

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Químicas
Centro de Química-Instituto de Ciencias

Posgrado en Ciencias Químicas



“Investigación computacional de la interacción proteína-proteína: el caso del sistema Ribonucleasa-Metalotioneína”

Tesis para obtener el grado de:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS EN EL ÁREA DE
FISICOQUÍMICA**

Presenta:

**Q.F.B. FRANCISCO TRUJILLO
GONZÁLEZ**

Directores de Tesis:

Dr. José Manuel Pérez Aguilar

Dra. Brenda Leonor Sánchez Gaytán

Noviembre 2025



BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por la D.C. María Eugenia Castro Sánchez, D.C. Norma Angelica Caballero Concha, D.C. Eduardo Miguel Brambila Colombres y el D.C. José A. Villegas, informan haber leído y aprobado, la tesis denominada “**Investigación computacional de la interacción proteína-proteína: el caso del sistema Ribonucleasa-Metalotioneína**”, que presenta el alumno **Francisco Trujillo González** (223470207), para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los veintiún días del mes de noviembre del año dos mil veinticinco.

ATENTAMENTE

D.C. María Eugenia Castro Sánchez

D.C. Norma Angelica Caballero Concha

D.C. Eduardo Miguel Brambila Colombres

D.C. José A. Villegas

**Esta investigación se realizó gracias al financiamiento de la Secretaría de Ciencia,
Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) CVU 1318320**

**Los resultados de este trabajo fueron presentados en: The 8th International Society
for Zinc Biology (ISZB) Meeting (2024).**

Dedicado a:

Mis padres Paco y Mily, quienes con su amor, apoyo incondicional y ejemplo de esfuerzo han sido la base de cada uno de mis logros.

Mis hermanos Max y Ana Jose, por su compañía y cariño, ustedes han sido siempre un motor de inspiración y constancia en mi trabajo.

Mi novia Fer, por su cariño, comprensión y por estar a mi lado en los momentos más desafiantes de este camino, brindándome motivación y alegría.

Todo el resto de mi familia, por su cercanía, consejos y por ser parte de la red de afecto que me ha acompañado en cada etapa.

Todos mis amigos, por su apoyo constante, las conversaciones que me dieron claridad y las sonrisas que hicieron más ligero el trayecto.

Cada uno de ustedes ha sido parte esencial de este logro, y esta tesis es también reflejo de lo que hemos compartido juntos. Gracias a todos por creer en mí.

-Francisco

AGRACEDIMIENTOS

Agradezco a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la beca otorgada con el número de becario No. (CVU): 1318320, para la realización de la Maestría en Ciencias Químicas durante el periodo



Ciencia y Tecnología
Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación

Así mismo agradezco a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por los apoyos otorgados.



Al Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México (LNS) y al Laboratorio Nacional de Computo de Alto Desempeño (LANCAD) por los servicios de supercómputo que permitieron el desarrollo de este proyecto.



A mis asesores, el **Dr. José Manuel Pérez Aguilar** y la **Dra. Brenda Leonor Sánchez Gaytán**. Gracias por su total apoyo, consejos, conocimiento, amabilidad y aliento en momentos difíciles. Ha sido un total gusto trabajar con ustedes. Ustedes me hicieron sentir en familia en todo momento.

Al **Dr. Eduardo Miguel Brambila Colombres** por la colaboración en este proyecto. Sin todo su apoyo y conocimiento brindado, nada de esto hubiera sido posible.

A mi jurado de tesis, **Dr. José Villegas**, **Dra. Norma Angélica Caballero Concha** y **Dra. María Eugenia Castro Sánchez** por el tiempo, la revisión y puntos de vista a este trabajo para su enriquecimiento y mejora.

INDÍCE GENERAL

INDÍCE DE GRÁFICAS Y FIGURAS	7
INDÍCE DE TABLAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS	10
ABSTRACT	12
RESUMEN	13
I. ANTECEDENTES	14
1.1 PROTEÍNAS, ESTRUCTURA Y FUNCIÓN	14
1.1.1 CLASIFICACIÓN ESTRUCTURAL DE PROTEÍNAS	15
1.1.2 PLEGAMIENTO PROTEICO	15
1.1.3 SÍNTESIS DE PROTEÍNAS Y EL PAPEL DE LAS CHAPERONAS	17
1.1.3.1 FASE DE INICIACIÓN	18
1.1.3.2 FASE DE ELONGACIÓN	18
1.1.3.3 FASE DE TERMINACIÓN	18
1.1.3.4 FASE DE RECICLAJE	19
1.1.3.5 MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES	20
1.1.3.6 CHAPERONAS	20
1.2 HERRAMIENTAS PARA EL ESTUDIO TRIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS	22
1.2.1 CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X	23
1.2.2 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	24
1.2.3 CRIOMICROSCOPIA ELECTRÓNICA (CRYO-EM)	25
1.2.4 MÉTODOS DE PREDICCIÓN DE ESTRUCTURA	25
1.2.4.1 MODELADO POR HOMOLOGÍA	26
1.2.4.2 MÉTODOS <i>AB INITIO</i>	26
1.2.4.3 MÉTODOS DE PREDICCIÓN ESTRUCTURAL MEDIANTE INTELIGENCIA ARTIFICIAL (IA)	27
1.3 HERRAMIENTAS PARA EL ESTUDIO DE LA DINÁMICA DE PROTEÍNAS	28
1.3.1 SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR	28
1.4 HERRAMIENTAS PARA EL ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA	30
1.4.1 ACOPLAMIENTO MOLECULAR	30
1.5 METALOTIONEÍNA	32
1.6 RIBONUCLEASA A	35

II. HIPÓTESIS	38
III. OBJETIVOS	38
3.1 OBJETIVO GENERAL	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
IV. METODOLOGÍA	39
4.1 PREPARACIÓN DE LOS SISTEMAS MT/T Y RNASA A PARA SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR	39
4.2 SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR DE LOS SISTEMAS MT/T	40
4.3 ACOPLAMIENTO MOLECULAR RNASA A-T	41
4.4 PREPARACIÓN DEL SISTEMA RNASA A-T Y SIMULACIÓN DE MD	42
4.5 ANÁLISIS DE DATOS	42
V. RESULTADOS	43
5.1 MODELADO COMPUTACIONAL DE LAS CONFORMACIONES MT/T	43
5.1.1 RMSD Y ESTRUCTURA SECUNDARIA DE MT/T	43
5.2 MODELADO COMPUTACIONAL DE LA INTERACCIÓN T-RNASA A	48
5.2.1 ACOPLAMIENTO MOLECULAR PROTEÍNA-PROTEÍNA	48
5.2.2 RMSD Y ENERGÍA DE INTERACCIÓN DEL COMPLEJO T-RNASA A	50
5.2.3 ESTRUCTURA SECUNDARIA Y RMSF DE T	51
5.2.4 SASA Y SES DE RNASA A	53
5.2.5 ANÁLISIS DE INTERACCIONES Y DISTANCIAS DEL COMPLEJO T-RNASA A	54
VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	58
VII. CONCLUSIÓN	59
APÉNDICE A	60
APÉNDICE B	62
REFERENCIAS	63

INDÍCE DE GRÁFICAS Y FIGURAS

Figura 1. Estructura de una proteína simple (Ribonucleasa A, PDB ID: 1A2W) y una proteína conjugada con iones de magnesio (Mg) como grupo prostético (Enolasa, PDB ID: 1E9I)	14
Figura 2. Niveles de estructura de una proteína (primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria)	15
Figura 3. Interacciones no covalentes en una proteína (puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas y de van der Waals) Imagen tomada y modificada de (Alberts et al., 2022)	16
Figura 4. Mapa de densidad cryo-EM del ribosoma citosólico de la planta de tabaco en traducción activa con ARNt unidos a una resolución de 2.2 Å. Imagen tomada y modificada de (Smirnova et al., 2023)	18
Figura 5. Esquema del proceso de traducción de las proteínas en el ribosoma 80S en eucariotas. Se muestran las fases de iniciación, elongación, terminación y reciclaje. Imagen tomada y modificada de (Zhang et al., 2020)	19
Figura 6. A. Esquema del mecanismo de acción de las chaperonas (Hsp70). B. Esquema del mecanismo de acción de las chaperoninas (GroEL/GroES) (Imagen tomada y modificada de (Lodish et al., 2016)	22
Figura 7. Esquema de proceso de obtención de estructura de una proteína por cristalografía de rayos X	23
Figura 8. Efecto Overhauser nuclear (NOE) en una proteína y espectro de RMN de una proteína. Imagen tomada y modificada de (Berg et al., 2015)	24
Figura 9. Esquema de proceso de obtención de estructura de una proteína por cryo-EM. Imagen tomada y modificada de (Zhu et al., 2023)	25
Figura 10. Esquema comparativo de procesamiento de un acoplamiento molecular proteína-proteína basado en plantilla y acoplamiento proteína-proteína libre para un heterodímero. Imagen tomada y modificada de (Porter et al., 2019)	31
Figura 11. Mecanismos de regulación del ciclo redox entre tionina, tioneína y metalotioneína. Imagen tomada y modificada de (Krežel et al., 2007)	33
Figura 12. A. Secuencia de MT-2, en donde se identifican los 20 residuos de cisteína presente en la estructura. B. Estructura tridimensional de MT-2. C. Estructura de clústeres tiolato-metal en los dominios de MT-2	34
Figura 13. A. Secuencia de RNasa A, en donde se identifican los residuos catalíticos en la secuencia aminoacídica. B. Estructura tridimensional de RNasa A, en donde se observan las 3 hélices así como la estructura de tipo β plegada	36
Figura 14. Preparación del sistema homodimérico de MT saturado con iones de Zn, solvatado e ionizado a una concentración 0.15M de NaCl	39
Figura 15. Preparación del sistema homodimérico de T en ausencia de metales, solvatado e ionizado a una concentración 0.15 M de NaCl	40
Figura 16. Pasos de la simulación de dinámica molecular	41
Figura 17. Preparación del sistema heterotrimérico de T-RNasa A, solvatado e ionizado a una concentración 0.15 M de NaCl	42

- Figura 18. A. Cambios estructurales de la estructura de MT. B. Análisis RMSD de las cadenas A y B de la estructura de MT dimérica. C. Análisis de la estructura secundaria de todos los residuos de MT _____ 44
- Figura 19. A. Alineación estructural de la estructura de rayos X 4MT2 y una estructura representativa del dímero de MT2 de la simulación de dinámica molecular. A la izquierda, el recuadro muestra un residuo representativo (Ala42) del segmento alfa-helicoidal corto de la estructura de MT2 (alrededor de los residuos 42 a 45) y su rotación en la simulación. La estructura de ambos monómeros permanece estable, con una rotación de aproximadamente 80° de una cadena con respecto a la otra. B. RMSD global de la estructura de MT _____ 45
- Figura 20. A. Estructura de T a 300 ns de simulación. B. Análisis RMSD de las cadenas A y B de la estructura dimérica de T. C. Análisis de la estructura secundaria de todos los residuos de T, donde la cadena A se muestra en el panel izquierdo y la cadena B en el panel derecho _____ 47
- Figura 21. Estructuras representativas de las mejores poses obtenidas mediante el esquema de acoplamiento molecular proteína-proteína por consenso. Superposición de las posiciones de acoplamiento de las estructuras del homodímero T y RNasa A. RNasa A se representa como una superficie en amarillo, y todas las posiciones obtenidas de T se representan en diferentes colores orientadas hacia la alineación de RNasa A. _____ 48
- Figura 22. A. Interacción de Arg39 y Lys41 de RNasa A con Asp10 de T. Se observa interacción equivalente de Arg39 y Arg41 de RNasa 1 con Glu287 de RI. B. Interacción de Lys91 de RNasa A con Asp55 de T. Se observa interacción equivalente de Arg91 de RNasa 1 con Glu287 de RI. (Arg91 en RNasa 1 es reemplazada por Lys91 en RNasa A, manteniendo su cadena lateral con carga positiva). C. Superposición de las estructuras del complejo RNasa 1-RI (código de acceso PDB 1Z7X) y una estructura representativa del complejo T-RNasa A obtenida de la simulación de dinámica molecular _____ 49
- Figura 23. Análisis de RMSD de T y RNasa A _____ 50
- Figura 24. Análisis de energía de interacción entre T y RNasa A a lo largo de la simulación utilizando con NAMD Energy _____ 51
- Figura 25. Análisis de la estructura secundaria de todos los residuos de T en complejo con RNasa A, donde la cadena A se muestra en el panel izquierdo y la cadena B en el panel derecho _____ 51
- Figura 26. Análisis de RMSF de los dominios β y α de la cadena A y B del dímero de T en complejo con RNasa A. La cadena A esta representada en gris y la cadena B en negro. Se muestra la posición de algunos residuos que forman interacciones importantes con RNasa A tales como Met1, Asp10, Lys30 y Asp55 _____ 52
- Figura 27. Evolución temporal de la superficie accesible al solvente (SASA) y la superficie excluida del solvente (SES) de RNasa A debido a la interacción con el dímero de T, utilizando el radio de 1,4 Å² (correspondiente a la molécula de agua) _____ 53
- Figura 28. A. Interacción de Arg39 y Lys41 de RNasa A con Asp10 de T (Cadena A). B. Distancia en Å entre Arg39 de RNasa A y Asp10 de T. C. Distancia en Å entre Lys41 de RNasa A y Asp10 de T _____ 55
- Figura 29. A. Interacción de Glu111 de RNasa A con Lys30 y Lys31 de T (Cadena B). B. Distancia en Å entre Glu111 de RNasa A y Asp10 de T. C. Distancia en Å entre Lys41 de RNasa A y Asp10 de T _____ 56
- Figura 30. Estructura del complejo RNasa A-T. Se representan residuos importantes en el complejo como His12, Arg39, Lys41, His119 de RNasa A y Asp10, Asp55 y Lys31 de T _____ 57

INDÍCE DE TABLAS

Tabla 1. Interacciones polares identificadas en el complejo T-RNasa A _____ 54

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADP:** Adenosín difosfato
- ARN:** Ácido ribonucleico
- ARNt:** ARN de transferencia
- ARNm:** ARN mensajero
- ATP:** Adenosín trifosfato
- BiP:** Proteína de unión a inmunoglobulina
- CAPRI:** Evaluación crítica de la predicción de interacciones
- CASP:** Evaluación crítica de la predicción de estructuras
- CHARMM:** *Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics*
- CMP:** Monofosfato de citidina
- Cryo-EM:** Criomicroscopía electrónica
- eIF:** Factor de iniciación de la traducción
- eEF:** Factor de elongación de la traducción
- eRF:** Factor de liberación de la traducción
- ERA:** Elementos de respuesta a antioxidantes
- ERG:** Elementos de repuesta a glucocorticoides
- ERM:** Elementos de respuesta a metales
- FRET:** Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia
- HADDOCK:** *High Ambiguity Driven protein-protein DOCKing*
- Hsp:** Proteína de choque térmico
- IL-6:** Interleucina 6
- IR:** Inhibidor de ribonucleasa
- LPS:** Lipopolisacárido
- Met-tARNi:** Metionil-ARNt iniciador
- MSA:** Alineamiento múltiple de secuencias
- NAMD:** *Nanoscale Molecular Dynamics*
- MD:** Dinámica molecular
- MT:** Metalotioneína
- MTF:** Factor de transcripción regulador de metales

NF- κ B: Factor nuclear kappa B

NOE: Efecto Overhauser nuclear

PDB: *Protein Data Bank*

PKC: Proteína quinasa C

QM/MM: Mecánica cuántica/mecánica molecular

QM/MM/MD: Mecánica cuántica/mecánica molecular/dinámica molecular

RMN: Resonancia magnética nuclear

RMSD: Desviación de la raíz cuadrática media

RMSF: Fluctuación de la raíz cuadrática media

RNasa A: Ribonucleasa A

RNS: Radicales libres de nitrógeno

ROS: Radicales libres de oxígeno

SASA: Área superficial accesible al solvente

SES: Área superficial inaccesible al solvente

SAXS: Dispersión de rayos X de ángulo reducido

SNC: Sistema nervioso central

STRIDE: *STR*uctural *ID*entification

T: Tioneína

TFIIA: Factor de transcripción IIA

TNF- α : Factor de transcripción de necrosis tumoral alfa.

TR-FRET: Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia con resolución temporal

trRosetta: *Transform-restrained Rosetta*

VMD: *Visual Molecular Dynamics*

Zn-Sp: Factor de transcripción de dedo de zinc

ABSTRACT

Metallothioneins (MTs) are low molecular weight globular proteins composed of 61 to 68 amino acid residues, characterized by a high content of cysteine residues that displays a high redox activity. The 20 conserved cysteine residues present in the structure of MT forms metal-thiolate clusters, that have the capacity to coordinate up to seven metals in its structure, including zinc, cadmium, copper and mercury.

Although structural information on the three-dimensional structure of the metal-bound form MT has been obtained either through X-ray crystallography or NMR spectroscopy, details regarding the structural stability of the apo-form remain largely unknown. Consequently, it is of special interest to investigate how the presence or absence of bound metals contributes to modulate the different conformations of the protein and if such structural variations affect the interactions of MT with the function of other proteins.

Ribonucleases (RNases) constitute a group of enzymes that hydrolyze various classes of RNA and are tightly regulated *in vivo* by specific inhibitors. Previous studies by Brambila et al. showed that the reduction of RNase activity observed following surgical trauma may result from an inhibitory mechanism by a "de novo" protein synthesis. In addition, MT can act as an acute-phase protein, and Ostrakhovitch et al. showed that MT, in its thionein (apo) form, can interact selectively with proteins such as p53. Therefore, we aim to analyze the possible interaction of thionein and ribonuclease A.

Herein, molecular dynamics simulations were used to characterize the structure of MT in the presence and absence of zinc ions under physiological conditions of temperature, pressure and ionic strength. Structural changes on the secondary and tertiary structures of the systems were analyzed and their potential implications regarding the differential modulation of the function of a well-studied cytoplasmic protein (Ribonuclease A) were explored. This computational approach provides detailed insights into the versatile role of MT and its metal ion-dependent interactions.

RESUMEN

Las metalotioneínas (MTs) son proteínas globulares de bajo peso molecular, (de entre 61 a 68 residuos) con un alto contenido de residuos de cisteína y una marcada actividad redox. Los 20 residuos conservados de cisteína presentes en la secuencia de la MT forman clústeres metal-tiolato, los cuales le confieren la capacidad de coordinar hasta siete iones metálicos en su estructura, entre ellos zinc, cadmio, cobre y mercurio.

Aunque existe información disponible sobre la estructura tridimensional de la forma metalada de la MT obtenida mediante cristalografía de rayos X o espectroscopía de RMN, los detalles sobre la estabilidad estructural en ausencia de metales siguen siendo en gran parte desconocidos. Por lo tanto, es de especial interés analizar cómo la presencia o ausencia de iones metálicos contribuyen a modular las diferentes conformaciones de la proteína y si dichas conformaciones afectan la interacción de MT con la función de otras proteínas.

Las ribonucleasas (RNAsas) constituyen una familia de enzimas que hidrolizan diferentes clases de ARN y cuya actividad está regulada *in vivo* por inhibidores específicos. Estudios previos de Brambila y colaboradores reportaron que la disminución de la actividad de las RNAsas observadas después de un trauma quirúrgico podría deberse a un mecanismo de inhibición mediado por una síntesis de proteínas *de novo*. También se sabe que la MT puede actuar como una proteína de fase aguda y Ostrakhovitch y colaboradores demostraron que la MT en forma de tioneína "apo", puede actuar selectivamente con proteínas como p53. Por lo tanto, nuestro objetivo es analizar la posible interacción de tioneína y ribonucleasa A.

En este trabajo se emplearon simulaciones de dinámica molecular para caracterizar la estructura de la MT en presencia y ausencia de iones de zinc bajo condiciones fisiológicas de temperatura, presión y fuerza iónica. Se analizaron las variaciones en las estructuras secundaria y terciaria de los sistemas y se investigaron las posibles implicaciones en la modulación diferencial de la función de una proteína citoplasmática ampliamente estudiada (ribonucleasa A). El uso de enfoques computacionales en el estudio de la interacción de MT en ausencia y presencia de iones metálicos proporciona información detallada sobre el papel versátil de esta proteína.

I. ANTECEDENTES

El estudio de la estructura, función e interacción de las diversas proteínas existentes es fundamental para entender las vías de señalización relacionadas a los procesos efectuados en las células de los diversos seres vivos. En este contexto, existe un creciente interés en desarrollar diversas herramientas que permitan entender cómo la estructura de una proteína se relaciona con su función y de qué manera los cambios estructurales impactan en su capacidad de interactuar selectivamente con otras proteínas.

1.1 Proteínas, estructura y función

Las proteínas son polímeros de aminoácidos unidos covalentemente mediante enlaces peptídicos y constituyen las macromoléculas más abundantes en los sistemas biológicos (Nelson & Cox, 2013). La función de una proteína está determinada por su estructura tridimensional, la cual a su vez está dictada por su secuencia de aminoácidos (Junker & Schreiber, 2011).

Algunas proteínas como la ribonucleasa A, están formadas exclusivamente por residuos de aminoácidos y ningún otro constituyente; estas se consideran proteínas simples. En contraste, proteínas que contienen componentes químicos permanentemente asociados además de los aminoácidos se llaman proteínas conjugadas (Figura 1). La parte no aminoacídica de una proteína conjugada se denomina grupo prostético; ejemplo de ello son las lipoproteínas que contienen lípidos, las glicoproteínas que contienen carbohidratos asociados y las metaloproteínas, como las metalotioneínas que contienen un metal específico unido (Nelson & Cox, 2013).

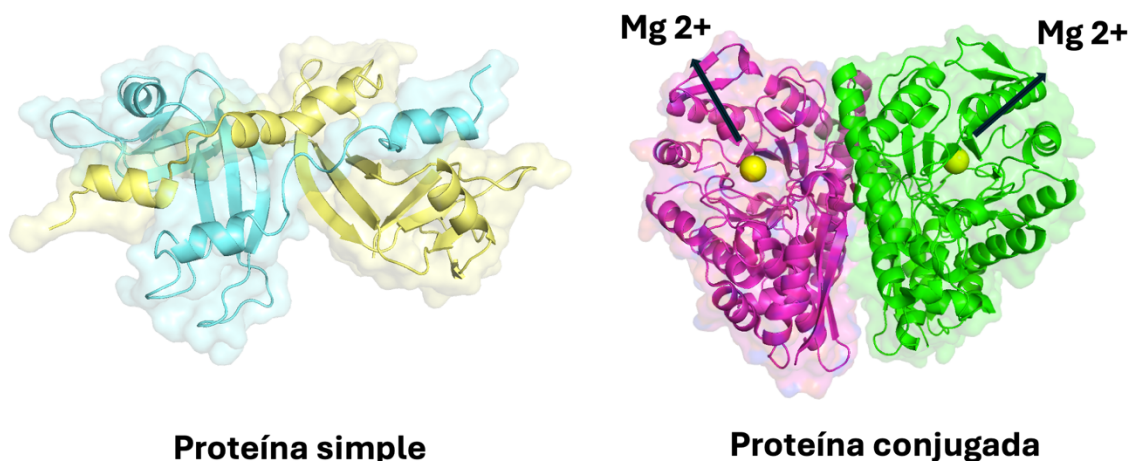


Figura 1. Estructura de una proteína simple (Ribonucleasa A, PDB ID: 1A2W) y una proteína conjugada con iones de magnesio (Mg) como grupo prostético (Enolasa, PDB ID: 1E9I).

1.1.1 Clasificación estructural de proteínas

Existen cuatro niveles estructurales para clasificar a las proteínas:

La estructura primaria corresponde a la descripción de todos los enlaces covalentes que unen a los residuos de aminoácidos en una cadena polipeptídica, es decir, está dictada por la secuencia de residuos de aminoácidos. La estructura secundaria se refiere a las conformaciones particularmente estables de los residuos de aminoácidos que dan lugar a patrones estructurales recurrentes (tales como la formación de estructuras de tipo alfa hélices o beta plegadas, entre otras). La estructura terciaria describe el plegamiento tridimensional de un polipéptido. Si una proteína tiene dos o más subunidades polipeptídicas, su disposición espacial se denomina estructura cuaternaria (Nelson & Cox, 2013; Petsko & Ringe, 2004) (Figura 2).

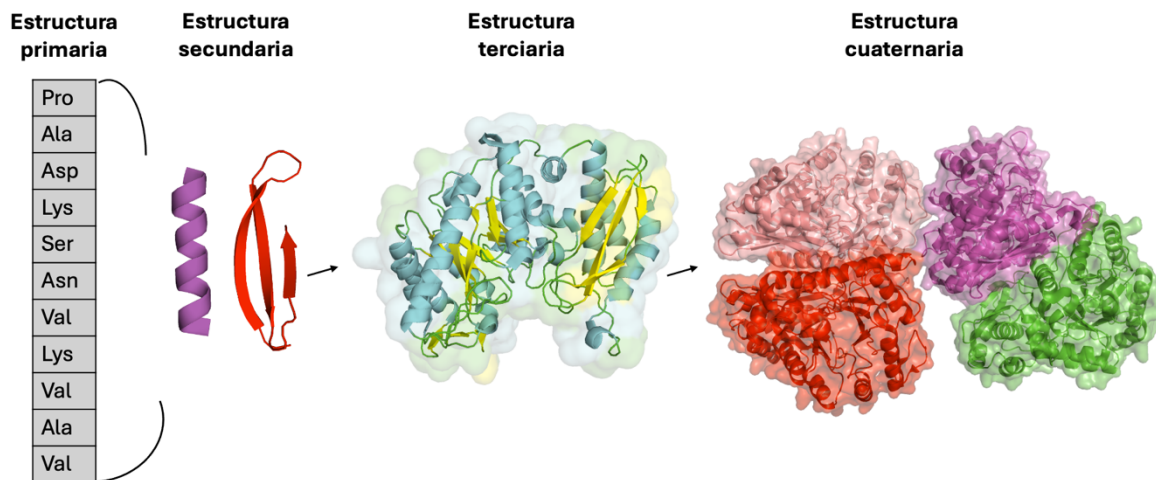


Figura 2. Niveles de estructura de una proteína (primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria).

1.1.2 Plegamiento proteico

El proceso mediante el cual una proteína pasa de su estructura primaria hasta su estructura tridimensional funcional se conoce como plegamiento proteico (Henzler-Wildman & Kern, 2007a; Lodish et al., 2016). A lo largo del tiempo, las proteínas pueden formar diversas conformaciones estables, sin la necesidad del rompimiento o formación de nuevos enlaces y a cada una de estas conformaciones funcionales se les conoce como proteínas nativas (Dwevedi, 2015; Nelson & Cox, 2013).

El plegamiento proteico está determinado por una combinación de interacciones covalentes, como la formación de puentes disulfuro, y en gran medida por interacciones no covalentes, como la formación de puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas e interacciones de tipo van der Waals. Aunque las interacciones no covalentes son entre 30 y 300 veces más

débiles que los enlaces covalentes (80-120 kcal/mol), la unión global de muchas interacciones no covalentes pueden mantener de manera estable una estructura tridimensional establecida en una proteína (Figura 3) (Alberts et al., 2022; Murray et al., 2018).

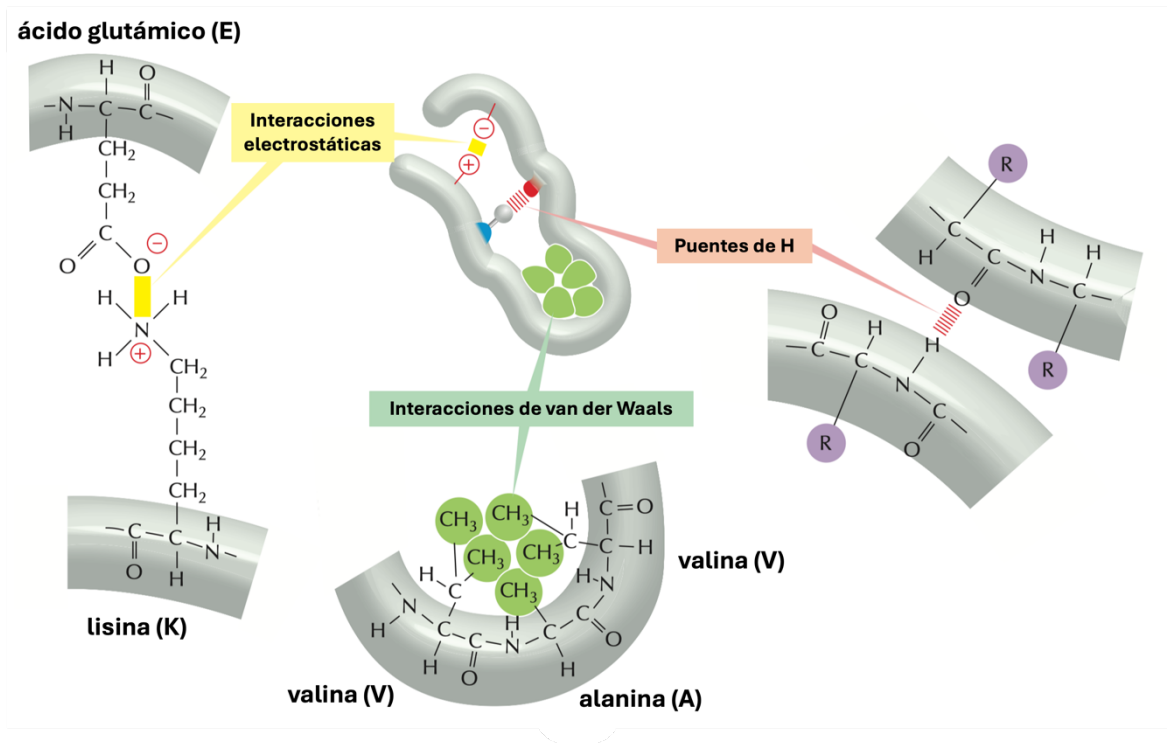


Figura 3. Interacciones no covalentes en una proteína (puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas y de van der Waals) Imagen tomada y modificada de (Alberts et al., 2022)

Actualmente existe un gran foco de interés en identificar las conformaciones nativas importantes que existen en una proteína y además entender cómo se produce el plegamiento y cambio en dichas estructuras a través del tiempo.

Se han propuesto una serie de hipótesis que han tratado de describir el proceso del plegamiento proteico. La evidencia inicial mostró que la información necesaria para que una proteína se pliegue correctamente está contenida en su secuencia de aminoácidos, lo cual se demostró a través de estudios *in vitro* sobre el plegamiento de la proteína ribonucleasa A. Los estudios realizados por Christian Anfinsen, acreedores de un premio Nobel, mostraron que las proteínas se pueden desplegar y plegar reversiblemente, implicando que las estructuras nativas de algunas proteínas se encuentran en los estados termodinámicos estables, por lo tanto, la conformación más estable es el mínimo global sobre la superficie de energía libre accesible (Alas-Guardado et al., 2010; Lodish et al., 2016).

Aunque la información mostrada por Anfinsen fue sumamente importante para comprender la relación entre la estructura primaria y terciaria de una proteína, no terminó por esclarecer

el proceso secuencial que sigue una proteína para su plegamiento. En 1969 Cyrus Levinthal planteó la denominada “paradoja de Levinthal” que permitió ratificar que el proceso de plegamiento proteico es sumamente complejo y de difícil entendimiento. Esta paradoja establece que si cada enlace peptídico de una proteína tiene sólo tres grados de libertad, para una proteína pequeña de unos 101 aminoácidos existirán 3^{100} conformaciones (5×10^{47}). Aun si la proteína fuera capaz de explorar estas conformaciones a una enorme velocidad de 10^{13} conformaciones por segundo (3×10^{20} por año), entonces le tomaría 10^{27} años probar todas las posibilidades. Es decir que si una proteína se plegara de forma aleatoria, muestreando el espacio conformacional de manera exhaustiva, entonces le tomaría una cantidad tiempo de 17 órdenes de magnitud mayor que la edad del universo para plegarse (Alas-Guardado et al., 2010).

Levinthal sentó las bases para proponer que la búsqueda conformacional estocástica no es el mecanismo real del plegamiento, sino que éste debe ser un proceso dirigido por las condiciones fisicoquímicas existentes durante la biosíntesis de la proteína y las rutas bioquímicas que experimentan a posteriori, es decir, una vez plegadas.

El plegamiento de proteínas es por tanto un proceso termodinámico en el que la entropía desempeña un papel fundamental. La entropía en una cadena polipeptídica no plegada es alta, por lo que el plegamiento hacia una estructura tridimensional definida requiere de una reducción significativa de esta entropía, lo que representa un cambio desfavorable en la energía libre del sistema. Este cambio es compensado por el efecto hidrofóbico ya que cuando residuos no polares se insertan hacia la parte interna de la proteína, las moléculas de agua previamente ordenadas a su alrededor son expuestas al exterior, aumentando la entropía del disolvente. Esta ganancia entrópica, junto con las contribuciones entálpicas favorables de los enlaces de hidrógeno y las interacciones de van der Waals impulsan a la proteína hacia una conformación nativa. Por lo tanto, el plegamiento proteico refleja un equilibrio entre la estabilización entálpica y la compensación entrópica (Benítez & Jiménez, 2025; Rose, 2021).

En la actualidad los datos experimentales sugieren que la ruta de plegamiento en la mayoría de las proteínas no es única y que el plegamiento de proteínas *in vivo* esta mediado por numerosas proteínas que facilitan el plegamiento, como las chaperonas, las rotamasas y las disulfuro-isomerasas (Alas-Guardado et al., 2010; Lodish et al., 2016).

1.1.3 Síntesis de proteínas y el papel de las chaperonas

En los organismos eucariotas, la síntesis de proteínas es llevada a cabo por los ribosomas de tipo 80S y la ayuda de numerosos factores de traducción. La traducción comprende cuatro etapas principales: iniciación, elongación, terminación y reciclaje (Entian, 2022; Khatter et al., 2015).

Los ribosomas eucariotas están constituidos por una subunidad menor (40S) y una subunidad mayor (60S) que en conjunto forman el ribosoma 80S. Durante la traducción, el ribosoma

lee la información de un codón a la vez (tres nucleótidos) utilizando aminoacil-ARNt como moléculas adaptadoras que reconocen cada codón para insertar el aminoácido apropiado (Figura 4 y 5) (Alberts et al., 2022; Entian, 2022; Lodish et al., 2016).

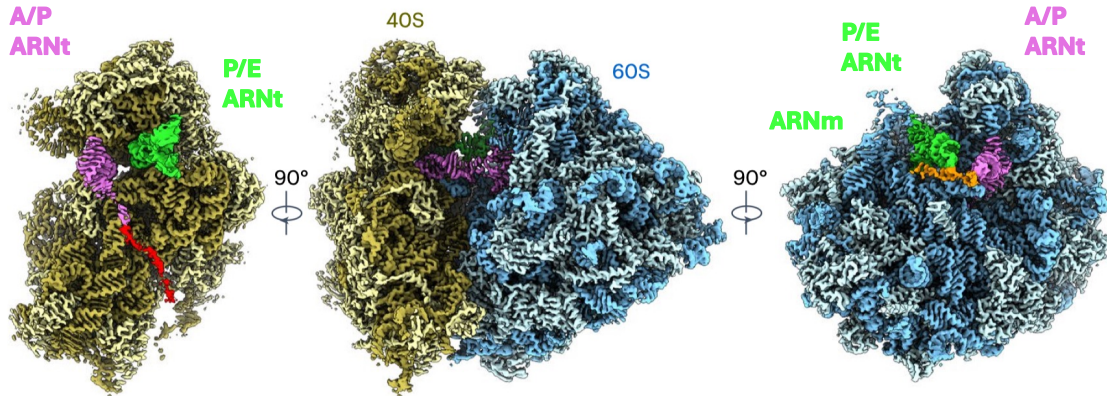


Figura 4. Mapa de densidad cryo-EM del ribosoma citosólico de la planta de tabaco en traducción activa con ARNt unidos a una resolución de 2.2 Å. El ARNr 60S se muestra en azul oscuro y el ARNr 40S en amarillo oscuro. Imagen tomada y modificada de (Smirnova et al., 2023).

1.1.3.1 Fase de iniciación

Durante la fase de iniciación, los factores de iniciación de la traducción eucariota (eIFs) promueven el ensamblaje de los ribosomas 80S en el codón de inicio AUG con un metionil-ARNt iniciador (Met-tARN_i) unido al sitio P. Esta fase comprende dos etapas principales: un paso donde el Met-tARN_i se une al codón de inicio en el sitio P de la subunidad 40S para formar el complejo de iniciación 48S y un segundo paso en donde la subunidad 60S se une al complejo 48S para formar el complejo de iniciación 80S, listo para la elongación. En la etapa de iniciación participan los factores eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3, eIF4A, eIF4B, eIF4E, eIF4F, eIF4G, eIF4H, eIF5, eIF5B y eIF2B (Alberts et al., 2022; Entian, 2022; Khatter et al., 2015).

1.1.3.2 Fase de elongación

La fase de elongación comprende tres principales etapas en donde se encuentran: la decodificación de los codones del ARNm por los aminoacil-ARNt, posteriormente la formación del enlace peptídico y finalmente la translocación del complejo ARNt-ARNm, lo que resulta en el movimiento del peptidil-ARNt del sitio A al sitio P, para dar paso a la presentación del siguiente codón en el sitio A. Esta etapa esta mediada por la participación de los factores eEF1A, eEF2, eIF5A y eEF3 (Entian, 2022; Smirnova et al., 2023).

1.1.3.3 Fase de terminación

La fase de terminación ocurre cuando los ribosomas alcanzan un codón de paro (UAA, UGA o UAG). La terminación es mediada por dos factores de terminación: eRF1 que reconoce

cualquiera de los codones de paro y la GTPasa eRF3 que promueve la terminación mediante la hidrólisis de GTP (Entian, 2022).

1.1.3.4 Fase de reciclaje

Durante el reciclaje, las subunidades ribosómicas se disocian y el ARNm junto con el ARNt se liberan para regenerar los componentes necesarios para los siguientes procesos de traducción. Este proceso es realizado por la ATPasa ABCE1, proteína que contiene dos dominios de unión a nucleótidos y un átomo metálico unido a un átomo de azufre (Fe-S) en el extremo N-terminal, induciendo la disociación a partir de la hidrólisis de ATP. Tras la unión e hidrólisis del ATP, el grupo Fe-S experimenta un cambio conformacional que impulsa a eRF1 hacia el espacio intersubunitario ribosómico, lo que provoca la disociación de los ribosomas en las subunidades 40S y 60S. El ARNt y el ARNm se liberan entonces de las subunidades 40S (Alberts et al., 2022; Entian, 2022; Khatter et al., 2015).

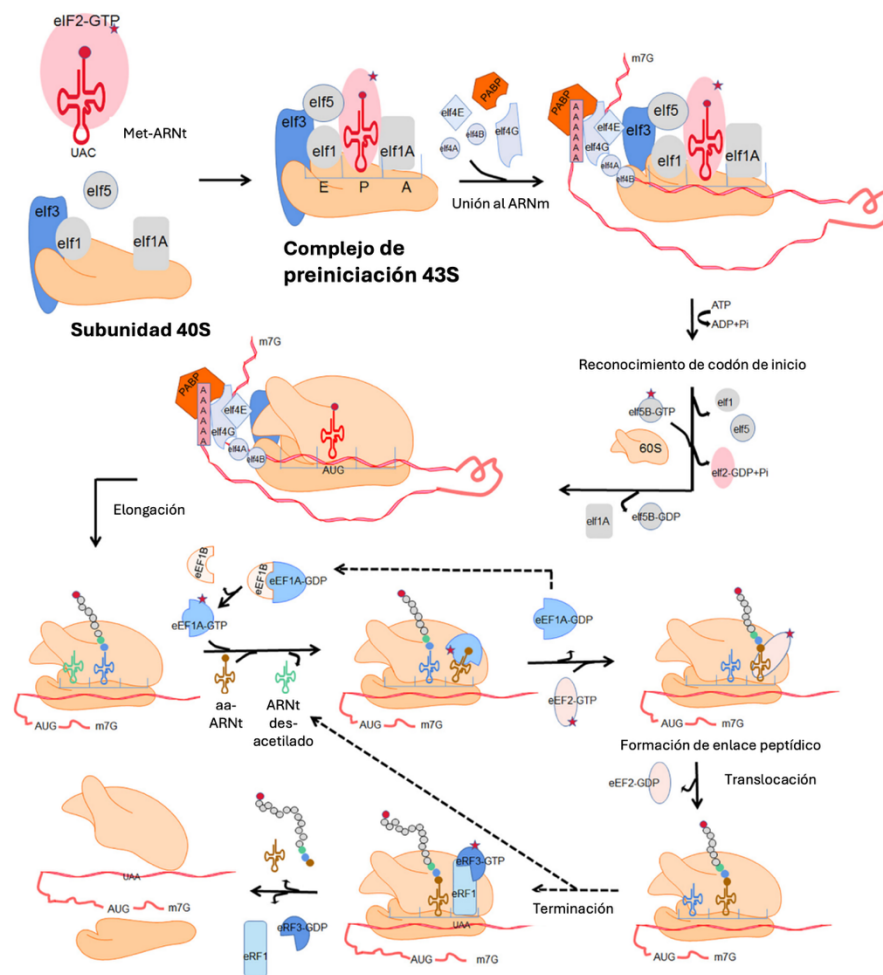


Figura 5. Esquema del proceso de traducción de las proteínas en el ribosoma 80S en eucariotas. Se muestran las fases de iniciación, elongación, terminación y reciclaje. Imagen tomada y modificada de (Zhang et al., 2020).

1.1.3.5 Modificaciones postraduccionales

El proceso de expresión génica no concluye cuando el código genético se ha utilizado para crear la secuencia de aminoácidos que constituye una proteína. Para ser útil a la célula y a cada una de las funciones que ejecuta, esta nueva cadena polipeptídica debe plegarse en su conformación tridimensional funcional, unirse a los cofactores necesarios para su actividad, ser modificada adecuadamente por enzimas tales como proteínas quinasas así como ensamblarse correctamente con las demás subunidades proteicas con las que funciona.

En algunas proteínas, el plegamiento comienza en el túnel de salida del ribosoma. Aunque esta cavidad es demasiado estrecha para acomodar el plegamiento de proteínas completas, el túnel de salida se ensancha hacia su extremo para permitir la formación de estructuras simples, como α hélices cortas, a medida que el péptido en crecimiento es impulsado a través del proceso de traducción. Sin embargo, la mayor parte del plegamiento de proteínas comienza cuando la proteína emerge del túnel de salida del ribosoma, donde la nueva proteína se encuentra con enzimas que realizan modificaciones postraduccionales. Estas modificaciones ocurren en organelos tales como el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi y resultan fundamentales para que la proteína adquiera una estructura funcional (Alberts et al., 2022; Cloutier & Coulombe, 2013).

Existen más de 400 tipos diferentes de modificaciones postraduccionales que afectan a diversos aspectos de las funciones proteicas tales como acetilaciones, fosforilaciones, glicosilaciones, lipidaciones, formación de puentes disulfuro e incluso ubiquitinaciones (en el caso de que la proteína este mal plegada y requiera ser degradada mediante el sistema ubiquitina-proteasoma). Entre ellas, las tres modificaciones postraduccionales más frecuentes son la fosforilación, la acetilación y la ubiquitinación, que comprenden más del 90 % de todas las modificaciones postraduccionales reportadas (alrededor de 827,000 sitios de aproximadamente 908,000). Cada aminoácido puede experimentar al menos tres modificaciones postraduccionales diferentes, en donde lisina constituye el residuo con el mayor número de modificaciones (15 tipos). La cisteína y serina por su parte pueden experimentar al menos 10 tipos de modificaciones postraduccionales, donde la fosforilación en serina es el tipo de modificación postraduccional más reportado (Deribe et al., 2010; Mann & Jensen, 2003; Ramazi & Zahiri, 2021).

1.1.3.6 Chaperonas

Concomitantemente a las modificaciones postraduccionales que participan en el plegamiento proteico, algunas proteínas requieren adicionalmente de otras proteínas que facilitan dicho proceso y aumentan la estabilidad para prevenir su agregación, estas proteínas son conocidas como chaperonas.

Las chaperonas interactúan con polipéptidos parcialmente plegados o mal plegados, facilitando las vías de plegamiento correctas o proporcionando microambientes en los que puede ocurrir el plegamiento. En el contexto del plegamiento y la agregación de proteínas, las proteínas chaperonas pueden afectar las constantes de velocidad de reacción. Pueden acelerar el plegamiento de proteínas al unirse a proteínas desplegadas o mal plegadas e impedir la agregación, aumentando así eficazmente la velocidad de formación de proteínas nativas. Por el contrario, también pueden ralentizar las reacciones al unirse a intermediarios o reactivos, lo que influye en la velocidad general de una reacción. (Figura 6). Existen dos familias principales de chaperonas, en donde se encuentra la familia Hsp70 y las chaperoneas (Cloutier & Coulombe, 2013; Nelson & Cox, 2013).

La proteína de choque térmico Hsp70 en el citosol y sus homólogos Hsp70 en la matriz mitocondrial, BiP en el retículo endoplasmático y DnaK en bacterias, son chaperonas identificadas inicialmente por su rápida aparición tras el estrés de una célula por choque térmico. La Hsp70 y sus homólogos utilizan un ciclo dependiente de ATP para plegar sus sustratos. Al unirse al ATP, la proteína monomérica Hsp70 adopta una conformación abierta, en la que una cavidad hidrofóbica de unión al sustrato expuesta se une transitoriamente a las regiones hidrofóbicas expuestas de una proteína diana plegada de forma incompleta o parcialmente desnaturalizada, liberando rápidamente este sustrato, siempre que el ATP esté unido. La hidrólisis del ATP unido hace que la chaperona molecular asuma una forma cerrada que se une a su proteína sustrato mucho más fuertemente, y esta unión más fuerte facilita el plegamiento de la proteína objetivo, para evitar que se agregue con otras proteínas desplegadas. A continuación, el intercambio de ATP por el ADP unido a la chaperona causa un cambio conformacional en la chaperona que libera la proteína objetivo y regenera una Hsp70, unida a ATP, lista para ayudar a plegar otra proteína. Si la proteína objetivo ahora está plegada correctamente, no puede volver a unirse a una Hsp70. Si permanece al menos parcialmente desplegada, puede unirse de nuevo a una chaperona hasta plegarse correctamente (Cloutier & Coulombe, 2013; Lodish et al., 2016; Nelson & Cox, 2013).

Las chaperoninas (también llamadas Hsp60) son grandes conjuntos supramoleculares de estructura cilíndrica que se forman a partir de anillos de oligómeros. Existen dos grupos distintos de chaperoninas: las chaperoninas del grupo I, presentes en procariotas, cloroplastos y mitocondrias. Estas chaperoninas están compuestas por dos anillos, cada uno con siete subunidades que interactúan con una tapa de co-chaperona homoheptamérica. Las chaperoninas del grupo II están presentes en el citosol de las células eucariotas (por ejemplo TriC en mamíferos) y en arqueas, que pueden tener de ocho a nueve subunidades homoméricas o heteroméricas en cada anillo, y en donde la función de tapa está incorporada en dichas subunidades, por lo que no se necesita una proteína de tapa independiente. La hidrólisis del ATP desencadena el cierre de la tapa de las chaperoninas del grupo II (Feldman & Frydman, 2000; Lodish et al., 2016).

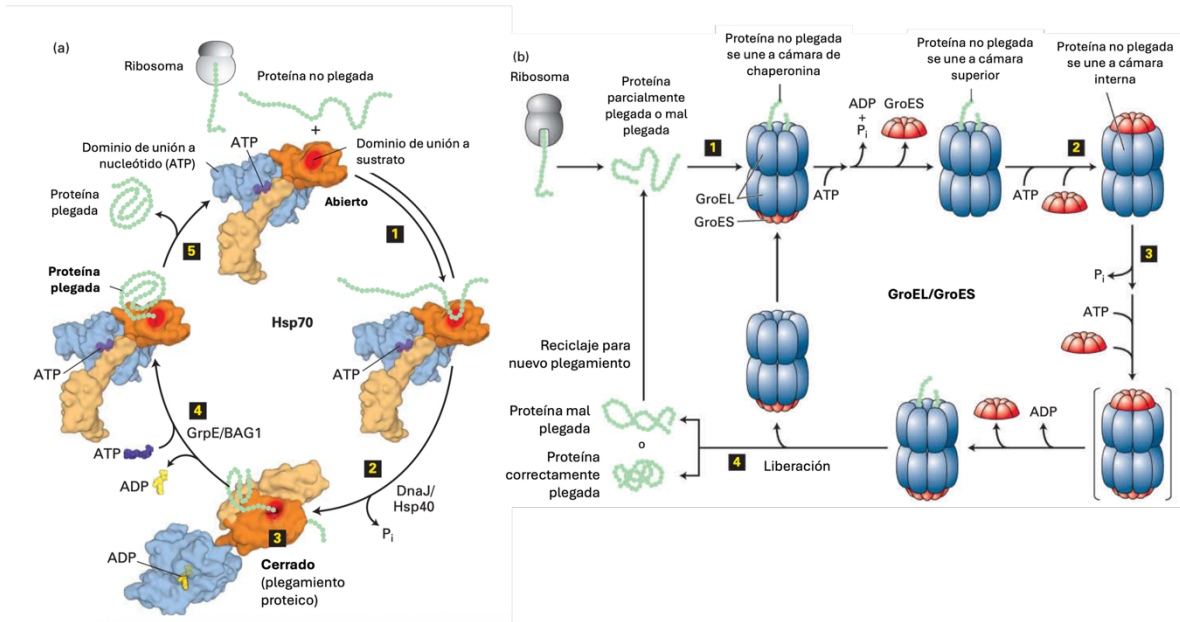


Figura 6. A. Esquema del mecanismo de acción de las chaperonas (Hsp70). B. Esquema del mecanismo de acción de las chaperoninas (GroEL/GroES) (Imagen tomada y modificada de (Lodish et al., 2016)).

1.2 Herramientas para el estudio tridimensional de proteínas

La determinación de la estructura tridimensional de las proteínas es fundamental para entender su funcionamiento, basado en la estrecha relación existente entre estructura y función. Este proceso ha sido uno de los mayores desafíos de la ciencia desde el siglo XX, ya que el proceso de elucidación de estructuras proteicas es un proceso sumamente costoso en términos de recursos y tiempo. Por lo tanto actualmente existe una gran brecha entre el volumen de datos de secuencia generados por los proyectos genómicos respecto al número de estructuras tridimensionales resueltas (Dorn et al., 2014; Kuhlman & Bradley, 2019; Moraes et al., 2024).

El desarrollo de metodologías experimentales que permiten la determinación de estructuras proteicas con resolución atómica ha contribuido a la comprensión de las diferentes propiedades y mecanismos de acción de las proteínas incluyendo procesos como el reconocimiento celular, la catálisis enzimática, entre otros.

La primera estructura resuelta fue la de la mioglobina, obtenida en 1958 mediante la técnica de cristalografía de rayos X por John Kendrew, mientras que Max Perutz se centró en el análisis estructural de hemoglobina, lo que representó un gran hito en la biología estructural de proteínas, haciéndolos acreedores del premio Nobel de Química en 1962 (Moraes et al., 2024).

1.2.1 Cristalografía de rayos X

La cristalografía de rayos X fue la primera técnica utilizada para obtener estructuras tridimensionales de proteínas y constituye la técnica responsable de la mayoría de entradas de estructuras de proteínas en el Protein Data Bank (PDB) (Morales et al., 2024; Nachiappan et al., 2021).

La cristalografía de rayos X se basa en el principio físico de que los rayos X, al incidir sobre un cristal, interactúan con las nubes electrónicas de los átomos en una red ordenada y se dispersan en direcciones específicas. Estos rayos X dispersos interfieren entre sí, produciendo un patrón de difracción. Posteriormente mediante la recopilación y el análisis de este patrón y mediante algoritmos avanzados (incluyendo la transformada de Fourier) se reconstruye un modelo tridimensional de la densidad electrónica, traduciendo los datos de dispersión en coordenadas atómicas espaciales (Figura 7). El proceso completo consta de 5 pasos: purificación y cristalización de la muestra, difracción de los rayos X, análisis de datos, construcción del modelo y refinamiento (Morales et al., 2024; Nachiappan et al., 2021; Petrova, 2024).

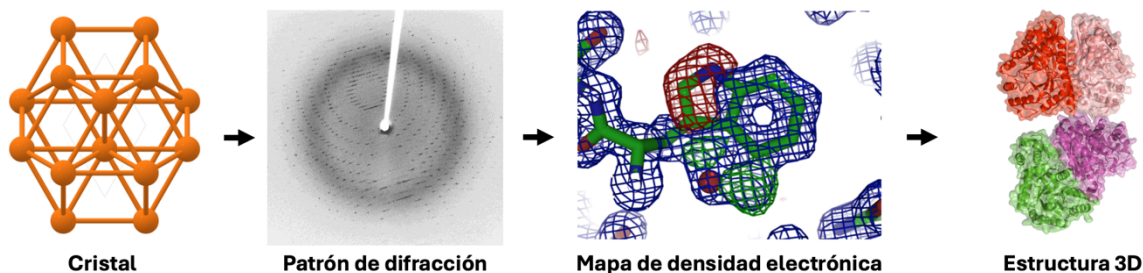


Figura 7. Esquema de proceso de obtención de estructura de una proteína por cristalografía de rayos X.

Esta técnica requiere monocristales de alta calidad, ya que solo en una forma cristalina bien ordenada las proteínas difractan los rayos X de una forma que permita su interpretación estructural. Sin embargo, muchas proteínas son inherentemente difíciles de cristalizar debido a su flexibilidad, inestabilidad o hidrofobicidad (como es el caso de las proteínas transmembranales o las proteínas intrínsecamente desordenadas) por lo que comúnmente se tienen que modificar las condiciones del medio añadiendo detergentes o modificando el pH, alterando así las condiciones fisiológicas basales (Petrova, 2024).

La cristalografía de rayos X es por tanto, una técnica sumamente útil pero con muchas limitantes para la obtención de estructuras.

1.2.2 Resonancia magnética nuclear (RMN)

La espectroscopía de RMN fue la segunda técnica experimental utilizada para determinar la estructura de las proteínas. Su principal ventaja radica en que tiene la capacidad de proporcionar información estructural de proteínas en solución, lo que permite estudiar conformaciones más cercanas a su estado fisiológico. La espectroscopía de RMN se basa en la medición de la frecuencia de precesión del momento magnético nuclear en presencia de un campo magnético intenso. Esta frecuencia se denomina frecuencia de Larmor y está modulada por el entorno químico de cada núcleo, por lo tanto refleja el entorno electrónico que rodea al núcleo (Petrova, 2024).

La RMN se utiliza para estudiar moléculas que contienen núcleos con espín nuclear diferente de cero. Dentro de los isótopos utilizados para el análisis por RMN se encuentran: ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P . Los más usados son ^1H y ^{13}C por estar en mayor abundancia los compuestos orgánicos y en particular en las proteínas (Moraes et al., 2024).

Los pasos para la determinación de una estructura por RMN incluyen: preparación de la muestra (marcado isotópico), realización de espectro, recopilación de datos, análisis espectral, calculo estructural y validación (Moraes et al., 2024).

Una proteína compuesta por aproximadamente 60 aminoácidos tiene en promedio alrededor de 800 núcleos de ^1H , por lo que el tamaño de la proteína restringe el uso de esta técnica a macromoléculas de hasta aproximadamente 50 kDa. Para caracterizar estructuralmente a una proteína se utiliza el efecto Overhauser nuclear (NOE), que consiste en la transferencia de la polarización de espín nuclear de una población de espines a otra población cercana en el espacio, obteniendo así información estructural a escalas de angstroms (Figura 8). La RMN requiere conocer previamente la secuencia de aminoácidos en la proteína (Berg et al., 2015).

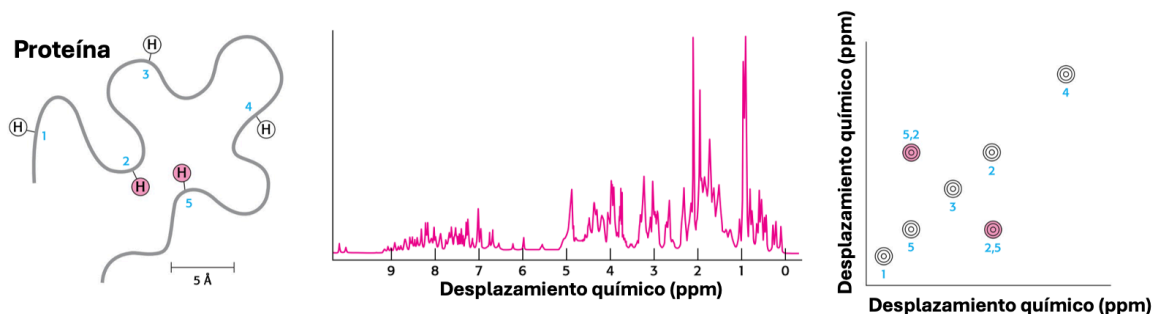


Figura 8. Efecto Overhauser nuclear (NOE) en una proteína y espectro de RMN de una proteína. Imagen tomada y modificada de (Berg et al., 2015).

1.2.3 Criomicroscopía electrónica (Cryo-EM)

La criomicroscopía electrónica se ha consolidado como una técnica novedosa y revolucionaria en la biología estructural al tener la capacidad de obtener estructuras de una alta resolución atendiendo algunas de las principales limitantes de la RMN y la cristalografía de rayos X. A diferencia de la cristalografía de rayos X que requiere una cristalización previa de la proteína y de la RMN restringida a macromoléculas de peso molecular bajo, la criomicroscopía utiliza la congelación rápida de proteínas en hielo vítreo, preservando su conformación nativa sin inducir artefactos cristalinos. Cryo-EM ha sido especialmente útil en el estudio de complejos proteicos de un peso molecular elevado tales como ribosomas, cápsides virales, canales iónicos, proteínas transmembranales y enzimas (Moraes et al., 2024; Nachiappan et al., 2021; Petrova, 2024).

En la criomicroscopía electrónica se recopilan de miles a millones de imágenes de partículas de proteínas individuales mediante un microscopio electrónico de transmisión. Posteriormente estas proyecciones bidimensionales capturadas en múltiples orientaciones son alineadas computacionalmente para reconstruir un mapa de densidad tridimensional (Figura 9) y con ello la estructura de la proteína (Zhu et al., 2023).

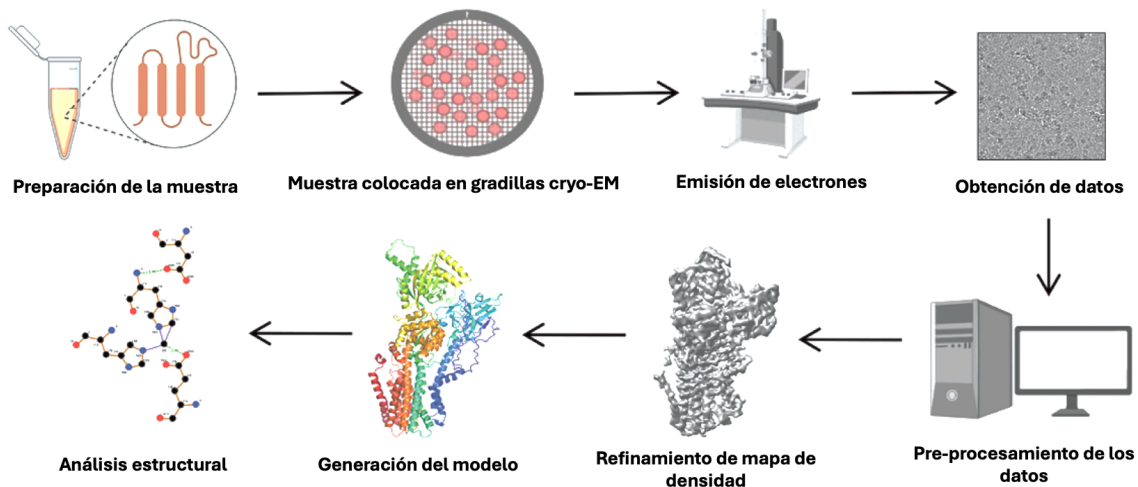


Figura 9. Esquema de proceso de obtención de estructura de una proteína por cryo-EM. Imagen tomada y modificada de (Zhu et al., 2023).

1.2.4 Métodos de predicción de estructura

Como alternativa a los métodos experimentales utilizados para la obtención de estructuras tridimensionales, se han desarrollado múltiples métodos con un enfoque computacional basados en la predicción de estructura tridimensional a partir de la secuencia primaria de aminoácidos. Estos métodos computacionales han logrado avances significativos

considerando las dificultades que se presentan para obtener estructuras por métodos experimentales.

Dentro de los principales enfoques computacionales utilizados se encuentran los métodos de predicción de estructura basados en plantillas (métodos de modelado por homología), los métodos de modelado sin plantilla (*ab initio*) y los métodos de predicción basados en inteligencia artificial (Dorn et al., 2014; Kuhlman & Bradley, 2019; Moraes et al., 2024; Nachiappan et al., 2021).

1.2.4.1 Modelado por homología

El modelado por homología es un método que permite construir estructuras tridimensionales de proteínas utilizando la secuencia primaria y el conocimiento previo obtenido a partir de similitudes estructurales con otras proteínas. Este método está basado en principios evolutivos, ya que la conservación de secuencias y motivos estructurales específicos ha sido un mecanismo esencial para mantener las funciones principales de las proteínas a lo largo del tiempo. Por lo tanto, las familias de proteínas tienden a mantener similitudes estructurales que permiten utilizarse para predecir estructuras conocidas a partir de estructuras de homólogos conocidos.

El proceso de modelado por homología se realiza de manera secuencial. Primero se optimiza el alineamiento de la secuencia con respecto en las plantillas seleccionadas que comparten un porcentaje de similitud considerable con modelo deseado. Posteriormente se construye la secuencia principal y se añaden las cadenas laterales modelando de manera inicial los zonas de la proteína que presentan una estructura secundaria específica (tales como α -hélice, 3_{10} -hélice, π -hélice, β plegada), así como motivos estructurales específicos. Una vez modelados los sitios que presentan una estructura secundaria definida, se procede a modelar los bucles de baja homología y alta movilidad conformacional. Después se optimiza la estructura previniendo contactos entre residuos y zonas no permitidas estereoquímicamente. Finalmente se realiza un proceso de validación de la estructura tridimensional utilizando algoritmos como la función de puntuación y el diagrama de Ramachandran (Hameduh et al., 2020; Kuhlman & Bradley, 2019; Moraes et al., 2024).

1.2.4.2 Métodos *ab initio*

Los métodos *ab initio* son métodos computacionales que no utilizan una plantilla como base al carecer de estructuras experimentales tridimensionales disponibles que cumplan con una homología adecuada (similitud superior al 30% en el Protein Data Bank). Estos métodos utilizan principios termodinámicos para predecir la conformación nativa de las proteínas a partir de la identificación de mínimos globales de energía libre. Existen tres principios

fundamentales para la obtención de estructuras satisfactorias con métodos *ab initio*: 1) una función que describa con precisión la energía potencial de la estructura nativa de la proteína y que conduzca a uno de los estados termodinámicos estables; 2) un algoritmo de búsqueda eficiente que permita caracterizar rápidamente estados de menor energía mediante análisis conformacional y 3) estrategias de muestreo que garanticen la correcta selección de conformaciones nativas (Dorn et al., 2014; Kuhlman & Bradley, 2019; Moraes et al., 2024; Nachiappan et al., 2021).

1.2.4.3 Métodos de predicción estructural mediante inteligencia artificial (IA)

Desde 1994, la evaluación crítica de métodos para la predicción de estructuras de proteínas (CASP, por sus siglas en inglés) ha servido como un riguroso campo de evaluación para algoritmos de predicción de plegamiento proteico. En este contexto, se examina la capacidad de los modelos para predecir estructuras tridimensionales de proteínas que han sido determinadas experimentalmente mediante cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear (RMN) o criomicroscopía electrónica (Cryo-EM), pero que aún no han sido depositadas en el Protein Data Bank (PDB), por lo que permanecen desconocidas para los participantes. En las ediciones CASP14 y CASP15, se introdujeron enfoques basados en inteligencia artificial como AlphaFold y trRosetta, los cuales superaron ampliamente a los métodos tradicionales al generar estructuras con un alto grado de similitud respecto a las obtenidas experimentalmente (Abramson et al., 2024; Du et al., 2021; Laurents, 2022; Moraes et al., 2024).

Los métodos de predicción de estructuras proteicas basados en inteligencia artificial emplean modelos de aprendizaje profundo para inferir la conformación tridimensional de una proteína a partir de su secuencia primaria. Estos algoritmos se entrenan con grandes conjuntos de datos estructurales, como las estructuras del Protein Data Bank, y utilizan alineamientos múltiples de secuencias (MSA, por sus siglas en inglés) para extraer información evolutiva. La red neuronal procesa esta información junto con representaciones codificadas de la secuencia para predecir distancias interresiduales, ángulos de torsión y mapas de contacto. Posteriormente, se aplica un módulo de ensamblaje estructural que convierte estas predicciones en coordenadas espaciales, optimizadas mediante funciones de energía o restricciones geométricas. Ejemplos destacados como AlphaFold y trRosetta han demostrado que este enfoque puede alcanzar precisión a nivel de resolución experimental, transformando el estudio de proteínas en campos como el diseño de fármacos, la ingeniería de enzimas y la biología estructural computacional (Abramson et al., 2024; Du et al., 2021; Hameduh et al., 2020; Laurents, 2022; Moraes et al., 2024).

1.3 Herramientas para el estudio de la dinámica de proteínas

Las proteínas no existen en una conformación única y fija, por el contrario, se describen como conjuntos conformacionales donde múltiples conformaciones coexisten en equilibrio. Las posibles conformaciones que puede adoptar una proteína pueden alcanzarse sin el rompimiento de los enlaces covalentes mediante procesos como la rotación de las cadenas laterales y los bucles, o el movimiento colectivo de dominios en la proteína. Entre estas conformaciones, algunos estados se encuentran con mayor frecuencia y juegan un papel más relevante fisiológicamente. El grado de diversidad conformacional depende de las características intrínsecas de la proteína; mientras algunas proteínas presentan cambios conformacionales menores, otras proteínas —como las proteínas intrínsecamente desordenadas—, por su naturaleza flexible y dinámica, exploran una alta cantidad de conformaciones posibles (Henzler-Wildman & Kern, 2007b; Moraes et al., 2024; Nelson & Cox, 2013).

Consecuentemente se han desarrollado diversas técnicas tanto por metodologías experimentales como computacionales que en conjunto permiten investigar las conformaciones y la dinámica de las proteínas a detalle.

Entre los enfoques experimentales más destacados se incluyen la espectroscopía de RMN, la criomicroscopía electrónica (Cryo-EM), dispersión de rayos X de ángulo reducido (SAXS), transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), entre otros (Henzler-Wildman & Kern, 2007b; Moraes et al., 2024).

Por su parte, dentro de las técnicas computacionales se encuentran las simulaciones de dinámica molecular (MD), los métodos de mecánica cuántica/mecánica molecular (QM/MM) y la mecánica cuántica/mecánica molecular/dinámica molecular (QM/MM/MD) que permiten investigar las diversas conformaciones de proteínas con un detalle atómico detallado.

1.3.1 Simulaciones de dinámica molecular

Las simulaciones de dinámica molecular forman parte de los métodos computacionales (*in silico*) que permiten predecir el movimiento de cada átomo de una proteína u otro sistema molecular a lo largo del tiempo, basándose en un modelo físico que rige las interacciones interatómicas. Operacionalmente, es un método utilizado para generar las trayectorias de un sistema compuesto de N partículas mediante la integración numérica directa de las ecuaciones de movimiento de Newton, utilizando un potencial de interacción interatómico de condiciones iniciales y de frontera adecuadas. La energía potencial del sistema se calcula usando mecánica molecular mediante funciones analíticas y parámetros denominados campos de fuerza (Hollingsworth & Dror, 2018; D. B. Singh & Tripathi, 2020; Tripathi & Dubey, 2022).

Los campos de fuerza utilizados con mayor frecuencia para simulaciones de dinámica molecular de proteínas son: AMBER, CHARMM, GROMOS y GROMACS. Dichos campos de fuerza son fundamentales ya que poseen la información de la energía potencial en términos de interacciones tanto enlazantes como no enlazantes (Brooks et al., 2009; Hollingsworth & Dror, 2018; Love et al., 2023).

En términos generales, el cálculo de la energía potencial en un campo de fuerza toma la siguiente forma:

$$\begin{aligned} U &= E_{enlace} + E_{no\ enlace} \\ &= (E_{enlace} + E_{angulos} + E_{torsiones}) + (E_{VDW} + E_{Couloumb}) \end{aligned}$$

Sustituyendo:

$$\begin{aligned} U &= \sum_{enlace} \frac{1}{2} K_b (r - r_0)^2 + \sum_{angulos} \frac{1}{2} K_a (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{torsión} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi \\ &\quad - \delta)] + \sum_{impropio} V_{imp} + \sum_{LJ} 4\epsilon_{ij} \left(\frac{\sigma_{ij}^{12}}{r_{ij}^{12}} - \frac{\sigma_{ij}^6}{r_{ij}^6} \right) + \sum_{elec} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \end{aligned}$$

Los primeros tres términos consideran los efectos de los enlaces, ángulos y torsiones de átomos unidos covalentemente, los términos cuatro y cinco expresan las interacciones de tipo no enlazante como son las fuerzas interatómicas de van der Waals y las fuerzas electrostáticas de largo alcance de Coulomb. (Patodia, 2014; Tripathi & Dubey, 2022)

El movimiento de los átomos se calcula aplicando la segunda ley de Newton como se describe en la siguiente ecuación, donde $x_i^{\vec{}}$ es el vector de posición de la i -ésima partícula en el tiempo t con una masa m y una fuerza aplicada de $F_i^{\vec{}}$ (Morales et al., 2024; D. B. Singh & Tripathi, 2020; Tripathi & Dubey, 2022).

$$F_i^{\vec{}} = m \frac{d^2 x_i^{\vec{}}(t)}{dt^2}$$

Las simulaciones de dinámica molecular de proteínas y sus complejos representan una herramienta eficaz para describir a nivel atómico-molecular sistemas biológicos complejos y nos permite responder preguntas de investigación asociadas a estos sistemas. Esta herramienta computacional es un complemento idóneo a la parte experimental, con aplicaciones como el refinamiento de modelos estructurales, análisis de características de unión, mecanismos de catálisis enzimática, entre los más importantes (Ferina & Daggett, 2019; Hollingsworth & Dror, 2018).

1.4 Herramientas para el estudio de las interacciones proteína-proteína

Los procesos celulares dependen en gran medida de las interacciones de tipo proteína-proteína y de la subsecuente formación de complejos macromoleculares. La disminución o aumento de tales interacciones pueden conducir a la desregulación de las vías metabólicas o de señalización, lo que puede resultar en estados patológicos. Por lo tanto, es crucial obtener información detallada sobre la naturaleza de los conjuntos macromoleculares (Bertoni et al., 2017; Brinda & Vishveshwara, 2005).

Para el estudio de las interacciones proteicas existen diversos métodos, tanto experimentales como computacionales. Entre los métodos experimentales se encuentran las técnicas de coimmunoprecipitación, hibridación así como la Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia con Resolución Temporal (TR-FRET). Por la parte computacional se tienen herramientas como las simulaciones de dinámica molecular y los acoplamientos moleculares (docking) que permiten analizar a escala atómica las interacciones en complejos macromoleculares (Junker & Schreiber, 2011; Miernyk & Thelen, 2008).

1.4.1 Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular es una herramienta computacional muy útil para la predicción específica de las interacciones entre dos moléculas y la evaluación de su energía de unión. Dependiendo de los grados de libertad, se tienen tres principales tipos de acoplamiento entre los que se encuentra el acoplamiento rígido (donde ambas moléculas se mantienen rígidas), acoplamiento semiflexible (en el cual una sola molecular cuenta con flexibilidad) y acoplamiento flexible (donde ambas moléculas presentan flexibilidad). A su vez dependiendo del conocimiento previo que se tenga de los posibles sitios de unión se pueden tener acoplamientos ciegos que exploran una mayor cantidad de posibles sitios de unión o acoplamientos dirigidos en los cuales el área explorada se encuentra delimitada basada en el conocimiento previo estructural de un sitio de unión específico. Finalmente, dependiendo de la naturaleza de las dos moléculas de interés, podemos clasificar el acoplamiento en ligante-proteína o proteína-proteína (Morris & Lim-Wilby, 2008; D. B. Singh & Tripathi, 2020; Tripathi & Dubey, 2022; Vakser, 2014).

Considerando seis grados de libertad traslacional y rotacional, así como los grados de libertad conformacionales de dos moléculas, el número de posibles modos de unión entre dos moléculas es muy grande. Por tanto, se han desarrollado diversos algoritmos de muestreo que permiten... tales como algoritmos de emparejamiento, de construcción incremental, Montecarlo, algoritmos genéticos o la inclusión de simulaciones de dinámica molecular al acoplamiento. A cada una de las poses o modos de interacción se les asigna una función de puntuación que se encuentra relacionada con la afinidad y el favorecimiento energético en la interacción. Estas funciones de puntuación pueden dividirse en funciones basadas en campos de fuerza, funciones empíricas y funciones basadas en el conocimiento (Meng et al., 2011).

El acoplamiento molecular proteína-proteína busca predecir la estructura de complejos multiproteicos a partir de las estructuras de las proteínas individuales (Figura 10). El punto clave en el acoplamiento molecular proteína-proteína es el concepto de complementariedad estérica en la interfase proteína-proteína en donde factores como la hidrofobicidad, cargas electrostáticas e impedimentos estéricos deben considerarse para la obtención de un complejo apropiado (Vakser, 2014).

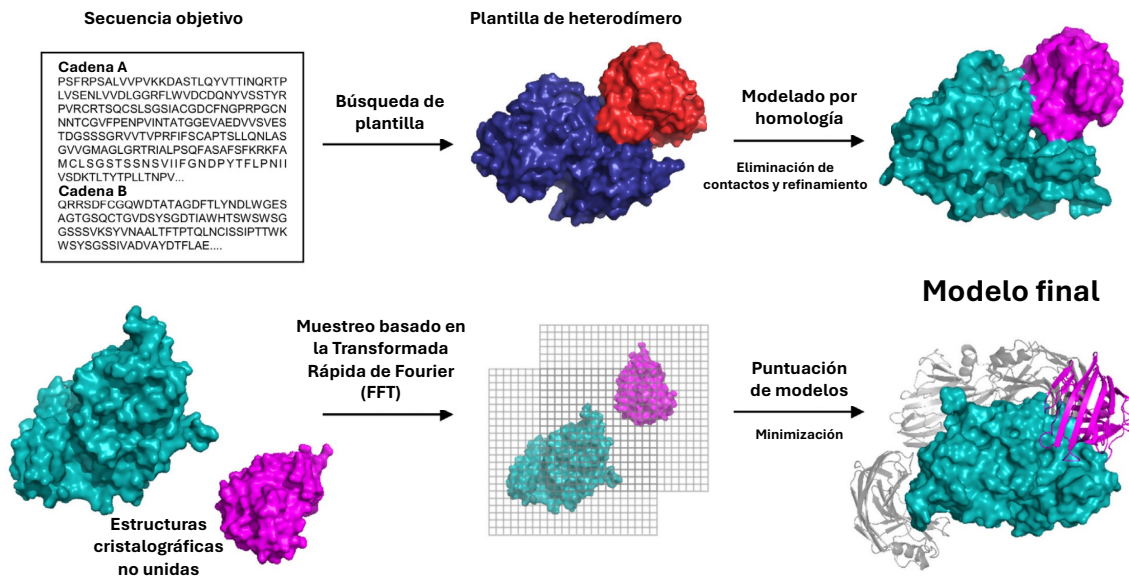


Figura 10. Esquema comparativo de procesamiento de un acoplamiento molecular proteína-proteína basado en plantilla y acoplamiento proteína-proteína libre para un heterodímero. Imagen tomada y modificada de (Porter et al., 2019).

La Evaluación Crítica de la Predicción de Interacciones (CAPRI por sus siglas en inglés) es una iniciativa internacional que analiza la capacidad de distintos métodos computacionales para predecir complejos proteína-proteína, basándose en estructuras multiméricas previamente resueltas. En la edición conjunta CASP15-CAPRI en 2022, se evaluaron 38 complejos (22 dímeros y 16 ensamblajes multicomponente) utilizando estructuras obtenidas mediante cristalografía de rayos X y Cryo-EM. En esta ronda, servidores como HADDOCK, ClusPro, pyDock, SwarmDock y LightDock destacaron por su precisión y consistencia al reproducir las conformaciones tridimensionales experimentales (CAPRI, 2022; Dominguez et al., 2003; Kozakov et al., 2017; Porter et al., 2019; Vajda & Kozakov, 2009). A su vez, se han incorporado herramientas basadas en inteligencia artificial y aprendizaje profundo tal como AlphaFold Multimer, que ha demostrado un rendimiento sobresaliente en la predicción de complejos proteína-proteína (Evans et al., 2021a; Omid et al., 2024).

1.5 Metalotioneína

Las metalotioneínas (MTs) son proteínas citosólicas de bajo peso molecular compuestas por aproximadamente 61 a 68 residuos de aminoácidos con un alto contenido de residuos de cisteína. Esta característica les confiere una gran capacidad redox y de coordinación con iones metálicos. Las cisteínas altamente conservadas en la estructura forman clústeres tiolato-metal y son, capaces de coordinar hasta siete metales en su estructura incluyendo iones de zinc, cadmio, cobre y mercurio (Dziegiel et al., 2016; Yang et al., 2024).

En los mamíferos existen cuatro isoformas de las metalotioneínas (MT-1, MT-2, MT-3 y MT-4). Las isoformas MT-1 y MT-2 se encuentran presentes y distribuidas en todos los órganos, mientras que MT-3 y MT-4 se encuentran principalmente en tejido especializado como sistema nervioso central y epitelio estratificado, respectivamente (Dziegiel et al., 2016; Thirumoorthy et al., 2011; Vašák, 2005).

MT participa en múltiples procesos fisiológicos y moleculares, incluyendo procesos de regulación y metabolismo de metales, control del estrés celular e inflamación (actuando como una proteína de fase aguda y regulando el estrés oxidativo con su alta capacidad redox), regulación de la neurogénesis, neurodegeneración y tumorigénesis (Coyle et al., 2002; Dziegiel et al., 2016; Gruys et al., 2005; Thirumoorthy et al., 2011; Vašák, 2005; Yang et al., 2024).

En condiciones fisiológicas normales, la MT existe en un equilibrio dinámico entre tres estados redox (Figura 11): una forma oxidada con la presencia de puentes disulfuro conocida como tionina, una forma reducida conocida como tioneína (T) y la forma unidad a metal, metalotioneína (MT). (Krężel & Maret, 2007a, 2021; Maret, 2011; Maret & Krężel, 2007).

Se ha demostrado que la MT es inducible por diversos agentes tales como metales pesados, esteroides, citocinas, factores de crecimiento, radicales libres de oxígeno (ROS) y radicales libres nítricos (RNS). En la región promotora de los genes MT-1 y MT-2 se han identificado múltiples elementos de respuesta, incluyendo a metales (ERM), glucocorticoides (ERG) y antioxidantes (ERA). Entre los diversos inductores que activan estos elementos, los iones metálicos —especialmente el zinc— destacan como los más potentes estimuladores de la expresión génica de MT-1 y MT-2. Estos iones metálicos se unen al factor de transcripción regulador de metales 1 (MTF-1), que interactúa con el ADN a través de sus seis dominios C_2H_2 de dedos de zinc con la secuencia de los ERM en las regiones promotoras de los genes MT-1/2 (Andrews, 2000; Dziegiel et al., 2016; Ruttkay-Nedecky et al., 2013).

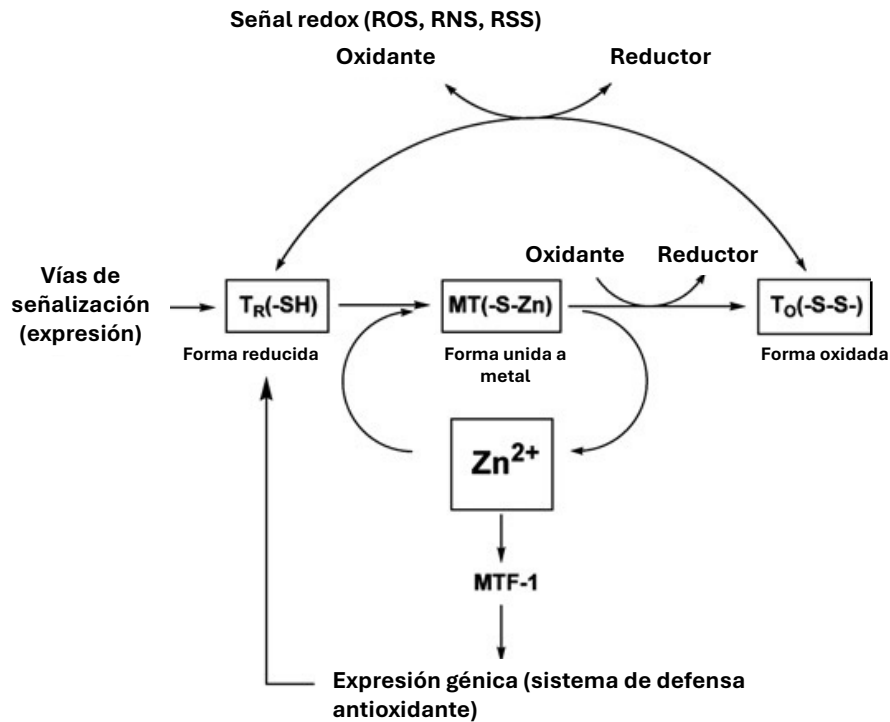


Figura 11. Mecanismos de regulación del ciclo redox entre tiorina, tioneína y metalotioneína. Imagen tomada y modificada de (Krężel et al., 2007)

La estructura tridimensional de la MT presenta dos dominios estructurales: un dominio β en el extremo N-terminal y un dominio α en el extremo C-terminal. El dominio β contiene 9 residuos de cisteína capaces de formar clústeres tiolato-metal que coordinan 3 iones metálicos, mientras que el dominio α presenta 11 residuos de cisteína capaces de coordinar hasta 4 iones metálicos (Figura 12). La geometría de coordinación en todos los centros metálicos, en ambos dominios es aproximadamente tetraédrica (Krężel & Maret, 2021; Mehlenbacher et al., 2022; A. K. Singh et al., 2023).

Aunque existe información relacionada con la estructura tridimensional de metalotioneína (MT) resuelta por métodos como cristalografía de rayos X y RMN (Arseniev et al., 1988; Messerle et al., 1990; Otvos & Armitage, 1980; Robbins et al., 1991; H. Wang et al., 2006), actualmente no existe información estructural experimental de la estructura en ausencia de metales.

Si bien la forma metalada (MT) predomina en condiciones fisiológicas, y se ha descrito una reserva dinámica de especies parcialmente metaladas (siendo Zn₅MT y Zn₆MT las formas dominantes), en ciertos contextos fisiopatológicos la expresión de la forma libre de metal, T, aumenta significativamente (Aburto-Luna et al., 2017a; Brambila et al., 1999; Carpenè et al., 2007; Dai et al., 2021; Krężel & Maret, 2007b; Ruttkay-Nedecky et al., 2013). Aunque T se coordina típicamente poco después de su síntesis en condiciones fisiológicas (transicionando

a MT), evidencia reciente sugiere que T puede adquirir relevancia funcional durante procesos inflamatorios agudos, desequilibrios en la biodisponibilidad de metal y respuestas al estrés oxidativo. En tales contextos, la síntesis “*de novo*” de T como proteína de fase aguda puede superar la disponibilidad inmediata de iones metálicos, resultando en una reserva transitoria de T biodisponible. Se ha demostrado que esta forma actúa como un regulador del estado redox, capaz de eliminar especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante la oxidación de sus residuos de cisteína y modulando dinámicamente los niveles intracelulares de zinc. Además, T puede participar en vías de señalización relacionadas con la activación inmune y la apoptosis, particularmente en tejidos expuestos a lipopolisacárido (LPS), TNF- α o IL-6 (Aburto-Luna et al., 2017b; Dai et al., 2021; Ruttkay-Nedecky et al., 2013). A su vez, resultados previos han mostrado que T puede encontrarse en la célula en cantidades importantes, lo que parece ser un indicativo de la importancia que puede tener esta isoforma carente de la unión a metales, en los procesos fisiológicos de la célula (Carpenè et al., 2007; Krężel & Maret, 2007b).

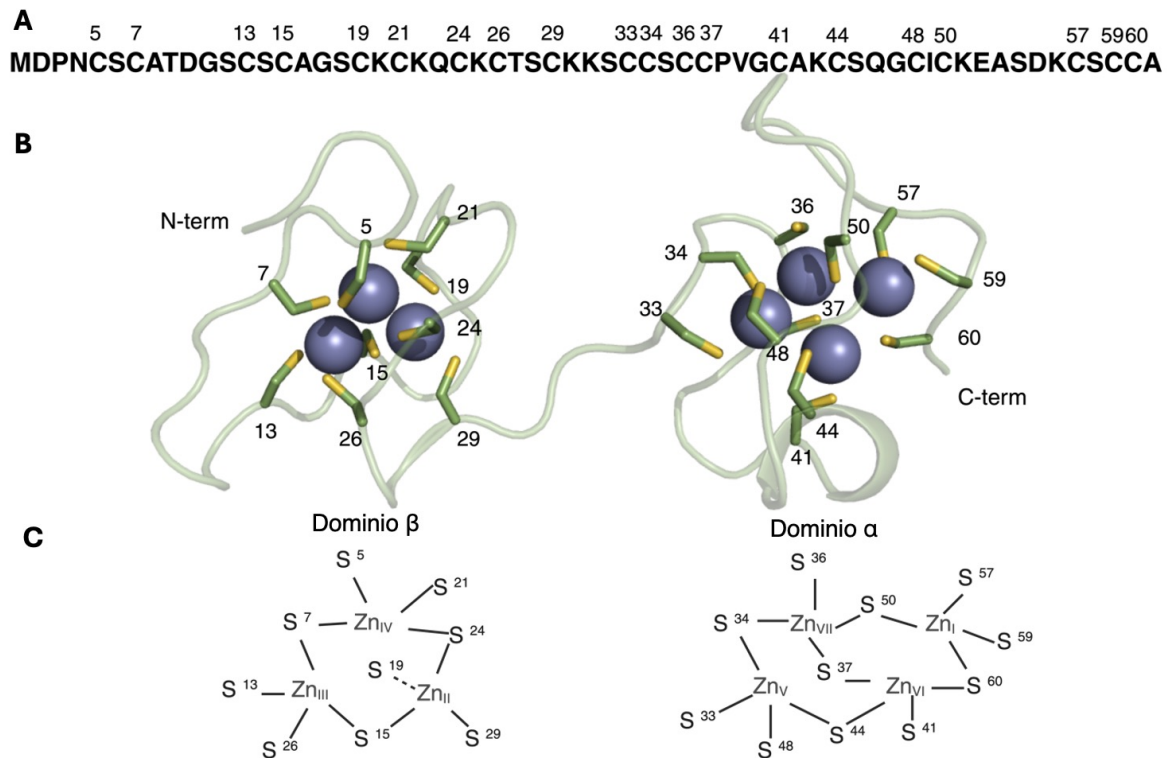


Figura 12. A. Secuencia de MT-2, en donde se identifican los 20 residuos de cisteína presente en la estructura. B. Estructura tridimensional de MT-2. C. Estructura de clústeres tiolato-metal en los dominios β y α de MT-2.

Tanto MT como T tienen la capacidad de interactuar con diversas proteínas como parte de su mecanismo de señalización celular, entre las cuales se encuentran reportadas interacciones de MT-1 y MT-2 en riñón con las proteínas megalina y transtiretina. En sistema nervioso central (SNC) MT-3 parece tener un papel relevante modulando la cantidad de metales así como interactuando y regulando a proteínas de agregamiento tales como el péptido A β , α -sinucleína y proteínas priónicas. MT puede interactuar también con enzimas y factores de transcripción dependientes de zinc (tales como p53, NF-kB y PKC μ) activándolos o desactivándolos, de tal manera que funciona como un regulador de la expresión génica. A su vez también se tienen documentadas interacciones de MT con ferritina y albúmina, lo que demuestra la amplia capacidad de la proteína de interactuar con múltiples proteínas en diversos contextos fisiológicos (Atrian & Capdevila, 2013; Yang et al., 2024; Zalewska et al., 2014).

Por otro lado se ha reportado que T puede regular indirectamente la actividad de factores de transcripción como TFIIA, Zn-Sp1 y p53 al competir por la biodisponibilidad del zinc. Sin embargo estudios previos han demostrado que T también puede actuar de manera directa y selectiva, al encontrarse que esta forma libre de metal puede inhibir selectivamente a p53, contrario a la forma metalada (MT-1) que no ejerce dicha inhibición (Ostrakhovitch et al., 2006).

Por lo tanto, es de especial interés analizar cómo la presencia o ausencia de metales en la metalotioneína contribuye a modular las diferentes conformaciones de MT y T y determinar si dichas conformaciones modifican la interacción de MT y T con la función de otras proteínas.

1.6 Ribonucleasa A

Las ribonucleasas constituyen un amplio grupo de enzimas que hidrolizan diferentes tipos de ARN a través del 2',3'-CMP cíclico para formar oligo o mononucleótidos con intermediarios con grupos 3'-fosfato terminal (Cuchillo et al., 2011; Nicholson, 2011; Shigematsu et al., 2018). Una célula contiene una gran cantidad de ribonucleasas distintas, que se acercan a 20 diferentes miembros que actúan sobre diferentes sustratos de ARN, por lo que establecer una clasificación única y adecuada no resulta sencillo. Existen criterios para clasificar a las ribonucleasas que consideran el tipo de ARN que hidrolizan, su estructura, el pH óptimo al que funcionan o si catalizan su reacción enzimática en ambiente intracelular o si son liberadas al exterior de la célula para que lleven a cabo su proceso catalítico (ribonucleasas secretoras) (Gotte & Menegazzi, 2019; Nicholson, 2011).

Dentro de las ribonucleasas secretoras y alcalinas (con un pH óptimo entre 7-8) se encuentra la ribonucleasa pancreática bovina de tipo A (RNasa A), una proteína de 124 residuos, considerada la ribonucleasa más estudiada de los siglos XX y XXI, ya que el estudio

Figura 13. **A.** Secuencia de RNasa A, en donde se identifican los residuos catalíticos en la secuencia aminoacídica. **B.** Estructura tridimensional de RNasa A, en donde se observan las 3 hélices así como la estructura de tipo β plegada.

La RNasa A posee un inhibidor fisiológico de ribonucleasa (conocido como IR, por sus siglas en inglés) con alta afinidad (posee una constante de disociación K_d en el rango de pico- a femtomolar), que inhibe fuertemente su función catalítica. Sin embargo, la ribonucleasa A puede mantener su actividad mediante la fosforilación en algunos residuos Ser/Thr cruciales para la unión del IR o mediante oligomerización, formando oligómeros catalíticamente activos mediante un mecanismo de intercambio de dominios (Geiger et al., 2011; Libonati & Gotte, 2004, 2004; Mascarenhas & Gosavi, 2017; Rutkoski & Raines, 2008; Yakovlev et al., 2006).

La RNasa A desempeña múltiples funciones críticas en diversos procesos biológicos, que incluyen actividades antivirales, antibacterianas y antifúngicas como parte de la actividad inmune innata. Además, participa en procesos de regulación de neurotoxicidad, inmunomodulación, proliferación celular, apoptosis y en la regulación del metabolismo intra y extracelular del ARN (Sun et al., 2022a).

Estudios previos mostraron que, en situaciones de trauma quirúrgico, se observa una disminución de la actividad de ribonucleasa que parece ser una consecuencia de un mecanismo de inhibición de la síntesis *de novo* de un inhibidor de ribonucleasa no identificado. (Brambila et al., 2001).

II. HIPÓTESIS

Los cambios conformacionales que se presentan en el homodímero de MT-2 en ausencia de metales coordinados (transición metalotioneína-tioneína) constituyen cambios estructurales significativos que permiten que haya una interacción selectiva y específica con ribonucleasa A, inhibiendo así su actividad enzimática. A través de métodos computacionales, particularmente simulaciones atomísticas de dinámica molecular, se pueden caracterizar los cambios conformacionales de MT-2 así como caracterizar las interacciones con ribonucleasa A que promueven su inhibición.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- Generar un modelo tridimensional representativo del heterotrímero de ribonucleasa A-metalotioneína 2 y mediante simulaciones de dinámica molecular, analizar la estabilidad del complejo formado, así como predecir un mecanismo de interacción que nos permita complementar la información experimental no estructural obtenida.

3.2 Objetivos específicos

- Generar modelos tridimensionales de metalotioneína 2 en su forma *apo* y en su forma *holo* (coordinada a metales) y realizar simulaciones de dinámica molecular de los modelos generados.
- Analizar las características estructurales de metalotioneína 2 en su forma *apo* y en su forma *holo*.
- Generar una estructura inicial del complejo ribonucleasa A-metalotioneína 2 para evaluar su estabilidad mediante simulaciones de dinámica.
- Analizar los detalles de la interacción entre ribonucleasa A-metalotioneína 2 para poder establecer un mecanismo de interacción proteína-proteína.
- Complementar la información experimental no estructural obtenida para el entendimiento de los mecanismos fisiológicos y las vías de señalización de metalotioneína 2 y ribonucleasa A.

IV. METODOLOGÍA

4.1 Preparación de los sistemas MT/T y RNasa A para simulaciones de dinámica molecular

La estructura de MT-2 se obtuvo del PDB ID: **4MT2** (Braun et al., 1992) que corresponde a una estructura dimérica de ratón (*rattus rattus*) resuelta por cristalografía de rayos X. Esta estructura fue resuelta con 5 iones de cadmio (Cd^{2+}) y 2 iones de zinc (Zn^{2+}) en cada cadena. Para la preparación del sistema de la forma de MT se reemplazaron los 5 iones de Cd por 5 iones de Zn en ambas cadenas para replicar las condiciones experimentales de la forma saturada con Zn (Figura 14).

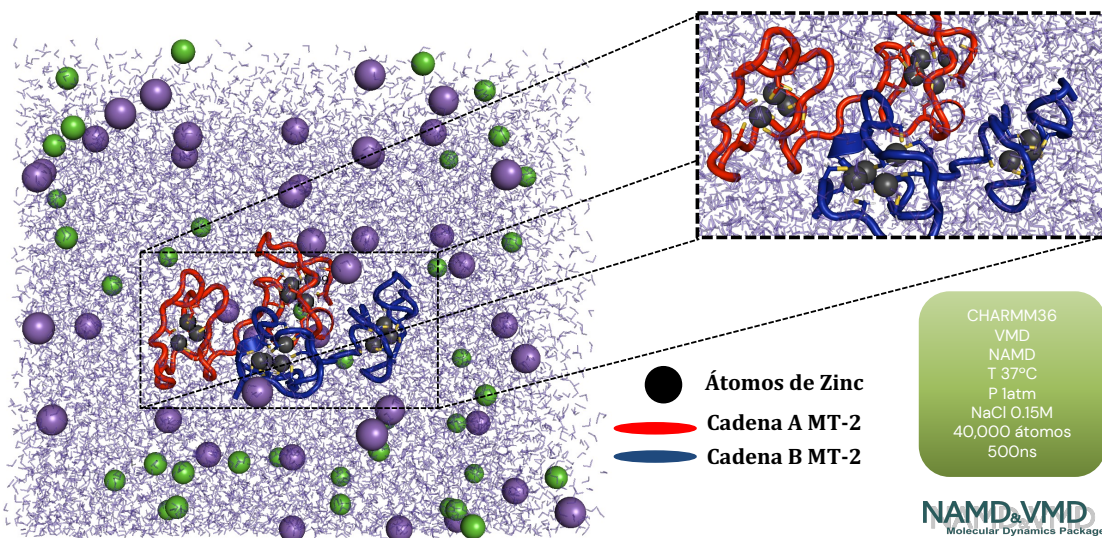


Figura 14. Preparación del sistema homodimérico de MT saturado con iones de Zn, solvatado e ionizado a una concentración 0.15M de NaCl.

Para la preparación de la estructura inicial en ausencia de metales, T, se partió de la misma forma de la estructura PDB ID: **4MT2** (Braun et al., 1992), sin embargo para este sistema, se eliminaron todos los átomos metálicos (Figura 15).

La cadena lateral de los residuos de cisteína en su forma T, se trató como tiol (forma reducida) mientras que los residuos de cisteína en su forma MT se trataron como tiolatos (forma aniónica), esto acorde al ciclo redox de MT/T. (Krężel & Maret, 2007b; Maret, 2011; Maret & Krężel, 2007; Mehlenbacher et al., 2022).

Los estados de protonación del resto de residuos seleccionado fue el estado de protonación estándar más probable a un pH neutro. Ambos sistemas se solvataron e ionizaron con un modelo de agua TIP3 utilizando una concentración salina de NaCl de

0.15 M. Los sistemas biomoleculares se prepararon con el software VMD. (Humphrey et al., 1996).

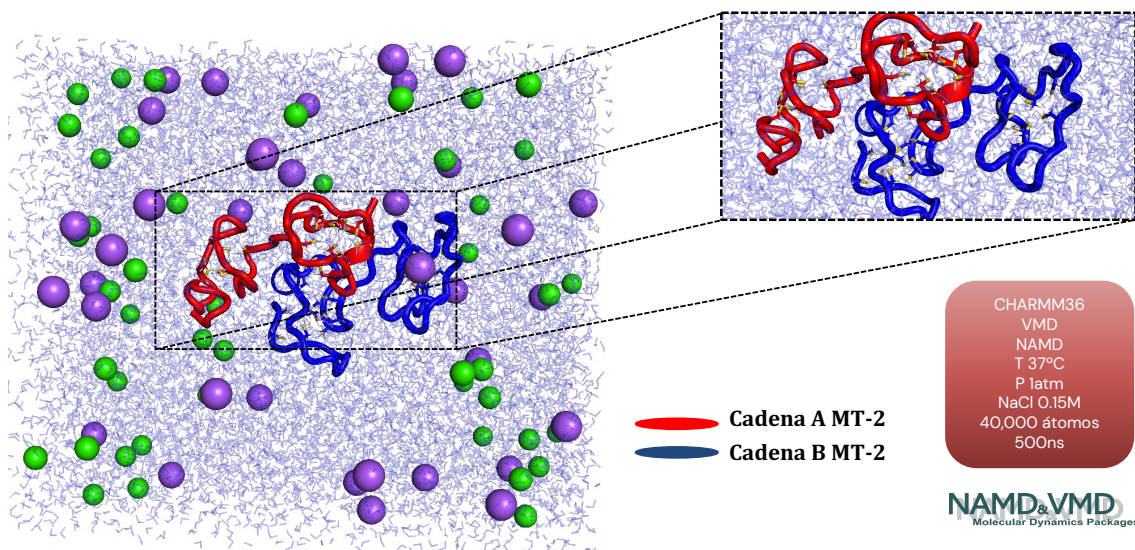


Figura 15. Preparación del sistema homodimérico de T en ausencia de metales, solvatado e ionizado a una concentración 0.15 M de NaCl.

4.2 Simulaciones de dinámica molecular de los sistemas MT/T

Se realizaron simulaciones atomísticas de dinámica molecular para los sistemas diméricos en las dos formas T y MT. Para ello se realizaron pasos de preparación del sistema (predinámica) donde, además de minimizar al sistema para evitar posiciones de los átomos con energías muy altas (utilizando el algoritmo de gradiente conjugado), se imponen fuerzas externas de tipo armónicas en diversos tipos de átomos con la finalidad de equilibrar el sistema de una manera más paulatina que evite conformaciones ficticias. Posterior a los pasos de preparación se realizaron las simulaciones de dinámica molecular de ambos sistemas (Figura 16) T y MT, durante un tiempo de 500 ns utilizando el programa NAMD (Phillips et al., 2020a) y el campo de fuerza CHARMM36 (Huang et al., 2017; Huang & MacKerell, 2013). Éste último es un campo de fuerza clásico comúnmente utilizando en el estudio de sistemas biomoleculares, especialmente proteínas. Las condiciones utilizadas para simular un entorno fisiológico en los sistemas fueron una temperatura y presión constantes de 310.15 K y 1 atm, respectivamente (condiciones de termóstato y baróstato). Las fases de producción de las simulaciones fueron realizadas sin la introducción de ninguna fuerza externa (sin sesgo) con un tiempo de paso de 2.0 fs.

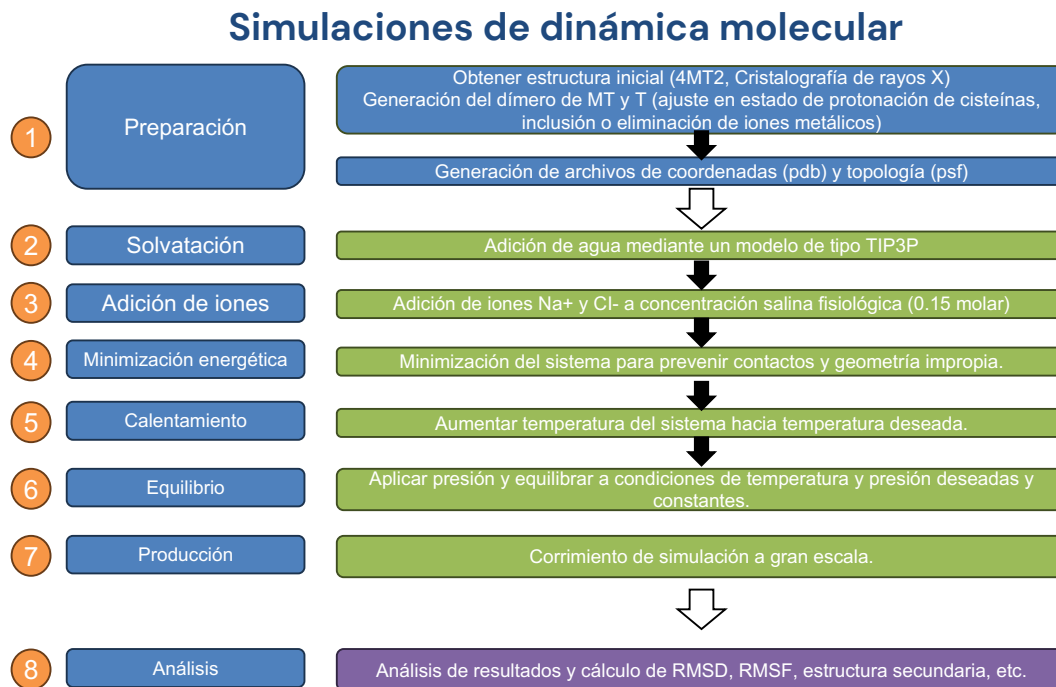


Figura 16. Pasos de la simulación de dinámica molecular

4.3 Acoplamiento molecular RNasa A-T

La estructura de RNasa A se obtuvo del PDB ID: **1FS3** que corresponde a una estructura bovina obtenida por cristalografía de rayos X (*bos taurus*).

Se obtuvo una estructura representativa de la forma T a partir de la trayectoria a los 300 ns de simulación (basada en la estabilidad estructural observada, particularmente los valores de RMSD). Para obtener un modo de interacción T-RNasa A se desarrolló un esquema de acoplamiento molecular proteína-proteína por consenso. Para ello se utilizaron los software y servidores web HADDOCK (Dominguez et al., 2003; Van Zundert et al., 2016), Cluspro (Desta et al., 2020; Kozakov et al., 2017), HawkDock (Weng et al., 2019) y AlphaFold Multimer (Evans et al., 2021b; Mirdita et al., 2022) en el esquema de acoplamiento molecular por consenso. La mejor pose obtenida fue correlacionada con la información experimental estructural conocida del complejo RNasa A con RI (PDB ID: **1Z7X** (Johnson et al., 2007) y **1DFJ** (Kobe & Deisenhofer, 1995)).

4.4 Preparación del sistema RNasa A-T y simulación de MD

El complejo heterotrimérico del dímero de T con RNasa A monomérica se preparó en las mismas condiciones fisiológicas que los sistemas MT y T. Para evaluar la estabilidad del complejo proteico T-RNasa A y los residuos involucrados en las interacciones proteína-proteína, se realizaron simulaciones atómicas de dinámica molecular sin sesgo durante 1.0 μ s utilizando las mismas condiciones que en los sistemas MT y T diméricos (Figura 17).

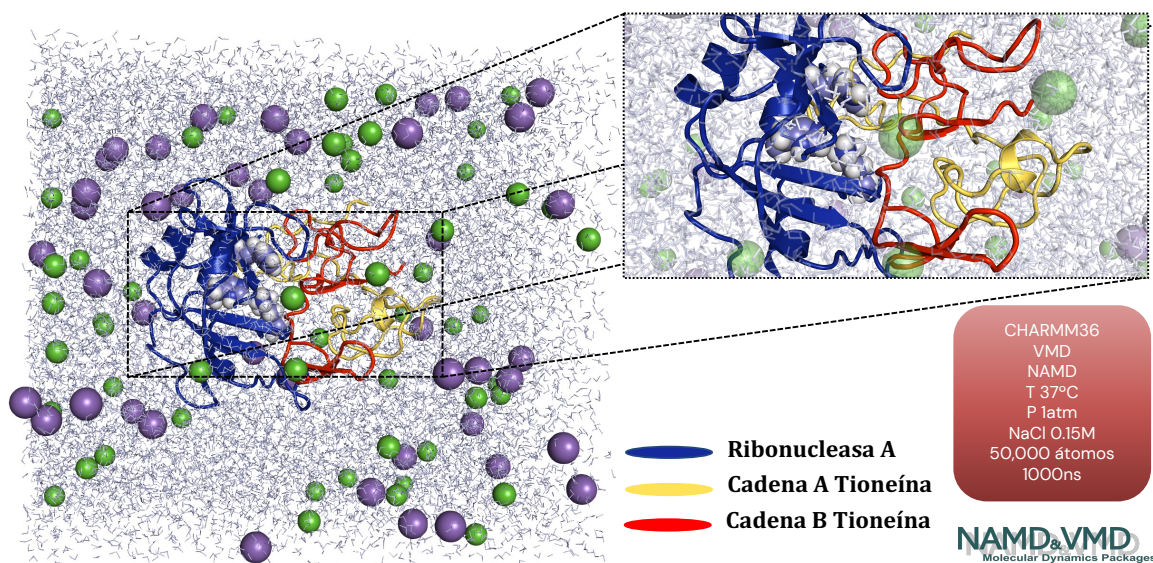


Figura 17. Preparación del sistema heterotrimérico de T-RNasa A, solvatado e ionizado a una concentración 0.15 M de NaCl.

4.5 Análisis de datos

Se analizaron las trayectorias de cada átomo del sistema a lo largo del tiempo de simulación (500 ns para los sistemas MT/T y 1000 ns para el sistema T-RNasa A) utilizando parámetros estructurales y energéticos que incluyeron el análisis de la desviación de la raíz cuadrática media (RMSD), análisis de estructura secundaria, fluctuación de la raíz cuadrática media (RMSF), análisis de la energía de interacción, análisis del área superficial accesible al solvente (SASA) y no accesible al solvente (SES). Posteriormente se analizaron de manera individual y exhaustiva las interacciones individuales en el complejo obtenidas durante la simulación de dinámica molecular.

V. RESULTADOS

Para investigar los cambios conformacionales importantes de las dos formas de MT/T, es decir, enlazada a metales y en ausencia de metales, respectivamente, así como sus implicaciones en la interacción selectiva con otras proteínas, se construyó un dímero de cada forma, en un ambiente fisiológico; los sistemas proteicos fueron caracterizados mediante la técnica computacional de simulaciones de dinámica molecular. Dado que ambas simulaciones de dinámica molecular comenzaron a partir de la misma estructura cristalográfica de rayos X (PDB ID: **4MT2**), los cambios conformacionales en la proteína se presentan como consecuencia de la presencia o ausencia de los iones metálicos de Zn^{2+} en la estructura. Con esto en mente, se evaluaron parámetros estructurales como el RMSD y el análisis de estructura secundaria de ambos sistemas. Los resultados muestran cambios conformacionales importantes entre ambos sistemas. Los resultados se describen a continuación:

5.1 Modelado computacional de las conformaciones MT/T

5.1.1 RMSD y Estructura secundaria de MT/T

En el análisis de RMSD, identificamos que ambos sistemas diméricos (MT y T) alcanzaron una estabilización estructural aproximadamente a los 150 ns para ambas cadenas. Acorde a lo esperado, la estructura de MT con enlaces coordinados metálicos tetrahédricos mostró una menor divergencia estructural en relación con la conformación inicial, la cual fue resuelta en condiciones equivalentes de coordinación de metales.

En el caso del sistema MT, el análisis de RMSD de cada una de las cadenas mostró un patrón similar de estabilidad estructural, alcanzando una meseta con valores de RMSD inferiores a 10 Å, en relación con la estructura inicial, esto para ambas cadenas (Figura 18-B).

La estructura disponible del dímero de MT (4MT2) no presenta estructuras de tipo β plegada y presenta un segmento α helicoidal alrededor de los residuos 42-45. El análisis de la estructura secundaria de MT reveló que los segmentos con estructura secundaria definida en el sistema inicial permanecen estables durante el tiempo de simulación (Figura 18-C).

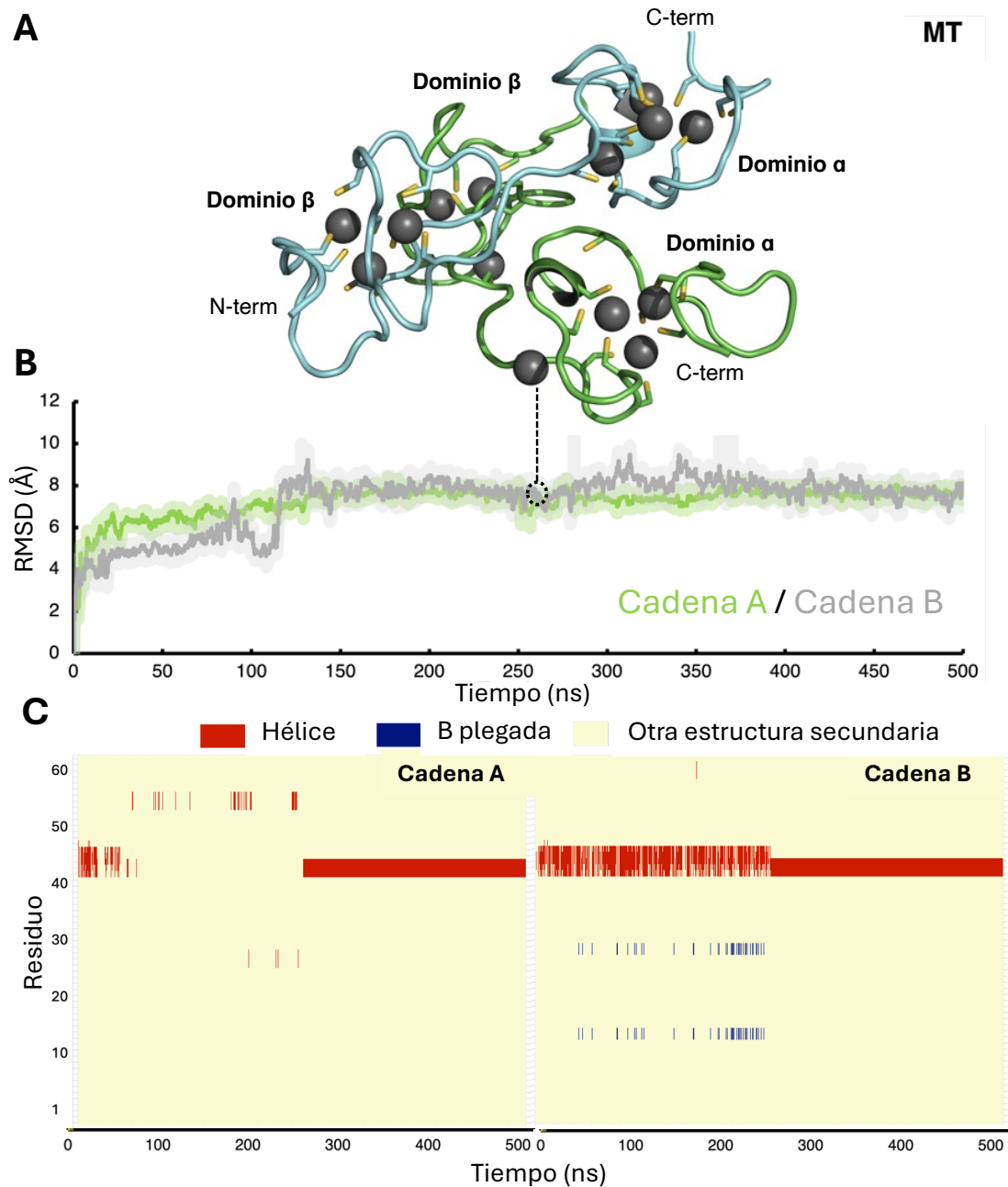


Figura 18. A. Cambios estructurales de la estructura de MT. La estructura de MT homodimérica a 260 ns de la simulación MD se muestra con la cadena A en verde, la cadena B en cian y los iones Zn representados como esferas grises. B. Análisis RMSD de las cadenas A y B de la estructura de MT dimérica. La cadena A se muestra en verde y la cadena B en gris. C. Análisis de la estructura secundaria de todos los residuos de MT, donde la cadena A se muestra en el panel izquierdo y la cadena B en el panel derecho. Las estructuras secundarias fueron asignadas por el programa STRIDE instalado en VMD (Humphrey et al., 1996). El contenido helicoidal se presenta en rojo, las β plegadas en azul y otras estructuras secundarias (como bucles y giros) en amarillo.

En la cadena A, el segmento helicoidal en el dominio β fluctuó entre conformaciones helicoidales y no estructuradas alrededor de la primera mitad de la trayectoria (~0 a 240 ns), antes de alcanzar conformaciones helicoidales estables para el resto de la simulación (240 a 500 ns). Se observó un comportamiento similar en el caso de la cadena B, aunque en este caso, no se observó pérdida temporal del contenido helicoidal (Ver Figura 18). Durante toda la simulación, todos los iones Zn^{2+} permanecieron coordinados en la estructura homodimérica de MT, lo que resalta tanto la importancia de los iones metálicos a la estabilidad estructural de MT como la capacidad del campo de fuerza y la técnica computacional utilizados para describir las características funcionales y estructurales del sistema proteico.

En comparación con la estructura cristalográfica de 4MT2 resuelta experimentalmente por cristalografía de rayos X, la estructura final de los sistemas MT en condiciones fisiológicas de simulación de dinámica molecular presentó una ligera rotación de aproximadamente 80° de un monómero con respecto a la orientación del otro, lo que provocó que el valor total de RMSD de ambas cadenas en el homodímero sea ligeramente superior al de las cadenas individuales (Figura 19).

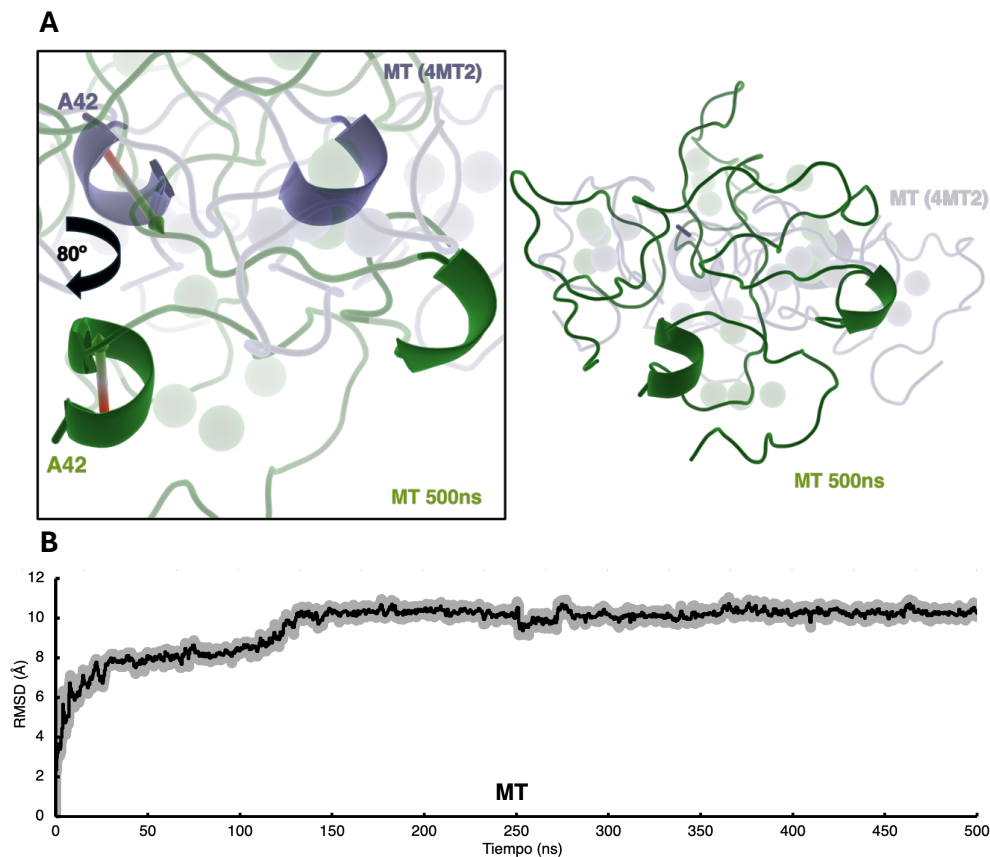


Figura 19. A. Alineación estructural de la estructura de rayos X 4MT2 y una estructura representativa del dímico de MT2 de la simulación de dinámica molecular. 4MT2 se muestra en púrpura y la estructura de MT de la simulación (a 500 ns) se muestra en verde. A la izquierda, el recuadro muestra un residuo

representativo (Ala42) del segmento alfa-helicoidal corto de la estructura de MT2 (alrededor de los residuos 42 a 45) y su rotación en la simulación. La estructura de ambos monómeros permanece estable, con una rotación de aproximadamente 80° de una cadena con respecto a la otra. **B.** RMSD global de la estructura de MT

En el caso del sistema de la forma T, en el análisis de RMSD se identificó que en relación con la estructura inicial tanto la cadena A como la B, presentan valores que fluctúan mayormente con respecto a la estructura *holo*. De manera particular, la cadena B presentó mayores cambios conformacionales con valores de RMSD superiores a 10 Å. La cadena A muestra cambios conformacionales globales más estables (Figura 20-B).

El análisis de la estructura secundaria del sistema T mostró un número significativo de cambios estructurales, como la formación de β plegadas estables en los dominios α y β de la cadena B (Figura 20-C). Asimismo, se forman estructuras helicoidales en la primera mitad de la simulación en el dominio β de la cadena B. En cuanto a la cadena A, se forma un segmento helicoidal alrededor de los residuos 42 a 45, de forma similar a lo observado en el sistema con metales enlazados, MT. Por lo tanto, identificamos que T, en ausencia de cationes divalentes, podría adoptar conformaciones estables en un contexto fisiológico, aunque con una mayor diversidad estructural, que difieren de la estructura conocida de la forma con metal, MT.

Estos resultados concuerdan con análisis computacionales previos realizados sobre la desmetalización de MT-1 unida a Cd, que sugirieron que la proteína libre de metal es estructuralmente estable, así como con el análisis experimental de transferencia de energía por resonancia de Förster (FRET), donde se observó que las dimensiones generales de la proteína no cambiaron significativamente entre el estado unido a y el libre de cationes metálicos. (Carpenè et al., 2007; Hong et al., 2005; Hong & Maret, 2003; Rigby Duncan & Stillman, 2006).

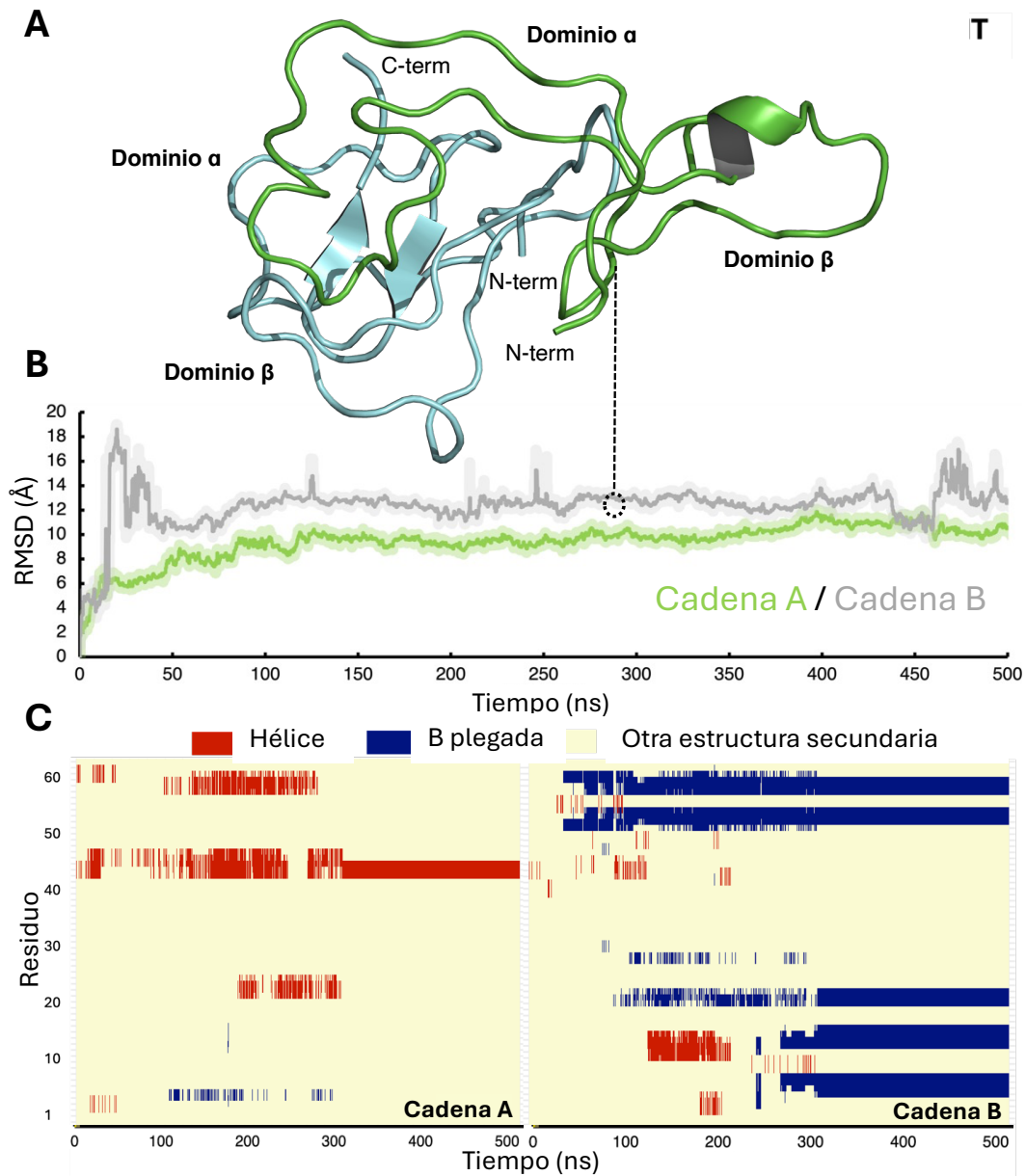


Figura 20. A. Estructura de T a 300 ns de simulación. La cadena A se representa en verde, la cadena B en cian. B. Análisis RMSD de las cadenas A y B de la estructura dimérica de T. La cadena A se muestra en verde y la cadena B en cian. C. Análisis de la estructura secundaria de todos los residuos de T, donde la cadena A se muestra en el panel izquierdo y la cadena B en el panel derecho. Las estructuras secundarias se identificaron mediante el programa STRIDE distribuido en VMD (Humphrey et al., 1996). Las hélices se representan en rojo, las β plegadas en azul y otras estructuras secundarias (como bucles y giros) en amarillo.

5.2 Modelado computacional de la interacción T-RNasa A

Para investigar el modo de interacción entre T y RNasa A se realizó un acoplamiento molecular proteína-proteína por consenso (Figura 21) utilizando una estructura representativa de la forma T obtenida a los 300 ns de la simulación, así como la estructura de RNasa A obtenida de la estructura cristalográfica de rayos X con código de acceso **1FS3**. La estabilidad del complejo formado se analizó mediante la técnica computacional de simulaciones de dinámica molecular. Se analizaron parámetros estructurales y energéticos que incluyeron el análisis RMSD, energía de interacción, estructura secundaria y RMSF de T así como SASA y SES de RNasa A. Posteriormente se analizaron de manera individual y detallada interacciones individuales en el complejo obtenidas durante la simulación de dinámica molecular. Los resultados se describen a continuación:

5.2.1 Acoplamiento molecular proteína-proteína

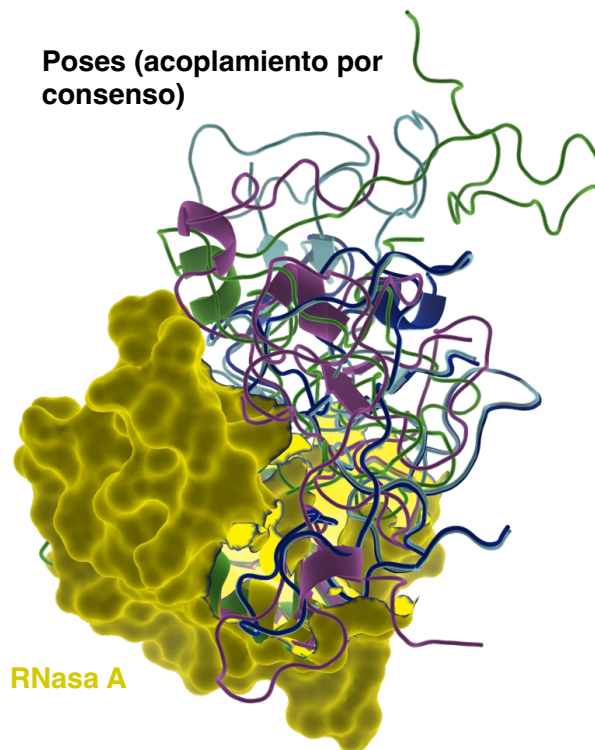


Figura 21. Estructuras representativas de las mejores poses obtenidas mediante el esquema de acoplamiento molecular proteína-proteína por consenso. Superposición de las posiciones de acoplamiento de las estructuras del homodímero T y RNasa A. RNasa A se representa como una superficie en amarillo, y todas las posiciones obtenidas de T se representan en diferentes colores orientadas hacia la alineación de RNasa A.

La estructura tridimensional del complejo RI-RNasa A se determinó en 1995 y la estructura tridimensional de la ribonucleasa humana (Ribonucleasa 1) con RI se determinó en 1997. A partir de la estructura obtenida del complejo RI-RNasa 1 fue posible identificar residuos (Arg39 y Arg91) que son responsables de su notable estabilidad al formar interacciones de tipo carga-carga (puentes salinos). (Johnson et al., 2007; Kobe & Deisenhofer, 1995, 1996).

Para identificar la mejor pose de acoplamiento molecular del complejo T-RNasa A, se correlacionó la mejor pose obtenida mediante el esquema de acoplamiento proteína-proteína por consenso con la información estructural y experimental previa sobre el RI en complejo con RNasa A y RNasa 1 (Figura 22). Se identificó que T se posiciona en una región similar a la utilizada por RI, que comprende interacciones con los residuos Arg39 y Lys91 (Arg91 de la RNasa 1 se reemplaza por Lys91 en la RNasa A, manteniendo sus características de residuo de aminoácido con carga positiva), los cuales son residuos fundamentales para la estabilidad del complejo con RI. Además, se identificó la presencia de interacciones entre T y los residuos catalíticos de RNasa A (Lys41, Thr45, His12 e His119). (Johnson et al., 2007).

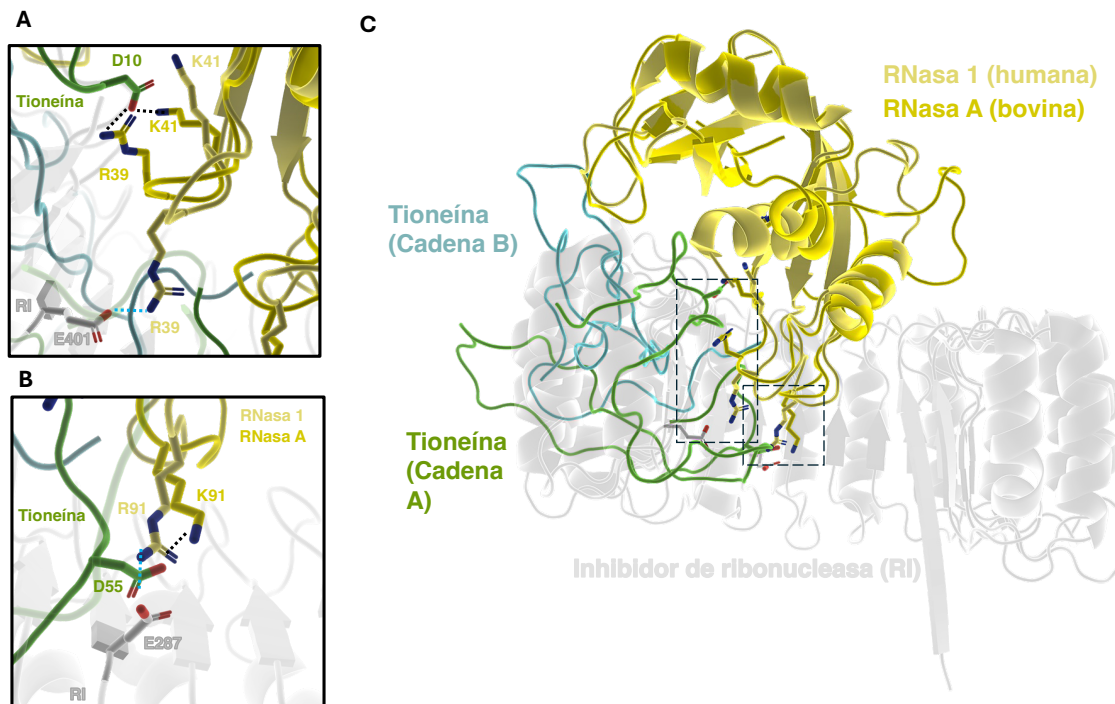


Figura 22. **A.** Interacción de Arg39 y Lys41 de RNasa A con Asp10 de T representada con líneas discontinuas de color negro. Se observa interacción equivalente de Arg39 y Arg41 de RNasa 1 con Glu287 de RI representada con líneas discontinuas de color azul. **B.** Interacción de Lys91 de RNasa A con Asp55 de T representada con líneas discontinuas de color negro. Se observa interacción equivalente de Arg91 de RNasa 1 con Glu287 de RI representada con líneas discontinuas de color azul. (Arg91 en RNasa 1 es reemplazada por Lys91 en RNasa A, manteniendo su cadena lateral con carga positiva). **C.**

Superposición de las estructuras del complejo RNasa 1-RI (código de acceso PDB 1Z7X) y una estructura representativa del complejo T-RNasa A obtenida de la simulación de dinámica molecular. Ambas estructuras de RNasa se presentan en amarillo, mientras que RI se presenta en gris y tioneína en verde y cian.

5.2.2 RMSD y energía de interacción del complejo T-RNasa A

Con base en el análisis de RMSD, se observó una conformación estable del complejo T-RNasa A. Se identificó que la estabilización estructural se alcanza aproximadamente a los 400 ns tanto para T como para RNasa A (Figura 23). Debido a su reconocida alta estabilidad, RNasa A mostró cambios estructurales relativamente menores ($< 4 \text{ \AA}$), mientras que la estructura homodimérica de T presenta conformaciones un poco más diversas. En particular, la cadena que inicialmente contribuye más a los valores de RMSD fue la cadena B, la cual estableció un menor número de contactos con RNasa A en la primera parte de la simulación. Sin embargo, de manera general, la interfase de T que interactúa con RNasa A se observa estable a lo largo de la trayectoria de la simulación.

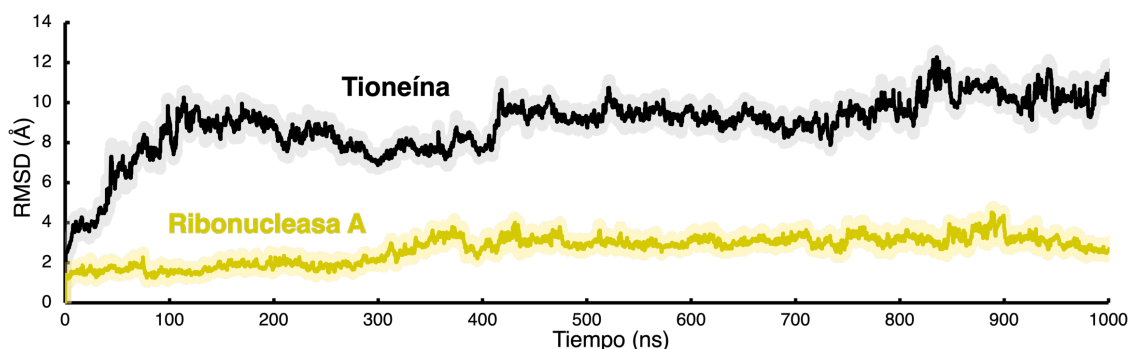


Figura 23. Análisis de RMSD. T se representa en negro mientras que RNasa A se representa en amarillo.

Para comprender si la energía de interacción en el complejo se ve favorecida a lo largo de la simulación, así como su naturaleza, se procedió a hacer un cálculo de análisis energético de interacción mediante la herramienta NAMD Energy (Phillips et al., 2020b). Como se muestra en la Figura 24, a medida que avanza la simulación, se observa una disminución hacia valores más negativos en la energía total de interacción por lo que la energía de interacción del complejo se ve favorecida. A su vez, se identificó que la energía electrostática contribuye principalmente a la estabilización del complejo proteico, con una contribución menor de la energía de van der Waals.

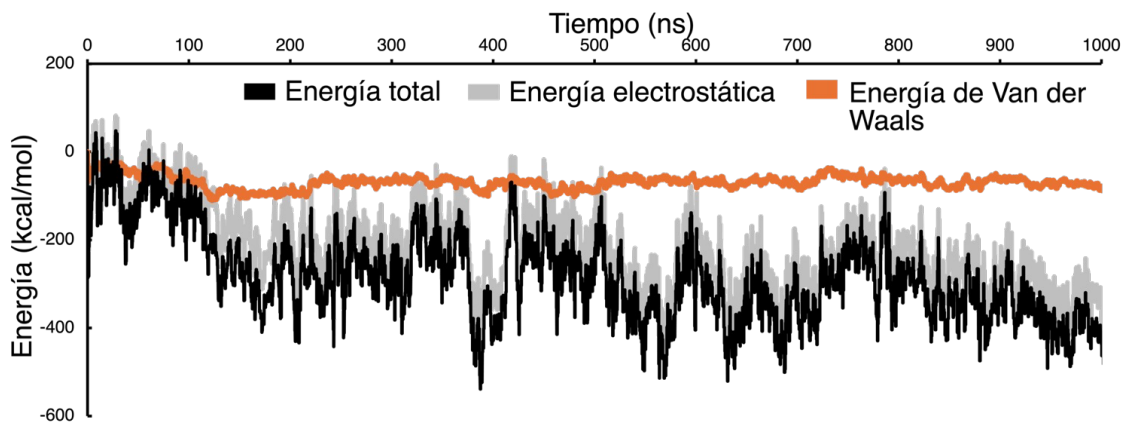


Figura 24. Análisis de energía de interacción entre T y RNasa A a lo largo de la simulación utilizando con NAMD Energy. La energía total está representada en negro, la energía electrostática en gris y la energía de Van der Waals en verde.

5.2.3 Estructura secundaria y RMSF de T

El análisis de la estructura secundaria de T en complejo con RNasa a lo largo de la simulación mostró que las estructuras de tipo β plegada en el dominio α de la cadena B que se formaron durante la simulación del dímero de T se mantuvieron durante su interacción con RNasa A (Figura 25). Sin embargo algunos segmentos del dominio β perdieron esta estructura de tipo β plegada. En el caso de la cadena A se observó la formación de nuevos segmentos de tipo β plegada así como la conservación de segmentos helicoidales.

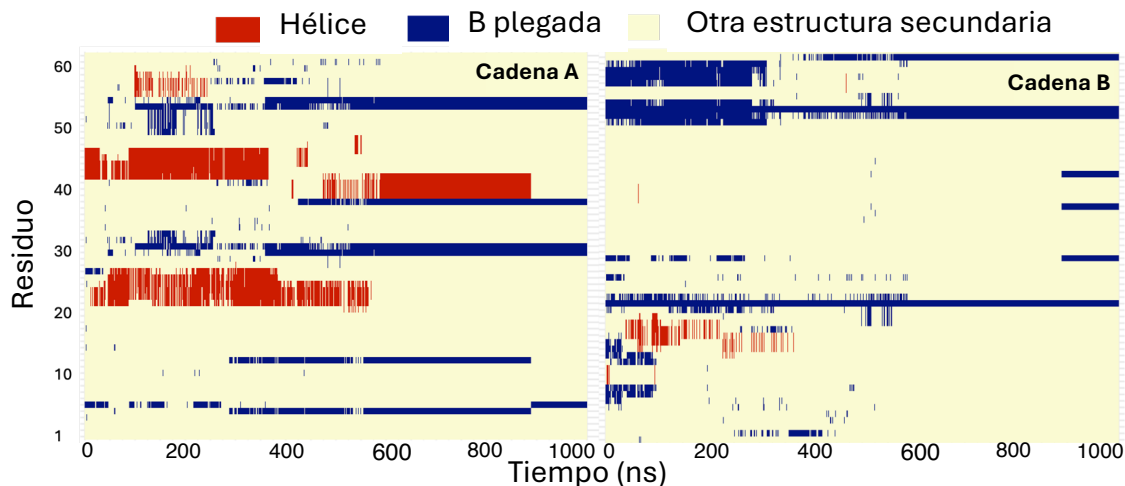


Figura 25. Análisis de la estructura secundaria de todos los residuos de T en complejo con RNasa A, donde la cadena A se muestra en el panel izquierdo y la cadena B en el panel derecho. Las estructuras secundarias fueron asignadas por el programa STRIDE distribuido en VMD (Humphrey et al., 1996). El contenido

helicoidal se presenta en rojo, las β plegadas en azul y otras estructuras secundarias (como bucles y giros) en amarillo.

Es sabido que la estructura de RNasa A presenta una forma de riñón con una hendidura que acomoda los residuos del sitio catalítico. Los dos lóbulos de la estructura de RNasa A están constituidos por bucles que flanquean el núcleo de la estructura de tipo β plegada que constituye la mayor parte de la estructura de la proteína. Durante la simulación del complejo, el primer lóbulo de la RNasa A, compuesto por dos asas: asa 1 (Leu35 a Val43) y asa 3 (Thr87 a Ala96), interactúa principalmente con la cadena A de T. Asimismo, el segmento de la cadena A de T (que comprende los residuos 55 a 60) y que forma contactos con el primer lóbulo de RNasa A, muestra una flexibilidad reducida, como lo indica el cálculo del RMSF (Ver Figura 26). El segundo lóbulo, formado principalmente por el asa 2 (Lys61 a Asn71), establece contacto con residuos de tioneína de la cadena B. El segmento de la cadena B de T (que comprende los residuos 31 a 37) que interactúa con el segundo lóbulo de RNasa A, también muestra una flexibilidad reducida de acuerdo con los valores de RMSF calculados. Finalmente, el análisis de RMSF de otros segmentos del homodímero de T muestra que los residuos presentes en la interfase proteína-proteína, como Asp10, Lys30 y Asp55, presentan fluctuaciones menores, mientras que los residuos en regiones que no interactúan con la RNasa A presentan fluctuaciones mayores, lo que destaca la estabilidad de la interfase formada por T y RNasa A (Figura 26).

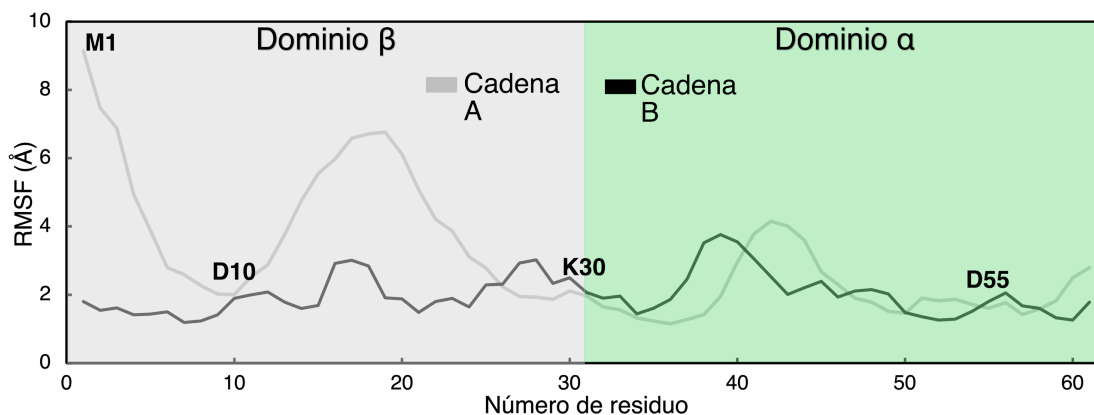


Figura 26. Análisis de RMSF de los dominios α y β de la cadena A y B del dímero de T en complejo con RNasa A. La cadena A está representada en gris y la cadena B en negro. Se muestra la posición de algunos residuos que forman interacciones importantes con RNasa A tales como Met1, Asp10, Lys30 y Asp55.

5.2.4 SASA y SES de RNasa A

Continuando con la caracterización de la estabilidad del complejo formado, se evaluó la interfase de la superficie proteína-proteína calculando valores de SASA y SES a lo largo de la simulación (Figura 27). El análisis de SASA en la estructura de RNasa A, sin considerar la presencia de T, indica valores estables a lo largo de la simulación (con un valor promedio de $8095.36 \pm 1.09 \text{ \AA}^2$). Para estimar la superficie de interacción proteína-proteína, se calculó la SES (es decir, el área superficial de RNasa A que se vuelve inaccesible al solvente debido a la interacción con T). Los valores de SES permanecen muy estables durante el tiempo de simulación (con un valor promedio de $1426.03 \pm 1.04 \text{ \AA}^2$).

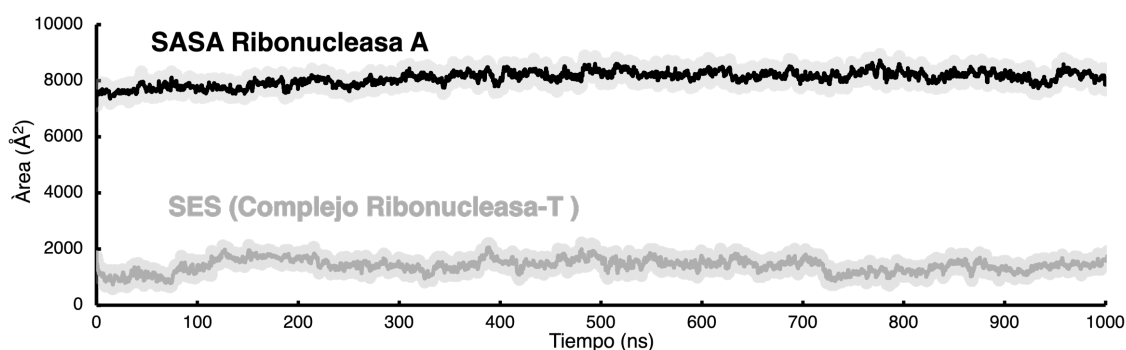


Figura 27. Evolución temporal de la superficie accesible al solvente (SASA) y la superficie excluida del solvente (SES) de RNasa A debido a la interacción con el dímero de T, utilizando el radio de $1,4 \text{ \AA}^2$ (correspondiente a la molécula de agua). SASA muestra valores estables con un valor promedio de $8095.36 \pm 1,09 \text{ \AA}^2$. En presencia de T, la superficie excluida del solvente (SES) de RNasa A (que indica el área superficial que se vuelve inaccesible al solvente debido a la presencia de T) exhibe valores estables con un valor promedio de $1426,03 \pm 1,04 \text{ \AA}^2$. Ambos parámetros indican interacciones proteína-proteína estables en el complejo RNasa A-T.

Cuando RI se une a ribonucleasas, existe una disminución previa reportada de entre $2583\text{-}3438 \text{ \AA}^2$ en el área superficial que está expuesta al solvente circundante. En comparación, el valor de $1426,03 \pm 1,04 \text{ \AA}^2$ de T sigue siendo significativo, considerando que RI tiene un mayor peso molecular ($\sim 50 \text{ kDa}$), en relación con el peso molecular del dímero de T ($\sim 14 \text{ kDa}$). (Johnson et al., 2007; Kobe & Deisenhofer, 1996; Turcotte & Raines, 2008).

El análisis SASA y SES en la RNasa A muestra que el área de la interfase proteína-proteína permanece altamente estable mostrando valores constantes durante la interacción.

5.2.5 Análisis de interacciones y distancias del complejo T-RNasa A

Dado que la contribución electrostática a la energía total de interacción fue predominante, se analizaron los residuos directamente involucrados en la formación de interacciones polares, específicamente, la formación de puentes salinos y puentes de hidrógeno (Tabla 1).

Se analizaron las interacciones en diferentes puntos de la simulación y se identificaron residuos que mantienen interacciones importantes durante gran parte de la simulación y que le proporcionan gran estabilidad al complejo formado.

Tabla 1. Interacciones polares identificadas en el complejo T-RNasa A.

Cadena	Residuo (RNasa A)	Residuo (T)	Tipo de interacción
Cadena A	Lys7 (R)	Ser14 (A)	Puente de H
	Lys7 (R)	Cys15 (A)	Puente de H
	Arg10 (R)	Ser14 (A)	Puente de H
	Asp38 (R)	Lys22 (A)	Carga-Carga
	Asp38 (R)	Lys25 (A)	Carga-Carga
	Asp38 (R)	Thr27 (A)	Puente de H
	Arg39 (R)	Asp10 (A)	Carga-Carga
	Arg39 (R)	Ser12 (A)	Puente de H
	Arg39 (R)	Ser28 (A)	Puente de H
	Arg39 (R)	Cys26 (A)	Puente de H
	Arg39 (R)	Ser58 (A)	Puente de H
	Arg39 (R)	Cys60 (A)	Puente de H
	Lys41 (R)	Ser6 (A)	Puente de H
	Lys41 (R)	Asp10 (A)	Carga-Carga
	Glu86 (R)	Lys56 (A)	Carga-Carga
	Ser90 (R)	Cys59 (A)	Puente de H
	Lys91 (R)	Thr27 (A)	Puente de H
	Lys91 (R)	Ser58 (A)	Puente de H
	Lys91 (R)	Asp55 (A)	Carga-Carga
	His119 (R)	Cys7 (A)	Puente de H
His119 (R)	Ser6 (A)	Puente de H	
Cadena B	Arg39 (R)	Cys26 (B)	Puente de H
	Lys66 (R)	Asp55 (B)	Carga-Carga
	Gln69 (R)	Lys31 (B)	Puente de H
	Gln69 (R)	Ser32 (B)	Puente de H
	Glu86 (R)	Met1 (B)	Carga-Carga
	Tyr92 (R)	Lys22 (B)	Puente de H
	Glu111 (R)	Lys30 (B)	Carga-Carga
	Glu111 (R)	Lys31 (B)	Carga-Carga
	Glu111 (R)	Lys43 (B)	Carga-Carga

*Se resaltan en color negro las interacciones más importantes identificadas y entre parentésis se indica la cadena a la que pertenece el residuo.

El análisis de la formación de puentes de H mostró un valor relativamente estable del número de enlaces de H formados entre T y RNasa A durante la simulación (Ver Apéndice B).

En la forma enlazada a metal, MT, todos los residuos de cisteína no se encuentran disponibles para interactuar debido a su función de coordinación de los cationes divalentes (zinc en nuestro caso). En el caso de la forma libre de metal, T, que forma un complejo con RNasa A, observamos que varios residuos de cisteína, incluyendo Cys7, Cys15 y Cys26, establecieron interacciones de enlace de hidrógeno con RNasa A (Ver Tabla 1 y Apéndices A y B).

En el caso de la formación de puentes salinos, el análisis indicó que, después de 400 ns, el número de interacciones carga-carga se vuelve significativo (Figura 28 y 29), lo que indica su importante contribución a la estabilidad de la interacción proteína-proteína durante los últimos 200 ns. Al caracterizar la formación de puentes salinos en la contribución de la cadena A y la cadena B de T, es evidente que el número de interacciones carga-carga entre la cadena A y RNasa A es mayor que el de aquellas que se forman con la cadena B; sin embargo, el número de interacciones de ambas cadenas permanece estable en el último segmento de la trayectoria (Ver Apéndice B).

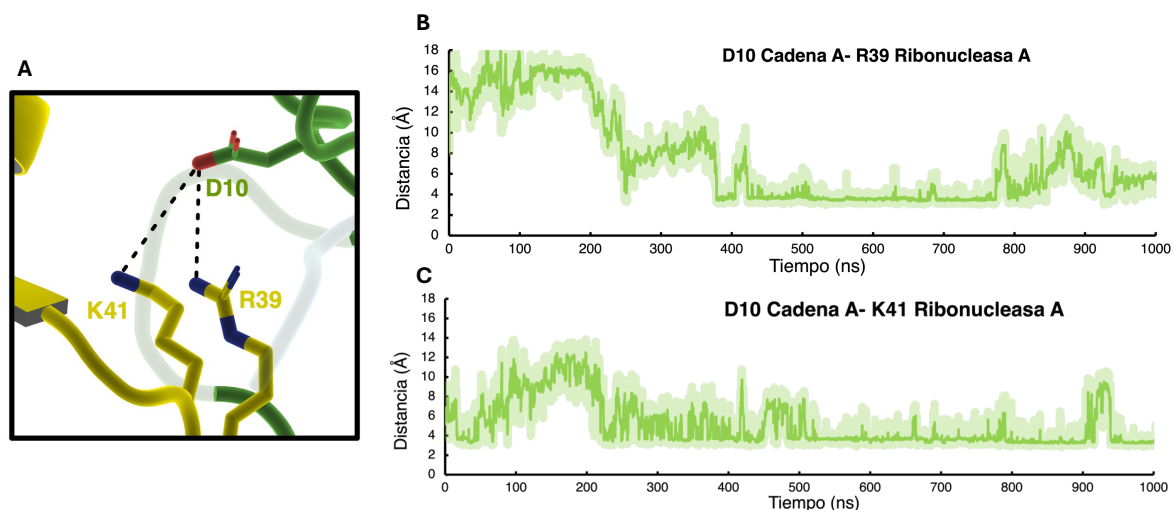


Figura 28. A. Interacción de Arg39 y Lys41 de RNasa A con Asp10 de T (Cadena A) representada con líneas discontinuas. B. Distancia en Å entre Arg39 de RNasa A y Asp10 de T. C. Distancia en Å entre Lys41 de RNasa A y Asp10 de T.

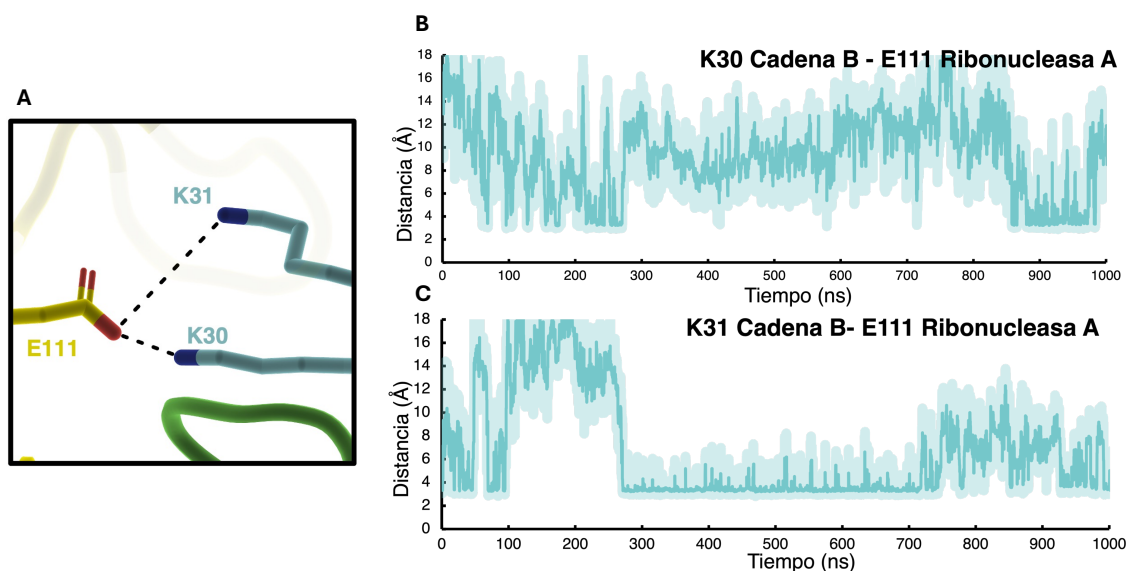


Figura 29. A. Interacción de Glu111 de RNasa A con Lys30 y Lys31 de T (Cadena B) representada con líneas discontinuas. B. Distancia en Å entre Glu111 de RNasa A y Asp10 de T. C. Distancia en Å entre Lys41 de RNasa A y Asp10 de T.

Además, identificamos la formación de puentes salinos estables y enlaces de hidrógeno que involucran a los residuos Arg39 y Lys91 (residuos que desempeñan un papel central en la interacción con RI). En este sentido, también observamos una importante estabilización proteína-proteína mediante la formación de puentes salinos entre Glu111 de RNasa A y Lys30 y Lys31 de la cadena B de T, así como entre Lys41 de RNasa A y Asp10 de la cadena A de T (Figura 30). Cabe destacar que residuos como Lys30 forman interacciones intermoleculares en la estructura del sistema MT, lo que podría impedirles interactuar con RNasa A en presencia de metales.

La participación de residuos de T en la formación del complejo T-RNasa A, incluyendo Lys30, Cys7, Cys15 y Cys26, que formaron interacciones intermoleculares en la proteína unida a metal, MT, así como los cambios estructurales en la proteína libre de metal, T, permiten explicar por qué únicamente la forma de T exhibe interacción y capacidades inhibitorias sobre RNasa A.

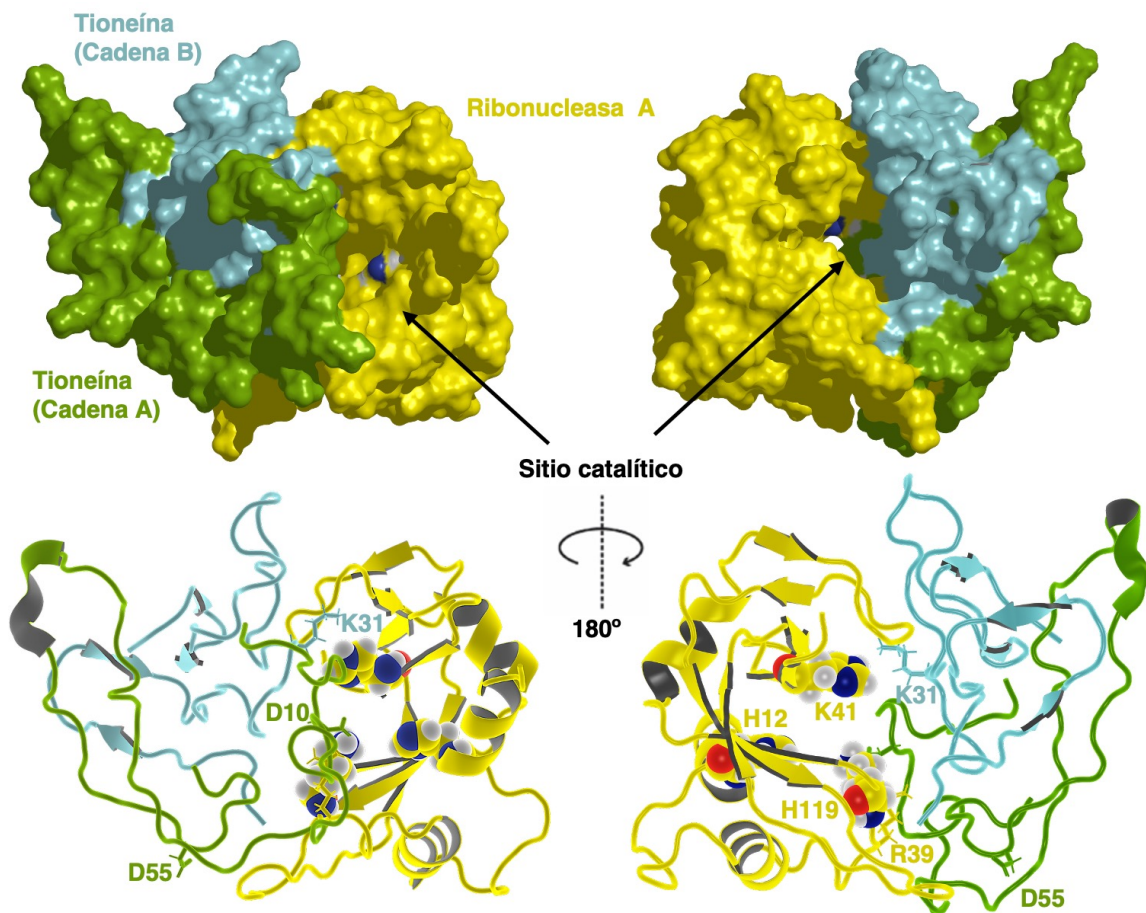


Figura 30. Estructura del complejo RNasa A-T. RNasa A se representa en color amarillo, la cadena A de tioneína se representa en color verde y la cadena B de tioneína en color cian. Se representan residuos importantes en el complejo como His12, Arg39, Lys41, His119 de RNasa A y Asp10, Asp55 y Lys31 de T.

VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La síntesis de proteínas en células eucariotas constituye un proceso altamente regulado y multifásico, en el que intervienen complejos multiproteicos como los factores de transcripción, que modulan la expresión génica, y los ribosomas 80S, encargados de traducir el ARNm en cadenas polipeptídicas (Entian, 2022; Khatter et al., 2015). Este proceso no concluye con la traducción: proteínas accesorias como las chaperonas desempeñan un papel esencial al facilitar el plegamiento correcto de las cadenas recién sintetizadas, evitando agregados y asegurando la funcionalidad estructural.

El plegamiento proteico, aunque intensamente estudiado, sigue siendo un fenómeno parcialmente comprendido. La resolución de estructuras tridimensionales es clave para correlacionar la conformación de una proteína con su función biológica relevante, pero representa un reto técnico considerable. A pesar de los avances en cristalografía de rayos X, espectroscopía de RMN y criomicroscopía electrónica, muchas proteínas, especialmente aquellas altamente flexibles o involucradas en procesos dinámicos, escapan a una caracterización estructural completa. Esta dificultad se incrementa al intentar capturar los cambios conformacionales que ocurren en condiciones fisiológicas, donde variables como el pH, la concentración iónica y las interacciones con otras biomoléculas modulan el comportamiento estructural. Comprender estas transiciones es esencial para esclarecer mecanismos moleculares, diseñar fármacos de forma racional y desarrollar terapias dirigidas con mayor precisión.

Asimismo, la caracterización de los complejos macromoleculares que participan en la activación e inactivación de vías de señalización celular resulta crucial para entender los procesos fisiológicos en su contexto real. Dada la complejidad de las interacciones proteína-proteína, se vuelve indispensable integrar enfoques experimentales y computacionales que permitan modelar y analizar estos sistemas de manera integral.

En este trabajo, utilizamos varios métodos computacionales y realizamos un conjunto de simulaciones atomísticas de dinámica molecular para identificar la divergencia estructural de MT/T con y sin metal en un contexto fisiológico y correlacionamos esa información obtenida con cómo estos cambios impactan en su capacidad para interactuar selectivamente con otras proteínas. Elucidamos conformaciones representativas de T, con la presencia de importantes elementos estructurales secundarios que son significativamente diferentes de los observados en la forma unida a metal, MT (p. ej. estructuras de tipo β plegada estables).

Evaluamos la estabilidad del complejo T-RNasa A, donde se identificó que residuos como Arg39 y Arg91, son fundamentales para la inhibición de la capacidad catalítica de RNasa A. A su vez que interacciones carga-carga y por puente de H con estos residuos pueden generar una alta afinidad y una considerable capacidad de inhibición.

En este contexto, los resultados muestran que la inhibición de ribonucleasa A mediante tioneína representa un hallazgo relevante: al bloquear la degradación del ARNm, prolongando su estabilidad e incrementando la eficiencia traduccional. Este mecanismo ofrece una vía prometedora para modular la producción de proteínas en condiciones fisiopatológicas específicas, como la inflamación, el trauma o el cáncer, donde el control fino de la expresión génica puede tener implicaciones terapéuticas significativas. (Canestrari & Paroo, 2018; Sun et al., 2022b; X.-L. Wang et al., 2023).

VII. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron caracterizar los cambios conformacionales significativos que puede experimentar una proteína en un entorno fisiológico, destacando cómo estas variaciones estructurales influyen directamente en su capacidad de interacción molecular. Mediante simulaciones atomísticas de dinámica molecular, se identificaron diferencias clave entre las formas T y MT, lo que permitió correlacionar sus cambios conformacionales con funciones específicas.

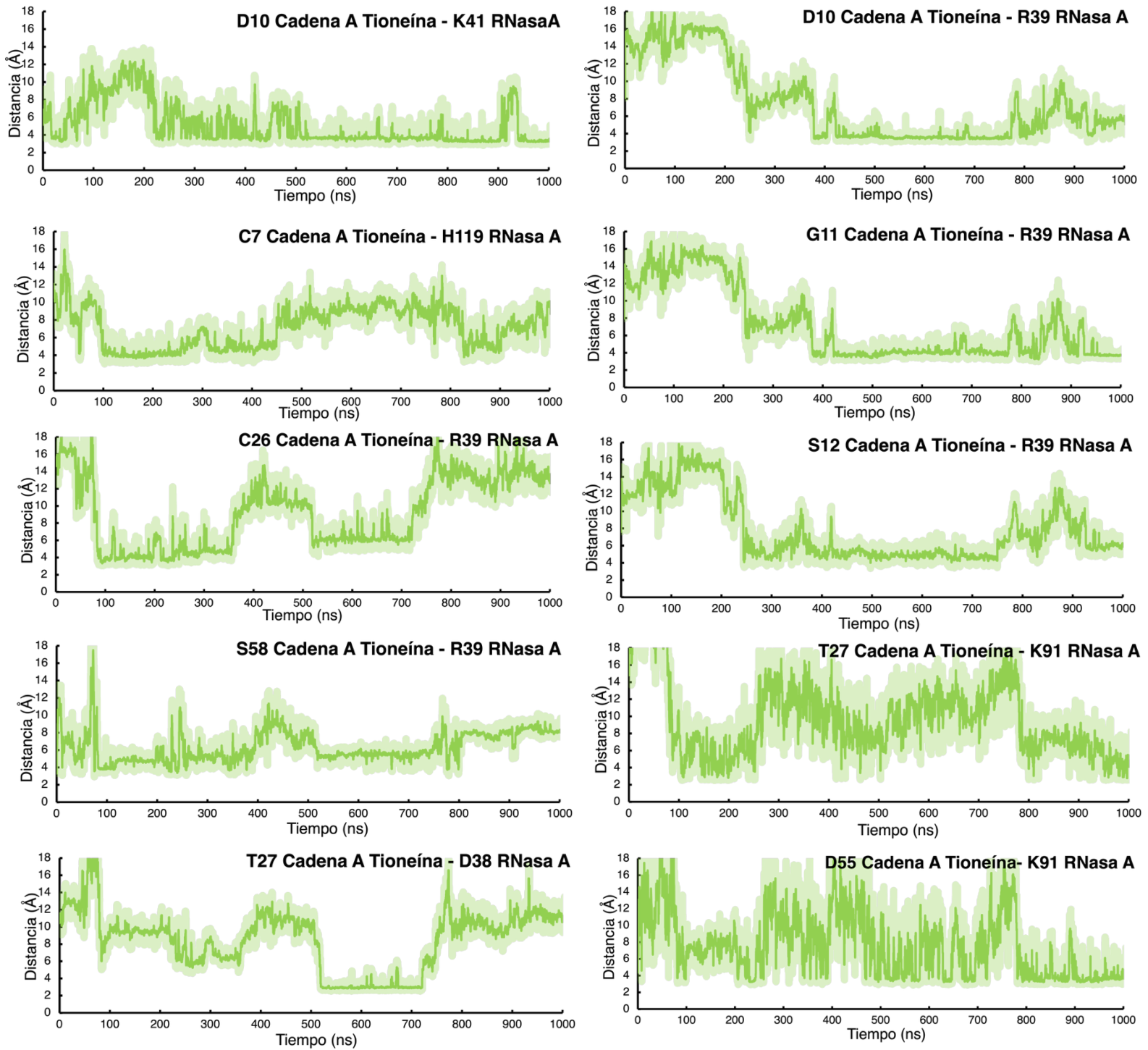
En particular, la interacción entre tioneína y ribonucleasa A reveló un mecanismo de inhibición que depende de residuos críticos como Arg39 y Arg91 así como de residuos de cisteína en presencia y ausencia de metal, que llevan a cambios conformacionales significativos, sugiriendo un papel regulador en la estabilidad del ARNm y, por ende, en la eficiencia traduccional. Este hallazgo adquiere especial relevancia en escenarios fisiopatológicos (como inflamación, trauma o cáncer) donde el control fino de la expresión génica puede tener implicaciones terapéuticas significativas.

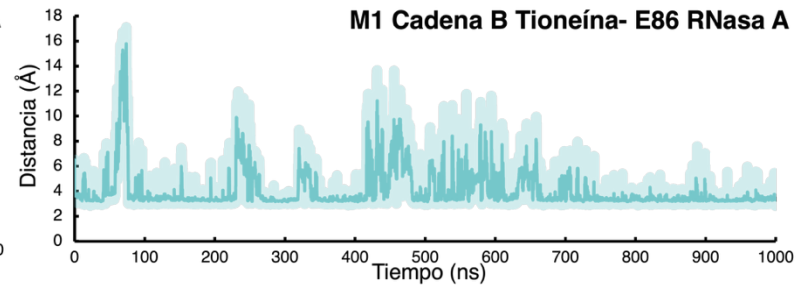
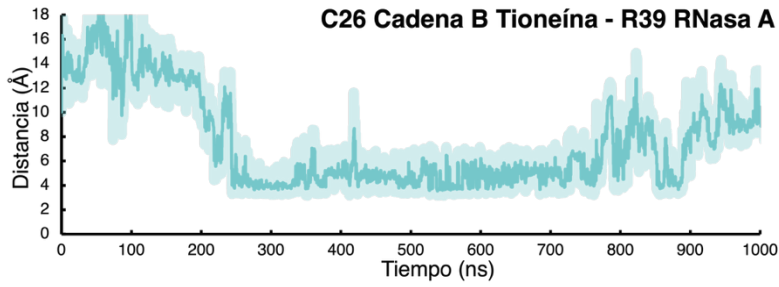
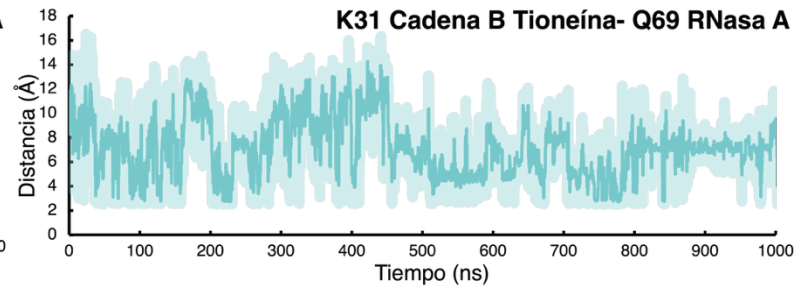
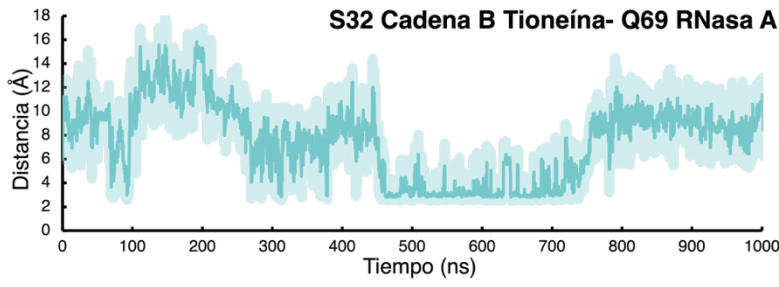
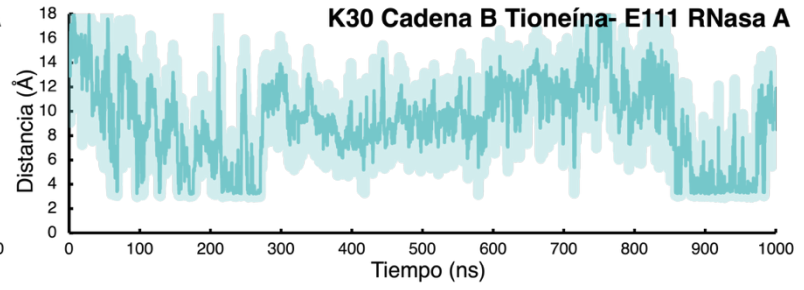
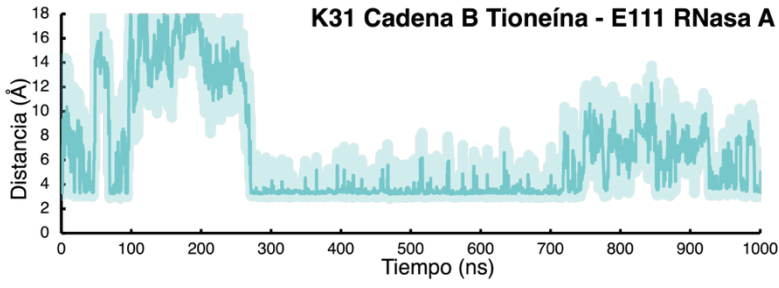
La integración de enfoques computacionales y experimentales para estudiar complejos macromoleculares y transiciones conformacionales bajo condiciones fisiológicas reales, se consolida como una estrategia indispensable para comprender las vías de señalización celular en un contexto dinámico. En conjunto, este trabajo aporta evidencia estructural y funcional que amplía el entendimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la regulación postraduccional, abriendo nuevas perspectivas para la intervención biomédica, biofísica y bioquímica.

Además, los métodos computacionales, como las simulaciones de dinámica molecular, ofrecen hipótesis mecanísticas sobre interacciones proteína-proteína que pueden validarse mediante técnicas de caracterización biofísicas y bioquímicas. Explorar la posible interacción de T con otras ribonucleasas o proteínas con similitudes estructurales representa una línea de investigación prometedora para mapear con mayor precisión las redes de señalización en las que participan MT y T.

APÉNDICE A

A. Distancias entre residuos de RNasa A-T

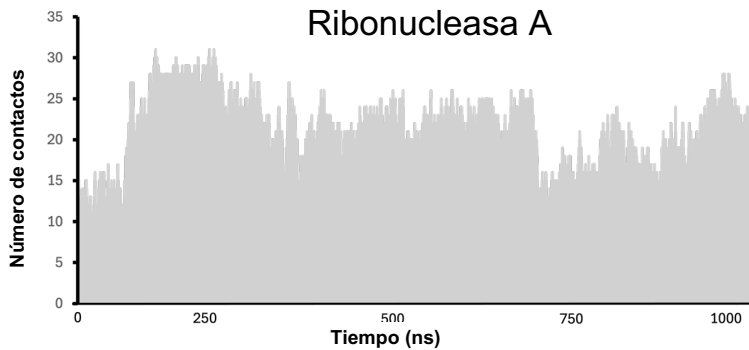




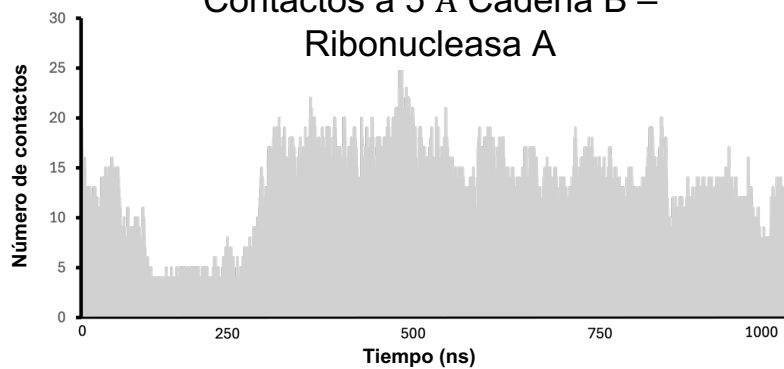
APÉNDICE B

B. Análisis de interacciones RNasa A-T

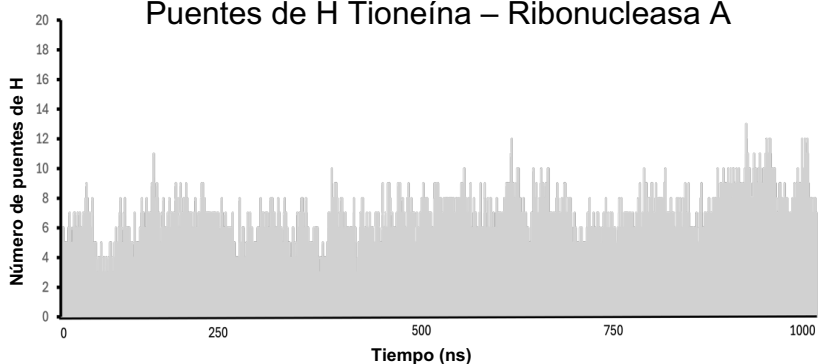
Contactos a 5 Å Cadena A –
Ribonucleasa A



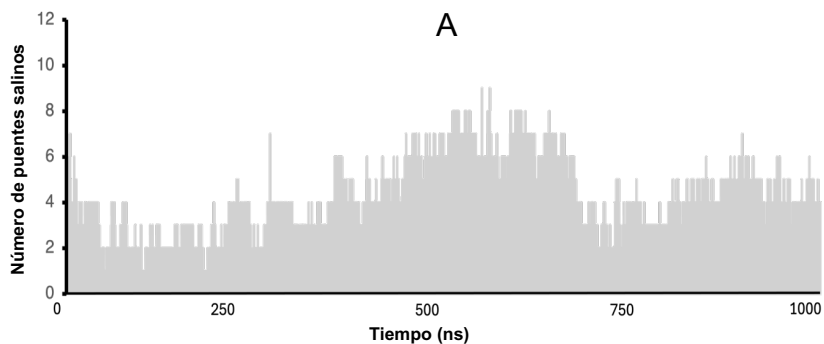
Contactos a 5 Å Cadena B –
Ribonucleasa A



Puentes de H Tioneína – Ribonucleasa A



Puentes salinos Tioneína – Ribonucleasa
A



REFERENCIAS

- Abramson, J., Adler, J., Dunger, J., Evans, R., Green, T., Pritzel, A., Ronneberger, O., Willmore, L., Ballard, A. J., Bambrick, J., Bodenstein, S. W., Evans, D. A., Hung, C.-C., O'Neill, M., Reiman, D., Tunyasuvunakool, K., Wu, Z., Žemgulytė, A., Arvaniti, E., ... Jumper, J. M. (2024). Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*, 630(8016), 493–500.
<https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>
- Aburto-Luna, V., Treviño, S., Santos-López, G., Moroni-González, D., Calva-Cruz, O., Aguilar-Alonso, P., León-Chávez, B. A., & Brambila, E. (2017a). Hepatic mobilization of zinc after an experimental surgery, and its relationship with inflammatory cytokines release, and expression of metallothionein and Zip14 transporter. *Inflammation Research*, 66(2), 167–175.
<https://doi.org/10.1007/s00011-016-1003-5>
- Aburto-Luna, V., Treviño, S., Santos-López, G., Moroni-González, D., Calva-Cruz, O., Aguilar-Alonso, P., León-Chávez, B. A., & Brambila, E. (2017b). Hepatic mobilization of zinc after an experimental surgery, and its relationship with inflammatory cytokines release, and expression of metallothionein and Zip14 transporter. *Inflammation Research*, 66(2), 167–175.
<https://doi.org/10.1007/s00011-016-1003-5>
- Alas-Guardado, S. de J., Rojo, A., & Merino, G. (2010). La paradoja de Levinthal: Cuando una contradicción se vuelve lógica. *Educación Química*, 22(1), 51–54.
[https://doi.org/10.1016/S0187-893X\(18\)30114-9](https://doi.org/10.1016/S0187-893X(18)30114-9)

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2022).

Molecular Biology of the Cell (Seventh Edition). Garland Science, Taylor and Francis Group.

Andrews, G. K. (2000). Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochemical Pharmacology*, 59(1), 95–104.

[https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)00301-9](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00301-9)

Arseniev, A., Schultze, P., Wörgötter, E., Braun, W., Wagner, G., Vašák, M., Kägi, J. H. R., & Wüthrich, K. (1988). Three-dimensional structure of rabbit liver

[Cd7]metallothionein-2a in aqueous solution determined by nuclear magnetic resonance. *Journal of Molecular Biology*, 201(3), 637–657.

[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(88\)90644-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(88)90644-4)

Atrian, S., & Capdevila, M. (2013). Metallothionein-protein interactions. *BioMolecular Concepts*, 4(2), 143–160. <https://doi.org/10.1515/bmc-2012-0049>

Benítez, M. J., & Jiménez, J. S. (2025). Gibbs Free Energy and Enthalpy–Entropy Compensation in Protein Folding. *Biophysica*, 5(1), 2.

<https://doi.org/10.3390/biophysica5010002>

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J., & Stryer, L. (Eds.). (2015). *Biochemistry* (8. ed). W.H. Freeman/Macmillan.

Bertoni, M., Kiefer, F., Biasini, M., Bordoli, L., & Schwede, T. (2017). Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Scientific Reports*, 7(1), 10480.

<https://doi.org/10.1038/s41598-017-09654-8>

- Brambila, E., Muñoz-Sánchez, J. L., Albores, A., & Waalkes, M. (1999). Early effects of surgery on zinc and metallothionein levels in female rats. *Biological Trace Element Research*, 70(2), 173–182. <https://doi.org/10.1007/BF02783858>
- Brambila, E., Tenorio, N., Garcia-Luna, E., & Waalkes, M. P. (2001). Effect of Abdominal Surgery on the Activity of Acid and Alkaline Ribonucleases in Rats. *Experimental and Molecular Pathology*, 71(2), 125–131. <https://doi.org/10.1006/exmp.2001.2383>
- Braun, W., Vasák, M., Robbins, A. H., Stout, C. D., Wagner, G., Kägi, J. H., & Wüthrich, K. (1992). Comparison of the NMR solution structure and the x-ray crystal structure of rat metallothionein-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(21), 10124–10128. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.21.10124>
- Brinda, K., & Vishveshwara, S. (2005). Oligomeric protein structure networks: Insights into protein-protein interactions. *BMC Bioinformatics*, 6(1), 296. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-6-296>
- Brooks, B. R., Brooks III, C. L., Mackerell Jr., A. D., Nilsson, L., Petrella, R. J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., Caflisch, A., Caves, L., Cui, Q., Dinner, A. R., Feig, M., Fischer, S., Gao, J., Hodoscek, M., Im, W., ... Karplus, M. (2009). CHARMM: The biomolecular simulation program. *Journal of Computational Chemistry*, 30(10), 1545–1614. <https://doi.org/10.1002/jcc.21287>

- Canestrari, E., & Paroo, Z. (2018). Ribonucleases as Drug Targets. *Trends in Pharmacological Sciences*, 39(10), 855–866.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.07.005>
- CAPRI. (2022). *CASP15-CAPRI Round 54: Assembly prediction results*. CAPRI Docking. CAPRI Docking. <https://www.capri-docking.org/>
- Carpenè, E., Andreani, G., & Isani, G. (2007). Metallothionein functions and structural characteristics. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 21, 35–39.
<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2007.09.011>
- Cloutier, P., & Coulombe, B. (2013). Regulation of molecular chaperones through post-translational modifications: Decrypting the chaperone code. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(5), 443–454.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.02.010>
- Coyle, P., Philcox, J. C., Carey, L. C., & Roife, A. M. (2002). Metallothionein: The multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 59(4), 627–647. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8454-2>
- Cuchillo, C. M., Nogués, M. V., & Raines, R. T. (2011). Bovine Pancreatic Ribonuclease: Fifty Years of the First Enzymatic Reaction Mechanism. *Biochemistry*, 50(37), 7835–7841. <https://doi.org/10.1021/bi201075b>
- Dai, H., Wang, L., Li, L., Huang, Z., & Ye, L. (2021). Metallothionein 1: A New Spotlight on Inflammatory Diseases. *Frontiers in Immunology*, 12.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.739918>

- Deribe, Y. L., Pawson, T., & Dikic, I. (2010). Post-translational modifications in signal integration. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(6), 666–672.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.1842>
- Desta, I. T., Porter, K. A., Xia, B., Kozakov, D., & Vajda, S. (2020). Performance and Its Limits in Rigid Body Protein-Protein Docking. *Structure*, 28(9), 1071-1081.e3.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2020.06.006>
- Dominguez, C., Boelens, R., & Bonvin, A. M. J. J. (2003). HADDOCK: A Protein–Protein Docking Approach Based on Biochemical or Biophysical Information. *Journal of the American Chemical Society*, 125(7), 1731–1737.
<https://doi.org/10.1021/ja026939x>
- Dorn, M., e Silva, M. B., Buriol, L. S., & Lamb, L. C. (2014). Three-dimensional protein structure prediction: Methods and computational strategies. *Computational Biology and Chemistry*, 53, 251–276.
<https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2014.10.001>
- Du, Z., Su, H., Wang, W., Ye, L., Wei, H., Peng, Z., Anishchenko, I., Baker, D., & Yang, J. (2021). The trRosetta server for fast and accurate protein structure prediction. *Nature Protocols*, 16(12), 5634–5651. <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00628-9>
- Dwevedi, A. (2015). *Protein Folding: Examining the Challenges from Synthesis to Folded Form*. SpringerLink. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-319-12592-3>

- Dziegiel, P., Pula, B., Kobierzycki, C., Stasiolek, M., & Podhorska-Okolow, M. (2016). *Metallothioneins in Normal and Cancer Cells*. Springer.
- Entian, K.-D. (Ed.). (2022). *Ribosome Biogenesis: Methods and Protocols* (Vol. 2533). Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2501-9>
- Evans, R., O'Neill, M., Pritzel, A., Antropova, N., Senior, A., Green, T., Žídek, A., Bates, R., Blackwell, S., Yim, J., Ronneberger, O., Bodenstein, S., Zielinski, M., Bridgland, A., Potapenko, A., Cowie, A., Tunyasuvunakool, K., Jain, R., Clancy, E., ... Hassabis, D. (2021a). *Protein complex prediction with AlphaFold-Multimer*. <https://doi.org/10.1101/2021.10.04.463034>
- Evans, R., O'Neill, M., Pritzel, A., Antropova, N., Senior, A., Green, T., Žídek, A., Bates, R., Blackwell, S., Yim, J., Ronneberger, O., Bodenstein, S., Zielinski, M., Bridgland, A., Potapenko, A., Cowie, A., Tunyasuvunakool, K., Jain, R., Clancy, E., ... Hassabis, D. (2021b). *Protein complex prediction with AlphaFold-Multimer*. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1101/2021.10.04.463034>
- Feldman, D. E., & Frydman, J. (2000). Protein folding *in vivo*: The importance of molecular chaperones. *Current Opinion in Structural Biology*, *10*(1), 26–33. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(99\)00044-5](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(99)00044-5)
- Ferina, J., & Daggett, V. (2019). Visualizing Protein Folding and Unfolding. *Journal of Molecular Biology*, *431*(8), 1540–1564. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.02.026>
- Geiger, R., Gautschi, M., Thor, F., Hayer, A., & Helenius, A. (2011). Folding, Quality Control, and Secretion of Pancreatic Ribonuclease in Live Cells. *Journal of*

Biological Chemistry, 286(7), 5813–5822.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.171694>

Gotte, G., & Menegazzi, M. (2019). Biological Activities of Secretory RNases: Focus on Their Oligomerization to Design Antitumor Drugs. *Frontiers in Immunology*, 10, 2626. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02626>

Gruys, E., Toussaint, M. J. M., Niewold, T. A., & Koopmans, S. J. (2005). Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 6(11), 1045–1056. <https://doi.org/10.1631/jzus.2005.B1045>

Hameduh, T., Haddad, Y., Adam, V., & Heger, Z. (2020). Homology modeling in the time of collective and artificial intelligence. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 3494–3506.

<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.11.007>

Henzler-Wildman, K., & Kern, D. (2007a). *Dynamic personalities of proteins*.

<https://www.nature.com/articles/nature06522>

Henzler-Wildman, K., & Kern, D. (2007b). Dynamic personalities of proteins. *Nature*, 450(7172), 964–972. <https://doi.org/10.1038/nature06522>

Hollingsworth, S. A., & Dror, R. O. (2018). Molecular Dynamics Simulation for All.

Neuron, 99(6), 1129–1143. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.011>

Hong, S.-H., Hao, Q., & Maret, W. (2005). Domain-specific fluorescence resonance energy transfer (FRET) sensors of metallothionein/thionein. *Protein*

Engineering, Design and Selection, 18(6), 255–263.

<https://doi.org/10.1093/protein/gzi031>

- Hong, S.-H., & Maret, W. (2003). A fluorescence resonance energy transfer sensor for the β -domain of metallothionein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(5), 2255–2260. <https://doi.org/10.1073/pnas.0438005100>
- Huang, J., & MacKerell, A. D. (2013). CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *Journal of Computational Chemistry*, *34*(25), 2135–2145. <https://doi.org/10.1002/jcc.23354>
- Huang, J., Rauscher, S., Nawrocki, G., Ran, T., Feig, M., De Groot, B. L., Grubmüller, H., & MacKerell, A. D. (2017). CHARMM36m: An improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. *Nature Methods*, *14*(1), 71–73. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4067>
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). *VMD - Visual Molecular Dynamics* [Computer software].
- Johnson, R. J., McCoy, J. G., Bingman, C. A., Phillips, G. N., & Raines, R. T. (2007). Inhibition of Human Pancreatic Ribonuclease by the Human Ribonuclease Inhibitor Protein. *Journal of Molecular Biology*, *368*(2), 434–449. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.02.005>
- Junker, B. H., & Schreiber, F. (2011). *Analysis of Biological Networks*. John Wiley & Sons.
- Khatter, H., Myasnikov, A. G., Natchiar, S. K., & Klaholz, B. P. (2015). Structure of the human 80S ribosome. *Nature*, *520*(7549), 640–645. <https://doi.org/10.1038/nature14427>

- Kobe, B., & Deisenhofer, J. (1995). A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature*, 374(6518), 183–186.
<https://doi.org/10.1038/374183a0>
- Kobe, B., & Deisenhofer, J. (1996). Mechanism of Ribonuclease Inhibition by Ribonuclease Inhibitor Protein Based on the Crystal Structure of its Complex with Ribonuclease A. *Journal of Molecular Biology*, 264(5), 1028–1043.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0694>
- Kozakov, D., Hall, D. R., Xia, B., Porter, K. A., Padhorny, D., Yueh, C., Beglov, D., & Vajda, S. (2017). The ClusPro web server for protein–protein docking. *Nature Protocols*, 12(2), 255–278. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.169>
- Krężel, A., Hao, Q., & Maret, W. (2007). The zinc/thiolate redox biochemistry of metallothionein and the control of zinc ion fluctuations in cell signaling. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 463(2), 188–200.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.02.017>
- Krężel, A., & Maret, W. (2007a). Different redox states of metallothionein/thionein in biological tissue. *Biochemical Journal*, 402(3), 551–558.
<https://doi.org/10.1042/BJ20061044>
- Krężel, A., & Maret, W. (2007b). Different redox states of metallothionein/thionein in biological tissue. *Biochemical Journal*, 402(3), 551–558.
<https://doi.org/10.1042/BJ20061044>

- Krežel, A., & Maret, W. (2021). The Bioinorganic Chemistry of Mammalian Metallothioneins. *Chemical Reviews*, 121(23), 14594–14648.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00371>
- Kuhlman, B., & Bradley, P. (2019). Advances in protein structure prediction and design. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(11), 681–697.
<https://doi.org/10.1038/s41580-019-0163-x>
- Larson, S. B., Day, J. S., Nguyen, C., Cudney, R., & McPherson, A. (2010). Structure of bovine pancreatic ribonuclease complexed with uridine 5'-monophosphate at 1.60 Å resolution. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications*, 66(2), 113–120.
<https://doi.org/10.1107/S174430910905194X>
- Laurents, D. V. (2022). AlphaFold 2 and NMR Spectroscopy: Partners to Understand Protein Structure, Dynamics and Function. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.906437>
- Libonati, M., & Gotte, G. (2004). Oligomerization of bovine ribonuclease A: Structural and functional features of its multimers. *Biochemical Journal*, 380(2), 311–327.
<https://doi.org/10.1042/bj20031922>
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C., & Krieger, M. (2016). *Molecular Cell Biology 8th Edition*. W. H. Freeman.
- Love, O., Galindo-Murillo, R., Zgarbová, M., Šponer, J., Jurečka, P., & Cheatham, T. E. (2023). Assessing the Current State of Amber Force Field Modifications for

- DNA–2023 Edition. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 19(13), 4299–4307. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.3c00233>
- Mann, M., & Jensen, O. N. (2003). Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature Biotechnology*, 21(3), 255–261. <https://doi.org/10.1038/nbt0303-255>
- Maret, W. (2011). Redox biochemistry of mammalian metallothioneins. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 16(7), 1079–1086. <https://doi.org/10.1007/s00775-011-0800-0>
- Maret, W., & Krężel, A. (2007). Cellular Zinc and Redox Buffering Capacity of Metallothionein/Thionein in Health and Disease. *Molecular Medicine*, 13(7–8), 371–375. <https://doi.org/10.2119/2007-00036.Maret>
- Marshall, G. R., Feng, J. A., & Kuster, D. J. (2008). Back to the future: Ribonuclease A. *Peptide Science*, 90(3), 259–277. <https://doi.org/10.1002/bip.20845>
- Mascarenhas, N. M., & Gosavi, S. (2017). Understanding protein domain-swapping using structure-based models of protein folding. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 128, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2016.09.013>
- Mehlenbacher, M. R., Elsiey, R., Lakha, R., Villones, R. L. E., Orman, M., Vizcarra, C. L., Meloni, G., Wilcox, D. E., & Austin, R. N. (2022). Metal binding and interdomain thermodynamics of mammalian metallothionein-3: Enthalpically favoured Cu^+ supplants entropically favoured Zn^{2+} to form Cu_4^+ clusters under

physiological conditions. *Chemical Science*, 13(18), 5289–5304.

<https://doi.org/10.1039/D2SC00676F>

Meng, X.-Y., Zhang, H.-X., Mezei, M., & Cui, M. (2011). Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Current Computer-Aided Drug Design*, 7(2), 146–157. <https://doi.org/10.2174/157340911795677602>

Messerle, B. A., Schäffer, A., Vašák, M., Kägi, J. H. R., & Wüthrich, K. (1990). Three-dimensional structure of human [113Cd7]metallothionein-2 in solution determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Molecular Biology*, 214(3), 765–779. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(90\)90291-S](https://doi.org/10.1016/0022-2836(90)90291-S)

Miernyk, J. A., & Thelen, J. J. (2008). Biochemical approaches for discovering protein–protein interactions. *The Plant Journal*, 53(4), 597–609.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03316.x>

Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., & Steinegger, M. (2022). ColabFold: Making protein folding accessible to all. *Nature Methods*, 19(6), 679–682. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>

Moraes, A. H., Martins, D. M., & Chagas, M. A. (2024). Exploring the Significance of Experimental and Computational Methods in Protein Structure Determination. In V. G. Maltarollo (Ed.), *Computer-Aided and Machine Learning-Driven Drug Design: From Theory to Applications* (pp. 401–432). Springer Nature Switzerland. https://doi.org/10.1007/978-3-031-76718-0_14

- Morris, G. M., & Lim-Wilby, M. (2008). Molecular Docking. In A. Kukol (Ed.), *Molecular Modeling of Proteins* (pp. 365–382). Humana Press.
https://doi.org/10.1007/978-1-59745-177-2_19
- Murray, R., Bender, D., Botham, K., Kennelly, P., Rodwell, V., & Weil, A. (2018). *Harper's Illustrated Biochemistry* (31st Edition). McGraw Hill.
- Nachiappan, M., Guru Raj Rao, R., Richard, M., Prabhu, D., Rajamanikandan, S., Chitra, J. P., & Jeyakanthan, J. (2021). Chapter 6—3D Structural Determination of Macromolecules Using X-ray Crystallography Methods. In M. S. Coumar (Ed.), *Molecular Docking for Computer-Aided Drug Design* (pp. 119–140). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822312-3.00007-2>
- Nelson, D., & Cox, M. (2013). *Lehninger Principles of Biochemistry: 6th Edition*. W.H. Freeman and Company.
- Nicholson, A. W. (Ed.). (2011). *Ribonucleases*. Springer Berlin Heidelberg.
<https://doi.org/10.1007/978-3-642-21078-5>
- Omidi, A., Møller, M. H., Malhis, N., Bui, J. M., & Gsponer, J. (2024). AlphaFold-Multimer accurately captures interactions and dynamics of intrinsically disordered protein regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 121(44), e2406407121. <https://doi.org/10.1073/pnas.2406407121>
- Ostrakhovitch, E. A., Olsson, P.-E., Jiang, S., & Cherian, M. G. (2006). Interaction of metallothionein with tumor suppressor p53 protein. *FEBS Letters*, 580(5), 1235–1238. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.01.036>

- Otvos, J. D., & Armitage, I. M. (1980). Structure of the metal clusters in rabbit liver metallothionein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(12), 7094–7098. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.12.7094>
- Patodia, S. (2014). Molecular Dynamics Simulation of Proteins: A Brief Overview. *Journal of Physical Chemistry & Biophysics*, 4(6). <https://doi.org/10.4172/2161-0398.1000166>
- Petrova, D. E. V. (2024). The Role of Biophysical Techniques in Protein Structure Determination. *Austra & Lian Journal of Basic Sciences*, 5(4), 18–25.
- Petsko, G. A., & Ringe, D. (2004). *Protein Structure and Function*. New Science Press.
- Phillips, J. C., Hardy, D. J., Maia, J. D. C., Stone, J. E., Ribeiro, J. V., Bernardi, R. C., Buch, R., Fiorin, G., Héning, J., Jiang, W., McGreevy, R., Melo, M. C. R., Radak, B. K., Skeel, R. D., Singharoy, A., Wang, Y., Roux, B., Aksimentiev, A., Luthey-Schulten, Z., ... Tajkhorshid, E. (2020a). Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. *The Journal of Chemical Physics*, 153(4), 044130. <https://doi.org/10.1063/5.0014475>
- Phillips, J. C., Hardy, D. J., Maia, J. D. C., Stone, J. E., Ribeiro, J. V., Bernardi, R. C., Buch, R., Fiorin, G., Héning, J., Jiang, W., McGreevy, R., Melo, M. C. R., Radak, B. K., Skeel, R. D., Singharoy, A., Wang, Y., Roux, B., Aksimentiev, A., Luthey-Schulten, Z., ... Tajkhorshid, E. (2020b). Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. *The Journal of Chemical Physics*, 153(4), 044130. <https://doi.org/10.1063/5.0014475>

Porter, K. A., Desta, I., Kozakov, D., & Vajda, S. (2019). What method to use for protein-protein docking? *Current Opinion in Structural Biology*, 55, 1–7.

<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2018.12.010>

Ramazi, S., & Zahiri, J. (2021). Post-translational modifications in proteins: Resources, tools and prediction methods. *Database*, 2021, baab012.

<https://doi.org/10.1093/database/baab012>

Rigby Duncan, K. E., & Stillman, M. J. (2006). Metal-dependent protein folding: Metallation of metallothionein. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100(12),

2101–2107. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.09.005>

Robbins, A. H., McRee, D. E., Williamson, M., Collett, S. A., Xuong, N. H., Furey, W. F., Wang, B. C., & Stout, C. D. (1991). Refined crystal structure of Cd, Zn

metallothionein at 2.0 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 221(4), 1269–

1293. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90933-W](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90933-W)

Rose, G. D. (2021). Reframing the Protein Folding Problem: Entropy as Organizer.

Biochemistry, 60(49), 3753–3761.

<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00687>

Rosenberg, H. F. (2008). RNase A ribonucleases and host defense: An evolving story.

Journal of Leukocyte Biology, 83(5), 1079–1087.

<https://doi.org/10.1189/jlb.1107725>

Rutkoski, T., & Raines, R. (2008). Evasion of Ribonuclease Inhibitor as a Determinant of Ribonuclease Cytotoxicity. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 9(3),

185–199. <https://doi.org/10.2174/138920108784567344>

- Ruttkey-Nedecky, B., Nejd, L., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik, M., Eckschlager, T., Stiborova, M., Adam, V., & Kizek, R. (2013). The Role of Metallothionein in Oxidative Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(3), 6044–6066. <https://doi.org/10.3390/ijms14036044>
- Shigematsu, M., Kawamura, T., & Kirino, Y. (2018). Generation of 2',3'-Cyclic Phosphate-Containing RNAs as a Hidden Layer of the Transcriptome. *Frontiers in Genetics*, *9*, 562. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00562>
- Singh, A. K., Pomorski, A., Wu, S., Peris-Díaz, M. D., Czepczyńska-Krężel, H., & Krężel, A. (2023). The connection of α - and β -domains in mammalian metallothionein-2 differentiates Zn(II) binding affinities, affects folding, and determines zinc buffering properties. *Metallomics*, *15*(6), mfad029. <https://doi.org/10.1093/mtomcs/mfad029>
- Singh, D. B., & Tripathi, T. (Eds.). (2020). *Frontiers in Protein Structure, Function, and Dynamics*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-5530-5>
- Smirnova, J., Loerke, J., Kleinau, G., Schmidt, A., Bürger, J., Meyer, E. H., Mielke, T., Scheerer, P., Bock, R., Spahn, C. M. T., & Zoschke, R. (2023). Structure of the actively translating plant 80S ribosome at 2.2 Å resolution. *Nature Plants*, *9*(6), 987–1000. <https://doi.org/10.1038/s41477-023-01407-y>
- Sun, D., Han, C., & Sheng, J. (2022a). The role of human ribonuclease A family in health and diseases: A systematic review. *iScience*, *25*(11), 105284. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105284>

- Sun, D., Han, C., & Sheng, J. (2022b). The role of human ribonuclease A family in health and diseases: A systematic review. *iScience*, 25(11), 105284. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105284>
- Thirumoorthy, N., Shyam Sunder, A., Manisenthil Kumar, K., Senthil Kumar, M., Ganesh, G., & Chatterjee, M. (2011). A Review of Metallothionein Isoforms and their Role in Pathophysiology. *World Journal of Surgical Oncology*, 9(1), 54. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-9-54>
- Tripathi, T., & Dubey, V. K. (2022). *Advances in Protein Molecular and Structural Biology Methods*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2020-0-03170-1>
- Turcotte, R. F., & Raines, R. T. (2008). Interaction of onconase with the human ribonuclease inhibitor protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 377(2), 512–514. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.10.032>
- Vajda, S., & Kozakov, D. (2009). Convergence and combination of methods in protein–protein docking. *Current Opinion in Structural Biology*, 19(2), 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2009.02.008>
- Vakser, I. A. (2014). Protein-Protein Docking: From Interaction to Interactome. *Biophysical Journal*, 107(8), 1785–1793. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.08.033>
- Van Zundert, G. C. P., Rodrigues, J. P. G. L. M., Trellet, M., Schmitz, C., Kastiris, P. L., Karaca, E., Melquiond, A. S. J., Van Dijk, M., De Vries, S. J., & Bonvin, A. M. J. J. (2016). The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of

Biomolecular Complexes. *Journal of Molecular Biology*, 428(4), 720–725.

<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.09.014>

Vašák, M. (2005). Advances in metallothionein structure and functions. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 19(1), 13–17.

<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.03.003>

Wang, H., Zhang, Q., Cai, B., Li, H., Sze, K.-H., Huang, Z.-X., Wu, H.-M., & Sun, H.

(2006). Solution structure and dynamics of human metallothionein-3 (MT-3).

FEBS Letters, 580(3), 795–800. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.12.099>

Wang, X.-L., Schnoor, M., & Yin, L.-M. (2023). Metallothionein-2: An emerging target in inflammatory diseases and cancers. *Pharmacology & Therapeutics*, 244,

108374. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2023.108374>

Weng, G., Wang, E., Wang, Z., Liu, H., Zhu, F., Li, D., & Hou, T. (2019). HawkDock: A

web server to predict and analyze the protein–protein complex based on computational docking and MM/GBSA. *Nucleic Acids Research*, 47(W1),

W322–W330. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz397>

Yakovlev, G. I., Mitkevich, V. A., & Makarov, A. A. (2006). Ribonuclease inhibitors.

Molecular Biology, 40(6), 867–874.

<https://doi.org/10.1134/S0026893306060045>

Yang, R., Roshani, D., Gao, B., Li, P., & Shang, N. (2024). Metallothionein: A

Comprehensive Review of Its Classification, Structure, Biological Functions, and Applications. *Antioxidants*, 13(7), 825.

<https://doi.org/10.3390/antiox13070825>

Zalewska, M., Trefon, J., & Milnerowicz, H. (2014). The role of metallothionein

interactions with other proteins. *PROTEOMICS*, 14(11), 1343–1356.

<https://doi.org/10.1002/pmic.201300496>

Zhang, S., Chen, Y., Wang, Y., Zhang, P., Chen, G., & Zhou, Y. (2020). Insights Into

Translatomics in the Nervous System. *Frontiers in Genetics*, 11.

<https://doi.org/10.3389/fgene.2020.599548>

Zhu, K.-F., Yuan, C., Du, Y.-M., Sun, K.-L., Zhang, X.-K., Vogel, H., Jia, X.-D., Gao, Y.-Z.,

Zhang, Q.-F., Wang, D.-P., & Zhang, H.-W. (2023). Applications and prospects of cryo-EM in drug discovery. *Military Medical Research*, 10(1), 10.

<https://doi.org/10.1186/s40779-023-00446-y>