



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

MODELACIÓN MOLECULAR Y ESTUDIO DE LA ISOFORMA 1A/IRE(+) DE LA
PROTEÍNA DMT₁ HUMANA

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

DANIELA PAZ RIVAS ROMERO

PROFESOR GUÍA:
JOSÉ CRISTIAN SALGADO HERRERA

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
ÁLVARO OLIVERA NAPPA
ANGÉLICA FIERRO HUERTA

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto FONDECYT N° 1130317

SANTIAGO DE CHILE
2015

**RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL
TÍTULO DE:** Ingeniera Civil en Biotecnología
POR: Daniela Paz Rivas Romero
FECHA: Octubre 2015
PROFESOR GUÍA: J. Cristian Salgado Herrera

MODELACIÓN MOLECULAR Y ESTUDIO DE LA ISOFORMA 1A/IRE(+) DE LA PROTEÍNA DMT1 HUMANA

En distintos estudios se ha determinado que mutaciones en la proteína transportadora DMT1, encargada de transportar hierro desde el lumen intestinal hacia los enterocitos, son causantes de distintos tipos de anemia, no obstante, poco se conoce sobre su estructura tridimensional y su mecanismo de transporte. Por esta razón, el objetivo del presente trabajo es obtener un modelo estructural de la isoforma 1A/IRE(+) de la proteína DMT1 humana y a partir de éste estudiar el posible comportamiento de la proteína inserta en membrana.

La predicción de dominios transmembrana para la proteína de interés estableció la presencia de 12 dominios transmembrana, 6 loops extracelulares, 5 loops intracelulares y los extremos amino y carboxilo terminales al interior del citoplasma de los enterocitos, lo cual concuerda totalmente con lo expuesto en bibliografía. Se obtuvieron 100 modelos de la proteína mediante modelamiento comparativo, utilizando el cristal de la familia de la proteína, ScaDMT, como plantilla principal. El mejor modelo se obtuvo a través de un análisis energético y estructural. Este modelo obtuvo un z-score de -4.3, dentro de la densidad de puntajes obtenidos por estructuras cristalinas, un perfil energético por residuo similar al del cristal de ScaDMT, y un gráfico de Ramachandran con tan solo 2 residuos dentro de zonas no permitidas.

Se realizaron cuatro dinámicas moleculares para estudiar el comportamiento del modelo en membrana, las cuales fueron analizadas para estudiar las características de la proteína. A partir del análisis de los modos normales, se observó un movimiento de apertura y cierre, el cual podría representar el movimiento principal de captura y liberación del ion de hierro. Por otro lado, se presentó una variación en el potencial electrostático en las regiones superior e inferior de la proteína, lo que podría estar relacionado al mecanismo de interacción de la proteína con hierro. A partir del análisis del comportamiento de las moléculas de agua en el sistema, se determinó que éstas ingresan a la proteína por la zona orientada hacia el citoplasma, posicionándose entre las hélices TM1 y TM6, donde se ubica el ion de hierro. Finalmente, en cuanto a la interacción de la proteína con hierro, se proponen los residuos Asp115, Asn118, Ala291 y Met294 como principales candidatos a interactuar con él, y se observa un posible rol del agua en la estabilización de éste.

De esta manera, los resultados y discusiones aquí expuestos representan los primeros avances para un mejor conocimiento de la estructura y características de la proteína DMT1 humana. Se requiere profundizar y extender estos análisis para poder establecer bases más sólidas respecto a la relación estructura-función y dilucidar el mecanismo de transporte asociado a la proteína. Esto resultaría de gran utilidad para comprender la causa de las enfermedades asociadas a mutaciones en DMT1 y posteriormente proponer tratamientos más efectivos para estas enfermedades.

*“Felicidad no es hacer lo que uno quiere
sino querer lo que uno hace”*

- Jean Paul Sartre

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis padres, ya que gracias a ellos soy la mujer que soy el día de hoy. Gracias por haberme guiado a lo largo de mi vida, por esforzarse en darme una buena educación y entregarme los valores que me han hecho una mejor persona. Por creer en mí, por acompañarme y apoyarme incondicionalmente en este camino que escogí.

También, gracias a mi hermana, Constanza, por ser mi apoyo siempre y compartir conmigo una linda amistad de hermanas. Por escuchar mis locuras, por acompañarme y ayudarme cuando lo he necesitado.

Además, quisiera agradecer a los profesores de mi comisión, al profesor Cristian Salgado, el profesor Álvaro Olivera y la profesora Angélica Fierro, por haber confiado en mí para llevar a cabo este trabajo, y por su gran compromiso con el proyecto, lo cual fue una gran motivación para sacar adelante mi memoria.

Muchas gracias a todas las personas que me acompañaron en este camino, quienes hicieron mi paso por la universidad menos estresante y más entretenido. A todos aquellos con los que compartí buenos momentos, risas, reuniones en grupo, maratones de estudio, etc.

Finalmente, como siempre hay que dejar lo mejor para el final, gracias a mi chanchito, Sebastián, por haber sido mi compañero a lo largo de toda la carrera, estando siempre a mi lado en las buenas y en las malas. Por escucharme, aguantarme, amarme y aconsejarme. Por aceptarme tal y como soy y ayudarme a crecer como persona. Gracias por todos los lindos momentos que hemos compartido, los cuales han hecho de estos años los mejores de mi vida, y sé que viviremos muchas más aventuras y viajes juntos en el futuro.

Tabla de Contenido

1. Introducción	1
1.1. Antecedentes Generales	1
1.2. Motivación	2
1.3. Descripción del Proyecto	2
2. Objetivos	3
2.1. Objetivo General	3
2.2. Objetivos Específicos	3
3. Antecedentes	4
3.1. Absorción de Hierro	4
3.2. Transportador de Metales Divalentes (DMT1)	6
3.2.1. Función, Localización y Mecanismo	6
3.2.2. Isoformas	6
3.2.3. Estructura	8
3.2.4. Mutaciones y Aminoácidos Importantes	9
3.3. Determinación de Estructura de Proteínas de Membrana	11
3.3.1. Modelamiento Comparativo	12
3.4. Dinámica Molecular	12
3.4.1. Campo de Fuerzas	13
3.4.2. Condiciones de Borde	14
3.4.3. Control de Presión y Temperatura	14
4. Metodología	16
4.1. Herramientas Computacionales Utilizadas	16
4.2. Procedimiento	17
4.2.1. Análisis Preliminar	17
4.2.1.1. Análisis de Secuencias en la Familia Nramp	17
4.2.1.2. Predicción de Dominios Transmembrana	18
4.2.2. Modelamiento Comparativo	18
4.2.2.1. Análisis y Selección de Moldes	18
4.2.2.2. Modelos 3D	19
4.2.2.3. Análisis de los Mejores Modelos	19
4.2.3. Dinámica Molecular	21
4.2.3.1. Preparación del Sistema	21
4.2.3.2. Condiciones de Simulación	22
4.2.3.3. Análisis de las Dinámicas	23
5. Resultados	25
5.1. Análisis Preliminar	25
5.1.1. Análisis de Secuencias en la Familia Nramp	25
5.1.2. Predicción de Dominios Transmembrana	27
5.2. Modelamiento Comparativo	29
5.2.1. Análisis y Selección de Moldes	29
5.2.2. Modelos 3D	31
5.2.3. Análisis de los Mejores Modelos	31

5.3. Dinámica Molecular	36
5.3.1. Análisis Preliminares	36
5.3.2. Análisis en Detalle	41
5.3.2.1. Perfil RMSF por Residuo	41
5.3.2.2. Análisis de Puentes Disulfuro	43
5.3.2.3. Análisis de Modos Normales.....	44
5.3.2.4. Análisis del pH y Potencial Electrostático	48
5.3.2.5. Análisis del Ion de Hierro y Residuos Colindantes.....	51
5.3.2.6. Análisis del Movimiento de Agua.....	52
6. Discusión.....	55
6.1. Análisis Preliminar	55
6.1.1. Análisis de Secuencias en la Familia Nramp	55
6.1.2. Predicción de Dominios Transmembrana	56
6.2. Modelamiento Comparativo	56
6.2.1. Análisis y Selección de Moldes.....	56
6.2.2. Modelos 3D.....	57
6.2.3. Análisis de los Mejores Modelos	57
6.3. Dinámica Molecular	60
6.3.1. Análisis Preliminares	60
6.3.2. Análisis en Detalle	62
6.3.2.1. Perfil RMSF por Residuo.....	62
6.3.2.2. Análisis de Puentes Disulfuro	63
6.3.2.3. Análisis de Modos Normales.....	63
6.3.2.4. Análisis del pH y Potencial Electrostático	64
6.3.2.5. Análisis del Ion de Hierro y Residuos Colindantes	65
6.3.2.6. Análisis del Movimiento de Agua	66
7. Conclusiones	68
Bibliografía	73
Anexos.....	85
Anexo 1: Alineamientos Múltiples Familia Nramp	85
Anexo 2: Predicción Estructura 2D	94
Anexo 3: Gráficos de Ramachandran Mejores Modelos	95
Anexo 4: Análisis Preliminares Dinámica	99
Anexo 5: Análisis Movimiento de Agua	107

Índice de Figuras

Figura 3.1 – Mecanismo de absorción de hierro en los enterocitos	5
Figura 3.2 – Flujo del hierro a través del torrente sanguíneo	5
Figura 3.3 – Organización del gen de DMT1	7
Figura 3.4 – Transcritos alternativos de DMT1.....	7
Figura 3.5 – Isoformas de DMT1	8
Figura 3.6 – Expresión de DMT1 en distintos órganos y tejidos	8
Figura 3.7 – Estructura de ScaDMT	9
Figura 3.8 – Interacciones enlazantes	14
Figura 4.1 – Residuos que interaccionan con ion de manganeso	21
Figura 5.1 – Alineamiento múltiple eucariontes familia Nramp.....	25
Figura 5.2 – Alineamiento múltiple mamíferos familia Nramp	26
Figura 5.3 – Predicción estructura bidimensional DMT1	28
Figura 5.4 – Alineamiento DMT1 – ScaDMT	29
Figura 5.5 – Alineamiento DMT1 – NUP192.....	30
Figura 5.6 – Plantilla dominio transmembrana 12	30
Figura 5.7 – Plantilla dominio transmembrana 1.....	30
Figura 5.8 – Alineamiento manual de plantillas	31
Figura 5.9 – Gráfico de Ramachandran mejor modelo.....	33
Figura 5.10 – Residuos en zona no favorable en Modelo 23	33
Figura 5.11 – Z-score	34
Figura 5.12 – Perfil energía por residuo	34
Figura 5.13 – Estructura tridimensional	35
Figura 5.14 – Comparación estructura tridimensional	35
Figura 5.15 – Perfil RMSD a pH 7.4.....	37
Figura 5.16 – Perfil RMSD a pH 5.5.....	37
Figura 5.17 – Gráfico de Ramachandran Modelo 23 después de la dinámica	38
Figura 5.18 – Z-score Modelo 23 después de la dinámica	39
Figura 5.19 – Perfil energía por residuo Modelo 23 después de la dinámica	39
Figura 5.20 – Estructura Modelo 23 antes y después de la dinámica	40
Figura 5.21 – Sistema membrana-proteína antes y después de la dinámica	41
Figura 5.22 – Perfil RMSF a pH 7.4.....	42
Figura 5.23 – Perfil RMSF a pH 5.5.....	42
Figura 5.24 – Sectores con mayor RMSF	43
Figura 5.25 – Análisis cisteínas	44
Figura 5.26 – Modo Normal 1 vista lateral	45
Figura 5.27 – Modo Normal 1 vista superior	45
Figura 5.28 – Modo Normal 1 vista inferior	45
Figura 5.29 – Superficie Modo Normal 1.....	46
Figura 5.30 – Modo Normal 2 vista lateral	47
Figura 5.31 – Modo Normal 2 vista superior	47
Figura 5.32 – Modo Normal 2 vista inferior.....	47
Figura 5.33 – Superficie Modo Normal 2	48
Figura 5.34 – Potencial electrostático superior.....	49
Figura 5.35 – Potencial electrostático inferior	50
Figura 5.36 – Residuos cercanos a hierro.....	52
Figura 5.37 – Análisis movimiento de agua.....	53

Figura 5.38 – Trayectoria moléculas de agua.....	54
Figura 6.1 – Sectores con mayor energía por residuo	59
Figura 6.2 – Perfil energético por residuo antes y después de la dinámica.....	61
Figura 6.3 – Sectores con mayor movilidad	62

Índice de Tablas

Tabla 3.1 – Mutaciones y aminoácidos importantes en DMT1	11
Tabla 4.1 – Herramientas computacionales	16
Tabla 4.2 – Esquema de colores Zappo	17
Tabla 5.1 – Principales resultados alineamientos múltiples	27
Tabla 5.2 – Conservación aminoácidos mutados DMT1	27
Tabla 5.3 – Cobertura plantillas	31
Tabla 5.4 – 10 modelos con mejor puntaje DOPE.....	31
Tabla 5.5 – Resumen gráficos de Ramachandran	32
Tabla 5.6 – Colores dominios transmembrana	36

1. Introducción

1.1. Antecedentes Generales

Los iones metálicos son elementos esenciales para la vida que participan en muchos procesos metabólicos en todas las células, no obstante, tanto su escasez como exceso pueden causar graves enfermedades e incluso la muerte [1].

En particular, el hierro es un metal traza muy importante para todos los organismos [2], pues su capacidad de aceptar o donar electrones le ha conferido un rol importante en una gran variedad de procesos como el transporte de oxígeno, la producción de energía y la síntesis de ADN [3]. Sin embargo, la absorción anormal de hierro ha sido implicada en la hemocromatosis hereditaria más común, así como en la anemia y la aterosclerosis, y en enfermedades neurológicas como el Parkinson, la enfermedad de Huntington, la ataxia de Friedreich y Pica [4–12].

Dado que el cuerpo humano carece de un mecanismo definido para la excreción de hierro, la homeostasis de éste depende totalmente de la regulación de su absorción, la cual es llevada a cabo por los enterocitos presentes en el duodeno [2, 3, 13]. La absorción de hierro en el intestino es un proceso altamente regulado que consta de 2 etapas principales: la captación de hierro a través de la membrana apical del enterocito y la posterior transferencia de hierro a través de su membrana basolateral [14]. Así, para el mantenimiento de una homeostasis de hierro balanceada, la tasa de absorción intestinal se adapta a las demandas de hierro del cuerpo [15], aumentando la captación de hierro cuando existe deficiencia y disminuyéndola cuando hay exceso [14].

En los últimos años se ha hecho evidente que la familia de proteínas transportadoras de iones de metales divalentes, Nramp (Natural Resistance Associated Macrophage Protein), juegan un rol fundamental en la homeostasis de estos iones [16–20]. Los miembros de esta familia transportan iones metálicos como Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} y Pb^{2+} [21–25], y comparten una notable identidad en sus secuencias [26]. En el caso particular de la absorción de hierro, el transporte de este metal en su estado divalente (Fe^{2+}) es mediado por la proteína DMT1 (Divalent Metal Transporter 1) [27–29], miembro de esta familia, la cual es expresada en la membrana apical de los enterocitos [30–32], cuya expresión está altamente regulada por hierro [33].

Diversos estudios han determinado que mutaciones en la proteína DMT1 son causantes de algunas enfermedades relacionadas con la absorción de hierro. Por ejemplo, los ratones *mk* y Belgrade (*b*) poseen una sustitución de Glicina por Arginina en el aminoácido 185 (Gly185Arg), la cual provoca una pérdida de funcionalidad de DMT1, y presentan anemia microcítica hipocrómica severa y disminución de la vida media de sus eritrocitos [33, 34]. Adicionalmente, se han detectado mutaciones missense con pérdida de función (Arg416Cys, Gly212Val, delVal114) [35–38] y mutaciones de splicing en pacientes humanos con anemia microcítica hipocrómica que presentan exceso de hierro en el suero y el hígado [35, 36].

Dado lo anterior, DMT1 ha sido muy estudiada los últimos años debido a su importancia en la absorción de hierro, pero hasta la fecha no se ha determinado su

estructura tridimensional. Sin embargo, hace poco se logró cristalizar una de las proteínas pertenecientes a la familia Nramp, ScaDMT [39], lo cual representa un gran avance en el estudio de la estructura de esta proteína.

1.2. Motivación

En distintos estudios se ha determinado que ciertas mutaciones en la proteína transportadora DMT1 son causantes de enfermedades asociadas a la absorción de hierro.

Se tiene bastante información experimental acerca del funcionamiento de DMT1, no obstante, poco se conoce sobre su estructura tridimensional. Por tanto, contar con un modelo de su estructura facilitaría la comprensión de su mecanismo de transporte y además permitiría realizar un análisis más exhaustivo respecto a la relación entre sus mutaciones conocidas y las distintas enfermedades relacionadas con la absorción de hierro.

1.3. Descripción del Proyecto

Mediante el uso de herramientas bioinformáticas y de simulación molecular se construirá un modelo de la estructura tridimensional de la isoforma 1A/IRE(+) de la proteína DMT1 humana. Este modelo será estudiado utilizando distintas herramientas bioinformáticas y técnicas de Dinámica Molecular, de manera de relacionar los resultados de la modelación molecular con las observaciones experimentales disponibles.

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Estudiar las características estructurales y funcionales de la isoforma 1A/IRE(+) de la proteína DMT1 humana a la luz de la evidencia experimental disponible.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar posibles estructuras tridimensionales de la isoforma 1A/IRE(+) de la proteína DMT1 humana mediante el uso de técnicas de modelación comparativa.
- Analizar la calidad estructural de los distintos modelos obtenidos mediante herramientas bioinformáticas de evaluación estructural.
- Estudiar las características del mejor modelo estructural utilizando dinámica molecular.
- Contrastar la evidencia experimental con las características estructurales de los modelos desarrollados.

3. Antecedentes

3.1. Absorción de Hierro

El hierro es un metal traza esencial para todos los organismos, participando en numerosos procesos bioquímicos, como la unión de oxígeno en la hemoglobina, la producción de energía, la síntesis de ADN y como un importante centro catalítico en muchas enzimas [2, 3]. Sin embargo, el hierro también puede ser tóxico para las células, dado que el hierro “libre” participa en la química de Fenton para catalizar la producción de radicales hidroxilo de superóxido y peróxido de hidrógeno [40]. Estas especies son altamente reactivas, las cuales pueden dañar membranas lipídicas, proteínas y ácidos nucleicos dentro de las células [41].

A diferencia de muchos otros nutrientes, los seres humanos no poseen la maquinaria necesaria para liberar del cuerpo del exceso de hierro y, por tanto, el proceso de absorción debe ser estrechamente regulado [2], de manera de proveer suficiente hierro para sus necesidades celulares, sin desarrollar la toxicidad asociada con su exceso [3].

El hierro en la dieta es encontrado en dos formas básicas, ya sea hemo, presente en las carnes, o no-hemo, presente en cereales, verduras, legumbres, frijoles, frutas, entre otros, siendo este último el predominante en todas las dietas, componiendo entre el 90-95% de la ingesta total en la dieta, siendo ambos absorbidos principalmente en el intestino [2]. La mayor parte del hierro no-hémico ingresa al tracto gastrointestinal en su forma férrica, sin embargo, debe ser reducido para poder ser captado por los enterocitos del intestino delgado [2, 3].

El primer paso en el proceso de absorción de hierro es su ingreso desde el lumen del intestino a través de la zona apical de los enterocitos hacia el interior de éstos [3]. Como se puede ver en la Figura 3.1, este paso es mediado por la proteína de metales divalente (DMT1, por sus siglas en inglés) [33], la cual transporta hierro en su forma ferrosa (Fe^{2+}) [42]. Sin embargo, dado que la mayor parte del hierro en la dieta se encuentra en su forma férrica (Fe^{3+}), éste debe ser reducido para poder ingresar a los enterocitos [2]. Esta reducción la lleva a cabo ascorbato, catalizado por la reductasa férrica presente en la zona apical del enterocito, Dcytb [13].

Luego, una vez dentro del enterocito, comienza a formar parte del hierro plasmático lábil (LIP, por sus siglas en inglés) [43]. La mayor parte del hierro es utilizado en la mitocondria para la síntesis de Hemo y centros Fe-S, y en el citoplasma para su incorporación en metaloproteínas [41], mientras que el exceso de hierro se almacena dentro de ferritina [44]. Además, dependiendo de las necesidades de hierro del cuerpo, parte del hierro absorbido puede pasar al torrente sanguíneo a través de la membrana basolateral mediado por Ferroportina, con apoyo de la ferroxidasa Hefaestina [3], o bien Ceruloplasmina [42, 45], que vuelve a oxidar el hierro a su forma férrica y Transferrina lo recoge para llevarlo a los tejidos a través del sistema circulatorio [3], como se observa en la Figura 3.1.

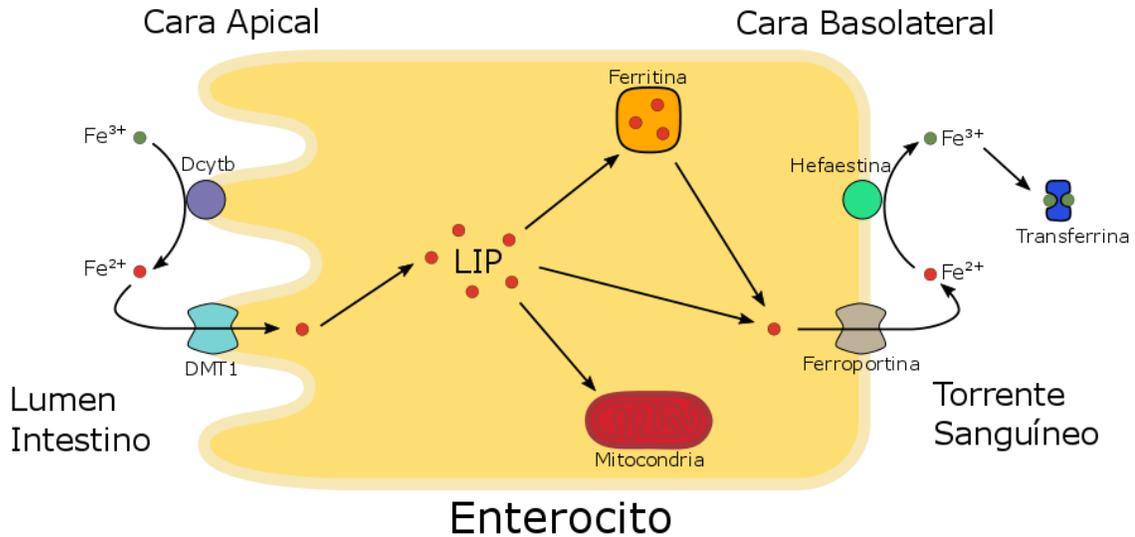


Figura 3.1 – Mecanismo de absorción de hierro en los enterocitos (Adaptación de [43]).

Finalmente, el hierro absorbido es transportado por el torrente sanguíneo, unido a transferrina, para llegar a distintos músculos y tejidos (Figura 3.2). El mayor flujo de hierro ocurre hacia la médula ósea, donde es utilizado en la eritropoyesis, para sintetizar hemoglobina. Adicionalmente, cuando los glóbulos rojos mueren, el hierro es recuperado por macrófagos del bazo, como se muestra en la Figura 3.2. Por otro lado, el exceso de hierro es almacenado en el hígado [42, 46].

Dado lo anterior, DMT1 juega un rol importante en el proceso de absorción de hierro, ya que es un componente principal en la primera etapa de absorción. Así, una pérdida de función o ausencia de esta proteína impide el paso de hierro al torrente sanguíneo, afectando principalmente la eritropoyesis, causando anemia.

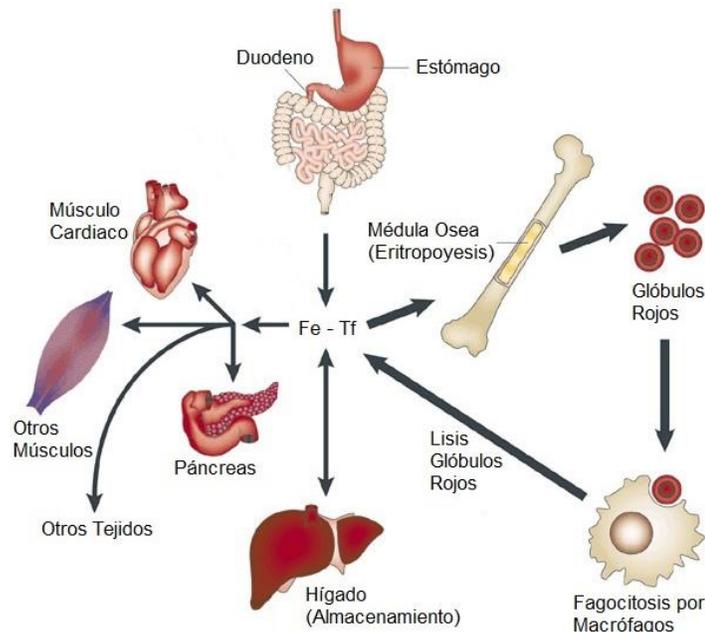


Figura 3.2 – Flujo del hierro a través del torrente sanguíneo. El grosor de las flechas indica la dimensión del flujo, es decir, a mayor grosor, mayor flujo de hierro en esa dirección (Adaptación de [46]).

3.2. Transportador de Metales Divalentes (DMT1)

3.2.1. Función, Localización y Mecanismo

La proteína transportadora de metales divalentes, DMT1 por sus siglas en inglés, también conocida como Nramp2, DCT1 o SLC11A2, es un transportador de cationes divalentes con un simporte de protones [28]. Se le conoce por tomar el hierro desde la cara basolateral de los enterocitos en mamíferos y ha sido relacionada con el transporte de hierro dependiente de transferrina desde endosomas acidificados hacia el citoplasma de diferentes tejidos [17, 28, 47].

DMT1 transporta una amplia gama de metales divalentes [24, 28, 48]. Experimentos de electrofisiología mostraron que Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} y en menor medida Ni^{2+} y Pb^{2+} generan un cambio en el voltaje en la membrana de oocitos que expresan DMT1, lo que sugiere que cada uno de éstos son ligandos de la proteína (se unen al transportador e inician un proceso) [28]. Sin embargo, se requiere una medición directa para confirmar que cada uno de los ligandos es realmente transportado. Así, en experimentos de absorción en oocitos utilizando $^{55}\text{Fe}^{2+}$, $^{54}\text{Mn}^{2+}$, $^{60}\text{Co}^{2+}$ y $^{65}\text{Zn}^{2+}$ radiactivos, se confirmó que al menos estos metales son transportados [25, 28, 48–50]. Adicionalmente, se sabe que DMT1 tiene mayor afinidad por Fe^{2+} [28].

El ARNm de DMT1 se encuentra en muchos tejidos diferentes, incluyendo el cerebro, intestino, riñón, médula ósea y reticulocitos [28, 33, 51, 52], sin embargo, tanto la proteína como su ARNm son más abundantes en el duodeno, lo cual es consistente con su importante rol en la absorción intestinal de hierro [28, 53].

DMT1 es el transportador responsable de la entrada de Fe^{2+} a los enterocitos del intestino delgado [27, 28, 54], acoplado al co-transporte de H^+ , generando una corriente positiva hacia el interior de la célula [28, 55, 56]. La superficie mucosal en el duodeno permanece moderadamente ácida a pesar de la alcalinización progresiva en el lumen intestinal [57]. Se cree que este “microclima ácido”, resultante de la actividad de la bomba Na^+/H^+ , es el que provee el gradiente de potencial electroquímico como fuerza motora para la absorción de hierro [33].

3.2.2. Isoformas

El gen humano de DMT1 consta de 17 exones que se distribuyen en más de 36 kb [58], como se puede ver en la Figura 3.3. A partir de éste se pueden obtener 4 transcritos alternativos, donde promotores alternativos determinan si el extremo 5' del ARNm es el exón 1A o el exón 1B (Figura 3.3) [59]. Por otro lado, sitios alternativos de poliadenilación determinan si el extremo 3' del ARNm será el exón 16/16A o el exón 17 (Figura 3.3), donde el exón 16A contiene una región IRE (Iron Responsive Element) [28] y el exón 17 no la posee [4, 58]. Aquellas isoformas que contienen la región IRE comúnmente son llamadas IRE(+), mientras que aquellas que no lo poseen, IRE(-). De esta manera, se tienen 4 posibles isoformas de la proteína, provenientes de las distintas combinaciones posibles de los transcritos, las cuales son: 1A/IRE(+), 1A/IRE(-), 1B/IRE(+), y 1B/IRE(-), siendo la isoforma 1B/IRE(-) la secuencia canónica de la proteína, ya que representa la isoforma más común de la proteína.

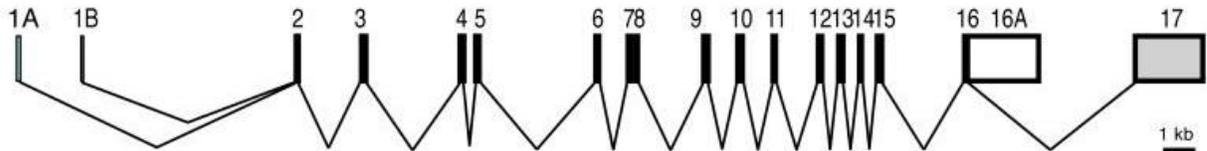


Figura 3.3 – Organización del gen de DMT1. El gen de DMT1 presenta 17 exones en total, 2 promotores alternativos (1A y 1B) y 2 sitios de poliadenilación alternativos (16/16A y 17) [59].

Las isoformas cuyos transcritos comienzan en el exón 1A comienzan su traducción aquí, dado que este contiene un codón de inicio. Luego, el exón es seguido por una secuencia de splicing que indica el corte del siguiente exón, saltándose así el exón 1B y continuando la traducción en el exón 2 [60, 61], como se puede ver en la Figura 3.4. En cambio, aquellas isoformas que comienzan en el exón 1B, el cual carece de un codón de inicio, comienzan su traducción en el exón 2, el cual sí tiene un codón de inicio [61], como se muestra en la Figura 3.4.

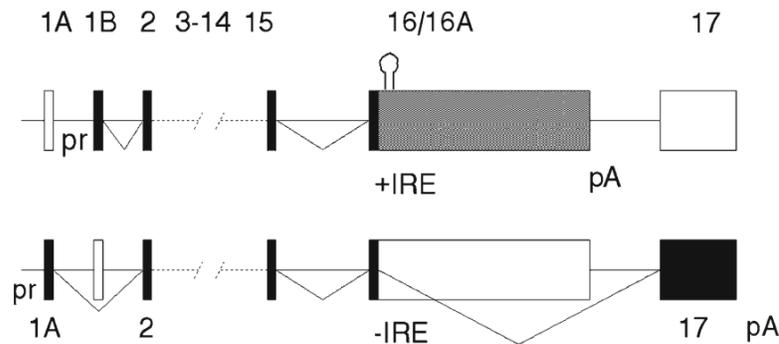


Figura 3.4 – Transcritos alternativos de DMT1. pr: promotor. pA: sitio de poliadenilación. En blanco se muestran los exones no traducidos y en negro los que sí son traducidos. En la parte superior se muestra el caso en que se utiliza el exón 1B como promotor y el exón 16/16A como sitio de poliadenilación, y en la parte posterior se presenta el caso en que se utiliza el exón 1A, saltándose el exón 1B, y utilizando el exón 17 como sitio de poliadenilación, saltándose el exón 16/16A [42].

Las 4 isoformas comparten 543 aminoácidos en común, y al comenzar la traducción en el exón 1A, se incorporan 29 aminoácidos adicionales en el extremo 5' de la proteína que no se encuentran presentes en las isoformas 1B, como se puede ver en la Figura 3.5. Del mismo modo, las isoformas que contienen la región IRE en su extremo 3' presentan 18 aminoácidos, a diferencia de los 25 aminoácidos presentes en las isoformas IRE(-), como se detalla en la Figura 3.5 [60].

Finalmente, las 4 isoformas difieren en su ubicación. Aquellas que presentan el exón 1B se encuentran presentes en todo el cuerpo, mientras que las isoformas 1A son tejido-específicas y se encuentran predominantemente en el duodeno y riñones, como se puede observar en la Figura 3.6. Por otra parte, tanto las isoformas IRE(+) como IRE(-) son expresadas en la mayor parte de los órganos y tejidos, como se muestra en la Figura 3.6, por lo que es poco probable que la presencia o ausencia de IRE en la región 3' incida en la expresión de DMT1 en diferentes tipos celulares [59]. En particular, la isoforma 1A/IRE(+) se encuentra presente principalmente en el duodeno [53].

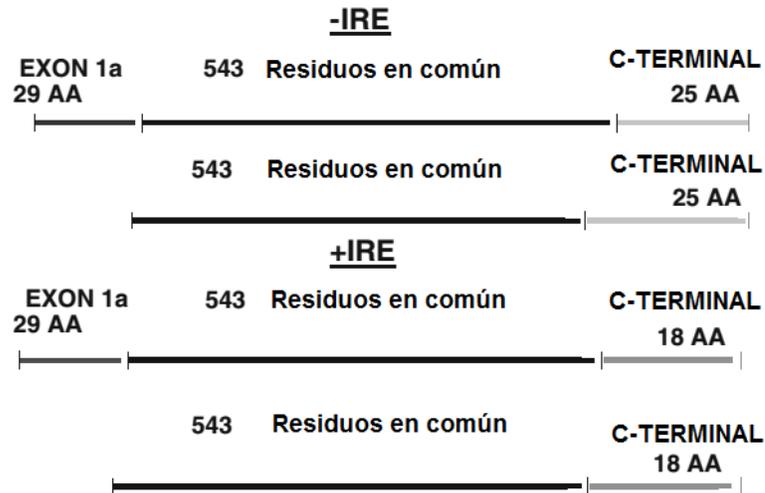


Figura 3.5 – Isoformas de DMT1. Aquellas isoformas que utilizan el promotor 1A poseen 29 aminoácidos adicionales en su extremo amino, mientras que las isoformas IRE(+) presentan 18 aminoácidos, a diferencia de los 25 aminoácidos presentes en las isoformas IRE(-), en su extremo carboxilo [42].

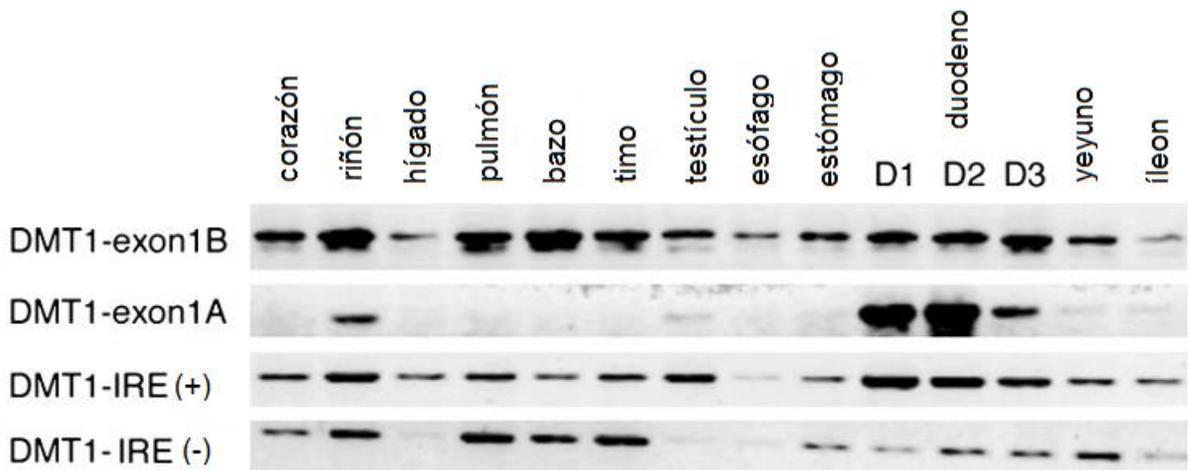


Figura 3.6 – Expresión de DMT1 en distintos órganos y tejidos. D1, D2 y D3 se refieren al centímetro 1, 2 y 3 del duodeno, respectivamente [59].

3.2.3. Estructura

DMT1 pertenece a una familia de proteínas integrales de membrana, Nramp, que han sido altamente conservadas durante la evolución, desde bacterias hasta el ser humano [26, 62–64]. El más alto nivel de conservación se encuentra en su núcleo hidrofóbico, compuesto por los primeros 10 dominios transmembrana predichos computacionalmente, cuyas secuencias comparten un 33-75% de identidad. Fuera de este núcleo la similitud de la familia decae bastante, teniendo secuencias amino y carboxilo terminales bastante heterogéneas tanto en longitud como en secuencia [26].

Por otra parte, se ha identificado una secuencia motivo conocida como “binding-protein-dependent transport system inner membrane component signature” [65–67], la cual fue encontrada en el loop intracelular entre los dominios transmembrana 8 y 9

predichos en la familia, el cual se encuentra altamente conservado [26]. Adicionalmente, se detectó la presencia de dos secuencias de glicosilación en el loop extracelular ubicado entre los dominios transmembrana 7 y 8 predichos [67], los cuales también se encuentran altamente conservados [26].

En particular, se ha predicho computacionalmente que DMT1 consiste de 12 dominios transmembrana, 6 loops extracelulares, 5 loops intracelulares, y las zonas amino y carboxilo terminales expuestas al citoplasma [28].

Ahora, respecto a la estructura tridimensional de la proteína, hasta la fecha no se ha determinado la estructura específica de DMT1, sin embargo, hace poco se logró cristalizar una de las proteínas pertenecientes a la familia Nramp, ScaDMT [39], lo cual representa un gran avance en el estudio de la estructura tridimensional de la proteína DMT1 humana.

La proteína cristalizada presenta 11 hélices transmembrana, algunas de las cuales se encuentran interrumpidas por loops cortos. Por otra parte, las primeras 5 alfa-hélices están estructuralmente relacionadas con las siguientes 5 hélices por una rotación aproximadamente dos veces alrededor de un eje situado en el centro de la membrana y paralela a su plano [39], como se puede ver en la Figura 3.7. Además, la primera hélice de cada repetición (es decir, los dominios 1 y 6) se desenrolla en el centro de la membrana, proporcionando así los residuos de coordinación de los sustratos soportados [39], como se aprecia en la Figura 3.7.

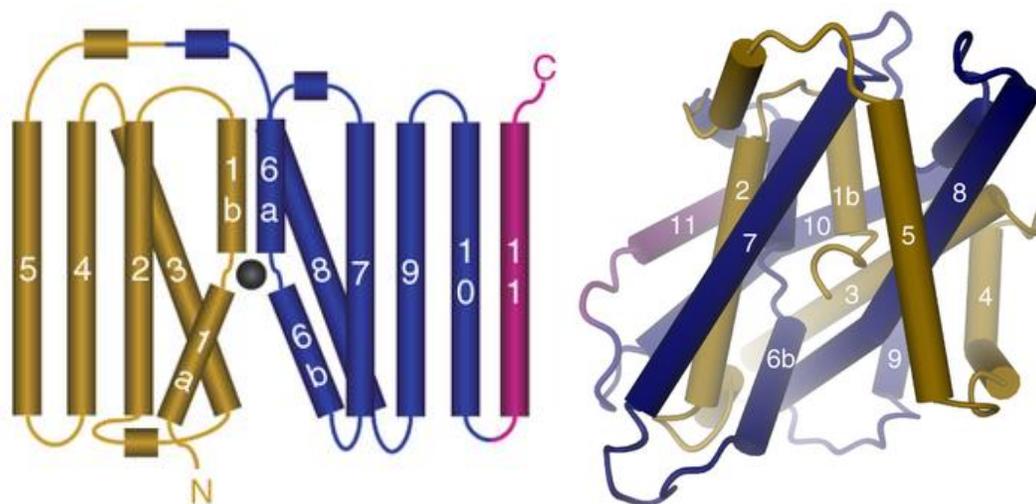


Figura 3.7 – Estructura de ScaDMT. A la izquierda se presenta la topología de la estructura de la proteína, mientras que a la derecha se presenta su estructura tridimensional. En café y azul se destacan los dominios relacionados, mientras en morado se señala el dominio transmembrana 11 [39].

3.2.4. Mutaciones y Aminoácidos Importantes

El ratón anémico microcítico (*mk*) y la rata Belgrade (*b*) han heredado los defectos en el transporte de hierro que dan lugar a la anemia por deficiencia de hierro [68–75]. Sus fenotipos son similares, en que tanto la absorción de hierro en los glóbulos rojos como el transporte de hierro se ven afectados. Se sabe que estos dos procesos se producen por

mecanismos distintos, sin embargo, es probable que estos procesos compartan un paso en común, la transferencia real de hierro a través de la membrana plasmática [76].

Se tiene información reciente que muestra que los animales *mk* y *b* tienen mutaciones missense en el gen que codifica DMT1 [34, 77], las cuales generan una misma sustitución aminoacídica, convirtiendo un residuo de glicina en arginina en la posición 185 (Gly185Arg) [65], numeración según isoforma canónica (1B/IRE(-)), la cual provoca una pérdida de funcionalidad de DMT1, y presentan anemia microcítica hipocrómica severa y disminución de la vida media de sus eritrocitos [34, 33].

Por otra parte, en humanos, una mutación en el gen de DMT1 en homocigosis en el exón 12 produce la sustitución de ácido glutámico por aspartato en la posición 399 (Glu399Asp), numeración según isoforma canónica (1B/IRE(-)), fue identificada en una mujer Checa con anemia microcítica severa y exceso de hierro en el hígado [35, 78]. Esta sustitución también provoca el salto preferencial del exón 12 durante el procesamiento del ARNm, y por consecuencia existen 2 transcritos presentes en las células del paciente: un transcrito completo conteniendo la mutación puntual y otro sin el exón 12 [35].

Adicionalmente, en humanos se ha reportado un heterocigoto compuesto por 2 nuevas mutaciones en DMT1, asociadas con anemia microcítica desde el nacimiento y sobrecarga progresiva de hierro en el hígado [37]. La primera mutación corresponde a una deleción en el exón 5, lo cual conduce a la eliminación del residuo de valina ubicado en la posición 114 (delVal114), numeración según isoforma canónica (1B/IRE(-)), en el segundo dominio transmembrana [37]. La segunda mutación corresponde a una sustitución en el exón 8 que conduce al cambio de una glicina por una valina en la posición 212 (Gly212Val), numeración según isoforma canónica (1B/IRE(-)), en el dominio transmembrana 5 [37].

Además, en un paciente humano que padecía de anemia microcítica se detectó un heterocigoto compuesto para polimorfismos en el gen de DMT1, incluyendo una deleción de 3 pb en el intrón 4, el cual afecta parcialmente al splicing y, por otro lado, una sustitución de un residuo conservado en el dominio transmembrana 9, sustituyendo la arginina 416 por una cisteína (Arg416Cys) [38], numeración según isoforma canónica (1B/IRE(-)). Esta mutación conlleva a una pérdida total de la función de la proteína y en la reducción en su expresión, lo que causa la anemia microcítica y la sobrecarga de hierro en el hígado del paciente [38].

La sobrecarga de hierro en el hígado ocasionada por la pérdida o disminución de la funcionalidad de DMT1, se debe a que el hierro no absorbido en el intestino es almacenado en los hepatocitos [37], como se expuso anteriormente.

Adicionalmente, se ha identificado un par de histidinas conservadas sensibles a mutaciones (His267 y His272, numeración según isoforma canónica, 1B/IRE(-)), en el sector transmembrana 6, cuyos mutantes inactivos pueden ser rescatados mediante la reducción del pH del ensayo de transporte [65]. Esto indica que estas histidinas no están implicadas directamente en la unión del metal, sino que juegan un papel importante en el movimiento de protones acoplado al transporte del metal [65].

En la Tabla 3.1 se presenta un resumen de las mutaciones identificadas hasta el día de hoy en la familia Nramp que producen enfermedades relacionadas con la absorción de hierro en el intestino.

Tabla 3.1 –Mutaciones y aminoácidos importantes en DMT1. Detalle mutaciones y aminoácidos reportados en bibliografía, especificando su efecto o posición en la proteína, la posición en la isoforma estudiada en este trabajo, la localización y la enfermedad asociada a la mutación o bien la posible función de los residuos.

Mutación o Aminoácido importante	Efecto o Posición	Posición en DMT1 1A/IRE(+)	Localización	Enfermedad asociada o Posible función
Ratones <i>mk y b</i>	Sustitución Gly185Arg	214	TM4	Anemia microcítica hipocrómica
Exón 12	Sustitución Glu399Asp	428	Secuencia motivo	Anemia microcítica severa y exceso de hierro en el hígado
Exón 5	Delección Val114	143	TM2	Anemia microcítica y exceso de hierro en el hígado
Exón 8	Sustitución Gly212Val	241	TM5	Anemia microcítica y exceso de hierro en el hígado
Intrón 4	Sustitución Arg416Cys	445	TM9	Anemia microcítica y exceso de hierro en el hígado
Histidinas	His267 y His272	296 y 301	TM6	Importancia en movimiento de protones

3.3. Determinación de Estructura de Proteínas de Membrana

La disparidad entre el conocimiento de las proteínas solubles y proteínas de membrana se debe en gran parte a las dificultades prácticas que intervienen en la expresión y cristalización de las proteínas de membrana [79]. Su naturaleza inherente de encontrarse unida a la membrana hace que la determinación de su estructura sea un desafío y, por tanto, requiere de un tratamiento especial [80]. Esto es particularmente cierto para proteínas con alfa-hélices, debido a que tienden a ser hidrofóbicas y por lo tanto son difíciles de desplegar y replegar *in vitro*. Sin embargo, las proteínas de barril beta son más hidrofílicas y más susceptibles a los métodos tradicionales de desnaturación y replegamiento con detergentes o directamente en los lípidos [81].

Existen tres principales cuellos de botella para la obtención de la estructura de una proteína de membrana. Primero, es difícil obtener la proteína de interés, debido a que las proteínas de membrana por lo general se encuentran presentes en bajas concentraciones en la célula [80], por lo tanto, para la mayoría de ellas es necesaria la sobreexpresión [81]. En segundo lugar, las proteínas de membrana se encuentran incrustadas de forma natural en el entorno dinámico heterogéneo de la bicapa lipídica y es extremadamente difícil utilizar técnicas experimentales de alta resolución en su ambiente nativo [80]. Por lo tanto, las proteínas necesitan ser extraídas de la membrana y estudiadas en un entorno con detergente o lípidos *in vitro*, lo que conduce a dificultades en la preparación de la muestra para los métodos de cristalografía de rayos X y RMN [82]. En tercer lugar, las

proteínas de membrana son generalmente insolubles en solución acuosa, por lo que se requiere que los detergentes se encuentren en concentraciones superiores a la concentración micelar crítica. Sin embargo, demasiado detergente puede desnaturalizar la proteína o impedir la cristalización por separación de fases y, por otra parte, con muy poco detergente la proteína podría convertirse en insoluble [80].

Así, frente a la escasez de estructuras tridimensionales de alta resolución para proteínas de membrana, se utilizan métodos computacionales para la predicción de su estructura. Estos métodos se pueden dividir en dos categorías: modelamiento comparativo y modelamiento *ab initio* [83, 84], siendo el primero el más utilizado.

3.3.1. Modelamiento Comparativo

Conocer la estructura tridimensional de una proteína es crucial para responder a muchas preguntas biológicas [85], sin embargo, el rápido crecimiento del número de genes y genomas secuenciados ha superado fuertemente el número de estructuras determinadas experimentalmente [86]. A pesar del considerable progreso en la predicción de estructuras *de novo* [87], los métodos de modelamiento comparativo, cuando son aplicables, proveen modelos de proteína más fiables y precisos [88].

El principal objetivo del modelamiento de proteínas es predecir su estructura a partir de su secuencia con una precisión comparable a los mejores resultados obtenidos experimentalmente [89]. Además, el modelamiento es la única forma de obtener información estructural de la proteína cuando las técnicas experimentales fallan debido a la dificultad de obtener su estructura experimentalmente, como es el caso de proteínas de gran tamaño [89] y proteínas de membrana [90].

El modelamiento comparativo, también llamado modelamiento por homología, se basa en dos importantes observaciones:

- La estructura de una proteína es únicamente determinada por su secuencia aminoacídica [91].
- Durante la evolución, la estructura es más estable y cambia mucho más lento que su secuencia asociada, por lo que secuencias similares adoptan estructuras prácticamente idénticas, y secuencias lejanamente relacionadas todavía se pliegan en estructuras similares [92, 93].

Por lo tanto, un modelo tridimensional de una proteína de interés (objetivo) puede ser construido a partir de una proteína relacionada cuya estructura sea conocida (plantilla o molde) y que estadísticamente comparta significativa similitud de secuencia con la proteína objetivo [85].

3.4. Dinámica Molecular

Desde su introducción a finales de 1950 [94, 95] y su primera aplicación a una proteína [96], las simulaciones de dinámica molecular se han convertido en una herramienta común para investigar las relaciones estructura-actividad de macromoléculas biológicas. Proporcionando el elemento de la dinámica a nivel atómico

en detalle, estas simulaciones facilitan la interpretación de los datos experimentales y dan acceso a información que no se puede obtener directamente mediante experimentos [97].

La dinámica molecular de biomoléculas posee tres grandes áreas de aplicación en la actualidad. En primer lugar, se utiliza para traer a la vida a estructuras moleculares, dando ideas sobre la dinámica natural en diferentes escalas de tiempo de biomoléculas en solución. En segundo lugar, proporciona promedios térmicos de propiedades moleculares, ya que de acuerdo a la hipótesis ergódica, se puede simular una sola molécula con su entorno durante un período de tiempo y obtener propiedades moleculares promedio que se acercan al promedio medido experimentalmente. Esto se puede utilizar para calcular las propiedades de masa de los fluidos, las diferencias de energía libre en procesos químicos, tales como la unión de un ligando, entre otras aplicaciones. En tercer lugar, permite explorar las conformaciones de una molécula o complejo que son térmicamente accesibles, lo cual se puede utilizar, por ejemplo, para analizar el espacio conformacional en el acoplamiento de un ligando [98].

3.4.1. Campo de Fuerzas

En una simulación de dinámica molecular todos los átomos en el sistema son tratados clásicamente. Las interacciones entre los átomos se dividen en enlazantes y no enlazantes. Las interacciones enlazantes se refieren a aquellas que ocurren entre átomos unidos por enlaces químicos, mientras que las interacciones no enlazantes por lo general se refieren a aquellas que resultan de cualquier par de átomos que se encuentren dentro de un radio de corte dado (cutoff). Estas interacciones definen la función de energía potencial del sistema y en dinámica molecular se le conoce como campo de fuerzas [97, 99, 100]:

$$U_{Total} = U_{enlazante} + U_{no\ enlazante} \quad (1)$$

Para las interacciones enlazantes se considera la distancia de cada enlace, el ángulo entre cada par de enlaces covalentes que comparten un solo átomo en el vértice y los ángulos diedros formados por pares de átomos separados por exactamente tres enlaces covalentes, como se puede ver en la Figura 3.8. Por otra parte, para las interacciones no enlazantes (electrostáticas y Van der Waals), se asigna una carga parcial y parámetros de repulsión y atracción a cada átomo [97, 99].

De este modo, las interacciones enlazantes quedan dadas por [101]:

$$U_{enlazante} = \sum k(r_{ij} - r_0)^2 + \sum k_\theta(\theta - \theta_0)^2 + \sum k_n(1 + \cos(n\varphi + \phi)) \quad (2)$$

Donde k es la constante elástica, $r_{ij} = \|\vec{r}_j - \vec{r}_i\|$ es la distancia entre los átomos i y j , r_0 es la distancia de equilibrio; k_θ es la constante del ángulo, θ es el ángulo entre \vec{r}_{ij} y \vec{r}_{kj} , formado por los átomos i, j y k , θ_0 es el ángulo de equilibrio; k_n es la constante multiplicativa, n es la periodicidad, φ es el ángulo entre los planos (i, j, k) y (j, k, l) , formado por los átomos i, j, k y l , y ϕ es el ángulo de equilibrio [101].

Por otra parte, las interacciones no enlazantes están dadas por [101]:

$$U_{no\ enlazante} = \sum -E_{min} \left[\left(\frac{R_{min}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{min}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum \varepsilon_{14} \frac{C q_i q_j}{\varepsilon r_{ij}} \quad (3)$$

Donde $E_{min} = U_{LJ}(R_{min})$ es el mínimo del término potencial, R_{min} es la separación intermolecular a la cual la energía potencial es igual a cero, $r_{ij} = \|\vec{r}_j - \vec{r}_i\|$ es la distancia entre los átomos i y j ; ε_{14} es el factor de escala cuyo valor es 1, a excepción de una interacción modificada 1-4, donde el par de átomos está separado por una secuencia de tres enlaces covalentes, donde $\varepsilon_{14} = \varepsilon$, que interpreta las interacciones dada por el ángulo de torsión; C es la constante de Coulomb, y, q_i y q_j son las cargas de los átomos i y j , respectivamente [101].

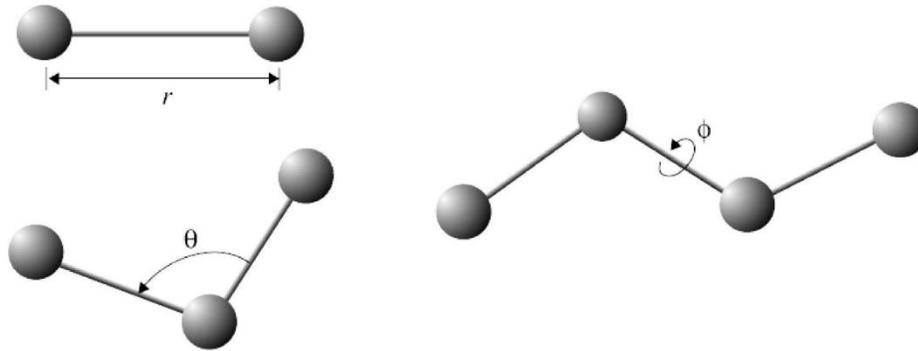


Figura 3.8 – Interacciones enlazantes. Arriba a la izquierda se muestra la distancia entre 2 átomos formando un enlace covalente (r), abajo a la izquierda se presenta el ángulo formado por dos enlaces covalentes que comparten el vértice (θ), y a la derecha se señala el ángulo diedro formado por 4 átomos unidos por 3 enlaces covalentes consecutivos (ϕ) (Adaptación de [99]).

3.4.2. Condiciones de Borde

En una simulación existen diferentes maneras para tratar las condiciones de borde macroscópicas, pero por lo general la temperatura (T) y el número de partículas (N) casi siempre se mantienen constantes. Sin embargo, considerando una caja de simulación paralelepípeda, hay varias opciones para el volumen o la presión, y se deben distinguir las dimensiones y presiones en las direcciones lateral y perpendicular. Siendo l el tamaño perpendicular de la caja de simulación, A el área lateral, p la presión y γ la tensión superficial, se pueden mantener constantes las dimensiones (N, l, A, T) , (N, p, γ, T) o (N, p, A, T) [102–109]. En general, se utiliza la condición NPT , con una presión lateral y perpendicular de 1 bar.

3.4.3. Control de Presión y Temperatura

La temperatura de un sistema viene dada por la energía cinética de todos los átomos. Debido a la inexactitud y al efecto del cutoff, la temperatura en un sistema tenderá a alejarse de la temperatura inicial, por lo cual es necesario un control de temperatura si se desea mantenerla constante. Por otro lado, la presión de un sistema depende de las fuerzas y posiciones de todos los átomos, y determina si el sistema se expande o se contrae, y, por tanto, cómo varía el tamaño de la caja de simulación [98].

Un método simple para controlar tanto la presión como la temperatura es el esquema de acoplamiento débil [110], lo que significa que el sistema está acoplado a un “baño” constante de presión y temperatura a través de algunos parámetros de acoplamiento adecuados. La principal ventaja de este método es que se trata de un procedimiento simple y que causa poca perturbación al sistema. Por otro lado, el mayor inconveniente de este sistema es que resulta imposible interpretar las fluctuaciones termodinámicas promedio y que no hay cantidades conservadas [98].

Un segundo método es el enfoque de “sistema extendido” [109, 111, 112], en el cual se incluyen grados de libertad para un pistón para el acoplamiento de presión y termostatos para el acoplamiento de temperatura. Este sistema tiene la ventaja de ser un conjunto mecánico-estadístico bien definido, a pesar de incluir un pistón no físico y un termostato. Por otra parte, su mayor desventaja radica en la mayor complejidad de las ecuaciones de movimiento involucradas [111].

4. Metodología

4.1. Herramientas Computacionales Utilizadas

En la Tabla 4.1 se detallan las herramientas computacionales utilizadas para el desarrollo de este trabajo.

Tabla 4.1 – Herramientas computacionales. Descripción de las principales herramientas computacionales utilizadas para el desarrollo del trabajo.

Herramienta	Descripción	Referencias
CLUSTAL	Programa que utiliza árboles y técnicas de perfil-perfil HMM (Hidden Markov Model) para generar alineamientos entre 3 o más secuencias.	[113]
Jalview	Programa para la visualización y análisis de alineamientos múltiples de secuencias.	[114]
Protter	Herramienta que permite el análisis interactivo de datos de proteínas y generación de hipótesis a partir de anotaciones de la secuencia y datos experimentales de topología de proteínas.	[115]
PSI-BLAST	Herramienta que permite realizar una búsqueda de proteínas a partir de una secuencia, con una matriz de puntuación posición-específica, lo cual permite encontrar proteínas con relaciones evolutivas distantes.	[116]
Modeller	Programa utilizado para el modelamiento comparativo de proteínas, a partir de un alineamiento de la proteína objetivo con una o más proteínas plantilla.	[117]
RAMPAGE	Servidor web que permite la obtención del gráfico de Ramachandran a partir de un archivo PDB.	[118]
ProSA	Herramienta que permite identificar errores en la estructura tridimensional de una proteína.	[119, 120]
H++	Sistema automatizado que calcula los valores de pK de los grupos ionizables en macromoléculas y añade la falta de átomos de hidrógeno de acuerdo a un pH especificado.	[121, 122]
NAMD	Programa de dinámica molecular diseñado para simulaciones de grandes sistemas biomoleculares, de alto rendimiento.	[103]
VMD	Programa de visualización molecular para mostrar, animar y analizar grandes sistemas biomoleculares utilizando gráficos en 3D y scripting integrado.	[123]
Chimera	Programa de visualización y análisis de estructuras moleculares y datos relacionados.	[124]
APBS	Adaptative Poisson-Boltzmann Solver, es un paquete de software para el modelamiento de solvatación biomolecular mediante la resolución de la ecuación de Poisson-Boltzmann.	[125]

4.2. Procedimiento

4.2.1. Análisis Preliminar

Antes de llevar a cabo el modelamiento por homología para la obtención de un modelo tridimensional de la proteína de interés, se realizaron algunos análisis preliminares para tener un conocimiento base respecto a su estructura.

4.2.1.1. Análisis de Secuencias en la Familia Nramp

En primer lugar, se realizó un análisis de las secuencias de la familia a la cual pertenece la proteína (Nramp), para reconocer los dominios y residuos mayormente conservados. Para esto, se construyó el alineamiento múltiple de los miembros eucariontes de la familia que han sido revisados en Uniprot [126] y, por otro lado, el alineamiento múltiple de las proteínas de la familia, provenientes de mamífero, utilizando CLUSTAL, usando los parámetros por defecto. Luego, se analizaron estos alineamientos mediante el uso de la herramienta Jalview. Los análisis realizados fueron los siguientes:

- Nivel de conservación del alineamiento.
- Nivel de calidad del alineamiento.
- Nivel de conservación de mutaciones expuestas en bibliografía.

El nivel de conservación del alineamiento refleja la conservación de las propiedades fisicoquímicas en cada columna del alineamiento. Las identidades tienen la puntuación más alta (11, marcadas con un *), y las columnas con mutaciones en las que se conservan todas las propiedades poseen la siguiente puntuación más alta (10, marcadas con un signo +). Luego, los niveles de conservación van bajando de acuerdo a las diferencias en las características fisicoquímicas de los aminoácidos de cada columna y a la presencia de gaps, la cual disminuye radicalmente el puntaje de conservación.

Por otro lado, la calidad del alineamiento es una medida de la probabilidad de observar mutaciones en una columna en particular del alineamiento. La puntuación obtenida es inversamente proporcional al costo promedio de todos los pares de mutaciones observadas en una columna.

Tabla 4.2 – Esquema de colores Zappo. Esquema de colores utilizado para colorear los aminoácidos de los alineamientos.

Residuos	Descripción	Color
I, L, V, A, M	Alifático/Hidrofóbico	ILVAM
F, W, Y	Aromático	FWY
K, R, H	Carga Positiva	KRH
D, E	Carga Negativa	DE
S, T, N, Q	Hidrofílico	STNQ
P, G	Prolina/Glicina	PG
C	Cisteína	C

Adicionalmente, se colorearon los alineamientos de acuerdo al esquema de colores Zappo, detallado en la Tabla 4.2, para así identificar de mejor manera los residuos dentro del alineamiento.

4.2.1.2. Predicción de Dominios Transmembrana

Posteriormente, se realizó un análisis de la estructura bidimensional de la proteína DMT1 humana, es decir, se determinó el posible número de dominios transmembrana, número de loops internos y externos, y sectores intra y extracelulares.

Este análisis se llevó a cabo mediante el uso del servidor Protter, el cual permite predecir los aminoácidos que se encontrarán en la membrana y aquellos que se posicionarán en el medio intra o extracelular. Adicionalmente, este servidor permite identificar los aminoácidos por carga, polaridad y marcar aminoácidos clave, de modo de visualizar el posicionamiento de éstos en la estructura, lo cual resulta de gran importancia para los análisis posteriores.

4.2.2. Modelamiento Comparativo

Luego, para la obtención de un modelo tridimensional de la proteína de interés se utilizó la técnica de modelamiento comparativo, cuyo procedimiento tradicional consiste en varios pasos consecutivos que generalmente se repiten de manera iterativa hasta que se obtiene un modelo satisfactorio [127]:

1. Búsqueda de una o más proteínas molde relacionada(s) con la proteína objetivo.
2. Alineamiento entre las secuencias de la proteína objetivo y el(los) molde(s).
3. Identificación de regiones estructuralmente conservadas.
4. Predicción de regiones estructuralmente variables.
5. Modelamiento de las cadenas laterales.
6. Refinamiento y evaluación del modelo resultante.

Dado lo anterior, en primer lugar se buscaron y seleccionaron las proteínas que se utilizarían como molde, luego se alinearon las secuencias manualmente para ajustar los moldes a las zonas correspondientes de la proteína de interés, y finalmente se obtuvieron modelos 3D de la proteína utilizando Modeller.

4.2.2.1. Análisis y Selección de Moldes

Ya que recientemente se logró cristalizar una de las proteínas de la familia Nramp, ScaDMT [39], se utilizó esta estructura como molde principal de la proteína. Sin embargo, ésta posee sólo 11 dominios transmembrana y su dominio transmembrana 1 se encuentra incompleto, debido a la dificultad de la cristalización.

Así, dado que el nivel de conservación dentro de la familia Nramp es bastante alto dentro del núcleo hidrofóbico (dominios transmembrana), ScaDMT se pudo utilizar como molde principal para los dominios transmembrana 2 a 11. Sin embargo, se tuvo que buscar otras proteínas molde que pudiesen servir como plantillas para completar los dominios TM1 y TM12.

Para la búsqueda de las proteínas plantilla, se utilizó la herramienta PSI-BLAST para buscar en la base de datos Protein Data Bank (PDB) [128] proteínas ya cristalizadas que alinearan con los sectores faltantes, es decir, con el trozo faltante del dominio transmembrana 1 y el dominio transmembrana 12 ausente en la proteína ScaDMT.

Adicionalmente, se superpuso tridimensionalmente los candidatos a plantilla de los sectores faltantes con el dominio correspondiente del cristal de ScaDMT utilizando la herramienta MatchMaker de Chimera, para así determinar si éstos encajaban bien con el resto de la estructura.

Finalmente, es importante señalar que se decidió que sólo se obtendría un modelo del núcleo de la proteína, es decir, sus 12 dominios transmembrana, debido a la dificultad de contar con un buen molde para los extremos amino y carboxilo terminales, y que además éstos son muy extensos (alrededor de 100 residuos) y por tanto podrían afectar los análisis posteriores.

4.2.2.2. Modelos 3D

Una vez seleccionados los moldes adecuados para cada sector de la proteína, se procedió a obtener modelos tridimensionales de la proteína de interés mediante la técnica de modelamiento comparativo con la ayuda del software Modeller, el cual proporciona las herramientas necesarias para generar modelos a partir del alineamiento entre la proteína objetivo y sus moldes.

Modeller implementa el modelamiento comparativo por satisfacción de restricciones espaciales, siendo diseñado para utilizar tantos tipos diferentes de información acerca de la secuencia objetivo como sea posible. Las restricciones utilizadas para el modelamiento son: restricciones derivadas de la homología, restricciones estereoquímicas, optimización de la función objetivo (suma de violaciones a las restricciones), restricciones derivadas de los datos experimentales y la precisión, flexibilidad y automatización relativas [129].

Ahora, dado que para obtener los modelos tridimensionales se debe contar con un alineamiento múltiple entre los moldes y la proteína de interés, se obtuvo este alineamiento manualmente, para así encajar las secuencias de cada molde en los sectores correspondientes. Así, a partir del alineamiento manual se generaron 100 posibles modelos de la proteína DMT1 humana, de los cuales se seleccionó el mejor de acuerdo a análisis estructurales y energéticos de éstos.

4.2.2.3. Análisis de los Mejores Modelos

Luego de obtener los 100 posibles modelos tridimensionales de la proteína, se realizaron análisis energéticos y estructurales de éstos, y adicionalmente se determinó la ubicación exacta de los aminoácidos importantes para DMT1, de acuerdo a la información bibliográfica recopilada.

Para analizar estas características, en primer lugar se hizo una selección de los mejores 10 modelos obtenidos en función de su puntuación DOPE (Discrete Optimized Protein Energy, de sus siglas en inglés), provista por el software Modeller, la cual está

diseñada para la selección de la mejor estructura de una colección de modelos construidos por este software.

La estructura nativa de una proteína tiene generalmente la energía libre más baja de todos los estados bajo las condiciones nativas, por lo tanto, una función precisa de la energía libre podría permitir la predicción y evaluación de estructuras de proteínas. Un enfoque utilizado para obtener una aproximación de la energía libre consiste en construir una función de puntuación cuyo mínimo global corresponda a una estructura nativa a partir de una muestra de estructuras nativas de diferentes secuencias, encontradas en el Protein Data Bank (PDB) [128]. Así, debido a su dependencia a la estructura de proteínas conocidas, tal función de puntuación se denomina a menudo un potencial de conocimiento o potencial estadístico.

En particular, el puntaje DOPE es un potencial estadístico dependiente de la distancia atómica, calculado a partir de una muestra de estructuras de proteínas nativas y se basa enteramente en la teoría de la probabilidad. Éste se basa en un estado de referencia mejorado que corresponde a átomos no interactuantes en una esfera homogénea con un radio dependiente de la estructura nativa de la muestra, por lo tanto, representa la forma finita y esférica de las estructuras nativas. De este modo, el DOPE score se utiliza para evaluar la energía del modelo de la proteína generado a través de muchas iteraciones por Modeller [130]. Por tanto, a menor puntaje DOPE, menor energía libre asociada al modelo, y por tanto, se espera sea un mejor modelo de la proteína de interés.

Una vez seleccionados los mejores 10 modelos según su puntaje DOPE, se obtuvo los gráficos de Ramachandran de cada uno de ellos en el servidor RAMPAGE, y a partir de éste se seleccionó el mejor modelo. El gráfico de Ramachandran proporciona una manera fácil de ver la distribución de los ángulos de torsión de una estructura proteica, y también permite tener una visión general de las regiones permitidas y no permitidas para estos ángulos, lo cual sirve como un indicador importante de la calidad de la estructura tridimensional de una proteína [131].

A continuación, ya seleccionado el mejor modelo de acuerdo a su gráfico de Ramachandran, se utilizó el servidor ProSA para analizar su z-score y la energía en función de la posición en la secuencia. El z-score permite determinar la calidad del modelo general, comparando su puntaje con el puntaje de proteínas cristalizadas por rayos X o NMR de tamaño similar. Por otro lado, el análisis energético a lo largo de la secuencia permite detectar regiones con energía positiva que por lo general resultan problemáticas o con errores. Este último análisis se realiza con una ventana de 10 y 40 aminoácidos para calcular la energía promedio de cada posición en la secuencia.

Dado que las funciones de energía utilizadas en ProSA se obtienen principalmente de proteínas globulares solubles de estructura conocida, no está claro en qué medida los resultados reflejan problemas en estructuras de proteínas que contienen dominios transmembrana [119].

Por otro lado, los potenciales de fuerza media obtenidos a partir de una base de datos proporcionan una media estadística de las estructuras conocidas. Las estructuras de proteínas globulares solubles cuyos z-score se desvían considerablemente de la media son inusuales y con frecuencia este tipo de estructuras resultan ser erróneas. Adicionalmente,

para proteínas con regiones transmembrana los resultados también demuestran que grandes desviaciones pueden indicar una estructura errónea [119].

4.2.3. Dinámica Molecular

Finalmente, se realizaron 4 dinámicas moleculares utilizando NAMD, para estudiar el comportamiento del mejor modelo obtenido en membrana y llevar a cabo otros análisis que permitirán dar un primer paso en el estudio del funcionamiento de la proteína DMT1 humana.

Dado que la proteína de interés se encuentra localizada en la membrana apical de los enterocitos, ésta se encuentra expuesta a un pH 7.4 en el medio citoplasmático y a un pH 5.5 en el micro-clima presente en las vellosidades del intestino delgado. Por lo tanto, se llevaron a cabo 2 dinámicas moleculares tanto para el modelo seleccionado como para el cristal de la familia Nramp (ScaDMT), una a pH 7.4 y la otra a pH 5.5. De este modo, se puede analizar las variaciones en el comportamiento de los residuos ubicados en estos sectores según el pH al cual se encuentran expuestos.

Adicionalmente, ya que la proteína cristalizada ScaDMT también fue cristalizada en conjunto con un ion de Mn^{2+} , se insertó dentro del modelo seleccionado un ion de Fe^{2+} en la misma región, dado que en [39] se postula que los mismos residuos que interactúan con manganeso también interactúan con hierro. En la Figura 4.1 se pueden ver los residuos que se encuentran interactuando con el ion de manganeso en la estructura de ScaDMT.

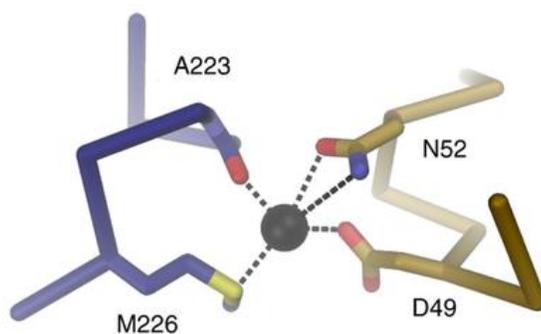


Figura 4.1 – Residuos que interactúan con ion de manganeso. Los residuos que se encuentran interactuando con manganeso en ScaDMT son A223, M226, provenientes de la hélice TM6 y N52 y D49 presentes en la hélice TM1 [39].

4.2.3.1. Preparación del Sistema

Para realizar una dinámica molecular, en primer lugar se debe preparar el sistema que será sometido a la simulación. En el caso particular de la dinámica molecular de una proteína de membrana utilizando NAMD, se siguen los siguientes pasos generales [116]:

1. Preparar proteína para la simulación.
 - Verificar protonación (pH).
 - Generar archivo PSF.
2. Generar un sector de membrana plasmática de tamaño adecuado para el tamaño de la proteína.
3. Centrar proteína en la membrana.

4. Combinar membrana y proteína en un solo archivo.
5. Eliminar lípidos en la zona donde se encuentre la proteína.
6. Solvatar el sistema con el solvente adecuado, por lo general, agua.
7. Ionizar el sistema a la concentración salina deseada, por lo general, con NaCl.

Para protonar las proteínas a los pH que se llevarán a cabo las dinámicas se utilizó el servidor H++, el cual protona los residuos de acuerdo a un pH y concentración salina dados. Luego, con VMD se generaron los archivos PSF para cada dinámica, ya que es el formato que utiliza NAMD para almacenar los datos de las estructuras obtenidos del campo de fuerzas utilizado en la dinámica.

A continuación, para cada caso, utilizando VMD se generó una membrana del doble del tamaño de la proteína en las dimensiones x e y, y se posicionó la proteína en el centro de ésta para encontrarse completamente rodeada de fosfolípidos. Por otro lado, se posicionó la proteína verticalmente de acuerdo a la hidrofobicidad de sus aminoácidos, dejando los aminoácidos más hidrofóbicos al interior de la membrana y aquellos hidrofílicos en el exterior.

Luego, en cada caso se combinó la membrana con la proteína en un solo archivo PDB y PSF, para luego remover los fosfolípidos que se encuentran en la región donde se ubicó la proteína.

Una vez preparado el sistema proteína-membrana, se procedió a generar la caja de solvatación, agregando agua al sistema, y posteriormente agregar los iones correspondientes a la caja de simulación. En este caso, se utilizó agua tipo TIP3P [132] como solvente, modelo que NAMD utiliza por defecto, y la sal utilizada para ionizar el sistema fue NaCl.

4.2.3.2. Condiciones de Simulación

Ya preparado el sistema para la dinámica, se generó el archivo de configuración de la simulación, el cual especifica:

- Archivos de entrada: PDB y PSF sistema.
- Campo de fuerzas utilizado.
- Cutoff.
- Periodicidad de almacenamiento de datos (archivos de salida).
- Condiciones de simulación: presión, temperatura, concentración salina, etc.
- Tipo de control de presión y temperatura.
- Tamaño de caja de simulación y tamaño de la grilla (margen de movimiento).
- Etapas que se llevarán a cabo: minimizaciones, producción, etc.
- Tiempo de simulación para cada etapa.

Para el estudio de este trabajo se utilizó el campo de fuerzas CHARMM27, el cual incluye los parámetros para todos los átomos del sistema y los fosfolípidos. Sin embargo, éste fue modificado para agregar los parámetros del ion de hierro y el ion de manganeso, ya que no se encontraban originalmente en el campo de fuerzas.

Las condiciones del sistema fueron establecidas de acuerdo a las condiciones biológicas presentes en los enterocitos del intestino, esto es, concentración salina fisiológica (0.15 mol/l), temperatura fisiológica (310 K) y presión atmosférica (1 bar). Para controlar la temperatura y la presión se utilizó el enfoque de “sistema extendido”. El tamaño de la caja de simulación fue dado por el tamaño del sistema proteína membrana, agregando 20 Angstrom en el eje z (10 hacia arriba y 10 hacia abajo), y por otro lado, el tamaño de la grilla le confirió un margen de 5 Angstrom en las 3 dimensiones.

Se llevaron a cabo 2 etapas, en primer lugar una etapa de minimización del sistema, y finalmente la etapa de producción. La minimización tuvo una duración de 10,000 pasos (1 fs por paso), con un cutoff de 10 Angstrom. Por otro lado, la etapa de producción fue realizada por 20 ns, almacenando los datos del sistema cada 500 fs (energías, presión, temperatura, posiciones atómicas, etc), generándose así 40,000 frames durante toda la simulación.

Finalmente, las 4 dinámicas fueron ejecutadas en un computador con 12 CPUs y 1 GPU, tardando aproximadamente 8 días en cada una de ellas, con un promedio de 2.5 ns/día de producción.

4.2.3.3. Análisis de las Dinámicas

En primer lugar se verificó que las dinámicas se hubiesen realizado de manera correcta, cumpliendo las condiciones básicas de temperatura y presión establecidas, y por otro lado, que tanto el volumen como el RMSD (Root Mean Square Deviation) durante la simulación alcanzaran un estado estacionario en algún punto de la dinámica. Todos estos análisis fueron realizados utilizando la extensión de NAMD en VMD.

Adicionalmente, se obtuvo el gráfico de Ramachandran y se realizó el análisis en el servidor ProSA de la estructura final de la proteína en la dinámica, para así comparar la calidad estructural y energética del modelo una vez terminada la simulación y observar si hubo mejoras.

Una vez realizados estos análisis preliminares, se procedió a realizar análisis más detallados del sistema. El primer análisis elaborado, utilizando Gromacs [133], fue el cálculo del RMSF (Root Mean Square Fluctuation, de sus siglas en inglés) por residuo, el cual indica el movimiento promedio de cada residuo de la proteína a lo largo de la simulación. Por tanto, este análisis permite determinar aquellos residuos que presentan mayor movilidad y aquellos que se mantienen más estáticos.

A continuación, se evaluó la posibilidad de formación de puentes disulfuro en la proteína, los que podrían rigidizar algún sector de ésta. Para este análisis, en VMD se marcaron las cisteínas dentro de la estructura y se buscaron posibles pares que pudieran formar un puente disulfuro, y finalmente se analizó su movimiento a lo largo de la dinámica para establecer si es posible la formación del puente o no.

El siguiente análisis realizado fue el de modos normales. Para esto, en primer lugar se realizó el cálculo de los modos normales de la trayectoria utilizando Gromacs [133], y luego utilizando la extensión de ProDy en VMD, Normal Mode Wizard [134], se analizó visualmente los 4 primeros modos normales encontrados. El objetivo de este análisis es

tener una primera idea de los movimientos que podrían tener relación con el funcionamiento de la proteína.

Luego, se procedió a evaluar la influencia del pH en los residuos expuestos tanto al lumen del intestino como a aquellos expuestos al citoplasma, para así determinar si existen cambios significantes en su configuración dependiendo de la protonación. Para realizar este análisis, se calculó el campo electrostático de la proteína en 3 frames de la simulación (comienzo, mitad y final) para ambos pH, utilizando APBS, para así observar los cambios a lo largo del tiempo dependiendo de la protonación.

Posteriormente, utilizando VMD se analizaron los residuos presentes en las cercanías del ion de hierro insertado en el sistema, de modo de establecer los residuos que posiblemente interactúan con él.

Finalmente, en VMD se siguió el movimiento de las moléculas de agua al interior de la proteína, en las cercanías del ion de hierro, para establecer un posible rol de éstas en el transporte o quelación del hierro. Además, se siguió la trayectoria de un grupo de moléculas de agua que ingresan al interior de la proteína, para así determinar el sector a través del cual ingresan a ella.

5. Resultados

5.1. Análisis Preliminar

5.1.1. Análisis de Secuencias en la Familia Nramp

En primer lugar, se realizó un análisis de las secuencias de la familia a la cual pertenece la proteína (Nramp), para así determinar el nivel de conservación general dentro de la familia y también de aquellos aminoácidos que presentan mutaciones conocidas. Para esto se construyó el alineamiento múltiple de los miembros eucariontes de la familia y, por otro lado, de las proteínas de la familia provenientes de mamífero, coloreando los alineamientos de acuerdo al esquema de colores Zappo.

En la Figura 5.1 se presenta parte del alineamiento múltiple obtenido para las proteínas de la familia Nramp de origen eucarionte. Adicionalmente, bajo el alineamiento se presenta la conservación, calidad y consenso de cada columna del alineamiento. En el Anexo 1.1 se puede ver el alineamiento múltiple completo.

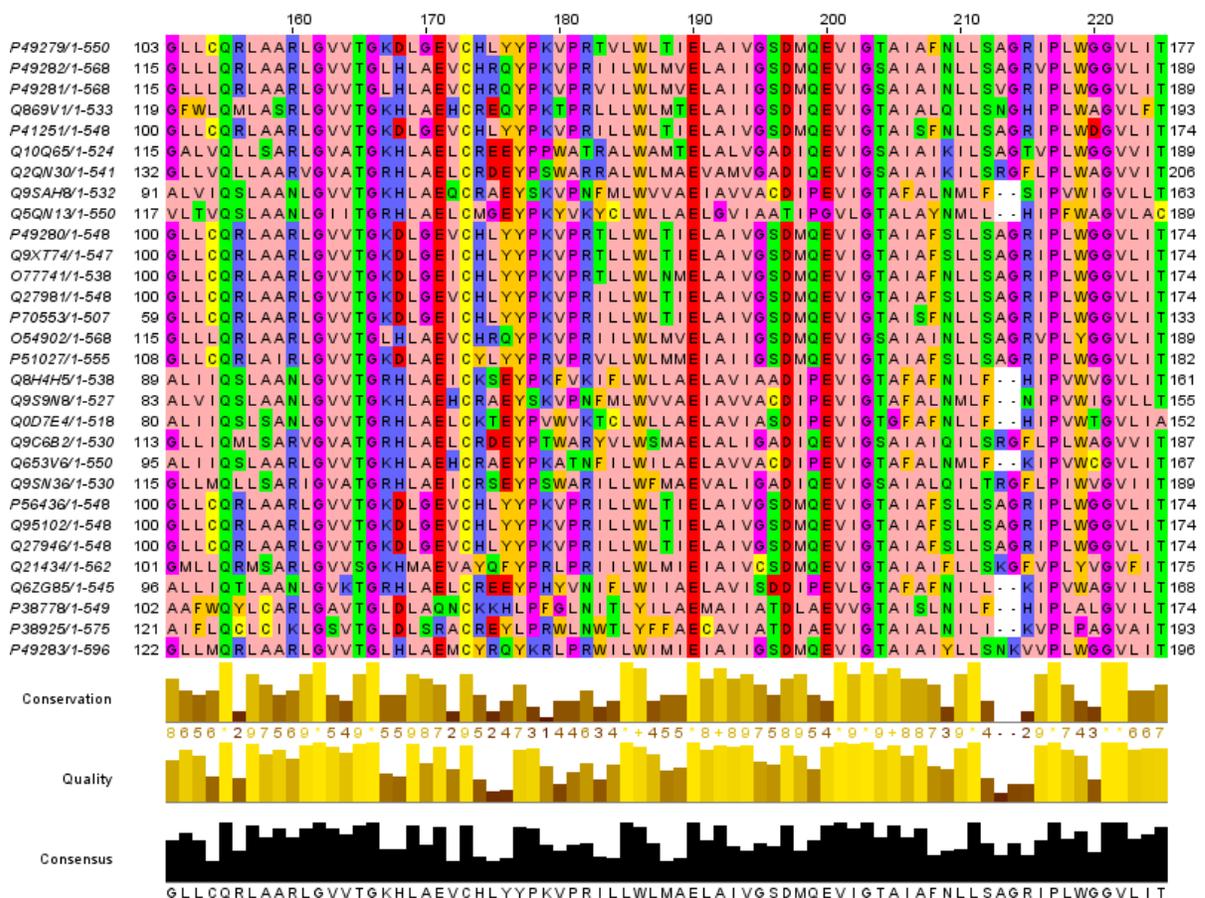


Figura 5.1 – Alineamiento múltiple eucariontes familia Nramp. Aminoácidos coloreados de acuerdo a esquema Zappo. Bajo el alineamiento se presenta el nivel de conservación, calidad y consenso de cada columna del alineamiento.

Por otro lado, en la Figura 5.2 se presenta parte del alineamiento múltiple obtenido para las proteínas de la familia Nramp pertenecientes a mamíferos. En este caso también se muestra el nivel de conservación, calidad y consenso de cada columna del alineamiento. En el Anexo 1.2 se presenta el alineamiento completo.

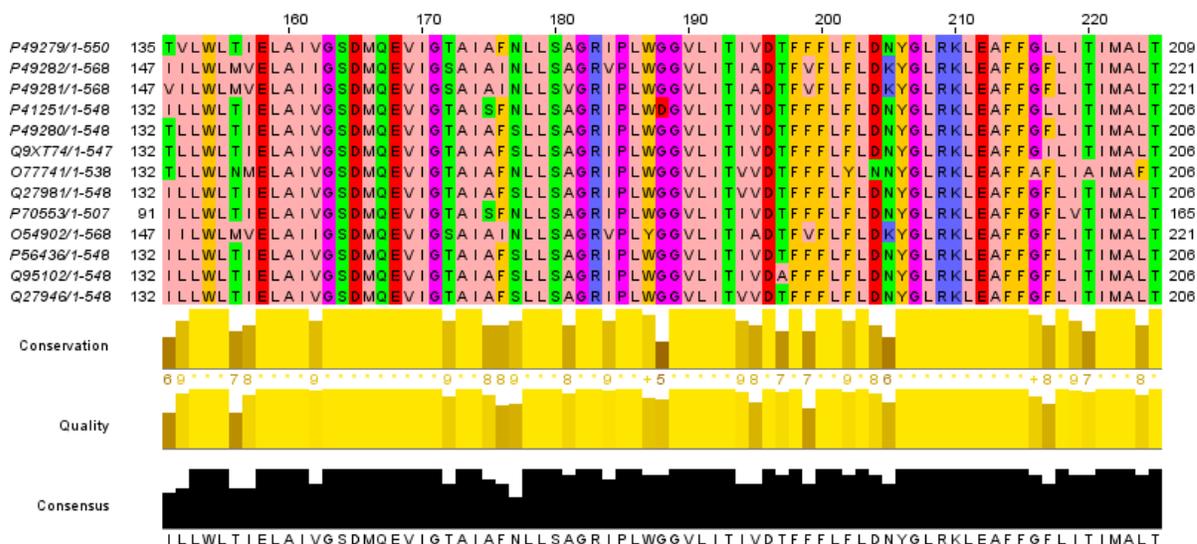


Figura 5.2 – Alineamiento múltiple mamíferos familia Nramp. Aminoácidos coloreados de acuerdo a esquema Zappo. Bajo el alineamiento se presenta el nivel de conservación, calidad y consenso de cada columna del alineamiento.

Como se dijo anteriormente, el nivel de conservación del alineamiento refleja la conservación de las propiedades fisicoquímicas en cada columna del alineamiento. Las identidades tienen la puntuación más alta (11, marcadas con un *), y las columnas con mutaciones en las que se conservan todas las propiedades poseen la siguiente puntuación más alta (10, marcadas con un signo +). Luego, los niveles de conservación van bajando de acuerdo a las diferencias en las características fisicoquímicas de los aminoácidos de cada columna y a la presencia de gaps, la cual disminuye radicalmente el puntaje de conservación.

De este modo, resulta importante estudiar el nivel de conservación de los alineamientos múltiples, ya que permite establecer qué tanto se conservan las secuencias o características de los aminoácidos dentro de la familia, y además permite determinar el la conservación de residuos importantes de la proteína.

En la Tabla 5.1 se presentan los datos más importantes extraídos a partir de ambos alineamientos múltiples. Aquí se detalla el número de secuencias alineadas en cada caso y la extensión del alineamiento, la cantidad de residuos con altos puntajes de conservación (10 y 11) y el puntaje promedio de conservación para cada alineamiento.

A partir de los resultados expuestos en la Tabla 5.1 se puede observar que el nivel de conservación a nivel de eucariontes es bastante bajo, sin embargo, aumenta considerablemente en el alineamiento de mamíferos. Dado lo anterior, se obtuvo el nivel de conservación de los aminoácidos reportados con mutaciones, expuestos en la Tabla 3.1, a partir del alineamiento de mamíferos.

Tabla 5.1 – Principales resultados alineamientos múltiples. Detalle de la cantidad de secuencias alineadas, la extensión del alineamiento, el número de columnas con identidades (puntaje 11) y con conservación de propiedades fisicoquímicas (puntaje 10), además del puntaje promedio del alineamiento y porcentaje de columnas con identidades y conservación de propiedades.

	Alineamiento eucariontes	Alineamiento mamíferos
Secuencias alineadas	30	13
Identidades (Puntaje 11, *)	37	257
Conservación propiedades fisicoquímicas (Puntaje 10, +)	10	11
Puntaje promedio conservación	2.94	7.99
Extensión alineamiento	750	574
Porcentaje identidades	4.93%	44.7%
Porcentaje conservación propiedades fisicoquímicas	1.33%	1.91%

En la Tabla 5.2 se muestra el puntaje de conservación y el consenso obtenido para cada uno de los aminoácidos reportados con mutaciones. Aquí se puede ver que el nivel de conservación de 4 de los 5 aminoácidos que presentan mutaciones conocidas en DMT1 es bastante alto (10 y 11), 3 de los cuales poseen un 100% de consenso (Gly185, Glu399 y Arg416). En cambio, el residuo Val114, se presenta en sólo 3 de las 13 secuencias alineadas, sin embargo, el resto de las secuencias poseen un residuo de leucina en esta posición, la cual posee propiedades fisicoquímicas similares a valina, proporcionando igualmente un alto puntaje de conservación en esta posición (9).

Tabla 5.2 – Conservación aminoácidos mutados DMT1. Puntaje de conservación obtenido por los aminoácidos que presentan mutaciones reportadas y residuo con mayor número de apariciones a lo largo de una columna del alineamiento (consenso) y su respectivo porcentaje.

Residuo	Puntaje conservación	Consenso	% Consenso
Gly 185	11	Gly	100
Glu 399	11	Glu	100
Val 114	9	Leu	76
Gly 212	10	Gly	92
Arg 416	11	Arg	100

5.1.2. Predicción de Dominios Transmembrana

Luego, se realizó un análisis de la estructura bidimensional de la proteína para determinar el posible número de dominios transmembrana, número de loops internos y externos, y sectores intra y extracelulares. Este análisis se llevó a cabo mediante el uso del servidor Protter.

En la Figura 5.3 se muestra la predicción de la estructura bidimensional de la isoforma 1A/IRE(+) de la proteína DMT1 humana. En ella se destacan los sectores correspondientes a 1A e IRE, las 2 histidinas que posiblemente son responsables del movimiento de protones, y adicionalmente se destacan los aminoácidos que han sido reportados con mutaciones. Además, en el Anexo 2 se presenta la estructura 2D con los aminoácidos coloreados según carga.

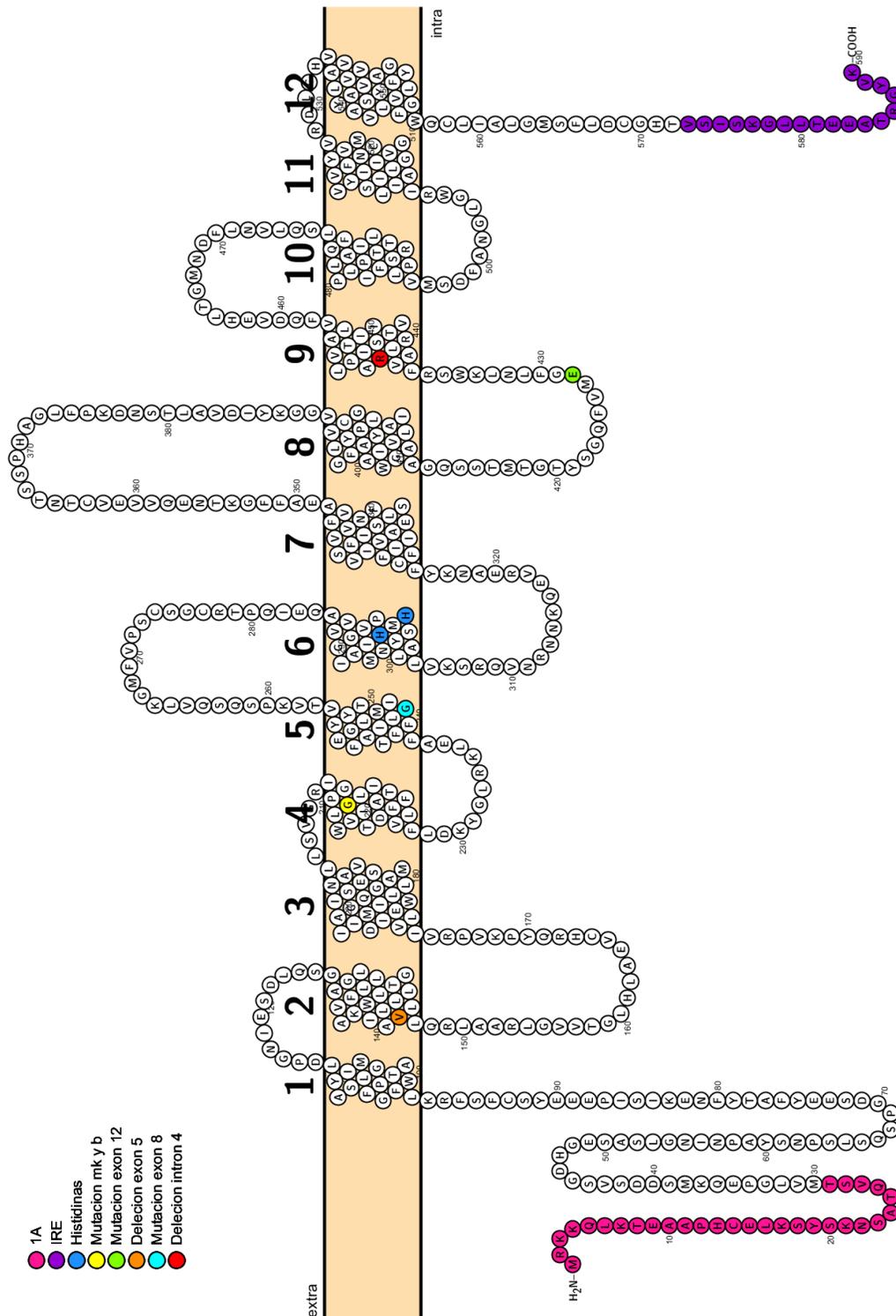


Figura 5.3 – Predicción estructura bidimensional DMT1. Determinación de dominios transmembrana de la isoforma 1A/IRE(+). de la proteína DMT1 humana.

Esta predicción establece la presencia de 12 dominios transmembrana, 6 loops extracelulares, 5 loops intracelulares y los extremos amino y carboxilo terminales al interior del citoplasma de los enterocitos, lo que concuerda en su totalidad con lo expuesto en bibliografía. Adicionalmente, se observa que aquellos aminoácidos que presentan mutaciones se encuentran posicionados al interior de la membrana.

5.2. Modelamiento Comparativo

5.2.1. Análisis y Selección de Moldes

Posteriormente, para la obtención de un modelo tridimensional de la proteína de interés se utilizó la técnica de modelamiento comparativo para obtener un modelo del núcleo de la proteína, es decir, sin considerar los extremos amino y carboxilo terminales. Como se dijo anteriormente, se utilizó como molde principal la proteína cristalizada de la familia, ScaDMT (PDB ID: 4WGV [128]). En la Figura 5.4 se muestra el alineamiento obtenido en BLAST entre esta proteína y DMT1, considerando sólo el núcleo de la proteína. Aquí se puede ver que el porcentaje de identidad obtenido es de un 38%, la cantidad de positivos es de un 59% y el porcentaje de gaps 7%. Adicionalmente, se obtuvo una cobertura del 92% de la proteína objetivo.

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
256 bits(653)	2e-84	Compositional matrix adjust.	159/419(38%)	248/419(59%)	31/419(7%)
Query 111	IAYLDPGNIESDLQSGAVAGFKLLWILLLATLVGLLQRLAARLGVVTGLHLAEVCHRQY				170
	+ Y+DPGN + +Q GA G+ LL+++L+++L +LLQ + RLG+ TG LA++				
Sbjct 5	VGYMDPGNWITSMQGAQYGYTLFVILISSLAAMLLQSMTVRLGIATGKDLAQMTRHFL				64
Query 171	PKVPRVILWLMVELAIIIGSDMQEVIIGSAIAINLLSVGRIPLWGGVLTIIADTFVFLFDK				230
	K +I W++ ELAII +D+ EVIGSAIA++L + IPL G LIT+ D F+ LF+ +				
Sbjct 65	SKPVAIIFWIIAELAIATDIAEVIIGSAIALDL--IFGIPLIVGALITVDFVFLFIMR				122
Query 231	YGLRKLEAFFGFLITIMALTFGYEYVTVKPSQSQVLKGMFVPSGSGCRTPQIEQ-AVGIV				289
	+G RK+EA G LI + F +E P + +L G FVP I A+GI+				
Sbjct 123	FGFRKIEAIVGTLIFTVLAIFVFEVFISSPQLTDILNG-FVPHKEIVTNQGILYIALGII				181
Query 290	GAVIMPHNMYLHSALVKSQVNRNNKQEVREANKYFFIESCIALFVSFIINVFVSVFAE				349
	GA IMPHN+YLHS++V+SR+ +R++ +E +A KY I+S + L ++F++N ++++ A				
Sbjct 182	GATIMPHNLYLHSSIVQSRKYDRHDNEEKAQAIKYATIDSNLQLSIAFVNVNCLLLTLGAA				241
Query 350	AFFG-KTNEQVVECTNTSSPHAGLFPKDNSTLAVDIY---KGGVVLGCFYGPAAALYIWA				405
	FFG KTN+ G + D+Y K VLG G ++A				
Sbjct 242	LFFGKTNDL-----GGFY-----DLYHALKTEPVLGATLGGVMSTLFA				280
Query 406	VGILAAGQSSTMTGTYSQGFVMEGFLNLKWSRFARVVLTRSAIIPITLL-VAVFQ-DVEH				463
	V +LA+GQ+ST+TGT +GQ VMEGFL L + R ++TRS+A+IP ++ + +F+ + E				
Sbjct 281	VALLASGQNSTITGTLAGQIVMEGFLRLSIPNWLRLITRSLAVIPVVICLIIFKGNSEK				340
Query 464	LTGMNDFLNVLQSLQLPFALIPILTFTSLRPVMSDFANGLGWRIAGGILVLIICSINMY				522
	+ + F V S+ LPF+LIP+ TS + +M F N I L++I+ +N+Y				
Sbjct 341	IEQLLVFSQVFLSIALPFLSILPQLATSNNKLMGPFINKTWNIIISWTLIVILSGLNVY				399

Figura 5.4 – Alineamiento DMT1 – ScaDMT. Alineamiento entre la isoforma 1A/IRE(+) de la proteína DMT1 humana y el cristal de la familia Nramp, ScaDMT.

Como se puede ver en la Figura 5.4, el cristal de ScaDMT cubre desde el residuo 111 al 522 de DMT1, faltando 11 aminoácidos en el sector TM1 y el sector TM12 completo, en base a la predicción presentada en la Figura 5.3. Luego, se llevó a cabo la búsqueda de estos fragmentos faltantes mediante PSI-BLAST, sin embargo, no se obtuvieron resultados positivos para el trozo faltante del primer dominio transmembrana, ya que los resultados obtenidos correspondían a trozos de proteína sin estructura secundaria, lo cual no concuerda con la estructura de un sector transmembrana (por lo general alfa hélices). En cambio, para el dominio transmembrana 12 se obtuvo sólo 1 resultado positivo, un trozo de la proteína NUP192 (PDB ID: 4IFQ [135]).

En la Figura 5.5 se presenta el alineamiento obtenido en BLAST del sector TM12 y el trozo de NUP192 con el que alinea. El porcentaje de identidad obtenido es de un 23%, la cantidad de positivos es de un 63% y el porcentaje de gaps 0%. Adicionalmente, se obtuvo una cobertura del 85% del sector objetivo. Adicionalmente, se observa que el trozo

de NUP192 alinea entre el residuo 527 y 556 de DMT1, completando así la estructura del núcleo de la proteína.

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
24.6 bits(52)	2e-06	Compositional matrix adjust.	7/30(23%)	19/30(63%)	0/30(0%)
Query	527	YVRDLGHVALYVVAAVVSVAYLGFVFIGW	556		
		+++DL ++Y V++ ++ F +++GW			
Sbjct	261	FMKDLKDDSIYTKPVKVALIFFAYFIGW	290		

Figura 5.5 – Alineamiento DMT1 – NUP192.

Por otra parte, dado que la búsqueda de PSI-BLAST no fue exitosa para el dominio transmembrana 1, se utilizó otra metodología para completar la estructura faltante. Ya que antes de la publicación del cristal de la familia se habían obtenido modelos de DMT1 utilizando como plantilla la proteína MHP1 (PDB ID: 2JLN [136]), la cual posee 12 dominios transmembrana, y un 28% de identidad con DMT1, pero un 15% de cobertura, se probó utilizar su primer dominio transmembrana como molde para el mismo dominio de la proteína de interés.

Finalmente, se superpuso los extremos de ambos trozos obtenidos (MHP1 para dominio TM1 y NUP192 para TM12) con los extremos de la plantilla principal, ScaDMT, para visualizar si éstos se posicionan adecuadamente respecto al resto de la estructura y si sus extremos se superponen. Así, en las Figuras 5.6 y 5.7 se presenta la superposición del trozo de NUP192 y MHP1, respectivamente, con ScaDMT, utilizando MatchMaker en Chimera.

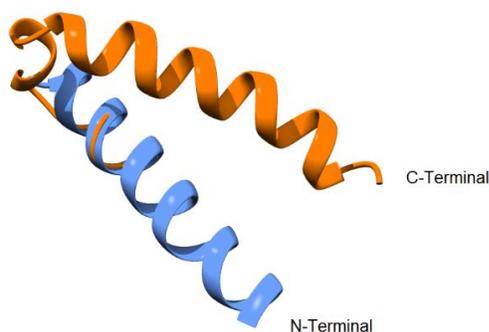


Figura 5.6 – Plantilla dominio transmembrana 12. En azul se muestra el dominio transmembrana 11 de ScaDMT (cristal familia Nramp) y en naranja el trozo de la proteína NUP192.

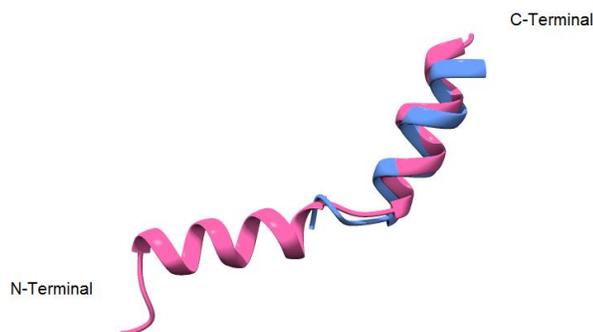


Figura 5.7 – Plantilla dominio transmembrana 1. En azul se muestra el trozo de dominio transmembrana 1 de ScaDMT (cristal familia Nramp) y en rosado el trozo de la proteína MHP1 que permite completar lo que falta de este dominio.

5.2.2. Modelos 3D

Una vez seleccionados los moldes que se utilizarían para el modelamiento comparativo, se utilizó el software Modeller para obtener 100 posibles modelos de DMT1. Para esto, el alineamiento utilizado fue realizado manualmente, a partir de la superposición de los moldes con los sectores correspondientes. En la Figura 5.8 se presenta el detalle del alineamiento utilizado para la obtención de los modelos.

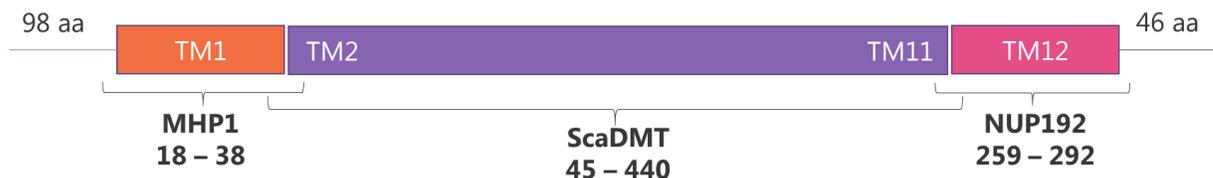


Figura 5.8 – Alineamiento manual de plantillas. En él se señalan los 3 moldes utilizados, su respectiva ubicación y rango de aminoácidos alineados. Además, se señala la cantidad de aminoácidos no alineados en los extremos amino y carboxilo terminales.

Adicionalmente, en la Tabla 5.3 se presenta la cobertura de DMT1 de cada uno de los moldes utilizados y la cantidad de gaps presentes en cada sector del alineamiento. Aquí se puede ver que existe un traslape entre las plantillas utilizadas, lo que permite establecer una conexión entre las estructuras de los moldes.

Tabla 5.3 – Cobertura plantillas. Nivel de cobertura de cada plantilla utilizada en el modelamiento comparativo. Cantidad de residuos utilizados, rango de residuos de DMT1 con los que alinea y número de gaps del alineamiento.

Plantilla	Residuos utilizados	Cobertura DMT1	Número de Gaps
MHP1	18 a 38	99 a 119	0
ScaDMT	45 a 440	111 a 522	16
NUP192	259 a 292	511 a 544	0

5.2.3. Análisis de los Mejores Modelos

Luego de generar los modelos, éstos fueron ordenados de acuerdo a su DOPE score de menor a mayor (mientras más negativo mejor) para así seleccionar los 10 mejores, los cuales se pueden ver en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4 – 10 modelos con mejor puntaje DOPE.

Modelo	DOPE score
Modelo 66	-55925.98
Modelo 86	-55907.19
Modelo 37	-55856.41
Modelo 90	-55744.88
Modelo 23	-55708.82
Modelo 34	-55662.98
Modelo 69	-55603.73
Modelo 44	-55571.63
Modelo 28	-55501.86
Modelo 93	-55467.75

A continuación, para seleccionar el mejor modelo entre los 10 con mejor DOPE score, se obtuvo el gráfico de Ramachandran de cada uno de ellos y se seleccionó el mejor. En la Tabla 5.5 se muestra un resumen del resultado del gráfico de Ramachandran para los 10 mejores modelos y la proteína cristalizada de ScaDMT, detallando los porcentajes de aminoácidos en zonas favorables, permitidas y no favorables.

Tabla 5.5 – Resumen gráficos de Ramachandran. Número y porcentaje de residuos ubicados en zonas favorables, permitidas y no favorables dentro del gráfico de Ramachandran.

	Favorables	Permitidos	No Favorables
Cristal	375 aminoácidos (95.4%)	18 aminoácidos (4.6%)	0 aminoácidos (0%)
Modelo 66	423 aminoácidos (95.9%)	12 aminoácidos (2.7%)	6 aminoácidos (1.4%)
Modelo 86	417 aminoácidos (94.6%)	18 aminoácidos (1.4%)	6 aminoácidos (1.4%)
Modelo 37	422 aminoácidos (95.7%)	10 aminoácidos (2.3%)	9 aminoácidos (2%)
Modelo 90	420 aminoácidos (95.2%)	15 aminoácidos (1.4%)	6 aminoácidos (1.4%)
Modelo 23	422 aminoácidos (95.7%)	17 aminoácidos (3.9%)	2 aminoácidos (0.5%)
Modelo 34	422 aminoácidos (95.7%)	13 aminoácidos (2.9%)	6 aminoácidos (1.4%)
Modelo 69	420 aminoácidos (95.2%)	14 aminoácidos (3.2%)	7 aminoácidos (1.6%)
Modelo 44	426 aminoácidos (96.6%)	8 aminoácidos (1.8%)	7 aminoácidos (1.6%)
Modelo 28	417 aminoácidos (94.6%)	16 aminoácidos (3.6%)	8 aminoácidos (1.8%)
Modelo 93	423 aminoácidos (95.9%)	11 aminoácidos (2.5%)	7 aminoácidos (1.6%)

Los resultados expuestos en la Tabla 5.5 permiten concluir que el Modelo 23 es aquel que posee menor cantidad de aminoácidos dentro de regiones no favorables, por lo cual se selecciona este modelo como el mejor de todos.

En la Figura 5.9 se muestra el gráfico de Ramachandran obtenido para el Modelo 23 (izquierda), el mejor, y como referencia el gráfico del cristal de ScaDMT (derecha). Adicionalmente, en el Anexo 3 se presentan los gráficos de Ramachandran del resto de los modelos.

A partir del gráfico de Ramachandran del Modelo 23 de la Figura 5.9 se desprende que los 2 residuos que se encuentran fuera de las zonas permitidas son: Ala13 y Pro395, los cuales en la estructura completa corresponderían a los residuos 112 y 494, respectivamente. La prolina se encuentra bastante cerca de su región permitida, mientras que el residuo de alanina está bastante alejado de su sector permitido.

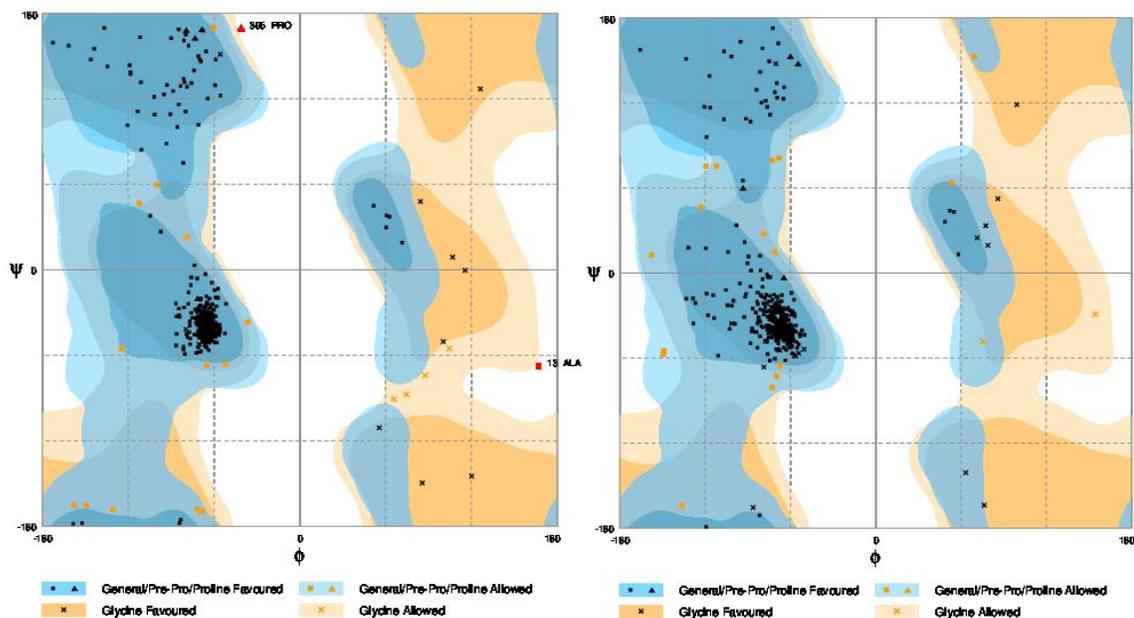


Figura 5.9 – Gráfico de Ramachandran mejor modelo. A la izquierda el gráfico del Modelo 23 y a la derecha el gráfico del cristal de la familia Nrap, ScaDMT.

Adicionalmente, en la Figura 5.10 se puede ver en rojo la ubicación de los 2 residuos que se encuentran fuera de su región favorable, dentro de la estructura del modelo.

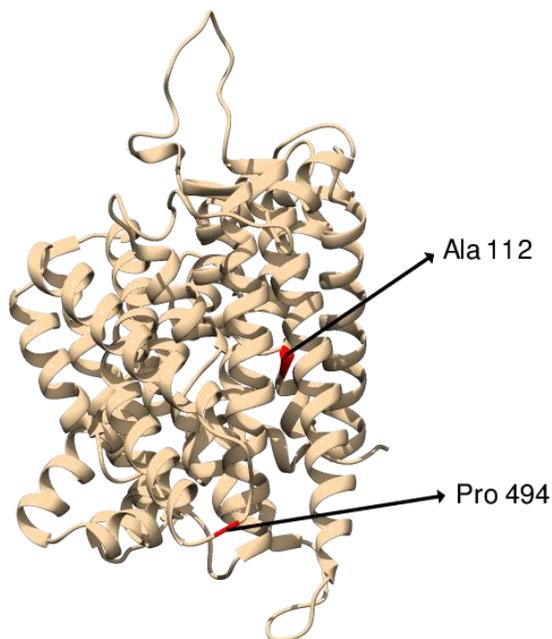


Figura 5.10 – Residuos en zona no favorable en Modelo 23.

Luego, seleccionado el Modelo 23, se procedió a realizar los análisis en el servidor ProSA para analizar la calidad del modelo obtenido, comparándolo con estructuras de proteínas cristalizadas. En la Figura 5.11 se presenta el resultado obtenido para el z-score, mientras que en la Figura 5.12 el análisis energético. En ambos casos se muestra como referencia el resultado obtenido para el cristal de la familia Nrap, ScaDMT, en el mismo análisis.

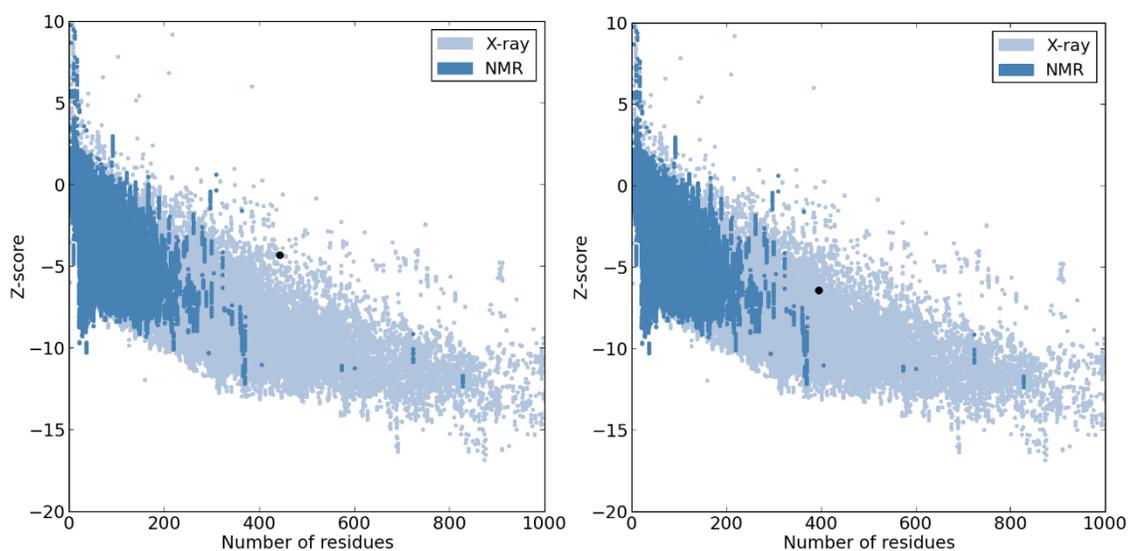


Figura 5.11 – Z-score. A la izquierda el resultado para el Modelo 23 y a la derecha para el cristal de ScaDMT.

El Modelo 23 obtuvo un z-score de -4.3, mientras que el cristal presentó un z-score de -6.45. En ambos casos, el resultado se posiciona dentro del rango de puntajes obtenidos por proteínas cristalizadas mediante la técnica de rayos X.

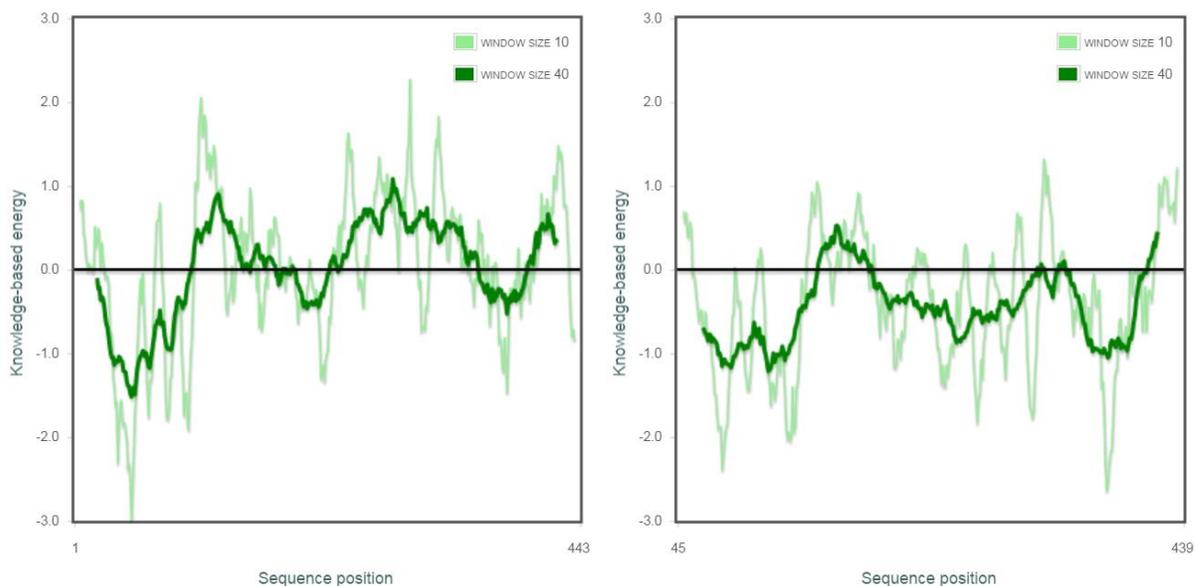


Figura 5.12 – Perfil energía por residuo. A la izquierda el resultado para el Modelo 23 y a la derecha para el cristal ScaDMT.

Por otra parte, en cuanto a energía, tanto el Modelo 23 como el cristal de ScaDMT presentan regiones con energía positiva. Sin embargo, el modelo obtenido mediante modelación comparativa posee una mayor cantidad de residuos con energía positiva, aunque su curva presenta un perfil similar al del cristal, desplazado hacia arriba.

En la Figura 5.13 se muestra la estructura del Modelo 23 y a su lado la estructura del cristal de ScaDMT, señalando los aminoácidos que presentan mutaciones conocidas.

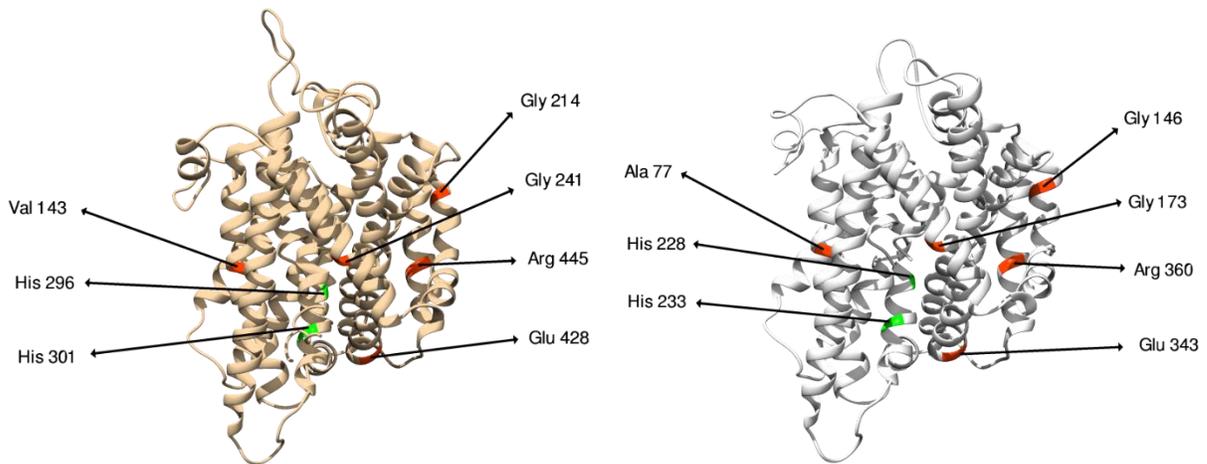


Figura 5.13 – Estructura tridimensional. A la izquierda se muestra la estructura del Modelo 23 y a la derecha la del cristal ScaDMT. En ambos casos se señalan en naranja las mutaciones conocidas de la familia y en verde las 2 histidinas que deberían interactuar con los protones, en sus respectivas posiciones.

Las mutaciones e histidinas se encuentran en aminoácidos con distinta numeración debido a la diferencia en el largo de sus secuencias y por el alineamiento entre ellas, pero en la Figura 5.13 se puede ver que la posición relativa de éstas es bastante similar. Sin embargo, existe una diferencia en el residuo Val143, proveniente de la mutación del Val114, donde se observa la presencia de una alanina en vez de una valina en el cristal de ScaDMT.

Adicionalmente, en la Figura 5.14 se presenta la estructura del Modelo 23 y del cristal de ScaDMT, con sus hélices coloreadas de acuerdo a su dominio transmembrana correspondiente. En la Tabla 5.6 se detalla el color de cada dominio.

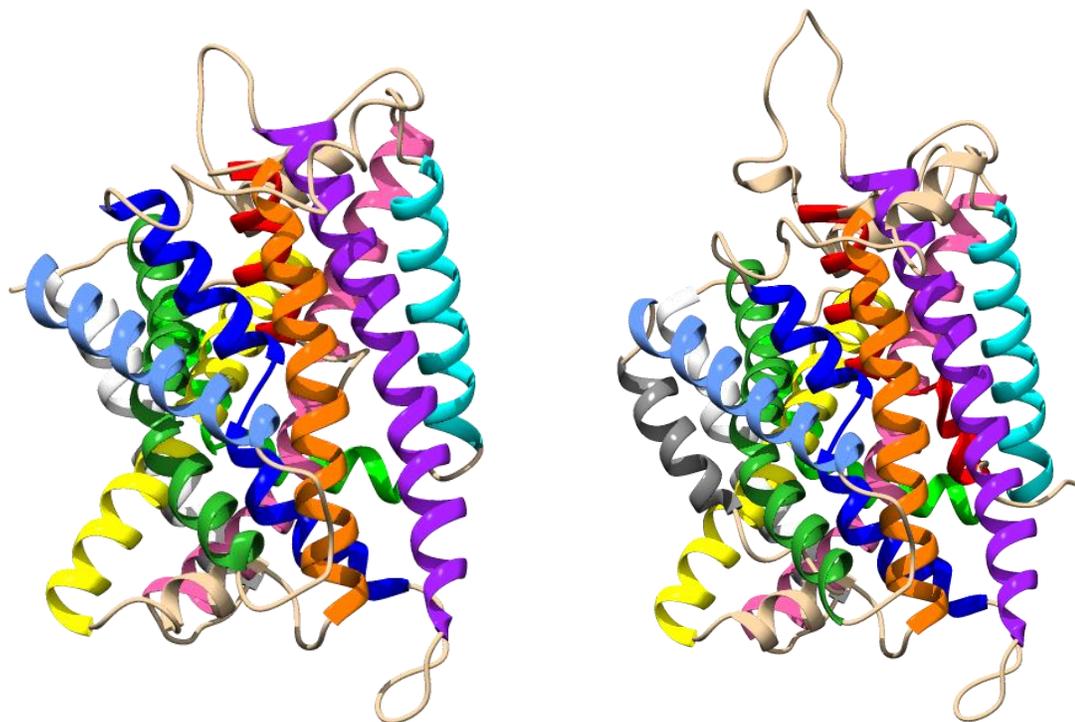
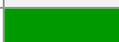


Figura 5.14 – Comparación estructura tridimensional. Comparación entre las estructuras del cristal de ScaDMT (izquierda) y el Modelo 23 obtenido por modelamiento comparativo (derecha). Los dominios transmembrana correspondientes se encuentran coloreados con el mismo color en ambas estructuras.

Tabla 5.6 – Colores dominios transmembrana.

Dominio	Color
TM1	
TM2	
TM3	
TM4	
TM5	
TM6	
TM7	
TM8	
TM9	
TM10	
TM11	
TM12	

La estructura cristalizada de ScaDMT posee 11 dominios transmembrana, mientras que el modelo seleccionado para la proteína DMT1, el Modelo 23, posee 12 dominios transmembrana. Sin embargo, en la Figura 5.14 se puede ver que la estructura del Modelo 23 es bastante similar a la estructura del cristal de ScaDMT, posicionando los dominios TM1 a TM11 en posiciones prácticamente idénticas, obteniéndose un RMSD de 0.372 Angstrom entre las estructuras.

5.3. Dinámica Molecular

Una vez seleccionado un modelo para la estructura de la isoforma 1A/IRE(+) de la proteína DMT1 humana, se llevaron a cabo 4 dinámicas moleculares para estudiar el comportamiento del modelo en membrana y compararlo con el comportamiento del cristal de ScaDMT, evaluando el sistema a 2 pH diferentes.

Los sistemas fueron sometidos a pH 7.4 y a pH 5.5, debido a que la proteína de interés se ubica en la membrana apical de los enterocitos, estando así expuesta a pH 5.5 en el exterior de los enterocitos y a un pH 7.4 al interior de éstos. Así, al evaluar los sistemas a ambos pH, se pueden obtener conclusiones respecto a la importancia de esta diferencia de pH para los residuos expuestos en estas zonas.

A continuación se presentan los resultados obtenidos de una serie de análisis realizados a partir de las dinámicas obtenidas.

5.3.1. Análisis Preliminares

En primer lugar, se desarrollaron una serie de análisis preliminares que permiten establecer que las dinámicas se llevaron a cabo exitosamente, y adicionalmente determinar el momento en que el sistema se encuentra en estado estacionario y a partir del cual se pueden tomar mediciones.

En la Figura 5.15 se muestra el RMSD del modelo y del cristal a pH 7.4 a lo largo de la simulación, y en la Figura 5.16 a pH 5.5. En ambos casos se puede ver que los sistemas alcanzaron el estado estacionario entre el segundo y tercer nanosegundo de la simulación, siendo más estable el cristal que el modelo a lo largo del tiempo.

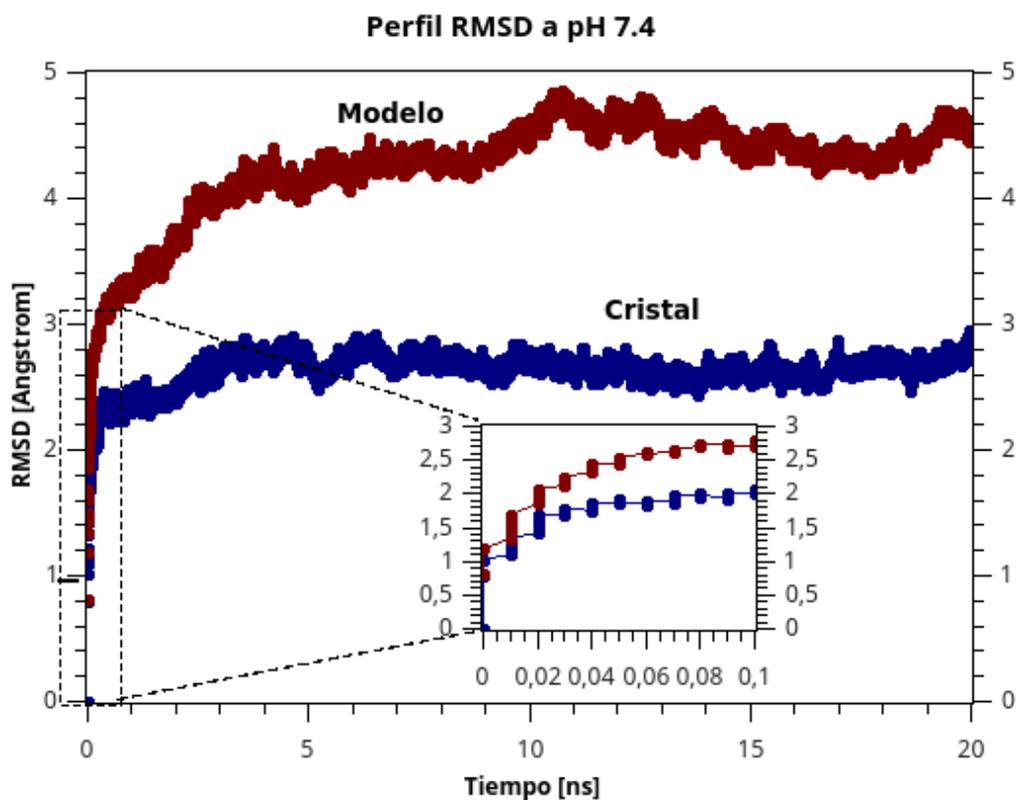


Figura 5.15 – Perfil RMSD a pH 7.4. En azul para el cristal de ScaDMT y en rojo para el Modelo 23.

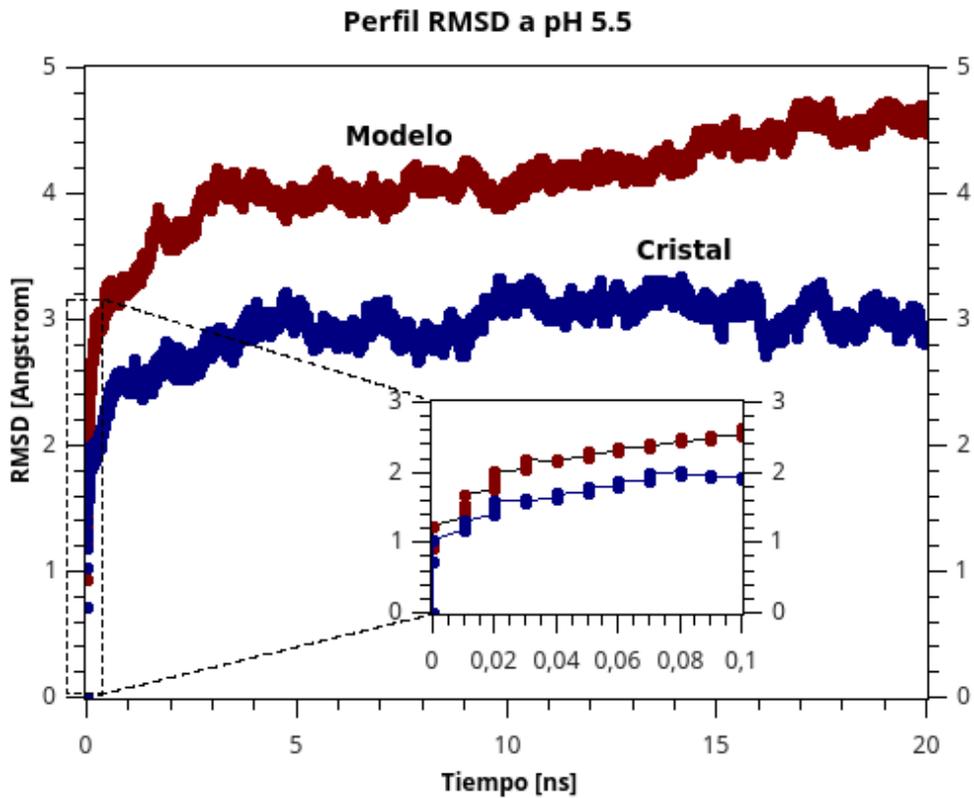


Figura 5.16 – Perfil RMSD a pH 5.5. En azul para el cristal de ScaDMT y en rojo para el Modelo 23.

Además, es importante señalar que en ambos casos se aprecia una gran variación del RMSD en los primeros nanosegundos de la simulación, debido a que el sistema comienza con una etapa de minimización y posteriormente se ajustan los parámetros de presión y temperatura hasta alcanzar el valor establecido, de modo que el sistema va acomodándose hasta alcanzar un estado estacionario, donde su RMSD se estabiliza alrededor de un promedio.

Adicionalmente, en el Anexo 4 se pueden ver los perfiles de radio de giro (Anexo 4.1), energía (Anexo 4.2), temperatura (Anexo 4.3), presión (Anexo 4.4) y volumen (Anexo 4.5) del modelo y del cristal a ambos pH durante las simulaciones. Los perfiles obtenidos para cada propiedad son similares a los obtenidos para el RMSD, presentando una gran variación al comienzo de la simulación, para luego alcanzar un estado estacionario alrededor de un valor promedio.

A partir de los resultados presentados en el Anexo 4, se puede ver que la temperatura promedio, se acerca bastante a la temperatura establecida para el sistema, 310 K. Del mismo modo, la presión promedio obtenida también se acerca al valor fijado para el sistema, 1 bar. De este modo, se puede decir que el sistema alcanzó y mantuvo las condiciones de temperatura y presión establecidas.

Por otra parte, el radio de giro y volumen promedio del cristal y el modelo alcanzaron valores cercanos a ambos pH, sin embargo, en ambos casos el modelo presentó un mayor valor promedio, en comparación con el cristal. En cambio, los valores promedio de la energía total se mantienen bastante parejos entre el modelo y el cristal a ambos pH.

Luego, se obtuvo el gráfico de Ramachandran para la estructura del Modelo 23 tras la dinámica a pH 7.4 (Ver Figura 5.17), para así comparar estos resultados con los obtenidos antes de la simulación.

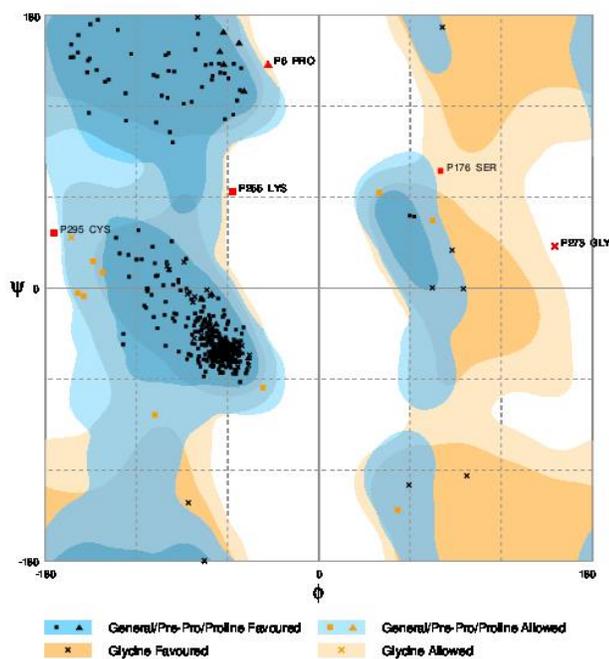


Figura 5.17 – Gráfico de Ramachandran Modelo 23 después de la dinámica.

A partir del gráfico de Ramachandran presentado en la Figura 5.17, se puede ver que aumentó la cantidad de residuos dentro de zonas no permitidas, en comparación con el gráfico presentado en la Figura 5.9. Sin embargo, los residuos que se encuentran dentro de estas zonas (Pro6, Ser176, Lys255, Gly273 y Cys295) están bastante cerca de su zona permitida, a diferencia de la prolina 395 en la estructura del modelo previo a la simulación, la cual se encontraba muy alejada de su región permitida.

Por otro lado, en las Figuras 5.18 y 5.19 se presentan los resultados del z-score y energía por residuo, respectivamente, obtenidos en el servidor ProSA, para el Modelo 23 después de la dinámica.

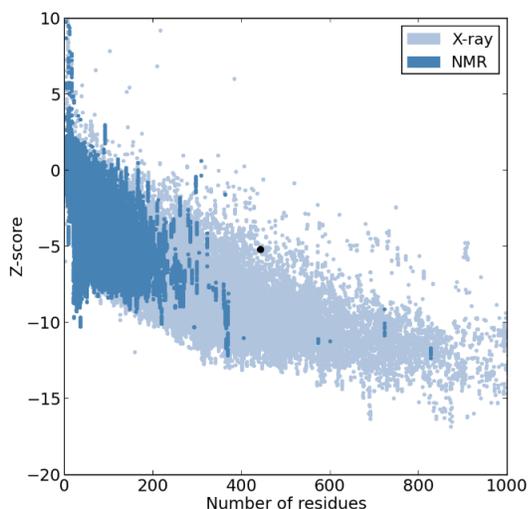


Figura 5.18 – Z-score Modelo 23 después de la dinámica.

El z-score obtenido para el Modelo 23 una vez terminada la dinámica fue de -5.21, menor al valor obtenido antes de la simulación, el cual fue de -4.3. Esto representa una mejora del modelo respecto a la estructura inicial, la cual se encontraba más alejada de la densidad de puntos de los z-score obtenidos por estructuras cristalizadas (Ver Figura 5.11).

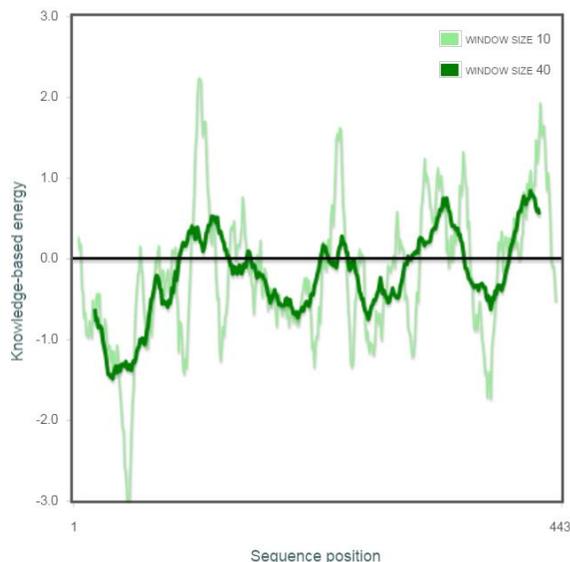


Figura 5.19 – Perfil energía por residuo Modelo 23 después de la dinámica.

Luego, comparando el resultado de la Figura 5.19 con aquel presentado en la Figura 5.12, se puede decir que la estructura del modelo mejoró energéticamente, pues presenta menos residuos con energías positivas y su perfil energético se asemeja más al obtenido por el cristal de ScaDMT. Sin embargo, aún existen sectores de la estructura con energías positivas, los cuales deben ser estudiados.

Adicionalmente, en la Figura 5.20 se presenta la estructura del Modelo 23 antes y después de la dinámica, coloreando las hélices de acuerdo a la Tabla 5.6.

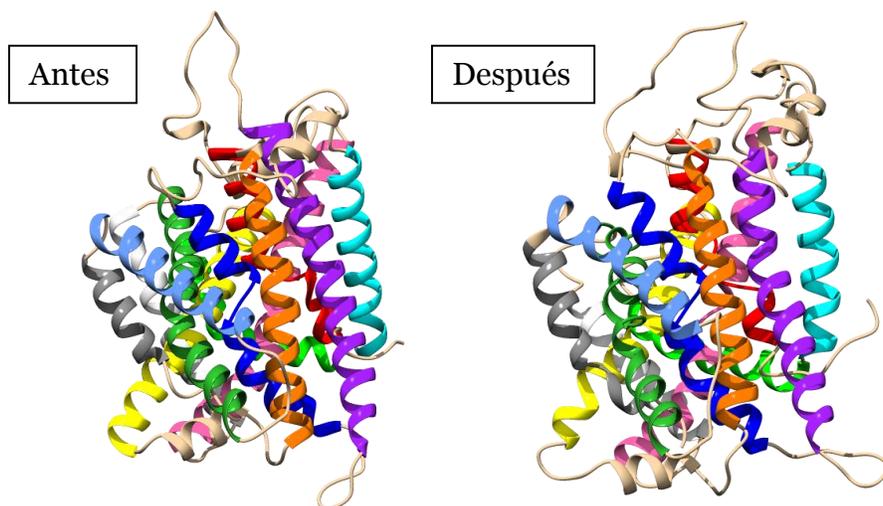


Figura 5.20 – Estructura Modelo 23 antes y después de la dinámica.

Aquí se puede ver que la estructura se mantuvo a nivel global, pero se observan algunas variaciones en las posiciones de los sectores TM9, TM10 y TM11, representados en gris claro, verde oscuro y celeste, respectivamente. Adicionalmente, se aprecia un desplazamiento de los coils que unen las hélices, dando por resultado una estructura menos compacta, obteniéndose un RMSD de 2.34, lo cual se puede apreciar en la Figura 5.20.

Finalmente, en la Figura 5.21 se presenta el sistema completo antes y después de la dinámica, sin el solvente y los iones, para permitir visualizar mejor el sistema membrana-proteína.

En la Figura 5.21 se observa que el sistema proteína-membrana se mantuvo estable a lo largo de la simulación, presentando una conformación bastante compacta antes de la dinámica y una más relajada al final de ésta, lo cual se asemeja más a la realidad. El RMSD promedio de los lípidos de la membrana fue de 26.65 Angstrom.

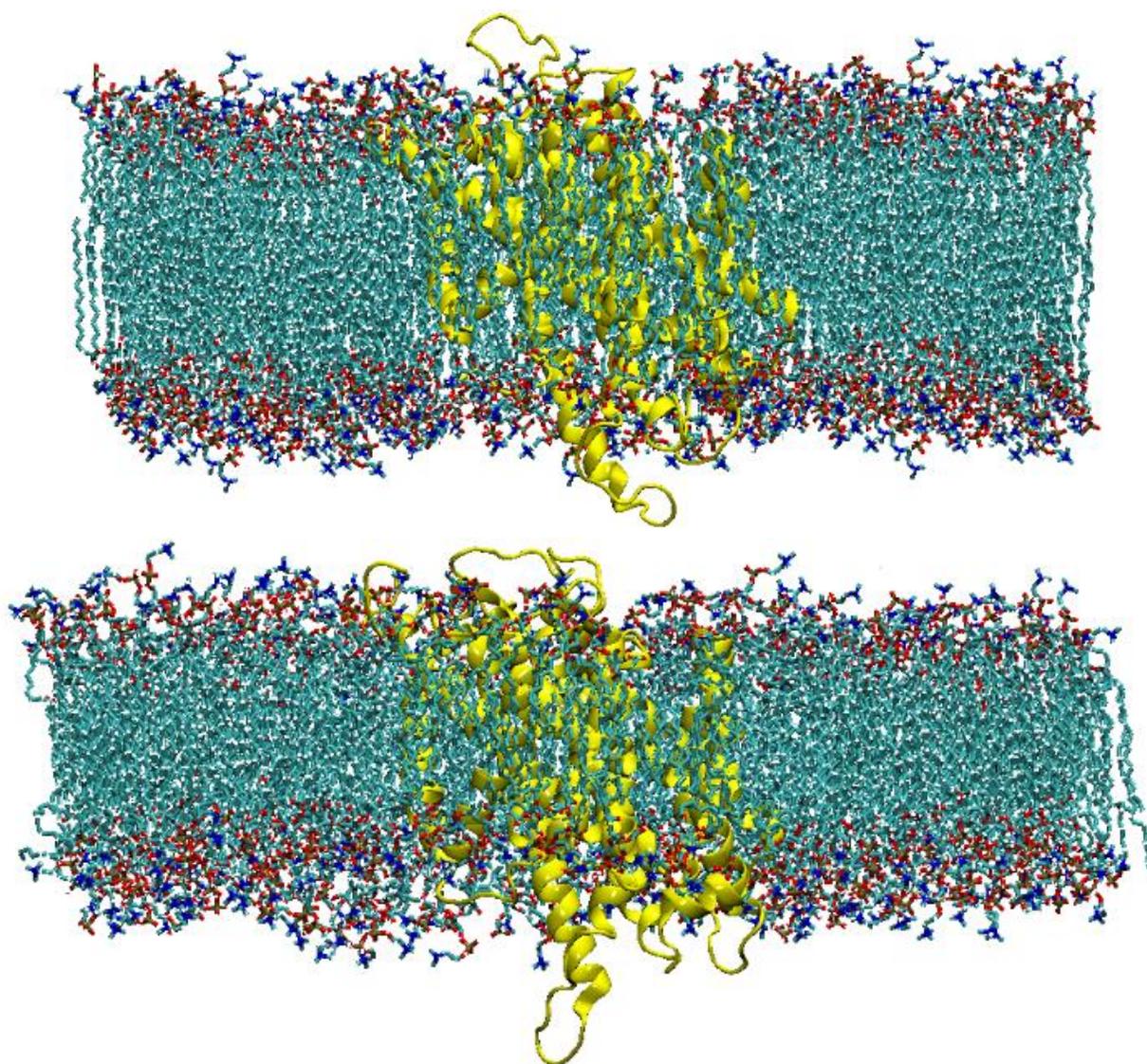


Figura 5.21 – Sistema membrana-proteína antes y después de la dinámica.

5.3.2. Análisis en Detalle

Dado que los resultados preliminares indican que la dinámica se realizó de manera adecuada, se procedió a realizar análisis más detallados del sistema, a partir de los cuales se puede obtener información valiosa respecto a la estructura y funcionamiento de la proteína.

5.3.2.1. Perfil RMSF por Residuo

En primer lugar se llevó a cabo un análisis de RMSF por residuo, el cual permite establecer el nivel de movimiento de cada residuo dentro de la estructura, pudiendo identificar así aquellos sectores con mayor movilidad y aquellos más estables.

En la Figura 5.22 se muestra el perfil RMSF por residuo a pH 7.4 para el modelo y el cristal, mientras que en la Figura 5.23 se muestra el mismo resultado a pH 5.5.

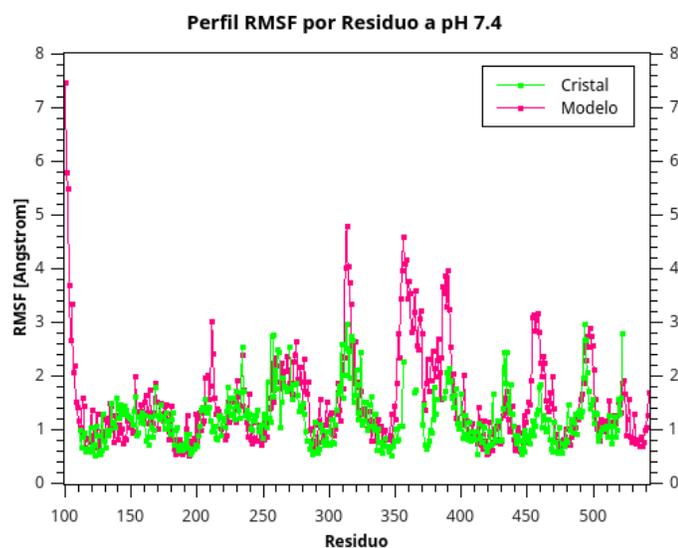


Figura 5.22 – Perfil RMSF a pH 7.4. En rosado se presenta el RMSF del Modelo 23 y en verde del cristal de ScaDMT.

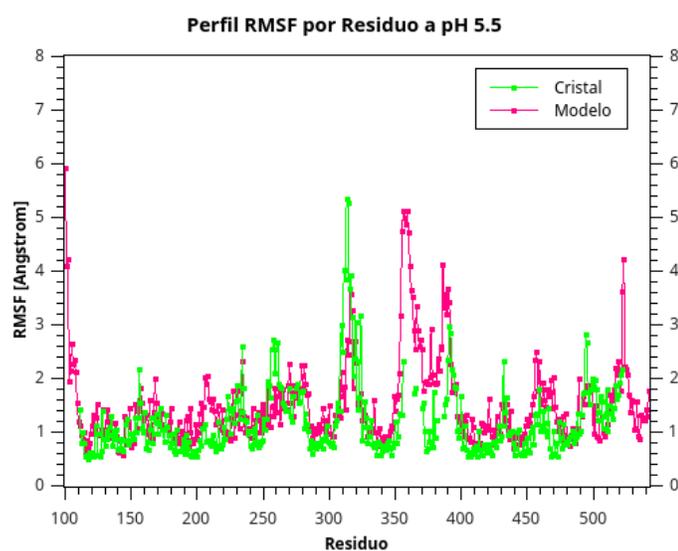


Figura 5.23 – Perfil RMSF a pH 5.5. En rosado se presenta el RMSF del Modelo 23 y en verde del cristal de ScaDMT.

En ambos casos se muestran los residuos de acuerdo al alineamiento entre el cristal de la familia Nramp, ScaDMT, y el núcleo de DMT1, por lo que se presentan algunos gaps en los gráficos, los cuales se encuentran en el alineamiento utilizado para generar los modelos. Así, se puede tener una idea de cómo afectaron estos gaps en el modelo obtenido.

A partir de los resultados presentados en las Figuras 5.22 y 5.23, se observa que las diferencias obtenidas entre el modelo y el cristal son pocas en ambos casos. La mayor diferencia se presenta entre los residuos 350 y 400, donde se encuentran gaps en el alineamiento entre DMT1 y el cristal de ScaDMT. Por otro lado, otros sectores interesantes a estudiar se encuentran alrededor de los residuos 210, 320, 460 y 520.

En la Figura 5.24 se destacan estos sectores con mayor movilidad dentro de la estructura del Modelo 23, para así establecer de mejor manera su localización dentro de la estructura de la proteína.

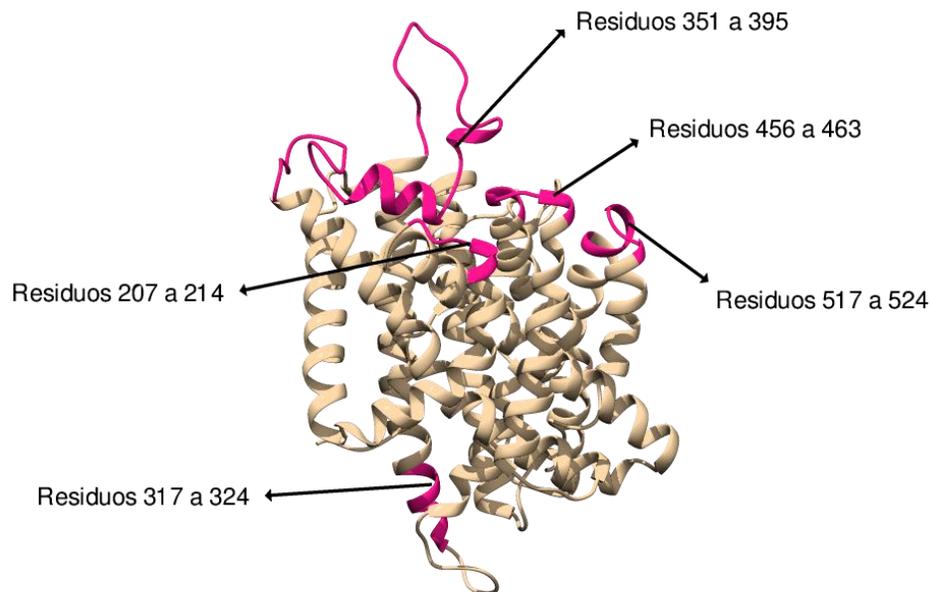


Figura 5.24 – Sectores con mayor RMSF.

La Figura 5.24 permite establecer que los sectores que presentan mayor movilidad dentro de la estructura se encuentran formando parte de loops que unen sectores transmembrana, la mayoría de ellos ubicados en el extremo extracelular. Los loops identificados corresponden a aquellos entre los dominios TM3 y TM4, TM6 y TM7, TM7 y TM8 (el más extenso de todos), TM9 y TM10, y TM11 y TM12.

Por otra parte, se observan diferencias en algunos sectores dependiendo del pH al que se encuentran expuestos. El sector alrededor del residuo 210 (entre dominios TM3 y TM4) posee un mayor RMSF a pH 7.4 tanto para el modelo como para el cristal. En el sector cercano al residuo 320 (entre dominios TM6 y TM7) se aprecia un mayor RMSF en el modelo a pH 7.4 y un mayor RMSF en el cristal a pH 5.5. Finalmente, el RMSF al final de la estructura (entre dominios TM11 y TM12) es mayor a pH 5.5 para el modelo.

5.3.2.2. Análisis de Puentes Disulfuro

Luego, para analizar la posibilidad de formación de puentes disulfuro en el modelo de la proteína, se seleccionaron todas las cisteínas de la estructura inicial y visualmente se determinaron aquellos pares que podrían formar un puente.

A partir del análisis visual, se estableció que las cisteínas en las posiciones 175 y 178 se encontraban bastante cerca y además forman parte de uno de los loop más extensos de la proteína (ubicado entre los sectores TM5 y TM6), lo que les confiere cierta flexibilidad para poder formar el enlace, como se puede observar en la Figura 5.25.

Luego, se siguió la trayectoria de estas cisteínas durante toda la dinámica para establecer si los átomos de azufre de éstas se posicionaban frente a frente en algún momento, lo que implicaría la posibilidad de formación del enlace. Sin embargo, los azufres en ningún momento se encontraron uno frente al otro, al contrario, apuntaban en sentidos opuestos, lo que no permite proponer con certeza un enlace disulfuro en este sector, dado lo observado en la simulación. A pesar de lo anterior, no puede descartarse la

posibilidad de formación del enlace, debido a la flexibilidad de las estructuras asociadas a las cisteínas.

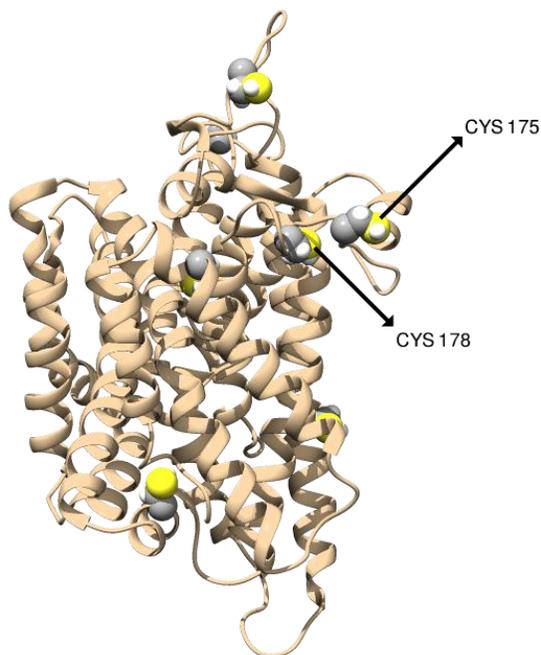


Figura 5.25 – Análisis cisteínas. Estructura tridimensional del Modelo 23 con todas sus cisteínas identificadas. Adicionalmente, se señalan las Cys175 y Cys178 como candidatas a formar un puente disulfuro.

5.3.2.3. Análisis de Modos Normales

A continuación, se analizaron los principales modos normales de la proteína de interés, ya que éstos permiten identificar los distintos movimientos que presenta la estructura, los cuales pueden tener relación con la funcionalidad de la proteína. Para esto, se obtuvieron los 10 principales modos normales del Modelo 23 de la proteína DMT1 humana utilizando Gromacs y se observó el movimiento de cada uno de ellos mediante la extensión de ProDy, Normal Mode Wizard, en VMD. Sin embargo, tan solo se analizaron los primeros 2 modos, debido a que los siguientes no presentaban grandes diferencias con los 2 primeros.

En las Figuras 5.26, 5.27 y 5.28 se muestran la vista lateral, superior e inferior, respectivamente, del primer modo normal de la proteína.

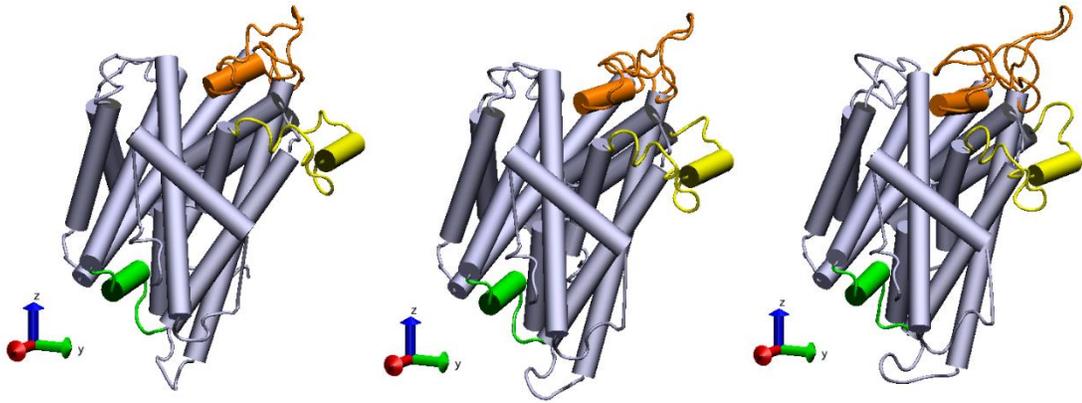


Figura 5.26 – Modo Normal 1 vista lateral. Se destaca el movimiento presentado por el loop ubicado entre los dominios TM2 y TM3 (verde), el loop entre los dominios TM5 y TM6 (amarillo) y el loop entre los dominios TM7 y TM8 (naranja).

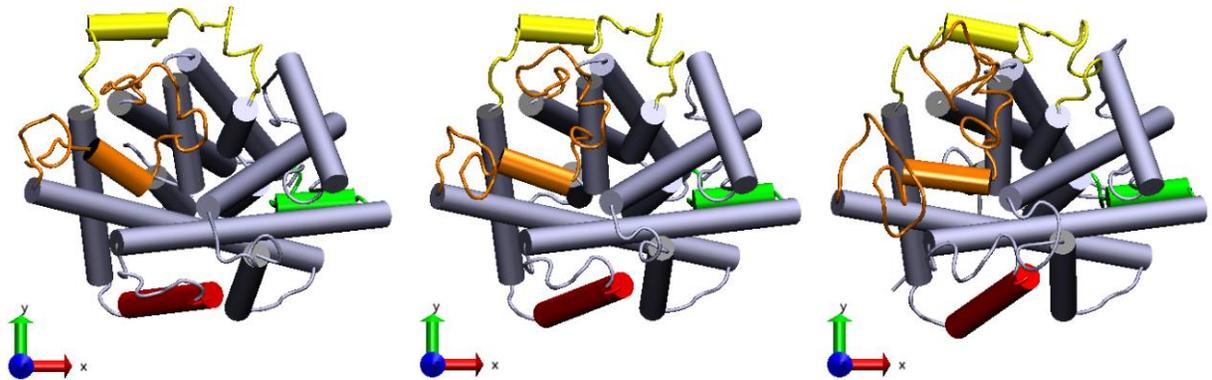


Figura 5.27 – Modo Normal 1 vista superior. Se destaca el movimiento presentado por el loop ubicado entre los dominios TM2 y TM3 (verde), el loop entre los dominios TM5 y TM6 (amarillo) y el loop entre los dominios TM7 y TM8 (naranja). Adicionalmente, se marca en rojo el dominio TM4, el cual presenta un movimiento interesante.

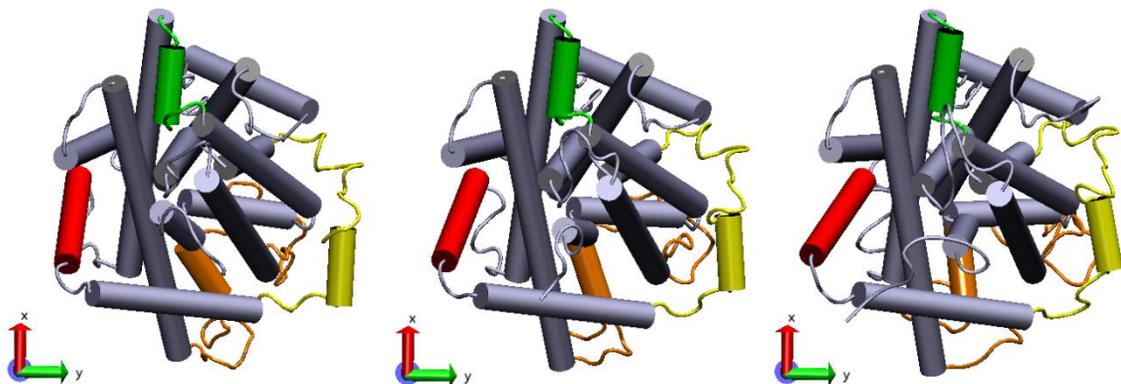
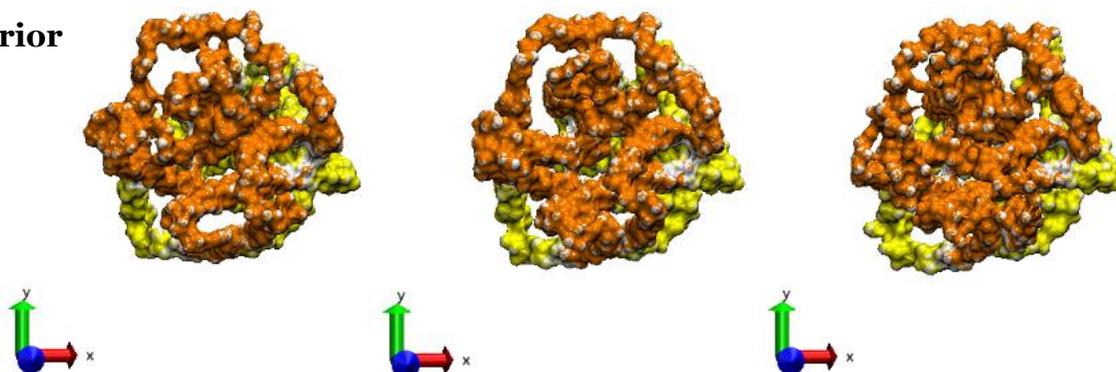


Figura 5.28 – Modo Normal 1 vista inferior. Se destaca el movimiento presentado por el loop ubicado entre los dominios TM2 y TM3 (verde), el loop entre los dominios TM5 y TM6 (amarillo) y el loop entre los dominios TM7 y TM8 (naranja). Adicionalmente, se marca en rojo el dominio TM4, el cual presenta un movimiento interesante.

Adicionalmente, en la Figura 5.29 se presenta el modo normal 1 con vistas superior e inferior, presentando la superficie de la proteína, para así tener una visión del movimiento global de la estructura. Además, se colorearon los residuos de la parte superior en naranja y los de la parte inferior en amarillo, para así distinguir sus movimientos.

Vista Superior



Vista Inferior

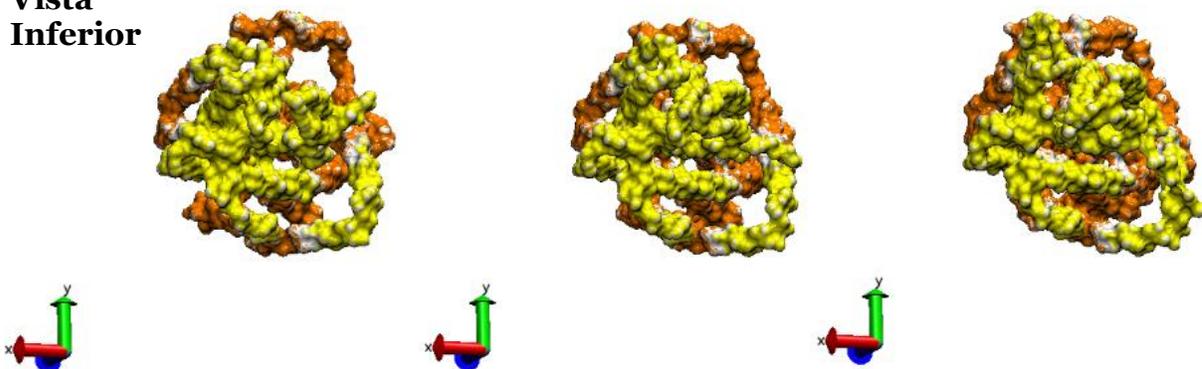


Figura 5.29 – Superficie Modo Normal 1. Vistas superior e inferior del modo normal 1 presentando la superficie de la proteína. En naranja se destacan los residuos de la parte superior de la proteína (apuntando hacia el medio extracelular) y en amarillos los presentes en la parte inferior (apuntando hacia el citoplasma).

Por otra parte, en las Figuras 5.30, 5.31 y 5.32 se presentan las vistas lateral, superior e inferior, respectivamente, del segundo modo normal identificado en la proteína.

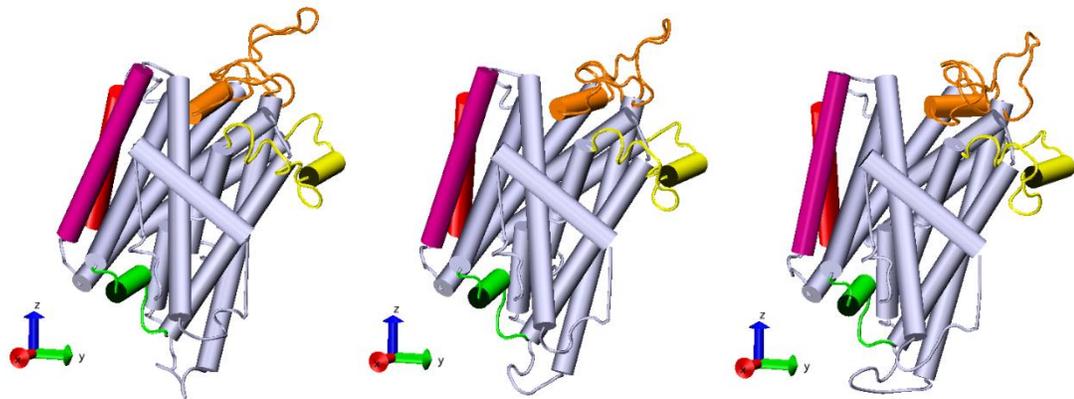


Figura 5.30 – Modo Normal 2 vista lateral. Se destaca el movimiento presentado por el loop ubicado entre los dominios TM2 y TM3 (verde), el loop entre los dominios TM5 y TM6 (amarillo) y el loop entre los dominios TM7 y TM8 (naranja). Adicionalmente, se marca en rojo y en morado el dominio TM4 y TM9, los cuales presentan un movimiento interesante.

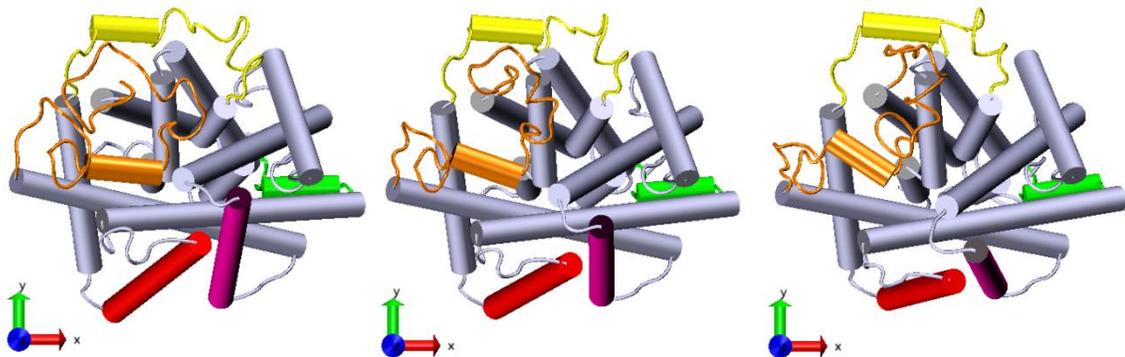


Figura 5.31 – Modo Normal 2 vista superior. Se destaca el movimiento presentado por el loop ubicado entre los dominios TM2 y TM3 (verde), el loop entre los dominios TM5 y TM6 (amarillo) y el loop entre los dominios TM7 y TM8 (naranja). Adicionalmente, se marca en rojo y en morado el dominio TM4 y TM9, los cuales presentan un movimiento interesante.

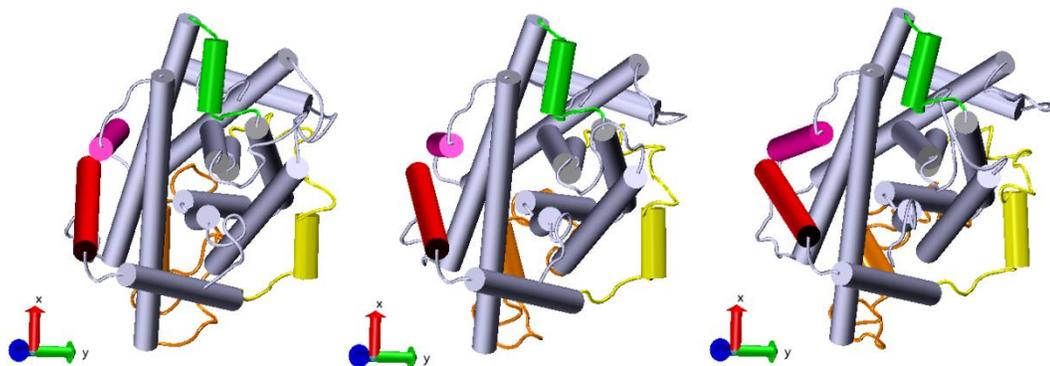
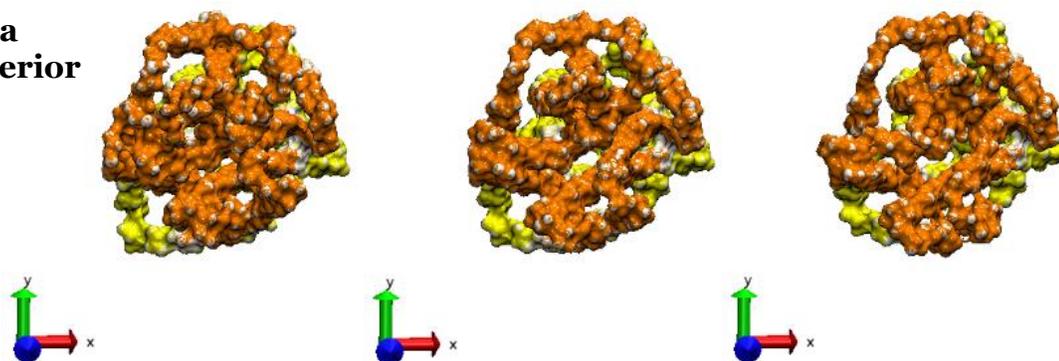


Figura 5.32 – Modo Normal 2 vista inferior. Se destaca el movimiento presentado por el loop ubicado entre los dominios TM2 y TM3 (verde), el loop entre los dominios TM5 y TM6 (amarillo) y el loop entre los dominios TM7 y TM8 (naranja). Adicionalmente, se marca en rojo y en morado el dominio TM4 y TM9, los cuales presentan un movimiento interesante.

Además, en la Figura 5.33 se presenta el segundo modo normal con vistas superior y lateral, presentando la superficie de la proteína, para así tener una visión del movimiento global de la estructura. Además, se colorearon los residuos de la parte superior en naranja y los de la parte inferior en amarillo, para así distinguir sus movimientos.

Vista Superior



Vista Lateral

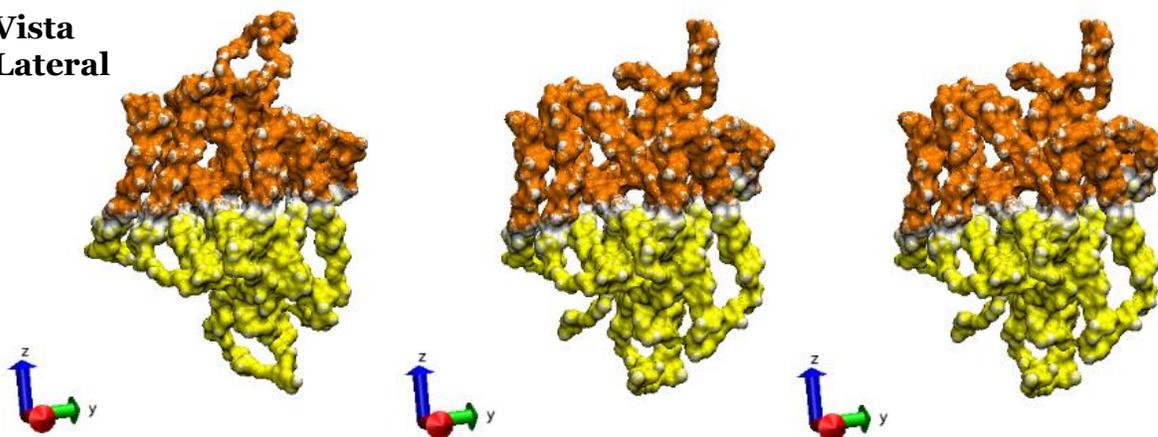


Figura 5.33 – Superficie Modo Normal 2. Vistas superior y lateral del modo normal 2 presentando la superficie de la proteína. En naranja se destacan los residuos de la parte superior de la proteína (apuntando hacia el medio extracelular) y en amarillos los presentes en la parte inferior (apuntando hacia el citoplasma).

A partir de los resultados anteriores, se puede establecer que los principales movimientos de la estructura se presentan en los loop más extensos de la proteína, como se puede ver en las Figuras 5.26 y 5.30, y que el movimiento de éstos provoca pequeñas variaciones en el posicionamiento de las hélices transmembrana, abriendo y cerrando levemente la estructura de la proteína en algunos sectores de la estructura, como se aprecia en las Figuras 5.29 y 5.33, donde se presenta la proteína con representación de su superficie.

Por otro lado, el primer modo normal presenta un movimiento de cierre en la parte superior de la proteína, mientras que en la parte inferior presenta una apertura de la estructura, y viceversa, lo cual se puede ver claramente en la Figura 5.27. En cambio, en el segundo modo normal se observa un ensanche y posterior angostamiento global de la estructura, como se puede ver en la Figura 5.33.

5.3.2.4. Análisis del pH y Potencial Electroestático

Posteriormente, para analizar la influencia del pH en las zonas expuestas al lumen del intestino y al citoplasma de los enterocitos, se calculó el potencial electrostático en la superficie del Modelo 23 en frames diferentes para ambos pH. En la Figura 5.34 se presenta el resultado obtenido para la parte superior de la proteína en el primer y último

frame de producción de la dinámica, expuesta al lumen del intestino, y en la Figura 5.35 para la parte inferior de la proteína, expuesta al citoplasma de los enterocitos.

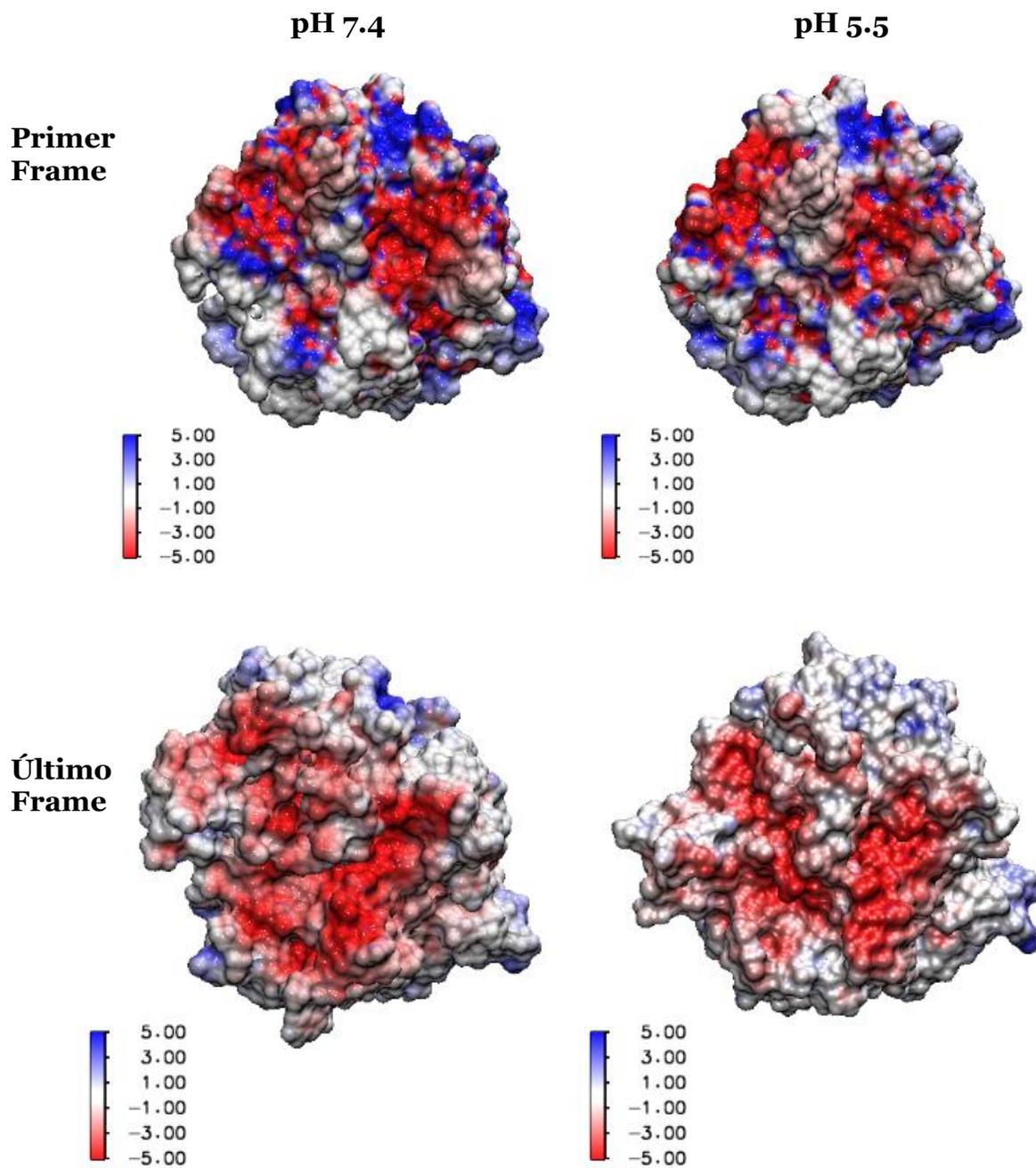


Figura 5.34 – Potencial electrostático superior. Potencial electrostático de los residuos expuestos al lumen del intestino. A la izquierda los resultados a pH 7.4 y a la derecha a pH 5.5. En la parte superior se muestra el potencial del primer frame de la dinámica y abajo el potencial del último frame.

En la Figura 5.34 se observa que el sector expuesto al lumen del intestino al comienzo de la dinámica posee un potencial bastante negativo, principalmente en el centro de la estructura, con algunos pequeños sectores positivos. Luego, al final de la simulación, la mayor parte de las cargas positivas se han redistribuido, presentando un potencial negativo, pero con menor intensidad que el presentado al inicio de la dinámica.

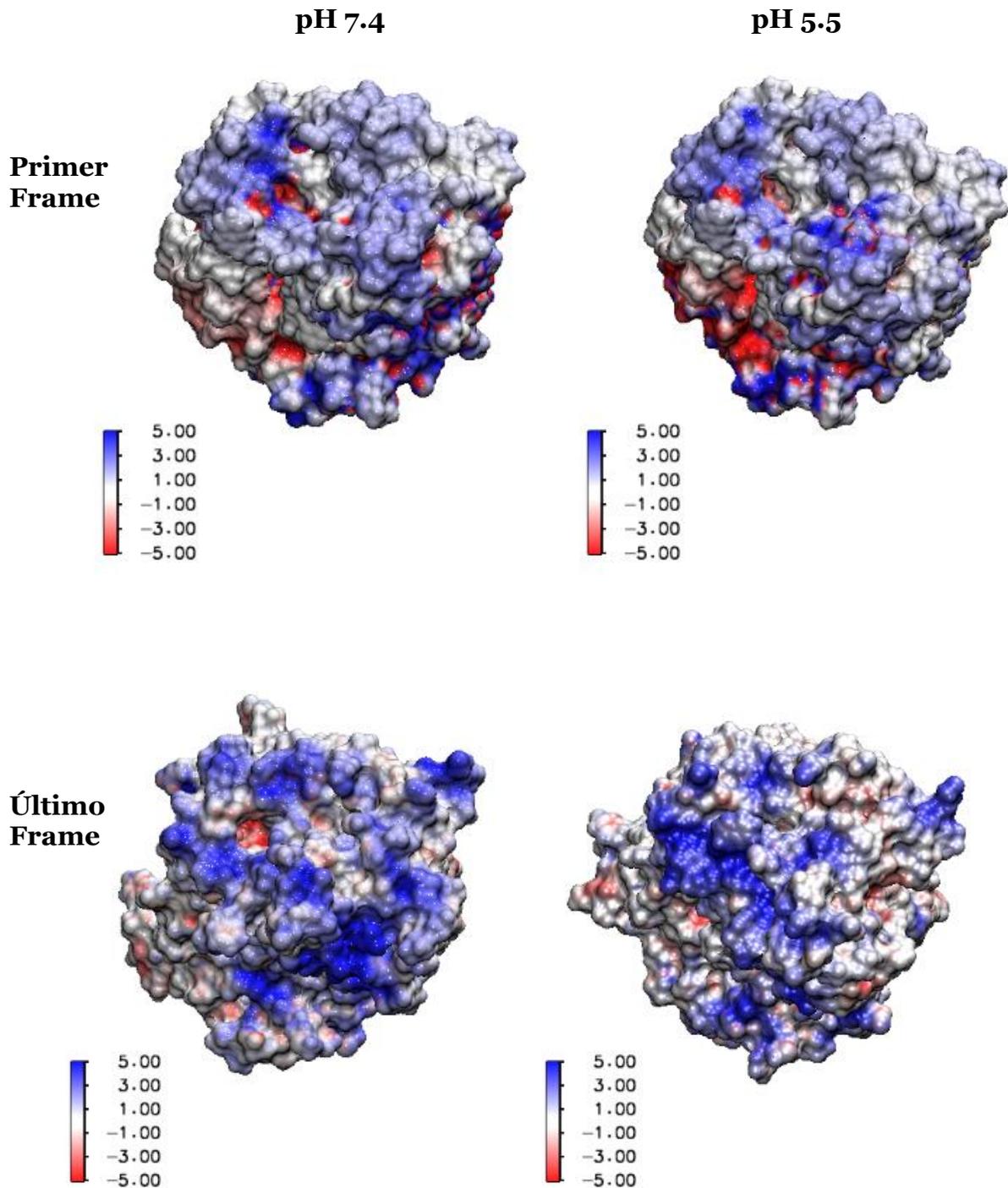


Figura 5.35 – Potencial electrostático inferior. Potencial electrostático de los residuos expuestos al citoplasma de los enterocitos. A la izquierda los resultados a pH 7.4 y a la derecha a pH 5.5. En la parte superior se muestra el potencial del primer frame de la dinámica y abajo el potencial del último frame.

Por otro lado, en la Figura 5.35 se observa que el sector que apunta hacia el interior de los enterocitos, en el primer frame se observa un potencial principalmente positivo con algunos pequeños sectores cargados negativamente, mientras que en el último frame se aprecia un potencial principalmente positivo y con mayor intensidad que aquel expuesto al comienzo de la simulación.

5.3.2.5. Análisis del Ion de Hierro y Residuos Colindantes

Luego, para determinar aquellos residuos que podrían interactuar con el ion de hierro en el sector donde fue insertado, en VMD se seleccionaron aquellos residuos que se encontraban a lo más a 5 Angstrom de distancia del ion, a lo largo de la dinámica. Sin embargo, al hacer zoom en este sector, se observó que el átomo de hierro se encontraba unido a un residuo de la proteína, lo cual no correspondía a la posición inicial establecida antes de la simulación, y evidentemente no representa la realidad, por lo que no se pudo llevar a cabo el análisis deseado.

Este problema se debió a que el ion de hierro no-hémico no se encontraba dentro del campo de fuerzas utilizado para llevar a cabo la dinámica, por lo que se ingresó manualmente sus parámetros. Sin embargo, ya que el hierro no se encontraba unido a la estructura proteica, se debía especificar en el campo de fuerzas las interacciones que mantenían a este ion de hierro dentro de la estructura. Dado que estos datos no fueron especificados en el campo de fuerzas, el programa automáticamente une el ion libre con el residuo más cercano a éste con el cual presente atracción.

Es importante señalar que este problema también lo presentó el ion de manganeso dentro de la estructura del cristal, dado que al igual que el hierro, el manganeso divalente no se encontraba parametrizado en el campo de fuerzas, por lo que también fue ingresado manualmente sin especificar las interacciones con los residuos. De esta manera, tampoco se pudo realizar comparaciones respecto al movimiento que presentaron los iones de hierro y manganeso, ya que no se encuentran bien localizados en el sistema.

Ahora, puesto que el objetivo principal de este análisis era establecer posibles residuos interactuantes con hierro a lo largo de la dinámica, el fijar las interacciones de éste con ciertos residuos limita este estudio, ya que las interacciones restringirían el movimiento del ion. Por esta razón, se decidió hacer el análisis sólo para la estructura original.

Dado lo anterior, se realizó el análisis de los residuos colindantes con el ion de hierro utilizando la estructura inicial, antes de comenzar la dinámica, donde no se presenta el problema detectado. Así, en la Figura 5.36 se presentan los residuos que se encuentran dentro de un radio de 5 Angstrom del ion de hierro insertado en la estructura. Aquí se puede ver que las hélices que se encuentran más cercanas al ion son las de los dominios TM1 y TM6, como era de esperarse, debido a que es en esta posición donde se encontraba posicionado el ion de manganeso en la estructura tridimensional de ScaDMT.

En la Figura 5.36 se observa que a partir de la selección de aquellos residuos que se encuentran dentro de un radio de 5 Angstrom del ion de hierro, se tienen 8 candidatos para interactuar con éste: Ile111, Ala112, Asp115, Asn118, Ala291, Val292, Met294 y Asn297, los cuales se encuentran ubicados en los dominios TM1 y TM6, alrededor del área donde se encuentra el loop en el centro de las hélices.

Además, es importante señalar que los 4 residuos presentados en la Figura 4.1 se encuentran entre los 8 residuos identificados en la Figura 5.36, los cuales son: Asp115, Asn118, Ala291 y Met294. Esto quiere decir que los residuos que se encuentran interactuando con manganeso en la estructura cristalina se mantienen totalmente

invariantes en la estructura de DMT1. Dado esto, se podría establecer que estos 4 residuos son los principales candidatos a interactuar con el ion de hierro, dado que se observó su interacción en el cristal de ScaDMT con un ion de manganeso.

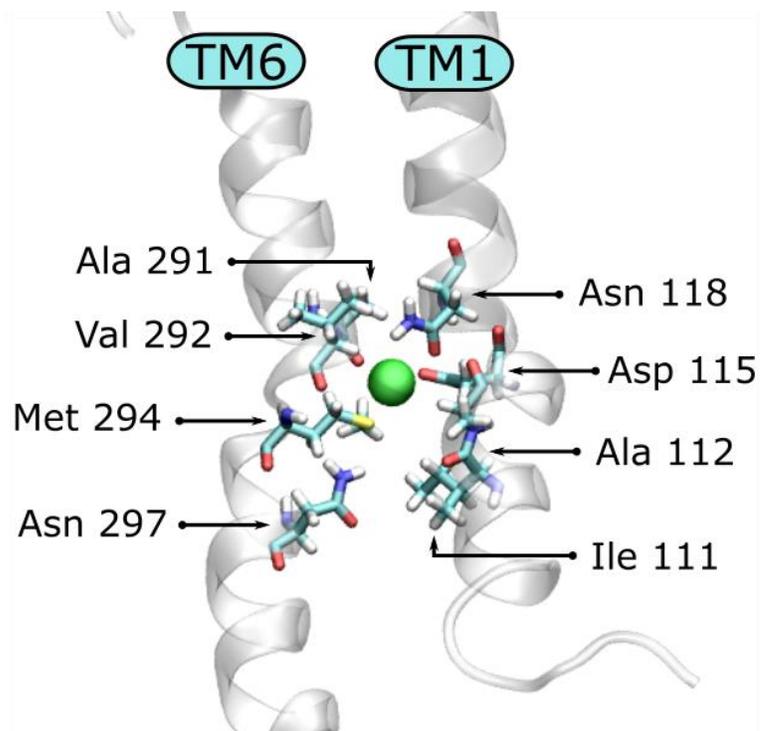


Figura 5.36 – Residuos cercanos a hierro.

5.3.2.6. Análisis del Movimiento de Agua

Finalmente, para llevar a cabo el análisis de un posible rol del agua en el transporte de hierro, se observó el movimiento de ésta a lo largo de la dinámica, en un radio de 5 Angstrom del ion de hierro.

En la Figura 5.37 se presenta el resultado obtenido para 3 frames de la dinámica, al inicio, al medio y al final de la simulación, para observar la evolución del movimiento de agua alrededor del ion de hierro a lo largo de la dinámica. Adicionalmente, en el Anexo 5 se muestran más frames del seguimiento de las moléculas de agua en la simulación.

Aquí se observa que la proteína comienza sin moléculas de agua alrededor del ion de hierro, pero a medida que avanza la simulación distintas moléculas de agua van ingresando a este sector de la proteína, donde las moléculas más cercanas a hierro se encuentran apuntando sus átomos de oxígeno hacia el ion cargado positivamente. Por otro lado, se observa interacción entre las aguas mediante puentes de hidrógeno.

La cantidad de moléculas de agua interaccionando con hierro a lo largo de la simulación va variando, y se observa que algunas de ellas se mantienen en posiciones similares, lo cual se puede ver en las imágenes del Anexo 5, en donde se presenta el mismo resultado pero para una mayor cantidad de frames.

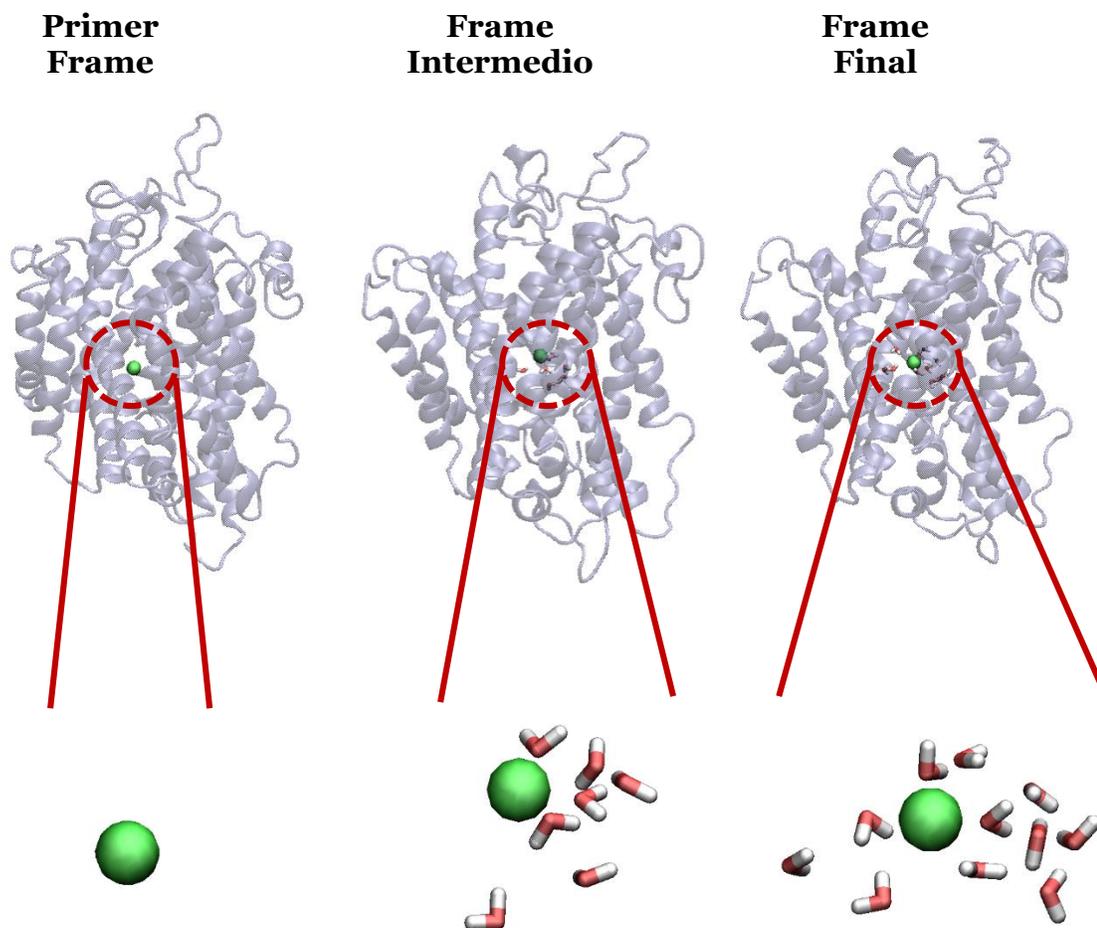


Figura 5.37 – Análisis movimiento de agua.

Finalmente, se seleccionaron algunas moléculas de agua que ingresaban al interior de la proteína durante la dinámica y se siguió su trayectoria a lo largo de ésta para así detectar la cavidad por la cual ingresan a la estructura. En la Figura 5.38 se muestran algunos frames a lo largo de la simulación, en los cuales se puede ver por donde ingresan estas moléculas de agua a la proteína.

A partir del resultado expuesto en la Figura 5.38 se puede ver claramente que las moléculas de agua ingresan principalmente por el inferior de la proteína, en el sector donde se encuentran las hélices TM1 y TM6, marcadas en naranja y amarillo, respectivamente, en la figura.

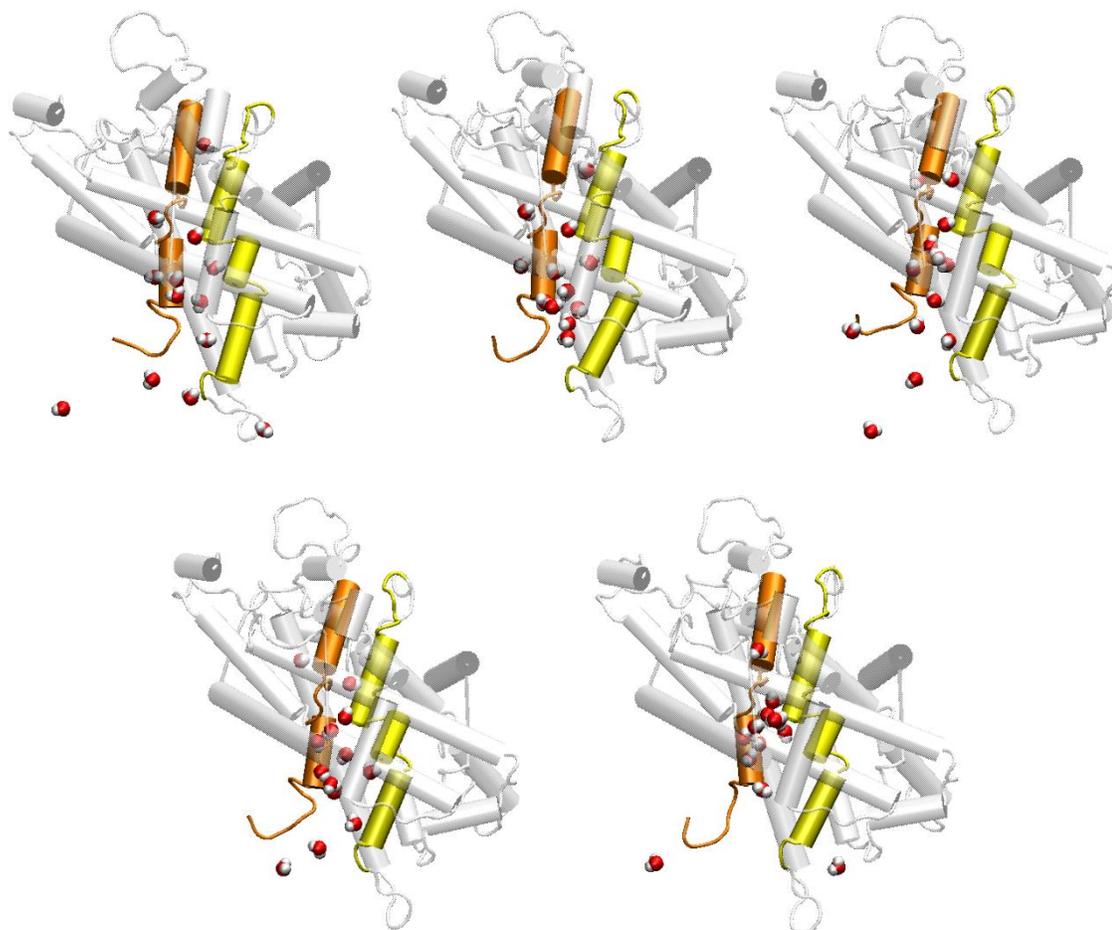


Figura 5.38 – Trayectoria moléculas de agua.

6. Discusión

6.1. Análisis Preliminar

6.1.1. Análisis de Secuencias en la Familia Nramp

A partir de los alineamientos múltiples presentados en el Anexo 1, se puede ver que el nivel de conservación y calidad del alineamiento es bastante mayor para las proteínas provenientes de mamífero que para el alineamiento de eucariontes, lo cual se ve reflejado en los resultados expuestos en la Tabla 5.1. El porcentaje de identidades en el alineamiento entre mamíferos es cercano al 45%, mientras que en el alineamiento de eucariontes no supera el 5%.

En primer lugar, podría pensarse que esto se debe a la reducción en el número de proteínas alineadas, lo cual disminuye la cantidad de diferencias en cada columna del alineamiento. Si bien esto es cierto, también se observa que disminuye considerablemente la cantidad de gaps dentro del alineamiento, reduciendo su extensión desde 750 a 574 (Ver Tabla 5.1), y además la distribución de las columnas de conservación y calidad se mantienen más estables a lo largo de éste, teniendo un puntaje promedio de 7.99 v/s 2.94 de un máximo de 11, lo cual no se justifica sólo con la disminución en la cantidad de secuencias alineadas.

Dado lo anterior, se cree que la principal razón de la mejora en la conservación y calidad del alineamiento es la localización de la proteína, ya que ésta difiere bastante entre plantas, hongos y mamíferos, debido a que pertenecen a distintos reinos de la naturaleza. De este modo, la proteína se encuentra presente en diferentes localizaciones dependiendo del tipo de organismo. En particular, DMT1 se localiza principalmente en el intestino delgado en mamíferos y en menor medida en otros órganos, lo cual podría justificar la considerable mejora en el alineamiento.

Por otra parte, en la Tabla 5.2 se observa que el nivel de conservación de 4 de los 5 aminoácidos que presentan mutaciones conocidas en DMT1 es bastante alto, 3 de los cuales se encuentran totalmente invariantes en el alineamiento de proteínas proveniente de mamíferos (Gly185, Glu399 y Arg416). En cambio, el residuo Val114, se presenta en sólo 3 de las 13 secuencias alineadas, sin embargo, el resto de las secuencias poseen un residuo de leucina en esta posición, la cual posee propiedades fisicoquímicas similares a valina, proporcionando así un alto puntaje de conservación en esta posición. Además, es importante señalar que aquellas secuencias que no presentan un residuo de valina en la posición de referencia 114, poseen una valina en el residuo inmediatamente anterior, obteniendo un alto puntaje de conservación en esta posición (113) (Ver alineamiento múltiple en Anexo 1.2).

A partir de lo anterior, se podría establecer que los aminoácidos reportados con mutaciones en DMT1 presentan una alta conservación en mamíferos, debido a su importancia en la función transportadora de la proteína, puesto que una mutación puntual en estos residuos provoca inmediatamente la pérdida de la funcionalidad de DMT1, causando distintas variedades de anemia. No obstante, es necesario un análisis con un mayor número de secuencias para confirmar esta suposición.

Finalmente, tal como se expone en bibliografía, el nivel de conservación dentro del núcleo estructural de las proteínas de la familia Nramp es mayor que en sus extremos amino y carboxilo terminales, donde se presenta bastante variabilidad de una proteína a otra, como se puede apreciar en ambos alineamientos múltiples expuestos en el Anexo 1.

6.1.2. Predicción de Dominios Transmembrana

La predicción de dominios transmembrana para la isoforma 1A/IRE(+) de la proteína DMT1 humana, presentada en la Figura 5.3, establece la presencia de 12 dominios transmembrana, 6 loops extracelulares, 5 loops intracelulares y los extremos amino y carboxilo terminales al interior del citoplasma de los enterocitos. Este resultado concuerda en su totalidad con lo expuesto en bibliografía.

Luego, al analizar la posición de los residuos que han sido reportados con mutaciones causantes de enfermedades relacionadas con la absorción de hierro, se observa que estos se encuentran en su mayoría posicionados en sectores al interior de la membrana, a diferencia de la mutación en el exón 12, la cual se presenta en la secuencia motivo (Ver Figura 5.3). Adicionalmente, las posiciones determinadas por el predictor de estos aminoácidos coinciden con lo expuesto en bibliografía.

Por otro lado, al observar en el Anexo 2 el tipo de aminoácidos presentes en los sectores transmembrana, se puede ver que la mayoría de ellos son apolares y se presentan 10 aminoácidos cargados, 3 positivos y 7 negativos. El carácter apolar de los residuos ubicados dentro de la membrana es de esperarse, ya que se trata de una región altamente hidrofóbica. Sin embargo, la presencia de residuos cargados no es común en esta región, y por tanto representan un punto interesante a estudiar en el futuro, ya que se sabe de proteínas de membrana que poseen aminoácidos cargados en membrana que juegan roles importantes en su funcionamiento [137–142].

6.2. Modelamiento Comparativo

6.2.1. Análisis y Selección de Moldes

Para obtener un modelo tridimensional de la isoforma 1A/IRE(+) de la proteína DMT1 humana, se utilizó la técnica de modelamiento comparativo, teniendo como molde principal a la proteína cristalizada ScaDMT, perteneciente a la familia Nramp. Como se aprecia en la Figura 5.4, la identidad entre este cristal y la proteína de interés es de un 38% y se obtuvo un 59% de positivos (aminoácidos que comparten propiedades fisicoquímicas similares) en su alineamiento, lo cual representa una buena base para llevar a cabo un modelamiento comparativo.

Por otro lado, los porcentajes de identidad entre DMT1 y los otros 2 moldes adicionales son un poco menores al obtenido con el molde principal, ScaDMT, sin embargo, dado que se trata de sectores pequeños localizados a los extremos del núcleo de la proteína, y que no existe evidencia bibliográfica que les confiera gran importancia a estos sectores para el funcionamiento de la proteína, no resulta significativo seleccionar moldes con un alto porcentaje de identidad en estas zonas.

Lo anterior resulta evidente para el dominio TM12, ya que la evidencia no establece una importancia de este sector para el transporte de la proteína, incluso no existiendo este dominio en proteínas de la misma familia que cumplen funciones similares e incluso iguales, como es el caso de ScaDMT. Sin embargo, se sabe que el dominio TM1 participa en la interacción con el ion, pero también se tiene conocimiento que el sector de este dominio que interactúa con el ion se encuentra presente en la estructura cristalizada de ScaDMT, y que la ausencia del trozo faltante de esta zona no afecta la funcionalidad de la proteína.

6.2.2. Modelos 3D

Los modelos tridimensionales de la proteína fueron obtenidos mediante modelamiento comparativo utilizando el software Modeller. Para esto se utilizó un alineamiento manual entre los 3 moldes seleccionados, expuesto en la Figura 5.8, de modo de ajustar cada plantilla en el sector de la proteína objetivo correspondiente y superponerlas de manera tal que la estructura completa sea continua, sin saltos y sin hélices fuera del núcleo de la estructura.

En la Tabla 5.3 se puede ver que la cobertura de las plantillas para su sector correspondiente es completa para el caso de los moldes de los extremos TM1 y TM12 y con la presencia de sólo 16 gaps en el alineamiento con el cristal de ScaDMT, presentes en su mayoría entre los residuos 360 y 380 de la secuencia completa de DMT1, como se aprecia en la Figura 5.4.

6.2.3. Análisis de los Mejores Modelos

A continuación, se seleccionaron los 10 mejores modelos según su puntaje DOPE, los cuales se presentan en la Tabla 5.4, dado que esta puntuación se basa en un potencial estadístico, el cual representa la energía libre de la estructura, de modo que mientras menor sea su puntaje DOPE, mejor es el modelo.

En la Tabla 5.4 se puede notar que las diferencias en el puntaje DOPE de los 10 mejores modelos no presentan grandes diferencias, sin embargo, a partir de los gráficos de Ramachandran expuestos en la Figura 5.7 y Anexo 3, se observan diferencias considerables en la calidad estructural de estos 10 modelos, lo cual se ve reflejado en la Tabla 5.5.

Al analizar los gráficos de Ramachandran, el punto más importante a considerar para la selección del mejor modelo es la cantidad de aminoácidos ubicados en zonas no favorables, dado que los átomos de éstos se encuentran formando ángulos no favorables, tensionando así la estructura de la proteína en la zona en la que se encuentran. Por lo tanto, es deseable no tener aminoácidos formando este tipo de ángulos, o bien tener la menor cantidad posible, en comparación al cristal que se tiene como referencia, que en este caso no posee ningún residuo fuera de las regiones permitidas.

Teniendo en consideración lo anterior, el Modelo 23 obtenido por modelamiento comparativo representa el mejor modelo entre los 10 seleccionados por su DOPE score, dado que presenta sólo 2 residuos en la región no favorable del gráfico de Ramachandran, mientras el resto de los modelos contienen 6 o más aminoácidos dentro de esta región

(Ver Tabla 5.5). Por esta razón, los siguientes análisis sólo fueron realizados para este modelo en particular, descartando los otros modelos, debido a sus problemas estructurales.

Luego, al observar los gráficos de Ramachandran del Modelo 23 y del cristal de ScaDMT, en la Figura 5.9, se detecta que los 2 aminoácidos del Modelo 23 que se encuentran en regiones desfavorables son Ala13 y Pro395, los cuales en la estructura completa corresponderían a los residuos 112 y 494, respectivamente. En la estructura tridimensional del modelo, la alanina se encuentra ubicada cercana a la mitad del sector TM1, mientras el residuo de prolina está ubicado al comienzo del loop intracelular entre el dominio TM10 y TM11, como se observa en la Figura 5.10.

La prolina se encuentra bastante cerca de su región permitida, presentando una leve tensión probablemente debida a su posicionamiento al comienzo del loop entre los dominios TM10 y TM11. Por otro lado, el residuo de alanina está bastante alejado de su sector permitido, lo cual podría deberse a la presencia de un pequeño loop en el centro del dominio TM1, heredado del cristal de ScaDMT, el cual puede estar tensionando los residuos en los extremos de las hélices que une. Además, el sector TM1 representa el final de la estructura modelada, lo que le confiere mayores grados de libertad a este sector, pudiendo afectar también al tensionamiento de este residuo.

Adicionalmente, la prolina que se encuentra fuera de su zona favorable alinea con una lisina en el cristal de ScaDMT, lo cual también pudo haber afectado a su posicionamiento, ya que se trata de aminoácidos con características fisicoquímicas diferentes. En cambio, la alanina alinea con un residuo de glicina en la estructura cristalizada de ScaDMT, que al igual que alanina es un aminoácido de tamaño pequeño y de carácter apolar, por lo que se puede inferir que la principal razón de su tensión se debe a su ubicación dentro de la estructura de la proteína.

Luego, en el análisis del z-score obtenido en el servidor ProSA, presentado en la Figura 5.11, se observa que el resultado obtenido para el cristal de la familia Nramp, ScaDMT, difiere bastante al obtenido por el Modelo 23. A pesar de esto, se aprecia que el puntaje obtenido por el modelo se encuentra dentro del rango de resultados obtenidos por proteínas cristalizadas, aunque cercano al borde de los puntajes obtenidos por proteínas cristalizadas. Esto representa un buen resultado para el modelo obtenido por modelamiento comparativo, ya que presenta un z-score comparable con aquellos obtenidos por proteínas cristalizadas de tamaño similar.

Por otro lado, a partir del análisis energético obtenido en el servidor ProSA, expuesto en la Figura 5.12, se puede ver que gran parte de los residuos del modelo presentan energía positiva, que por lo general resultan ser problemáticos en la estructura. Sin embargo, se trata de residuos levemente positivos y comparables con las energías obtenidas positivas presentes en el cristal, por lo tanto originadas por el molde.

Adicionalmente, se puede ver que las curvas de energía obtenidas por el Modelo 23 y ScaDMT siguen una tendencia similar a lo largo de su secuencia, pero el resultado para el modelo se encuentra levemente desplazado hacia arriba del punto cero. Este resultado era esperable, debido a que este cristal fue utilizado como principal molde de la proteína, cubriendo más del 90% del alineamiento.

Los sectores que presentan mayores energías dentro del modelo son los dominios TM4, TM7 y TM8, y el loop entre los dominios TM7 y TM8 (Ver Figura 6.1), siendo este último el con mayor energía. De este modo, la zona comprendida entre el dominio TM7 y el TM8 es el sector con mayor energía dentro de la estructura, como se aprecia en la Figura 6.1, lo que puede deberse a que el loop comprendido entre estos sectores es el más extenso dentro de la estructura, lo cual le confiere mayor movilidad a esta zona, aumentando así la energía del sector. Por otra parte, el dominio TM4 presenta energías positivas, pero es comparable con la energía que presenta el cristal de la familia, por lo que se trata de un comportamiento heredado de la plantilla.

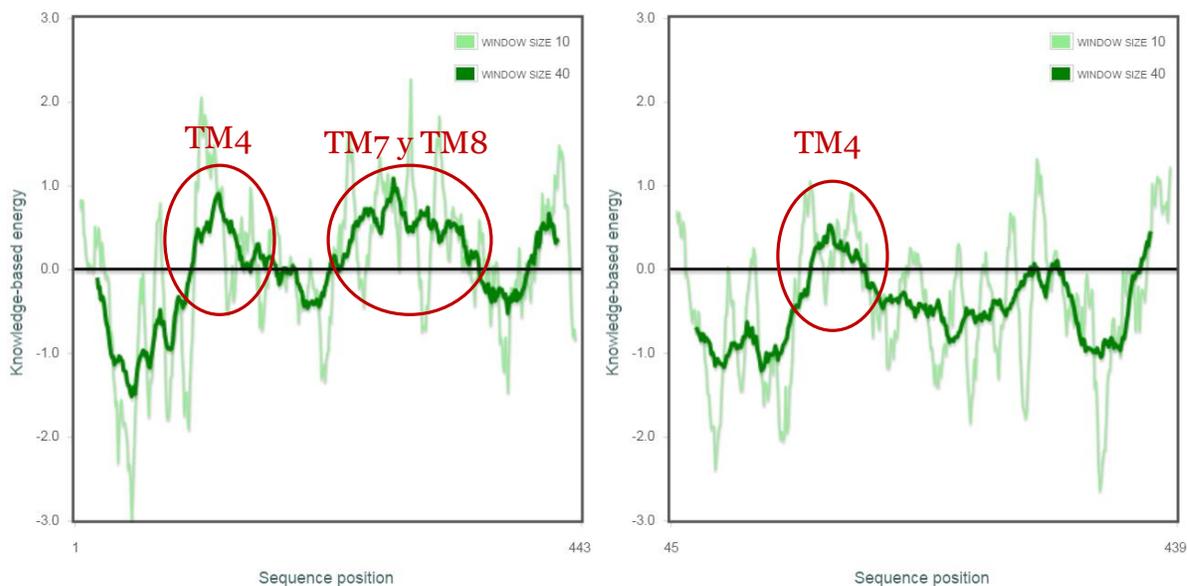


Figura 6.1 – Sectores con mayor energía por residuo.

Por otra parte, en la Figura 5.13 se observa que tanto los residuos que presentan mutaciones conocidas como las histidinas conservadas se encuentran en posiciones bastante similares dentro de la estructura, a pesar de la diferencia en la numeración. Sin embargo, existe una diferencia en el residuo Val143, proveniente de la mutación del Val114, donde se observa la presencia de una alanina en vez de una valina en el cristal de ScaDMT.

La diferencia en el residuo de Val143 no representa una diferencia significativa, dado que tanto la valina como la alanina son residuos de tamaño pequeño de carácter apolar, por lo cual sus características fisicoquímicas son comparables.

Finalmente, en la Figura 5.14 se puede ver que la estructura tridimensional del modelo obtenido para DMT1 es bastante similar estructuralmente al cristal ScaDMT, presentando un RMSD de 0.372 entre ambas estructuras, lo cual era de esperarse, debido a que este cristal aportó más de un 90% para el modelamiento comparativo. De este modo, la estructura del Modelo 23 presenta las mismas características importantes detectadas en el cristal, esto es, las primeras 5 alfa-hélices están estructuralmente relacionadas con las siguientes 5 hélices y tanto la primera como la sexta hélice transmembrana se desenrollan en el centro de ésta, como se pudo ver en la Figura 3.7. Además, se conservan las largas hélices de los dominios TM2, TM3, TM7 y TM8, coloreados en naranja, amarillo,

morado y rosado, respectivamente, y también se mantiene la formación de un codo entre los dominios TM4 y TM5, coloreados en verde claro y calipso, respectivamente.

6.3. Dinámica Molecular

6.3.1. Análisis Preliminares

Antes de llevar a cabo cualquier análisis detallado, se desarrollaron una serie de análisis preliminares que permiten establecer que las dinámicas se llevaron a cabo exitosamente, y adicionalmente determinar el momento en que el sistema se encuentra en estado estacionario y a partir del cual se pueden tomar mediciones.

A partir del perfil RMSD obtenido por la proteína y el modelo tanto a pH 7.4 como a pH 5.5, presentados en las Figuras 5.15 y 5.16, respectivamente, se puede ver que los sistemas alcanzaron el estado estacionario entre el segundo y tercer nanosegundo de la simulación, por tanto, se concluye que el período de producción de la dinámica parte en el tercer nanosegundo, obteniéndose así 17 ns en esta etapa.

Además, se observa que a ambos pH el cristal presentó una menor desviación en el tiempo que el Modelo 23, lo cual era de esperarse, dado que se trata de una estructura cristalizada. En cambio, el modelo fue obtenido por modelamiento comparativo, y por tanto su estructura puede ser optimizada para alcanzar valores cercanos a cualquier cristal.

Por otro lado, se pudo observar que la diferencia en el RMSD entre el cristal y el modelo fue mayor a pH 7.4 que a pH 5.5. A este último pH se observa un constante aumento en el RMSD tanto del modelo como del cristal, a pesar de haber alcanzado un cierto equilibrio. Esto puede deberse a que el pH 7.4 se acerca mucho más a la realidad a la cual se encuentran expuestos la mayor parte de los residuos de la proteína, ya que sólo los aminoácidos presentes en el sector extracelular se encuentran a pH 5.5, y un pH 7.4 es más adecuado para los residuos presentes en membrana, debido a la hidrofobicidad de este sector. A pH fisiológico la protonación de la mayoría de los aminoácidos es neutra, lo que es deseable para residuos dentro de la membrana celular.

Adicionalmente, junto con los resultados expuestos en el Anexo 4, se puede decir que las 4 dinámicas se llevaron a cabo de manera exitosa, manteniendo estables las condiciones básicas de energía, temperatura, presión y volumen, como es de esperarse para un sistema que alcanza el estado estacionario. Además, es importante destacar que tanto las mediciones de temperatura como presión presentan bastantes oscilaciones a lo largo del tiempo, lo cual suele ocurrir en las dinámicas. Sin embargo, sus valores promedio convergen a los valores establecidos para la dinámica, esto es, 310 K de temperatura y 1 bar de presión.

Luego, al comparar el gráfico de Ramachandran del modelo antes y después de la dinámica, presentados en las Figuras 5.17 y 5.9, respectivamente, se puede ver que aumentó la cantidad de residuos dentro de zonas no permitidas. Sin embargo, los residuos que se encuentran dentro de estas zonas (Pro6, Ser176, Lys255, Gly273 y Cys295) están bastante cerca de su zona permitida, a diferencia de Ala13 en la estructura del modelo previo a la simulación, la cual se encontraba muy alejada de su región permitida.

Dado lo anterior, se observa una mejora respecto al aminoácido que se encontraba bastante tensionado en la estructura previa a la dinámica. Sin embargo, aumentó el número de residuos que se encuentran en sectores no favorables para su estructura, pero dada la cercanía de éstos a su región permitida, se podría decir que existe una mejora estructural en el modelo. Dado lo anterior, se propone realizar una dinámica más extensa para observar si la calidad estructural del modelo puede ser optimizada al aumentar el tiempo de la simulación, permitiendo que los residuos levemente tensionados se acomoden mejor en la estructura.

Por otra parte, el z-score obtenido para el Modelo 23 una vez terminada la dinámica fue de -5.21 (Ver Figura 5.18), menor al valor obtenido antes de la simulación, el cual fue de -4.3 (Ver Figura 5.11). Esto representa una mejora del modelo respecto a la estructura inicial, la cual se encontraba más alejada de la densidad de puntos de los z-score obtenidos por estructuras cristalizadas.

A continuación, a partir de la Figura 6.2 se puede decir que la estructura del modelo mejoró energéticamente después de la dinámica, pues presenta menos residuos con energías positivas (Ver Figura 5.19) y su perfil energético se asemeja más al obtenido por el cristal de ScaDMT (Ver Figura 5.12). Sin embargo, el sector comprendido entre los dominios TM7 y TM8 aún posee energías positivas, lo que no se aprecia en el cristal de ScaDMT, por tanto, este sector requiere un mayor estudio y tal vez la realización de una dinámica más prolongada podría ayudar a disminuir la energía de esta zona.

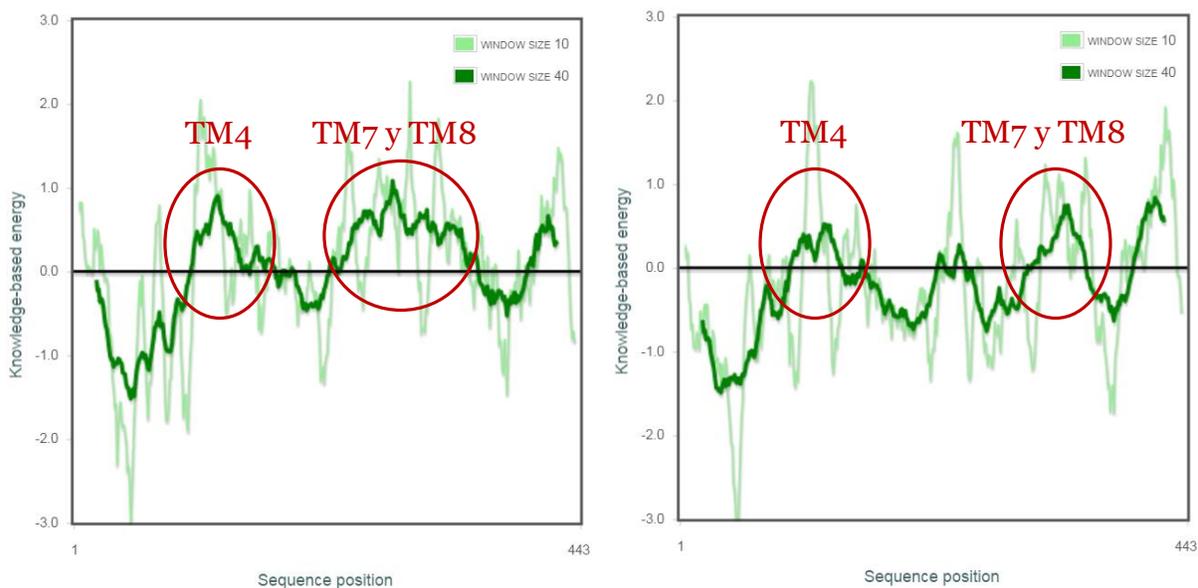


Figura 6.2 – Perfil energético por residuo antes y después de la dinámica.

Finalmente, en la Figura 5.20 se observa que la estructura de la proteína se mantuvo a nivel global, pero se observan algunas variaciones en las posiciones de los sectores TM9, TM10 y TM11, representados en gris claro, verde oscuro y celeste, respectivamente. Adicionalmente, se aprecia un desplazamiento de los coils que unen las hélices, dando por resultado una estructura menos compacta, obteniéndose un RMSD de 2.34, lo cual se aprecia en la Figura 5.20. Por otro lado, a partir de la Figura 5.21 se puede concluir que el sistema proteína-membrana se mantuvo estable a lo largo de la simulación, presentando una conformación bastante compacta antes de la dinámica y una más

relajada al final de ésta, lo cual se asemeja más a la realidad. Esto se debe a que la estructura inicial del sistema es generada arbitrariamente y posteriormente los movimientos moleculares e interacciones entre las moléculas permiten que éstas se acomoden de mejor manera en la estructura. El RMSD promedio de los lípidos de la membrana fue de 26.65 Angstrom, el cual es un valor bastante alto, pero tiene sentido al tratarse de una estructura bastante extensa y con altos grados de libertad debido a su flexibilidad y elongación.

6.3.2. Análisis en Detalle

6.3.2.1. Perfil RMSF por Residuo

En primer lugar, a partir del análisis de RMSF por residuo a ambos pH, presentado en las Figuras 5.22 y 5.23, se observa que las diferencias obtenidas entre el modelo y el cristal son pocas en ambos casos. La mayor diferencia se presenta alrededor de los residuos 350 a 400, donde se encuentran gaps en el alineamiento entre DMT1 y el cristal de ScaDMT. Por otro lado, otros sectores interesantes a estudiar se encuentran alrededor de los residuos 210, 320, 460 y 520.

Luego, en la Figura 5.24 se observa que los sectores que presentan mayor movilidad dentro de la estructura se encuentran formando parte de loops que unen sectores transmembrana, la mayoría de ellos ubicados en el extremo extracelular. Los loops identificados corresponden a aquellos entre los dominios TM3 y TM4, TM6 y TM7, TM7 y TM8 (el más extenso de todos), TM9 y TM10, y TM11 y TM12, señalados en la Figura 6.3. Las grandes variaciones presentes en los loops se deben principalmente a la extensión de éstos, lo cual les confiere gran movilidad dentro de la estructura.

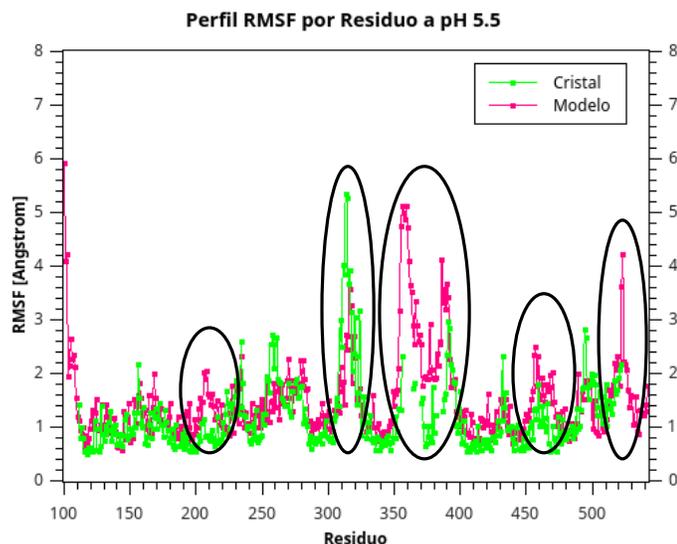


Figura 6.3 – Sectores con mayor movilidad.

Todos los sectores señalados en la Figura 6.3 presentan altos RMSF tanto en el cristal como en el modelo, a excepción del loop ubicado entre los dominios TM7 y TM8, el cual presenta un mayor RMSF en el Modelo 23, lo cual se podría deberse principalmente a la presencia de gaps en este sector del alineamiento.

Por otra parte, se observan diferencias en algunos sectores dependiendo del pH al cual se encuentran expuestos. El sector alrededor del residuo 210 (entre dominios TM3 y TM4) posee un mayor RMSF a pH 7.4 tanto para el modelo como para el cristal. En el sector cercano al residuo 320 (entre dominios TM6 y TM7) se aprecia un mayor RMSF en el modelo a pH 7.4 y un mayor RMSF en el cristal a pH 5.5. Finalmente, el RMSF al final de la estructura (entre dominios TM11 y TM12) es mayor a pH 5.5 para el modelo.

Las diferencias de RMSF debidas al pH pueden deberse a la variación en la protonación de los residuos dependiendo de éste, interactuando de manera diferente con el solvente presente en el sistema, ya que poseen distinto número de hidrógenos, dependiendo de la protonación de los aminoácidos, lo cual depende del pH al cual se encuentran expuestos. Por otro lado, aquellas diferencias observadas entre el cristal y el modelo podrían ser causadas por las diferencias entre los residuos que alinearon en este sector, lo cual se puede ver claramente en el sector entre los dominios TM6 y TM7.

6.3.2.2. Análisis de Puentes Disulfuro

El análisis de cisteínas presentado en la Figura 5.25 indica la posible formación de un puente disulfuro entre los residuos ubicados en las posiciones 175 y 178, puesto que se encuentran bastante cerca y además forman parte de uno de los loop más extensos de la proteína (ubicado entre los sectores TM5 y TM6), lo que les confiere cierta flexibilidad para poder formar el enlace.

Sin embargo, a pesar de su cercanía, al seguir la trayectoria de estas cisteínas durante toda la dinámica, los átomos de azufre de éstas en ningún momento se encontraron uno frente al otro, lo que no permite proponer un enlace disulfuro en este sector. Esto puede deberse a que las cisteínas se encuentran muy cerca dentro de la secuencia, sólo a 3 aminoácidos de distancia, lo que podría provocar que éstas no se encuentren en el ángulo adecuado para formar el enlace, pero para poder establecer algo como esto, es necesario contar con una dinámica mucho más extensa o bien forzar la formación del enlace y observar el comportamiento de los residuos, si se mantiene estable el enlace o si se deforma o tensiona con facilidad.

6.3.2.3. Análisis de Modos Normales

A partir del resultado del análisis de los 2 primeros modos normales de la proteína, se puede establecer que los principales movimientos de la estructura se presentan en los loops más extensos de la proteína, como se puede ver en las Figuras 5.26 y 5.30, y que el movimiento de éstos provoca pequeñas variaciones en el posicionamiento de las hélices transmembrana, abriendo y cerrando levemente la estructura de la proteína en algunos sectores, como se aprecia en las Figuras 5.29 y 5.33, donde se presenta la proteína con representación de su superficie.

En el primer modo normal se observa un amplio movimiento de los loops más extensos presentes en la zona superior de la proteína (Ver Figura 5.29). Adicionalmente, el modo presenta un movimiento de cierre en la parte superior de la proteína, mientras que en la parte inferior presenta una apertura de la estructura, y viceversa, lo cual se puede apreciar en la Figura 5.29. Este modo podría representar el movimiento particular de entrada y salida del ion transportado, abriéndose en el extremo superior y cerrándose al

inferior, para captar el ion, posteriormente abrirse en el extremo inferior y cerrando la parte superior, para liberar el hierro al citoplasma.

Por otra parte, en el segundo modo normal se observa un movimiento de ensanchamiento y angostamiento de la estructura global de la proteína, como se puede ver en la Figura 5.33. Este modo podría representar el movimiento de apertura y cierre del canal transportador, para permitir o cerrar el paso al ion de hierro a través de la estructura.

De esta manera, estos movimientos detectados podrían representar un movimiento importante para el transporte, dado que en conjunto proporcionan un movimiento de apertura y cierre de la estructura de la proteína, lo cual es común en proteínas transportadoras. Por tanto, este movimiento podría representar el movimiento principal de captura y liberación del ion de hierro. Sin embargo, para establecer una conclusión como ésta se requeriría un estudio más acabado del movimiento de la proteína, como por ejemplo una dinámica suficientemente extensa (rango de los microsegundos), la cual permita establecer conclusiones respecto al mecanismo de transporte de la proteína, lo cual se encuentra fuera de los alcances de este estudio, pero resulta un punto importante a considerar para estudios futuros del funcionamiento de la proteína.

Adicionalmente, en ambos modos se observa que la hélice del dominio transmembrana 4 presenta mayor movilidad que las otras hélices de la estructura, como se puede apreciar en las Figuras 5.17 y 5.20. Dado el movimiento particular de este dominio, se plantea la posibilidad de que esta hélice cumpla un rol importante ya sea en la entrada del ion de hierro al interior de la proteína, o bien la posible entrada de agua al interior de la estructura, lo cual podría conferirle una importancia funcional importante.

Es importante destacar que se encuentra reportada una mutación en este sector transmembrana en los ratones *mk* y *b*, provocando una pérdida de funcionalidad de la proteína, lo cual afirma la importancia de este dominio en la función de la proteína transportadora. Por tanto, es posible que este movimiento de apertura y cierre evidente en este sector pudiera conferirle una función importante a este dominio. Sin embargo se requieren estudios más detallados para poder concluir al respecto.

La mutación que ocurre en esta zona es la sustitución de una glicina por una arginina. La glicina es el aminoácido más pequeño de todos, confiriéndole flexibilidad a las estructuras, por otro lado, la arginina es un aminoácido de mayor tamaño, con una larga cadena lateral que por lo general ayuda a estabilizar la estructura terciaria de las proteínas. Por tanto, dado que este residuo se encuentra ubicado en las cercanías del loop extracelular que conecta los sectores TM3 y TM4 (Ver Figura 5.13), es probable que la sustitución de glicina por arginina rigidice la estructura, limitando el movimiento del loop y la flexibilidad de su hélice más cercana, el dominio TM4.

6.3.2.4. Análisis del pH y Potencial Electrostático

A partir del análisis electrostático de la proteína en sus sectores expuestos al lumen del intestino y al citoplasma de los enterocitos, se esperaba encontrar diferencias en la distribución de cargas al encontrarse protonados a distinto pH, lo cual permitiría establecer la importancia de realizar estudios con el pH correspondiente a cada lado de la

proteína. Sin embargo, los resultados expuestos en las Figuras 5.22 y 5.23 se puede ver que no se presentan cambios considerables en el potencial electrostático de estos sectores al encontrarse protonados a distinto pH.

Este resultado sugiere que la diferencia de pH presente en el sistema de la proteína no juega un rol importante para los residuos expuestos a estos pH, ya que no se aprecian cambios que podrían interferir en la interacción de estos residuos con alguna molécula. Sin embargo, sí se observa un cambio importante en el potencial al inicio y al final de la dinámica, presentando una redistribución de las cargas.

En el caso del sector expuesto al lumen del intestino, al comienzo de la dinámica se observa un potencial bastante negativo principalmente en el centro de la estructura, con algunos pequeños sectores positivos. Luego, al final de la simulación, la mayor parte de las cargas positivas se han redistribuido, presentando un potencial negativo, pero con menor intensidad que el presentado al inicio de la dinámica (Ver Figura 5.22).

Por otro lado, en el sector que apunta hacia el interior de los enterocitos, en el primer frame se observa un potencial principalmente positivo con algunos pequeños sectores cargados negativamente, mientras que en el último frame se aprecia un potencial principalmente positivo y con mayor intensidad que aquel expuesto al comienzo de la simulación (Ver Figura 5.23).

Esta variación en el potencial de las regiones superior e inferior de la proteína podría deberse al mecanismo de interacción de la proteína con el ion de hierro, presentando un potencial principalmente negativo en la parte superior para captar el ion que se encuentra cargado positivamente, y una vez captado redistribuye su potencial, disminuyendo la cantidad de cargas presentes a este lado de la proteína, disminuyendo así su posible interacción con hierro. En cambio, en el sector inferior de la estructura, se presenta un potencial ligeramente positivo, pero con sectores cargados negativamente, los cuales podrían atraer al ion positivo de hierro guiando su movimiento hacia el interior de la célula, para luego redistribuir su carga y presentar un potencial en mayor parte positivo, de modo de repeler el ion de hierro de la estructura, impulsando así su movimiento hacia el interior de los enterocitos.

Dado lo anterior, este cambio en el potencial electrostático que presenta la proteína representa un punto importante a analizar en el futuro, ya que podría resultar importante para el proceso de captación y liberación de hierro de la estructura, como se ha observado en otras proteínas transportadoras.

6.3.2.5. Análisis del Ion de Hierro y Residuos Colindantes

El análisis de los residuos cercanos al ion de hierro durante la dinámica no pudo ser realizado, debido a que se presentó un problema al analizar la simulación. El ion de hierro se encontraba sobrepuesto a un residuo de la proteína, lo cual no correspondía con la posición fijada para éste en un comienzo.

Este problema se debe a que el ion de hierro no-hémico no se encontraba dentro del campo de fuerzas utilizado para llevar a cabo la dinámica, por lo que se ingresó manualmente sus parámetros. Sin embargo, ya que el hierro no se encontraba unido a la

estructura proteica, se debía especificar en el campo de fuerzas las interacciones que mantenían a este ion de hierro dentro de la estructura. Dado que estos datos no fueron especificados en el campo de fuerzas, durante la simulación dinámica se une el ion libre con el residuo más cercano a éste con el cual presente atracción.

Es importante señalar que este problema también lo presentó el ion de manganeso dentro de la estructura del cristal, al igual que hierro, el manganeso divalente no se encontraba parametrizado en el campo de fuerzas, por lo que también fue ingresado manualmente sin especificar las interacciones con los residuos.

Ahora, puesto que el objetivo principal de este análisis era establecer posibles residuos interactuantes con hierro a lo largo de la dinámica, fijar las interacciones de éste con ciertos residuos limita este estudio, ya que las interacciones restringirían el movimiento del ion. Por esta razón, se decidió hacer el análisis sólo para la estructura original, ya que resolver este problema se escapaba de los alcances de este trabajo y adicionalmente esto implicaba rehacer las 4 dinámicas.

Así, a partir de la selección de aquellos residuos que se encuentran dentro de un radio de 5 Angstrom del ion de hierro, se pudo obtener 8 cadenas laterales candidatas para interactuar con éste: Ile111, Ala112, Asp115, Asn118, Ala291, Val292, Met294 y Asn297, los cuales se encuentran ubicados en los dominios TM1 y TM6, alrededor del área donde se encuentra el loop en el centro de las hélices. Además, es importante señalar que los 4 residuos presentados en la Figura 4.1 se encuentran entre estos 8 residuos, los cuales son: Asp115, Asn118, Ala291 y Met294. Esto quiere decir que los residuos que se encuentran interactuando con manganeso en la estructura cristalina se mantienen totalmente invariantes en la estructura de DMT1.

Dado esto, se podría establecer que estos 4 residuos son los principales candidatos a interactuar con el ion de hierro, dado que se observó su interacción en un cristal con un ion de manganeso. Por otro lado, a pesar que los residuos Ala112 y Asn297 también representan buenos candidatos a interactuar con hierro, su ubicación dentro de las hélices les confiere menor flexibilidad que los otros residuos como para recibir un átomo de hierro divalente. Sin embargo, resultaría interesante analizar más a fondo la posibilidad de interacción de estos residuos en estudios posteriores.

6.3.2.6. Análisis del Movimiento de Agua

A partir del resultado expuesto en el Anexo 5, se observa que la proteína comienza sin moléculas de agua alrededor del ion de hierro, pero a medida que avanza la simulación distintas moléculas de agua van ingresando a este sector de la proteína, donde las moléculas más cercanas a hierro se encuentran apuntando sus átomos de oxígeno hacia el ion cargado positivamente.

La cantidad de moléculas de agua interaccionando con hierro a lo largo de la simulación va variando a lo largo del tiempo, sin embargo, alrededor del nanosegundo 16 la cantidad y localización de éstas se mantiene bastante estable. Adicionalmente, es importante señalar que la distribución de aguas alrededor del ion se encuentra desplazada hacia el sector derecho, debido al problema con la parametrización de hierro que lo ha dejado fijo a un residuo del lado izquierdo. De este modo, este problema afecta el resultado

obtenido para este análisis, ya que se esperaría observar aguas distribuidas más uniformemente alrededor de hierro y no cargadas hacia un sector, como se aprecia en este caso, ya que la interacción con el residuo limita el paso de aguas por el sector izquierdo.

A pesar de lo anterior, el resultado obtenido es suficiente para poder proponer un rol importante de las moléculas de agua al interior de la estructura, puesto que se observa cómo las aguas van quelando el hierro y formando puentes de hidrógeno entre ellas, lo cual sugiere que éstas podrían estar estabilizando el ion de hierro al interior de la estructura, o bien abriéndole paso a través de la estructura altamente hidrofóbica.

Finalmente, en la Figura 5.38 se puede ver claramente que las moléculas de agua ingresan principalmente por el inferior de la proteína, en el sector donde se encuentran las hélices TM1 y TM6, marcadas en naranja y amarillo, respectivamente, en la figura. Este resultado reafirma la posible formación de un canal entre estas hélices, donde se debería posicionar el ion de hierro una vez ha ingresado a la proteína, y por tanto, estas moléculas de agua podrían ser parte importante del transporte del ion de hierro hacia el interior de la célula a través de este canal.

7. Conclusiones

En primer lugar, es importante destacar la importancia de la proteína DMT1 en el proceso de absorción de hierro, dado que se encarga de captar el ion en el intestino para poder ser absorbido. La ausencia o pérdida de función de esta proteína es causante de distintos tipos de anemia tanto en el ser humano como en otros mamíferos. Por lo tanto, conocer su estructura y funcionamiento son aspectos clave para comprender mejor el proceso de absorción de hierro y así poder proponer mejores tratamientos para las enfermedades asociadas.

Dado lo anterior, el principal objetivo de este trabajo es proponer un modelo tridimensional de la isoforma 1A/IRE(+) de la proteína DMT1 humana, el cual permita establecer la posible estructura de la proteína, y a partir de éste estudiar el posible comportamiento de la proteína en membrana. De esta manera, este estudio representa un primer acercamiento al análisis estructural y funcional de DMT1, el cual dará pie a futuras investigaciones que permitirán establecer conclusiones respecto al mecanismo de transporte de la proteína, y por tanto, del proceso de absorción de hierro.

A partir del análisis preliminar de la familia a la cual pertenece DMT1 (Nramp), se pudo establecer que los aminoácidos reportados con mutaciones presentan una alta conservación en mamíferos, debido a su importancia en la función transportadora de la proteína, puesto que una mutación puntual en estos residuos provoca inmediatamente la pérdida de la funcionalidad de la proteína, causando distintas variedades de anemia. No obstante, es necesario un análisis con un mayor número de secuencias para observar si la conservación de estos residuos se mantiene.

Luego, la predicción de dominios transmembrana para la proteína de interés estableció la presencia de 12 dominios transmembrana, 6 loops extracelulares, 5 loops intracelulares y los extremos amino y carboxilo terminales al interior del citoplasma de los enterocitos, lo cual concuerda totalmente con lo expuesto en bibliografía. Por otro lado, al analizar el tipo de aminoácidos presentes en los sectores transmembrana, se observa que la mayoría de ellos son apolares, pero se presentan 10 aminoácidos cargados, 3 positivos y 7 negativos, los cuales representan un punto interesante a estudiar a futuro, ya que se sabe de proteínas de membrana que poseen aminoácidos cargados en membrana que juegan roles importantes en su funcionamiento.

Por otra parte, al analizar la calidad de los modelos de la isoforma 1A/IRE(+) de la proteína DMT1 humana, obtenidos por modelamiento comparativo, se seleccionó el Modelo 23, debido a que presentaba el mejor gráfico de Ramachandran entre los 10 mejores modelos según su DOPE score, obteniendo un 95.4% de sus residuos en zona favorable, 4.6% de ellos en zona permitida, y tan solo 0.5% de ellos en una región desfavorable, lo cual se acerca bastante al resultado obtenido por el cristal. Luego, en el análisis realizado en ProSA, el modelo obtuvo un z-score de -4.3 y un perfil energético por residuo similar al del cristal ScaDMT.

Adicionalmente, se observa que la estructura tridimensional del modelo obtenido para DMT1 es bastante similar estructuralmente al cristal ScaDMT, lo cual era de esperarse, debido a que éste aportó más de un 90% para el modelamiento comparativo.

De este modo, la estructura del Modelo 23 presenta las mismas características importantes detectadas en el cristal, esto es, las primeras 5 alfa-hélices están estructuralmente relacionadas con las siguientes 5 hélices y tanto la primera como la sexta hélice transmembrana se desenrollan en el centro de ésta.

A continuación, los análisis preliminares de las 4 dinámicas moleculares realizadas permitieron establecer que éstas se llevaron a cabo de manera exitosa, manteniendo estables las condiciones básicas de energía, temperatura, presión y volumen, como es de esperarse para un sistema que alcanza el equilibrio. También, a partir de los perfiles RMSD obtenidos, se pudo establecer que los sistemas alcanzaron el estado estacionario entre el segundo y tercer nanosegundo de la simulación, a partir del cual comienza la etapa de producción de la dinámica.

Además, a partir de la estructura del sistema completo antes y después de la dinámica, se pudo concluir que el sistema se mantuvo estable a lo largo de la simulación, lo que indica que la proteína y la membrana se adaptaron de buena manera a las condiciones establecidas y por tanto el sistema podría representar un buen modelo para el sistema real que se está imitando.

Por otro lado, al comparar el gráfico de Ramachandran del modelo antes y después de la dinámica, se detectó un aumento en la cantidad de residuos dentro de zonas no permitidas. Sin embargo, los residuos que se encontraban dentro de estas zonas están bastante cerca de su zona permitida, a diferencia del residuo Ala13 en la estructura del modelo previo a la simulación, el cual se encontraba muy alejada de su región permitida. De este modo, se puede decir que hubo una mejora estructural en esta posición después de la dinámica, pero aumentó el número de residuos en sectores no favorables para su estructura, aunque dada la cercanía de éstos a su región permitida, se podría decir que existe una mejora estructural en el modelo.

Luego, el z-score obtenido para el Modelo 23 una vez terminada la dinámica fue de -5.21, menor al valor obtenido antes de la simulación, el cual fue de -4.3. Esto representa una mejora del modelo respecto a la estructura inicial, la cual se encontraba más alejada de la densidad de puntos de los z-score obtenidos por estructuras cristalizadas. Además, la estructura del modelo mejoró energéticamente después de la dinámica, pues presenta menos residuos con energías positivas y su perfil energético se asemeja mucho más a aquel obtenido por el cristal de ScaDMT. Sin embargo, el sector comprendido entre los dominios TM7 y TM8 aún posee energías positivas, lo que no se aprecia en el cristal de ScaDMT, por tanto, este sector requiere un mayor estudio y tal vez la realización de una dinámica más prolongada podría ayudar a disminuir la energía de esta zona.

Dado lo anterior, se puede concluir que tras la dinámica se observaron mejoras tanto estructurales como energéticas del modelo, lo cual se ve reflejado en la relajación de la estructura de la proteína después de la dinámica. Por esta razón, resultaría interesante llevar a cabo una dinámica más extensa para determinar si es posible optimizar el modelo propuesto, de modo que no contenga aminoácidos estructuralmente tensionados y/o que posean energías positivas que desfavorezcan la estructura.

Posteriormente, a partir del perfil RMSF por residuo se pudo detectar que los sectores que presentan mayor movilidad dentro de la estructura se encuentran formando

parte de loops que unen sectores transmembrana, la mayoría de ellos ubicados en el extremo extracelular. Los loops identificados corresponden a aquellos entre los dominios TM3 y TM4, TM6 y TM7, TM7 y TM8 (el más extenso de todos), TM9 y TM10, y TM11 y TM12.

Por otra parte, no se pudo proponer la formación de un enlace disulfuro en la estructura de la proteína, puesto que en la posición propuesta los átomos de azufre no se encontraron frente a frente en ningún momento a lo largo de la dinámica. Sin embargo, resultaría interesante forzar la formación del enlace disulfuro y observar lo que sucede con éste a lo largo de una dinámica, lo cual permitiría proponer o descartar este enlace.

Luego, a partir del análisis de los modos normales detectados en la proteína, los movimientos detectados podrían representar un movimiento importante para el transporte, dado que en conjunto proporcionan un movimiento de apertura y cierre de la estructura de la proteína, lo cual es común en proteínas transportadoras. Por tanto, este movimiento podría representar el movimiento principal de captura y liberación del ion de hierro, sin embargo, para establecer una conclusión como ésta se requeriría un estudio más acabado del movimiento de la proteína, como por ejemplo una dinámica suficientemente extensa (rango de los microsegundos), la cual permita establecer conclusiones respecto al mecanismo de transporte de la proteína, lo cual se encuentra fuera de los alcances de este estudio, pero resulta un punto importante a considerar para estudios futuros del funcionamiento de la proteína.

Adicionalmente, en ambos modos normales se observa que la hélice del dominio transmembrana 4 presenta mayor movilidad que las otras hélices de la estructura, por lo cual se plantea la posibilidad de que esta hélice cumpla un rol importante ya sea en la entrada del ion de hierro al interior de la proteína, o bien la posible entrada de agua al interior de la estructura, lo que podría conferirle una importancia funcional importante. Sin embargo, esta última hipótesis fue descartada tras el seguimiento de las moléculas de agua que ingresan a la estructura, a lo largo de la dinámica. Dado esto, sería interesante analizar de manera más detallada este dominio para así determinar el rol que este desempeña en el transporte de hierro.

A continuación, a partir del análisis electrostático de la proteína en sus sectores expuestos al lumen del intestino y al citoplasma de los enterocitos, se puede ver que no se presentan cambios considerables en el potencial de estos sectores al encontrarse protonados a distinto pH. Esto sugiere que la diferencia de pH presente en el sistema de la proteína no juega un rol importante para los residuos expuestos a estos pH, sin embargo, sí se observa un cambio importante en el potencial al inicio y al final de la dinámica, presentando una redistribución de las cargas.

Esta variación en el potencial de las regiones superior e inferior de la proteína podría deberse al mecanismo de interacción de la proteína con el ion de hierro, presentando un potencial principalmente negativo en la parte superior para captar el ion que se encuentra cargado positivamente, y una vez captado redistribuye su potencial, disminuyendo la cantidad de cargas presentes a este lado de la proteína, disminuyendo así su posible interacción con hierro. En cambio, en el sector inferior de la estructura, se presenta un potencial ligeramente positivo, pero con sectores cargados negativamente, los cuales podrían atraer al ion positivo de hierro guiando su movimiento hacia el interior de

la célula, para luego redistribuir su carga y presentar un potencial en mayor parte positivo, de modo de repeler el ion de hierro de la estructura, impulsando así su movimiento hacia el interior de los enterocitos.

Por otro lado, a pesar de no haber podido realizar el análisis de los posibles residuos interactuantes con el ion de hierro a lo largo de la dinámica, a partir de la selección de aquellos residuos que se encuentran dentro de un radio de 5 Angstrom del ion de hierro, se pudo obtener 8 candidatos para interactuar con éste: Ile111, Ala112, Asp115, Asn118, Ala291, Val292, Met294 y Asn297, los cuales se encuentran ubicados en los dominios TM1 y TM6, alrededor del área donde se encuentra el loop en el centro de las hélices. Además, es importante señalar que 4 de estos residuos resultaron ser los aminoácidos que interactúan con manganeso en el cristal de ScaDMT, los cuales son: Asp115, Asn118, Ala291 y Met294. Esto quiere decir que estos residuos que se mantienen totalmente invariantes en la estructura de DMT1, obtenida principalmente a partir de este cristal.

Dado lo anterior, se podría establecer que estos 4 residuos son los principales candidatos a interactuar con el ion de hierro, dado que se observó su interacción en un cristal con un ion de manganeso, y se ha propuesto que también interactúan con hierro. Por otro lado, a pesar que los residuos Ala112 y Asn297 también representan buenos candidatos a interactuar con hierro, su ubicación dentro de las hélices les confiere menor flexibilidad que los otros residuos como para recibir un átomo de hierro divalente. Sin embargo, resultaría interesante analizar más a fondo la posibilidad de interacción de estos residuos en estudios posteriores.

Posteriormente, a partir del seguimiento de las moléculas de agua en las cercanías del átomo de hierro, se propone la posibilidad de un rol importante de las moléculas de agua al interior de la estructura, puesto que se observa cómo las aguas van quelando el hierro y formando puentes de hidrógeno entre ellas, lo cual sugiere que éstas podrían estar estabilizando el ion en el interior de la estructura, o bien abriéndole el paso a través de la estructura altamente hidrofóbica.

Adicionalmente, luego de observar la trayectoria de algunas moléculas de agua que ingresan a la proteína, se pudo concluir que las moléculas de agua ingresan principalmente por la parte inferior de la proteína, en el sector donde se encuentran las hélices TM1 y TM6. Este resultado reafirma la posible formación de un canal entre estas hélices, donde se debería posicionar el ion de hierro una vez ha ingresado a la proteína, y por tanto, estas moléculas de agua podrían ser parte importante del transporte del ion de hierro hacia el interior de la célula a través de este canal.

Dados los resultados y análisis positivos extraídos a partir del modelamiento por homología y las dinámicas moleculares realizadas, se puede establecer que la metodología utilizada es adecuada para el sistema estudiado, y por tanto podría usarse para estudios futuros de DMT1 o proteínas con características similares. Por ejemplo, podría mejorarse el modelo propuesto para la proteína, encontrando moldes con mayor porcentaje de identidad y provenientes de organismos más cercanos filogenéticamente.

Por otra parte, resulta importante realizar una dinámica molecular más extensa para la proteína de interés, a partir de la cual se pueda plantear un posible mecanismo de transporte y estudiar más a fondo aquellos puntos destacados en este trabajo. Además,

resulta clave fijar adecuadamente el ion de hierro dentro de la estructura, para así poder estudiar el movimiento de éste a lo largo del tiempo y como va interactuando con los residuos colindantes y moléculas de agua que lo rodean. También, una dinámica más larga permitiría estudiar el movimiento de protones que debería acompañar al hierro a lo largo del transporte, y determinar si las histidinas reportadas efectivamente cumplen un rol en este proceso.

En conclusión, los resultados y discusiones aquí expuestos representan los primeros avances para un mejor conocimiento de la estructura y función de la isoforma 1A/IRE(+) de la proteína DMT1 humana. Sin embargo, se requiere profundizar y extender los análisis presentados en este estudio para poder establecer bases más potentes respecto a la estructura y comenzar a identificar el mecanismo de transporte de la proteína, lo cual resultaría de gran utilidad para comprender la causa de las enfermedades asociadas a mutaciones en DMT1 y posteriormente proponer tratamientos más efectivos para estas enfermedades.

Bibliografía

- [1] Y. Nevo and N. Nelson, “The NRAMP family of metal-ion transporters”, *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1763, no. 7, pp. 609–620, 2006.
- [2] P. Sharp and S. K. Srail, “Molecular mechanisms involved in intestinal iron absorption”, *World Journal of Gastroenterology*, vol. 13, no. 35, pp. 4716–4724, 2007.
- [3] D. M. Frazer and G. J. Anderson, “Iron Imports. I. Intestinal iron absorption and its regulation”, *American Journal Physiology - Gastrointestinal Liver Physiology*, vol. 289, no. 4, pp. G631–G635, 2005.
- [4] M. D. Fleming, M. A. Romano, M. A. Su, L. M. Garrick, M. D. Garrick and N. C. Andrews, “Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport”, *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, vol. 95, no. 3, pp. 1148–1153, 1998.
- [5] T. Herrmann, M. Muckenthaler, F. Van der Hoeven, K. Brennan, S. G. Gehrke, N. Hubert, C. Sergi, H. J. Grone, I. Kaiser, I. Gosch, et al., “Iron overload in adult Hfe-deficient mice independent of changes in the steady-state expression of the duodenal iron transporters DMT1 and Ireg1/ferroportin”, *Journal of Molecular Medicine*, vol. 82, no. 1, pp. 39–48, 2003.
- [6] M. Muckenthaler, C. N. Roy, A. O. Custodio, B. Miñana, J. Degraaf, L. K. Monstross, N. C. Andrews and M. W. Hentze, “Regulatory defects in liver and intestine implicate abnormal hepcidin and Cybrd1 expression in mouse hemochromatosis”, *Nature Genetics*, vol. 34, no. 1, pp. 102–107, 2004.
- [7] P. Fergelot, M. Orhant, A. Thénier, P. Loyer, M. Ropert-Bouchet, S. Lohyer, J. Y. Le Gall and J. Mosser, “Over-expression of wild-type and mutant HFE in a human melanocytic cell line reveals an intracellular bridge between MHC class I pathway and transferrin iron uptake”, *Biology of the Cell*, vol. 95, no. 5, pp. 243–255, 2003.
- [8] W. Li, A. Hellsten, J. D. Nyhalah and X. M. Yuan, “Enhanced expression of natural resistance-associated macrophage protein 1 in atherosclerotic lesions may be associated with oxidized lipid-induced apoptosis”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1030, pp. 202–207, 2004.
- [9] M. Babcock, D. De Silva, R. Oaks, S. Davis-Kaplan, S. Jiralerspong, L. Montermini, M. Pandolfo and J. Kaplan, “Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin”, *Science*, vol. 276, no. 5319, pp. 1709–1712, 1997.
- [10] N. C. Andrews and J. E. Levy, “Iron is hot: an update on the pathophysiology of hemochromatosis”, *Blood*, vol. 92, no. 6, pp. 1845–1851, 1998.
- [11] C. Askwith and J. Kaplan, “Iron and copper transport in yeast and its relevance to human disease”, *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 23, no. 4, pp. 135–138, 1998.

- [12] T. Moss and E. H. Morgan, “The metabolism of neuronal iron and its pathogenic role in neurological disease: review”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1012, pp. 14–26, 2004.
- [13] M. D. Garrick, L. M. Garrick, “Cellular iron transport”, *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1790, no. 5, pp. 309–325, 2009.
- [14] H. Zoller, I. Theurl, R. Koch, A. Kaser and G. Weiss, “Mechanisms of iron mediated regulation of the duodenal iron transporters divalent metal transporter 1 and ferroportin 1”, *Blood Cells, Molecules and Diseases*, vol. 29, no. 3, pp. 488–497, 2002.
- [15] C. C. Philpott, “Molecular aspects of iron absorption: Insights into the role of HFE in hemochromatosis”, *Hepatology*, vol. 35, pp. 993–1001, 2002.
- [16] N. Nelson, “Metal ion transporters and homeostasis”, *EMBO Journal*, vol. 18, no. 16, pp. 4361–4371, 1999.
- [17] J. R. Forbes and P. Gros, “Divalent-metal transport by Nramp proteins at the interface of host pathogen interactions”, *Trends in Microbiology*, vol. 9, no. 8, pp. 397–403, 2001.
- [18] A. Van Ho, D. M. Ward and J. Kaplan, “Transition metal transport in yeast”, *Annual Review of Microbiology*, vol. 56, pp. 237–261, 2002.
- [19] T. Goswami, A. Rolfs and M. A. Hediger, “Iron transport: Emerging roles in health and disease”, *Biochemistry and Cell Biology*, vol. 80, pp. 679–689, 2002.
- [20] D. Agranoff, L. Collins, D. Kehres, T. Harrison, M. Maguire and S. Krishna, “The Nramp orthologue of *Cryptococcus neformans* is a pH-dependent transporter of manganese, iron, cobalt and nickel”, *Biochemical Journal*, vol. 385, pp. 225–232, 2005.
- [21] F. Supek, L. Supekova, H. Nelson and N. Nelson, “A yeast manganese transporter related to macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, pp. 5105–5110, 1996.
- [22] F. Supek, L. Supekova, H. Nelson and N. Nelson, “Function of metal-ion homeostasis in the cell division cycle, mitochondrial protein processing, sensitivity to mycobacterial infection and brain function”, *Journal of Experimental Biology*, vol. 200, pp. 321–330, 1997.
- [23] X. F. Liu, F. Supek, N. Nelson and V. C. Culotta, “Negative control of heavy metal uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* BSD2 gene”, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, pp. 11763–11769, 1997.
- [24] X. Z. Chen, J. B. Peng, A. Cohen, H. Nelson, N. Nelson and M. A. Hediger, “Yeast SMF1 mediates H(+)-coupled iron uptake with concomitant uncoupled cation currents”, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, pp. 35089–35094, 1999.

- [25] Y. Nevo and N. Nelson, “The mutation F227I increases the coupling of metal ion transport in DCT1”, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 27951, pp. 53056–53061, 2004.
- [26] M. Cellier, G. Prive, A. Belouchi, T. Kwan, V. Rodrigues, W. Chia and P. Gros, “Nramp defines a family of membrane proteins”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, no. 22, pp. 10089–10093, 1995.
- [27] M. D. Garrick and L. M. Garrick, “Divalent metal transporter DMT1 (SLC11A2)”. In: *Membrane Transporter Diseases*, S. Bröer and C. A. Wagner (eds.), Dordrecht, The Netherlands, Kluwer, pp. 107–122, 2004.
- [28] H. Gunshin, B. Mackenzie, U. V. Berger, M. F. Romero, W. F. Boron, S. Nussberger, J. L. Gollan and M. A. Hediger, “Cloning and characterization of a proton-coupled mammalian metal-ion transporter”, *Nature*, vol. 388, no. 6641, pp. 482–488, 1997.
- [29] M. Knöpfel, L. Zhao and M. D. Garrick, “Transport of divalent transition metal ions is lost in small-intestinal tissue of b/b Belgrade rats”, *Biochemistry*, vol. 44, pp. 3454–3465, 2005.
- [30] S. Lynch, “Iron metabolism”. In: *Nutritional Anemia*, J. Badham and M. B. Zimmermann (eds.), Sweden, Sight and Life, pp. 59–76, 2007.
- [31] K. Kimberly and H. L. Bonkowsky, “Heme oxygenase: Recent advances in understanding its regulation and role”, *Proceedings of the Association of American Physicians*, vol. 111, pp. 438–447, 1999.
- [32] S. Ludwiczek, I. Theurl, E. Artner-Dworzak, M. Chorney and G. Weiss, “Duodenal HFE expression and hepcidin levels determine body iron homeostasis: modulation by genetic diversity and dietary iron availability”, *Journal of Molecular Medicine*, vol. 82, no. 6, pp. 373–382, 2004.
- [33] B. Mackenzie and M. D. Garrick, “Iron Imports. II. Iron uptake at the apical membrane in the intestine”, *American Journal Physiology - Gastrointestinal Liver Physiology*, vol. 289, no. 6, pp. G981–G986, 2005.
- [34] M. D. Fleming, C. C. Trenor and M. A. Su, “Microcytic anemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene”, *Nature Genetics*, vol. 16, no. 4, pp. 383–386, 1997.
- [35] M. P. Mims, Y. Guan, D. Pospisilova, M. Priwitzerova, K. Indrak, P. Ponka, V. Divoky and J. T. Prchal, “Identification of a human mutation of DMT1 in a patient with microcytic anemia and iron overload”, *Blood*, vol. 105, no. 3, pp. 1337–1342, 2005.
- [36] A. Iolascon, M. D’Apolito, V. Servedio, F. Cimmino, A. Piga and C. Camaschella, “Microcytic anemia and hepatic iron overload in a child with compound heterozygous mutations in DMT1 (SLC11A2)”, *Blood*, vol. 107, no. 1, pp. 349–354, 2006.

- [37] C. Beaumont, J. Delaunay, G. Hetet, B. Grandchamp, M. De Montalbert and G. Tchernia, “Two new human DMT1 gene mutations in a patient with microcytic anemia, low ferritinemia, and liver iron overload”, *Blood*, vol. 107, pp. 4168–4170, 2006.
- [38] S. Lam-Yuk-Tseung, C. Camaschella, A. Iolascon and P. Gros, “A novel R416C mutation in human DMT1 (Slc11a2) displays pleiotropic effect on function and causes microcytic anemia and hepatic iron overload”, *Blood Cells, Molecules and Diseases*, vol. 36, pp. 347–354, 2006.
- [39] I. A. Ehrnstorfer, E. R. Geertsma, E. Pardon, J. Steyaert and R. Dutzler, “Crystal structure of a SLC11 (NRAMP) transporter reveals the basis for transition-metal ion transport”, *Nature Structure & Molecular Biology*, vol. 21, pp. 990–996, 2014.
- [40] G. Papanikolaou and K. Pantopoulos, “Iron metabolism and toxicity”, *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 202, pp. 199–211, 2005.
- [41] N. Wilkinson and K. Pantopoulos, “The IRP/IRE system in vivo: insights from mouse models”, *Frontiers in Pharmacology*, vol. 5, p. 176, 2014.
- [42] M. D. Garrick, “Human iron transporters”, *Genes & Nutrition*, vol. 6, no. 1, pp. 45–54, 2011.
- [43] S. Gulec, G. J. Anderson and J. F. Collins, “Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption”, *American Journal of Physiology – Gastrointestinal Liver Physiology*, vol. 307, pp. G397–G409, 2014.
- [44] P. Arosio, R. Ingrassia and P. Cavadini, “Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more”, *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1790, pp. 589–599, 2009.
- [45] T. J. Robert, “Consequences of long-term proton pump blockade: insights from studies of patients with gastrinomas”, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, vol. 98, pp. 4–19, 2006.
- [46] N. C. Andrews, “Iron homeostasis: insights from genetics and animal models”, *Nature Reviews – Genetics*, vol. 1, no. 3, pp. 208–217, 2000.
- [47] M. Tabuchi, T. Yoshimori, K. Yamaguchi, T. Yoshida and F. Kishi, “Human Nramp2/DMT1, which mediates iron transport across endosomal membranes, is localized to late endosomes and lysosomes in HEP-2 cells”, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, pp. 22220–22228, 2000.
- [48] F. Canonne-Hergaux, M. D. Fleming, J. E. Levy, S. Gauthier, T. Ralph, V. Picard, N. C. Andrews and P. Gros, “The Nramp2/DMT1 iron transporter is induced in the duodenum of microcytic anemia *mk* mice but is not properly targeted to the intestinal brush border”, *Blood*, vol. 96, pp. 3964–3970, 2000.

- [49] M. Okubo, K. Yamada, M. Hosoyamada, T. Shibasaki and H. Endou, "Cadmium transport by human Nramp2 expressed in *Xenopus laevis* oocytes", *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 187, no. 3, pp. 162–167, 2003.
- [50] P. Marciani, D. Trotti, M. A. Hediger and G. Monticelli, "Modulation of DMT1 activity by redox compounds", *Journal of Membrane Biology*, vol. 197, no. 2, pp. 91–99, 2004.
- [51] E. Huang, W. Y. Ong and J. R. Connor, "Distribution of divalent metal transporter 1 in the monkey basal ganglia", *Neuroscience*, vol. 1283, pp. 487–496, 2004.
- [52] Y. Z. Chang, Z. M. Qian, K. Wang, L. Zhu, X. D. Yang, J. R. Du, L. Jiang, K. P. Ho, Q. Wang and Y. Ke, "Effects of development and iron status on ceruloplasmin expression in rat brain", *Journal of Cellular Physiology*, vol. 204, pp. 623–631, 2005.
- [53] F. Canonne-Hergaux, S. Gruenheid, P. Ponka and P. Gros, "Cellular and subcellular localization of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron", *Blood*, vol. 93, no. 12, pp. 4406–4417, 1999.
- [54] B. Mackenzie and M. A. Hediger, "SLC11 family of H⁺-coupled metal-ion transporters NRAMP1 and DMT1", *Pflügers Archiv*, vol. 447, pp. 571–579, 2004.
- [55] A. Sacher, A. Cohen and N. Nelson, "Properties of the mammalian and yeast metal-ion transporters DCT1 and Smf1p expressed in *Xenopus laevis* oocytes", *Journal of Experimental Biology*, vol. 204, pp. 1053–1061, 2001.
- [56] S. Tandy, M. Williams, A. Leggett, M. López-Jiménez, M. Dedes, B. Ramesh, S. K. Srai and P. Sharp, "Nramp2 expression is associated with pH-dependent iron uptake across the apical membrane of human intestinal Caco-2 cells", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, pp. 1023–1029, 2000.
- [57] G. T. A. McEwan, M. L. Lucas and V. I. Mathan, "A combined TDDA-PVC pH and reference electrode for use in the upper small intestine", *Journal of Medical Engineering & Technology*, vol. 14, pp. 16–20, 1990.
- [58] P. L. Lee, T. Gelbart, C. West, C. Halloran and E. Beutler, "The human Nramp2 gene: characterization of the gene structure, alternative splicing, promoter region and polymorphisms", *Blood Cells, Molecules and Diseases*, vol. 24, no. 2, pp. 199–215, 1998.
- [59] N. Hubert and M. W. Hentze, "Previously uncharacterized isoforms of divalent metal transporter (DMT)-1: implications for regulation and cellular function", *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 19, pp. 12345–12350, 2002.
- [60] B. Mackenzie, H. Takanaga, N. Hubert, A. Rolfs and M. A. Hediger, "Functional properties of multiple isoforms of human divalent metal-ion transporter 1 (DMT1)", *Biochemical Journal*, vol. 403, pp. 59–69, 2007.

- [61] M. D. Garrick, L. Zhao, J. A. Roth, H. Jiang, J. Feng, N. J. Foot, H. Dalton, S. Kumar and L. M. Garrick, “Isoform specific regulation of divalent metal (ion) transporter (DMT1) by proteasomal degradation”, *Biometals*, vol. 25, no. 4, pp. 787–793, 2012.
- [62] M. Tabuchi, T. Yoshida, K. Takedgawa and F. Kishi, “Functional analysis of the human Nramp family expressed in fission yeast”, *Biochemical Journal*, vol. 344, pp. 211–219, 1999.
- [63] D. Agranoff, I. M. Monahan, J. A. Mangan, P. D. Butcher and S. Krishna, “Mycobacterium tuberculosis expresses a novel pH-dependent divalent cation transporter belonging to the Nramp family”, *Journal of Experimental Medicine*, vol. 190, pp. 717–724, 1999.
- [64] C. Curie, J. M. Alonso, M. Le Jean, J. R. Ecker and J. F. Briat, “Involvement of Nramp1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport”, *Biochemical Journal*, vol. 347, pp. 749–755, 2000.
- [65] S. Lam-Yuk-Tseung, G. Govoni, J. Forber and P. Gros, “Iron transport by Nramp2/DMT1: pH regulation of transport by 2 histidines in transmembrane domain 6”, *Blood*, vol. 101, no. 9, pp. 3699–3707, 2003.
- [66] S. M. Vidal, D. Malo, K. Vogan, E. Skamene and P. Gros, “Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg”, *Cell*, vol. 73, pp. 469–485, 1993.
- [67] A. Bairoch, “The PROSITE dictionary of sites and patterns in proteins, its current status”, *Nucleic Acids Research*, vol. 21, pp. 3097–3103, 1993.
- [68] E. S. Russell, D. J. Nash, S. E. Bernstein, E. L. Kent, E. C. McFarland, S. M. Matthews and M. S. Norwood, “Characterization and genetic studies of microcytic anemia in house mouse”, *Blood*, vol. 35, pp. 838, 1970.
- [69] R. M. Bannerman, J. A. Edwards, M. Kreimer-Birnbaum, E. McFarland and E. S. Russell, “Hereditary microcytic anemia in the mouse; studies in iron distribution and metabolism”, *British Journal of Hematology*, vol. 23, pp. 235, 1972.
- [70] J. A. Edwards and J. E. Hoke, “Defect of intestinal mucosal iron uptake in mice with hereditary microcytic anemia”, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 141, pp. 81, 1972
- [71] J. A. Edwards and J. E. Hoke, “Red cell iron uptake in hereditary microcytic anemia”, *Blood*, vol. 46, pp. 381, 1975.
- [72] D. Sladic-Simic, P. N. Martinovich, N. Zivkovic, D. Pavic, J. Martinovic, M. Kahn and H. M. Ranney, “A thalassemia-like disorder in Belgrade laboratory rats”, *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 165, pp. 93, 1969.
- [73] E. A. Farcich and E. H. Morgan, “Diminished iron acquisition by cells and tissues of Belgrade laboratory rats”, *American Journal of Physiology*, vol. 262, pp. R220, 1992.

- [74] M. D. Garrick, K. Gniecko, Y. Liu, D. S. Cohan and L. M. Garrick, “Transferrin and the transferrin cycle in Belgrade rat reticulocytes”, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 68, pp. 14867–14874, 1993.
- [75] M. Garrick, D. Scott, S. Walpole, E. Finkelstein, J. Whitbred, S. Chopra, L. Trivikram, D. Mayes, D. Rhodes, K. Cabbagestalk, R. Oklu, A. Sadiq, B. Mascia, J. Hoke and L. Garrick, “Iron supplementation moderates but does not cure the Belgrade anemia”, *Biometals*, vol. 10, pp. 65, 1997.
- [76] M. A. Su, C. C. Trenor, J. C. Fleming, M. D. Fleming and N. C. Andrews, “The G185R mutation disrupts function of the iron transporter Nramp2”, *Blood*, vol. 92, pp. 2157–2163, 1998.
- [77] M. D. Fleming, M. A. Romano, L. M. Garrick, M. D. Garrick MD and N. C. Andrews, “Anemia of the Belgrade rat is caused by a mutation in iron transporter protein Nramp2”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, pp. 1148, 1998.
- [78] M. Priwitzerova, D. Pospisilova, J. T. Prchal, K. Indrak, A. Hlobilkova, V. Mihal, P. Ponka, and V. Divoky, “Severe hypochromic microcytic anemia caused by a congenital defect of the iron transport pathway in erythroid cells” *Blood*, vol. 103, pp. 3991–3992, 2004.
- [79] R. Grishammer and C. G. Tate, “Overexpression of integral membrane proteins for structural studies”, *Quarterly Reviews of Biophysics*, vol. 28, pp. 315–422, 1995.
- [80] Y. Arinaminpathy, E. Khurana, D. M. Engelman and M. B. Gerstein, “Computational analysis of membrane proteins: the largest class of drug targets”, *Drug Discovery Today*, vol 14, no. 23–24, pp. 1130–1135, 2009.
- [81] G. E. Schulz, “ β -Barrel membrane proteins”, *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 10, pp. 443–447, 2000.
- [82] W. Chiu, “What does electron cryomicroscopy provide that X-ray crystallography and NMR spectroscopy cannot?”, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, vol. 23, pp. 233–255, 1993.
- [83] N. Vaidehi, J. E. Pease and R. Horuk, “Modeling small molecule-compound binding to G-proteincoupled receptors”, *Methods in Enzymology*, vol. 460, pp. 263–288, 2009.
- [84] M. Punta, L. R. Forrest, H. Bigelow, A. Kernytsky, J. Liu and B. Rost, “Membrane protein prediction methods”, *Methods*, vol. 41, no. 4, pp. 460–474, 2007.
- [85] K. Ginalski, “Comparative modeling for protein structure prediction”, *Structural Biology*, vol. 16, pp. 172–177, 2006.
- [86] G. Stoesser, P. Sterk, M. A. Tuli, P. J. Stoehr and G. N. Cameron, “The EMBL nucleotide sequence database”, *Nucleic Acids Research*, vol. 25, pp. 7–13, 1997.

- [87] P. Bradley, K. M. Misura and D. Baker, “Toward high-resolution *de novo* structure prediction for small proteins”, *Science*, vol. 309, pp. 1868–1871, 2005.
- [88] D. Baker and A. Sali, “Protein structure prediction and structural genomics”, *Science*, vol. 294, pp. 93–96, 2001.
- [89] E. Krieger, S. B. Nabuurs and G. Vriend, “Homology modeling”, *Methods of Biochemical Analysis*, vol. 44, pp. 509–523, 2003.
- [90] Ch. S. Reddy, K. Vijayasarathy, E. Srinivas, G. M. Sastry and G. N. Sastry, “Homology modeling of membrane proteins: A critical assessment”, *Computational Biology and Chemistry*, vol. 30, pp. 120–126, 2006.
- [91] R. L. Dunbrack Jr and M. Karplus, “Conformational analysis of the backbone dependent rotamer preferences of protein side chains”, *Nature Structural Biology*, vol. 5, pp. 334–340, 1993.
- [92] C. Chothia and A. M. Lesk, “The relation between the divergence of sequence and structure in proteins”, *EMBO Journal*, vol. 5, pp. 823–36, 1986.
- [93] C. Sander and R. Schneider, “Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment”, *Proteins*, vol. 9, pp. 56–68, 1991.
- [94] B. J. Alder and T. E. Wainwright, “Phase transition for a hard sphere system”, *Journal of Chemical Physics*, vol. 27, no. 5, pp. 1208–1209, 1957.
- [95] B. J. Alder and T. E. Wainwright, “Studies in molecular dynamics. I. General method”, *Journal of Chemical Physics*, vol. 31, no. 2, pp. 459–466, 1959.
- [96] J. A. McCammon, B. R. Gelin and M. Karplus, “Dynamic of folded proteins”, *Nature*, vol. 267, no. 5612, pp. 585–590, 1977.
- [97] C. Kandt, W. L. Ash and D. P. Tieleman, “Setting up and running molecular dynamics simulations of membrane proteins”, *Methods*, vol. 41, no. 4, pp. 475–488, 2008.
- [98] D. P. Tieleman, S. J. Marrink and H. J. C. Berendsen, “A computer perspective of membranes: molecular dynamics studies of lipid bilayer systems”, *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1331, pp. 235–270, 1997.
- [99] T. Hansson, C. Oostenbrink and W. F. Van Gunsteren, “Molecular dynamics simulations”, *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 12, pp. 190–196, 2002.
- [100] J. C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R. D. Skeel, L. Kale and K. Schulten, “Scalable molecular dynamics with NAMD”, *Journal of Computational Chemistry*, vol. 26, pp. 1781–1802, 2005.
- [101] M. Bhandarkar, R. Brunner, C. Chipot, A. Dalke, S. Dixit, P. Grayson, J. Gullingsrud, A. Gursoy, D. Hardy, W. Humphrey, et al., “NAMD user’s guide”, *Urbana*, vol. 51, p. 61801, 2003.

- [102] D. P. Tieleman and H. J. Berendsen, “Molecular dynamics simulations of a fully hydrated dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer with different macroscopic boundary conditions and parameters”, *Journal of Chemical Physics*, vol. 105, pp. 4871–4880, 1996.
- [103] Y. Zhang, S. E. Feller, B. R. Brooks and R. W. Pastor, “Computer simulation of liquid/liquid interfaces. I. Theory and application to octane/water”, *Journal of Chemical Physics*, vol. 103, pp. 10252–10266, 1995.
- [104] S. E. Feller, Y. Zhang, R. W. Pastor, “Computer simulation of liquid/liquid interfaces. II. Surface tension-area dependence of a bilayer and a monolayer”, *Journal of Chemical Physics*, vol. 103, pp. 10267–10276, 1995.
- [105] S. E. Feller and R. W. Pastor, “On simulating lipid bilayers with an applied surface tension: periodic boundary conditions and undulations”, *Biophysics Journal*, vol. 71, pp. 1350–1355, 1996.
- [106] F. Jahnig, “What is the surface tension of a lipid bilayer membrane?”, *Biophysics Journal*, vol. 71, pp. 1348–1349, 1996.
- [107] K. Tu, D. J. Tobias and M. L. Klein, “Constant pressure and temperature molecular dynamics simulation of a fully hydrated liquid crystal phase dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer”, *Biophysics Journal*, vol. 69, pp. 2558–2562, 1995.
- [108] S. W. Chiu, M. Clark, V. Balaji, S. Subramaniam, H. L. Scott and E. Jakobsson, “Incorporation of surface tension into molecular dynamics simulation of an interface: A fluid phase lipid bilayer membrane”, *Biophysics Journal*, vol. 69, no. 4, pp. 1230–1245, 1995.
- [109] G. J. Martyna, D. J. Tobias and M. L. Klein, “Constant pressure molecular dynamics algorithms”, *Journal of Chemical Physics*, vol. 101, pp. 4177–4189, 1994.
- [110] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. Van Gunsteren, A. DiNola and J. R. Haak, “Molecular dynamics with coupling to an external bath”, *Journal of Chemical Physics*, vol. 81, pp. 3684–3689, 1984.
- [111] S. E. Feller, Y. Zhang and R. W. Pastor, “Constant pressure molecular dynamics simulation: the langevin piston method”, *Journal of Chemical Physics*, vol. 103, pp. 4613–4621, 1995.
- [112] G. J. Martyna, M. E. Tuckerman, D. J. Tobias and M. L. Klein, “Explicit reversible integrators for extended system dynamics”, *Molecular Physics*, vol. 87, pp. 1117–1157, 1996.
- [113] F. Sievers, A. Wilm, D. G. Dineen, T. J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Söding, et al., “Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega”, *Molecular Systems Biology*, vol. 7, p. 539, 2011.

- [114] A. M. Waterhouse, J. B. Procter, D. M. A. Martin, M. Clamp and G. J. Barton, "Jalview Version 2 – a multiple sequence alignment editor and analysis workbench", *Bioinformatics* 25, vol. 9, pp. 1189–1191, 2009.
- [115] U. Omasits, C. H. Ahrens, S. Müller and B. Wollscheid, "Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data", *Bioinformatics*, vol. 30, no. 6, pp. 884–886, 2014.
- [116] S. F. Altschul, T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman, "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Research*, vol. 25, pp. 3389-3402, 1997.
- [117] N. Eswar, M. A. Marti-Renom, B. Webb, M. S. Madhusudhan, D. Eramian, M. Shen, U. Pieper and A. Sali "Comparative Protein Structure Modeling With Modeller" *Current Protocols in Bioinformatics*, John Wiley & Sons, Inc., Supplement 15, pp. 5.6.1–5.6.30, 2006.
- [118] S. C. Lovell, I. W. Davis, W. B. Arendall III, P. I. W. de Bakker, J. M. Word, M. G. Prisant, J. S. Richardson and D. C. Richardson, "Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation", *Proteins: Structure, Function & Genetics*, vol. 50, pp. 437–450, 2002.
- [119] M. Wiederstein and M. J. Sippl, "ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins", *Nucleic Acids Research* 35, W407-W410, 2007.
- [120] M. J. Sippl, "Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins", *Proteins*, vol. 17, pp. 355-362, 1993.
- [121] J. C. Gordon, J. B. Myers, T. Folta, V. Shoja, L. S. Heath and A. Onufriev, "H++: a server for estimating pKas and adding missing hydrogens to macromolecules", *Nucleic Acids Research*, vol. 33, pp. W368–W371, 2005.
- [122] V. Tech, "H++: Web-based computational prediction of protonation states", [en línea] <<http://biophysics.cs.vt.edu/>>, Consulta: Abril 2015.
- [123] W. Humphrey, A. Dalke and K. Schulten, "VMD – Visual Molecular Dynamics", *Journal of Molecular Graphics*, vol. 14, pp. 33–38, 1996.
- [124] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng and T. E. Ferrin, "UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis", *Journal of Computational Chemistry*, vol. 25, no. 13, pp. 1605–12, 2004.
- [125] N. A. Baker, D. Sept, S. Joseph, M. J. Holst and J. A. McCammon, "Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 98, no. 18, pp. 10037–10041, 2001.

- [126] UniProt, “UniProtKB Search: nramp family AND reviewed:yes”, [en línea] <<http://www.uniprot.org/uniprot/?query=nramp+family+AND+reviewed%3Ayes&sort=score>>, Consulta: Agosto 2015.
- [127] M. A. Marti-Renom, A. C. Stuart, A. Fiser, R. Sanchez, F. Melo and A. Sali, “Comparative protein structure modeling of genes and genomes”, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, vol. 29, pp. 291-325, 2000.
- [128] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov and P.E. Bourne, “The Protein Data Bank”, *Nucleic Acids Research*, vol. 28, pp. 235–242, 2000.
- [129] N. Eswar, B. Webb, M. A. Marti-Renom, M. S. Madhusudhan, D. Eramian, M. Shen, U. Pieper and A. Sali, “Comparative protein structure modeling using Modeller”, *Current Protocols in Bioinformatics*, Chapter 5: Unit 5.6, 2006.
- [130] M. Shen and A. Sali, “Statistical potential for assessment and prediction of protein structures”, *Protein Science*, vol. 15, no. 11, pp. 2507–2524, 2006.
- [131] G. N. Ramachandran, C. Ramakrishnan and V. Sasisekharan, “Stereochemistry of polypeptide chain configurations”, *Journal of Molecular Biology*, vol. 7, pp. 95–99, 1963.
- [132] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, and M. L. Klein, “Comparison of simple potential functions for simulating liquid water”, *The Journal of Chemical Physics*, vol. 79, no. 2, pp. 926–935, 1983.
- [133] E. Lindahl, B. Hess and D. Van der Spoel, “Gromacs 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis”, *Journal of Molecular Modeling*, vol. 7, pp. 306–317, 2001.
- [134] A. Bakan, L. M. Meireles and I. Bahar, “ProDy: protein dynamics inferred from theory and experiments”, *Bioinformatics*, vol. 27, no. 11, pp. 1575–1577, 2011.
- [135] P. Sampathkumar, S. J. Kim, P. Upla, W. J. Rice, J. Phillips, B. L. Timney, U. Pieper, J. B. Bonanno, J. Fernandez-Martinez, Z. Hakhverdyan, et al, “Structure, dynamics, evolution, and function of a major scaffold component in the nuclear pore complex”, *Structure*, vol. 21, no. 4, pp. 560–571, 2013.
- [136] S. Weyand, T. Shimamura, S. Yajima, S. Suzuki, O. Mirza, K. Krusong, E. P. Carpenter, N. G. Rutherford, J.M. Hadden, J. O'Reilly, et al, “Structure and molecular mechanism of a nucleobase-cation-symport-1 family transporter”, *Science*, vol. 322, no. 5902, pp. 709–713, 2008.
- [137] L. Cocquerel, C. Wychowski, F. Minner, F. Penin and J. Dubuisson, “Charged residues in the transmembrane domains of hepatitis C virus glycoproteins play a major role in the processing, subcellular localization, and assembly of these envelope proteins”, *Journal of Virology*, vol. 74, no. 8, pp. 3623–3633, 2000.

[138] M. Lerch-Bader, C. Lundin, H. Kim, I. Nilsson and G. Von Heijne, “Contribution of positively charged flanking residues to the insertion of transmembrane helices into the endoplasmic reticulum”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 11, pp. 4127–4132, 2007.

[139] M. Bañó-Polo, C. Baeza-Delgado, M. Orzáez, M. A. Marti-Renom, C. Abad and I. Mingarro, “Polar/ionizable residues in transmembrane segments: effects on helix-helix packing”, *PloS One*, vol. 7, no. 9, 2012.

[140] T. Hoang, T. Matovic, J. Parker, M. D. Smith and M. Jelokhani-Niaraki, “Role of positively charged residues of the second transmembrane domain in the ion transport activity and conformation of human uncoupling protein-2”, *Biochemistry*, vol. 54, no. 14, pp. 2303–2313, 2015.

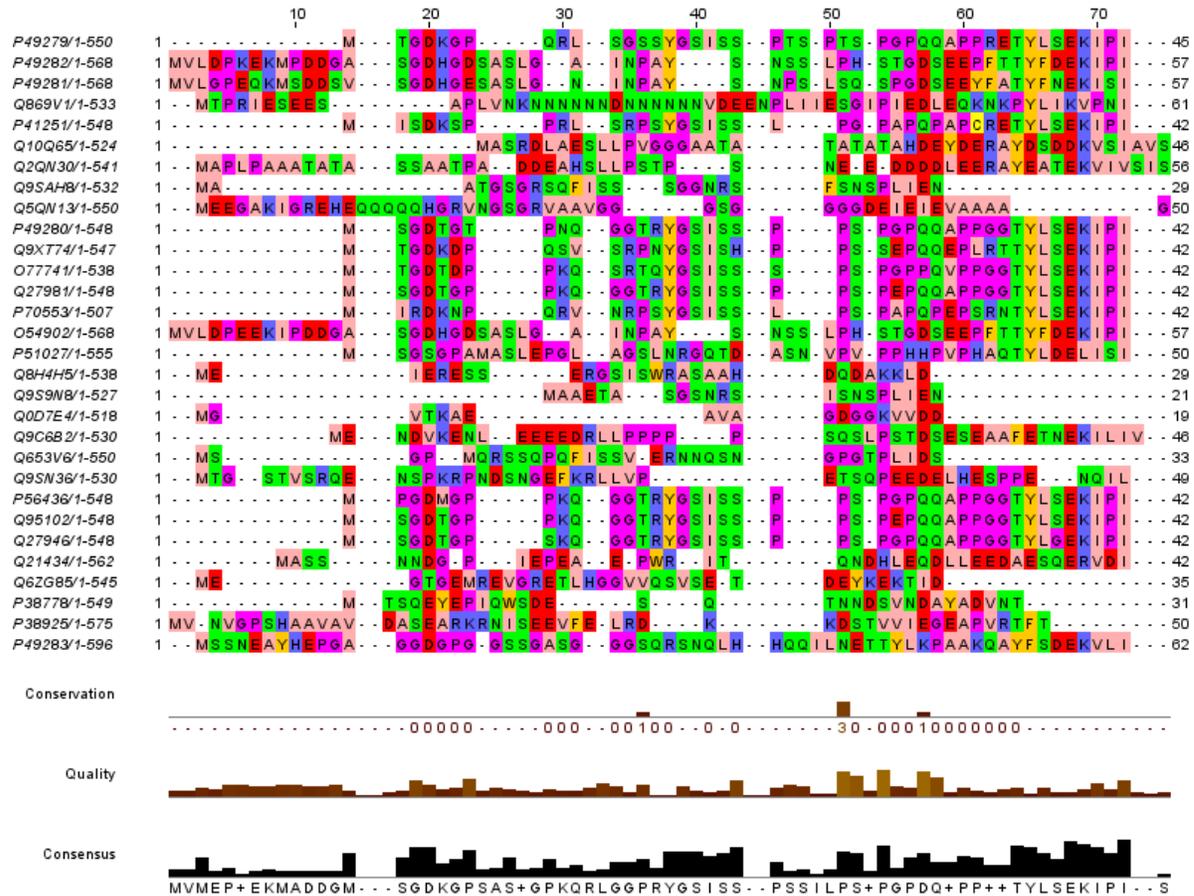
[141] J. L. Petersen, H. D. Hickman-Miller, M. M. McIlhaney, S. E. Vargas, A. W. Purcell, W. H. Hildebrand and J. C. Solheim, “A charged amino acid residue in the transmembrane/cytoplasmic region of tapasin influences MHC Class I assembly and maturation”, *Journal of Immunology*, vol. 174, pp. 962–969, 2005.

[142] C. Manoharan, C. Manoharan, M. C. Wilson, R. B. Sessions and A. P. Halestrap, “The role of charged residues in the transmembrane helices of monocarboxylate transporter 1 and its ancillary protein basigin in determining plasma membrane expression and catalytic activity”, *Molecular Membrane Biology*, vol. 23, no. 6, pp. 486–498, 2006.

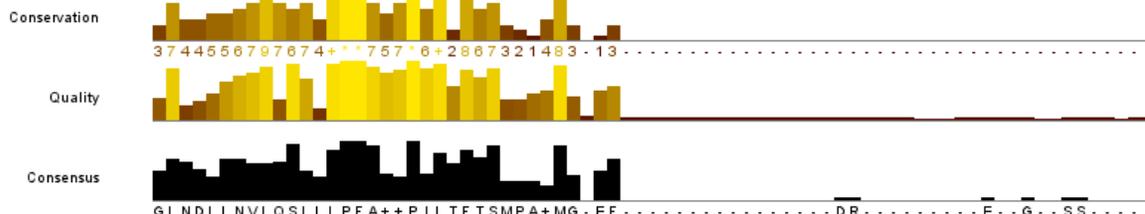
Anexos

Anexo 1: Alineamientos Múltiples Familia Nramp

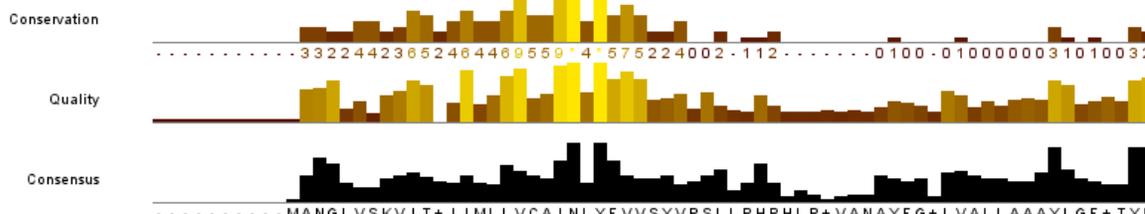
Anexo 1.1: Alineamiento Múltiple Eucariontes



	530	540	550	560	570	580	590		
P49279/1-550	426	GLNDLLNVLQSLLLPF	AVLP	ILTF	TSMPTLMQ	EF	459	
P49282/1-568	437	GMNDFLNVLQSLQLP	FALIP	ILTF	TSLRPVMS	EF	470	
P49281/1-568	437	GMNDFLNVLQSLQLP	FALIP	ILTF	TSLRPVMS	DF	470	
Q869V1/1-533	412	SLDQWLNILQSIQLP	FVAVP	VLLFT	TSSEKIMG	SKF	446	
P41251/1-548	423	GLNDLLNVLQSLLLPF	AVLP	ILTF	TSMPAVMQ	EF	456	
Q10Q65/1-524	416	ILNEALNVLQSIQIP	FALIP	PLIT	LVSKQVIMG	SF	449	
Q2QN30/1-541	432	VLNEWLNVLQSIQIP	FALIP	PLIT	LVSKQVIMG	VF	465	
Q9SAHB/1-532	392	KLIIIASMILSFE	LPFALV	LLKFT	SCKTKMG	SH	425	
Q5QN13/1-550	415	RIINIAAIVL	SFVLPF	FALIP	PLIKFSSSCTNIG	PY	448	
P49280/1-548	423	GLNDLLNVLQSLLLPF	AVLP	ILTF	TSMPALMQ	EF	456	
Q9XT74/1-547	423	GLNDLLNVLQSLLLPF	AVLP	ILTF	TSMPALMQ	EF	456	
O7774/1-538	423	GLNDLLNVLQSLLLPF	AVLP	ILTF	TSMPALMQ	EF	456	
Q27981/1-548	423	GLNDLLNVLQSLLLPF	AVLP	ILTF	TSMPALMQ	EF	456	
P70553/1-507	382	GLNDLLNVLQSLLLPF	AVLP	ILTF	TSMPAVMQ	EF	415	
O54902/1-568	437	GMNDFLNVLQSLQLP	FALIP	ILTF	TSLRPVMS	EF	470	
P51027/1-555	431	GMNDFLNVLQSIQLP	FALVPL	FTSL	RLPLMH	DF	464	
Q8H4H5/1-538	390	RLIIIASMILSFE	LPFALIP	LLKFS	SSSKSKMG	PH	423	
Q9S9WB/1-527	384	KLIIIASMILSFE	LPFALV	LLKFT	SCKTKMG	SH	417	
Q007E4/1-518	381	RLIVIASMILSFE	LPFALIP	LLKFS	SSSKSKMG	EN	414	
Q9C6B2/1-530	414	VLNEWLNVLQSVQIP	FALLP	LLTLV	SKQVIMG	DF	447	
Q653V6/1-550	396	QLIIIASMILSFE	LPFALV	LLKFT	SSRTKMG	QH	429	
Q9SN36/1-530	416	VLNEWLNILQSMQIP	FAVIP	LLTMV	SNEHIMG	VF	449	
P56436/1-548	423	GLNDLLNVLQSLLLPF	AVLP	ILTF	TSMPAVMQ	EF	456	
Q95102/1-548	423	GLNDLLNVLQSLLLPF	AVLP	ILTF	TSMPALMR	EF	456	
Q27946/1-548	423	GLNDLLNVLQSLLLPF	AVLP	ILTF	TSMPALMQ	EF	456	
Q21434/1-562	425	GMNDFLNCVQMIQLP	FALIP	ILTF	TSSRKIMH	DF	468	
Q6ZG85/1-545	397	KLIIILSMLSFE	LPFALIP	LLKFC	NSKKVIMG	PL	430	
P38778/1-549	428	GALNASQVVL	SLLPFV	APLLY	FTSKKIMRVQL	NR	TKELRRTDKKPVADRTEDEETIELEEMGIGSSSQRSS	502	
P38925/1-575	460	KALNASQVVL	SIVLPFL	VAPLI	FFTC	KSI	IMKTEITVDHTEEDSHNHQNNDRSAGS	528	
P49283/1-596	440	SMNDILN	AVMSLQ	LFFAAI	PTIAF	TSCAA	IMG	EF	482

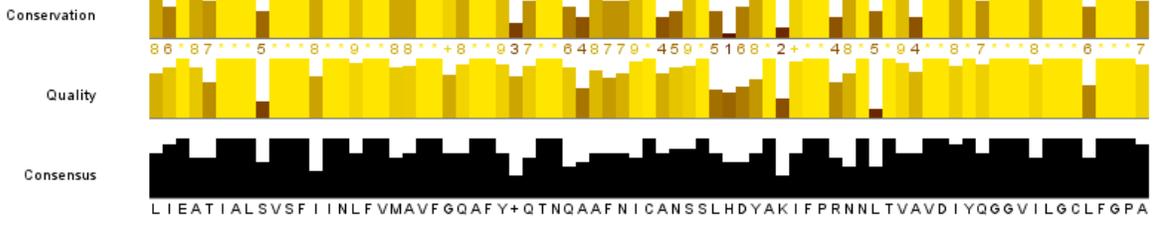


	610	620	630	640	650	660	670																																																
P49279/1-550	460	ANGLLNKVV	TSSIMVLVCA	INLYF	VVSYLPSL	PHF	514																																															
P49282/1-568	471	ANGIGWR	IAGGLVLLVCS	INMYF	VVVVYDEL	GHV	525																																															
P49281/1-568	471	ANGIGWR	IAGGLVLLVCS	INMYF	VVVVYRDL	GHV	525																																															
Q869V1/1-533	467	KNHWL	NNGFVRFL	SLLII	AINIYLII	TFSMQI	SES	502																																														
P41251/1-548	467	ANGRMSKAI	TSCIMALVCA	INLYF	VVSYLPSL	PHF	511																																															
Q10Q65/1-524	460	VVGPITKVI	SWIVTFL	MLING	YLILSFYATE	VRG	505																																															
Q2QN30/1-541	426	KIGRNTQAV	TWTVATLLI	TINGY	LLDFFSSE	IRG	521																																															
Q9SAHB/1-532	466	VNPMAT	TALTWVIGGL	IMGIN	IYYLV	SSFIKLLI	HSHM	KLILVVF	CGILGFAGIALYLA	AIAYL	489																																												
Q5QN13/1-550	449	KNATSII	RIAWILSL	VIIGIN	IYF	CTSFVAWL	VHS	DLPR	VVNAI	ISSLV	PFMAAY	IAALI	Y	512																																									
P49280/1-548	467	ANGLVSKII	TSSIMVLVCA	INLYF	VVSYLPSL	PHF	511																																															
Q9XT74/1-547	457	ANGRLSKAI	TSCIMALVCA	INLYF	VVSYLPSL	PHF	511																																															
O7774/1-538	457	ASGRV	NKVI	TSSIM	VLVCA	INLYF	VVSYLPSL	PHF	511																																													
Q27981/1-548	467	ANGLVSKVI	TSSIMVLVCA	INLYF	VVSYLPSL	PHF	511																																															
P70553/1-507	416	ANGWLSKVI	TSCIMALVCA	INLYF	VVSYLPSL	PHF	470																																															
O54902/1-568	471	ANGIGWR	IAGGLVLLVCS	INMYF	VVVVYDEL	GHV	525																																															
P51027/1-555	465	ANGLLG	VLMSLITGLVCA	INMYF	VVDL	FLPTL	RGL	519																																														
Q8H4H5/1-538	424	KNSIY	IIVG	SWFLGL	LIIIG	INMYF	LS	TSFV	GWLI	HNDLP	KYAN	LV	LGAA	V	FAV	V	Y	487																																					
Q9S9WB/1-527	418	ANSLVI	SSVTW	IIGGL	IMGIN	IYYLV	SSFIKLL	HSHM	NLVA	IV	FLG	VLF	SGI	ATY	LA	AI	Y	481																																					
Q007E4/1-518	415	KNSIY	IIVG	SWFLG	LVIIIG	INMYF	LS	TSKLV	GWIL	HNAL	PTFAN	VL	I	IV	FL	ML	LLY	V	V	AV	Y	478																																	
Q9C6B2/1-530	448	KIGPIL	RIAWT	VAAAL	MI	INGY	LLD	FFV	SE	VDG	FL	F	GV	T	CV	WT	T	AY	I	A	F	I	V	Y	503																													
Q653V6/1-550	430	TNSKAI	SVITW	IG	GFIV	INTY	FLIT	SFV	KLL	HN	GL	STV	SG	V	FG	I	F	G	L	M	L	I	Y	MA	A	I	Y	493																											
Q9SN36/1-530	460	KIGP	SL	EKLAW	TVA	FV	MMI	NGY	LLD	FF	MAE	VEG	F	L	V	G	F	L	V	F	G	V	V	G	Y	S	F	I	Y	505																								
P56436/1-548	467	ANGLVSKVI	SSS	IMVLVCA	INLYF	VVSYLPSL	PHF	511																																														
Q95102/1-548	467	ANGLVSKVI	TSSIMVLVCA	INLYF	VVSYLPSL	PHF	511																																															
Q27946/1-548	467	ANGLVSKVI	TSSIMVLVCA	INLYF	VVSYLPSL	PHF	511																																															
Q21434/1-562	469	RSSKVF	QIFAL	ITS	ALIS	INMYF	LS	SDY	V	FSR	LGS	E	W	Y	I	M	V	L	A	P	I	T	F	A	V	L	F	V	Y	515																								
Q6ZG85/1-545	431	KESI	YTV	I	AWIL	S	F	A	L	I	V	V	N	T	Y	F	L	V	W	T	Y	V	D	W	L	V	H	N	L	P	K	Y	A	N	G	L	I	S	V	V	V	F	A	L	M	A	A	Y	L	V	A	V	V	Y	404
P38778/1-549	503	LVS	P	A	P	E	Y	K	D	M	S	N	G	M	I	V	L	A	I	V	W	L	I	S	G	L	N	F	Y	M	L	L	G	F	T	T	G	K	E	V	H	L	549										
P38925/1-575	529	ENGK	Q	V	K	I	V	Y	M	A	N	N	W	I	I	T	V	A	I	V	W	L	F	L	L	N	V	Y	A	I	V	L	G	M	S	H	G	D	I	S	575													
P49283/1-596	483	VNGL	G	N	K	I	V	S	I	L	L	T	I	V	V	I	G	V	N	L	Y	F	V	V	V	G	V	E	N	M	E	I	K	G	G	L	L	A	L	V	C	I	F	A	I	L	F	N	L	Y	538		



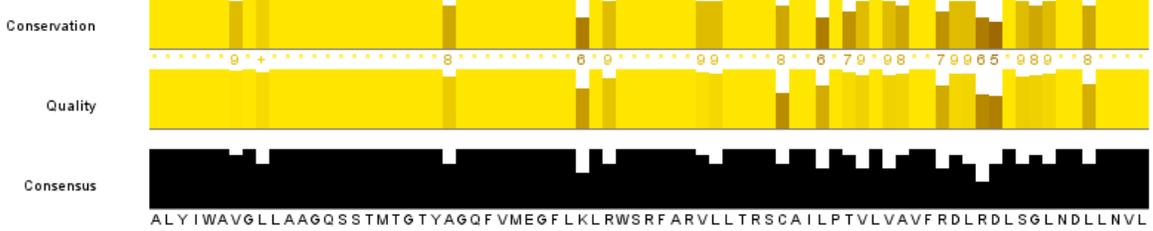
310 320 330 340 350 360 370

P49279/1-550 285 LI EAT IALSVSFIINLFVMAVFGQAFYQKTNQAAFNICANSSLDHYAKIFPRNNLTVAVDIYQGGVILGCLFGPA 359
P49282/1-568 297 FIE SCIALFVSFIINLVVSVFAEAFKTNKQVVEVCKNNS- PHADLFPNDNSTLAVDIYKGGVVLGCVFGPA 370
P49281/1-568 297 FIE SCIALFVSFIINLVVSVFAEAFKTNKQVVEVCTINTSS- PHAGLFPKDNSTLAVDIYKGGVVLGCVFGPA 370
P41251/1-548 282 LI EAT IALSVSFIINLFVMAVFGQAFYQQTNEEAFNICANSSLDNYAKIFPRNNLTVAVDIYQGGVILGCLFGPA 356
P49280/1-548 282 LI EAT IALSVSFIINLFVMAVFGQAFYKQTNQAAFNICANSSLDHYATIFPRNNLTVAVDIYQGGVILGCLFGPA 356
Q9X774/1-547 282 LI EAT IALSVSFIINLFVMAVFGQAFYQQTNEEAFNVCANSSLDHYAKIFPRNNLTVAVDIYQGGVMLGCVFGPA 356
O77741/1-538 282 LI EST IALFVSFFIINLFVMAVFGQAFYQQTNQAAFNICANSSLDHYAKIFPRNNLTVAVDIYQGGVILGCLFGPA 356
Q27981/1-548 282 LI EAT IALSVSFLIINLFVMAVFGQAFYKQTNQAAFNICANSSLDHYATIFPRNNLTVAVDIYQGGVILGCLFGPP 356
P70553/1-507 241 L TEAT IALFVSFIINLFVMAVFGQAFYQQTNEEAFNICANSSLDHYAKIFPRNNLTVAVDIYQGGVILGCLFGPA 315
O54902/1-568 297 FIE SCIALFVSFIINLVVSVFAEAFKTNKQVVEVCRNNS- PHADLFPNDNSTLAVDIYKGGVVLGCVFGPA 370
P56436/1-548 282 LI EAT IALSVSFLIINLFVMAVFGQAFYKQTNQAAFNICANSSLDHYATIFPRNNLTVAVDIYQGGVILGCLFGPA 356
Q95102/1-548 282 LI EAT IALSVSFLIINLFVMAVFGQAFYKQTNQAAFNICANSSLDHYATIFPRNNLTVAVDIYQGGVILGCLFGPA 356
Q27946/1-548 282 LI EAT IALSVSFLIINLFVMAVFGQAFYKQTNQAAFNICAKSSLDHYATIFPRNNLTVAVDIYQGGVILGCLFGPA 356



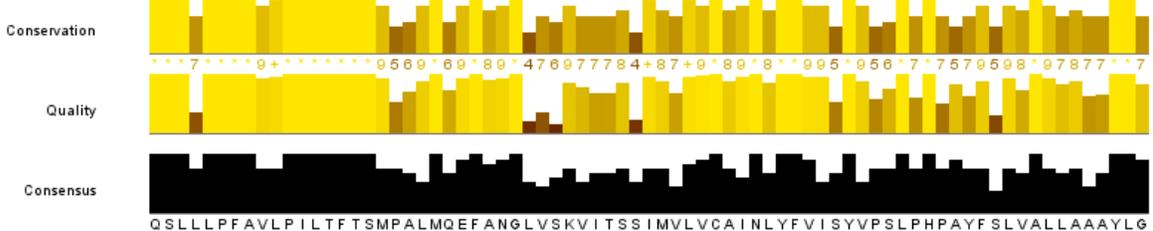
380 390 400 410 420 430 440

P49279/1-550 360 ALY IWAIGLLAAGQSSMTGTGTYAGQFVMEGFLRLRWSRFARVLLTRSCAIIPTVLLAVFRDLRDLSSGLNDLLNVL 434
P49282/1-568 371 ALY IWAIGLLAAGQSSMTGTGTYAGQFVMEGFLNLRWSRFARVLLTRSCAIIPTVLLAVFRDVEHLTGMNDFLNVL 445
P49281/1-568 371 ALY IWAIGLLAAGQSSMTGTGTYAGQFVMEGFLNLRWSRFARVLLTRSCAIIPTVLLAVFRDVEHLTGMNDFLNVL 445
P41251/1-548 357 ALY IWAIGLLAAGQSSMTGTGTYAGQFVMEGFLKLRWSRFARVLLTRSCAIIPTVLLAVFRDLKDLSSGLNDLLNVL 431
P49280/1-548 357 ALY IWAIGLLAAGQSSMTGTGTYAGQFVMEGFLKLRWSRFARVLLTRSCAIIPTVLLAVFRDLKDLSSGLNDLLNVL 431
Q9X774/1-547 357 ALY IWAIGLLAAGQSSMTGTGTYAGQFVMEGFLRRLRWSRFARVLLTRSCAIIPTVLLVFRDLKDLSSGLNDLLNVL 431
O77741/1-538 357 ALY IWAIGLLAAGQSSMTGTGTYAGQFVMEGFLKLRWSRFARVLLTRSCAIIPTVLLAVFRDLKDLSSGLNDLLNVL 431
Q27981/1-548 357 ALY IWAIGLLAAGQSSMTGTGTYAGQFVMEGFLKLRWSRFARVLLTRSCAIIPTVLLAVFRDLRDLSSGLNDLLNVL 431
P70553/1-507 316 ALY IWAIGLLAAGQSSMTGTGTYAGQFVMEGFLKLRWSRFARVLLTRSCAIIPTVLLAVFRDLRDLSSGLNDLLNVL 390
O54902/1-568 371 ALY IWAIGLLAAGQSSMTGTGTYAGQFVMEGFLNLRWSRFARVLLTRSCAIIPTVLLAVFRDVEHLTGMNDFLNVL 445
P56436/1-548 357 ALY IWAIGLLAAGQSSMTGTGTYAGQFVMEGFLKLRWSRFARVLLTRSCAIIPTVLLAVFRDLRDLSSGLNDLLNVL 431
Q95102/1-548 357 ALY IWAIGLLAAGQSSMTGTGTYAGQFVMEGFLKLRWSRFARVLLTRSCAIIPTVLLAVFRDLRDLSSGLNDLLNVL 431
Q27946/1-548 357 ALY IWAIGLLAAGQSSMTGTGTYAGQFVMEGFLKLRWSRFARVLLTRSCAIIPTVLLAVFRDLRDLSSGLNDLLNVL 431



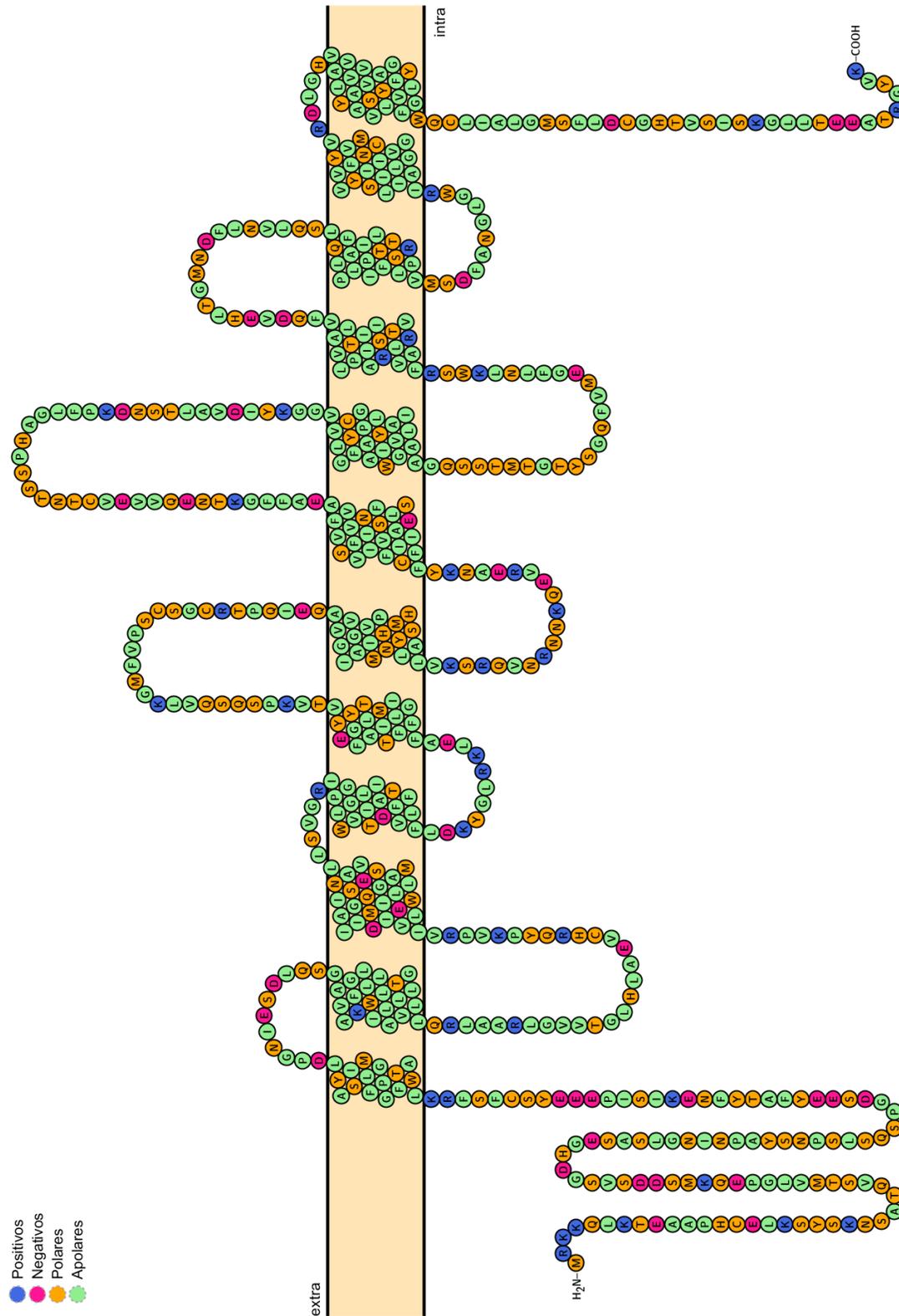
460 470 480 490 500 510 520

P49279/1-550 435 QSLLLPFAVLPILFTTSMPTLMOEFANGLLNKVVTSIMVLVCAINLYFVVSYPVSLPHPAYFGLAALLAAAYLG 509
P49282/1-568 446 QSLLLPFAVLPILFTTSLRPVMSSEFNGIGWRIAGGLVLLVCSINMYFVVVVYDELGHVALYVVAAVVSVAYLT 520
P49281/1-568 446 QSLLLPFAVLPILFTTSLRPVMSSEFANGLGWRIAGGLVLLVCSINMYFVVVVYRDLGHVALYVVAAVVSVAYLG 520
P41251/1-548 432 QSLLLPFAVLPILFTTSMPAVMOEFANGRMSKAITSSIMALVCAINLYFVVSYPVSLPHPAYFGLVALLFAIGYLG 506
P49280/1-548 432 QSLLLPFAVLPILFTTSMPALMOEFANGLVSKVIITSSIMVLVCAINLYFVVSYPVSLPHPAYFSLVALLAAAYLG 506
Q9X774/1-547 432 QSLLLPFAVLPILFTTSMPALMOEFANGRLSKAITSFIMALVCAINLYFVVSYPVSLPHPAYFGLVALLAVIYLG 506
O77741/1-538 432 QSLLLPFAVLPILFTTSMPALMOEFASGRVNVKVIITSSIMLLVCAINLYFVVSYPVSLPHPAYFGLVALLAVIYLG 506
Q27981/1-548 432 QSLLLPFAVLPILFTTSMPALMOEFANGLVSKVIITSSIMVLVCAINLYFVVSYPVSLPHPAYFSLVALLAAAYLG 506
P70553/1-507 391 QSLLLPFAVLPILFTTSMPAVMOEFANGVLSKVIITSSIMALVCAINLYFVVSYPVSLPHPAYFGLVALLAIGYLG 485
O54902/1-568 446 QSLLLPFAVLPILFTTSLRPVMSSEFNGIGWRIAGGLVLLVCSINMYFVVVVYDELGHVALYVVAAVVSVAYLT 520
P56436/1-548 432 QSLLLPFAVLPILFTTSMPAVMOEFANGVLSKVIITSSIMVLVCAINLYFVVSYPVSLPHPAYFSLVALLAAAYLG 506
Q95102/1-548 432 QSLLLPFAVLPILFTTSMPALMOEFANGLVSKVIITSSIMVLVCAINLYFVVSYPVSLPHPAYFSLVALLAAAYLG 506
Q27946/1-548 432 QSLLLPFAVLPILFTTSMPALMOEFANGLVSKVIITSSIMVLVCAINLYFVVSYPVSLPHPAYFSLVALLAAAYLG 506



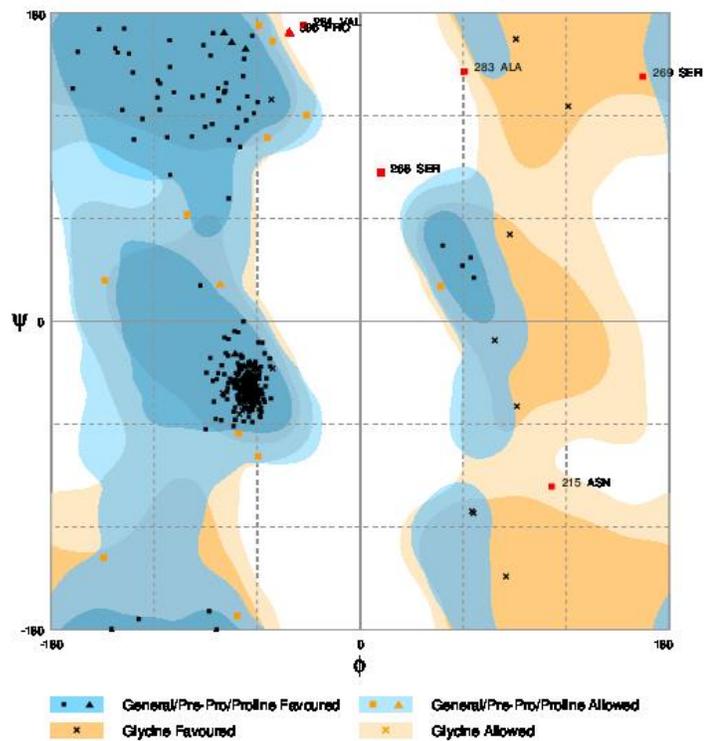
Anexo 2: Predicción Estructura 2D

Estructura 2D + Carga

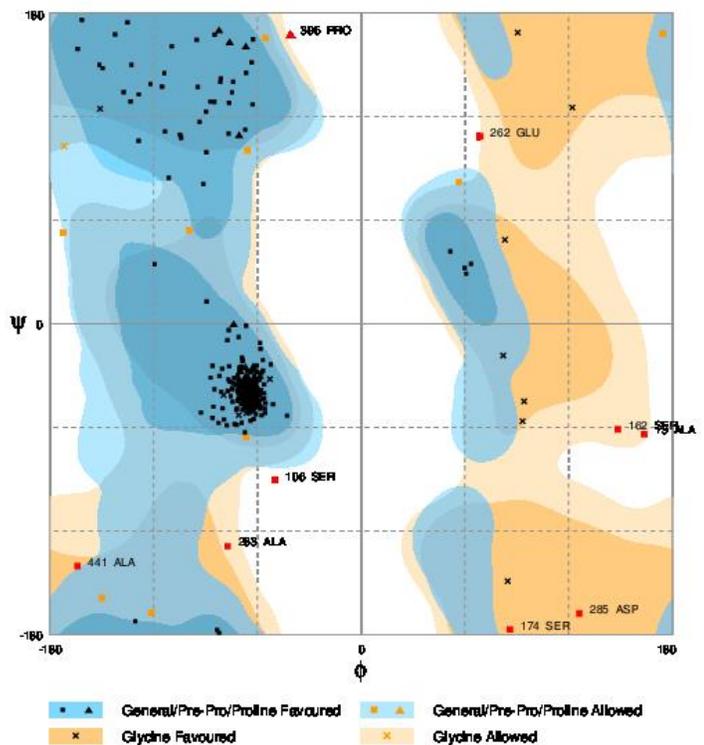


Anexo 3: Gráficos de Ramachandran Mejores Modelos

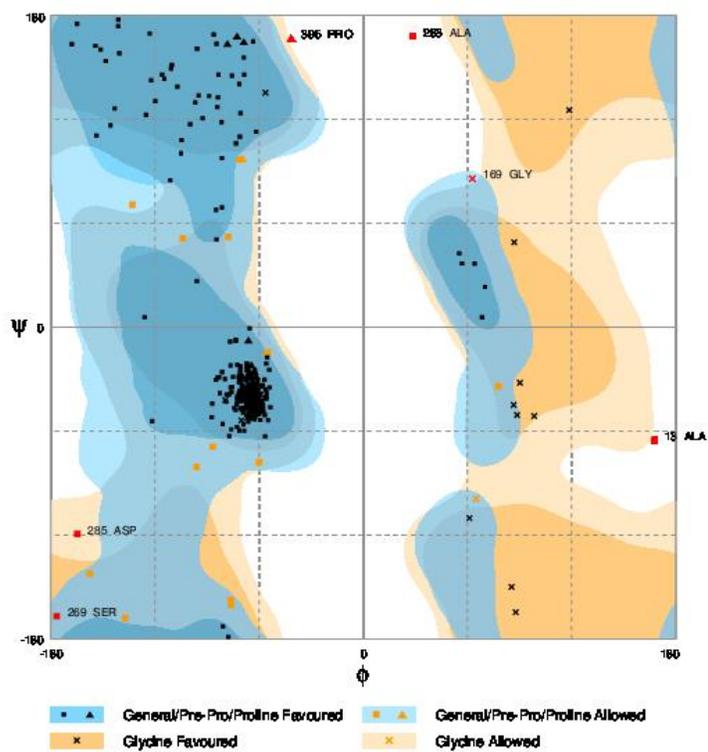
Modelo 66



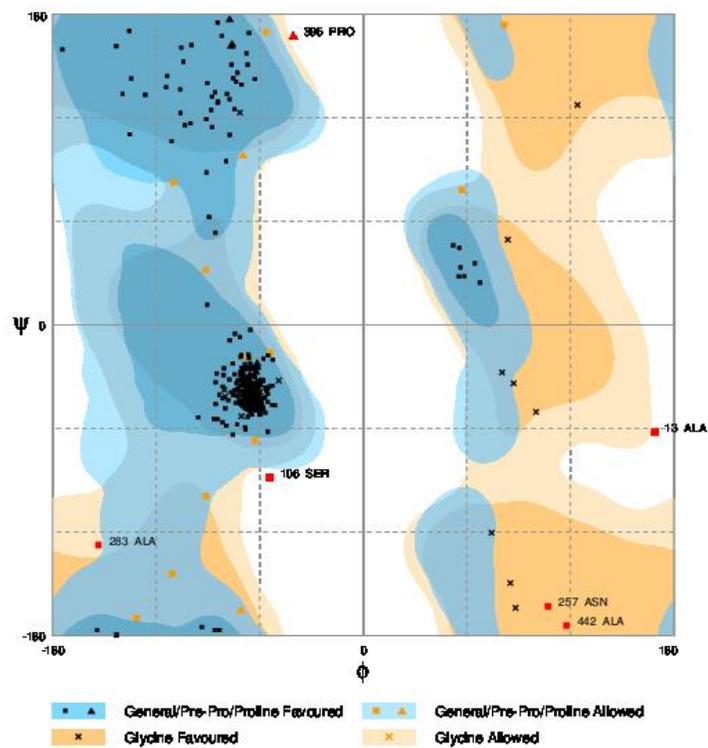
Modelo 37



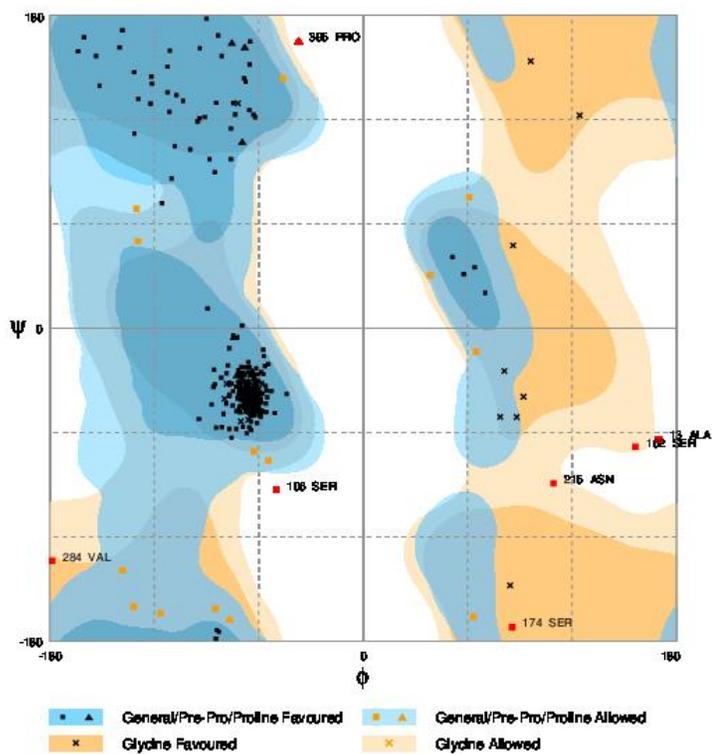
Modelo 90



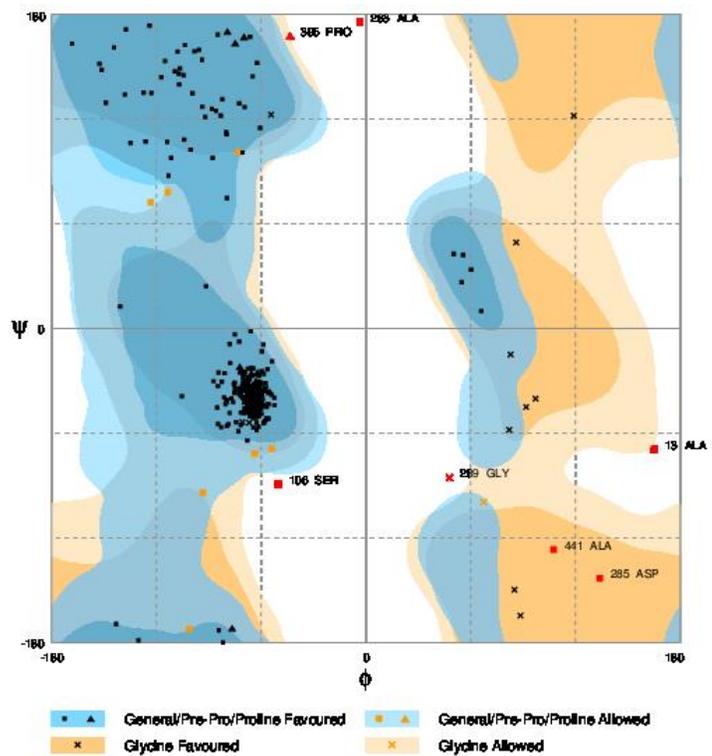
Modelo 34



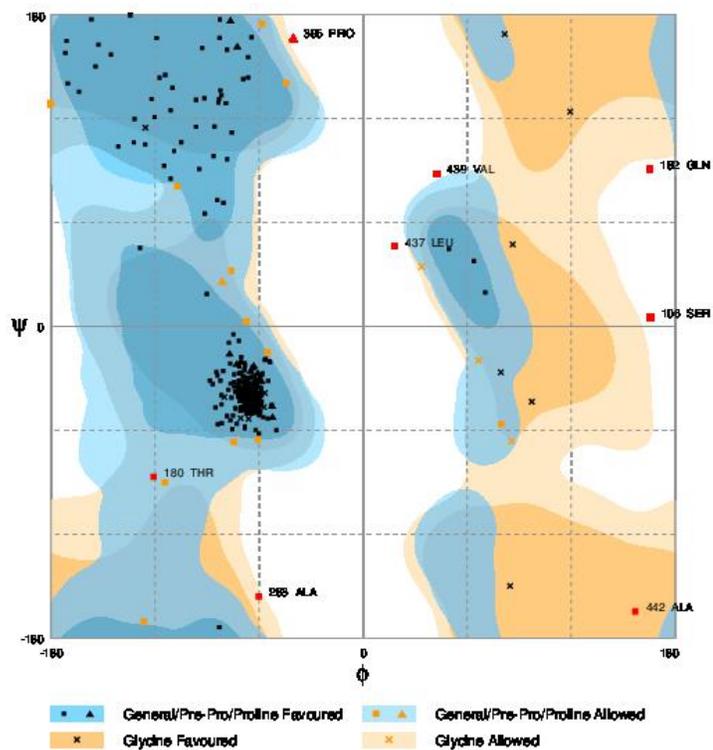
Modelo 69



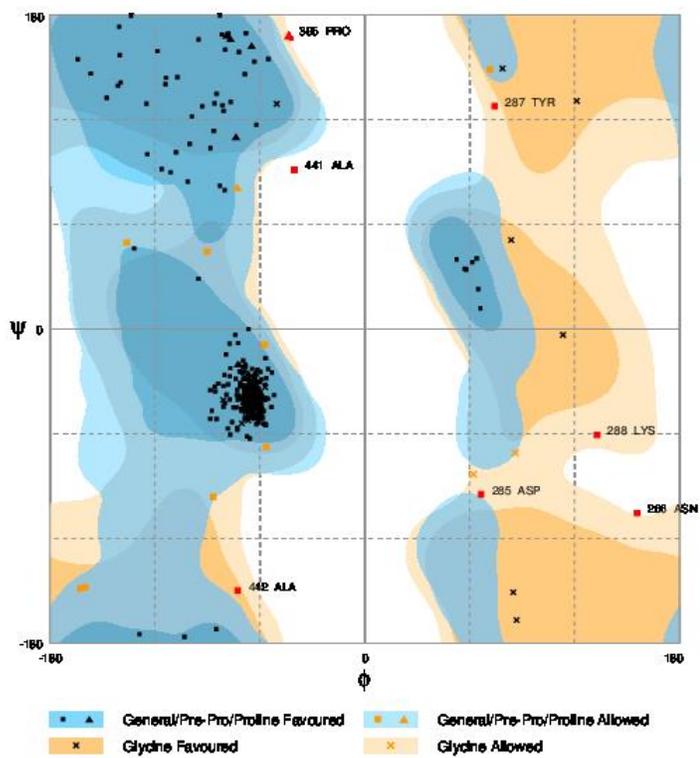
Modelo 44



Modelo 28

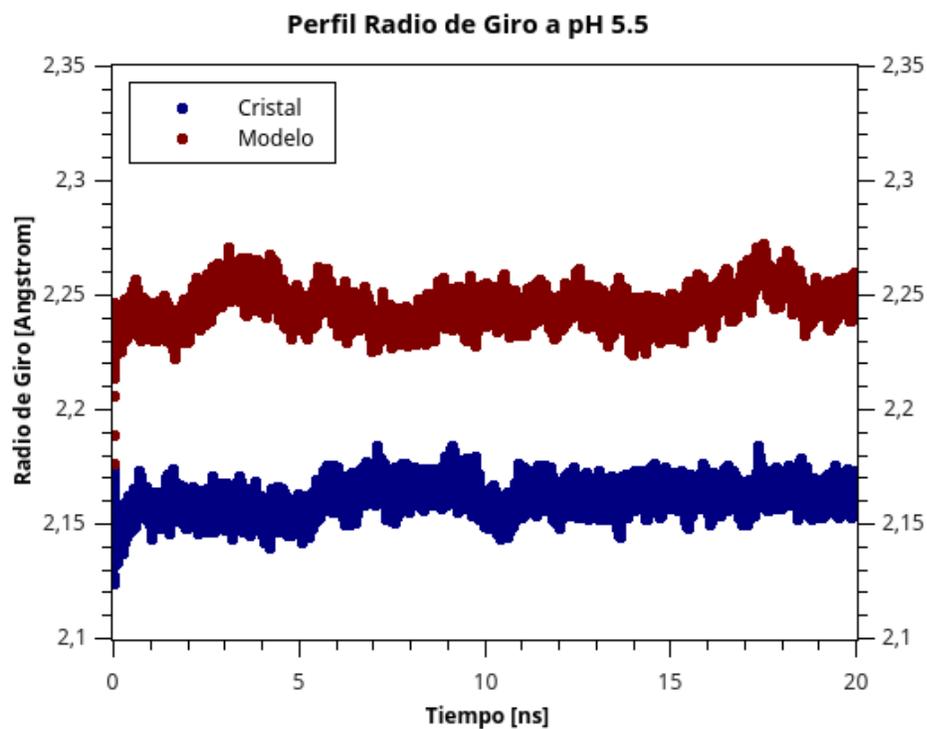
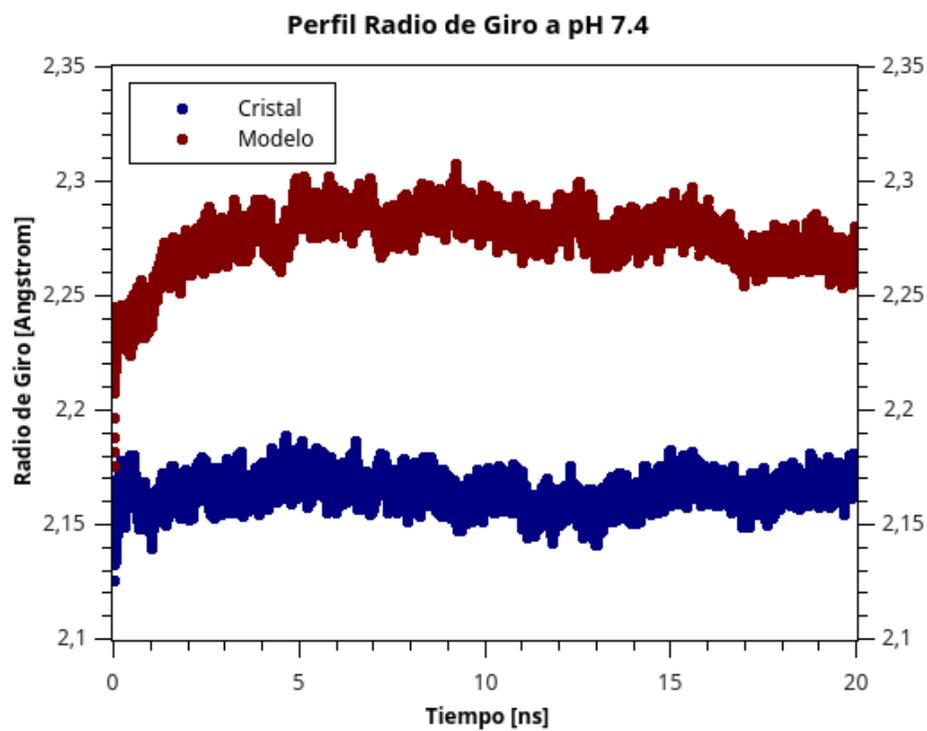


Modelo 93



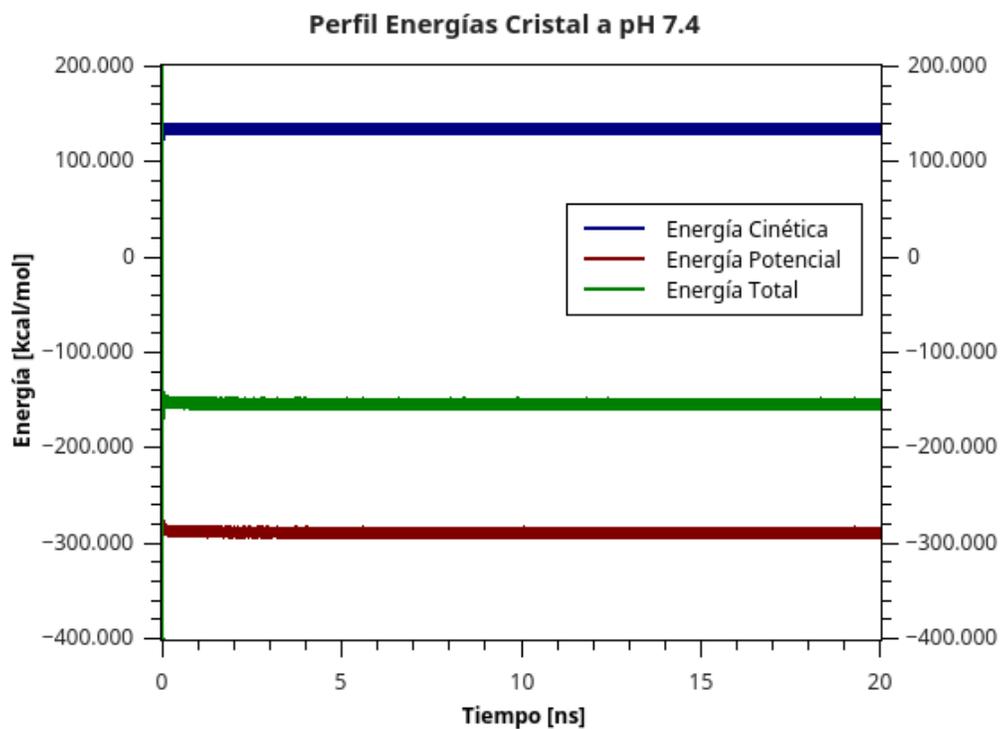
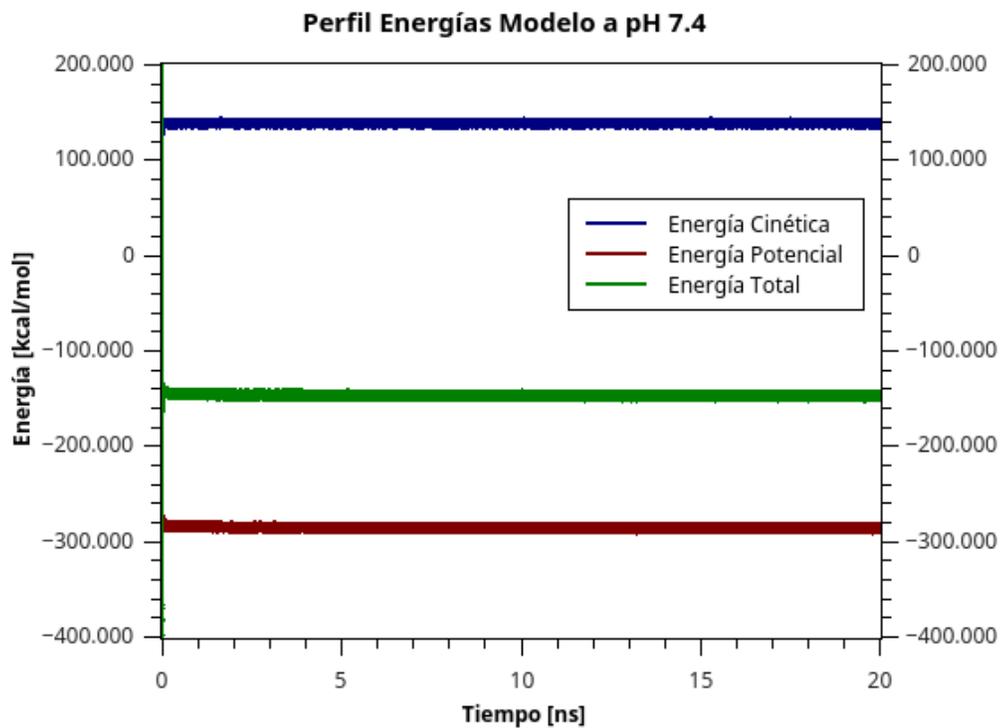
Anexo 4: Análisis Preliminares Dinámica

Anexo 4.1: Perfil Radio de Giro

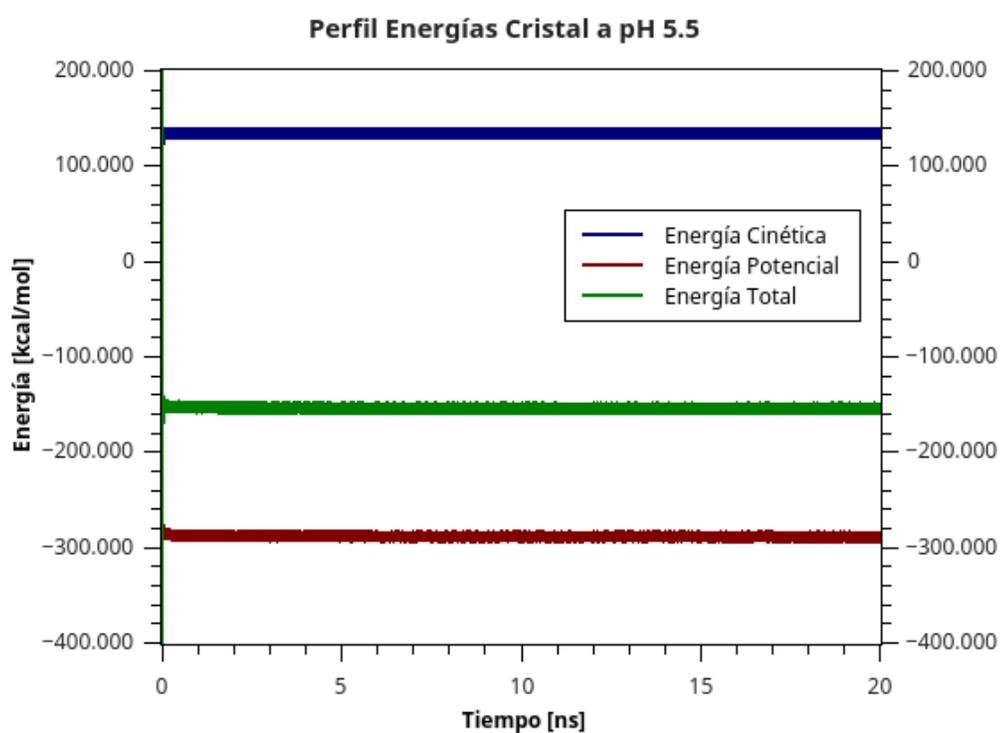
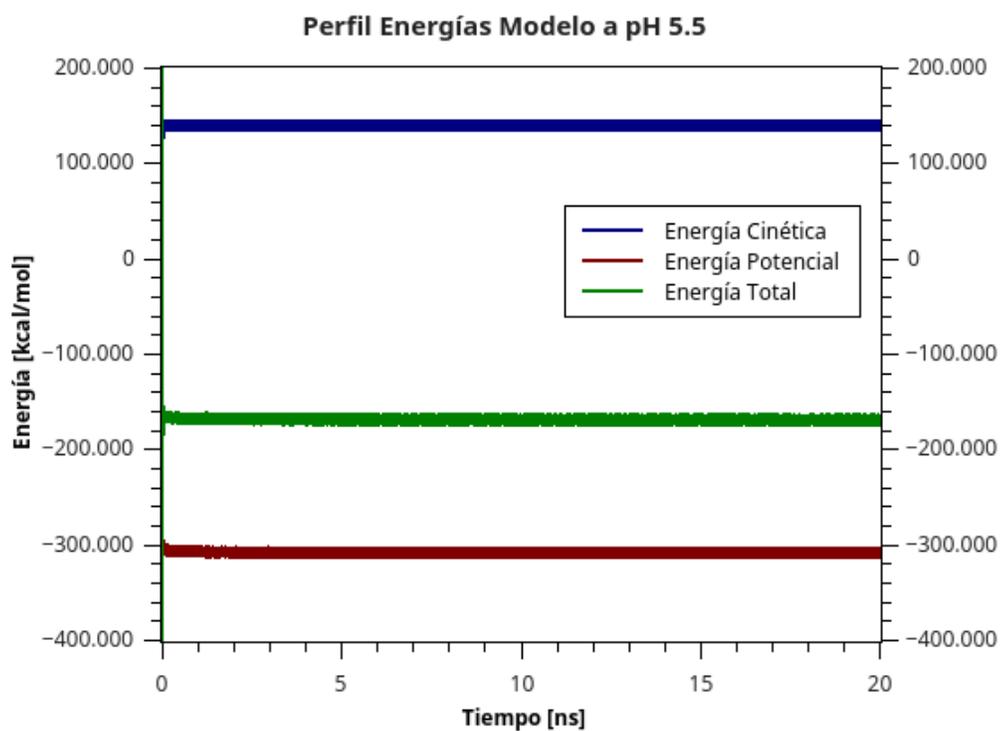


Anexo 4.2: Perfil Energías

pH 7.4

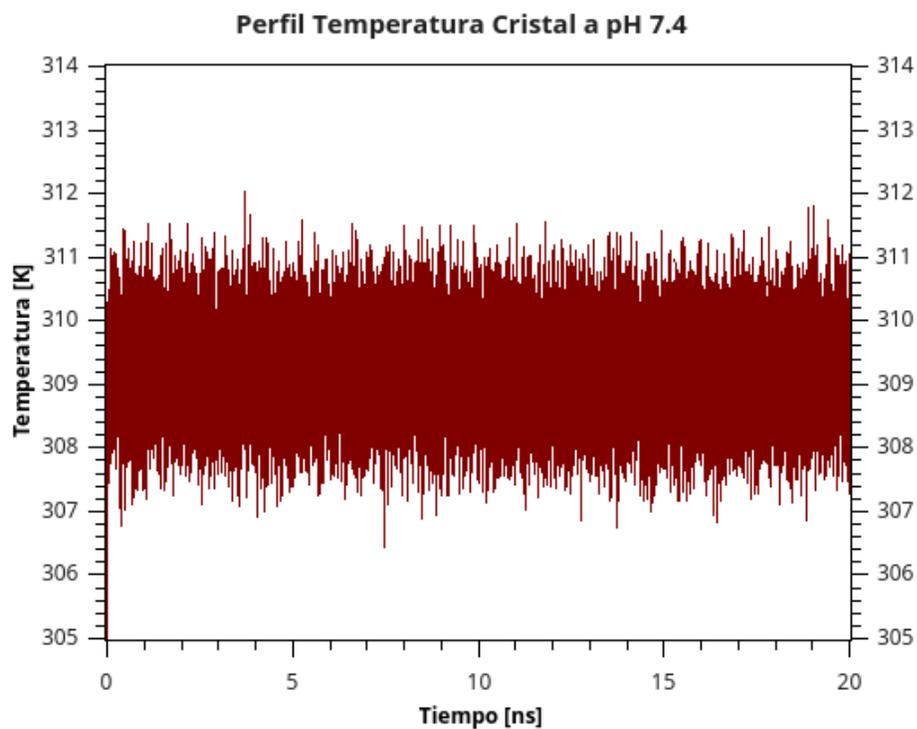
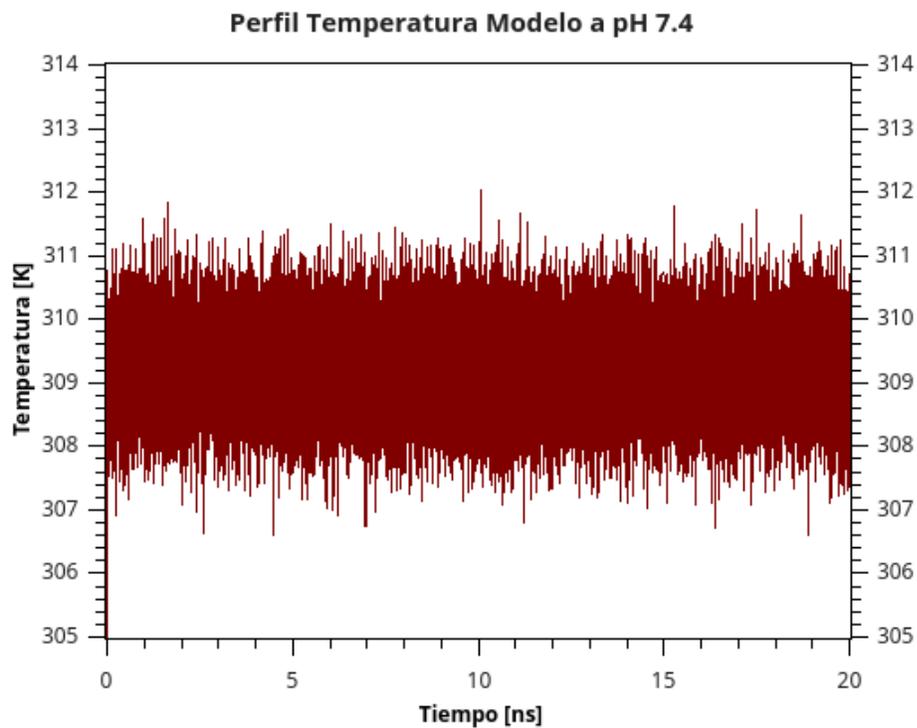


pH 5.5

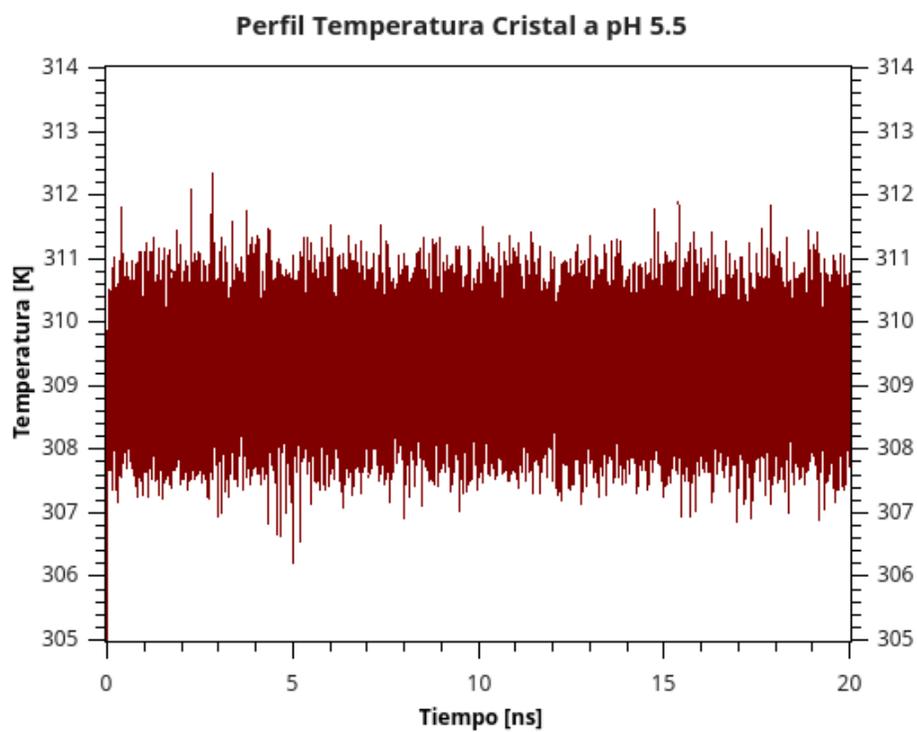
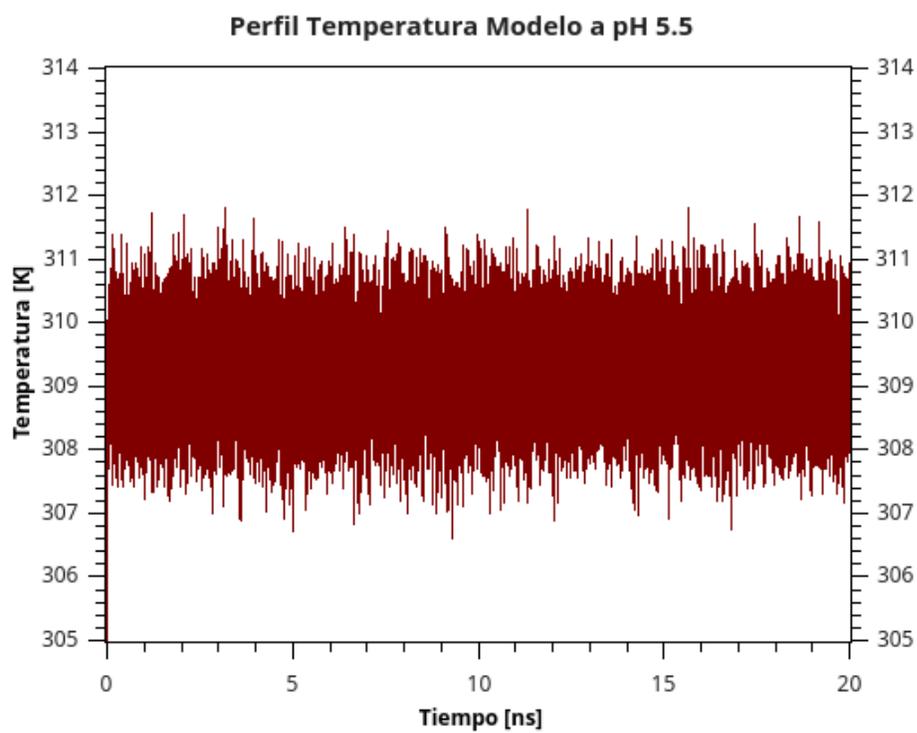


Anexo 4.3: Perfil Temperatura

pH 7.4

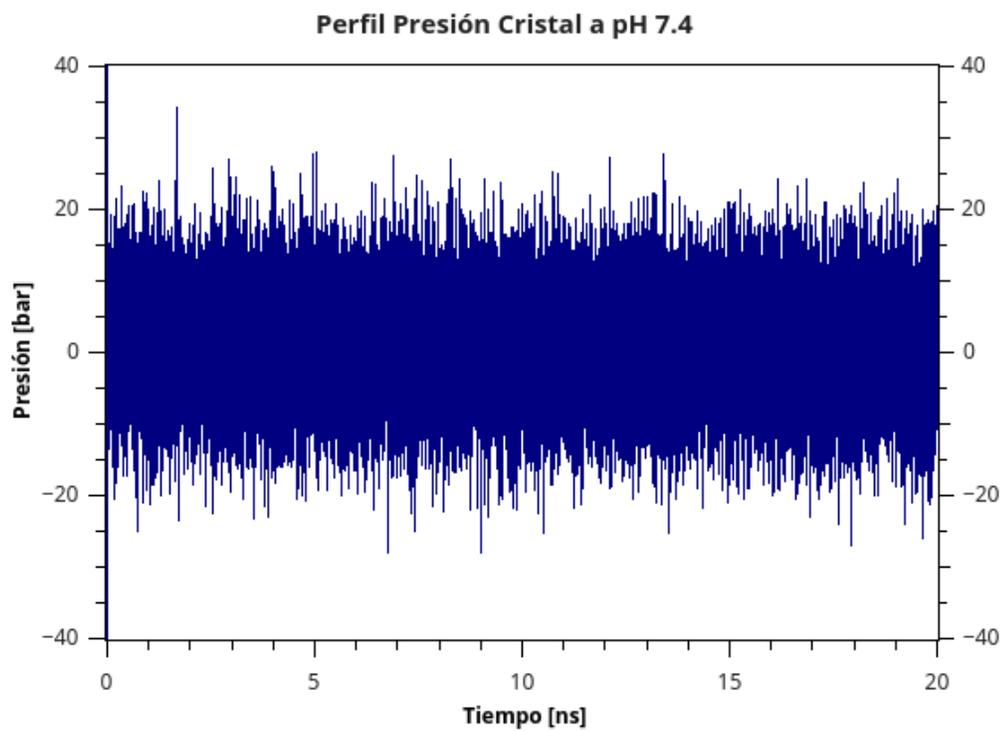
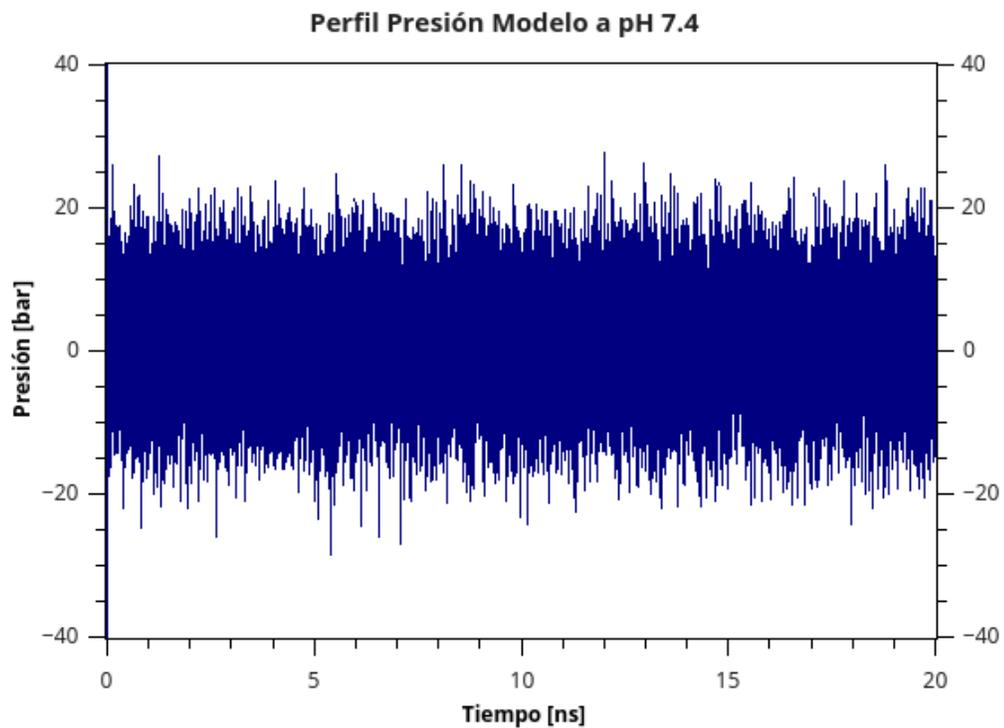


pH 5.5

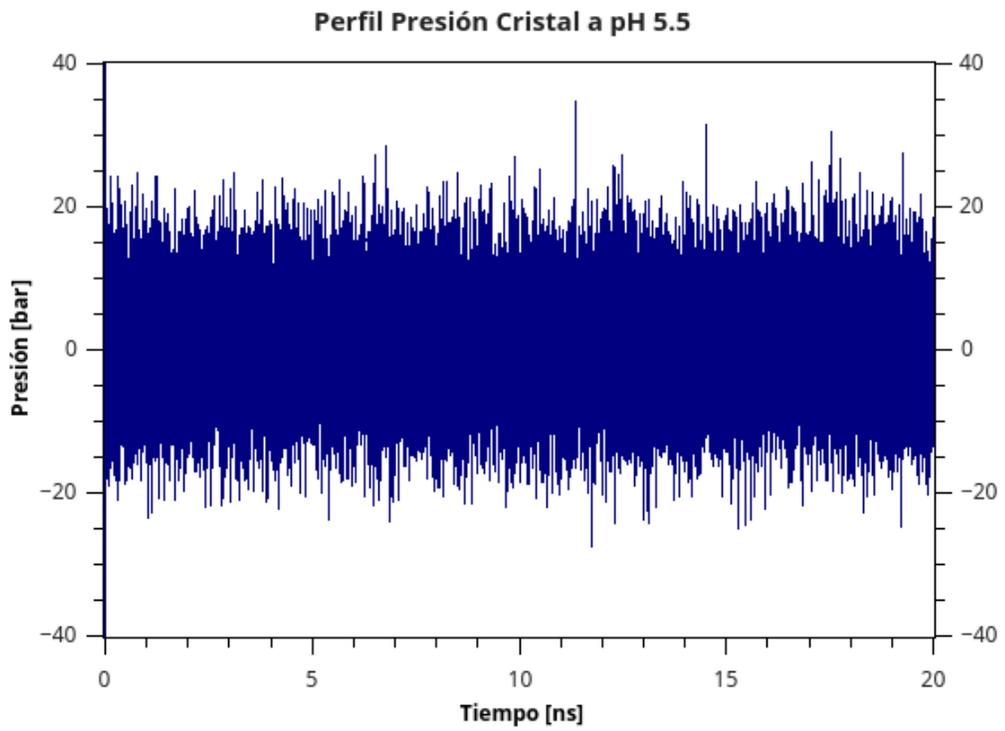
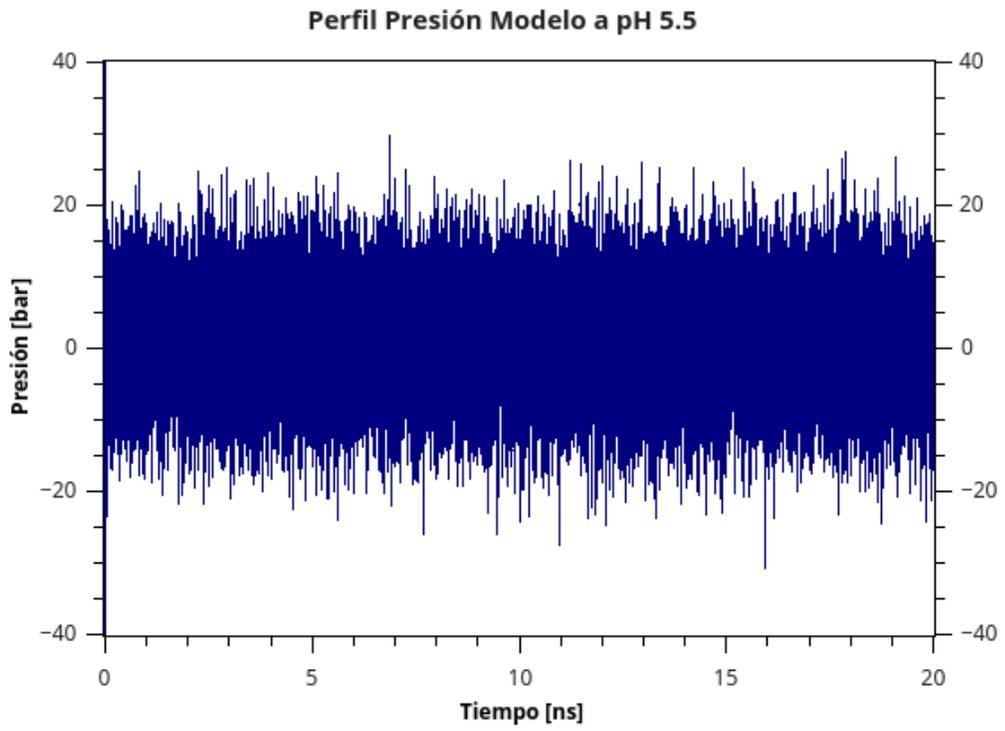


Anexo 4.4: Perfil Presión

pH 7.4

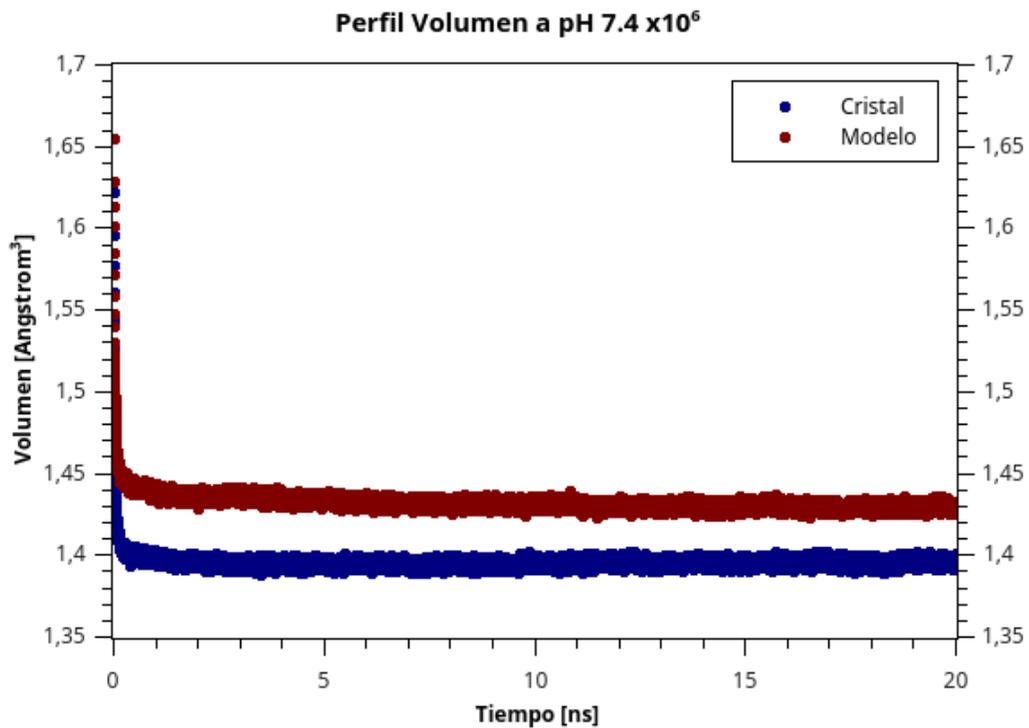


pH 5.5

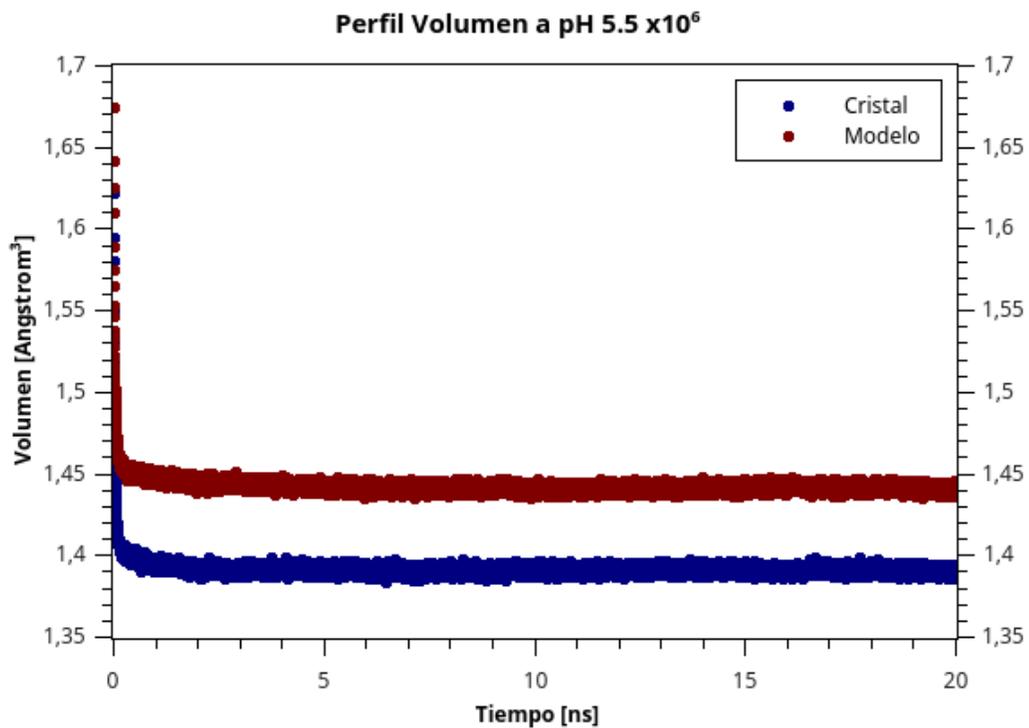


Anexo 4.5: Perfil Volumen

pH 7.4



pH 5.5



Anexo 5: Análisis Movimiento de Agua

