

## Estudio de la estabilidad del cluster hidrofóbico de la horquilla beta de una proteína utilizando el método Monte Carlo.

A. NICASTRO<sup>1\*</sup>, S. J. SFERCO<sup>1-2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Física, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Paraje El Pozo, 3000 Sante Fe, Argentina.

<sup>2</sup>INTEC (CONICET-UNL), Güemes 3450, 3000 Sante Fe, Argentina.

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

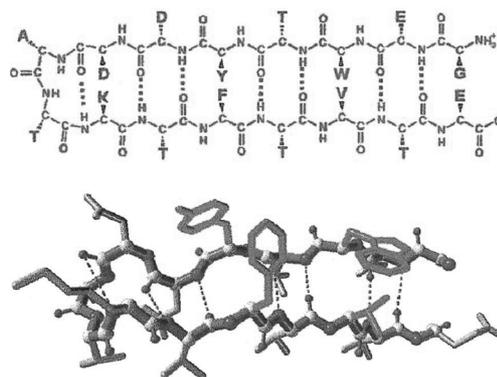
**Resumen:** Se realizaron simulaciones Monte Carlo para estudiar la estabilidad del cluster hidrofóbico y del esqueleto peptídico de una horquilla  $\beta$  ( $\beta$ -hairpin) de la proteína G de *Streptococcus*. El cluster hidrofóbico resultó inestable tanto en vacío como en solvente acuoso mientras que el patrón de enlaces de hidrógeno intracatenarios, analizado solo en vacío pero a diferentes temperaturas, demostró una importante estabilidad. Los resultados de estas simulaciones de desestabilización de la horquilla nativa sugieren que, si se evaluara el proceso de plegamiento de esta estructura, la estabilidad se conseguiría principalmente a través de la formación de los enlaces de hidrógeno intracatenarios, mientras que la formación del cluster hidrofóbico quedaría en un plano complementario respecto al aporte de estabilidad. La mutación de un residuo por otro aún más hidrofóbico aumenta la estabilidad de dicho cluster.

**Summary:** In order to study the hydrophobic cluster and backbone stability of a  $\beta$ -hairpin of the G protein, Monte Carlo simulations were performed. Both in vacuo and explicit solvent the hydrophobic cluster proved to be unstable while the backbone hydrogen bond pattern (analyzed only in vacuo but at different temperatures) showed significant stability. The results of simulations from the native structure suggest that in the folding process of  $\beta$ -hairpin, stability is essentially achieved by formation of the backbone hydrogen bonds while the formation of hydrophobic cluster only contribute in a complementary way to the system stability. The mutation of a cluster residue for another even more hydrophobic increases the stability of the cluster.

### Introducción

Una horquilla beta ( $\beta$ -hairpin) de la proteína G de *Streptococcus* permanece estable en solución luego de ser escindida del resto de la proteína<sup>1,2</sup> (Fig. 1). Normalmente, cuando un segmento de proteína que tiene una estructura secundaria determinada se separa de su polipéptido original y se lo pone en solución, aquel pierde su conformación secundaria nativa. Esta característica poco común que ofrece la  $\beta$ -hairpin de la proteína G ha motivado el estudio de las causas de su estabilidad y de los mecanismos de plegamiento que conducen a esta estructura secundaria.

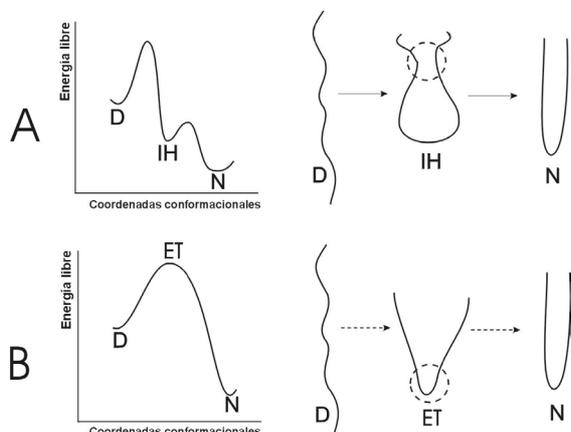
Los resultados experimentales, simulaciones de Monte Carlo y de Dinámica Molecular y modelos termodinámicos estadísticos, proponen distintos mecanismos de plegamiento para la estructura en estudio.



**Figura 1.** Representación química y estructural de la  $\beta$ -hairpin (figura tomada de Muñoz et al (ref. 3)). Está formada por 16 residuos aminoácidos, 4 de los cuales (W43, Y45, F52 y V54) orientan sus cadenas laterales hidrofóbicas hacia arriba del plano de la horquilla, formando un cluster hidrofóbico. Contiene además, siete enlaces de hidrógeno intracatenarios.

\* Autor a quien debe dirigirse la correspondencia.

Algunos resultados sugieren que el primer paso del mecanismo sería la formación del cluster hidrofóbico a través de la formación de un intermediario hidrofóbico (IH), mientras que los enlaces de hidrógeno (enlaces de H) del esqueleto peptídico se formarían en segunda instancia<sup>4,5,6,7</sup> (Fig. 2A).



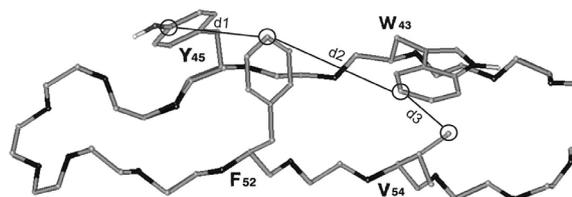
**Figura 2.** Representación esquemática de los dos posibles mecanismos A y B (ver texto). D: estado desnaturalizado. IH: estado intermediario hidrofóbico. N: estado nativo. ET: estado de transición.

En este mecanismo, la bibliografía suele identificar tres interacciones hidrofóbicas netas: Y45 con F52, F52 con W43 y W43 con V54. Otros resultados explican que en un primer momento ocurriría la formación de los enlaces de H del quiebre de la horquilla, a lo que seguiría la formación del resto de los enlaces de H y la estabilización final por formación del cluster hidrofóbico<sup>3</sup>. En este segundo mecanismo no habría intermediarios (Fig. 2B). No hay acuerdo en la literatura sobre cuál de estos dos mecanismos es el dominante. En este trabajo, como aporte teórico a esta cuestión, se estudia cuán estable es el cluster hidrofóbico, a través de simulaciones Monte Carlo.

## Método de cálculo

Se ha considerado el péptido formado por los 16 residuos que se muestra en la figura 1, con el agregado de terminadores Ace y Nme. Se llevaron a cabo simulaciones con el método de Metropolis Monte Carlo (MC) a temperaturas de 300 y 400 K, que se extendieron en  $10^6$

pasos, y se colectaron datos cada  $2 \cdot 10^3$  pasos. Se utilizó el campo de fuerzas AMBER, desarrollado especialmente para proteínas y ácidos nucleicos<sup>8</sup>. Para cada una de las estructuras correspondientes a los últimos 10 datos recolectados, se realizó una optimización de geometría usando el método de gradientes conjugados. Dado que las estructuras optimizadas son muy similares entre sí, se tomó para su evaluación una estructura representativa de cada decena, para cada simulación. Para evaluar el cambio conformacional de la horquilla se realizó un seguimiento de la energía total del sistema, de tres distancias representativas de la separación entre las cadenas laterales hidrofóbicas (Fig. 3), de la conservación de los enlaces de hidrógeno intracatenarios y del RMSD (Root Mean Square Distance), como valor de comparación entre las posiciones atómicas nativas y las posiciones obtenidas luego de la simulación y posterior optimización de geometría.



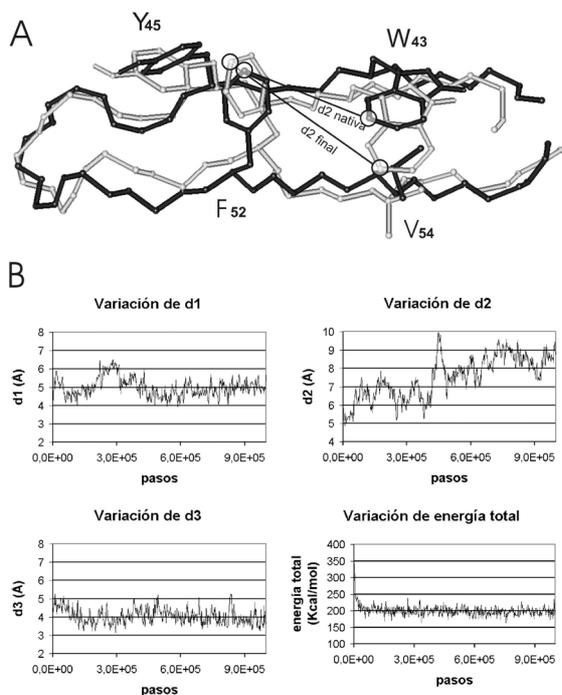
**Figura 3.** Esquema de la horquilla donde se expone las distancias evaluadas: d1, d2 y d3.

## Resultados y discusión

### Simulaciones en vacío

Simulación 1: se permite movilidad a la estructura completa y se ejecuta la simulación a  $T=300$  K. Los resultados se exponen en la figura 4. Luego de un período de equilibración, la energía total queda estabilizada. Se observa un incremento importante de d2 a lo largo de la simulación, mientras que d1 y d3 no muestran cambios significativos. De la figura de superposición, se puede observar que las cadenas laterales de W43 y V54 se desplazaron en la misma dirección, sugiriendo una tendencia al desarme del cluster hidrofóbico, que deja dos cadenas laterales por un lado y dos por otro. Por

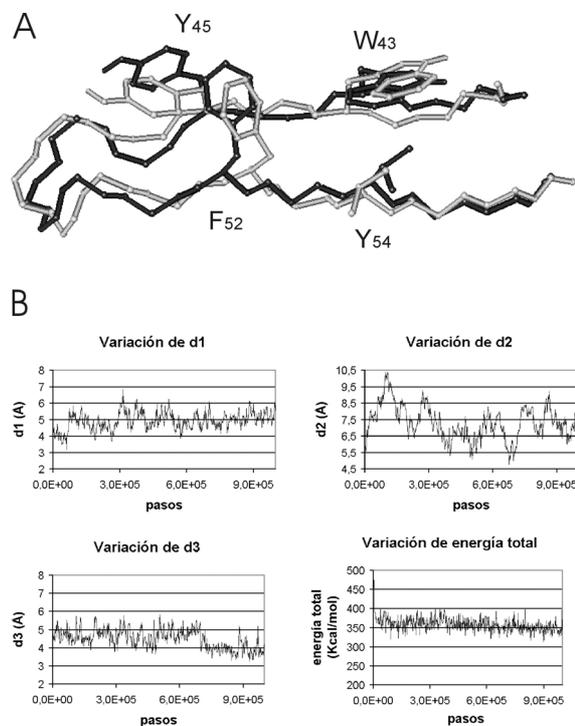
otra parte, el valor RMSD entre todos los átomos del esqueleto peptídico (igual a 1,1 Å) y el patrón de enlaces de H intracatenarios en la estructura final obtenida permiten afirmar que el esqueleto peptídico conserva su estructura original de lámina β. En conclusión, mientras que el cluster hidrofóbico tiende a romperse, la estructura de β-hairpin se conserva.



**Figura 4.** Simulación 1. A.: superposición entre la estructura nativa (negro) y una estructura representativa de los resultados obtenidos (gris), alcanzada luego de la simulación y posterior optimización de geometría. Se señalan las distancias d2 nativa y d2 final. B: gráficas de la variación a lo largo de la simulación MC, de d1, d2, d3 y energía total.

Simulación 2: se permite movilidad a la estructura completa y se ejecuta la simulación a T=400 K. Los resultados se exponen en la figura 5. Luego de un período de equilibración, la energía queda estabilizada. Las distancias d1, d2 y d3 exhiben mayor fluctuación a lo largo de la simulación que la observada a 300 K, sin revelar ninguna tendencia determinada en ningún caso. El esqueleto se muestra estable, con un valor RMSD=1,2 Å y con la conservación de seis de los siete enlaces de H nativos. En conclusión, el cluster hidrofóbico no exhibe cambios conformacionales significativos a pesar de sufrir una gran fluctuación, mientras que el esqueleto conserva su estructura de β-hairpin, al igual que en la simulación anterior. Resulta de

singular importancia el efecto cooperativo que ejercen entre sí los enlaces de H intracatenarios, ya que a una temperatura de 400 K (lejana de la fisiológica para esta proteína) era esperable la desnaturalización de esta estructura.



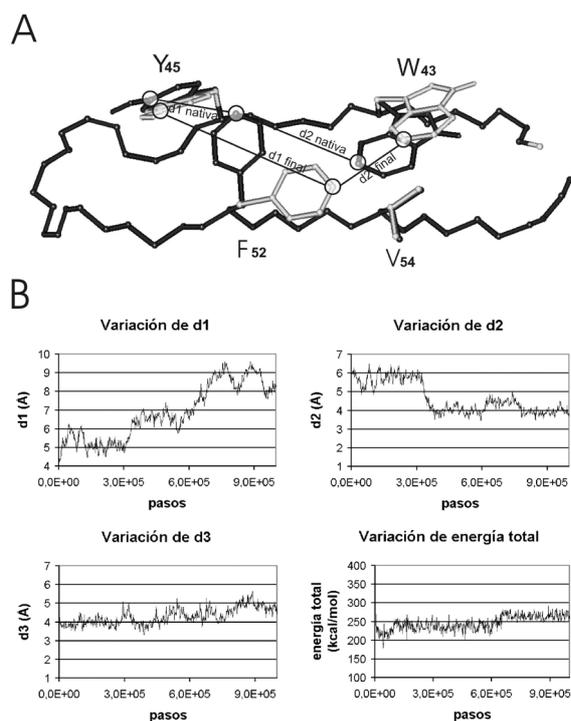
**Figura 5.** Simulación 2. A.: superposición entre la estructura nativa (negro) y una estructura representativa de los resultados obtenidos (gris), alcanzada luego de la simulación y posterior optimización de geometría. B: gráficas de la variación a lo largo de la simulación MC, de d1, d2, d3 y energía total.

### Simulaciones en solvente acuoso

Para estas simulaciones se construyó un modelo que consta de una semiesfera de 180 moléculas de agua, cuya base es paralela al plano de la horquilla, y baña completamente a las cadenas laterales del cluster hidrofóbico. La configuración espacial para las moléculas explícitas de agua fue tomada del modelo TIP3P<sup>9</sup>.

Simulación 3: se permitió movilidad a lo largo de la simulación, a las cadenas laterales que forman el cluster y a las 60 moléculas de agua más cercanas a estos grupos. El resto del sistema (las moléculas de agua exteriores, el esqueleto peptídico y las otras cadenas laterales) se dejó fijo, ya que se quiere focalizar el estudio

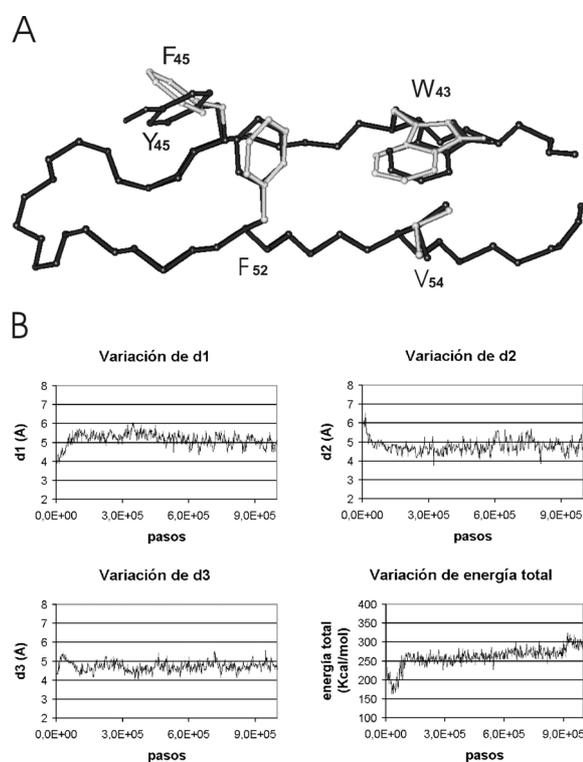
sobre la estabilidad del cluster hidrofóbico, además de permitir que el problema sea computacionalmente manejable. Una justificación parcial para dejar fijo el esqueleto es que las simulaciones en vacío nos mostraron, a través de los pequeños valores de RMSD, que el esqueleto peptídico variaba muy poco con la temperatura. Los resultados se exponen en la figura 6. La energía total parece quedar estabilizada desde la segunda mitad de la simulación en adelante. Se observa una variación muy importante en la posición de la cadena lateral de F52, dando lugar a cambios significativos en d1 y d2. La cadena lateral de Y45 parece quedar excluida del cluster de cadenas laterales hidrofóbicas; de hecho esta cadena lateral es la menos hidrofóbica de las cuatro. En conclusión, el cluster hidrofóbico, aún en presencia de solvente acuoso, parece sufrir una reformulación conformacional, quedando formado por tres de las cuatro cadenas laterales iniciales.



**Figura 6.** Simulación 3. A.: superposición entre la estructura nativa (negro) y una estructura representativa de los resultados obtenidos (gris), alcanzada luego de la simulación y posterior optimización de geometría. Se señalan las distancias d1 y d2, tanto nativas como finales. Para una mejor visualización, el gráfico no muestra las moléculas de agua. B.: gráficas de la variación a lo largo de la simulación MC, de d1, d2, d3 y energía total.

Simulación 4: se construyó un mutante de la  $\beta$ -hairpin, que consistió en el reemplazo del

residuo Y45 por un residuo F (desde ahora, F45). Se permitió movilidad a lo largo de la simulación, a las cadenas laterales que forman el cluster y a las 60 moléculas de agua más cercanas a estos grupos. El resto del sistema permaneció fijo. Los resultados se exponen en la figura 7. La energía total, si bien permanece estable durante la mayor parte de la simulación, se incrementa levemente en el último tramo. No se observan cambios significativos en ninguna de las tres distancias evaluadas. En conclusión, el cluster hidrofóbico parece recobrar la estabilidad inicial, luego de reemplazar Y45 por un residuo de características estructurales similares, pero mucho más hidrofóbico (F45).



**Figura 7.** Simulación 4. A.: superposición entre la estructura nativa (negro) y una estructura representativa de los resultados obtenidos (gris), alcanzada luego de la simulación y posterior optimización de geometría. Para una mejor visualización, el gráfico no muestra las moléculas de agua. B.: gráficas de la variación a lo largo de la simulación MC, de d1, d2, d3 y energía total.

## Conclusiones

En las simulaciones en vacío, tanto a 300 como a 400 K, se observa una manifiesta estabilidad del esqueleto peptídico, de los enlaces de H

intracatenarios y, por consiguiente, de la estructura de horquilla  $\beta$ . La estabilidad del cluster hidrofóbico en vacío cambia dependiendo de la temperatura de la simulación. Este resultado era esperable ya que en ausencia de agua no habría motivos para esperar su conservación en la conformación nativa.

En las simulaciones en solvente acuoso explícito, el cluster nativo se manifiesta inestable. Al realizar una mutación que aumenta su hidrofobicidad el cluster aumenta su estabilidad. Nuestros resultados sugieren que los enlaces de H intracatenarios son más difíciles de romper que el cluster hidrofóbico mismo. Los resultados de las simulaciones en vacío y en solvente acuoso permiten pensar que, si se estudiara el proceso de plegamiento de la horquilla (es decir, el proceso inverso al de estas simulaciones), la barrera energética más importante a superar la constituiría la formación de los enlaces de hidrógeno de la zona de quiebre y no la formación de un intermediario hidrofóbico (IH), apoyando así los resultados obtenidos en la referencia 3.

Por otra parte, la mayor estabilidad del cluster conseguida a través de una mutación que aumenta su hidrofobicidad, y a que la mutación realizada es evolutivamente probable<sup>10</sup>, sugieren que este cambio de residuos podría ocurrir sin pérdida de estructura nativa y quizá tampoco de la función biológica de la horquilla.

## Agradecimientos

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

## Bibliografía

1. Blanco, F.G. et al, J. Am. Chem. Soc. **115**, 5887-5888 (1993).
2. Blanco, F.G.; Rivas, G.; Serrano, L., Nature Struct. Biol. **1**, 584-590 (1994).
3. Muñoz, V.; Henry, E.R.; Hofrichter, J; Eaton, W.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**, 5872-5879 (1998).
4. García, A.E.; Sanbonmatsu, K.Y., PROTEINS: Structure, Functions, and Genetics **42**, 345-354 (2001).
5. Dinner, A.R.; Lazaridis, T.; Karplus, M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**, 9068-9073 (1999).
6. Zagrovic, B.; Sorin, E.J.; Pande, V., J. Mol. Biol. **313**, 151-169 (2001).
7. Pande, V.J.; Rokhsar, D.S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**, 9062-9067 (1999).
8. Cornell, W.D.; Cieplak, P.; Bayly, C.I.; Gould, I.R.; Merz, K.M.; Ferguson, D.M.; Spellmeyer, D.C.; Fox, T.; Caldwell, J.W.; Kollman, P.A., J. Am. Chem. Soc. **117**, 5179-5197 (1995).
9. Jorgensen, W.L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J.D.; Impey, R.W.; Klein, M.L.. J. Chem. Phys. **79**, 926. (1983).
10. Leach, A. *Molecular Modelling. Principles and Applications*, 2<sup>nd</sup> edition. Prentice Hall, USA 2001.