis de cálculo de estructura secundaria. Además, se realizó un cálculo del área de la superficie accesible al solvente (SASA) para determinar si la unión del metal genera un cambio conformacional que permita la entrada de solvente a regiones previamente inaccesibles, como los núcleos hidrofóbicos, y un análisis de contactos nativos para determinar si durante la simulación los contactos iniciales se conservan. Estos análisis fueron realizados en cpptraj de la suite de Amber, excepto el análisis de SASA por residuo, el cual fue realizado en GROMACS.

Para el análisis de estructura secundaria, se utilizó un script de Python que grafica la fracción de tiempo, a lo largo de una simulación, que un aminoácido forma parte de un elemento de estructura secundaria. Cada gráfica de estructura se presenta junto con el gráfico correspondiente para la simulación sin zinc.

Las simulaciones de 500 ns serán nombradas de acuerdo con los aminoácidos que conforman el sitio donde se une el zinc. Es decir, si el metal se encuentra unido al sitio **C18, H22**, la simulación de 500 ns correspondiente será denominada la simulación **C18, H22** y así para los demás sitios de unión.

La estructura secundaria se mantiene en todas las simulaciones.

De acuerdo con el gráfico de estructura secundaria para la simulación **C18, H22** (figura 5.2), no se encontraron cambios significativos en el dominio N-terminal (ni en el dominio C-terminal) que sugieran una pérdida de estructura. La proteína parece mantenerse estable al interactuar con el ion metálico, lo que concuerda con la evidencia experimental, en la que se observa que utilizar un agente quelante revierte el proceso de agregación [24], además, de que la unión de Zn no afecta significativamente el perfil de dicroísmo circular de CRYGD [22] ni el perfil de fluorescencia de los triptófanos [39], sugiriendo que no hay desplegamiento de la

proteína. El cambio de estructura más notable observado es la formación de una pequeña hebra- β alrededor del residuo 22 (figura 5.2) la cual puede observarse interactuando con otra hebra cercana. La nueva hebra- β no parece tener un efecto negativo en la proteína.

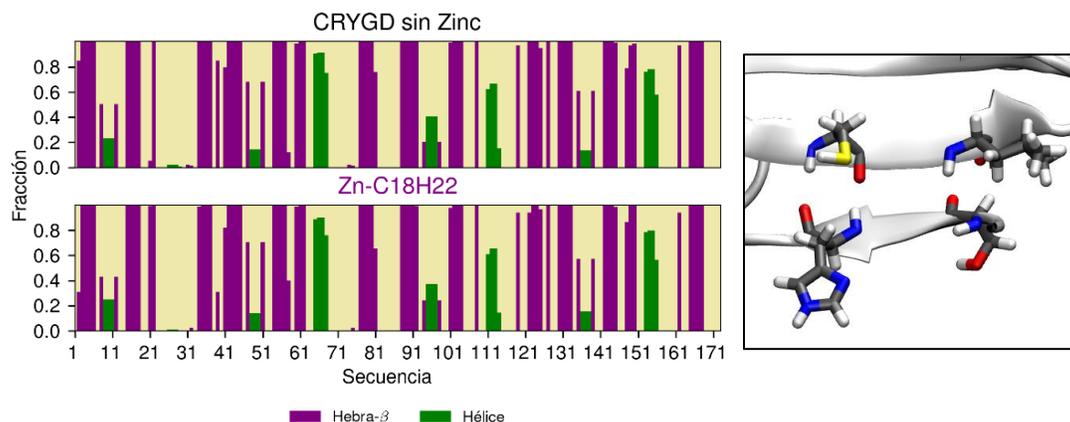


Figura 5.2. Izquierda: Gráfica de estructura secundaria de la proteína CRYGD lo largo de la simulación de 500 ns del sitio **C18, H22**. Derecha: Hebra- β compuesta por los residuos S20, D21 y H22 formada durante la simulación de 500 ns del sitio **C18, H22** y sus interacciones con los aminoácidos C78 y L80 pertenecientes a una hebra- β cercana.

De acuerdo con el gráfico de estructura secundaria para la simulación **C110, D113** (figura 5.3), no se encontraron cambios significativos que sugieran la pérdida de estructura en ninguno de los dos dominios, por lo cual el sitio es un candidato interesante para la formación del puente metálico entre monómeros. Sin embargo, sí es interesante destacar que la unión del metal provocó cambios interesantes, como la formación de la hebra- β compuesta por S20, D21 y H22 observada en la simulación de 500 ns del sitio **C18, H22** a pesar de que el sitio de unión se encontraba en el dominio opuesto. También, es posible observar un ligero incremento en la estructura de tipo helicoidal para la región alrededor del sitio de unión, lo cual concuerda con los resultados observados para QM/MM. Adicionalmente, hay un decremento en la estructura helicoidal para las regiones alrededor del residuo 10 y del residuo 95.

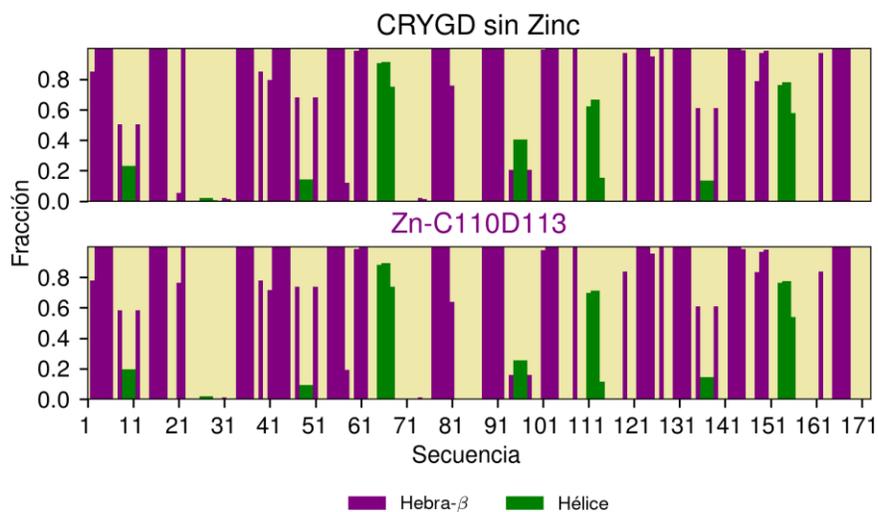


Figura 5.3. Gráfica de estructura secundaria de la proteína CRYGD lo largo de la simulación de 500 ns del sitio **C110, D113**.

Para la simulación **C110, S136** se observa, en el gráfico de estructura secundaria (figura 5.4), que no hay cambios que sugieran el desplegamiento de la proteína, aunque sí se observan algunos cambios conformacionales interesantes respecto a la proteína nativa. Al igual que para la simulación del sitio **C110, D113**, se observa la formación de la hebra- β en S20, D21 y H22; sin embargo, la estructura no se mantiene estable a lo largo de toda la simulación. Además, se observa una reducción en la estructura de hebra cerca de Y150 y un incremento en la estructura tipo helicoidal alrededor de los aminoácidos que coordinan al metal y alrededor de D155.

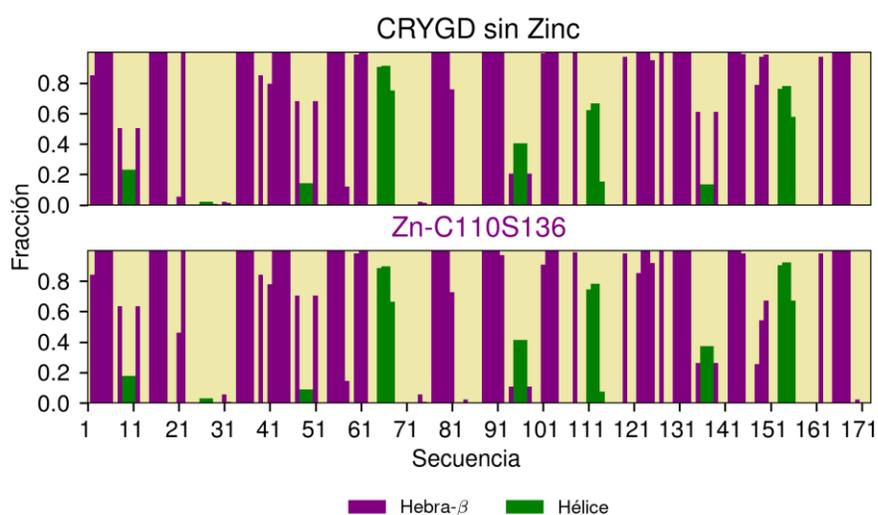


Figura 5.4. Gráfica de estructura secundaria de la proteína CRYGD a lo largo de la simulación de 500 ns del sitio **C110, S136**.

Al contrario de las simulaciones anteriores, en la simulación **H65, D73** no presenta la hebra- β conformada por los residuos 20-22 (figura 5.5). De acuerdo con el gráfico de estructura secundaria, no se observan cambios importantes en la proteína, ni se observa un cambio que pueda sugerir su desplegamiento.

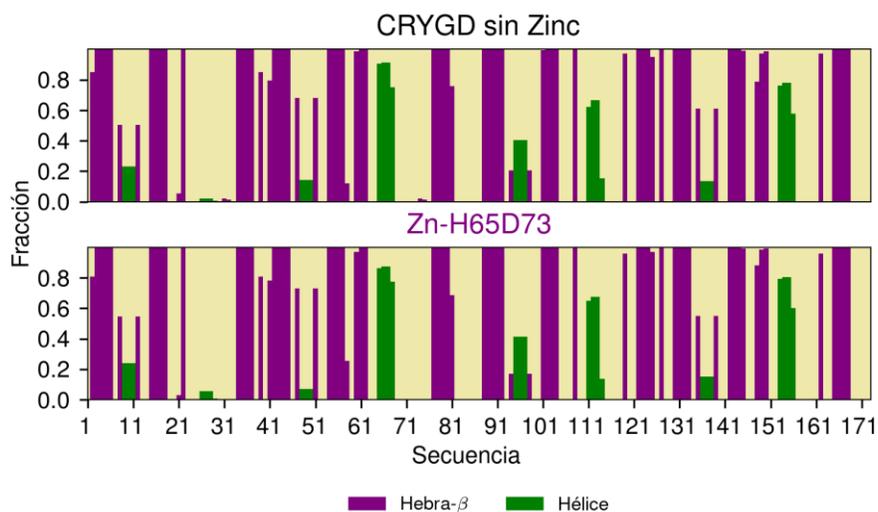


Figura 5.5. Gráfica de estructura secundaria de la proteína CRYGD a lo largo de la simulación de 500 ns del sitio **H65, D73**.

Interesantemente, en la gráfica de estructura secundaria para la simulación **H83, D171** (figura 5.6), se observa un ligero incremento en la formación de la hebra- β de S20, D21 y H22, sin embargo, no se mantiene estable y no es una conformación predominante. El cambio más notable es el aumento de la estructura de tipo hélice en la región alrededor del residuo D113. Al contrario de lo esperado, no se observan cambios alrededor de las hebras- β del dominio C-terminal que se encuentran presentes en la simulación QM/MM, lo que sugiere que éstos son únicamente transitorios y no son predominantes en una simulación de mayor longitud.

En la gráfica, no se observan cambios que sugieran el desplegamiento o la pérdida de estructura de alguno de los dominios de CRYGD.

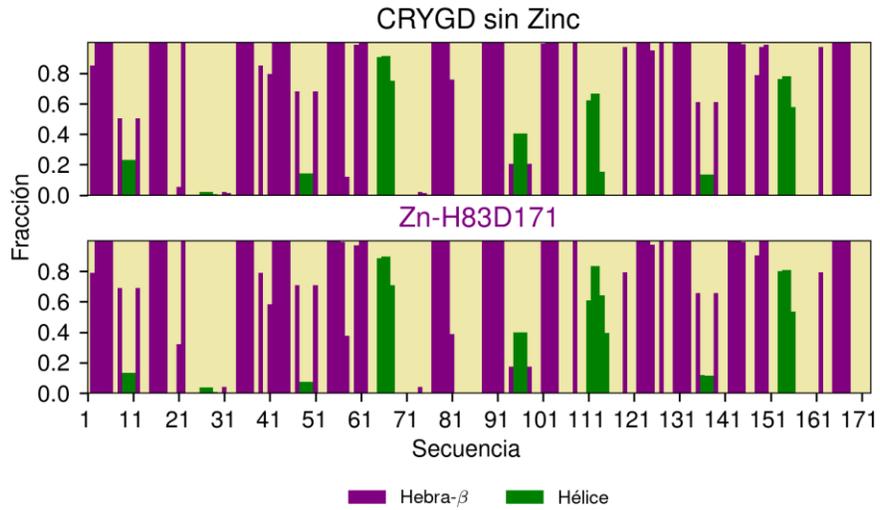


Figura 5.6. Gráfica de estructura secundaria de la proteína CRYGD a lo largo de la simulación de 500 ns del sitio **H83, D171**.

En la figura 5.7 pueden observarse una comparación de la diferencia de estructura secundaria de todas las simulaciones realizadas de monómeros de CRYGD. Las diferencias más notables corresponden a la formación de la hebra alrededor del residuo 22 y las pérdidas de estructuras helicoidales alrededor de los residuos 113 y 155. Las regiones de la gráfica en las que se observan valores de estructura helicoidal tanto positivos como negativos corresponden a un cambio en el tipo de hélice observada en dicha región.

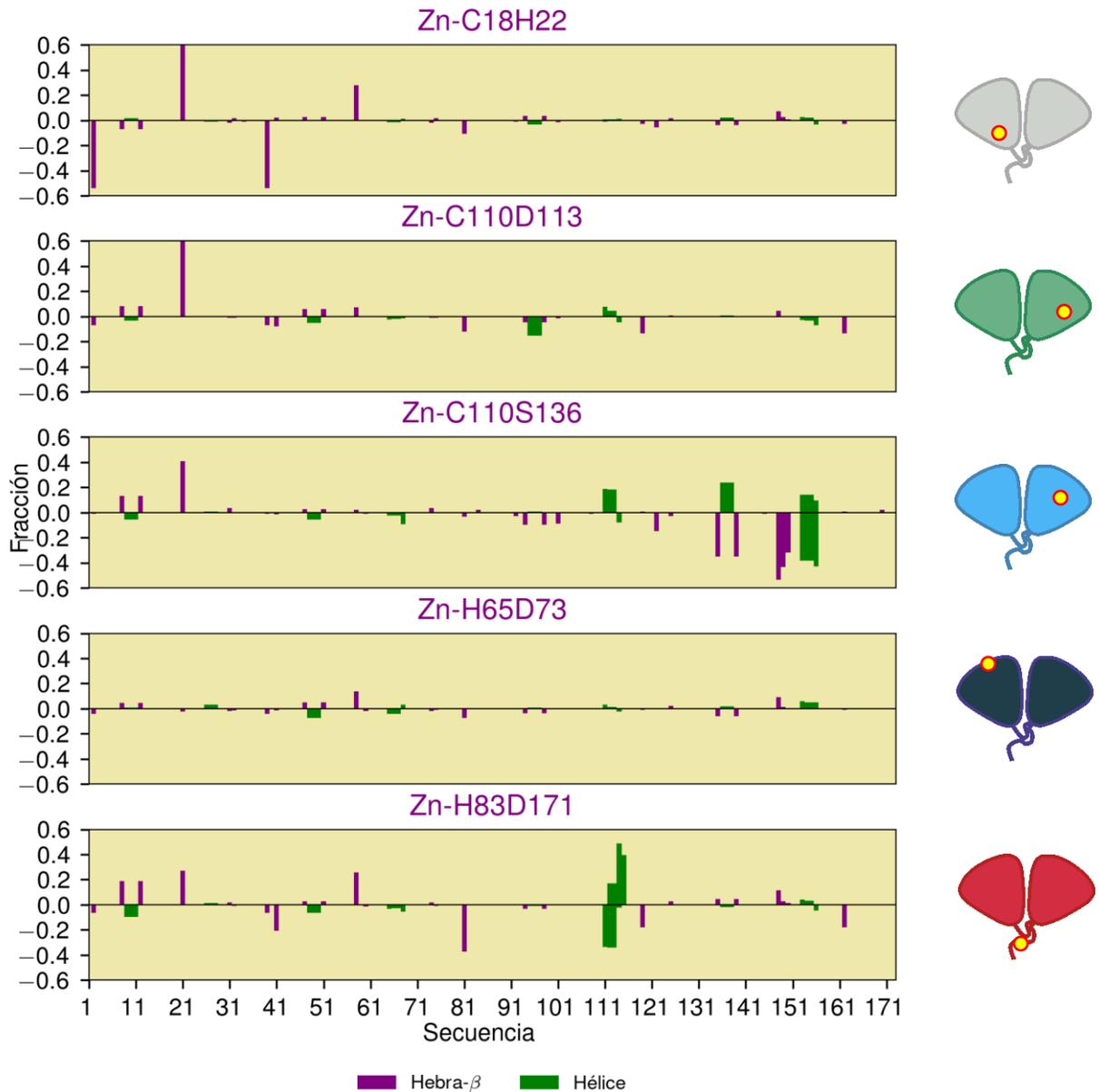


Figura 5.7. Gráfica de diferencia de estructura secundaria de la proteína CRYGD a lo largo de las simulaciones de 500 ns. A la derecha, se representan de manera esquemática los sistemas analizados y la posición del metal en el sitio de unión correspondiente.

La unión del metal no incrementa la accesibilidad al solvente.

Adicionalmente, se realizó un análisis del área de la superficie accesible al solvente (SASA) en las simulaciones de 500 ns. Con este análisis se puede observar que en todas las simulaciones mostradas, el residuo W42, el más relevante del núcleo hidrofóbico y que determina la estructura del dominio N-terminal [9], se mantiene sin cambios (figura 5.8).

SASA por residuo en N-terminal

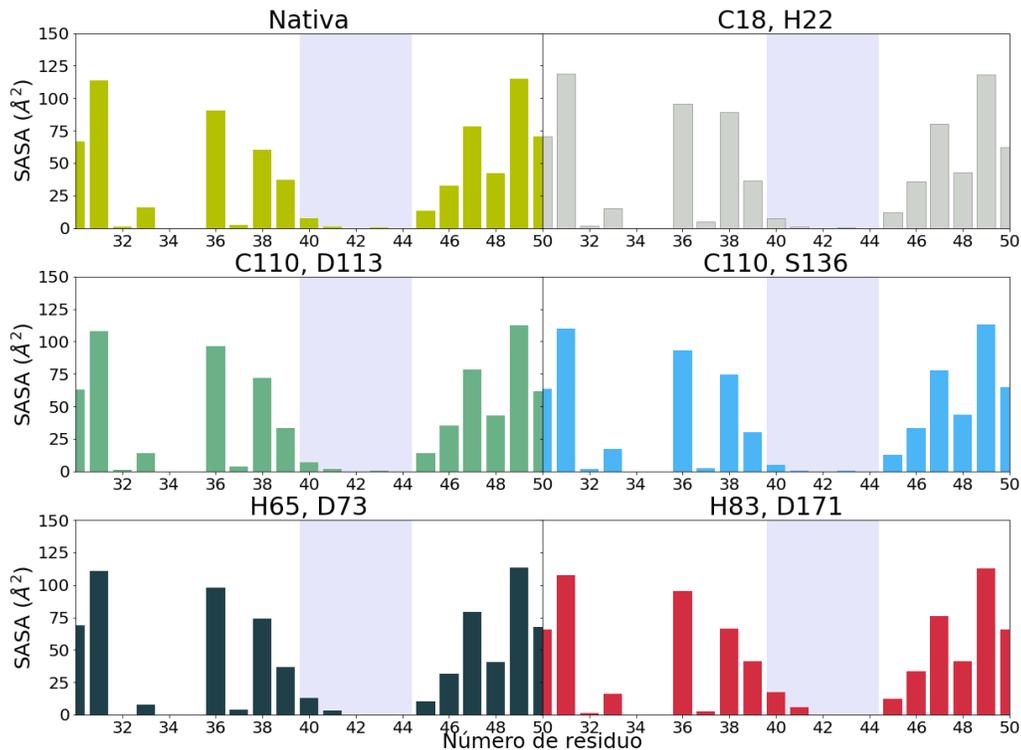


Figura 5.8. Gráfico de SASA por residuo del dominio N-terminal con un acercamiento a la región de interés (Donde se encuentra W42, resaltada con un rectángulo gris claro).

En la figura 5.9 se observa que el residuo W130, análogo de W42 para el dominio C-terminal [9], se mantiene sin incremento en el SASA. Estos resultados indican que no hay entrada de solvente en el núcleo hidrofóbico de ninguno de los dos dominios de CRYGD, por lo que se sugiere que la proteína se mantiene estable y sin desplegarse.

SASA por residuo en C-terminal

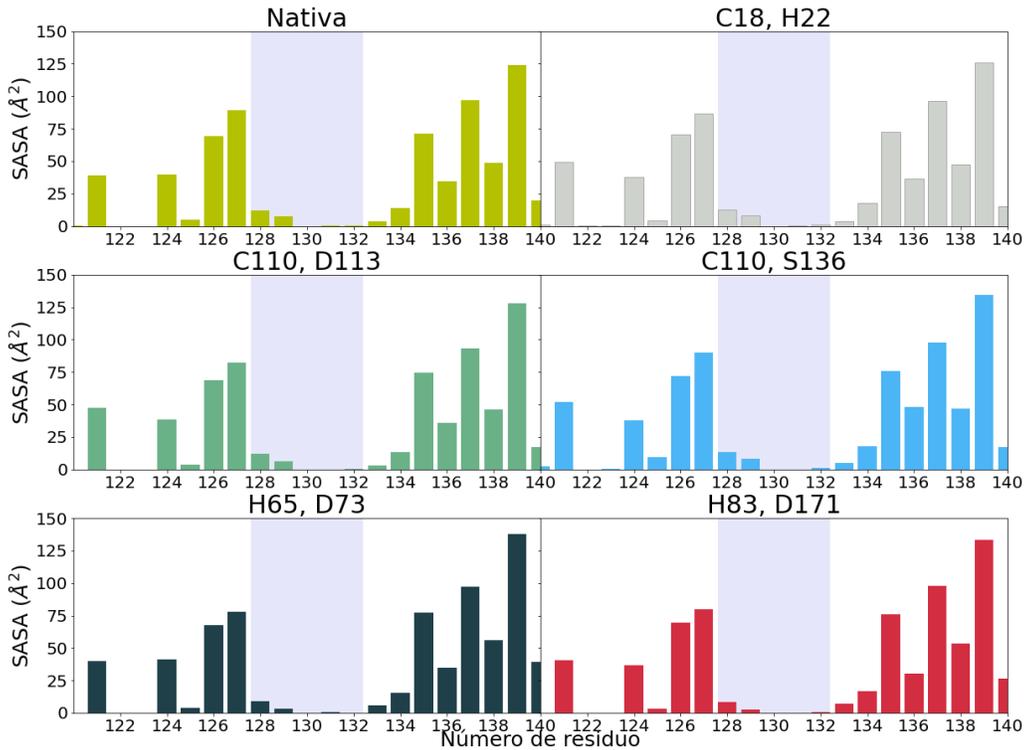


Figura 5.9. Gráfico de SASA por residuo del dominio C-terminal con un acercamiento a la región de interés (Donde se encuentra W130, resaltada con un rectángulo gris claro).

Los contactos nativos se mantienen para todas las simulaciones.

Para complementar los resultados anteriores, se realizó un análisis de contactos nativos, el cual permite cuantificar el cambio en la interacción de los aminoácidos a lo largo de una simulación usando de referencia los contactos observados en la estructura más representativa de la simulación de la proteína nativa (obtenida a través de un análisis jerárquico de *clustering*). Si hay una disminución drástica, se puede inferir que la proteína se está desplegando y está perdiendo su estructura nativa.

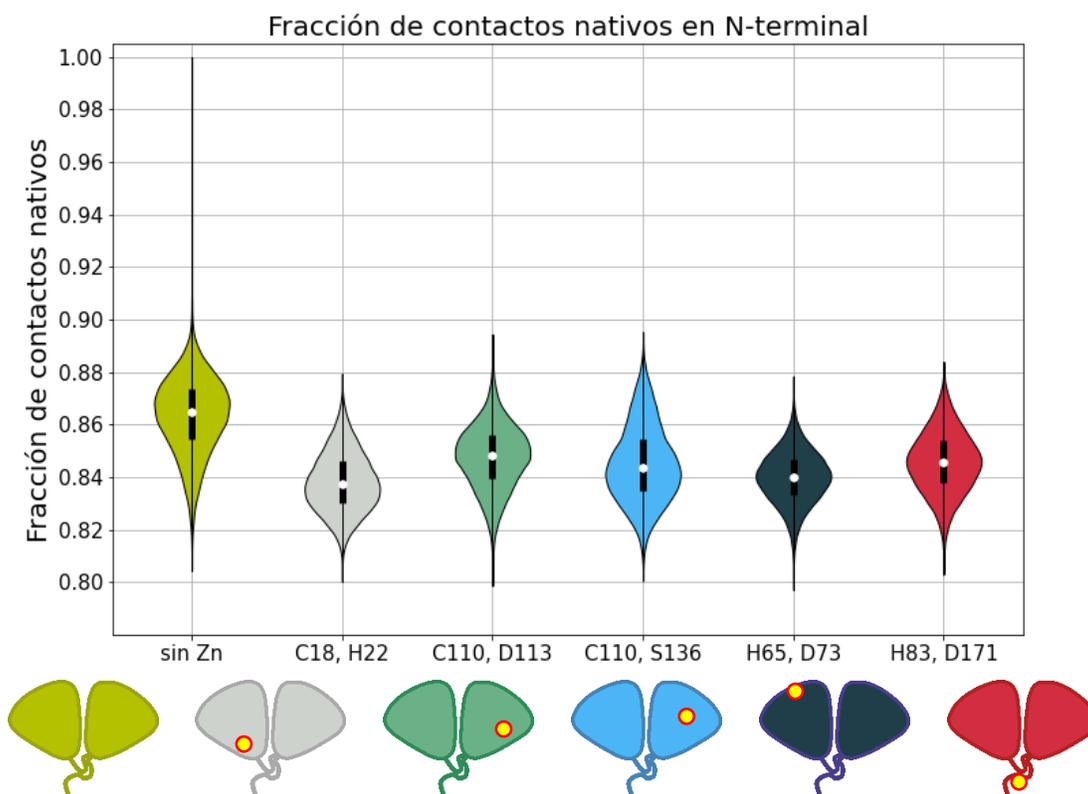


Figura 5.10. Gráfico de violín de la fracción de contactos nativos para el dominio N-terminal a lo largo de todas las simulaciones de 500 ns. Abajo, se representan de manera esquemática los sistemas analizados y la posición del metal en el sitio de unión correspondiente.

Para el dominio N-terminal, el promedio de la fracción de contactos nativos para la simulación sin zinc es de 0.87 (figura 5.10); y para las simulaciones con zinc, la fracción es menor; sin embargo, los valores son muy similares, oscilan entre ≈ 0.835 y 0.85. En las simulaciones **C110, D113**; **C110, S136** y **H83, D171** (en los cuales el ion metálico se une en el dominio C-terminal) la fracción de contactos nativos es ligeramente mayor que en las simulaciones **C18, H22** y **H65, D73** (en los cuales el ion se une en el dominio N-terminal), siendo la simulación **C18, H22** en la que se observa la mayor pérdida de contactos nativos (aunque la diferencia respecto a **H65, D73** es mínima).

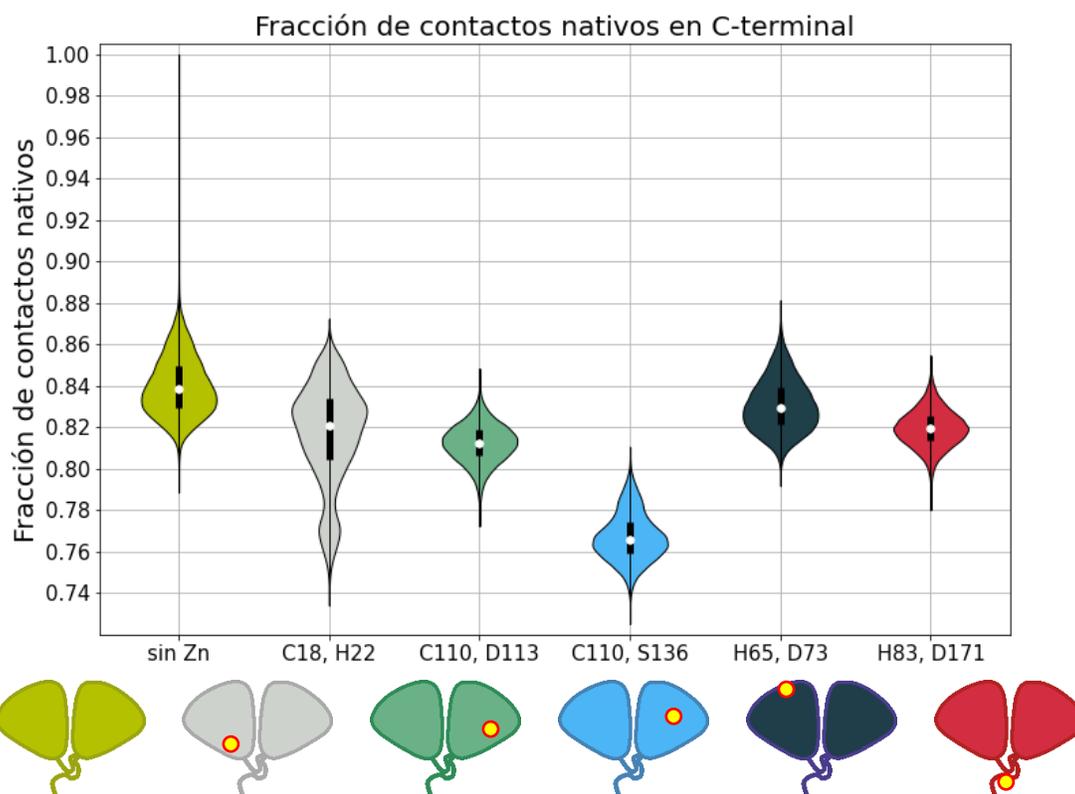


Figura 5.11. Gráfico de violín de la fracción de contactos nativos para el dominio C-terminal a lo largo de todas las simulaciones de 500 ns. Abajo, se representan de manera esquemática los sistemas analizados y la posición del metal en el sitio de unión correspondiente.

Interesantemente, para el dominio C-terminal, la fracción de contactos nativos para todas las simulaciones es menor, aún para la simulación sin zinc, con un promedio ligeramente menor de 0.84 (figura 5.11). El cambio más notorio es el observado en la simulación **C110, S136** en la que hay una disminución importante en la fracción de contactos nativos, con un valor promedio ligeramente mayor a 0.76, contrastando con la simulación sin zinc, en la cual se mantiene en un promedio cercano a 0.84. Es posible que dicho cambio en los contactos nativos se encuentre relacionado con el cambio de estructura secundaria alrededor del residuo 153 (observado en la figura 5.4). Sin embargo, cabe destacar que la fracción de contactos nativos sigue siendo alta para **C110, S136**, además, de que el análisis de SASA del núcleo hidrofóbico del dominio C-terminal (figura 5.9) muestra que no hay un incremento en la accesibilidad al solvente en W130, por lo que se concluye que la proteína se mantiene estable.

Para las simulaciones **C110, D113** y **H83, D171**, también se observa una reducción de los contactos nativos con respecto a las simulaciones en las cuales el metal se une en el dominio N-terminal (**C18, H22** y **H65, D73**); sin embargo, ambas se

mantienen alrededor de un valor promedio de 0.82, el cual es bastante cercano a la simulación sin zinc.

Para la simulación **C18, H22** se observa una mayor distribución de los datos, en algunas regiones incluso alcanzando el valor de fracción de 0.77; sin embargo, el promedio de los datos se ubica alrededor de 0.83, ligeramente mayor que para **H65, D73** y ligeramente menor que para la simulación de la proteína nativa.

Con ello, se puede observar una tendencia general: La unión del metal disminuye el número de contactos nativos en la proteína humana CRYGD y su efecto es mayor para el dominio en donde se encuentran ubicados los aminoácidos del sitio de unión. Es decir, si el sitio de unión se encuentra en el dominio N-terminal (como en el caso de la simulación **C18, H22**), el número de contactos nativos para el dominio N-terminal disminuye en mayor cantidad que en el dominio C-terminal y viceversa.

Los resultados de SASA y contactos nativos indican que la estructura de proteína se mantiene durante el tiempo de simulación, lo cual concuerda con lo observado experimentalmente sobre la agregación de CRYGD inducida por Zn [24].

5.3 Conclusiones

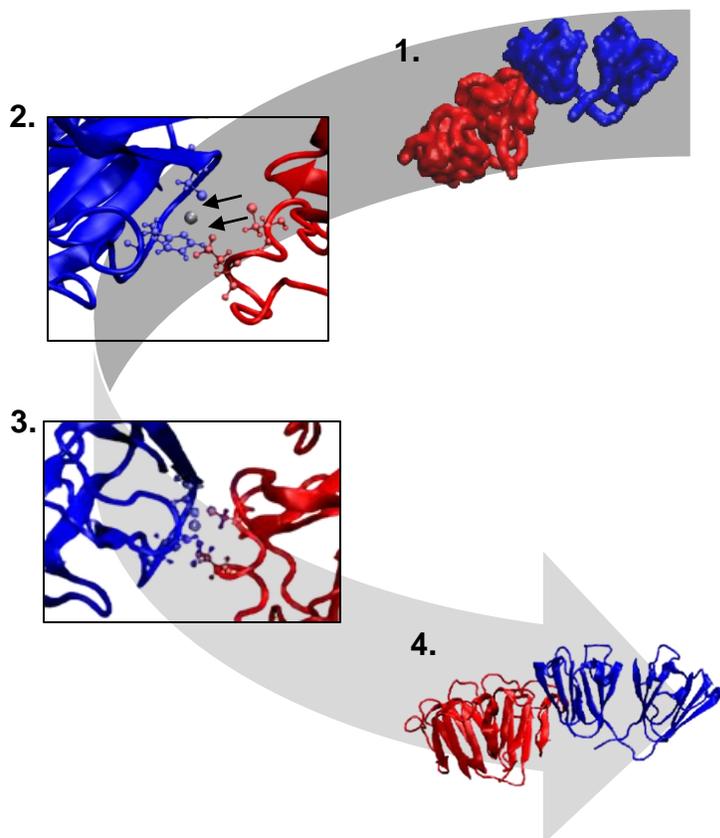
A partir de simulaciones de 500 ns con el metal unido a la proteína, se realizaron análisis de estructura secundaria, área de la superficie accesible al solvente (SASA) y contactos nativos, con los cuales demostramos que la unión de Zn(II) no induce el desplegamiento de CRYGD en ninguno de los sitios propuestos. Estos resultados concuerdan con el mecanismo de agregación propuesto en la literatura. [24]

Los sitios analizados, al mantener la estabilidad de la proteína, son candidatos favorables para el análisis de la formación de dímeros a través de puentes metálicos.

Análisis de formación de dímeros de CRYGD unidos por puente metálico

6.1 Metodología

Para estudiar la formación del dímero de CRYGD, se siguió la metodología representada en el Esquema 6.1:



1. Se analizaron las distancias entre el aminoácido C18 (que forma parte del sitio de unión más importante [24]) y los aminoácidos que forman parte de los diferentes sitios de unión al Zn(II) durante una simulación de grano grueso de dos monómeros de CRYGD sin metal de 5000 ns de longitud. Dicha simulación fue realizada por el Dr. José Luis Velasco Bolom, integrante del laboratorio de la Dra. Laura Domínguez Dueñas utilizando GROMACS. A partir de dicha simulación, se tomó la estructura en la cual la distancia entre sitios de unión de Zn(II) fuera menor y la orientación de los sitios fuera la óptima. Las estructuras seleccionadas se emplearon como estructuras iniciales para las simulaciones SMD, agregando el metal a partir de los resultados de las simulaciones de las simulaciones QM/MM y utilizando MCPB.py.

2. Las simulaciones SMD se utilizaron para permitir el acercamiento del segundo sitio de unión al metal (éste ya unido a C18 y H22 a través de MCPB.py) utilizando una distancia óptima de interacción menor a 2.8 Å. Para ello, se tomó la distancia entre el Zn(II) y el centro de masa de los átomos que realizan la interacción con el metal (S para cisteína, N para histidina y O para serina y aspartato) y una constante k de 50 kcal/mol. La duración de las simulaciones de SMD fue de 10 ns con un paso de tiempo de 2 fs y se utilizó el campo de fuerza ff14SB para modelar a la proteína.
3. Posteriormente, se realizaron simulaciones QM/MM utilizando como estructura inicial la conformación final de las simulaciones SMD, para permitir la relajación y un modelamiento más correcto del comportamiento del dímero unido por puente metálico. En la región QM se modelaron los 4 aminoácidos que actúan como ligando y el Zn(II) utilizando el nivel de teoría PM6 [36] y el resto del sistema se modeló con los campos de fuerza ff14SB para la proteína y TIP3P para las moléculas de agua. La duración de las simulaciones es de 2 ns con un paso de tiempo de 1 fs. Se utilizó Amber18 para las simulaciones SMD y QM/MM.
4. Para estudiar el comportamiento del dímero formado, se realizó una simulación a una temperatura de 300 K, utilizando una concentración de CaCl_2 de 0.15 M y una duración de 500 ns con un paso de tiempo de 2 fs; utilizando los campos de fuerza ff14SB para la proteína y TIP3P para las moléculas de agua; y para el modelado de iones se utilizó la herramienta MCPB.py.

Para analizar los resultados obtenidos, se realizaron cálculos de RMSD, se midieron los ángulos de coordinación para las simulaciones QM/MM, del área de la superficie accesible al solvente (SASA) y de contactos nativos de cada uno de los dominios de la proteína para las simulaciones de 500 ns. Para el cálculo de contactos nativos, se realizó un análisis de clústering de la simulación sin metal utilizando un algoritmo jerárquico y la estructura más representativa del clúster más poblado fue utilizada como referencia para todas las simulaciones. Estos análisis se realizaron con ccpptraj [40].

Adicionalmente, se utilizó el comando `gmx sasa` dentro de la suite de GROMACS (versión 2020.1) [41] para el análisis de SASA por residuo de todas las simulaciones de 500 ns.

6.2 Resultados y discusión

Para analizar la formación y estabilidad del dímero de CRYGD unido mediante un puente metálico, utilizamos simulaciones SMD para acercar los aminoácidos de los sitios de unión lo suficiente como para que interactúen con el zinc; QM/MM, para relajar el nuevo sitio de unión formado por aminoácidos de ambos monómeros; y MCPB.py para introducir el metal reparametrizado en las simulaciones SMD y realizar simulaciones de 500 ns del dímero recién formado.

Debido a que el sitio **C18, H22** es el sitio más importante para la agregación de la CRYGD dependiente de zinc [24], en todos los dímeros formados el puente metálico se compone por dicho sitio en el monómero 1 (M1) más uno de los sitios analizados en el presente trabajo (**C110, D113**; **C110, S136** ó **H65, D73**) en el monómero 2 (M2). En total, se formaron tres dímeros diferentes (figura 6.1).



Figura 6.1. Esquema representativo de los dímeros formados y la posición aproximada del metal en cada uno de los sistemas. De izquierda a derecha: Dímero CHCD (**C18, H22** + **C110, D113**); Dímero CHHD (**C18, H22** + **H65, D73**); Dímero CHCS (**C18, H22** + **C110, S136**).

Para cada simulación SMD, modelamos al metal unido a **C18, H22** en M1 (a través de MCPB.py) y realizamos el acercamiento del sitio contenido en M2.

6.2.1 Dímero CHCD (**C18, H22** + **C110, D113**)

El primer dímero formado tiene su sitio de unión conformado por los aminoácidos C18 y H22 de M1; y C110 y D113 de M2. Este dímero será denominado como dímero **CHCD**.

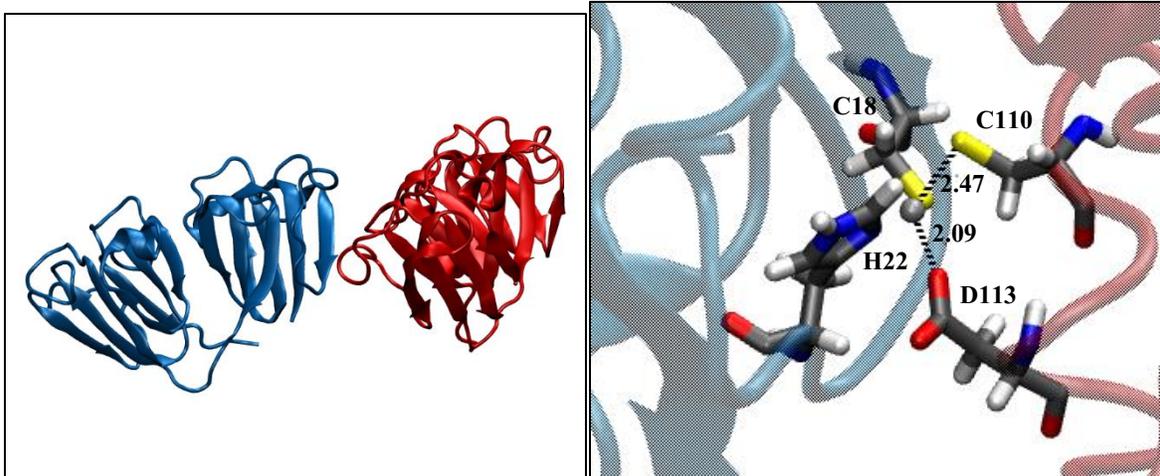


Figura 6.2. Derecha: Representación del dímero **CHCD**, donde M1 se representa en color azul y M2 se representa en color rojo. Izquierda: Representación de los aminoácidos que coordinan al metal en el dímero **CHCD** (C18 y H22 en M1; y C110 y D113 en M2). Se muestran las distancias de coordinación obtenidas en la conformación final de la simulación SMD.

Como puede observarse en la figura 6.2, a través de la simulación SMD se logró el acercamiento del sitio **C110, D113** y se obtuvieron distancias de coordinación de 2.47 y 2.09 Å, las cuales son menores a la distancia máxima de interacción con metales considerada por MCPB.py [29]. De tal forma se logró que los aminoácidos del sitio **C110, D113** se encontraran a una distancia óptima para que su interacción con el metal sea considerada en una simulación QM/MM.

A través de la simulación QM/MM, se permitió la relajación de las distancias y ángulos de coordinación del nuevo sitio de unión formado por los 4 aminoácidos, así como la relajación del sistema completo. La interacción con el metal se mantuvo estable durante toda la simulación y la geometría de coordinación obtenida se asemeja a la tetraédrica. Con ello, logramos obtener una estructura óptima para la reparametrización del sitio completo con MCPB.py y simular por 500 ns.

Para analizar la estabilidad de cada uno de los monómeros que conforman el dímero, realizamos los análisis de estructura secundaria, SASA, SASA por residuo y de contactos nativos, de la misma manera que fueron realizados para las simulaciones de las proteínas sin dimerizar con zinc.

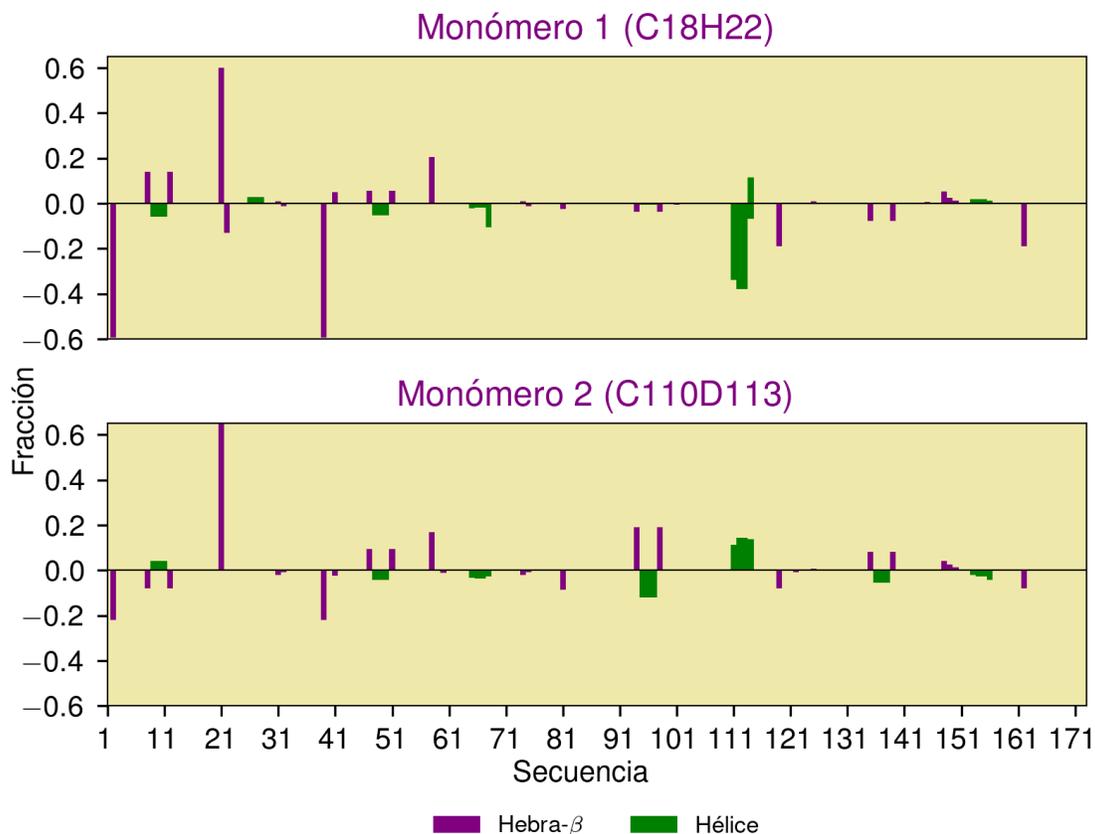


Figura 6.3. Gráfica de diferencia de estructura secundaria del monómero 1 (en medio) y del monómero 2 (abajo) a lo largo de la simulación de 500 ns del dímero **CHCD**.

Para M1, en el dominio N-terminal (que es donde se une el metal que forma el puente con M2) se observa la desestabilización de la hebra- β cercana a H22, cuya estructura se encontró altamente predominante en la simulación del monómero unido a Zn(II) en el sitio **C18, H22** (figuras 5.1 y 6.3). Es probable que el cambio observado se deba a un reposicionamiento de H22 y los aminoácidos a su alrededor para permitir una mayor interacción con los aminoácidos del sitio de M2 y así obtener una geometría de coordinación óptima y una unión más estable. También, se observa una pérdida de estructura de hebra para el residuo 1 y alrededor del residuo 40.

En el dominio C-terminal de M1, aunque no hay unión de metal, se observa una pérdida de estructura secundaria (hélice) alrededor de D113. Sin embargo, el resto de la estructura secundaria parece mantenerse estable, por lo que no se considera que sea un cambio que afecte la integridad de M1.

Al contrario de lo observado para M1, en M2 la hebra- β alrededor de H22 sí se encuentra presente durante la mayor parte de la simulación (figura 6.3), lo que

refuerza la teoría de que el cambio observado permite una mayor interacción para mantener al dímero estable.

Interesantemente para M2, aún con la unión del metal y la formación del dímero, la región alrededor del D113 se mantuvo más estable respecto a la proteína nativa que M1. En general, el dominio C-terminal se mantiene bastante estable, siendo los únicos cambios notables la ligera pérdida de estructura tipo hélice alrededor del residuo 95 y alrededor del residuo 135.

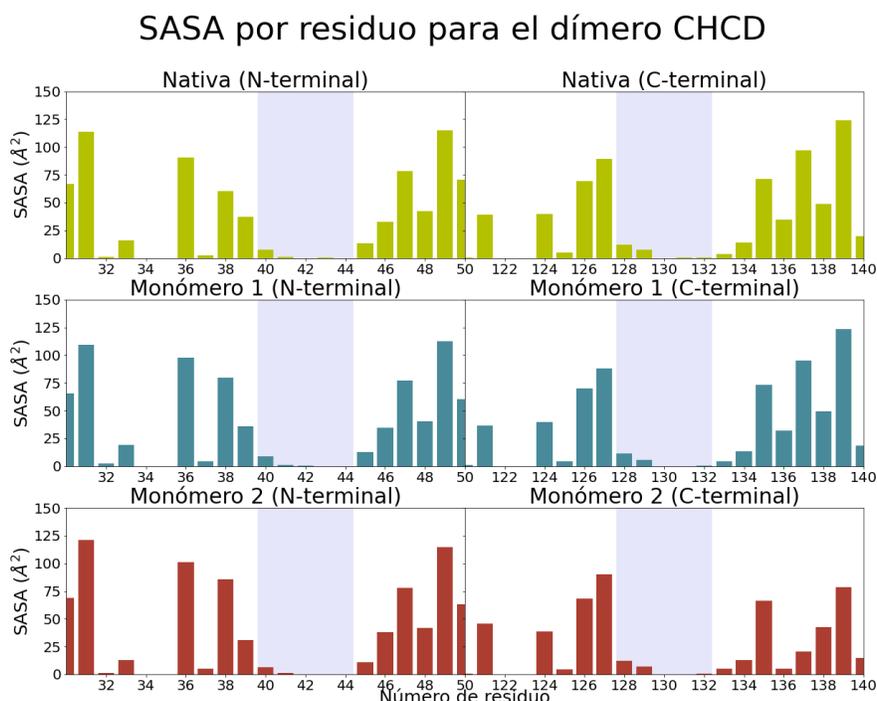


Figura 6.4. Gráfico de SASA por residuo de los dominios N- y C-terminal (izquierda y derecha, respectivamente) con un acercamiento a las regiones de interés (en las cuales se encuentran W42 y W130, resaltadas con un rectángulo gris claro) de la simulación del dímero **CHCD**.

De acuerdo con el análisis de SASA por residuo (figura 6.4), se observa que no hay un incremento en la accesibilidad al solvente en los residuos W42 y W130 de M1 y M2, con lo que se puede afirmar que los núcleos hidrofóbicos de ambos monómeros se mantienen íntegros durante la simulación de los dímeros **CHCD** y que la formación del dímero no afecta la accesibilidad al solvente.

Finalmente, realizamos el análisis de contactos nativos para confirmar que la estructura de M1 y M2 se conserva durante la formación del dímero.

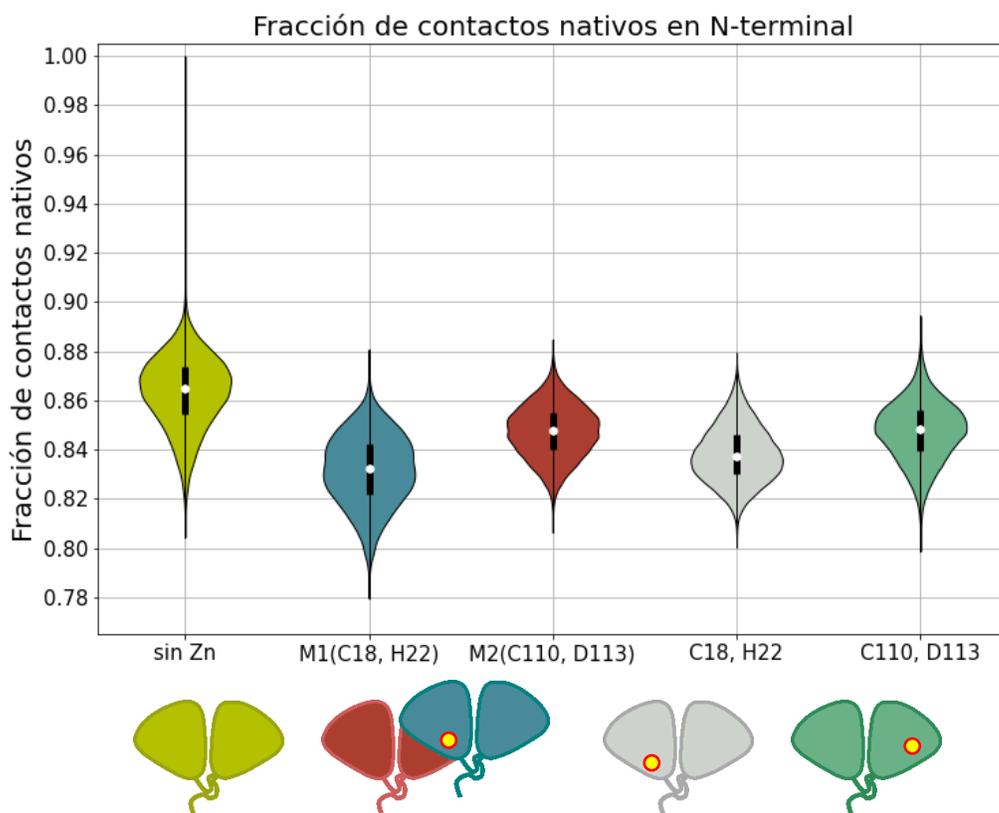


Figura 6.5. Gráfico de violín de la fracción de contactos nativos para el dominio N-terminal de cada uno de los monómeros del dímero **CHCD** (denotados con M1 y M2 más el sitio de unión correspondiente entre paréntesis) a lo largo de la simulación de 500 ns. A manera de comparación, se graficaron la simulación sin metal (extrema izquierda) y las simulaciones con el metal unido a los sitios de unión que conforman **CHCD**, pero sin dimerizar (extrema derecha). Abajo, se representan de manera esquemática los sistemas analizados y la posición del metal en el sitio de unión correspondiente.

En la fracción de contactos nativos en el dominio N-terminal se puede observar un “alargamiento” del promedio observado en el gráfico de violín, tanto para M1 como para M2 (siendo más notable para el primero) con un mayor número de valores en la parte inferior del gráfico (figura 6.5). Esto indica que hay una mayor pérdida de contactos nativos para las estructuras que conforman el dímero que para aquellas que se encuentran en forma monomérica. Sin embargo, para M1, el promedio tiene un valor de fracción mayor a 0.82, y para M2, el perfil es bastante similar al observado para su homólogo sin dimerizar.

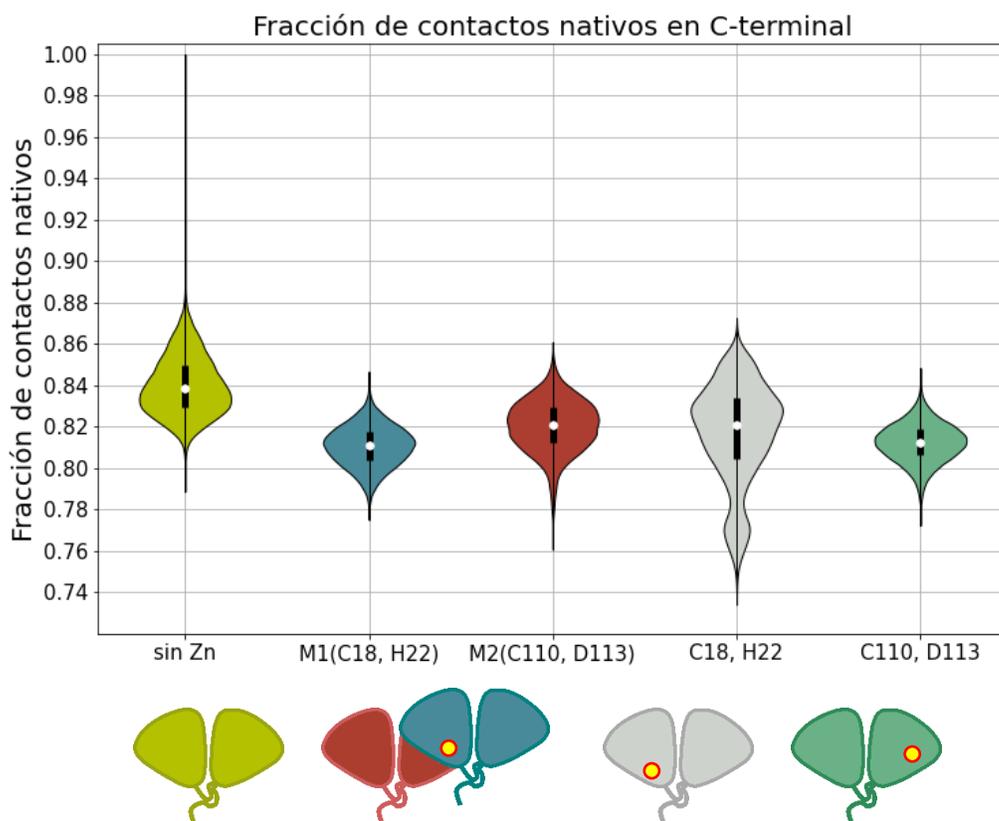


Figura 6.6. Gráfico de violín de la fracción de contactos nativos para el dominio C-terminal de cada uno de los monómeros del dímero **CHCD** (denotados con M1 y M2 más el sitio de unión correspondiente entre paréntesis) a lo largo de la simulación de 500 ns. A manera de comparación, se graficaron la simulación sin metal (extrema izquierda) y las simulaciones con el metal unido a los sitios de unión que conforman **CHCD**, pero sin dimerizar (extrema derecha). Abajo, se representan de manera esquemática los sistemas analizados y la posición del metal en el sitio de unión correspondiente.

Sin embargo, para el dominio C-terminal (figura 6.6) se observa un efecto bastante interesante. Para el caso de M1, se encuentra presente la esperada reducción de contactos nativos con respecto a su homólogo sin dimerizar (el promedio general se reduce de ≈ 0.83 a ≈ 0.815). No obstante, los datos se encuentran menos dispersos (reflejado en la altura del violín). Es posible que esto se deba a que la dimerización reduce la libertad de movimiento para M1 y no pueda adoptar el mismo número de conformaciones, ni mantenerlas por un tiempo prolongado; sin embargo, se requeriría de un análisis más detallado para confirmar o descartar dicha posibilidad.

Para el caso de M2, la fracción de contactos tiene un ligero incremento con respecto a la proteína en forma monomérica (la región promedio alcanza un máximo de ≈ 0.83 , comparado con ≈ 0.815 de la proteína sin dimerizar). Este efecto es sobre todo notable ya que el promedio de contactos nativos es incluso mayor que para

M1, donde no está unido el zinc en el dominio C-terminal. Sin embargo, esto concuerda con los resultados de estructura secundaria (figuras 6.3) en el cual M2 se mantiene más estable respecto a la proteína nativa que M1 en el dominio C-terminal.

Se desconoce si este efecto de pérdida de estructura helicoidal alrededor de D113 tenga algún efecto en la formación de un multímero que considere únicamente los sitios de unión **C18, H22** y **C110, D113** para el puente metálico, ya que podría afectar la unión del metal a los residuos C110 y D113 y la estabilidad de la interacción. Sin embargo, cabe recordar que M2 es bastante estable en el dímero **CHCD**, por lo que esta estabilización adicional podría compensar la pérdida de estructura en M1 durante la formación del multímero. Se necesitaría realizar simulaciones adicionales para confirmar o descartar alguna de estas posibilidades.

Además, existe una alta probabilidad de que **C110, D113** no sea el único sitio de unión involucrado en la agregación de zinc, es posible que en un mismo multímero haya puentes metálicos conformados por **C18, H22** y varios de los sitios de unión propuestos en el presente trabajo. Esto, aunado al hecho de que durante la formación del dímero **CHCD**, los monómeros no tienen una pérdida significativa de estructura (concordando con lo observado experimentalmente en la agregación de CRYGD inducida por Zn [24]) nos permite proponer que el sitio de unión **C110, D113** está involucrado en el proceso de agregación de CRYGD inducido por Zn.

6.2.2 Dímero CHHD (C18, H22 + H65, D73)

El segundo dímero formado tiene su sitio de unión conformado por los aminoácidos C18 y H22 de M1; y H65 y D73 de M2. Este dímero será denominado como dímero **CHHD**.

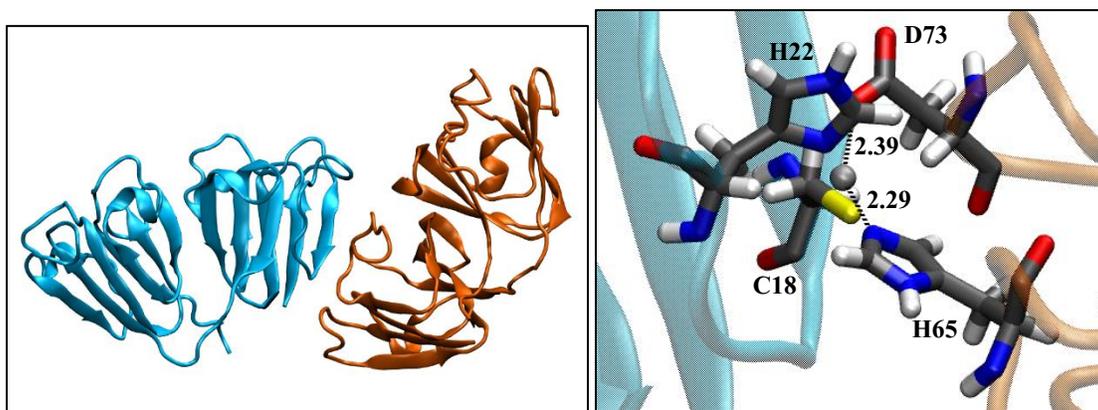


Figura 6.7. Derecha: Representación del dímero **CHHD**, donde M1 se representa en color azul y M2 se representa en color naranja. Izquierda: Representación de los aminoácidos que coordinan al metal en el dímero **CHHD** (C18 y H22 en M1; y H65 y D73 en M2). Se muestran las distancias de coordinación obtenidas en la conformación final de la simulación SMD.

Como puede observarse en la figura 6.7, a través de la simulación SMD se logró el acercamiento del sitio **H65, D73** y se obtuvieron distancias de coordinación de 2.39 y 2.29 Å. A través de la simulación QM/MM, se permitió la relajación de las distancias y ángulos de coordinación del nuevo sitio de unión formado. El sitio de unión se mantuvo estable y se procedió a la reparametrización con MCPB.py y a simular por 500 ns.

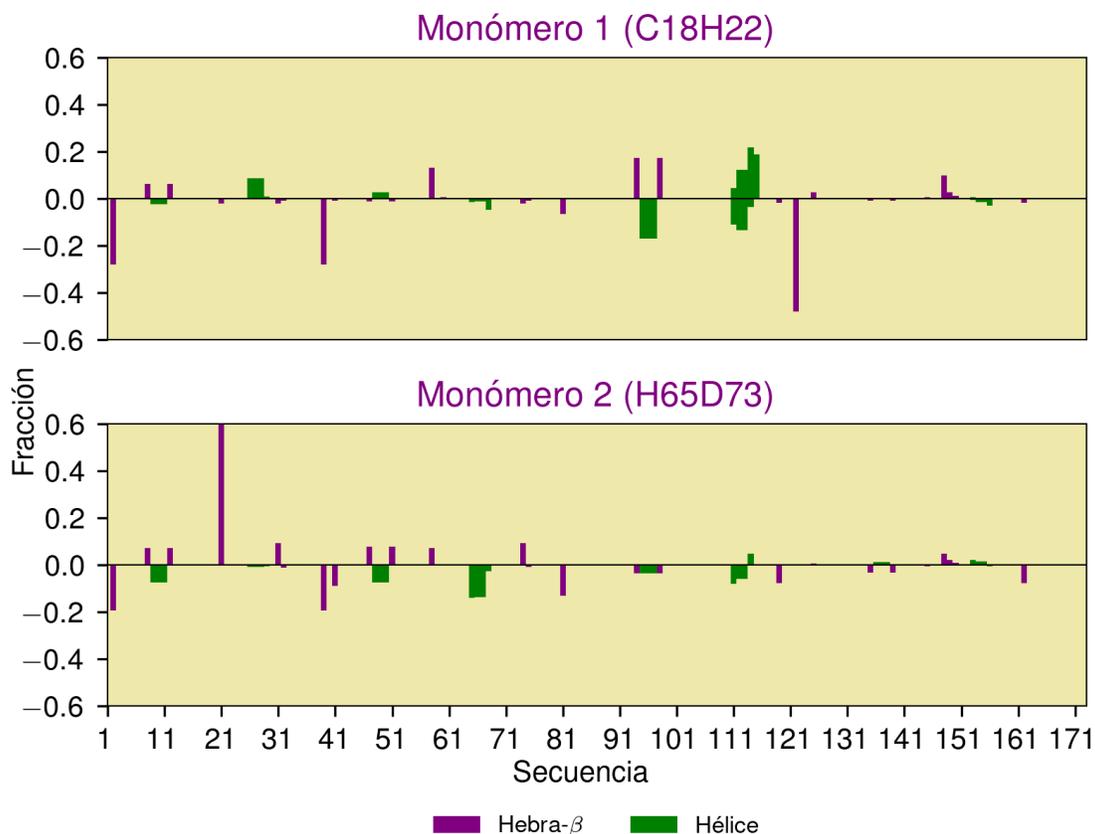


Figura 6.8. Gráfica de diferencia de estructura secundaria del monómero 1 (en medio) y del monómero 2 (abajo) a lo largo de la simulación de 500 ns del dímero **CHHD**.

En la gráfica de estructura secundaria para **CHHD** (figura 6.8), para M1 se puede observar la desaparición de la hebra-β alrededor del residuo 22. Este efecto es más notable que en el dímero **CHCD** (figura 6.3). Otros cambios que vale la pena destacar son la ligera pérdida de estructura helicoidal alrededor del residuo 95 y las ligeras pérdidas de estructura de hebra alrededor del residuo 40 y del residuo 121, además del aumento de estructura helicoidal alrededor del residuo 113.

Este último cambio podría tener consecuencias interesantes, ya que para **CHCD** se observa el efecto contrario, que en M1 hay una pérdida de estructura helicoidal en dicha región (figura 6.3), lo que podría afectar la formación del agregado si

únicamente se considera a los sitios de unión **C18, H22** y **C110, D113**. Al estabilizarse la región alrededor de D113 en **CHHD**, se abre la posibilidad de que la unión de un hipotético tercer monómero de CRYGD se realice en el sitio **C110, D113** de M1, obteniéndose interacciones de tipo **CHCD (C18, H22 + C110, D113)**. Esto quiere decir que el agregado inducido por zinc estaría conformado por interacciones de tipo puente metálico entre **C18, H22** y más de un posible segundo sitio de unión, lo cual concuerda con los resultados reportados en la bibliografía sobre que no se observa preferencia sobre un solo sitio de unión y que hay una alta probabilidad de que el zinc pueda interactuar en diferentes sitios [39].

Para M2 se observa la formación de la hebra- β alrededor del residuo 22, a pesar de que en la simulación de **H65, D73** sin dimerizar esta estructura se encontraba ausente (figura 5.5). Estos datos refuerzan la hipótesis de que la estructura secundaria se pierde en M1 para favorecer la interacción con el dímero observado. La hebra- β en M2 podría favorecer la unión de un nuevo ion de Zn(II) en su sitio **C18, H22** y, como consecuencia, la formación de un nuevo puente metálico con otro monómero de CRYGD, resultando eventualmente en un multímero de cristalina.

En este sistema, también, se observa una ligera pérdida de estructura helicoidal alrededor de la H65, lo cual podría aumentar la flexibilidad de la región y favorecer la interacción con el metal.

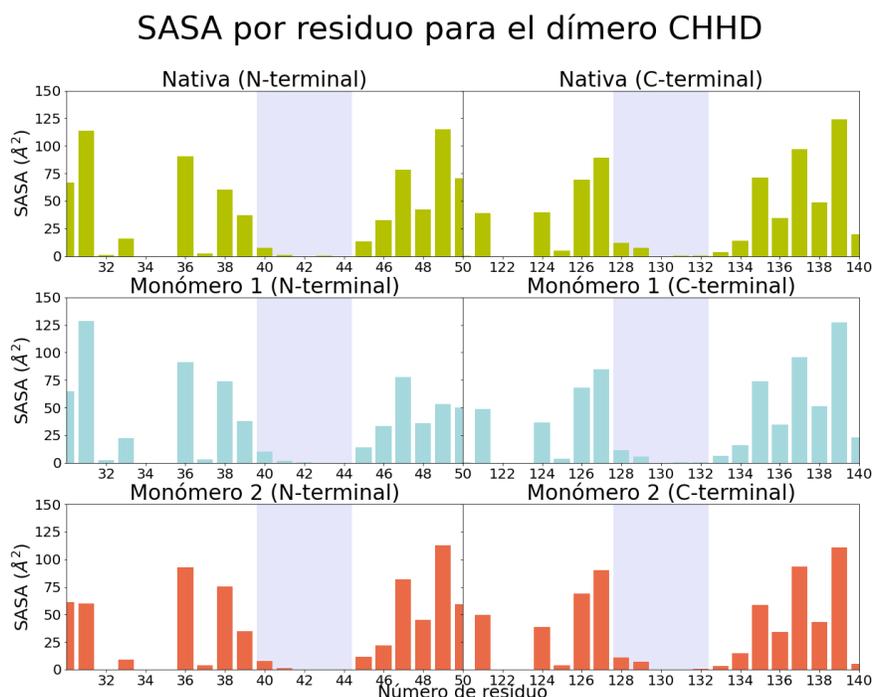


Figura 6.9. Gráfico de SASA por residuo de los dominios N- y C-terminal (izquierda y derecha, respectivamente) con un acercamiento a las regiones de interés (en las cuales se encuentran W42 y W130, resaltadas con un rectángulo gris claro) de la simulación del dímero **CHHD**.

En el análisis de SASA por residuo (figura 6.9) se observa que no hay un incremento en la accesibilidad al solvente en los residuos W42 y W130 de ambos monómeros. Por tanto, tampoco hay una modificación en la accesibilidad al solvente al formarse el dímero **CHHD**. Esto concuerda con el análisis de estructura secundaria (figura 6.8) en el que se observa que ambos monómeros son bastante estables y conservan la gran mayoría de la estructura con respecto a la simulación de la proteína nativa.

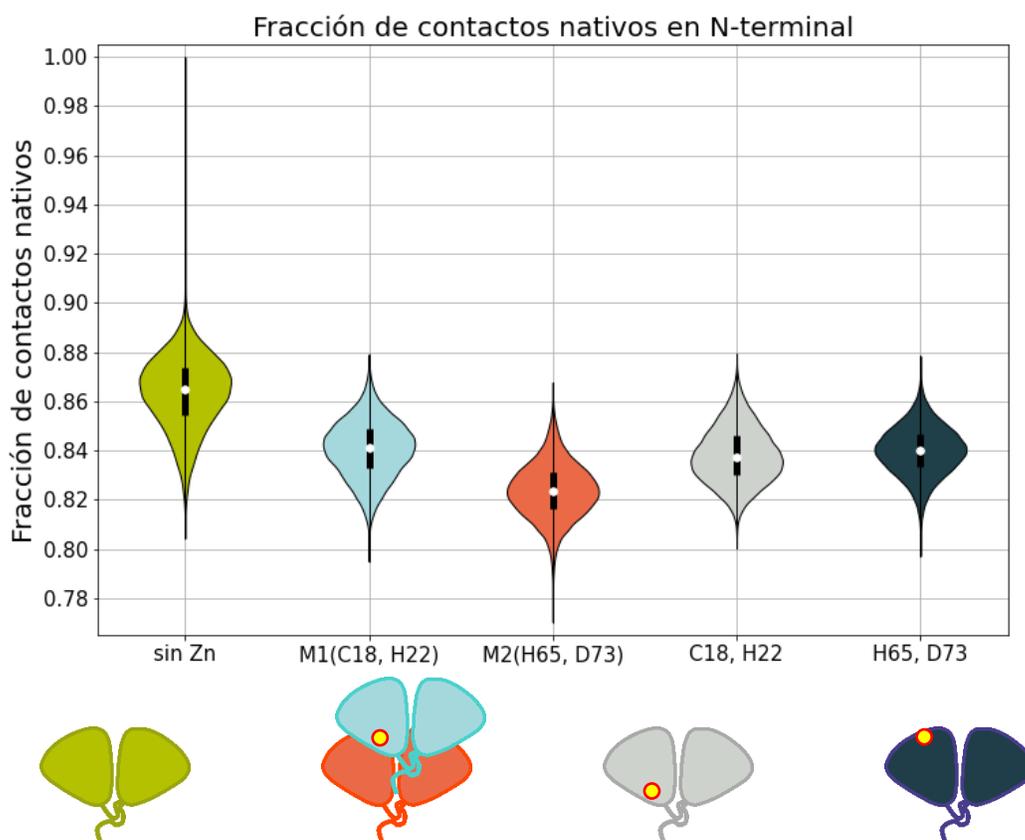


Figura 6.10. Gráfico de violín de la fracción de contactos nativos para el dominio N-terminal de cada uno de los monómeros del dímero **CHHD** (denotados con M1 y M2 más el sitio de unión correspondiente entre paréntesis) a lo largo de la simulación de 500 ns. A manera de comparación, se graficaron la simulación sin metal (extrema izquierda) y las simulaciones con el metal unido a los sitios de unión que conforman **CHHD**, pero sin dimerizar (extrema derecha). Abajo, se representan de manera esquemática los sistemas analizados y la posición del metal en el sitio de unión correspondiente.

Al contrario de lo observado para **CHCD**, no se observa un “alargamiento” de los violines en los gráficos de contactos nativos, y M1 presenta un promedio de contactos mayor que el de M2, e incluso ligeramente mayor que el de su homólogo sin dimerizar (figura 6.10). A pesar de que el promedio de contactos observado para

M2 es el menor de las simulaciones graficadas en la figura 6.10, su valor es ligeramente mayor a 0.82, por lo que se considera que la estructura es estable. Este perfil observado para M2 podría relacionarse a las ligeras pérdidas de estructuras helicoidales observadas en el análisis de estructura secundaria (figura 6.8).

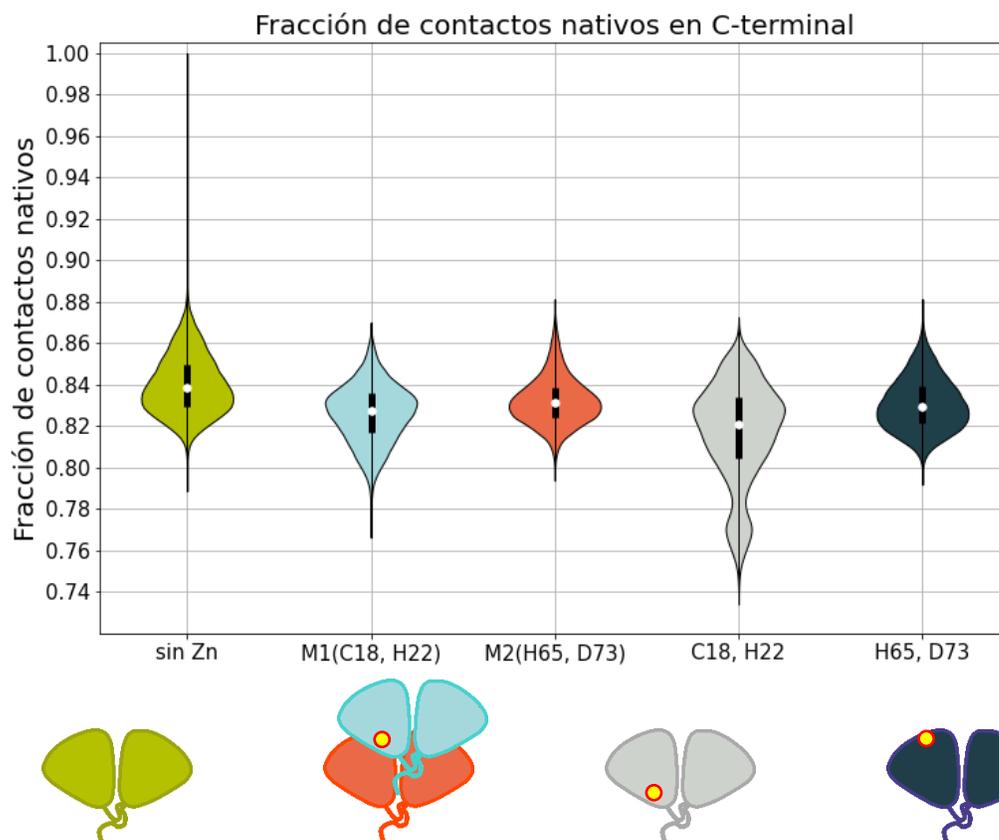


Figura 6.11. Gráfico de violín de la fracción de contactos nativos para el dominio C-terminal de cada uno de los monómeros del dímero **CHHD** (denotados con M1 y M2 más el sitio de unión correspondiente entre paréntesis) a lo largo de la simulación de 500 ns. A manera de comparación, se graficaron la simulación sin metal (extrema izquierda) y las simulaciones con el metal unido a los sitios de unión que conforman **CHHD**, pero sin dimerizar (extrema derecha). Abajo, se representan de manera esquemática los sistemas analizados y la posición del metal en el sitio de unión correspondiente.

Interesantemente, en el dominio C-terminal, las fracciones de contactos nativos para M1 y M2 se mantienen en un valor promedio bastante similar (e incluso ligeramente mayor) que las de sus homólogos sin dimerizar, alrededor de 0.83 (figura 6.11). Estos datos concuerdan con el mantenimiento de la estructura secundaria respecto a la simulación de la proteína nativa en el dominio C-terminal (figura 6.8) y confirman que los monómeros se mantienen estables durante la formación del dímero **CHHD**.

Con estos resultados, concluimos que hay una alta probabilidad de que el sitio de unión **H65, D73** también se encuentre involucrado en el proceso de agregación de CRYGD inducido por Zn y que se encuentre presente la formación de una estructura similar al dímero **CHHD**.

6.2.3 Dímero CHCS (C18, H22 + C110, S136)

El tercer dímero formado tiene su sitio de unión conformado por los aminoácidos C18 y H22 de M1; y C110 y S136 de M2. Este dímero será denominado como dímero **CHCS**.

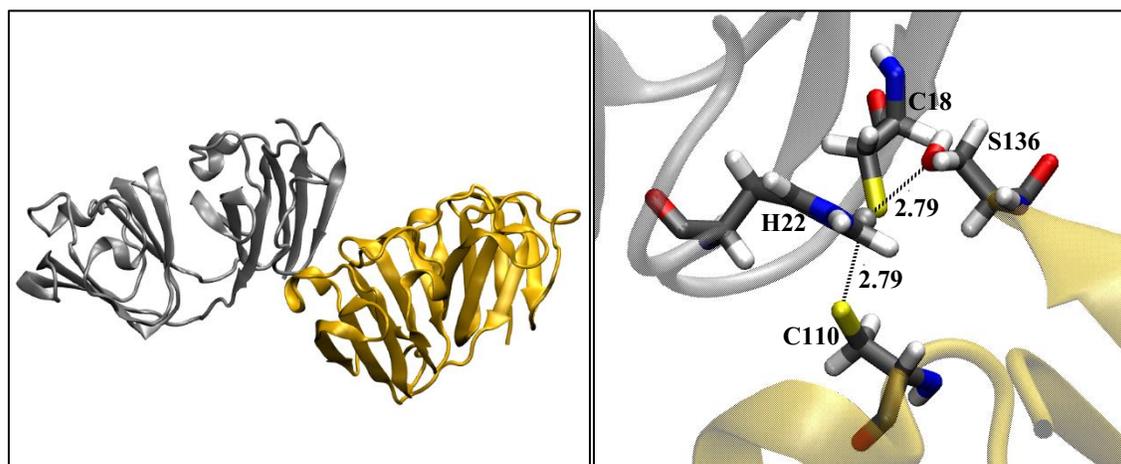


Figura 6.12. Derecha: Representación del dímero **CHCS**, donde M1 se representa en color plata y M2 se representa en color dorado. Izquierda: Representación de los aminoácidos que coordinan al metal en el dímero **CHCS** (C18 y H22 en M1; y C110 y S136 en M2). Se muestran las distancias de coordinación obtenidas en la conformación final de la simulación SMD.

Como puede observarse en la figura 6.12, a través de la simulación SMD se logró acercar el sitio **C110, S136** para formar el dímero y se obtuvieron distancias de coordinación de 2.79 Å para ambos aminoácidos. A través de la simulación QM/MM, se permitió la relajación de las distancias y ángulos de coordinación del nuevo sitio de unión formado. El sitio de unión se mantuvo estable, sin embargo, no se observó la desprotonación de la S136, por lo que el hidrógeno fue removido manualmente y el sistema fue sometido a 2 ns adicionales de simulación QM/MM. Posteriormente, realizamos la reparametrización con MCPB.py y se realizó dinámica molecular del sistema 500 ns.

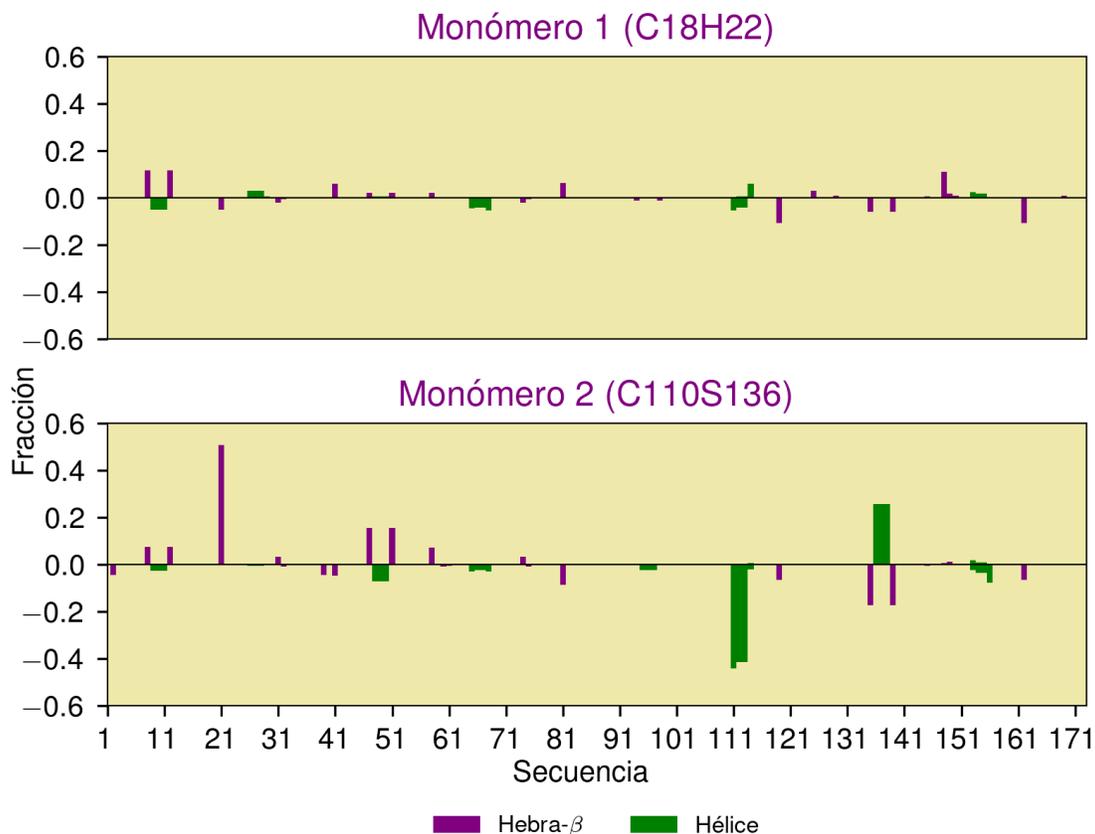


Figura 6.13. Gráfica de diferencia de estructura secundaria del monómero 1 (en medio) y del monómero 2 (abajo) a lo largo de la simulación de 500 ns del dímero **CHCS**.

En el gráfico de estructura secundaria para **CHCS** (figura 6.13), se puede observar que en M1, el único cambio notable es la desaparición de la hebra- β alrededor de H22; y para M2, los únicos cambios notables son la disminución de estructura helicoidal alrededor del residuo 113 y el aumento del mismo tipo de estructura alrededor del residuo 136. Ambos cambios ocurrieron en las regiones alrededor de los aminoácidos que forman parte del puente metálico. También, puede observarse un aumento de la estructura de hebra- β alrededor de H22, sin embargo, es menos predominante que para **CHCD** (figura 6.3) y **CHHD** (figura 6.8).

En general, la estructura secundaria de ambos monómeros de **CHCS** es muy estable respecto a la estructura de la proteína nativa, incluyendo las regiones alrededor de los aminoácidos que conforman los puentes metálicos de **CHCD** y **CHHD**.

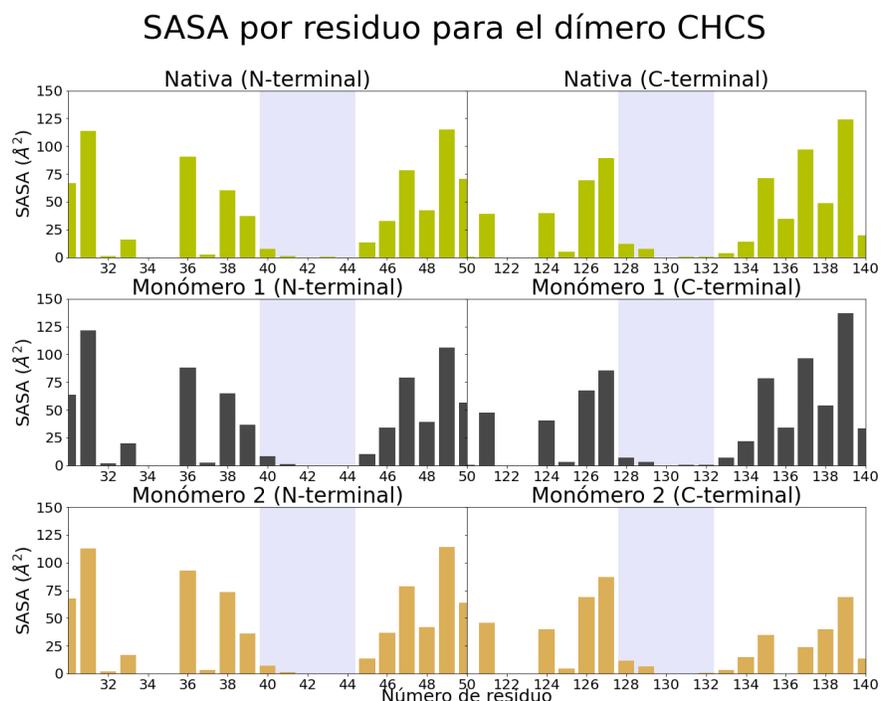


Figura 6.14. Gráfico de SASA por residuo de los dominios N- y C-terminal (izquierda y derecha, respectivamente) con un acercamiento a las regiones de interés (en las cuales se encuentran W42 y W130, resaltadas con un rectángulo gris claro) de la simulación del dímero **CHCS**.

Con el análisis de SASA por residuo para **CHCS** (figura 6.14) concluimos que no hay una afectación grave en cuanto a accesibilidad al solvente al formarse el dímero **CHCS** al no observarse un aumento en SASA en los residuos más importantes de los núcleos hidrofóbicos de los dominios N- y C-terminal de ambos monómeros.

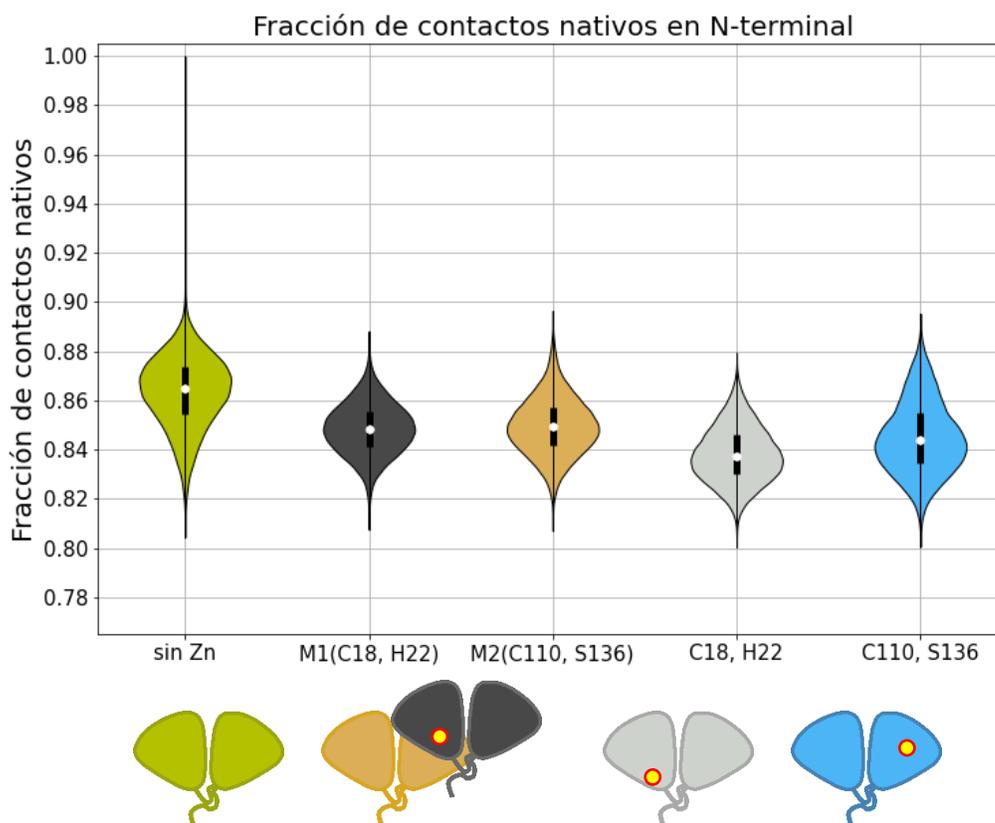


Figura 6.15. Gráfico de violín de la fracción de contactos nativos para el dominio N-terminal de cada uno de los monómeros del dímero **CHCS** (denotados con M1 y M2 más el sitio de unión correspondiente entre paréntesis) a lo largo de la simulación de 500 ns. A manera de comparación, se graficaron la simulación sin metal (extrema izquierda) y las simulaciones con el metal unido a los sitios de unión que conforman **CHCS**, pero sin dimerizar (extrema derecha). Abajo, se representan de manera esquemática los sistemas analizados y la posición del metal en el sitio de unión correspondiente.

El perfil obtenido en las gráficas de contactos nativos para el dominio N-terminal se asemeja más al observado en **CHHD** (figura 6.10) que al observado en **CHCD** (6.5) con una menor dispersión de los valores, la cual, también, se observa al comparar los valores del M1 y M2 con sus respectivos homólogos sin dimerizar, posiblemente derivado de una reducción en la libertad de movimiento. El valor promedio de la fracción de contactos para ambos monómeros es de 0.85 y es mayor que para las simulaciones **C18, H22** y **C110, S136**.

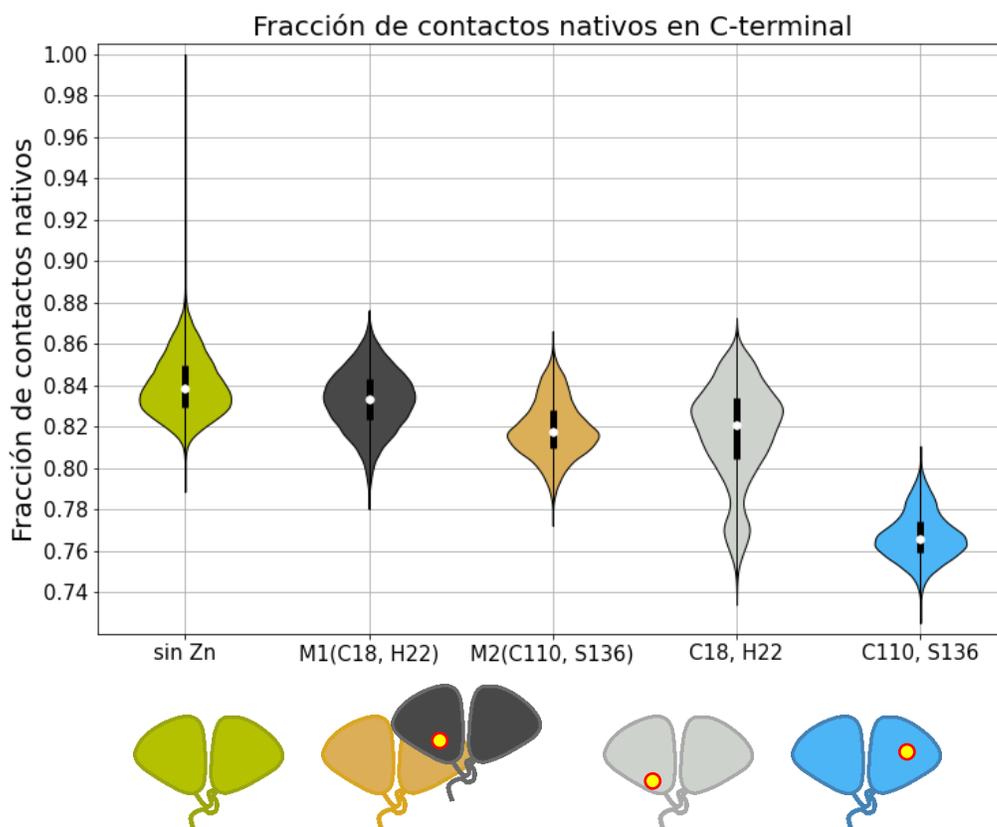


Figura 6.16. Gráfico de violín de la fracción de contactos nativos para el dominio C-terminal de cada uno de los monómeros del dímero **CHCS** (denotados con M1 y M2 más el sitio de unión correspondiente entre paréntesis) a lo largo de la simulación de 500 ns. A manera de comparación, se graficaron la simulación sin metal (extrema izquierda) y las simulaciones con el metal unido a los sitios de unión que conforman **CHCS**, pero sin dimerizar (extrema derecha). Abajo, se representan de manera esquemática los sistemas analizados y la posición del metal en el sitio de unión correspondiente.

El aumento en el valor promedio de la fracción de contactos nativos en el dímero con respecto a las simulaciones con zinc sin dimerizar, también se observa para el dominio C-terminal y es incluso más notable para el caso de M2, en el cual el promedio para la simulación **C110, S136** es de 0.77 y para M2 es ligeramente menor a 0.82 (figura 6.16). Para M1, la diferencia es menor, pero el valor promedio es muy similar al de la simulación de la proteína nativa.

Con los datos obtenidos de estructura secundaria, SASA y contactos nativos, se puede concluir que el dímero **CHCS** es una estructura muy estable, e incluso, los resultados sugieren que es ligeramente más estable que las simulaciones de los sitios sin dimerizar. Concluimos que hay una alta probabilidad de que el sitio de unión **C110, S136** esté involucrado en el proceso de agregación de CRYGD inducido por Zn y que se encuentre presente la formación de una estructura similar al dímero **CHCS**. Sin embargo, cabe destacar que la estabilidad de dicho sitio de

unión depende de la desprotonación de la serina (figura 2.8) para permitir su unión al metal, lo cual no fue observado durante los primeros 2 ns de la simulación QM/MM del dímero. Es posible que este efecto se deba a que, como el metal se encontraba unido a cuatro aminoácidos, la distribución de la carga del Zn(II) era mayor que cuando únicamente se encontraba unido a **C110**, **S136** disminuyendo la probabilidad de que la serina se desprotone.

Como se ha mencionado anteriormente, no se descarta la posibilidad de que exista más de una estructura tipo puente metálico involucrada en el proceso de agregación de CRYGD inducida por zinc, observándose en un mismo agregado estructuras tipo **CHCD**, **CHHD** y **CHCS**. Mostrado por los resultados del presente trabajo, los dímeros de CRYGD unidos por puente metálico son altamente estables y no hay desplegamiento de ninguno de los monómeros involucrados concordando con los resultados experimentales [24]. A su vez, la descripción de más de un dímero distinto que sea estable concuerda con resultados experimentales, en los cuales se propone que el Zn(II) no tiene un sitio de unión preferente en CRYGD, siendo el agregado el producto de la interacción con aminoácidos de distintos sitios [39].

6.3 Conclusiones

A partir de simulaciones de 500 ns con el metal unido a la proteína, se realizaron análisis de estructura secundaria, área de la superficie accesible al solvente (SASA) y contactos nativos, con los cuales mostramos que la unión de Zn(II) no induce el desplegamiento de CRYGD en ninguno de los sitios propuestos. Estos resultados concuerdan con el mecanismo de agregación propuesto en la literatura [24].

Adicionalmente, realizamos simulaciones de dímeros de CRYGD unidos por puente metálico (denominadas CHCD, CHHD y CHCS de acuerdo con los aminoácidos que conforman el sitio de unión), simulando el mecanismo propuesto en la literatura, y con datos de estructura secundaria, SASA y contactos nativos, mostramos que se conserva la estructura secundaria y no se observó riesgo de desplegamiento en ninguno de los dímeros formados. Las estructuras formadas parecen ser altamente estables, especialmente para los dímeros **CHHD** y **CHCS**, por lo cual, los sitios de unión **C110**, **D113**; **H65**, **D73** y **C110**, **S136** junto con **C18**, **H22** son candidatos favorables para la interacción con el zinc y la formación de agregados. La detección de más de un sitio de unión favorable concuerda con lo descrito en la literatura sobre que el Zn(II) no tiene preferencia sobre un único sitio [39].

Los datos obtenidos favorecen la propuesta de que la agregación de la CRYGD dependiente de Zn(II) se realiza a través de la formación de puentes metálicos y que ninguno de los monómeros involucrados pierde su estructura tridimensional ni sufre eventos de desplegamiento.

Conclusiones generales

A través de herramientas de predicción, identificamos posibles sitios de unión a Zn(II) en la proteína cristalina gamma-D humana y, utilizando diversas herramientas *in silico*; entre ellas cálculos de energía a nivel DFT, simulaciones QM/MM, de dinámica molecular clásica, dinámica molecular dirigida, reparametrización; proponemos que la unión del metal a los sitios identificados no afecta la estructura de CRYGD y los dímeros formados a través de puente metálico son estables.

Por lo tanto, concluimos que hay una alta probabilidad de que la proteína inicie un proceso de agregación en presencia de zinc, a través de la unión del metal a los residuos C18 y H22. Al asociarse a un segundo monómero de CRYGD, el metal completa su esfera de coordinación con residuos de ese otro monómero. De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, los sitios posibles, aunque no limitados a, son: **C110, D113; H65, D73; C110, S136**. Con ello, se forma un dímero que se mantiene unido gracias a la interacción con el zinc. Este nuevo dímero, a su vez, puede seguir uniendo iones de Zn(II) formando trímeros, tetrámeros y multímeros de CRYGD, generando agregados incapaces de realizar su función, resultando en cataratas. Este mecanismo propuesto de agregación concuerda con los resultados experimentales [24, 39].

Perspectivas

En este trabajo se encontró que la unión del ion metálico Zn^{2+} a la proteína humana CRYGD no induce una respuesta de desplegamiento ni de pérdida de estructura y que los dímeros formados a través de una interacción tipo puente metálico son altamente estables.

La continua unión de monómeros de CRYGD a través de puente metálico, eventualmente formaría agregados incapaces de realizar las funciones naturales de la proteína, resultando, en el caso más grave, en cataratas. Si bien los dímeros formados en el presente trabajo no son lo suficientemente grandes para dichas consecuencias, son un buen modelo inicial para entender el proceso de agregación inducido por zinc y los sitios propuestos podrían tener un papel fundamental.

Para continuar estudiando el mecanismo propuesto y la validez del modelo presentado, sería necesario realizar el estudio de un modelo extendido, formando trímeros de CRYGD (o incluso multímeros más grandes), a partir de los dímeros formados, y analizar la estabilidad de cada uno de los monómeros involucrados. Sin embargo, a mayor número de átomos, mayor será el costo computacional necesario para estudiar los sistemas extendidos. Una solución alternativa sería el uso de simulaciones de grano grueso en lugar de simulaciones atomísticas para estudiar sistemas de cada vez mayor tamaño.

Otro ion metálico que tiene una alta importancia en la agregación de CRYGD y en la formación de cataratas es el Cu^{2+} . De acuerdo con evidencia experimental, la unión de Cobre induce el desplegamiento de la proteína y consecuentemente, a su agregación. Al igual que en el caso del $Zn(II)$, se desconocen con certeza los aminoácidos involucrados. El uso de la metodología descrita en el presente trabajo (búsqueda en servidores de predicción, QM/MM, análisis de energía de unión, simulaciones MD con reparametrización utilizando MCPB.py) podría extenderse al análisis de $Cu(II)$ para entender de mejor manera el proceso de agregación inducido por este metal, con la diferencia de utilizar una metodología distinta a QM/MM debido a que Cu^{2+} tiene un electrón desapareado, el cual no es un parámetro permitido en los métodos utilizados en este trabajo.

Extender la presente metodología a $Cu(II)$ permitiría aumentar el entendimiento de las interacciones de las proteínas cristalinas con metales y cómo se ve afectada su función.

Bibliografía

1. Ceguera y discapacidad visual. (n.d.). Retrieved April 21, 2022, from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/blindness-and-visual-impairment>
2. Allen, D., & Vasavada, A. (2006). Cataract and surgery for cataract. *BMJ*, *333*(7559), 128–132. <https://doi.org/10.1136/bmj.333.7559.128>
3. Bloemendal, H., de Jong, W., Jaenicke, R., Lubsen, N. H., Slingsby, C., & Tardieu, A. (2004). Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *86*(3), 407–485. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2003.11.012>
4. Rivillas-Acevedo, L., Fernández-Silva, A., & Amero, C. (2015). Function, Structure and Stability of Human Gamma D Crystallins: A Review. In L. Olivares-Quiroz, O. Guzmán-López, & H. E. Jardón-Valadez (Eds.), *Physical Biology of Proteins and Peptides* (pp. 81–98). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-21687-4_5
5. Cataracts and Cataract Surgery: A Simple Explanation from Your Eye Doctor - Seaview Eye Care cloudy. (n.d.). Retrieved April 21, 2022, from <https://www.seavieweyecare.com/cataracts-and-cataract-surgery-a-simple-explanation-from-your-eye-doctor/>
6. Andley, U. P. (2007). Crystallins in the eye: Function and pathology. *Progress in Retinal and Eye Research*, *26*(1), 78–98. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2006.10.003>
7. Kalligeraki, A. A., & Quinlan, R. A. (2021). Structural Proteins | Crystallins of the Mammalian Eye Lens. In *Encyclopedia of Biological Chemistry III* (pp. 639–667). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819460-7.00139-0>

8. Das, P., King, J. A., & Zhou, R. (2011). Aggregation of γ -crystallins associated with human cataracts via domain swapping at the C-terminal β -strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(26), 10514–10519.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1019152108>
9. Aguayo-Ortiz, R., & Dominguez, L. (2020). Effects of Mutating Trp42 Residue on γ D-Crystallin Stability. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *60*(2), 777–785. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00747>
10. Ji, F., Jung, J., Koharudin, L. M. I., & Gronenborn, A. M. (2013). The Human W42R γ D-Crystallin Mutant Structure Provides a Link between Congenital and Age-related Cataracts*. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(1), 99–109.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.416354>
11. Pande, A., Annunziata, O., Asherie, N., Ogun, O., Benedek, G. B., & Pande, J. (2005). Decrease in Protein Solubility and Cataract Formation Caused by the Pro23 to Thr Mutation in Human γ D-Crystallin. *Biochemistry*, *44*(7), 2491–2500.
<https://doi.org/10.1021/bi0479611>
12. Banerjee, P. R., Pande, A., Patrosz, J., Thurston, G. M., & Pande, J. (2011). Cataract-associated mutant E107A of human γ D-crystallin shows increased attraction to α -crystallin and enhanced light scattering. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(2), 574–579. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014653107>
13. Roshan, M., Vijaya, P. H., Lavanya, G. R., Shama, P. K., Santhiya, S. T., Graw, J., ... Satyamoorthy, K. (2010). A novel human CRYGD mutation in a juvenile autosomal dominant cataract. *Molecular Vision*, *10*.

14. Santhiya, S. T. (2002). Novel mutations in the gamma-crystallin genes cause autosomal dominant congenital cataracts. *Journal of Medical Genetics*, 39(5), 352–358. <https://doi.org/10.1136/jmg.39.5.352>
15. Pande, A., Gillot, D., & Pande, J. (2009). The Cataract-Associated R14C Mutant of Human γ D-Crystallin Shows a Variety of Intermolecular Disulfide Cross-Links: A Raman Spectroscopic Study. *Biochemistry*, 48(22), 4937–4945. <https://doi.org/10.1021/bi9004182>
16. Kmoch, S., Brynda, J., Asfaw, B., Bezouška, K., Novák, P., Rezáčová, P., ... Elleder, M. (n.d.). Link between a novel human γ D-crystallin allele and a unique cataract phenotype explained by protein crystallography, 8.
17. Heon, E., Priston, M., Schorderet, D. F., Billingsley, G. D., Girard, P. O., Lubsen, N., & Munier, F. L. (1999). The γ -Crystallins and Human Cataracts: A Puzzle Made Clearer. *Am. J. Hum. Genet.*, 7.
18. Aguayo-Ortiz, R., Guzmán-Ocampo, D. C., & Dominguez, L. (2022). Insights into the binding of morin to human γ D-crystallin. *Biophysical Chemistry*, 282, 106750. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2021.106750>
19. Dawczynski, J., Blum, M., Winnefeld, K., & Strobel, J. (2002). Increased Content of Zinc and Iron in Human Cataractous Lenses. *Biological Trace Element Research*, 90(1–3), 15–24. <https://doi.org/10.1385/BTER:90:1-3:15>
20. Srivastava, V. K., Varshney, N., & Pandey, D. C. (2009). Role of trace elements in senile cataract. *Acta Ophthalmologica*, 70(6), 839–841. <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.1992.tb04898.x>
21. Dolar-Szczasny, Świąch, Flieger, Tatarczak-Michalewska, Niedzielski, Proch, ... Mackiewicz. (2019). Levels of Trace Elements in the Aqueous Humor of Cataract

- Patients Measured by the Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. *Molecules*, 24(22), 4127. <https://doi.org/10.3390/molecules24224127>
22. Quintanar, L., Domínguez-Calva, J. A., Serebryany, E., Rivillas-Acevedo, L., Haase-Pettingell, C., Amero, C., & King, J. A. (2016). Copper and Zinc Ions Specifically Promote Nonamyloid Aggregation of the Highly Stable Human γ -D Crystallin. *ACS Chemical Biology*, 11(1), 263–272. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00919>
23. Dudev, T., & Lim, C. (2000). Tetrahedral vs Octahedral Zinc Complexes with Ligands of Biological Interest: A DFT/CDM Study. *Journal of the American Chemical Society*, 122(45), 11146–11153. <https://doi.org/10.1021/ja0010296>
24. Domínguez-Calva, J. A., Haase-Pettingell, C., Serebryany, E., King, J. A., & Quintanar, L. (2018). A Histidine Switch for Zn-Induced Aggregation of γ -Crystallins Reveals a Metal-Bridging Mechanism That Is Relevant to Cataract Disease. *Biochemistry*, 57(33), 4959–4962. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00436>
25. Lin, Y.-F., Cheng, C.-W., Shih, C.-S., Hwang, J.-K., Yu, C.-S., & Lu, C.-H. (2016). MIB: Metal Ion-Binding Site Prediction and Docking Server. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 56(12), 2287–2291. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00407>
26. Sánchez-Aparicio, J.-E., Tiessler-Sala, L., Velasco-Carneros, L., Roldán-Martín, L., Sciortino, G., & Maréchal, J.-D. (2021). BioMetAll: Identifying Metal-Binding Sites in Proteins from Backbone Preorganization. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 61(1), 311–323. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c00827>
27. Groenhof, G. (2013). Introduction to QM/MM Simulations. In L. Monticelli & E. Salonen (Eds.), *Biomolecular Simulations* (Vol. 924, pp. 43–66). Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-017-5_3

28. Amber 18 Reference Manual. (n.d.). Retrieved from <https://ambermd.org/doc12/Amber18.pdf>
29. Li, P., & Merz, K. M. (2016). MCPB.py: A Python Based Metal Center Parameter Builder. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *56*(4), 599–604. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00674>
30. Hénin, J., Lelièvre, T., Shirts, M. R., Valsson, O., & Delemotte, L. (2022). Enhanced sampling methods for molecular dynamics simulations. *arXiv:2202.04164 [cond-mat, physics:physics]*. Retrieved from <http://arxiv.org/abs/2202.04164>
31. Izrailev, S., Stepaniants, S., Isralewitz, B., Kosztin, D., Lu, H., Molnar, F., ... Schulten, K. (1999). Steered Molecular Dynamics. In P. Deuffhard, J. Hermans, B. Leimkuhler, A. E. Mark, S. Reich, & R. D. Skeel (Eds.), *Computational Molecular Dynamics: Challenges, Methods, Ideas* (Vol. 4, pp. 39–65). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-58360-5_2
32. Basak, A., Bateman, O., Slingsby, C., Pande, A., Asherie, N., Ogun, O., ... Pande, J. (2003). High-resolution X-ray Crystal Structures of Human γ D Crystallin (1.25Å) and the R58H Mutant (1.15Å) Associated with Aculeiform Cataract. *Journal of Molecular Biology*, *328*(5), 1137–1147. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00375-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00375-9)
33. Case, D. A., Ben-Shalom, I. Y., Brozell, S. R., Cerutti, D. S., Cheatham, I., T. E., Cruzeiro, V. W. D., ... Kollman, P. A. (2018). AMBER 18. University of California, San Francisco.
34. Maier, J. A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K. E., & Simmerling, C. (2015). ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *11*(8), 3696–3713. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00255>

35. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., & Klein, M. L. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*, 79(2), 926–935. <https://doi.org/10.1063/1.445869>
36. Stewart, J. J. P. (2007). Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *Journal of Molecular Modeling*, 13(12), 1173–1213. <https://doi.org/10.1007/s00894-007-0233-4>
37. Honarparvar, B., Kanchi, S., & Bisetty, K. (2019). Theoretical insights into the competitive metal bioaffinity of lactoferrin as a metal ion carrier: a DFT study. *New Journal of Chemistry*, 43(41), 16374–16384. <https://doi.org/10.1039/C9NJ03786A>
38. Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., ... Fox, D. J. (2016). Gaussian16, Revision A.03. Wallingford CT: Gaussian, Inc.
39. Fernández-Silva, A., French-Pacheco, L., Rivillas-Acevedo, L., & Amero, C. (2020). Aggregation pathways of human γ D crystallin induced by metal ions revealed by time dependent methods. *PeerJ*, 8, e9178. <https://doi.org/10.7717/peerj.9178>
40. Roe, D. R., & Cheatham, T. E. (2013). PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 9(7), 3084–3095. <https://doi.org/10.1021/ct400341p>
41. Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., & Lindahl, E. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1–2, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>

Anexos

8.1 Gráficas complementarias a los resultados del capítulo 4

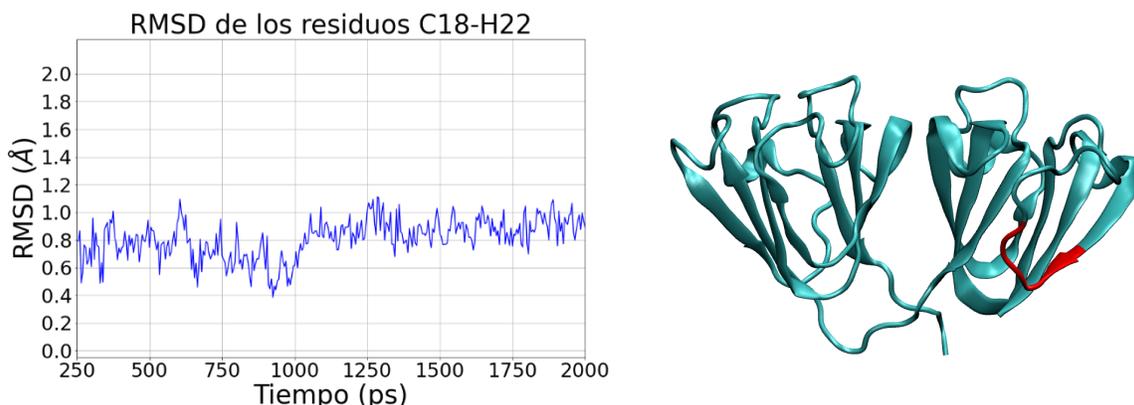


Figura 8.1. Derecha: RMSD de todos los átomos de los residuos C18 a H22 de la simulación QM/MM del sitio de unión **C18, H22** (los primeros 250 ps fueron omitidos debido a que el sistema aún se encontraba en fase de equilibrio). Izquierda: Estructura tridimensional de CRYGD con los aminoácidos para los cuales se calculó su RMSD marcados en rojo.

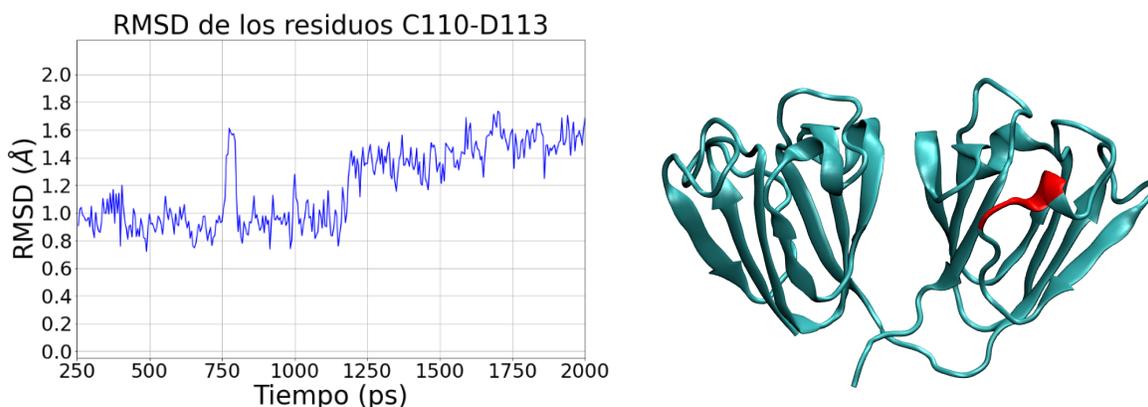


Figura 8.2. Derecha: RMSD de todos los átomos de los residuos C110 a D113 de la simulación QM/MM del sitio de unión **C110, D113** (los primeros 250 ps fueron omitidos debido a que el sistema aún se encontraba en fase de equilibrio). Izquierda: Estructura tridimensional de CRYGD con los aminoácidos para los cuales se calculó su RMSD marcados en rojo.

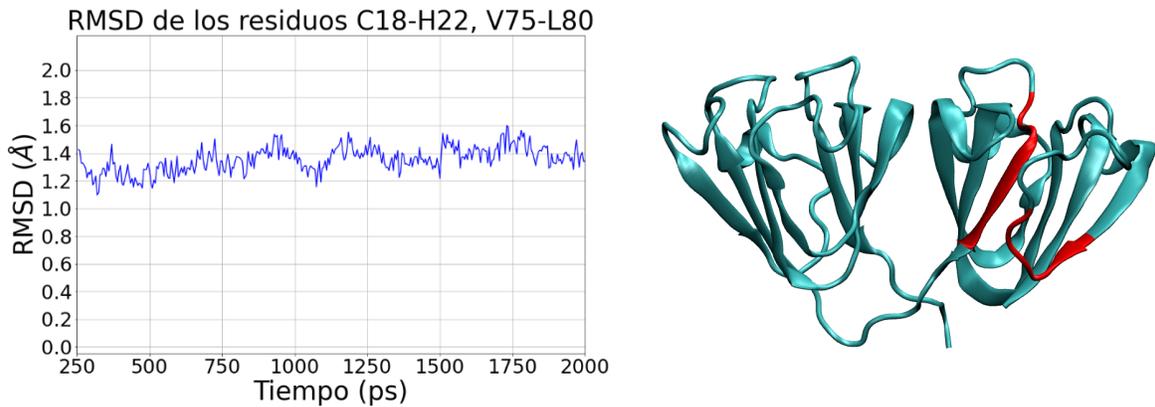


Figura 8.3. Derecha: RMSD de todos los átomos de los residuos C18 a H22 y V75 a L80 de la simulación QM/MM del sitio de unión **C18, C78** (los primeros 250 ps fueron omitidos debido a que el sistema aún se encontraba en fase de equilibrio). Izquierda: Estructura tridimensional de CRYGD con los aminoácidos para los cuales se calculó su RMSD marcados en rojo.

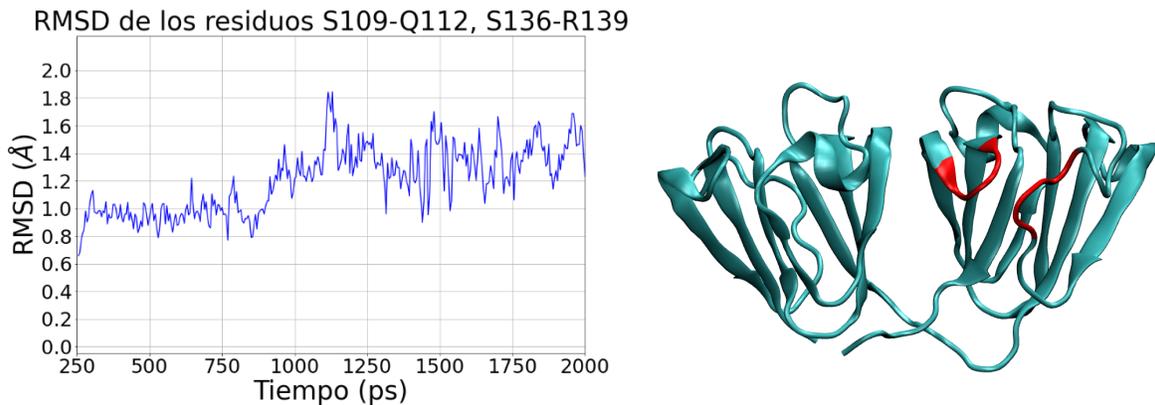


Figura 8.4. Derecha: RMSD de todos los átomos de los residuos S109 a Q112 y S136 a R139 de la simulación QM/MM del sitio de unión **C110, S136** (los primeros 250 ps fueron omitidos debido a que el sistema aún se encontraba en fase de equilibrio). Izquierda: Estructura tridimensional de CRYGD con los aminoácidos para los cuales se calculó su RMSD marcados en rojo.

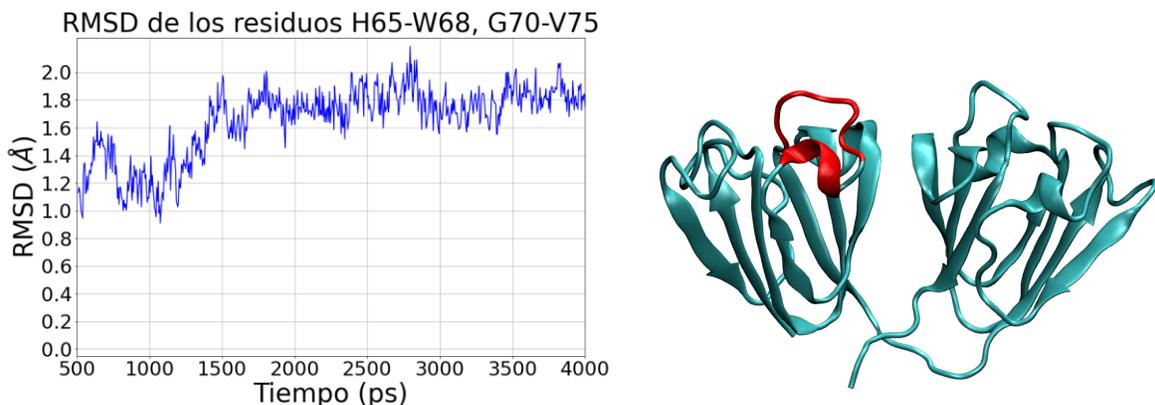


Figura 8.5. Derecha: RMSD de todos los átomos de los residuos H65 a W68 y G70 a V75 de la simulación QM/MM del sitio de unión **H65, D73** (los primeros 500 ps fueron omitidos debido a que el sistema aún se encontraba en fase de equilibrio). Izquierda: Estructura tridimensional de CRYGD con los aminoácidos para los cuales se calculó su RMSD marcados en rojo.

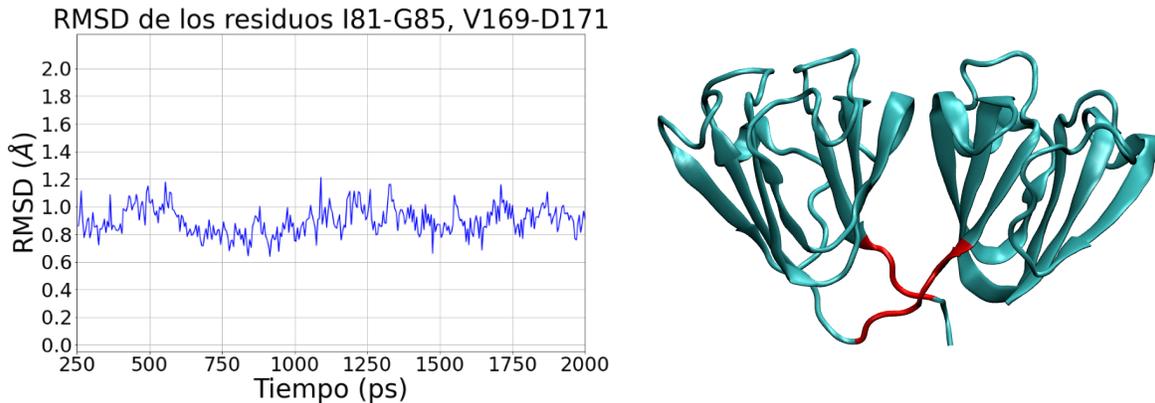


Figura 8.6. Derecha: RMSD de todos los átomos de los residuos I81 a G85 y V169 a D171 de la simulación QM/MM del sitio de unión **H83, D171** (los primeros 250 ps fueron omitidos debido a que el sistema aún se encontraba en fase de equilibrio). Izquierda: Estructura tridimensional de CRYGD con los aminoácidos para los cuales se calculó su RMSD marcados en rojo.

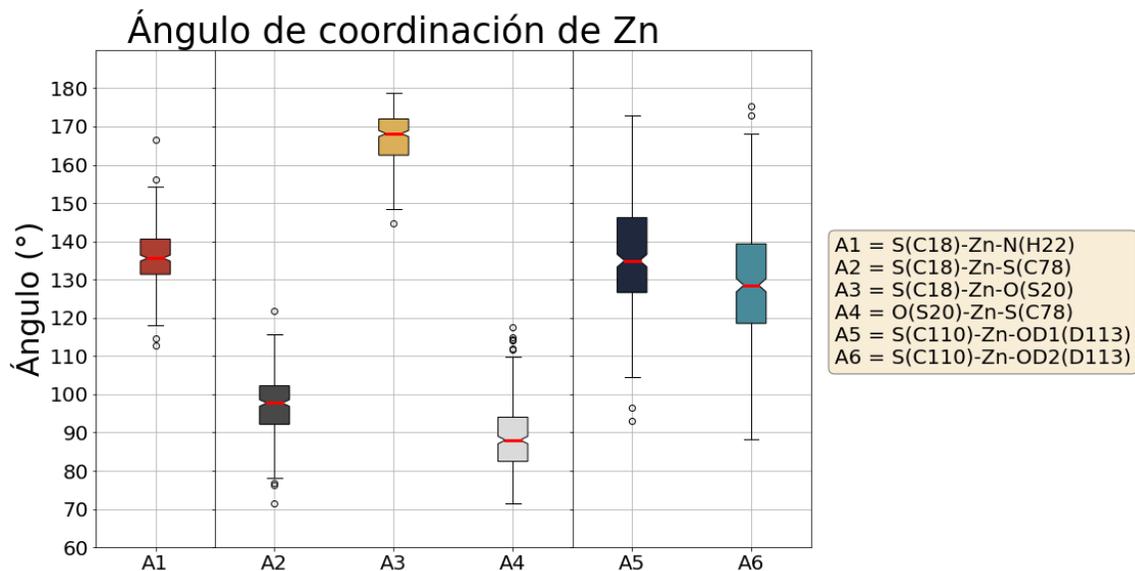


Figura 8.7. Gráfico de caja de la variación en los ángulos de coordinación entre los aminoácidos del sitio de unión y el ion metálico durante las simulaciones QM/MM. Derecha: Simulación del sitio **C18, H22**. Centro: Simulación **C18, C78**. Izquierda: Simulación **C110, D113**.

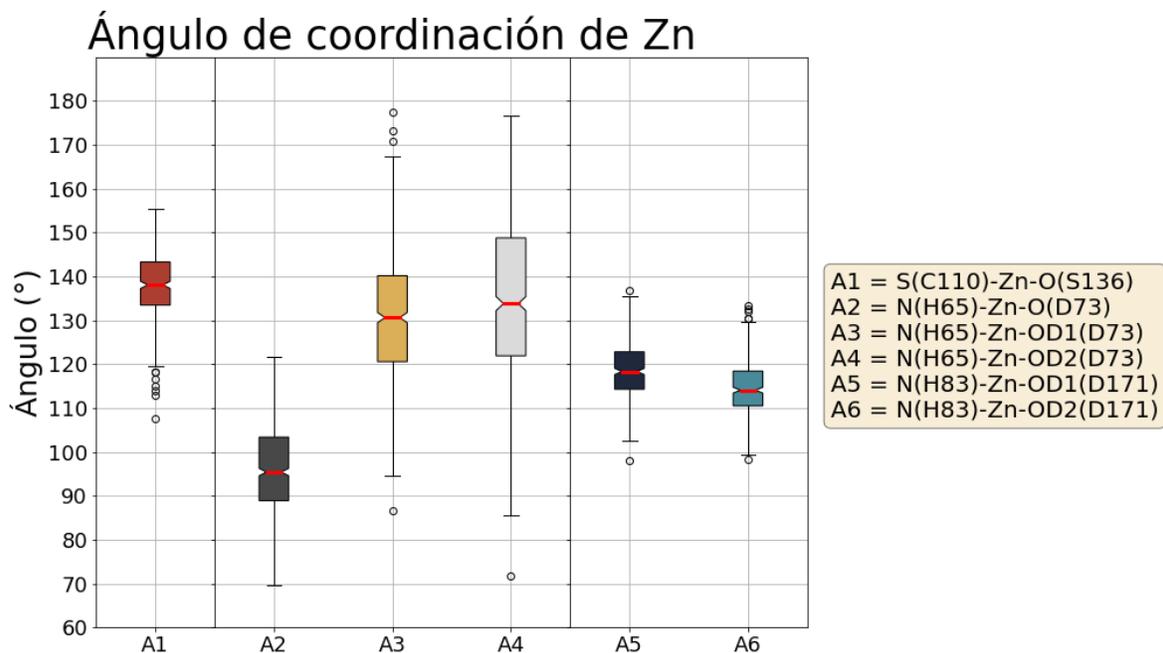


Figura 8.8. Gráfico de caja de la variación en los ángulos de coordinación entre los aminoácidos del sitio de unión y el ion metálico durante las simulaciones QM/MM. Derecha: Simulación del sitio C110, S136. Centro: Simulación H65, D73. Izquierda: Simulación H83, D171.

8.2 Figuras complementarias a los resultados del capítulo 5

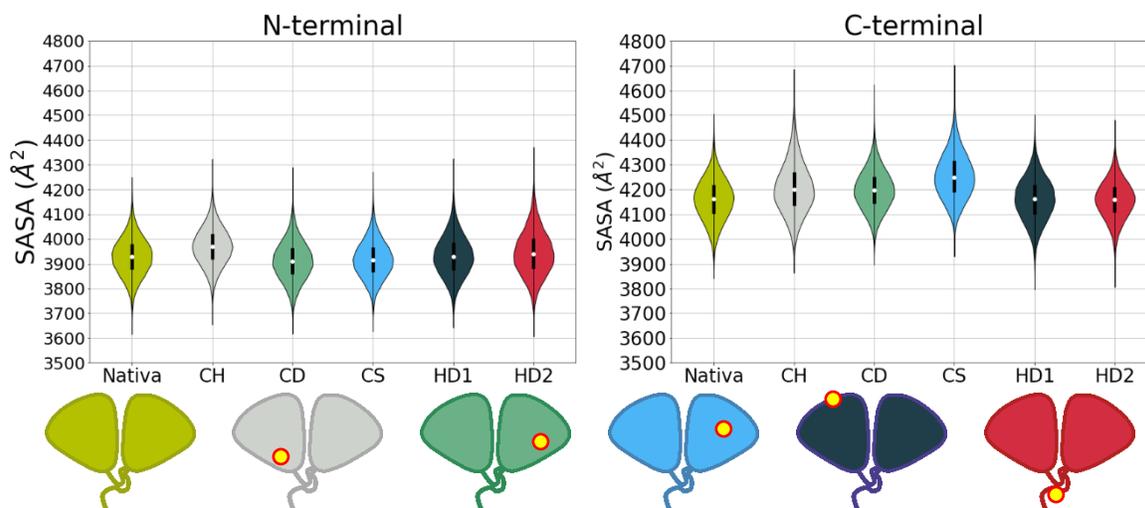


Figura 8.9. Gráfico de violín de la superficie accesible al solvente para el dominio N-terminal (izquierda) y C-terminal (derecha) a largo de las simulaciones de 500 ns. CH corresponde a la simulación C18, H22; CD a C110, D113; CS a C110, S136; HD1 a H65, D73; y H83, D171. Abajo, se representan de manera esquemática los sistemas analizados y la posición del metal en el sitio de unión correspondiente.

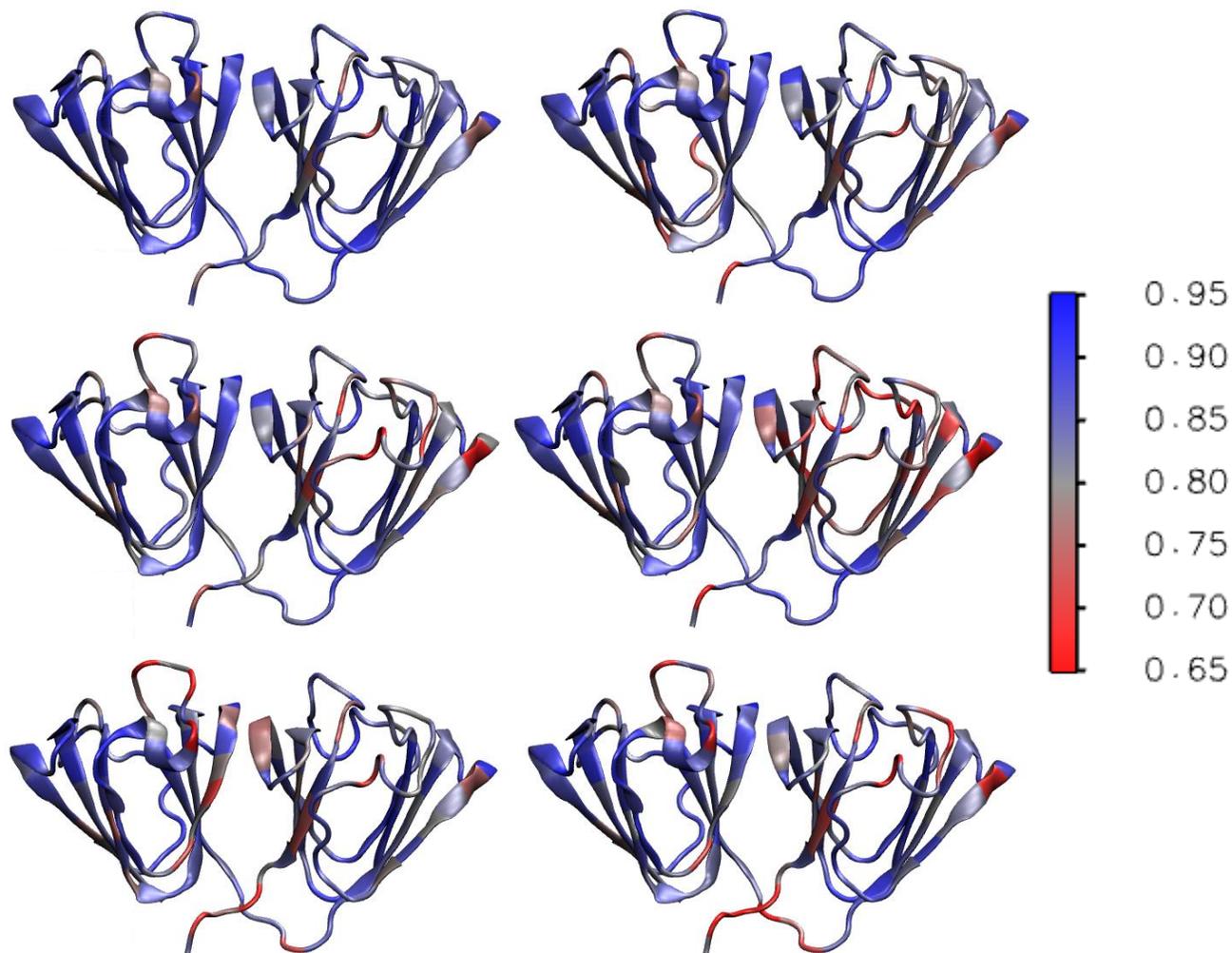


Figura 8.10. Estructura tridimensional de la proteína CRYGD y los cambios en los contactos nativos por residuo para las simulaciones de la proteína nativa (Superior izquierda) y los monómeros unidos a Zn: **C18, H22** (Superior derecha); **C110, D113** (Intermedia izquierda); **C110, S136** (Intermedia derecha); **H65, D73** (Inferior izquierda) y **H83, D171** (Inferior derecha). La escala de colores se ubica a la derecha de las estructuras.

Tabla 8.1. Radios atómicos y cargas parciales obtenidos con MCPB.py para el ion zinc y los átomos que se le unen para las simulaciones de monómeros de CRYGD.

| Átomo | Carga parcial | Radio LJ | Radio GB |
|------------------------------|---------------|----------|----------|
| Simulación C18, H22 | | | |
| Zn | 0.8644 | 1.3950 | 1.5000 |
| SG (C18) | -0.4853 | 2.0000 | 1.8000 |
| ND1 (H22) | -0.2674 | 1.8240 | 1.5500 |
| Simulación C110, D113 | | | |
| Zn | 0.9652 | 1.3950 | 1.5000 |
| SG (C110) | -0.6288 | 2.0000 | 1.8000 |
| OD2 (D113) | -0.6789 | 1.6612 | 1.5000 |
| Simulación C110, S136 | | | |
| Zn | 1.0042 | 1.3950 | 1.5000 |
| SG (C110) | -0.5417 | 2.0000 | 1.8000 |
| OG (S136) | -0.6359 | 1.7210 | 1.5000 |
| Simulación H65, D73 | | | |
| Zn | 1.1249 | 1.3950 | 1.5000 |
| NE2 (H65) | -0.4398 | 1.8240 | 1.5500 |
| OD1 (D73) | -0.6924 | 1.6612 | 1.5000 |
| Simulación H83, D171 | | | |
| Zn | 1.1261 | 1.3950 | 1.5000 |
| NE2 (H83) | -0.4614 | 1.8240 | 1.5500 |
| OD1 (D171) | -0.6363 | 1.6612 | 1.5000 |

8.3 Figuras complementarias a los resultados del capítulo 6

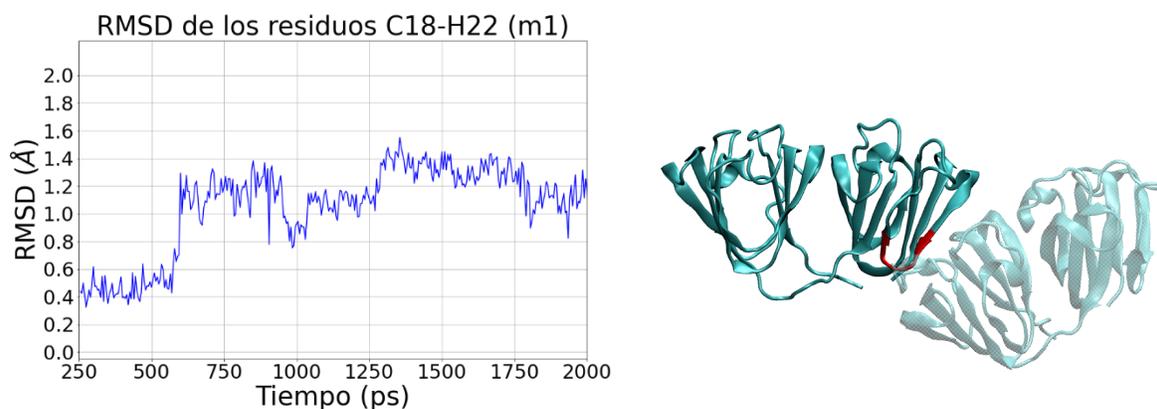


Figura 8.11. Derecha: RMSD de todos los átomos de los residuos C18 a H22 del monómero 1 (con el Zn unido a **C18, H22**) de la simulación QM/MM del dímero **CHCD** (los primeros 250 ps fueron omitidos debido a que el sistema aún se encontraba en fase de equilibrio). Izquierda: Estructura tridimensional del monómero 1 del dímero **CHCD** (el monómero 2 se encuentra transparentado para mayor claridad) con los aminoácidos para los cuales se calculó su RMSD marcados en rojo.

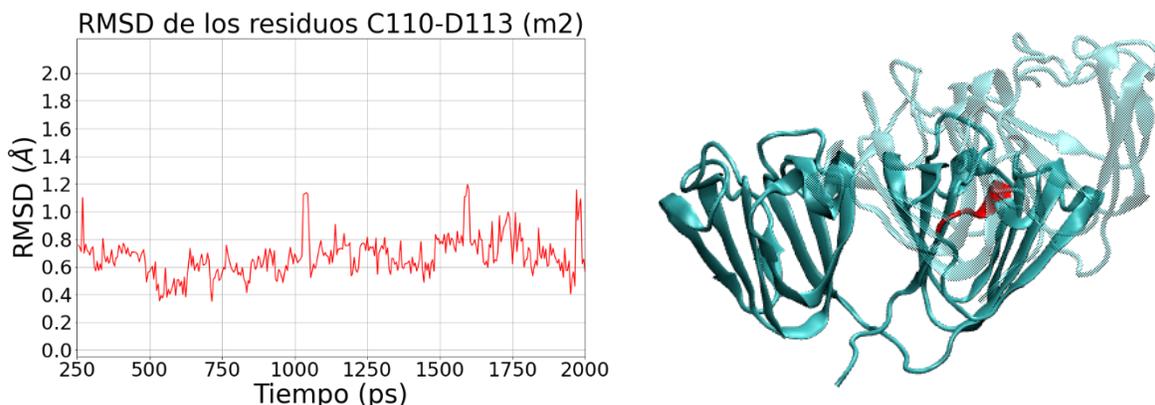


Figura 8.12. Derecha: RMSD de todos los átomos de los residuos C110 a D113 del monómero 2 (con el Zn unido a C110, D113) de la simulación QM/MM del dímero **CHCD** (los primeros 250 ps fueron omitidos debido a que el sistema aún se encontraba en fase de equilibrio). Izquierda: Estructura tridimensional del monómero 2 del dímero **CHCD** (el monómero 1 se encuentra transparentado para mayor claridad) con los aminoácidos para los cuales se calculó su RMSD marcados en rojo.

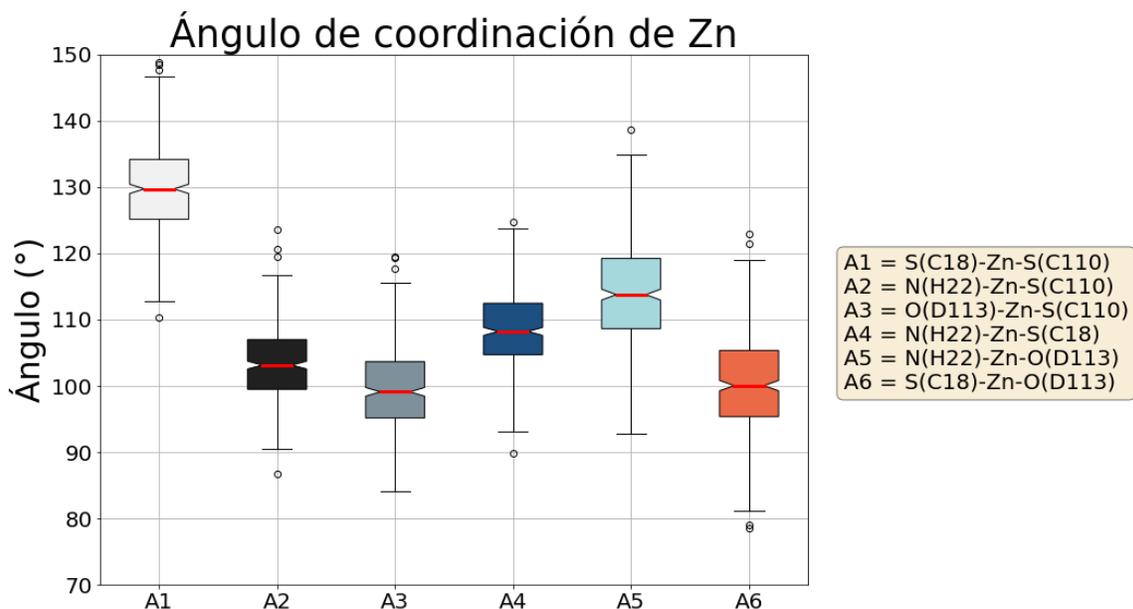


Figura 8.13. Gráfico de caja de la variación en los ángulos de coordinación entre los aminoácidos del sitio de unión y el ion metálico durante la simulación QM/MM del dímero **CHCD**.

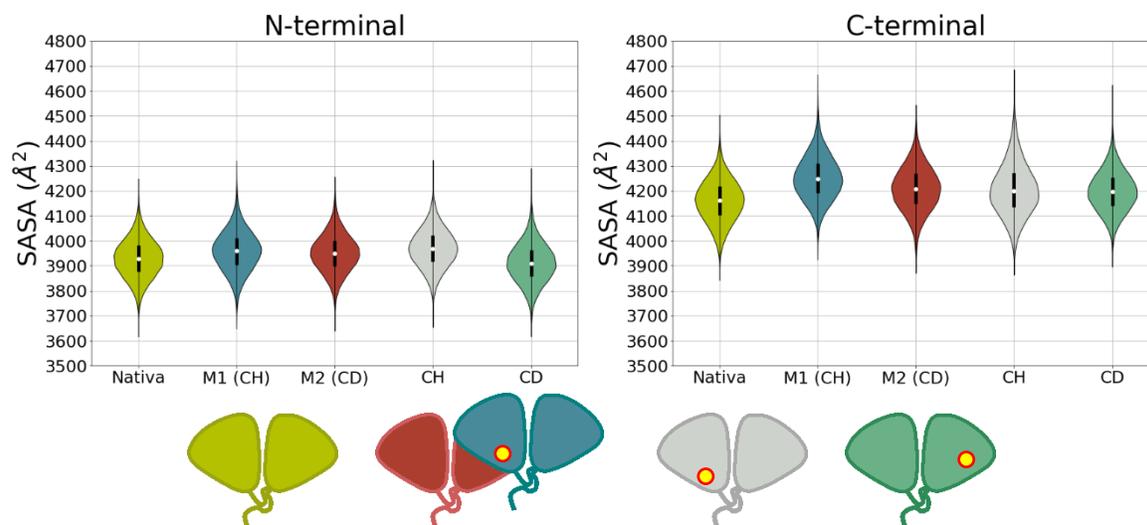


Figura 8.14. Gráfico de violín de la superficie accesible al solvente para el dominio N-terminal (izquierda) y C-terminal (derecha) de cada uno de los monómeros del dímero **CHCD**. M1(CH) corresponde al monómero 1 de **CHCD** con el metal unido a C18 y H22; M2(CD) al monómero 2 con el metal unido a C110 y D113; CH corresponde a la simulación **C18, H22**; y CD a **C110, D113**. Abajo, se representan de manera esquemática los sistemas analizados y la posición del metal en el sitio de unión correspondiente.

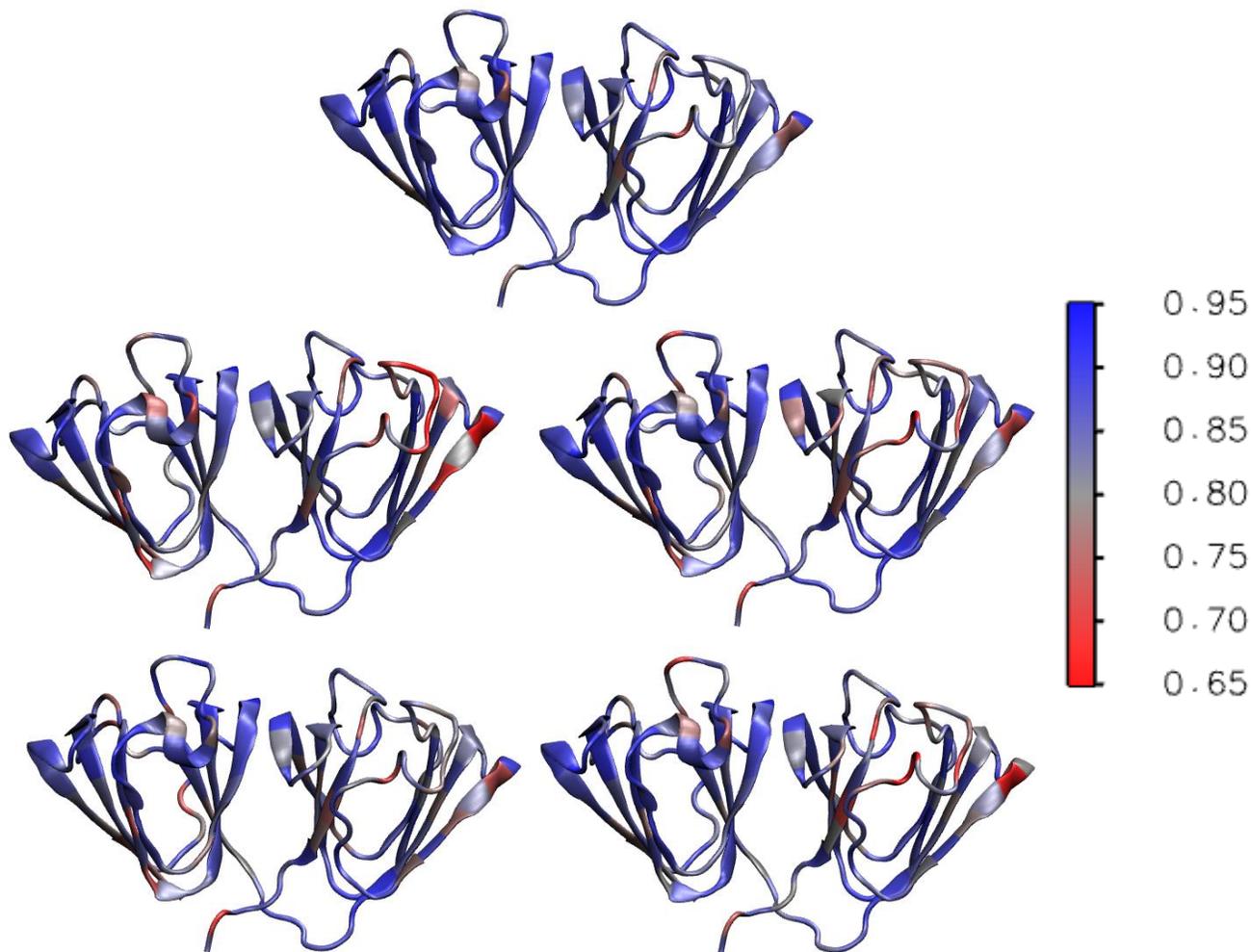


Figura 8.15. Estructura tridimensional de la proteína CRYGD y los cambios en los contactos nativos por residuo para las simulaciones de la proteína nativa (Superior), los monómeros que conforman a CHCD: M1 con el metal unido en C18, H22 (Intermedia izquierda); M2 con el metal unido a C110, D113 (Intermedia derecha) y sus correspondientes homólogos sin dimerizar unidos a Zn: **C18, H22** (Inferior izquierda); **C110, D113** (Inferior derecha). La escala de colores se ubica a la derecha de las estructuras.

Tabla 8.2. Radios atómicos y cargas parciales obtenidos con MCPB.py para el ion zinc y los átomos que se le unen para la simulación del dímero CHCD.

| Átomo | Carga parcial | Radio LJ | Radio GB |
|-------------------|---------------|----------|----------|
| Zn | 0.6402 | 1.3950 | 1.5000 |
| Monómero 1 | | | |
| SG (C18) | -0.6252 | 2.0000 | 1.8000 |
| ND1 (H22) | -0.0190 | 1.8240 | 1.5500 |
| Monómero 2 | | | |
| SG (C110) | -0.6630 | 2.0000 | 1.8000 |
| OD2 (D113) | -0.4183 | 1.6612 | 1.5000 |

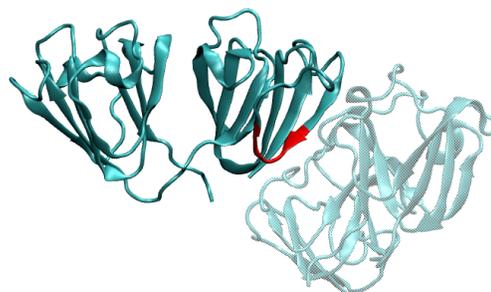
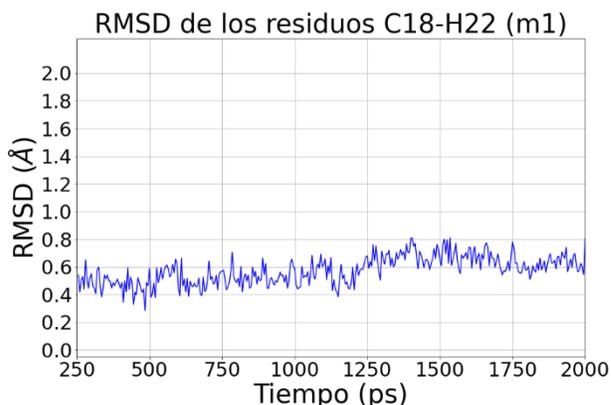


Figura 8.16. Derecha: RMSD de todos los átomos de los residuos C18 a H22 del monómero 1 (con el Zn unido a **C18**, **H22**) de la simulación QM/MM del dímero **CHHD** (los primeros 250 ps fueron omitidos debido a que el sistema aún se encontraba en fase de equilibrio). Izquierda: Estructura tridimensional del monómero 1 del dímero **CHHD** (el monómero 2 se encuentra transparentado para mayor claridad) con los aminoácidos para los cuales se calculó su RMSD marcados en rojo.

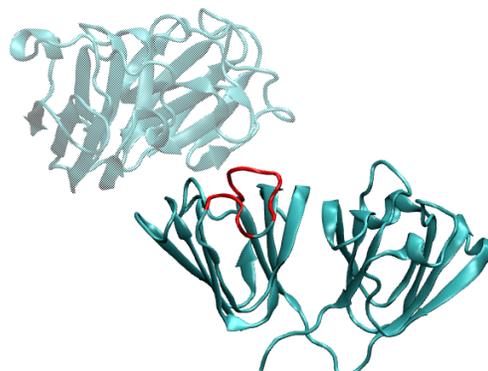
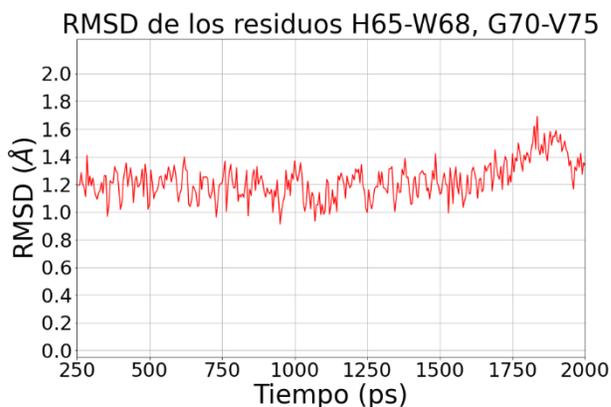


Figura 8.17. Derecha: RMSD de todos los átomos de los residuos H65 a W68 y G70 a V75 del monómero 2 (con el Zn unido a **H65**, **D73**) de la simulación QM/MM del dímero **CHHD** (los primeros 250 ps fueron omitidos debido a que el sistema aún se encontraba en fase de equilibrio). Izquierda: Estructura tridimensional del monómero 2 del dímero **CHHD** (el monómero 1 se encuentra transparentado para mayor claridad) con los aminoácidos para los cuales se calculó su RMSD marcados en rojo.

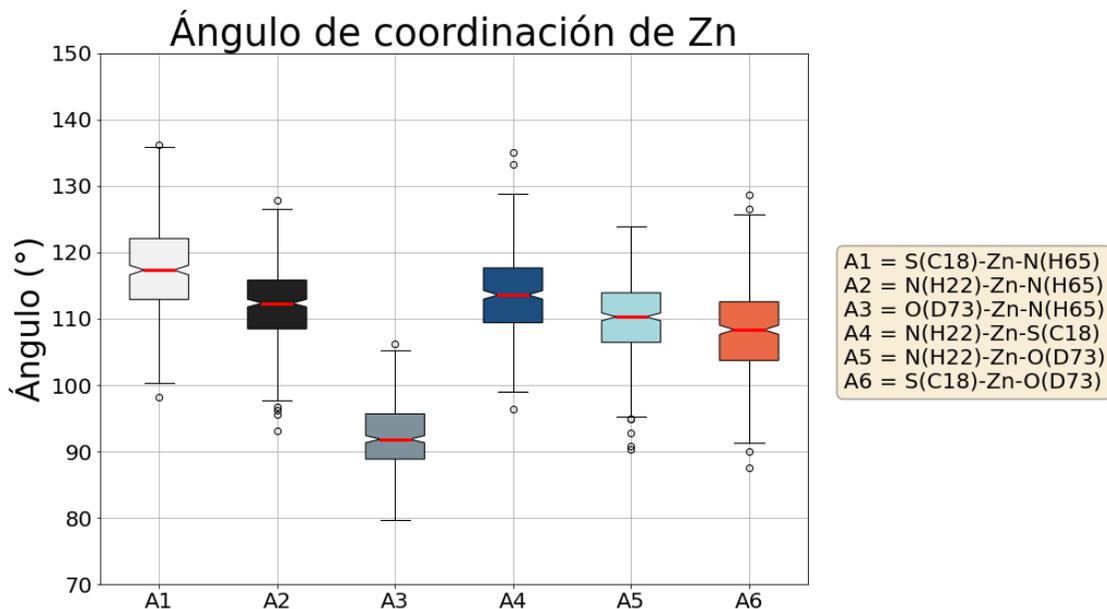


Figura 8.18. Gráfico de caja de la variación en los ángulos de coordinación entre los aminoácidos del sitio de unión y el ion metálico durante la simulación QM/MM del dímero **CHHD**.

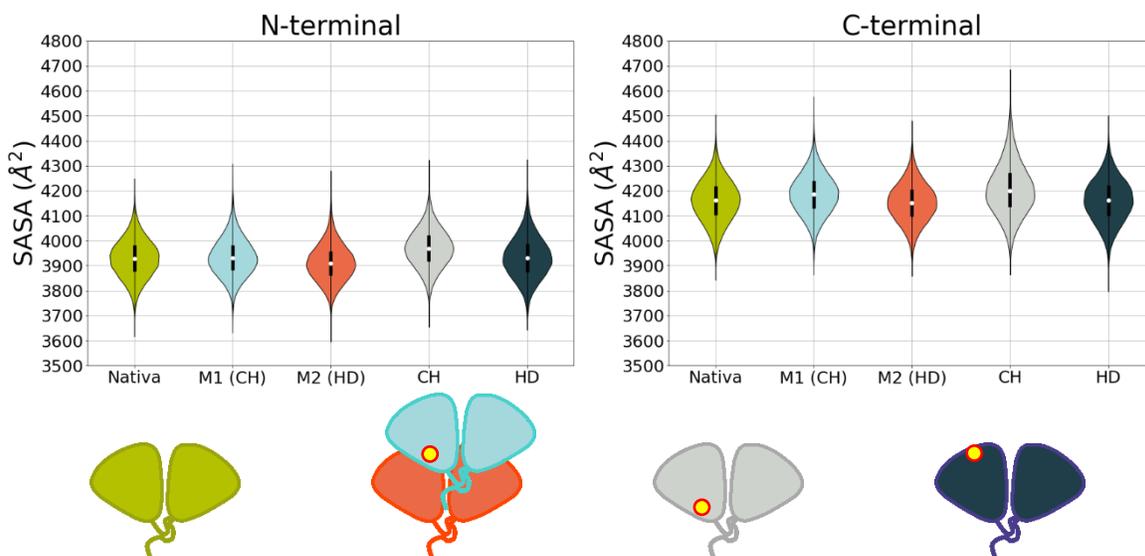


Figura 8.19. Gráfico de violín de la superficie accesible al solvente para el dominio N-terminal (izquierda) y C-terminal (derecha) de cada uno de los monómeros del dímero **CHHD**. M1(CH) corresponde al monómero 1 de **CHHD** con el metal unido a C18 y H22; M2(HD) al monómero 2 con el metal unido a H65 y D73; CH corresponde a la simulación **C18, H22**; y HD a **H65, D73**. Abajo, se representan de manera esquemática los sistemas analizados y la posición del metal en el sitio de unión correspondiente.

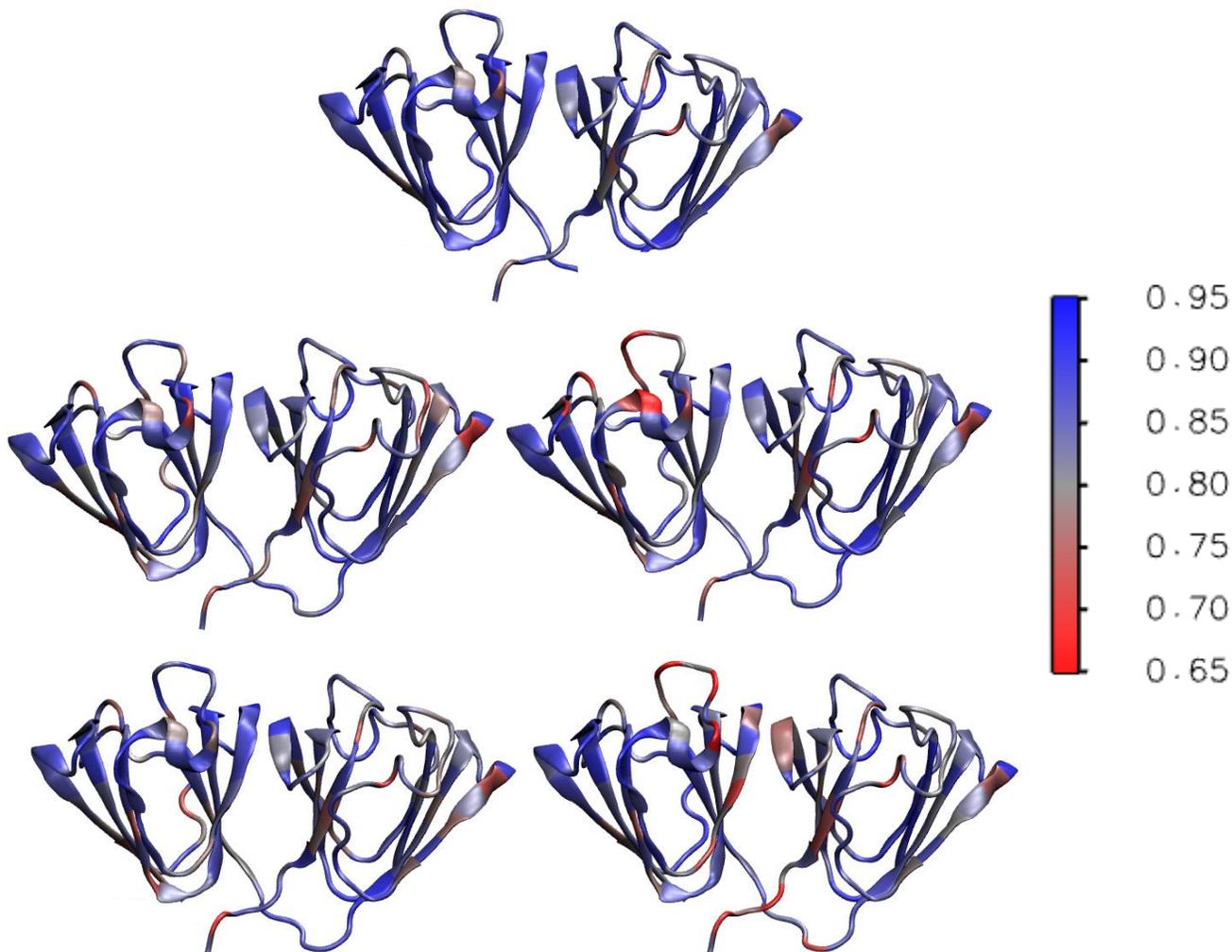


Figura 8.20. Estructura tridimensional de la proteína CRYGD y los cambios en los contactos nativos por residuo para las simulaciones de la proteína nativa (Superior), los monómeros que conforman a CHHD: M1 con el metal unido en C18, H22 (Intermedia izquierda); M2 con el metal unido a H65, D73 (Intermedia derecha) y sus correspondientes homólogos sin dimerizar unidos a Zn: **C18, H22** (Inferior izquierda); **H65, D73** (Inferior derecha). La escala de colores se ubica a la derecha de las estructuras.

Tabla 8.3. Radios atómicos y cargas parciales obtenidos con MCPB.py para el ion zinc y los átomos que se le unen para la simulación del dímero CHHD.

| Átomo | Carga parcial | Radio LJ | Radio GB |
|-------------------|---------------|----------|----------|
| Zn | 0.5333 | 1.3950 | 1.5000 |
| Monómero 1 | | | |
| SG (C18) | -0.6792 | 2.0000 | 1.8000 |
| ND1 (H22) | -0.1233 | 1.8240 | 1.5500 |
| Monómero 2 | | | |
| NE2 (H65) | -0.0514 | 1.8240 | 1.5500 |
| OD2 (D73) | -0.2949 | 1.6612 | 1.5000 |

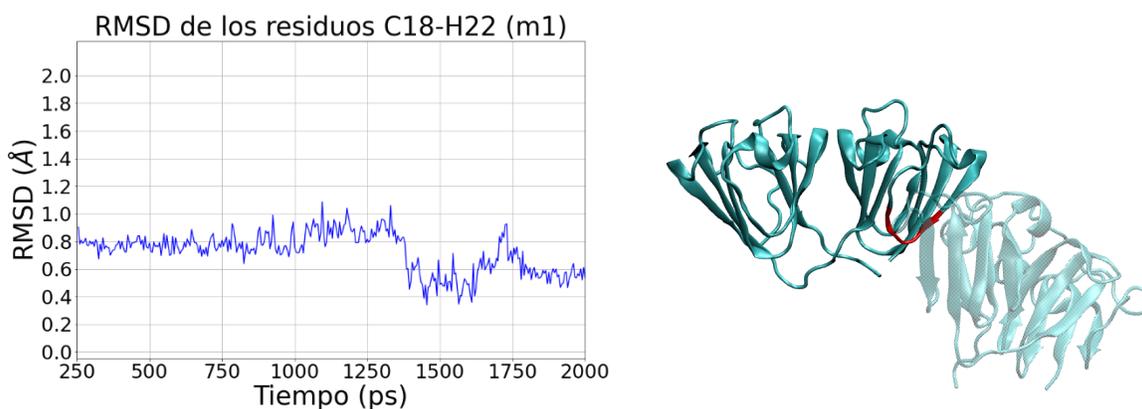


Figura 8.21. Derecha: RMSD de todos los átomos de los residuos C18 a H22 del monómero 1 (con el Zn unido a **C18**, **H22**) de la simulación QM/MM del dímero **CHCS** (los primeros 250 ps fueron omitidos debido a que el sistema aún se encontraba en fase de equilibrio). Izquierda: Estructura tridimensional del monómero 1 del dímero **CHCS** (el monómero 2 se encuentra transparentado para mayor claridad) con los aminoácidos para los cuales se calculó su RMSD marcados en rojo.

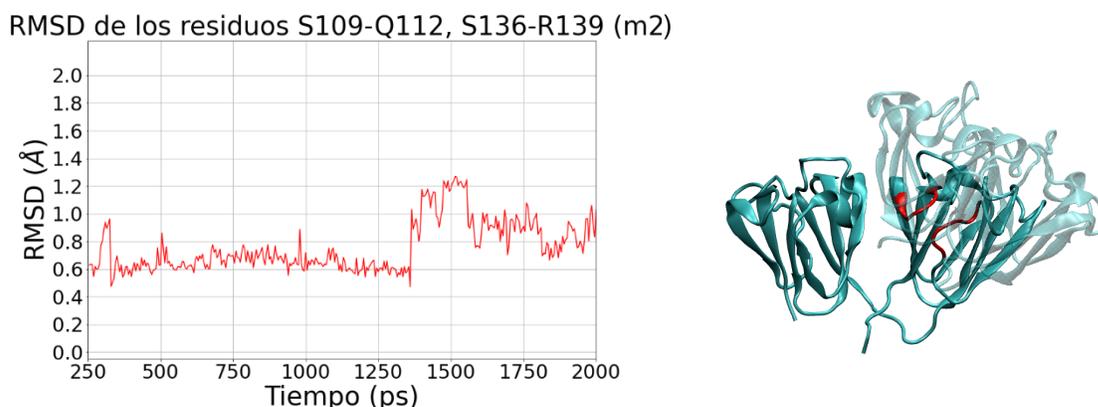


Figura 8.22. Derecha: RMSD de todos los átomos de los residuos S109 a Q112 y S136 a R139 del monómero 2 (con el Zn unido a **C110**, **S136**) de la simulación QM/MM del dímero **CHCS** (los primeros 250 ps fueron omitidos debido a que el sistema aún se encontraba en fase de equilibrio). Izquierda: Estructura tridimensional del monómero 2 del dímero **CHCS** (el monómero 1 se encuentra transparentado para mayor claridad) con los aminoácidos para los cuales se calculó su RMSD marcados en rojo.

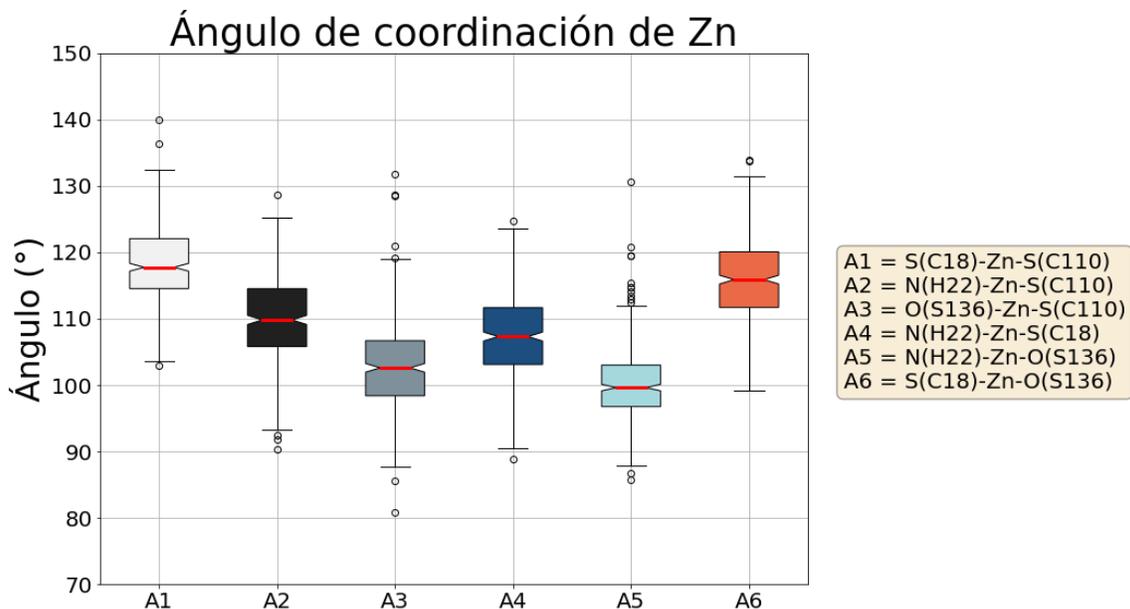


Figura 8.23. Gráfico de caja de la variación en los ángulos de coordinación entre los aminoácidos del sitio de unión y el ion metálico durante la simulación QM/MM del dímero **CHCS**.

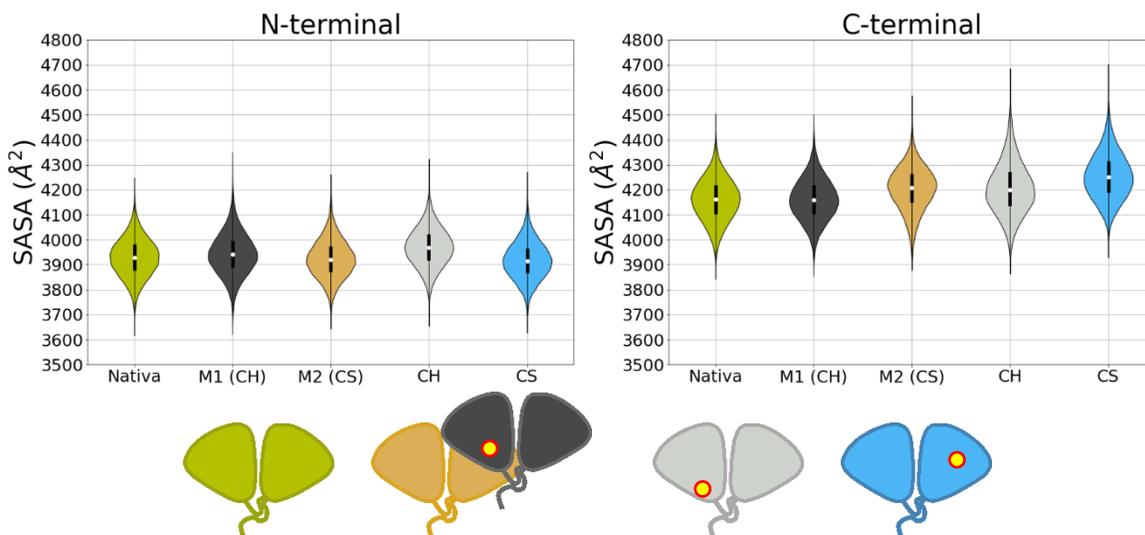


Figura 8.24. Gráfico de violín de la superficie accesible al solvente para el dominio N-terminal (izquierda) y C-terminal (derecha) de cada uno de los monómeros del dímero **CHCS**. M1(CH) corresponde al monómero 1 de **CHCS** con el metal unido a C18 y H22; M2(CS) al monómero 2 con el metal unido a C110 y S136; CH corresponde a la simulación **C18, H22**; y CS a **C110, S136**. Abajo, se representan de manera esquemática los sistemas analizados y la posición del metal en el sitio de unión correspondiente.

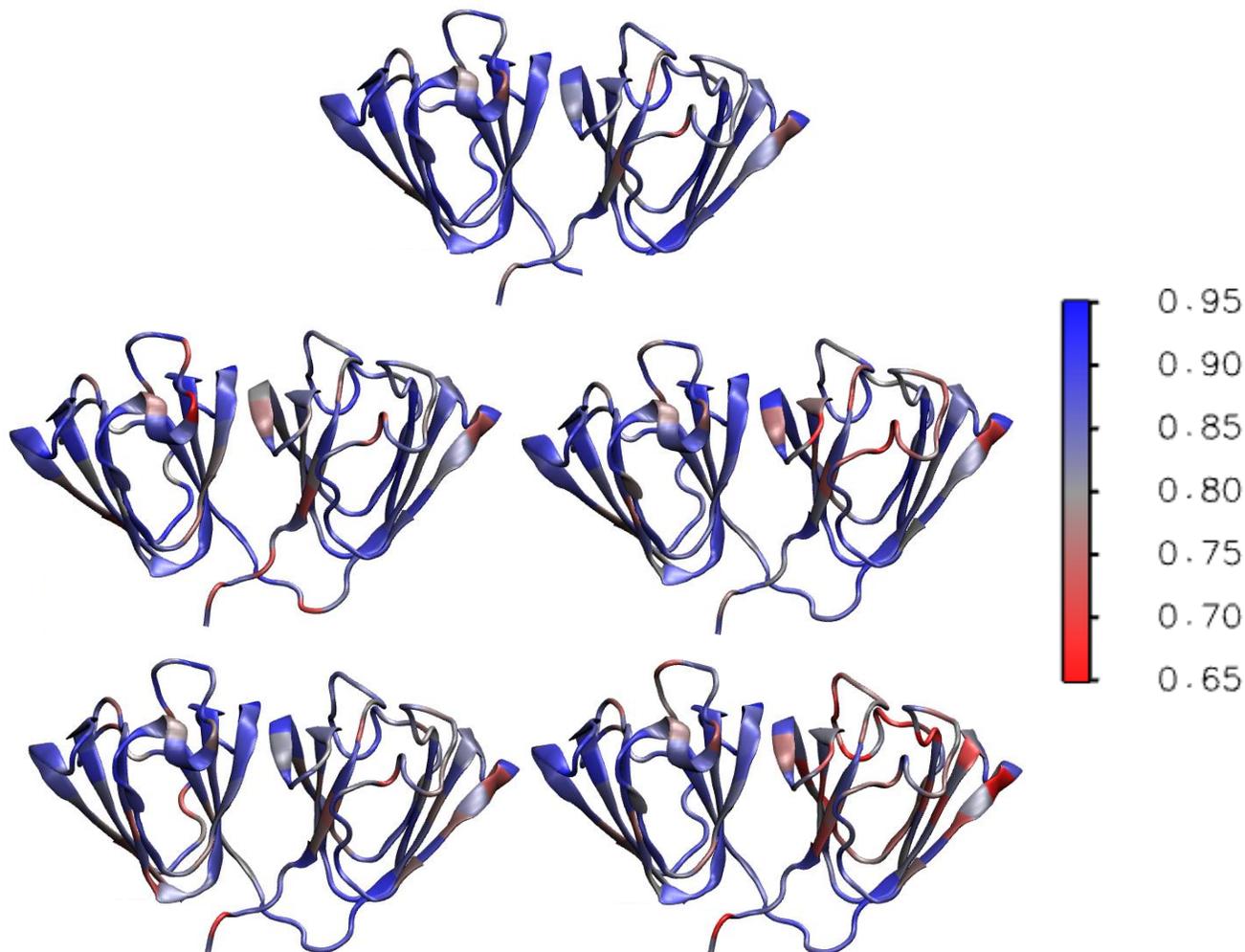


Figura 8.25. Estructura tridimensional de la proteína CRYGD y los cambios en los contactos nativos por residuo para las simulaciones de la proteína nativa (Superior), los monómeros que conforman a CHCS: M1 con el metal unido en C18, H22 (Intermedia izquierda); M2 con el metal unido a C110, S136 (Intermedia derecha) y sus correspondientes homólogos sin dimerizar unidos a Zn: **C18, H22** (Inferior izquierda); **C110, S136** (Inferior derecha). La escala de colores se ubica a la derecha de las estructuras.

Tabla 8.4. Radios atómicos y cargas parciales obtenidos con MCPB.py para el ion zinc y los átomos que se le unen para la simulación del dímero CHCS.

| Átomo | Carga parcial | Radio LJ | Radio GB |
|-------------------|---------------|----------|----------|
| Zn | 0.1941 | 1.3950 | 1.5000 |
| Monómero 1 | | | |
| SG (C18) | 0.1234 | 2.0000 | 1.8000 |
| ND1 (H22) | 0.0332 | 1.8240 | 1.5500 |
| Monómero 2 | | | |
| SG (C110) | -0.6888 | 2.0000 | 1.8000 |
| OG (S136) | -0.5458 | 1.7210 | 1.5000 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| 1.1. Alteración de la vista ocasionada por cataratas. Modificada de [5] | 1 |
| 1.2. Derecha: Estructura tridimensional de la proteína CRYGD (PDB ID: 1hk0), determinada a 1.25 Angstroms de resolución. En color morado se resalta el dominio N-terminal; en verde el dominio C-terminal; en dorado la cavidad hidrofóbica y en azul la región interdominio. | 2 |
| 1.3. Representación esquemática del proceso de desplegamiento de CRYGD a través de intermediarios de conformación abierta. Modificada de [18]. | 3 |
| 1.4. Geometría de coordinación tetraédrica (izquierda) y octaédrica (derecha) para el zinc. Para mayor simplicidad, los ligandos se representan únicamente como moléculas de agua. Los ángulos ideales se marcan en rojo. | 4 |
| 1.5. Representación esquemática del inicio del proceso de agregación de CRYGD al interactuar con Zn(II). El metal se une al sitio de unión C18, H22 (marcado en amarillo) del monómero 1 (izquierda) e interacciona con un sitio de unión desconocido (marcado esquemáticamente en rojo) ubicado en el monómero 2 (derecha). La interacción resulta en la formación de un dímero unido por puente metálico. El sitio C18, H22 del monómero 2 se encuentra disponible para coordinarse con otro ion de Zn(II), permitiendo la unión de otro monómero y formando un agregado multimérico. | 5 |
| 1.6. Parámetros geométricos analizados en BioMetAll. A. Parámetros analizados para el enlace entre el metal y la cadena lateral: Ma corresponde a la distancia entre la sonda metálica y $C\alpha$; $M\beta$ corresponde a la distancia entre el metal y el $C\beta$; y $Ma\beta$ corresponde al ángulo formado entre la sonda metálica, $C\alpha$ y $C\beta$. B. Parámetros analizados para el enlace entre metal y cadena principal a través de C-terminal: MO corresponde a la distancia entre el metal y el oxígeno del carbonilo de C-terminal; y MOC corresponde al ángulo formado entre la sonda metálica, el oxígeno del carbonilo y el carbono de C-terminal. Imagen obtenida de [26]. | 6 |
| 1.7. Esquema representativo del esquema QM/MM. En magenta se representan los átomos y moléculas que se encuentran en la región QM y serán descritos con mecánica cuántica y en azul se representan los átomos y moléculas que serán descritos con mecánica molecular. Imagen obtenida de [27]. | 7 |
| 4.1. Distribución y vista general de los seis sitios seleccionados de unión a zinc en una representación tridimensional de la proteína cristalina gamma-D. | 27 |
| 4.2. Conformación inicial (izquierda) y Conformación final (derecha) de la simulación QM/MM para el sitio de unión C18, H22 . Puede observarse el mantenimiento del sitio de unión con una geometría similar a la tetraédrica a lo largo de la simulación. Se observa que la cadena lateral de la histidina se expone ligeramente más al solvente, sin embargo, no se observan cambios conformacionales importantes. | 28 |
| 4.3. Conformación inicial (izquierda) y Conformación final (derecha) de la simulación QM/MM para el sitio de unión C110, D113 . Se puede observar la transición a un sitio con coordinación tetraédrica que se mantiene estable a lo largo de la simulación. También, se observan ligeros cambios conformacionales en el asa donde se encuentra D113, dándole características más similares a las de una hélice. | 29 |
| 4.4. Conformación inicial (izquierda) y Conformación final (derecha) de la simulación QM/MM para el sitio de unión C110, S136 . Se puede observar la desprotonación de la cadena lateral de S136 y la protonación de su N-terminal. La geometría similar a la tetraédrica se mantiene estable a lo largo de la simulación. | 29 |
| 4.5. Conformación inicial (izquierda) y Conformación final (derecha) de la simulación QM/MM para el sitio de unión H65, D73 . Se observan ligeros cambios conformacionales especialmente en el asa donde se encuentra H65, dándole características más similares a las de una hélice. | 30 |
| 4.6. Conformación inicial (izquierda) y Conformación final (derecha) de la simulación QM/MM para el sitio de unión H83, D171 . Se observan ligeros cambios conformacionales en las asas que unen elementos de hebra- β en el dominio N-terminal. | 31 |

| | |
|---|----|
| 4.7. Conformación inicial (izquierda) y Conformación final (derecha) de la simulación QM/MM para el sitio de unión C18, C78 . Se puede observar el mantenimiento de un sitio de unión donde el número de coordinación es 3 y los ángulos entre los átomos coordinantes son más similares a un sitio con geometría octaédrica. | 31 |
| 4.8. Gráfica de la energía de unión en el vacío para los sitios elegidos calculada a través de una optimización de estructura (azul) y con energía SP (verde). Se observa que para todos los sitios la energía de unión calculada con SP es mayor. | 32 |
| 4.9. Gráfica de las energías SP de unión para los sitios con dos aminoácidos cargados negativamente (amarillo) y los sitios con un aminoácido cargado negativamente (morado). Se observa que, al realizar dicha modificación, las diferencias de energía entre cada sitio se reducen drásticamente. | 33 |
| 5.1. Representación esquemática de los sistemas monoméricos a estudiar en la presente sección. Cada sistema se representa de un color diferente para una mayor claridad, con la posición aproximada del metal denotada con un círculo amarillo. De izquierda a derecha: CRYGD nativa (sin unión a metal); CRYGD con el metal unido al sitio 1 (C18, H22); CRYGD con el metal unido al sitio 2 (C110, D113); CRYGD con el metal unido al sitio 3 (C110, S136); CRYGD con el metal unido al sitio 4 (H65, D73); CRYGD con el metal unido al sitio 5 (H83, D171)..... | 26 |
| 5.2. Izquierda: Gráfica de estructura secundaria de la proteína CRYGD lo largo de la simulación de 500 ns del sitio C18, H22 . Derecha: Hebra- β compuesta por los residuos S20, D21 y H22 formada durante la simulación de 500 ns del sitio C18, H22 y sus interacciones con los aminoácidos C78 y L80 pertenecientes a una hebra- β cercana. | 27 |
| 5.3. Gráfica de estructura secundaria de la proteína CRYGD lo largo de la simulación de 500 ns del sitio C110, D113 | 28 |
| 5.4. Gráfica de estructura secundaria de la proteína CRYGD a lo largo de la simulación de 500 ns del sitio C110, S136 | 28 |
| 5.5. Gráfica de estructura secundaria de la proteína CRYGD a lo largo de la simulación de 500 ns del sitio H65, D73 | 29 |
| 5.6. Gráfica de estructura secundaria de la proteína CRYGD a lo largo de la simulación de 500 ns del sitio H83, D171 | 30 |
| 5.7. Gráfica de diferencia de estructura secundaria de la proteína CRYGD a lo largo de las simulaciones de 500 ns. A la derecha, se representan de manera esquemática los sistemas analizados y la posición del metal en el sitio de unión correspondiente. | 31 |
| 5.8. Gráfico de SASA por residuo del dominio N-terminal con un acercamiento a la región de interés (Donde se encuentra W42, resaltada con un rectángulo gris claro). | 32 |
| 5.9. Gráfico de SASA por residuo del dominio C-terminal con un acercamiento a la región de interés (Donde se encuentra W130, resaltada con un rectángulo gris claro). | 33 |
| 5.10. Gráfico de violín de la fracción de contactos nativos para el dominio N-terminal a lo largo de todas las simulaciones de 500 ns. Abajo, se representan de manera esquemática los sistemas analizados y la posición del metal en el sitio de unión correspondiente..... | 34 |
| 5.11. Gráfico de violín de la fracción de contactos nativos para el dominio C-terminal a lo largo de todas las simulaciones de 500 ns. Abajo, se representan de manera esquemática los sistemas analizados y la posición del metal en el sitio de unión correspondiente..... | 35 |
| 6.1. Esquema representativo de los dímeros formados y la posición aproximada del metal en cada uno de los sistemas. De izquierda a derecha: Dímero CHCD (C18, H22 + C110, D113); Dímero CHHD (C18, H22 + H65, D73); Dímero CHCS (C18, H22 + C110, S136). | 38 |
| 6.2. Derecha: Representación del dímero CHCD , donde M1 se representa en color azul y M2 se representa en color rojo. Izquierda: Representación de los aminoácidos que coordinan al metal en el dímero CHCD (C18 y H22 en M1; y C110 y D113 en M2). Se muestran las distancias de coordinación obtenidas en la conformación final de la simulación SMD..... | 39 |
| 6.3. Gráfica de diferencia de estructura secundaria del monómero 1 (en medio) y del monómero 2 (abajo) a lo largo de la simulación de 500 ns del dímero CHCD | 40 |
| 6.4. Gráfico de SASA por residuo de los dominios N- y C-terminal (izquierda y derecha, respectivamente) con un acercamiento a las regiones de interés (en las cuales se encuentran W42 y W130, resaltadas con un rectángulo gris claro) de la simulación del dímero CHCD | 41 |

6.5. Gráfico de violín de la fracción de contactos nativos para el dominio N-terminal de cada uno de los monómeros del dímero **CHCD** (denotados con M1 y M2 más el sitio de unión correspondiente entre paréntesis) a lo largo de la simulación de 500 ns. A manera de comparación, se graficaron la simulación sin metal (extrema izquierda) y las simulaciones con el metal unido a los sitios de unión que conforman **CHCD**, pero sin dimerizar (extrema derecha). Abajo, se representan de manera esquemática los sistemas analizados y la posición del metal en el sitio de unión correspondiente. 42

6.6. Gráfico de violín de la fracción de contactos nativos para el dominio C-terminal de cada uno de los monómeros del dímero **CHCD** (denotados con M1 y M2 más el sitio de unión correspondiente entre paréntesis) a lo largo de la simulación de 500 ns. A manera de comparación, se graficaron la simulación sin metal (extrema izquierda) y las simulaciones con el metal unido a los sitios de unión que conforman **CHCD**, pero sin dimerizar (extrema derecha). Abajo, se representan de manera esquemática los sistemas analizados y la posición del metal en el sitio de unión correspondiente. 43

6.7. Derecha: Representación del dímero **CHHD**, donde M1 se representa en color azul y M2 se representa en color naranja. Izquierda: Representación de los aminoácidos que coordinan al metal en el dímero **CHHD** (C18 y H22 en M1; y H65 y D73 en M2). Se muestran las distancias de coordinación obtenidas en la conformación final de la simulación SMD..... 44

6.8. Gráfica de diferencia de estructura secundaria del monómero 1 (en medio) y del monómero 2 (abajo) a lo largo de la simulación de 500 ns del dímero **CHHD**. 45

6.9. Gráfico de SASA por residuo de los dominios N- y C-terminal (izquierda y derecha, respectivamente) con un acercamiento a las regiones de interés (en las cuales se encuentran W42 y W130, resaltadas con un rectángulo gris claro) de la simulación del dímero **CHHD**. 46

6.10. Gráfico de violín de la fracción de contactos nativos para el dominio N-terminal de cada uno de los monómeros del dímero **CHHD** (denotados con M1 y M2 más el sitio de unión correspondiente entre paréntesis) a lo largo de la simulación de 500 ns. A manera de comparación, se graficaron la simulación sin metal (extrema izquierda) y las simulaciones con el metal unido a los sitios de unión que conforman **CHHD**, pero sin dimerizar (extrema derecha). Abajo, se representan de manera esquemática los sistemas analizados y la posición del metal en el sitio de unión correspondiente. 47

6.11. Gráfico de violín de la fracción de contactos nativos para el dominio C-terminal de cada uno de los monómeros del dímero **CHHD** (denotados con M1 y M2 más el sitio de unión correspondiente entre paréntesis) a lo largo de la simulación de 500 ns. A manera de comparación, se graficaron la simulación sin metal (extrema izquierda) y las simulaciones con el metal unido a los sitios de unión que conforman **CHHD**, pero sin dimerizar (extrema derecha). Abajo, se representan de manera esquemática los sistemas analizados y la posición del metal en el sitio de unión correspondiente. 48

6.12. Derecha: Representación del dímero **CHCS**, donde M1 se representa en color plata y M2 se representa en color dorado. Izquierda: Representación de los aminoácidos que coordinan al metal en el dímero **CHCS** (C18 y H22 en M1; y C110 y S136 en M2). Se muestran las distancias de coordinación obtenidas en la conformación final de la simulación SMD..... 49

6.13. Gráfica de diferencia de estructura secundaria del monómero 1 (en medio) y del monómero 2 (abajo) a lo largo de la simulación de 500 ns del dímero **CHCS**. 50

6.14. Gráfico de SASA por residuo de los dominios N- y C-terminal (izquierda y derecha, respectivamente) con un acercamiento a las regiones de interés (en las cuales se encuentran W42 y W130, resaltadas con un rectángulo gris claro) de la simulación del dímero **CHCS**. 51

6.15. Gráfico de violín de la fracción de contactos nativos para el dominio N-terminal de cada uno de los monómeros del dímero **CHCS** (denotados con M1 y M2 más el sitio de unión correspondiente entre paréntesis) a lo largo de la simulación de 500 ns. A manera de comparación, se graficaron la simulación sin metal (extrema izquierda) y las simulaciones con el metal unido a los sitios de unión que conforman **CHCS**, pero sin dimerizar (extrema derecha). Abajo, se representan de manera esquemática los sistemas analizados y la posición del metal en el sitio de unión correspondiente. 52

6.16. Gráfico de violín de la fracción de contactos nativos para el dominio C-terminal de cada uno de los monómeros del dímero **CHCS** (denotados con M1 y M2 más el sitio de unión correspondiente entre paréntesis) a lo largo de la simulación de 500 ns. A manera de comparación, se graficaron la simulación sin metal (extrema izquierda) y las simulaciones con el metal unido a los sitios de unión

que conforman **CHCS**, pero sin dimerizar (extrema derecha). Abajo, se representan de manera esquemática los sistemas analizados y la posición del metal en el sitio de unión correspondiente. 53

8.1. Derecha: RMSD de todos los átomos de los residuos C18 a H22 de la simulación QM/MM del sitio de unión **C18, H22** (los primeros 250 ps fueron omitidos debido a que el sistema aún se encontraba en fase de equilibrio). Izquierda: Estructura tridimensional de CRYGD con los aminoácidos para los cuales se calculó su RMSD marcados en rojo. 65

8.2. Derecha: RMSD de todos los átomos de los residuos C110 a D113 de la simulación QM/MM del sitio de unión **C110, D113** (los primeros 250 ps fueron omitidos debido a que el sistema aún se encontraba en fase de equilibrio). Izquierda: Estructura tridimensional de CRYGD con los aminoácidos para los cuales se calculó su RMSD marcados en rojo. 65

8.3. Derecha: RMSD de todos los átomos de los residuos C18 a H22 y V75 a L80 de la simulación QM/MM del sitio de unión **C18, C78** (los primeros 250 ps fueron omitidos debido a que el sistema aún se encontraba en fase de equilibrio). Izquierda: Estructura tridimensional de CRYGD con los aminoácidos para los cuales se calculó su RMSD marcados en rojo. 66

8.4. Derecha: RMSD de todos los átomos de los residuos S109 a Q112 y S136 a R139 de la simulación QM/MM del sitio de unión **C110, S136** (los primeros 250 ps fueron omitidos debido a que el sistema aún se encontraba en fase de equilibrio). Izquierda: Estructura tridimensional de CRYGD con los aminoácidos para los cuales se calculó su RMSD marcados en rojo. 66

8.5. Derecha: RMSD de todos los átomos de los residuos H65 a W68 y G70 a V75 de la simulación QM/MM del sitio de unión **H65, D73** (los primeros 500 ps fueron omitidos debido a que el sistema aún se encontraba en fase de equilibrio). Izquierda: Estructura tridimensional de CRYGD con los aminoácidos para los cuales se calculó su RMSD marcados en rojo. 66

8.6. Derecha: RMSD de todos los átomos de los residuos I81 a G85 y V169 a D171 de la simulación QM/MM del sitio de unión **H83, D171** (los primeros 250 ps fueron omitidos debido a que el sistema aún se encontraba en fase de equilibrio). Izquierda: Estructura tridimensional de CRYGD con los aminoácidos para los cuales se calculó su RMSD marcados en rojo. 67

8.7. Gráfico de caja de la variación en los ángulos de coordinación entre los aminoácidos del sitio de unión y el ion metálico durante las simulaciones QM/MM. Derecha: Simulación del sitio **C18, H22**. Centro: Simulación **C18, C78**. Izquierda: Simulación **C110, D113**. 67

8.8. Gráfico de caja de la variación en los ángulos de coordinación entre los aminoácidos del sitio de unión y el ion metálico durante las simulaciones QM/MM. Derecha: Simulación del sitio **C110, S136**. Centro: Simulación **H65, D73**. Izquierda: Simulación **H83, D171**. 68

8.9. Gráfico de violín de la superficie accesible al solvente para el dominio N-terminal (izquierda) y C-terminal (derecha) a largo de las simulaciones de 500 ns. CH corresponde a la simulación **C18, H22**; CD a **C110, D113**; CS a **C110, S136**; HD1 a **H65, D73**; y **H83, D171**. Abajo, se representan de manera esquemática los sistemas analizados y la posición del metal en el sitio de unión correspondiente. 68

8.10. Estructura tridimensional de la proteína CRYGD y los cambios en los contactos nativos por residuo para las simulaciones de la proteína nativa (Superior izquierda) y los monómeros unidos a Zn: **C18, H22** (Superior derecha); **C110, D113** (Intermedia izquierda); **C110, S136** (Intermedia derecha); **H65, D73** (Inferior izquierda) y **H83, D171** (Inferior derecha). La escala de colores se ubica a la derecha de las estructuras. 69

8.11. Derecha: RMSD de todos los átomos de los residuos C18 a H22 del monómero 1 (con el Zn unido a **C18, H22**) de la simulación QM/MM del dímero **CHCD** (los primeros 250 ps fueron omitidos debido a que el sistema aún se encontraba en fase de equilibrio). Izquierda: Estructura tridimensional del monómero 1 del dímero **CHCD** (el monómero 2 se encuentra transparentado para mayor claridad) con los aminoácidos para los cuales se calculó su RMSD marcados en rojo. 70

8.12. Derecha: RMSD de todos los átomos de los residuos C110 a D113 del monómero 2 (con el Zn unido a **C110, D113**) de la simulación QM/MM del dímero **CHCD** (los primeros 250 ps fueron omitidos debido a que el sistema aún se encontraba en fase de equilibrio). Izquierda: Estructura tridimensional del monómero 2 del dímero **CHCD** (el monómero 1 se encuentra transparentado para mayor claridad) con los aminoácidos para los cuales se calculó su RMSD marcados en rojo. 71

| | |
|--|----|
| 8.13. Gráfico de caja de la variación en los ángulos de coordinación entre los aminoácidos del sitio de unión y el ion metálico durante la simulación QM/MM del dímero CHCD | 71 |
| 8.14. Gráfico de violín de la superficie accesible al solvente para el dominio N-terminal (izquierda) y C-terminal (derecha) de cada uno de los monómeros del dímero CHCD . M1(CH) corresponde al monómero 1 de CHCD con el metal unido a C18 y H22; M2(CD) al monómero 2 con el metal unido a C110 y D113; CH corresponde a la simulación C18, H22 ; y CD a C110, D113 . Abajo, se representan de manera esquemática los sistemas analizados y la posición del metal en el sitio de unión correspondiente. | 72 |
| 8.15. Estructura tridimensional de la proteína CRYGD y los cambios en los contactos nativos por residuo para las simulaciones de la proteína nativa (Superior), los monómeros que conforman a CHCD: M1 con el metal unido en C18, H22 (Intermedia izquierda); M2 con el metal unido a C110, D113 (Intermedia derecha) y sus correspondientes homólogos sin dimerizar unidos a Zn: C18, H22 (Inferior izquierda); C110, D113 (Inferior derecha). La escala de colores se ubica a la derecha de las estructuras. | 73 |
| 8.16. Derecha: RMSD de todos los átomos de los residuos C18 a H22 del monómero 1 (con el Zn unido a C18, H22) de la simulación QM/MM del dímero CHHD (los primeros 250 ps fueron omitidos debido a que el sistema aún se encontraba en fase de equilibrio). Izquierda: Estructura tridimensional del monómero 1 del dímero CHHD (el monómero 2 se encuentra transparentado para mayor claridad) con los aminoácidos para los cuales se calculó su RMSD marcados en rojo. | 74 |
| 8.17. Derecha: RMSD de todos los átomos de los residuos H65 a W68 y G70 a V75 del monómero 2 (con el Zn unido a H65, D73) de la simulación QM/MM del dímero CHHD (los primeros 250 ps fueron omitidos debido a que el sistema aún se encontraba en fase de equilibrio). Izquierda: Estructura tridimensional del monómero 2 del dímero CHHD (el monómero 1 se encuentra transparentado para mayor claridad) con los aminoácidos para los cuales se calculó su RMSD marcados en rojo. | 74 |
| 8.18. Gráfico de caja de la variación en los ángulos de coordinación entre los aminoácidos del sitio de unión y el ion metálico durante la simulación QM/MM del dímero CHHD | 75 |
| 8.19. Gráfico de violín de la superficie accesible al solvente para el dominio N-terminal (izquierda) y C-terminal (derecha) de cada uno de los monómeros del dímero CHHD . M1(CH) corresponde al monómero 1 de CHHD con el metal unido a C18 y H22; M2(HD) al monómero 2 con el metal unido a H65 y D73; CH corresponde a la simulación C18, H22 ; y HD a H65, D73 . Abajo, se representan de manera esquemática los sistemas analizados y la posición del metal en el sitio de unión correspondiente. | 75 |
| 8.20. Estructura tridimensional de la proteína CRYGD y los cambios en los contactos nativos por residuo para las simulaciones de la proteína nativa (Superior), los monómeros que conforman a CHHD: M1 con el metal unido en C18, H22 (Intermedia izquierda); M2 con el metal unido a H65, D73 (Intermedia derecha) y sus correspondientes homólogos sin dimerizar unidos a Zn: C18, H22 (Inferior izquierda); H65, D73 (Inferior derecha). La escala de colores se ubica a la derecha de las estructuras. | 76 |
| 8.21. Derecha: RMSD de todos los átomos de los residuos C18 a H22 del monómero 1 (con el Zn unido a C18, H22) de la simulación QM/MM del dímero CHCS (los primeros 250 ps fueron omitidos debido a que el sistema aún se encontraba en fase de equilibrio). Izquierda: Estructura tridimensional del monómero 1 del dímero CHCS (el monómero 2 se encuentra transparentado para mayor claridad) con los aminoácidos para los cuales se calculó su RMSD marcados en rojo. | 77 |
|) | 77 |
| 8.22. Derecha: RMSD de todos los átomos de los residuos S109 a Q112 y S136 a R139 del monómero 2 (con el Zn unido a C110, S136) de la simulación QM/MM del dímero CHCS (los primeros 250 ps fueron omitidos debido a que el sistema aún se encontraba en fase de equilibrio). Izquierda: Estructura tridimensional del monómero 2 del dímero CHCS (el monómero 1 se encuentra transparentado para mayor claridad) con los aminoácidos para los cuales se calculó su RMSD marcados en rojo. | 77 |
| 8.23. Gráfico de caja de la variación en los ángulos de coordinación entre los aminoácidos del sitio de unión y el ion metálico durante la simulación QM/MM del dímero CHCS | 78 |
| 8.24. Gráfico de violín de la superficie accesible al solvente para el dominio N-terminal (izquierda) y C-terminal (derecha) de cada uno de los monómeros del dímero CHCS . M1(CH) corresponde al | |

monómero 1 de **CHCS** con el metal unido a C18 y H22; M2(CS) al monómero 2 con el metal unido a C110 y S136; CH corresponde a la simulación **C18, H22**; y CS a **C110, S136**. Abajo, se representan de manera esquemática los sistemas analizados y la posición del metal en el sitio de unión correspondiente. 78

8.25. Estructura tridimensional de la proteína CRYGD y los cambios en los contactos nativos por residuo para las simulaciones de la proteína nativa (Superior), los monómeros que conforman a CHCS: M1 con el metal unido en C18, H22 (Intermedia izquierda); M2 con el metal unido a C110, S136 (Intermedia derecha) y sus correspondientes homólogos sin dimerizar unidos a Zn: **C18, H22** (Inferior izquierda); **C110, S136** (Inferior derecha). La escala de colores se ubica a la derecha de las estructuras. 79

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| 1.1. Resumen general de los métodos utilizados en cada sección del presente trabajo..... | 10 |
| 4.1. Resultados de BioMetAll para los posibles sitios de unión a metales a CRYGD. El número de repeticiones indica el número de conformaciones (máx. 20) en los que la herramienta detectó el sitio mencionado. La tercera columna indica el número de sondas que BioMetAll logró colocar en dicho sitio y que presentan interacciones con los aminoácidos que lo componen. | 14 |
| 4.2. Resultados de MIB para los posibles sitios de unión a Zn(II) de H γ D. La tercera columna indica el promedio de los scores de cada sitio para cada una de las repeticiones en las que se presentó. .. | 25 |
| 8.1. Radios atómicos y cargas parciales obtenidos con MCPB.py para el ion zinc y los átomos que se le unen para las simulaciones de monómeros de CRYGD. | 70 |
| 8.2. Radios atómicos y cargas parciales obtenidos con MCPB.py para el ion zinc y los átomos que se le unen para la simulación del dímero CHCD..... | 73 |
| 8.3. Radios atómicos y cargas parciales obtenidos con MCPB.py para el ion zinc y los átomos que se le unen para la simulación del dímero CHHD. | 76 |
| 8.4. Radios atómicos y cargas parciales obtenidos con MCPB.py para el ion zinc y los átomos que se le unen para la simulación del dímero CHCS. | 79 |