



UNIVERSIDAD
MAYOR

para espíritus emprendedores

Facultad de Ciencias

**ESCUELA DE
BIOTECNOLOGÍA**

Estudio de la modulación de las propiedades elásticas del dominio I10 de titina mediante modificaciones post-traduccionales basada en S-glutación

Pablo Germán Berríos Segovia

Proyecto de Tesis para optar al título de Biotecnólogo

Santiago - Chile
2022



**UNIVERSIDAD
MAYOR**

para espíritus emprendedores

Facultad de Ciencias

**ESCUELA DE
BIOTECNOLOGÍA**

**Estudio de la modulación de las propiedades elásticas del dominio I10 de
titina mediante modificaciones post-traduccionales basada en glutatión**

Pablo Germán Berríos Segovia

Proyecto de Tesis para optar al título de Biotecnólogo

Tutor: Jaime Andrés Rivas Pardo, Doctor en Ciencias
Co-tutor: Ivana Orellana, Ingeniera en Bioinformática

Santiago - Chile
2022

INFORMACIÓN DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN

Centro de Genómica y Bioinformática - Universidad Mayor.

El desarrollo de esta tesis se llevó a cabo en las dependencias del Centro de Genómica y Bioinformática (CGB) de la Universidad Mayor. El CGB es dirigido por la Dra. Elena Vidal, quién lidera y coordina a las diferentes unidades académicas organizadas en tres laboratorios de investigación: Laboratorio de Bioinformática, Laboratorio de Genómica Vegetal y Laboratorio de Genómica Microbiana.

El director de la tesis fue el profesor Jaime Andrés Rivas Pardo, líder del grupo de Biología Mecánica mecánica que tiene por objetivo entender como las fuerzas mecánicas son capaces de modular distintos procesos biológicos, abarcando desde elasticidad muscular a la adhesión bacteriana. Para esto, el grupo implementa metodologías computacionales, biología molecular, ingeniería y biofísica de proteínas.

El grupo de Biología Mecánica se incluye en el Laboratorio de Genómica Microbiana, el cual es codirigido por los profesores Dr. Sebastián Reyes y por el mismo Dr. Rivas Pardo. Cada uno posee líneas de investigación independiente que se reúnen en el estudio y caracterización de mecanismos involucrados en la relación patógeno-hospedero.

Este trabajo de investigación, asociado al grupo de investigación del Dr. Rivas Pardo, se enmarcó en la propuesta relacionada al entendimiento de los mecanismos involucrados en la elasticidad del músculo estriado—*Mecano-Fisiología de Titina*—, proyecto de investigación apoyado por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID) mediante el fondo de investigación FONDECYT (11180705). Dentro de esta propuesta se planteaba como parte de sus objetivos determinar el efecto de modificaciones postraduccionales sobre dominios de titina.

ABREVIATURAS

Å: Ångstrom, 1×10^{-10} metros

AFM: Microscopio de Fuerza Atómica (del inglés *Atomic Force Microscope*)

F: Estado plegado de la proteína (del inglés *folded state*)

FC: Protocolo de fuerza constante (del inglés *Force clamp*)

fs: Femtosegundo, 1×10^{-15} segundos

FX: Protocolo de velocidad constante (del inglés *Force-extension*)

GSSG: Glutati3n oxidado

I1: Intermediario mecánico 1

I2: Intermediario mecánico 2

Ig: Inmunoglobulina

ns: Nanosegundo, 1×10^{-9} segundos

PBS: Buffer fosfato salino

ps: Picosegundo, 1×10^{-12} segundos

SMD: Simulaci3n Molecular Dirigida (del ingl3s *Steered Molecular Dynamics*)

T2580I: Sustituci3n Treonina 2580 por isoleucina

U: Estado desplegado de la prote3na (del ingl3s *unfolded state*)

vdW: van der Waals

WLC: modelo vermiforme (del ingl3s *Worm-like chain*)

i. ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Titina y el sarcómero.....	2
1.2 Banda I de Titina.....	4
1.3 Estudio de la elasticidad de dominios Ig.....	5
1.4 Simulaciones Moleculares dinámicas.....	6
1.5 Proyecciones biotecnológicas.....	7
2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	9
2.1 Hipótesis.....	9
2.2 Objetivos.....	9
2.2.1 Objetivos específicos.....	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
3.1 Materiales.....	10
3.1.1 Reactivos químicos.....	10
3.1.2 Amortiguadores.....	10
3.1.3 Medios de cultivo.....	11
3.1.4 Plásmidos.....	11
3.1.5 Cepas bacterianas.....	12
3.2 Métodos.....	12
3.2.1 Dinámica Molecular Dirigida.....	12

3.2.2 Expresión de la poliproteína (I10) ₈	14
3.2.3 Espectroscopia de fuerza.....	14
3.2.4 Análisis estadísticos	16
4. PRESENTACION Y ANALISIS DE RESULTADOS.....	18
4.1 Caracterizar las propiedades mecánicas del dominio I10 silvestre y mutante de la banda I de titina mediante dinámica molecular dirigida	18
4.1.1 Estados de plegamiento e intermediarios.....	18
4.1.2 Fuerzas de desplegamiento	19
4.1.3 Enlaces de hidrógeno.....	20
4.1.4 Fuerzas no enlazantes.....	21
4.2 Comparar la dinámica de plegamiento del dominio I10 silvestre y mutante usando modelos simplificados en la presencia de cisteínas S-glutatinilizadas	23
4.2.1 Estados de desplegamiento.....	24
4.2.2 Fuerza de desplegamiento.....	24
4.2.3 Enlaces de hidrógeno.....	25
4.2.4 Fuerzas no enlazantes.....	27
4.3 Evaluar el efecto del estrés oxidativo S-glutatinión en el dominio I10 silvestre y mutante de titina utilizando espectroscopia de fuerza basada en AFM.....	29
4.3.1 Desplegamiento a velocidad constante.....	29
4.3.3 Desplegamiento bajo Fuerza constante	32
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	38

5.1 Dinámicas Moleculares	38
5.1.1 Estados de plegamiento	38
5.1.2 Fuerzas de extensión	39
5.1.3 Enlaces de hidrógeno.....	39
5.1.4 Efecto del Glutación sobre la elasticidad del dominio I10.....	39
5.2 AFM	40
5.2.1 Desplegamiento a velocidad y fuerza constante.....	40
6. CONCLUSIONES.....	44
7. IMPLICANCIAS, RECOMENDACIONES Y/O PROYECCIONES FUTURAS.....	45
8. REFERENCIAS	46
9. ANEXOS/MATERIAL SUPLEMENTARIO	51

ii. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparaciones en la velocidad de despliegamiento	24
Tabla 2. Comparaciones para la cantidad de enlaces de hidrógeno	26
Tabla 3. Comparaciones de fuerza de despliegamiento del dominio I10 a velocidad constante	32
Tabla 4. Tasa de despliegamiento obtenido para dominio I10 bajo un protocolo FC	36
Tabla 5. Comparaciones de la tasa de despliegamiento	37

iii. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo de la ultraestructura del tejido cardiaco.	2
Figura 2: Representación esquemática de titina	4
Figura 3: Secuencia lógica de pasos utilizada en esta investigación	10
Figura 4: Esquema del plásmido pQE-80L incluyendo el segmento quimérico clonado (I10) ₈ .	11
Figura 5: Esquema de la (a) topología y (b) representación tridimensional del dominio I10 de titina.	13
Figura 6: Microscopio de fuerza atómica y manipulación de moléculas individuales.	15
Figura 7: Representación esquemática de los principales estados encontrados mediante simulación molecular dirigida del dominio I10 de titina.	18
Figura 8: Relación distancia en función del tiempo obtenido desde las simulaciones de desplegamiento mecánico del dominio I10 silvestre y mutante	20
Figura 9: Evolución del número de enlaces de hidrógeno en función del tiempo para el dominio I10 silvestre y mutante a 1000 pN de fuerza	21
Figura 10: Fuerzas electroestáticas en función del tiempo del dominio I10 silvestre y mutante a una fuerza de 1000 pN.	22
Figura 11: Fuerzas de vdW en función del tiempo para el dominio I10 salvaje y mutante a	23

una fuerza de 1000 pN de fuerza.

Figura 12: Longitud del dominio I10 silvestre y mutante desplegado en función del tiempo. **25**

Figura 13: Número de enlaces de hidrógeno en función del tiempo totales de las hebras beta (superior) y totales (inferior). **27**

Figura 14: Fuerzas electroestáticas del dominio I10 en función del tiempo. **28**

Figura 15: Fuerzas de vdW para el dominio I10 en función del tiempo. **29**

Figura 16: Curvas de extensión a velocidad constante del dominio I10. **30**

Figura 17: Histograma de fuerzas de desplegamiento para dominio I10 **31**

Figura 18: Desplegamiento del dominio I10 bajo un protocolo FC. **32**

Figura 19: Fracción replegada del dominio I10 **33**

Figura 20: Trazas y el promedio resultante para la obtención de tasa de desplegamiento **34**

Figura 21: Tasa de desplegamiento del dominio I10 en FC con sus respectivos ajustes. **35**

Figura 22: Tasa de desplegamiento de dominio I10. Cada traza representa el ajuste para cada condición estudiada. **36**

iv. RESUMEN

Titina es la proteína más grande del cuerpo humano, con más de 363 exones y una variedad de productos génicos encontrados en distintos tejidos musculares. Forma parte del complejo proteico muscular, denominado sarcómero, siendo reconocido como el tercer filamento, luego de actina y miosina. Titina cuenta con una función de andamiaje, sensor mecánico, y resorte biológico. Debido a su tamaño y variedad de funciones se han asociado una variedad de patologías, musculares y cardíacas. Investigaciones recientes mostraron que, en un contexto isquémico de infarto cardíaco, las moléculas del sarcómero incluyendo titina eran modificadas post-traduccionalmente con glutatión.

En este estudio se evaluó el efecto mecánico que ejerce la S-glutationización sobre el dominio proximal I10, perteneciente a la región de la banda I de titina. Este dominio es ampliamente usado como dominio modelo de las funciones de titina, ya que se ha propuesto que experimenta desplegamiento durante el estiramiento del músculo. Además, el dominio I10 ha cobrado relevancia debido a que sustituciones en el dominio se han relacionado con cardiomiopatías arritmogénicas. Gracias a la combinación de estrategias computacionales y espectroscopia de fuerza se logró determinar que el GSSG entorpece el replegamiento de la proteína, tanto en el dominio silvestre como en la versión mutante asociada a la patología. Sorprendentemente, nuestros análisis muestran que GSSG disminuye la constante cinética de desplegamiento, sugiriendo un mecanismo alternativo para conciliar la modificación de las cisteínas. Finalmente, las dinámicas moleculares fueron esenciales para ofrecer explicaciones a la presencia de intermediarios mecánicos y como GSSG podría interactuar con otros residuos distintos a las cisteínas.

Estos hallazgos entregan información esencial sobre el mecanismo de modificación post-traduccional de los residuos de cisteínas en dominios proximales de titina. Estos resultados pueden ser empleados para la confección de herramientas que permitan revertir o impedir la modificación de cisteínas de dominios de titina durante procesos isquémicos como el presente en el infarto cardíaco.

v. SUMMARY

Titin is the largest protein in the human body, with more than 363 exons and a variety of gene products found throughout different muscle tissue. Titin belongs to the muscle protein complex known as the sarcomere, which includes the well-characterized and widely known actin and myosin filaments. Titin operates as a scaffolding protein, mechanical sensor, and biological spring. Due to its size and multiple functions, this giant protein has been associated with several muscular and cardiac diseases. Recent investigations have shown that the protein molecules from the sarcomere experienced post-translational modifications with S-glutathione when cardiac tissue was under ischemic conditions.

In this study, we evaluated the mechanical effect triggered by the S-glutathionylation of I10, a proximal domain of titin located in the I-band of the sarcomere. I10 is widely used as a titin protein model due to early studies proposing that I10 could unfold during muscle stretching. Moreover, mutations on the same I10 domains have been related to arrhythmogenic cardiomyopathies. Using computational tools and force spectroscopy, we determined that GSSG blocks the refolding of I10, either wild-type or the cardiac disease-related I10 mutant. Surprisingly, our analysis shows that GSSG decreases the unfolding kinetics constant, suggesting an alternative mechanism for modifying buried cysteine residues. Finally, the molecular dynamics simulations were essential for explaining the presence of mechanical intermediates and how GSSG could interact with other amino acids different from the cysteine residues.

These findings provide critical information about the post-translational modifications of cysteine residues in the proximal Ig titin domains. These results could be used to design and prepare tools for preventing or reverting the modifications of titin domains during ischemic processes such as myocardial infarction.

1. INTRODUCCIÓN

Titina es la proteína más larga y de mayor masa molecular presente en mamíferos (1). Formando parte del complejo sistema contráctil del músculo estriado, titina puede ser entendida como el tercer filamento del sarcómero acompañado por el filamento grueso y delgado. A pesar de sus colosales dimensiones, una masa que supera los 3 MDa y más un micrón de largo, fue el último filamento proteico descrito en la célula muscular. Su inhabilidad a correr en geles de electroforesis tradicionales contribuyó a que no reconocido como un filamento relevante del sarcómero (2). Los primeros estudios de titina se concentraron en sus funciones estructurales, dando pie al descubrimiento de su rol como proteína de andamiaje (3), sin embargo, nuevos desarrollos e investigaciones de la últimas dos décadas han logrado proponer que titina además opera en el miocito como un sensor mecánico (4) y delimitando la elasticidad pasiva durante el estiramiento del sarcómero (5).

Al interior del sarcómero, definido como la unidad mínima contráctil de la célula muscular, se encuentran los filamentos delgado y grueso, actores principales del sistema contráctil actina-miosina (6). Actualmente, conocemos que la presencia del tercer filamento de titina es esencial para una serie de actividades estructurales y funcionales del miocito (5)(7), no obstante, estudios recientes han mostrado que titina podría desempeñar además funciones críticas para la adecuada contracción del sarcómero colaborando activamente junto al complejo actina-miosina (8). Titina aportaría energía contráctil almacenada en dominios tipo inmunoglobulina (Ig) desplegados durante el estiramiento del músculo colaborando activamente en el acortamiento del sarcómero (7,8). A pesar de estas sugerencias sobre el nuevo papel que tiene titina, se conoce muy poco el efecto del desplegamiento de los dominios tipo inmunoglobulina (Ig) presentes en titina bajo condiciones fisiológicas, definido por la presencia de iones, chaperonas, moléculas oxidantes y otras proteínas presentes en el entorno citosólico.

Durante la última década ha comenzado el interés por dilucidar el papel que podría tener el contexto citosólico del cardiomiocito y otras células musculares sobre los dominios tipo Ig de titina. Sumado a esto, se ha identificado el rol patológico que puede ejercer titina sobre tejido cardiaco mediante un abanico de mutaciones identificadas (9,10). Cualquier desarrollo de terapias que usen a titina como diana de tratamiento hacen necesario describir y entender los mecanismos moleculares subyacentes de esta compleja proteína.

1.1 Titina y el sarcómero

El sarcómero es la unidad funcional mínima contráctil muscular presente en las células musculares esqueléticas y cardíacas (6). Este sistema macromolecular está organizado por compartimientos repetitivos de fibras proteicas ordenadas en forma paralela (Figura 1), constituida principalmente por miosina (filamento grueso) y actina (filamento delgado). Ambos filamentos interactúan entre sí por medio de un mecanismo propuesto inicialmente por Hugh Huxley, conocido como la teoría del filamento deslizante (11). Este modelo plantea que el filamento grueso de miosina se desliza sobre el filamento delgado, mediado por el cambio conformacional de las cabezas de miosina y la subsecuente atracción hacia actina, impulsados por el intercambio e hidrólisis de nucleótidos de ATP (11). El incesante arreglo estructural y movilización de las cabezas de miosina a lo largo del filamento delgado permiten el acortamiento del sarcómero y por tanto de la célula muscular (Figura 1d).

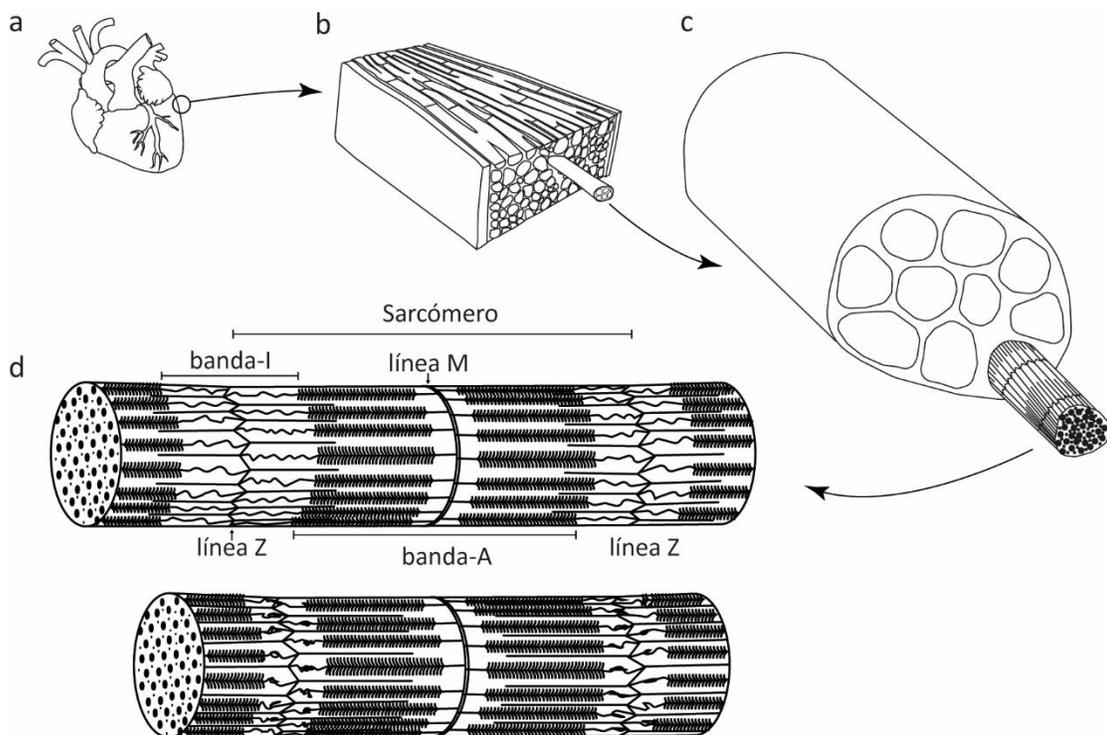


Figura 1. Esquema representativo de la ultraestructura del tejido cardíaco. (a) Corazón, (b) pared cardíaca, las fibras que se observan son representativas de cardiomiocito, (c) Sección de cardiomiocito, con sección de miofibrilla, (d) Esquema de miofibrilla, esquematizando el cambio en el largo de sarcómero; arriba sarcómero extendido, abajo sarcómero contraído.

Sumado al filamento grueso y delgado, titina se ubica conectando el extremo (disco Z) con la mitad (banda M) del sarcómero, a través de una única cadena polipeptídica desde su extremo N-terminal a C-terminal respectivamente (Figura 1)(12). La extraordinaria longitud de titina permite acomodar cerca de 300 dominios globulares que se distribuyen en las cuatro regiones del sarcómero: disco Z, banda I, banda A, y banda M.

El gen de titina (TTN) cuenta con 363 exones y una alta tasa de edición alternativa del ARN mensajero, expresando isoformas con proteínas de 3.7 MDa en tejido esquelético y versiones cardiacas de 3.0 MDa (1,5). Esta variabilidad de tamaño se asocia particularmente a los exones que codifican la porción de la región I del sarcómero (13). Esta edición tejido-específica que experimenta el gen de titina ha desencadenado un interés por entender como estos cambios en el número de dominios Ig impactan en la función de titina y en la fisiología del individuo (5,13,14).

El gran tamaño del gen de titina lo convierte en uno de los genes con el mayor número de mutaciones acumuladas en el genoma (15). Además, mutaciones puntuales causantes de sustituciones de aminoácidos y versiones truncas de titina, identificadas en su mayoría gracias a la aparición de patologías familiares, permitió relacionar titina y enfermedades cardiacas o musculoesqueléticas con altas tasas de morbilidad (16,17). No obstante, los mecanismos moleculares por los cuales titina colabora en el desarrollo de estas patologías siguen siendo desconocidas.

La visión canónica sobre la función estructural de titina entorpece comprender totalmente como sustituciones puntuales en esta proteína con cerca de 33.000 aminoácidos podría relacionarse con una patología como la cardiomiopatía arritmogénica o la distrofia muscular (18,19). Desde un punto de vista estructural, de las cuatro porciones en las cuales puede ser dividida titina; disco Z, banda-I, banda-A y banda-M (Figura 2), las sustituciones se distribuyen sin grandes preferencias a lo largo de toda la proteína (13). En su mayoría corresponden a mutaciones sin sentido que da origen a versiones truncas de titina. No obstante, una mutación en la posición 2580 de Treonina por Isoleucina, ha concentrado la atención de la comunidad dedicada a la fisiopatología cardíaca, desencadenado una cardiomiopatía arritmogénica.

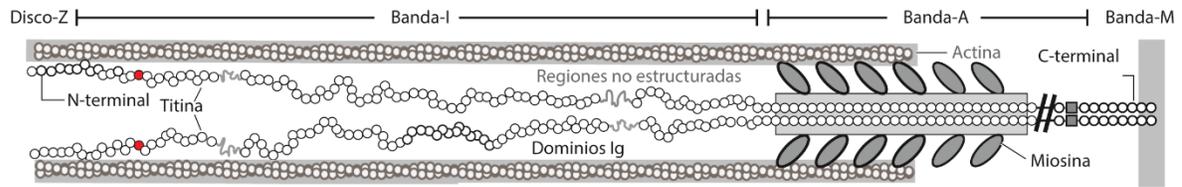


Figura 2. Representación esquemática de titina. Titina es una proteína con más de 33000 aminoácidos arregladas mayoritariamente en dominios Ig, con algunas zonas no estructuradas. Estructuralmente se divide en 4 zonas, representativas de su localización en el sarcómero. De N-terminal a C-terminal: Disco-Z, Banda-I, Banda I, Banda-M. En rojo localización del dominio I10.

La relevancia de esta sustitución radica en su posición en la cadena polipeptídica. La sustitución Tre2580Ile, ubicada en el exón 37 del gen TTN, da origen al décimo dominio Ig que está localizado en la región de la banda I (19)(Figura 2). Esta zona viscoelástica además posee una serie de elementos elásticos capaces de estirarse bajo tensión (20), además de la capacidad de interactuar con otras proteínas del sarcómero (21). No obstante, no hay claridad cual es la asociación entre enfermedades cardíacas y las mutaciones puntuales de esta porción de la proteína (15).

1.2 Banda I de Titina

Esta región de la proteína de titina está compuesta principalmente por dos tipos de dominios estructurales: dominios tipo Ig, los cuales se encuentran arreglados en tándem a lo largo de la cadena; y las regiones intrínsecamente desordenadas, que interrumpen las cadenas Ig de la región de la banda I. Dentro de estas regiones no estructuradas se encuentran tres segmentos principales: N2B y N2A, localizado en la porción media de la banda I, y una región rica en prolina, glutamato, valina y lisina, conocida como PEVK. De acuerdo a la organización de estos diferentes dominios estructurales, la banda-I de titina puede ser dividida en tres nuevas porciones: Ig-proximales (Ig10-Ig20), Ig-mediales (Ig24-Ig76) y los Ig-distales (Ig80-Ig95) (Figura 2)(5,13).

Funcionalmente se ha demostrado que la región de la banda I de titina opera como un “resorte biológico” al tener la capacidad de almacenar energía elástica mediante desplegamiento de los dominios Ig y regiones PEVK, que colaboran en el proceso de acortamiento del sarcómero (14). Este sistema viscoelástico es modulado por modificaciones postraduccionales tanto de las regiones no estructuradas, por la generación de enlaces disulfuro entre cisteínas para acortar el largo de

desplegamiento del N2B (4), y por la S-glutatinilización y presencia de disulfuros en los dominios Ig (22,23)

En los últimos años se han desarrollado una serie de modelos animales con el objetivo de encontrar el rol que desempeñan tanto dominios Ig proximales como distales para el correcto funcionamiento del sarcómero y del corazón. En estos estudios, se ha mostrado que la remoción parcial de regiones de titina de la banda I afectan el funcionamiento normal del corazón, evidenciando un significativo aumento de la tensión pasiva del cardiomiocito en ratones adultos, desencadenando principalmente cardiopatías diastólicas (18,21,24).

1.3 Estudio de la elasticidad de dominios Ig

Tradicionalmente, el estudio de la mecánica de los dominios Ig de titina se han llevado a cabo por medio de espectroscopia de fuerza usando sistemas recombinantes, expresando pequeños segmentos de titina proximal, distal, o dominios únicos arreglados en tándem. Este es el caso de los segmentos I4-I11, I65-I70, I91-I98, y de los dominios individuales I1, I10 e I91 (14,22,23,25,26). En la mayoría de los casos, los ensayos mecánicos se llevaron a cabo mediante espectroscopia de fuerza basada en el empleo de microscopios de fuerza atómica (AFM), aportando información valiosa para comprender los mecanismos de elasticidad de titina (25). Muchos de estos trabajos han propuesto que la sección proximal de la banda-I de titina podría desplegarse a demandas de fuerza durante la contracción muscular, mientras que las regiones distales se encontrarían salvaguardando la molécula previniendo demandas mecánicas que superan la capacidad del sarcómero (8,25).

Hace cerca de una década surgieron las primeras evidencias que luego de un infarto cardíaco, las moléculas del sarcómero eran S-glutatinilizadas debido a la alteración del estado redox y depleción aguda de los mecanismos antioxidantes (27). Se propuso que a nivel molecular glutatión oxidado (GSSG) podría desencadenar modificaciones en las proteínas del cardiomiocito que podrían interferir con el debido funcionamiento contráctil del corazón (27). Posteriormente se demostró que al someter a fuerzas de desplegamiento el dominio I91, este era capaz de oxidarse ante GSSG. Este mecanismo sería capaz de controlar la oxidación de residuos de cisteínas expuestos y la elasticidad de titina (28). Sin embargo, el dominio I91 es parte de los Ig distales, con gran resistencia mecánica que difícilmente se despliega durante las múltiples demandas de fuerza que experimenta titina

fisiológicamente (28). Por lo tanto, a pesar de que el mecanismo puede ser el adecuado, no hay evidencia de que realmente este ocurriendo en los dominios que se despliegan durante el estiramiento del sarcómero.

En este trabajo de investigación se ha propuesto explorar la elasticidad del dominio I10 perteneciente a los Ig proximales, bajo condiciones oxidantes equivalentes a las presentes durante el infarto cardíaco. El dominio I10 es capaz de desplegarse ante esfuerzos mecánicos fisiológicos (25), se encuentra asociado a cardiomiopatías familiares por medio de la sustitución de unos de sus aminoácidos (29). Además, posee dos residuos de cisteínas, los cuales pueden ser expuestos durante el proceso reversible de desplegamiento, convirtiéndolo en un segmento susceptible a la modificación post-traduccionales de moléculas como el GSSG. Debido a lo anterior, el dominio I10 es un modelo molecular ideal para estudiar los mecanismos fisiológicos *in-vitro* de elasticidad bajo estrés oxidativo, equivalentes a los que experimentaría una proteína de titina luego del infarto cardíaco.

1.4 Simulaciones Moleculares dinámicas

Los estudios de simulaciones moleculares, o estrategias computacionales que permiten simular el comportamiento de biomoléculas usando las leyes de mecánica clásica, han permitido entender una serie de fenómenos moleculares con una resolución atómica (30). Con la ayuda de herramientas de simulación molecular, tales como NAMD (31), AMBER (32) o GROMACS (33) ha sido posible evaluar la estructura de proteínas utilizando las coordenadas en tres dimensiones de los átomos (archivo PDB), la conectividad entre los átomos, conocido como topología (archivo PSF) y campos de fuerza como CHARMM (34) o OPLS (35), que permiten realizar cálculos electrostáticos que predicen cómo se comportan estos átomos en el tiempo.

Por medio de simulaciones moleculares, se pueden replicar condiciones de estrés mecánico, aplicando protocolos de fuerza o velocidad constante, teniendo siempre el cuidado de que el muestreo se debe realizar con una frecuencia de tiempo suficiente para capturar las vibraciones de enlaces atómicos en el rango de los femtosegundos (fs), por lo que 1 nanosegundo conlleva hasta 100.000 pasos de cálculo de fuerzas, siendo esta la mayor restricción metodológica de esta estrategia

(36). A pesar de esto, la información entregada lo vuelven un método atractivo para el estudio de mecánica de proteínas en tiempos cortos.

Estudios previos de simulación molecular dirigida (SMD) usando el dominio I91 dilucidaron la evolución de los enlaces de hidrógenos y áreas expuestas a velocidad y/o fuerza constante, interacciones electrostáticas, y mecanismos moleculares de desplegamiento (37). Se determinó que la evolución del desplegamiento esta mediado principalmente por una etapa inicial de rompimiento de enlaces de hidrógeno, necesitando una gran fuerza inicial, seguido de un progresivo rompimiento de enlaces de hidrógeno restantes (38).

El desplegamiento del dominio I10 también se ha estudiado anteriormente por medio de dinámicas moleculares. En un trabajo que buscaban entender el efecto de Ca^{+2} sobre el dominio I10 mostraron el aumento de la resistencia del dominio ante fuerzas de desplegamiento y que la mutación Tre2580Ile disminuye levemente la fuerza necesaria para su desplegamiento, restaurando la fuerza a la normalidad al añadir Ca^{+2} (39). En este trabajo, proponemos ensayar la elasticidad de I10 y su versión mutante Tre2580Ile mediante simulación molecular, empleando protocolos de fuerza y velocidad constante, determinando el efecto que posee para el desplegamiento que los residuos de cisteínas se encuentren modificados con glutatión.

1.5 Proyecciones biotecnológicas

El primer paso para el desarrollo de nuevas terapias y aplicaciones biotecnológicas para cualquier patología consiste en comprender de forma íntegra los mecanismos involucrados en su desarrollo. En el caso de la fisiopatología del músculo cardíaco, en especial luego del infarto cardíaco, se vuelve vital entender los mecanismos por los cuales fuerzas de tensión modulan la acción de titina y la relevancia que pueden tener durante el infarto cardíaco.

A la fecha, la diversidad de tratamientos de patologías cardíacas es reducida, debido a la diversidad de enfermedades y la falta de desarrollos científicos y tecnológicos. La mayoría de los tratamientos actualmente están centrados en enfermedades ateroscleróticas o derivadas del proceso de obstrucción de arterias o arritmias, donde el énfasis para el tratamiento es el empleo de terapias farmacológicas convencionales. Por otro lado, marcapasos y los dispositivos STET son ejemplo de estrategias que surgen de la innovación en ingeniería que buscan restituir una adecuada función del

corazón y del sistema circulatorio (40). A pesar de ser dispositivos rutinarios en centros hospitalarios, muchas patologías agudas como el ataque cardíaco carece de soluciones que permitan restituir la función cardíaca de manera adecuada. Pacientes que han experimentado un proceso isquémico al miocardio, ven comprometido de manera parcial la función contráctil del corazón. Pacientes que han sobrevivido a un infarto cardíaco, no logran expulsar un volumen de sangre adecuado, por lo que de modo compensatorio experimentan una hiperplasia patológica, fenómeno en que el tamaño del corazón aumenta como finalidad de compensar la pérdida de capacidad contráctil del miocardio (41). También se ha observado una disfunción de los procesos de óxido-reducción del corazón en ataque cardíaco, desencadenado muerte celular y fibrosis del tejido (42).

Por lo tanto, existe una posibilidad de desarrollar estrategias biotecnológicas basadas en los mecanismos moleculares que operan al interior del cardiomiocito, con el propósito de revertir o detener el aumento de rigidez cardíaca en paciente infartados.

2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

El glutatión oxidado modifica post-traduccionamente los residuos de cisteínas del dominio I10 de titina alterando su plegamiento y sus propiedades elásticas

2.2 Objetivos

Determinar el comportamiento mecano-elástico de titina frente a moléculas oxidantes de los grupos tiol presentes en la cadena polipeptídica utilizando el dominio I10 y la versión mutante T2580I como modelos de estudio de la elasticidad de titina.

2.2.1 Objetivos específicos

- 1.** Caracterizar las propiedades mecánicas del dominio I10 silvestre y mutante de la banda I de titina mediante dinámica molecular dirigida.
- 2.** Comparar la dinámica de desplegamiento del dominio I10 silvestre y mutante usando dinámica molecular dirigida en la presencia de cisteínas S-glutatinilizadas.
- 3.** Evaluar el efecto del estrés oxidativo S-glutatión en el dominio I10 silvestre y mutante de titina utilizando espectroscopia de fuerza basada en AFM.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Con el objetivo de determinar el efecto de la S-glutacionización sobre el dominio i10 de titina se utilizó una metodología doble combinando técnicas *in-vitro* e *in-silico*, siguiendo una secuencia lógica de pasos mostrados en figura 3:

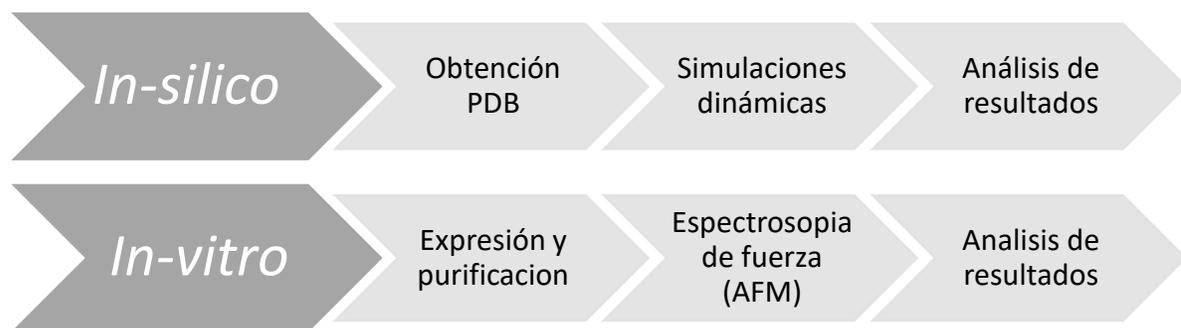


Figura 3. Esquema de la secuencia lógica de pasos utilizada en esta investigación.

3.1 Materiales

3.1.1 Reactivos químicos

Agarosa, estándar de tamaño molecular 1 kilobase (1 Kb DNA Ladder, estándar de amplio rango para geles SDS-PAGE), agua destilada, agua libre de nucleasas, ampicilina, azul de Coomassie, ácido acético glacial, metanol de grado técnico, ácido clorhídrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), cloranfenicol, cloruro de calcio (CaCl₂), dodecilsulfato sódico (SDS), etanol, Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), fosfato de sodio, cloruro de sodio, imidazol, 40% acrilamida, tris-(hidroximetil)-aminometano (TRIS), glicerol, glicina, glutaraldehído, glutatión oxidado (GSSG), Hellmanex III, kanamicina, leupeptina, isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), persulfato de amonio, N',N',N',N'- tetrametiletildiamina (TEMED) y tetraciclina.

3.1.2 Amortiguadores

Amortiguador fosfato salino (PBS), amortiguador de unión (fosfato de potasio 50 mM pH 7,0, cloruro de sodio 0,3 mM), amortiguador de elusión (fosfato de potasio 20 mM pH 7,0, cloruro de sodio 0,3 mM, imidazol 150 mM), amortiguador geles de proteína TGS (Load-Buffer 5X - SDS, β-

mercaptoetanol, azul de Coomassie y glicerol) y amortiguador de carga para geles de acrilamida (Load-Buffer 5X - SDS, β -mercaptoetanol, azul de Coomassie y glicerol).

3.1.3 Medios de cultivo

Medio líquido de cultivo Luria-Bertani (LB) (Tryptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro de sodio 5 g/L) y medio de cultivo agar Luria-Bertani (Tryptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro de sodio 5 g/L y agar 15 g/L), ambos obtenidos desde el fabricante BD. Los medios fueron suplementados con los antibióticos ampicilina, cloranfenicol, kanamicina y tetraciclina.

3.1.4 Plásmidos

Vector pQE80L, Novagen (Figura 4), modificado previamente en el laboratorio con 8 dominios tándem del dominio I10 ó I10(T2580I) de titina, incluyendo un ancla terminal de dos cisteínas. Este último permite su inmovilización sobre superficies modificadas durante el experimento de AFM.

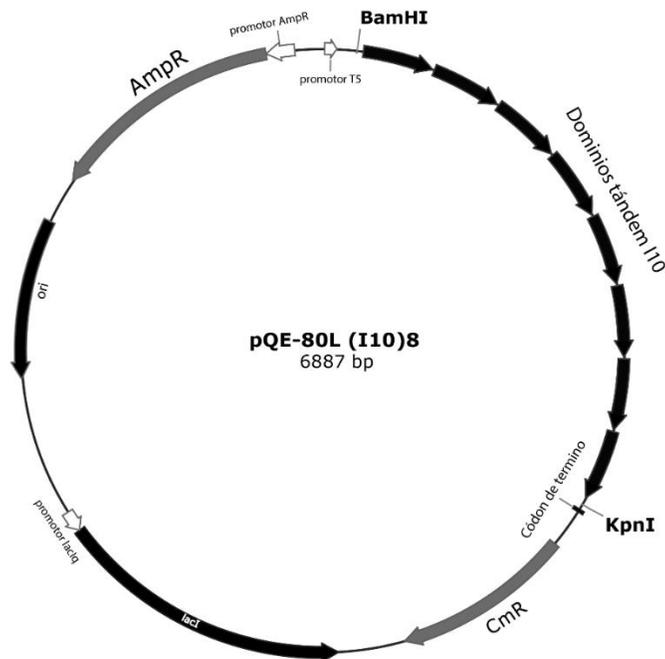


Figura 4. Esquema del plásmido pQE-80L incluyendo el segmento quimérico clonado (I10)₈. Los sitios de restricción *Bam*HI y *Kpn*I, junto a las secuencias que contienen los elementos de resistencia CmR: Cloranfenicol acetiltransferasa, AmpR: gen de la beta-lactamasa, origen de replicación Ori, y Represor lac, lacI, se encuentran indicados a lo largo del vector.

3.1.5 Cepas bacterianas

Para la expresión de la poliproteína I10 e I10(Tre16Ile), se emplearon las cepas de *E. coli* BLR (DE3) pLysS, las cuales fueron obtenidas desde Novagen.

3.2 Métodos

3.2.1 Dinámica Molecular Dirigida

Para las simulaciones se empleó el programa de dinámica molecular NAMD 2.9.1 (31), utilizando el campo de fuerza CHARMM36 (43), el cual posee estrategias estandarizadas para imponer regímenes de perturbación por fuerza. Se utilizó el modelo deducido del cristal para el dominio I10 de titina obtenido desde el *Protein Data Bank* (ID: 4QEG, <https://www.rcsb.org>). Desde el archivo PDB obtenido se eliminaron manualmente todos los átomos que no formaban parte de la proteína (moléculas de agua y coprecipitantes), posteriormente se usó como templado para implementar la sustitución T2580I, mediante la herramienta “*mutate residue*” implementada en el programa VMD (44), y la adición de glutatión parametrizado de forma manual en el campo de fuerza CHARMM36, unido por un enlace de disulfuro a los residuos 2857, 2909, o en ambos. Se centro la proteína sobre el origen y alineo el extremo N y C terminal sobre un vector paralelo al eje Y. Estos modelos fueron solvatados agregando una caja de agua tipo *TIP3* de dimensiones 99.7 (X), 447.9 (Y), 99.1 (Z) nm, dando espacio suficiente para el desplegamiento de la molécula, neutralizando el sistema con CaCl₂ a una concentración de 0.2 mol/L con una distancia mínima entre iones y soluto de 5 ángstrom (Å). Este procedimiento de neutralización de cargas mediante iones se repitió individualmente para cada una de las réplicas utilizadas en este trabajo. Finalmente, se hizo una repartición de masas con el objetivo de aumentar la velocidad de las simulaciones al disminuir la frecuencia de vibración de los átomos de hidrogeno (45).

Cada repetición fue minimizada durante 20000 pasos, seguido por un equilibrio de 60 picosegundos (ps) aumentando lentamente la temperatura desde 0 K hasta una temperatura final de 298 K (pasos de 2 fs), manteniendo una presión constante de 1 atmosfera (1.01325 bar). Desde este punto se iniciaron las simulaciones moleculares dirigida, las cuales fueron realizadas aplicando una fuerza constante de 500, 1000 y 2000 pN (pasos de 4 fs). Para el estiramiento de la molécula se utilizaron los carbonos alfa de los residuos 2833 y 2921, primer y último residuo de la proteína, como puntos de

referencia para aplicar el vector de fuerza (Figura 5), con una constante de fuerza armónica de 10 kcal/mol/Å². El protocolo de fuerza se mantuvo hasta lograr que la proteína obtuviera el estado desplegado, cuando la distancia entre los átomos de referencia no cambia.

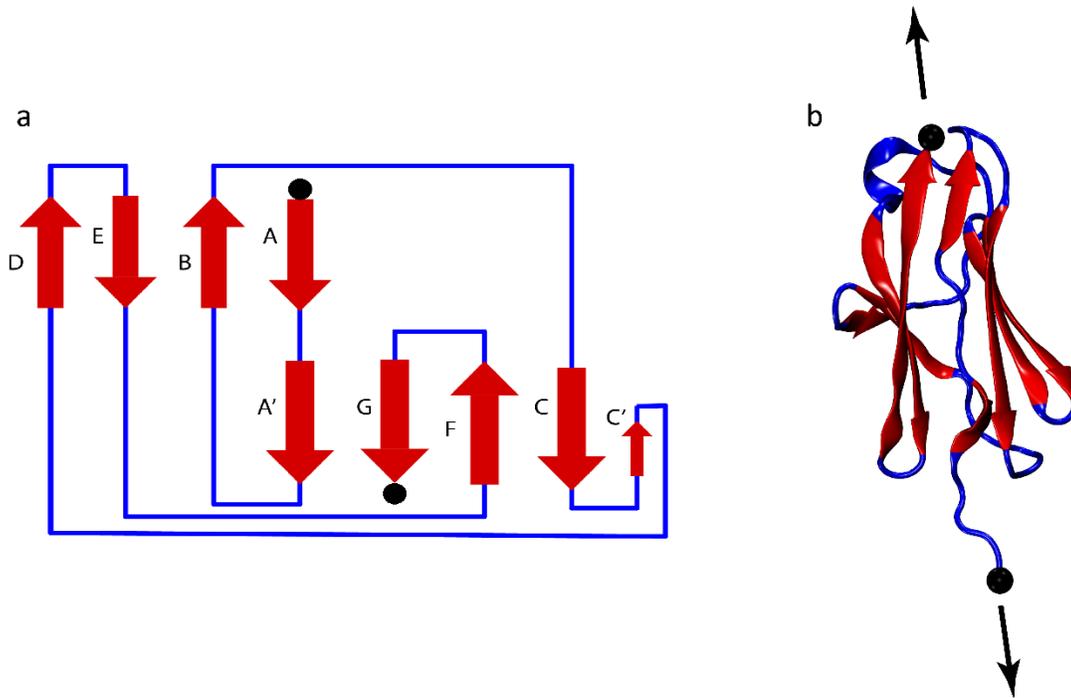


Figura 5. Esquema de la (a) topología y (b) representación tridimensional del dominio I10 de titina. En rojo se representan las hebras beta de la proteína, mientras que en azul giros beta, sección desestructuradas y segmentos de hélice alfa. Esferas negras representan el primer y último aminoácido, lugar de aplicación de las fuerzas con el respectivo vector de direccionalidad usado para desplegar la proteína mediante SMD.

Para la visualización y análisis de los datos se utilizaron las herramientas implementadas en el programa de visualización molecular VMD, además de scripts desarrollados localmente, los cuales se encuentran incluidos en material suplementario (ver Anexos).

Las dinámicas moleculares fueron llevadas a cabo en uno de los servidores de alto computo del centro de Genómica y Bioinformática “Pudu” (HPC@CGB), el cual consta de un CPU Intel Xeon de 16 hebras de 2.3 GHz y una memoria RAM de 32 GB. Por otro lado, también se empleó una computadora portátil con un CPU AMD Ryzen 5 de 8 hebras de 3.0 GHz, una memoria RAM de 16 GB y una tarjeta de video NVIDIA GeForce GTX 1650. De manera conjunta, se realizaron un total de 124 nanosegundos de simulación para el estudio del desplegamiento mecánico del dominio I10 de titina y su versión mutante T2580I, en la presencia y ausencia de glutatión.

3.2.2 Expresión de la poliproteína (I10)₈

Para la expresión del dominio I10 de titina silvestre y mutante se inocularon 50 μ L de células *E. coli* BLR (DE3) pLysS previamente transformadas con el vector pQE80L en 5 mL de medio LB fresco suplementado con cloranfenicol 0.002 mg/mL y ampicilina 0.001 mg/mL. Los cultivos fueron incubados a 37 °C bajo agitación durante la noche o hasta alcanzar saturación. Posteriormente, las bacterias fueron trasladadas hasta un medio LB fresco de 400 mL que incluía los antibióticos cloranfenicol y ampicilina. En este caso los cultivos se incubaron en agitación hasta alcanzar una densidad óptica (OD) a 600 nm de 0.6, momento en el cual 1 mM de IPTG fue añadido a los cultivos para la inducción de la expresión de la poliproteína I10. Los cultivos fueron incubados bajo agitación a 37° C durante al menos 12 horas. Posteriormente, las células fueron cosechadas por medio de centrifugación a 7000 g por 10 minutos. El pellet obtenido de células fue lavado en PBS, incluyendo 1 mM PMSF y 1 μ g/mL de leupeptina, moléculas que disminuyen la proteólisis durante la preparación de la proteína. La integridad celular fue comprometida aplicando a la suspensión un pulso de ultrasonido de aproximadamente 12-15 Watts (sonicador Q55 Sonicator, Qsonica, 55W) bajo un régimen de 30 pulsos de una extensión de 30 segundos interrumpidos por pausas de 30 segundos. La totalidad del proceso fue realizado en hielo, evitando aumentos excesivos de la temperatura. El extracto crudo fue centrifugado a 20.000 g a 4 °C por 60 minutos. Para la purificación de proteína el sobrenadante obtenido desde la centrifugación se introdujo en una columna de afinidad NTA-sephadex pre-equilibrada con cobalto y el mismo amortiguador en el que se encontraba la proteína (1 mL de resina seca). Luego de cargar la columna con el lisado, se continuaron lavados de hasta 50 mL que aseguraran la eliminación de unión inespecífica de otras proteínas a la resina. Finalmente, la proteína fue eluída por la adición del amortiguador de elusión recolectando en fracciones de aproximadamente 500 μ L y almacenadas para futuros análisis. La concentración fue cuantificada mediante absorbancia a 280 nm utilizando un espectrofotómetro Infinite® M200 PRO NanoQuant de Tecan, y la homogeneidad de la preparación se analizó mediante SDS-PAGE.

3.2.3 Espectroscopia de fuerza

Para la caracterización de las propiedades mecánicas del dominio I10 se utilizó un microscopio de fuerza acondicionado específicamente para estas tareas (Figura 6), el cual permite aplicar fuerzas calibradas sobre moléculas individuales con una resolución espacial cercana a 2 nm, una fuerza

mínima aplicada de 20 pN y una resolución de 5 pN en regímenes de alta fuerza, gracias al piezoeléctrico.

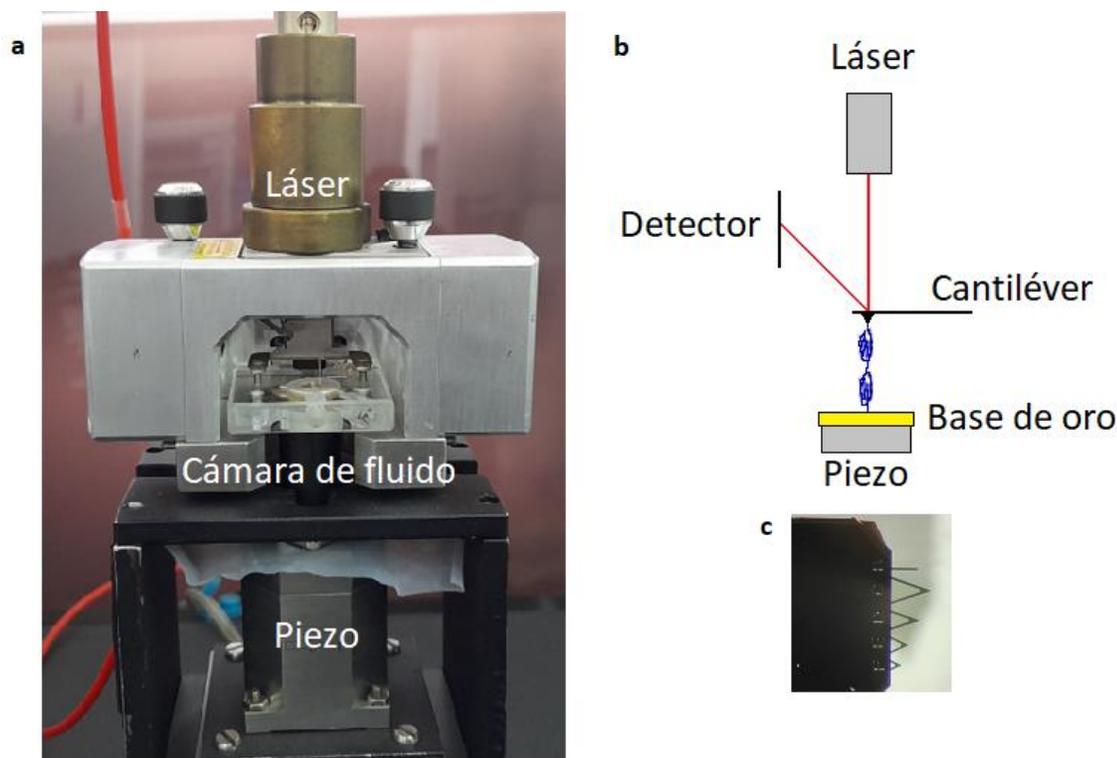


Figura 6. Microscopio de fuerza atómica (AFM) y manipulación de moléculas individuales. (a) El AFM empleado en este trabajo está basado en un diseño previamente publicado (46). Cuenta de un cabezal de la compañía Bruker, que contiene al láser y al detector. A su vez, el cabezal aloja la cámara de fluido en el que se ubica el cantiléver o microviga encargada de la manipulación de las biomoléculas depositadas en la muestras o base de oro. Por debajo del cabezal esta la muestra que se encuentra movilizada por el piezo, cristal que responde a cambios de potencial modificando su altura con una resolución nanométrica. (b) esquema representativo del experimento, (c) cantiléver utilizado en experimentos.

Para las mediciones de perturbación mecánica se emplearon las poliproteínas I10 silvestre y mutante, las cuales se encontraban previamente purificadas y almacenadas en buffer de elusión. Una alícuota de 15 μL de proteína, de una concentración aproximada de 0.1 mg/mL, fue depositada sobre una superficie de vidrio funcionalizada con una nanocapa de 40 nm de oro. Luego de una incubación de 20 minutos y evitando la deshidratación total, se ubicó la cámara de fluido que incluye el cantiléver, por arriba de la superficie. La cámara de fluido contiene entre 500 a 1000 μL de PBS filtrado, desgaseado y termo estabilizado, de modo de asegurar un buen desempeño del instrumento durante la calibración y experimento. El sistema completo se incubó por otros 10 minutos para lograr un equilibrio de los fluidos en el sistema. Una segunda jeringa con PBS desgaseado es mantenida en

conexión con la cámara de fluido a lo largo del experimento, asegurando una columna de solvente durante el transcurso del experimento, además de permitir lavados e intercambios de moléculas. En el caso de los ensayos en presencia de glutatión, el amortiguador PBS incluido en las jeringas de entrada y salida contenía una concentración de 100 mM GSSG. A esta concentración se asegura que la modificación de cisteínas expuestas a la solución durante el experimento ocurra en una escala de tiempo apropiadas para la medición (28).

La realización de experimentos en AFM puede ser realizada mediante fuerza constante (FC) y velocidad constante (FX). En los protocolos de FC empleados en este trabajo se utilizó una fuerza inicial de estiramiento constante preestablecida inicial de 100 pN, fase inicial de exposición al medio, la cual fue mantenida por 5 segundos. A continuación, ya confirmado el desplegamiento de la proteína, la fuerza de desplegamiento es suspendida, relajando el sistema a una fuerza 10 pN. Durante esta fase del protocolo los dominios I10 desplegados se vuelvan a plegar, etapa que dura 5 segundos. Finalmente se vuelve a ejercer una fuerza de 100 pN para medir la proporción de dominios que fueron capaces de plegarse. Siendo GSSG el factor a medir frente a un medio PBS control. Para el protocolo de FX, las proteínas se estiran a una velocidad de 400 nm/s, por lo que el experimento tarda cerca de 1 segundo en completar el desplegamiento total de la proteína y ruptura de la superficie o punta del cantiléver (fenómeno conocido como *detachment*).

El control del instrumento, incluyendo la calibración, se realiza mediante una rutina generada en IGOR versión 6.12 (Wavemetrics), programa específicamente diseñado para la operación de instrumentación, incluyendo microscopios de fuerza atómica (ver Anexos). Una vez montado el sistema, se puede seguir utilizando por varias horas recolectando datos de forma automática y bajo control remoto (46).

3.2.4 Análisis estadísticos

Para las trayectorias de simulación molecular dirigida, se analizaron los datos de manera individual inspeccionando las trayectorias con la ayuda de scripts o rutinas previamente desarrollada de manera local en tk-consola o disponibles en el programa VMD.

Los ensayos de mecánica se analizaron por medio de histogramas de frecuencia de eventos y ajustados los datos a modelos *ad-hoc* con el fin de ofrecer una explicación a las distribuciones

provenientes de ensayos de moléculas individuales. Para los experimentos FX, se analizaron las curvas de desplegamiento de manera individual ajustando al modelo de elasticidad de polímeros vermiforme (ecuación 1), también conocido como Worm-Like Chain (WLC):

$$\text{Ecuación 1} \quad F = \frac{k_B T}{L_p} \left(\frac{1}{4 \left(1 - \frac{z}{L_c}\right)^2} + \frac{z}{L_c} + \frac{1}{4} \right)$$

Este modelo permite estimar el largo de la molécula cuando es estirada a una fuerza que tiende a infinito, siendo sus parámetros el largo de cada dominio " ΔL_c ", la distancia mínima a la cual se puede torcer el polímero " L_p ", la distancia de desplegamiento de la proteína " z ", la constante de Boltzmann " k_B " y la temperatura " T " (47)

Por otro lado, en los experimentos de FC, se siguió la misma rutina de análisis individual, utilizando trazas que incluían un número suficiente de eventos de desplegamiento las que fueron promediadas de modo de conocer la temporalidad del proceso de desplegamiento a una fuerza dada (46), aplicando un modelo exponencial para determinar la tasa de plegamiento de los distintos experimentos definido por ecuación 2:

$$\text{Ecuación 2} \quad F(x) = A - Ae^{-kx}$$

Donde A es una constante, k es la tasa de desplegamiento y x es tiempo. Para determinar el error asociado se realizó un análisis de *bootstrapping* (46).

Tanto en los experimentos FX y FC, es necesario una selección de datos de la gran de cantidad recogidas de manera automática por el algoritmo de registro de trazas. Este procedimiento se realiza por inspección de las curvas de manera individual, usando una rutina escrita en Igor 6.12 (ver Anexos). Los criterios de selección constan del uso de registros de moléculas individuales con un mínimo de longitud, que asegure que toda la proteína fue sometida a la perturbación mecánica (46). Los histogramas fueron ajustados a distribuciones Gaussianas, analizando los valores promedio de las distribuciones usando ANOVA. Finalmente, se empleó el post-test Bonferroni para determinar las diferencias significativas entre los diferentes pares a comparar (silvestre, mutante, presencia y ausencia del glutatión oxidado) (48). Se consideró como diferencias significativas un valor $P < 0.05$.

4. PRESENTACION Y ANALISIS DE RESULTADOS

4.1 Caracterizar las propiedades mecánicas del dominio I10 silvestre y mutante de la banda I de titina mediante dinámica molecular dirigida

4.1.1 Estados de plegamiento e intermediarios

Se utilizó un protocolo de fuerza constante aplicando una fuerza de 500, 1000 y 2000 pN comenzando la simulación desde un estado previamente minimizado y equilibrado. En todas las simulaciones se observa un estado inicial plegado estable o *folded* (F). Al comenzar el desplegamiento se encontró en todas las fuerzas realizadas un estado en el cual los enlaces de hidrógeno de las hebras AB y A'G se rompen generando un intermediario 1 (I1), sin embargo, a 2000 pN este estado fue de solo un par ps. Posterior a esta etapa existe un desplegamiento sucesivo de las hebras GF, FC, BE, C'C y ED hasta un estado completamente desplegado extendido o *unfolded* (U). Un caso especial fue la simulación a 500 pN donde se encontró un segundo intermediario (I2) en el cual las hebras AB A'G y GF se encuentran expuestas al medio (Figura 7), continuando posteriormente al estadio U.

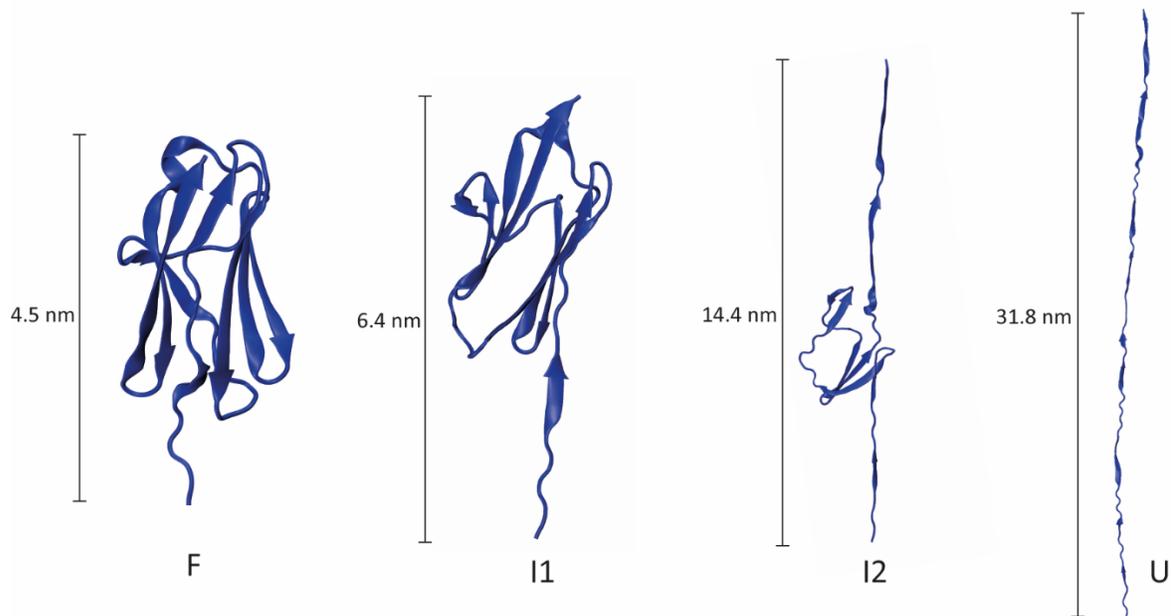


Figura 7. Representación esquemática de los principales estados encontrados mediante simulación molecular dirigida del dominio I10 de titina. El dominio I10 realiza una transición desde el estado plegado (F) hasta el estado desplegado (U) visitando los intermediarios estables I1 y I2, que cuentan con una gran abundancia de elementos de estructura secundaria.

La serie de eventos de desplegamiento, con la presencia de intermediarios, es conservado entre el dominio I10 silvestre y mutante. Esto sugiere que la sustitución Tre2580Ile posee poca injerencia en el fenómeno de desplegamiento mecánico del dominio I10.

4.1.2 Fuerzas de desplegamiento

La fuerza es el factor que determina el tiempo necesario para desplegar completamente el dominio I10, extendiéndose por cerca de 11 ns cuando 500 pN de fuerza fueron aplicados, 0.8 ns a 1000 pN y cerca de 0.4 ns a 2000 pN. Además, se encuentra poca variabilidad en las simulaciones al ser estiradas a mayores fuerzas, deducido por la baja variabilidad obtenida a 1000 y 2000 pN (Figura 8b). Debido a los largos tiempos de simulación a 500 pN, solo se realizaron 3 simulaciones del dominio I10 silvestre, de los cuales 2 mostraron un comportamiento similar a otras fuerzas demorando 11 ns, mientras que una simulación mostro el estado I2 (Figura 8a), añadiendo 60 ns extras a su tiempo de desplegamiento. Finalmente, no se encontraron diferencias de velocidad entre el dominio silvestre y mutante en ninguna de las fuerzas exploradas.

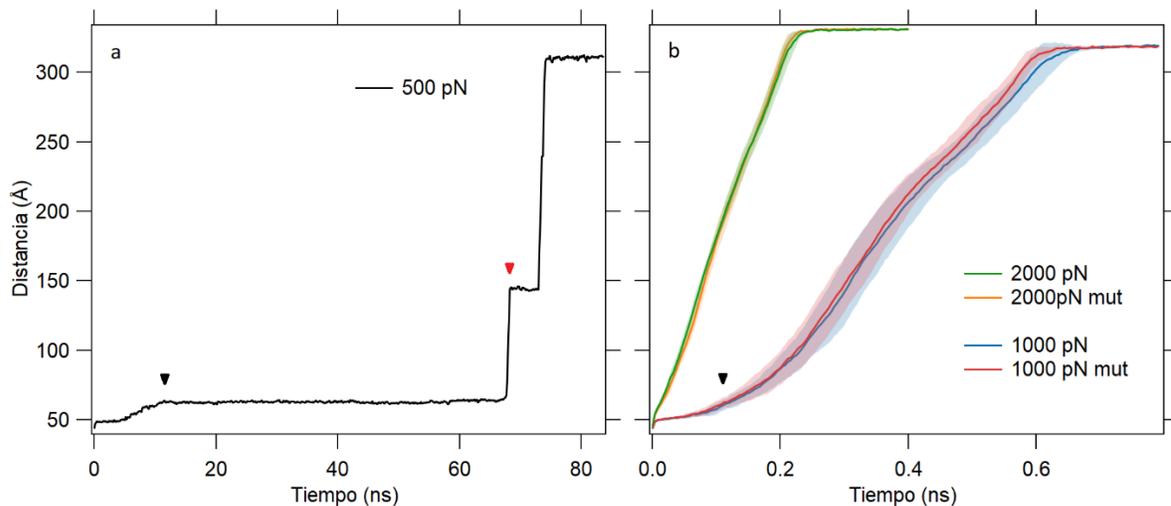


Figura 8. Relación distancia en función del tiempo obtenido desde las simulaciones de desplegamiento mecánico del dominio I10 silvestre y mutante. (a) representación de tres simulaciones a 500 pN de fuerza del dominio I10 silvestre. (b) Representación promedio a distintas fuerzas del dominio I10, silvestre y mutante a 1000 y 2000 pN. Cada condición experimental a 1000 y 2000 pN corresponde al promedio de 6 simulaciones (línea sólida). Triangulo negro I1, Triangulo rojo I2. Sombras representan el intervalo de confianza.

4.1.3 Enlaces de hidrógeno

Un análisis detallado del comportamiento de los enlaces de hidrógeno muestra un estado inicial de equilibrio en la formación y destrucción de enlaces entre las hebras beta presentes en la proteína, fenómeno normal para cualquier proteína. Sin embargo, al comenzar el desplegamiento mediado por la fuerza aplicada ocurre un rompimiento inicial de las hebras AB y A'G, las cuales se ve completamente desplazada desencadenando la caída abrupta en los enlaces de hidrógeno pertenecientes a las hebras beta (Figura 9, panel izquierdo). Al comparar el dominio I10 mutante Tre2580Ile respecto a la versión silvestre, no se encuentran diferencias significativas, tanto en el número ni la evolución de enlaces de hidrógenos de las hebras beta a lo largo de las trayectorias de estiramiento mecánico (Figura 9). Debido a que la mutación Tre2580Ile se encuentra entre las hebras beta A' y B sin formar puentes de hidrogeno de forma directa en esta estructura, se analizaron los enlaces de hidrógeno totales buscando diferencias en las interacciones no nativas. Sin embargo, al igual que en el caso anterior no se encontraron diferencias en los enlaces de hidrógeno totales (Figura 9, panel derecho).

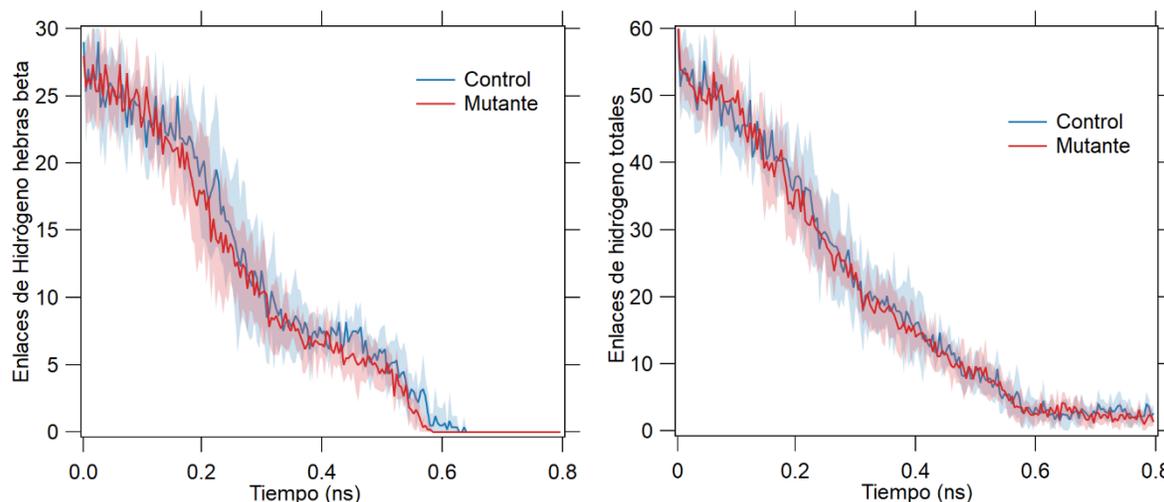


Figura 9. Evolución del número de enlaces de hidrógeno en función del tiempo para el dominio I10 silvestre y mutante a 1000 pN de fuerza. A medida que la proteína se despliega los enlaces de hidrógeno de las hebras beta (panel izquierdo) y totales (panel derecho) se rompen, sin evidenciar diferencias entre silvestre y mutante. Cada experimento es el promedio de 6 simulaciones, con la sombra representando el intervalo de confianza.

4.1.4 Fuerzas no enlazantes

Para entender de forma íntegra el comportamiento y evolución del dominio I10 silvestre y mutante se analizaron las fuerzas no enlazantes de la simulación en función del tiempo. Para esto se midieron las fuerzas electroestáticas y de van der Waals (vdW) de la proteína por sí sola y las interacciones de la proteína en relación con el solvente (agua).

Las fuerzas electroestáticas de la proteína se mantienen estables durante la apertura las hebras beta AB y A'G debido al efecto compensatorio que tienen las interacciones no nativas al desplegarse la proteína. Este proceso perdura hasta el punto de apertura de la estructura globular en el cual se expone el núcleo hidrofóbico (Figura 10). Desde este momento la distancia entre las hebras imposibilita la formación de nuevas interacciones. Debido a que los aminoácidos solo pueden generar interacciones con los aminoácidos contiguos las fuerzas electroestáticas disminuyen a cero, en algunos casos, estos aminoácidos vecinos son apolares por lo que las fuerzas se vuelven termodinámicamente desfavorables, pasando a fuerzas electroestáticas positivas (Figura 10). Al mismo tiempo, el área de la proteína expuesta aumenta con cada hebra desplegada, siendo esta la razón del aumento de las fuerzas electroestáticas de la proteína frente al agua (Figura 10). Al comparar este fenómeno entre silvestre y mutante no se encontraron diferencias significativas.

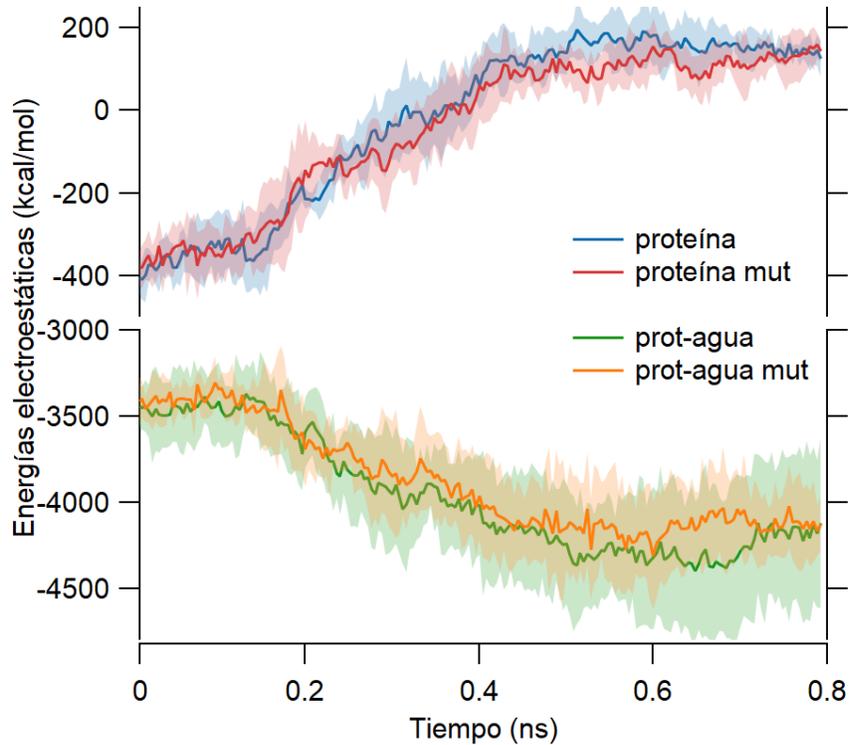


Figura 10. Fuerzas electrostáticas en función del tiempo del dominio I10 silvestre y mutante a una fuerza de 1000 pN. Se analizan las interacciones electrostáticas de la proteína por si sola (registro en azul y rojo) y las interacciones de la proteína frente al solvente (registro en verde y naranja). N=6. Sombras representan el intervalo de confianza.

Al analizar las fuerzas de vdW de la proteína se encuentra que estas disminuyen continuamente, mientras que las fuerzas de interacción entre la proteína y el solvente aumentan. El punto en el cual estas fuerzas se equiparan es el punto en el cual el núcleo hidrofóbico se ve expuesto al solvente (Figura 11). De la misma forma que pasa con las fuerzas electrostáticas, el área de la proteína expuesta frente al agua aumenta en proporción a la longitud, por lo que los residuos que se encuentran al centro de la proteína globular sin acceso al exterior comienzan a interactuar con el solvente, traspasando las energías internas hacia el solvente.

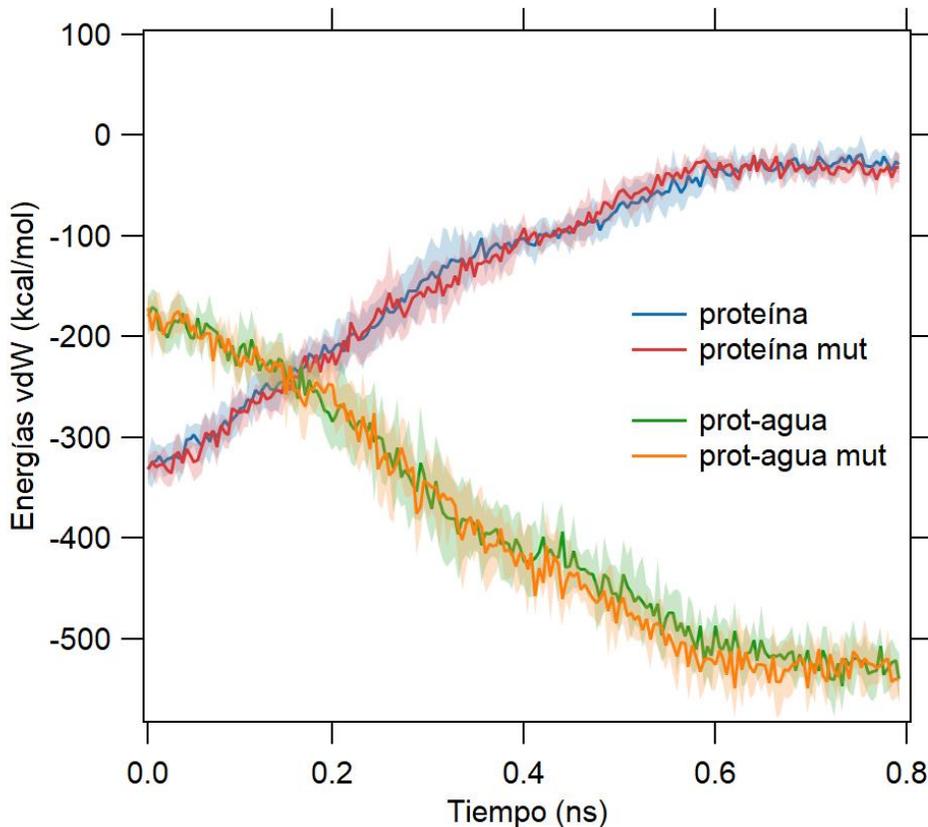


Figura 11. Fuerzas de vdW en función del tiempo para el dominio I10 salvaje y mutante a una fuerza de 1000 pN de fuerza. Se observa una disminución progresiva de las fuerzas internas de la proteína siendo transferida a interacciones proteína-solvente. Promedio de 6 réplicas para ambos estados, sombras representan el intervalo de confianza.

El análisis de las fuerzas de vdW a 500 pN mostró la estabilidad energética en el intermediario 1 lo que sugiere que la pérdida de los enlaces de hidrógenos de las hebras AB y A'G es compensada por el núcleo hidrofóbico, siendo vencida estas fuerzas al desprenderse las hebras FC, siendo expuesta al agua completamente. Además, se observó que el punto de cruce de las fuerzas ocurrió durante I2.

Finalmente, al comparar entre el control y la proteína mutante no se encontraron diferencias significativas.

4.2 Comparar la dinámica de plegamiento del dominio I10 silvestre y mutante usando modelos simplificados en la presencia de cisteínas S-glutatinilizadas

Debido a la complejidad de realizar dinámicas moleculares que permitan explorar la trayectoria de plegamiento de proteínas, se procedió a construir un modelo del dominio I10 ya unido a glutatión en

el residuo de cisteínas 2909, 2857 o en ambos residuos. Los dominios I10 S-glutationilizados fueron desplegados aplicando una fuerza constante de 1000 pN, entregando un nivel de detalle superior a 2000 pN y en un tiempo razonable en comparación a 500 pN. En total se realizaron 6 repeticiones por cada sistema experimental, silvestre y mutante, modificación simple o doble, totalizando 36 simulaciones, todas realizadas a 1000 pN.

4.2.1 Estados de desplegamiento

Todas las simulaciones mostraron patrones de desplegamiento similares a los encontrados en objetivo 1, con un estado inicial F, un estado final U, además de I1. Sin embargo, en ninguna de las simulaciones se encontró un intermediario 2. A pesar de la gran cantidad de simulaciones realizadas no es posible concluir que glutatión es responsable de esto, ya que sin su presencia en los experimentos anteriores solo fue encontrado en una simulación.

4.2.2 Fuerza de desplegamiento

Al analizar la evolución de la longitud de la proteína en función del tiempo solo se observó una diferencia significativa en la proteína silvestre con ambos residuos de cisteína modificados (Tabla 1), en la que el dominio con ambos glutatones demora 0.1 ns más en desplegarse (Figura 12).

Tabla 1. Comparaciones en la velocidad de desplegamiento	
Experimento	valor-P
Control – 2909	0.72
Control – 2909 mut	0.56
Control – 2857	0.70
Control – 2857 mut	0.15
Control – Ambos	8.6e ⁻³
Control – Ambos mut	0.55

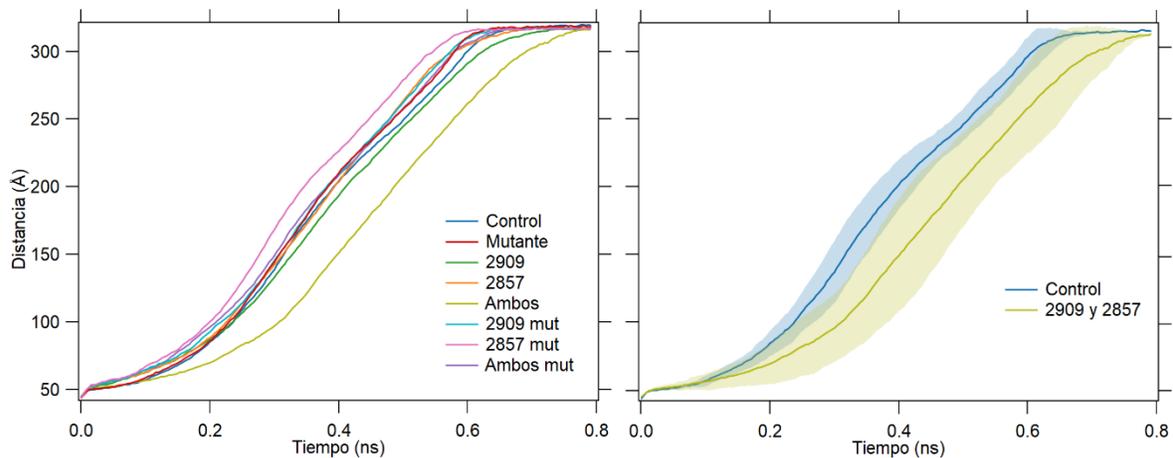


FIGURA 12. Longitud en función del tiempo del dominio I10 silvestre y mutante. (a) comparativa de todos los sistemas experimentales. (b) comparación entre control y ambos residuos modificados mostrando sus respectivos intervalos de confianza. El número indica el residuo modificado.

4.2.3 Enlaces de hidrógeno

Durante las dinámicas los dos glutaciones se acomodan en un costado de la proteína sin afectar las hebras, pero al comenzar el desplegamiento se producen enlaces de hidrógenos transitorios entre los glutaciones, lo que aumenta la energía necesaria para separar las hebras AB y A'G, aumentando en aproximadamente 0.85 ns y de forma significativa el tiempo necesario para elongar completamente la proteína cuando están presentes ambos glutaciones (tabla 2), explicando el tiempo extra observado para I10 silvestre con ambas cisteínas modificadas. En el caso del dominio I10 mutante este no tardo más tiempo como su contraparte silvestre al tener ambos glutaciones, debido a la disrupción de enlaces de hidrógenos de las hebras AB por parte de estos glutaciones al acomodarse de forma distinta, disminuyendo las fuerzas iniciales necesarias para su estiramiento. A pesar de esto, se demora el mismo tiempo que el control al contrarrestar la menor cantidad de hidrógenos en la hebra con nuevos enlaces de hidrógeno generados por los glutaciones entre sí.

Otro factor que se encontró al analizar los enlaces de hidrogeno es la diferencia en la posición de los glutaciones (Figura 13). Se observó que en el caso de la proteína modificada en la posición Cys2857 y ambas cisteínas modificadas existen diferencias significativas al momento de contabilizar los enlaces de hidrogeno entre las hebras (Tabla 2 y Figura 13). Debido a la posición del glutatión ubicado en la Cys2857, se disrumpan los enlaces de hidrógeno de las hebras A'G y AB. Esto sería el factor diferencial en la cantidad de enlaces de hidrógeno, aunque no significativa, en la velocidad de desplegamiento

de las hebras. En el caso de ambos glutationes está pérdida de enlaces es compensada por la formación de nuevos enlaces de hidrógeno entre las hebras de la proteína y las moléculas de glutatión.

Tabla 2. Comparaciones para la cantidad de enlaces de hidrógeno

Experimento	Valor-P - Hebras beta	Valor-P - Totales
Control – 2909	0.21	0.17
Control – 2909 mut	0.04	0.99
Control – 2857	1.7e-3	0.39
Control – 2857 mut	4.5e-4	0.83
Control – Ambos	0.66	1.99e-5
Control – Ambos mut	5.5e-3	0.31

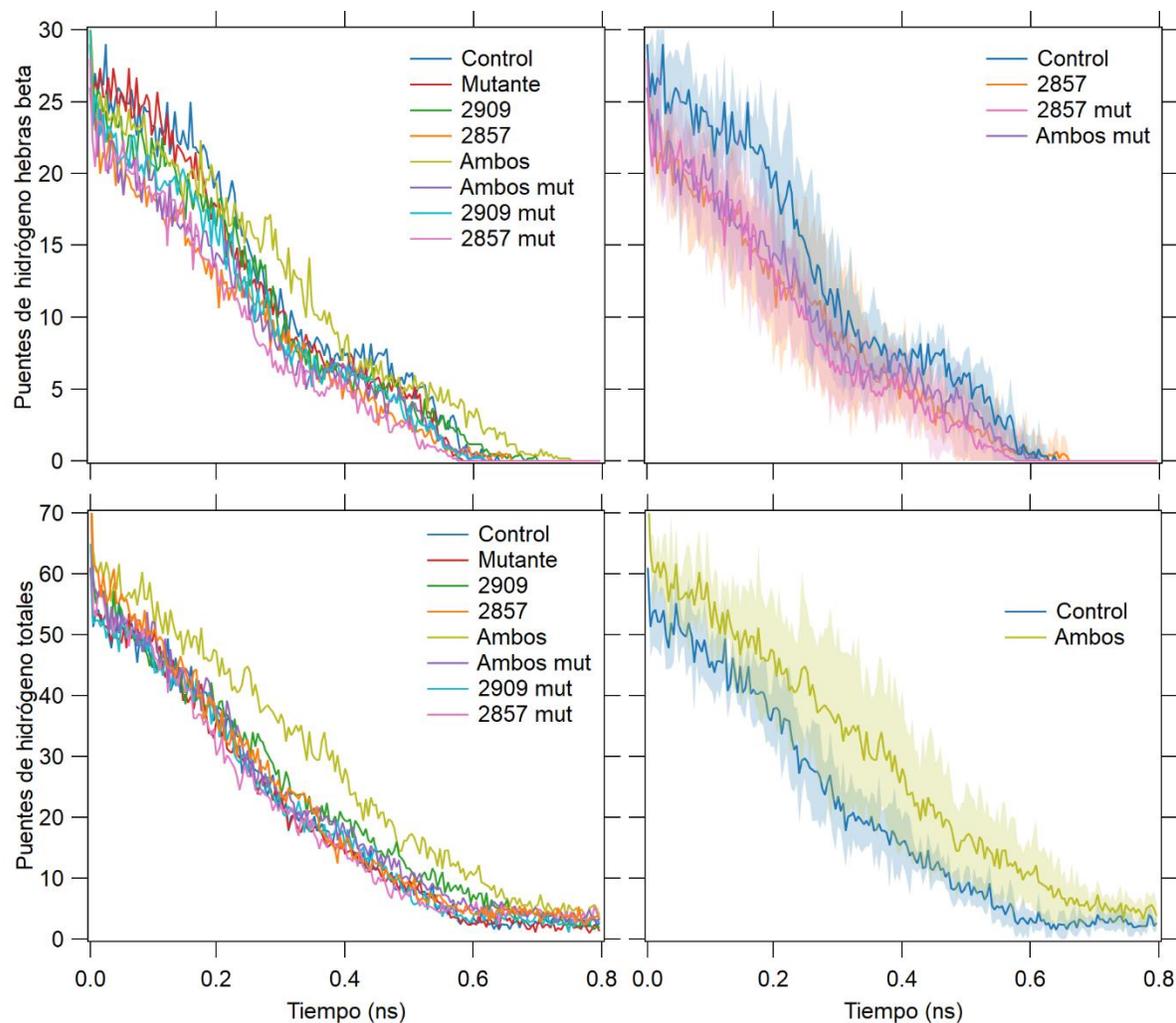


Figura 13. Número de enlaces de hidrogeno en función del tiempo totales de las hebras beta (superior) y totales (inferior). con las respectivas diferencias significativas (figuras derechas). Se observa una disminución progresiva de la cantidad de enlaces de hidrógenos a medida que las hebras se separan. La mayor cantidad de enlaces de hidrogeno de “ambos” es en gran parte por la demora en la separación de sus hebras y los enlaces de hidrogeno extra formado debido a la interacción entre ambos. Cada línea representa el promedio de 6 simulaciones. Sombras representan el intervalo de confianza.

4.2.4 Fuerzas no enlazantes

Debido a que el glutatión está formado por tres aminoácidos, las fuerzas electroestáticas internas son mayores inicialmente en comparación al control (Figura 14a, trazas ascendentes), siendo reflejado en que la proteína control (sin glutatión) parte de una energía interna de -400 kcal/mol, seguida por -600 kcal/mol para dominio I10 más un glutatión y cercano a -800 kcal/mol con ambos glutationes unidos (Figura 14a, trazas ascendentes). Siguiendo esta comparativa, para el dominio I10 mutante las energías son más bajas en comparación a dominio salvaje, pero esto se explica por la posición en la

que se acomodan los glutaciones al principio de la simulación (Figura 14b, trazas descendentes), observando que estas energías se encuentran presentes en interacciones con el solvente (traza 14b, trazas descendentes).

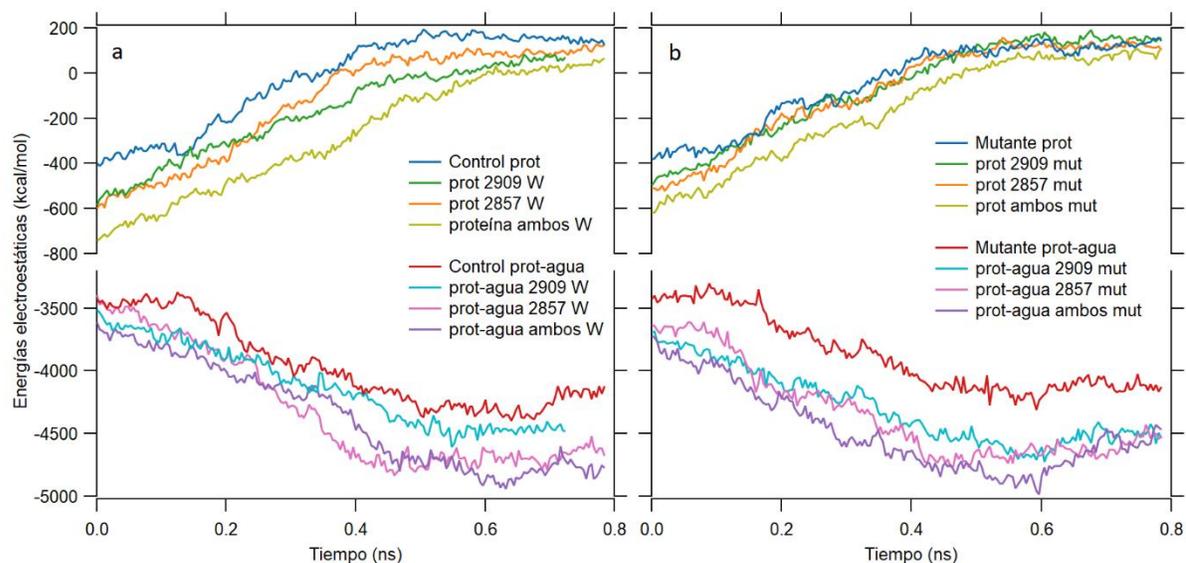


Figura 14. Fuerzas electrostáticas del dominio I10 en función del tiempo. (a) silvestre y mutante (b). Se analizan las interacciones electrostáticas de la proteína por sí sola (gráficos ascendentes) y las interacciones de la proteína frente al solvente (gráficos descendentes). A medida que la proteína se despliega las fuerzas electrostáticas internas son transferidas al solvente. Cada línea es un promedio de 6 réplicas.

No existen diferencias en las fuerzas de vdW frente al control (Figura 15), sugiriendo que los glutaciones no disrupten el orden interno de la caja hidrofóbica, sin embargo, es necesario recordar que el dominio I10 empleado en las simulaciones no se generó siguiendo la reacción natural, donde el dominio es previamente extendido mecánicamente, modificado por glutación y plegado hasta el estado nativo. En este caso, se usó la aproximación de incluir manualmente el residuo de glutación en una u otra posición, probablemente superando una serie de dificultades que posee la proteína al momento de plegar en la presencia de un residuo de cisteína S-glutacionilizada. La demora extra de la proteína silvestre con ambos glutaciones se asocia al desplegamiento más lento de la proteína, siendo asociado como un síntoma de esto y no una posible causa.

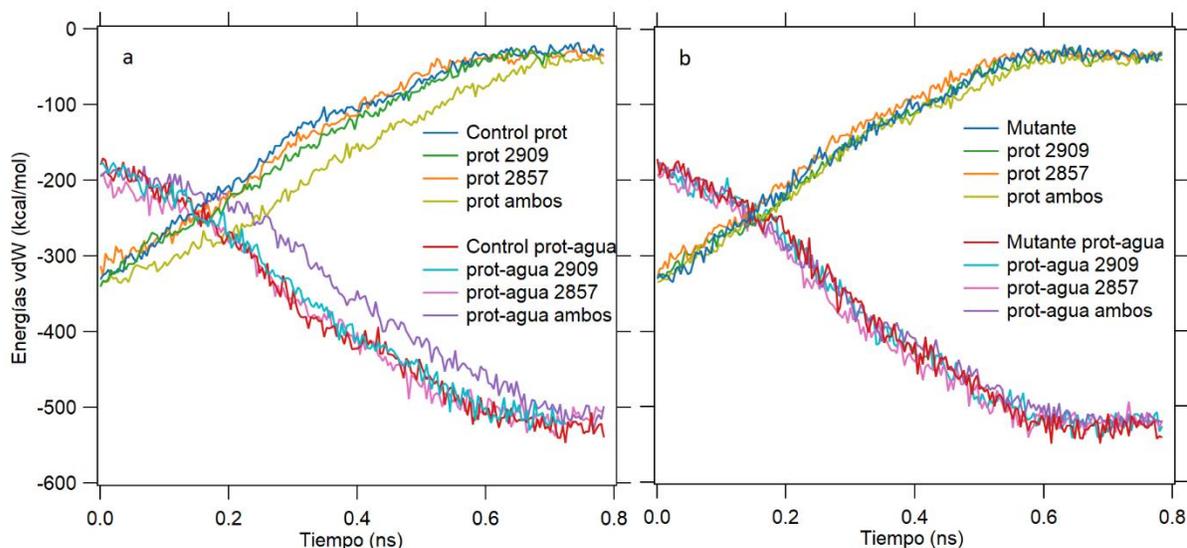


Figura 15. Fuerzas de vdW para el dominio I10 en función del tiempo. (a) silvestre y (b) mutante. Se observa una disminución progresiva de las fuerzas internas de la proteína siendo transferida a interacciones proteína-solvente. Promedio de 6 réplicas para ambos estados.

4.3 Evaluar el efecto del estrés oxidativo S-glutación en el dominio I10 silvestre y mutante de titina utilizando espectroscopia de fuerza basada en AFM.

La caracterización mecánica de proteínas elásticas se ha conseguido mediante el empleo de espectrómetros de fuerza, como el AFM. En el caso de titina, proteína de gran dimensión y complejidad para los sistemas de expresión heterólogos, se emplean pequeñas secciones o dominios clonados en tándem. Para el desarrollo de este trabajo experimental se utilizó un constructo que cuenta con 8 dominios de I10 clonados en tándem, que además de emular a una pequeña titina facilita la manipulación en el microscopio y amplifica las propiedades mecánicas medibles. Se utilizó una estrategia de FX y FC para medir las características mecánicas del dominio y como responde ante un entorno oxidante, mediado por GSSG.

4.3.1 Desplegamiento a velocidad constante

Mediante AFM se estiraron bajo un protocolo de FX un total de 176 moléculas, mostrando un patrón de dientes de serrucho al desplegar cada uno de los dominios Ig organizados en tándem en la poliproteína (Figura 16). Este patrón presenta una serie de picos de magnitudes similares en fuerza, representativo de un evento de desplegamiento de un dominio individual. El aumento de la tensión

sobre la proteína causa que un dominio cederá y se desplegará, relajando la tensión y comenzando el proceso de nuevo. El ultimo pico de mayor tamaño refleja la separación de la proteína desde el cantiléver, fenómeno conocido como despegue o desanclaje (Figura 16).

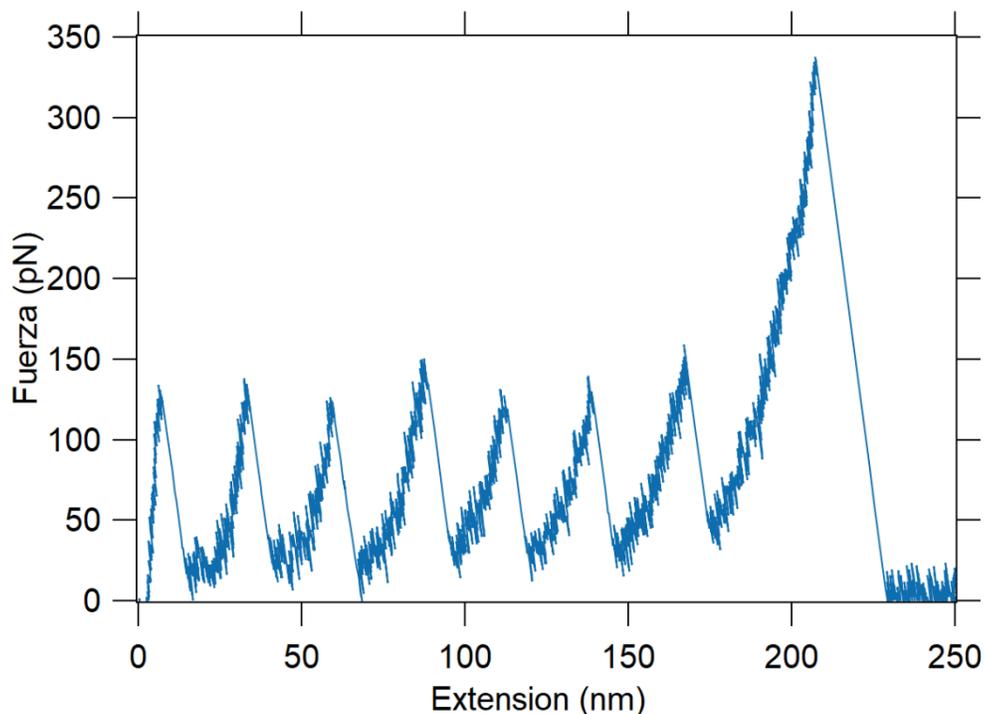


Figura 16. Curvas de extensión a velocidad constante del dominio I10. Este patrón de serrucho es representativo del desplegamiento de dominios Ig en tándem. Cada pico representa el desplegamiento de un dominio individual, mientras que el ultimo representa el despegue de la proteína desde el cantiléver.

Mediante el modelo de elasticidad WLC y congregando un número equivalente a 806 eventos de desplegamiento, se determinó la fuerza promedio a la cual se despliegan los dominios I10 silvestre y mutante, en la presencia y la ausencia de glutatión oxidado. Los distintos experimentos se ajustaron a un modelo Gaussiano arrojando una fuerza promedio para I10 silvestre de 118 pN y 113 pN en PBS y GSSG respectivamente, mientras que para I10 mutante de 104 pN y 118 pN en PBS y GSSG respectivamente (Figura 17).

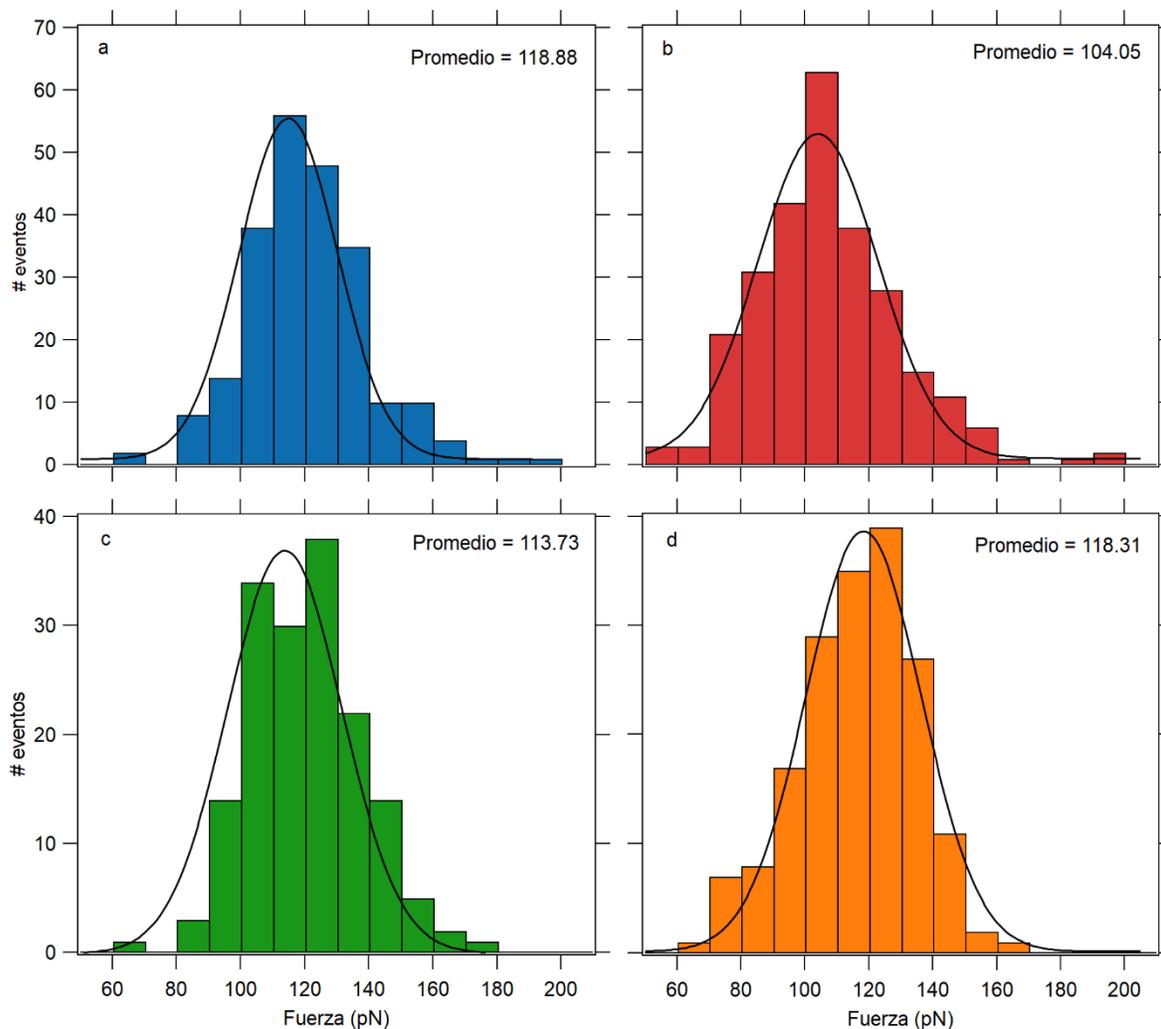


Figura 17. Histograma de fuerzas de desplegamiento en protocolo FX para dominio I10. (a) silvestre PBS, (b) mutante PBS, (c) silvestre GSSG, (d) mutante GSSG.

No se encontró una diferencia significativa entre el control y el dominio silvestre en presencia de glutatión, sugiriendo que la presencia de glutatión oxidante en el medio no afecta las propiedades mecánicas de la proteína, pero sí entre el control y el dominio mutado bajo la condición en PBS, mostrando que la mutación disminuye la fuerza necesaria para desplegar el dominio I10 (Tabla 3). Al comparar la fuerza de desplegamiento se observó que la proteína mutante en presencia de GSSG restablece la fuerza de control, probablemente por algún mecanismo mediado por GSSG.

Tabla 3. Comparaciones de fuerza de desplegamiento del dominio I10 a velocidad constante.

Experimento	valor de P
I10 PBS vs GSSG	0.75
I10 vs I10 T16I en PBS	1.19×10^{-12}
T16I PBS vs GSSG	2.05×10^{-6}

4.3.3 Desplegamiento bajo Fuerza constante

En Figura 18 se muestra un ejemplo representativo de un experimento FC en el cual se observan las etapas de exposición relajación y medición. En este caso cada escalón es un evento de desplegamiento de aproximadamente 26 nm, que representa la extensión ganada producto del desplegamiento de un dominio. Para la contabilización de la tasa de replegamiento solo se tomaron en cuenta trazas que mantuvieron el contacto con el cantiléver durante el tiempo completo del experimento tal como se muestra en Figura 18.

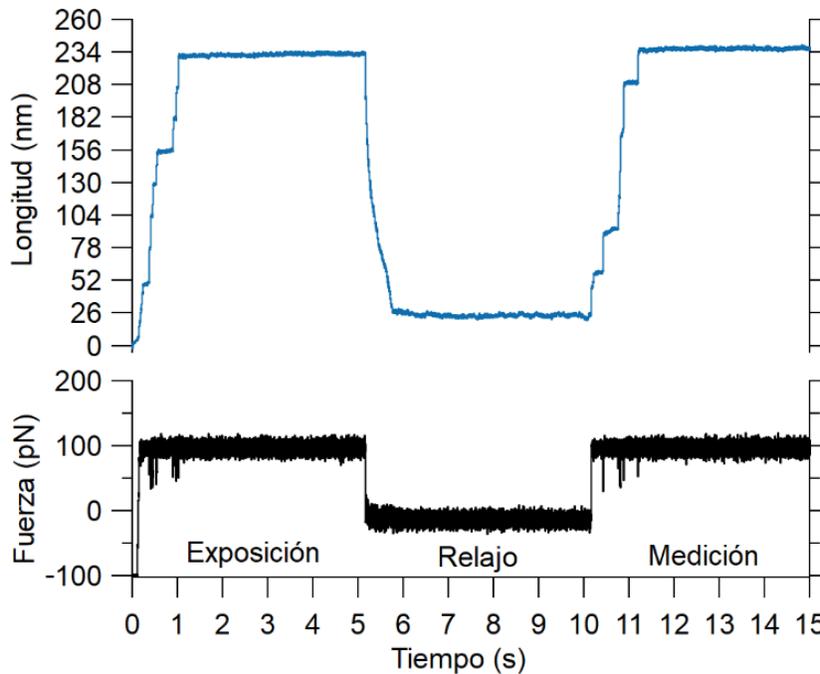


Figura 18. Desplegamiento del dominio I10 bajo un protocolo FC. Se utiliza 100 pN de fuerza por 5 segundos para desplegar las proteínas arregladas en tándem hasta su máxima longitud y exponer los dominios al medio, posteriormente se relaja a 10 pN de fuerza por 5 segundos, permitiendo el plegamiento de los dominios. Finalmente se vuelve a estirar 100 pN para desplegar los dominios. Representativo para dominio I10 salvaje y mutante. Medio en el cual se encuentra es PBS o GSSG.

Con un total de 102 eventos de desplegamiento-plegamiento exitoso para dominio I10 silvestre y 12 para dominio I10 mutante, se procedió a analizar la fracción replegada contando la cantidad de eventos entre la fase de medición y exposición. De este modo se obtuvo en el dominio silvestre una tasa de replegamiento de 51% en PBS la cual bajo hasta 26% en presencia de GSSG. Para el mutante, los valores fueron similares, 48% para PBS y 22% en GSSG (Figura 19). El análisis estadístico de los datos sugiere que la diferencia significativa ocurre en el I10 silvestre entre PBS y el GSSG, evidenciando una disminución de eventos de plegamiento debido a la presencia del glutatión. Para el caso mutante se observó un patrón parecido y de proporciones similares, sin embargo, debido al bajo número de exposiciones exitosas no fue posible realizar test estadístico para determinar de manera certera diferencias entre silvestre y mutante.

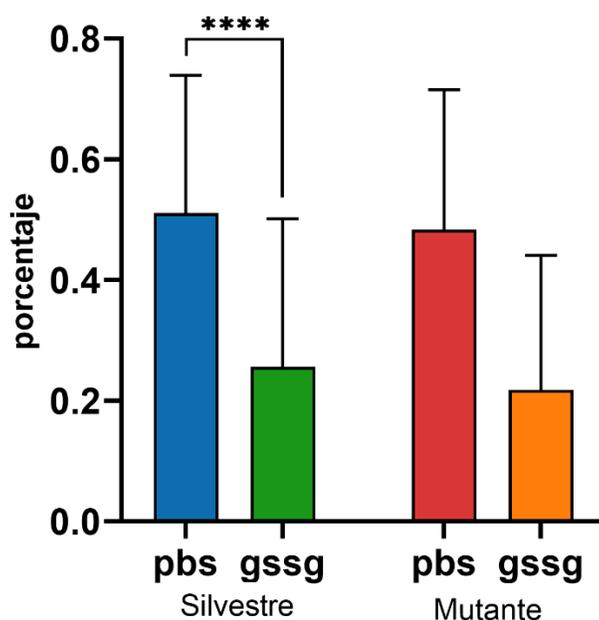


Figura 19. Fracción replegada del dominio I10. N= 102 para silvestre y 12 para mutante. Se obtuvo la diferencia de replegamiento luego de un evento de desplegamiento frente al medio PBS o GSSG. **** $p < 0.0001$

Con el objetivo de obtener una tasa de desplegamiento del dominio I10 se utilizaron trazas de FC con al menos 3 eventos de desplegamiento en la etapa de exposición. Las trayectorias fueron sumadas de modo de obtener un promedio total de desplegamiento y utilizar *bootstrapping* para obtener el error y realizar las correspondientes comparaciones. La sumatoria de distintas trazas de eventos de desplegamiento (Figura 20) se utilizó para hacer un ajuste según ecuación 2.

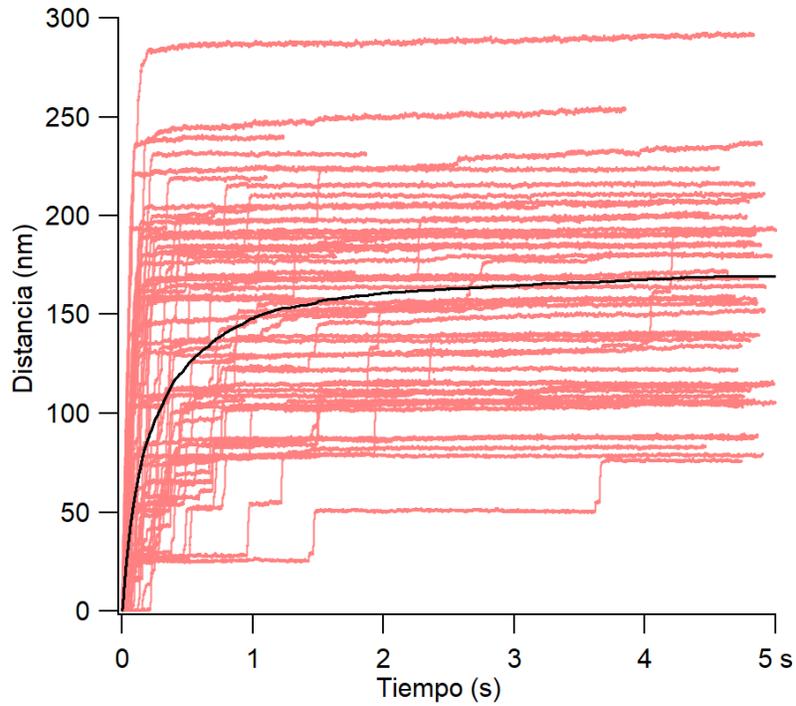


Figura 20. Trazas y el promedio resultante para la obtención de tasa de desdoblamiento. En rojo se observan trazas obtenidas desde desdoblamiento mediante FC. En negro se observa la sumatoria de estas trazas, sobre la cual se obtiene un fit exponencial posteriormente.

La tasa de desdoblamiento puede ser expresado como una exponencial simple mediado por ecuación 2. Este ajuste obtenido no capturo completamente el comportamiento expuesto por el dominio I10 (Figura 21), arrojando una k de 2.5 s y 1.4 s para dominio I10 silvestre en PBS y GSSG, respectivamente (Figura 22, Tabla 4). Para el mutante los valores de k fueron 2.4 s y 1.5 s en PBS y GSSG respectivamente (Figura 22 y Tabla 4).

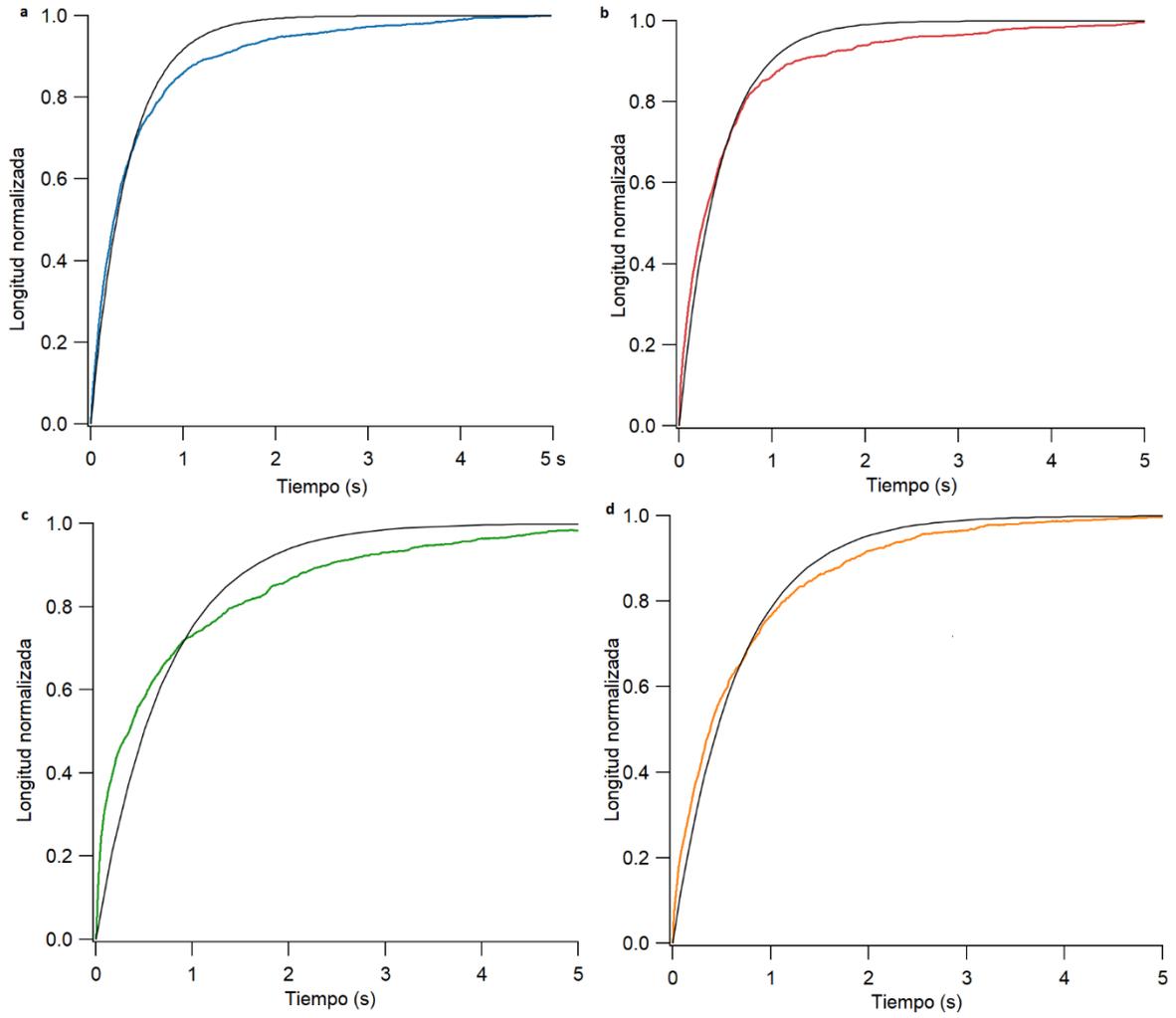


Figura 21. Tasa de desplegamiento del dominio I10 en FC con sus respectivos ajustes. (a) silvestre PBS, (b) mutante PBS, (c) silvestre GSSG, (d) mutante GSSG.

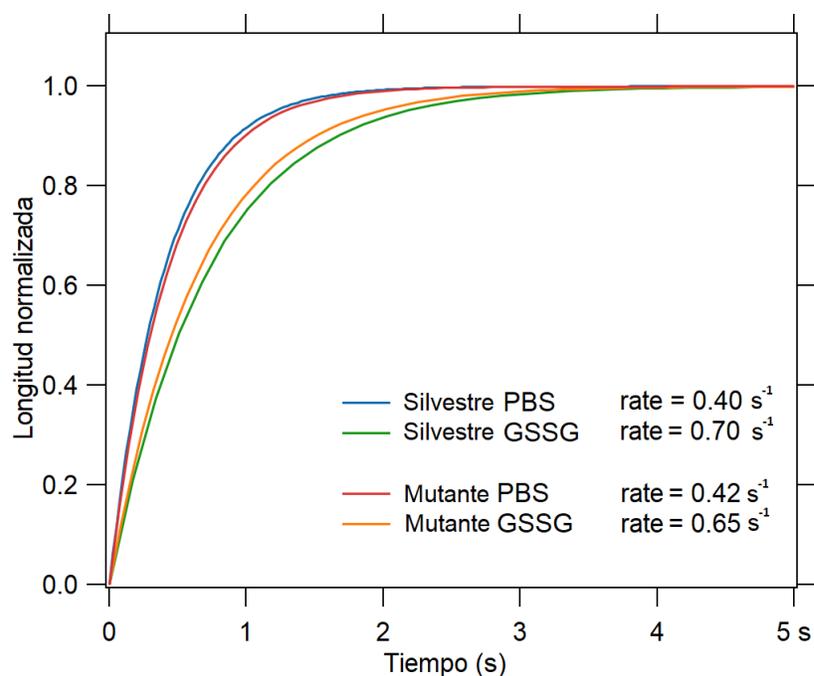


Figura 22. Tasa de desplegamiento de dominio I10. Cada traza representa el ajuste para cada condición estudiada.

Tabla 4. Tasa de desplegamiento obtenido para dominio I10 bajo un protocolo FC, error obtenido mediante bootstrapping.

Factor	k (s)	error	n	Inv k (s ⁻¹)
Silvestre PBS	2.49	0.16	211	0.40
Silvestre GSSG	1.43	0.14	152	0.70
Mutante PBS	2.36	0.23	122	0.42
Mutante GSSG	1.54	0.10	114	0.65

A pesar de que el ajuste no es perfecto, es suficiente para aproximar el patrón de desplegamiento de proteínas, mostrando diferencias significativas al comparar PBS versus GSSG, sin mostrar diferencias entre silvestre y mutación (Tabla 5). Además, se observa GSSG desacelera en mayor proporción el desplegamiento de dominio I10 silvestre y mutante.

Tabla 5. Comparaciones de la tasa de desplegamiento	
Factor	Valor de P
Silvestre vs mutante	0,4668
PBS vs GSSG	<0,0001

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 Dinámicas Moleculares

5.1.1 Estados de plegamiento

En las trayectorias inspeccionadas para el dominio I10, se encontraron un total de cuatro estados de plegamiento principales: F, I1, I2 y U (Figura 6). A pesar de estos diferentes estados, al comparar las trayectorias pertenecientes al dominio silvestre y la versión que incluía la sustitución Tre2580Ile no se observaron diferencias significativas en los parámetros analizados (Figura 7). Estos estados fueron encontrados en investigaciones previas que evaluaron la evolución de dominios Ig de la banda I de titina frente a fuerzas y velocidades constantes de desplegamiento. En particular, mostrando una disminución continua de las energías y puentes de hidrógeno internas debido al sucesivo desplegamiento de las hebras beta (30,37). Sin embargo, algunas de estas conclusiones fueron hechas a partir de simulaciones a velocidad constante, las cuales no fueron realizadas en esta investigación (37). Simulaciones que evalúan el comportamiento del dominio I10 a profundidad usando un protocolo de velocidad constante a futuro son un paso por seguir.

El intermediario I1 encontrados en esta investigación se encuentra mediado por los puentes de hidrogeno de las hebras AB A'G. Anteriormente se mostró que estas mismas hebras del dominios Ig 91 son fundamentales para su estabilidad mecánica, demostrando que al remover o mutar estas porciones, la estabilidad de estos dominios disminuía sustancialmente (49).

Un evento importante es la generación del I2 en la simulación a 500 pN y único entre las simulaciones dinámicas. En el cual, posterior a la rotura de las hebras AB, A'G iniciales se crea un evento estable (Figura 7a). Se ha encontrado evidencia de intermediarios mediante SMD previamente en experimentos del dominio I91, pero se asemeja al intermediario 1 encontrado en este trabajo, también mediado por hebra AB y A'G (49). Mientras que I2 surge luego del desplegamiento total de estas hebras más GF (Figura 7). Este evento también se detectó en los experimentos AFM realizados en este trabajo debido a un escalón marcado en el protocolo FC con una longitud que se aproxima a I2. Corroborando que no fue una aberración de la simulación, más bien un camino alternativo de desplegamiento. El mecanismo de este intermediario no está descrito en la literatura, por lo que

resulta muy relevante comprobar su presencia en los ensayos *in-vitro*. En esta simulación el mecanismo parece estar dado por un rol conjunto de las fuerzas de atracción del núcleo hidrofóbico y una interacción por enlaces de hidrógeno no nativa entre los aminoácidos ácido glutámico-17 y ácido glutámico-67, protegiendo el centro hidrofóbico de ser expuesto y entregando ns extra de estabilidad a este intermediario. Mutación dirigida de estos dos aminoácidos en simulaciones dinámicas e ingeniería de proteínas son experimentos viables para probar esta hipótesis.

5.1.2 Fuerzas de extensión

Se encontró poca variabilidad a una fuerza de 1000 y 2000 pN, mientras a 500 pN se encontró un intermediario único visto en experimentos AFM. Anteriormente se ha visto que la velocidad de desplegamiento está directamente relacionada a la fuerza de desplegamiento, sugiriendo que, a mayores fuerzas, la posibilidad de estados que explora una proteína es menor debido a las altas energías aplicadas sobre la proteína (50,51). Debido a esto se optó por realizar simulaciones a 1000 pN, encontrando un equilibrio entre cantidad y calidad. Buscar herramientas de simulación más eficientes o centros de cómputo acondicionados para simulaciones dinámicas son la prioridad para realizar este tipo de estudios.

5.1.3 Enlaces de hidrógeno

La mutación Tre258olle, no está directamente ligada a formación de enlaces de hidrógeno en las hebras beta. No obstante, en estas simulaciones se observó que son capaces de formar enlaces de hidrógeno con aminoácidos cercanos, no así en la versión que contenía la mutación a isoleucina. Se ha visto que al cambiar los aminoácidos de *loops* contiguos a las hebras beta, la estabilidad de los dominios disminuye de forma significativa (52). A pesar de esto no se vieron diferencias debido a la mutación en ninguna de nuestras simulaciones, en presencia o ausencia de glutatión.

5.1.4 Efecto del Glutatión sobre la elasticidad del dominio I10

Las simulaciones moleculares realizadas en este trabajo no mostraron diferencias significativas en ningún rasgo analizado sin la presencia de glutatión. Las diferencias presentes en glutatión fueron debido a la posición que se acomodaron las moléculas y no por la mutación en sí. Sin embargo, los experimentos *in-vitro* si mostraron diferencias significativas de la fuerza de desplegamiento, de

aproximadamente 15 pN menores en la presencia de GSSG junto a disminución de la tasa de plegamiento desde un 50 a un 25% con GSSG. Una posibilidad de esta falta de coincidencia entre los datos *in silico* vs *in vitro*, es la metodología de SMD utilizada, en el cual se usó fuerza constante para el análisis. A pesar, de que en experimentos realizados si hubo diferencias, tal vez eran pequeños para ser encontrados en fuerzas tan altas. Sumado a esto, la inhabilidad de explorar de forma correcta un camino de plegamiento junto a GSSG imposibilitó caracterizar de forma íntegra como el glutatión afecta el dominio I10.

5.2 AFM

Mediante AFM es posible realizar una gran cantidad de mediciones a proteínas arregladas en tándem para obtener relaciones estadísticas de fuerza y velocidad constante, siendo posible obtener tasas de desplegamiento, fuerzas de desplegamiento y proporción de replegamiento. Se analizaron 290 mediciones con el objetivo de obtener un resultado que refleje el comportamiento de la proteína.

5.2.1 Desplegamiento a velocidad y fuerza constante

Al analizar las múltiples trazas de FX se obtuvo una distribución que permitió conocer las fuerzas a las cuales el dominio I10 silvestre y mutante se despliegan, mostrando una pequeña pero significativa disminución en la fuerza necesaria para desplegar el dominio I10 mutante en comparación al control en PBS (Figura 17). En esta investigación no podemos concluir si el cambio en fuerza entre el dominio silvestre y mutante es suficiente para explicar el origen de la patología, debido a que el dominio I10 ya sería propenso al desplegamiento sin esta mutación (figura 17). Realizar cálculos de probabilidad de desplegamiento a distintas fuerzas es un camino a futuro para evaluar la relación de la mutación frente a fuerzas de desplegamiento.

Un segundo punto importante observado en los ensayos de FX fue la recuperación de la fuerza de la mutación en un medio GSSG (Figura 17). Anteriormente, al analizar la acción del ion Ca^{+2} sobre el dominio Ig I10 mostraron que este aumentaba la fuerza necesaria para desencadenar su desplegamiento, además al analizar la mutación T2580I observaron que se restauraba la fuerza de desplegamiento normal (39). Se ha evidenciado que al cambiar la composición del medio en el cual se despliega una proteína cambian las estabilidades energéticas a las cuales se ven sujetos las proteínas

(53), por lo que no es sorprendente que al añadir GSSG o Ca^{+2} cambien las fuerzas necesarias para el desplegamiento.

Por otro lado, en los ensayos a FC se observó que al contabilizar la tasa de replegamiento del dominio I10 silvestre y mutante frente a glutatión, esta disminuye significativamente la capacidad de los dominios de volver a replegarse (Figura 19). Estudios previos, mostraron que la glutatiónización del dominio I91 impedía el correcto replegamiento de la proteína, siendo evidente una disminución de las fuerzas a las cuales se desplegaban estos dominios glutatiónizados (28). Esto probablemente debido al impedimento estérico que produce el glutatión para el replegamiento de la proteína, o efectos energéticos que cambian las posibles conformaciones posibles al replegarse (28). Debido a que cisteínas internas son ubicuas en los dominios Ig de la banda I de titina, es probable que la S-glutatiónización sea una forma rápida de modular la estabilidad mecánica de titina. Este mecanismo puede adquirir un papel patológico en eventos donde la homeostasis redox del sarcómero se ve perjudicada, tal como ocurre en un evento isquémico (27).

La tasa de desplegamiento es un índice útil para determinar la estabilidad que presenta un dominio (54), por lo que también se evaluó la velocidad a la cual el dominio I10 se despliega. Para esto es necesario ajustar los datos a un modelo, en este caso a la ecuación 2 que corresponde a una reinterpretación de la ecuación de Arrhenius incluyendo el término de fuerza (55):

$$\text{Ecuación 3} \quad k(F) = A \exp\left(-\left(\frac{\Delta G - F\Delta x}{k_B T}\right)\right)$$

Donde $k(F)$ es la tasa en función de la fuerza, A es un factor preexponencial, ΔG es la barrera energética por superar, Δx es la distancia recorrida desde el estado nativo, k_B es la constante de Boltzmann y T es la temperatura. Sin embargo, en trabajo posteriores mostraron que algunos dominios Ig no se comportan con este patrón, por lo que se desarrolló un modelo que explicara este comportamiento, argumentando que el desplegamiento mecánico puede estar afectado por un factor de desorden estático (56), que afectaría la velocidad de desplegamiento mediado por una exponencial doble descrita por:

$$\text{Ecuación 4} \quad \{k(F)\} = A \exp\left(-\left(\frac{\Delta G - F\Delta x}{k_B T}\right)\right) \exp\left(\left(\frac{\sigma^2 \Delta G + \sigma^2 F^2 \Delta x}{2(k_B T)^2}\right)\right)$$

Donde σ representa el desorden en la cinética, por lo que cuando esta se aproxima a 0, esta vuelve a ser una cinética de exponencial simple. Esto explicaría porque el modelo no ajusta el comportamiento de manera adecuada, siendo los intermediarios un factor que probaría esta hipótesis. Una investigación previa que buscaba entender las diferencias entre el dominio I10 silvestre y mutante uso un protocolo FC mostrando un comportamiento exponencial simple. Esta diferencia puede ser derivada del ajuste mostrado en ese trabajo no es una representación de la totalidad de experimentos FC (18).

Se encontró una leve, pero no significativa diferencia en la tasa de desplegamiento del dominio I10 silvestre y mutante (Figura 22 y tabla 5). Anteriormente mostraron que la tasa de desplegamiento del dominio I10 silvestre frente a la mutación era significativamente diferente, concluyendo que sería la razón de la patología cardíaca (18). Sin embargo, en el presente trabajo las diferencias son muy bajas para concluir esto. Es importante recalcar que las fuerzas de FC usadas en el estudio anterior son menores. A pesar de esta diferencia, es difícil conciliar las conclusiones de disminución de la estabilidad mecánica con el desarrollo de la cardiomiopatía generada por la mutación.

El GSSG disminuyó la cinética de desplegamiento de forma significativa frente a PBS, tanto en el dominio silvestre como en el dominio con la mutación (Figura 22 y tabla 5). Este resultado inesperado, ya que estudios anteriores han propuesto y demostrado que los residuos de cisteínas se encuentran ocultos en el centro de la proteína, previniendo su exposición al medio (23,28). Además, en el caso de que las moléculas de GSSG de alguna manera reaccionaran con las cisteínas deberían entorpecer con el estado plegado, tal como se observó en los experimentos de replegamiento. Sin embargo, el proceso que determina el desplegamiento de la proteína está mediado por el rompimiento de las hebras A'G, que ocurre antes del momento en que las cisteínas quedan expuestas al medio. Por lo que las cisteínas no deberían mediar la cinética de desplegamiento. Por otro lado, en otros estudios se ha observado que al cambiar la composición del medio en el cual se encuentra una proteína disminuye la cinética de desplegamiento producto a nuevas interacciones entre la proteína y solvente (57). Esta diferencia es significativa en un entorno rodeado de moléculas antioxidantes y oxidantes como es el sarcómero. Esto llevaría a concluir que la presencia de un entorno oxidante debido a algún factor externo podría afectar los dominios Ig de titina sin la necesidad de ser desplegado. Investigaciones que develen los mecanismos por el cual GSSG es capaz de cambiar las

propiedades del dominio I10 de titina, además de otras moléculas del sarcómero, son un paso lógico por seguir.

6. CONCLUSIONES

Las simulaciones moleculares mostraron que la fuerza es el principal factor que dicta la velocidad de desplegamiento del dominio I10 de titina. Sin evidenciar diferencia en el comportamiento entre el dominio I10 silvestre y mutante, en ninguno de los factores analizados durante esta investigación. La presencia de intermediarios fue ubicua en todas las simulaciones, sin embargo, se encontró un intermediario especial en solo una de las simulaciones, también vista en experimentos AFM.

El glutatión afecta puentes de hidrógeno internos del dominio I10, sin perjudicar de forma significativa el desplegamiento. Sin embargo, las simulaciones moleculares realizadas no capturan un entorno *in-vivo*, mediado por un desplegamiento inicial, glutatiónización y finalmente plegamiento.

La mutación disminuye de forma significativa, pero levemente, la fuerza de desplegamiento del dominio I10 mutante frente a silvestre, y glutatión restaura la fuerza original en un régimen de velocidad constante. No se encontraron otras diferencias debido a glutatión. Mas investigaciones para dilucidar el rol de glutatión y el mecanismo de acción por el cual restaura la fuerza son necesarias a futuro.

La tasa de desplegamiento no varía en gran medida al analizar la mutación, pero se ve afectada al usar GSSG en el medio. De la misma forma el GSSG afecta la tasa de plegamiento del dominio I10 luego de ser desplegado, sugiriendo un efecto regulador de GSSG *in-vivo*. Investigaciones a futuro deben analizar a fondo este mecanismo.

El glutatión afecta las propiedades mecánicas de los dominios Ig previo al desplegamiento al aumentar el tiempo necesario para desplegar estos dominios, mostrado por los experimentos FC. Además, el porcentaje de replegamiento se ve afectado de forma significativa al ser glutatiónizado.

7. IMPLICANCIAS, RECOMENDACIONES Y/O PROYECCIONES FUTURAS

Esta investigación se confirmó la capacidad que posee la molécula de GSSG de modular las propiedades mecánicas de dominios elásticos de titina, como es el caso del dominio I10. Al ser un dominio representativo de los Ig presentes en la banda I, este mecanismo oxidativo podría tener un rol regulador de tensión frente a eventos oxidativos. Estos resultados serán publicados a futuro, de esta forma progresando el avance científico de la mecánica de proteínas. Además, al mostrar el efecto de GSSG tiene sobre el desplegamiento son necesarias más investigación que exploren el comportamiento de los dominios Ig ante un entorno oxidativo. Explorar como titina interactúa con otras moléculas del entorno citosólico bajo estrés mecánico son investigaciones necesarias a futuro para profundizar el conocimiento en esta área.

Los resultados presentados aquí indican una vía oxidativa como diana de tratamiento para las consecuencias patológicas oxidativas. Debido al carácter patológico de la desregulación oxidativa en tejido muscular cardíaco es de suma importancia entender los mecanismos regulatorios involucrados. Terapias que usen la mecánica de titina para tratar enfermedades cardíacas son un nicho interesante por explorar.

Es de importancia continuar la investigación del comportamiento de I10 mutante y el mecanismo involucrado en la patología asociada. Los resultados obtenidos en esta investigación se contraponen a una investigación previa. Es importante realizar un trabajo que replique el trabajo anterior, buscando confirmar sus hallazgos. Debido a la letalidad de la mutación es imperativo encontrar las causas de esta enfermedad, en la actualidad aun no existen terapias o curas, por lo que investigaciones que busquen editar el gen involucrado o revertir el tejido fibroso en el corazón son los pasos por seguir.

8. REFERENCIAS

1. Rivas-Pardo JA. The power of the force: mechano-physiology of the giant titin. *Emerg Top Life Sci.* 2018;2(5):681–6.
2. Labeit S, Kolmerer B, Linke WA. The Giant Protein Titin. *Circ Res.* 1997;290–4.
3. Kontogianni-Konstantopoulos A, Ackermann MA, Bowman AL, Yap S V., Bloch RJ. Muscle giants: Molecular scaffolds in sarcomerogenesis. *Physiol Rev.* 2009;89(4):1217–67.
4. Linke WA, Krüger M. The Giant Protein Titin as an Integrator of Myocyte Signaling Pathways. *Physiology.* 2010;186–98.
5. Linke WA, Hamdani N. Gigantic business: Titin properties and function through thick and thin. *Circ Res.* 2014;114(6):1052–68.
6. Craig RW, Padrón R. Molecular structure of the sarcomere. *Myology.* 2004;129–44.
7. Swist S, Unger A, Li Y, Vöge A, von Frieling-Salewsky M, Skärlén Å, et al. Maintenance of sarcomeric integrity in adult muscle cells crucially depends on Z-disc anchored titin. *Nat Commun.* 2020;11(1):1–18.
8. Rivas-Pardo JA, Eckels EC, Popa I, Kosuri P, Linke WA, Fernández JM. Work Done by Titin Protein Folding Assists Muscle Contraction. *Cell Rep.* 2016;14(6):1339–47.
9. Chauveau C, Rowell J, Ferreira A. A rising titan: TTN review and mutation update. *Hum Mutat.* 2014;35(9):1046–59.
10. Begay RL, Graw S, Sinagra G, Merlo M, Slavov D, Gowan K, et al. Role of Titin Missense Variants in Dilated Cardiomyopathy. 2015;
11. Huxley A. F., M. simmons R. Proposed mechanism of force generation in striated muscle. *Nature.* 1971;
12. Fiirst DO, Osborn M, Nave R, Weber K. The Organization of Titin Filaments in the Half-Sarcomere Revealed by Monoclonal Antibodies in Immunoelectron Microscopy: A Map of Ten Nonrepetitive Epitopes Starting at the Z Line Extends Close to the M Line. 1988;106(May):1563–72.
13. Linke WA. Titin Gene and Protein Functions in Passive and Active Muscle. *Annu Rev Physiol.* 2018;80:389–411.
14. Eckels EC, Tapia-Rojo R, Rivas-Pardo JA, Fernández JM. The Work of Titin Protein Folding as a Major Driver in Muscle Contraction. *Annu Rev Physiol.* 2018;80:327–51.
15. Herman DS, Lam L, Taylor MRG, Wang L, Teekakirikul P, Christodoulou D, et al. Truncations of Titin Causing Dilated Cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2012;366(7):619–28.

16. Ware JS, Cook SA. Role of titin in cardiomyopathy : from DNA variants to patient stratification. *Nat Publ Gr.* 2017;15(4):241–52.
17. Tharp CA, Haywood ME, Sbaizero O, Taylor MRG, Mestroni L. The Giant Protein Titin’s Role in Cardiomyopathy: Genetic, Transcriptional, and Post-translational Modifications of TTN and Their Contribution to Cardiac Disease. *Front Physiol.* 2019;10(November):1–8.
18. Anderson BR, Bogomolovas J, Labeit S, Granzier H. Single molecule force spectroscopy on titin implicates immunoglobulin domain stability as a cardiac disease mechanism. *J Biol Chem.* 2013;288(8):5303–15.
19. Taylor M, Graw S, Sinagra G, Barnes C, Slavov D, Brun F, et al. Genetic Variation in Titin in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy – Overlap Syndromes. 2011;876–85.
20. Trombitás K, Greaser M, Labeit S, Jin J, Kellermayer M. Titin Extensibility In Situ: Entropic Elasticity of Permanently Folded and Permanently Unfolded Molecular Segments. 1998;140(4):853–9.
21. Yamasaki R, Berri M, Wu Y, Trombitás K, McNabb M, Kellermayer MSZ, et al. Titin-actin interaction in mouse myocardium: Passive tension modulation and its regulation by calcium/S100A1. *Biophys J.* 2001;81(4):2297–313.
22. Giganti D, Yan K, Badilla CL, Fernandez JM, Alegre-Cebollada J. Disulfide isomerization reactions in titin immunoglobulin domains enable a mode of protein elasticity. *Nat Commun [Internet].* 2018;9(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-02528-7>
23. Mayans O, Wuerges J, Canela S, Gautel M, Wilmanns M. Structural evidence for a possible role of reversible disulphide bridge formation in the elasticity of the muscle protein titin. *Structure.* 2001;9(4):331–40.
24. Chung CS, Hutchinson KR, Methawasin M, Saripalli C, Smith JE, Hidalgo CG, et al. Shortening of the elastic tandem immunoglobulin segment of titin leads to diastolic dysfunction. *Circulation.* 2013;128(1):19–28.
25. Li H, Linke WA, Oberhauser AF, Carrion-Vazquez M, Kerkvliet JG, Lu H, et al. Reverse engineering of the giant muscle protein titin. *Nature.* 2002;418(6901):998–1002.
26. Rivas-pardo JA, Li Y, Mártonfalvi Z, Tapia-rojo R, Unger A, Fernández-trasancos Á, et al. phenotyping of proteins from tissues. *Nat Commun [Internet].* (2020):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-15465-9>
27. Avner BS, Shioura KM, Scruggs SB, Grachoff M, Geenen DL, Helseth DL, et al. Myocardial infarction in mice alters sarcomeric function via post-translational protein modification. *Mol Cell Biochem [Internet].* 2012 Apr 8 [cited 2020 Oct 11];363(1–2):203–15. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11010-011-1172-z>
28. Alegre-Cebollada J, Kosuri P, Giganti D, Eckels E, Rivas-Pardo JA, Hamdani N, et al. S-

- glutathionylation of cryptic cysteines enhances titin elasticity by blocking protein folding. *Cell*. 2014;156(6):1235–46.
29. Taylor M, Graw S, Sinagra G, Barnes C, Slavov D, Brun F, et al. Genetic variation in titin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy-overlap syndromes. *Circulation*. 2011;124(8):876–85.
 30. Gao M, Wilmanns M, Schulten K. Steered molecular dynamics studies of titin I1 domain unfolding. *Biophys J* [Internet]. 2002;83(6):3435–45. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75343-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75343-5)
 31. Phillips JC, Hardy DJ, Maia JDC, Stone JE, Ribeiro J V., Bernardi RC, et al. Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. *J Chem Phys* [Internet]. 2020;153(4). Available from: <https://doi.org/10.1063/5.0014475>
 32. Salomon-Ferrer R, Case DA, Walker RC. An overview of the Amber biomolecular simulation package. *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci*. 2013;3(2):198–210.
 33. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, et al. Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*. 2015;1–2:19–25.
 34. Brooks BR, Brooks CL, Mackerell AD, Nilsson L, Petrella RJ, Roux B, et al. CHARMM: The biomolecular simulation program. *J Comput Chem*. 2009;30(10):1545–614.
 35. Jorgensen WL, Maxwell DS, Tirado-Rives J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *J Am Chem Soc*. 1996;118(45):11225–36.
 36. Dror RO, Jensen M, Borhani DW, Shaw DE. Perspectives on: Molecular dynamics and computational methods Exploring atomic resolution physiology on a femtosecond to millisecond timescale using molecular dynamics simulations. *J Gen Physiol*. 2010;135(6):555–62.
 37. Lu H, Israilewitz B, Krammer A, Vogel V, Schulten K. Unfolding of titin immunoglobulin domains by steered molecular dynamics simulation. *Biophys J*. 1998;75(2):662–71.
 38. Lu H, Schulten K. The Key Event in Force-Induced Unfolding of Titin ' s Immunoglobulin Domains. *Biophys J* [Internet]. 2000;79(1):51–65. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76273-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76273-4)
 39. Abidi M, Soheilifard R. The effect of calcium binding on the unfolding force of mutated and healthy titin I10 domain: A steered molecular dynamics simulation study. *J Mol Graph Model* [Internet]. 2020;96:107534. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2020.107534>
 40. Cingolani E, Goldhaber JJ, Marbán E. Next-generation pacemakers: from small devices to biological pacemakers. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15(3):139–50.

41. Pfeffer JM, Braunwald E, Pfeffer MA, Fletcher PJ, Finn P, Braunwald E. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. 2018;c.
42. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. 2021;(100).
43. Lee J, Cheng X, Swails JM, Yeom MS, Eastman PK, Lemkul JA, et al. CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. *J Chem Theory Comput.* 2016;12(1):405–13.
44. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD - Visual Molecular Dynamics. Elsevier; 1996. p. 33–8.
45. Hopkins CW, Le Grand S, Walker RC, Roitberg AE. Long-time-step molecular dynamics through hydrogen mass repartitioning. *J Chem Theory Comput.* 2015;11(4):1864–74.
46. Popa I, Kosuri P, Alegre-Cebollada J, Garcia-Manyes S, Fernandez JM. Force dependency of biochemical reactions measured by single-molecule force-clamp spectroscopy. *Nat Protoc.* 2013;8(7):1261–76.
47. Bustamante C, Marko JF, Siggia ED, Smith S. Entropic Elasticity of X-Phage DNA Explicit and Implicit Learning and Maps of Cortical Motor Output. *Science (80-) [Internet].* 1994;265(5178):1599–600.
48. Rivas-Pardo JA, Alegre-Cebollada J, Ramírez-Sarmiento CA, Fernandez JM, Guixé V. Identifying sequential substrate binding at the single-molecule level by enzyme mechanical stabilization. *ACS Nano.* 2015;9(4):3996–4005.
49. Marszalek PE, Lu H, Li H, Carrion-Vazquez M, Oberhauser AF, Schulten K, et al. Mechanical unfolding intermediates in titin modules. *Nature.* 1999;402(6757):100–3.
50. Li MS, Kouza M. Dependence of protein mechanical unfolding pathways on pulling speeds. *J Chem Phys.* 2009;130(14).
51. Irbäck A, Mitternacht S, Mohanty S. Dissecting the mechanical unfolding of ubiquitin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(38):13427–32.
52. Li H, Carrion-Vazquez M, Oberhauser AF, Marszalek PE, Fernandez JM. Point mutations alter the mechanical stability of immunoglobulin modules. *Nat Struct Biol.* 2000;7(12):1117–20.
53. Levy Y, Jortner J, Becker OM. Solvent effects on the energy landscapes and folding kinetics of polyalanine. 2000;
54. Schlierf M, Li H, Fernandez JM. The unfolding kinetics of ubiquitin captured with single-molecule force-clamp techniques. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(19):7299–304.
55. Bell GI. Models for the Specific Adhesion of Cells to Cells. 1978;618(1978).
56. Kuo T, Garcia-manyes S, Li J, Barel I, Lu H, Berne BJ, et al. Probing static disorder in Arrhenius

kinetics by single-molecule force spectroscopy. 2010;

57. Motlagh HN, Toptygin D, Kaiser CM, Hilser VJ. Single-Molecule Chemo-Mechanical Spectroscopy Provides Structural Identity of Folding Intermediates. *Biophys J* [Internet]. 2016;110(6):1280–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2015.12.042>

9. ANEXOS/MATERIAL SUPLEMENTARIO

Anexos: Enlace a repositorio

Enlace: https://github.com/RivasPardoLab/Pablo-s_Thesis.git