

Estudio de las bases estructurales de la selectividad de transporte de H₂O₂ en peroxiporinas

Chevriau JJ ^{1,2}, Zerbetto De Palma G ^{1,2}, Canessa Fortuna A ^{1,2}, Zeida A ³, Alleva K ^{1,2}.

¹⁾ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Departamento de Fisicomatemática, Cátedra de Física, Argentina. ²⁾ IQUIFIB, UBA-CONICET, Argentina ³⁾ Departamento de Bioquímica and Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay. Contacto: jchevriau@docente.fybio.uba.ar

Peroxioporinas

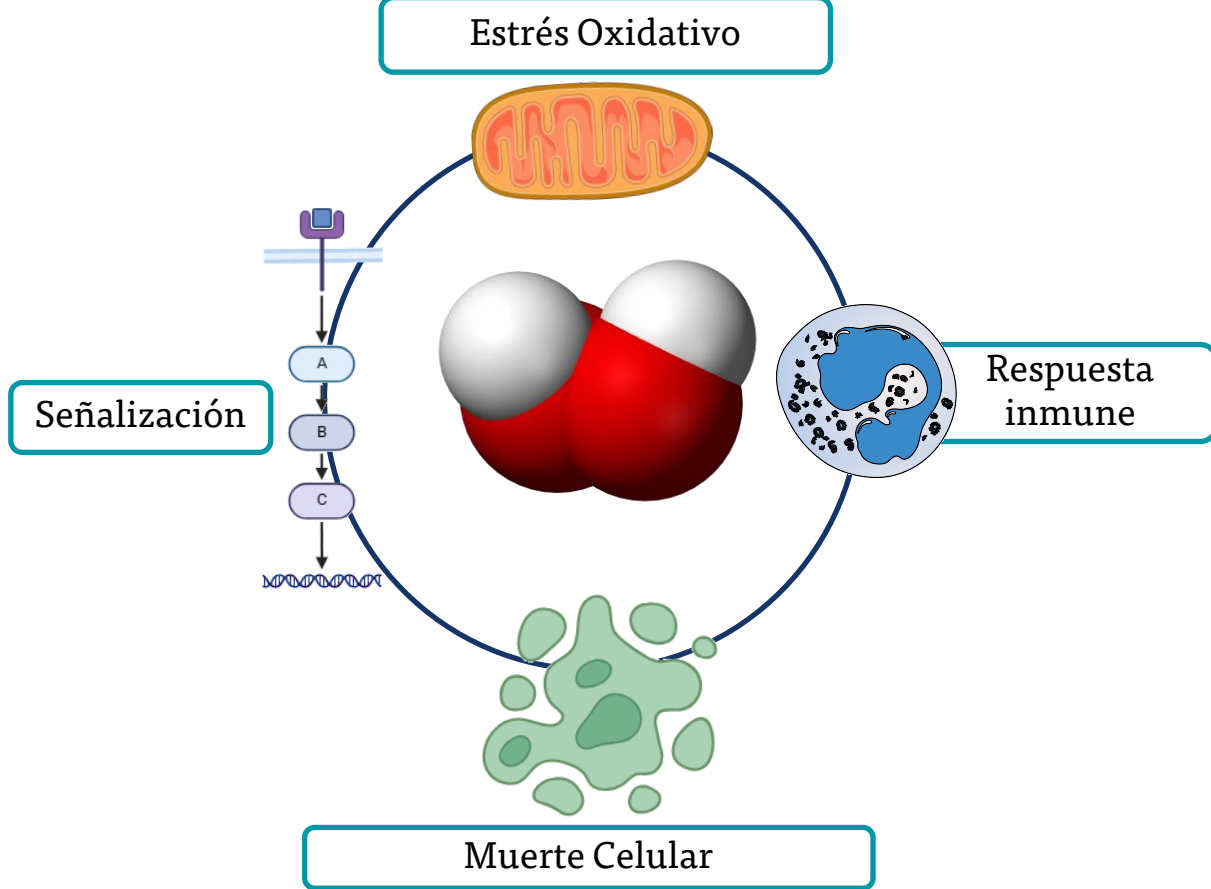
Familia MIP: ¿Qué es una peroxiporina?

Las MIP (*major intrinsic proteins*) son una gran familia de canales con más de 86.000 miembros, presentes de forma ubicua en bacterias, arqueas y eucariotas.

Participan en el transporte pasivo de agua y pequeñas moléculas como glicerol, urea, amoníaco, dióxido de carbono, iones y otros solutos a través de las membranas, por lo que poseen un papel importante en el mantenimiento y la homeostasis celular.

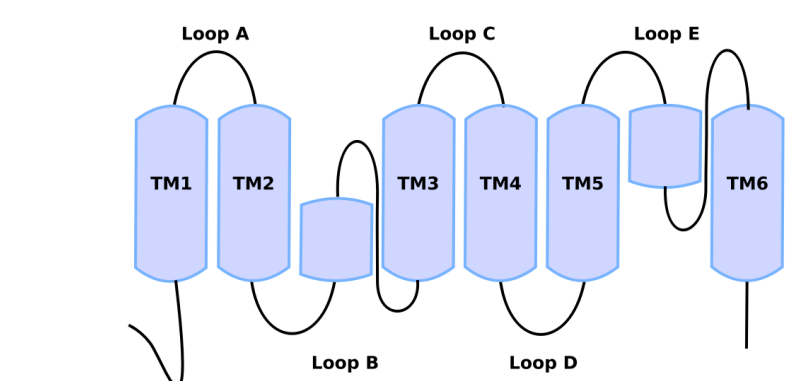
Existe un subconjunto de estos canales, conocidos como **peroxiporinas**, que son capaces de transportar **peróxido de hidrógeno (H₂O₂)**.

Roles de las Peroxioporinas

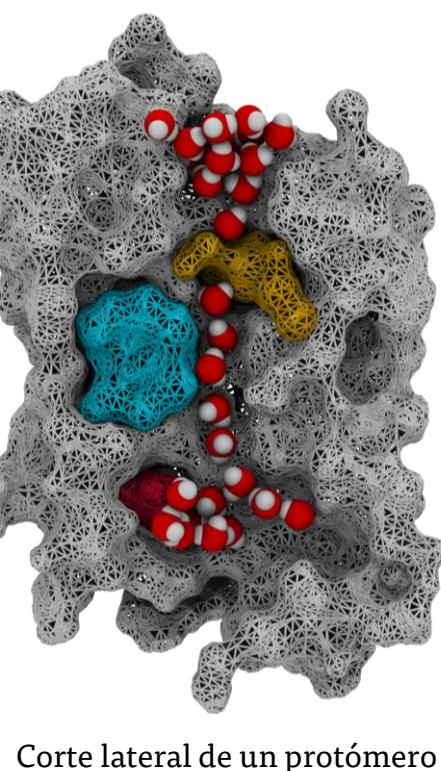


¡Estos mecanismos requieren el transporte de H₂O₂ a través de las membranas!

Estructura

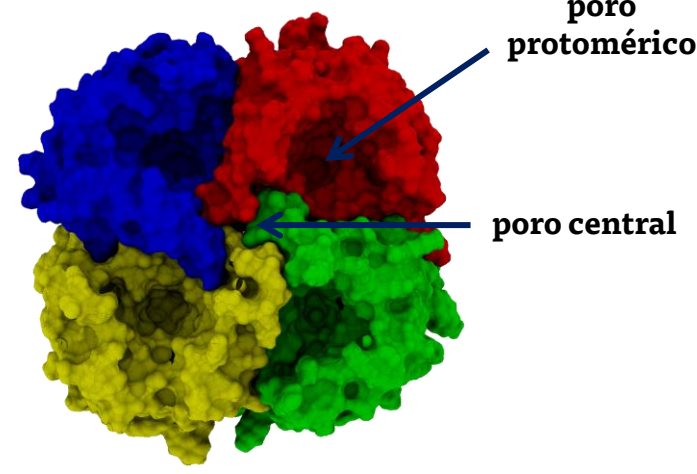


Estructura arquetípica de una MIP: Consiste en seis segmentos transmembrana, loops y dos semihelices que forman un séptimo segmento transmembrana. En su ensamble biológico encuentran en la membrana en forma de tetrameros: Los poros de cada protómero actúan como conductos para la permeación de agua y solutos. En algunos casos, el poro central también participa en este proceso.



Conformación abierta

Conformación cerrada

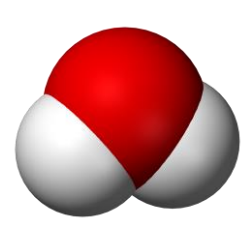


Regiones de restricción: incluyen la región aromática/arginina (o filtro de selectividad), la región NPA y el filtro citoplasmático.

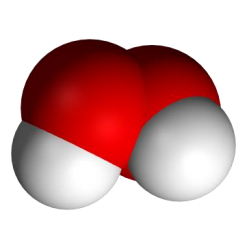
- La región del SF y del NPA son los filtros principales en las MIPs y contribuyen a la selectividad en el transporte de diferentes moléculas.

- El filtro citoplasmático, que se encuentra en las acuaporinas gatillables como las PIP (*Plasma membrane Intrinsic Proteins*), implica un reordenamiento conformacional que genera una obstrucción al transporte de moléculas de agua dentro del poro de las peroxiporinas, mediado por un residuo de leucina (Canessa Fortuna *et al.*, 2019)

H₂O y H₂O₂: Semejantes, pero diferentes



Características fisicoquímicas
Tamaño similar
Moléculas polares
Capacidad de formar puentes de hidrógeno



- Esta similitud estructural entre el agua (H₂O) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) plantea la interrogante sobre si todas las acuaporinas que transportan H₂O podrían también facilitar el transporte de H₂O₂, actuando como peroxiporinas. Hipótesis de mimetismo entre estos transportes (Wragg *et al.*, 2020)
- Si bien estudios previos han demostrado que ciertas acuaporinas vegetales exhiben esta permeabilidad dual, actuando como canales para ambas moléculas, la realidad es que esta capacidad parece no estar presente en todas las acuaporinas, incluso entre aquellas con alta similitud en su secuencia de aminoácidos, se observa una variabilidad en la eficiencia de transporte de H₂O₂.
- Esta disparidad sugiere que existen características estructurales o regulatorias específicas, aún no del todo comprendidas, que determinan la selectividad y eficiencia del transporte de H₂O₂ a través de estos canales.

¿Cómo es el mecanismo de transporte del H₂O₂ a través de las MIP?
¿Es similar al del agua?
¿Qué factores influyen en su permeación?

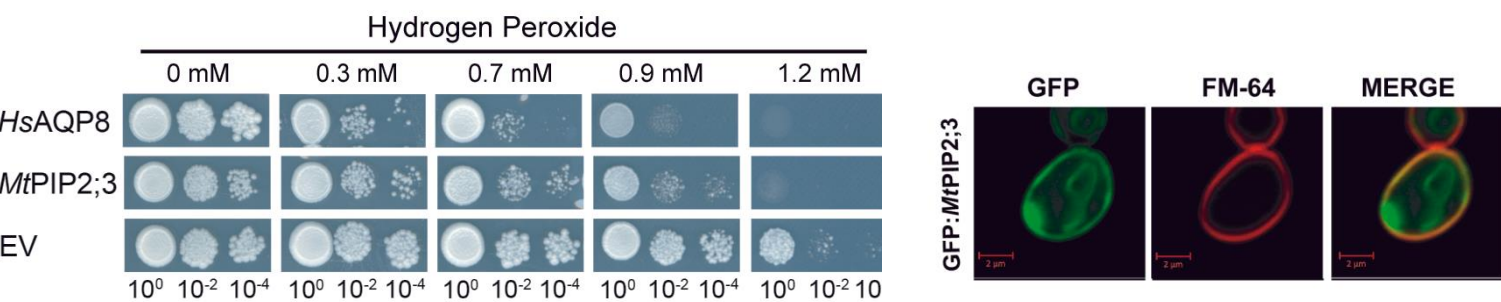
Los canales MIP que transportan H₂O
¿Siempre actúan como canales de H₂O?

¿Qué determina la capacidad de una MIP para transportar H₂O₂?

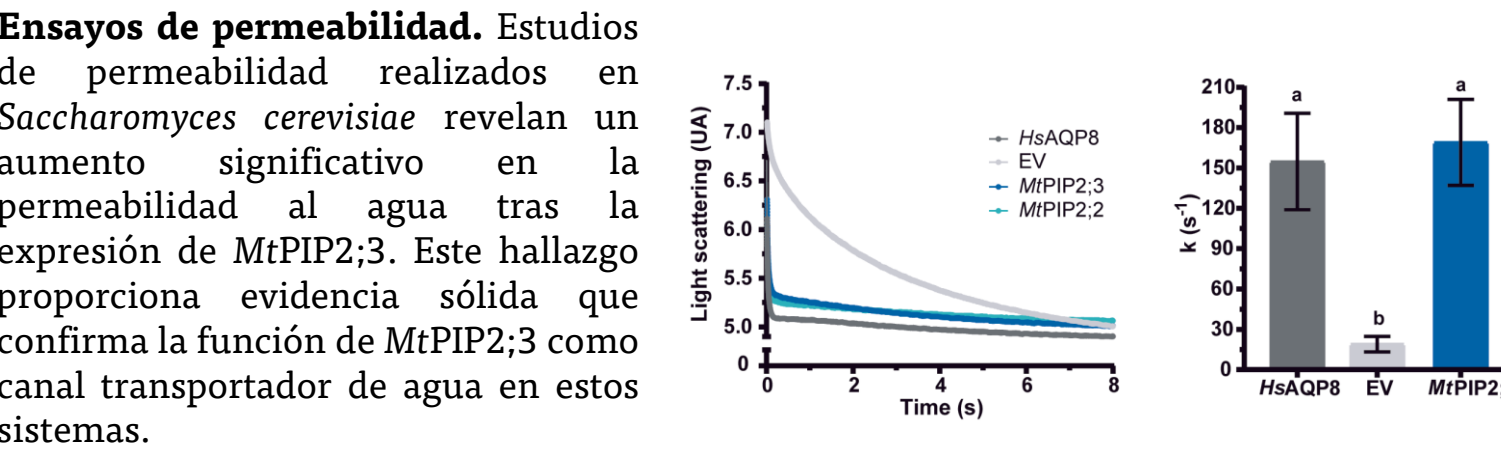
Para intentar resolver estas preguntas, exploramos la permeación del H₂O₂ a través de MtPIP2;3 mediante técnicas experimentales y simulaciones computacionales

Resultados

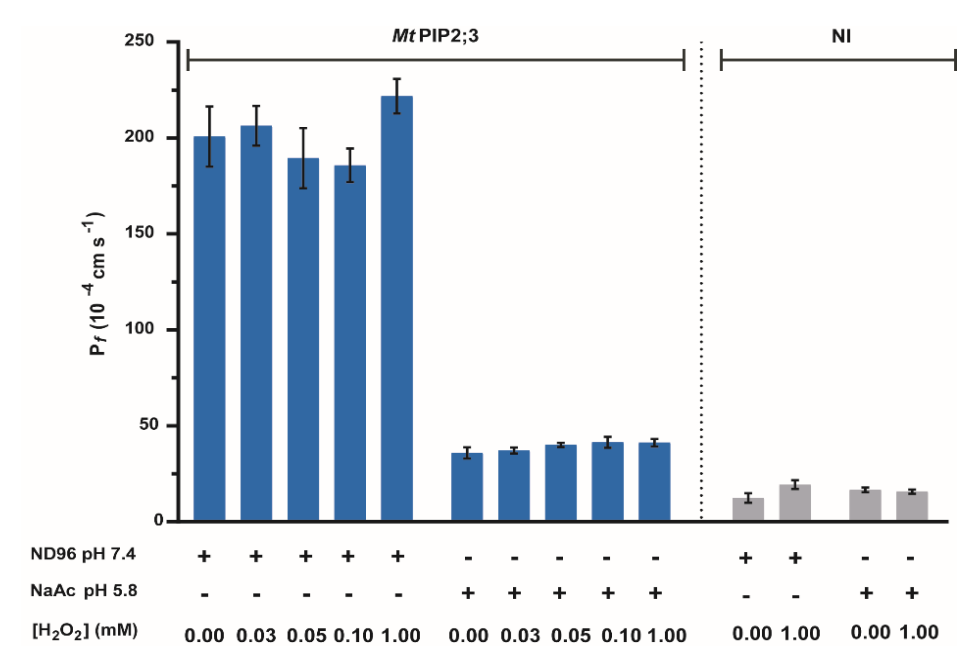
Caso de estudio: MtPIP2;3 como peroxiporina



Ensayos de toxicidad en levadura. Usando cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que expresan MtPIP2;3, confirmamos que este MIP se localizaría en membrana plasmática y sería capaz de transportar peróxido de hidrógeno, clasificándola como una peroxiporina (Chevriau *et al.*, en preparación)



Ensayos de permeabilidad. Estudios de permeabilidad realizados en *Saccharomyces cerevisiae* revelan un aumento significativo en la permeabilidad al agua tras la expresión de MtPIP2;3. Este hallazgo proporciona evidencia sólida que confirma la función de MtPIP2;3 como canal transportador de agua en estos sistemas.



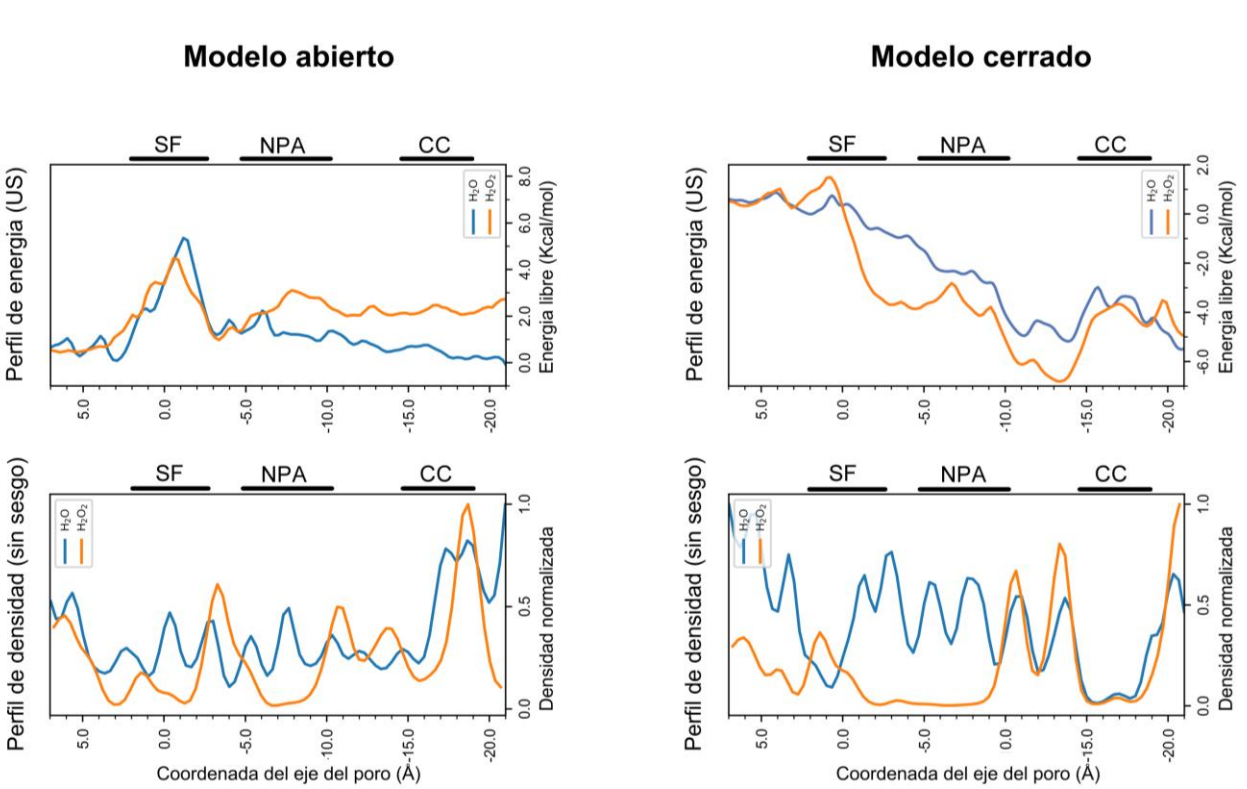
Impacto del H₂O₂ en el transporte de agua. Dada la probada eficiencia de MtPIP2;3 en el transporte de agua, se empleó el sistema heterólogo de ovocitos de *Xenopus laevis* para explorar el efecto del H₂O₂ sobre la función de la proteína. Los resultados obtenidos indican que el H₂O₂ no altera la permeabilidad al agua de MtPIP2;3, ni en su estado abierto ni cerrado. Esto descarta la existencia de una regulación del transporte de agua por H₂O₂, al menos a través de mecanismos regulatorios directos.

Comportamiento del H₂O₂ dentro del poro en MtPIP2;3

- Distribución:**
- El H₂O se distribuye uniformemente a lo largo del poro en ambas conformaciones.
 - El H₂O₂ muestra preferencia por zonas específicas:
 - En la conformación abierta, se encuentra principalmente después de la región SF en la zona CC cercana.
 - La zona NPA actúa como zona de exclusión para H₂O₂, mientras que el H₂O se distribuye con normalidad.
 - En la conformación cerrada, la probabilidad de encontrar H₂O₂ en las regiones SF, NPA y CC es despreciable.

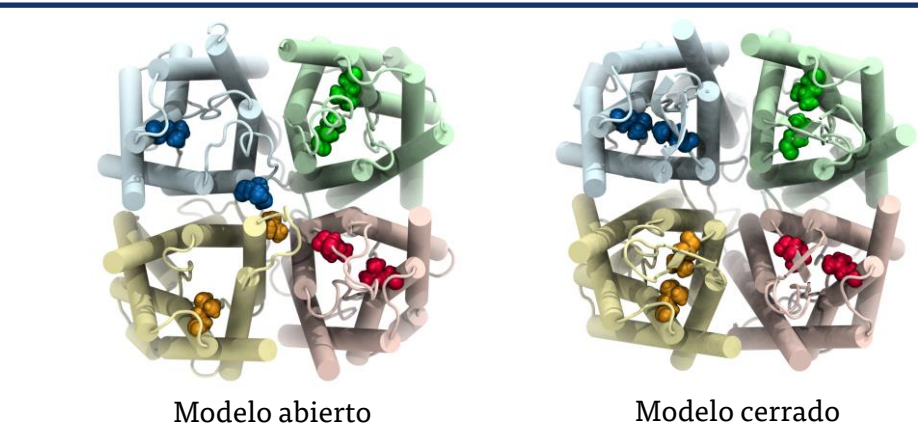
Energía de permeación:

- Ambas moléculas enfrentan una barrera energética principal alrededor de la región SF en el estado abierto (~4 kcal/mol).
- En el estado abierto, el H₂O experimenta un aumento de energía libre (~1 kcal/mol) en la región NPA, a diferencia del H₂O.
- En el estado cerrado, las barreras de energía para ambas moléculas son más altas que en el estado abierto (hasta 8 kcal/mol para H₂O₂). El área entre NPA y CC presenta menor energía, pero luego aumenta hacia el final del poro en ambos estados, esto atrapa a las moléculas y dificulta su paso.

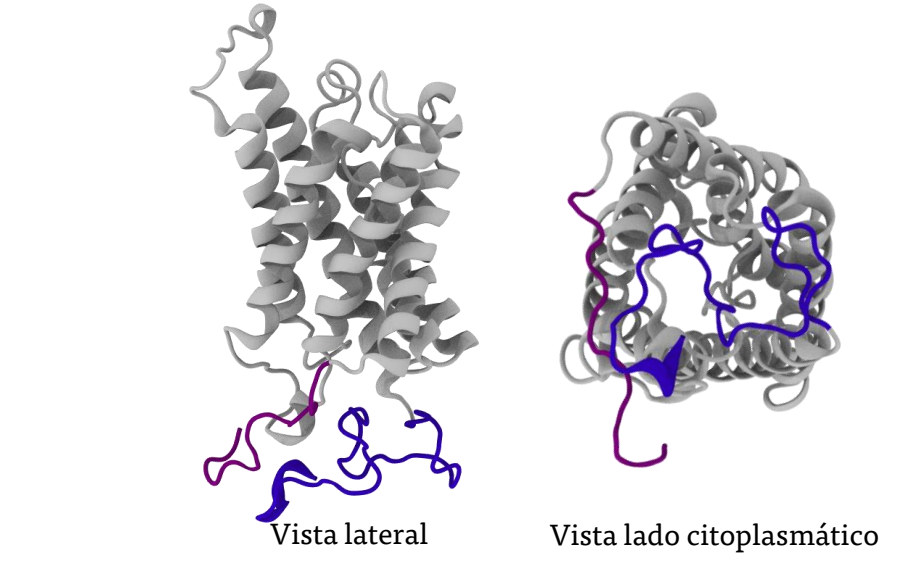


La región SF es la barrera principal para ambas moléculas en cualquier estado del canal, siendo más restrictivo para el H₂O₂ en la conformación cerrada. El H₂O₂ se comporta de manera diferente al H₂O en la región NPA, ya que esta zona está ocupada por H₂O, pero no por H₂O₂.

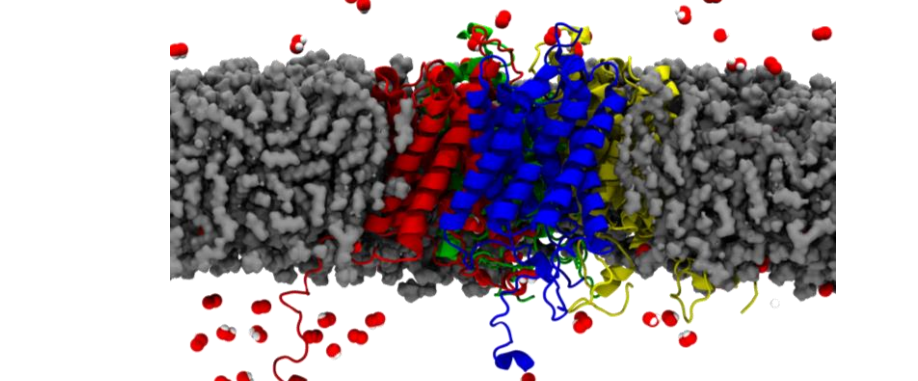
Modelado y Simulaciones de Dinámica Molecular



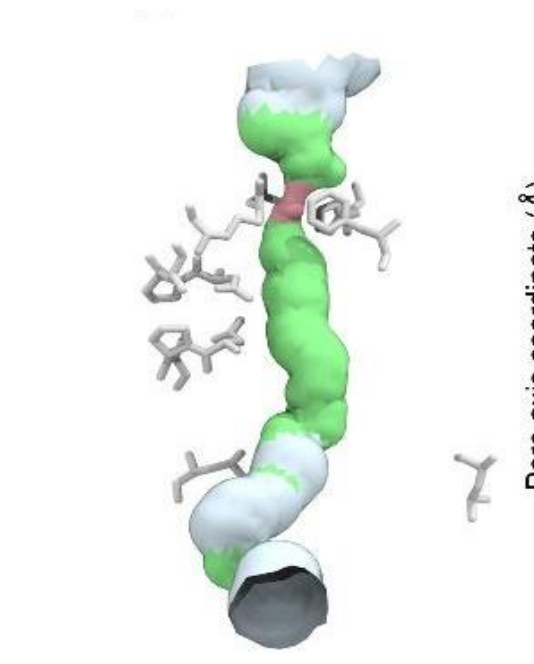
Modelados por homología. Se diseñaron dos modelos base a partir de las estructuras cristalográficas de SoPIP2;1 en estado abierto (PDB: 2B5F) y estado cerrado (PDB: 1Z98)



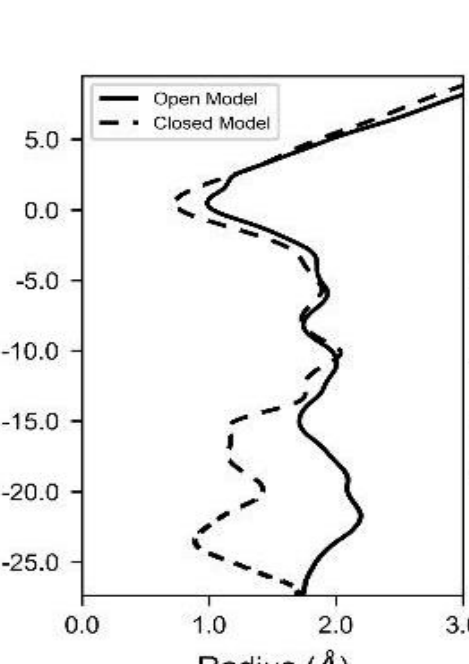
Modelados completos. En las estructuras cristalográficas resueltas están ausentes los extremos N y C terminales, que podrían ser relevantes para el mecanismo de gatillado (Socchero *et al.*, 2021). Para obtener modelos completos, se modelaron por separado y luego se incorporaron a los modelos de homología de MtPIP2;3.



Simulaciones de Dinámica Molecular. Para analizar el comportamiento del H₂O₂ en el sistema, se incorporó una concentración de 0,3 M de H₂O₂ mediante la colocación aleatoria de moléculas dentro del espacio de simulación. Se realizaron dinámicas moleculares de hasta 2 μs tanto en los modelos abiertos como cerrados, con y sin el agregado de H₂O.

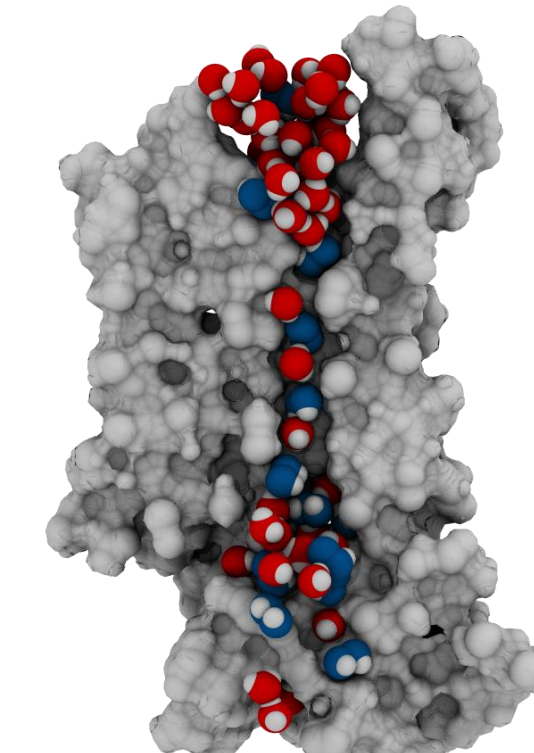


Cadena abierta
Eventos de permeación /μs: 32



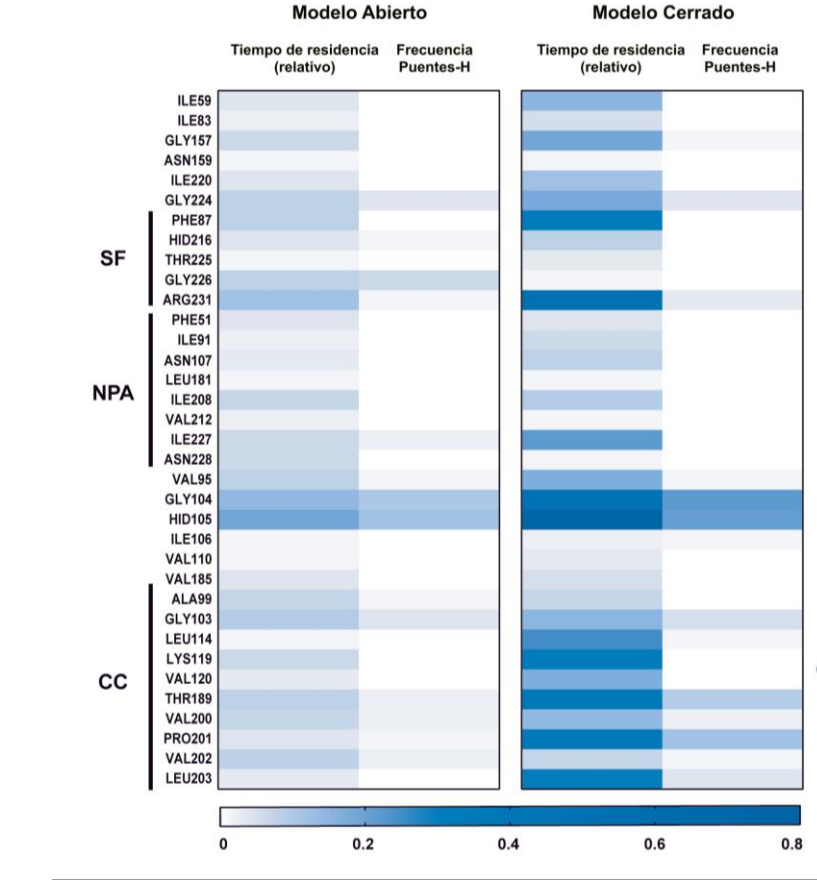
Cadena cerrada
Eventos de permeación /μs: 0

Caracterización de los modelos. Se identificaron y caracterizaron los estados abiertos y cerrados de la proteína en las simulaciones de dinámica molecular. La adición de H₂O₂ al sistema no modificó las conformaciones de la proteína en comparación con los sistemas que solo contenían agua. La principal diferencia entre los estados abiertos y cerrados se observó en la restricción citosólica, donde en el estado cerrado la protrusión de la leucina del loop D dentro del poro disminuye su luz. Concordantemente con esta restricción, se observaron eventos de permeabilidad en las cadenas abiertas, mientras que en la cadena cerrada no se registraron eventos de paso de moléculas a pesar de la presencia de moléculas de H₂O₂ visitando el poro.



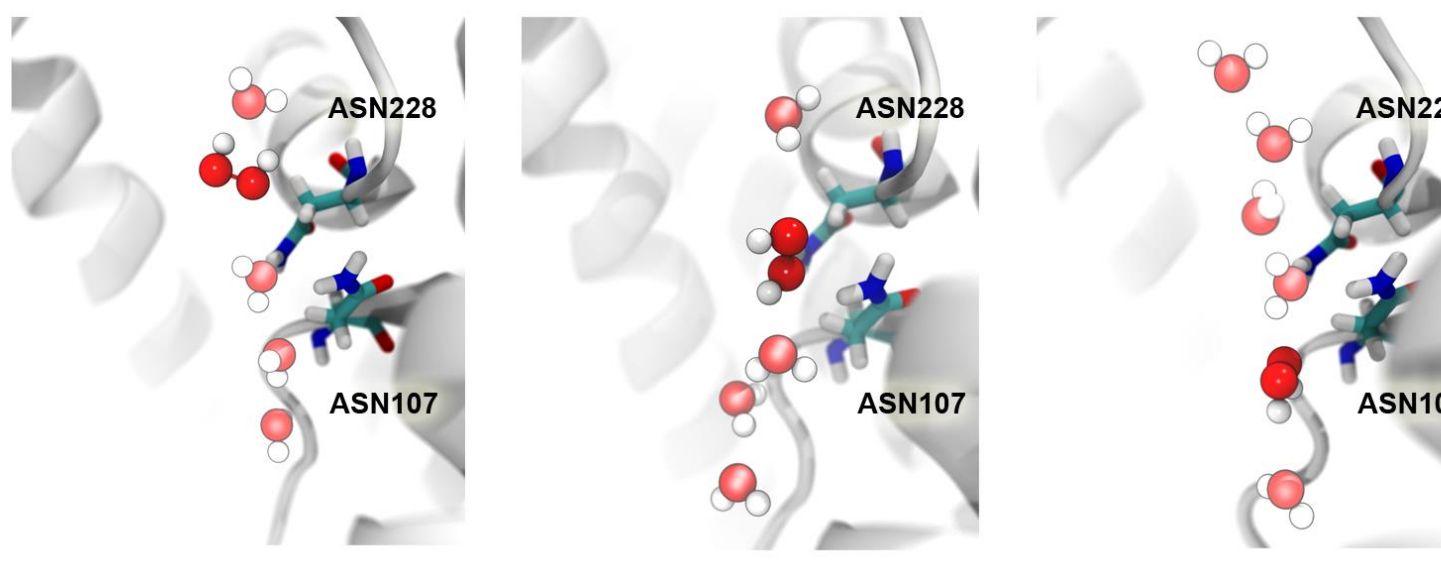
Permeación de H₂O₂ en MtPIP2;3. Utilizando estas simulaciones, confirmamos la ocurrencia de eventos de permeación donde el paso de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a través del poro y se observa que este paso se acompaña de moléculas de agua, en filas mixtas.

Junto con los experimentos funcionales, estas dinámicas nos indican que MtPIP2;3 es una peroxiporina genuina en su estado abierto y sugieren que la misma conformación que inhibe el transporte de H₂O también puede restringir la permeación de H₂O₂.



Análisis de puentes de hidrógeno y residencias de H₂O₂. Los puentes de hidrógeno se consideran interacciones clave en la permeación de moléculas a través del poro de las MIP. Los análisis de estos parámetros en las dinámicas moleculares nos muestran que:

- En el canal abierto, los residuos que recubren el poro como GLY104 e HIS105, justo antes de la región de restricción citosólica, presentan una alta frecuencia de formación de puentes de hidrógeno con H₂O₂. Esto se correlaciona con los tiempos de residencia más largos de H₂O₂ en estas regiones.
- Se observa una tendencia similar en la conformación cerrada, aunque con tiempos de residencia aún mayores, debido a la incapacidad de las moléculas de H₂O₂ para atravesar la región NPA y quedar atrapadas por interacciones con los residuos GLY104 e HIS105.
- En la zona del NPA, la formación de puentes de hidrógeno con los residuos clave ASN228 y ASN107 es casi inexistente, mientras que sí ocurre para el caso del H₂O.



La región NPA presenta una barrera energética superior a la permeación de H₂O₂, debido a la falta de formación de puentes de hidrógeno con residuos clave. Estas diferencias en el comportamiento de H₂O en comparación con el H₂O en esta región, descartarían la hipótesis de una mimetización completa entre los mecanismos de permeación de ambas moléculas.

Comportamiento del H₂O₂ en la región NPA.

- El estudio del comportamiento geométrico de H₂O₂ durante su paso por el poro revela un giro en el momento dipolar de la molécula al atravesar la región NPA, tanto en simulaciones sin sesgo como en aquellas con sesgo. Este comportamiento es similar al ya reportado para el momento dipolar de las moléculas de agua en acuaporinas en general, sin embargo, este estudio representa la primera determinación sin sesgo del comportamiento de una molécula de H₂O₂ cruzando un canal PIP.
- Se observa un ligero aumento en la distribución de ángulos diedros en esta zona, lo que sugiere que este cambio en la orientación de la molécula se produce concomitantemente con una torsión del diedro de la misma.

Efecto de los puentes de hidrógeno en la permeación de H₂O₂ en la región NPA.

- La región NPA juega un papel crucial en la permeación de H₂O, formando puentes de hidrógeno con los dos residuos ASN de los motivos NPA vecinos. En MtPIP2;3, vimos que la formación de puentes de hidrógeno entre la región NPA y H₂O₂ se ve obstaculizada, probablemente debido a restricciones conformacionales o estéricas.
- Se observa que el H₂O₂ adopta una conformación trans-like de corta duración cerca de los residuos ASN, lo que aumenta el costo energético de atravesar la región NPA. Esta característica explica la menor densidad y la mayor energía libre observada para H₂O₂ en la región NPA.
- Esta conformación maximizaría la interacción con los residuos ASN y las moléculas vecinas, superando el impedimento geométrico para establecer simultáneamente puentes de hidrógeno con estas especies.

Metodología

Localización subcelular. Se utilizó microscopía confocal para determinar la localización de las MIPs en las células de levadura. Se fusionaron las MIPs con una proteína verde fluorescente (GFP) y se observó su distribución en las células. Se usó FM-64 como marcador específico para identificar la membrana plasmática.

Ensayos de crecimiento para evaluar la permeabilidad a H₂O₂. Se evaluó el crecimiento de levaduras que expresaban MtPIP2;3 en medios con diferentes concentraciones de H₂O₂. La capacidad de las MtPIP2;3 para transportar este soluto se determinó en base a la supervivencia y tasa de crecimiento de las levaduras en comparación con los controles. Se realizaron tres experimentos independientes con resultados consistentes para confirmar la selectividad de sustrato.

Ensayo de transporte de agua en levaduras. La permeabilidad al agua se midió en esferoplastos de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando un método de cinética rápida [stoppered-flow]. Los cambios de volumen celular en respuesta a un choque osmótico se registraron mediante la dispersión de luz.

Ensayos de transporte de agua en ovocitos de Xenopus laevis. Los ovocitos de *Xenopus laevis* fueron microinyectados con ARNm codificante para MtPIP2;3 e incubados durante 3 o 4 días en tampón ND96 (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl2, 1,8 mM CaCl2 y 5 mM HEPES pH 7,5) a 18°C antes de realizar los experimentos. La permeabilidad osmótica al agua (P) de los ovocitos inyectados o no inyectados (NI) con ARNm se determinó midiendo la tasa de hinchamiento del ovocito inducida en respuesta a una dilución de 1/3 del tampón ND96 con 0,0025, 0,1 o 1 μM de H₂O₂ en agua Milli-Q. En los experimentos realizados en canales de estado cerrado, antes de la exposición al choque osmótico, los ovocitos se incubaron durante 15 minutos en solución AcNa pH 5,8. Los ovocitos NI (no inyectados) se utilizaron como controles negativos.

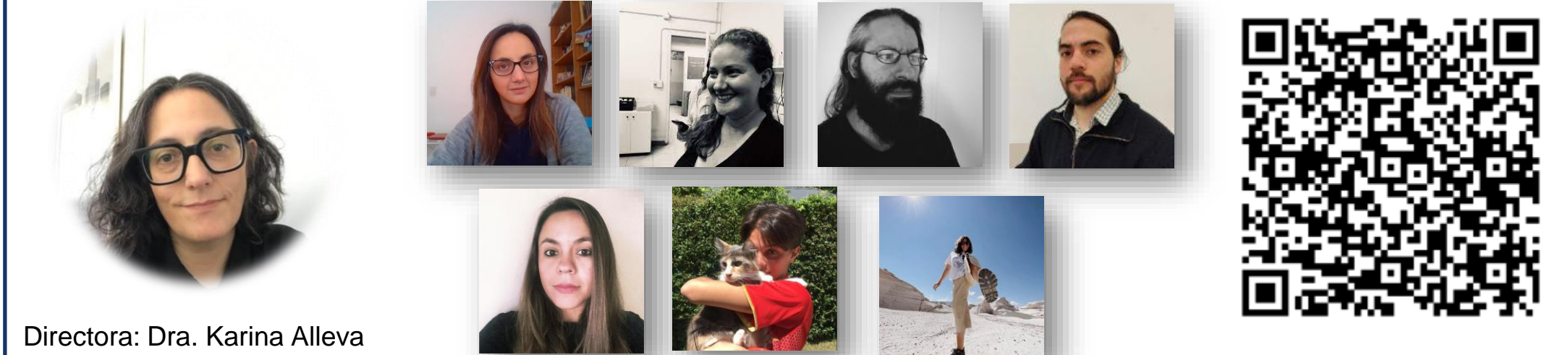
Construcción de modelos y dinámica molecular. Se construyeron modelos tridimensionales de tetrameros de MIP mediante modelado de homología con plataformas como Swissmodel o plataformas de predicción de estructura como AlphaFold2. Estos sistemas tetraméricos se insertaron luego en una membrana lipídica de 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfolipina (POPC), rodeada de moléculas de agua explícitas TIP3P. Los sistemas se neutralizaron y se suplementaron con 0,15M NaCl. Se aplicó *Hydrogen mass repartitioning* para permitir un mayor paso de tiempo en las simulaciones. Posteriormente, los sistemas se sometieron a simulaciones de dinámica molecular en agua explícita de al menos 500 ns, tanto en presencia como en ausencia de peróxido de hidrógeno. Los perfiles de energía libre para H₂O y H₂O₂ se obtuvieron con Umbrella Sampling (US). Para cada perfil, se muestrearon aproximadamente 80 ventanas de US a lo largo de la coordenada de reacción que se definió como la distancia entre la molécula (H₂O o H₂O₂) y los átomos del SF. Las ventanas muestreadas se separaron por 1,0 Å y se separaron con una constante de fuerza de 2 kcal mol⁻¹ Å⁻². En algunas regiones dentro del poro (regiones de alta energía), se muestrearon ventanas adicionales con una constante de fuerza mayor (5 a 10 kcal mol⁻¹ Å⁻²) según fuera necesario para tener una superposición aceptable de histogramas de US. Finalmente, los perfiles de energía libre se construyeron a partir de histogramas de US utilizando Umbrella Integration.

Estimación de la densidad del agua y del peróxido de hidrógeno. Para el cálculo de densidades, las coordenadas cartesianas de los centros geométricos de las moléculas de H₂O y H₂O₂ se extrajeron a lo largo del tiempo de simulación utilizando el módulo Ptraj de PyTraj. Para el análisis de los enlaces de hidrógeno y los tiempos de residencia, los contactos entre H₂O o H₂O₂ y los residuos de la proteína se calcularon utilizando el software CPTDA. La determinación de residencias y puentes de hidrógeno se basó en la proximidad entre cada átomo de los residuos del poro y las moléculas de peróxido de hidrógeno, con una distancia de corte establecida en 3,5 Å y se cuantificaron como el porcentaje del tiempo total de simulación.

Lab. Biofísica de Acuaporinas

El grupo de trabajo se dedica al estudio biofísico de las relaciones estructura-función en canales de la familia MIP (*membrane intrinsic proteins*), entre los que se encuentran los canales que transportan agua o Acuaporinas.

Catedra de Física – Departamento Fisicomatemática – FFyB-UBA / IQUIFIB (UBA/CONICET)



Directora: Dra. Karina Alleva

