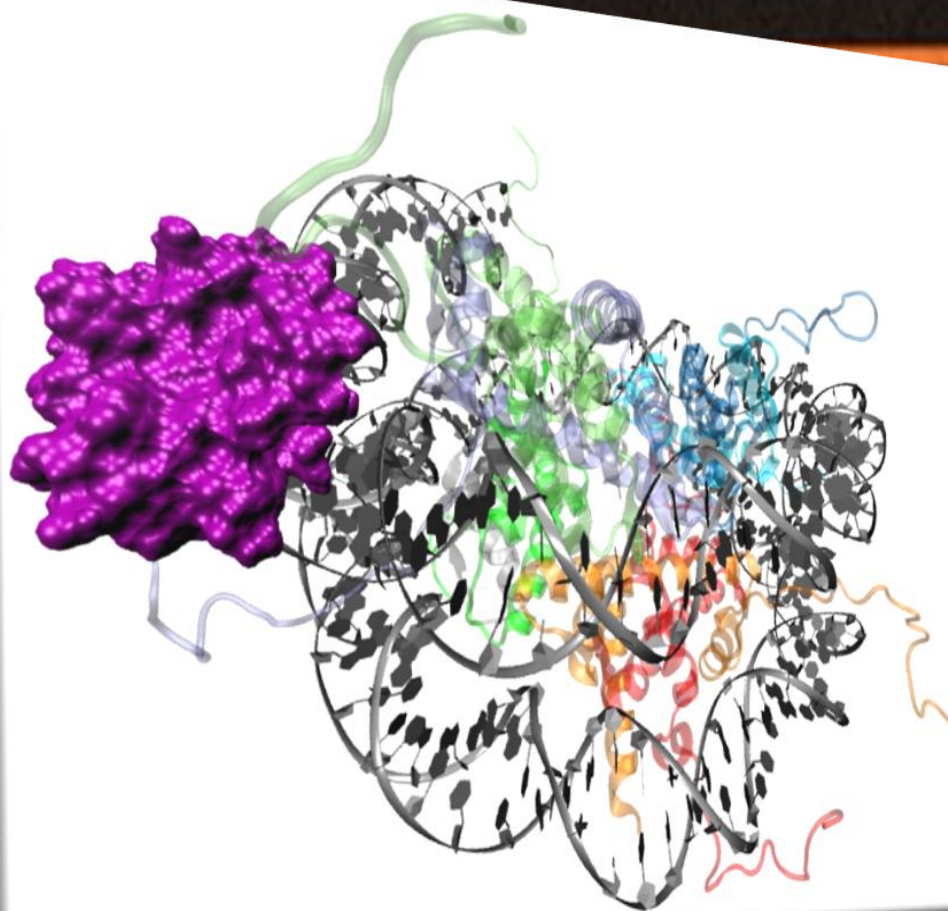


Estudio de la glicación temprana de Histona H1

Buscando blancos para su inhibición y marcadores para
diagnóstico precoz de patologías humanas



Autora: Florencia Klein

Tutora: Dra. Laura Coitiño

Laboratorio de Química Teórica y Computacional (LQTC)

Instituto de Química Biológica

Tesina de graduación
Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias
Universidad de la República (UdelaR)

Abril 2015

Contenido:

Contenido de figuras y tablas	2
Resumen	3
1. Introducción	4
1.1. La glicación y su relevancia biomédica	4
1.2. Las reacciones de glicación y sus productos	5
1.3. Histonas como blanco de glicación	10
1.3.1. Generalidades de las Histonas	10
1.3.2. Subtipos de H1 y sus características	11
1.3.3. Histona H1: estructura, función y reactividad	12
1.4. Los azúcares en la glicación de la Histona H1	14
1.5. Los productos avanzados de glicación (AGES) derivados de H1 y los efectos de su acumulación	18
2. Objetivos	20
2.1. Objetivo general	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. Metodología	21
3.1. Reactividad de los residuos básicos del dominio globular de la histona H1	21
3.2. Caracterización de la estructura y dinámica de H1x con el residuo Lys blanco de glicación	22
3.3. Caracterización del mecanismo básico de glicación de Lys por ribosa/ADP-ribosa	24
3.4. Caracterización de la estructura y propiedades de BS y PA sobre la Lys más reactiva	25
3.5. Tendencia a la oxidación de 2LSO y la sinergia con la glicación	25
4. Resultados y discusión	27
4.1. Reactividad de los residuos básicos: Lys75 como blanco de glicación primario	27
4.2. Efecto de la desprotonación de Lys75 sobre la estructura y reactividad de Lys/Arg	29
4.3. Mecanismo de glicación de Lys por ribosa/ADP-ribosa y la estructura de BS y PA	30
4.4. Caracterización de BS y PA de Lys75 con ribosa en H1 y la reactividad Lys/Arg	35
4.5. Oxidación de 2LSO y sinergia con la glicación	38
5. Conclusiones	40
Glosario de términos técnicos	43
Bibliografía	45
Anexo: información suplementaria tabulada	56
Agradecimientos	60

Listado de figuras y tablas:

Figuras:

Figura 1. Diagrama sobre las etapas temprana/ intermedias/ avanzadas de diferentes reacciones de glicación	6
Figura 2. Mecanismo de reacción básico para las etapas de glicación temprana /intermedia por ADP-ribosa.....	7
Figura 3. Categorías principales de productos de glicación avanzada (AGEs)	8
Figura 4. Esquema de la disposición de la histona H1 en el nucleosoma.....	10
Figura 5. Dominio globular de la histona H1x humana	13
Figura 6. Caminos de generación de ADP-ribosa libre y sus posibles destinos metabólicos.....	16
Figura 7. Diagrama de flujo en la generación de AGEs a partir de H1 y ADP-Ribosa en respuesta al daño celular.....	17
Figura 8. Esquema hipotético para la generación de AGEs derivados de la reacción con histonas	18
Figura 9. Esquema de los modelos explorados para Lys 7 y Lys36.....	21
Figura 10. Definición de las regiones QM	23
Figura 11. Residuos oxidables en H1x	26
Figura 12. Residuos del dominio globular más reactivos según la dureza calculada a nivel B3LYP y ω B97X-D	28
Figura 13. Dureza por residuo básico a nivel B3LYP y ω B97X-D sobre diferentes estructuras del dominio globular.....	29
Figura 14. Análisis conformacional de la ribosa en su isómero <i>gauche</i> y <i>anti</i>	30
Figura 15. Estructura de los cuatro primeros TS de la reacción de glicación con ribosa a nivel B3LYP/6-31+G**	30
Figura 16. Perfil global de ΔG^{298} a nivel B3LYP y ω B97X-D para las cuatro etapas de glicación de Lys con ribosa.....	31
Figura 17. Estructura PCM-B3LYP del TS correspondientes a TS _{1W} y TS _{2W}	33
Figura 18. RMSD y RMSF C α de la proteína H1-WT y modificada en Lys75 a H1-BS y H1-PA	35
Figura 19. Comparación de la estructura de H1-WT, H1-BS y H1-PA	36
Figura 20 Reactividad comparada de Lys/Arg en la serie H1 WT, BS y PA con los dos funcionales de la densidad	37
Figura 21. Resumen gráfico de los cambios de exposición y reactividad luego de la modificación en K75	37
Figura 22. Identificación de los átomos con mayor tendencia a oxidar dentro del residuo Trp39 de H1.....	39

Tablas:

Tabla 1. Porcentaje de residuos básicos (Arg/Lys)	10
Tabla 2. Principales características de los diferentes subtipos de histona H1	11
Tabla 3. Localización de residuos glicosados por glucosa en histonas H2B y H1 de ratas diabéticas	14
Tabla 4 Efecto de la región QM sobre la predicción de la dureza de residuos Lys.....	22
Tabla 5. Área expuesta (SASA), pKa estimado y reactividad de los residuos básicos de H1	27
Tabla 6. Órdenes de enlace de Wiberg obtenidos para las cuatro etapas de reacción con ribosa	31
Tabla 7. Barreras de activación $\Delta^\ddagger G^{298}$ PCM-B3LYP/6-31+G** para los cuatro pasos	32
Tabla 8. Órdenes de enlace de Wiberg para TS2 bajo escenarios catalíticos con N = 1 y 2.	34
Tabla 9. Energía del KS-HOMO ONIOM por residuo oxidable en la serie H1sp/H1-WT-oniom/H1-BS _{K75} /H1-PA _{K75}	38

Resumen

La glicación es un proceso no enzimático que provoca la modificación post-traducción de péptidos y proteínas, alterando su estructura y otras propiedades relevantes para su función. Inicia por ataque nucleofílico de residuos Lys/Arg sobre carbonilos reductores (RCs) formando Bases de Schiff (BS), Productos de Amadori (PA) y *Advanced Glycation End-Products* (AGEs) respectivamente como productos de glicación temprana, intermedia y avanzada. La acumulación de productos de glicación en proteínas centrales para un organismo sano ha sido vinculada al desarrollo de diversas patologías humanas (diabetes, mal de Alzheimer y cáncer entre otros) y al daño por envejecimiento fisiológico, evidenciándose recientemente su sinergia con el daño por estrés oxidativo. En particular, siendo una proteína nuclear de larga vida con alto contenido de residuos básicos reactivos y que está expuesta en el nucleosoma, la histona H1 resulta un excelente blanco de glicación por RCs nucleares como la ribosa y la ADP-ribosa. Estas modificaciones tienen potencial impacto sobre la doble función de H1 en el mantenimiento estructural de la cromatina y el silenciamiento epigenético.

En este trabajo se identificó a nivel QM/MM ONIOM(DFT:AMBER) al residuo Lys75 como sitio de glicación principal en H1, seguido de Lys79 como posible blanco secundario. Examinados la *performance* de tres funcionales de la densidad (DFT = B3LYP, M06 y ω B97X-D) para predecir la reactividad de Lys/Arg en H1 y el desempeño de estrategias clásicas (MM+MD) y mixtas ONIOM(QM:MM) para caracterizar los efectos de desprotonar Lys75 previo a glicarse en H1-WT (todos sus residuos básicos tienen pKa en el rango 9-13), se concluye que las estructuras MM+MD obtenidas son representativas y las correcciones por dispersión electrónica sólo son necesarias para modelar correctamente la reactividad de un par de residuos Arg (y Trp) más sensibles a efectos del entorno. También se evaluó a nivel ONIOM(B3LYP:AMBER) la tendencia a oxidar de H1 mediante la energía del orbital KS-HOMO sobre Met/Tyr/Trp y la función de Fukui f^+ condensada (calculada con cargas NPA a nivel PCM-B3LYP/6-31G(d,p) sobre una región amplia de H1 de 545 átomos). Se identificó a Trp39 como residuo más propenso a oxidar en H1-WT distanciado del resto, y la necesidad de considerar los efectos del medio. También a nivel PCM-DFT se caracterizó el mecanismo de las primeras 4 etapas de reacción de Lys con ribosa/ADP-ribosa en solución acuosa, caracterizando la Base de Schiff (BS) y el Producto de Amadori (PA) correspondientes y corroboró la asistencia activa por moléculas del solvente (agua) y la activación del carbonilo reductor al incorporar ADP en ribosa, consistentemente con el conocimiento pre-existente. A partir de lo anterior se caracterizó la estructura de las modificaciones de H1-WT por glicación con ribosa en Lys75 a H1-BS/H1-PA, analizando cómo se altera la estructura y comportamiento dinámico de H1 y la reactividad de los residuos Lys/Arg restantes (Lys79 se mantuvo como siguiente blanco de glicación en H1-BS, activándose gradualmente Lys66, que acaba siendo blanco de glicación primario en H1-PA, seguido de Lys7 y/o Arg78 según el funcional usado). La tendencia a oxidar de Trp39 aumenta con la glicación, manteniéndose como el sitio de oxidación principal a través de las modificaciones de H1 (con posible participación secundaria de Met3). Todo esto corrobora la hipótesis de sinergia glicación-oxidación para el sistema H1-ribosa y aporta elementos clave para el diseño de inhibidores/revertidores específicos de glicación en H1, para lo que H1-BS_{K75} se presenta como mejor candidato.

Palabras clave: Glicación; Histona H1; reactividad y mecanismos.

1. Introducción

1.1. La glicación y su relevancia biomédica

Desde fines de la década del 70, los procesos de glicación o glucosilación no enzimática y la acumulación de productos que se forman como resultado de la transformación que éstos generan en aminas biológicas, han sido vinculados con el desarrollo de diversas enfermedades que en la actualidad afectan y conciernen al mundo entero. Estas patologías (entre las que se incluyen la diabetes, el mal de Alzheimer y el cáncer, todas con gran impacto en nuestro país tanto por su alta incidencia como por la falta de terapias específicas totalmente efectivas) están conectadas con la aparición y acumulación de modificaciones post-traducción en proteínas y péptidos que cumplen roles centrales en la fisiología del organismo sano. Así es que la glicación de proteínas (y también del ADN) se ha convertido en un problema de gran interés en investigación básica y en el terreno biomédico [1].

Según datos de la *Comisión Honoraria de la Lucha contra el Cáncer* (CHLCC) tomados en el período 2006-2010, cada 100.000 habitantes mujeres en Uruguay 255 poseían algún tipo de cáncer; en el caso de los hombres dicho valor aumentaba a 351 de cada 100.000 [2]. Por otro lado, datos relevados en 2008 por el *Programa Nacional de Diabetes* del Ministerio de Salud Pública indicaban que el 8.2% de la población uruguaya tenía diabetes y otro 8% era susceptible a presentar dicha enfermedad en el futuro [3]. Finalmente, según un estudio realizado por Ketzoian *et al.*, la incidencia del mal de Alzheimer en nuestro país era por su parte en 1997 del orden del 4.1%, con una de las tasas de crecimiento anual más altas reportadas en América Latina y con el agravante que si bien tradicionalmente se la consideró una patología de edad longeva, en los últimos años se ha venido notando un desplazamiento progresivo en la edad de aparición hacia poblaciones más jóvenes [4], siendo su detección precoz una de las metas principales en la actualidad en esa área de la medicina. Estos datos muestran la relevancia y necesidad a nivel nacional de contribuir a la búsqueda de nuevos bio-marcadores para diagnóstico temprano del daño molecular subyacente a estas patologías y al desarrollo de potenciales fármacos que puedan detener o revertir el avance de los procesos de glicación sobre proteínas fundamentales para el organismo sano con consecuencias dañinas al alterar su estructura, propiedades y función.

Se sabe al presente que la glicación compromete las funciones de una gran cantidad de proteínas como ser la hemoglobina [5; 6], la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa [7], la glutatión reductasa [8], la glutatión peroxidasa [9] y la Cu-Zn superóxido dismutasa [10], entre otras. El eje de esta tesina de graduación se dirige a la glicación de histonas, de la que existe evidencia experimental *in vitro* e *in vivo* [11; 12] y ha sido vinculada hasta el momento con la aparición de complicaciones de distinto tipo ligadas al desarrollo de *diabetes mellitus* (DM) y a través de ésta última con el del mal de Alzheimer (con una

incidencia de este mal en diabéticos tres veces más alta que en personas sanas [13]) y con el desarrollo de cáncer [1].

1.2. Las reacciones de glicación y sus productos

Desde el punto de vista químico, la glicación es un proceso complejo que implica una cascada de reacciones no enzimáticas, también conocida como reacción de Maillard, siendo descrita por primera vez por Louis-Camille Maillard en 1912 [14]. Sin embargo no fue hasta 1958 que Allen *et al.* reportaron el primer caso de una proteína glicada *in vivo*, caracterizada en 1968 por Bookchin y Gallop como HbA_{1c}, una variante de la hemoglobina glicada por glucosa que algunos años más tarde Cerami y colaboradores propondrían como marcador para el control de glicemia en pacientes diabéticos, según establecen Rabbani y Thornalley en una revisión reciente de la historia de la investigación en glicación [15]. A finales de la década de los 70' y principios de los 80' grupos como los de Jacobson, Sugimura y Hilz empezaron a prestar interés por el desarrollo de este proceso en organismos vivos [15; 16] y fue a partir de trabajo fundamental de Monnier y Cerami que se comenzó a asociar a la glicación y la acumulación de sus productos con el desarrollo de patologías y efectos deletéreos del envejecimiento [17].

La glicación no debe ser confundida con la glicosilación de proteínas, que corresponde a la adición de carbohidratos catalizada por enzimas que conduce a la formación de glicoproteínas y ocurre sobre residuos proteicos (Asn, Thr, Ser) [15; 16] de distinta naturaleza a aquéllos que son blanco de la glicación [17; 18].

Este proceso complejo se da entre especies carbonílicas reductoras (RCs) por una parte (entre las que se incluyen diversos azúcares en su forma aldehídica acíclica -como ser glucosa, fructosa, ribosa y ADP-ribosa [17; 18], entre otros- y oxoaldehídos derivados de los primeros, como glioxal y metilglioxal [15; 17-20] y por otra parte grupos amino primarios de proteínas y péptidos o del ADN (ver Figura 1).

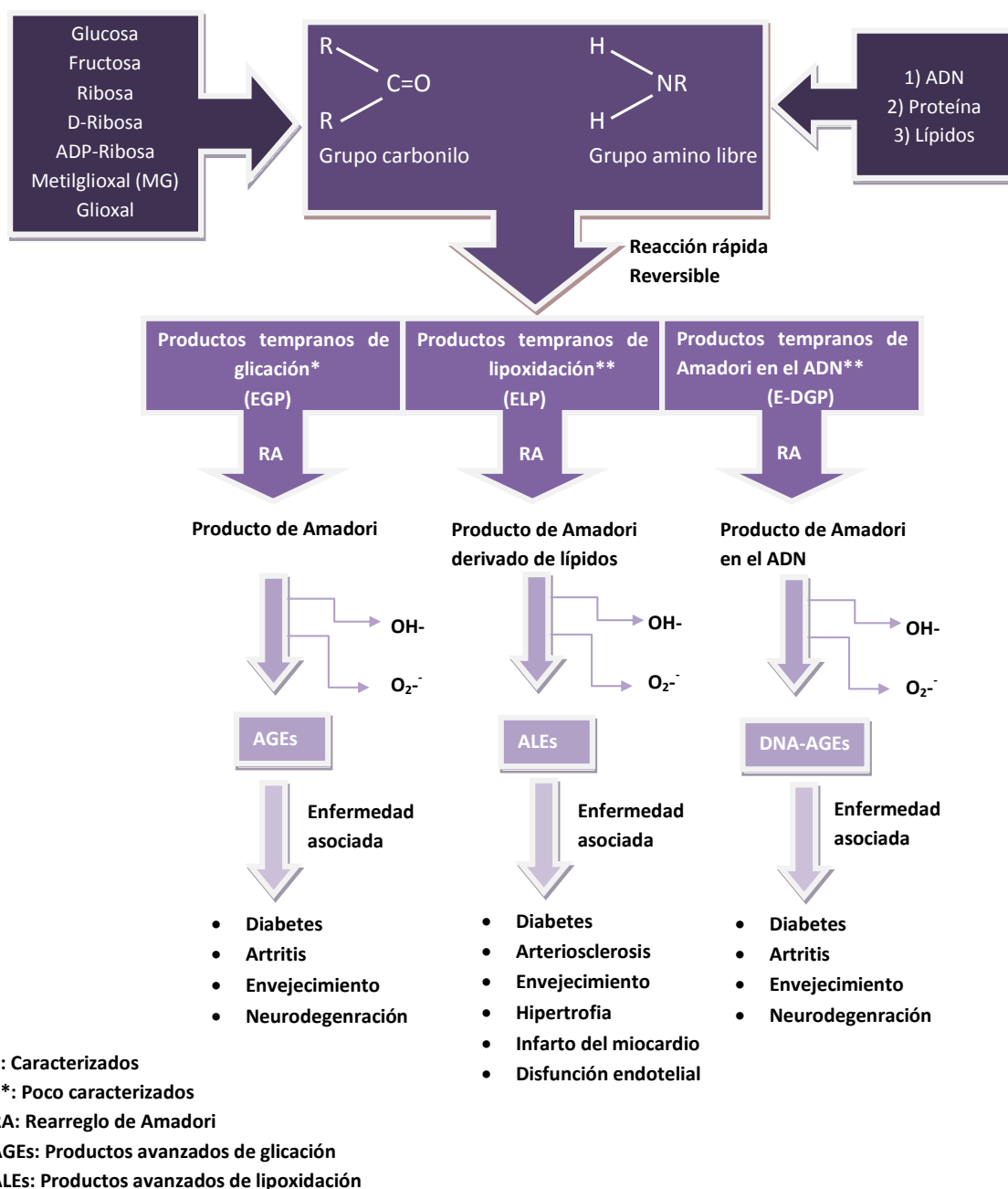


Figura 1. Diagrama sobre las etapas tempranas, intermedias y avanzadas de diferentes reacciones de glicación con sus enfermedades asociadas. Modificado de Ahmad *et al.* [21].

Su mecanismo involucra varios pasos, de los cuales los primeros son relativamente lentos y reversibles, mientras que los finales suceden a mayor velocidad y son irreversibles, cruzándose con caminos de oxidación y formación de radicales cuyo mecanismo molecular detallado es hasta el momento poco conocido [1; 17; 18]. Todo ello hace que en primer instancia sean las especies involucradas en las primeras etapas de la glicación las que se consideran mejores blancos potenciales para el desarrollo de fármacos anti-glicación y para identificar biomarcadores precoces del avance del daño experimentado a nivel molecular.

Las primeras etapas reversibles (ver esquema más detallado en la Figura 2) se identifican como etapas de glicación temprana e intermedia [15; 17]. La adición nucleofílica inicial sobre un carbonilo reductor tiene entre sus protagonistas biológicos a grupos amino presentes en las bases nitrogenadas del ADN y en aminoácidos que integran péptidos y proteínas (en especial grupos $^{\epsilon}\text{NH}_2$ y guanidinio en la cadena lateral de residuos Lys y Arg, respectivamente, y grupos amino N-terminales) formando carbinolaminas (CBLAs) de vida corta que se transforman por pérdida de agua en Bases de Schiff (BSs, aldíminas, Figura 2) en una segunda etapa más lenta. Las dos siguientes etapas intermedias parten de la BS y la molécula de agua formadas y consisten en procesos de isomerización interna catalizados por especies presentes en el medio, que dan lugar a un enol (enaminol) y a Productos de Amadori (PA, cetoaminas, Figura 2). Mientras que la formación de la BS se logra en minutos o pocas horas, en términos generales el PA se obtiene en semanas [22].

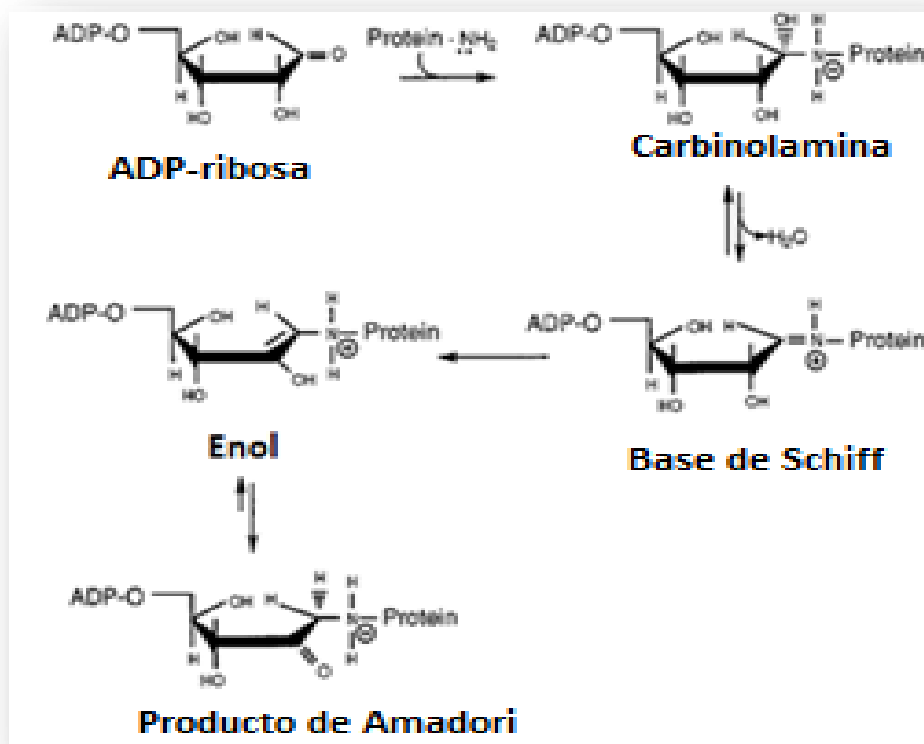


Figura 2. Mecanismo de reacción básico para las etapas de glicación temprana e intermedia de proteínas por ADP-ribosa. Primera etapa: formación de carbinolamina (CBLA); Segunda etapa: Formación de la Base de Schiff (BS) por deshidratación. Tercera y cuarta etapas: Isomerización de la BS a Enol y Producto de Amadori (PA, cetoamina). Modificado de Cervantes-Laurean *et al.* [11].

Más adelante, en las etapas de glicación avanzada, esos productos intermedios terminarán formando compuestos heterocíclicos, varios de ellos con propiedades fluorescentes e inmunogénicas, denominados "productos finales de glicación avanzada" (AGEs, por "advanced glycation end-products") que ya vienen siendo utilizados como marcadores clínicos para el seguimiento del avance de la glicación de varias proteínas con clara vinculación a patologías humanas (ver la Figura 3 general y la sección 1.5 por los aspectos específicos al sistema blanco en estudio) [1; 17; 18; 23; 24].

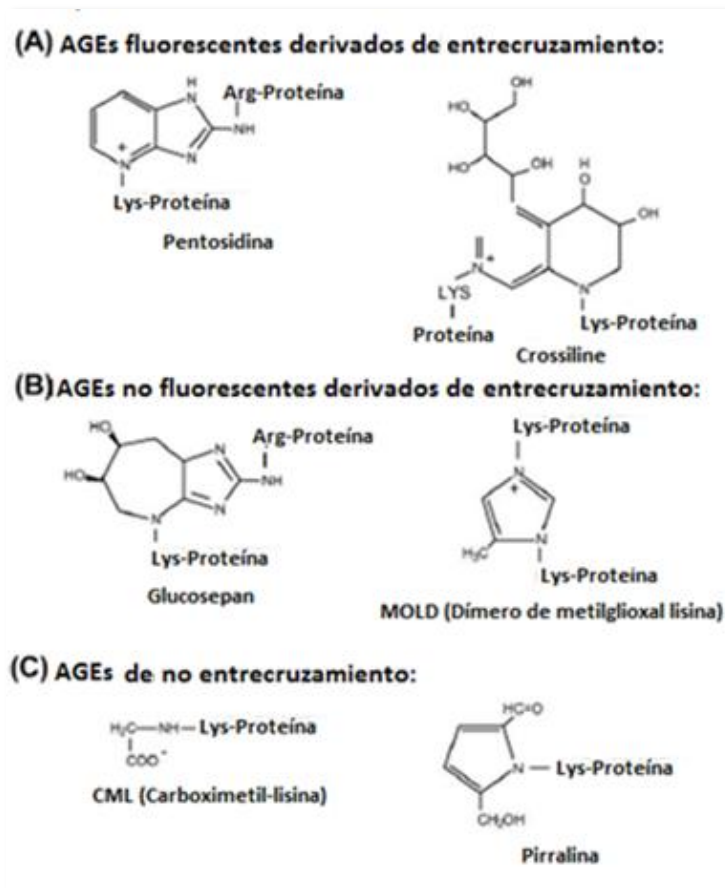


Figura 3. Categorías principales de productos de glicación avanzada (AGEs) en base a su origen por entrecruzamiento y propiedades fluorescentes. Modificado de Peyroux *et al.* [25].

La reactividad de la amina biológica hacia la glicación es determinada por diversos factores, como el pK_a del grupo amino nucleófilo, su exposición a la superficie de la proteína (que define su accesibilidad al RCs) y el ambiente local generado por los residuos vecinos del péptido/proteína/nucleobase [26]. Se espera que grupos amino con pK_a bajo (y por tanto mayor tendencia a hallarse en forma desprotonada bajo condiciones fisiológicas) sean más reactivos debido a la mayor nucleofilia de la forma $-NH_2$ frente a la forma $-NH_3^+$. Estudios realizados por Venkatraman *et al.* sobre péptidos representativos organizados en hélice α , mostraron mediante ensayos de dicroísmo circular (CD) y espectrometría de masas (MS) que la formación de Productos de Amadori sobre Lys se ve aumentada en proximidad de residuos básicos His/Arg y ácidos Asp que catalizan la etapa

de conversión a PA [27].

En cuanto a la catálisis por moléculas del medio, estudios de modelado computacional de la glicación de Lys/Arg por los oxoaldehídos glioxal (GO) y metilglioxal (MG) como RCs desarrollados al nivel ω B97X-D/6-31+G* por Nasiri *et al.* mostraron el rol fundamental de moléculas de agua actuando como agente catalítico, logrando disminuir hasta en 8 Kcal/mol la barrera de activación al incluir $n = 0, 1, 2$ moléculas de agua explícita en el modelo material del proceso, siendo el pasaje de $n=1$ a $n=2$ el cuantitativamente más relevante en dicha disminución [28; 29].

Con el tiempo, las proteínas del cuerpo sufren modificaciones post-traducción tales como la glicación y la oxidación. Los resultados de muchos estudios han llevado a plantear la hipótesis de que estas dos reacciones están fuertemente interconectadas y se retroalimentan mutuamente [30; 31]. La existencia de esta sinergia glicación-oxidación [32] es analizada en la presente tesina de graduación para el caso particular del dominio globular de la Histona H1 frente a su glicación por ribosa. La glicación puede ser catalizada por metales y a partir de ello es que se la asocia con la generación de especies reactivas oxigenadas (ROS) y con la oxidación, haciendo referencia el término glicoxidación a ambos procesos [33]. Autores como Guedes *et al.* plantean que al aumentar el grado de glicación de una proteína, su tendencia a oxidar también aumentaría; a su vez, la tendencia a glicar también se vería aumentada por la presencia de modificaciones oxidativas en la proteína, generándose una especie de cascada retroalimentada [31; 34].

El término glicoxidación se ha empleado tanto para hacer referencia a la autooxidación de azúcares y otros RCs unidos a proteínas [35], como a la glicosilación autooxidativa donde radicales generados por RCs libres interactúan con las proteínas [36]. Los radicales asociados a la glicoxidación generan productos reactivos de larga vida que se encuentran unidos a las proteínas y la formación de aductos oxidativos como carboximetil-lisina (CML) y pentosidina. Estos productos se forman preferencialmente en proteínas que ya fueron glicadas, quedando en evidencia el efecto cíclico de la reacción.

En el caso particular de la histona H1, estudios realizados por Guedes *et al.* usando MS muestran que al incubar la histona H1 nativa (WT, por “*wild type*” en inglés) en condiciones oxidativas leves, el daño oxidativo resultante es del orden del 7% mientras que en condiciones oxidativas fuertes dicho valor aumenta un 6%. Por otro lado, en histonas ya glicadas, el daño oxidativo fue mayor y ocurrió más tempranamente que en el experimento anterior, encontrándose un mayor número de residuos oxidados (un 19% bajo condiciones leves de oxidación, mientras que bajo condiciones fuertes alcanza al 24%) [31].

1.3. Histonas como blanco de glicación

1.3.1. Generalidades de las Histonas

Las histonas son las proteínas más básicas de la cromatina, ricas en residuos de Lys/Arg y por ello constituyen un muy buen blanco para la glicación, con consecuencias sobre su estructura, propiedades y función. Evolutivamente son proteínas conservadas, responsables de la condensación, organización y regulación del ADN dentro del núcleo de todos los organismos eucariotas [37] y algunas arqueas, no así en bacterias [38].

En condiciones normales hay cinco tipos de histonas que se caracterizan por tener diferente contenido de aminoácidos básicos (ver **Tabla 1**), a saber: H1, H2A, H2B, H3 y H4 [39].

Tabla 1. Porcentaje de residuos básicos (Arg/Lys) y relación respecto a los residuos ácidos en cada tipo de histona. Modificado de Lewin [39].

Tipo de Histona	% Aminoácidos básicos		Relación residuos ácidos/básicos
	Lys	Arg	
H1	29%	1%	5,4
H2A	11%	9%	1,4
H2B	16%	6%	1,7
H3	10%	13%	1,8
H4	11%	14%	2,5

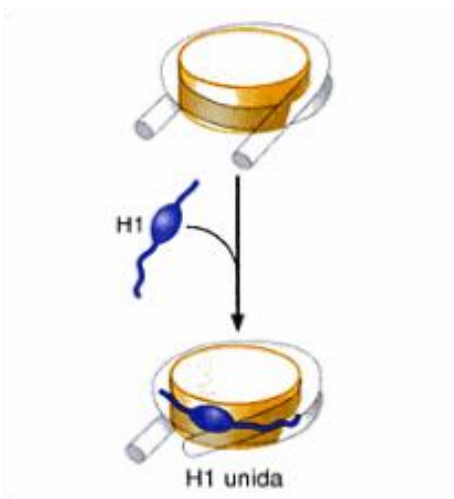


Figura 4. Esquema de la disposición de la histona H1 en el nucleosoma. Tomado de Bell *et al.* [4].

Las histonas centrales del nucleosoma se organizan como dímeros H2A-H2B y tetrámeros H3-H4, formando un *core* alrededor del cual se enrolla el ADN. La histona H1 no pertenece al nucleosoma central sino que se une al ADN ligador ("*linker*") tal como se muestra en la Figura 4 denominándose "histona ligadora". La misma desempeña un papel relevante en la regulación y mantenimiento de la estructura de la cromatina [40-42] siendo un componente bastante móvil comparado con las histonas centrales [43; 44].

1.3.2. Subtipos de H1 y sus características

La expresión de la histona H1 varía entre las distintas especies y tejidos, siendo la familia menos conservada en mamíferos [45] conociéndose más de once variantes descriptas en seres humanos [46] cuyas características se recogen en la **Tabla 2**.

Los subtipos H1.1-H1.5 están presentes en todas las células somáticas y se expresan de manera dependiente de la replicación [47-49]. La composición variada de subtipos de H1 en diferentes tejidos, tipos de células y estadios de desarrollo sugiere funciones específicas para cada subtipo individual. Esto se reafirma por la distribución intracelular variada de los subtipos [49], siendo en la actualidad desconocida la precisa localización de la histona H1 en la fibra de la cromatina [50].

Tabla 2. Principales características de los diferentes subtipos de histona H1

Subtipo	Expresión	Localización/Distribución en el núcleo	Expresión-Replicación
H1.1	Ubiquitinada	n/d*	Dependiente
H1.2		Uniforme	
H1.3		Desigual	
H1.4		Desigual	
H1.5		Periferia núcleo [51]	
H1 ^o	Células diferenciadas	Heterocromatina y zona perinucleares [52; 53]	Independiente
H1x	Ubiquitinada [54]	Zonas resistentes a la nucleasa micrococcica [55]	Regulación diferente
H1t, H1T2, H1LS1	Espermagénicos [56]	n/d*	n/d*
H1foo	Ovocitos [57; 58]	n/d*	n/d*

*n/d= No determinado

El subtipo H1^o se considera de reemplazo y replica de manera independiente, restringiéndose por lo tanto principalmente a células cuyo crecimiento se encuentra detenido (ver sus características en la **Tabla 2**) [59]. Estudios de microscopía revelaron que por su parte el subtipo H1.2 genera en el núcleo una distribución específica en el ADN nuclear, significando que su propia distribución es uniforme, a diferencia de lo que ocurre con H1.3 y H1.4 (ver **Tabla 2**) [60]. A su vez, H1x se encuentra en la región del cromosoma resistente a la nucleasa micrococcica [55], significando que frente a condiciones adversas seguirá interaccionando con el ADN. Esta variante exhibe al mismo tiempo menor solubilidad en condiciones ácidas comparada con el resto de los subtipos. La cantidad de H1x no se ve afectada ni por el arresto del ciclo celular ni por el avance de la fase S. Por lo tanto la regulación de su expresión difiere tanto respecto a los subtipos de H1 que se replican independientemente (H1^o) como los que lo hacen de manera dependiente (desde H1.1-H1.5) [55]. Estos subtipos se expresan durante la fase S del ciclo celular de manera de poder acomodar la cromatina al ADN recién replicado; el subtipo H1^o se acumula

cuando la célula deja de proliferar y se empieza a diferenciar; la expresión del subtipo H1x es regulada de manera nada similar a ninguno de los dos subtipos anteriores, sus cantidades no cambian luego del arresto del ciclo celular en G1 ni en el avance de la fase S, asumiéndose por lo tanto que se localiza en genes ribosomales inactivos [55]. Los subtipos H1⁰ y H1x poseen muchas características en común debido a que ambos pertenecen a genes solitarios localizados en los cromosomas humanos 22 y 3 respectivamente, no poseen intrones y sus ARNm se encuentran poliadenilados [57].

1.3.3. Histona H1: estructura, función y reactividad

Experimentos realizados por Talasz *et al.* con células endoteliales mostraron que a pesar que cada histona del *core* del nucleosoma sería intrínsecamente mucho más reactiva *in vitro* frente a la glicación que las histonas H1, al estar organizadas en el *core* como dímeros/tetrámeros poco expuestos al medio, su capacidad de glicarse se ve muy disminuida (especialmente en el tetrámero H3-H4) respecto a lo que corresponde a la histona H1, que acaba siendo en los hechos la histona más reactiva [12].

La histona ligadora no está presente en todos los nucleosomas, pero cuando lo está hace contacto con el ADN en su entrada y salida a la partícula del nucleosoma [45;61] tal como se aprecia en la Figura 4, siendo su posición determinante de cuánto pueda acceder la maquinaria celular a los mensajes genéticos. H1 interactúa con 146 pares de bases del ADN ligador [62] encargándose de estabilizar al nucleosoma y al mismo tiempo de contribuir a la compactación de la cromatina, haciéndola más o menos accesible a la maquinaria de transcripción del ADN y actuando también en la activación o inhibición de genes [63-65], de ahí su importancia como proteína blanco hacia el desarrollo de cáncer, entre otras patologías vinculadas a la glicación. Adicionalmente, se ha reportado que las modificaciones de H1 activan el proteosoma nuclear en células cancerosas [66; 67], pero se ha mostrado que las histonas que son ampliamente modificadas por procesos de glicación son resistentes a la degradación del mismo [68].

Estructuralmente la histona H1 es la más grande de los cinco tipos; posee en su secuencia 220 aminoácidos (con un porcentaje total de residuos Lys/Arg del orden del 32%) que en metazoarios aparecen organizados en tres dominios con distinto grado de conservación y a los que se atribuye distintas funciones, a saber: un dominio globular central altamente conservado (tanto desde el punto de vista evolutivo como entre variantes de la proteína) y los extremos N- y C-terminal que lo rodean, divergentes y sumamente básicos [57].

Su región C-terminal es la más extensa, con cerca de 100 aminoácidos de longitud [57], que contienen a más de la mitad de los residuos Lys y Arg, cargados positivamente (40% aproximadamente sólo de Lys) [37; 66; 69]. La región amino terminal tiene por su parte ~45 aminoácidos y se la puede subdividir en dos sub-regiones: un extremo donde la secuencia es rica en residuos hidrofóbicos y una zona más cercana al dominio globular

que, al igual que como ocurre con el extremo C-terminal, es también rica en aminoácidos básicos [57; 70]. Esta zona básica localizada junto al dominio globular ha sido caracterizada como una estructura secundaria de tipo hélice α en presencia de ADN, mientras que para la región hidrofóbica no se ha logrado determinar la estructura por cristalografía de rayos X, considerándose desestructurada [71]. Se sabe que la cola N-terminal tiene mínimos efectos sobre la unión a la cromatina [72]. El principal determinante de la unión de los subtipos de H1 con la cromatina se encuentra en la cola C-terminal, que es la región más divergente de las tres [43; 73].

Su dominio globular posee un largo aproximado de 75 aminoácidos siendo la porción de la proteína más conservada entre los diferentes subtipos [57] y por sí sola logra proteger 20 pares de bases (bp) adicionales del total de 147 pares de nucleótidos del *core* del ADN nucleosomal. La histona H1 puede ser pensada como un módulo independiente que se encarga de la unión al nucleosoma, mientras que su cola C-terminal se encuentra unida al ADN ligador entre dos nucleosomas adyacentes [65]. La estructura en solución del dominio globular de la histona ligadora H1x humana (residuos 44-123) determinada por NMR en solución fue depositada en el PDB Databank (código PDB 2LSO) [74] en 2012, que es la estructura de referencia utilizada en este estudio, tal como se la representa en la Figura 5. La misma se organiza en tres α -hélices y tres hojas β que representan respectivamente 42% y 12% de su estructura secundaria.

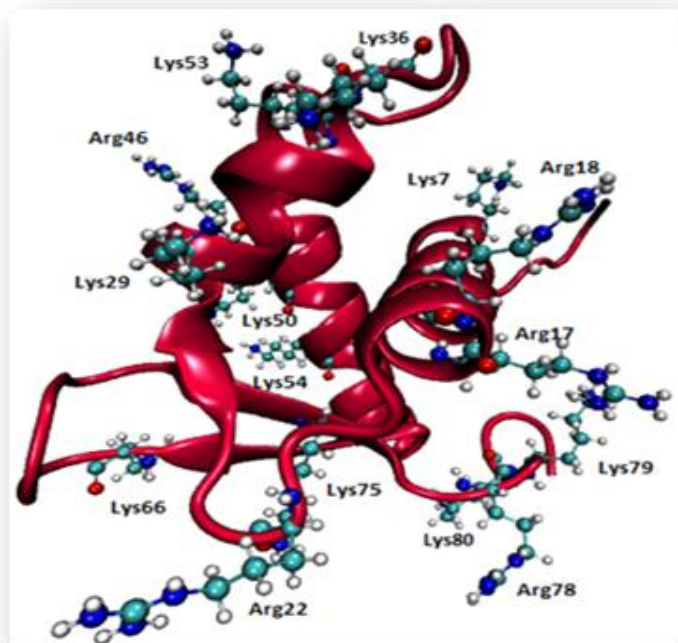


Figura 5. Dominio globular de la histona H1x humana (residuos 44-123) en solución determinado por NMR (PDB ID: 2LSO [74]). Representación tridimensional generada con el paquete VMD [75].

Determinar el destino de las histonas modificadas por glicación y glicoxidación es importante ya que este tipo de alteración de las cadenas aminoacídicas puede intervenir en el código epigenético de las histonas. Se sabe que el mismo involucra a numerosas modificaciones post-traducción reversibles (acetilación, fosforilación, metilación, poliADP-ribosilación y ubiquitinación) sobre las regiones amino terminales que van a cambiar la forma/fuerza de unión al ADN en el nucleosoma, estando todas involucradas en las funciones regulatorias del procesamiento de la información genética [67; 76].

1.4. Los azúcares en la glicación de la Histona H1

Estudios *in vitro* de la glicación de las Histonas H1 y H2 desarrollados recientemente por Guedes *et al.* usando MS revelaron que la glicación por parte de azúcares en estas proteínas se localiza principalmente sobre residuos Lys de su estructura (existiendo múltiples sitios de glicación ante la modificación de H1 por glucosa, tal como se recoge en la **Tabla 3**) y que la misma induce en la proteína un estado pro-oxidante (en el que la oxidación de H1 sería más veloz y se daría en mayor extensión una vez glicada) [31].

Tabla 3. Localización de residuos glicosados por glucosa en histonas H2B y H1 de ratas diabéticas. Tomado de Guedes *et al.* [31].

Posición	Secuencia de glicación	Masa molecular	# Lys modificada ^a
H2B			
5-23	AKSAPAPKKGSKKAVTKAQ	2220,2505	12;16
5-23	AKSAPAPKKGSKKAVTKAQ	2220,2476	12;13
35-41	KESYSVY	1037,4603	35
100-114	RLLLPGELAKHAVSE	1749,9799	109
115-116	GTKAVTKYTSSK	1432,7509	117
H1			
5-25	APAAPAAAPPAEKTTPVKKKAA	2487,3401	21;22;23
9-32	PAAAPPAEKTTPVKKKAAKPPAGAR	2545,4105	27
128-140	PKKAAGAANKTKK	1520,9149	136
149-162	KTAKKTPKKAKKPA	1719,0308	157
168-172	KKVAK	735,4622	172
161-178	PAAAATKVKVAKSPKAK	1972,1338	175
182-201	PKAAKSAKAVKPKAAKPK	2342,4287	199;201
191-203	KAVKPKAAKPKVA	1513,9228	201
196-201	KAAPK	804,4822	199

^a Numeración correspondiente a la secuencia original completa de la proteína, notar que la secuencia usada para 2LSO y estructura derivadas está desfasada respecto a la misma.

Se comprobó que el número de residuos Lys cargados positivamente accesibles en H1 del hígado de ratas diabéticas se reduce debido a la glicación por glucosa, produciendo cambios en su estructura y disminuyendo también su capacidad para interactuar con el ADN, perdiendo por lo tanto su función principal. Estos cambios además afectarían su capacidad de emitir fluorescencia, por lo que sería posible hacer un seguimiento de la extensión del daño a partir de los espectros de emisión de los productos formados [77].

A diferencia de un organismo que padece diabetes, donde la concentración de glucosa se eleva en forma notable aumentando la velocidad de los procesos en los que está involucrada, en condiciones normales este es uno de los azúcares menos reactivos (comparado a cualquier otro azúcar generado naturalmente) siendo responsable del menor grado de formación de productos de glicosilación [12]. De allí que sea importante enfocar estudios sobre otros azúcares más reactivos entre los que se hallan presentes en el ambiente celular.

Este trabajo se centrará en estudiar cómo afectan a la estructura, carga superficial, reactividad y dinámica de la proteína las modificaciones no enzimáticas inducidas en H1 por ribosa. Debido a que isomerizan a su forma abierta activa (menos estable en solución respecto a la forma cíclica del azúcar) con mayor velocidad, las pentosas reductoras son mucho más reactivas que las hexosas frente a la glicación y glicoxidación de proteínas [33; 78]. Las reacciones de las histonas con pentosas y sus productos vienen siendo estudiadas desde inicios de la década del '90 por Jacobsen, Cervantes-Laurean y otros desde un enfoque experimental [11; 78; 79].

Mientras que la D-glucosa ha sido encontrada en altas concentraciones en la orina de pacientes con diabetes del tipo I, en pacientes con diabetes del tipo II se encontraron concentraciones aumentadas de D-ribosa [18; 80]. Estudios de modelado computacional desarrollados con funcionales de la densidad (DFT) permitieron comparar las características de las dos formas (cíclica y abierta) de la D-ribosa en solución acuosa y a diferentes pH, revelando que ambas formas pueden participar en este tipo de reacciones, pero la forma abierta es más reactiva que la cíclica [81].

La ADP-ribosa se genera por distintas vías metabólicas a partir del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD^+ , ver esquema en la Figura 6) que está presente en el organismo en niveles del orden de 100-300 μM y se sabe que es más eficiente que otras posibles fuentes de pentosas frente a la glicación y glicoxidación de histonas [11; 82]. En las células eucariotas NAD^+ posee un rol esencial como coenzima involucrada en la bioenergética de los procesos [16]. Los aceptores conocidos de ADP-ribosa en células eucariotas en diferentes tipos de reacciones (siendo uno de ellos la glicación) son los residuos de: Lys, Arg, Glu, Asp, Cys, fosfo-Ser y Asn [83].

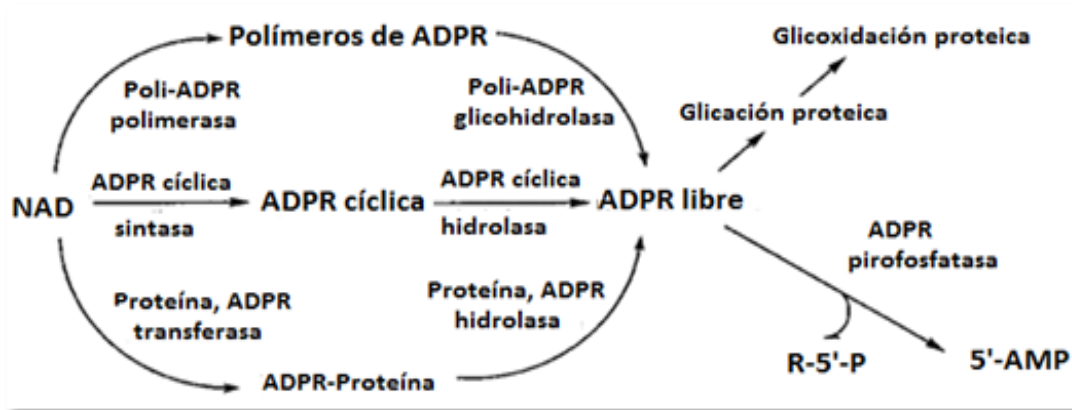


Figura 6. Caminos de generación de ADP-ribosa (ADPR) libre y sus posibles destinos metabólicos. Modificado de Cervantes-Laurean *et al.* [11].

Otro factor relacionado con la eficacia de la ADP-ribosa actuando como agente glicante es que también se ha determinado que presenta gran afinidad por la histona H1 pirofosfatada, lo que puede facilitar su unión a la proteína [11]. Se debe tener en cuenta que la afinidad $\text{H1} \cdots \text{ADP-ribosa}$ es lo suficientemente alta para competir con las interacciones $\text{H1} \cdots \text{ADN}$, sugiriendo esto que la ADP-ribosa puede descondensar a la cromatina localmente, haciendo que distintas macromoléculas de histona H1 se atraigan entre sí [84].

La integridad genómica requiere que cualquier daño sobre las proteínas nucleares sea minimizado y que, si sucede, sea reparado. Por otro lado, las proteínas dañadas deben ser degradadas y remplazadas para mantener la regulación homeostática de la expresión génica. Existen muchos mecanismos para reparar el ADN y el daño de las histonas [67; 85]. La alta concentración intracelular de ADP-ribosa en el microambiente local de las histonas es además una señal frente al estrés oxidativo, que indica futuro daño del ADN. La enzima poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP) es activada por el daño que dicho estrés induce en el ADN [16] y forma polímeros de ADP-ribosa que reaccionan covalentemente con las histonas nucleosomales como parte de la respuesta de defensa celular dirigida a la reparación del ADN. La pérdida de carga positiva en residuos Lys/Arg cargados, que se vuelven neutros por la glicación en general y por el agregado de carga negativa llevado por

el grupo fosfato cuando ésta involucra a la ADP-ribosa, induce la separación de las histonas y el ADN, dejando a éste expuesto para la acción de otras proteínas de reparación [79].

La presencia de una gran cantidad de ADP-ribosa en una pequeña zona de la cromatina facilita que monómeros de este agente glicante se asocien a la Histona H1 modificándola. Todo esto se resume en la Figura 7.

H1 resulta ser el mejor aceptor de PARP *in vitro*, seguido por H2B. Mientras que la histona H1 logra unir cadenas de hasta 15 unidades de ADP-ribosa, las histonas nucleosomales centrales son poli-ADP-ribosiladas por pequeños oligómeros [83].

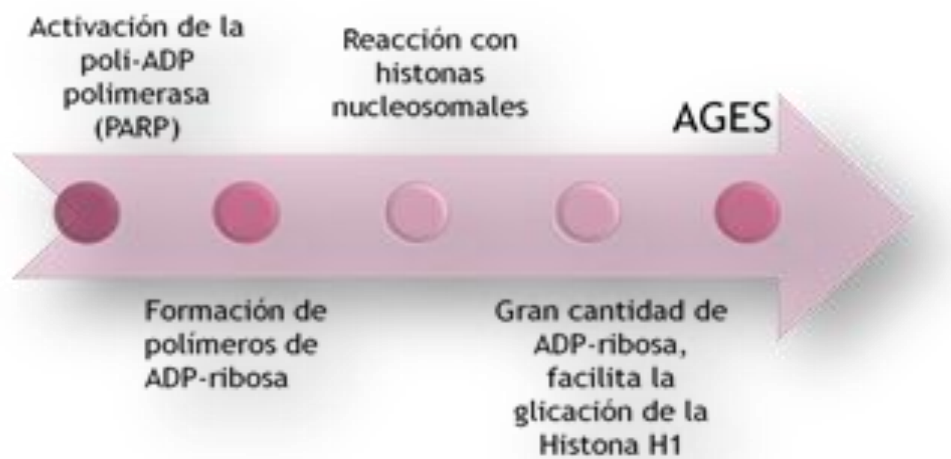


Figura 7. Diagrama de flujo en la generación de AGEs a partir de H1 y ADP-Ribosa en respuesta al daño celular [79].

1.5. Los productos avanzados de glicación (AGEs) derivados de H1 y los efectos de su acumulación

En busca de biomarcadores del daño proteico entre los productos intermedios de glicación y AGEs formados, se encuentran varios estudios que aportan evidencia de la glicación de histonas *in vivo*. Estos muestran que cuando la Histona H1 es expuesta a ribosa y ADP-ribosa forma CML, entrecruzamientos proteína-proteína y otros AGEs fluorescentes (ver Figuras 3 y 8 por una descripción genérica y la correspondiente a las histonas) [11; 23; 25; 79].

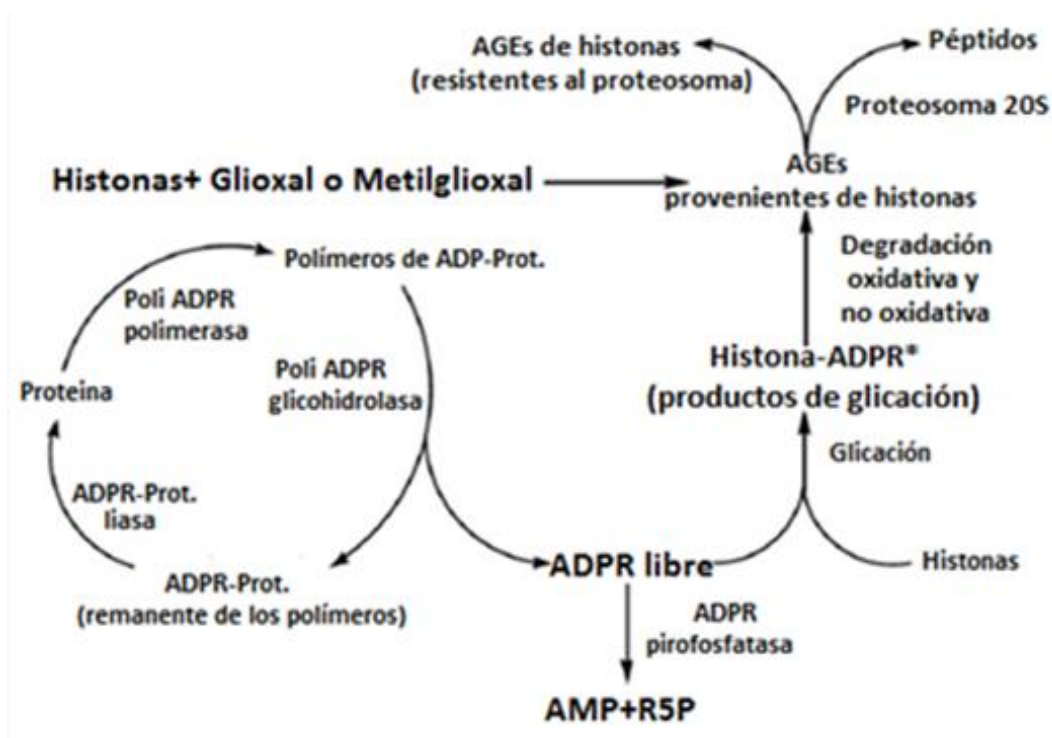


Figura 8. Esquema hipotético para la generación de AGEs derivados de la reacción con histonas. Modificado de Pashikanti *et al.* [79].

La degradación de CML no es completa en el proteosoma, acumulándose remanentes en formas que causan tanto cambios epigenéticos como daño adicional sobre ADN y proteínas [86].

En ratas diabéticas se evidenció la formación *in vitro* de AGEs fluorescentes, con niveles de glicación tres veces más altos respecto al control en las histonas del hígado. A su vez, al comparar animales enfermos de diferentes edades, se determinó que existía una proporcionalidad en el aumento de AGEs a medida que la duración de la diabetes era mayor [87]. La acumulación de AGEs depende de las concentraciones del azúcar (u otras especies RCs que actúen como agente glicante), su tiempo de permanencia en el organismo y la velocidad de modificación que tenga la proteína hacia otros derivados. Como evidencia de esto se ha observado acumulación de AGEs en pacientes con diabetes cuando su concentración de azúcar en sangre es normal, un resultado debido únicamente

al proceso de envejecimiento.

A nivel extracelular se presume que los AGEs son sólo derivados de la glucosa, siendo sus productos de glicación hasta 20.000 veces más reactivos que la propia glucosa [79]. Debido a la baja concentración de glucosa intracelular se asume que la formación de AGEs intracelulares se debe a la larga vida de dichas moléculas en el organismo.

Estos productos pueden unirse a receptores de membrana en la circulación y generar daños intracelulares. La célula posee diferentes receptores de AGEs como ser los receptores capturadores (*scavenger*) de macrófagos, la galectina-3, siendo el más estudiado el Receptor de AGEs denominado RAGE [88]. Este receptor puede ser estimulado por CML, otros AGEs y ligandos tales como las S-100 calgranulinas (grupo de citoquinas pro-inflamatorias), la amfotericina y el péptido β -amiloide, entre otras proteínas/péptidos fibrilares [25]. En el desarrollo de diabetes e inflamación la expresión de RAGE aumenta y la interacción RAGE-AGE en la membrana lleva a generar estrés oxidativo intracelular y a la activación del factor nuclear NF- χ B que modula la transcripción de varios genes [88; 89]. Este factor nuclear es muy importante en la respuesta inmune, relacionada con patologías tales como el cáncer, las enfermedades inflamatorias y autoinmunes, el shock séptico, las infecciones virales o un mal desarrollo inmune general. A su vez se lo involucra en procesos de plasticidad sináptica y memoria [90; 91].

En los últimos años, se han venido desarrollando estudios experimentales dirigidos a identificar y/o desarrollar sustancias capaces de inhibir la formación de los productos de glicación temprana, intermedia y AGEs, con la intención de usarlas para prevenir y tratar las patologías ligadas a su acumulación. En la actualidad existe evidencia clínica que muestra que la inhibición/reducción de la glicación proteica lograría disminuir significativamente el riesgo de desarrollar complicaciones asociadas a la diabetes por glicación [77; 92]. Como potenciales inhibidores se ha identificado al ácido acetilsalicílico (Aspirina[®]), las vitaminas B1 (tiamina), B6 (piridoxina) y la tiamina [93]. Estos estudios han sido realizados sobre bacterias, en las que la histona H1 está ausente, por lo que modelar esta reacción en eucariotas (con especial énfasis sobre las histonas humanas) nos permite reproducir en forma más representativa condiciones similares a aquéllas en que se desarrollan las enfermedades que azotan a la población uruguaya y mundial día tras día.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Esta tesina de graduación se orienta a identificar mediante técnicas bioinformáticas y de modelado computacional de la estructura molecular (y otras propiedades fisicoquímicas asociadas) los sitios más susceptibles de glicación en el dominio central de H1 humana y el mecanismo molecular detallado de las etapas iniciales de glicación entre ribosa y Lys hasta llegar al Producto de Amadori correspondiente. Para ello se comenzó con un modelo reducido (lisina zwitterión más ribosa), analizando el rol del solvente (agua) y la influencia ejercida por la presencia del grupo ADP en la ribosa.

Con la meta de identificar las características de productos iniciales e intermedios de glicación de H1 por ribosa frente a su potencial uso como biomarcadores para diagnóstico precoz de daño por glicación y como blancos para diseñar nuevos inhibidores, se caracterizó también computacionalmente su estructura 3D en el contexto del dominio globular de la H1 humana (2LSO), poniendo especial énfasis sobre el efecto que tiene la glicación sobre la activación de otros residuos Lys/Arg presentes en la estructura proteica y sobre la tendencia a oxidar de la proteína.

2.2. Objetivos específicos

- i. Ajustar distintos aspectos metodológicos para lograr un modelo confiable y representativo del problema.
- ii. Identificar los sitios más probables de glicación (Lys/Arg) en el dominio globular de la H1x humana.
- iii. Determinar *in silico* el mecanismo molecular detallado de las 4 etapas iniciales (incluyendo efectos de catálisis por agua y activación del agente glicante por incorporación de ADP en ribosa) y la estructura de BS y PA usando modelos reducidos.
- iv. Caracterizar productos BS y PA de H1 con ribosa en el sitio de glicación más probable hacia su posterior empleo como blanco de diagnóstico precoz y desarrollo de inhibidores de glicación.
- v. Explorar la existencia de sinergia glicación-oxidación en H1 con ribosa y caracterizarla.

3. Metodología

3.1. Reactividad de los residuos básicos del dominio globular de la histona H1

Para este estudio se trabajó con la estructura en solución del dominio globular central de la histona ligadora H1x humana determinada por NMR (PDB 2LSO) [74] la cual, tal como se aprecia en la Figura 5, contiene 10 residuos de lisina y 5 de arginina.

La reactividad intrínseca de cada uno de esos 15 residuos Lys/Arg que son potenciales blancos de glicación en H1 se determinó mediante cálculos *single-point* a nivel ONIOM QM/MM [94; 95] combinando la teoría de los funcionales de la densidad (DFT) [96] con el campo de fuerza AMBER parm96 [97; 98] tal como se halla implementado en el programa Gaussian09 rev. A.02 [99]. Como indicador de reactividad global se usó la dureza global μ , evaluada a partir de la diferencia entre la energía de los orbitales de frontera de Kohn-Sham (ϵ_{HOMO} y ϵ_{LUMO}) en el marco de la DFT conceptual [100].

En cuanto a la extensión de la región cuántica (QM), se usó el funcional de la densidad B3LYP [101; 102] y un par de residuos (Lys7 y Lys36, ver Figura 9) para evaluar en forma preliminar la posibilidad de abarcar en ella únicamente la cadena lateral del aminoácido cuya reactividad se desea predecir hasta su $\text{C}\alpha$ (**Modelo 1**) frente a la alternativa de una región QM más amplia, extendida hasta incluir los dos enlaces peptídicos que rodean al $\text{C}\alpha$ (**Modelo 2**).

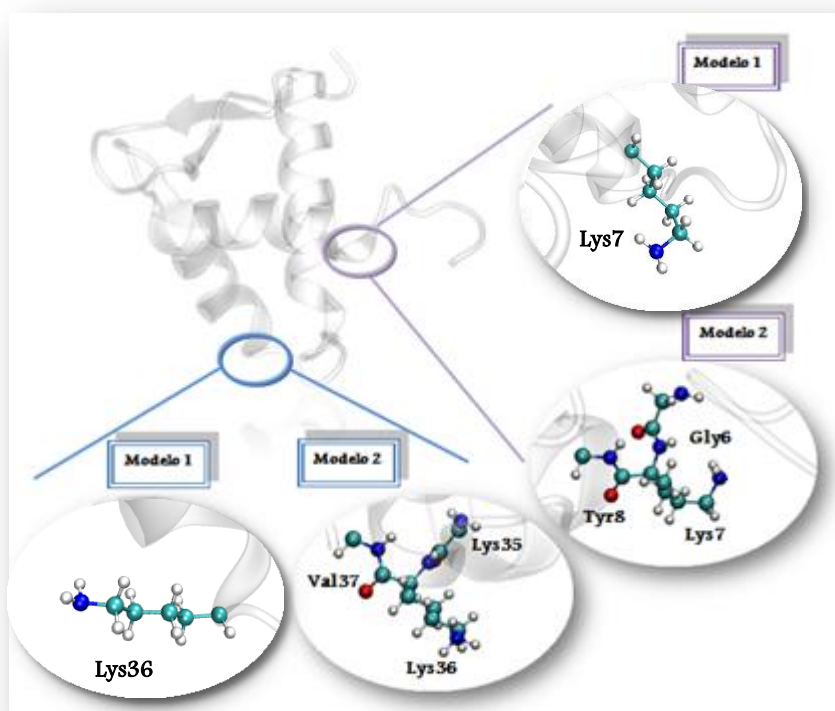


Figura 9. Esquema de los modelos explorados para Lys 7 y Lys36. Región QM del Modelo 1: extendida hasta el $\text{C}\alpha$; Modelo 2: extendida hasta el $\text{C}\alpha$ de los dos aminoácidos vecinos. Representación tridimensional generada con el paquete VMD [75].

En cada caso el residuo de Lys cuya reactividad se está determinando es desprotonado, siendo esa la forma en que se da la reacción inicial de glicación. En la **Tabla 4** se recogen los resultados de dicha exploración preliminar de la dureza de estos dos residuos obtenidos con ambos modelos.

Tabla 4 Efecto de la región QM sobre la predicción de la dureza de residuos Lys a nivel ONIOM(B3LYP/6-311+G(d,p):AMBER)

Residuo	Dureza (eV)	
	Modelo 1	Modelo 2
Lys36	7,24	3,29
Lys7	7,65	2,99

A partir de estos datos se pudo concluir que al excluir el *backbone* proteico de la región QM se sobrestima significativamente el valor absoluto de la dureza y se invierte el orden relativo de reactividad entre estos residuos Lys. Siendo una de las metas de esta tesina de graduación identificar los blancos más probables de glicación entre todos los residuos Lys/Arg presentes en el dominio globular de H1x, se aplicó el Modelo 2 para determinar la reactividad relativa de los 15 residuos. Se emplearon tres funcionales de la densidad diferentes (B3LYP [101; 102], M06 [103] y ω B97X-D [104]) y el conjunto de base 6-31+G(d,p) [105; 106] para estos cálculos *single-point* ONIOM(DFT:AMBER). Este sistema de estudio cuya estructura corresponde a la determinada experimentalmente en solución con todas las Lys protonadas excepto aquella cuya reactividad se evalúa en cada caso, será identificado de aquí en adelante como **H1sp**.

También se analizó el área expuesta al solvente (SASA) por residuo evaluada con el servidor GetArea [107] y el pKa de los residuos básicos Lys/Arg con el servidor H++ [108] teniendo en cuenta que además de la reactividad intrínseca estimada por medio de la dureza del residuo, su exposición al medio y su estado de protonación inciden sobre su posibilidad de ser blanco del ataque por glicación.

3.2 Caracterización de la estructura y dinámica de H1x con el residuo Lys blanco de glicación desprotonado

La desprotonación del residuo Lys más reactivo entre los presentes en **H1sp** (requerida para lograr su unión al agente de glicación) puede alterar la estructura proteica localmente, incidiendo sobre otras propiedades cuya evolución ante la glicación de Lys hasta BS y PA se pretende determinar. Para obtener una estructura representativa de referencia de la proteína con ese residuo Lys desprotonado, se llevó a cabo en primer lugar una minimización clásica bajo condiciones quasi-fisiológicas (caja octaédrica truncada de agua TIP3P [109] extendida hasta a 12 Å del átomo de soluto más cercano a sus bordes y nueve contraiones Cl⁻ para neutralizar la carga de la proteína) con el campo

de fuerza AMBER ff99SB [110], seguida de una simulación de dinámica molecular (DM). Esto se desarrolló con el paquete AMBER12 [111] siguiendo un protocolo estándar de optimización clásica en dos etapas (250 pasos de gradiente conjugado GC + 250 pasos de *steepest descent* SD en cada minimización, manteniendo en la primera fija la proteína por aplicación de una restricción de 500 Kcal/mol sobre sus átomos y liberando todo el sistema en la segunda etapa). Las interacciones electrostáticas de largo alcance fueron tratadas con el método *Particle Mesh Ewald* (PME) con un *cut-off* de 8 Å [112]. Para la DM se calentó de 0-310 K en 100 ps, manteniendo la temperatura constante en la fase de equilibración con el termostato de Langevin [113] y aplicando el termostato de Berendsen [114] en la fase productiva de 30 ns a 310 K. El tamaño de paso usado fue de 2 fs, restringiendo los enlaces que involucran átomos de H con el algoritmo SHAKE [115]. Para el análisis estructural a lo largo de la trayectoria de DM se utilizó el módulo *ptraj* [116] y otras utilidades presentes en el paquete AmberTools12 [117]. La estructura así generada se identifica como **H1-WT-mm**.

Luego se refinó la estructura clásica por optimización parcial de geometría a nivel ONIOM(B3LYP/6-31G(d,p):AMBER) ubicando al residuo Lys75 desprotonado en la región QM y abarcando en la región MM flexible a los residuos en contacto directo, a saber: Glu21-Arg22-Asn23-Gly24-Ser25, Leu62-Leu63-Gln64-Val65-Lys66 y Pro74-(QM)-Leu76-Asn77, tal como se detalla en la Figura 10. A esta estructura se la denominará **H1-WT-oniom**.

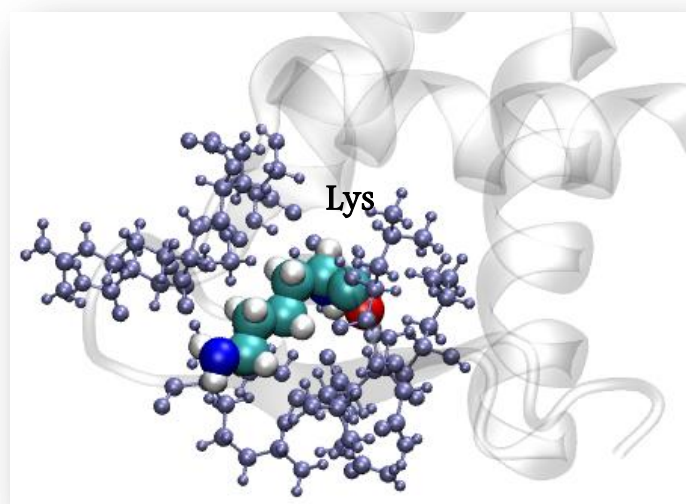


Figura 10. Definición de las regiones QM (Lys75 desprotonada, color por elemento) y MM flexible (violeta) en la optimización parcial ONIOM(B3LYP:AMBER). Representación en gris de la estructura secundaria de la región MM rígida realizada con VMD [75].

Para verificar si un refinamiento estructural con métodos mixtos QM/MM ONIOM es indispensable, se comparó la reactividad de los restantes residuos básicos y la tendencia a oxidar obtenidas a partir de **H1-WT-mm** y **H1-WT-oniom**, determinando estas propiedades según los protocolos especificados en las secciones 3.1 y 3.5.

3.3. Caracterización del mecanismo básico de glicación de Lys por ribosa/ADP-ribosa en solución acuosa

Las primeras cuatro etapas del mecanismo (formación de carbinolamina CBLA, BS + H₂O, enol y PA, ver Figura 2) fueron caracterizadas para un modelo de ribosa y Lys libre en solución acuosa. Se evaluó además el efecto activador del fragmento ADP en la ribosa como agente glicante a fin de comparar los resultados con aquéllos reportados por Cervantes *et al.*, que indican que ADP-ribosa es el azúcar más reactivo frente a la glicación de histona H1 [11].

En cada etapa se determinó la estructura de cada una de las especies estables (reactivos, productos y complejos intermediarios) y el estado de transición, optimizando su geometría sin restricciones en solución acuosa a nivel PCM-DFT/6-31+G(d,p) con los tres funcionales de la densidad ya señalados en la sección 3.1 para el caso de ribosa como agente glicante y limitado al funcional B3LYP para ADP-ribosa (limitación justificada en la mayor complejidad del sistema a caracterizar y en los resultados obtenidos para el sistema más sencillo). En la caracterización de los reactivos iniciales se realizó un análisis conformacional de la molécula de ribosa en solución acuosa al nivel PCM-B3LYP/6-31+G(d,p) para identificar su forma más estable como punto de partida para los estudios de mecanismos. Se puso especial atención al papel de las moléculas de agua como catalizadoras del proceso, utilizando una descripción mixta del medio. Por ello se combinó el modelo continuo IEF-PCM [118] ($\epsilon = 78.15$, cavidades adaptadas a la forma molecular construidas usando radios de Bondi e inclusión de las componentes no electrostáticas) con N moléculas de agua explícita ($n = 0, 1, 2$ según el escenario catalítico considerado).

La naturaleza de los puntos estacionarios obtenidos se caracterizó en base al número de valores propios negativos del Hessiano analítico para cada uno de los tres niveles de cálculo empleados. Para los estados de transición (TSs) se complementó el análisis del vector propio asociado al modo normal de vibración con frecuencia imaginaria determinando el camino de reacción IRC [119], con el algoritmo HPC [120] usando un paso de integración de $2 \text{ uma}^{1/2} \text{ Bohr}$. Para cada etapa se evaluó termoquímica a 298 K y 1 atm empleando las aproximaciones usuales de la Termodinámica Estadística (rotor rígido, oscilador armónico, etc.) y ZPEs sin escalar. Se siguió además la evolución de la densidad electrónica a través de cargas atómicas naturales basadas en el análisis poblacional NPA-NBO de Weinhold y órdenes de enlace de Wiberg [121]. Todos estos estudios se llevaron a cabo empleando el paquete Gaussian09 rev. A.02 [99]. Para la visualización de las estructuras y la representación gráfica de propiedades se empleó la herramienta GaussView 5.0 [122].

3.4 Caracterización de la estructura y propiedades de BS y PA sobre la Lys más reactiva del dominio 2LSO

No habiendo sido determinadas experimentalmente las estructuras en solución de los dos productos de glicación temprana (BS) e intermedia (PA) de H1 que se pretende caracterizar en este estudio, su búsqueda fue el primer paso a dar. Para ello se siguió un protocolo similar al especificado en la sección 3.2 para obtener estructuras clásicas representativas de la proteína modificada en el residuo blanco previamente seleccionado, realizando una minimización clásica en solución acuosa con contraiones Cl^- que fue seguida de una simulación de dinámica molecular para eliminar contactos inadecuados luego de la modificación post-traducción. Adicionalmente, la representación clásica de las modificaciones de Lys75 en H1 por ribosa hasta sus derivados BS (**H1-BS_{K75}**) y PA (**H1-PA_{K75}**) requirió generar bibliotecas de parámetros partiendo del conocimiento de las estructuras de BS y PA generadas para un modelo de la reacción de Lys libre zwitteriónica con ribosa en solución acuosa, generado según se describe en la sección 3.3, extendiendo el modelo a otro más representativo de un residuo Lys inmerso en el esqueleto proteico y determinando las cargas RESP [123] correspondientes y todos los parámetros estructurales necesarios.

3.5. Tendencia a la oxidación de 2LSO y la sinergia con la glicación

Se analizó la sinergia glicación-oxidación, determinando la tendencia a oxidar de la proteína WT, y si ésta se ve afectada al formar los productos BS y PA y de qué manera. Entre los residuos típicos oxidables se identifica en H1x la presencia de los siguientes: Met3, Tyr8, Tyr31, Tyr48, Tyr51 y Trp39 (ver Figura 11a).

Su tendencia a oxidar se evaluó tomando como indicador la energía del orbital KS-HOMO [124] (descriptor global de la tendencia por residuo) [125]. Cuanto más alta sea la energía de su orbital KS-HOMO, más fácil será que el residuo pierda electrones frente a otras moléculas. Se realizaron así cálculos *single-point* sobre las estructuras **H1-WT-mm**, **H1-WT-oniom**, **H1-BS** y **H1-PA** al nivel ONIOM(DFT/6-31+G(d,p):AMBER) con los funcionales de la densidad B3LYP [101; 102] y M06 [103] y ω B97X-D [104], desplazando la región QM sobre cada uno de los residuos considerados y de acuerdo al **Modelo 2** de región cuántica previamente seleccionado.

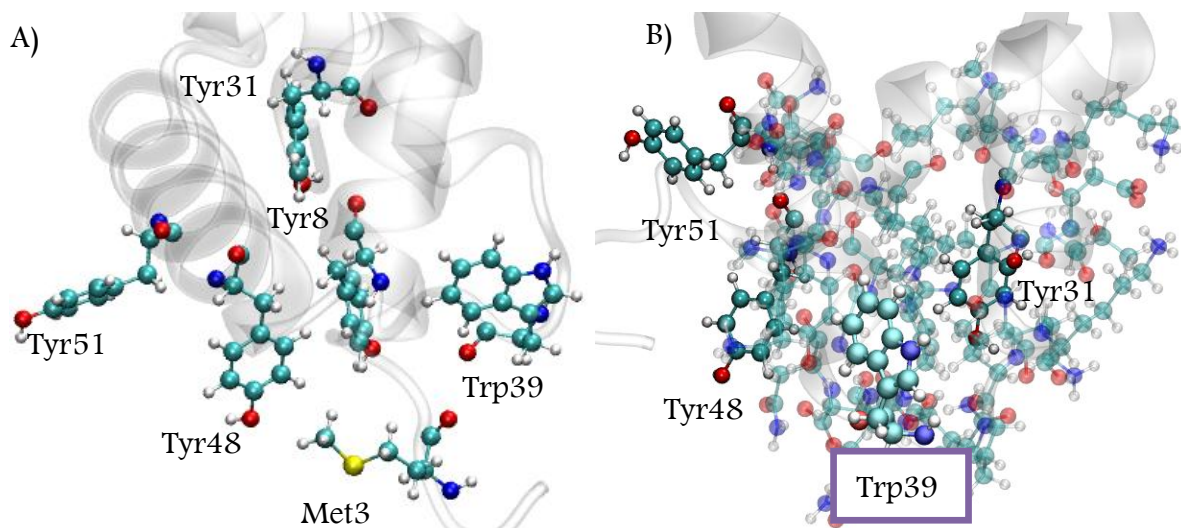


Figura 11. A) Residuos oxidables en H1x; B) Recorte de 545 átomos (coloreados por elemento, destacando las tres Tyr y el Trp oxidables) empleado para evaluar los efectos del entorno en la función de Fukui f^- . Representación tridimensional generada con el paquete VMD [75].

Una vez determinada la identidad del residuo más fácilmente oxidable en H1x, se evaluó la capacidad de oxidación con detalle atómico, a través de la función de Fukui condensada f^- [100; 125] calculada en base a cargas atómicas NPA [121]. Visto que los cálculos ONIOM(QM:MM) no tienen implementado el análisis NPA en el paquete Gaussian09, la densidad electrónica se obtuvo mediante cálculos *single-point* al nivel DFT/6-31+G(d,p) con los funcionales B3LYP y ω B97X-D aplicados sobre un recorte de 545 átomos de H1x (ver Figura 11b) con la cantidad de electrones originales y luego de la pérdida de un electrón. El estudio se realizó en fase gaseosa y en solución acuosa descrita con el modelo IEF-PCM ($\epsilon=78.15$, cavidad molecular y radios de Bondi) [118; 126] a efectos de determinar la influencia del medio sobre la reorganización de carga que acompaña a la oxidación de la proteína en este residuo.

4. Resultados y discusión

4.1. Reactividad de los residuos básicos: Lys75 como blanco de glicación primario

Los resultados obtenidos aplicando el protocolo descrito en la sección 3.1 a la serie completa de 15 residuos Lys/Arg del dominio globular de la Histona H1 con los 3 funcionales de la densidad considerados se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Área expuesta (SASA), pKa estimado con H++ [108] y reactividad (dureza estimada con los tres funcionales de la densidad) de los residuos básicos de H1

Tipo y # Residuo	SASA (Å ²)	pKa	Dureza μ (eV)		
			B3LYP	M06	ω B97X-D
Lys					
K7	99,40	10,3	2,99	3,67	7,55
K29	91,49	10,5	3,58	4,27	8,20
K35	77,23	10,4	3,61	4,28	8,21
K36	141,81	11,7	3,29	4,00	7,96
K50	101,73	9,3	3,44	4,14	8,04
K54	124,22	10,4	3,03	3,74	7,68
K66	139,28	10,5	3,26	3,98	7,92
K75	47,45	10,3	2,56	3,30	7,25
K79	145,70	10,6	2,95	3,67	7,62
K80	110,66	11,2	3,51	4,21	8,14
Arg					
R17	168,09	12,0	4,12	4,69	8,40
R18	176,29	>12,0	4,29	4,86	8,57
R22	201,79	>12,0	4,13	4,71	8,44
R46	138,32	>12,0	4,22	4,80	7,52
R78	183,18	>12,0	4,43	5,03	8,73

Los tres funcionales de la densidad empleados coinciden en señalar al residuo Lys75 como el blanco de glicación más probable en H1x, mostrando en términos generales a los residuos de Arg como bastante menos reactivos que los residuos Lys (esto se aprecia tanto en base a la dureza, como en términos de su nucleofilia, como indican los valores de energía orbital del KS-HOMO sobre cada residuo básico, ver Tabla S1). Este residuo Lys75 indicado como blanco primario de glicación en H1x presenta la particularidad de ubicarse en la hoja β 3, formando un enlace de hidrógeno (EdH) con Arg22, motivo estructural que refleja uno de los patrones de activación de Lys para la glicación reportado previamente por otros autores [27].

En cuanto a los siguientes blancos de glicación, los resultados B3LYP y M06 son similares entre sí e indican a Lys79 (ubicada en un giro, formando un puente salino con Glu82) y/o Lys7 (ubicada al comienzo de la hélice α 1, formando EdH con Gln7) como blancos secundarios, más expuestos al medio que Lys75. En cualquier caso, visto que la exposición de Lys75 es suficiente para que sea objeto de ataque por agentes glicantes relativamente pequeños como la ribosa, se definió tomar al residuo Lys75 como blanco de glicación principal sobre el cual profundizar en los estudios planteados para esta tesina. La Figura 12 resume gráficamente los hallazgos principales de esta sección.

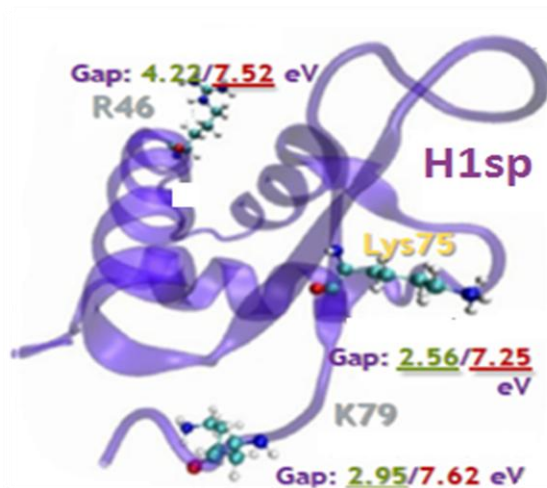


Figura 12. Residuos del dominio globular más reactivos según la dureza calculada a nivel B3LYP (verde) y ω B97X-D (rojo) en solución. Representación tridimensional generada con VMD [75].

Siendo el pKa de los residuos blanco un factor que incide sobre la concentración disponible de la forma desprotonada reactiva frente a la glicación, se inspeccionó su valor para los residuos Lys/Arg básicos de 2LSO con el servidor web H++ [108]. Según los datos de la tercera columna de la Tabla 5, a pH 7 todos los residuos Lys/Arg se hallarían protonados, con valores de pKa del orden de 10 en la mayoría de las Lys (para las que la modulación de la propiedad por el entorno local del residuo parece ser más importante que en el caso de los residuos Arg) y de 12,0 o superior para los residuos Arg.

Cabe también señalar que al nivel ω B97X-D el residuo Arg46 sería el segundo blanco de glicación, algo que podría llegar a tener una implicancia importante sobre la oxidación del residuo Tyr31, aspecto cuya consideración se retomará más adelante. Este funcional incluye correcciones de dispersión electrónica en forma empírica, efecto crucial para describir correctamente EdH e interacciones de van der Waals que inciden sobre la energética de las etapas de glicación temprana y que ya se ha documentado resultaría indispensable para describir correctamente las barreras de reacción de la glicación temprana entre Lys/Arg y oxoaldehídos [28; 127].

4.2. Efecto de la desprotonación de Lys75 sobre la estructura y reactividad de Lys/Arg en H1sp

A fin de comparar la estructura global de **H1sp** y **H1-WT-mm** se evaluó el RMSD calculado sobre la posición de los átomos pesados y se obtuvo un valor de 0,34 Å. Por otro lado, de la comparación entre las estructuras **H1-WT-oniom** y **H1-WT-mm** surge un RMSD de 0,09 Å. Esto indica que la desprotonación de Lys75 no induce cambios estructurales globales de gran relevancia y muestra que la mayor parte de las variaciones ya están reflejadas en la estructura clásica **H1-WT-mm** por lo que un refinamiento estructural con el método ONIOM QM/MM no parece ser indispensable en este caso y no será abordado en forma sistemática en esta tesina.

En cuanto al efecto que puede tener sobre las tendencias de reactividad por residuo Lys/Arg el uso de las distintas estructuras de H1x (**H1sp**, **H1-WT-mm** o **H1-WT-oniom**) y los dos funcionales retenidos del estudio preliminar reseñado en 4.1, la Figura 13 muestra la variación de dureza por residuo (ver los valores numéricos correspondientes a las estructuras **H1-WT-mm** y **H1-WT-oniom** en la Tabla S2).

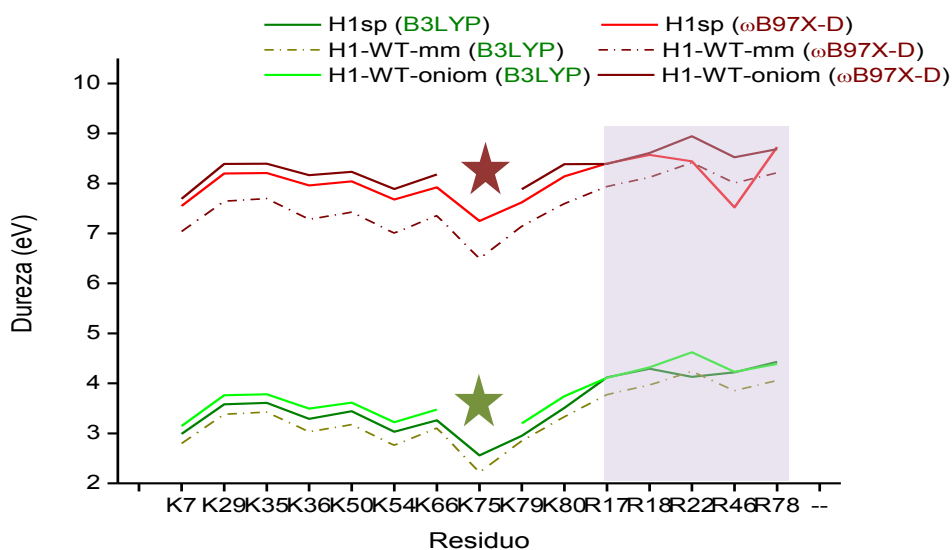


Figura 13. Dureza por residuo básico a nivel B3LYP y ω B97X-D sobre diferentes estructuras del dominio globular (**H1sp**, **H1-WT-mm** y **H1-WT-oniom**). Con una estrella se marca el residuo más reactivo en cada modelo de H1.

Comparando las tendencias generales de reactividad relativa de los residuos Lys, se ve que son similares entre las tres estructuras, siendo en todos los casos K75 el residuo más reactivo (en **H1-WT-oniom** no se reporta la dureza para K75 por centrarse la zona QM/MM flexible en él, no siendo así las condiciones de determinación directamente comparables con las del resto de los residuos). El marcado descenso de dureza de R46 señalado a nivel ω B97X-D en **H1sp**, se pierde en las estructuras **H1-WT-mm** y **H1-WT-oniom**, mostrando que la reactividad de este residuo sería muy sensible a variaciones en las características de su entorno.

4.3. Mecanismo de glicación de Lys por ribosa/ADP-ribosa y la estructura de BS y PA en modelos reducidos

Inicialmente se realizó un análisis conformacional de la ribosa en solución acuosa para seleccionar su forma más favorecida (ver Figura 14).

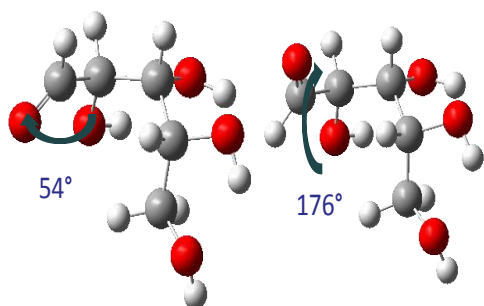


Figura 14. Análisis conformacional de la ribosa en su isómero *gauche* (izquierda) y *anti* (derecha) alrededor del enlace C1-C2.

La diferencia de energía electrónica entre ambos conformeros, determinada a nivel PCM-B3LYP vale 0.67 Kcal/mol, valor que se halla por debajo del error del método y señala la facilidad de conversión entre ellos y presencia de ambas formas, siendo la forma *gauche* la más estable. Se evaluó a su vez la dureza al mismo nivel de teoría, siendo respectivamente de 6.26/5.99 eV para los conformeros *gauche/anti*, mostrando que la forma *anti* sería algo más reactiva.

La Figura 15 y la Tabla 6 muestran respectivamente la estructura geométrica y el valor de los órdenes de enlace de Wiberg (WBI) para los estados de transición (TS1-4) obtenidos en solución acuosa a nivel PCM-B3LYP/6-31G* para las 4 etapas del mecanismo de glicación de Lys por ribosa.

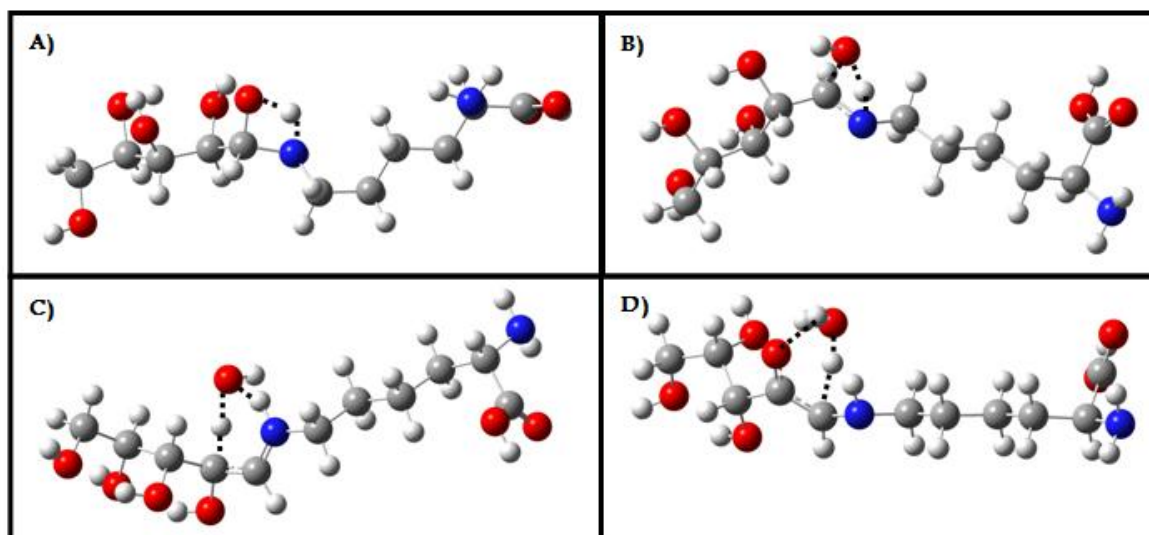


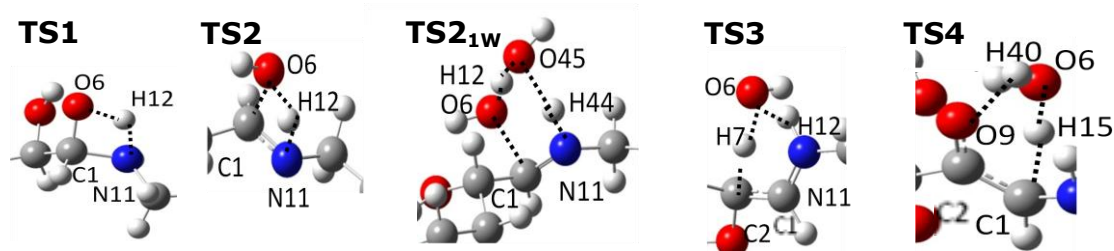
Figura 15. Estructura de los cuatro primeros TS de la reacción de glicación con ribosa a nivel B3LYP/6-31+G**. A) TS1: adición directa de ribosa y Lys que forma una carbinolamina (CBLA) intermedio de reacción; B) TS2: deshidratación directa de CBLA a BS y H₂O; C) TS3: rearreglo interno BS a Enol asistido por H₂O; D) TS4: rearreglo de Amadori a PA asistido por H₂O.

Tabla 6. Órdenes de enlace de Wiberg (WBI en u.a.)^a obtenidos a nivel PCM($\epsilon=78.15$)-B3LYP/6-31+G para las cuatro etapas de reacción con ribosa sin/con participación de agua catalítica.**

Enlaces	TS1	TS2	Enlaces	TS2 _{1w}	Enlaces	TS3	Enlaces	TS4
C ₁ =O ₆	1,00	0,49/0,52 ^b	C ₁ -O ₆	0,27/0,25 ^b	C ₁ =C ₂	1,19	C ₁ -C ₂	1,47/1,49 ^b
C ₁ -N ₁₁	0,90	1,31/1,28 ^a	C ₁ =N ₁₁	1,52	C ₁ -N ₁₁	1,53	C ₂ -O ₉	1,29
N ₁₁ -H ₁₂	0,40	0,36	N ₁₁ -H ₄₄	0,58	N ₁₁ -H ₁₂	0,65	O ₉ -H ₄₀	0,07/0,06 ^b
O ₆ -H ₁₂	0,32	0,37	O ₆ -H ₁₂	0,45	O ₆ -H ₁₂	0,11	O ₆ -H ₄₀	0,61
			O ₄₅ -H ₄₄	0,17	O ₆ -H ₇	0,31	O ₆ -H ₁₅	0,47
			O ₄₅ -H ₁₂	0,28/0,30 ^b	C ₂ -H ₇	0,48	C ₁ -H ₁₅	0,19/0,17 ^b

^a Numeración de los átomos indicada en las ampliaciones de la Fig. 15 mostradas aquí abajo.

^b El segundo valor en cursiva corresponde al resultado PCM- ω B97X-D/6-31+G**, reportado solo cuando difiere del valor obtenido a nivel PCM-B3LYP/6-31+G**.



La Figura 16 y la **Tabla 7** muestran el perfil global de energía libre relativa obtenido con ambos funcionales de la densidad (B3LYP y ω B97X-D) para las cuatro etapas de reacción y el efecto sobre las barreras de reacción al incluir 1-2 moléculas de agua catalítica y al cambiar el agente glicante (ADP-ribosa en lugar de ribosa).

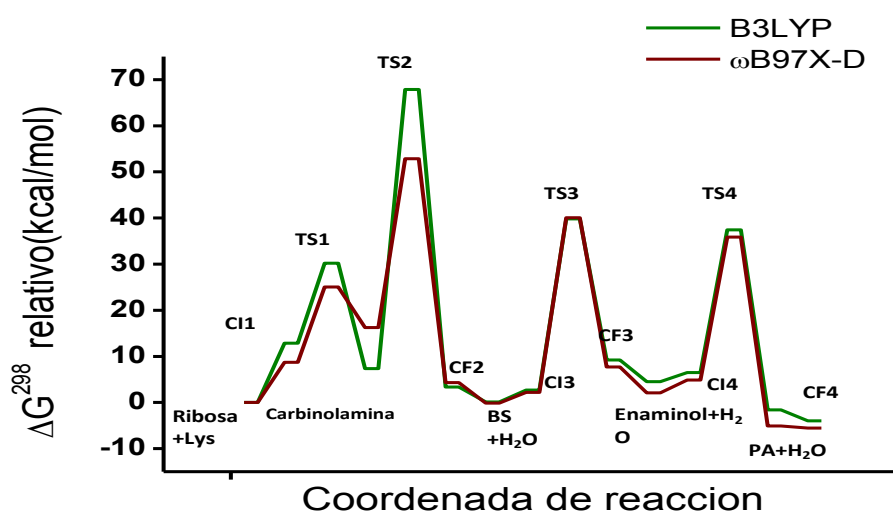


Figura 16. Perfil global de ΔG^{298} (kcal/mol) relativa a nivel B3LYP (verde) y ω B97X-D (rojo) para las cuatro etapas de glicación de Lys con ribosa en solución acuosa. No se incluye agua explícita en las etapas 1 y 2 ($n=0$) y se considera $n=1$ en las etapas 3 y 4. Se toma la suma de energía de Ribosa + Lys a cada nivel como cero de energía.

Los cuatro estados de transición mostrados en la Figura 16 corresponden a procesos concertados de distinto tipo, que combinan en forma asíncrona en su coordenada de reacción la reorganización de átomos pesados y una o más transferencias protónicas. En todos los casos, los complejos intermediarios débiles formados en los canales de entrada (CI) y salida (CF) son inestables en términos de energía libre, debido a que la estabilización lograda por la interacción de sus componentes no logra compensar el término entrópico desfavorable asociado a un mayor grado de organización. Así, las barreras de reacción que se presentan en la **Tabla 7** fueron evaluadas respecto a los reactivos/intermediarios estables en términos de energía libre de cada etapa.

Tabla 7. Barreras de activación $\Delta^\ddagger G^{298}$ PCM-B3LYP/6-31+G para los cuatro pasos con ambos agentes glicantes bajo escenarios sin (TS1/TS2) y con (TS2_{1w}/TS2_{2w}/TS3/TS4) agua catalítica.**

Barreras de reacción $\Delta^\ddagger G^{298}$ (Kcal/mol)				
Agente glicante	TS1	TS2/TS2 _{1w}	TS3	TS4
Ribosa	30,2 (25,0) ^a	62,9/32,4 (53,9/27,8) ^a	37,1 (37,9) ^a	30,9 (31,0) ^a
TS2 _{1w} /TS2 _{2w}				
ADP-ribosa	30,0	27,9/21,5	36,8	32,0

^a resultados PCM- ω B97X-D/6-31+G**

Según se aprecia a partir de los órdenes de enlace en la **Tabla 6**, para el primer paso que forma la carbinolamina (CBLA) la reorganización de la densidad electrónica en C=O y C...N está casi completa al llegar a TS1 mientras la transferencia protónica tuvo un menor avance. La barrera de reacción asociada a este TS tardío es de 30-25 kcal/mol en términos de energía libre en solución acuosa a 298 K según el funcional de la densidad usado (ver **Tabla 7**) valor que señala al proceso directo como viable pero demasiado lento, dando a suponer que experimentaría catálisis (no explorada para esta etapa en este trabajo). Como resultado de efectos entrópicos desfavorables asociados a la condensación este primer paso es exotérmico (ver energía interna y entalpía relativas a 298 K en la Tabla S3) pero endergónico, como se ve en la Figura 16.

El segundo paso de deshidratación de CBLA es exergónico pero su barrera de activación resulta demasiado alta (62,9/53,9 kcal/mol según el funcional de la densidad usado para caracterizar TS2, cuya frecuencia imaginaria vale 1883i/1876i cm⁻¹ respectivamente a nivel B3LYP y ω B97X-D, ver Figuras 15 y 16 y **Tabla 7**) para una posible reacción directa, sin catálisis. La participación activa de una molécula de agua como catalizador bifuncional explorada aquí para esta etapa reduce en ~50% el valor de la energía libre de activación asociada a TS2_{1w} (y la diferencia entre la predicción B3LYP y ω B97X-D bajo este escenario de catálisis también disminuye respecto a las transformaciones que pasan por TS1 y TS2 a menos de 5 kcal/mol). Los órdenes de enlace en la **Tabla 6** muestran que la participación

de la molécula de agua catalítica favorece la ruptura del enlace C1-O6 (WBI pasa de 0,49 u.a a 0,27 u.a al comparar TS2 con TS2_{1w}) y la transferencia protónica (WBI O6-H12 pasa de 0,37 u.a a 0,45 u.a) necesarias para la formación de la molécula de agua saliente. En el caso del enlace C1-N11 el mismo se refuerza un 20% al incluir la molécula de agua catalítica (WBI pasa de 1,31 u.a a 1,52 u.a al comparar TS2 con TS2_{1w}).

Los reordenamientos internos de BS a enamino y de éste a PA tiene barreras de activación de respectivamente $\Delta G^{298} = 37,1$ y $30,9$ Kcal/mol aún bajo catálisis bifuncional por una molécula de agua, algo elevadas para lo que conoce en términos generales sobre la velocidad de estos procesos. Esto sugiere como probable la participación de una segunda molécula de agua catalítica, profundización en estudios del mecanismo que se plantea abordar fuera del desarrollo de esta tesis de graduación, donde el principal interés de abordar la descripción de las reacciones con estos modelos reducidos, se dirige a obtener una caracterización inicial de BS y PA entre Lys + ribosa a trasladar al estudio de las correspondientes BS y PA en la proteína. Para el primer reordenamiento, los valores de WBI en TS3 lo caracterizan como un proceso avanzado aproximadamente un 50% en términos de la transferencia protónica y la ruptura del doble enlace C1-N11 (ver **Tabla 6**) pero bastante asíncrono visto que el valor de WBI para el enlace C₁=C₂ indica un avance del orden del 20% para la reorganización que lleva a un doble enlace en el enol. Para el segundo reordenamiento que lleva al PA a través de TS4 la asincronía es aún más marcada (ver **Tabla 6**).

En cuanto al efecto de incorporar ADP como sustituyente en la molécula de ribosa, por la limitación temporal de este trabajo de tesina, se exploró aquí solamente a nivel B3LYP. Los resultados de barreras de activación mostrados en la **Tabla 7** señalan que el efecto más significativo se da en la etapa de formación de la BS (considerando ya directamente el escenario de catálisis por una molécula de agua, tal como se aprecia en la Figura 17) favorecida cinéticamente por una caída en 4.5 kcal/mol en el valor de la energía libre de activación del proceso comparado con el que corresponde a la reacción con ribosa al mismo nivel.

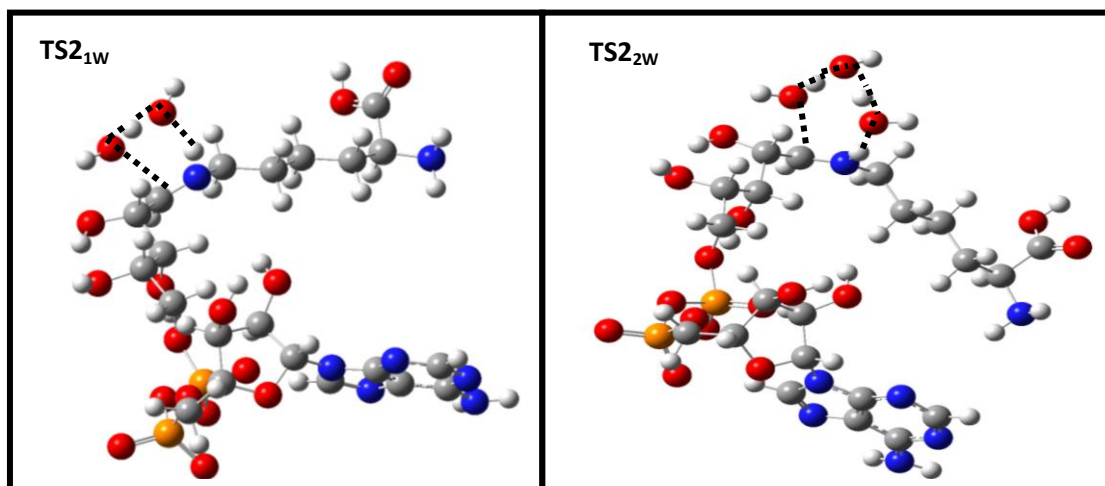


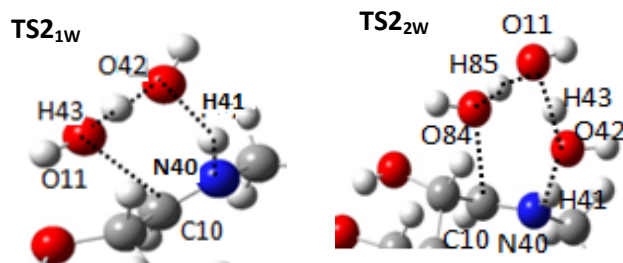
Figura 17. Estructura PCM-B3LYP del TS correspondientes al pasaje de CBLA de ADP-ribosa y Lys a BS bajo escenarios con una (TS2_{1w}) y dos moléculas (TS2_{2w}) de agua catalítica.

Adicionalmente, el primer paso se vuelve exergónico ($\Delta G_{rxn}^{298} = 5.8$ y -9.5 Kcal/mol respectivamente para ribosa y ADP-ribosa actuando como RCS, ver Tabla S4), sin alterarse significativamente su barrera de reacción. Esto va en línea con los resultados experimentales de Cervantes-Laurean *et al.* [11].

Siendo central la formación de la BS, se exploró también el efecto de incluir una segunda molécula de agua catalítica (TS2_{2w} en la Figura 17) en este paso. Como se aprecia en la **Tabla 7** la catálisis por esta segunda molécula reduce la barrera de activación en 6.4 kcal/mol (de 27.9 a 21.5 Kcal/mol) efecto mucho menor al ejercido por la primera molécula catalítica de agua en la reacción con ribosa, pero aún muy significativo en términos de su impacto sobre la cinética del proceso, que se acelera en forma notable.

Tabla 8. Órdenes de enlace de Wiberg (WBI en u.a.) para TS2 (deshidratación de CBLA de ADP-Ribosa y Lys) bajo escenarios catalíticos con N = 1 y 2.

Enlaces	TS2 _{1w}	Enlaces	TS2 _{2w}
C ₁₀ -O ₁₁	0,26	C ₁₀ -O ₈₄	0,22
O ₁₁ -H ₄₃	0,44	O ₈₄ -H ₈₅	0,50
C ₁₀ -N ₄₀	1,52	C ₁₀ -N ₄₀	1,57
N ₄₀ -H ₄₁	0,59	N ₄₀ -H ₄₁	0,64
O ₄₂ -H ₄₁	0,17	O ₄₂ -H ₄₁	0,12
O ₄₂ -H ₄₃	0,31	O ₁₁ -H ₈₅	0,25
		O ₄₂ -H ₄₃	0,51
		O ₁₁ -H ₄₃	0,25



Al comparar los órdenes de enlace de Wiberg de las estructuras TS2_{1w} y TS2_{2w} mostrados en la **Tabla 8** se aprecia que la reorganización de la densidad C^{••}O y O^{••}H de enlaces en ruptura/formación involucrados en la eliminación de la molécula de agua y del enlace C=N están algo más avanzadas en TS2_{2w}, apareciendo algo más retrasada la pérdida del protón desde el átomo de N de la BS en formación, lo que indicaría que la participación de la segunda molécula de agua catalítica adelanta la deshidratación de CBLA participando activamente en el proceso y dando lugar a un estado de transición con una mayor separación de carga. La incorporación de ADP a la ribosa no cambia por lo tanto el mecanismo de reacción ni la necesidad de utilizar moléculas de agua como catalizadoras de la reacción, simplemente acelera en forma importante la velocidad de esta etapa. Se hace notar que junto con la información suplementaria sobre la energética de estos

procesos presente en las Tablas S3-S4 del Anexo, se incluye también una memoria micro-SD con animaciones del modo normal de vibración que corresponde a la frecuencia imaginaria de cada estado de transición caracterizado en este trabajo y del IRC correspondiente a cada uno de ellos.

4.4. Caracterización de BS y PA de Lys75 con ribosa en H1 y la reactividad Lys/Arg en los productos de glicación

Uno de los hallazgos originales centrales a esta tesina de graduación es la caracterización por minimización clásica y simulaciones de dinámica molecular de estructuras en solución acuosa de productos de glicación temprana (BS) e intermedia (PA) de H1 con ribosa atacando sobre Lys75.

La evolución dinámica de las estructuras proteicas WT y con modificaciones por glicación en Lys75 muestra que el *backbone* proteico se estabiliza en el entorno de los 17 ns de simulación (Figura 18a). El RMSD calculado entre los átomos pesados de estructuras representativas de H1-BS_{K75} y H1-PA_{K75} vale 3,85 Å, valor que indica diferencias significativas entre ambos productos de glicación. La comparación entre el RMSD de H1-WT y las diferentes modificaciones indican, una vez más, diferencias estructurales de importancia, siendo la comparación H1-WT / H1-BS_{K75} de 4,79 Å y H1-WT/ H1-PA_{K75} de 3,42 Å.

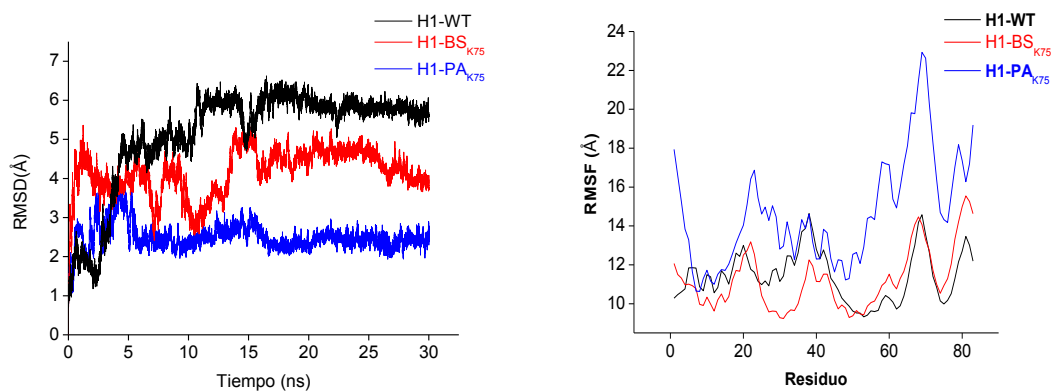


Figura 18. A) RMSD C α de la proteína H1-WT (negro) y modificada en Lys75 a H1-BS (rojo) y H1-PA (azul). B) RMSF C α respecto a la estructura promedio de la región estabilizada de cada simulación de 30 ns: H1-WT (negro); H1-BS (rojo) y H1-PA (azul).

El análisis de la fluctuación cuadrática media del C α por residuo (RMSF, Figura18b) revela que en tanto la formación de la BS reduce la flexibilidad de la proteína WT en varias zonas del dominio globular en especial en el segmento 25-42 (que abarca la hoja β 1, la hélice α 2 y casi todo el giro que la conecta con la hélice α 3) por el contrario la formación de PA aumenta la movilidad en la mayor parte del dominio globular, excepto en las regiones de la hélice α 1 y del giro que conecta α 2 con α 3. Debido a que aún no se tiene certeza de la identidad exacta de los aminoácidos de H1 que se hallan en contacto con la doble hebra

de ADN en el nucleosoma, sería interesante en un estudio posterior confirmar cuán involucrada se encuentran estas regiones en el reconocimiento, ya que estos cambios podrían estar modulando la unión ADN-proteína.

En la Figura 19 se observa la superposición de las estructuras 3D representativas del dominio globular de H1 en H1-WT (cian), H1-BS (gris) y H1-PA (azul) obtenidas a partir de los *clusters* más poblados (siendo H1-WT el porcentaje de ocupación de 58,0%, H1-BS de 52,4% y H1-PA de 74,6%) luego de 30 ns de simulación de dinámica molecular clásica. Allí se aprecia que la región de hoja β se dispone en forma muy distinta en los tres estados de la proteína (Figura 19a) y que la orientación del residuo Lys75 modificado al formar BS o PA con ribosa es diferente en cada caso (en BS se aproxima al residuo de Lys79; en PA se aproxima al residuo de Lys66).

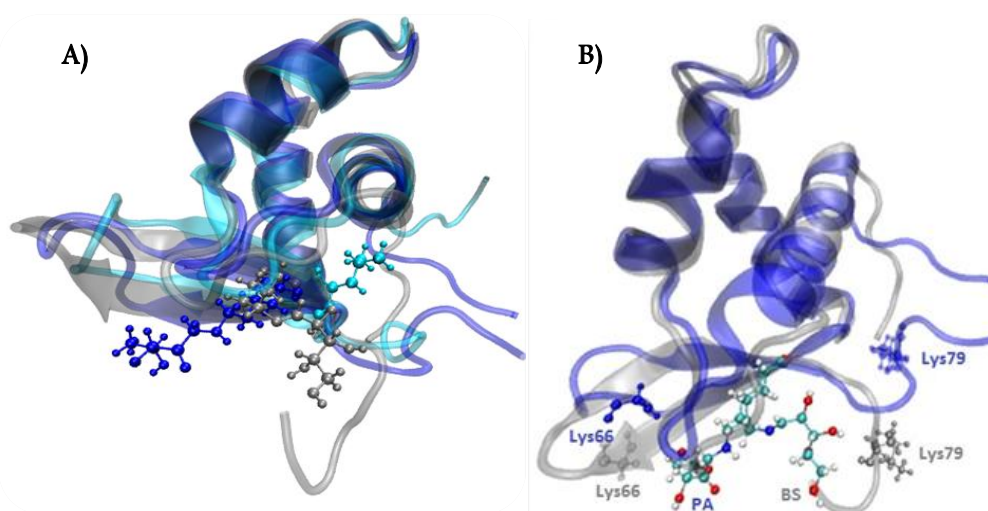


Figura 19. A) Comparación de la estructura de H1-WT (cian), H1-BS (gris) y H1-PA (azul) obtenida a partir de la simulación de dinámica molecular de 30 ns; B) posicionamiento de Lys75 original y modificada a BS y PA respecto a los residuos Lys79 y Ly66 principales blancos de posterior glicación según modificación. Representación generada con VMD [75].

Sobre estas mismas estructuras representativas se analizó a nivel ONIOM(DFT:AMBER) que efecto tiene la glicación temprana/intermedia sobre la reactividad y exposición de blancos de glicación Lys/Arg aún disponibles para modificación en cascada por glicación y/o glicoxidación. Las tendencias obtenidas con los funcionales B3LYP y ω B97X-D se ven en la Figura 20 y los valores correspondientes de dureza y área expuesta por residuo para H1-BS_{K75} y H1-PA_{K75} se detallan en la Tabla S2 del Anexo.

Así se determina que al formar H1-BS en Lys75, Lys79 (SASA = 129.61 Å²) sigue siendo el próximo blanco de ataque, seguido ahora de cerca por Lys66 (SASA = 178,65 Å², ubicado en la hoja β 2 algo más próximo a Lys75, formando EdH con Gln64, ver Figura 19b) cuya reactividad aumenta diferencialmente al glicarse H1. El PA formado en Lys75 muestra al mismo Lys66 pasando a ser el primer blanco de ataque, seguido de Lys7 (SASA = 116.45 Å²) con ONIOM(B3LYP:AMBER) o Arg78 (SASA = 216.54 Å²) y Lys7 con ONIOM(ω B97X-D:

AMBER). Nuevamente los resultados indican a los residuos Lys como puntos de ataque primarios más probables hacia una cascada de glicación en H1 por ribosa y muestran la importancia de incluir correcciones por dispersión para describir correctamente la reactividad de algunos residuos Arg muy sensibles a variaciones de su entorno (detalles en la Tabla S2). Los resultados de este estudio, resumidos gráficamente en la Figura 21, muestran que la orientación del residuo Lys75 modificado altera la estructura global de H1 y que su proximidad respecto a otros residuos Lys/Arg modula diferencialmente la reactividad, activándolos y alterando su exposición.

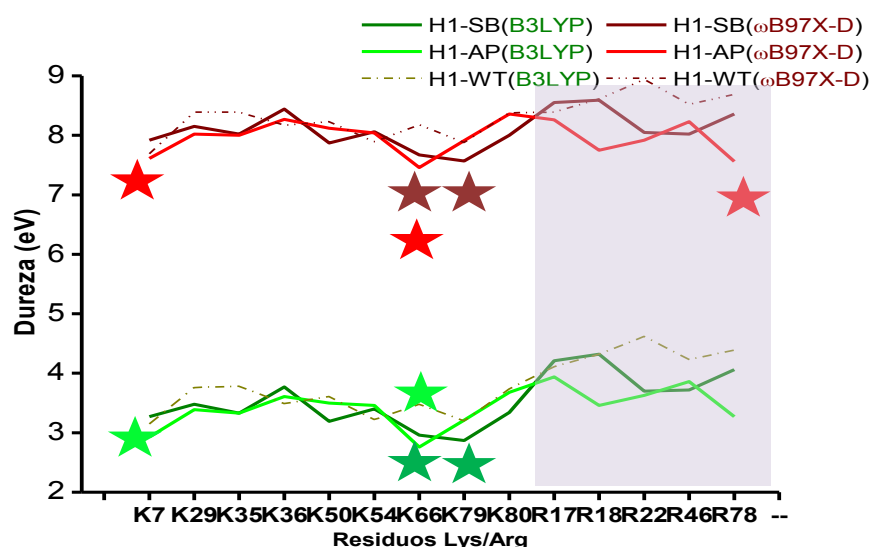


Figura 21 Reactividad comparada de Lys/Arg en la serie H1 WT, BS y PA, expresada como dureza ONIOM(DFT:AMBER), con DFT = B3LYP y ω B97X-D. Las estrellas marcan los residuos más reactivos luego de cada modificación, excluyendo K75. Referencia: modelo H1-WT-oniom, sección 4.2.

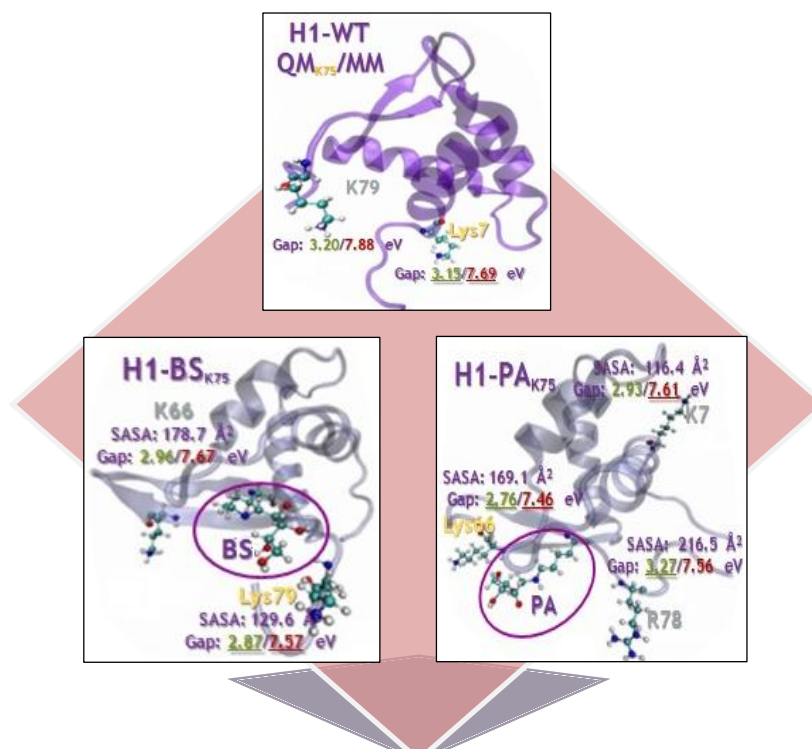


Figura 20. Resumen gráfico de los cambios de exposición y reactividad luego de la modificación en K75. Código de colores: verde B3LYP; rojo ω B97X-D; dorado residuo más reactivo, plateado segundo residuo más reactivo. Representación tridimensional generada con el paquete VMD [75].

4.5. Oxidación de 2LSO y sinergia con la glicación

Tal como se especificó en la sección 3.5, se examinó la tendencia a oxidar de los 6 residuos oxidables presentes en H1 (Met3, Tyr8, Tyr31, Tyr48, Tyr51 y Trp39, ver su ubicación en la Figura 11, Sección 3.5) empleando como indicador global la energía del orbital HOMO de cada uno de ellos, determinada a nivel ONIOM(DFT:AMBER) desplazando la región QM sobre cada residuo considerado por vez.

De la exploración preliminar desarrollada sobre la estructura NMR 2LSO de H1 (**H1sp**) se determinó que el residuo **Trp39** (próximo a **Lys7**) sería el más propenso a oxidar en el estado nativo de la proteína, resultado invariante al cambio de funcional de la densidad (B3LYP u ω B97X-D) o de estructura utilizada, tal como se aprecia en las primeras cuatro columnas de datos en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Energía del KS-HOMO ONIOM(DFT:AMBER) por residuo oxidable en la serie H1sp/H1-WT-oniom/H1-BS_{K75}/H1-PA_{K75} con DFT = B3LYP u ω B97X-D.^a

Residuo	H1sp		H1-WT-oniom		H1-BS _{K75}		H1-PA _{K75}	
	B3LYP	ω B97X-D	B3LYP	ω B97X-D	B3LYP	ω B97X-D	B3LYP	ω B97X-D
Met3	-5,73	-7,89	-5,73	-7,88	-5,28	-7,56	-5,49	-7,76
Tyr8	-5,99	-8,23	-5,99	-8,11	-5,81	-7,90	-5,82	-7,81
Tyr31	-5,99	-8,10	-5,90	-7,93	-5,74	-7,79	-5,78	-7,93
Tyr48	-5,95	-8,19	-5,91	-8,11	-5,82	-7,82	-5,95	-7,98
Tyr51	-5,99	-8,07	-5,89	-7,92	-5,74	-7,76	-5,97	-8,05
Trp39	-5,64	-7,60	-5,64	-7,60	-5,34	-7,29	-5,62	-7,57

^a Los números destacados en rojo corresponden al residuo más reactivo en cada estructura y aquéllos en violeta, al segundo residuo más reactivo, en general a no más de 0.2-0.3 eV.

El funcional ω B97X-D indica valores de energía orbital ~ 2 eV más bajos respecto a la estimación B3LYP (causa junto con la desestabilización del KS-LUMO de las diferencias en los valores de dureza por residuo estimados por diferencia de energías HOMO-LUMO previamente discutidas). Cuando se comparan los valores para las estructuras glicadas, se aprecia que en **H1-BS_{K75}** todos los residuos se vuelven más fácilmente oxidables respecto a la proteína WT, sosteniendo la idea de la existencia de sinergia glicación-oxidación. En la estructura **H1-PA_{K75}** el efecto de desestabilización del KS-HOMO es menos marcado y, según el funcional empleado, la oxidación de Met3 aparece como la alternativa más probable. Esto afirma la importancia de detener la reacción en etapas tempranas, en especial antes que se forme la BS.

En cuanto a la exploración preliminar detallada a nivel atómico de la oxidación del residuo Trp39 examinada a través de la función de Fukui f^- mapeada sobre una superficie molecular de densidad 0,003 u.a y condensada (cargas atómicas NPA) determinadas a nivel PCM-B3LYP/6-31G**, la misma muestra la importancia de considerar los efectos del medio y que los átomos con mayor tendencia a oxidar son los de carbono del anillo indol

(ver Figura 22) que conduce a la vía de la quinurenina, habiéndose reportado que modificaciones en el metabolismo de esta vía se encuentran involucradas en el desarrollo de enfermedades como los males de Parkinson, Huntington y Alzheimer, entre otros [128], siendo este un punto interesante a profundizar en futuros estudios de este sistema molecular.

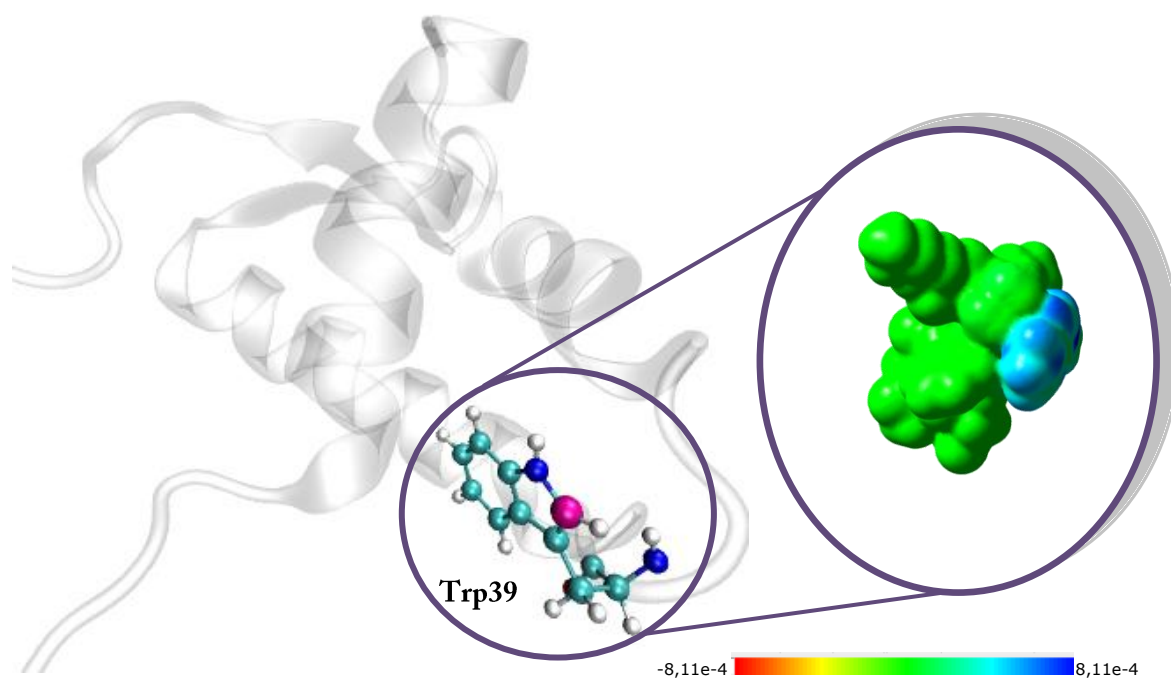


Figura 22. Identificación de los átomos con mayor tendencia a oxidar dentro del residuo Trp39 de H1. En rosado se destaca el átomo con mayor tendencia a oxidar ubicado en el anillo indol. A la derecha: función de Fukui f^- mapeada sobre la densidad electrónica PCM-B3LYP para Trp39 y su entorno local. Representación tridimensional generada con los paquetes VMD [75] y Gaussview [122].

5. Conclusiones

Mediante modelado computacional QM/MM a nivel ONIOM(DFT:AMBER) de la dureza por aminoácido calculada para los 15 aminoácidos básicos Lys/Arg del dominio globular de la histona H1 (PDB ID: 2LS0) se determinó que Lys75 sería el residuo con mayor reactividad. En términos generales, los cinco residuos Arg presentes en la estructura serían intrínsecamente menos reactivos que las diez Lys, por lo que es esperable que ante la presencia de un carbonilo reductor pequeño y poco selectivo como la ribosa, Lys75 sea el blanco principal de modificación inicial por glicación. Se encontró evidencia que apoya la idea de una modulación de la reactividad de Lys por parte de otros residuos His, Arg o ácidos Asp cercanos.

Estas tendencias se mantienen con variaciones menores al cambiar el funcional de la densidad empleado para describir la región QM en los cálculos ONIOM (se usó DFT = B3LYP, M06 y ω B97X-D y solamente el ordenamiento de algunas Arg se ve afectado significativamente por la inclusión de correcciones por dispersión, bajando la dureza de algunos residuos Arg que parecen ser muy sensibles a la estructura de su entorno local) y al tener en cuenta las variaciones estructurales globales y locales que puede inducir en el dominio la desprotonación del residuo básico (a pH fisiológico todos ellos están protonados, con valores de pKa en el rango 9-11 para Lys y mayores que 12 para los residuos Arg) necesaria para que el ataque nucleofílico sobre el carbonilo de la ribosa acíclica.

Respecto al mecanismo de reacción de Lys zwitteriónica en solución acuosa con ribosa y ADP-ribosa modelados a nivel PCM-DFT/6-31G** (DFT = B3LYP y ω B97X-D) se determinó la estructura de los distintos intermediarios de glicación CBL, BS, enamínol y PA y se corroboró la importancia de incluir en el modelo moléculas de agua explícita que actúan como catalizador bifuncional de estos procesos, en especial en el segundo paso de formación de la BS, limitante de la velocidad del mecanismo de glicación temprana. La inclusión de una primera agua catalítica reduce en un 50% la barrera de energía libre a 298 K obtenida para la deshidratación directa de CBL y al incorporar una segunda molécula catalizadora, la reducción alcanza al 30% del valor inicial. Al incluir el grupo ADP como sustituyente en la ribosa, la glicación inicial se ve facilitada por dos lados al convertir el primer paso de formación de CBL en exergónico y reducir la barrera del segundo paso, que también se beneficia cinéticamente por la participación de moléculas de agua como catalizador bifuncional, apoyando los resultados de Cervantes-Laurean *et al.* en cuanto a la mayor reactividad de ADP-ribosa como agente glicante de H1 [11]. Si bien el uso del funcional de la densidad ω B97X-D parece reproducir mejor la cinética de los procesos directos respecto a lo que se conoce en general de su velocidad, las diferencias se atenúan al incluir moléculas de agua en los pasos posteriores.

Tomando como punto de partida la estructura en solución de H1 con Lys75 desprotonada y las estructuras de BS y PA de Lys con ribosa obtenidas a nivel IEFPCM-B3LYP/6-31G** en solución acuosa, se parametrizó el campo de fuerza para los residuos Lys modificados (describiendo la región de la unión de Lys a la proteína en forma similar al Modelo 2 de región QM usado en los cálculos ONIOM) y se caracterizaron los dos productos de glicación formados en H1 bajo condiciones quasi-fisiológicas por simulaciones de dinámica molecular clásica.

Así se determinó que la glicación induce alteraciones sobre la estructura y flexibilidad del dominio globular de H1 a lo largo de 30 ns de simulación en ambos productos H1-BS_{K75} y H1-PA_{K75} respecto a H1-WT: mientras la formación de la BS vuelve más rígida la estructura proteica y deja al residuo Lys75 glicado orientado hacia Lys79 (que aparece como el siguiente blanco de glicación también en BS), la formación de PA vuelve más flexible la estructura y deja al residuo Lys75 modificado orientado hacia el residuo Lys66, para el que se encuentra evidencia de una modulación diferencial de su reactividad, que se activa gradualmente al avanzar los estadios de glicación y que a partir de la formación del PA pasa a tener un papel central ante la posibilidad de una cascada de múltiple modificación por glicación, al que se suman a este punto Lys7 y Arg78. Se evidenció además en esta comparación la existencia de una zona (hélice $\alpha 2$) donde la flexibilidad se mantiene similar entre **H1-WT y H1-PA_{K75}** y se reduce en **H1-BS_{K75}**, lo que podría ser un indicio de que se trata de una región involucrada en la modulación de la interacción ADN-histona. También se aprecia que los cambios estructurales mayores se localizan en las hojas beta y los giros que conectan los motivos secundarios más organizados.

En cuanto a la tendencia a oxidar de la proteína, se identificó a Trp39 (ubicado muy próximo a Lys7 en las estructuras **Hs1p y H1-WT-oniom**) como el residuo más propenso a oxidar. Si bien esta tendencia se acentúa en las estructuras glicadas, en las que empieza a perfilarse el residuo Met3 como un punto de oxidación competitivo o preferencial respecto a Trp39 (este resultado depende del funcional de la densidad usado, ya que al incluir correcciones por dispersión Trp39 se mantiene firme como el punto de oxidación en **H1-BS_{K75} y H1-PA_{K75}**). Todo ello aporta evidencia para sostener la idea de una sinergia glicación-oxidación y el que el aumento de la tendencia a oxidar sea más marcado en H1-BS y que la reactividad de algunos residuos se potencie hacia H1-PA lleva a concluir la conveniencia de concentrar los esfuerzos de diseño de fármacos para inhibir/revertir la glicación en la etapa de formación de la BS. Adicionalmente la evidencia encontrada a través de la evaluación de la función de Fukui f^+ señala la localización del proceso oxidativo en el anillo indol indicativo de un involucramiento de la vía de la quinurenina.

Finalmente, desde el punto de vista metodológico se validaron modelos materiales y computacionales adecuados para estudiar este problema complejo concreto, destacándose la necesidad de incluir correcciones por dispersión en los funcionales de la densidad utilizados para reflejar correctamente la reactividad de algunos residuos Arg

muy sensibles a su entorno (Arg46 y Arg78) y la facilidad de oxidación del residuo Trp39 a lo largo de las distintas modificaciones resultantes de la glicación.

Glosario de términos técnicos

AMBER: Acrónimo para *Assisted Model Building with Energy Refinement*, es el nombre de un paquete de *software* de dinámica molecular basado en el campo de fuerza AMBER desarrollado por Kollman.

B3LYP: Funcional de la densidad híbrido y no local, que permite obtener la energía y densidad electrónica del sistema molecular en el marco de un tratamiento de Kohn-Sham de la DFT (cuántico).

Campo de fuerza: Engloba la forma de las funciones matemáticas usadas para describir la energía potencial de un sistema molecular dentro de la mecánica molecular y la parametrización empleada. Permite calcular la geometría molecular y energías relativas entre isómeros conformacionales.

Conjunto de base: Conjunto de funciones matemáticas usadas para representar los orbitales atómicos (OA) con los que se construye los orbitales moleculares (OM) como combinación lineal de los primeros (TOM-LCAO). Puede incluir funciones de polarización y difusas. En este trabajo de tesis se usó un conjunto de base de Pople 6-31G(d,p) o 6-31G**.

DFT: Teoría de modelado mecánico-cuántico que se basa en el uso de funcionales de la densidad electrónica a partir de los teoremas de Hohenberg-Kohn y Kohn-Sham. Permite incorporar efectos de correlación electrónica dinámica.

DFT conceptual (dureza y funciones de Fukui): Este enfoque también identificado como DFT químico se desarrolló en los años 80 y está basado en el estudio del funcional $E=E[N,v]$ donde E es la energía del sistema, N el número de electrones y v el potencial externo al que están sometidos estos electrones. Parte del concepto que en una reacción química se ve alterado N, v o ambos. La respuesta del sistema junto a la magnitud de la perturbación permiten caracterizar la reactividad al inicio de la reacción y comparar reacciones similares. Fundamental en este tipo de estudio son las funciones de respuesta de la energía vs la perturbación. Estas funciones son usadas en el principio de igualdad de la electronegatividad y en el principio de ácidos y bases duros o blandos tanto a nivel global como local.

La función de Fukui indica el cambio de la densidad electrónica en una posición dada cuando el número de electrones cambia. Se pueden definir dos diferentes versiones finitas de la función correspondiente a la adición o sustracción de un electrón. Para el caso utilizado en esta tesina, f⁻ se define como:

$$f^-(r) = \rho_N(r) - \rho_{N-1}(r)$$

A la segunda derivada de la energía con respecto al número de electrones se le denomina dureza (η), siendo su cantidad inversa denominada blandura (S). La dureza es una propiedad global del sistema y mide la resistencia impuesta por este, al cambio en su distribución electrónica.

Funcionales híbridos: Son funcionales de intercambio contruidos como combinación lineal del intercambio exacto de Hartree-Fock y términos de intercambio local y corregido por el gradiente, usados en combinación con funcionales de correlación (pueden ser locales o corregidos por el gradiente). Su desarrollo se debe principalmente a las contribuciones del científico canadiense Axel Becke.

Hessiana, matriz: Matriz de derivadas segundas de la energía potencial de una molécula con respecto a las posiciones nucleares. Da información sobre la curvatura de la superficie de energía potencial en puntos estacionarios de la misma, indicando si la especie química descrita es un

estado de transición (curvatura positiva en todas las direcciones excepto la que corresponde a la coordenada de reacción) o una especie estable (curvatura positiva en todas las direcciones).

IRC: Coordenada de reacción intrínseca con la que se construye un camino de reacción a partir del conocimiento de la estructura del estado de transición, siendo la ruta de menor energía que conecta dicha especie con reactivos y productos en un proceso químico. En este trabajo se utilizó el algoritmo HPC para su construcción.

M06: Funcional híbrido de Truhlar y Zhao, basado en la aproximación meta-GGA. Utiliza funcionales flexibles altamente parametrizados en base a datos de referencia de alta calidad. Requieren cuidado especial en la selección de la grilla para la integración numérica, en este trabajo se utilizó una grilla ultrafina optimizada (pruned) de 99*590 puntos (99 capas radiales y 590 puntos angulares por capa alrededor de cada posición nuclear).

Meta-GGA: Funcionales de la densidad de tercera generación derivados de los denominados *Generalized Gradient Approximation* (GGA). Su expresión depende de la densidad electrónica ρ_σ , su gradiente $\nabla\rho_\sigma$ y su Laplaciano $\nabla^2\rho$ (la densidad de energía cinética de spin $\tau_\sigma(r)$).

NPA: Análisis de Weinhold de la población electrónica en base a orbitales naturales que diagonalizan la matriz densidad y se usa para obtener cargas atómicas.

ONIOM: Método de modelado combinado de naturaleza sustractiva que describe distintas partes de un mismo sistema molecular a través de métodos de diferente exactitud y costo. En este trabajo se empleó la mecánica cuántica (QM) en la región reactiva de la proteína y la mecánica clásica (MM) en el resto de su estructura. En este trabajo se utilizó bajo una aproximación de “embedding mecánico”.

Optimización de geometría: Procedimiento para la búsqueda de especies estables o estados de transición sobre una superficie de energía potencial. Requiere la verificación de la naturaleza del punto estacionario mediante el análisis de los valores propios de la matriz Hessiana correspondiente al mismo nivel de cálculo.

PCM (Polarizable Continuum Model): Método que modela el entorno como un continuo de constante dieléctrica (que puede ser uniforme o variable) ubicando al soluto en una cavidad dentro del medio. En este trabajo se utilizó la aproximación IEF y una cavidad adaptada a la forma molecular y se calcularon las contribuciones no electrostáticas (dispersión, repulsión y cavitación).

Radios de Bondi: Radios atómicos determinados por Bondi en 1964 que se utilizan en la generación de las cavidades ajustadas a la forma molecular donde se posicionará el soluto en un solvente descrito implícitamente.

Single Point: Cálculo a posiciones nucleares fijas; en el caso de métodos clásicos proporciona la energía del sistema, asociado a métodos cuánticos permite obtener la energía y la función de onda.

ω B97X-D: Funcional híbrido con correcciones de largo-rango que incluyen toda el intercambio de Hartree-Fock desarrollados por Chai y Head-Gordon; incluye dispersión empírica según el modelo D2 de dispersión de Grimme con una función de damping.

Bibliografía

1. Kulkarni M., Korwar A., Mary S., Bhonsle H., Giri. A. **Glycated proteome: From reaction to intervention.** 2013, *Proteomics Clin. Appl.*, Vol. 7, pp. 155-170.
2. *Registro Nacional de cáncer. Comisión Honoraria de Lucha contra el cáncer.* Incidencia 2006-2010, Publicado 2010.
3. *Ministerio de Salud Pública. Programa Nacional de Diabetes.* Acceso 16/03/11, http://www.msp.gub.uy/uc_1735_1.html.
4. Ketzoian C., Romero S., Dieguez E., Cairolo G., Rega I., Caseres R., Chouza C. **Prevalence of demential syndromes in a population of Uruguay. Study of "Villa del Cerro".** 1997, *J. Neurol. Sci.*, Vol. 150, pp. 150-155.
5. Bunn H., Shapiro R., McManus M., Garrick L., McDonald M., Gallop P., Gabbay K. **Structural heterogeneity of human hemoglobin-A due to non-enzymatic glycosylation.** 1979, *J. Biol. Chem.*, Vol. 254, pp. 3892-3898.
6. Sen S., Kar M., Roy A., Chakraborti A. **Effect of nonenzymatic glycation on functional and structural properties of hemoglobin.** 2005, *Biophys. Chem.*, Vol. 113, pp. 289-298.
7. Ganea E., Harding J. **Inactivation of glucosa6-phosphate-dehydrogenase by glycation.** 1994, *Biochem. Soc. Trans.*, Vol. 22, pp. 181-185.
8. Blakytyn R., Harding J. **Glycation (nonenzymatic glycosylation) inactivates glutathione-reductase.** 1992, *Biochem. J.*, Vol. 288, pp. 303-307.
9. Baldwin J., Lee L., Leung T., Muruganandam A., Mutus B. **Identification of the site of nonenzymatic glycation of glutathione-peroxidase-rationalization of the glycation-related alterations on the basis of 3-dimensional-protein-structure.** 1995, *Biochem. Biophys. Acta*, Vol. 1247, pp. 60-64.
10. Arai K., Maguchi S., Fujii S., Ishibashi H., Oikawa K., Taniguchi N. **Glycation and inactivation of human Cu-Zn-superoxide dismutase-identification of the in vitro glycation sites.** 1987, *J. Biol. Chem.*, Vol. 262, pp. 16969-16972.
11. Cervantes-Laurean D., Jacobson E., Jacobson M. **Glycation and Glyoxidation of Histones by ADP-ribose.** 1996, *J. Biol. Chem.*, Vol. 18, pp. 10461-10469.
12. Talasz H., Wasserer S., Puschendorf B. **Nonenzymatic Glycation of Histones In Vitro and In Vivo.** 2002, *J. Cellular Biochem.*, Vol. 85, pp. 24-34.

13. *Haan M.* **Therapy insight: type 2 diabetes mellitus and the risk of late-onset Alzheimer's disease.** 2006, *Nat. Clin. Pract. Neurol.*, Vol. 2, pp. 159-166.
14. *Maillard L.* **Action of amino acids on sugars. Formation of melanoidins in a methodical way.** 1912, *Compt. Rend.*, Vol. 154, pp. 66-68.
15. *Rabbani N., Thornalley P.* **Glycation research in amino acids: a place to call home.** 2012, *Amino Acids*, Vol. 42, pp. 1087-1096.
16. *Hassa P., Haenni S., Elser M., Hottiger M.* **NuclearADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going?** 2006, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, Vol. 70, pp. 789-829.
17. *Vistoli G., De Maddis D., Cipak A., Zarkovic N., Carini M., Aldini G.* **Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation.** 2013, *Free Rad. Res.*, Vol. 47, pp. 3-27.
18. *Adrover M, Mariño L., Sanchis P., Pauwels K., Kraan Y., Lebrun P., Vilanova B., Muñoz F., Broersen K., Donoso J.* **Mechanistic Insights in Glycation-Induced Protein Aggregation.** 2014, *Biomacromol.*, Vol. 15, pp. 3449-3462.
19. *Takahashi K.* **The reactions of phenylglyoxal and related reagents with amino acids.** 1977, *J. Biochem.*, Vol. 81, pp. 395-402.
20. *Harding J., Beswick H.* **The possible contribution of glucose autoxidation to protein modification of diabetes.** 1988, *Biochem. J.*, Vol. 249, pp. 617-619.
21. *Ahmad S., Salman M., Akhter F., Sajid M., Khan A., Ashraf J., Pati R., Shahab U.* **Glycoxidation of biological macromolecules: A critical approach to halt the menace of glycation.** 2014, *Glycobiology*, Vol. 0, pp. 1-12.
22. *Leone V.* **Fuente de la juventud.** 2005, Trabajo especial I de la Lic. en Bqica. Facultad de Ciencias, Univ. de la República.
23. *Singh R., Barden A., Mori T., Beilin L.* **Advanced glycation end-products: a review.** 2001, *Diabetologia*, Vol. 44, pp. 129-146.
24. *Zhang Q., Ames J., Smith R., Baynes J., Metz T.* **A Perspective on the Maillard Reaction and the Analysis of Protein Glycation by Mass Spectrometry: Probing the Pathogenesis of Chronic Disease.** 2009, *J. Proteome Res.*, Vol. 8, pp. 754-769.

25. *Peyroux J., Sternberg M.* **Advanced Glycation End Products(AGEs): pharmacological inhibition in diabetes.** 2006, *Pathologie Biologie*, Vol. 54, pp. 405-419.
26. *Johansen M., Kierner L., Brunak S.* **Analysis and prediction of mammalian protein glycation.** 2006, *Glycobiology*, Vol. 16, pp. 844-853.
27. *Venkatraman J., Aggarwal K., Balaram P.* **Helical peptide models of protein glycation: proximity effects in catalysis of the Amadori rearrangement.** 2001, *Chem. Biol.*, Vol. 8, pp. 611-625.
28. *Nasiri R., Field M., Zahedi M., Moosavi A.* **Cross-linking mechanisms of arginine and lysine with α,β -dicarbonyl compounds in aqueous solution.** 2011, *J. Phys. Chem A*, Vol. 115, pp. 13542-13555.
29. *Leone V.* **Análisis comparativo del mecanismo de reacción del glioxal con metilamina y aminoguanidina y el papel del solvente de ellos. Una primera aproximación a las etapas iniciales de la glicación y su inhibición.** 2005, Trabajo especial II de la Lic. en Bqica. Facultad de Ciencias, Univ. de la República.
30. *Arena S., Salzano A., Renzone G., D'Ambrosio C., Scaloni A.* **Non-enzymatic glycation and glycooxidation protein products in foods and diseases: an interconnected, complex scenario fully open to innovative proteomic studies.** 2013, *Mass Spectrometry Reviews*, Vol. 33, pp. 49-77.
31. *Guedes S., Vitorino R., Domingues M., Amado F.* **Glycation and oxidation of histones H2B and H1 in vitro study and characterization by mass spectrometry.** 2011, *Anal. Bioanal. Chem.*, Vol. 399, pp. 3529-3539.
32. *Aldini G., Vistoli G., Stefek M., Chondrogianni N., Grune T., Sereikaite J., Sadowska I., Bartosz G.* **Molecular strategies to prevent, inhibit, and degrade advanced glycooxidation and advanced lipoxidation end products.** 2013, *Free Rad. Res.*, Vol. 47, pp. 93-137.
33. *Sadowska I., Galiniak S., Bartosz G.* **Kinetics of Glycooxidation of Bovine Serum Albumin by Glucose, Fructose and Ribose and Its Prevention by Food Components.** 2014, *Molecules*, Vol. 19, pp. 18828-18849.
34. *Monacelli F., Storace D., D'Arriego C., Sanguineti R., Borghi R., Pacini D., Furfano A., Pronzato M., Odetti P., Traverso N.* **Structural Alterations of Human Serum Albumin Caused by Glycative and Oxidative Stressors Revealed by Circular Dichroism Analysis.** 2013, *Int. J. Molec. Sci.*, Vol. 14, pp. 10694-10709.
35. *Morgan P., Dean R., Davies M.* **Inactivation of cellular enzymes by carbonyls and protein-bound glycation/glycooxidation products.** 2002, *Arch. Biochem. Biophys.*, Vol. 403, pp. 259-269.

36. *Wolff S., Dean R.* **Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes.** 1987, *Biochem. J.*, Vol. 245, pp. 243-250.
37. *Harshman S., Young N., Parthun M., Freitas M.* **H1 histones: current perspectives and challenges.** 2013, *Nucleic Acids Res.*, pp. 1-17.
38. *Hoffmann M., Trembleau S., Muller S., Steiner G.* **Nucleic acid-associated autoantigens: Pathogenic involvement and therapeutic potential.** 2010, *J. of Autoimmunity*, Vol. 34, pp. 178-206.
39. *Lewin B.* **Genes.** 1996 : 2da edición, Editorial Reverté, pp. 542-544.
40. *Bell W., Losick G.* **Biología molecular del gen.** 2008 : 5ta edición, Editorial Panamerican, pp. 173-175.
41. *Hansen J.* **Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms and functions.** 2002, *Annu Rev. Biophys., Biomol. Struct.*, Vol. 31, pp. 361-392.
42. *Hizume K., Yoshimura S., Takeyasu K.* **Linker histone H1 per se can induce three-dimensional folding of chromatin fiber.** 2005, *Biochemistry*, Vol. 44, pp. 12978-12989.
43. *Lever M., Th'ng J., Sun X., Hendzel M.* **Rapid exchange of histone H1.1 on chromatin in living human cells.** 2000, *Nature*, Vol. 408, pp. 873-876.
44. *Misteli T., Gunjan A., Hock R., Bustin M., Brown D.* **Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells.** *Nature*, Vol. 408, pp. 877-881.
45. *Wells D., Brown D.* **Histone and histone gene compilation and alignment update.** 1991, *Nucleic Acids Res.*, Vol. 19, pp. 2173-2188.
46. *Ausio J.* **Histone variants: the structure behind the function.** *Brief Funct. Genomic Proteomic*, Vol. 5, pp. 228-243.
47. *Weiss T., Hergeth S., Zeissler U., Izzo A., Tropberger P., Zee B., Dundr M., Garcia M., Daujat S., Schneider R.* **Histone H1 variant-specific lysine methylation by G9a/KMT1C and Glp1/KMT1D.** 2010, *Epigenetics and Chromatin*, Vol. 3, pp. 1-13.
48. *Khochibin S.* **Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function.** 2001, *Gene*, Vol. 271, pp. 1-12.
49. *Parseghian M., Newcomb R., Hamkalo B.* **Distribution of somatic H1 subtypes is non-random on active vs. inactive chromatin II: distribution in human adult fibroblasts.** 2001, *J. Cell Biochem.*, Vol. 83, pp. 643-659.

50. Yang S., Kim B., Norwood L., Skoultchi A. **H1 linker histone promotes epigenetic silencing by regulating both DNA methylation and histone H3 methylation.** 2012, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Vol. 110, pp. 1708-1713.
51. Parseghian M., Clark R., Hauser L., Dvorkin N., Harris D., Hamkalo B. **Fractionation of human H1 subtypes and characterization of a subtype-specific antibody exhibiting non-uniform nuclear staining.** 1993, Chromosome Res., Vol. 1, pp. 127-139.
52. Brenemann J., Yau P., Teplitz R., Bradbury E. **A light microscope study of linker histone distribution in rat metaphase chromosomes and interphase nuclei.** 1993, Exp. Cell Res., Vol. 206, pp. 16-26.
53. Gorka C., Fakan S., Lawrence J. **Light and electron microscope immunocytochemical analyses of histone H1(0) distribution in the nucleus of Friend erythroleukemia cells.** 1993, Exp. Cell Res., Vol. 205, pp. 152-158.
54. Yamamoto T., Horikoshi M. **Cloning of the cDNA encoding novel subtype of histone H1.** 1996, Gene, Vol. 173, pp. 281-285.
55. Stoldt S., Wenzel D., Schulze E., Doenecke D., Happel N. **G1 phase-dependent nucleolar accumulation of human histone H1x.** 2007, Biol. Cell, Vol. 99, pp. 541-552.
56. Doenecke D., Albig W., Bode C., Drabent B., Franke K., Gavenis K., Witt O. **Histones: genetic diversity and tissue-specific gene expression.** 1997, Histochem. Cell Biol., Vol. 107, pp. 1-10.
57. Happel N., Doenecke D. **Histone H1 and its isoforms: Contribution to chromatin structure and function.** 2008, Gene, Vol. 431, pp. 1-12.
58. Panyim S., Chalkley R. **A new histone found only in mammalian tissues with little cell division.** 1969, Biochem. Biophys. Res. Commun, Vol. 37, pp. 1042-1049.
59. Zlatanova J., Doenecke D. **Histone H1 zero: a major player in cell differentiation?** 1994, Faseb J., Vol. 8, pp. 1260-1268.
60. Parseghian M., Harris D., Rishwain D., Hamkalo B. **Characterization of a set of antibodies specific for three human histone H1 subtypes.** 1994, Chromosoma, Vol. 103, pp. 198-208.
61. Thomas J. **Histone H1: location and role.** 1999, Curr. Opin. Cell Biol., Vol. 11, pp. 312-317.
62. Wolffe A. **Histone H1.** 1997, Int. J. Biochem. Cell Biol., Vol. 29, pp. 1463-1466.

63. Vila R., Ponte I., Jiménez M., Rico M., Suau P. **An inducible helix–Gly–Gly–helix motif in the N-terminal domain of histone H1e: A CD and NMR study.** 2002, *Protein Sci.*, Vol. 11, pp. 214-220.
64. Brown D. **Histone H1 and the dynamic regulation of chromatin function.** 2003, *Biochem. Cell Biol.*, Vol. 81, pp. 221-227.
65. Harvey A., Downs J. **What functions do linker histones provide?.** 2004, *Mol. Microbiol.*, Vol. 53, pp. 771-775.
66. Ullrich O., Grune T. **Proteasomal degradation of oxidatively damaged endogenous histones in K562 human leukemic cells.** 2001, *Free Radic. Biol. Med.*, Vol. 31, pp. 887– 893.
67. Cervantes-Laurean D., Roberts M., Jacobson E., Jacobson M. **Nuclear proteasome activation and degradation of carboxymethylated histones in human keratinocytes following glyoxal treatment.** 2005, *Free Rad. Biol. Med.*, Vol. 38, pp. 786– 795.
68. Merker K., Ullrich O., Schmidt H., Sitte N., Grune T. **Stability of the nuclear protein turnover during cellular senescence of human fibroblasts.** 2003, *FASEB J.*, Vol. 17, pp. 1963-1965.
69. Ramakrishnan V. **Histone structure and the organization of the nucleosome.** 1997, *Annu. Rev. Biophys., Biomol. Struct.*, Vol. 26, pp. 83-112.
70. Bohm L., Mitchell T. **Sequence conservation in the N-terminal domain of histone H1.** 1985, *FEBS Lett.*, Vol. 193, pp. 1-4.
71. Holde K. **Chromatin.** 1989, *Cell*, Vol. 59, pp. 243-244.
72. Th'ng J., Guo X., Swank R., Crissman H., Bradbury E. **H1 family histones in the nucleus. Control of binding and localization by the C-terminal domain.** 2005, *J. Biol. Chem.*, Vol. 280, pp. 27809-27814.
73. De S., Brown D., LuZ., Leno G., Wellman S., Sittman D. **Histone H1 variants differentially inhibit DNA replication through an affinity for chromatin mediated by their carboxyl-terminal domains.** 2002, *Gene*, Vol. 292, pp. 173-181.
74. Eletsky A., Lee H., Lee D., Kohan E., Janjua H., Xiao R., Acton T., Everett J., Montelione G., Prestegard J., Szyperski T. **Solution NMR Structure of the Globular Domain of Human Histone H1x, Northeast Structural Genomics Consortium (NESG) Target HR7057A.** Acceso 04/11/2014, <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2lso>.
75. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. **VMD-Visual Molecular Dynamics.** 1996, *J. Molec. Graphics*, Vol. 14, pp. 33-38.

76. *Strahl B., Allis C.* **The language of covalent histone modifications.** 2000, *Nature*, Vol. 403, pp. 41-45.
77. *Rahmanpour R., Bathaie S.* **Histone H1 Structural Changes and its Interaction with DNA in the Presence of High Glucose Concentration In Vivo and In Vitro.** 2011, *J. Biomolec. Structure & Dynamics*, Vol. 28, pp. 575-586.
78. *Cervantes-Laurean D., Minter D., Jacobson E., Jacobson M.* **Protein glycation by ADP-ribose: studies of model conjugates.** 1993, *Biochemistry*, Vol. 32, pp. 1528-1534.
79. *Pashikanti S., Boissonneault G., Cervantes-Laurean D.* **Ex vivo detection of histone H1 modified with advanced glycation products.** 2011, *Free Rad. Biol. Med.*, Vol. 50, pp. 1410-1416.
80. *Han C., Lu Y., Wu B., Liu Y., He R.* **D-ribosylation induces cognitive impairment through RAGE-dependent astrocytic inflammation.** 2014, *Cell Death & Disease*, Vol. 5, pp. 1-12.
81. *Jalbout A., Haider A., Contreras F.* **Density functional computational studies on the intermediate stage of the ribose and glycine Maillard reaction: Formation of deoxyosones in aqueous solution.** 2007, *Food Chem.*, Vol. 105, pp. 1342-1348.
82. *Chen L., Wei Y., Wang X., He R.* **Ribosylation rapidly induces alpha-synuclein to form highly cytotoxic molten globules of advanced glycation end products.** 2010, *PLoS One*, Vol. 5, pp. 1-14.
83. *Messner S., Hottinger M.* **Histone ADP-ribosylation in DNA repair, replication and transcription.** 2011, *Trends in Cell Biol.*, Vol. 21, pp. 534-542.
84. *Reale A., Malanga M., Zardo G., Strom R., Scovassi A., Farina B., Caiafa P.* **In Vitro Induction of H1-H1 Histone Cross-Linking by Adenosine Diphosphate-Ribose Polymers.** 2000, *Biochemistry*, Vol. 39, pp. 10413-10418.
85. *Voss P., Grune T.* **The nuclear proteasome and the degradation of oxidatively damaged proteins.** 2007, *Amino Acids*, Vol. 32, pp. 527-534.
86. *Roberts M., Wondrak G., Cervantes-Laurean D., Jacobson M., Jacobson E.* **DNA damage by carbonyl stress in human skin cells.** 2003, *Mutat. Res.*, Vol. 522, pp. 45-56.
87. *Gugliucci A.* **Advanced glycation of rat liver histone octamers. An in vitro study.** 1994, *Biochem. Biophys. Res Commun*, Vol. 203, pp. 588-593.

88. Xie J., Méndez J., Méndez V., Montserrat M. **Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE)**. 2013, Cellular Signalling, Vol. 25, pp. 2185-2197.
89. Monnier V. **Intervention against the Maillard reaction in vivo**. 2003, Arch. Biochem. Biophys., Vol. 419, pp. 1-15.
90. Oeckinghaus A., Ghosh S. **The NF- κ B Family of Transcription Factors and Its Regulation**. 2009, CSH Perspectives in Biol., Vol. 4, pp. 1-14.
91. Baeuerle P., Henkel T. **Function and activation of NF- κ B in the immune system**. 1994, Annu. Rev. Immunol., Vol. 12, pp. 141-179.
92. Agardh C., Stenram U., Torffvit O., Agardh E. **Effects of inhibition of glycation and oxidative stress on the development of diabetic nephropathy in rats**. 2002, J. Diabetes Complications, Vol. 16, pp. 395-400.
93. Stoynev G., Srebrevna L., Ivanov I. **Histone H1 as a Reporter Protein to Investigate Glycation in Bacteria**. 2004, Current Microbiology, Vol. 49, pp. 423-427.
94. Svensson M., Humbel S., Froese R., Matsubara T., Sieber S., Morokuma K. **ONIOM: A multi-layered integrated MO+MM method for geometry optimizations and single point energy predictions. A test for Diels-Alder reactions and Pt(P(*t*-Bu) $_3$) $_2$ +H $_2$ oxidative addition**. 1996, J. Phys. Chem., Vol. 100, pp. 19357-19363.
95. Dapprich S., Komáromi I., Byun K., Morokuma K., Frisch M. **A new ONIOM implementation in Gaussian 98. The calculation of energies, gradients and vibrational frequencies and electric field derivatives**. 1999, J. Mol. Struct. (Theochem), Vol. 462, pp. 1-21.
96. Hohenberg P., Kohn W. **Inhomogeneous Electron Gas**. 1964, Phys. Rev., Vol. 136, pp. B864-B871.
97. Cornell W., Cieplak P., Byly C., Gould I., Merz K., Ferguson D., Spellmeyer D., Fox T., Caldwell J., Kollman P. **A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules**. 1995, J. AM. Chem. Soc., Vol. 117, pp. 5179-5197.
98. Kollman P., Dixon R., Cornell W., Fox T., Chipot C., Pohorille A. **Computer Simulation of Biomolecular Systems**. 1997 : 3, Eds. Wilkinson A., Weiner P., van Gunsteren W., pp. 83-96.
99. Frisch M., Trucks G., Schlegel H., Scuseria G., Robb M., Cheeseman J., Scalmani G., Barone V., Mennucci B., Petersson G., et al. **Gaussian 09, Revision A.02**. 2009, Gaussian Inc., Wallingford CT.

100. Geerlings P., Fias S., Boisdenghien Z., De Proft F. **Conceptual DFT: chemistry from the linear response function.** 2014, Chem. Soc. Rev., Vol. 43, pp. 4989-5008.
101. Becke A. . **Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange.** 1993, J. Chem. Phys., Vol. 98, pp. 5648-5652.
102. Lee C., Yang W., Parr R. . **Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density.** 1988, Phys. Rev. B., Vol. 37, pp. 785-789.
103. Zhao Y., Truhlar D. **The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals.** 2008, Theor. Chem. Acc., Vol. 120, pp. 215-241.
104. Chai J., Head-Gordon M. **Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom-atom dispersion corrections.** 2008, Phys. Chem., Vol. 10, pp. 6615-6620.
105. Raghavachari K., Binkley J., Seeger R., Pople J. **Self-Consistent Molecular Orbital Methods. 20. Basis set for correlated wave-functions.** 1980, J. Chem. Phys., Vol. 72, pp. 650-654.
106. McLean A., Chandler G. . **Contracted Gaussian-basis sets for molecular calculations. 1. 2nd row atoms, Z=11-18.** 1980, J. Chem. Phys., Vol. 72, pp. 5639-5648.
107. GetArea. <http://curie.utmb.edu/getarea.html>. Acceso 17/02/2013.
108. H++ versión 3.1. <http://biophysics.cs.vt.edu/H++>. Acceso 06/03/15.
109. Jorgensen W., Chandrasekhar J., Madura J., Impey R., Klein M. **Comparison of simple potential functions for simulating liquid water.** 1983, J. Chem. Phys., Vol. 79, pp. 926-935.
110. Hornak V., Abel R., Okur A., Strockbine B., Roitberg A., Simmerling C. **Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters.** 2006, Proteins: Struct., Func., Genet. , Vol. 65, pp. 712-725.
111. Case D., Darden T., Cheatham T., Simmerling C., Wang J., Kollman P., et al. **AMBER 12.** 2012, University of California, San Francisco.
112. Darden T., York D., Pedersen L. **Particle mesh Ewald: An N log(N) method for Ewald sums in large systems.** 1993, J. Chem. Phys., Vol. 98, pp. 10089-10092.

113. *Pastor R., Brooks B., Szabo A.* **An analysis of the accuracy of Langevin and molecular dynamics algorithms.** 1988, *Mol. Phys.*, Vol. 65, pp. 1409-1419.
114. *Berendsen H., Postma J., van Gunsteren W., DiNola A., Haak J.* **Molecular dynamics with coupling to an external bath.** 1984, *J. Chem. Phys.*, Vol. 81, pp. 3684-3690.
115. *Ryckaert J., Ciccotti G., Berendsen H.* **Numerical integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of n-Alkanes.** 1977, *J. Comp. Phys.*, Vol. 23, pp. 327-341.
116. *Roe D., Cheatham T.* **PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data.** 2013, *J. Chem. Theory Comput.*, Vol. 9, pp. 3084-3095.
117. *Salomon-Ferrer R., Case D., Walker R.* . **An overview of the Amber biomolecular simulation package.** 2012, *WIREs Comput. Mol. Sci.*
118. *Tomasi J., Mennucci B., Cammi. R.* . **Quantum mechanical continuum solvation models.** 2005, *Chem. Rev.*, Vol. 105, pp. 2999-3093.
119. *Fukui K.* **The path of chemical-reactions-The IRC approach.** 1981, *Acc. Chem. Res.*, Vol. 14, pp. 363-368.
120. *Hratchian H., Schlegel H.* **Accurate reaction paths using a Hessian based predictor-corrector integrator.** 2004, *J. Chem. Phys.*, Vol. 120, pp. 9918-9924.
121. *Glendenning E., Landis C., Weinhold F.* . **Natural bond orbital methods.** 2012, *WIREs Comput. Mol. Sci.*, Vol. 2, pp. 1-42.
122. *Denninton V., Keith R., Millam T.* **GaussView Version 5.** 2009, Semichem Inc., Shawnee Mission, KS.
123. *Bayly C., Cieplak P., Cornell W., Kollman P.* **A Well-Behaved Electrostatic Potential Based Method Using Charge Restraints for Deriving Atomic Charges: The RESP Model.** 1993, *J. Phys. Chem*, Vol. 97, pp. 10269-10280.
124. *Jensen F.* **Introduction to Computational Chemistry.** 2007 : 2da edición, John Wiley & Sons Ltd, pp. 487-494.
125. *Parr R., Yang W.* . **Density Functional Approach to the Frontier-Electron Theory of Chemical Reactivity.** 1984, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 106, pp. 4049-4050.
126. *Bondi A.* **Van der Waals volumes and radii.** 1964, *J. Phys. Chem.*, Vol. 68, pp. 441-451.

127. Zhao Y., Truhlar D. **Density Functionals with Broad Applicability in Chemistry.** 2008, Acc. Chem. Res., Vol. 41, pp. 157-167.

128. Stone T., Darlington L. **The Kynurenine pathway as a therapeutic target in cognitive and neurodegenerative disorders.** 2013, BJP, Vol. 169, pp. 1211-1227.

Anexo: información suplementaria tabulada

Tabla S1. Energía de los orbitales KS-HOMO y KS-LUMO a nivel ONIOM(DFT:AMBER) localizados sobre los residuos Lys/Arg desprotonados en H1sp.

Tipo y # Residuo	ϵ KS-HOMO(eV)			ϵ KS-LUMO(eV)		
	B3LYP	M06	ω B97X-D	B3LYP	M06	ω B97X-D
Lys						
7	-8,03	-8,52	-10,29	-5,04	-4,83	-2,72
29	-7,95	-8,38	-10,15	-4,36	-4,11	-1,96
35	-8,22	-8,65	-10,45	-4,61	-4,38	-2,24
36	-8,11	-8,54	-10,34	-4,81	-4,55	-2,38
50	-7,92	-8,35	-10,12	-4,47	-4,22	-2,09
54	-7,78	-8,22	-10,01	-4,74	-4,48	-2,32
66	-7,86	-8,33	-10,12	-4,62	-4,35	-2,19
75	-7,32	-7,78	-9,58	-4,75	-4,49	-2,33
79	-7,46	-7,95	-9,74	-4,51	-4,27	-2,12
80	-7,89	-8,35	-10,15	-4,39	-4,14	-2,00
Arg						
17	-7,81	-8,25	-10,04	-3,68	-3,55	-1,63
18	-8,00	-8,46	-10,23	-3,72	-3,60	-1,67
22	-7,92	-8,38	-10,18	-3,79	-3,67	-1,73
46	-8,03	-8,46	-10,26	-3,80	-3,67	-1,74
78	-7,76	-8,22	-9,99	-3,33	-3,20	-1,26

Tabla S2. Reactividad calculada a nivel ONIOM(DFT:AMBER) y área expuesta al solvente (SASA) por residuo en H1-WT-oniom, H1-WT-mm, H1-BS_{K75} y H1-PA_{K75}^a

Residuo Serie Lys	H1-WT-oniom			H1-WT-mm			H1-BS _{K75} -mm			H1-PA _{K75} -mm		
	Dureza μ (eV)		Área (Å ²)	Dureza μ (eV)		Área (Å ²)	Dureza μ (eV)		Área (Å ²)	Dureza μ (eV)		
	B3LYP	ω B97X-D		B3LYP	ω B97X-D		B3LYP	ω B97X-D		B3LYP	ω B97X-D	
K7	3,15	7,69	99,43	2,80	7,04	120,05	3,27	7,92	116,45	2,93	7,61	
K29	3,76	8,39	95,52	3,38	7,64	125,89	3,48	8,15	99,61	3,39	8,02	
K35	3,78	8,39	77,22	3,43	7,70	93,70	3,33	8,02	90,59	3,33	8,00	
K36	3,49	8,17	141,80	3,03	7,28	131,04	3,77	8,44	135,20	3,61	8,27	
K50	3,61	8,23	101,71	3,17	7,42	112,17	3,19	7,87	102,86	3,50	8,12	
K54	3,22	7,89	124,39	2,76	7,01	140,19	3,40	8,06	127,74	3,46	8,04	
K66	3,48	8,18	136,95	3,11	7,36	178,65	2,96	7,67	169,14	2,76	7,46	
K75	--	--	53,85	2,22	6,49	--	--	--	--	--	--	
K79	3,20	7,88	145,72	2,85	7,14	129,61	2,87	7,57	153,16	3,21	7,91	
K80	3,74	8,38	106,83	3,33	7,60	188,33	3,34	8,00	99,47	3,68	8,36	
Serie Arg												
R17	4,11	8,39	170,14	3,78	7,94	126,14	4,21	8,55	128,68	3,94	8,26	
R18	4,32	8,61	175,94	3,97	8,12	194,95	4,32	8,59	155,88	3,46	7,75	
R22	4,62	8,94	190,63	4,24	8,41	178,97	3,70	8,05	239,69	3,63	7,92	
R46	4,23	8,52	138,31	3,85	8,01	91,58	3,72	8,02	113,37	3,86	8,23	
R78	4,39	8,69	177,31	4,06	8,21	149,36	4,06	8,36	216,54	3,27	7,56	

^a Se señalan en rojo los residuos más activos en cada estructura y en violeta aquéllos que le siguen en reactividad.

Tabla S3. Energética relativa (en Kcal/mol) para los primeros cuatro pasos de reacción con ribosa como carbonilo reductor con n = 0 ,1 aguas catalíticas.

Funcional	$\Delta[E+ZPE/H^{298}/G^{298}]_{CI^a}$	$\Delta[E+ZPE/H^{298}/G^{298}]_{TS^b}$	$\Delta[E+ZPE/H^{298}/G^{298}]_{CF^c}$	$\Delta[E+ZPE/H^{298}/G^{298}]_{rxn^d}$
Paso 1 – Formación directa de CBLA a través de TS1				
B3LYP	0,6/0,02/12,9	17,7/17,0/30,2	-	-6,2/-6,6/5,8
M06	-3,9/-10,9/1,1	14,7/6,7/19,5	-	-11,5/-19,1/-6,3
ωB97X-D	-4,2/-5,0/8,7	12,4/11,6/25,0	-	-12,1/-12,6/0,7
Paso 2 – Formación de BS directa a través de TS2				
B3LYP	-1,5/-1,4/-0,8	63,7/63,7/62,9	1,1/2,3/-1,7	6,0/7,4/-4,9
M06	-1,4/-1,2/-1,6	51,6/51,6/51,7	6,0/6,7/4,9	12,0/13,5/1,7
ωB97X-D	-1,2/-1,1/-1,7	53,5/53,5/53,9	6,0/6,6/5,3	11,2/12,3/0,9
Paso 2 – Formación de BS catalizada por agua a través de TS2_{1w}				
B3LYP	-6,3/-6,7/2,8	26,4/25,8/27,8	-0,3/0,2/-1,0	10,8/12,6/-8,5
M06	-7,0/-7,4/1,7	32,0/31,6/32,1	5,4/6,1/3,7	17,6/19,7/-1,7
ωB97X-D	-7,3/-7,7/1,5	31,4/30,9/32,4	4,2/4,7/3,0	17,2/18,9/-2,3
Paso 3 – Rearreglo interno a Enolamina catalizada por agua a través de TS3				
B3LYP	-0,2/-0,1/-0,6	34,8/34,0/37,1	6,1/6,4/6,5	9,8/10,4/1,8
M06	-0,8/-0,4/-2,3	37,5/36,7/39,4	6,2/6,2/7,6	8,5/8,8/0,7
ωB97X-D	-1,3/-1,0/-2,1	36,4/35,7/37,9	6,0/6,3/5,5	9,0/9,5/-0,1
Paso 4 – Rearreglo interno a PA catalizada por agua a través de TS4				
B3LYP	-4,4/-5,2/-2,7	29,6/28,7/30,9	-7,9/-7,7/-8,1	-0,4/0,5/-10,5
M06	-5,0/-5,6/-4,1	28,7/27,8/30,3	-9,8/-9,5/-10,7	0,1/1,1/-10,4
ωB97X-D	-4,6/-5,3/-2,8	30,0/29,1/31,0	-9,3/-9,0/-10,0	0,2/1,1/-10,4

a Energética relativa respecto a los reactivos separados al infinito.

b Barreras calculadas respecto a los reactivos, o al CI en los casos en que resulta más estable que los mismos.

c Energética relativa respecto a los productos

d Energías de reacción calculadas como la diferencia de productos con/sin aguas correspondientes y reactivos obtenidos del IRC.

Tabla S4. Energética relativa IEFPCM-B3LYP/6-31G (en Kcal/mol) para los primeros cuatro pasos de reacción con ADP-ribosa como carbonilo reductor con n = 0,1, 2 aguas catalíticas.**

	$\Delta[E+ZPE/H^{298}/G^{298}]_{CI^a}$	$\Delta[E+ZPE/H^{298}/G^{298}]_{TS^b}$	$\Delta[E+ZPE/H^{298}/G^{298}]_{CF^c}$	$\Delta[E+ZPE/H^{298}/G^{298}]_{rxn^d}$
Paso 1 – Formación directa de CBLA a través de TS1				
N=0	//	17,1/16,9/17,4	-6,8/-6,7/-7,5	-12,4/-13,1/-9,5
Paso 2 – Formación de BS catalizada por agua a través de TS2_{1w}				
N=1	-5,9/-6,2/3,4	26,3/25,7/27,9	-0,6/-0,01/-1,7	10,4/11,6/-6,5
Paso 2 – Formación de BS catalizada por agua a través de TS2_{1w}				
N=2	-12,6/-13,6/-51,8	20,5/19,8/21,5	1,7/-0,8/-1,5	17,1/19,0/-9,7
Paso 3 – Rearreglo interno a Enolamina catalizada por agua a través de TS3				
N=1	6,4/7,4/-3,2	34,7/34,0/36,8	0,1/-0,4/4,3	4,2/4,0/-0,4
Paso 4 – Rearreglo interno a PA catalizada por agua a través de TS4				
N=1	2,5/2,7/-1,1	29,8/28,7/32,0	-8,0/-7,7/-8,3	-7,1/-7,2/-13,7

a Energética relativa respecto a los reactivos separados al infinito.

b Barreras calculadas respecto a los reactivos, o al CI en los casos en que resulta más estable que los mismos.

c Energética relativa respecto a los productos

d Energías de reacción calculadas como la diferencia de productos con/sin aguas correspondientes y reactivos obtenidos del IRC.

Agradecimientos

Agradezco a mi tutora la Dra. Laura Coitiño por su gran disposición, enseñanza y consejos en este gran proceso de aprendizaje de convertirme en un científico.

A mis compañeros de laboratorio: Jenner Bonanata, Alicia Merlino, Lucía Minini y Stephanie Portillo por haberme ayudado un sin fin de veces a lo largo de esta tesina con sus conocimientos y su gran disposición hacia conmigo y por sobre todas las cosas por hacerme sentir en familia día a día.

A mis compañeras de Facultad: Lucía Alfaya, Alejandra Kaplanski, Agustina Irazusta, Alejandra Espíndola y Ximena Doldán por haber transcurrido este largo camino junto a mí logrando hacer más ameno este viaje y llevándome no sólo una profesión sino amigas perdurables.

Por otro lado, los más importantes en mi vida, mis amigos de años: Andrés Séré, Mercedes Royes y Valentina Pérez que han estado junto a mí en todo momento, ¡muchas gracias!

Finalmente la ANII por la beca de iniciación a la investigación otorgada en el año 2013 (INI_X_2012_1_4310) por la cual fue posible este trabajo de graduación.