

**CARACTERIZACION ENERGETICA DE LAS INTERACCIONES DE LA
MIOGLOBINA Y SUS LIGANDOS INORGANICOS -O₂ y CO**

Dr. CARLOS CORREDOR
Decano Facultad de Ciencias

Dr LUIS ALEJANDRO BARRERA
Director Programa de Posgrado

**CARACTERIZACION ENERGETICA DE LAS INTERACCIONES DE
MIOGLOBINA Y SUS LIGANDOS INORGANICOS-O₂ y CO**

Dr. LEONARDO RENE LAREO
DIRECTOR

Dr. JORGE AHUMADA
JURADO

Dr. JAVIER BURGOS
JURADO

Dr. EDGAR REYES
JURADO

**TRABAJO DE GRADO:
CARACTERIZACION ENERGETICA DE LAS INTERACCIONES DE
MIOGLOBINA Y SUS LIGANDOS INORGANICOS-O₂ y CO**

MARIA DEL PILAR TRUJILLO VALDES

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRIA EN BIOLOGIA
Santafé de Bogotá D.C**

**TRABAJO DE GRADO:
CARACTERIZACION ENERGETICA DE LAS INTERACCIONES
MIOGLOBINA Y SUS LIGANDOS INORGANICOS-O₂ y CO**

MARIA DEL PILAR TRUJILLO VALDES

**Trabajo presentado como prerrequisito para obtener el Título de Maestría
en Biología
Director: Dr. LEONARDO LAREO**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRIA EN BIOLOGIA
Santafé de Bogotá D. C**

CARACTERIZACION ENERGETICA DE LAS INTERACCIONES DE MIOGLOBINA Y SUS LIGANDOS INORGANICOS-O₂ y CO

RESUMEN

MARIA DEL PILAR TRUJILLO. Maestría en biología

Director: Dr. LEONARDO LAREO

La mioglobina (Mb) es una hemoproteína monomérica de 16 -18 kDa, cuya función es la de facilitar el almacenamiento y desplazamiento del oxígeno molecular en las células musculares. Los procesos de interacción de hemoproteínas, nativas y mutadas, han mostrado que la afinidad por ligandos como O₂ y CO están reguladas por la naturaleza química de los aminoácidos en las proximidades del grupo hemo.

Los procesos fisicoquímicos y bioquímicos que ocurren en los procesos de interacciones moleculares presentan una gran importancia en la comprensión de las funciones celulares y en general de los sistemas vivos. Por ello se han realizado muchos estudios sobre las interacciones entre macromoléculas, especialmente enzimas con sustratos, receptores-ligandos, en donde por ser ambas macromoléculas pueden haber modificaciones estructurales y ambas aportan energía potencial al proceso.

Un proceso aparentemente más sencillo pero de una complejidad similar a cualquier interacción molecular, lo presenta el caso de una macromolécula y una molécula inorgánica relativamente pequeña. El caso de las hemoproteínas ha sido ampliamente estudiado como modelo teórico y experimental, pero aún no ha sido completamente entendido. (Barker & Ferguson, 1999).

Es por esto, que en este trabajo se pretende caracterizar energéticamente el complejo mioglobina-ligando inorgánico; empleando la teoría de campos de fuerza o mecánica molecular para generar modelos predictivos y explicativos de la capacidad de interacción de esta molécula con diferentes sustratos, así como también, determinar propiedades de los aminoácidos en las mioglobinas con mutaciones simuladas, que puedan regular los cambios en las actividades de nuevas mioglobinas, como otra aproximación a la comprensión de ese tipo de interacciones

El análisis del efecto de los cambios energéticos debidos a las energías de corto alcance (energías de enlace, ángulos y torsión) y entre las energías de largo alcance (energías de no-enlace, o sea la suma de las energías de van der Waals y de los puentes de hidrógeno y la energía electrostática), sobre la actividad de la Mb es explicado con una correlación (R²) de 0,23 y 0,34 para O₂ y CO respectivamente.

Los anteriores valores reflejan una relación multifactorial entre las interacciones estructurales de la molécula y las interacciones de largo y corto alcance con el ligando. Concluyendo la existencia de una dependencia compleja de la constante de afinidad con los cambios de energía potencial de enlace y no enlace debidos a las mutaciones. En este caso la adición de otras variables como volumen, hidrofobicidad, polaridad, flexibilidad, área oculta, además de los valores de energía de los aminoácidos mutados en la mioglobina permitió explicar la interacción con un coeficiente de correlación del 0,95 y 0,74% para O₂ y CO respectivamente. Estos resultados confirman que la interacción de la mioglobina con ligandos como CO y O₂ es: multifactorial, que los factores importantes no son iguales para todos los ligandos, que no se conocen aún, completamente todos los factores que influyen para los dos ligandos.

Los criterios expuestos, las opiniones expresadas y las conclusiones anotadas, son responsabilidad del autor y en ningún caso comprometen a la Pontificia Universidad Javeriana.

*A Dios, a mis padres, hermanos y amigos
Por su paciencia, apoyo y amor en la
Realización de uno de mis más grandes
Sueños.*

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que contribuyeron a llevar a un buen término este trabajo, agradezco muy especialmente.

Al Dr. LEONARDO LAREO, director del proyecto, por la paciencia y dedicación prestada.

A mis Padres y hermanos quienes desde lejos me brindaron una voz de aliento en los momentos más cruciales.

A Orlando, Gerardo , Elpidia y a todos los integrantes del grupo PROTEAM por el apoyo y la constancia que me brindaron en todo momento.

Al Laboratorio de Bioquímica Molecular computacional quienes ofrecieron las instrumentos necesarias para finalizar este trabajo.

A la Pontificia Universidad Javeriana por darme la oportunidad una vez más de superarme como persona y profesional.

1 INTRODUCCIÓN

La mioglobina (Mb) es una hemoproteína monomérica de 16 -18 kDa, cuya función es la de facilitar el almacenamiento y desplazamiento del oxígeno molecular en las células musculares.

La Mb posee una alta afinidad por el oxígeno y una baja tasa de autooxidación en su forma férrica inactiva (Fe^{+2}), lo que le permite desarrollar adecuadamente su función. (Antoni & Brunori, 1971).

Los procesos de interacción de hemoproteínas, nativas y mutadas, han mostrado que la afinidad por los ligandos y la autooxidación están reguladas por la naturaleza química de los aminoácidos en las proximidades del grupo hemo.

Para obtener una mejor comprensión de las propiedades funcionales asociadas a las estructuras moleculares de las mioglobinas nativas y mutadas y hemoglobina, sus estructuras han sido determinadas experimentalmente por cristalografía de rayos X.

Recientemente los estudios de mutagénesis dirigida han permitido la exploración sistemática y detallada del papel fisiológico de los residuos individuales. (Olson y col.,1988; Ormos y col., 1988; Carver y col., 1990; 1994; Li y col., 1994)

Los procesos fisicoquímicos y bioquímicos que ocurren en los procesos de interacciones moleculares presentan una gran importancia en la comprensión de las funciones celulares y en general de los sistemas vivos. Por ello se han realizado muchos estudios sobre las interacciones entre macromoléculas, especialmente enzimas con sustratos, receptores-ligandos, en donde por ser

ambas macromoléculas pueden haber modificaciones estructurales y ambas aportan energía potencial al proceso. En procesos aparentemente más sencillos pero de una complejidad similar a cualquier interacción molecular, lo presenta el caso de una macromolécula y una molécula inorgánica relativamente pequeña. El caso de las hemoproteínas ha sido ampliamente estudiado como modelo teórico y experimental, pero aún no ha sido completamente entendido. (Barker & Ferguson, 1999)

Es por esto, que en este trabajo se pretende caracterizar energéticamente el complejo mioglobina-ligando inorgánico; empleando la teoría de campos de fuerza o mecánica molecular para generar modelos predictivos y explicativos de la capacidad de interacción de esta molécula con diferentes sustratos, como otra aproximación a la comprensión de ese tipo de interacciones.

Se pretende generalizar una posible relación entre los valores de energía potencial calculada de mioglobinas mutadas, nativas y con mutaciones simuladas y sus constantes de afinidad para ligandos como oxígeno y monóxido de carbono, las cuales han sido determinadas experimentalmente.

El empleo de modelos teóricos y computacionales brinda una serie de alternativas que disminuyen el tiempo y el costo del trabajo experimental para determinar las propiedades funcionales de diversas moléculas.

Este caso particular, la mioglobina sirve como modelo, debido a la abundante cantidad de información y estructuras existentes, permitiendo iniciar la comprensión de otros sistemas importantes para los que existe menos información como son los procesos moleculares de nitrificación, el transporte de trazas de minerales en los sistemas enzimáticos, y en los sistemas orgánicos de depuración y eliminación de metales pesados, etc.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Generar un modelo explicativo y predictivo basado en los valores calculados para la energía potencial de la mioglobina, y analizar su relación con las constantes de afinidad por ligandos inorgánicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar el perfil energético de la mioglobina de diferentes organismos, nativa y mutada, al interactuar con diferentes ligandos inorgánicos.
- Comparar los perfiles energéticos de la mioglobina nativa, con y sin ligandos, con los valores energéticos de la mioglobina mutada e interactuando con sus ligandos.
- Comparar el perfil energético de las mioglobinas nativas con los valores obtenidos por mutaciones simuladas.
- Correlacionar los perfiles energéticos de las mioglobinas con mutaciones simuladas con sus respectivas constantes de afinidad determinadas experimentalmente.
- Identificar las propiedades de los aminoácidos mutados que regulan los cambios en las actividades de las nuevas mioglobinas

3 ANTECEDENTES

Debido a la capacidad del grupo hemo de la mioglobina de unirse a diferentes ligandos, y a la importante función fisiológica que desempeña esta molécula a nivel celular, existe una relativa abundancia de información y estructuras determinadas con una alta resolución. Con estos datos se han realizado muchos estudios para determinar el efecto de la sustitución de residuos específicos del bolsillo distal en su grupo hemo, sobre la cinética de unión de ligandos como oxígeno (O₂), monóxido de carbono (CO), cianuro (CN), etc. Estos estudios han aumentado grandemente la comprensión del proceso sin que aún sea completa. (Barker & Ferguson,1999)

La Mb, es la proteína más estudiada dentro del grupo de las globinas transportadoras. (Antoni & Brunori,1971). La mioglobina de ballena fue la primera proteína caracterizada por cristalografía de rayos X en los estudios realizados por Kendrew & Perutz en 1960. (Kendrew,1960).

El comportamiento de la mioglobina sirve como paradigma en aspectos relacionados con estructura, plegamiento, mecánica y dinámica molecular, y unión de ligandos de proteínas globulares. Es por esto que estudios preliminares, han caracterizado la importancia de la parte proteica (apoproteína), removiendo el grupo hemo de la Mb. (Teale,1959). De otra parte el entendimiento de las interacciones de residuos distales y proximales al grupo hemo, ha sido de gran interés. El papel de estos residuos ha contribuido al entendimiento de la naturaleza de unión de los ligandos, siendo

un factor importante que define las funciones bioquímicas de las hemoproteínas (Dawson, 1988).

En la mioglobina y hemoglobina, la quinta posición de coordinación unida al átomo de hierro está ocupada por el grupo imidazol de la histidina proximal en la posición 93, y ligandos exógenos se unen en la sexta posición de coordinación (Dickerson & Geis, 1983).

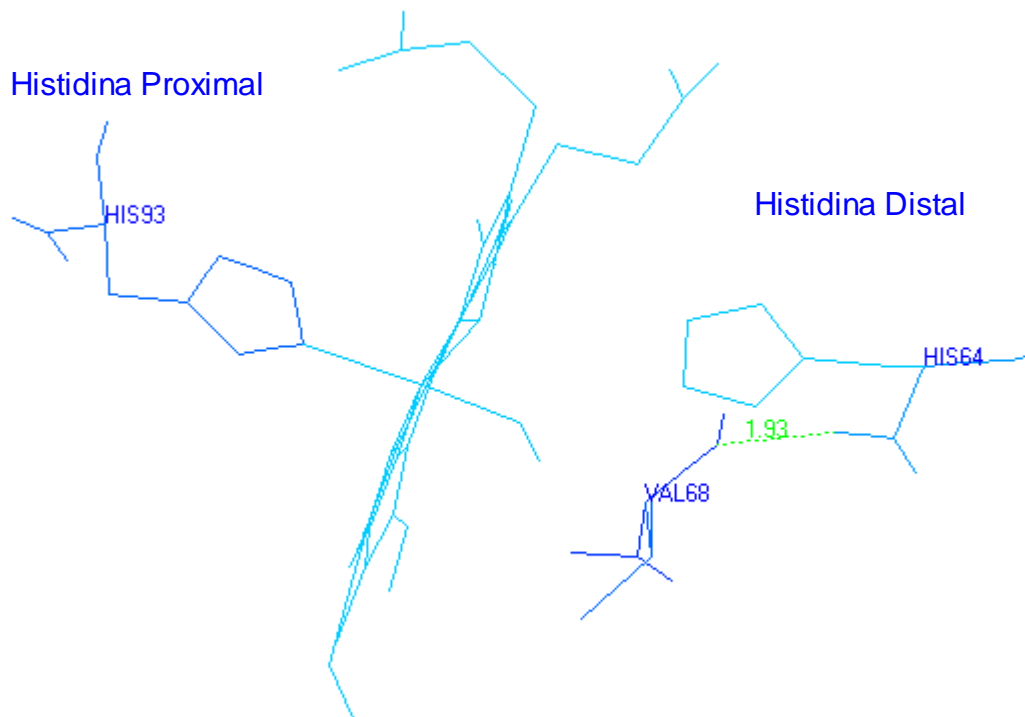


Figura 1. Mioglobina de ballena. Histidina proximal (His⁹³); Histidina distal (His⁶⁴)

La Mb presenta dos residuos altamente conservados en diferentes organismos, la His⁶⁴, presente en la hélice E posición 7 (E7) y la Val⁶⁸, presente en la hélice E, posición 11 (E11) localizados en el bolsillo distal adyacente al sitio de unión de los ligandos.(Figura 1)

Varios experimentos han evaluado cualitativamente la contribución del residuo de la histidina distal His⁶⁴ (E7) mostrando que la cadena lateral de imidazol de este residuo domina la relativa afinidad para CO y O₂.

Se ha determinado que una cara de la cadena lateral del imidazol de la His⁶⁴ se encuentra unido al ligando, y la otra cara da a la superficie de la molécula. (Phillips, 1980 y Rolhfs, 1990)

Esta histidina no está directamente unida al hierro del hemo pero forma un puente de hidrógeno con el oxígeno unido para estabilizar la forma oxi de las globinas (Phillips & Shoenborn 1981; Jewsbury y col., 1995; Jewsbury & Kitawa,1994) . (Figura 2).

También se determinó que la histidina en la posición 64, reduce la afinidad por el monóxido de carbono (CO), colocando la unión del ligando en un plano afuera, perpendicular al grupo hemo, respecto a la unión del oxígeno. (Collman y col.,1976, citado en Rolhfs y col.,1990). Otras investigaciones confirmaron que esta histidina en la Mb de ballena, está ligeramente desplazada por la unión del monóxido de carbono (CO), como se observa en la figura 2. (Johnson, y col.,1989).

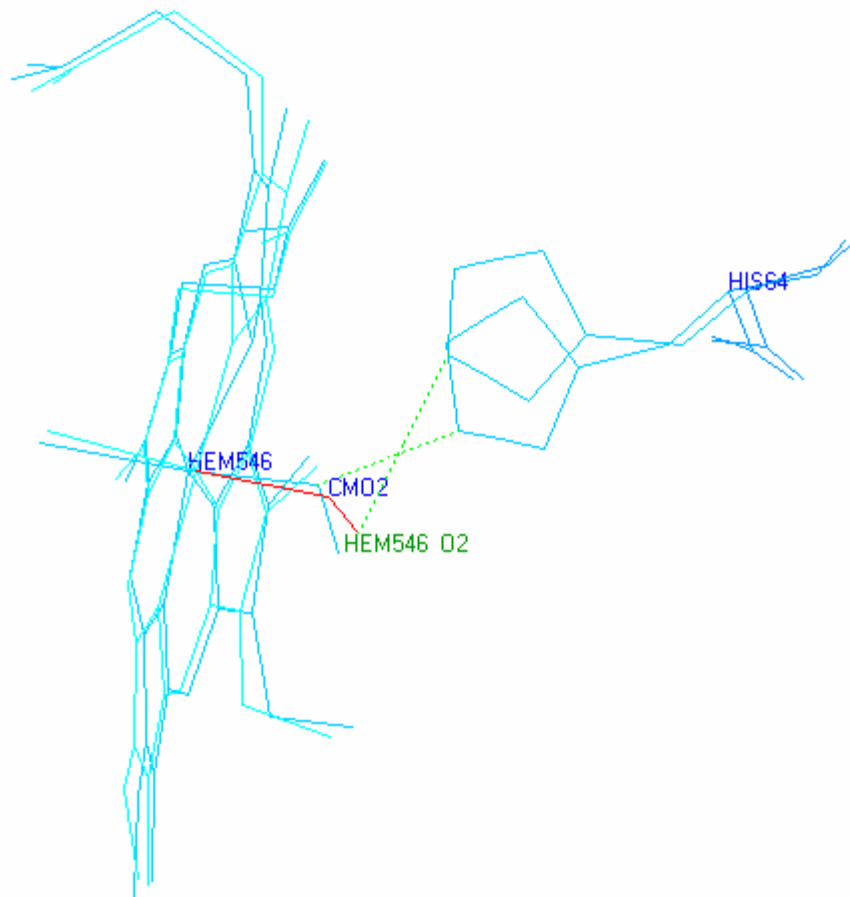


Figura 2. Interacción de la histidina distal en la posición 64

Estudios de dinámica molecular y cristalografía de rayos X sugieren, que la His⁶⁴ actúa como puerta de entrada dentro del bolsillo distal del grupo hemo, para la unión de los ligandos en la Mb. (Case & Karplus, 1979; Kottalam, 1988)

Se ha observado que la His⁶⁴ estabiliza la unión del oxígeno en menos de -1.4 Kcal/mol a través del puente de hidrógeno, y la unión del monóxido de carbono es desestabilizada en +1.0 Kcal/mol, debido a un obstáculo estérico de la His⁶⁴. (Kuriyan y col.,1986). Esto es expresado estructuralmente por la geometría inclinada Fe – C=O y el movimiento de la cadena de imidazol de la histidina distal al átomo de hierro. Así mismo determinaron que la Val⁶⁸ no

dificulta la unión del oxígeno, pero a la vez puede servir para la orientación en la unión del ligando, haciéndolo más eficiente, debido al puente de hidrógeno con la His⁶⁴.

El efecto de la polaridad en la unión de los ligandos ha sido también estudiado, determinando que el complejo Fe-O₂ está facilitado y estabilizado por un ambiente polar, otorgado por la carga negativa parcial sobre los átomos de oxígeno, en contraste con el complejo Fe-C=O, menos afectado por las condiciones del solvente. (Traylor y col.,1985)

Sin embargo, otros sugirieron que no es claro, cómo la polaridad y los efectos exteriores influyen en el ambiente estructural del hemo y/o en la conformación del ligando unido al hierro del grupo hemo en la mioglobina. (Adachi y col.,1989)

El papel fisiológico de la His⁶⁴, en la mioglobina de ballena ha sido muy bien estudiado por otros grupos (Springer y col., 1989; Rolhfs y col., 1990). Estos grupos determinaron el efecto de la cinética de unión del oxígeno y el monóxido de carbono, comparando mioglobinas que poseen diferentes residuos en la posición 64.

Los métodos de escogencia para resolver las contribuciones funcionales de estos residuos, se han basado sobre técnicas de mutagénesis dirigida en estas posiciones. Se construyó un gen sintético de Mb de ballena, el cual fue expresado como una proteína completamente funcional en *E.coli*. (Springer & Sligar,1987). El sistema de expresión de Springer & Sligar fue usado para construir mioglobinas mutantes, sustituyendo la His⁶⁴ por glicina, valina, leucina, metionina, fenilalanina, glutamina, arginina y aspártico. Ellos midieron las tasas de unión para CO y O₂ utilizando la técnica de fotólisis con láser y posteriormente determinaron la dependencia de la constante de afinidad para estos ligandos sobre el tamaño y la polaridad de cada uno de los residuos por los que fue sustituida la His⁶⁴; concluyendo que la constante de afinidad para O₂ muestra una pequeña dependencia sobre el tamaño de

los residuos en la posición 64, así como la sustitución por residuos polares muestra una disminución en la constante de afinidad para O_2 mientras que para la unión de CO, la polaridad causa el efecto contrario aumentado la constante de afinidad para CO (K_{CO}) respecto a la mioglobina nativa.

Otros estudios han realizado el análisis del barrido cinético, sustituyendo la Val⁶⁸ por residuos de cadena lateral más grande como alanina, isoleucina y fenilalanina, determinando también una pequeña dependencia de la constante tanto para CO como para O_2 sobre el tamaño de las cadenas laterales de los residuos. En los dos casos estas sustituciones disminuyeron las constantes de afinidad. (Carver y col., 1990; Springer y col., 1990)

La hidrofobicidad en el bolsillo del grupo hemo también ha sido de gran interés para entender la dinámica de unión de los diferentes ligandos en mioglobina. Algunas mutantes de mioglobina humana han sido preparadas con aminoácidos de menor hidrofobicidad como alanina, glicina, y serina, localizados en la posición 29, (Figura 3) lugar ocupado por la Leu (B10) presente en la hélice B posición 10, mostrando que la unión de ligandos como el O_2 y CO depende de la hidrofobicidad del bolsillo del grupo hemo junto con el volumen de las cadenas laterales de los aminoácidos. (Uchida y col., 1997; Adachi, y col., 1992; Zhao y col., 1995)

Estudios realizados sobre la secuencia de la Mb de elefante han determinado la presencia de una glutamina en la posición 64 comúnmente ocupada por una histidina en todos los demás mamíferos. (Dene y col., 1980) (Figura 3).

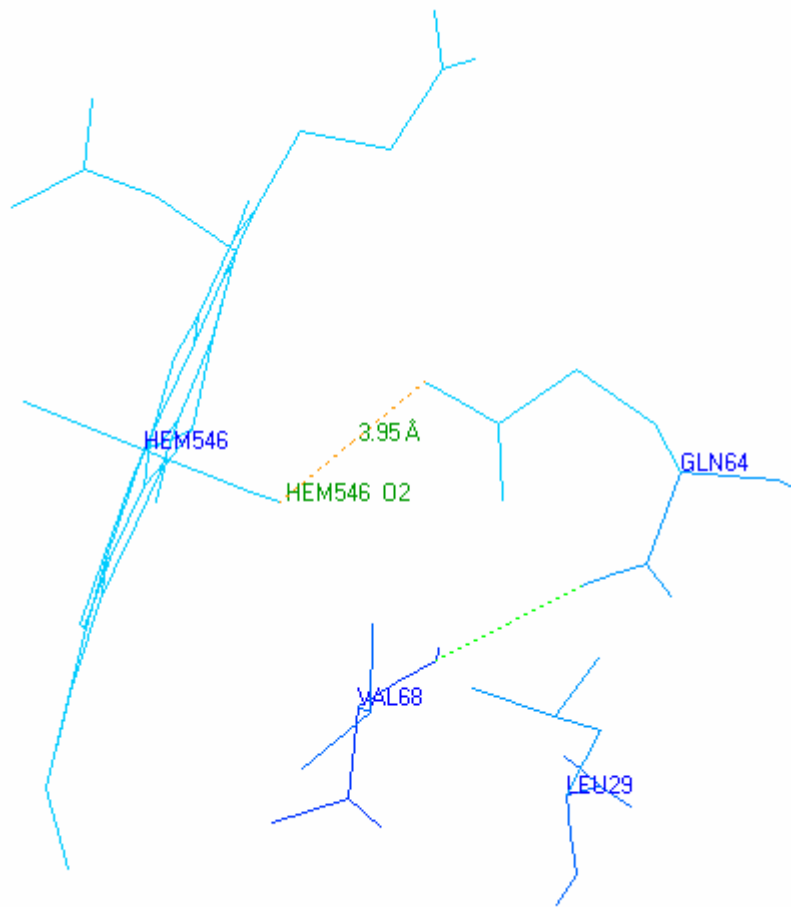


Figura 3. Glutamina en la posición 64 en la Mb de elefante.

La tasas de autooxidación y afinidad para el O₂ de esta mioglobina parece causar un efecto neutral ya que son muy similares a las presentadas por las Mb de ballena, humano y cerdo. (Romero-Herrera y col., 1981 ; Springer y col., 1994). Ellos, concluyeron que en la Mb de elefante, el hidrógeno del N ϵ de la glutamina 64 forma un puente de hidrógeno con el oxígeno unido, el cual es equivalente en longitud al formado con la His⁶⁴ en todas las mioglobinas de mamífero. Sin embargo cuando probaron el efecto de esta mutación en la Mb de ballena , los resultados indicaron que esta sustitución

no es neutral. La mutación H64Q decrece la constante de afinidad para el oxígeno (K_{O_2}) e incrementa la autooxidación. (Springer y col., 1989).

En un intento por comprender por qué la mutación H64Q en Mb de ballena no reproduce las propiedades espectrales y funcionales de la mioglobina de elefante, se realizaron dos aproximaciones: La primera realizada por La Mar y colaboradores, (Yu y col., 1990 ; Vyas y col., 1993; Zhao y col., 1994), quienes a través de estudios de resonancia magnética nuclear (NMR) compararon las mioglobina nativas de ballena y elefante, observando que en la Mb de elefante la cadena lateral de la fenilalanina en la posición 29 presenta un fuerte contacto de van der Waals con el ligando unido respecto a la Mb de ballena nativa. (Figura 4)

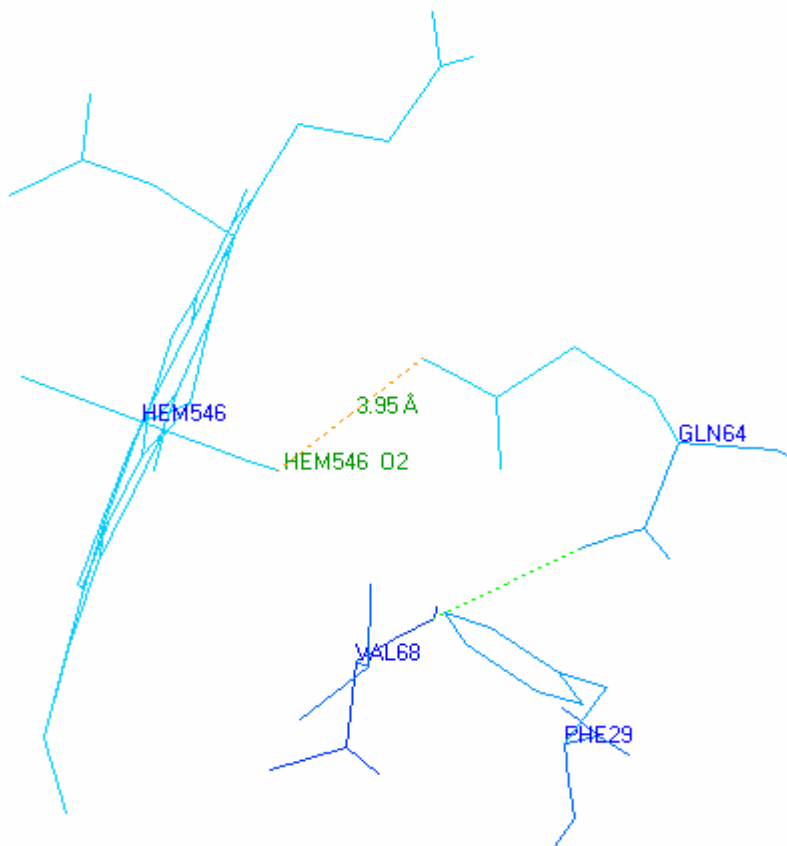


Figura 4. Mutación natural H64Q/L29F en Mb de elefante

Con base en estos resultados y por medio de la técnica de mutagénesis dirigida, otros investigadores, sustituyeron la leucina en la posición 29 por fenilalanina, observando un aumento en la constante de afinidad para el O₂ y disminución en la tasa de autooxidación. (Phillips, y col.,1981; Carver y col., 1992; Springer y col., 1994; Li y col., 1994). A nivel estructural se observó como el C_γ de la cadena lateral de la fenilalanina hace contacto de van der Waals con el ligando. El complejo Fe^{δ (+)} -O-O^{δ (-)} es estabilizado por una interacción electrostática favorable por la parte cargada positivamente del grupo fenil. La cadena lateral de la fenilalanina excluye el agua del bolsillo distal de la forma deoxi de la mutante.

En un esfuerzo por construir un sustituto sanguíneo Olson y colaboradores, (Brantley y col., 1993; Olson, 1994), construyeron una doble mutante en la cual la leucina en la posición 29 fue sustituida por fenilalanina, para inhibir la autooxidación, por la exclusión de la molécula de agua en el sitio activo, y la histidina en la posición 64 fue sustituida por glutamina, para disminuir la afinidad por el O₂ debido al débil enlace de hidrógeno formado con el ligando. También se ha construido, una mutante de mioglobina de ballena en la cual la histidina 64 y la valina 68 están intercambiadas: His⁶⁴ Val y Val⁶⁸ His. Para evaluar este modelo de coordinación y para determinar el efecto de estas mutaciones, utilizaron técnicas de cinética de unión, en donde mostraron que estas sustituciones estabilizan los complejos de unión para CO y NO, mientras que para O₂ presentan una rápida formación de las especies férricas. (Dou y col.,1995).

Estudios anteriores han determinado que la polaridad de la His⁶⁴ en el bolsillo del grupo hemo es dominante en la afinidad relativa tanto para el CO como para el O₂. En la deoximioglobina el N_ε del imidazol estabiliza la unión no covalente con una molécula de agua, mediante un puente de hidrógeno. Esta molécula de agua es desplazada del bolsillo distal por los ligandos diatómicos que pueden acercarse al hierro. Para la unión del O₂, un cambio

en la energía libre no favorable asociada con la pérdida del puente de hidrógeno entre el agua y el imidazol, es compensado por la formación de un puente de hidrógeno fuerte entre especies de imidazol y complejos de Fe - O-O altamente polares. En contraste, la interacción imidazol-Fe-C=O que es mucho menos polar, por lo tanto, no alcanza a compensar el requerimiento para desplazar el agua de la deoximioglobina. (Krzywda y col., 1998)

Estas observaciones sugieren que la introducción de un segundo grupo donador de puente de hidrógeno adyacente al ligando, puede ser otorgado al reemplazar la Val⁶⁸ por una treonina. El efecto permitió ver que la sustitución de la val⁶⁸ incrementa la afinidad por el oxígeno 3 veces y decrece la afinidad por el CO de 4-6 veces. De otra parte se ha sustituido el isopropil de la cadena lateral de la Val⁶⁸ (E11) por la cadena lateral de acetamida de la asparagina, en un segundo esfuerzo por proveer la interacción de un segundo puente de hidrógeno en la posición 68. (Krzywda y col., 1998). (Figura 5). El grupo amino de la asparagina, tiene la capacidad de servir como donador de un segundo puente de hidrógeno. La cadena lateral de este residuo, está orientada con el grupo amino hacia el enlace con el CO, otorgando un campo electrostático positivo adicional adyacente a la unión del ligando con lo cual decrece la unión de este último, y a la vez facilita la unión del O₂.

Todos estos resultados demuestran que la posición de la His⁶⁴ y la Val⁶⁸ en mioglobinas nativas son tan importantes como la naturaleza química de las cadenas laterales que facilitan la unión irreversible del O₂ e inhiben la autooxidación.

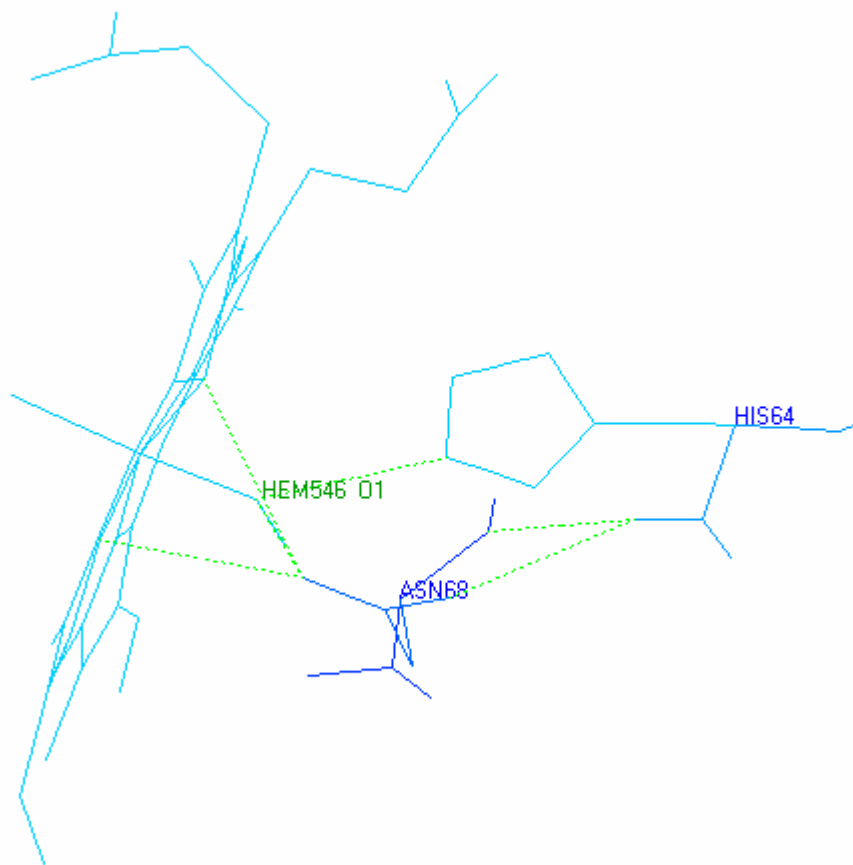


Figura 5. Mioglobina de ballena mutada valina 68 sustituida por asparagina.

Mutantes de mioglobina humana recombinantes, en las cuales la His⁶⁴ (E7) es reemplazada por los residuos de leucina, valina, o glutamina han sido estudiadas para medir el equilibrio de unión de ligandos como azida y cianuro, determinando que la sustitución por leucina y valina exhibe una disminuida afinidad por la azida y una extremadamente baja afinidad por el cianuro. Mientras que la mutación por la glutamina muestra una alta afinidad por la azida y una tasa en la constante de asociación del cianuro similar a la de la proteína nativa.(Saito y col.,1992).

Golberg y colaboradores han mostrado la más alta afinidad por el O₂ en la hemoglobina de *Ascaris suum* (Miele y col.,1999),debido a un puente de hidrógeno adicional entre el ligando y el residuo de tirosina en la posición 29. Esta mutación en la Mb de ballena no reproduce este comportamiento de la misma forma, aunque la afinidad por el O₂ es incrementada por la triple mutación H64Q/L29Y y T67R (Travaglini-Alocatelli y col., 1994). (Figura 6). Estas mutaciones generan una reducción en la tasa de la constante de disociación de O₂ que tiene como efecto la retención de O₂ por más tiempo que las mutantes y nativas analizadas hasta el momento.

Proteínas con estas características (dadas por las mutaciones), pueden ser consideradas como candidatas para la síntesis de un posible sustituto sanguíneo, con el cual se puede crear un aductor (que induce) estable para la autooxidación y una baja reactividad por oxido nítrico (NO) (Miele y col.,1999; Federici y col., 2000)

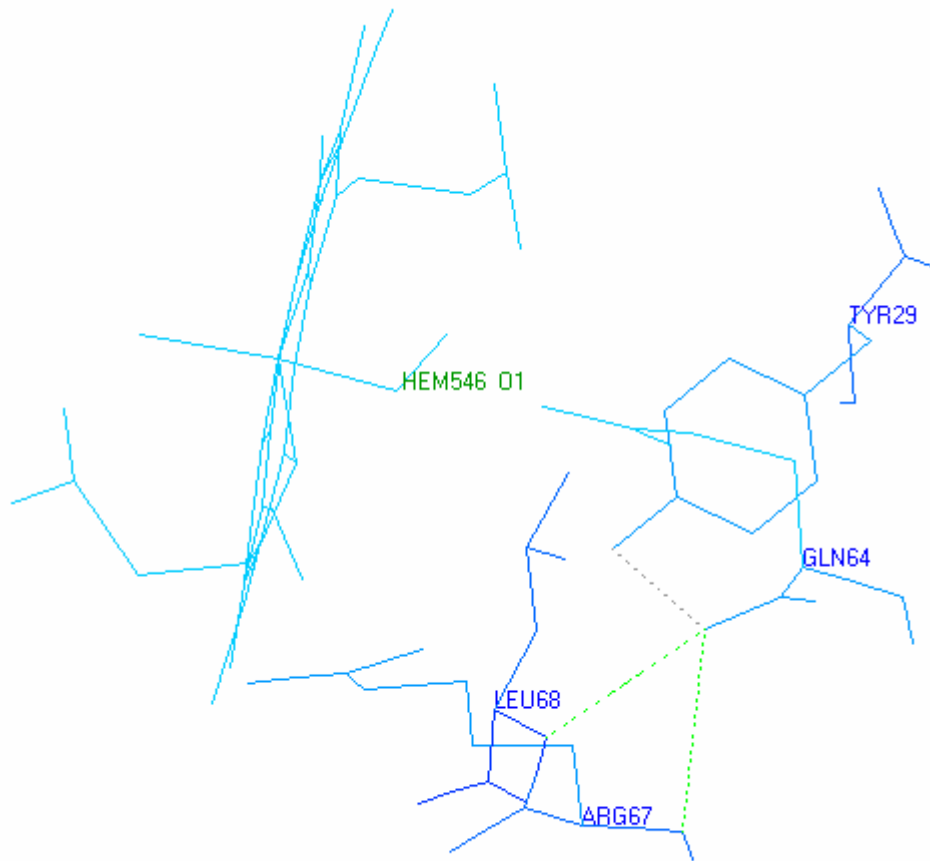


Figura 6. Simulación de las mutaciones de mioglobina de *Ascaris suum*, en mioglobina de ballena.

Este mismo grupo ha realizado últimamente estudios en la mioglobina de *Aplisia limacina*; esta mioglobina del músculo bucal de este molusco presenta una muy limitada secuencia homóloga con otras mioglobinas de mamíferos, mostrando un sólo residuo de histidina, la His⁹³ (F8) denominada histidina proximal. La histidina distal se encuentra reemplazada por un residuo de valina en la posición (E7), y en la posición B10 se encuentra el residuo de arginina.

Estudios de función y estructura en mioglobina y hemoglobina de diferentes organismos y la variación en la construcción de estas han arrojado

importantes datos, debido a la importancia de las propiedades físico-químicas de las cadenas laterales en las posiciones B10, E7, ya que estos residuos son cruciales en la estabilización y discriminación de ligandos gaseosos como O₂ y CO.

4 JUSTIFICACIÓN

A pesar de la existencia de muchos trabajos tendientes a explicar la unión del oxígeno y otros ligandos a la mioglobina y la hemoglobina, los mecanismos de esta interacción aún no están completamente comprendidos desde el punto vista molecular.

Para comprender la dinámica fisiológica de la liberación de oxígeno en la mioglobina, se han realizado estudios biofísicos y bioquímicos con mutaciones puntuales en la molécula que contribuyen a la comprensión del número de elementos estructurales que intervienen en la dinámica y mecánica de reacción.

La comprensión de las interacciones de las macromoléculas con sustratos inorgánicos, usualmente de bajo peso molecular, conllevan la comprensión de una mecánica molecular de aspectos sustancialmente diferentes a las interacciones entre macromoléculas. Esta comprensión permitirá el desarrollo de sustancias diseñadas “de novo” o por hemisíntesis que tengan algunas de sus propiedades y/o funciones incrementadas o disminuidas según sea el interés. La mioglobina es un modelo excelente para esta comprensión pues involucra el más ubicuo de los grupos prostéticos, el grupo hemo, ya que éste interactúa con los elementos fundamentales para la vida como los conocemos.

Los diversos estudios realizados con la Mb, permiten tener acceso a una gran cantidad de información. Existen 509 secuencias de mioglobina reportadas en GenBank (Benson y col., 1998), para las cuales existen 158

con estructura tridimensional determinadas experimentalmente por cristalografía de rayos X y cuyas coordenadas están depositadas en RCSB-PDB. (Bernstein y col.,1977). Existen estructuras para Mb de organismos como ballena, cerdo, caballo, Aplysia, tortuga, elefante y humano, etc.

En este trabajo se empleará la aproximación de campos de fuerza o mecánica molecular para generar modelos predictivos de la capacidad de interacción de esta molécula con diferentes sustratos.

Además el empleo de métodos computacionales permiten reducir el tiempo y costo para comprender este tipo de interacciones.

"La mioglobina ofrece la posibilidad de establecer un puente de unión entre su energía y su comportamiento fisiológico."(Miele y col., 1999)

5 HIPÓTESIS

Es posible relacionar funcionalmente los cambios en la energía potencial del complejo mioglobina-ligando con las constantes de afinidad de las moléculas en estado nativo y mutado.

6 MARCO TEORICO

6.1 MIOGLOBINA

La mioglobina es una hemoproteína monomérica, se encuentra principalmente en los músculos, permite el transporte y almacenamiento intracelular del oxígeno.

La capacidad de la mioglobina para interactuar con el oxígeno depende de la presencia de una unidad no polipeptídica, pero constitutivamente integral a la molécula, denominada grupo hemo. Es este grupo prostético hemo, es el que le confiere a la mioglobina su color rojo característico.

El grupo hemo consta de un anillo de protoporfirina, el cual está formado por cuatro anillos pirrólicos.(Figura 7).

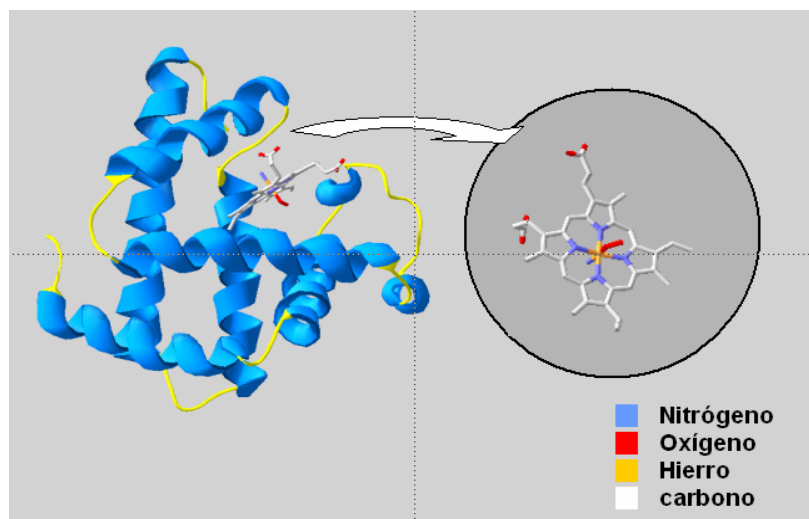


Figura 7. Grupo Hemo de la mioglobina

Estos anillos están unidos por puentes metileno para formar un tetrapirrol. Al anillo tetrapirrónico están enlazados cuatro metilos, dos vinilos y dos cadenas laterales de ácido propiónico. Estos constituyentes pueden estar ubicados espacialmente de quince formas diferentes, pero solamente uno de estos isómeros, el denominado protoporfirina IX, está presente en los sistemas biológicos. Además el grupo hemo presenta un átomo de hierro, dicho átomo de hierro presenta una coordinación octaédrica, es decir, que puede unir seis ligandos. Cuatro de ellos unidos a los nitrógenos en el centro del anillo de protoporfirina. Los otros dos enlaces, se localizan a cada lado del plano del grupo hemo, la quinta y la sexta posición de coordinación.

La quinta interactúa con la His⁹³, denominada histidina proximal, mientras que la sexta posición interactúa con los posibles ligandos. (Figura 8).

Este átomo de hierro del hemo puede presentar varios estados de oxidación: ferroso (Fe^{+2}) o de férrico (Fe^{+3}). Las formas correspondientes, de la mioglobina en estos estados de oxidación se denominan ferromioglobina y ferrimioglobina o metamioglobina, respectivamente. Solamente la ferromioglobina, correspondiente al estado de oxidación Fe^{+2} , puede interactuar con el oxígeno.

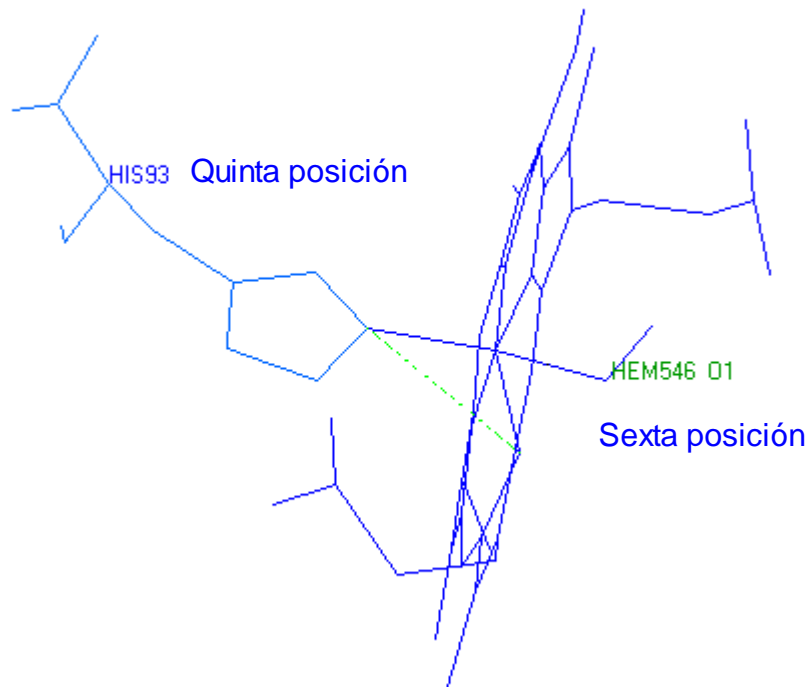


Figura 8. Quinta y sexta posición de coordinación del grupo hemo.

Todas las interacciones conocidas para la Mb están relacionadas con su estructura tridimensional; alrededor del 75% de su cadena principal está plegada en una conformación de hélices alfa (Figura 9). Todas las hélices son dextrógiras. Existen entre ocho y nueve segmentos helicoidales denominados A, B, C, D, E, F, G, H, hasta I. Los residuos de cada hélice se nombran con la letra a la que pertenecen y el número de la posición en la misma, ejemplo: A1, B11, E10, etc. Existen segmentos no helicoidales constitutivos de enrollamientos al azar de diferentes longitudes que unen las regiones helicoidales. (Mathews & van Holde, 1998)

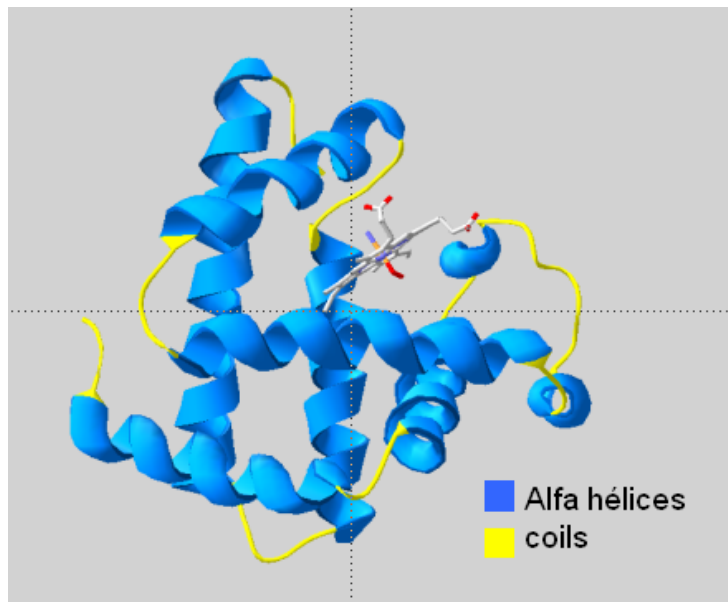


Figura 9. Estructura tridimensional de la mioglobina

La orientación de las hélices, es la conocida, ubicándose hacia el interior los residuos hidrofóbicos, y dejando las zonas expuestas al solvente para ser ocupadas por los residuos polares y/o hidrofóbicos

El interior consiste usualmente de residuos no polares como la leucina, valina, metionina y fenilalanina. Los residuos de glutámico, aspártico, glutamina, asparagina, lisina y arginina están en las zonas accesibles al solvente. Los residuos que tienen a la vez parte polar y no polar, como la treonina, la tirosina y el triptófano, están orientados de tal forma, que sus porciones apolares apunten hacia el interior de la molécula. Los únicos residuos polares, ubicados parcialmente en el interior de la estructura de la mioglobina son las dos histidinas (His⁶⁴ y la His⁹³) que tienen una función crítica en el centro activo.

El grupo hemo queda localizado en una especie de bolsillo en la molécula de mioglobina, (Figura 9), unido en forma no covalente en la hendidura hidrofóbica en la molécula. Desde aquí tiene acceso a interacciones con los residuos esenciales para la función.

Las cadenas altamente polares de propionato del hemo se ubican en la superficie de la molécula. Tanto en la forma desoxigenada de la mioglobina como en la oxigenada, uno de estos lugares está ocupado por el nitrógeno del residuo de histidina número 93 o residuo F8. Esta histidina, que ocupa la quinta posición de coordinación, se denomina proximal, ya que está unida directamente al átomo de hierro.

Al ligando que interactúa en la sexta posición de coordinación se le une a través de un puente de hidrógeno un segundo residuo, la histidina 64 o E7, denominada histidina distal, ya que no está ligada al hierro. (Figura 1).

La Mb es una macromolécula a la que se le conocen 509 secuencias de diferentes organismos aproximadamente, reportadas por el NCBI. Estas secuencias se caracterizan en su mayoría por tener una estructura primaria conservada, similar a la Mb de ballena (Figura 10). Así como también se le conoce su estructura tridimensional por difracción de rayos X hasta una resolución de 2.80 Å

```
1      MGLSDGEWQL VLNWVGKVEA DIPGHGQEV LIRLFKGH PETLEKFDKFKHL KSEDEMKASE
61     DLKKHGATVL TALGGILKKK GHHEAEIKPL AQSHATKHKI PVKYLEFISE CIIQVLQSKH
121    PGDFGADAQG AMNKALELFR KDMASNYKEL GFQGG
```

Figura 10. Secuencia de mioglobina de ballena.

Para las anteriores estructuras se han investigado tres formas fisiológicamente importantes: la carbomonoximioglobina (Mb-CO), la oximioglobina (Mb-O₂) y la metamioglobina (Mb-H₂O). Sus conformaciones parecen ser muy semejantes, excepto en la sexta posición de coordinación. En la carbomonoximioglobina este sitio está ocupado por monóxido de carbono, en la metamioglobina está ocupado por agua; y en la oximioglobina lo ocupa la molécula de O₂.

El eje de la molécula de O_2 enlazada forma un ángulo con el enlace hierro-oxígeno. El átomo de hierro se desplaza hacia el plano del hemo unos 0.2 Å en la oxigenación. Cuando la mioglobina se almacena en contacto con el aire, fuera del ambiente celular, el hierro se oxida lentamente formando lo que se denomina metamioglobina. Cuando se produce esta oxidación, el lugar de unión se inactiva. Parte de la función del componente proteico de la Mb es permitir la unión del oxígeno de forma reversible. Esta molécula proporciona un entorno al hierro (Fe), en los que se permite el primer paso de una reacción de oxidación (la unión del oxígeno) pero se limita el paso final (oxidación irreversible).

De otra parte el monóxido de carbono también se une coordinadamente al átomo de hierro de una manera similar al oxígeno, pero la unión del monóxido de carbono es mucho más fuerte que la del oxígeno.

El monóxido de carbono es tóxico porque se combina con la ferromioglobina y la ferrohemoglobina y de este modo interfiere en el transporte de oxígeno. El grupo hemo tiene, por sí mismo, una elevada afinidad para el CO, mucho menor que en la proteína conjugada (componente proteico con el grupo hemo), esto se debe a cierto ángulo con el enlace Fe-CO de la carbomonoximioglobina. Ya que en los complejos CO-hierro porfirinas de elevada afinidad, los átomos Fe-C=O están en línea recta, este enlace lineal del CO se halla dificultado principalmente por el impedimento estérico de la histidina distal. Por otro lado el eje de la molécula de O_2 forma un ángulo con el enlace Fe-O-O en la oximioglobina. Por consiguiente, la proteína obliga al CO a enlazar en ángulo en vez de línea recta. Este acodamiento debilita la interacción del CO con el hemo de las globinas, al tiempo que favorece al máximo la unión del O_2

6.1.1 Requisitos fisiológicos de la unión oxígeno – mioglobina.

La mioglobina en los tejidos, especialmente en el músculo, acepta oxígeno de la hemoglobina de la sangre arterial circulante. A continuación cede ese oxígeno a los organelos de las células en donde se emplea por las mitocondrias. Por lo tanto la unión de un ligando como el oxígeno depende de su concentración en los alrededores. (Wittenberg & Wittenberg,1989; Wittenberg & Wittenberg,1990)

Para poder hacer un análisis cuantitativo de los requerimientos de oxígeno primero se debe tener en cuenta la forma de medir la concentración de oxígeno disuelto.

Por la ley de Henry (Chang, 1986), se sabe que la concentración de cualquier gas disuelto en un fluido es proporcional a la presión parcial de ese gas sobre el fluido. De esta manera se puede medir la concentración de O_2 disuelto regulando la presión parcial de O_2 sobre la solución de mioglobina que se estudia. Se expresa la concentración de oxígeno en forma de su presión parcial: P_{O_2}

Para estudiar la unión del oxígeno a la mioglobina, debemos disponer de una forma de medir la fracción de las moléculas de mioglobina que transportan oxígeno.

Cuando se oxigena la mioglobina, el espectro de absorción se modifica debido a los desplazamientos electrónicos en el anillo de porfirina: este cambio permite la determinación espectrofotométrica de la fracción de las moléculas de mioglobina que están oxigenadas.

Un gráfico de curva de unión (Figura 11), describe la forma en que la fracción de lugares de la mioglobina que tienen oxígeno unido a ellos, (θ ,) depende de la concentración.(presión arterial de oxígeno libre).

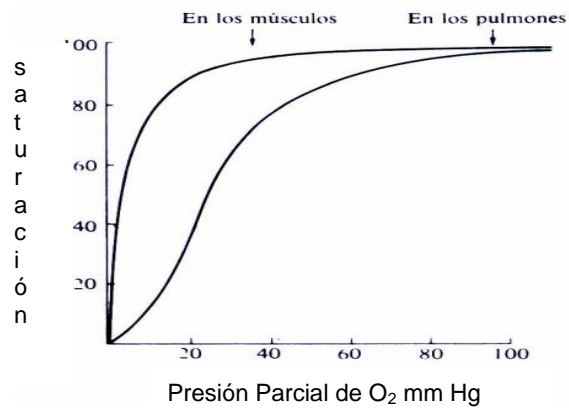
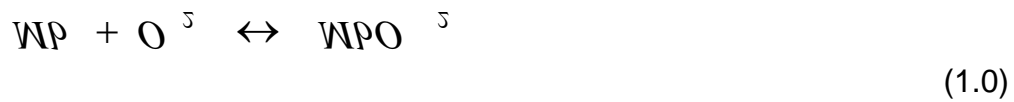


Figura 11. Curva de unión del oxígeno a la mioglobina

La forma hiperbólica de la curva de unión de la mioglobina puede explicarse de la siguiente forma:



Se tiene:

$$K = \frac{[MbO_2]}{[Mb][O_2]} \quad (2.0)$$

donde la constante de equilibrio K se denomina constante de asociación o constante de afinidad. Las magnitudes indicadas entre los corchetes indican concentraciones molares de mioglobina oxigenada $[MbO_2]$, mioglobina no oxigenada $[Mb]$, y oxígeno libre $[O_2]$.

La fracción de lugares de la mioglobina ocupados se define así:

$$\theta = \frac{\text{Lugares ocupados}}{\text{Lugares disponibles totales}} \quad (3.0)$$

Cada molécula de mioglobina tiene sólo un lugar, por lo que el número total de lugares disponibles es proporcional a la concentración total de mioglobina, $[MbO_2] + [Mb]$ En consecuencia:

$$\theta = \frac{[MbO_2]}{[Mb] + [MbO_2]} = \frac{K[Mb][O_2]}{[Mb] + K[Mb][O_2]} \quad (4.0)$$

Donde se utiliza $[MbO_2] = K [Mb][O_2]$ de la ecuación 2.0 para obtener la ecuación de la derecha. La concentración de mioglobina sin ligar, $[Mb]$, puede eliminarse en el numerador y el denominador, con lo que se obtiene:

$$\theta = \frac{K[O_2]}{1 + K[O_2]} = \frac{[O_2]}{\frac{1}{K} + [O_2]} \quad (5.0)$$

Es decir:

$$\frac{[O_2]}{[O_2]_{\frac{1}{2}} + [O_2]}$$

(6.0)

Donde se ha utilizado el hecho de que $1/K = [O_2]_{1/2}$, la concentración de oxígeno cuando la mitad de las moléculas de mioglobina tienen oxígeno unido a ellas. Es fácil comprobar esta relación estableciendo $\theta = 1/2$ en la ecuación 6: Dado que la concentración de oxígeno es proporcional a la presión del oxígeno, la ecuación 6 puede también formularse de la siguiente forma:

$$\theta = \frac{PO_2}{P_{50} + PO_2}$$

(7.0)

Donde P_{50} es la presión parcial de oxígeno a la mitad de la saturación.

Se puede comprobar que la ecuación 7.0, describe la curva de unión hiperbólica, como la presentada en la gráfica 1.

La P_{50} de la mioglobina es muy baja (unos 4 mmHg), lo cual implica que la mioglobina tiene una elevada afinidad por el oxígeno. A la concentración de oxígeno que existe en los capilares (aproximadamente 30 mmHg), la mioglobina de los tejidos adyacentes está casi saturada. Cuando las células están metabólicamente activas, su PO_2 interna disminuye hasta valores mucho más bajos. En estas condiciones, la mioglobina descargará su oxígeno.

Las moléculas de mioglobinas nativas y mutadas no sólo debe proporcionar un entorno para la unión reversible del oxígeno sino que debe garantizar también que la constante de afinidad K o P_{50} tenga exactamente la magnitud adecuada. Esta función se puede obtener de la constante de afinidad, ya que

esta es una constante de equilibrio, y que por lo tanto debe ser el cociente de dos constantes, K_1 para la reacción de unión y K^{-1} para la reacción de liberación.

$$K = \frac{K_1}{K^{-1}} \quad (8.0)$$

Es decir:

Estudios de función y estructura en mioglobina y hemoglobina de diferentes organismos y la variación en la construcción de estas han arrojado importantes datos, debido a la importancia de las propiedades físico-químicas de las cadenas laterales en las posiciones B10, E7, ya que estos residuos son cruciales en la estabilización y discriminación de ligandos gaseosos como O_2 y CO . (Mathews & van holde, 1998)

6.2 PROPIEDADES QUIMICAS DE LIGANDOS QUE SE UNEN A LA MIOGLOBINA

Es interesante, aunque no sorprendente desde el punto de vista de evolución que en las proteínas tales como la mioglobina, la hemoglobina los citocromos y en las enzimas tales como la catalasa y la peroxidasa, el hierro está situado en el centro de un sistema porfirínico plano. Al igual que en los hidrocarburos aromáticos, la molécula de porfirina se halla bastante deslocalizada.

Tanto en la mioglobina como en la hemoglobina, el hierro está en el estado de oxidación de +2. Forma cuatro enlaces σ con los átomos de nitrógeno del anillo de porfirina. Con esto quedan dos lugares que ocupan dos ligandos más para explicar la formación de complejos octaédricos. En estos casos, el quinto ligando es una molécula de agua, la cual se une al ion Fe^{+2} por el otro lado del anillo para completar el complejo octaédrico. (Chang, 1996)

Esta clase de enlace que presenta el átomo de hierro es característico de los complejos de los metales del grupo de transición d al cual pertenece. Es posible construir conjuntos de orbitales híbridos equivalentes y con una distribución geométrica concreta mediante combinaciones lineales. Las combinaciones más importantes para este caso de especies complejas son sp (lineal), sp^3 (tetraédrica), dsp^2 (plana cuadrada), dsp^3 (bipiramidal-trigonal), y la de interés para la Mb, d^2sp^3 (octaédrica). Tales tipos de orbitales híbridos se obtienen a partir de la reordenaciones de orbitales apropiados que conduzcan a un conjunto de orientaciones espaciales adecuadas para la recepción de los electrones suministrados por los ligandos. En ocasiones resulta posible evitar la poco verosímil acumulación de carga negativa sobre el ion metálico central, que aparece como consecuencia de sus propiedadesceptoras, mediante la hipótesis de que opera un proceso de devolución de electrones a los ligandos, es decir mediante la formación de enlaces dobles. Por este mecanismo se produce una deslocalización de carga negativa que se extiende sobre varios átomos. El resultado se manifiesta por una estabilización global del sistema. Los ejemplos más representativos son los carbonilos CO, nitrosilos metálicos (NO) y los complejos con cianuro (NC^-), en los que se observa enlaces metal-ligando cortos. Este fenómeno sólo es posible con ligandos que posean orbitales propios vacíos de tipo p o d ; estos orbitales pueden interactuar con orbitales d_{xy} , d_{xz} , d_{yz} doblemente ocupados del ion metálico. Para dar lugar a un enlace de tipo π . Por otra parte la disposición espacial de tales orbitales d favorece un recubrimiento lateral. La tendencia a formar enlaces π aumenta con el número de orbitales d doblemente ocupados en el átomo metálico y por ello se presenta de modo característico en los complejos de metales de la última zona de las series de transición d .

Comúnmente este tipo de enlace π se puede formar por enlace de valencia cuando hay un recubrimiento del orbital d o por recubrimiento de un orbital d

del ion metálico, con un orbital p del ligando π^* . Cuando el ion posee más de tres electrones $3d$, el principio de Hund exige que el número de orbitales $3d$ semiocupados sea lo mayor posible, de modo que no siempre están fácilmente disponibles los dos orbitales $3d$ vacíos necesarios para formar los híbridos propios de una configuración octaédrica. Por ejemplo en el Fe^{+2} , este par puede ser obtenido por apareamiento de electrones para dar lugar a dos, uno o ningún electrones $3d$ desapareados, respectivamente. Nuevamente los datos magnéticos están de acuerdo en muchos casos con un apareamiento de electrones máximo (especialmente en las especies d^6 como en el Fe^{+2}).

En la oxihemoglobina donde el oxígeno molecular sustituye a la molécula de agua, el enlace se da cuando el oxígeno comparte dos electrones con unos de los orbitales vacíos de el hierro. Se han propuesto tres orientaciones diferentes de la molécula de O_2 (Figura 12).

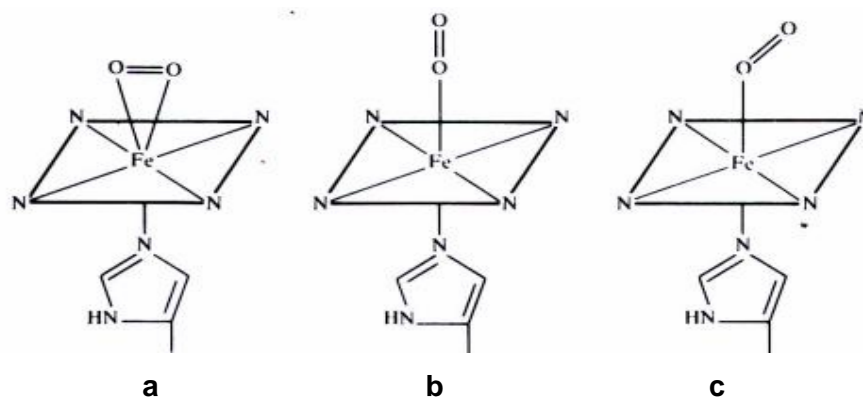


Figura 12. Orientaciones que puede tener la molécula de oxígeno al unirse al grupo hemo.

Aunque todavía se desconoce la distribución exacta, las evidencias indirectas sugieren con firmeza que la molécula de oxígeno adopta una configuración oblicua como se muestra en la figura 12c. Aun cuando la configuración frontal de la figura. 12b parecería ser la más razonable, ya que en esta la superposición orbital sería máxima, el impedimento estérico debido a las cadenas laterales vecinas fuerzan a la molécula de oxígeno a inclinarse.

La naturaleza del enlace es esencialmente la misma en la oximioglobina y en la oxihemoglobina, aunque su afinidad por el oxígeno es bastante diferente.

Además del agua y del oxígeno, muchos otros ligandos, tales como el CO o el NO, se unen al Fe^{+2} . Sin embargo, el enlace con el CO es 50 veces más fuerte que en el de O_2 en la mioglobina y 200 veces en la hemoglobina. La mayor afinidad del CO por el Fe^{+2} es el resultado de la interacción $d\pi - p\pi$.

El átomo de carbono del CO tiene hibridación sp. Uno de los orbitales híbridos sp que contiene al par de electrones no compartido se superpone con el orbital d_{z^2} de hierro para formar un enlace σ . También hay retrodonación de la densidad electrónica del orbital d_{xz} a un orbital vacío π del CO. (Figura 13).

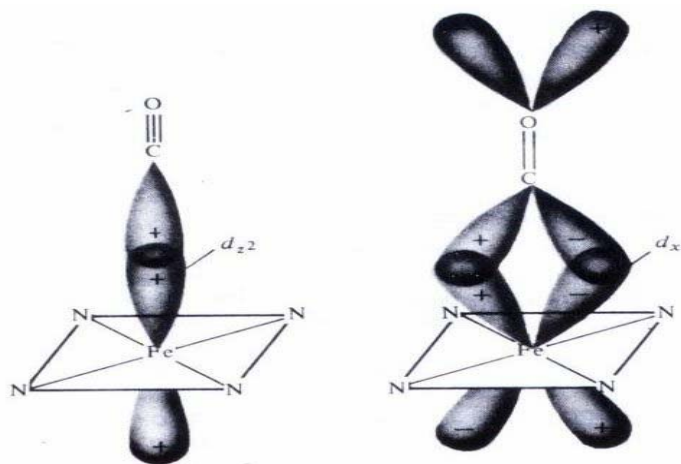


Figura 13. Formas de enlace del monóxido de carbono al grupo hemo de la mioglobina

Como resultado de esta interacción, la unión entre el Fe^{+2} y el CO tiene características apreciables de enlace doble y, por tanto, es difícil de romper. La fuerza del enlace Fe-C depende del grado de la superposición orbital. Se supone que en la carboxihemoglobina y carboximioglobina el CO adoptan también una configuración oblicua como la del O_2

Este hecho es un acontecimiento afortunado para el hombre moderno. Si no fuera así, esto es, si la molécula de CO se uniera al Fe^{+2} en la forma frontal, la afinidad del CO por el Fe^{+2} de la mioglobina y la hemoglobina sería mil veces más fuerte o más que la del O_2 .

Aunque el ion cianuro es isoeléctrico como el monóxido de carbono, el primero no forma complejos tan estables con el Fe^{+2} . La capacidad que tiene el ion CN^- para estabilizar los estados de oxidación bajos es una clara indicación de que acepta densidad de carga electrónica sobre sus orbitales π^* en la interacción con el metal, aunque la carga negativa del ion CN^- disminuye posiblemente esta tendencia en cierta magnitud, y hace de este modo al ion CN^- menos efectivo que lo que es el CO para conseguir la estabilización. La toxicidad del ion cianuro reside en su capacidad de atacar a la citocromooxidasa, una enzima respiratoria.

De otra parte la coordinación de la molécula NO a un átomo o ion metálico puede suponerse realizada de tres maneras distintas:

1. Por la transferencia de un electrón impar al átomo o ion metálico, seguido por la cesión de un par de electrones solitario por el ion NO^+ resultante
2. Transferencia de un electrón desde el átomo o ion metálico sobre la molécula de NO para dar lugar al ion NO^- , que después se enlaza del mismo modo que un ion haluro.
3. La cesión de un par de electrones por el átomo de nitrógeno de la molécula NO, con retención del electrón desapareado por parte del ligando.

Lo más útil es considerar la molécula de NO como una especie dadora de tres electrones tanto cuando actúa como ligando terminal como cuando lo hace como puente. (Chang,1996)

6.3 MECÁNICA MOLECULAR

La simulación clásica atomística, asume que un sistema molecular puede ser descrito usando leyes de mecánica clásica. Esto provee un rápido y aproximado estudio de movimiento, energía y estructura molecular.

Los métodos de mecánica cuántica alternativos son usualmente más exactos pero también mucho más expansivos computacionalmente. Hay algunas circunstancias en las cuales la mecánica cuántica es el método apropiado, y algunos en los cuales los métodos clásicos son los de escogencia. Frecuentemente, las dos aproximaciones se complementan. Fundamentalmente ellos difieren en la manera de cómputo de la energía del sistema molecular. La mecánica clásica emplea unas herramientas conocidas como Campos de Fuerza.

Si una molécula fuera una colección de esferas cargadas (átomos), conectados por resortes (enlaces), esta energía potencial podría ser descrita por el conocimiento de las masas y cargas de todas las esferas, y todas las constantes de los resortes y las interacciones de largo alcance, generalmente se pueden describir como electrostáticas.

Las funciones de energía típicas de campos de fuerza usadas generalmente para proteínas están compuestas de términos de enlace, ángulos de enlace, ángulos de torsión, interacciones de van der Waals, interacciones tipo Coulomb y enlaces de hidrógeno.

La expresión resultante tiene la forma:

$$\begin{aligned}
 E(\vec{R}) = & \frac{1}{2} \sum_{\text{enlace}} Kb(b-b_o)^2 + \frac{1}{2} \sum_{\text{ángulos}} K_v(\nu-\nu_o)^2 + \frac{1}{2} \sum_{\text{torsión}} K_\phi [1 + \cos(n\phi - \delta)] \\
 + & \sum_{\text{pares nb } r \leq 8\lambda} \frac{A}{r^{12}} - \frac{C}{r^6} + \frac{q_1 - q_2}{Dr} + \sum_{\text{enlace de H}} \left(\frac{A'}{r^m} - \frac{C'}{r^p} \right) f(\theta' - \theta'')
 \end{aligned}
 \tag{9.0}$$

la energía se expresa como una función de los grupos de coordenadas cartesianas que especifican las posiciones de todos los átomos involucrados, pero el cálculo es llevado a cabo determinando las coordenadas internas para enlaces (b), ángulos (ν) ángulos diédricos (ϕ) y las distancias interpartículas (r) para alguna geometría dada, cada uno de estos componentes depende de los parámetros de energía de enlace Kb , $K\nu$, $K\phi$ parámetros de Lennard-Jones A y C , cargas atómicas q_i , constante dieléctrica D , parámetros de enlace de hidrógeno A' y C' y valores de referencia geométrica b_o , ν_o , n y δ . En los términos de enlaces de hidrógeno, $f(\theta, \theta'')$ representa una función de los ángulos donadores (θ) y ángulo aceptor (θ'') y han sido usados exponentes $m = 12$ o 6 y $p = 10$

Los arreglos computacionales correspondientes a los más bajos de energía (minimización de la energía), indicarían cual es la geometría probable del sistema.

El sistema es descrito por unas expresiones que corresponden a la suma de los componentes energéticos (energías de enlace y de no enlace).

Las expresiones de energía son las bases de un campo de fuerza, llamado así porque este permite la energía y de esta manera las fuerzas del sistema son calculadas.

6.3.1 Componentes de un campo de fuerza.

Un campo de fuerza completo requiere:

1. Una forma funcional que describa cada componente de energía. (El modelo armónico simple puede ser usado para representar las energías de enlace).
2. Parámetros determinados. (Las constantes de un resorte para el enlace). Cada posible forma de energía puede tener una forma funcional. Cada átomo, o combinaciones de átomos implican términos que pueden tener unos parámetros (el enlace C-H, por ejemplo, tendría una constante de resorte diferente para el enlace C-C).

6.3.2 Aplicaciones de Campos de Fuerza.

Ya que los campos de fuerza son determinados usando un grupo particular de moléculas, algunos dan campos de fuerza que no son aplicables en forma general.

Los campos de fuerza tienden a trabajar bien para sistemas moleculares similares, con sus correspondientes parámetros.

Así por ejemplo, un campo de fuerza puede ser específico para determinado grupo de moléculas orgánicas (como las proteínas).

Un campo de fuerza es un modelo relativamente simple y rápido de cómputo energético de un sistema molecular, usando herramientas como la mecánica molecular. Esta se refiere al hallazgo de la geometría molecular que corresponde a un mínimo de energía para el sistema, un proceso conocido como minimización energética.

Un sistema molecular exhibe numerosos mínimos, cada uno corresponde a una conformación posible.

Cada mínimo tendrá una energía característica, la cual puede ser calculada. Los cálculos de mecánica molecular pueden ser formados sobre sistemas moleculares que incluyen moléculas aisladas en "fase gaseosa", sistemas en solución y macromoléculas; introduciendo limitantes periódicas, dentro de las cuales se usan celdas unitarias para representar un sistema infinito o semi-infinito que permite cálculos sobre materiales cristalinos o sólidos amorfos voluminosos.

La información que estos cálculos proveen, es importante para procesos cruciales de control y planeación en los que se incluye síntesis de reacciones químicas, efectos estereo-químicos, solubilidad y enlace de drogas o aditivos químicos.

6.3.3 Propiedades de Campos de Fuerza.

Un campo de fuerza es una expresión analítica que aproxima la energía de un sistema molecular como una función de las posiciones de los átomos. Esta función es llamada superficie de energía. Para el estudio de la mecánica molecular se parte de estructuras cristalinas y de modelos conceptuales; estos últimos se basan en una serie de coordenadas de átomos, medidas de coordenadas o la construcción de estas en un sistema gráfico molecular computarizado.

Así con datos experimentales observados, (coordenadas de átomos) se puede calcular las posiciones de los átomos en una estructura, y se puede crear un pseudopotencial de energía, el cual se toma como las desviaciones entre lo observado y los datos experimentales tomados.

El modelo de mecánica molecular simple provee un ejemplo basado en una energía potencial mínima de la estructura. Este proceso asume que la aproximación del modelo de Born-Oppenheimer es aplicable. (Se trabaja con

moléculas en sus estados electrónicos más bajos, y que la energía puede ser determinada de las posiciones de los núcleos atómicos).

Los campos de fuerza representan la energía potencial de un sistema molecular, para ser calculados rápida y exactamente. Un campo de fuerza típico representa cada átomo en el sistema como un punto único, y las energías como la suma de dos, tres y cuatro partículas interaccionando.

La energía potencial de una interacción particular está descrita por una ecuación, la cual tiene en cuenta la posición de la partícula y un número pequeño de parámetros, los cuales han sido determinados experimentalmente o por cálculos de mecánica cuántica.

La energía potencial de un sistema molecular es descrita típicamente por un campo de fuerza diferente en términos de átomos enlazados (interacciones de valencia) o a través del espacio (interacciones de no enlace). Las interacciones de valencia incluyen: enlace, ángulos, torsión e inversión.

Las de no enlace incluyen interacciones electrostáticas, de Van der Waals y enlaces de hidrógeno.

Las fuerzas potenciales son calculadas independientemente y sumadas para dar un total de energía de la molécula.

6.3.4 Energía debida a la elongación del enlace:

Cuando un enlace es comprimido o elongado, la energía es almacenada y/o liberada.(Figura 14a)

La energía potencial para un enlace comprimido o elongado es descrita por una ecuación similar a la de Hooke para un resorte.

6.3.5 Energía debida al ángulo de enlace:

Cuando los ángulos se desvían de su forma normal la energía incrementa y/o se reduce.(Figura 14b)

6.3.6 Energía debida a torsiones:

Se refiere a rotaciones moleculares (rotaciones acerca de ángulos de torsión o ángulos diédricos) que requieren energía.(Figura 14 c)

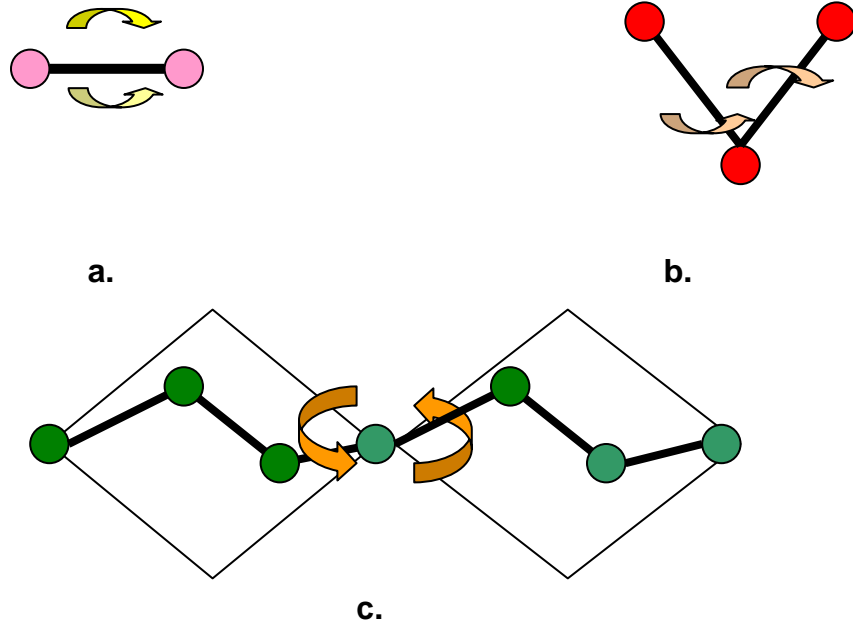


Figura 14. Energías de corto alcance debidas a enlace, torsión y ángulo

6.3.7 Energía debida a las interacciones carga-carga:

Es la interacción no covalente más sencilla electrostática entre un par de partículas cargadas, la fuerza entre un par de cargas q_1 y q_2 , separadas en el vacío por una distancia r , viene determinada por la ley de Coulomb:

$$F = K \frac{q_1 q_2}{r^2} \quad (10)$$

Donde K es una constante cuyo valor depende de las unidades utilizadas.

Si q_1 y q_2 tienen el mismo signo, F es positiva, de modo que un valor positivo implica repulsión. Si una carga es + y la otra -, F es negativa, lo que implica atracción.

El entorno biológico obviamente, no está vacío. En una célula, las cargas siempre están separadas por agua o por otras moléculas o partes de moléculas. La existencia de este medio dieléctrico entre las cargas tiene el efecto de apantallarlas de las otras, de modo que la fuerza real es siempre inferior a la que nos da la ecuación 10. Este efecto apantallador se expresa añadiendo a la ecuación 10, un número sin dimensión: la constante dieléctrica (ϵ).

$$F = K \frac{q_1 q_2}{\epsilon r^2} \quad (11)$$

Toda sustancia que actúe como un medio dieléctrico tiene un valor característico ϵ . Cuanto más elevado es este valor, más débil es la fuerza entre las cargas separadas.

La ley de Coulomb expresa una fuerza; es decir, es una descripción cuantitativa de una interacción. Sin embargo, cada interacción implica un

cambio de energía, referida a la energía de interacción (U). Se trata de la energía necesaria para separar dos partículas cargadas desde una *distancia* r a una distancia infinita; es decir, separadas superando la fuerza electrostática. La energía de interacción viene dada por la ecuación 12

$$U = K \frac{q_1 q_2}{\epsilon r} \quad (12)$$

Al igual que con la fuerza, la energía de una pareja q_1 y q_2 con carga opuesta siempre es negativa; es decir, existe atracción, pero U tiende a cero cuando r tiende a un valor alto.

Dos características principales de las interacciones carga-carga surgen de las ecuaciones 11 y 12. En primer lugar, la fuerza entre las cargas es totalmente no direccional, y depende únicamente de la distancia de separación. En segundo lugar, la energía de interacción varía muy gradualmente con la distancia: Es inversamente proporcional a la primera potencia de r . Las interacciones carga-carga se producen con frecuencia dentro de o entre biopolímeros; por ejemplo, en la interacción entre grupos amino y carboxilo de una proteína. (Mathews & van holde, 1998)

6.3.8 Interacciones de dipolos permanentes.

Las moléculas que no tienen carga neta pueden, no obstante, tener una distribución interna asimétrica de la carga. Por ejemplo, la distribución electrónica de la molécula de monóxido de carbono sin carga es tal que el extremo del oxígeno es ligeramente más negativo que el extremo del carbono. Una molécula así se denomina polar, o dipolo permanente, y se dice que tiene un momento dipolar permanente (μ). El momento dipolar expresa la magnitud de la polaridad de una molécula. Si una molécula lineal

como CO tiene cargas fraccionales q^+ y q^- , separadas por una distancia x , el momento dipolar es un vector orientado hacia q^- , cuya magnitud es:

$$\mu = qx \tag{13}$$

A pH neutro el aminoácido glicina existe como ion ${}^+H_3NCH_2COO^-$, que tiene un grupo ionizado negativo y otro positivo. De este modo, las cargas electrónicas totales están separadas por la longitud de la molécula.

En el entorno acuoso de una célula, un dipolo permanente puede ser atraído por un ion cercano (interacción carga-dipolo) o por otro dipolo permanente (interacción dipolo-dipolo), a diferencia de las interacciones simples carga-carga descritas anteriormente, (Figura 15). Las interacciones dipolares dependen de la orientación de los dipolos. Además son interacciones con un alcance inferior. La energía de interacción carga-dipolo es proporcional a $1/r^2$, y la de una interacción dipolo-dipolo es proporcional a $1/r^3$. De este modo, para que la interacción sea fuerte, un par de dipolos permanentes debe estar bastante cerca.

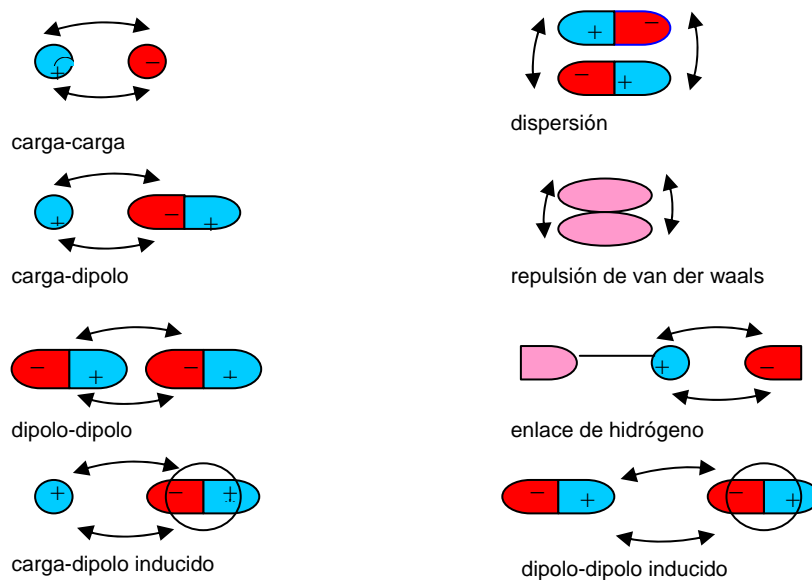


Figura 15. Tipos de interacciones electrostáticas dadas en un sistema molecular.

Los momentos dipolo de enlace son usados para representar contribuciones electrostáticas que se siguen por las leyes de Coulomb.

Las interacciones electrostáticas son medidas por cargas de puntos atómicos de las moléculas.

6.3.9 Energía debida a las interacciones de Van de Waals:

Cuando las moléculas o los átomos que no tienen enlaces covalentes entre ellos se acercan tanto que sus orbitales electrónicos más externos empiezan a solaparse, existe repulsión mutua. Esta repulsión aumenta muy rápidamente a medida que la distancia entre sus centro (r) disminuye; es aproximadamente proporcional a r^{-12} .

Si combinamos esta energía de repulsión con una o más clases de energía total de la interacción no covalente (U) de una pareja de átomos, moléculas o iones cambiará según la distancia (r). Debe destacarse dos puntos: en primer lugar, existe una posición r_0 que corresponde al mínimo de distancia más estables entre los centros de las dos partículas. En segundo lugar, el potencial de repulsión aumenta tan pronunciadamente en distancias más cortas que actúa como una barrera, impidiendo de modo efectivo que se aproximen más de la distancia r_v . Esta distancia define el llamado radio de Van de Waals, R , el radio efectivo para el empaquetamiento molecular más cercano. Para un par de moléculas esféricas idénticas, $r_v = 2R$; para moléculas con radios de Van der Walls R_1 y R_2 , $r_v = R_1 + R_2$

El radio de Van der Waals de un átomo dado está definido por un tamaño efectivo. Cuando dos átomos no enlazados están relativamente juntos, la atracción de Van der Waals incrementa (la energía decrece). Cuando la distancia entre ellos es igual a la suma de los radios la atracción es máxima. (Figura 16).

Las moléculas reales, por supuesto, no son objetos esféricos. Puesto que todas las moléculas biológicas grandes tienen formas complejas, es útil

extender el concepto del radio de van der Waals a los átomos o a los grupos de átomos que hay dentro de una molécula.

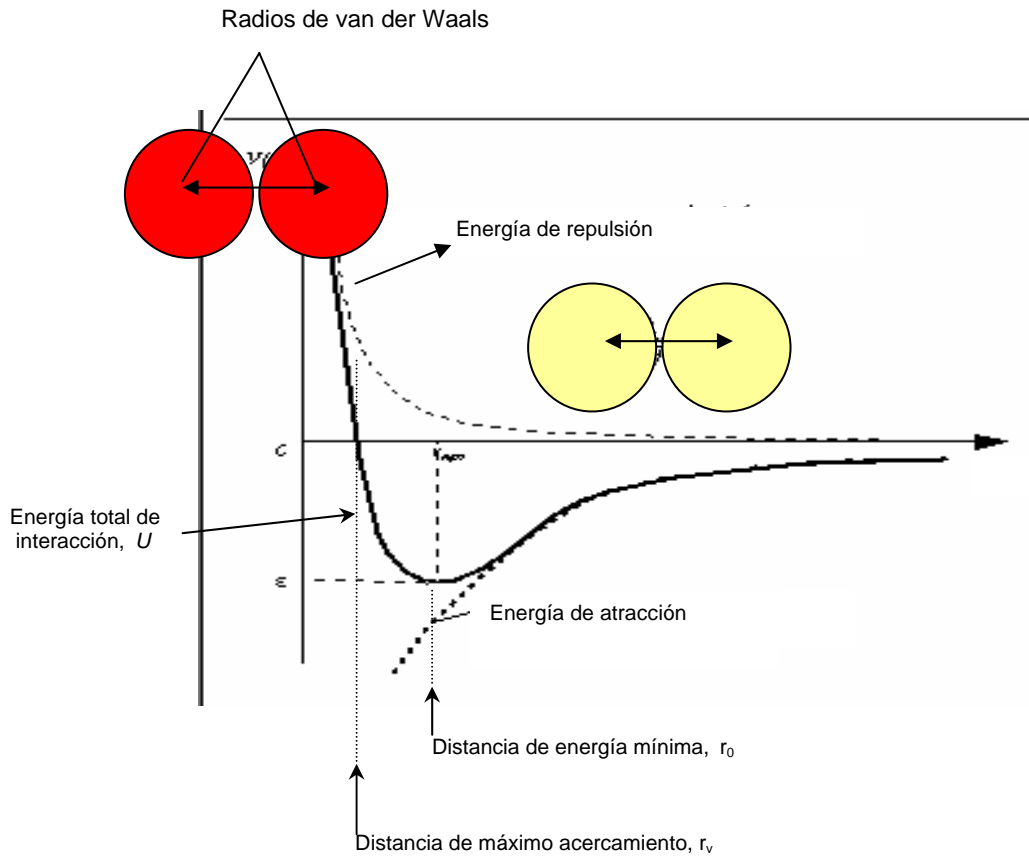


Figura 16. Interacción molecular de van der Waals

6.3.10 Energía debida a los enlaces de Hidrógeno:

La estructura y las propiedades de muchas moléculas biológicas así como las del agua, el disolvente biológico universal, están determinadas en gran medida por este tipo de enlace. Un enlace de hidrógeno es una interacción entre un átomo de hidrógeno enlazado covalentemente en un grupo donador (Como -O-H o N-H) y un par de electrones libres pertenecientes a un grupo aceptor (como O-C - o N). El átomo al que el hidrógeno está covalentemente enlazado se denomina donador del enlace de hidrógeno, y el átomo con el par de electrones no enlazados se denomina aceptor del enlace de hidrógeno. (Figura 17). Se define la longitud del enlace de hidrógeno como la distancia centro-centro entre los átomos donador y aceptor.

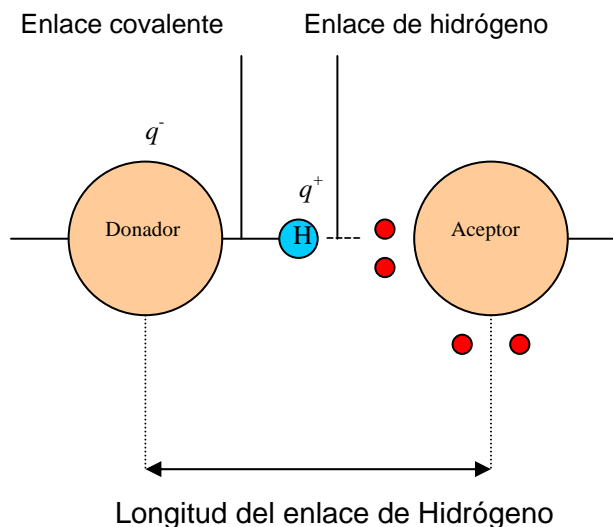


Figura 17. Interacción molecular debida a puentes de hidrógeno.

La capacidad de un átomo para actuar como donador o aceptor de enlace de hidrógeno depende en gran medida de su electronegatividad. Cuanto más electronegativo es el átomo donador, más carga negativa extrae del hidrógeno al cual está enlazado. De este modo el hidrógeno se vuelve más positivo y es atraído con más fuerza hacia el par de electrones del aceptor. Entre los átomos que se encuentran en los compuestos biológicos, sólo O y N tienen las electronegatividades apropiadas para comportarse como donadores, de este modo, los grupos C-H no forman enlaces de hidrógeno fuertes y sí los grupos O-H.

El enlace de hidrógeno comparte algunas propiedades tanto de las interacciones covalentes como de las no covalentes. En parte es como una interacción carga-carga entre la carga positiva parcial del H y la carga negativa del par de electrones. Pero, al mismo tiempo, también se comparten electrones entre el H y el aceptor. Estas dos propiedades se reflejan en la longitud del enlace de H. La distancia entre el átomo de hidrógeno y el átomo aceptor en un enlace de hidrógeno es bastante más reducida que en la que cabría esperar de sus radios de Van der Waals.

Los enlaces de hidrógeno, al igual que los enlaces covalentes, son altamente direccionales: el enlaces de H donador tiende a apuntar directamente hacia el par de electrones aceptores. La importancia de esta direccionalidad puede observarse en el papel que desempeñan los enlaces como la hélice α en las proteínas.

6.4 ENERGÍA POTENCIAL DE SUPERFICIE

La descripción matemática compleja incluye teorías tanto de mecánica cuántica como de efectos relativistas.

Inicialmente se propone una teoría mecánico-cuántica relativista para la descripción de las moléculas. Se tiene en cuenta su comprensión una función de las coordenadas de los núcleos y de los electrones de los átomos que conforman el sistema.

Born y Oppenheimer (1927) proponen un modelo comúnmente conocido como la aproximación de Born-Oppenheimer: En este modelo el movimiento de los electrones puede ser desacoplado desde el núcleo, indicando que la energía se define como una función sólo de las coordenadas de los núcleos, es decir, que describe el movimiento de los núcleos en esta energía potencial de superficie.

6.5 MINIMIZACIÓN DE LA ENERGÍA POTENCIAL

Dada la importancia de conocer las energías potenciales, y la dificultad o casi imposibilidad, de modelos experimentales, se han desarrollado muchos programas computacionales que permiten estimar esta energía a través de simulaciones generalmente basadas en modelos matemáticos con algunos datos empíricos iniciales.

Estos comprenden el cálculo de energía potencial, permiten la minimización de la energía, y simulaciones de dinámica de proteínas. Uno de los más básicos es el programa de mecánica molecular AMBER (Weiner y col.,1984), modificado y actualizado por GROMOS (Berendsen & Van Gunsteren,1994). Este último es un programa que permite simulaciones dinámicas por computador, para el estudio de sistemas moleculares, ya sea en solución o en estado cristalino, utilizando métodos de dinámica estocástica (SD), de dinámica molecular (MD), o métodos integrados.

A su vez, permite minimizar la energía de sistemas moleculares, y el análisis de conformaciones obtenidas experimentalmente o simuladas por computador. También ofrece la posibilidad de predecir la dependencia de la conformación molecular según el ambiente (agua, metanol, cloroformo, solvente apolar, cristal etc), el cálculo de las constantes de unión, evaluando las diferencias de la energía libre entre varios complejos moleculares, y la predicción de los cambios estructurales y energéticos causados por la modificación de aminoácidos en enzimas, proteínas o pares de bases en el DNA.

La minimización de la energía genera una función de la energía potencial en la que la configuración obtenida corresponde a la estructura más estable para el sistema.

En la figura 18a, la optimización de la geometría del hidrógeno diatómico es representada. En esta se puede observar que la distancia inicial del enlace de H-H (q_1) es más corta que la distancia de equilibrio. La minimización dará la distancia a el potencial mínimo en q_2 donde la pendiente de la función es cero.

Desafortunadamente, la situación para la mayoría de las moléculas es mucho más compleja. Típicamente las moléculas tienen muchos grados de libertad, y por lo tanto el resultado dará muchos mínimos en la energía potencial de superficie.

Si la estructura inicial de una molécula tiende a estar en '3' (Figura 18b), entonces la minimización no encontrará el mínimo en '1'. Es mas la estructura en equilibrio estará representada en la parte profunda de '3' (Figura 18b).

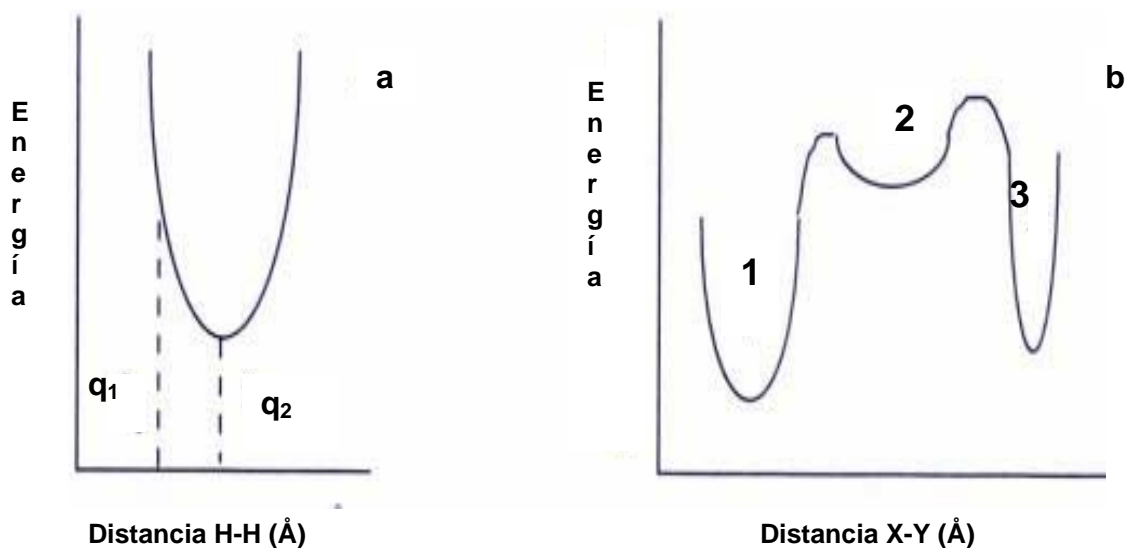


Figura 18. Optimización de la energía del hidrógeno(a), Optimización de la energía de un sistema molecular(b).

Si una molécula contiene pocas variables, la minimización de la energía se puede realizar usando diferentes estructuras iniciales, con las que es posible obtener un resultado de estas estructuras que permita acercarse a un mínimo global, y así encontrar la configuración más estable de los átomos durante la optimización de la energía.

Un mínimo puede ser encontrado después de un ajuste o requiere de cientos de iteraciones, dependiendo de la naturaleza del algoritmo, de la forma de la función y el tamaño de la molécula. La eficiencia de la minimización es determinada tanto por el tiempo necesario para evaluar la función como por el número de ajustes estructurales (iteraciones) necesarias para converger en el mínimo

La minimización de una molécula requiere de un número de pasos a saber:

- Se inicia con una estructura dada (principalmente determinada por cristalografía de rayos X).

- Para la determinación de los pasos de refinamiento de la molécula se aplican algunos programas con algoritmos, denominados comúnmente "*descenso pronunciado*" o "*steepest descent*" (SD) y el algoritmo del gradiente conjugado, o "*conjugate gradient*". El método de descenso pronunciado, utiliza una línea de búsqueda, es decir parte de un cambio en las coordenadas, y busca una estructura con una energía más baja. Se parte de un punto en el plano de coordenadas cartesianas (X_0, Y_0) definido como **a**. (Figura 19). La cantidad de líneas de búsqueda, o ajustes estructurales que se definan es determinado en cada iteración por el número de pasos. Durante el ajuste es posible encontrar un mínimo local en el sistema, definido como un soporte entre dos puntos con una energía potencial más alta, por ejemplo **b** y **d** (Figura 19). En este caso, se realiza un calculo del potencial de energía mínimo en cada iteración, en dirección a la velocidad con el que cambia este potencial. (gradiente negativo de la energía potencial).

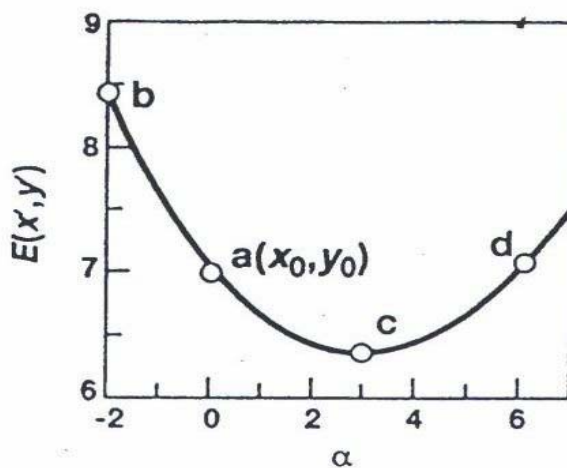


Figura 19. Seguimiento en la búsqueda de un mínimo local

En este ejemplo **c**, es el punto donde el potencial de energía es más negativo respecto a **b** y **d**. Se puede aumentar el número de iteraciones para encontrar el punto con un potencial más negativo, o también comprobar que como en este caso **c**, el encontrado es el adecuado.

El método del gradiente conjugado difiere del primer método en que en este se tiene en cuenta, tanto la dirección del gradiente de energía potencial como la línea de búsqueda. La dirección del gradiente es favorable ya que en cada paso sucesivo se refina continuamente la dirección hacia el mínimo.

- Todos los programas pueden minimizar la energía potencial obtenida a través de los modelos. En realidad el cálculo es dirigido a un mínimo de energía libre, la cual está en función de la entalpía (H) y entropía (S) ($\Delta H - T\Delta S$).

Para todos los campos de fuerza usados en cálculos de este tipo el cero de energía es arbitrario. La energía calculada de una estructura minimizada completamente (mínimo global) es la entalpía clásica de los sistemas en un cero absoluto. Los efectos para estos casos son ignorados (en particular el punto cero del movimiento vibracional).

La energía mínima calculada para complejos de macromolécula- ligando pueden ser usadas para estimar entalpías. De esta forma se tienen en cuenta dos consideraciones:

1. Para una comparación significativa, de la unión relativa de dos sustratos diferentes, se tiene en cuenta un ciclo termodinámico completo. En términos prácticos, esto significa que se puede realizar un cálculo de entalpía para varios sustratos en agua .
2. Para estimar la solidez de la unión relativa, la entropía también puede ser considerada, pero los cálculos de esta incluyen procesos computacionales muy exhaustivos.

La importancia de estas consideraciones fundamentalmente depende del objetivo de cálculo. Cuando se estudia la unión relativa en un sitio activo

por ejemplo de una enzima de dos sustratos diferentes, uno de los cuales es flexible y el otro es rígido, los efectos entrópicos pueden ser cruciales para obtener un acuerdo cualitativo con constantes de unión experimental. Si la interacción de algún componente putativo con muchos átomos del sitio activo causan, como producto de la estructura minimizada, una energía potencial más positiva que la de los componentes por separado, el complejo obtenido es rechazado. De lo contrario, aceptado.

La minimización de la energía potencial puede estar limitada por los problemas del solvente, por lo tanto, la temperatura es excluida de la minimización así como las contribuciones entrópicas para la estabilidad de la molécula.

Para sistemas macromoleculares, el número de mínimos locales y el costo de los cálculos impiden una búsqueda exhaustiva de la energía potencial. Computacionalmente es imposible determinar un mínimo de energía global. Generalmente un mínimo local puede ser la estructura determinada por cristalografía de rayos X .

La minimización de la energía ha sido utilizada para resolver problemas acerca de la determinación y del análisis de proteínas haciendo un especial énfasis en proteínas mutadas o modificadas.

6.6 MUTACIONES PUNTUALES EXPERIMENTALES Y SIMULADAS.

En la historia de la mutación y modificación de proteínas se ha venido desarrollando la técnica de la mutagénesis de sitio dirigido, reportándose casos en donde el comportamiento de las mutantes no ha sido el esperado por quienes hacen el estudio. Es importante entonces el desarrollo de nuevas estrategias predictivas y el uso de toda la información estructural, técnica, termodinámica y energética, que existe al alcance para desarrollar modelos predictivos. (Shih,1985)

Cuando se trata de predecir la función o los cambios en la función de una proteína se requiere de resultados estructurales de alta veracidad.

Es por esto que técnicas como la cristalografía de rayos X son utilizadas para la determinación de estructuras de proteínas a nivel experimental. Varias de las proteínas modificadas han sido determinadas por esta técnica, aunque la resonancia magnética nuclear y otras técnicas espectroscópicas pueden ser usadas para encontrar las diferencias entre las moléculas nativas y las mutantes.

El empleo de modelos teóricos ha desencadenado una serie de alternativas que son utilizadas para predecir la estructura y las propiedades funcionales de las proteínas nativas y mutantes, basadas en el conocimiento de la estructura patrón y en el cambio de los aminoácidos específicos de la proteína mutante.

Una de las metodologías estudiadas se basa en la minimización de la energía del sistema y simulación de la dinámica molecular de macromoléculas.

Para el estudio teórico de la energía, dinámica y termodinámica de una proteína se hace necesario el conocimiento de la energía potencial del sistema, la cual corresponde a la energía de la molécula en función de las coordenadas atómicas.

La energía potencial puede ser usada directamente para determinar la estabilidad relativa de las diferentes estructuras posibles de la proteína. Las fuerzas que actúan sobre los átomos son obtenidas de las primeras derivadas de la energía potencial, respecto a las posiciones de los átomos. Estas fuerzas pueden ser usadas para calcular las propiedades dinámicas y mecánicas del sistema, por resolución de ecuaciones de Newton de movimientos para determinar como las posiciones atómicas cambian con el tiempo.

De las segundas derivadas de la energía potencial de superficie se tienen las constantes de fuerza para pequeños desplazamientos; éstas pueden ser

evaluadas y usadas para encontrar los modos normales del sistema ; estos sirven como base para un acercamiento alternativo de la dinámica de la molécula.

Todas las interacciones atómicas y moleculares podrían ser evaluadas por métodos de mecánica cuántica, así como por cálculos de orbitales moleculares (MO). Pero hasta el momento con estos métodos es imposible resolver moléculas grandes; por lo tanto, se han desarrollado métodos basados en mecánica molecular. Este método asume que las interacciones pueden ser descritas adecuadamente por el modelo convencional de campos de fuerza.

Este modelo permite realizar todos los cambios posibles de residuos en la molécula, probar todas las orientaciones posibles de las cadenas laterales, y seleccionar una con una energía más baja (minimización de la energía). Aunque el modelo parezca simple, se requiere de conocimientos estereoquímicos para llevar a cabo el proceso.

Estudios anteriores tienen en cuenta las diferencias en las propiedades estereoquímicas de cada uno de las cadenas laterales de los aminoácidos. Por ejemplo, se ha determinado experimentalmente las diferencias que presentan en la distribución los ángulos de torsión, al cambiar aminoácidos como glicina, prolina, alanina treonina, estos pueden adoptar diferentes conformaciones que afectan la reorientación de la cadena principal.

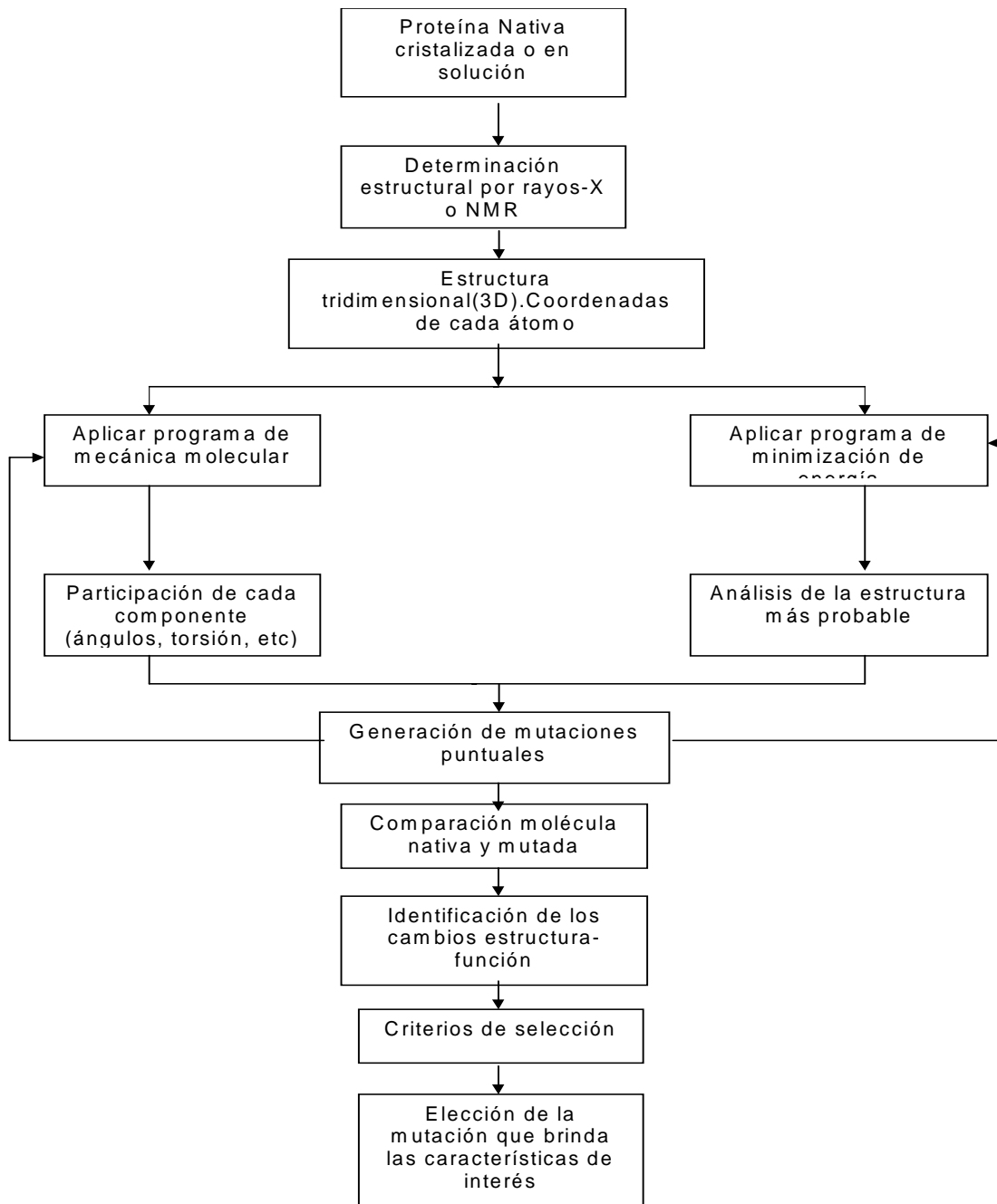
En estos casos se requiere de un cuidadoso análisis de los ángulos de torsión, y de las interacciones estereoquímicas de cada uno de los residuos. También se ha venido estudiando la implicación de la suma o pérdida de posibilidades de formar puentes de hidrógeno, o puentes salinos al realizar diversas mutaciones.

Por lo tanto se requiere de una función de energía potencial empírica aproximada para determinar la conformación de las cadenas laterales entre las interacciones de la estructura conocida y el resto de la proteína.

Con el proceso de minimización de la energía, se pueden determinar estructuras estables potencialmente existentes. Lo óptimo sería definir claramente las estructuras con las energías más bajas. Se puede encontrar varios mínimos en el espacio de energías potenciales que son difíciles de distinguir por los métodos disponibles. La presencia de éstos sugeriría la existencia de más de una conformación de cadenas laterales viables para permitir estabilidad y una mejor interacción de la molécula.

6.7 HERRAMIENTAS COMPUTACIONALES

A pesar de los múltiples experimentos se requieren de avances para la comprensión de la interacción del complejo Mb-ligando. Experimentalmente, no hay metodologías para explicar cada factor que interviene en la interacción y comprensión del proceso. Los componentes de campos de fuerza es lo que se puede manipular y se requiere estimar cada uno. Las herramientas computacionales empleadas en este trabajo se discuten a continuación. El diagrama de flujo que ilustra los pasos metodológicos a seguir se presenta en la figura 20:



**Figura 20. Pasos requeridos en el diseño molecular por computador.
(Schomburg,1990)**

6.7.1 INFORMACIÓN ESTRUCTURAL EN BASES DE DATOS

La información estructural de moléculas determinadas por cristalografía de rayos X o de Resonancia Magnética Nuclear (NMR) no tendrían significancia sino fueran accesibles a la comunidad científica. Las estructuras de proteínas se encuentran archivadas en el Banco de Datos de Proteínas de Brookhaven (PDB) (Bernstein y col.,1977), el cual contiene un número aproximadamente de 13.672 estructuras de proteínas y ácidos nucleicos, que crece rápidamente. Este brinda la posibilidad de obtener las coordenadas de cada uno de los átomos de las moléculas que allí se encuentran. También ofrece un resumen indicando el nombre, el método por el cual fueron determinadas, el número de átomos, residuos, grupos heterogéneos que posee y la fuente de donde provienen. Además clasifica las moléculas por su función, a la vez incluye las referencias bibliográficas correspondientes; permite obtener una descripción detallada de las estructuras tanto primaria como secundaria, y busca relación con otras moléculas de función o estructura similar.

Los estudios de modelos por computador hacen uso de las bases de datos derivadas del Banco de Datos de Proteínas. A través de las coordenadas almacenadas en este banco, se pueden realizar estudios de mecánica y dinámica molecular puesto que los tipos de átomos para determinar dichas coordenadas son sugeridos por GROMOS (van Gunsteren y col., 1996).

Al Banco de Datos de Proteínas (PDB) se puede acceder en Internet en la siguiente dirección: <http://www.rcsb.org.gov>

6.7.2 NCBI/NLM/NIH/ENTREZ

Debido a la importancia de los métodos de información por computador, en la orientación de las investigaciones biomédicas se estableció el NCBI(National Center for Biotechnology Information), como una división del NLM (National Library of Medicine) y el NIH (National Institute of Health).

El NLM, es el encargado del mantenimiento de las bases de datos y a su vez hace parte del NIH.

El NCBI asumió la responsabilidad del GENBANK (Base de Datos de secuencias de DNA), y a través de un entrenamiento avanzado en biología molecular, su personal se encarga de mantener actualizado el banco, alimentándose de secuencias otorgadas por laboratorios particulares y por intercambios con bases de datos de secuencias de nucleótidos entre las que se encuentran: European Bioinformatic Institute (EBI); European Molecular Biology laboratory (EMBL) y DNA Data Bank of Japan (DDBJ). Adicionalmente compila los datos de Swiss-Prot, PIR-International, PDB y GSDB entre otros. Adicionalmente se asocian las secuencias con las referencias bibliográficas guardadas en MEDLINE.

ENTREZ es un motor de búsqueda que permite a los usuarios acceder a toda la información almacenada por el NCBI, ingresando a la siguiente dirección en Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ENTREZ/>),

En ENTREZ se puede realizar los siguientes tipos de búsquedas (Figura 21):

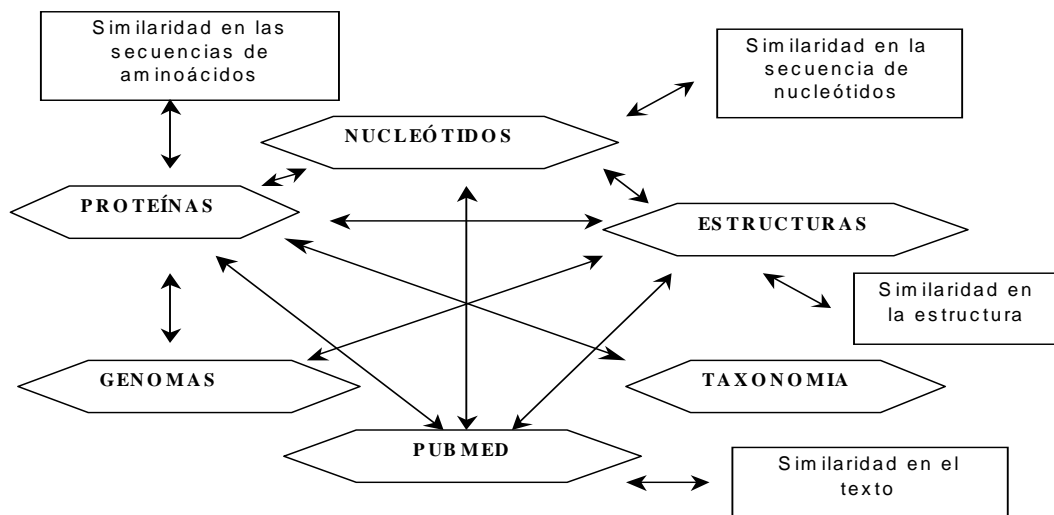


Figura 21. Bases De Datos que constituyen ENTREZ y su interrelación.

6.7.3 Alineamientos de secuencias

Dada la posibilidad de conocer secuencias proteicas de diferentes fuentes, una muestra de esto son las Mb de diferentes organismos, es importante conocer las características comunes entre ellas. Esas características están asociadas con la similaridad en las secuencias. Para conocer esta modalidad, es esencial el adecuado alineamiento de las secuencias de cada molécula de Mb.

Los alineamientos de las secuencias brindan bastante veracidad cuando las secuencias de aminoácidos tienen más del 40 % de identidad. Este porcentaje de identidad indica que las secuencias presentan los mismos aminoácidos y en las mismas posiciones.

Existen muchos programas para realizar este proceso de comparación la mayoría de los programas de computador usan los algoritmos desarrollados por Smith y Waterman (Waterman & Smith, 1981).

En estas técnicas de programación dinámica, se calcula una matriz que cuenta cuantos y donde existen residuos idénticos o conservados dentro de la secuencia. Los puntajes obtenidos se modifican si para alcanzar el mejor alineamiento es necesario introducir brechas de las secuencias (Figura 22).

Algunos programas solo dan una multa para alguna inserción/supresión, otros siguen un incremento en las multas dependiendo de la longitud de la inserción /supresión.

```
ANNIKAKAREN
ANNIKA - - REN
* * * * * * * * * *
```

Figura 22. Alineamiento de dos secuencias cortas usando la matriz de Smith-Waterman. (* Para identidad, - para supresión)

En general se trata de identificar las zonas más conservadas (High Scoring Pair ,HSP) que deberán estar asociadas con la función común a todas las moléculas estudiadas.

6.7.4 BLAST (BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL)

Uno de los programas de alineamiento más común y utilizado en este estudio es el algoritmo de BLAST. Este utiliza un algoritmo de búsqueda de similitud que otorga significancia estadística a sus hallazgos, usando los métodos estadísticos de Karlin & Altschul (Maden y col.,1996). Fue desarrollado por el NCBI, y se puede acceder a través de internet en la siguiente dirección:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

La estrategia utilizada por este programa se fundamenta en el alineamiento de secuencias de nucleótidos o proteínas para encontrar entre ellas regiones que se conserven y/o que tengan cierta identidad o similitud.

El resultado viene dado por los HSPs (High Scoring Pair), los cuales están definidos como dos fragmentos de secuencia de longitud igual pero arbitraria, en los cuales el alineamiento es localmente el máximo. Adicionalmente, también tiene en cuenta los MSPs (Maximal-Scoring Segment Pair), el cual identifica los resultados más altos de todos los posibles pares de segmentos que puede ser producido a partir de dos secuencias.

Para obtener un resultado de una búsqueda en BLAST, éste programa realiza el siguiente procedimiento:

- a. localiza los HSPs entre la secuencia a estudiar y todas las secuencias consignadas en la base de datos.
- b. Evalúa la significancia de los resultados.
- c. Reporta aquellos datos que satisfacen un resultado de significancia para el usuario (Waterman,1996).

d. Blast ofrece como resultado un histograma en el cual se resume los resultados obtenidos en la búsqueda.

En la Tabla 1 se observa a modo de ejemplo el informe arrojado por BLAST en este caso al comparar la mioglobina de ballena con todo el banco de datos.

Secuencias	Identidad (%)
pdb 1DUK A Chain A, Wild-Type Recombinant Sperm Whale Metaq	100%
sp P02185 MYG_PHYCA MYOGLOBIN >gij70558 pir MYWHP myoglobi.	100%
pdb 1ABS Photolysed Carbonmonoxy-Myoglobin At 20 K >gij	99%
prf 742482A myoglobin [Physeter catodon]	98%
pdb 1MLM Myoglobin (Carbonmonoxy) Mutant With Initiator	95%
pdb 1CIO A Chain A, Recombinant Sperm Whale Myoglobin I99v .	95%
pdb 1MLS Myoglobin (Met) Mutant With Initiator Met, Val	95%
pdb 1CO9 A Chain A, Recombinant Sperm Whale Myoglobin L104v	95%
pdb 2SPO Myoglobin (Met) Mutant With Initiator Met, Leu	95%
pdb 2SPM Myoglobin (Met) Mutant With Initiator Met, Asp	95%
pdb 1MLF Myoglobin (Carbonmonoxy) Mutant With Initiator	95%
pdb 1CP5 A Chain A, Recombinant Sperm Whale Myoglobin L104f	95%
pdb 1CH2 A Chain A, Recombinant Sperm Whale Myoglobin L89f	95%
pdb 1CIK A Chain A, Recombinant Sperm Whale Myoglobin I99a	95%
pdb 1DUO A Chain A, Sperm Whale Metaquomyoglobin Proximal H	95%
pdb 1CO8 A Chain A, Recombinant Sperm Whale Myoglobin L104a	95%
pdb 1MLL Myoglobin (Met) Mutant With Initiator Met, Val	95%
pdb 1DTM A Chain A, Crystal Structure Of The Sperm-Whale My	95%
pdb 1CPW A Chain A, Recombinant Sperm Whale Myoglobin L104w	95%
pdb 1MGN Metmyoglobin Mutant With Initiator Met, Asp 12	95%
pdb 1DO1 A Chain A, Carbonmonoxy-Myoglobin Mutant L29w At 1	95%
pdb 1CH3 A Chain A, Recombinant Sperm Whale Myoglobin L89w	95%
pdb 1MTI Mol_id: 1; Molecule: Myoglobin; Chain: Null; E	95%
pdb 1LTW Recombinant Sperm Whale Myoglobin 29w Mutant	95%
pdb 1A6M Oxy-Myoglobin, Atomic Resolution >gij4699527 p	95%
pdb 1MYM Myoglobin (Carbonmonoxy) Mutant With Initiator	95%
pdb 1CP0 A Chain A, Recombinant Sperm Whale Myoglobin L104n	95%
pdb 1MCY Sperm Whale Myoglobin (Mutant With Initiator M	95%
pdb 1CH9 A Chain A, Recombinant Sperm Whale Myoglobin H97q	95%
pdb 1CH1 A Chain A, Recombinant Sperm Whale Myoglobin L89g	95%
pdb 2MGF Myoglobin (Carbonmonoxy) Mutant With Initiator	95%
pdb 1DTI A Chain A, Recombinant Sperm Whale Myoglobin H97d,	95%
pdb 1CH7 A Chain A, Recombinant Sperm Whale Myoglobin H97f	95%
pdb 102M Sperm Whale Myoglobin H64a Aquomet At Ph 9.0 >	95%
pdb 2MGB Myoglobin (Met) Mutant With Initiator Met, His	95%
pdb 1MOC Myoglobin (Carbonmonoxy) Mutant With Initiator	95%
pdb 2MGE Myoglobin (Met) Mutant With Initiator Met, Asp	95%
pdb 1A6G Carbonmonoxy-Myoglobin, Atomic Resolution	95%
pdb 2MGJ Myoglobin (Met) Mutant With Initiator Met, Asp	95%

Tabla 1. Porcentajes de identidad de la mioglobina de ballena respecto a las mioglobinas del Banco de Datos (BLAST)

6.7.5 Swiss-pdbviewer

Uno de los programas más importantes para este trabajo es el denominado Spdbviewer 3.5.

El Spdbviewer es un programa distribuido de forma libre con derechos reservados para modificaciones. A través de él se manipulan una o varias moléculas a la vez para analizarlas al mismo tiempo; se interponen secuencias de proteínas y por alineamientos se determinan sitios activos, u otras zonas relevantes entre ellas; se obtienen puentes de hidrógeno, ángulos, distancias entre átomos; permite hacer mutaciones en una secuencia, minimizaciones energéticas, determinación de campos de fuerza y crear premodelos de estructura a enlace con un programa conocido como Swiss-Model.

Cada molécula y sus coordenadas deben ser tomadas del Banco de Datos de Proteínas (PDB).

A este programa se accede en las siguientes direcciones:

<http://expasy.ch/spdb/mainpage.htm>

<http://expasy.proteome.org.au/spdv>

Este programa ofrece la posibilidad de realizar cálculos de la energía de superficie, potencial electrostático, minimización de la energía de un sistema molecular, y cambios estructurales con el cálculo de RMS. La desviación media de mínimos cuadrados (Root-Mean-Square Deviation, RMSD), es una de las herramientas más usadas en el diseño de proteínas. Si la diferencia en el valor de RMSD de una molécula diseñada y una molécula patrón se encuentra en un rango $< 0,2 \text{ \AA}$, entonces indica que la estructura diseñada puede ser muy parecida a la patrón. El cálculo de RMS se genera por la superposición de los centros de las estructuras junto con el cálculo de rotaciones que minimizan todos los valores. (ecuación 14)

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r_i - r'_i)^2} \quad (14)$$

Donde N es el número de átomos comparados, r y r' son las coordenadas atómicas para la estructura patrón y la estructura diseñada, respectivamente. El potencial electrostático de proteínas está formado por las cargas de las cadenas laterales de cada aminoácido; éstos cumplen un papel importante en el plegamiento y la estabilidad de la proteína, así como también, en catálisis enzimática o en interacción proteína-proteína, o, como se ha citado en este trabajo, proteína-ligando.

En general los potenciales electrostáticos pueden visualizarse a través de un mapa, en donde los potenciales positivos se muestran en azul y los negativos en rojo (Figura 23). Este potencial varía de acuerdo a las condiciones del solvente y al tipo de interacción entre las moléculas.

Swiss-pdbviewer incluye una versión de GROMOS.43B1, basado en el modelo de campos de fuerza (van Gunsteren y col.,1996), permitiendo de esta manera evaluar también la energía de la estructura, realizar mutaciones puntuales en la molécula, y obtener geometrías mucho más estables.

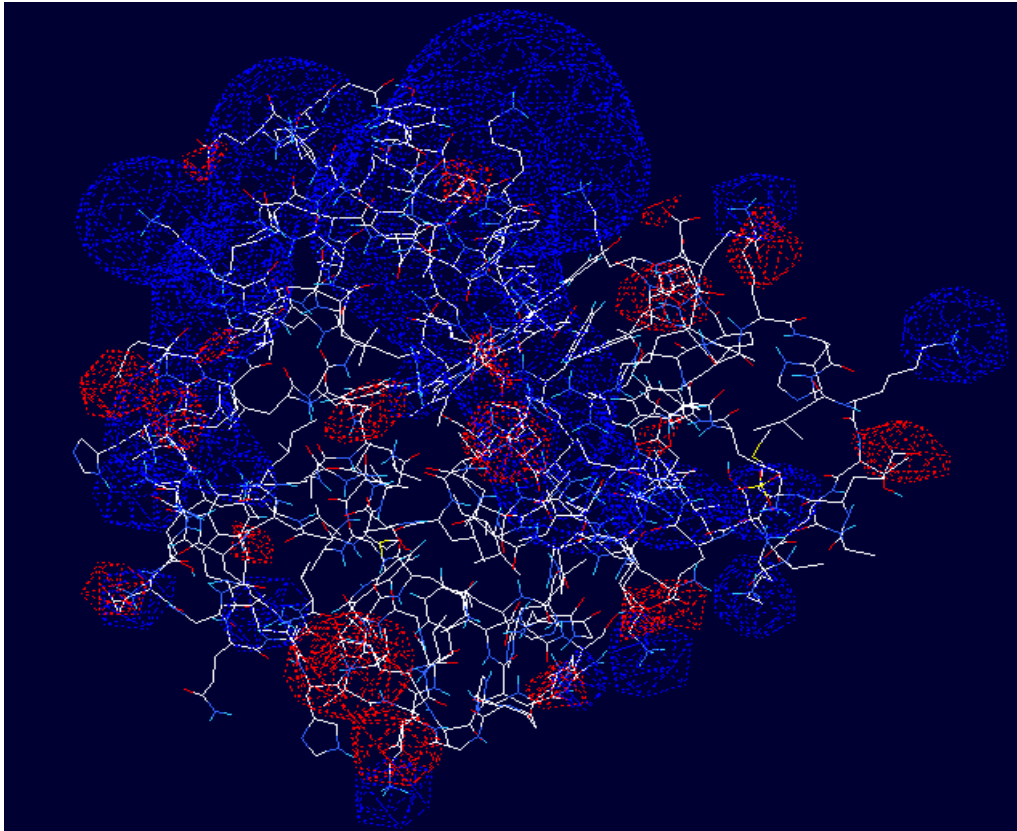


Figura 23. Potencial electrostático de la molécula de mioglobina

6.7.6 Programa “ProtScale”

ProtScale es una aplicación que posee diversas herramientas para determinar propiedades como volumen, peso molecular, punto isoeléctrico, hidrofobicidad, polaridad, área oculta etc, a partir de la secuencia primaria en una proteína seleccionada. Además permite calcular y obtener un perfil de las propiedades fisicoquímicas para cada aminoácido que conforma una proteína nativa o mutada.

Las escalas para los diferentes parámetros son definidas por un valor numérico asignado para cada uno de los aminoácidos. Frecuentemente las escalas usadas son de hidrofobicidad e hidrofiliidad, escalas de parámetros de conformación de la estructura secundaria, también escalas que se basan

en diferencias químicas y propiedades físicas de los aminoácidos. Este programa brinda 50 escalas predeterminadas, que se encuentran en la literatura.

Las escalas de las propiedades analizadas para los 20 aminoácidos en este trabajo se observan en la Tabla 2.

En el momento de diseñar una proteína es importante conocer propiedades físico-químicas como la hidrofobicidad, polaridad, flexibilidad, área oculta etc. de los aminoácidos que la conforman para así realizar una buena predicción de su estructura y funcionamiento.

Se dice que una sustancia hidrofóbica es realmente soluble en solventes no polares y poco o nada soluble en agua. En el plegamiento de una proteína, los residuos con cadenas laterales no polares serán comprimidos en el interior de la molécula. El efecto es análogo a la segregación del aceite en agua, con la distinción importante de que los residuos en las proteínas son covalentemente unidos a sus vecinos y no pueden participar independientemente.

Para cuantificar este efecto, muchas escalas de hidrofobicidad para aminoácidos han sido propuestas. Tales escalas han sido calculadas sobre medidas de solución o por cálculos empíricos. Las primeras se basan en coeficientes de distribución entre una fase acuosa y una fase orgánica, mientras que las empíricas se basan sobre particiones entre la superficie accesible al solvente y el interior oculto o área oculta de los residuos en proteínas con estructura conocida. (Rose,1985; Eisenhaber,1995; Eisenhaber,1996; Hubbar,1994).

En este trabajo se utiliza las escalas de hidrofobicidad según la aproximación de Kyte & Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982). Estos dos grupos han llevado a cabo trabajos en donde la hidrofobicidad del aminoácido está estrechamente ligada a el área accesible y oculta , es decir han determinado que el área oculta de un residuo en el plegamiento de una proteína es proporcional a la contribución hidrofóbica para la energía libre conformacional (ΔG_{conf}), y la

accesibilidad de un residuo se define como el cociente entre el área media accesible en la molécula, dividido por el área en un estado estándar. La accesibilidad es una medida intrínseca de la hidrofobicidad.

La polaridad es una de las principales propiedades químicas de los residuos que los hace aptos para hacer parte fundamental en la estructura y función de una proteína. Estudios anteriores han calculado una escala de polaridad de aminoácidos determinando que las mutaciones de estos, con respecto a la polaridad, pueden explicar la evolución de las proteínas. (Grantham, 1974). Cuando una molécula se encuentra en un campo eléctrico, una fuerza en la misma dirección es impuesta sobre partículas cargadas negativamente en la molécula, mientras que cada partícula cargada positivamente recibe un fuerza en la dirección opuesta. La distribución de cargas en una molécula tiende a ser más inclinada en presencia de un campo eléctrico en un espacio libre. De acuerdo a esto, el momento dipolar de una molécula situada en un campo eléctrico tiende a aumentar si la molécula es polar o no. El incremento del momento dipolar atraído por un campo eléctrico es llamado momento dipolar inducido.

La polarizabilidad es asumida para cada átomo en una molécula como una esfera rígida centrada en un núcleo con los radios covalentes y las cargas de los núcleos y los electrones del alrededor concentrados en el centro para formar un punto con carga neta, llamada la carga neta efectiva.

El momento dipolar efectivo o carga neta efectiva de una unidad monomérica de una cadena polimérica, en forma general, es una función a la vez de caracterización de parámetros del obstáculo para la rotación interna. Es por tanto que la flexibilidad de cada residuo dentro de la conformación de la molécula, es también importante en el momento de definir el momento dipolar referido a una unidad, el cual depende no solo de la estructura interna, sino también de una interacción intramolecular. Estudios sobre la rotación interna de moléculas poliméricas sugiere que las unidades de las cadenas pueden rotar libremente para cada una.

Considerando una única cadena polimérica aislada donde los átomos de carbono están unidos solo por enlaces δ , se supone que los ángulos de valencia de las cadenas no están fijos y las unidades rotan libremente alrededor de los enlaces δ . Esto es conocido como cadenas de unión libre. El interés de conocer la flexibilidad de los polímeros y lo que conduce a obtener un número de conformaciones está dado comúnmente por una sucesión de N pasos (enlaces) de determinada longitud (L_i); que unen $N+1$ átomos (A_0, A_1, A_N).

Dentro de las conformaciones que tiene una macromolécula se debe tener en cuenta los radios cuadrados de giro de cada una de las cadenas que conforman la cadena polimérica. Este radio de giro es definido como:

$$s^2 = \frac{1}{N+1} \sum_{i=0}^N (r_i - q)(r_i - q) \quad (15)$$

Donde q es el vector centro de masa

$$(N+1)^{-1} \sum_i r_i : \quad (16)$$

Actualmente se define como:

$$S^2 = \frac{\sum_{i=0}^N m_i s_i^2}{\sum_{i=0}^N m_i} \quad (17)$$

Donde m_i es la masa de A_i y s_i es la distancia al centro de masa. (Machida,1999)

Aminoácido	Volumen	Hidrofobicidad	Flexibilidad	Polaridad	Area oculta
Alanina	11.50	1.800	0.360	8.100	86.600
Arginina	14.280	-4.500	0.530	10.500	162.200
Asparagina	12.820	-3.500	0.460	11.600	103.300
Aspártico	11.680	-3.500	0.510	13.000	97.800
Cisteína	13.460	2.500	0.350	5.500	132.300
Glutamina	14.450	-3.500	0.490	10.500	119.200
Glutámico	13.570	-3.500	0.500	12.300	113.900
Glicina	3.400	-0.400	0.540	9.000	62.900
Histidina	13.690	-3.200	0.320	10.4000	155.800
Isoleucina	21.400	4.500	0.460	5.200	158.000
Leucina	21.400	3.800	0.370	4.900	164.100
Lisina	15.710	-3.900	0.470	11.300	115.500
Metionina	16.250	1.900	0.300	5.700	172.900
Fenilalanina	19.800	2.800	0.310	5.200	194.100
Prolina	17.430	-1.600	0.510	8.000	92.900
Serina	9.470	-0.800	0.510	9.200	85.600
Treonina	15.770	-0.700	0.440	8.600	106.500
Triptófano	21.670	-0.900	0.310	5.400	224.600
Tirosina	18.030	-1.300	0.420	6.200	177.700
Valina	21.570	4.200	0.390	5.900	141.000

Tabla 2. Escalas de volumen, hidrofobicidad, flexibilidad, polaridad y área oculta de aminoácidos del programa ProtScale.

Al definir la relación existente entre estructura y función, también es importante conocer la influencia de la estructura de cada aminoácido en la totalidad del sistema molecular. Una característica relevante se refiere al volumen ocupado por cada residuo.

El conocimiento geométrico de cada uno conlleva al conocimiento geométrico total de la proteína. En este análisis se debe tener en cuenta una serie de puntos en tres dimensiones, así como la geometría de sus átomos antes que las características químicas de estos. Se dice que cristalográficamente se tiene en cuenta las posiciones de los átomos, realizando una aproximación de los números atómicos, pero no de las cargas y del número de puentes de hidrógeno. Para propósitos de la relación estructura-función en este trabajo se ha tenido en cuenta la escala de volumen para cada residuo basada en el poliedro de Voronoi. (Voronoi, 1908, Eisenhaber y col., 1995)

Este poliedro provee una útil manera de construir la división del espacio entre una grupo de átomos. Cada átomo se encuentra circundado por un poliedro y localizado allí dentro de un espacio determinado. Las caras de este son formadas por la construcción de los planos de división perpendiculares a los vectores que unen los átomos.

6.7.7 Programa “Statística”

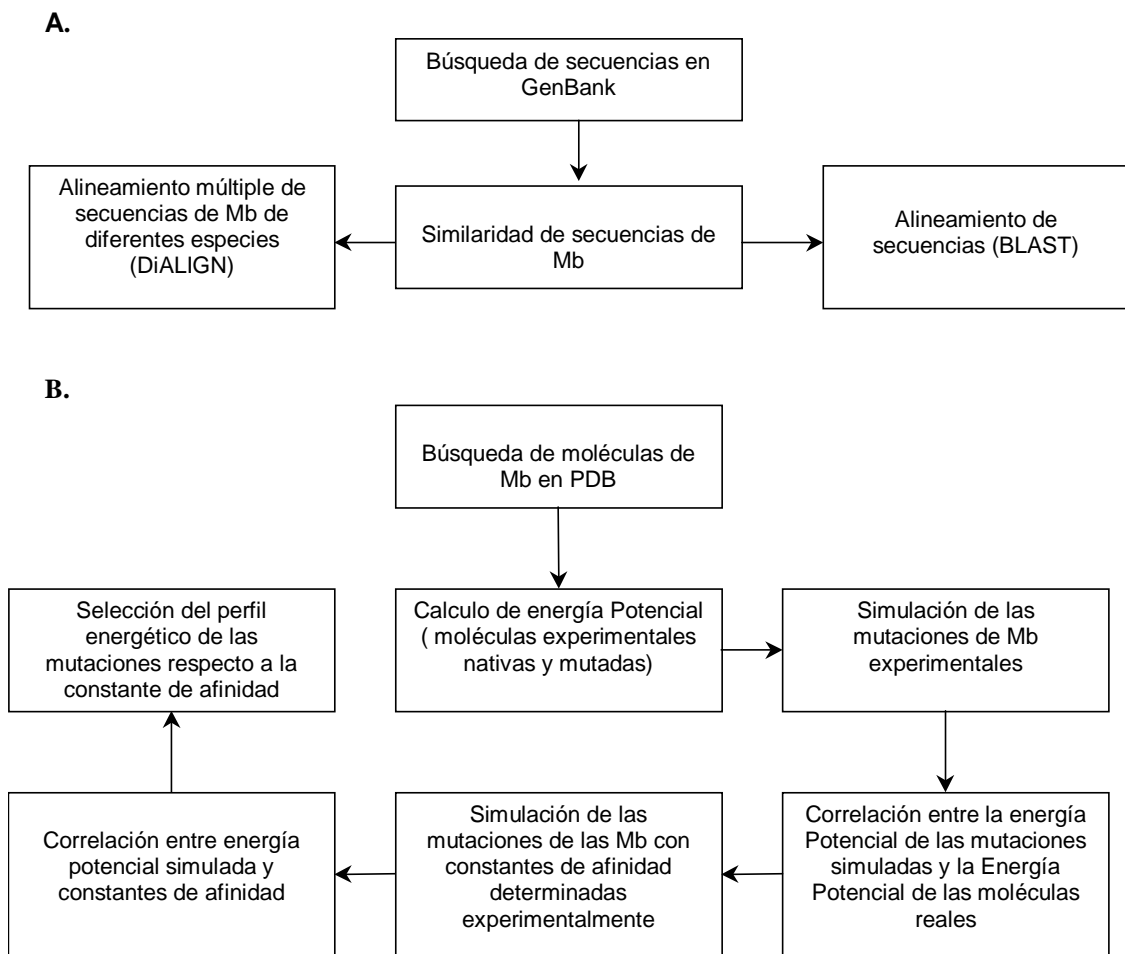
Statistica 6.0 es un programa creado por Statsoft del cual se puede obtener información accediendo a la siguiente dirección en internet:

<http://www.statsoft.com>. Este programa incluye un paquete de herramientas estadísticas, que permite obtener respuestas a las sucesivas preguntas de diversas investigaciones. Dentro de los métodos estadísticos sugeridos se encuentran:

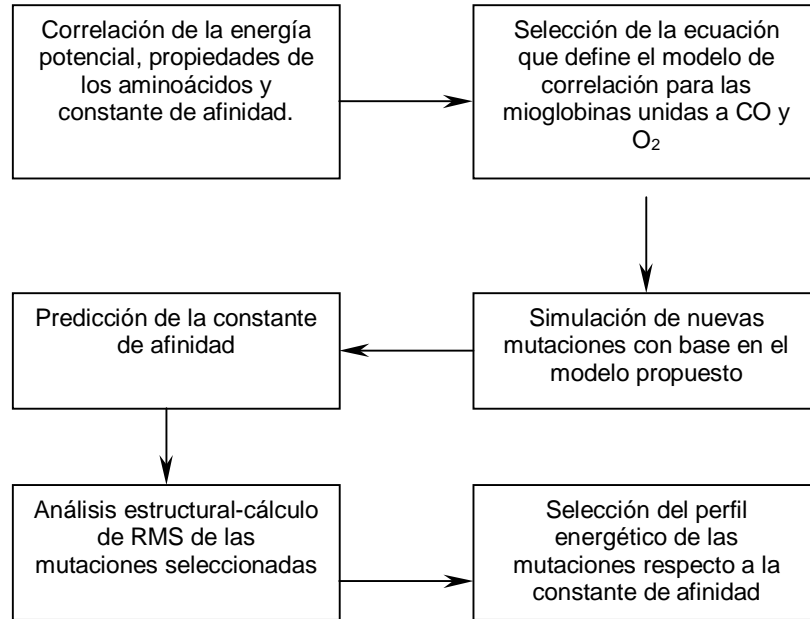
1. Estadística descriptiva: forma y distribución de variables, en las que se encuentran cálculo de media, mediana, desviación estándar, varianza, cuartiles, percentiles, a la vez que permite computar tablas de distribución de frecuencias, visualizadas en histogramas.
2. Pruebas de hipótesis: Este módulo permite realizar comparaciones entre las variables observadas, y distribuciones teóricas, tales como distribuciones normales, distribuciones gamma, chi cuadrado exponenciales, geométricas y binomiales. La significancia estadística permite evaluar las discrepancias entre los datos observados y los respectivos datos teóricos.
3. Exploración de datos y búsqueda de estructuras, patrones y clusters: Este módulo permite realizar análisis de componentes principales y de factores. Estos métodos buscan relaciones entre múltiples variables, en los que se encuentran análisis de clusters para realizar árboles basados en medidas de distancias.

4. Cómputos estadísticos para control de calidad industrial: A través de este módulo se logra obtener muestras secuenciales para medias, frecuencias binomiales y frecuencias de Poisson.

7 PROCEDIMIENTO



C.



A.

7.1 BÚSQUEDA DE SECUENCIAS DE MIOGLOBINAS DE DIFERENTES ORGANISMOS

Para la búsqueda de las secuencias de las mioglobinas de diferentes organismos se accedió al banco de datos GenBank empleando el sistema ENTREZ.

Se seleccionaron las siguientes secuencias de mioglobina: la Mb de humano con número de acceso P02144, cuya comprensión es el objetivo final de este trabajo. La Mb de *Ascaris suum* con número de acceso: P49672, por estar reportada como la de más alta afinidad por el O₂. La Mb de ballena con número de acceso: P02185, por ser la que mayor número de estructuras y mutaciones experimentales estudiadas. Una vez identificadas cada una de las secuencias se utilizó el formato FASTA para someterlas a alineamientos con todo el banco utilizando el programa BLAST.

7.2 SIMILARIDAD DE SECUENCIAS

Las secuencias de mioglobinas de ballena, humana y *Áscaris suum* fueron sometidas al programa BLAST.

A los resultados de los diferentes alineamientos se les realizó el análisis respectivo de las secuencias que reportaron los puntajes más altos de similaridad, realizando un consenso de las secuencias de mioglobinas de otras especies representativas.

Todas las secuencias derivadas del consenso, fueron sometidas al programa de alineamiento múltiple DiALING, junto con las mioglobinas de *Ascaris suum*, para identificar las zonas comunes o HSP's

Posteriormente se identificaron las secuencias de mioglobina que poseen estructura tridimensional y que aparecen registradas en el Banco de Datos de Proteínas (PDB), entre las que se encuentran: de mioglobinas nativas de: elefante (P02186); Mb de caballo (P02188); Mb de cerdo (P02189); Mb humana (P02144); Mb de ballena (P02185); Mb de *Ascaris suum* (P49672); Mb de *Aplisia limacina* (CAA558) y la Mb de tortuga (P56208). A cada una de las secuencias se les observaron similitudes y diferencias entre ellas, con énfasis en los residuos distales y proximales al grupo hemo de la molécula.

B

7.3 IDENTIFICACIÓN DE MIOGLOBINAS DETERMINADAS EXPERIMENTALMENTE POR CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X

Se realizó una búsqueda abierta en el Banco de Datos de Proteínas (PDB) de las moléculas de mioglobina determinadas experimentalmente por cristalografía de rayos X con una resolución no mayor a 2.0 Å.

Una vez obtenido el banco de mioglobinas se clasificaron en mioglobinas nativas con y sin ligando y mutadas con y sin ligando.

Los ligandos que se tuvieron en cuenta fueron los siguientes: monóxido de carbono, oxígeno, cianuro, óxido nitroso, y agua.

Se clasificaron las moléculas de mioglobina de acuerdo a las diferentes especies, reportadas en el Banco de datos de Proteínas (PDB), cuyas secuencias también fueron sometidas a alineamiento. Todas las estructuras con las que se desarrolló el modelo provienen de estudios de difracción de

rayos X sobre cristales, con un relativamente bajo número de moléculas de agua, proporción por la cual se consideran como estructuras determinadas “al vacío”.

7.4 CALCULO DE ENERGÍA POTENCIAL MINIMIZADA DE LAS MOLECULAS DE MIOGLOBINA DETERMINADAS EXPERIMENTALMENTE AL VACIO

Utilizando el programa computacional Spdbviewer 3.5 se procedió al cálculo de la minimización de la energía potencial del banco de mioglobinas obtenidas.

A cada una de las moléculas de mioglobina nativas con y sin ligando y mutadas con y sin ligando se les calculó la energía potencial utilizando la herramienta "energy minimisation". Como resultado se obtienen las energías debidas a enlace (enlace, ángulos y torsión) y energías debidas a no enlace (no-enlace, electrostática). Cada una de las moléculas fueron minimizadas utilizando los mismos criterios a seguir:

- Minimización en 3 pasos, tomando como punto de corte en cada uno 100 iteraciones
- Corte 10.000 Å
- Detener el cálculo cuando ΔE entre dos pasos consecutivos esté por debajo de 0.05 KJ/mol.
- Incluir en el cálculo de la energía todos los parámetros discutidos (ángulos, torsión, no-enlace, electrostática).

7.5 ANÁLISIS DE LOS VALORES DE ENERGÍA POTENCIAL MINIMIZADA DE LAS MIOGLOBINAS DETERMINADAS EXPERIMENTALMENTE AL VACIO POR CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X

Para determinar el rango de variación de los valores de energía de las moléculas de mioglobina nativas con ligando y sin ligando se utilizaron estadísticas descriptivas y se determinó el coeficiente de variación.

Se clasificaron cada una de las moléculas por grupos teniendo en cuenta aquellas nativas que unen ligandos como CO, O₂, NO, CN y H₂O.

Se generaron grupos de moléculas con mutaciones específicas que unen los ligandos respectivos y moléculas con la mutación correspondiente a cada grupo sin ligando.

7.6 ANÁLISIS DE LA RELACIÓN DE ENERGÍA ENTRE MACROMOLÉCULA LIGANDO

La comparación de las varianzas de dos poblaciones se basa por lo general en la prueba de la relación de varianzas, que es una prueba de hipótesis nula que indica si las varianzas de dos poblaciones son iguales. Cuando son ciertas dichas suposiciones la relación entre las variables de una y otra población siguen una distribución F .

Para este análisis se utilizó en un principio una prueba con distribución F para varianzas y así poder seleccionar el tipo de prueba utilizando el estadístico t , para varianzas iguales o desiguales a utilizar según el resultado del valor de p en la prueba F . Es decir, para determinar si el valor observado de el estadístico de prueba es significativo o no, se informa la probabilidad (p) exacta de obtener un valor tanto o mas extremo que el observado, es decir si la hipótesis nula es verdadera; en este caso que las varianzas de las dos poblaciones son iguales, tanto de los valores de energía de las

mioglobinas nativas sin ligando como los valores de las energías de las mioglobinas nativas con ligando. Es decir p puede definirse también como el valor más pequeño para α por el cual la hipótesis nula se puede rechazar. En otras palabras si el valor de p es menor que α , es posible rechazar la hipótesis nula. Si el valor p es mayor o igual que α , no es posible rechazar la hipótesis nula. En este caso se utilizó $\alpha = 0.05$

7.7 SIMULACION DE LAS MUTACIONES DE LAS MIOGLOBINAS DETERMINADAS EXPERIMENTALMENTE

La simulación se inicia cargando la molécula nativa para cada uno de los ligandos a estudiar. Para la simulación de las mutaciones de las mioglobinas unidas a O_2 se utilizó la molécula de mioglobina nativa de ballena unida a O_2 minimizada, registrada en el Banco de Datos de Proteínas como 1MBO.

En las simulaciones de las mutaciones de las mioglobinas unidas a CO se utilizó la molécula nativa de ballena minimizada unida a CO registrada en el Banco de Datos de Proteínas como 1 VXC.

En las simulaciones de las mutaciones de las moléculas unidas a NO y H_2O se utilizaron las moléculas nativas de ballena minimizadas registradas en el Banco de Datos de Proteínas como 1HJT y 1VXE respectivamente.

Una vez clasificadas las moléculas nativas de cada grupo de ligando, se seleccionaron el o los aminoácidos a mutar individualmente.

Con la herramienta denominada “mutation” de programa Spdbviewer se selecciona el aminoácido por el cual se quiere hacer el cambio, se acepta la mutación y se minimiza.

Se simularon las moléculas de mioglobina cuyas mutaciones experimentales presentaron valores mínimos de energía potencial significativos respecto a las nativas de cada grupo.

7.8 CORRELACION ENTRE LOS VALORES DE ENERGÍA DE LAS MIOGLOBINAS EXPERIMENTALES Y LAS MUTACIONES SIMULADAS

Para este análisis se utilizó en un principio una prueba F para varianzas y así poder seleccionar el tipo de prueba t , (para varianzas iguales o desiguales) a utilizar según el valor de p en la prueba F , determinando por consiguiente la homogeneidad de los datos en una y otra variable, como se explicó en el numeral 7.6.

Para determinar si el valor observado del estadístico de prueba es significativo o no, se informa la probabilidad exacta de obtener un valor tanto o más extremo que el observado, es decir si la hipótesis nula es verdadera, en este caso que las varianzas de las dos poblaciones son iguales, tanto de los valores de energía reales como los valores de las energías simuladas. Es decir p puede definirse también como el valor más pequeño para α por el cual la hipótesis nula se puede rechazar.

En otras palabras si el valor de p es menor que α , es posible rechazar la hipótesis nula. Si el valor p es mayor o igual que α , no es posible rechazar la hipótesis nula. En este caso se utilizó $\alpha = 0.05$

Se realizó una prueba de hipótesis utilizando el estadístico de prueba t suponiendo varianzas iguales. Se relacionaron los valores de energía correspondientes a enlace, ángulos, torsión, no-enlace, electrostáticas y total de las moléculas simuladas y los valores de energía de las moléculas experimentales.

7.9 BÚSQUEDA DE LAS CONSTANTES DE AFINIDAD DE MIOGLOBINAS DETERMINADAS EXPERIMENTALMENTE

Con base en referencias bibliográficas se obtuvo un banco de datos de constantes de afinidad de mioglobinas mutadas y nativas con ligandos como O₂ y CO que han sido reportadas con base en estudios experimentales.

La técnica de determinación experimental de estas constantes de afinidad fue descrita por Rohlfis y col., 1989

7.10 SIMULACIÓN DE MUTACIONES DE MIOGLOBINAS PARA LAS CUALES EXISTEN CONSTANTES DE AFINIDAD REPORTADAS EXPERIMENTALMENTE

Para cada molécula que posee constante de afinidad determinada experimentalmente se realizaron las simulaciones de las mutaciones correspondientes, mutando la nativa que une O₂ (1MBO) y la nativa que une CO (1VXC), como se explica en el numeral 7.7

7.11 CORRELACIÓN DE LAS CONSTANTES DE AFINIDAD Y LOS VALORES DE ENERGÍA DE LAS MUTACIONES SIMULADAS

Para los dos grupos tanto de mioglobinas con mutaciones simuladas y constante de afinidad determinada experimentalmente que unen CO y O₂ se realizó un análisis de regresión múltiple, inicialmente tomando como variable dependiente la constante de afinidad y como variable independiente la energía total, de corto alcance (enlace, ángulo, torsión) y de largo alcance (no-enlace, electrostática).

En un segundo análisis de regresión múltiple se tomó como variable independiente la proporción de cambio de la energía potencial total de corto y

largo alcance de la molécula mutada respecto a la molécula nativa, (**Proporción de cambio** = E: largo alcance mutada/nativa) y como variable dependiente la proporción de cambio de la constante de afinidad de la molécula mutada respecto a la constante de afinidad de la molécula nativa. (**Proporción de cambio** = constante de afinidad mutada/nativa)

7.12 ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LAS MOLÉCULAS DE MIOGLOBINAS MUTADAS Y NATIVAS

Haciendo uso de las herramienta RMS del programa Spdbviewer se puede evaluar los cambios estructurales de las moléculas de mioglobinas con constante de afinidad determinadas experimentalmente que unen O₂ y las mioglobinas que unen CO, así como también el efecto estructural de cada mutación respecto a la molécula nativa de cada grupo. Este análisis se realizó con base en los valores obtenidos para el RMS. Se considera que para valores mayores de 0,1 Å se produce cambio significativo en la estructura.

C.

7.13 CORRELACIÓN DE LOS VALORES DE ENERGÍA POTENCIAL, PROPIEDADES DE LOS AMINOÁCIDOS MUTADOS Y LAS CONSTANTES DE AFINIDAD DETERMINADAS EXPERIMENTALMENTE

Para el análisis de las propiedades de los aminoácidos como volumen, hidrofobicidad, polaridad, flexibilidad y área oculta se usaron diferentes herramientas computacionales existentes dentro del programa ProtScale. Allí se analizó la secuencia nativa de ballena (P02185) y se le calculó cada

variable a cada uno de los aminoácidos en las posiciones 29, 64, 67 y 68 de acuerdo a las escalas numéricas predeterminadas por el programa

Una vez obtenidos los valores nativos para cada residuo se mutan los de interés, y se calcula de nuevo la misma variable. Teniendo en cuenta los valores de los aminoácidos nativos y de los aminoácidos mutados se halló la proporción de cambio que explica el efecto de cada mutación respecto a la molécula nativa. (volumen mutada/nativa; hidrofobicidad mutada/nativa; polaridad mutada/nativa; área oculta mutada/nativa; etc.)

A cada grupo de moléculas simuladas con constante de afinidad determinada experimentalmente tanto las unidas a O₂ y CO se les realizaron análisis de regresión múltiple, tomando como variables independientes las proporciones de cambio de variables de energía potencial de corto alcance, energía potencial de largo alcance, volumen, hidrofobicidad, polaridad, flexibilidad, y área oculta y así observar la dependencia de la relación de cambio de constante de afinidad respecto a estos parámetros. Seguidamente se realizó un análisis descriptivo de cada uno de los residuos mutados relacionándolos con los cambios en cada una de las variables.

7.14 DETERMINACIÓN DE LA ECUACIÓN DE REGRESIÓN QUE EXPLICA LA DEPENDENCIA DE LA CONSTANTE DE AFINIDAD RESPECTO A LAS PROPIEDADES DE LOS AMINOÁCIDOS

Una vez realizado el cálculo de regresión para cada uno de los grupos de moléculas de mioglobina con mutaciones simuladas y con constante de afinidad determinadas experimentalmente que unen O₂ y CO, se identificaron las variables que permiten predecir la constante de afinidad para cada grupo, teniendo en cuenta aquellas que en la ecuación presentan valores de coeficiente altos.

7.15 DETERMINACIÓN DE CONSTANTE DE AFINIDAD PARA LAS MOLECULAS DE MIOGLOBINA CON NUEVAS MUTACIONES SIMULADAS.

Se realizaron nuevas mutaciones simuladas, haciendo uso del programa Spdbviewer como se explicó en el numeral 7.7. Teniendo en cuenta que la ecuación según el modelo establecido se ajusta solo a mutaciones en una sola posición, en este caso en las posiciones 29, 64 y 67, se realizaron las mutaciones solo en estas posiciones.

A cada simulación se le calculó los valores de las variables (volumen, hidrofobicidad, área oculta, etc.) así como se explica en el numeral 7.13, seguido del cálculo de la proporción de cambio, del aminoácido mutado respecto al nativo. Una vez obtenidos los valores de las variables se calculó la constante de afinidad para cada mutación haciendo uso del programa statistica, con base en el modelo de regresión obtenido anteriormente para cada grupo de moléculas.

7.16 PRE-SELECCIÓN Y ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LAS MOLÉCULAS DE MIOGLOBINA QUE SE AJUSTAN AL MODELO ESTABLECIDO.

La selección de las moléculas que más se ajustan a un modelo predictivo se realizó teniendo en cuenta aquellas mutaciones que aumentan la constante de afinidad para O₂ y a su vez disminuyen la constante de afinidad para CO, así como también aquellas que no producen un cambio significativo en la estructura de acuerdo a los valores del cálculo de RMS en cada mutación.

7.17 SELECCIÓN DE CRITERIOS Y DE LOS RESULTADOS MÁS SIGNIFICATIVOS DE LOS PERFILES ENERGÉTICOS HALLADOS

Para la selección de la molécula de mioglobina con las características adecuadas para el logro de los objetivos, se tuvo en cuenta los siguientes criterios:

1. Diferencia mínima en la estructura ($RMS \leq 0,1$)
2. Valor de energía mínimo.
3. El Δ de energía debido principalmente en las interacciones de no enlace (electrostáticas).
4. Que haya una relación inversamente proporcional entre la constante de afinidad y la energía: menor energía, mayor constante de afinidad.

8 RESULTADOS

8.1 IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS

En la base de datos para proteínas del NCBI aparecen registradas 509 secuencias de mioglobinas. Entre éstas se seleccionó la mioglobina de ballena (P02185) como patrón para el estudio. Esta molécula fue reportada en 1986, tiene 153 aminoácidos en su secuencia, lo que permite predecirle un peso molecular de 17.2 kD y un punto isoeléctrico (pI) de 8.71. Además esta mioglobina ha sido la más estudiada estructural y funcionalmente por lo que para ella existen, hasta la fecha, 113 estructuras experimentalmente determinadas en los bancos de datos públicos (RCSB-PDB). La mioglobina de *Ascaris suum* (P49672), reportada en 1996; con 153 aminoácidos para un peso molecular de 17.5 kD y un pI de 6.49, está reportada como la mioglobina de más alta afinidad por el oxígeno. Estas dos, por las características mencionadas, fueron usadas para entender la interacción entre macromolécula y ligando y predecir este comportamiento en mioglobinas como la de humano (P02144), reportada en 1986, con 154 aminoácidos para un peso molecular de 17.2 kD y un pI de 7.14.

Varios estudios sobre la interacción de la mioglobina con sus ligandos se han llevado a cabo tomando como modelo estas moléculas, debido a las características particulares que presentan en su secuencia (Carver y col.,1990;Rohlf's y col.,1990; Egeberg,1990;Springer,1989).

8.2 SIMILARIDAD DE SECUENCIAS

La comparación de las secuencias de mioglobina de humano y ballena con la totalidad de secuencias de otras Mb existentes en el banco de datos, se realizó mediante el programa BLAST. Este análisis reportó, para las dos, valores de identidad entre el 80 y 90% con las otras secuencias. Entre las secuencias de más alta identidad se encontraron las de organismos como:

Identificación	Especie	Porcentaje de similitud (%)
(P02185)	ballena	100%
(P02144)	humano	85%
(P02197)	ave	80%
(P02172)	delfín	82%
(P02186)	elefante	81%
(P02188)	caballo	88%
(P02203)	lagarto	84%
(P02165)	musaraña	82%
(P02205)	atún	80%
(P02190)	oveja	82%
(P02163)	vampiro	82%
(P02189)	cerdo	86%
(P02176)	foca	85%
(P02164)	oso hormiguero	86%
(P02171)	ornitorrinco	80%
(P20856)	ratón	87%
(P02157)	tejón	80%
(P02194)	canguro	83%
(P02159)	perro	82%
(P11343)	nutria	85%
(P02169)	lemur	80%
(P02153)	mono	85%
(P56208)	tortuga	82%
(P14397)	pez	82%
(P2156)	erizo	80%
(P02193)	sanguijuela	82%
(P02191)	ciervo	82%
(P14396)	castor	80%
(P2158)	zorro	82%
(P02192)	vaca	82%
(P02199)	pingüino	82%
(P02200)	caimán	82%
(P02170)	conejo	86%
(P02206)	tiburón	90%

Tabla 3. Porcentajes de similitud del alineamiento de la secuencia de mioglobina de ballena con el total del banco de datos

Este significativamente alto índice de similitud, es un índice de la conservación de la secuencia de la molécula de mioglobina en la mayoría de los organismos.

La secuencia de *Ascaris suum* no aparece, con ninguna similaridad significativa con las secuencias del grupo anterior. Por esto se realizó otra búsqueda de secuencias similares para ésta especie, la que presentó valores de identidad entre el 24 y 45% con la secuencia del nemátodo parasitario *Nippostrongylos brasiliensis* y la de *Aplisia limacina*, respectivamente. Esto evidencia la presencia de dos grupos ancestrales diferentes pero conservados para las secuencias de mioglobina. Este segundo grupo presenta, considerando lo conocido para *Ascaris suum*, una mayor afinidad por el O₂. Este fenómeno asociado a la secuencia del segundo grupo y a las mutaciones que este presenta respecto al primer grupo, esencialmente en el bolsillo distal al grupo hemo, fueron analizadas y transferidas a secuencias del primer grupo, con la mioglobina de ballena como modelo, en un intento de modificar las afinidades.

8.3 ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS DE DIFERENTES ESPECIES.

Dentro del grupo de secuencias reportadas en los alineamientos anteriores, es importante resaltar aquellas cuyas estructuras han sido determinadas por cristalografía de rayos X y que aparecen registradas en RCSB-PDB. Dentro de este grupo se encuentran las mioglobinas de humano, caballo, cerdo, ballena, *Aplisia*, elefante y tortuga, cuyas identificaciones en el NCBI son: P02144, P02188, P02189, P02185, CAA558, P02186 y P56208 respectivamente.

A pesar de las diferencias y similitudes que se puedan encontrar en la totalidad de la secuencia, en este trabajo se hace mayor énfasis en el análisis de los residuos distales y proximales al grupo hemo, por ser estos el centro funcional de la molécula.

Se incluye la secuencia de mioglobina de *Áscaris suum* (P49672), debido a las mutaciones que presenta en estas posiciones, a pesar de no tener

determinada su estructura y a que se propone que éstas son la causa de sus diferencias funcionales.

La comparación de los residuos dístales y proximales al grupo hemo, realizada con el programa DiALING muestra que la histidina distal en la posición 64 se encuentra conservada en las mioglobinas de humano, ballena, cerdo, caballo y tortuga. Esta His⁶⁴ está sustituida por un residuo de glutamina en las mioglobinas de elefante y *Áscaris suum* y por un residuo de valina en la Mb de *Aplisia limacina*.

La histidina proximal en la posición 93 (His⁹³) aparece sustituida por un residuo de alanina en la mioglobina de *Aplisia limacina*, a diferencia de todas las otras especies que la conservan, incluida la de *Ascaris*. De otro lado, en la posición 68 existe, para todas las Mb estudiadas, un residuo de valina, que se encuentra sustituido por una isoleucina y una leucina en las Mb de *Aplisia* y *Áscaris* respectivamente. También en las secuencias de éstas dos mioglobinas existe en la posición 67 en lugar de treonina, como en los demás organismos, un residuo de arginina.

La leucina en la posición 29 es sustituida, en las mioglobinas de *Áscaris*, elefante y tortuga por una tirosina, fenilalanina e isoleucina respectivamente. Por último es importante notar la conservación de la fenilalanina en la posición 43 en todas la secuencias de Mb del estudio. Esto se puede observar en las comparaciones de las secuencias que aparecen en la Tabla 4.

Ascaris:	Y29 -----F43----- Q64 ----- R67 L68 -----H93
Humano:	L29-----F43-----H64-----T67 V68-----H93
Ballena:	L29-----F43-----H64-----T67 V68-----H93
Cerdo:	L29-----F43-----H64-----T67 V68-----H93
Caballo	L29-----F43-----H64-----T67 V68-----H93
Elefante:	F29 -----F43----- Q64 -----T67 V68-----H93
Aplisia:	L29-----F43----- V64 ----- R67 I68 ----- A93
Tortuga:	I29 -----F43-----H64----- T67 V68----- H93

Tabla 4. Residuos dístales y proximales al grupo hemo en mioglobinas de diferentes especies.

Los efectos de los cambios en las propiedades químicas de las mioglobinas por las mutaciones en estos residuos, se discuten posteriormente, con respecto a los cambios estructurales y energéticos presentados en las moléculas.

8.4 VALORES DE ENERGÍA POTENCIAL MINIMIZADA DE MOLECULAS DE MIOGLOBINA.

Se obtuvieron, para este estudio, un total 153 mioglobinas de diferentes especies, con estructura determinada por cristalografía de rayos X (Tabla 5).

ESPECIE	NÚMERO
Ballena	113
Humano	1
Elefante	1
Cerdo	16
Caballo	13
<i>Aplisia</i>	8
Tortuga	1

Tabla 5. Moléculas de mioglobina de diferentes especies registradas en el Banco de Datos de Proteínas (PDB).

Luego de la depuración del banco de datos del RCSB-PDB seleccionando solamente las estructuras con una resolución no mayor de 2.0 Å, quedaron finalmente 85 mioglobinas clasificadas de la siguiente manera: Mb nativas sin ligando (11), Mb nativas con ligando (12), Mb mutadas con ligando (16), Mb mutadas sin ligando (46). Esta clasificación se mantendrá para todos los análisis y comparaciones como aparecen en las Tablas 6-9. Cada una de estas estructuras proviene de un cristal diferente, usualmente generado en laboratorios y por investigadores diferentes. Este hecho puede implicar diferencias en los datos iniciales de energía, lo que ocasionaría dificultades en la comparación e interpretación de los resultados. Para obviar esto a

“todas” las estructuras del estudio se les realizó una minimización de la energía potencial inicial bajo las condiciones de simulación idénticas, como se explicó en el procedimiento.

Lo anterior permite asegurar que, luego de estos procedimientos, las mioglobinas del estudio presentan las mismas condiciones estructurales asociadas a sus propiedades biológicas.

En la Tabla 6 se reportan los valores de las energías iniciales luego de las minimizaciones respectivas para las Mb nativas sin ligando. Se observa que el menor valor de energía lo presenta la mioglobina de tortuga; este valor se sale de los rangos de variación en relación con las otras moléculas debido a que un 20% del cristal está reconstruido computacionalmente, ubicando los diferentes residuos en la posición ideal que podrían tener y a un 10% se le desconocen las cadenas laterales de los diferentes residuos que conforman la molécula.

Un análisis similar se realizó para las Mb nativas con ligando observándose el efecto de los diferentes ligandos en los valores de las energías calculadas. (Tabla 7). Los efectos, dependiendo del tipo de ligando, se observan tanto en los cambios estructurales, observados en modificaciones en las energías de corto alcance y en cambios en sus capacidades de interacción como se pueden deducir de los cambios en las energías de largo alcance.

La comparación de los valores de energía potencial minimizada entre el conjunto de las moléculas de mioglobinas nativas sin ligando (Tabla 6) y mioglobinas nativas con ligando (Tabla 7) muestran una pequeña diferencia estadísticamente significativa, entre estos dos grupos. Esta diferencia arrojó un valor de $p = 0,31$ al realizar la prueba t para varianzas iguales.

Esto indica que entre el sistema molecular macromolécula-ligando inorgánico, es la mioglobina el principal aportador de energía, y que los cambios estructurales se deben a los ajustes generados por la interacción.

MOLECULA	ENLACE (kJ/mol)	ANGULOS (kJ/mol)	TORSION (kJ/mol)	NO-ENLACE (kJ/mol)	ELECTROSTATICA (kJ/mol)	TOTAL (kJ/mol)
1MBA (Aplisia)	105	683	549	-4936	-3740	-7344
1MYT (atún)	114	712	668	-4805	-2608	-5919
1BZ6(ballena)	108	719	544	-5414	-3393	-7437
1BZP (ballena)	108	729	551	-5380	-3267	-7259
1VXA(ballena)	117	595	815	-5398	-3046	-6703
1VXD(ballena)	104	775	582	-5441	-3351	-7330
4MBN(ballena)	118	750	645	-5440	-3258	-7187
1WLA(caballo)	121	763	582	-5267	-2859	-6682
1LHS(tortuga)	108	833	618	-5451	-5721	-8466
1MBD(ballena)	114	751	558	-5460	-3404	-7441
1DUK(ballena)	112	813	781	-5456	-3488	-7238

Tabla 6. Valores de Energía de Potencial minimizada de mioglobinas nativas sin ligando

MOLECULA	LIGANDO	ENLACE (kJ/mol)	ANGULO (kJ/mol)	TORSION (kJ/mol)	NO-ENLACE (kJ/mol)	ELECTROSTATICA (kJ/mol)	TOTAL (kJ/mol)
2CMN (ballena)	CN	103	794	669	-5499	-3342	-7275
1VXB (ballena)	H ₂ O	135	649	973	-5319	-2931	-6308
1HJT (ballena)	NO	113	570	642	-5336	-3048	-6866
1YMC (caballo)	CN	123	834	756	-5323	-2793,	-6404
1VXF (ballena)	CO	119	731	644	-5433	-3331	-7270
1VXC (ballena)	CO	116	565	662	-5388	-3049	-6900
1EMY (elefante)	CN	115	740	581	-5399	-2742	-6704
1VXE (ballena)	H ₂ O	120	757	638	-5427	-3273	-7184
1EBC (lucina)	CN	112	753	545	-5411	-3322	-7324
1MBC (ballena)	H ₂ O	114	761	627	-5522	-3228	-7294
1MBO (ballena)	O ₂	122	565	605	-5372	-3041	-6926
1SPE (ballena)	CO	108	765	740	-5483	-3236	-7105

Tabla 7. Valores de Energía Potencial minimizada de mioglobinas nativas con ligando

En las Tablas 8 y 9 se presentan los datos para las mioglobinas mutadas unidas a ligandos como O₂, CO y las Mb sin ligando. Estas presentan valores de energía potencial que pueden otorgarle a la molécula mayor estabilidad estructural, así como también existen valores de energía mayores a la nativa que pueden causar el efecto contrario.

Por lo tanto, aquellas mutaciones que presentan valores de energía más negativos son postulados para predecir un perfil energético característico para cada ligando.

Allí mismo, se presentan los residuos específicos del bolsillo distal y proximal seleccionados como modelo para explicar ciertas interacciones en el sistema. Por lo general estas mutaciones se han realizado en las posiciones 29, 64, 67 y 68, mutaciones hechas simultáneamente con la D122N. Esto indica, que la posición y las características estereoquímicas de residuos específicos determinan el cambio en las energías de corto y largo alcance, ofreciendo un perfil característico en cada caso.

MOLÉCULA	MUTACION	ENLACE (kJ/mol)	ANGULO (kJ/mol)	TORSION (kJ/mol)	NO ENLACE (kJ/mol)	ELECTROSTÁTICA (kJ/mol)	TOTAL (kJ/mol)
2MBW(ballena)	D122N	123	599	634	-5438	-3315	-7204
1MLG(ballena)	V68A-D122N	122	609	706	-5448	-3237	-7047
1MLK(ballena)	V68F-D122N	101	764	625	-5528	-3551	-7590
1MLR(ballena)=	V68L-D122N	104	792	627	-5557	-3594	-7629
1MOA(ballena)	L29F-D122N	112	799	622	-5526	-3541	-7535
2MGG(ballena)	H64Q-D122N	117	780	598	-5511	-3761	-7777
2MGD(ballena)	H64L-D122N	113	780	557	-5507	-3605	-7662
1MOD(ballena)	H64T-D122N	106	814	598	-5543	-3595	-7619
1MTJ(ballena)	F64V-D122N	112	786	632	-5513	-3629	-7596
102M(ballena)	H64A-D122N	117	755	532	-5513	-3629	-7737
2MGE(ballena)	H64L-D122N	103	787	543	-5502	-3659	-7675
2MGJ(ballena)	H64V-D122N	109	793	709	-5403	-3250	-7081
1MNH(cerdo)	H64V-T67R	113	775	644	-5443	-3494	-7405
1RSE(caballo)	S92D	117	739	597	-5327	-2806	-6680
1HRM(caballo)	H93Y	106	744	553	-5236	-2611	-6445
2MGL(ballena)	D122N	101	789	654	-5495	-3540	-7492

Tabla 8. Valores de Energía Potencial minimizada de mioglobinas mutadas sin ligando.

MOLECULA	MUTACION	LIGANDO	ENLACE (kJ/mol)	ANGULO (kJ/mol)	TORSION (kJ/mol)	NO ENLACE	ELECTROSTATICA (kJ/mol)	TOTAL (kJ/mol)
1ABS ballena	D122N	CO	122	581	626	-5506	-3294	-7271
1MLF ballena	V68A-D122N	CO	106	802	586	-5512	-3533	-7551
1MLJ ballena	V68F-D122N	CO	113	756	553	-5561	-3625	-7763
1MLM ballena	V68I-D122N	CO	113	771	650	-5495	-3596	-7567
1MLQ ballena	V68L-D122N	CO	116	776	615,	-5560	-3654	-7714
1MGC ballena	V68N	CO	121	575	574	-5341	-3125	-7001
1MLU ballena	V68A-D122N- H64G	CO	103	807	627	-5462	-3474	-7400
2SPL ballena	L29F-D122N	CO	119	761	556	-5520	-3590	-7675
2MGFballena	H64Q-D122N	CO	102	822	657	-5488	-3643	-7551
2MGC ballena	H64L-D122N	CO	128	763	595	-5398	-3318	-7222
2MGAballena	H64G-D122N	CO	108	803	591	-5444	-3454	-7396
1MOC ballena	H64T-D122N	CO	112	804	622	-5546	-3559	-7556
1MYM ballena	F64V-D122N	CO	126	813	666	-5468	-3472	-7336
1MCY ballena	L29F/H64Q	CO	101	787	598	-5490	-3491	-7495
2MGK ballena	D122N	CO	121	757	638	-5407	-3295	-7191
1CH3 ballena	L89W-D122N	H ₂ O	98	753	633	-5440	-3293	-7249
1CH5 ballena	H97V-D122N	H ₂ O	112	790	673	-5533	-3514	-7472
1CH7 ballena	H97F-D122N	H ₂ O	106	779	562	-5532	-3611	-7699
1CH9 ballena	H97Q-D122N	H ₂ O	114	756	547	-5445	-3704	-7732
1CIK ballena	I99V-D122N	H ₂ O	100	733	572	-5405	-3401	-7400
1CIO ballena	I99V-D122N	H ₂ O	110	733	619	-5464	-3456	-7459
1CO9 ballena	L104V-D122N	H ₂ O	109	764	592	-5480,	-3637	-7655
1CO8 ballena	L104A-D122N	H ₂ O	119	761	601	-5464	-3603	-7580
1CPO ballena	L104N-D122N	H ₂ O	104	778	623	-5499	-3727	-7720
1CP5 ballena	L104F-D122N	H ₂ O	103	778	619	-5494	-3519	-7512
1CPW ballena	L105W/D122N	H ₂ O	108	814	631	-5549	-5970	-7598
1MLH ballena	V68A-D122N	H ₂ O	123	603	675	-5433	-3276	-7105
1MLL ballena	V68F-D122N	H ₂ O	112	798	618	-5505	-3567	-7534
1MLO ballena	V68I-D122N	H ₂ O	112	780	628	-5484	-3583	-7536
1MTI ballena	F46L-D122N	H ₂ O	100	839	648	-5467	-3457	-7338
1MTK ballena	F46V-D122N	H ₂ O	108	827	710	-5501	-3559	-7416
2MGH ballena	H64Q-D122N	H ₂ O	118	820	586	-5501	-3749	-7725
2MGI ballena	H64T-D122N	H ₂ O	118	872	580	-5517	-3785	-7782
2SPM ballena	L29F-D122N	H ₂ O	115	611	651	-5459	-3249	-7131
1SPO ballena	L29V-D122N	H ₂ O	110	749	598	-5441	-3410	-7394
1JDO ballena	L29F-D122N	NO	115	596	609	-5445	-3306	-7228
1MGM ballena	D122N	O ₂	115	790	613	-5493	-3531	-7506
1OFJ ballena	L29F-G64L- D122N	H ₂ O	112	770	539	-5474	-3490	-7543
1OFK ballena	F43H-H64L- D122N	H ₂ O	108	766	534	-5463	-3526	-7585
2MMI humano	K45R,C110A	O ₂	109	874	833,53	-5455,49	-3485	-7125
1DTI ballena	H97D, D122N	H ₂ O	125	730	699,93	-5449,81	-3432	-7328
1LTW ballena	L29F-D122N	O ₂	122	614	673,45	-5493,92	-3273	-7164
CH2 ballena	L29F-D122N	H ₂ O	103	739	554,61	-5461,53	-3480	-7544
1MLS ballena	V68L-D122N	H ₂ O	119	773	636,97	-5494,16	-3523	-7488
1MNO cerdo	V68N	O ₂	109	588	616,95	-5339,92	-3136	-6971
1F65 Ballena	L29Y/H64Q/ T67R	O ₂	121	589	577,78	-5435,03	-3696	-7632

Tabla 9. Valores de Energía de Potencial minimizada de mioglobinas mutadas con ligando.

Al realizar el cálculo estadístico del coeficiente de variación de los valores de energía potencial minimizada, para determinar las variación de estos en mioglobinas nativas con y sin ligando y mioglobinas mutadas con y sin ligando, se observó un valor bajo para este coeficiente en cada uno de los grupos. El menor valor lo presentó el grupo de mioglobinas mutadas con ligando. (Tabla 10).

MIOGLOBINA	COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV %)
Mb nativas sin ligando	4,21
Mb nativas con ligando	3,06
Mb mutadas sin ligando	2,91
Mb mutadas con ligando	2,13

Tabla 10. Valores de coeficiente de variación (CV) de los datos de energía potencial inicial minimizada.

Esto indica que los valores iniciales, calculados para cada molécula están próximos a la media del conjunto de datos de cada grupo. Se asume que esta pequeña variación, indica que la mioglobina biológicamente activa, tiene valores energéticos estrechos, que pertenecen a mínimos locales dentro de un mínimo global de todo el sistema. La existencia de la molécula en un mínimo local, y la poca variabilidad de su energía inicial indica que las estructuras estables tienen alta similaridad estructural.

Para entender el efecto de las mutaciones sobre la energía potencial de la mioglobina unida a diferentes ligandos, se realizó un análisis por grupos así: En el primer grupo se encuentran mioglobinas con la mutación D122N sin CO y con CO, respecto a la Mb nativa unida a CO. (Tabla 11).

El valor de energía potencial, más negativo lo reporta la molécula con la mutación del ácido aspártico en la posición 122 por la asparragina (D112N) aproximadamente, un 10% menor respecto a la nativa. El residuo D122 se encuentra expuesto en la superficie de la molécula con distancias mínimas de

24,95 Å, y 26,28 Å de las histidinas distal y proximal respectivamente. Esto indica que los residuos presentes en la superficie de la molécula pueden producir variaciones en la energía de todo el sistema, permitiendo una mayor estabilidad estructural global. Este efecto es producto tanto de la mutación como de la interacción con el ligando. En este caso, la disminución en la energía es debida principalmente a la de no enlace, o sea que el cambio se debe a interacciones electrostáticas de largo alcance.(Anexo 1)

MOLECULA	LIGAND	MUTACION	ENLACE (kJ/mol)	ANGULOS (kJ/mol)	TORSION (kJ/mol)	NO-ENLACE (kJ/mol)	ELECTROSTATICA (kJ/mol)	TOTAL (kJ/mol)
MBW		D122N	120	774	559	-5484	-3629	-7661
1ABS	CO	D122N-CO	122	581	626,	-5506	-3294	-7271
1VXC	CO	NATIVA-CO	116	564	662	-5388	--3049	-6900

Tabla 11. Valores de Energía Potencial minimizada de mioglobinas nativas unidas a CO ; con la mutación D122N y sin ligando.

El segundo grupo analizado presenta las moléculas de Mb con la mutación doble de la valina en la posición 68 sustituida por alanina, fenilalanina, isoleucina, asparagina simultáneamente además de la mutación D122N (Tabla 12). En este grupo, todas registraron una energía potencial con valores más negativos comparados con la nativa, reportando el menor valor de energía potencial la mutación V68F/D122N, de nuevo cerca del 10% menor con respecto a la nativa. La sustitución de la valina, por alanina, isoleucina, fenilalanina, y leucina acompañadas de la mutación D122N, presentan disminución en la energía debida principalmente a la de no enlace, mientras que en la mutación puntual V68N se observa un cambio muy pequeño. (Anexo 1). La comparación de los valores de energía de las mutaciones anteriores, permiten observar que la mayor proporción del cambio se debe a la mutación D122N en la superficie, con una contribución del orden del 10% menor, mientras que las mutaciones en el bolsillo distal sólo aportan una

variación del orden del 0,5% menor. Esto permite predecir que no es necesario tener grandes cambios energéticos para obtener alteraciones en el bolsillo. También es posible que exista una relación entre el volumen de los residuos y el cambio en la energía, puesto que los mínimos valores los presentan aquellas sustituciones por fenilalanina y leucina correspondientes a las cadenas laterales de mayor tamaño.

MOLECULA	LIGANDO	MUTACION (kJ/mol)	ENLACE (kJ/mol)	ANGULOS (kJ/mol)	TORSION (kJ/mol)	NO-ENLACE (kJ/mol)	ELECTROSTATICA kJ/mol)	TOTAL (kJ/mol)
1VXC	CO	NATIVA-CO	116	565	662	-5388	--3049	-6900
1MLF	CO	V68A-D122N	106	802	586	-5512	-3533	-7551
1MLJ	CO	V68F-D122N	113	756	553	-5561	-3625	-7763
1MLM	CO	V68I-D122N	113	771	650	-5495	-3596	-7567
1MLQ	CO	V68L-D122N	116	776	615	-5560	-3654	-7714
1MGC	CO	V68N	121	575	574	-5341	-3125	-7001
1MLU	CO	V68A-D122N- H64G	103	807	627	-5462	-3474	-7400

Tabla 12. Valores de Energía Potencial minimizada de mioglobinas unidas a CO con mutaciones de Valina 68 sustituida por alanina-fenilalanina-isoleucina-leucina asparagina y la triple mutación V68A D122N-H64G junto con la mutación D122N.

El tercer grupo lo conforman las mutaciones L29F/D122N, L29F/H64Q y nativa unidas a CO. El valor de energía potencial más negativo fue presentado por la mutación L29F/D122N; de nuevo debido a la contribución de la mutación D122N. Esta mutación contribuye al cambio, más que las mutaciones en el bolsillo.(Tabla 13). En esta mutación los principales cambios energéticos se deben a la energía de no enlace, comparadas con la nativa. (Anexo 1)

MOLECULA	LIGANDCO	MUTACION	ENLACE (kJ/mol)	ANGULOS (kJ/mol)	TORSION (kJ/mol)	NO-ENLACE (kJ/mol)	ELECTROSTATICA (kJ/mol)	TOTAL (kJ/mol)
1VXC	CO	NATIVA-CO	116	565	662	-5388	-3049	-6900
1MCY	CO	H64Q-L29F	101	788	598	-5490	-3491	-7495
2SPL	CO	L29F-D122N	119	761	556	-5520	-3590	-7675

Tabla 13. Valores de Energía Potencial minimizada de mioglobinas unidas a CO con mutaciones L29F/D122N y L29F/H64Q.

En el cuarto grupo se encuentran las moléculas con mutaciones dobles, la histidina en la posición 64 está sustituida por glutamina, leucina, glicina y treonina junto con la mutación D122N. Todas presentaron unos valores de energía más negativos que la nativa, mostrando el menor valor la mutación H64T/D122N seguida de la mutación H64Q/D122N (Tabla 14). De nuevo el mayor aportador del cambio es D122N; las mutaciones en el bolsillo presentan contribuciones proporcionales a sus posibilidades de cargas, además de presentar todos los valores de energía que producen estabilidad en la molécula. Estos cambios energéticos se deben principalmente a la energía de no enlace. (Anexo 1).

MOLECULA	LIGANDCO	MUTACION	ENLACE (kJ/mol)	ANGULOS (kJ/mol)	TORSION (kJ/mol)	NO-ENLACE (kJ/mol)	ELECTROSTATICA (kJ/mol)	TOTAL (kJ/mol)
Bn1VXC	CO	NATIVA-CO	116	565	662	-5388	-3049	-6900
Bm2MGF	CO	H64Q-D122N	102	822	657	-5488	-3643	-7560
Bm2MGC	CO	H64L-D122N	128	763	595	-5389	-3318	-7222
Bm2MGA	CO	H64G-D122N	108	803	591	-5444	-3454	-7396
Bm1MOC	CO	H64T-D122N	112	805	622	-5546	-3558	-7556

Tabla 14. Valores de Energía Potencial minimizada de mioglobinas, unidas a CO con la doble mutación D122N/Histidina sustituida por T,G,L y Q.

Ahora se analizará el grupo de Mb mutadas ligadas a O₂. Se encuentran la Mb con doble mutación L29W/D122N, la mutación V68N, la mutación que simula la mioglobina de *Ascaris suum* L29Y/H64Q/T67R y la nativa. (Tabla 15). Mostrando un valor de energía potencial más negativo la mutación triple L29Y/H64Q/T67R, mutación presentada por la mioglobina nativa de *Áscaris suum* realizada en mioglobina de ballena, con un aporte de energía del orden del 40% menor, respecto a la nativa. Esto indica la importancia de la sustitución de estos tres residuos en estas posiciones, confirmando la posible relación energía–función, ya que estas sustituciones en la mioglobina de *Áscaris* ofrecen la más alta afinidad por el oxígeno. Las mutaciones L29W/D122N muestran un aporte del 3,5% menor respecto a la nativa, indicando de nuevo la contribución de los cambios en la superficie de la molécula. Los cambios se deben a ambos cambios de energía de enlace y no enlace, mostrando entonces tanto cambios estructurales como de capacidad de interacción (Anexo 2).

MOLECULA	LIGANDO	MUTACION	ENLACE (kJ/mol)	ANGULOS (kJ/mol)	TORSION (kJ/mol)	NO-ENLACE (kJ/mol)	ELECTROSTATICA (kJ/mol)	TOTAL (kJ/mol)
MBO	O ₂	Nativa	122	565	605	-5372	-3041	-6926
1LTW	O ₂	L29W/D122N	123	614	674	-5494	-3273	-7164
1MNO	O ₂	V68N	109	588	617	-5340	-3136	-6971
1F65	O ₂	L29Y/H64Q/ T67R	121	589	578	-5435	-3696	-7637

Tabla 15. Valores de Energía Potencial minimizada de mioglobinas unidas a O₂ con mutación D122N/L29W, L29Y/H64Q/T67R, la mutación puntual V68N y nativa

La comparación de las Mb nativas unidas a los diferentes ligandos como oxígeno (O₂), monóxido de carbono (CO), cianuro (CN) y óxido nítrico (NO), permiten ver que el potencial más negativo de las energías de largo alcance (no-enlace, electrostáticas), lo presenta la Mb unida a cianuro. Lo que

indica que este ligando interactúa con la molécula formando un complejo macromolécula-ligando más estable, seguida de la Mb que se une a CO, siendo las interacciones más inestables las mioglobinas unidas a O₂ y NO (Tabla16). Esto permite predecir algún grado de relación entre la energía potencial y la afinidad real que presenta cada uno de los ligandos en la molécula. De esto la afinidad de la molécula de CO, es 50 veces mayor que la molécula de oxígeno (Chang,1996), y las diferencias en sus energías potenciales avalan esta hipótesis, sin que esto implique que el modelo relacional sea sencillo.

MOLECULA	LIGANDOS	MUTACION	ENLACE (kJ/mol)	ANGULOS (kJ/mol)	TORSION (kJ/mol)	NO-ENLACE (kJ/mol)	ELECTROSTATICA (kJ/mol)	TOTAL (kJ/mol)	Kaf (μM^{-1})
1MBO(ballena)	O ₂	Nativa	123	565	606	-5372	-3041	-6925	1,1
1VXC(ballena)	CO	Nativa	116	564	662	-5388	-3049	-6901	27
2CMM(ballena)	CN	Nativa	103	794	669	-5499	-3342	-7275	
1HJT(ballena)	NO	Nativa	113	570	642	-5336	-3048	-6866	

Tabla 16. Valores de Energía Potencial minimizada de mioglobinas nativas unidas a CO, O₂; CN y NO.

8.5 CORRELACIÓN ENTRE LOS VALORES DE ENERGÍA POTENCIAL DE LAS MOLÉCULAS EXPERIMENTALES CON LOS VALORES DE ENERGÍA DE LAS MUTACIONES SIMULADAS.

Uno de los objetivos de este estudio es validar la posibilidad de realizar mutaciones puntuales simuladas sobre una molécula nativa con estructura conocida y que con este proceso computacional se puedan generar estructuras cuyos valores energéticos se correlacionen significativamente con los valores calculados para las moléculas reales a las que se les efectúen esas mismas mutaciones experimentalmente. Los valores de energía de las moléculas con mutaciones simuladas y reales aparecen en la Tabla 17.

Parámetro	Energía (kJ)									
	Ligando : CO									
	D122N		V68N		V68N/D122N		H64Q/D122N		L29F/D122N	
	Real	Simulada	Real	Simulada	Real	Simulada	Real	Simulada	Real	Simulada
Enlace	122	116	121	112	113	121	102	121	119	123
Angulo	581	566	575	567	756	752	822	760	761	760
Torsión	626	605	574	611	553	568	657	614	556	584
No-enlace	-5506	-5467	-5345	-5460	-5560	-5482	-5488	-5375	-5520	-5444
Electrostática	-3294	-3315	-3125	-3330	-3625	-3552	-3643	-3541	-3590	-3541
Total	-7271	-7304	-7001	-7313	-7763	-7593	-7551	-7420	-7676	-7464
Parámetro	Ligando : O2									
	V68N		L29W/D122N		L29Y/H64Q/T67R					
	Real	Simulada	Real	Simulada	Real	Simulada				
Enlace	109	119	123	122	121	122				
Angulo	588	564	614	566	589	579				
Torsión	617	669	674	595	578	528				
No-enlace	-5340	-5461	-5493	-5404	-5435	-5433				
Electrostática	-3136	-3308	-3272	-3061	-3696	-3587				
Total	-6971	-7328	-7163	-6991	-7632	-7536				
Parámetro	Ligando : H2O-									
	V68N/D122N		L29F/D122N							
	Real	Simulada	Real	Simulada						
Enlace	123	115	115	123						
Angulo	604	633	616	631						
Torsión	675	803	651	799						
No-enlace	-5433	-5402	-5459	-5424						
Electrostática	-3276	-3231	-3249	-3230						
Total	-7105	-6874	-7131	-6887						
Parámetro	Ligando : NO									
	L29F/D122N									
	Real	simulada								
Enlace	115	121								
Angulo	596	579								
Torsión	609	621								
No-enlace	-544	-5390								
Electrostática	-3306	-3259								
Total	-7228	-7131								
Parámetro	Sin ligando									
	D122N		V68N/D122N							
	Real	Simulada	Real	Simulada						
Enlace	124	111	122	116						
Angulo	599	580	609	573						
Torsión	534	726	706	722						
No-enlace	-5438	-5434	-5448	-5401						
Electrostática	-3315	-3302	-3237	-3306						
Total	-7204	-7129	-7047	-7105						

Tabla 17. Valores de parámetros de la Energía Potencial minimizada de mioglobinas con mutaciones reales y simuladas con diferentes ligandos

Utilizando una prueba F para varianzas de dos muestras, se determinó la variabilidad entre la energía potencial de las mutaciones simuladas con los valores de energía de las moléculas con mutaciones reales. Se aplicó una prueba t y se obtuvieron que las variaciones de las dos muestras son iguales. (Tabla 18). Los resultados de la prueba t validan la hipótesis de la correlación entre las energías obtenidas por simulación y los valores de las mutaciones reales. (Tabla 19)

ENERGÍA	p (fx)
ENLACE R vs. S	0,05
ANGULO R vs. S	0,41
TORSIÓN R vs. S	0,30
NO-ENLACE R vs. S	0,18
ELECTROSTÁTICA R vs. S	0,41
TOTAL R vs. S	0,50

Tabla 18. Valores de p arrojados en la prueba F para varianzas de dos muestras.

Cuando $p (fx) \geq 0,05$ es posible realizar la prueba t para las dos muestras suponiendo varianzas iguales; si $p (fx) < 0,05$, se debe realizar la prueba t para las dos muestras suponiendo varianzas desiguales.

ENERGÍA	p (fx)
ENLACE R vs. S	0,46
ANGULO R vs. S	0,18
TORSIÓN R vs. S	0,39
NO-ENLACE R vs. S	0,18
ELECTROSTÁTICA R vs. S	0,97
TOTAL R vs. S	0,78

Tabla 19. Valores de p arrojados en la prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales.

Condiciones de aplicación de la prueba igual que en la Tabla 17.

El análisis de regresión lineal entre los valores de energía de las moléculas simuladas y reales, muestra también una correlación estadísticamente significativa entre estas dos poblaciones. Se observa las agrupaciones de las energías de enlace (enlace, ángulos y torsión) y no enlace (no enlace y electrostáticas); cada punto contiene un conjunto de los valores de energía de moléculas con mutaciones experimentales correlacionados con los valores de energía de las moléculas con mutaciones simuladas, correspondientes a cada uno de los factores que componen un campo de fuerza. (Gráfico 1)

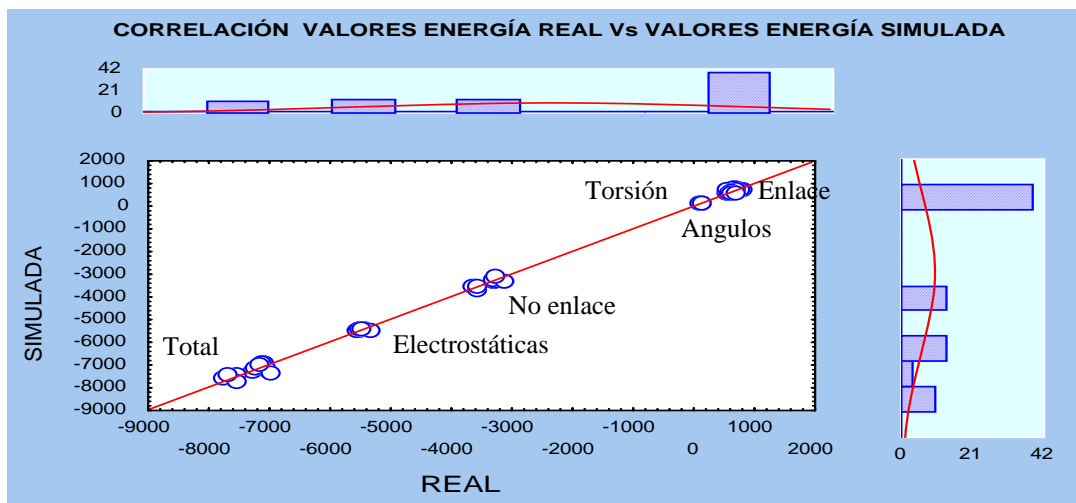


Gráfico 1. Correlación entre los valores de la Energía Potencial de las moléculas reales con mutaciones experimentales con los valores de Energía de las mutaciones simuladas. Mioglobinas sin ligando (V68N/D122N, D122N); con H₂O (L29F/D122N, V68N/D122N); con O₂ (V68N, L29W/D122N); con CO (V68N/D122,D122N, V68N, H64Q, H64T, L29F/D122N)

8.6 CORRELACIÓN DE LOS VALORES DE ENERGÍA POTENCIAL SIMULADA CON LAS CONSTANTES DE AFINIDAD OBTENIDAS EXPERIMENTALMENTE.

Para analizar el efecto de los cambios energéticos sobre la actividad de la Mb, se realizó un análisis de regresión múltiple tomando como variable dependiente la constante de afinidad (K_{af}) y como variables independientes las componentes de la energía total que incluye 5 factores: entre las energías de corto alcance (energías de enlace, ángulos y torsión) y entre las energías de largo alcance (energías de no-enlace, o sea la suma de las energías de van der Waals y de los puentes de hidrógeno) y la energía electrostática. Se obtuvieron un $R^2 = 0,23$ y $R^2 = 0,34$ para O_2 y CO respectivamente.

Los anteriores valores estadísticamente significativos reflejan una relación multifactorial entre las interacciones estructurales de la molécula y las interacciones de largo y corto alcance con el ligando. Esto permite ser interpretado como que los factores reguladores del proceso están complejamente acoplados entre los cambios estructurales y las fuerzas de interacción de largo alcance. Esta conclusión es consistente con los resultados de un análisis de factores, cuyos resultados muestran la existencia de dos componentes principales que representan las interacciones, tanto de corto como de largo alcance, es decir, que las interacciones con ligandos como CO y O_2 se realizan por la influencia de las energías de largo alcance, pero generan a su vez cambios en la estructura de la molécula.

Además, a pesar de la significancia estadística, los valores de R indican que existen otros posibles factores reguladores no identificados con estos análisis. Es posible concluir, entonces, la existencia de una dependencia compleja de la constante de afinidad con los cambios de energía potencial de enlace y no enlace debidos a las mutaciones. En la Tabla 20 y 21 se

observa el efecto energético de las interacciones con los ligandos O₂ y CO. Como se espera existen diferencias en las energías de interacción tanto de las denominadas de no-enlace (van der Waals, puentes de hidrógeno) y electrostáticas, lo que se puede observar en las mioglobinas nativas. Sin embargo aunque no sea obvio de esperarse las diferentes interacciones generan cambios estructurales en la macromolécula, lo cual se observa al comparar en las mismas Mb nativas las energías de enlace, ángulos y torsión. Estos mismos efectos se observan al comparar parejas de Mb mutadas en diferentes residuos (V68N, L29F, H64Q, H64F, H64V, H64G, H64R y H64M)) interaccionando tanto con O₂ como con CO. Sin embargo, de nuevo, el patrón de cambio no es sencillo ni unifactorial.

Al observar los datos de los valores de energía potencial de mioglobinas unidas a O₂ (Tabla 20), se observa como todas las mutaciones causan una disminución en la energía potencial respecto a la nativa. Las mutaciones L29F, V68N y la doble mutación H64L/V68N, causan un aumento en la constante de afinidad, comparada con la nativa. También se observa que mutaciones como H64Q, H64R y la doble mutación L29F/H64Q disminuyen la energía es decir le otorgan estabilidad a la estructura al tiempo que disminuyen la afinidad por el ligando.

Es importante resaltar, que el valor de energía más negativo de todas las mutaciones simuladas lo reporta la molécula con las mutaciones existentes en la Mb de *Áscaris suum* (L29Y/H64Q/T67R). Esta molécula está reportada como la de mayor afinidad por el oxígeno (Tabla 20).(Peterson y col.,1997; Miele y col., 1999).

En el grupo de mioglobinas unidas a CO (Tabla 21); se observa que las mutaciones de la histidina en la posición 64 aumentan la constante de afinidad al compararla con la nativa, a su vez disminuyen la energía total de la molécula. Las mutaciones H64R y H64Q causan un aumento en la afinidad

a la vez que producen la mayor disminución la energía potencial, lo que puede indicar que los cambios por residuos más polares y menos hidrofóbicos respecto a la histidina, como la arginina y glutamina en esta posición, producen el efecto mencionado.

También se puede observar que las sustituciones por otros residuos tales como glicina, valina, metionina, fenilalanina y ácido aspártico causan también aumento en la constante de afinidad y a su vez disminuyen la energía potencial de la molécula, indicando que estos residuos de una u otra forma facilitan la unión del ligando y estabilizan la estructura sin que estos tengan una propiedad físico química que los caracterice a todos en un grupo.. En la posición 29 el cambio de la leucina por otros aminoácidos como alanina, glicina y serina, disminuyen la energía potencial del complejo, es decir que a pesar de ser estable estructuralmente causan reducción de la afinidad por el CO. Estos tres residuos se caracterizan por ocupar un volumen menor, así como por ser menos hidrofóbicos, lo cual hace pensar que estas tres características, producen el efecto de disminuir la constante de afinidad.

La mutación L29F causa un aumento en la constante de afinidad y una disminución de la energía potencial, lo que indica que estabiliza la estructura y aumenta la afinidad por el ligando, lo que permite proponer que deben existir características específicas adicionales de este residuo en esta posición para favorecer la unión con el ligando.

En la tabla 20 la molécula de mioglobina que presenta las características de la mioglobina de *Ascaris suum* no presenta el valor de la constante de afinidad debido a que no está reportada con un valor absoluto, solo reportada como la de más alta afinidad por el oxígeno

MUTACIÓN	LIGANDO (kJ/mol)	ENLACE (kJ/mol)	ANGULO (kJ/mol)	TORSION (kJ/mol)	NO-ENLACE (kJ/mol)	ELECTROSTÁTICA (kJ/mol)	TOTAL (kJ/mol)	Kaf (μM^{-1})
NATIVA(ballena)	O ₂	122	565	605	-5372	-3041	-6925	1,10
L29F	O ₂	112	573	574	-5429	-3117	-7088	15,00
V68N	O ₂	114	566	574	-5421	-3259	-7267	3.5
H64L/V68N	O ₂	122	564	577	-5410	-3266	7223	2,20
V68A	O ₂	122	555	569	-5412	-3121	-7097	1,20
V68F	O ₂	122	554	570	-5451	-3102	-7118	0,48
V68I	O ₂	122	550	569	-5405	-3065	-7040	0,22
H64Q	O ₂	119	569	573	-5423	-3304	-7277	0,18
H64R	O ₂	120	563	571	-5400	-3373	-7327	0,09
H64G	O ₂	114	562	567	-5376	-3068	-7007	0,09
H64M	O ₂	122	561	579	-5421	-3144	-7112	0,05
H64L	O ₂	111	572	570	-5397	-3094	-7049	0,02
H64V	O ₂	113	574	572	-5386	-3132	-7068	0,01
H64F	O ₂	121	557	567	-5420	-3107	-7092	0,007
L29Y/H64Q/T67 R	O ₂	122	578	582	-5433	-3587	-7535	

Tabla 20. Valores de Energía Potencial de mioglobinas simuladas unidas a O₂ con constantes de afinidad.

MUTACIÓN	LIGANDO (kJ/mol)	ENLACE (kJ/mol)	ANGULO (kJ/mol)	TORSION (kJ/mol)	NO-ENLACE (kJ/mol)	ELECTROSTÁTICA (kJ/mol)	TOTAL (kJ/mol)	Kaf (μM^{-1})
NATIVA(ballena)	CO	116	564	662	-5388	-3049	-6900	27,0
H64R	CO	118	560	616	-5408	-3398	-7320	400
H64M	CO	109	566	622	-5408	-3123	-7044	200
H64G	CO	123	552	616	-5374	-3056	-6950	150
H64V	CO	111	571	622	-5389	-3123	7018	150
H64D	CO	122	552	618	-5409	-3116	-7042	85
H64F	CO	117	559	611	-5439	-3166	-7128	83
H64Q	CO	123	560	619	-5424	3310	-7243	82
L29F	CO	123	557	627	-5422	-3114	-7032	37
L29A	CO	110	564	619	-5388	-3130	-7036	7,9
L29G	CO	122	550	623	-5364	-3029	-6910	5
L29S	CO	121	551	620	-5391	-3131	-7041	3,6
V68N	CO	111	567	615	-5447	-3350	-7315	4,3
L29F/H64Q	CO	123	566	625	-5428	-3293	-7209	85

Tabla 21. Valores de Energía Potencial de mioglobinas simuladas que unen CO con constantes de afinidad.

8.7 ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LAS MOLÉCULAS DE MIOGLOBINAS CON MUTACIONES SIMULADAS Y NATIVAS.

Los valores de RMS, obtenidos al comparar los cambios estructurales debidos a las posiciones de los carbonos α y las cadenas laterales de las Mb que unen O_2 frente a las mioglobinas que unen CO, tanto mutadas como nativas, se observan en la Tabla 22. Los valores observados, muestran que ambas interacciones (Mb- O_2 y Mb-CO), nativas y mutadas, generan cambios estructurales en la molécula debido a la interacción con el ligando. También se observa que el efecto estructural debido a la interacción con el ligando es mayor que el efecto debido a las mutaciones estudiadas. Esto permite predecir que las interacciones con los diferentes ligandos, como ya se evidenció con otros datos, están reguladas por diferentes factores que parecen depender del ligando en cuestión. Los cambios reconocidos para las cadenas laterales presentan valores mayores debido esencialmente a su mayor flexibilidad con respecto al esqueleto carbonado en el que se encuentran los carbonos α .

MOLÉCULA	RMS(Carbonos alfa) (Å)	RMS (Cadenas laterales) (Å)
Nativa O_2 - Nativa CO	0,23	0,62
L29F O_2 - L29F CO	0,22	0,62
H64M O_2 - H64M CO	0,21	0,64
H64G O_2 - H64G CO	0,21	0,66
H64V O_2 - H64 V CO	0,24	0,65
H64F O_2 - H64F CO	0,23	0,65
H64R O_2 - H64R CO	0,23	0,76
V68N O_2 - V68N CO	0,30	0,70

Tabla 22. Valores de RMS para las mioglobinas que unen O_2 frente a Mioglobinas que unen CO nativas y mutadas.

En la Tablas 23 y 24 se observan los valores de RMS de las Mb nativas que unen O_2 y CO frente al las Mb mutadas de cada grupo

Aquí se observa como las mutaciones generan cambios estructurales pequeños respecto a la nativa, pero a su vez siguen generando cambios, mayores de 0,01 Å. También se puede observar que no todas las mutaciones realizan cambios estructurales de la misma medida, lo que indica que los modelos son específicos para cada ligando y no son generales, como ya se ha venido reconociendo en las interpretaciones de todas las fuentes de datos.

Mb QUE UNEN O₂	RMS (Carbonos alfa) (Å)
Nativa O ₂ - L29F-O ₂	0,04
Nativa O ₂ - H64M-O ₂	0,04
Nativa O ₂ - H64G-O ₂	0,04
Nativa O ₂ - H64V-O ₂	0,04
Nativa O ₂ - H64F-O ₂	0,03
Nativa O ₂ - H64R-O ₂	0,04
Nativa O ₂ -V68N-O ₂	0,03
Nativa O ₂ -L29Y/H64Q/T67R-O ₂	0,06

Tabla 23. Valores de RMS de mioglobinas que unen O₂ nativas frente a mioglobinas mutadas que unen O₂

Mb QUE UNEN CO	RMS (Carbonos alfa) (Å)
Nativa CO- L29F-CO	0,05
Nativa CO- H64M-CO	0,04
Nativa CO- H64G-CO	0,04
Nativa CO- H64V-CO	0,04
Nativa CO- H64F-CO	0,05
Nativa CO- H64R-CO	0,05
Nativa CO-V68N-CO	0,06

Tabla 24. Valores de RMS de mioglobinas que unen CO nativas frente a mioglobinas mutadas que unen CO

8.8 CORRELACIÓN DE LOS VALORES DE ENERGÍA POTENCIAL, PROPIEDADES DE LOS AMINOÁCIDOS MUTADOS Y LAS CONSTANTES DE AFINIDAD DETERMINADAS EXPERIMENTALMENTE.

Al no obtenerse un modelo único sencillo entre la energía potencial y la constante de afinidad para los ligandos considerados, se generó, para cada ligando, un modelo que incluye varias propiedades físico químicas de los aminoácidos nativos y mutados. Tales propiedades fueron calculadas mediante el programa computacional PtotScale entre ellas se tienen: hidrofobicidad, volumen, polaridad, flexibilidad y área oculta del residuo.

Con el propósito de entender la proporción de cambio de cada una de las propiedades de los residuos existentes en la mioglobina nativa respecto a los residuos mutados, esta proporción se obtuvo de la siguiente forma: E. potencial mutada/nativa; hidrofobicidad mutada/nativa; volumen mutada/nativa, etc. (Tablas 25 y 26)

Como modelo predictivo, se realizó una regresión múltiple por el método de pasos descendentes (stepwise) empleando las proporciones de cambio como variables independientes, y como variable dependiente la proporción de cambio de la constante de afinidad (Tablas 25 y 26). Se encontró que los modelos predictivos difieren según el ligando. Para el caso del O₂ las proporciones de cambio entre el aminoácido nativo y el mutado con coeficientes de regresión significativos son: proporción de cambio de la energía potencial de largo alcance, proporción de cambio del volumen, proporción de cambio de la hidrofobicidad; proporción de cambio de la polaridad; proporción de cambio de la flexibilidad.

Se obtuvo la siguiente ecuación de regresión para predecir la constante de afinidad para O₂. (Ecuación 18). Esta ecuación indica el valor más probable que toma la constante de afinidad, según los valores dados de cada uno de

los factores tomados como variables independientes. En este caso de las proporciones de cambio de las propiedades.

$$K_{af}^1 = 402,31 - 1,30(\text{Proporción}_{E. \text{ largo alcance mutada/nativa}}) + 0,98(\text{Proporción}_{\text{volumen mutada/nativa}}) - 1,70(\text{Proporción}_{\text{hidrofobicidad mutada/nativa}}) + 0,5(\text{Proporción}_{\text{polaridad mutada/nativa}}) - 0,50(\text{Proporción}_{\text{flexibilidad mutada/nativa}}).$$

Ecuación (18)

Con un índice de correlación (R^2) de 0.95. este índice Indica que un 95% de la variación total en los valores de la constante de afinidad es explicada por los valores de las proporciones de cambio ajustados por los coeficientes de regresión según la ecuación anterior ecuación de regresión.

Para el grupo de mioglobinas unidas a CO se encontraron como variables que pueden predecir la constante de afinidad teniendo en cuenta la ecuación de regresión: la proporción de cambio de la Energía Potencial de largo alcance, proporción de cambio de la hidrofobicidad; proporción de cambio de la polaridad; proporción de cambio de la flexibilidad y proporción de cambio del área oculta de los residuos mutados y nativos. Con base en estas variables se obtuvo la ecuación de regresión:

$$K_{af}^1 = -8,83 + 0,30(\text{Proporción}_{E. \text{ largo alcance mutada/nativa}}) - 0,99(\text{Proporción}_{\text{polaridad mutada/nativa}}) - 0,50(\text{Proporción}_{\text{hidrofobicidad mutada/nativa}}) + 0,70(\text{Proporción}_{\text{flexibilidad mutada/nativa}}) + 0,46 (\text{Proporción}_{\text{área oculta mutada/nativa}}).$$

Ecuación (18)

Con un índice de correlación (R^2) de 0,74. Este índice indica que un 74% de la variación total en los valores de la constante de afinidad es explicada por el plano de regresión ajustado por la ecuación anterior

Estos resultados confirman, las anteriores observaciones respecto a que las interacciones con diferentes ligandos, aunque ellos, sean químicamente similares tienen diferentes factores de regulación, por ejemplo, para el caso de las mioglobinas unidas a O_2 el volumen aparece explicando la interacción en este grupo mientras que el área oculta aparece para explicar la

interacción con un coeficiente de regresión más alto con respecto al área oculta en el grupo de las mioglobinas unidas a CO. A pesar de que variables como la energía de largo alcance, hidrofobicidad, polaridad y flexibilidad explican la interacción en los dos grupos no lo hacen con el mismo valor. Además, estos resultados confirman que la interacción de la mioglobina con ligandos como CO y O₂ es:

- multifactorial.
- Que los factores importantes no son iguales para todos los ligandos.
- Que para el caso de la Mb de ballena con mutaciones simuladas unida a O₂ influyen factores como cambios en el volumen, hidrofobicidad, polaridad, flexibilidad y energía potencial de las mutaciones (Tablas 25 y 26)
- Que aún no se conocen, completamente todos los factores que influyen en CO.

¹ K_{af}: constante de afinidad

Ligando-O ₂																						
Energía de corto alcance nativa:1292.11																						
Energía de largo alcance nativa:-8412.68																						
Mutación	Energía				Constante de afinidad			Volumen			Hidrofobicidad			Polaridad			Flexibilidad			Area		
	corto	R	largo	R	N	M	R	N	M	R	N	M	R	N	M	R	N	M	R	N	M	R
L29F	1259,9	0,98	-8628,5	1,02	1,2	15	12,50	0,72	0,71	0,99	0,59	0,58	0,98	0,33	0,337	1,02	0,62	0,593	0,95	0,49	0,511	1,04
V68N	1256,8	0,98	-8802,3	1,04	1,2	3,5	2,92	0,70	0,65	0,93	0,56	0,56	1,00	0,31	0,381	1,24	0,43	0,458	1,07	0,35	0,361	1,03
V68A	1246,5	0,97	-8606,6	1,01	1,2	1,2	1,00	0,70	0,64	0,91	0,56	0,62	1,10	0,31	0,335	1,10	0,43	0,412	0,96	0,35	0,349	0,99
V68F	1249,5	0,97	-8646,9	1,02	1,2	0,48	0,40	0,70	0,69	0,99	0,56	0,64	1,14	0,31	0,295	0,97	0,43	0,389	0,91	0,35	0,423	1,20
V68I	1253,9	0,98	-8619,3	1,01	1,2	0,22	0,18	0,70	0,7	1,00	0,56	0,66	1,18	0,31	0,295	0,97	0,43	0,458	1,07	0,35	0,398	1,12
H64Q	1240,9	0,98	-8469,5	1,03	1,2	0,18	0,15	0,67	0,67	1,00	0,46	0,45	0,98	0,50	0,498	1,00	0,56	0,634	1,14	0,37	0,342	0,93
H64R	1256,5	0,98	-8863,8	1,04	1,2	0,09	0,08	0,67	0,67	1,00	0,46	0,44	0,96	0,50	0,498	1,00	0,56	0,653	1,17	0,37	0,371	1,01
H64G	1248,5	0,97	-8447,8	0,99	1,2	0,09	0,08	0,67	0,61	0,91	0,46	0,49	1,07	0,50	0,477	0,96	0,56	0,657	1,18	0,37	0,303	0,82
H64M	1261,9	0,98	-8610	1,01	1,2	0,05	0,04	0,67	0,68	1,01	0,46	0,52	1,13	0,50	0,432	0,87	0,56	0,546	0,98	0,37	0,379	1,03
H64L	1258,2	0,98	-8610,3	1,01	1,2	0,02	0,02	0,67	0,72	1,07	0,46	0,55	1,20	0,50	0,421	0,84	0,56	0,579	1,04	0,37	0,373	1,02
H64V	1259,2	0,98	-8590,9	1,01	1,2	0,01	0,01	0,67	0,72	1,07	0,46	0,55	1,20	0,50	0,435	0,88	0,56	0,588	1,05	0,37	0,357	0,97
H64F	1248,1	0,97	-8626,9	1,02	1,2	0,007	0,01	0,67	0,71	1,06	0,46	0,52	1,13	0,50	0,425	0,86	0,56	0,551	0,99	0,37	0,393	1,07

Tabla 25. Proporciones de cambio entre los valores de energía potencial, constante de afinidad, volumen, hidrofobicidad, flexibilidad y área oculta de los residuos de las mioglobinas de ballena simuladas unidas a O₂ con sus correspondientes valores de los residuos en las proteínas nativas²

² **Corto:** energía potencial de corto alcance; **largo:** energía potencial de largo alcance; **N:** nativa; **M:** mutada; **R:** razón de cambio Mutada/Nativa

Ligando-CO																						
Energía corto alcance: 1342.24																						
Energía largo alcance: -8437.3																						
Mutación	Energía				constante			Volumen			Hidrofobicidad			Polaridad			Flexibilidad			Area		
	corto	R	largo	R	N	M	R	N	M	R	N	M	R	N	M	R	N	M	R	N	M	R
H64R	1280,90	0,89	-8879,68	1,00	27,00	400,00	14,81	0,67	0,67	1,00	0,46	0,44	0,96	0,50	0,50	1,00	0,56	0,65	1.16	0,37	0,37	1,00
H64M	1281,62	0,89	-8630,34	0,98	27,00	200,00	7,41	0,67	0,68	1,01	0,46	0,52	1,13	0,50	0,43	0,87	0,56	0,54	0,96	0,37	0,38	1.03
H64G	1278,11	0,89	-8514,60	0,96	27,00	150,00	5,56	0,67	0,61	0,91	0,46	0,49	1,07	0,50	0,48	0,96	0,56	0,65	1.06	0,37	0,30	0.81
H64V	1290,13	0,90	-8601,23	0,97	27,00	150,00	5,56	0,67	0,72	1,07	0,46	0,55	1,20	0,50	0,44	0,88	0,56	0,59	1.06	0,37	0,36	0.97
H64D	1279,24	0,89	-8621,49	0,98	27,00	85,00	3,15	0,67	0,66	0,99	0,46	0,45	0,98	0,50	0,53	1,07	0,56	0,64	1.14	0,37	0,33	0.89
H64F	1280,47	0,89	-8634,03	0,98	27,00	83,00	3,07	0,67	0,71	1,06	0,46	0,53	1,15	0,50	0,43	0,86	0,56	0,55	0.99	0,37	0,39	1.05
H64Q	1297,83	0,90	-8986,42	1,02	27,00	82,00	3,04	0,67	0,67	1,00	0,46	0,45	0,98	0,50	0,50	0,90	0,56	0,63	1.13	0,37	0,34	0.91
L29F	1288,72	0,89	-8641,14	0,98	27,00	37,00	1,37	0,72	0,71	0,99	0,59	0,57	0,98	0,33	0,34	1,02	0,62	0,59	0.96	0,49	0,51	1.04
L29A	1277,33	0,89	-8599,90	0,97	27,00	7,90	0,29	0,72	0,66	0,92	0,59	0,57	0,97	0,33	0,38	1,02	0,62	0,62	0.99	0,49	0,44	0.89
L29G	1277,49	0,89	-8518,02	0,96	27,00	5,00	0,19	0,72	0,61	0,85	0,59	0,54	0,92	0,33	0,39	1,18	0,62	0,70	1.13	0,49	0,42	0.86
L29S	1276,5	0,89	-8620,2	0,98	27,00	3,60	0,13	0,72	0,65	0,90	0,59	0,54	0,92	0,33	0,39	1,19	0,62	0,69	1.10	0,49	0,44	0.89
V68N	1295,9	0,90	-8758,2	0,99	27,00	4,30	0,16	0,70	0,65	0,93	0,56	0,56	0,98	0,31	0,38	1,09	0,43	0,46	1.08	0,35	0,36	1.03

Tabla 26. Proporciones de cambio entre los valores de energía potencial, constante de afinidad, volumen, hidrofobicidad, flexibilidad y área oculta de los aminoácidos de las mioglobinas de ballena simuladas unidas a CO con sus correspondientes valores de las proteínas nativa

8.9 PREDICCIÓN DE LA CONSTANTE DE AFINIDAD CON BASE EN EL MODELO PROPUESTO

A través del análisis de regresión múltiple se obtuvieron las ecuaciones que permiten predecir, con base en las interacciones de la mioglobina con mutaciones en las posiciones 29, 64 y 67 con O₂ y CO como ligandos, la constante de afinidad realizando una sola mutación en las posiciones mencionadas. A pesar de reportar una alta correlación entre los valores reales y los predichos, la predicción de la constante de afinidad de la mioglobina de *Ascaris suum* que se ha tomado como modelo de alta afinidad, no es posible realizarla completamente por la carencia de datos para mutaciones múltiples. Con base en las características que presenta esta molécula se simuló individualmente cada una de estas mutaciones en las diferentes posiciones así como también por aquellos aminoácidos que aumentan las proporciones de cambio en cada una de las propiedades (energía potencial, volumen, hidrofobicidad, polaridad, flexibilidad, área oculta).

El uso de métodos computacionales para el cálculo de las propiedades de los aminoácidos propuestas en este trabajo para regular la interacción de la mioglobina con CO y O₂, permitió obtener de una forma rápida el cálculo de las proporciones de cambio de cada una de ellas, y a la vez reemplazarlas en las ecuaciones de regresión obtenidas mediante este modelo. Es decir, al reemplazar en la ecuación los valores de las proporciones de cambio para la correspondiente mutación simulada se obtiene la constante de afinidad predicha para esta mutación.

Las proporciones entre el valor presentado por el aminoácido mutado y el aminoácido nativo para las mioglobinas que unen O₂ y CO se observan en

las Tablas 27 y 28 respectivamente, así como también el valor de la constante de afinidad predicha.

En la Tabla 27 se puede observar que en la posición 67 los residuos que aumentan la proporción de cambio en el volumen y/o en la flexibilidad, polaridad y la energía potencial entre 1,01 y 1,02 veces más respecto a la nativa con una disminución de la hidrofobicidad aumentan la constante de afinidad de 18 a 27 veces más que la nativa como se observa en las mutaciones T67W, T67V T67L, T67K y T67E. En general en esta posición aquellos residuos menos hidrofóbicos que la treonina pero más polares, flexibles y voluminosos que este residuo, producen una mejor interacción que se refleja en los valores energéticos al formar un complejo con una energía potencial más negativa respecto a la mutada en 1,01 y 1,02 veces, con la excepción de aquellos residuos que aumentan la energía en 1,04 y 1,05 veces más respecto a la nativa produciendo el efecto contrario como lo hace la mutación T67R.

También se evidencia que el modelo para las moléculas que unen O₂, en la posición 29 los residuos que aumentan la proporción de cambio en la flexibilidad y polaridad con la disminución de la hidrofobicidad y un aumento en la energía potencial de 1,01 veces más que la nativa, producen un aumento en la constante de afinidad entre 22 y 23 veces más respecto a la nativa, como lo hacen las mutaciones L29K y L29E. Es importante resaltar que los residuos que aumentan la hidrofobicidad producen una disminución a la mitad de la constante de afinidad respecto a las mutaciones anteriores como observa en las mutaciones L29I y L29Y. De nuevo se observa que un aumento en la energía entre 1,04 y 1,05 disminuye la constante de afinidad.

En la posición 64 en general se sigue presentando el mismo patrón. Es decir, cualquier residuo que aumente la proporción de cambio en la polaridad flexibilidad, volumen y que disminuya la proporción de cambio en la hidrofobicidad y no aumente la proporción en la energía más de 1,03 veces respecto a la nativa, produce aumento en la constante de afinidad, ya que

aquellas mutaciones que aumentan la energía en 1,05 veces más respecto a la nativa como la H64R, producen el efecto contrario, la disminución de la constante de afinidad. Es importante resaltar que en esta posición las mutaciones presentan las mismas características para CO, solo que no aumenta la constante en la misma proporción que para las moléculas unidas a O₂.

En la Tabla 28, en la que se presentan los datos para las Mb ligadas a CO, se puede observar para las mutaciones en la posición 67, el aumento en la proporción de cambio en el área oculta, en la energía, un valor no mayor de 1,02, y la disminución, en la hidrofobicidad en 0,84 y 0,85 veces producen un aumento en la constante de afinidad como lo hacen las mutaciones T67Y y T67W a diferencia de las mutaciones T67M y T67L; éstas, presentan las mismas características, pero el aumento en la hidrofobicidad es mucho mayor. También es posible observar que un aumento en la polaridad y la flexibilidad, junto con la disminución en la proporción de la hidrofobicidad, producen un aumento en la constante de afinidad, como la mutación T67K, siempre y cuando, la proporción de cambio en la energía no aumente en más de 1,02 veces respecto a la nativa como en la mutación T67N y T67Q produciendo de forma consecuente el efecto contrario. De otra parte aquellos residuos muy polares y a su vez muy flexibles, sin que estas características impliquen un aumento en la proporción de cambio en la energía potencial como el ácido aspártico (D) y el ácido glutámico (E), no favorecen un aumento en la afinidad.

En la posición 29 residuos muy polares aumentan la constante de afinidad siempre y cuando esta polaridad implique un cambio en la energía de largo alcance, no mayor de 1,02 veces más respecto a la nativa. Como se observa en la mutación L29E. La mutaciones L29R y L29Q a pesar de que poseen las mismas características de la L29E, excepto que producen un aumento en la energía entre 1,04 y 1,05 veces respecto a la nativa presentan bajas afinidades. Era de esperarse que las mutaciones L29K y L29D por sus

características similares a las mutaciones que aumentan la afinidad, produjeran también este efecto, no es muy claro aún por qué estas mutaciones presentan los valores más bajos de afinidad en esta posición.

Un aumento en la proporción de cambio de la hidrofobicidad sin que se presenten valores altos de polaridad, flexibilidad y área oculta también disminuyen la constante de afinidad como las mutaciones L29I y L29V.

MUTACIÓN	E. largo alcance M/N	Volumen M/N	Flexibilidad M/N	Polaridad M/N	Hidrofobicidad M/N	Kaf (μM^{-1}) M/N	RMS (Å)
Aminoácidos con valores de polaridad altos							
L29Q	1,03	0,94	1,08	1,23	0,85	13,73	0,03
L29D	1,02	0,92	1,10	1,33	0,85	18,53	0,05
L29R	1,05	0,94	1,11	1,23	0,83	7,40	0,05
L29K	1,01	0,95	1,08	1,26	0,84	23,85	0,03
L29E	1,01	0,93	1,10	1,31	0,85	22,55	0,03
L29N	1,04	0,93	1,07	1,28	0,85	11,14	0,05
H64Q	1,04	1,01	1,14	1,00	0,99	-0,46	0,04
H64D	1,01	0,98	1,16	1,07	0,99	10,09	0,03
H64R	1,04	1,01	1,17	1,00	0,97	0,27	0,04
H64K	1,01	1,02	1,12	1,02	0,98	13,05	0,04
H64E	1,02	1,00	1,15	1,05	1,00	6,65	0,04
H64N	1,03	0,99	1,12	1,03	0,99	3,79	0,03
T67Q	1,04	0,99	1,05	1,07	0,80	14,38	0,04
T67D	1,04	0,96	1,07	1,16	0,80	13,43	0,02
T67R	1,05	0,99	1,09	1,07	0,87	5,03	0,03
T67K	1,01	1,00	1,03	1,09	0,79	27,89	0,03
T67E	1,01	0,98	1,06	1,13	0,80	26,18	0,03
T67N	1,04	0,97	1,02	1,10	0,80	14,36	0,04
Aminoácidos con valores de flexibilidad altos							
L29P	1,01	0,97	1,06	1,13	0,89	19,49	0,06
L29S	1,01	0,90	1,10	1,18	0,90	14,68	0,02
H64P	1,01	1,03	1,16	0,93	1,04	6,97	0,06
H64S	1,01	0,96	1,16	0,97	1,07	1,43	0,03
T67P	1,01	1,01	1,07	0,98	0,84	22,09	0,06
T67S	1,02	0,94	1,07	1,02	0,85	14,09	0,03
Aminoácidos con valores de hidrofobicidad y volumen altos							
L29I	1,01	1,00	1,07	1,01	1,01	10,61	0,03
L29F	1,01	0,99	0,96	1,01	0,98	16,96	0,04
L29V	1,01	1,00	1,02	1,04	1,01	12,24	0,03
H64I	1,00	1,07	1,12	0,85	1,21	0,97	0,02
H64L	1,01	1,07	1,04	0,85	1,19	0,16	0,03
H64F	1,01	1,06	0,99	0,86	1,16	2,79	0,03
H64V	1,01	1,07	1,06	0,88	1,20	0,91	0,04
T67I	1,02	1,05	1,02	0,88	0,95	12,33	0,03
T67F	1,02	1,04	0,87	0,88	0,92	16,81	0,04
T67L	1,01	1,05	0,93	0,87	0,94	20,47	0,03
Aminoácidos con valores de volumen altos							
L29Y	1,02	0,97	1,04	1,05	0,89	14,47	0,05
L29W	1,03	1,00	0,96	1,02	0,90	12,88	0,06
H64Y	1,02	1,04	1,08	0,88	1,05	3,74	0,04
H64W	1,02	1,07	0,99	0,86	1,06	6,35	0,03
T67Y	1,02	1,02	0,98	0,92	0,84	19,53	0,04
T67W	1,02	1,05	0,87	0,89	0,85	22,35	0,03
T67V	1,01	1,05	0,95	0,91	0,95	18,17	0,03

Tabla 27. Proporción de cambio entre las Energías Potenciales, volumen, flexibilidad, polaridad, e hidrofobicidad, de los aminoácidos mutados con respecto a los aminoácidos nativos de las mioglobinas unidas a O₂

MUTACION	E. largo Alcance M/N	Area M/N	Flexibilidad M/N	Polaridad M/N	Hidrofobicidad M/N	Kaf (μM^{-1}) M/N	RMS (Å)
Aminoácidos con valores de polaridad altos							
L29Q	1,04	0,94	1,08	1,23	0,85	1,77	0,04
L29D	1,02	0,91	1,10	1,33	0,85	-1,51	0,05
L29R	1,05	1,00	1,11	1,23	0,83	4,81	0,04
L29K	1,01	0,93	1,08	1,26	0,84	0,64	0,04
L29N	1,04	0,91	1,07	1,28	0,85	11,14	0,05
L29E	1,01	0,93	1,10	1,31	0,85	22,55	0,03
H64Q	1,04	0,93	1,14	1,00	0,99	7,86	0,04
H64D	1,04	0,89	1,16	1,07	0,99	5,45	0,03
H64R	1,04	1,01	1,17	1,00	1,00	10,63	0,05
H64K	1,04	0,92	1,12	1,02	0,98	6,47	0,04
H64N	1,03	0,90	1,12	1,03	0,99	5,40	0,04
H64E	1,02	1,00	1,15	1,05	0,77	13,15	0,04
T67Q	1,04	0,93	1,05	1,07	0,80	6,59	0,04
T67D	1,02	0,90	1,07	1,16	0,80	3,67	0,06
T67R	1,02	1,01	1,09	1,07	0,87	8,26	0,04
T67K	1,01	0,93	1,03	1,09	0,79	9,14	0,04
T67N	1,03	0,91	1,02	1,10	0,80	3,99	0,03
T67E	1,01	0,93	1,06	1,13	0,80	4,89	0,03
Aminoácidos con valores de flexibilidad altos							
L29P	1,00	1,14	1,06	1,13	0,89	7,74	0,05
L29S	1,01	0,89	1,10	1,18	0,90	1,61	0,03
H64P	1,00	0,88	1,16	0,93	1,04	6,06	0,05
H64S	1,01	0,87	1,16	0,97	1,07	6,15	0,04
T67P	1,01	0,89	1,07	0,98	0,84	8,14	0,04
T67S	1,02	0,87	1,07	1,02	0,85	6,25	0,04
Aminoácidos con valores de área oculta altos							
L29Y	1,02	1,02	1,04	1,05	0,89	6,81	0,05
L29W	1,02	1,09	0,96	1,02	0,90	6,20	0,06
L29F	1,01	0,99	0,96	1,01	0,94	3,47	0,05
H64Y	1,02	1,04	1,08	0,88	1,05	10,52	0,04
H64W	1,02	1,13	0,99	0,86	1,06	9,69	0,03
H64F	1,02	1,07	0,99	0,86	1,16	6,02	0,05
T67Y	1,02	1,08	0,98	0,92	0,84	11,22	0,05
T67W	1,02	1,12	0,87	0,89	0,85	11,37	0,04
T67F	1,01	1,06	0,87	0,88	0,92	6,04	0,03
Aminoácidos con valores de hidrofobicidad altos							
L29V	1,02	0,97	1,02	1,04	1,01	2,50	0,04
L29M	1,00	1,01	0,95	1,03	0,96	2,16	0,04
L29I	1,01	0,99	1,07	1,01	1,01	1,01	0,03
H64V	1,01	0,97	1,06	0,88	1,20	4,68	0,04
H64L	1,01	1,02	1,04	0,85	1,19	5,11	0,03
H64M	1,01	1,03	0,98	0,87	1,14	4,78	0,04
H64I	1,01	1,00	1,12	0,86	1,21	8,08	0,05
T67V	1,01	0,98	0,95	0,91	0,95	5,52	0,02
T67M	1,02	1,03	0,86	0,90	0,90	4,85	0,03
T67I	1,01	1,01	1,02	0,88	0,95	10,90	0,04
T67L	1,02	1,02	0,93	0,87	0,94	7,26	0,04

Tabla 28. Proporción de cambio entre las Energías Potenciales, área oculta, flexibilidad, polaridad, e hidrofobicidad, de los aminoácidos mutados con respecto de los aminoácidos nativos de las mioglobinas unidos a CO

En la Tabla 29 se observa el grupo de mioglobinas seleccionadas que aumentan la constante de afinidad para O₂ y a su vez disminuyen la constante de afinidad para CO. Estas mutaciones fueron seleccionadas con el criterio de producir una proporción de cambio mayor que aquellas moléculas simuladas con constante de afinidad determinada experimentalmente, es decir en el grupo de Mb unidas a O₂ la mutación que presentó la mayor afinidad lo hizo con una relación de 12,5 veces mas respecto a la nativa (Tabla 25). Para las Mb simuladas que unen CO se seleccionan aquellas que producen una proporción de cambio en la afinidad menor de 14.8 veces respecto a la nativa. Con base es estos criterios se puede observar que la mayoría de las mutaciones en las posiciones 29 y 67 aumentan la afinidad para O₂ y la disminuyen para CO. Sólo existe una mutación en la posición 64 que aumenta la afinidad para O₂ hasta 13,05 veces más respecto a la nativa y a su vez la aumenta solo 0,04 veces más para CO. Todas estas estructuras presentaron valores de RMS entre 0,02 y 0,06, lo que indica que las mutaciones realizadas permiten cambios en la estructura muy pequeños generando a su vez interacciones de largo alcance que se encuentran entre los rangos de energía que se han considerado biológicamente activa.

De acuerdo a los criterios de selección de las moléculas, aquellas que presentan valores de energía potencial de enlace y no enlace más negativos respecto a la nativa (Tabla 29), son las mutaciones T67P, T67V y L29P.

Mutación-O ₂	E. corto-alcance-O ₂ (kJ/mol)	E. largo alcance-O (kJ/mol) ₂	Kaf-O ₂ (μM ⁻¹)	RMS-O ₂ (Å)	Kaf-CO (μM ⁻¹)	RMS-CO (Å)	E. corto alcance-CO (kJ/mol)	E. largo alcance-CO (kJ/mol)
T67K	1246,84	-8515,34	27,89	0,03	9,14	0,04	1299,75	-8563,25
T67E	1148,45	-8533,080	26,18	0,03	4,89	0,03	1297,77	-8511,09
L29K	1243,35	-8501,05	23,85	0,03	0,64	0,04	1296,47	-8542
T67W	1251,71	-8562,96	22,35	0,03	11,37	0,04	1296,75	-8592,37
T67P	1292,9	-8470,82	22,09	0,06	8,14	0,04	1336,49	-8536,1
T67L	1255,58	-8536,46	20,47	0,03	7,26	0,04	1309,98	-8574,63
T67Y	1250,80	-8611,770	19,53	0,04	11,22	0,05	1291,24	-8640,9
L29P	1299,46	-8516,67	19,49	0,06	7,74	0,05	1340,9	-8469,62
L29D	1250,08	-8563,18	18,53	0,05	-1,51	0,05	1289,38	-8584,47
T67V	1297,75	-8480,130	18,17	0,03	5,52	0,02	1257,79	-8519,53
L29F	1261,71	-8523,68	16,96	0,04	3,47	0,05	1306,72	-8535,81
T67F	1250,22	-8573,64	16,81	0,04	6,04	0,03	1298,66	-8526,83
L29S	1241,86	-8475,69	14,68	0,02	1,61	0,03	1292,4	-8522,47
L29Y	1263,11	-8568,72	14,47	0,05	6,81	0,05	1313,02	-8578,59
T67Q	1261,01	-8718,73	14,38	0,04	6,59	0,04	1302,03	-8734,24
T67N	1256,17	-8711,38	14,36	0,04	3,99	0,03	1303,29	-8700,6
T67S	1248,01	-8539,92	14,09	0,03	6,25	0,04	1289,57	-8577,44
L29Q	1252,27	-8686,29	13,73	0,03	1,77	0,04	1299,99	-8734,86
T67D	1244,82	-8495,36	13,43	0,02	3,67	0,06	1287,25	-8614,31
H64K	1258,1	-8529,48	13,05	0,04	6,47	0,04	1302,03	-8734,24

Tabla 29. Mioglobinas con mutaciones simuladas seleccionadas de acuerdo a los criterios establecidos para el modelo.

Molécula	Energía corto alcance (kJ/mol)	Energía largo alcance (kJ/mol)
1MBO-O2	1292	-8413
1VXC-CO	1342	-8437

Tabla 30. Valores de Energía Potencial de las mioglobinas nativas unidas a CO y O₂

9 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La comparación entre las secuencias de mioglobina de ballena (*Physeter catodon*) y *Ascaris suum* evidenció la presencia de dos grupos ancestrales diferentes pero conservados dentro de cada especie. A pesar de presentarse esta diferencia esta molécula desempeña la misma función en todos los organismos, la de almacenar y transportar ligandos como O₂, entre otros. Estas diferencias pueden estar relacionadas con las diferencias encontradas en la actividad ligadora de cada una. Mientras que en los mamíferos se encuentra involucrada en metabolismo netamente aerobio, en los nemátodos como el *Ascaris suum* está presente para un metabolismo esencialmente anaerobio pero optativamente aerobio e incluso ha sido reportada como la de más alta afinidad por el O₂, este rasgo, común a otros tremátodos, cuestiona la presencia de transportadores de oxígeno en la situación anaeróbica. (Travaglini-Alocatelli y col., 1994; Kiger y col., 1998). Se puede presumir que, evolutivamente, el gen que codifica un pigmento de tipo Mb es universal, por lo tanto está presente en casi todos los organismos; esto se ha demostrado en los peces del antártico que a pesar de tener el gen no lo expresan (Sidell y col., 1997). También puede ser que el gen no se exprese o que lo haga a niveles difícilmente detectables, o sólo en ciertas circunstancias, como es el caso de la Simbiosis fijadoras de nitrógeno, en donde la Hb solo es sintetizada por la planta huésped infectada por la bacteria simbiótica. Es difícil predecir en cual de estas circunstancias sea utilizada la mioglobina para el transporte de gases en estos organismos, probablemente, la designación anaerobia se deba principalmente al entorno en donde se

encuentra. En este caso si este parásito vive en un entorno aerobio, estos puede sobrevivir.

La mayor afinidad reportada hasta el momento de la mioglobina en el *Ascaris*, se debe posiblemente a que el origen de las hemoproteínas es muy antiguo y se remonte a los procariotes (Toumoud & Truchot, 1994), que hace miles de millones de años fueron lo únicos seres vivos que poblaron la tierra cuando el oxígeno, sustancia tóxica debía ser atrapada y neutralizada. Estas características, muy efectivas, pudieron ser heredadas y utilizadas, como adaptación al medio, por el *Ascaris suum*.

La diferencia en la capacidad funcional de la Mb de ballena, tomada como patrón en este estudio, y la de *Ascaris suum*, cuya actividad es considerada como el objetivo a alcanzar con las mutaciones a la de ballena, se ha venido estudiando desde el punto de vista estructural y bioquímico. El primer análisis ha permitido el diseño de nuevas moléculas, basados conceptualmente en el principio que ya formuló Ehrling en 1899 de la “llave y la cerradura”, es por esto que sitios específicos en diversas moléculas intervienen directamente en la interacción con el ligando y por lo tanto modifican su función. Con base en esta teoría, en este trabajo se dio particular énfasis al análisis de residuos distales y proximales al grupo hemo de la Mb o sea el equivalente a un sitio activo potencial en ella. Actualmente, mediante el uso de técnicas computacionales basadas en la teoría de campos de fuerza el estudio de una molécula no sólo se puede realizar desde el punto de vista de complementariedad geométrica, sino también ampliado a otras propiedades de los residuos constituyentes del sistema total. En el caso de las hemoproteínas se ha comprobado experimentalmente que el entorno proteico, o sitios activos de la molécula, permiten modificar la afinidad por diversos ligandos (Chang y col., 1975).

Como se ha dicho anteriormente la posición geométrica de los átomos en la molécula es importante para definir cualquier tipo de interacción. Para conservar una precisión y exactitud adecuada para la localización espacial de

los átomos, en este trabajo se seleccionaron estructuras con una resolución de difracción de hasta un límite de 2 Å. Aun así se pudo observar, a través de cálculos de RMS, que estructuras difractadas con la misma resolución e incluso generadas bajo los mismos criterios presentaban diferencias estructurales que podrían distorsionar los resultados en los valores energéticos para cada molécula de mioglobina. Con base en esto, y para aplicar correctamente la teoría de campos de fuerza, se llevaron todas las estructuras a un mínimo local de energía. Luego de este proceso los valores de energía potencial obtenidos mostraron un rango de variación mínimo confirmando esto que las coordenadas asignadas a los átomos de las moléculas se encuentran ajustados en un rango estrecho alrededor de un promedio y es posible que este se relacione con el rango en el que la molécula se encuentre biológicamente activa.

Estudios anteriores han demostrado que la estructura que presenta el complejo Fe-CO-O₂ es importante al definir la mecánica de unión del ligando (Stryer, 1995), como es el caso del CO en donde la desviación es de ~7°. Otros autores (Ray y col., 1995; Slebodnick & Ibers, 1997) mediante técnicas espectroscópicas han demostrado que esta desviación es pequeña y que el costo en la energía en la desviación del enlace es muy pequeño (Vangberg y col., 1997; Rovira & Parinello., 1999; Spiro & Kozlowiki, 1998; Havlin y col., 1998) lo que permite corroborar en los resultados de la pequeña variación de los valores energéticos entre el grupo de mioglobinas nativas sin ligando y el grupo de mioglobinas nativas con ligando, que el aporte de energía lo ofrece la apoproteína respecto al ligando. De otra parte, también es importante anotar que si la energía de desviación es pequeña, el aporte en la energía potencial de enlace del CO para estabilizar la interacción debe ser de igual forma pequeño y la energía potencial de enlace para este ligando es más positiva (~1342,24 kJ) respecto a la energía potencial de enlace para O₂ ~ (1292.11 kJ) más negativa. Esto permite decir, que las energías de largo

alcance son más importantes en el momento de la interacción del ligando con el total de la parte proteica.

En la determinación de la relación entre el ligando y la macromolécula dada por la función fue necesario simular mutaciones empleando métodos computacionales. Estas simulaciones se realizaron con base en mutaciones a las cuales se les ha determinado la afinidad experimentalmente, puesto que no se encontraron estas moléculas reportadas en PDB.

El valor de $R^2 = 0,23$ y $0,34$ obtenido en la correlación de los valores de energía de las moléculas simuladas con los valores de la constante de afinidad permitió sugerir la existencia de otros posibles factores no identificados, indicando una dependencia compleja de la constante de afinidad con los cambios de energía potencial de enlace y no enlace, así como lo han determinado los diversos estudios realizados al tratar de entender la dinámica de interacción entre las hemo proteínas y sus ligandos (Dickerson & Geis, 1983; Springer & Sligar, 1987; Phillips, 1980 y Shaanan, 1983). A pesar de lo mencionado anteriormente respecto a la baja influencia de la estructura de la unión ligando en la interacción, este resultado permite presumir que el modelo no explica en su totalidad el fenómeno debido a que las características químicas de cada uno de ellos (CO y O_2) son diferentes y por lo tanto pueden influir en la interacción. Esto es coherente con los resultados obtenidos por los cálculos de RMS para las estructuras de las mioglobinas unidas a CO y O_2 . Allí se observó que los cambios en la estructura para los dos ligandos es diferente y así mismo se dejan influenciar por las propiedades físico-químicas de los residuos de una forma diferente. Esta hipótesis se pudo comprobar al obtener unos coeficientes de correlación (R^2) de $0,95$ para O_2 y $0,74$ para CO entre las constantes de afinidad experimentalmente determinadas y todos los factores físico-químicos considerados en la regresión múltiple. Era de esperarse que si las características químicas de cada ligando son diferentes que el modelo no sea explicado de la misma forma para los dos; La mayor correlación para O_2 se

puede explicar en términos de las interacciones de largo alcance que incluyen electrostáticas, puentes de hidrógeno, etc. Es decir, tanto el complejo $\text{Fe}^{\delta(+)}\text{-O-O}^{\delta(-)}$ como el complejo $\text{Fe}^{\delta(+)}\text{-C=O}^{\delta(-)}$ presentan una polarización por redistribución de las cargas negativas que, potencialmente, los puede hacer más aptos para interactuar formando puentes de hidrógeno con los residuos distales, pero la polarización de las cargas negativas que presenta el CO es mayor debido al enlace entre átomos diferentes. En el caso del oxígeno, esta polarización se puede incrementar sensiblemente con la contribución del entorno proteico, mientras que para el CO, polar en sí mismo, la contribución no alcanza a modificar su valor inicial.

Los valores de las propiedades que se postulan en este trabajo para explicar la interacción entre la mioglobina con O_2 y CO, mediante métodos computacionales, junto con los valores de energía potencial de la molécula, ajustados a la teoría de campos de fuerza y con el respectivo acople al modelo de regresión múltiple, permitió acceder a ayudas rápidas y eficaces que disminuyeron el tiempo y costo en la investigación. En este trabajo, con la utilización de los métodos mencionados, se obtuvieron dos ecuaciones de regresión que explican la interacción de la mioglobina con O_2 y CO teniendo en cuenta propiedades tales como energía potencial, flexibilidad, área oculta, volumen hidrofobicidad, y polaridad . Estas ecuaciones indican el porcentaje de variación en los valores de la constante de afinidad, de acuerdo a los valores dados a cada una de las variables, multiplicados por un coeficiente de regresión constante para cada una.

Las mutaciones en cada una de las posiciones 29 y 67 modificaron el patrón de comportamiento de la molécula nativa en sus interacciones, lo que se logró explicar por un modelo de regresión múltiple que considera algunas propiedades específicas de los amino ácidos mutados y que permite predecir el aumento de la afinidad para el O_2 y simultáneamente la disminución para el CO. Las mutaciones realizadas en la posición 64, aunque presentan la misma tendencia en las interacciones, no lo hacen con la misma proporción,

es decir, el incremento en la afinidad por el O₂ es menor con respecto a las mutaciones en las posiciones 29 y 67. En otros estudios (Rovira, 2000) sobre la dinámica de rotación del CO y O₂ se ha encontrado que la energía de rotación de los ligandos es insensible a la orientación del imidazol de la histidina distal (His⁶⁴) (~ 1,3 Kcal para el O₂), lo cual indica que es independiente de la rotación del imidazol. Con base en estos resultados y los obtenidos en este trabajo respecto al efecto de mutar la histidina en esa posición se puede sugerir que la unión al ligando no sólo está influenciado por el residuo en esta posición, que se creía previamente era la puerta de entrada de los ligandos (Case & Karplus, 1979; Kottalam, 1988). Es posible que este residuo contribuya a otorgar un ambiente polar positivo (Figura 27a y b) cooperativamente con la influencia de las cargas de los otros residuos proximales. Esto se puede reinterpretar como la independencia relativa del ambiente polar generado por la histidina con respecto a los pequeños movimientos que este residuo logra hacer dentro de la estructura proteica, de esta forma es comprensible que los efectos de volumen, flexibilidad y otros factores considerados no tengan la misma capacidad predictiva que lo observado para otras posiciones estudiadas.

El entorno protéico del grupo hemo está mayormente influenciado por un ambiente hidrofóbico excepto por las dos histidinas, distal y proximal. Según estudios anteriores el papel que juega la hidrofobicidad en este bolsillo es fundamental para definir la interacción. (Takeshi y col., 1997)

Los resultados obtenidos aquí muestran, en general, que al simular un bolsillo menos hidrofóbico y mucho mas polar se obtiene una mayor afinidad por el O₂ particularmente en las posiciones 29 y 67. Estos resultados siguen siendo coherentes con la predicción de un modelo multifactorial al que aún no se le han identificado todos los factores reguladores. Por ejemplo, al realizar mutaciones por los residuos como la lisina (K) y el ácido glutámico (E) se logró aumentar la afinidad para el O₂. Al realizar mutaciones por residuos como la glutamina(Q), la asparagina (N), el ácido aspártico (D) y la

arginina(R) no se alcanza el mismo incremento. Sin embargo la proporción de cambio de las polaridades para todos estos residuos está entre 1,23 y 1,31, luego no sólo este factor influenció el incremento y pueden existir otros reguladores importantes que están limitando el aumento de afinidad por sólo aumentar la polaridad. Las mutaciones por el glutámico y la lisina otorgan al sistema una energía similar a la de la proteína nativa (proporción de cambio entre 1,01 y 1,02) mientras que aquellos , aún aumentando las polaridades en la misma proporción no aumentan la afinidad por el ligando, ya que la energía que le aportan al sistema (proporción de cambio entre 1,04 y 1,05) mayor que la de la molécula nativa, y que por este motivo posiblemente desestabilice la interacción. Estos resultados aún no tiene una explicación completa considerando los factores de este estudio.

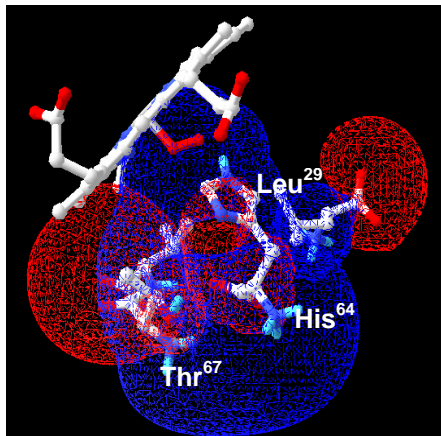
Como se observa en las figuras 26 b y c, la lisina tanto en la posición 29 como en la 67 ofrece un ambiente polar con una carga positiva mayor respecto a la molécula nativa creando el ambiente propicio para la formación del complejo $\text{Fe}^{\delta(+)}\text{-O-O}^{\delta(-)}$ con una carga negativa que se estabiliza en medio del entorno proteico. Así mismo, la sustitución por ácido glutámico (E) (Figuras 24c y 25c) aunque no propicie un entorno polar con una carga más positiva, la carga negativa del grupo carboxilo del glutámico crea una especie de distribución dipolar, que encierra al ligando brindándole estabilidad. Es decir, el grupo carboxilo al brindar una carga polar negativa interacciona con las cargas polares positivas de los residuos circundantes encerrando al grupo hemo y por consiguiente al ligando. Sin embargo, los dos efectos mencionados deben tener un límite llevando al sistema a un equilibrio inestable en el que si se sobrepasa cierto valor el efecto logrado no conserva un incremento lineal, por ejemplo al mutar por el residuo arginina (R) (Figuras 26b y c) la polaridad del residuo es muy intensa debido a la presencia de los grupo NH^{3+} en el radical que le otorga al bolsillo una carga positiva distribuida en una nube electrónica que alcanza a interactuar con el grupo hemo resultando al final una desestabilización del mismo.

De otra parte aquellas mutaciones que cumplen con los criterios establecidos en el modelo como la T67P y la L29P, permiten observar que estas mutaciones ofrecen un ambiente muy parecido al del ácido glutámico (Figuras 24d y 25d) pero a su vez crean una energía de interacción predeciblemente más estable tanto para las energías de enlace como las energías de no enlace; esto se puede explicar por las particulares propiedades de la prolina como imino ácido que tiene limitaciones para la formación de puentes de hidrógeno pero a su vez brinda un ambiente polar por la existencia de su pirrol. (Creighton,1984)

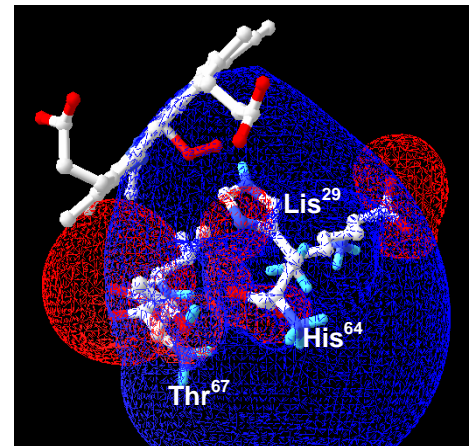
Todas estas mutaciones permiten un ambiente electrostático con las mismas características tanto para CO como para O₂ (Figura 27 a y b). Este ambiente influye en la interacción de una forma diferente debido como se a dicho, a que cada ligando posee características químicas diferentes, y también a que este no es el único factor que regula la interacción, posiblemente debida a efectos cuánticos imposibles de calcular mediante este modelo

En general las propiedades de los aminoácidos como volumen, hidrofobicidad, polaridad, área oculta y flexibilidad, complementan la relación de la energía potencial con la afinidad de la mioglobina por ligandos como O₂ y CO, lo que indica que este tipo de interacciones es multifactorial y que todavía no se han determinado todos los factores que la explican. Aún así, en términos de energía potencial fue posible ratificar la influencia del entorno proteico al modificar la constante de afinidad. Muchas de las conclusiones obtenidas en trabajos experimentales anteriores se han podido confirmar con la aplicación de este modelo computacional, indicando de esta forma que mediante el uso de programas y modelos computacionales es posible obtener resultados rápidos y con una capacidad de predicción aceptable.

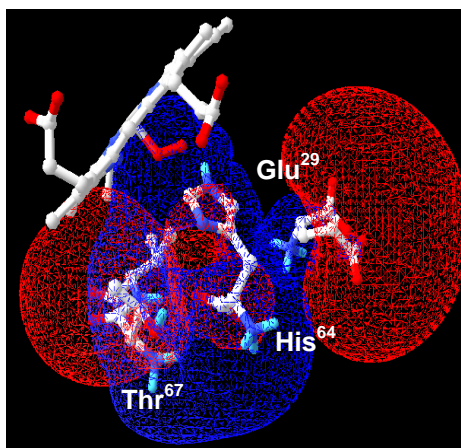
(a).Nativa-O₂



(b) L29K



(c) L29E



(d) L29P

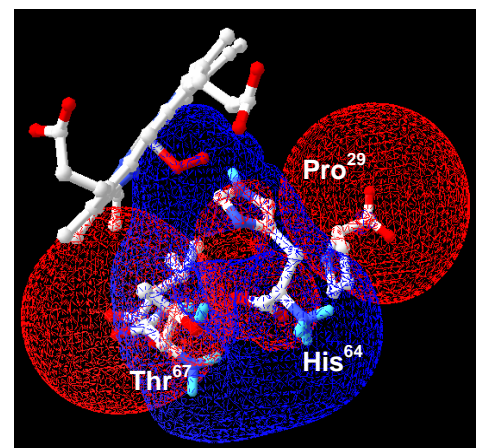
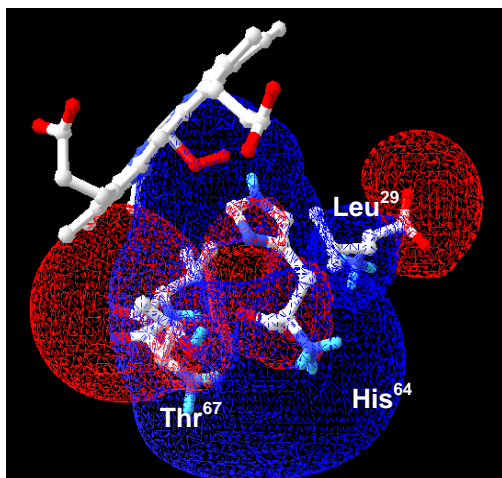
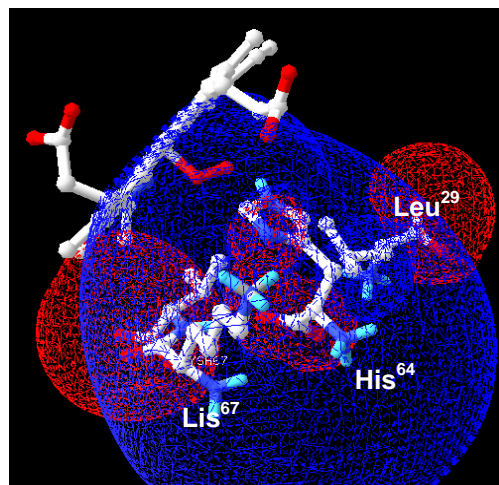


Figura 24. Potencial electrostático de la mioglobina nativa unida a O₂ (a), mioglobina con la mutación L29K (b), L29E (c) y L29P (d)

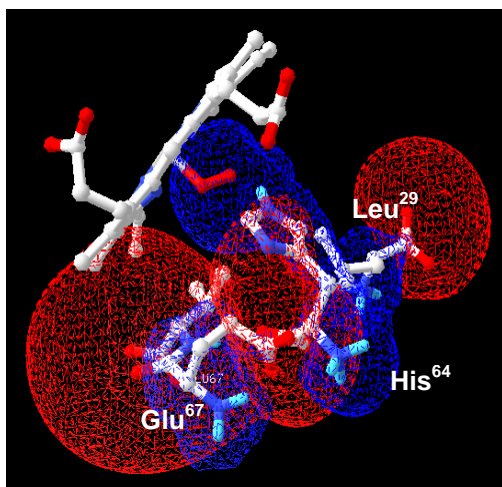
(a) Nativa-O₂



(b) T67K



(c) T67E



(d) T67P

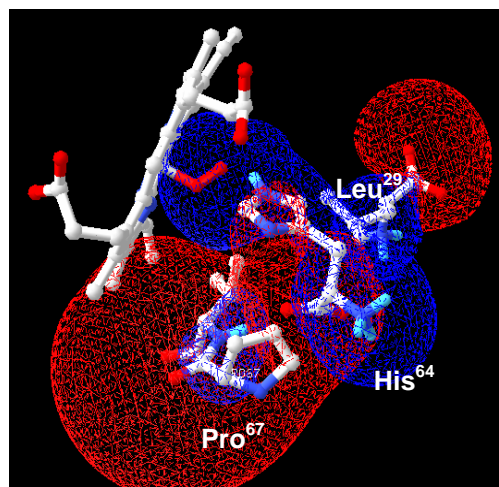
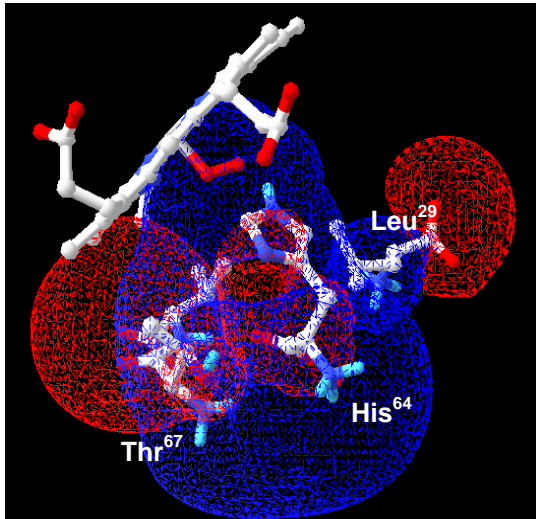
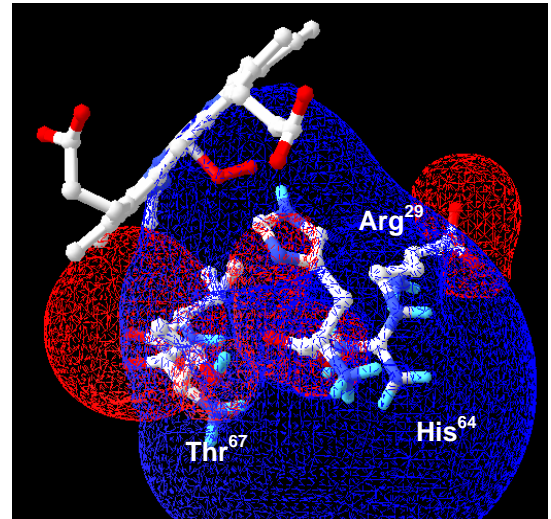


Figura 25. Potencial electrostático de la mioglobina nativa unida a O₂ (a), mioglobina con la mutación T67K (b), T67E (c) y T67P (d)

(a) Nativa-O₂



(b) L29R



(c) T67R

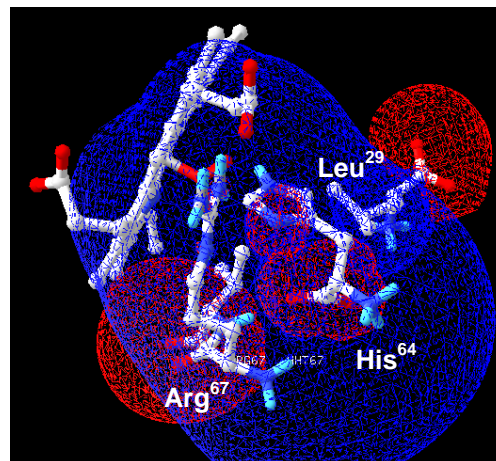
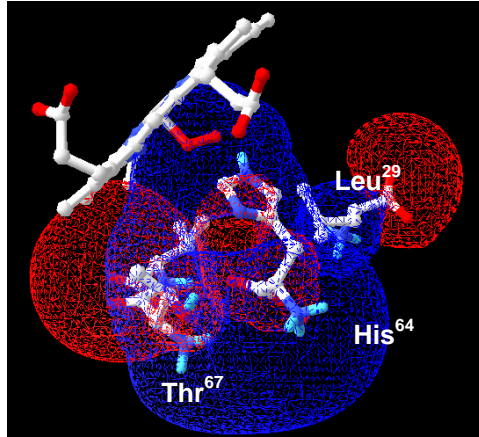


Figura 26. Potencial electrostático de la mioglobina nativa unida a O₂ (a), mioglobina con la mutación L29R (b), T67R (c)

(a) Nativa-O₂



(b) Nativa-CO

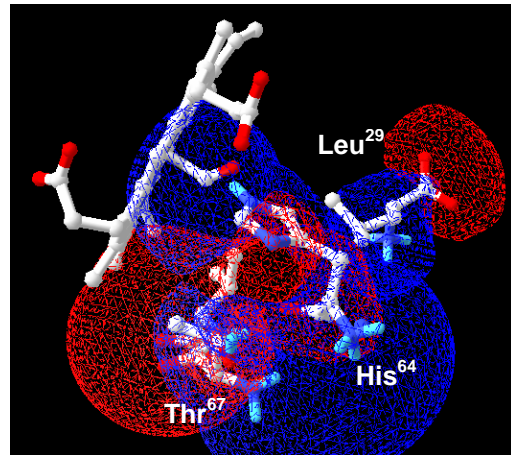


Figura 27. Potencial electrostático de la mioglobina nativa unida a O₂
(a), mioglobina nativa unida a CO (b)

10 CONCLUSIONES

- 1. La energía potencial de interacción entre la mioglobina y ligandos como CO y O₂ es aportada principalmente por la macromolécula.
- 2. La baja variabilidad de los valores energéticos iniciales de la mioglobina tanto nativa y mutada indican, que la mioglobina biológicamente activa tiene valores energéticos estrechos.
- 3. La correlación menor energía mayor constante de afinidad, se observó entre la energía potencial debida a las interacciones electrostáticas en las mioglobinas nativas unidas a CN, NO, CO y O₂.
- 4. Existe correlación entre los valores energéticos de las mioglobinas nativas determinadas experimentalmente con los valores de las mioglobinas con mutaciones simuladas expresado en un índice de correlación del 99% mediante el modelo de regresión lineal.
- 5. La relación existente entre los valores de energía potencial de la mioglobina y la constante de afinidad puede ser explicada con una correlación (R²) del 0,23y 0,34 para O₂ y CO respectivamente, mediante el modelo de regresión lineal.
- 6. Existe una dependencia multifactorial entre la constante de afinidad con los cambios de la energía potencial de enlace y no enlace.
- 7. Los factores que influyen en la interacción de la Mb con O₂ y CO son diferentes para cada ligando.
- 8. Para el caso de la Mb de ballena unida a O₂ la interacción puede ser explicada con índice de correlación (R²) de hasta un 0.95 mediante un modelo de regresión múltiple. Se encontraron relevantes los cambios de

factores como volumen, flexibilidad, polaridad, hidrofobicidad, y energía potencial de largo alcance de los aminoácidos mutados respecto a los nativos.

- 9. Para el caso de la Mb de ballena unida a CO la interacción puede ser explicada con un índice de correlación (R^2) de hasta un 0.74, mediante un modelo de regresión múltiple que encontró como importantes los cambios de factores como área oculta, flexibilidad, polaridad, hidrofobicidad, y energía potencial de largo alcance de los aminoácidos mutados respecto a los nativos.
- 10. No se conocen todos los factores que pueden regular la interacción de la mioglobina con ligandos inorgánicos como O_2 y CO.

11 RECOMENDACIONES

1. Aplicar el modelo de regresión lineal múltiple aplicando los mismos factores propuestos para regular la interacción simulando mutaciones en posiciones de la superficie de la molécula.
2. Obtener constantes de afinidad de moléculas con mutaciones múltiples y aplicar el modelo de regresión múltiple.
3. Obtener un banco de datos de constantes de afinidad determinadas bajo los mismos criterios y de los mismos grupos de investigación.
4. Obtener experimentalmente las moléculas de mioglobina con las mutaciones sugeridas en este trabajo
5. Determinar experimentalmente la afinidad de las moléculas con mutaciones simuladas que aumentaron la constante de afinidad para O_2 en este modelo.
6. Aplicar el modelo de regresión lineal utilizando otras propiedades de los aminoácidos que posiblemente puedan explicar la interacción.

12 BIBLIOGRAFÍA

1. Adachi. S., Sunohara. N., Ishimori. K., Morishima. . 1992. Structure and Ligand Binding Properties of leucine 29 (B10) Mutants of human Myoglobin. J. Biol.Chem. 267(18)12614-12621.
2. Adachi, S & Morishima, I. 1989. The effects of Pressure on Oxygen and Carbon Monoxide Binding Kinetics for Myoglobin. J. Biol. Chem. 263(32)18896-18901.
3. Antoni, E.and Bruniri, M. 1971. Hemoglobin and Myoglobin in their Reactions with Ligands. North-Hollan Publishing co Amsterdam. pp.150-180
4. Baker. P., Ferguson. S.1 999. Still a puzzle: why is haem covalently attached in c-type cytochromes? Structure. 7. R281-R290.
5. (BLAST) BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL).
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>
6. Brantley, R. E. Jr., Smerdon, S. J., Wilkinson, A. J., Singleton, E.W., and Olson, J. S. 1993. J. Biol. Chem. 270. En Zhao, X; Vyas, K., Nguyen, D; Rajarathnam, K., La Mar, G., Li, T., Phillips, G.; Eich, R., Olson, J. S., Ling, J., and Bocian, D. 1995. A double Mutant of sperm Whale myoglobin mimics the Structure and function of Elephant myoglobin. J. Biol. Chem. 270(35):20769-20774.
7. Benson, D. A., Boguski, M. S., Lipman, D. J., Ostell, J., Ouellette, F.1997 GenBank. Nucleic Acids Research. 26(1)2-7
8. Belleli, A., Antonini, G., Brunori, M., Springerg, B., Sligar, S. 1990. Transient Spectroscopy of the Reaction of Cyanide with Ferrous Myoglobin. He J. Biol. Chem. 265(31)18898-18901.

9. Bernstein, F.C., Koetzle, T.F., Williams, G: J.B., Meyer, E.F., Brice, M.D., Rodgers, J.R., Kennard, O., Shinanouchi, T., and Jasomi, M. 1977. T Protein Data Bank: a computer based archival file for macromolecular structure. *J. Mol. Biol.* 112: 535-542.
10. Berendsen, H. J. C., Potsma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., DiNola, A. D., Haak, J. R. *J. Chem. Phys.* 1984. 81. En San Francisco Program of Applications for the Simulation of Molecular Systems. SPASMS. Copyright.1989-1995. Regents of the University of California All Rights Reserved.
11. Carver, T., Rohlfs, R., Olson, J., Gibson, Q., Blackmore, R., Springer, B., Sligar, S. 1990. Analysis of the Kinetic Barriers for Ligand Binding to Sperm Whale Myoglobin Using Site-directed Mutagenesis and laser Photolysis techniques. *The J. Biol. Chem.* 265(32). 20007-20020.
12. Case, P: A & Karplus, M. 1979. Stereochemistry of carbon monoxide binding to myoglobin and hemoglobin. *J. Mol. Biol.*132:343-368.
13. Chang, R. 1996. Fisicoquímica con aplicaciones a sistemas biológicos. Primera edición en español. Compañía editorial continental, S.A D.E C.V. México.
14. Collman, J. P., Brauman, J. I., Halbert, T. R., and Suslick, K. S. 1976. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73. En Rohlfs, R., Matthews, A., Carver, T., Olson, J., Springer, B., Egeberg, K., Sligar, S. 1990. The Effects of Amino Acid Substitution at Position E7 (Residue 64) on the Kinetics of Ligand Bindind to Sperm Whale Myoglobin. *J. Biol. Chem.* 256(6).3168-3176
15. Creighton, T. E. 1984. *PROTEINS: Structure and Molecular Properties.* pg 5-28. W.H. Freeman and Co., New York.
16. Dawson, J. H. 1988. *Science* 240. En Dou, Y., Admiraal, S., Saito, M., Krzywada, S., Wilkinson, A., Li, T., Olson, J., Pickering, J, George, G. 1995. Alteration of Axial Coordination by protein Engineering in Myoglobin. *J. Biol. Chem.* 270(27):15993-16001.
17. Dene, H., Goodman, M., and Romero-herrera, A. E. 1980. *Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 207. En Zhao, X., Vyas, K., Nguyen. D., Rajarathnam. K., La Mar, G., Li, T., Phillips, G.; Eich, R., Olson, J. S., Ling, J., and Bocian, D., 1995. A double Mutant of sperm Whale myoglobin mimics the Structure and function of Elephant myoglobin. *J. Biol. Chem.* 270(35):20769-20774.

18. Dickerson, E. R; & Geis, I. 1993. Hemoglobin Structure, Fuction, Evolution, and Patology. Benjamin Cummings Publishing Company Inc: Menlo Pank, CA. En Carver, T., Ronald,J., Rohlfs., and Olson, J., Gibson, Q., Blackmore, R. 1990. Analysis of the Kinetic Barriers for Ligand Binding to eperman Whale Myoglobin Using Site-directed Mutagenesis and Laser Photolysis Techniques. J. Biol. Chem. 265(32): 20007-20020.
19. Egeber, K. D., Springer, B. A., Sligar, S. G., Carver, T: E., Rohlfs, R. J., and Olson, J. S. 1990. The role of val 68 in ligand binding to Sperm Whale Myoglobin. J. Biol. Chem. 265:11788-11795.
20. Eisenhaber, F., Lijnzaad, P., Argos, P., Sandetr, C., Scharf, M. 1995. The Double Cubic Lattice Method: Efficient Approaches to Numerical Integration of Surface Area and volume and to Dot Surgace Contouring of Molecular Assemblies. Journal of Computacional Chemistry. 16(3):273-284
21. Eisenhabe,r F., Lijnzaad, P., Argos, P. 1996. Hydrophobic regions on protein surface: definition based on hydration shell structure and a quick method for their computation. Protein Engineering. 9(12):1121-1133.
22. Federici, L., Savino, C., Musto, R., Alocatelli, C., Cutruzzola, F., Brunori, M. 2000. Engineering His (E7) Affects the Control of heme reactivity in *Aplysia limacina* Myoglobyn. Biochemical and Biophysical Research Communication. 269:58-63.
23. Grantham, R. 1974. Amino Acid Difference Formula to Help Explain Protein Evolution. Science. 185:862-864.
24. Havlin, R. H., Godbout, N., Salzmann, R., Wojdelski, M., Arnold, C. E., Schuzl., and Oldfield, E. 1998. An experimental and density functional investgation of iron-57 Mossbauer quadrupole splittings in organometallic and heme-model compounds: applications to carbomonoxy-heme proteins structure. J. Am. Chem. Soc.102:3144-3151.
25. Huang, S., Huang, J., Kloe, P., Goldberg, D. E., Friedman, J. M. 1996 Hidrogen Bonding of Tyrosine B10 to Heme-bound Oxygen in Ascaris Hemoglobin. Journal Biological Chemistry. 271(2):958-962.
26. Hubbard, S. J., Gross, K., Argos, P.1994. Intramolecular cavities in globular proteins. Protein Engineering 7(5):613-626.
27. Información estructural en Bases de Datos. : <http://www.rcsb.org.gov>

28. Jewsbury, P., Kitagawa, T. 1994. The Distal residue-CO interaction in carbonyl Myoglobins: A Molecular Dynamics Study of two Distal Histidine Tautomers. *Biophysical Journal*. 67:2236-2250.
29. Jewsbury, P., Yamamoto, S., Minato, T., Saito, M., Kitagawa, T. 1995. The proximal residue largely Determines the CO Distortion in Carbon Monoxide Globin Proteins. An ab Initio study of a heme prosthetic Unit. *J. Physical Chem.* 99:12677-12685.
30. Johnson, K. A., Magde, S. D., Taube, D. J., Marstes, J. C., Traylor, T. G., and Sharma, V. S. 1988. *J. Am. Chem. Soc.* 110. En Rohlfs, R., Matthews, A., Carver, T., Olson, J., Springer, B., Egeberg, K., Sligar, S. 1990. The Effects of Amino Acid Substitution at Position E7 (Residue 64) on the Kinetics of Ligand Binding to Sperm Whale Myoglobin. *J. Biol. Chem.* 256(6):3168-3176
31. Kendrew, J. C., Dickerson, R. F., Strandberg, R. G., Hart, D. R., Davies, D. C., Phillips, and Shore, V. C. 1960. Structure of myoglobin: At three dimensional fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature*. 185: 422-427.
32. Kiger, L., Rshid, A. K., Griffon, N., Haque, M., Moens, L., Gibson, Q. H., Poyart, C., Marden, M.c. 1998. Trematode Hemoglobins Show Exceptionally High Oxygen Affinity. *Biophysical Journal*. 75: 990-998
33. Kottalam, J., and Case, D. A. 1988. *J. Am. Chem. Soc.* 110. En Rohlfs, R., Mathews, A., Carver, T., Olson, J., Springer, B., Egeberg, K., Sligar, S. 1990. The Effects of Amino Acid Substitution at Position E7 (Residue 64) on the Kinetics of Ligand Binding to Sperm Whale Myoglobin. *J. Biol. Chem.* 256(6):3168-3176
34. Krzywda, S., Murshudov, G. N., Bruzozowski, A.; Jaskolski, M., Scott, E. E., Gibson, Q. H., Olson, J. S., and Wilkinson, A. J. 1998. Stabilizing Bound O₂ in myoglobin by Valine 68 (E11) to Asparagine substitution. *Biochemistry*. 37: 15896-15907.
35. Kuriyan, J., Wilz, S., Karplus, M., Prtsko, G. A. 1986. X-ray structure and refinement of carbon-monoxide (Fe II)-myoglobin at 1.5Å resolution. *J. Mol. Biol.* 192: 133-154.
36. Kyte, J., Doolittle, R. F. A. 1992. Simple Method for displaying the hydrophobic Character of a Protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-152.
37. La Mar, G. N., Dalichow, F., Zhao, X., Dou, Y., Saito, I. M., Chiu, M. L., Sligar, S. G. 1994. *J. Bio. Chem.* 269(47): 29629-29635.

38. Light, R. W., Rohlf, R. J., Palmer, G., and Olson, J. S. 1987. Functional Effects of Heme Orientational disorder in Sperm Whale Myoglobin. *J. Biol. Chem.* 262(1):46-52.
39. Li, T., Quillin, M. L., Phillips, G. N, Jr., and Olson, Jr. 1994. Structural determinants of the stretching frequency of CO bound myoglobin. *Biochemistry.* 33: 1433-1446.
40. Mathews, C. K., K. E. Van Holde. 1998.. *Bioquímica. Segunda edición.* McGraw-Hill. Interamericana de España.
41. Machida, K. 1999. *Principles of Molecular Mechanics.* Kodansha Ltd. Tokyo (Japan). and Wiley Inc (USA).
42. Miele, A., Santaché, S., Travaglini-Allocatelli, C., Vallone, B., Brunori, M., Bellelli, A. 1999. Modulation of Ligand Binding in Engineered Human Hemoglobin Distal Pocket. *J. Mol. Biol.* 290:515-524.
43. NCBI/NLM/NIH7ENTREZ. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ENTREZ/>)
44. Nguyen, B., Xia, Z., Cutruzzola, F., Travaglini, C., Brunori, M., La Mar, G. 2000. Solution 1h NMR study of the Influence of Distal Hydrogen Bonding and N Terminus Acetylation on the Active Site Electronic and Molecular Structure of *Aplysia limacina* Cyanomet Myoglobin. *J Biol. Chem.* 275(2): 724-751.
45. Monge, A., Lathrop, E., Gunn, Jr., Shenkin, P., Friesner, R. 1995. Computer Modeling of Protein Folding:Conformational and Energetic Analysis of Reduced and Detailed Protein Models. *J. Mol. Biol.* 247: 995-1012.
46. Olson, J.C., Mathew, A. J., Rohlf, R.J., Springer, B., Egeber, K.; Sligar, S. J., Tame, J., Renaud, J., and Nagai. K. 1988. The role of the distal histidine in myoglobin and haemoglobin. *Nature.* 336: 265-266.
47. Olson, J. S., 1994. *Biomater. Artif. Cells Immobilization Biotechnol.*22. En Zhao, X., Vyas, K., Nguyen, D., Rajarathnam, K., La Mar, G., Li, T., Phillips, G., Eich, R Jr., Olson, J., Ling, J., and Bocian, D. 1995. A double Mutant of sperm Whale myoglobin mimics the Structure and function of Elephant myoglobin. *J Biol Chem.* 270(35):20769-20774.
48. Ormos, P., Szaraz, S., Cupane, A., Nienhaus, G .U. 1998. Structural Factors Controlling Ligand Binding to Myoglobin: A kinetic hole-buning study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 6762-6767.

49. Oxender, D. L., Fox, F. 1997. Tutorial In Molecular and Cell biology. Rotein engineering. Alan R. LISS, INC. New York.
50. Ray, G. B., Li, X., Ibers, J. A., Sesler, J. L., and Spiro. T. G. 1994. How far proteins bend the FeCO unit? Distal polar and steric effects in heme proteins and models. *J. Am. Chem. Soc.* 116: 162-176.
51. Peterson, E. S., Huang, S., Wang, J., Miller, L. S., Vidugiris, G., Kloek, A.P., Goldberg, D. E., Chance, M. R., Witternberg, J. B., Friedman, J. M. 1997. A Comparison of Functional and Structural Consequences of the Tyrosine B10 and Glutamine E7 Motifs in Two Invertebrate Hemoglobins (*Ascaris summ* and *Lucina pectinata*). *Biochemistry.* 36(42): 13110-13121.
52. Phillips, S. E. V; and Schoenborn, B. P. 1981. Neutron difraction reveals Oxygen-histidine Hydrogen bond in oxymyoglobin. *Nature.* 292: 81-82
53. Phillips, S: E. V. 1981. The X-ray Structure of Deoxy-Mb (pH 8.5) at 1.4 Å resolution, Brookhaven Protein Data Bank,. Brookhaven National Laboratory, New York.
54. Romero-herrera, A. E; Goodmand, M., Dene, H., Bartiniki, D. E., and Mizukami, H. 1981. *J. Mol. Evol.* 17. En Zhao, X., Vyas, K., Nguyen, D., Rajarathnam, K., La Mar, G., Li, T., Phillips, G., Eich, R Jr., Olson, J., Ling, J., and Bocian, D. 1995. A double Mutant of sperm Whale myoglobin mimics the Structure and function of Elephant myoglobin. *The Journal of Biological Chemistry.* 270(35):20769-20774.
55. Rose, G. D., Geselowitz, A. R., Lesser, G. J., Zehfus, M. H.1985. Hydrophobicity of Amino Acid Residues in Globular Proteins. *Science* 229: 834-838.
56. Rovira, C.K., and Parrinello, M. 2000. Harmonic and Anharmonic Dynamics of Fe-Co and Fe-O in Heme models. *J. Biophys.* 78: 93-100.
57. Rovira, C. K., and Parinello, M., 1999. Factors influencing ligand binding properties of heme models: a first principles study of picket-fence and protoheme complexes. *Chem. Eur.J.* 5: 250-262.
58. Saito, M., Hori, H., Andersson, L., Prince, R., Pickerring, I., George, G., Sanders, C., Lutz, R., McKelvey, E., Mattera, R. 1992. Coordination Structure of the ferric heme iron in Engineered Distal histidine Myoglobin Mutants. *J. Biol. Chem.* 267(32): 22843-22852.

59. Schomburg, D. 1990. Methodological aspects and potencial of computer-aided protein engineering. *Food Biotechnol*: 4 329-336.
60. Shaanan, B. 1983. Structure of human oxyhaemoglobin at 2.1Å resolution. *J. Mol. Biol.* 171: 31-59.
61. Shih, H.H.L., Brady, J., and Kerplus. 1985. Structure of proteins with single-site mutation a minimum perturbation approach. *Prot. Natl. Sci. U.S.A.* 82: 1697-1700.
62. Sidell, B. D., Vayda, M. E., Small, D. J., Moylan, T. J., Londraville, R. I., Yuan, M., Rodnick, K., Eppley, Z., Costello, L. 1997. Variable expression of myoglobin among the hemoglobinless antarctic icefishes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 3420-3424.
63. Slebodnick, C., Ibers, J. A. 1997. Myoglobin models and steric origins of the discrimination between O₂ and CO. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2: 521-525
64. Spiro, T.G., and Kozlowki. 1998. Discordant result on FeCO deformability in heme proteins reconciled by functional theory. *J. Am. Chem. Soc.* 120:4524-4525.
65. Springer, B.A., Sligar, S.G., Olson, J. S., Phillips, G.N. 1994. Mechanisms of ligand recognition in myoglobins. *J. Chem. Rev.* 94: 699-714
66. Springer, B. A., and Sligar, S.G. 1987. High-level expression of Sperm Whale myoglobin in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 8962-8965.
67. Springer, B. A., and Sligar, S. G; Rohlf, R. J., Mathews, A. J., and Olson, J. S. 1989. Discrimination between Oxygen and Carbon Monoxide and Inhibition of Autooxidation by Myoglobin. *J. Biol. Chem.* 264: 3057-3060.
68. Stryer, S. 1995. Descripción de una proteína alostérica. *Bioquímica. Cuarta edición . Tomo I.* Editorial Reverté, S.A Freeman and Co. New York. pg.150-153.
69. Swiss Pdbviewer. <http://expasy.proteome.org.au/spdv>.
<http://expasy.ch/spdb/mainpage.htm>
70. Statistica. <http://www.statsoft.com>

71. Toulmond, A., Truchot, J. P., 1994. Los Transportadores del Oxígeno. *Mundo científico*.137(13): 642-649.
72. Travaglini-Allocatelli, C., Cutruzzola, F., Broncaccio, A. 1994. Ascaris hemoglobin oxygen affinity in Sperm whale myoglobin:role of tyrosin B10. *FEBS Letter*. 352:63-66.
73. Traylor, T. G., Tsuchiha, S., Campbell, D., Mitchell, M., Stynes, D., and Kog.1985b. *J. Am. Chem. Soc.* 107. En Rohlfs, R., Mathews, A., Carver, T., Olson, J., Springer, B., Egeberg, K., Sligar, S. 1990. The Effects of Amino Acid Substitution at Position E7 (Residue 64) on the Kinetics of Ligand Bindind to Sperm Whale Myoglobin. *J. Mol. Biol.* 256(6): 3168-3176
74. Teale, F.W.J. 1959. *Biochem. Biophys. Acta.* 35. En Varadarajan, R., Szabo, A., and Boxer, S. G. 1985. Cloning expresion in Escherichia Coli, and reconstitution of human myoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U:S:A.* 82: 5681-5684.
75. Uchida, T., Ishimori, K., Morishima, I. 1997. The Effects of heme Pocket Hydrophobicity on the ligand binding Dynamics in Myoglobin as Studied With Leucine 29 Mutants. *J. Biol. Chem.* 272(48): 30108.30114.
76. Vangberg, T. D., Bocian, D.F., Ghosh, A. 1997. Deformability of Fe(II) CO and Fe (III) CN groups in heme protein models: nonclonal dendity fuctional theory calculations. *J. Bio. Inorg. Chem.* 2: 526-530
77. Voronoi, G. F. 1908. Nouvelles applications des paramétrrs continuos a la theorie des formes quadratiques.*J.Reine Angew. Math.*134: 198-287.
78. Vyas, K., Rajarathan, K., Yu, L., Emerson, S. D., La Mar, G. N., Krishnamoorthi, R., and Mizukami, H. 1993. *J. Biol. Chem.* 268. En Zhao X., Vyas, K., Nguyen. D., Rajarathnam, K., La, Mar. G., Li,T., Phillips, G., Eich, R Jr., Olson, J., Ling, J., and Bocian, D. 1995. A double Mutant of sperm Whale myoglobin mimics the Structure and function of Elephant myoglobin. *J. Biol Chem.* 270(35): 20769-20774.
79. Waterman, M., Smith, H. Stadistic significance of local alignments with gaps In *Methods in Enzymology* (1996). 266: 477-485
80. Weiner, S. J., Kollman, P. A., Case, D. A., Singh, U. C., Ghio, C., Alagona, G., Profeta, Jr, S., Weiner, P. United-and all-atoms force fields. *J. Am. Chem. Soc.* 1984. 106: 765-784

81. Wittenberg, B., Wittenberg, J. B. 1989. Transport of Oxygen In Muscle. *Anu. Rev. Physiol.* 51: 857-78.
82. Wittenbergm, J. B., Wittenberg, B. A. 1990. Mechanisms of cytoplasmic hemoglobin and myoglobin function. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*19: 217-41
83. Yu, I. P., La Mar, G. N., and Mizukami, H. 1990. *Biochemistry.* 29. En Zhao, X., Vyas, K., Nguyen, D., Rajarathnam, K., La Mar, G., Li, T., Phillips, G., Eich, R Jr., Olson, J., Ling, J., and Bocian, D. 1995. A double Mutant of sperm Whale myoglobin mimics the Structure and function of Elephant myoglobin. *J. Biol Chem.* 270(35): 20769-20774.

Tabla de Contenido

1	INTRODUCCIÓN	1
2	OBJETIVOS	3
2.1	OBJETIVO GENERAL.....	3
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3	ANTECEDENTES	4
4	JUSTIFICACIÓN	18
	A pesar de la existencia de muchos trabajos tendientes a explicar la unión del oxígeno y otros ligandos a la mioglobina y la hemoglobina, los mecanismos de esta interacción aún no están completamente comprendidos desde el punto vista molecular.	18
5	HIPÓTESIS	20
6	MARCO TEORICO	21
6.1	MIOGLOBINA	21
6.1.1	Requisitos fisiológicos de la unión de oxígeno – mioglobina.....	27
6.2	PROPIEDADES QUIMICAS DE LIGANDOS QUE SE UNEN A LA MIOGLOBINA.....	31
6.3	MECÁNICA MOLECULAR	36
6.3.1	Componentes de un campo de fuerza.....	38
6.3.2	Aplicaciones de Campos de Fuerza.	38
6.3.3	Propiedades de Campos de Fuerza.	39
6.3.4	Energía debida a la elongación del enlace:.....	40
6.3.5	Energía debida al ángulo de enlace:	40
6.3.6	Energía debida a torsiones:.....	41
6.3.7	Energía debida a las interacciones carga-carga:.....	42
6.3.8	Interacciones de dipolos permanentes.	43
6.3.9	Energía debida a las interacciones de Van de Waals:	45
6.3.10	Energía debida a los enlaces de Hidrógeno:.....	47
6.4	ENERGÍA POTENCIAL DE SUPERFICIE.....	49
6.5	MINIMIZACIÓN DE LA ENERGÍA POTENCIAL	49
6.6	MUTACIONES PUNTUALES EXPERIMENTALES Y SIMULADAS.....	54
6.7	HERRAMIENTAS COMPUTACIONALES.....	57
6.7.1	INFORMACIÓN ESTRUCTURAL EN BASES DE DATOS	59
6.7.2	NCBI/NLM/NIH/ENTREZ	59
6.7.3	Alineamientos de secuencias	61
6.7.4	BLAST (BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL).....	62
6.7.5	Swiss-pdbviewer	65
6.7.6	Programa “ProtScale”	67
6.7.7	Programa “Statistica”	72

7	PROCEDIMIENTO.....	74
	A.....	76
7.1	BÚSQUEDA DE SECUENCIAS DE MIOGLOBINAS DE DIFERENTES ORGANISMOS	76
7.2	SIMILARIDAD DE SECUENCIAS	76
	B.....	77
7.3	IDENTIFICACIÓN DE MIOGLOBINAS DETERMINADAS EXPERIMENTALMENTE POR CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X	77
7.4	CALCULO DE ENERGÍA POTENCIAL MINIMIZADA DE LAS MOLECULAS DE MIOGLOBINA DETERMINADAS EXPERIMENTALMENTE AL VACIO.....	78
7.5	ANÁLISIS DE LOS VALORES DE ENERGÍA POTENCIAL MINIMIZADA DE LAS MIOGLOBINAS DETERMINADAS EXPERIMENTALMENTE AL VACIO POR CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X	79
7.6	ANÁLISIS DE LA RELACIÓN DE ENERGÍA ENTRE MACROMOLÉCULA LIGANDO.....	79
7.7	SIMULACION DE LAS MUTACIONES DE LAS MIOGLOBINAS DETERMINADAS EXPERIMENTALMENTE	80
7.8	CORRELACION ENTRE LOS VALORES DE ENERGÍA DE LAS MIOGLOBINAS EXPERIMENTALES Y LAS MUTACIONES SIMULADAS	81
7.9	BÚSQUEDA DE LAS CONSTANTES DE AFINIDAD DE MIOGLOBINAS DETERMINADAS EXPERIMENTALMENTE	82
7.10	SIMULACIÓN DE MUTACIONES DE MIOGLOBINAS PARA LAS CUALES EXISTEN CONSTANTES DE AFINIDAD REPORTADAS EXPERIMENTALMENTE	82
7.11	CORRELACIÓN DE LAS CONSTANTES DE AFINIDAD Y LOS VALORES DE ENERGÍA DE LAS MUTACIONES SIMULADAS	82
7.12	ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LAS MOLÉCULAS DE MIOGLOBINAS MUTADAS Y NATIVAS	83
	C.....	83
7.13	CORRELACIÓN DE LOS VALORES DE ENERGÍA POTENCIAL, PROPIEDADES DE LOS AMINOÁCIDOS MUTADOS Y LAS CONSTANTES DE AFINIDAD DETERMINADAS EXPERIMENTALMENTE	83
7.14	DETERMINACIÓN DE LA ECUACIÓN DE REGRESIÓN QUE EXPLICA LA DEPENDENCIA DE LA CONSTANTE DE AFINIDAD RESPECTO A LAS PROPIEDADES DE LOS AMINOÁCIDOS.....	84
7.15	DETERMINACIÓN DE CONSTANTE DE AFINIDAD PARA LAS MOLECULAS DE MIOGLOBINA CON NUEVAS MUTACIONES SIMULADAS..	85
7.16	PRE-SELECCIÓN Y ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LAS MOLÉCULAS DE MIOGLOBINA QUE SE AJUSTAN AL MODELO ESTABLECIDO.....	85

7.17	SELECCIÓN DE CRITERIOS Y DE LOS RESULTADOS MÁS SIGNIFICATIVOS DE LOS PERFILES ENERGÉTICOS HALLADOS	86
8	RESULTADOS	87
8.1	IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS.....	87
8.2	SIMILARIDAD DE SECUENCIAS	88
8.3	ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS DE DIFERENTES ESPECIES.	89
8.4	VALORES DE ENERGÍA POTENCIAL MINIMIZADA DE MOLECULAS DE MIOGLOBINA.....	91
8.5	CORRELACIÓN ENTRE LOS VALORES DE ENERGÍA POTENCIAL DE LAS MOLÉCULAS EXPERIMENTALES CON LOS VALORES DE ENERGÍA DE LAS MUTACIONES SIMULADAS.	101
8.6	CORRELACIÓN DE LOS VALORES DE ENERGÍA POTENCIAL SIMULADA CON LAS CONSTANTES DE AFINIDAD OBTENIDAS EXPERIMENTALMENTE.	105
8.7	ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LAS MOLÉCULAS DE MIOGLOBINAS CON MUTACIONES SIMULADAS Y NATIVAS.	109
8.8	CORRELACIÓN DE LOS VALORES DE ENERGÍA POTENCIAL, PROPIEDADES DE LOS AMINOÁCIDOS MUTADOS Y LAS CONSTANTES DE AFINIDAD DETERMINADAS EXPERIMENTALMENTE.	111
8.9	PREDICCIÓN DE LA CONSTANTE DE AFINIDAD CON BASE EN EL MODELO PROPUESTO.....	116
9	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	124
10	CONCLUSIONES	136
11	RECOMENDACIONES	116
12	BIBLIOGRAFÍA	139

Indice de Figuras

Figura 1. Mioglobina de ballena. Histidina proximal (His ⁹³); Histidina distal (His ⁶⁴).....	5
Figura 2. Interacción de la histidina distal en la posición 64.....	7
Figura 3. Glutamina en la posición 64 en la Mb de elefante.....	10
Figura 4. Mutación natural H64Q/L29F en Mb de elefante.....	11
Figura 5. Mioglobina de ballena mutada valina 68 sustituida por asparagina.....	14
Figura 6. Simulación de las mutaciones de mioglobina de <i>Ascaris suum</i> , en mioglobina de ballena.	16
Figura 7. Grupo Hemo de la mioglobina	21
Figura 8. Quinta y sexta posición de coordinación del grupo hemo.	23
Figura 9. Estructura tridimensional de la mioglobina	24
Figura 10. Secuencia de mioglobina de ballena.....	25
Figura 11. Curva de unión del oxígeno a la mioglobina	28
Figura 12. Orientaciones que puede tener la molécula de oxígeno al unirse al grupo hemo.	33
Figura 13. Formas de enlace del monóxido de carbono al grupo hemo de la mioglobina.....	34
Figura 14. Energías de corto alcance debidas a enlace, torsión y ángulo	41
Figura 15. Tipos de reacciones electrostáticas dadas en un sistema molecular.....	44
Figura 16. Interacción molecular de van der Waals.....	46
Figura 17. Interacción molecular debida a puentes de hidrógeno.	47
Figura 18. Optimización de la energía del hidrógeno	51
Figura 19. Seguimiento en la búsqueda de un mínimo local	52
Figura 20 Pasos requeridos en el diseño molecular por computador. (Schomburg,1990).....	58

Figura 21. Bases De Datos que constituyen ENTREZ y su interrelación.	60
Figura 22. Alineamiento de dos secuencias cortas usando la matriz de Smith-Waterman. (* Para identidad, - para delección)	61
Figura 23. Potencial electrostático de la molécula de mioglobina	67
Figura 24. Potencial electrostático de la mioglobina nativa unida a O₂(a), mioglobina con la mutación L29K(b), L29E (c) y L29P (d)	132
Figura 25. Potencial electrostático de la mioglobina nativa unida a O₂ (a), mioglobina con la mutación T67K (b), T67E (c) y T67P(d)	134
Figura 26. Potencial electrostático de la mioglobina nativa unida a O₂ (a), mioglobina con la mutación L29R (b), T67R (c)	135
Figura 27 Potencial electrostático de la mioglobina nativa unida a O₂ (a), mioglobina nativa unida a CO (b)	136

Indice de Tablas

Tabla 1. Porcentajes de identidad de la mioglobina de ballena respecto a las mioglobinas del Banco de Datos (BLAST)	64
Tabla 2. Escalas de volumen, hidrofobicidad, flexibilidad, polaridad y área oculta de aminoácidos del programa ProtScale.....	71
Tabla 3. Porcentajes de similaridad del alineamiento de la secuencia de mioglobina de ballena con el total del banco de datos	88
Tabla 4. Residuos distales y proximales al grupo hemo en mioglobinas de diferentes especies.	90
Tabla 5. Moléculas de mioglobina de diferentes especies registradas en el Banco de Datos de Proteínas (PDB).	91
Tabla 6. Valores de Energía de Potencial minimizada de mioglobinas nativas sin ligando.....	93
Tabla 7. Valores de Energía Potencial minimizada de mioglobinas nativas con ligando	93
Tabla 8. Valores de Energía Potencial minimizada de mioglobinas mutadas sin ligando.	94
Tabla 9. Valores de Energía de Potencial minimizada de mioglobinas mutadas con ligando.....	95
Tabla 10. Valores de coeficiente de variación (CV) de los datos de energía potencial inicial minimizada.....	96
Tabla 11. Valores de Energía Potencial minimizada de mioglobinas nativas unidas a CO ; con la mutación D122N y sin ligando.	97
Tabla 12. Valores de Energía Potencial minimizada de mioglobinas unidas a CO con mutaciones de Valina 68 sustituida por alanina-fenilalanina-isoleucina-leucina asparagina y la triple mutación V68A D122N-H64G junto con la mutación D122N.	98
Tabla 13. Valores de Energía Potencial minimizada de mioglobinas unidas a CO con mutaciones L29F/D122N y L29F/H64Q.....	99

Tabla 14. Valores de Energía Potencial minimizada de mioglobinas , unidas a CO con la doble mutación D122N/Histidina sustituida por T,G,L y Q.....	99
Tabla 15. Valores de Energía Potencial minimizada de mioglobinas unidas a O₂ con mutación D122N/L29W, L29Y/H64Q/T67R, la mutación puntual V68N y nativa.....	100
Tabla 16. Valores de Energía Potencial minimizada de mioglobinas nativas unidas a CO, O₂; CN y NO.....	101
Tabla 17. Valores de parámetros de la Energía Potencial minimizada de mioglobinas con mutaciones reales y simuladas con diferentes ligandos	102
Tabla 18. Valores de p arrojados en la prueba F para varianzas de dos muestras.....	103
Tabla 19. Valores de p arrojados en la prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales.....	103
Tabla 20. Valores de Energía Potencial de mioglobinas simuladas unidas a O₂ con constantes de afinidad.	108
Tabla 21. Valores de Energía Potencial de mioglobinas simuladas que unen CO con constantes de afinidad.....	108
Tabla 22. Valores de RMS para las mioglobinas que unen O₂ frente a Mioglobinas que unen CO nativas y mutadas.....	109
Tabla 23. Valores de RMS de mioglobinas que unen O₂ nativas frente a mioglobinas mutadas que unen O₂	110
Tabla 24. Valores de RMS de mioglobinas que unen CO nativas frente a mioglobinas mutadas que unen CO	110
Tabla 25. Proporciones de cambio entre los valores de energía potencial, constante de afinidad, volumen, hidrofobicidad, flexibilidad y área oculta de los residuos de las mioglobinas simuladas unidas a O₂ con sus correspondientes valores de los residuos en las proteínas nativas	114

Tabla 26. Proporciones de cambio entre los valores de energía potencial, constante de afinidad, volumen, hidrofobicidad, flexibilidad y área oculta de los aminoácidos de las mioglobinas simuladas unidas a CO con sus correspondientes valores de las proteínas nativa	115
Tabla 27. Proporción de cambio entre las Energías Potenciales, volumen, flexibilidad, polaridad, e hidrofobicidad, de los aminoácidos mutados con respecto a los aminoácidos nativos de las mioglobinas unidas a O₂	120
Tabla 28. Proporción de cambio entre las Energías Potenciales, área oculta, flexibilidad, polaridad, e hidrofobicidad, de los aminoácidos mutados con respecto de los aminoácidos nativos de las mioglobinas unidos a CO.....	121
Tabla 29. Mioglobinas con mutaciones simuladas seleccionadas de acuerdo a los criterios establecidos para el modelo.....	123
Tabla 30. Valores de Energía Potencial de las mioglobinas nativas unidas a CO y O₂.....	123

ANEXO 1

Mutacion	Total	Enlace	No-enlace
D122N	-7661,13	1452,545	-9113,68
D122N-CO	-7271,28	1329,11	-8799,67
NATIVA-CO	-6910,43	1337,81	-8439,62

**Energía de enlace y de no-enlace de Mb nativa unida a CO,
con la mutación D122N con CO y sin CO.**

Mutacion	Total	Enlace	No-enlace
NATIVA-CO	-6910,43	1337,81	-8439,62
V68A-D122N-CO	-7551,42	1493,84	-9045,27
V68F-D122N-CO	-7763,41	1422,302	-9185,72
V68I-D122N-CO	-7566,68	1533,58	-9090,28
V68L-D122N-CO	-7714,26	1507,84	-9214,11
V68N-CO	-7000,86	1269,31	-8465,26
V68A-D122N-H64G-CO	-7399,5	1536,49	-8936,01

**Energía de enlace y no-enlace de Mb unidas a CO: Nativa, con la mutación V68
sustituida por A-F-L-I-N junto con D122N**

Mutacion	Total	Enlace	No-enlace
Nativa-co	-6910,43	1337,81	-8439,62
H64Q-L29F-CO	-7495,18	1485,79	-8980,99
I29F-D122N	-7674,59	1435,02	-9109,63

**Energía de enlace y no-enlace de Mb unidas a CO: nativa,mutación doble
H64Q/L29F; L29F/D122N**

Mutacion	Total	Enlace	No-enlace
Nativa-CO	-6910,43	1337,81	-8439,62
H64Q-D122N	-7550,99	1580,483	-9131,44
H64L-D122N	-7221,48	1485,42	-8706,92
H64G-D122N	-7396,26	1501,6	-8897,88
H64T-D122N	-7555,57	1538,6	-9104,19

**Energía de enlace y no-enlace de Mb unidas a CO. Nativa, Mutación H64 sustituida
por Q-L-G-T junto con la mutación D122N**

ANEXO 2

Mutacion	Total	Enlace	No-enlace
Nativa-O ₂	-6925.95	1292.01	-8412.68
L29W/D122N-O ₂	-7163.67	1410.17	-8766.5
L29Y/H64Q/T67R	-7637	1288	-9131.45
V68N-O ₂	-6971	1284.7	-8476.32

**Energía de enlace y no enlace de Mb unidas a O₂: nativa. Doble mutación
L29F/D122N y V68N**

Ligando	Total	Enlace	No-enlace
Nativa-O ₂	-6925.26	1292.01	-8412.68
Nativa-CO	-6900.95	1342.24	-8841.26
Nativa-CN	-7274,63	1566,61	-8841,26
Nativa-NO	-6865,97	1325,8	-8384,57

Energía de enlace y no-enlace de Mb nativas unidas a O₂,CO,CN y NO

ANEXO 3

Aminoácido	Abreviatura de tres letras	Símbolo de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparragina	Asn	N
Acido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Acido glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V