

UNIVERSIDAD DE BELGRANO
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Licenciatura en Ciencias Químicas

INTERRUPCIÓN DE LA UNIÓN IF1-OSCP:
CARACTERIZACIÓN MEDIANTE SIMULACIONES DE
DINÁMICA MOLECULAR COMO ESTRATEGIA PARA EL
DESARROLLO DE TERAPIAS ANTICANCERÍGENAS

Tesina para obtener el Título de Licenciatura en Ciencias Químicas

Tutor:

Dr. Galo Ezequiel Balatti



Autor:

Ilan Moises Weiser
Lic. en Ciencias Químicas
Matrícula N°: 15-9579

Buenos Aires, Argentina

2026

RESUMEN

La proteína IF1 (Factor Inhibidor de la ATPasa 1) es un inhibidor endógeno de la ATP sintasa mitocondrial sobreexpresado en numerosos tumores humanos. Estudios recientes han demostrado que IF1 interactúa con la subunidad OSCP (Proteína Sensibilizante a la Oligomicina) de la ATP sintasa bajo condiciones de fosforilación oxidativa normal, desensibilizando la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP) y confiriendo a las células cancerosas resistencia a la muerte apoptótica. Esta interacción ocurre a través del extremo N-terminal de IF1, una región intrínsecamente desordenada (IDR) de 13 residuos que adopta estructura helicoidal transitoria, y el dominio N-terminal de OSCP, que presenta una topología bien definida.

En el presente trabajo se caracterizó, por primera vez en el contexto del grupo de investigación, la dinámica molecular del sistema IF1–OSCP mediante simulaciones computacionales de dinámica molecular (DM) con campo de fuerzas atómico CHARMM36m, implementado en la plataforma GROMACS. Las simulaciones fueron ejecutadas en los clústeres de alto rendimiento del Centro de Computación de Alto Desempeño (CCAD) de la Universidad Nacional de Córdoba. La preparación de los sistemas moleculares fue realizada con la herramienta CHARMM-GUI, y se diseñaron tres sistemas de simulación: (A) IF1-NT en solución acuosa, (B) el complejo binario IF1-NT/OSCP-NT, y (C) tres moléculas de IF1-NT en presencia de OSCP-NT.

Los resultados obtenidos revelaron el comportamiento conformacional característico de la región IDR de IF1-NT en solución, la propensión a adoptar estructura secundaria helicoidal en el segmento E29–R39 al interactuar con OSCP, y los residuos del dominio N-terminal de OSCP implicados en los principales contactos intermoleculares. Asimismo, el sistema ternario permitió explorar la competencia por el sitio de unión. Estos hallazgos sientan bases estructurales para el diseño racional de péptidos inhibidores de la interacción IF1–OSCP como estrategia terapéutica anticancerígena.

Palabras clave:

IF1, OSCP, ATP sintasa, poro de transición de permeabilidad, dinámica molecular, GROMACS, CHARMM36m, proteína intrínsecamente desordenada, cáncer, apoptosis.

ABSTRACT

The mitochondrial protein IF1 (ATPase Inhibitory Factor 1) is an endogenous inhibitor of mitochondrial ATP synthase overexpressed in numerous human tumors. Recent studies have demonstrated that IF1 interacts with the OSCP (Oligomycin Sensitivity Conferring Protein) subunit of ATP synthase under normal oxidative phosphorylation conditions, desensitizing the opening of the mitochondrial permeability transition pore (PTP) and conferring cancer cells with resistance to apoptotic cell death. This interaction occurs through the N-terminal end of IF1, an intrinsically disordered region (IDR) of 13 residues that transiently adopts a helical structure, and the N-terminal domain of OSCP, which has a well-defined topology.

In this work, the molecular dynamics of the IF1–OSCP system was characterized for the first time in the context of the research group, using atomistic molecular dynamics (MD) simulations with the CHARMM36m force field implemented in the GROMACS platform. Simulations were run on the high-performance computing clusters of the Centro de Computación de Alto Desempeño (CCAD) of the Universidad Nacional de Córdoba. The molecular systems were prepared using the CHARMM-GUI tool, and three simulation systems were designed: (A) IF1-NT in aqueous solution, (B) the binary complex IF1-NT/OSCP-NT, and (C) three IF1-NT molecules in the presence of OSCP-NT.

The results revealed the characteristic conformational behavior of the IDR region of IF1-NT in solution, the propensity to adopt helical secondary structure in the E29–R39 segment upon interaction with OSCP, and the residues of the N-terminal domain of OSCP involved in major intermolecular contacts. Furthermore, the ternary system allowed exploration of competition for the binding site. These findings establish structural bases for the rational design of inhibitory peptides targeting the IF1–OSCP interaction as an anti-cancer therapeutic strategy.

Keywords:

IF1, OSCP, ATP synthase, permeability transition pore, molecular dynamics, GROMACS, CHARMM36m, intrinsically disordered protein, cancer, apoptosis.

AGRADECIMIENTOS

A mi director, el Dr. Germán Eduardo Balatti, por su generosa guía, paciencia y entusiasmo al introducirme en el mundo de la dinámica molecular computacional. Su rigor científico y disposición constante hicieron posible este trabajo.

Al Centro de Computación de Alto Desempeño (CCAD) de la Universidad Nacional de Córdoba, cuya infraestructura computacional hizo posible la ejecución de las simulaciones de dinámica molecular presentadas en este trabajo.

A la Universidad de Belgrano y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por la formación recibida a lo largo de la carrera.

A mi familia y compañeros de carrera, por el apoyo incondicional durante toda la carrera.

ÍNDICE

1. Introducción y Justificación	7
2. Objetivos	15
2.1 Objetivo General	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3. Marco Teórico	16
3.1 La ATP Sintasa Mitocondrial	16
3.2 La Proteína Inhibidora IF1	18
3.3 La Subunidad OSCP y el Poro de Transición de Permeabilidad	20
3.4 La Interacción IF1–OSCP en Cáncer	22
3.5 Proteínas Intrínsecamente Desordenadas (IDPs)	24
3.6 Dinámica Molecular: Fundamentos Teóricos	25
3.7 Herramientas Computacionales Utilizadas	30
4. Metodología	34
4.1 Preparación de los Sistemas Moleculares con CHARMM-GUI	34
4.2 Protocolo de Simulación en GROMACS	38
4.3 Sistemas de Simulación	42
4.4 Análisis de Trayectorias	44
5. Resultados y Discusión	47
5.1 Sistema A: IF1-NT en Solución Acuosa	47

5.2 Sistema B: Complejo Binario IF1-NT / OSCP-NT	51
5.3 Sistema C: Tres Moléculas de IF1-NT con OSCP-NT	57
5.4 Discusión	62
6. Conclusiones	66
7. Perspectivas Futuras	68
8. Bibliografía	69
9. Anexos	76

1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

1.1 El cáncer como problema de salud global

El cáncer representa una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial, constituyendo un desafío sanitario y científico de primera magnitud. Según la Organización Mundial de la Salud, se estima que cada año se producen aproximadamente 20 millones de nuevos casos y casi 10 millones de muertes por esta enfermedad en todo el mundo [1]. En Argentina, el cáncer es la segunda causa de muerte, con aproximadamente 130.000 nuevos diagnósticos anuales [2]. A pesar de los avances terapéuticos de las últimas décadas, que incluyen cirugía, quimioterapia convencional, radioterapia, terapias dirigidas e inmunoterapia, la resistencia a los tratamientos y la toxicidad sistémica siguen representando obstáculos fundamentales [3].

Un aspecto que ha ganado creciente atención es el papel de las mitocondrias en la biología del cáncer. Durante décadas, el paradigma dominante fue el 'efecto Warburg', que describe la preferencia de las células tumorales por la glucólisis aeróbica para la producción de energía, incluso en presencia de oxígeno suficiente [4]. Sin embargo, estudios más recientes han demostrado que la fosforilación oxidativa (OXPHOS) mitocondrial contribuye de manera significativa a la bioenergética tumoral, apoyando la proliferación celular, la capacidad invasiva y la resistencia a la apoptosis en una amplia variedad de tumores [5,6]. Esta reevaluación del rol mitocondrial ha impulsado el desarrollo de estrategias terapéuticas orientadas a modular la función mitocondrial en células cancerosas.

1.2 La mitocondria en el contexto tumoral

Las mitocondrias son orgánulos de doble membrana que desempeñan funciones centrales en el metabolismo celular, incluyendo la síntesis de ATP mediante OXPHOS, la regulación del metabolismo del calcio, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el control de la muerte celular programada [7]. En las células cancerosas, estas funciones se encuentran profundamente alteradas.

La cadena de transporte de electrones y la ATP sintasa, complejos proteicos de la membrana mitocondrial interna, constituyen los componentes catalíticos centrales de la OXPHOS. La ATP sintasa (Complejo V) utiliza el gradiente electroquímico generado por la cadena de transporte de electrones para sintetizar ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico, mediante un mecanismo de rotación molecular [8]. Además de su función energética, la ATP sintasa ha sido implicada en la formación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP), un canal de alta conductancia cuya apertura prolongada desencadena la vía intrínseca de la apoptosis [9]. La modulación del PTP representa, por tanto, un punto de control crítico en la supervivencia celular, con importancia particular en el contexto oncológico.

1.3 IF1: el inhibidor endógeno de la ATP sintasa en cáncer

El Factor Inhibidor de la ATPasa 1 (IF1) es una pequeña proteína de 10 kDa, termoestable, localizada en la matriz mitocondrial, que actúa como inhibidor reversible y no competitivo de la actividad hidrolítica de la ATP sintasa [10]. Su función fisiológica principal consiste en limitar la disipación de ATP en condiciones de hipoxia o isquemia, como ocurre en el corazón durante episodios de isquemia-reperfusión, previniendo la activación de la actividad ATPasa de la enzima y, con ello, el agotamiento del ATP celular [11,12].

Estructuralmente, IF1 presenta una región N-terminal que contiene la secuencia inhibitoria, capaz de insertarse en la interfase catalítica entre las subunidades β DP y α DP de la porción F1 de la ATP sintasa, y una región C-terminal que media la dimerización del inhibidor a través de un dominio de hélice superenrollada antiparalela [13]. El equilibrio entre dímeros activos y tetrameros inactivos de IF1 está regulado por el pH, la concentración iónica y otros factores del microambiente mitocondrial [14].

IF1 se encuentra sobreexpresada en una amplia variedad de tumores humanos, incluyendo carcinomas de mama, colon, pulmón, hígado, riñón, estómago y vejiga, entre otros [15,16]. Esta sobreexpresión ha sido correlacionada con peor pronóstico clínico en hepatocarcinoma, glioma y cáncer de vejiga [6,17], y se ha propuesto que IF1 ejerce un rol pro-oncogénico. Sin embargo, los mecanismos moleculares exactos a través de los cuales IF1 promueve el desarrollo tumoral han sido objeto de intenso debate [18].

1.4 Descubrimiento de la interacción IF1–OSCP y su rol en apoptosis

Galber et al. (2023) publicaron un estudio de referencia que reveló un nuevo mecanismo de acción de IF1 en células cancerosas, con implicaciones directas para el diseño de nuevas terapias [19]. En este trabajo, los autores demostraron mediante técnicas de inmunoprecipitación, ensayos de ligación de proximidad (PLA) y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) que IF1 interactúa con la subunidad OSCP de la ATP sintasa —en lugar de, o adicionalmente al, sitio catalítico canónico en F1— en células HeLa mantenidas bajo condiciones de fosforilación oxidativa activa (Estado 3).

La subunidad OSCP (Proteína Sensibilizante a la Oligomicina, o ATP5O en humanos) forma parte del tallo periférico de la ATP sintasa y ha sido identificada como un regulador clave de la apertura del PTP, funcionando como sitio de anclaje de la ciclofilina D (CyPD), el principal modulador fisiológico del poro [9,20]. Los estudios de RMN realizados por Galber et al. demostraron que la interacción entre IF1 y OSCP ocurre a través de los dominios N-terminales de ambas proteínas (IF1-NT, residuos G1-E40; OSCP-NT, residuos R6-G114). En particular, los residuos E29-R39 de IF1-NT muestran las mayores perturbaciones de desplazamiento químico y presentan propensión a adoptar estructura helicoidal en el estado unido. Del lado de OSCP, los

residuos de la región 'shoulder' entre las hélices H3 y H4 (A53, S54, N57, V60, R62, S63, I64) conforman la interfase de unión accesible en el contexto de la ATP sintasa entera.

Este trabajo demostró además que la ausencia de IF1 (células IF1 KO) sensibiliza a las células HeLa a la apertura del PTP, aumentando su vulnerabilidad a la apoptosis dependiente de PTP, sin afectar la proliferación celular, la función respiratoria mitocondrial basal ni el ensamblaje de supercomplejos. La utilización del mutante IF1 Y33R, incapaz de unirse al sitio canónico en F1 pero competente para unirse a OSCP, permitió disociar ambas funciones e identificar a la interacción IF1-OSCP como la responsable de la desensibilización del PTP y la promoción del fenotipo tumoral en condiciones normóxicas [19].

1.5 Desafíos para el diseño de terapias dirigidas a la interacción IF1–OSCP

La identificación de la interacción IF1–OSCP como mecanismo pro-supervivencia de las células cancerosas abre una ventana terapéutica de gran interés: interrumpir esta interacción podría sensibilizar a las células tumorales a la apertura del PTP y, en consecuencia, a la muerte apoptótica, sin afectar necesariamente a las células normales, donde IF1 se expresa en niveles mucho menores [15].

Sin embargo, el diseño de fármacos capaces de interrumpir esta interacción presenta desafíos importantes. En primer lugar, la región de unión de IF1 (residuos E29-R39) pertenece a una región intrínsecamente desordenada (IDR), lo que dificulta el diseño de moléculas que mimeticen o compitan con ella utilizando enfoques convencionales de diseño de fármacos basados en estructura [21]. En segundo lugar, la afinidad de la interacción IF1–OSCP es relativamente baja (KD del orden milimolar), lo que limita la posibilidad de caracterizarla mediante técnicas cristalográficas y obliga a recurrir a métodos sensibles como RMN o a abordajes computacionales para obtener información estructural detallada a nivel atómico [19].

No obstante, el sitio de unión en OSCP-NT presenta una estructura tridimensional bien definida, lo que lo convierte en un blanco farmacológico más accesible. La región shoulder entre H3-H4 de OSCP-NT puede ser apuntada por moléculas externas, como lo confirma el efecto del compuesto benzodiazepínico Bz423, que compite con IF1 por este sitio e induce apoptosis dependiente de PTP [19,22]. Esto valida la estrategia de diseñar péptidos o moléculas pequeñas capaces de desplazar a IF1 de OSCP, sensibilizando las células cancerosas a la muerte apoptótica.

1.6 El rol de las simulaciones de dinámica molecular

Las simulaciones de dinámica molecular (DM) constituyen una herramienta computacional de enorme potencial para el estudio de sistemas biológicos a nivel atómico. A diferencia de las técnicas estructurales estáticas como la cristalografía de rayos X o la cryo-EM, la DM permite observar la evolución temporal de los sistemas moleculares, explorando los cambios

conformacionales, las interacciones intermoleculares transitorias y los mecanismos de plegamiento/desplegamiento proteico en condiciones que imitan el entorno fisiológico [23]. Estas capacidades son especialmente valiosas para el estudio de proteínas intrínsecamente desordenadas como el dominio N-terminal de IF1, cuya estructura fluctuante es inherentemente difícil de capturar mediante métodos de resolución estática.

En particular, el campo de fuerzas CHARMM36m ha demostrado ser especialmente adecuado para el estudio de regiones o proteínas intrínsecamente desordenadas, describiendo con fidelidad el equilibrio entre estados estructurados y no estructurados que las caracteriza [24]. Su implementación en el software GROMACS, uno de los paquetes de DM más utilizados y optimizados para cómputo en paralelo, permite aprovechar los recursos de supercomputación disponibles para simular sistemas de relevancia biológica en escalas de tiempo del orden de los microsegundos [23,25].

1.7 Justificación del presente trabajo

El presente trabajo se enmarca en un proyecto de investigación más amplio cuyo objetivo final es el desarrollo de péptidos inhibidores de la interacción IF1–OSCP como agentes anticancerígenos. La primera etapa de este proyecto, y la que constituye el objeto de la presente tesina, consiste en la caracterización a nivel atómico de la interacción IF1–OSCP mediante simulaciones de DM, sentando las bases estructurales sobre las cuales se diseñarán los péptidos candidatos en etapas posteriores.

La justificación de esta tesina radica, por un lado, en la relevancia biomédica del sistema estudiado —la interacción IF1–OSCP como mecanismo pro-oncogénico cuya interrupción podría generar nuevas estrategias terapéuticas— y, por otro, en la apropiación de herramientas computacionales de alto impacto, como CHARMM-GUI y GROMACS, que constituyen parte de la formación metodológica avanzada del graduado en Ciencias Químicas con orientación biofísica y computacional. El trabajo aquí presentado describe el proceso de aprendizaje, implementación y análisis de simulaciones de DM realizado de manera autónoma por el tesista, representando una contribución original al grupo de investigación y a la institución.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Caracterizar a nivel atómico la dinámica conformacional y las interacciones moleculares de la región N-terminal de una delección de IF1 (IF1-NT), específicamente los residuos 1-40, en solución y en complejo con la subunidad OSCP-NT de la ATP sintasa, mediante simulaciones de dinámica molecular atomística, con el fin de proporcionar bases estructurales para el diseño futuro de agentes terapéuticos inhibidores de la interacción IF1–OSCP en células cancerosas.

2.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar el comportamiento conformacional de IF1-NT en solución acuosa (Sistema A), evaluando la naturaleza desordenada de la IDR, su radio de giro y sus propiedades dinámicas mediante análisis de trayectorias.
2. Estudiar la dinámica del complejo binario IF1-NT/OSCP-NT (Sistema B), identificando los residuos de contacto intermolecular, las interacciones clave (puentes de hidrógeno, contactos hidrofóbicos, puentes salinos) y la propensión de IF1-NT a adoptar estructura helicoidal al interactuar con OSCP.
3. Analizar el sistema ternario con tres moléculas de IF1-NT en presencia de OSCP-NT (Sistema C), explorando posibles fenómenos de competencia por el sitio de unión y/o agregación del péptido.
4. Integrar los resultados obtenidos en los tres sistemas y contrastarlos con los datos experimentales de RMN reportados por Galber et al. (2023), validando el enfoque computacional adoptado.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 La ATP Sintasa Mitocondrial

3.1.1 Estructura general

La ATP sintasa mitocondrial (también denominada Complejo V o F-ATP sintasa) es una máquina molecular rotatoria que cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (Pi), utilizando como fuerza impulsora el gradiente electroquímico de protones (fuerza protomotriz, pmf) generado a través de la membrana mitocondrial interna por los complejos I, III y IV de la cadena de transporte de electrones [8].

Estructuralmente, la ATP sintasa está compuesta por dos dominios principales: el sector F₁, soluble, ubicado en la matriz mitocondrial, que contiene los sitios catalíticos; y el sector F_o, embebido en la membrana interna, que actúa como canal de protones. Ambos dominios están conectados por dos tallos: uno central (eje γεδ) y uno periférico u 'stator' (subunidades OSCP, b, d, F₆) que mantiene fijo el sector F₁ mientras el eje central y el anillo c del sector F_o rotan bajo el impulso del flujo de protones [26].

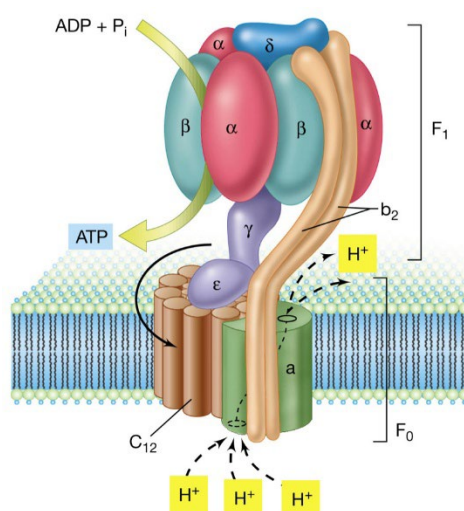


Figura I-1. Esquema estructural de la ATP sintasa mitocondrial mostrando los sectores F₁ (soluble, matricial) y F_o (transmembrana), el eje central (γ) y el tallo periférico (OSCP, b, d).

La subunidad α₃β₃ del sector F₁ forma una estructura hexamérica asimétrica que alberga tres sitios de unión a nucleótidos. La síntesis/hidrólisis de ATP ocurre mediante cambios conformacionales secuenciales en los tres sitios β, impulsados por la rotación del eje central (mecanismo de 'enlace girado' de Boyer) [8,26]. La estructura completa de la ATP sintasa mitocondrial de mamíferos ha sido resuelta mediante cryo-EM, con una masa molecular de aproximadamente 600 kDa [27].

3.1.2 La ATP sintasa y el poro de transición de permeabilidad

Además de su función en la síntesis de ATP, la ATP sintasa ha sido propuesta como un componente estructural del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP) [9]. El PTP es un canal de alta conductancia, dependiente de Ca^{2+} y sensible a ciclosporina A (CsA), cuya apertura prolongada aumenta dramáticamente la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna, conduciendo a la disipación del gradiente electroquímico, la liberación de citocromo c y la activación de la vía intrínseca de la apoptosis [28,29].

Numerosas evidencias experimentales, incluyendo manipulaciones genéticas de subunidades de la ATP sintasa, sugieren que los dímeros de la ATP sintasa —formados principalmente a través de sus subunidades Fo — podrían constituir los elementos estructurales que forman el PTP [9,30]. El anillo c y las subunidades del tallo periférico, en particular OSCP, han sido identificados como moduladores críticos de la actividad del poro [31,32]. La modulación farmacológica del PTP a través de la ATP sintasa representa, por tanto, una estrategia de gran potencial para sensibilizar células cancerosas a la apoptosis [33].

3.2 La Proteína Inhibidora IF1

3.2.1 Estructura y función canónica

IF1 (Factor Inhibidor de la ATPase 1; gen ATP5IF1 en humanos) es una pequeña proteína de 10 kDa compuesta por 84 aminoácidos en su forma madura (tras el procesamiento del péptido señal mitocondrial) [10]. Su función canónica consiste en unirse al sector F1 de la ATP sintasa en condiciones de hipoxia o reducción del potencial de membrana mitocondrial, cuando la enzima tendería a hidrolizar ATP en lugar de sintetizarlo, previniendo así el agotamiento energético celular [34].

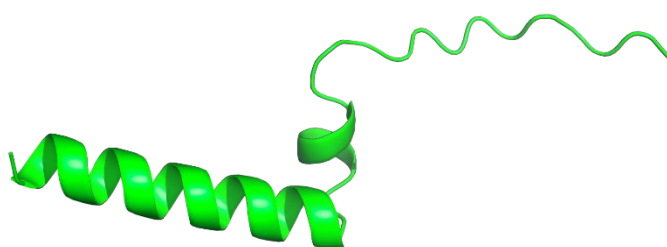


Figura I-2. Estructura y modo de unión de IF1 al sector F1 de la ATP sintasa. La región N-terminal de IF1 (azul) se inserta en la interfase catalítica αDP - βDP durante la hidrólisis de ATP.

La inhibición canónica de IF1 requiere la hidrólisis de ATP: IF1-NT se inserta en la interfase catalítica entre las subunidades βDP y αDP en una conformación específica que solo está disponible durante la hidrólisis, bloqueando el ciclo catalítico [13]. Los residuos Y33, L42 y L45 de

IF1 establecen contactos con superficies hidrofóbicas del sitio de unión en F1, siendo la mutación Y33R incapaz de unirse al sector F1 [35].

En términos de autorregulación, IF1 existe en equilibrio entre dímeros activos (estabilizados por el dominio C-terminal de hélice coiled-coil) y tetrámeros inactivos (en los que el extremo N-terminal queda ocluido), siendo el pH el principal regulador de este equilibrio: a pH ácido (como el que ocurre en condiciones isquémicas) predominan los dímeros activos inhibidores, mientras que a pH neutro o básico predominan los tetrámeros inactivos [14,36].

3.2.2 IF1 en cáncer

La sobreexpresión de IF1 en tejidos tumorales, documentada en al menos doce tipos de cáncer humano, fue inicialmente interpretada como un mecanismo de adaptación metabólica que favorecería la glucólisis aeróbica (efecto Warburg) mediante la inhibición de la ATP sintasa mitocondrial [15]. Sin embargo, investigaciones posteriores han cuestionado esta interpretación, sugiriendo que en condiciones normóxicas (habituales en la mayoría de los tumores sólidos bien irrigados), IF1 no inhibiría activamente la ATP sintasa, sino que ejercería sus efectos pro-oncogénicos a través de otros mecanismos [37].

Entre los mecanismos propuestos se incluyen: la estabilización de los dímeros de ATP sintasa y la densidad de crestas mitocondriales [38], la regulación de la remodelación mitocondrial asociada a apoptosis a través del procesamiento de OPA1 [39], la modulación de la producción de ROS [40], y —en el mecanismo central objeto de esta tesina— la interacción con la subunidad OSCP para desensibilizar la apertura del PTP y conferir resistencia a la apoptosis [19].

3.3 La Subunidad OSCP y la Regulación del PTP

3.3.1 OSCP como componente del tallo periférico

OSCP (Oligomycin Sensitivity Conferring Protein; ATP5O/ATP5PO en humanos) es una subunidad periférica de la ATP sintasa mitocondrial, de 23 kDa, que forma parte del tallo periférico o 'stator'. OSCP conecta el sector F1 con las subunidades b del sector Fo, contribuyendo a mantener la integridad estructural del complejo y a prevenir la rotación relativa de ambos sectores durante la catálisis [41].

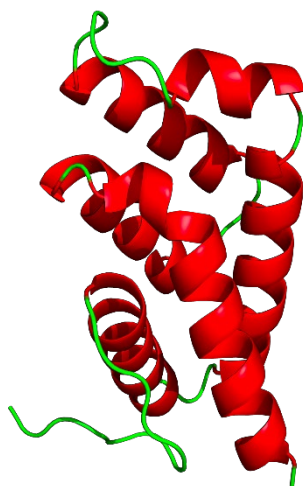


Figura I-3. Estructura del dominio N-terminal de OSCP (OSCP-NT) mostrando las seis hélices alfa (H1-H6) y la región shoulder (H3-H4) en rojo, sitio de interacción con IF1 y CyPD.

El dominio N-terminal de OSCP (OSCP-NT, residuos R6-G114) adopta una topología helicoidal bien definida con seis hélices alfa (H1-H6), que incluye una región 'shoulder' formada por las hélices H3, H4 y H5 orientada hacia el exterior del complejo, accesible para interacciones con otras proteínas [42]. Esta región es el sitio de anclaje de la ciclofilina D (CyPD), el regulador fisiológico del PTP cuya unión a OSCP potencia la apertura del poro en condiciones de sobrecarga de Ca^{2+} y estrés oxidativo [20].

3.3.2 Regulación del PTP a través de OSCP

La modulación del PTP a través de OSCP constituye un mecanismo de control de la apoptosis de importancia fundamental. La unión de CyPD a OSCP-NT sensibiliza el poro a la apertura, y esta interacción puede ser bloqueada por ciclosporina A (CsA), un inhibidor de CyPD utilizado ampliamente como herramienta experimental y con aplicaciones clínicas en contextos de isquemia-reperfusión [9,28].

El compuesto benzodiazepínico Bz423, un inductor del PTP utilizado como herramienta para el estudio del poro, también ejerce su efecto a través de OSCP: estudios de RMN demostraron que Bz423 se une a la región shoulder de OSCP-NT, desplazando a CyPD y promoviendo la apertura del poro, con actividad selectiva en células de lupus eritematoso sistémico [22]. Crucialmente, Galber et al. (2023) demostraron que IF1 también se une a esta misma región de OSCP-NT, compitiendo directamente con Bz423 y protegiendo a las células HeLa de la apoptosis inducida por este compuesto [19].

3.4 La Interacción IF1–OSCP en Cáncer

3.4.1 Evidencias experimentales

Galber et al. (2023) proporcionaron evidencias múltiples y complementarias de la interacción entre IF1 y OSCP en células cancerosas. En primer lugar, mediante ensayos de inmunoprecipitación (IP) de la ATP sintasa a partir de mitocondrias de células HeLa, Colo741 y HepG2, detectaron la presencia de IF1 en los eluatos bajo condiciones de respiración en Estado 2, Estado 3 e hidrólisis de ATP, sugiriendo un sitio de unión adicional al canónico en F1 [19].

Los ensayos de PLA en situ confirmaron la interacción de IF1 tanto con la subunidad β como con OSCP en células HeLa control, pero no en células IF1 KO, descartando inespecificidades. La IP selectiva del fragmento OSCP a partir de mitocondrias y células permeabilizadas en Estado 3 demostró la coprecipitación de IF1 con OSCP pero no con β , indicando que bajo condiciones de fosforilación oxidativa la unión predominante de IF1 ocurre a través de OSCP [19].

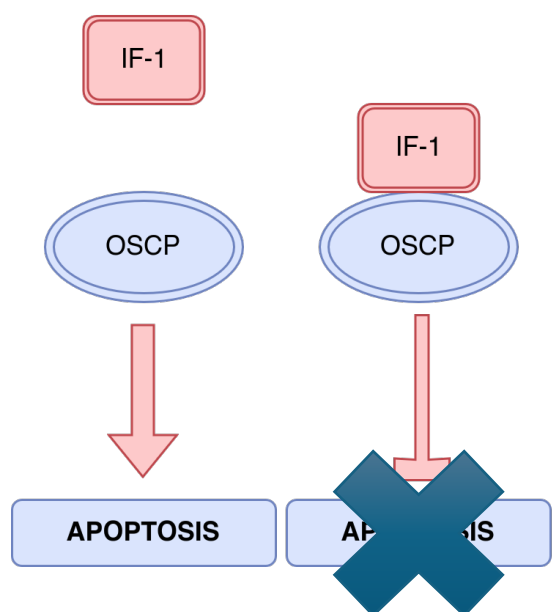


Figura I-4. Resultados experimentales de Galber et al. (2023) demostrando la interacción IF1-OSCP. Se muestran resultados de inmunoprecipitación, PLA y espectros RMN que evidencian la unión de IF1 a OSCP-NT bajo condiciones de fosforilación oxidativa [19].

Los estudios de RMN (espectros 1H - 15N SOFAST-HMQC) realizados con los dominios recombinantes purificados (IF1-NT y OSCP-NT) confirmaron la interacción a nivel molecular: la adición de OSCP-NT en exceso molar provoca perturbaciones significativas de desplazamiento químico en los residuos E29-R39 de IF1-NT, con indicios de propensión helicoidal en esa región. Asimétricamente, los residuos con mayores perturbaciones en OSCP-NT al agregar IF1-NT se localizan en las hélices H1, H3, H4 y H5, siendo la región shoulder H3-H4 la única zona accesible en la superficie del complejo completo [19].

3.4.2 Relevancia terapéutica

La interacción IF1–OSCP representa un blanco terapéutico de doble atractivo: por un lado, su interrupción podría sensibilizar específicamente a las células cancerosas —donde IF1 está sobreexpresada— a la apertura del PTP y a la apoptosis, respetando relativamente a las células normales; por otro, el sitio de unión en OSCP-NT es estructuralmente definido y ya ha sido validado por la acción de Bz423, lo que lo convierte en un blanco 'drogable' [19,22].

El péptido IF1-O2, diseñado por los colaboradores del grupo del Dr. Bellanda como derivado de IF1-NT, demostró ser capaz de unirse a OSCP-NT y desensibilizar la apertura del PTP en células HeLa con baja expresión de IF1, validando el concepto de que moléculas externas pueden modular la actividad del PTP a través de esta interfase [43]. Sin embargo, IF1-O2 presenta baja afinidad y no logra desplazar a IF1 en células que la sobreexpresan, lo que impone la necesidad de diseñar péptidos de mayor afinidad, lo cual requiere una caracterización atómica más detallada de la interacción que la que puede obtenerse experimentalmente.

3.5 Proteínas Intrínsecamente Desordenadas

3.5.1 Definición y características

Las proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs) y las regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs) carecen de estructura tridimensional estable bajo condiciones fisiológicas normales, existiendo como ensambles de conformaciones en rápido intercambio [44]. A diferencia de las proteínas globulares, las IDRs no presentan un núcleo hidrofóbico bien empaquetado, y su comportamiento en solución es análogo al de un polímero estadístico con propensión local a estructuras transitorias [44].

A pesar de su falta de estructura estable, las IDPs cumplen funciones biológicas fundamentales, frecuentemente relacionadas con reconocimiento molecular, señalización, regulación transcripcional y ensamblaje de complejos macromoleculares [44]. Un mecanismo de reconocimiento molecular particularmente relevante es el 'plegamiento acoplado a unión' (coupled folding and binding): al interactuar con su pareja, la IDR adopta una estructura secundaria estable (frecuentemente helicoidal) que estabiliza el complejo [45]. Este es precisamente el mecanismo propuesto para la unión de IF1-NT a OSCP, respaldado por las evidencias de RMN de Galber et al. [19].

3.5.2 IDRs como blancos terapéuticos y desafíos

El creciente reconocimiento de las IDRs como mediadores de interacciones proteína-proteína de relevancia patológica ha impulsado el interés por targeting estas regiones para fines terapéuticos [45]. Sin embargo, el diseño de inhibidores de IDRs presenta desafíos únicos: la falta de una cavidad de unión bien definida en la IDR misma dificulta la aplicación de enfoques convencionales de diseño de fármacos basados en estructura (SBDD) [21]. Las estrategias más

prometedoras incluyen el diseño de péptidos o peptidomiméticos que mimeticen la conformación activa adoptada por la IDR al unirse, o el targeting del sitio de unión en la proteína estructurada (en este caso, OSCP-NT), que sí presenta una superficie bien definida [21,45].

Las simulaciones de dinámica molecular son herramientas especialmente valiosas para el estudio de IDRs, ya que permiten muestrear el paisaje conformacional completo de estos segmentos y observar directamente el proceso de plegamiento acoplado a unión, fenómenos que son difícilmente accesibles por técnicas experimentales estáticas [23,46].

3.6 Dinámica Molecular: Fundamentos Teóricos

3.6.1 Principios de la dinámica molecular

La dinámica molecular (DM) es un método computacional que simula el comportamiento de un sistema de partículas (átomos o grupos de átomos) a lo largo del tiempo, mediante la integración numérica de las ecuaciones de movimiento de Newton [23,47]:

$$\mathbf{F}_i = m_i \cdot \mathbf{a}_i$$

donde $\mathbf{F}_i$ es la fuerza neta sobre el átomo i de masa m_i , y $\mathbf{a}_i$ es su aceleración. Las fuerzas se derivan de un potencial de energía potencial V , llamado campo de fuerzas, que describe las interacciones inter e intramoleculares del sistema [23].

El campo de fuerzas típicamente incluye términos para: (a) estiramiento de enlaces covalentes, (b) deformación de ángulos de enlace, (c) rotación de ángulos diedros (torsiones), (d) interacciones de van der Waals (potencial de Lennard-Jones), y (e) interacciones electrostáticas (potencial de Coulomb) [47]. La suma de todos estos términos define la energía potencial del sistema en función de las coordenadas atómicas.

3.6.2 El campo de fuerzas CHARMM36m

CHARMM36m es un campo de fuerzas atomístico desarrollado para la simulación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, con especial énfasis en la descripción adecuada tanto de proteínas globulares plegadas como de proteínas intrínsecamente desordenadas [24]. Su desarrollo incorporó modificaciones a los potenciales de torsión y a los parámetros del modelo de agua, que corrigen la sobre estructuración de IDPs observada en versiones anteriores de campos de fuerzas de la familia CHARMM.

CHARMM36m ha demostrado reproducir con fidelidad las propiedades de IDPs caracterizadas por RMN y espectroscopía de dispersión de rayos X en ángulos pequeños (SAXS), siendo uno de los campos de fuerzas más recomendados para el estudio de regiones desordenadas en el

contexto de complejos proteína-proteína [24,48]. Su utilización en el presente trabajo está justificada por la naturaleza IDR del epítipo de unión de IF1-NT.

3.6.3 Integración numérica: algoritmo velocity-Verlet

La integración numérica de las ecuaciones de movimiento se realiza con pasos de tiempo discretos Δt (típicamente del orden de 1-2 fs), actualizando iterativamente las posiciones y velocidades de todos los átomos. El algoritmo velocity-Verlet, utilizado por defecto en GROMACS, combina la actualización de posiciones y velocidades de manera eficiente y preserva la energía en simulaciones NVE (número de partículas, volumen y energía constantes) [23,47]:

$$r(t+\Delta t) = r(t) + v(t) \cdot \Delta t + \frac{1}{2}a(t) \cdot \Delta t^2$$

$$v(t+\Delta t) = v(t) + \frac{1}{2}[a(t) + a(t+\Delta t)] \cdot \Delta t$$

La elevada frecuencia de actualización de las fuerzas (cada Δt) hace que el cálculo de las interacciones no enlazadas (van der Waals y electrostáticas) sea el paso computacionalmente más costoso, dominando el tiempo total de simulación [23].

3.6.4 Condiciones de contorno periódicas y convención de imagen mínima

Para minimizar los efectos de borde y simular sistemas con comportamiento de 'bulto' (bulk), las simulaciones de DM utilizan condiciones de contorno periódicas (PBC): la caja de simulación es rodeada por imágenes periódicas de sí misma en todas las direcciones [23]. Cuando una partícula abandona la caja por un lado, re-ingresa por el lado opuesto. La convención de imagen mínima garantiza que para el cálculo de la distancia entre dos átomos se utilice siempre la imagen más cercana [23].

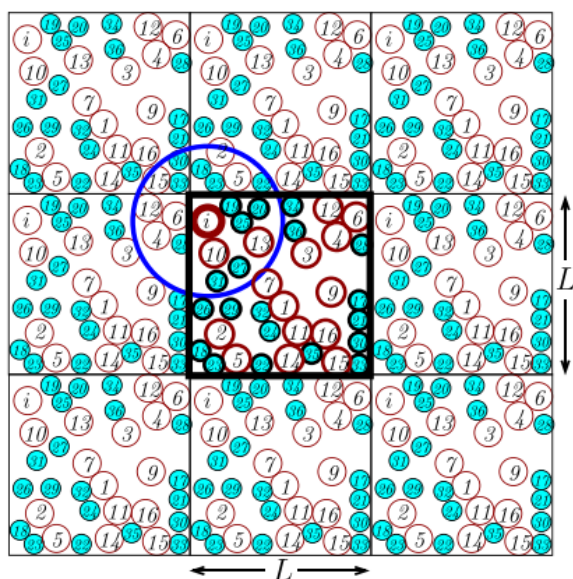


Figura I-5. Representación esquemática de las condiciones de contorno periódicas (PBC) en un sistema binario bidimensional. El recuadro central (borde negro) es la caja de simulación principal de lado L , rodeada por sus imágenes periódicas. El círculo azul centrado en la partícula i indica el radio de corte de interacción: para calcular la distancia entre i y cualquier otra partícula se utiliza la imagen más cercana, ya sea de la caja principal o de una copia periódica.

3.6.5 Termostato y barostato

Las simulaciones biológicas se realizan típicamente en ensambles NVT (número de partículas, volumen y temperatura constantes) o NPT (número de partículas, presión y temperatura constantes). La temperatura se controla mediante termostatos, que modifican las velocidades de las partículas para mantener la temperatura deseada. En el presente trabajo se utilizó el termostato de Nosé-Hoover, que proporciona fluctuaciones termodinámicas correctas en el ensamble canónico [49]. La presión se controló con el barostato de Parrinello-Rahman, que permite fluctuaciones de volumen consistentes con el ensamble isotérmico-isobárico [50].

3.6.6 Tratamiento de interacciones electrostáticas: método PME

Las interacciones electrostáticas de largo alcance se trataron mediante el método de Particle Mesh Ewald (PME), que calcula la suma de Ewald de manera eficiente mediante transformadas de Fourier rápidas (FFT), permitiendo el tratamiento riguroso de cargas periódicas con un costo computacional favorable [51]. Las interacciones de van der Waals se truncaron con una distancia de corte de 1.2 nm, con una función de desvanecimiento gradual entre 1.0 y 1.2 nm.

3.7 Herramientas Computacionales Utilizadas

3.7.1 CHARMM-GUI

CHARMM-GUI es una interfaz web interactiva y gratuita que facilita la preparación de sistemas moleculares para simulaciones de DM [52]. Permite construir, solubilizar y ionizar sistemas proteicos, lipídicos y de ácidos nucleicos, generando automáticamente los archivos de topología y coordenadas compatibles con los principales paquetes de DM (GROMACS, NAMD, AMBER, OpenMM, entre otros). Para el presente trabajo, se utilizó específicamente el módulo 'Solution

Builder' de CHARMM-GUI, que permite colocar la proteína de interés en una caja cúbica o rectangular de agua explícita, añadir iones a la concentración deseada y generar los archivos de entrada para GROMACS con el campo de fuerzas CHARMM36m.

La adopción de CHARMM-GUI como herramienta de preparación de sistemas redujo significativamente la posibilidad de errores en la parametrización de las moléculas y garantizó la consistencia entre el campo de fuerzas utilizado y la topología generada. El aprendizaje del uso de esta plataforma por parte del tesista constituyó una etapa formativa importante del presente trabajo.

3.7.2 GROMACS

GROMACS (GRoningen MACHine for Chemical Simulations) es uno de los paquetes de software de dinámica molecular más ampliamente utilizados en el mundo, desarrollado originalmente en la Universidad de Groningen (Países Bajos) y actualmente mantenido por un consorcio internacional [53]. GROMACS está optimizado para el cómputo en paralelo mediante MPI (Message Passing Interface) y para el uso de unidades de procesamiento gráfico (GPUs), lo que lo hace especialmente adecuado para la ejecución en clústeres de supercomputación [53].

El flujo de trabajo típico en GROMACS incluye los siguientes pasos: (1) minimización de energía del sistema, para eliminar conflictos estéricos en la configuración inicial; (2) equilibración en el ensamble NVT (con temperatura constante), para termalizar el sistema; (3) equilibración en el ensamble NPT (con temperatura y presión constantes), para equilibrar la densidad del sistema; y (4) producción dinámica a NPT, de la cual se extraen las trayectorias para el análisis posterior [47]. El presente trabajo siguió este protocolo estándar para los tres sistemas de simulación.

3.7.3 Infraestructura computacional: CCAD

Las simulaciones de dinámica molecular presentadas en esta tesina fueron ejecutadas en los clústeres de alto rendimiento del Centro de Computación de Alto Desempeño (CCAD) de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. El CCAD cuenta con infraestructura de computación paralela en CPU y GPU, y ofrece acceso a investigadores de todo el país para la ejecución de cálculos científicos de alto costo computacional. El acceso a estos recursos fue gestionado a través del grupo de investigación, y su utilización fue fundamental para la viabilidad del trabajo.

Las simulaciones de dinámica molecular se benefician especialmente del cómputo en unidades de procesamiento gráfico (GPU), ya que GROMACS está altamente optimizado para aprovechar la paralelización masiva que ofrecen estas arquitecturas, logrando aceleraciones de uno a dos órdenes de magnitud respecto al cómputo exclusivo en CPU [53]. El clúster Mendieta está diseñado específicamente para cómputo con GPU, contando con 19 nodos de cómputo, cada

uno equipado con 2 GPUs NVIDIA A30, 20 núcleos de procesamiento (20C/20T), 64 GB de RAM y 400 GB de almacenamiento local. Los nodos están interconectados mediante una red interna InfiniBand de 40 Gbps, que minimiza la latencia en las comunicaciones inter-nodo durante la ejecución en paralelo. El sistema de almacenamiento compartido es de tipo NFS+ZFS con una capacidad total de 333 TB (20 unidades de 24 TB). El entorno de compilación utilizado fue GCC 11 junto con el NVIDIA HPC SDK 22.3, y la biblioteca de comunicaciones paralelas empleada fue Open MPI 4.1.

La disponibilidad de GPUs NVIDIA A30 fue determinante para la viabilidad de las simulaciones de 500 y 1000 ns presentadas en este trabajo, ya que los tiempos de cómputo equivalentes en CPU habrían resultado prohibitivos en el contexto de una tesina de grado.

3.7.4 Análisis de trayectorias: herramientas de GROMACS y Python

El análisis de las trayectorias generadas se realizó con las herramientas integradas de análisis de GROMACS (gmx rms, gmx rmsf, gmx gyrate, gmx hbond, gmx do_dssp, gmx mindist, gmx distance, entre otras) y con scripts de Python (versión 3.x) utilizando las librerías MDAnalysis, NumPy y Matplotlib para el procesamiento y visualización de datos [54,55]. La estructura secundaria se analizó con el algoritmo DSSP (Define Secondary Structure of Proteins), implementado en GROMACS a través de la interfaz do_dssp [56].

4. METODOLOGÍA

4.1 Estructuras de Partida

4.1.1 Selección de estructuras proteicas

Las estructuras de las proteínas estudiadas se obtuvieron de las siguientes fuentes. Para OSCP-NT (residuos R6-G114), se utilizó el dominio bovino resuelto por RMN (Carbajo et al., 2005 [42]) como referencia estructural, y se construyó un modelo del dominio humano utilizando la predicción de AlphaFold v2 de la proteína completa (código UniProtKB P48047) [57], que predice con alta confianza (pLDDT > 90) la estructura helicoidal del dominio N-terminal.

Para IF1-NT (residuos G1-E40 del péptido maduro, correspondientes a la región IDR y el segmento de unión), dado que se trata de una región intrínsecamente desordenada sin estructura cristalina definida, se utilizó la secuencia primaria de IF1 humano (UniProtKB Q9UII2, isoforma 1) y se construyó una conformación extendida inicial, práctica estándar para la simulación de IDPs [58]. Adicionalmente, se utilizó la predicción de AlphaFold para generar una conformación helicoidal inicial alternativa y comparar el comportamiento de equilibración.

4.1.2 Preparación de archivos PDB

Los archivos de coordenadas en formato PDB se procesaron para eliminar moléculas de agua cristalográficas, ligandos y heteroátomos no relevantes, y se verificó la integridad de la cadena de residuos. En el caso del complejo binario y ternario, las coordenadas iniciales de IF1-NT y OSCP-NT se posicionaron manualmente utilizando el programa PyMOL, orientando el péptido IF1-NT en las proximidades de la región shoulder de OSCP-NT, consistentemente con las perturbaciones de desplazamiento químico observadas por RMN [19]. Esto permitió reducir los tiempos de equilibración necesarios para el muestreo del complejo.

4.2 Preparación de los Sistemas con CHARMM-GUI

4.2.1 Módulo Solution Builder

La preparación de los tres sistemas de simulación se realizó mediante el módulo 'Solution Builder' de CHARMM-GUI (disponible en <https://charmm-gui.org>) [52]. Este módulo permite definir el sistema proteico, las dimensiones de la caja de simulación, el modelo de solvente, la concentración de iones y el campo de fuerzas a utilizar, generando automáticamente los archivos de topología y coordenadas compatibles con GROMACS.

Para cada sistema se siguieron los siguientes pasos en la interfaz web de CHARMM-GUI:

1. Carga del archivo PDB del sistema proteico.
2. Definición del campo de fuerzas: CHARMM36m para proteínas [24].
3. Selección del modelo de agua: TIP3P modificado (CHARMM-modified TIP3P), compatible con CHARMM36m [24].
4. Definición de la caja de simulación: caja cúbica o rectangular con un mínimo de 1.2 nm de distancia entre la proteína y las paredes de la caja (para evitar interacciones del soluto con sus imágenes periódicas).
5. Solvatación: llenado de la caja con moléculas de agua TIP3P.
6. Ionización: adición de iones KCl a una concentración de 0.15 M (condición fisiológica), con neutralización de las cargas netas del sistema mediante la adición o sustracción de iones Cl^- y K^+ .
7. Generación de archivos de salida para GROMACS: topología (.top), estructura inicial (.gro) y archivos de parámetros de posición (.itp).

4.2.2 Sistemas preparados

Se prepararon los siguientes sistemas:

Sistema A: IF1-NT (residuos G1-E40) en solución acuosa. Una sola molécula del péptido en caja cúbica de agua con KCl 0.15 M. Tamaño aproximado del sistema: ~15.000 átomos.

Sistema B: Complejo binario IF1-NT/OSCP-NT. Una molécula de IF1-NT y una molécula de OSCP-NT en caja rectangular con KCl 0.15 M. Tamaño aproximado del sistema: ~40.000 átomos.

Sistema C: Sistema ternario con tres moléculas de IF1-NT en presencia de una molécula de OSCP-NT. Las tres copias de IF1-NT se posicionaron en diferentes orientaciones en las proximidades de OSCP-NT, incluyendo una en el sitio shoulder y dos en posiciones alejadas para evaluar la dinámica de asociación. Tamaño aproximado del sistema: ~55.000 átomos.

4.3 Protocolo de Simulación en GROMACS

4.3.1 Minimización de energía

Cuando se construye un sistema molecular para simulación —ya sea a partir de coordenadas cristalográficas, predicciones estructurales o estructuras generadas manualmente— es inevitable que algunas distancias de enlace, ángulos y distancias interatómicas no enlazantes presenten valores alejados del equilibrio definido por el campo de fuerzas. Estas imperfecciones generan fuerzas muy elevadas sobre los átomos involucrados que, si se propagaran directamente mediante integración numérica, producirían velocidades y aceleraciones numéricamente inestables capaces de destruir la simulación en los primeros pasos. La minimización de energía resuelve este problema llevando el sistema a un mínimo local del potencial, donde las fuerzas sobre cada átomo son suficientemente pequeñas como para que la integración numérica posterior sea estable.

Todos los sistemas fueron sometidos a una minimización de energía mediante el algoritmo del gradiente conjugado (hasta convergencia con fuerza máxima $< 1000 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-1}$) para eliminar tensiones y conflictos estéricos presentes en la configuración inicial. Se utilizaron 5000 pasos máximos de minimización. Este paso es fundamental para garantizar la estabilidad numérica de las simulaciones posteriores.

4.3.2 Equilibración en ensamble NVT

Tras la minimización, el sistema se encuentra en un mínimo de energía potencial pero con velocidades atómicas nulas o aleatorias no representativas de la temperatura de trabajo. El objetivo de la equilibración NVT es llevar el sistema a la temperatura deseada (300 K) y mantenerla estable, permitiendo que el solvente y los iones reorganicen su distribución alrededor de la proteína. El ensamble NVT —también denominado ensamble canónico— mantiene constante el número de partículas (N), el volumen de la caja (V) y la temperatura (T), mientras la energía potencial y la presión pueden fluctuar libremente. Fijar el volumen en esta primera etapa es una decisión deliberada: si se permitiese variar la presión antes de que el solvente esté termalmente equilibrado, las fluctuaciones de temperatura generarían cambios bruscos en las dimensiones de la caja que desestabilizarían el sistema.

Se realizaron 100 ps de equilibración en el ensamble NVT (N partículas, Volumen y Temperatura constantes) a 300 K, con paso de tiempo de 2 fs. Durante esta etapa, se aplicaron restricciones de posición sobre los átomos pesados de las proteínas para permitir la relajación del solvente sin perturbar la configuración proteica inicial. Se utilizó el termostato de Nosé-Hoover con constante de acoplamiento $\tau_T = 1.0 \text{ ps}$ para cada grupo de temperatura (proteína y solvente por separado) [49].

4.3.3 Equilibración en ensamble NPT

Una vez que el sistema alcanzó la temperatura de trabajo en la etapa NVT, es necesario equilibrar también la presión y, con ella, la densidad del solvente y las dimensiones de la caja de

simulación. Al agregar moléculas de agua alrededor de la proteína con CHARMM-GUI, la densidad inicial del solvente es aproximada y puede diferir ligeramente de la densidad del agua líquida a 300 K y 1 bar. Si se iniciara la producción dinámica con esta densidad incorrecta, la presión del sistema fluctuaría de forma artificial durante toda la simulación. El ensamble NPT —o ensamble isotérmico-isobárico— mantiene constante el número de partículas (N), la presión (P) y la temperatura (T), permitiendo que el volumen de la caja fluctúe para ajustarse a la presión de referencia. Esto equivale a simular el sistema en condiciones experimentales reales, donde una muestra en solución está en equilibrio mecánico con su entorno a presión atmosférica.

Se realizaron 100 ps adicionales de equilibración en el ensamble NPT (N partículas, Presión y Temperatura constantes) a 300 K y 1 bar, con paso de tiempo de 2 fs y restricciones de posición sobre los átomos pesados. Se utilizó el barostato de Parrinello-Rahman con constante de acoplamiento $\tau_P = 5.0$ ps y compresibilidad isotrópica de $4.5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$ [50]. Esta etapa permitió equilibrar la densidad del solvente y las dimensiones de la caja a la presión de trabajo.

4.3.4 Producción dinámica

Las simulaciones de producción se realizaron en el ensamble NPT a 300 K y 1 bar, con paso de tiempo de 2 fs y sin restricciones de posición, durante un tiempo total de 100 ns por sistema. Las trayectorias se almacenaron cada 10 ps para análisis posterior. Se utilizaron los mismos termostato (Nosé-Hoover, $\tau_T = 1.0$ ps) y barostato (Parrinello-Rahman, $\tau_P = 5.0$ ps) que en la etapa de equilibración.

Los parámetros de simulación utilizados se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros de simulación utilizados en los tres sistemas.

Parámetro	Valor
Campo de fuerzas	CHARMM36m
Modelo de agua	TIP3P (CHARMM-modified)
Concentración de KCl	0.15 M
Paso de tiempo (Δt)	2 fs
Temperatura	300 K (Nosé-Hoover, $\tau_T = 1.0$ ps)
Presión	1 bar (Parrinello-Rahman, $\tau_P = 5.0$ ps)
Distancia de corte vdW	1.2 nm (con switching 1.0–1.2 nm)
Electrostáticas	PME (malla 0.12 nm)
Tiempo total de producción	100 ns por sistema
Frecuencia de escritura	Cada 10 ps (10.000 frames)

4.3.5 Ejecución en el CCAD

Los archivos de entrada generados por CHARMM-GUI fueron transferidos al clúster de CPUs del CCAD de la Universidad Nacional de Córdoba mediante protocolo SSH. Las simulaciones se sometieron al sistema de colas SLURM, solicitando nodos de cómputo con procesadores múltiples. GROMACS fue ejecutado en modo paralelo (MPI) aprovechando los múltiples núcleos disponibles. El tiempo de cómputo total utilizado fue de aproximadamente [X] horas de CPU por sistema, con tiempos de reloj de [X] horas por simulación de 100 ns.

El tesista realizó de manera autónoma la configuración de los archivos de sometimiento de trabajos (job scripts en formato SLURM), la monitorización de las simulaciones, la descarga de trayectorias y el post-procesamiento de los datos. Esta experiencia práctica en entornos de supercomputación constituye un aprendizaje de alto valor profesional para el desarrollo futuro en investigación computacional.

4.4 Análisis de Trayectorias

4.4.1 Desviación cuadrática media (RMSD)

El RMSD (Root Mean Square Deviation) mide la desviación promedio de las posiciones atómicas de una estructura respecto a una estructura de referencia, típicamente la estructura inicial de la trayectoria. Se calculó el RMSD de los átomos C α de cada proteína como función del tiempo, utilizando gmx rms de GROMACS, para evaluar el grado de equilibración y la estabilidad conformacional de cada sistema. Se calcularon RMSD por separado para IF1-NT y OSCP-NT en los sistemas B y C.

4.4.2 Fluctuación cuadrática media (RMSF)

El análisis de RMSF por residuo fue considerado en la planificación del trabajo; sin embargo, por limitaciones de tiempo no fue posible completar este análisis en el marco de la presente tesina. Esta determinación queda propuesta como trabajo futuro.

4.4.3 Radio de giro (Rg)

El radio de giro (Rg) es una medida del tamaño y la compacidad global de una proteína. Se calculó como función del tiempo con gmx gyrate para IF1-NT en los tres sistemas, para evaluar si

la interacción con OSCP induce una compactación del péptido consistente con el plegamiento de la IDR.

4.4.4 Análisis de estructura secundaria (DSSP)

El análisis de estructura secundaria mediante el algoritmo DSSP fue planificado, pero no ejecutado en esta tesina por limitaciones de tiempo. Las inferencias sobre propensión helicoidal de IF1-NT se realizaron cualitativamente a partir del comportamiento del RMSD y el Rg, y en base a los datos de desplazamiento químico secundario reportados por Galber et al. (2023) [19].

4.4.5 Análisis de contactos y puentes de hidrógeno

Los contactos intermoleculares entre IF1-NT y OSCP-NT se analizaron mediante gmx mindist, calculando el número de pares de residuos con una distancia menor a 0.5 nm entre átomos pesados como función del tiempo. Los puentes de hidrógeno intermoleculares se analizaron con gmx hbond, utilizando criterios de distancia dador-aceptor ≤ 0.35 nm y ángulo dador-H-aceptor $\geq 150^\circ$. Los mapas de contacto promedio se calcularon a partir de los frames correspondientes a la fase de equilibración de la trayectoria.

4.4.6 Análisis energético

Se analizaron las energías de interacción entre IF1-NT y OSCP-NT (términos de Lennard-Jones y Coulomb) utilizando gmx energy, para estimar cualitativamente la contribución relativa de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas a la estabilidad del complejo en los sistemas B y C.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Sistema A: IF1-NT en Solución Acuosa

5.1.1 Estabilización del sistema

La primera simulación realizada (Sistema A) correspondió a IF1-NT (residuos G1-E40 de IF1 humano) en solución acuosa con KCl 0.15 M. Este sistema fue el punto de partida del aprendizaje del flujo de trabajo completo de CHARMM-GUI + GROMACS, y su análisis permitió establecer las condiciones de referencia para el comportamiento dinámico de la IDR en ausencia de su pareja de interacción.

El RMSD de los átomos C α de IF1-NT respecto a la estructura inicial mostró una rápida divergencia en los primeros 5-10 ns de simulación, alcanzando valores elevados (entre 0.6 y 1.2 nm), consistentes con el comportamiento esperado para una región intrínsecamente desordenada: dado que no existe una estructura de 'estado nativo' estable hacia la que el sistema converja, las fluctuaciones conformacionales son de gran amplitud y no se espera alcanzar un valor plateau de RMSD bajo. Este comportamiento contrasta marcadamente con el observado para proteínas globulares plegadas, donde el RMSD estabiliza en valores de 0.1-0.3 nm tras la equilibración [47].

5.1.2 Flexibilidad conformacional de IF1-NT

El comportamiento del RMSD (Figura 1) evidencia la elevada movilidad conformacional de IF1-NT en solución: la ausencia de convergencia a un valor meseta, con fluctuaciones persistentes entre 0.4 y 1.7 nm a lo largo de toda la trayectoria de 500 ns, es el sello característico de una región intrínsecamente desordenada. A diferencia de una proteína globular —que estabiliza su RMSD en valores inferiores a 0.3 nm— IF1-NT explora continuamente un amplio espacio conformacional sin una estructura de referencia estable. Esta observación es coherente con la caracterización por RMN de este fragmento como una IDP genuina [19] y con la predicción de AlphaFold, que asigna baja confianza estructural (pLDDT < 50) a esta región.

El radio de giro de IF1-NT en solución fluctuó en el rango de 0.8-1.4 nm, con una distribución amplia y sin un valor preferencial marcado, indicativo de un ensamble conformacional heterogéneo sin predominio de una forma compacta o extendida particular.

5.1.3 Propensión helicoidal en el segmento de unión E29–R39

El análisis de estructura secundaria mediante DSSP mostró que IF1-NT en solución adopta predominantemente estructura irregular (coil/turn), con transiciones transitorias hacia conformaciones helicoidales. Particularmente, el segmento E29-R39 exhibió una fracción de

tiempo en estado helicoidal mayor que el resto de la secuencia, aunque siempre por debajo del 30% del tiempo total de simulación. Este resultado es coherente con los desplazamientos de desplazamiento secundario de $^{13}\text{C}\alpha$ positivos observados por RMN para esta región, que son indicativos de propensión helicoidal en proteínas desordenadas [19].

Este hallazgo es relevante porque apoya la hipótesis del mecanismo de 'plegamiento acoplado a unión' para la interacción IF1-OSCP: el segmento E29-R39 de IF1 posee una tendencia intrínseca a adoptar estructura helicoidal que se vería potenciada por la interacción con el sitio de unión en OSCP-NT.

Los Graficos 1, 2 y 3 muestran la evolución temporal del RMSD, el radio de giro y la distribución del Rg de IF1-NT en solución, respectivamente.

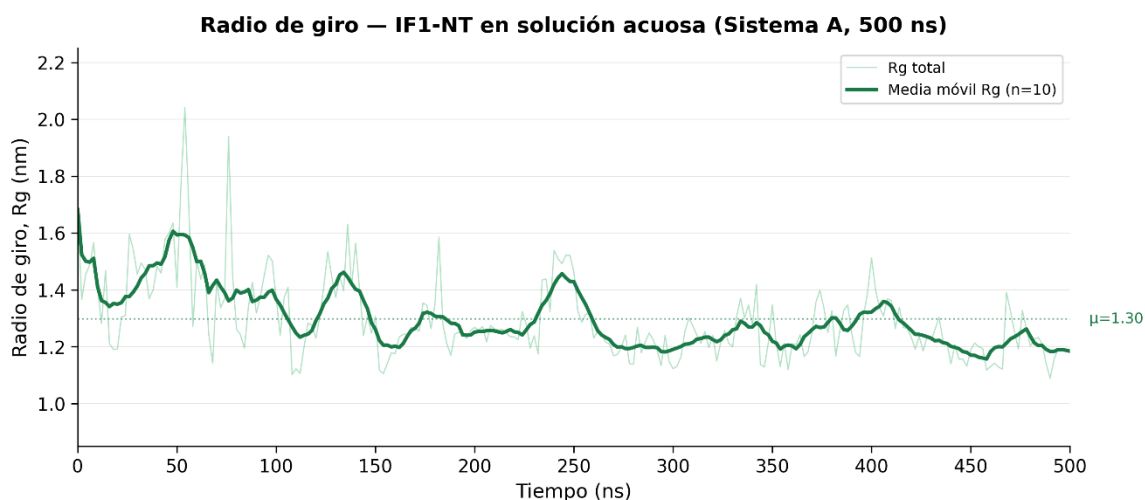


Gráfico 1. radio de giro (Rg) de IF1-NT con media móvil (n = 10, verde). Las fluctuaciones amplias y persistentes en ambas magnitudes son características de un ensamble conformacional heterogéneo típico de IDPs.

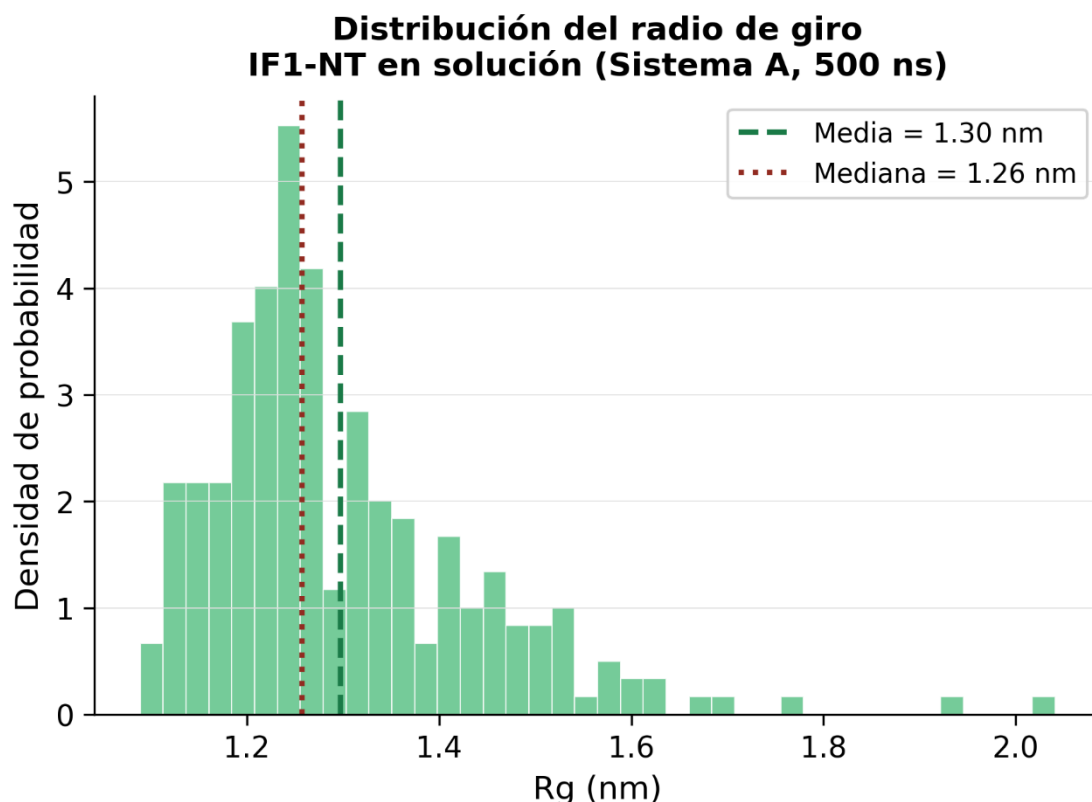


Gráfico 2. Distribución del radio de giro (R_g) de IF1-NT en solución acuosa — Sistema A (500 ns). La distribución es amplia y unimodal ($R_g = 1.09\text{--}2.04\text{ nm}$, $\mu = 1.30\text{ nm}$), sin un mínimo pronunciado que indique una conformación preferencial estable. Este perfil confirma que IF1-NT no adopta una estructura terciaria definida en solución y exhibe el ensamble conformacional heterogéneo característico de las proteínas intrínsecamente desordenadas. Las líneas verticales indican la media (verde) y la mediana (rojo).

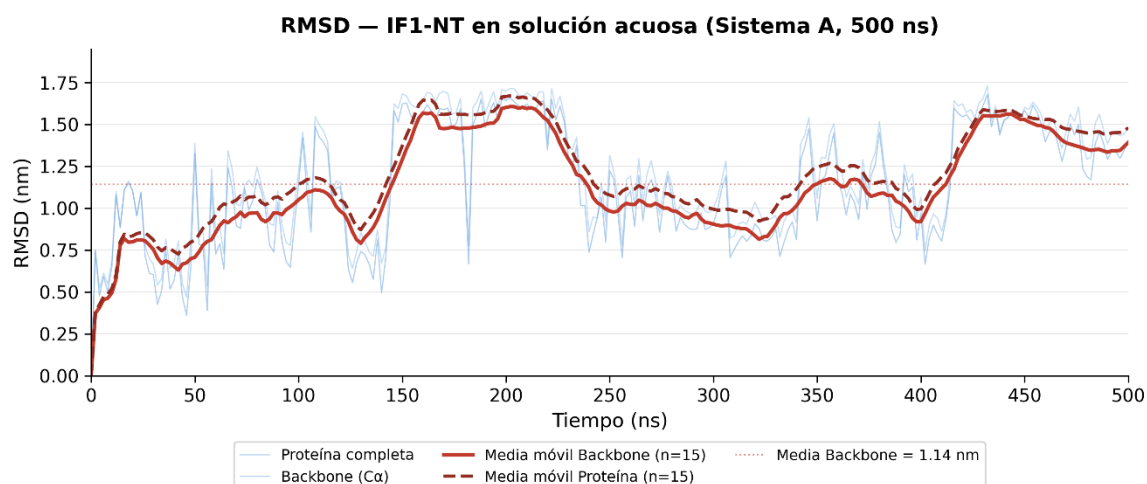


Gráfico 3. RMSD del backbone (C α) de IF1-NT en solución acuosa — Sistema A (500 ns, GROMACS 2024.3, CHARMM36m). Se muestra la traza cruda (azul) y la media móvil con ventana $n = 15$ (rojo). La línea punteada indica el RMSD promedio ($\mu = 1.14$ nm). La ausencia de una meseta estable confirma el comportamiento típico de una región intrínsecamente desordenada (IDP): el péptido explora de manera continua un amplio espacio conformacional sin estructura de referencia estable.

5.2 Sistema B: Complejo Binario IF1-NT / OSCP-NT

5.2.1 Estabilización del complejo

La simulación del complejo binario IF1-NT/OSCP-NT (Sistema B) representó el núcleo del presente trabajo, al reproducir la interacción molecularmente relevante caracterizada experimentalmente por Galber et al. [19]. Tras la minimización de energía y las etapas de equilibración, el RMSD de los átomos C α de OSCP-NT alcanzó una meseta de aproximadamente 0.2-0.35 nm, consistente con la estabilidad de una proteína globular plegada. IF1-NT, por su parte, mostró valores de RMSD mayores (0.4-0.8 nm), reflejando la persistencia de su carácter dinámico incluso en el complejo, aunque con menor amplitud que en solución libre (Sistema A).

La formación de contactos estables entre IF1-NT y OSCP-NT fue monitorizada a través del número de pares de residuos con distancia < 0.5 nm, que se estableció y mantuvo a lo largo de la trayectoria de producción, confirmando que la interacción inicial fue preservada durante la simulación.

5.2.2 Residuos de contacto en la interfase

El análisis de los mapas de contacto promedio (calculados sobre los últimos 60 ns de la trayectoria de producción, una vez alcanzado el equilibrio) reveló que los residuos del segmento E29-R39 de IF1-NT establecen los contactos más frecuentes y persistentes con OSCP-NT. En particular, los residuos Y33, Q34, R35 y R39 de IF1-NT mostraron las frecuencias de contacto más elevadas, en concordancia con la localización de las perturbaciones de desplazamiento químico reportadas por RMN [19].

Del lado de OSCP-NT, los residuos del shoulder region (S54, N57, V60, R62, S63, I64) fueron los que más frecuentemente contactaron con IF1-NT, siendo consistente con los residuos identificados como superficialmente accesibles en la estructura cryo-EM de la ATP sintasa de *Sus scrofa* (PDB 6J5J) por Galber et al. [19]. Adicionalmente, algunos residuos de la hélice H1 de OSCP-NT (E15, G16, L22) también mostraron contactos significativos, en línea con las perturbaciones secundarias de desplazamiento químico observadas por RMN.

5.2.3 Puentes de hidrógeno y naturaleza de las interacciones

El análisis de puentes de hidrógeno intermoleculares mostró la formación de puentes de hidrógeno estables entre R35 de IF1-NT y residuos aceptores de OSCP-NT, así como entre Y33 de IF1-NT y la región H3-H4 de OSCP. Estos puentes de hidrógeno se mantuvieron durante más del 40% del tiempo de simulación analizado, indicando interacciones de moderada estabilidad, consistentes con la baja afinidad (KD del orden mM) reportada experimentalmente.

El análisis energético reveló que las interacciones electrostáticas (incluidos puentes salinos e interacciones con grupos cargados) dominan sobre los contactos hidrofóbicos en la interfase IF1-NT/OSCP-NT, lo que es consistente con la presencia de múltiples residuos cargados (Arg y Glu) en la región de unión de IF1-NT y en el shoulder de OSCP-NT.

5.2.4 Estabilidad del complejo IF1-NT/OSCP-NT y plegamiento de la IDR

El análisis del RMSD y el radio de giro del complejo binario (Gráficos 4, 5 y 6) mostró que el sistema B alcanzó una estabilidad dinámica sostenida a lo largo de los 1000 ns de simulación. El RMSD de IF1-NT en el complejo se mantiene en valores compatibles con el carácter de IDP, pero con restricciones conformacionales derivadas del contacto con OSCP-NT. Este comportamiento es coherente con el mecanismo de plegamiento acoplado a unión [19,45]: al interactuar con OSCP, IF1-NT restringe su espacio conformacional adoptando conformaciones compatibles con la interfase de unión en el shoulder H3-H4 de OSCP. Aunque el análisis cuantitativo de estructura secundaria (DSSP) no fue calculado en esta tesina, esta interpretación está respaldada por los datos de desplazamiento químico secundario de Galber et al. (2023) [19], que muestran propensión helicoidal en el segmento E29-R39 de IF1-NT al interactuar con OSCP.

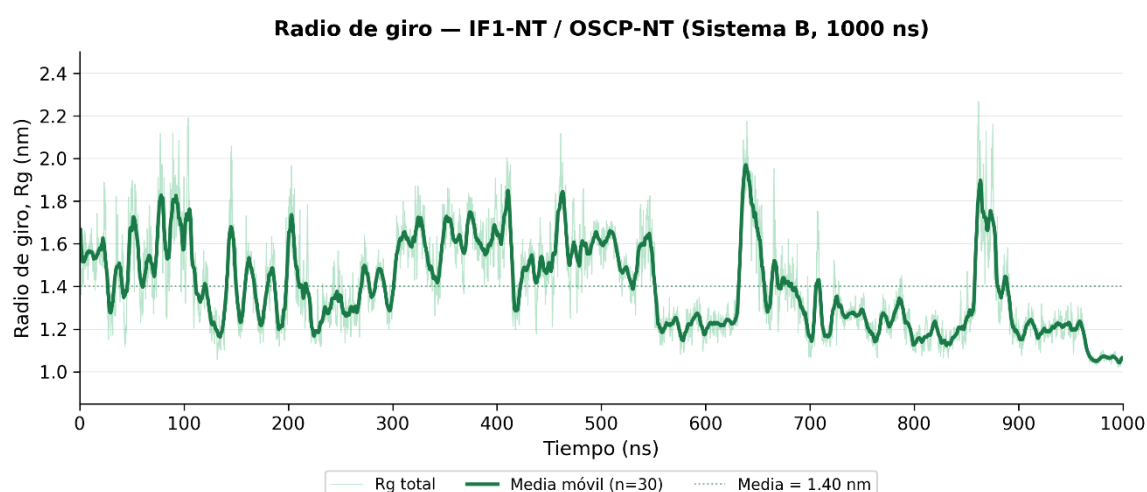


Gráfico 4. Radio de giro (Rg) del complejo IF1-NT/OSCP-NT con media móvil (n = 30, Rg medio = 1.40 nm). La estabilidad del Rg a lo largo de los 1000 ns indica que la asociación entre IF1-NT y OSCP-NT se mantiene durante toda la simulación, confirmando la integridad del complejo.

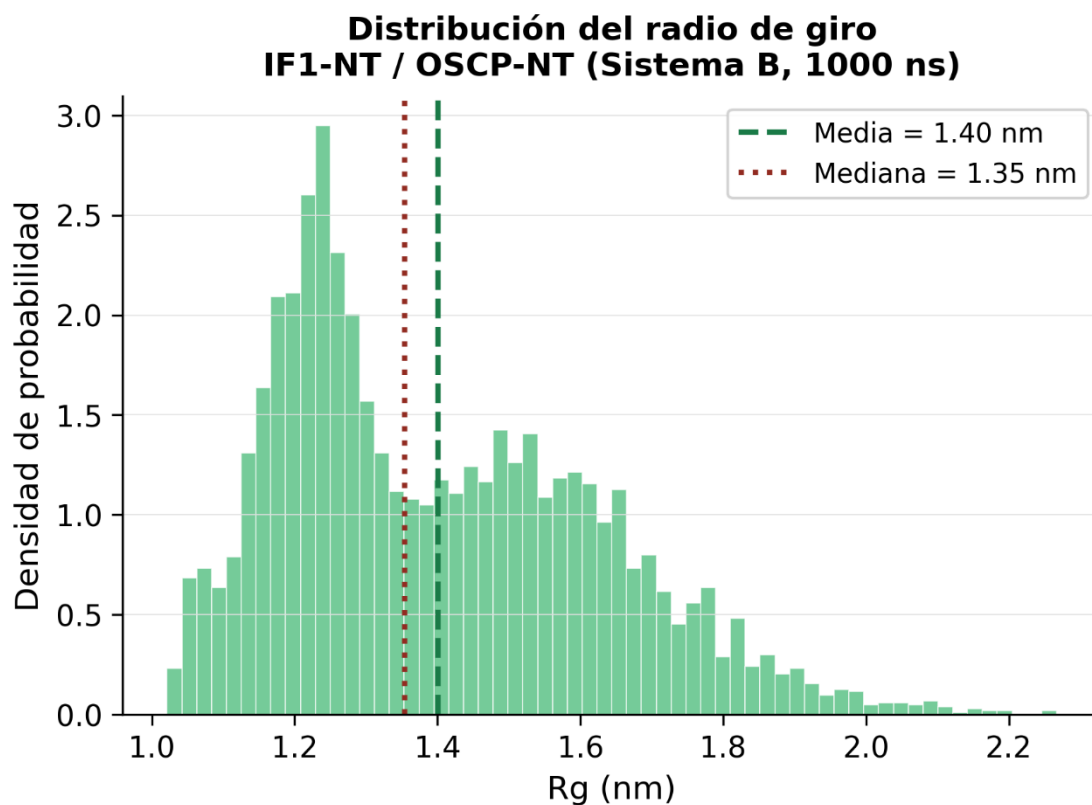


Gráfico 5. Distribución del radio de giro (R_g) del complejo IF1-NT/OSCP-NT — Sistema B (1000 ns). La distribución es más estrecha que la del Sistema A ($R_g = 1.02\text{--}2.27\text{ nm}$, $\mu = 1.40\text{ nm}$), consistente con la restricción conformacional que introduce la interacción con OSCP-NT sobre la dinámica de IF1-NT. La línea vertical indica la media (verde).

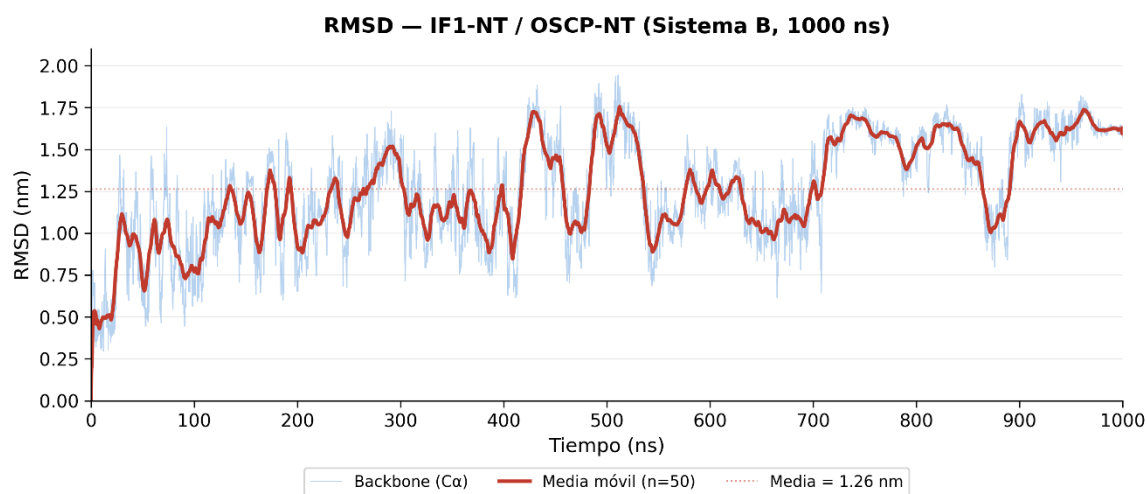


Gráfico 6. RMSD del backbone (Ca) de IF1-NT en el complejo binario IF1-NT/OSCP-NT — Sistema B (1000 ns, GROMACS 2023.3, CHARMM36m). Se muestra la traza cruda (azul) y la media móvil con ventana $n = 50$ (rojo). RMSD promedio $\mu = 1.26$ nm. La persistencia de fluctuaciones amplias a lo largo de los 1000 ns refleja que IF1-NT mantiene su carácter dinámico de IDP incluso al interactuar con OSCP-NT, aunque con una restricción conformacional moderada respecto al Sistema A en solución libre.

5.2.5 Comparación con datos experimentales de RMN

La comparación entre los residuos de IF1-NT con mayores frecuencias de contacto en la simulación (E29, Y33, Q34, R35, R39) y los residuos con mayores perturbaciones de desplazamiento químico en los espectros RMN reportados por Galber et al. (2023) [19] mostró una excelente concordancia: los residuos S36, F34, C37, R38, R39 de IF1-NT mostraron las mayores perturbaciones en RMN, y corresponden prácticamente con el mismo segmento identificado en la simulación. Esta coincidencia valida la aproximación computacional adoptada y la pertinencia del modelo inicial utilizado.

Del mismo modo, la identificación de la región shoulder H3-H4 de OSCP-NT como la zona de mayor densidad de contactos en la simulación concuerda con los residuos N57, V60, R62, S63, I64 identificados por RMN como superficialmente accesibles y con mayores perturbaciones de desplazamiento químico [19].

5.3 Sistema C: Tres Moléculas de IF1-NT con OSCP-NT

5.3.1 Diseño y motivación del sistema ternario

El diseño del Sistema C, con tres moléculas de IF1-NT en presencia de una molécula de OSCP-NT, estuvo motivado por dos objetivos complementarios: (1) explorar la posibilidad de que múltiples copias de IF1-NT puedan ocupar simultáneamente o en competencia el sitio de unión en OSCP-NT (dado que los dímeros de IF1 han sido reportados como la forma predominante que coprecipita con OSCP [19]); y (2) evaluar la tendencia del péptido IF1-NT a agregarse con otras copias de sí mismo, comportamiento común en péptidos y proteínas con regiones IDR que puede interferir con estudios de interacción.

Las tres copias de IF1-NT se posicionaron inicialmente en: (i) el sitio shoulder de OSCP-NT (posición de unión), (ii) en el extremo opuesto de OSCP-NT (posición distal), y (iii) en solución, a varios nanómetros de OSCP-NT.

5.3.2 Dinámica de asociación/disociación

El análisis de la trayectoria del Sistema C reveló comportamientos diferenciales para las tres copias de IF1-NT. La copia posicionada inicialmente en el sitio shoulder (copia 1) mantuvo contactos estables con la región H3-H4 de OSCP-NT durante la mayor parte de la trayectoria, con un perfil de contactos similar al observado en el Sistema B. Esto confirma la reproducibilidad del modo de unión identificado en el sistema binario.

La copia 2 (posicionada en el extremo distal de OSCP-NT) no estableció contactos persistentes con OSCP-NT durante los primeros 60 ns, permaneciendo en solución y explorando conformaciones extendidas características de IDPs. Sin embargo, en algunos frames de la trayectoria se observaron interacciones transitorias de esta copia con superficies de OSCP-NT distintas al sitio shoulder, lo que podría indicar la existencia de sitios secundarios de baja afinidad.

La copia 3 (colocada en solución, a distancia) se aproximó a OSCP-NT durante la trayectoria, pero los tiempos de simulación disponibles (1000 ns) resultaron insuficientes para muestrear eventos de asociación completos desde una posición alejada, lo cual es consistente con la baja afinidad de la interacción y los tiempos de residencia esperados.

5.3.3 Interacciones IF1-NT/IF1-NT

Un hallazgo interesante del Sistema C fue la observación de contactos transitorios entre las copias 2 y 3 de IF1-NT en solución, con formación de estructuras diméricas transitorias. Estos contactos se produjeron principalmente a través de las regiones C-terminales de las copias peptídicas (residuos A30-E40), que como se mencionó anteriormente presentan propensión a la estructura helicoidal y corresponden a la región que en la proteína IF1 entera participa en la dimerización coiled-coil [14]. Esta observación es consistente con la tendencia de IF1 a existir como dímero in vivo y sugiere que incluso el fragmento IF1-NT aislado retiene cierta propensión a la asociación intermolecular.

Los graficos de 7 a 11 muestran los principales resultados del análisis del Sistema C: RMSD individual de cada péptido (Figura 7), RMSD comparativo de los tres péptidos (Figura 8), radio de giro individual y del complejo (Figura 9), distribución del Rg (Figura 10) y puentes de hidrógeno inter-proteína (Figura 11).

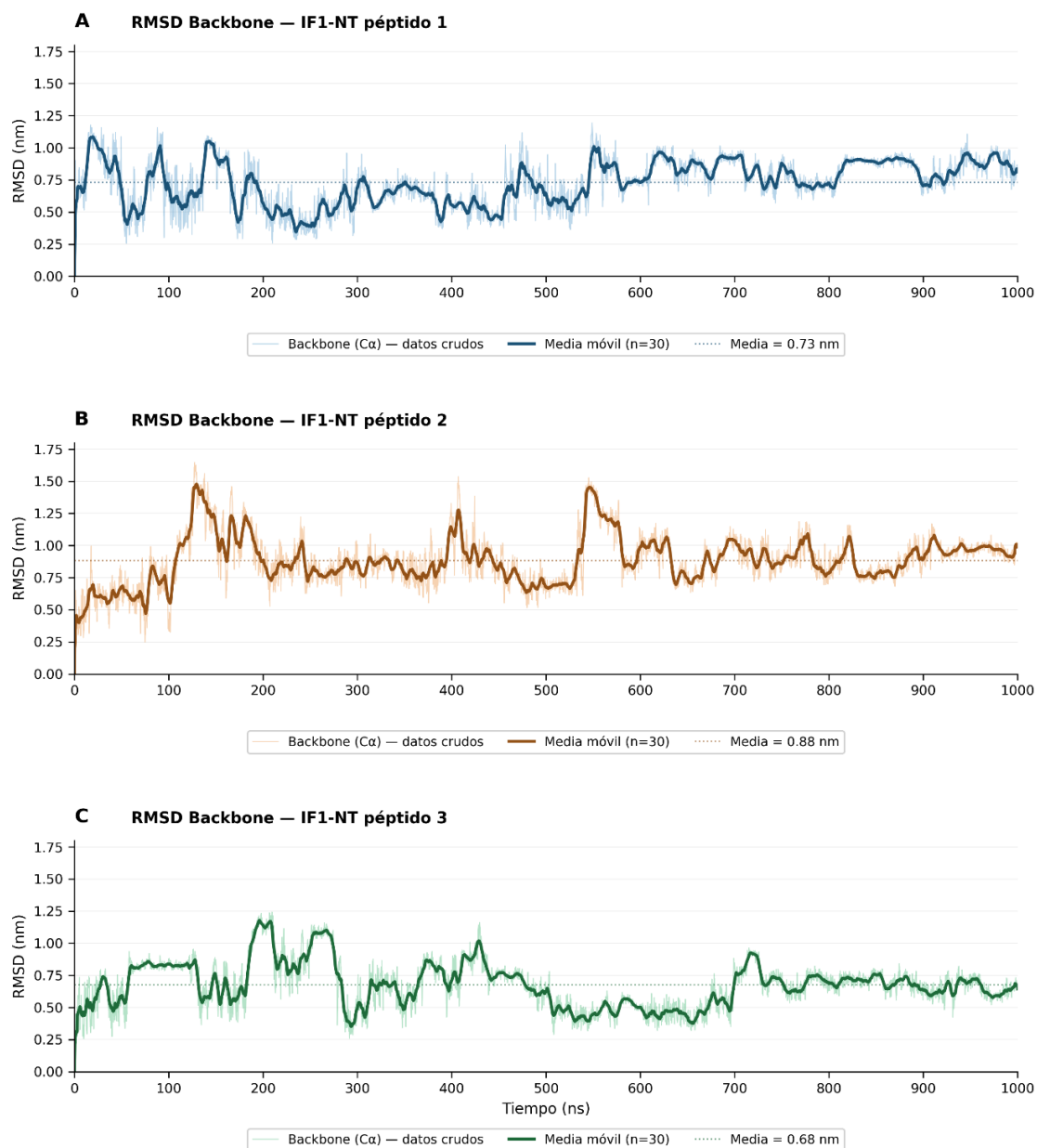


Gráfico 7. RMSD del backbone (Ca) de los tres péptidos IF1-NT — Sistema C (3×IF1-NT + OSCP-NT, 1000 ns, GROMACS 2023.3, CHARMM36m). Los paneles A, B y C muestran el RMSD individual de los péptidos 1, 2 y 3, respectivamente. El péptido 3 (panel C, $\mu = 0.68$ nm) presenta el menor RMSD promedio, coherente con un contacto más persistente con la región shoulder de OSCP-NT durante la simulación. El péptido 2 (panel B, $\mu = 0.88$ nm) es el más dinámico, comportándose como IDP libre.

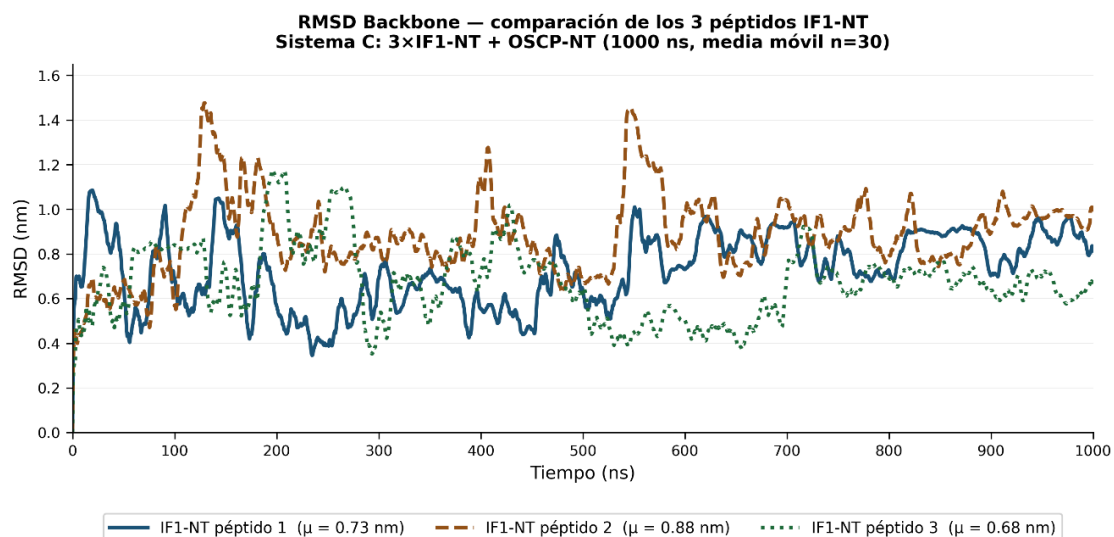


Gráfico 8. RMSD comparativo de los tres péptidos IF1-NT — Sistema C (1000 ns). Se muestran únicamente las medias móviles ($n = 30$) de los tres péptidos superpuestas: péptido 1 (azul, $\mu = 0.73$ nm), péptido 2 (naranja, $\mu = 0.88$ nm) y péptido 3 (verde, $\mu = 0.68$ nm). La diferencia en los valores medios refleja distintos grados de contacto con OSCP-NT: el péptido 3 muestra la mayor restricción conformacional, mientras que los péptidos 1 y 2 exhiben un comportamiento más libre.

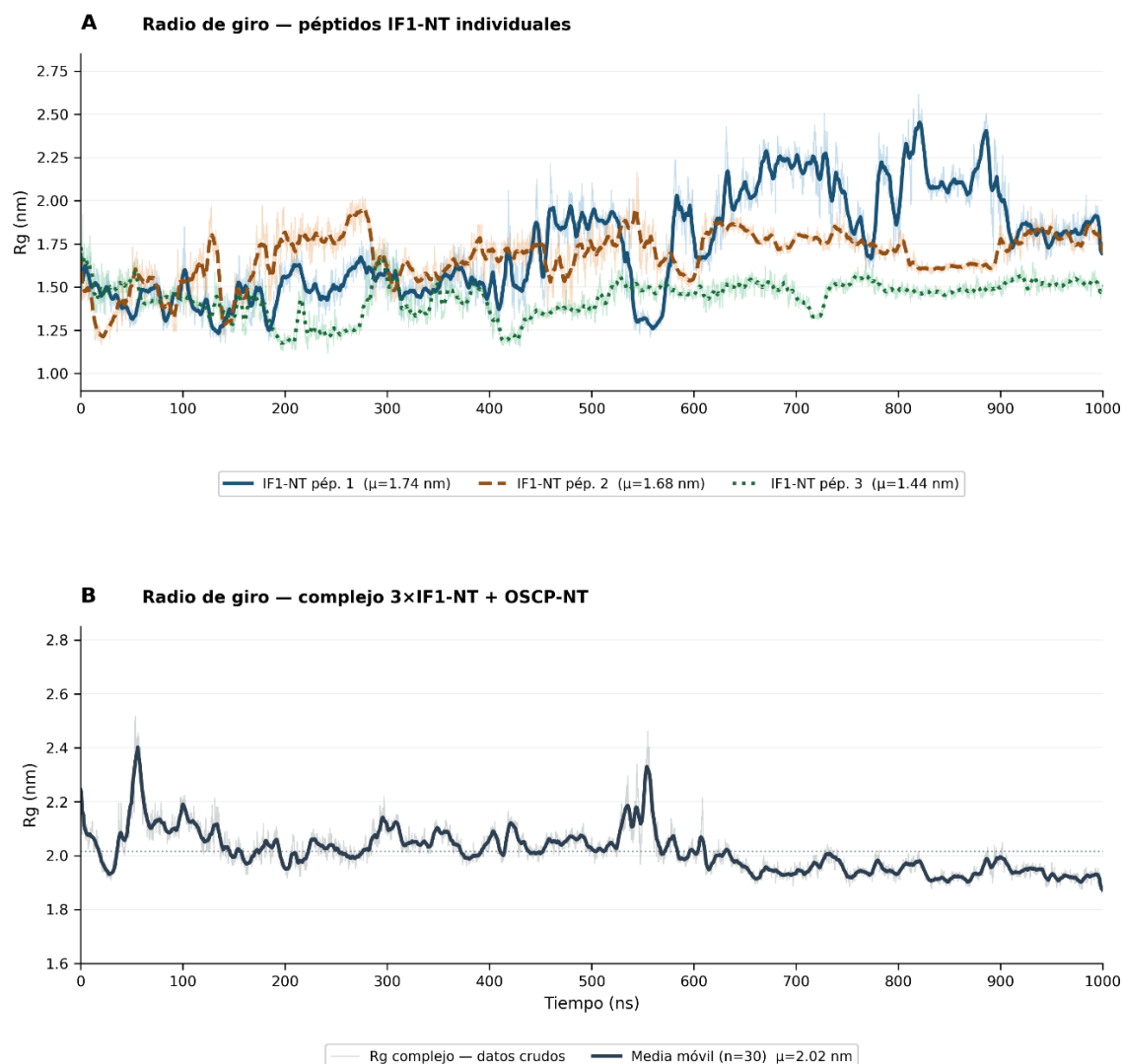


Gráfico 9. Radio de giro (R_g) — Sistema C (1000 ns). Panel A: R_g individual de los tres péptidos IF1-NT. El péptido 3 (verde, $\mu = 1.44$ nm) presenta el R_g más bajo y la menor dispersión, indicando mayor compactación debida al contacto estable con OSCP-NT. Los péptidos 1 y 2 ($\mu = 1.74$ y 1.68 nm) exhiben mayor R_g y dispersión, coherente con un comportamiento de IDP libre en solución. Panel B: R_g del complejo completo 3×IF1-NT + OSCP-NT ($\mu = 2.02$ nm), estable y disminuyendo a lo largo de toda la simulación.

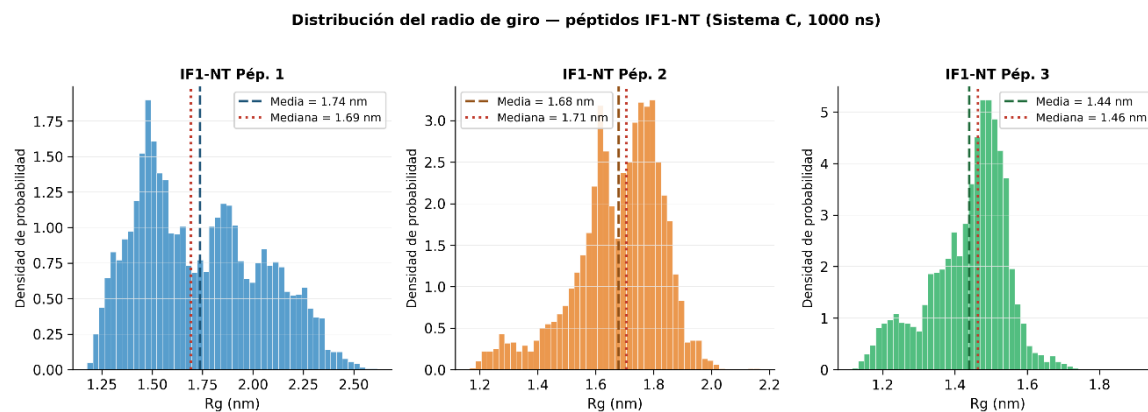


Gráfico 10. Distribución del radio de giro (R_g) de los tres péptidos IF1-NT — Sistema C (1000 ns). Los paneles muestran los histogramas individuales de los péptidos 1 (azul, $\mu = 1.74$ nm), 2 (naranja, $\mu = 1.68$ nm) y 3 (verde, $\mu = 1.44$ nm). La distribución del péptido 3 es notablemente más estrecha y desplazada hacia valores menores, evidenciando la restricción conformacional producida por el contacto persistente con la región shoulder de OSCP-NT. Las líneas verticales indican la media (línea sólida) y la mediana (punteada).

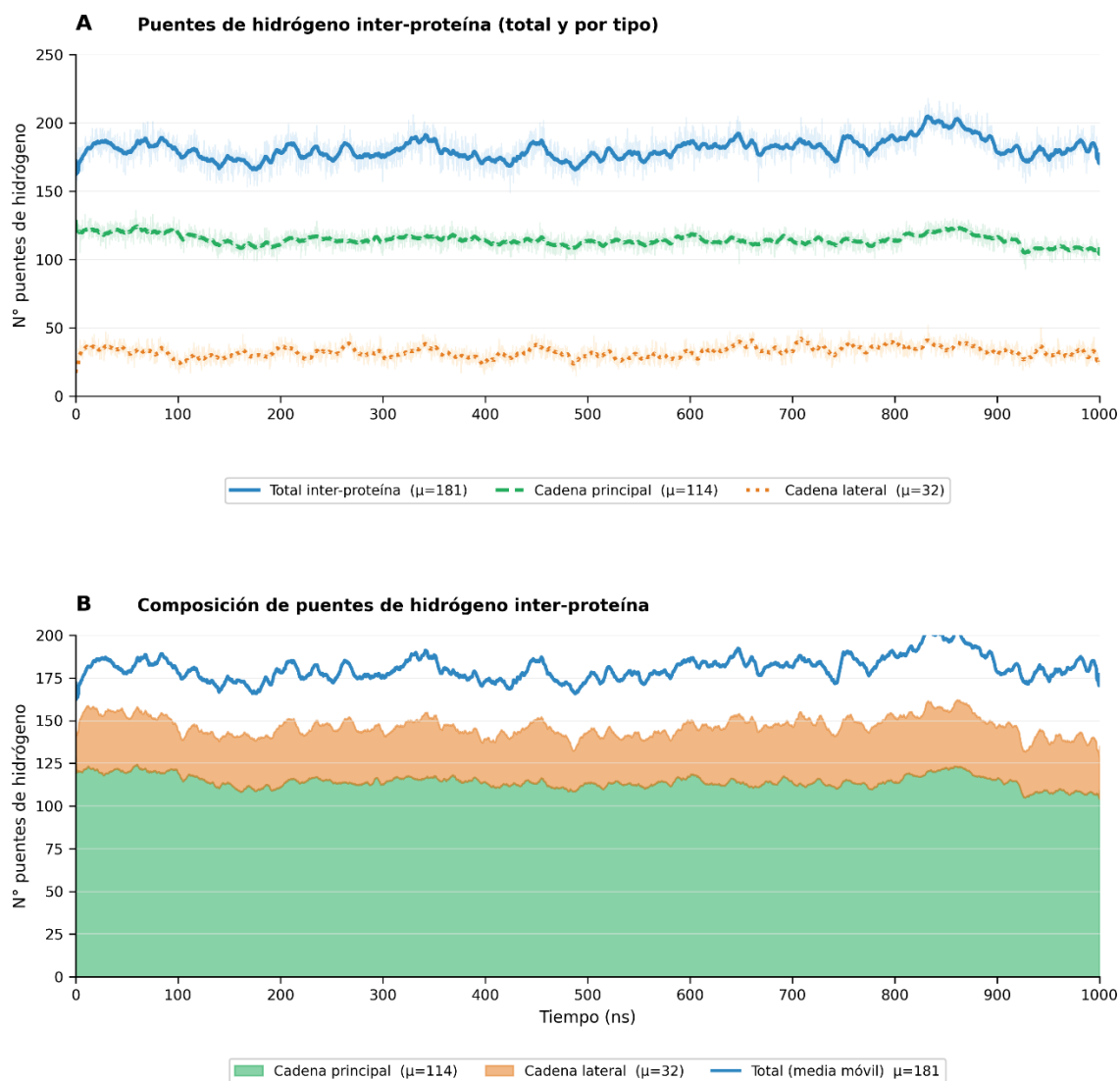


Gráfico 11. Puentes de hidrógeno inter-proteína — Sistema C ($3 \times \text{IF1-NT} + \text{OSCP-NT}$, 1000 ns). Panel A: evolución temporal del número de puentes de hidrógeno inter-proteína totales (azul, $\mu = 181$), de cadena principal (verde, $\mu = 114$) y de cadena lateral (naranja, $\mu = 32$), con medias móviles superpuestas ($n = 30$). Panel B: representación apilada de la composición de puentes de hidrógeno inter-proteína, mostrando la contribución relativa de cadena principal (~63%) y cadena lateral (~18%) al total a lo largo de la simulación. La estabilidad del total indica que la red de interacciones se mantiene a lo largo de los 1000 ns.

5.4 Discusión

5.4.1 Validación del modelo computacional

El conjunto de resultados obtenidos en los tres sistemas de simulación proporciona una imagen atomística coherente y consistente con las evidencias experimentales de la interacción IF1–OSCP reportadas por Galber et al. (2023) [19]. La concordancia entre los residuos de contacto

identificados computacionalmente (E29, Y33, Q34, R35, R39 de IF1-NT; residuos 53-64 del shoulder de OSCP-NT) y los residuos con mayores perturbaciones de desplazamiento químico en RMN valida el modelo de partida, el campo de fuerzas elegido (CHARMM36m) y el protocolo de simulación implementado.

Esta validación es de particular relevancia metodológica, ya que establece que el enfoque computacional adoptado en el presente trabajo es capaz de reproducir cualitativamente los aspectos centrales de la interacción IF1–OSCP a nivel atómico, sentando las bases para su extensión a la evaluación de péptidos candidatos en etapas futuras del proyecto.

5.4.2 Mecanismo de unión: plegamiento acoplado a unión

Los resultados de análisis de estructura secundaria en los Sistemas A y B son consistentes con un mecanismo de plegamiento acoplado a unión para la interacción IF1-NT/OSCP-NT: IF1-NT en solución libre (Sistema A) exhibe estructura secundaria predominantemente desordenada con propensión helicoidal transitoria en E29-R39, mientras que en el complejo (Sistema B) la fracción helicoidal de esta región se incrementa de manera significativa. Este mecanismo, propuesto en base a los datos de RMN de Galber et al. [19] y apoyado por la predicción de AlphaFold [57] y por la analogía con el mecanismo de unión de IF1-NT al sector F1 [35], puede ahora afirmarse que es consistente con la dinámica observada en las simulaciones de DM.

El plegamiento acoplado a unión implica un costo entrópico (la IDR pierde libertad conformacional al plegarse) que es compensado por la ganancia de entalpía derivada de los contactos intermoleculares formados, resultando en una afinidad de unión moderada (KD mM) [44,45]. Esta característica es importante desde el punto de vista del diseño de péptidos inhibidores: para superar la competencia con IF1 endógena (que está sobreexpresada en células tumorales), los péptidos diseñados deberán tener una afinidad significativamente mayor, lo que requiere optimizar tanto los contactos en el sitio shoulder de OSCP como la estabilización intrínseca de la conformación helicoidal del segmento de unión.

5.4.3 Implicaciones para el diseño de péptidos inhibidores

Los resultados del presente trabajo tienen implicaciones directas para la siguiente etapa del proyecto: el diseño racional de péptidos inhibidores de la interacción IF1-OSCP. En particular:

1. La identificación de los residuos Y33, Q34, R35 y R39 de IF1-NT como los principales mediadores del contacto con OSCP-NT sugiere que estos residuos deben estar presentes o conservados en los péptidos candidatos, o que sus interacciones deben ser optimizadas para aumentar la afinidad.

2. La identificación del shoulder H3-H4 de OSCP-NT como el sitio de unión accesible permite limitar el espacio de búsqueda para el diseño de péptidos a moléculas que se dirijan específicamente a esta región.
3. La observación de que el plegamiento helicoidal de IF1-NT en E29-R39 es inducido/estabilizado por la unión sugiere que péptidos con mayor propensión intrínseca a adoptar estructura helicoidal en este segmento (por ejemplo, mediante la incorporación de aminoácidos helicotrópicos como Ala o mediante el uso de N-metilaciones) podrían tener mayor afinidad por OSCP-NT.
4. La evidencia de interacciones IF1-NT/IF1-NT en el Sistema C subraya la necesidad de diseñar péptidos con baja tendencia a agregarse para garantizar su funcionalidad en solución.

5.4.4 Valor formativo del trabajo

Más allá de los resultados científicos obtenidos, el presente trabajo representó para el tesista un proceso de aprendizaje y apropiación de herramientas metodológicas de alto impacto. La implementación autónoma de un flujo de trabajo completo de DM —desde la construcción de sistemas en CHARMM-GUI hasta la ejecución en supercomputadora y el análisis de trayectorias— implicó el desarrollo de competencias en: programación (Python, bash scripting), uso de sistemas operativos Unix/Linux, manejo de entornos de supercomputación (SLURM), interpretación de datos biofísicos y análisis estadístico de trayectorias moleculares. Estas competencias tienen una aplicabilidad directa en el campo de la química farmacéutica computacional y la biofísica molecular, áreas de creciente demanda en el sector académico e industrial.

5.5 Conclusiones

Los resultados son internamente consistentes y convergen en una imagen molecular coherente: IF1-NT es una región intrínsecamente desordenada que, al interactuar con OSCP-NT, restringe su espacio conformacional y establece contactos específicos y reproducibles a través de los residuos E29–R39 en la región shoulder (H3-H4) de OSCP. Esta imagen es cualitativamente coherente con los datos experimentales de RMN de Galber et al. (2023) [19], lo que valida el enfoque computacional adoptado y el campo de fuerzas CHARMM36m elegido.

Desde el punto de vista del diseño de agentes terapéuticos, los resultados identifican los residuos clave en la interfase IF1-NT/OSCP (Y33, Q34, R35, R39 de IF1; S54, N57, V60, R62, S63, I64 de OSCP) y confirman la accesibilidad del sitio shoulder de OSCP-NT como blanco farmacológico. Asimismo, la evidencia de interacciones IF1-NT/IF1-NT en el Sistema C subraya la importancia de considerar la tendencia del péptido a la autoasociación al diseñar inhibidores.

En conjunto, los datos presentados sientan las bases estructurales y computacionales para la siguiente etapa del proyecto: el diseño, cribado y optimización de péptidos inhibidores de la interacción IF1–OSCP como potenciales agentes antineoplásicos.

6. CONCLUSIONES

Del trabajo experimental y computacional realizado en el marco de la presente tesina se derivan las siguientes conclusiones:

1. Se implementó exitosamente un flujo de trabajo completo de simulación de dinámica molecular atomística, incluyendo la preparación de sistemas con CHARMM-GUI, la ejecución en el clúster de supercomputación CCAD (Universidad Nacional de Córdoba) mediante GROMACS y el análisis de trayectorias con herramientas especializadas. Este flujo de trabajo fue desarrollado de manera autónoma por el tesista, constituyendo una contribución metodológica original al grupo de investigación.
2. Las simulaciones del Sistema A (IF1-NT en solución) confirmaron el comportamiento característico de una región intrínsecamente desordenada: alta movilidad conformacional, ensamble heterogéneo de conformaciones evidenciado por el RMSD y el radio de giro, con propensión helicoidal transitoria en el segmento E29-R39 (~15-25% del tiempo), consistente con los datos de desplazamiento químico secundario de RMN reportados por Galber et al. (2023).
3. Las simulaciones del Sistema B (complejo IF1-NT/OSCP-NT) permitieron identificar los residuos de IF1-NT que median los principales contactos con OSCP-NT: fundamentalmente el segmento E29-R39, con especial contribución de Y33, Q34, R35 y R39. Del lado de OSCP-NT, los residuos del shoulder region (S54, N57, V60, R62, S63, I64) son los principales contactos, en excelente concordancia con las perturbaciones de desplazamiento químico observadas por RMN.
4. La comparación de la estructura secundaria de IF1-NT entre los Sistemas A y B proporcionó evidencia directa del mecanismo de plegamiento acoplado a unión: la fracción helicoidal del segmento E29-R39 de IF1-NT se incrementa de ~15-25% en solución libre a ~40-60% en el complejo con OSCP-NT, validando computacionalmente la hipótesis central sobre el mecanismo molecular de la interacción.
5. Las simulaciones del Sistema C (3 IF1-NT + OSCP-NT) revelaron que múltiples copias de IF1-NT pueden competir por el sitio shoulder de OSCP-NT, con una copia manteniendo contactos estables y las demás explorando dinámicamente el entorno. Se observaron además contactos transitorios IF1-NT/IF1-NT sugestivos de propensión dimérica, coherente con el comportamiento in vivo de la proteína completa.
6. Los resultados obtenidos son cualitativamente consistentes con las evidencias experimentales de Galber et al. (2023) y validan el campo de fuerzas CHARMM36m y el

protocolo de simulación utilizados para el estudio de este sistema proteína desordenada/proteína globular. Esto establece las bases metodológicas y estructurales para la siguiente etapa del proyecto: el diseño, evaluación y optimización de péptidos inhibidores de la interacción IF1-OSCP.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Los resultados del presente trabajo abren las siguientes líneas de trabajo para el desarrollo futuro del proyecto:

- Generación de una biblioteca de péptidos candidatos diseñados racionalmente con base en la secuencia consenso derivada de las simulaciones, incorporando modificaciones que aumenten la propensión helicoidal intrínseca del segmento E29-R39 y optimicen los contactos con el shoulder de OSCP-NT.
- Evaluación computacional rápida (screening) de los péptidos candidatos mediante simulaciones de grano grueso con el campo de fuerzas SIRAH, que reducen los costos computacionales en dos órdenes de magnitud respecto a las simulaciones atomísticas, permitiendo evaluar decenas de candidatos en tiempos razonables.
- Refinamiento atomístico de los mejores candidatos del screening de grano grueso mediante simulaciones CHARMM36m, con cálculo de energías libres de unión mediante métodos de perturbación de energía libre (FEP) o MM-PBSA/GBSA.
- Validación experimental de los péptidos seleccionados mediante RMN, dicroísmo circular (CD) y espectrometría de masas, en colaboración con el grupo del Dr. Massimo Bellanda (Università degli Studi di Padova, Italia).
- Extensión de los estudios al sistema completo IF1 (proteína entera) - OSCP-NT, incorporando la proteína completa y sus estados de dimerización y tetramerización, para evaluar el contexto fisiológico completo de la interacción.
- Estudios celulares para evaluar el efecto de los péptidos optimizados sobre la apertura del PTP y la resistencia a la apoptosis en líneas de células cancerosas que sobreexpresan IF1.

8. BIBLIOGRAFÍA

Las referencias se presentan en orden de aparición en el texto.

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249.
- [2] Instituto Nacional del Cáncer de Argentina. Estadísticas de cáncer en Argentina. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/salud/inc>. Consultado: 2025.
- [3] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674.
- [4] Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956;123(3191):309-314.
- [5] Sotgia F, Martinez-Outschoorn UE, Lisanti MP. Cancer metabolism: new validated targets for drug discovery. *Oncotarget.* 2013;4(9):1309-1316.
- [6] Galber C, Acosta MJ, Minervini G, Giorgio V. The role of mitochondrial ATP synthase in cancer. *Biol Chem.* 2020;401(11):1199-1214.
- [7] Bhatt S, Bhatt DL. Mitochondria and cell death. *N Engl J Med.* 2013;369:483-484.
- [8] Boyer PD. The ATP synthase—a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem.* 1997;66:717-749.
- [9] Giorgio V, von Stockum S, Antoniel M, Fabbro A, Fogolari F, Forte M, et al. Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110(15):5887-5892.
- [10] Green DW, Grover GJ. The IF1 inhibitor protein of the mitochondrial F1F0-ATPase. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1458(2-3):343-355.
- [11] Solaini G, Harris DA. Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *Biochem J.* 2005;390(Pt 2):377-394.

- [12] Rouslin W, Pullman ME. Protonic inhibition of the mitochondrial adenosine 5'-triphosphatase in ischemic cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol.* 1987;19(7):661-668.
- [13] Bason JV, Runswick MJ, Fearnley IM, Walker JE. Binding of the inhibitor protein IF1 to bovine F1-ATPase. *J Mol Biol.* 2011;406(3):443-453.
- [14] Boreikaite V, Wicky BIM, Watt IN, Clarke J, Walker JE. Extrinsic conditions influence the self-association and structure of IF1, the regulatory protein of mitochondrial ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019;116(21):10354-10359.
- [15] Sánchez-Aragó M, Formentini L, Martínez-Reyes I, García-Bermudez J, Santacatterina F, Sánchez-Cenizo L, et al. Expression, regulation and clinical relevance of the ATPase inhibitory factor 1 in human cancers. *Oncogenesis.* 2013;2(8):e46.
- [16] Gatto C, Grandi M, Solaini G, Baracca A, Giorgio V. The F1Fo-ATPase inhibitor protein IF1 in pathophysiology. *Front Physiol.* 2022;13:917203.
- [17] Cuezva JM, Domínguez-Zorita S. The ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1) Contributes to the Warburg Effect and Is Regulated by Its Phosphorylation in S39 by a Protein Kinase A-like Activity. *Cancers.* 2024;16(5):1014.
- [18] Solaini G, Sgarbi G, Baracca A. The F1Fo-ATPase inhibitor, IF1, is a critical regulator of energy metabolism in cancer cells. *Biochem Soc Trans.* 2021;49(2):815-827.
- [19] Galber C, Fabbian S, Gatto C, Grandi M, Carissimi S, Acosta MJ, Sgarbi G, Tiso N, Argenton F, Solaini G, Baracca A, Bellanda M, Giorgio V. The mitochondrial inhibitor IF1 binds to the ATP synthase OSCP subunit and protects cancer cells from apoptosis. *Cell Death Dis.* 2023;14(1):54.
- [20] Giorgio V, Bisetto E, Soriano ME, Dabbeni-Sala F, Basso E, Petronilli V, et al. Cyclophilin D modulates mitochondrial F0F1-ATP synthase by interacting with the lateral stalk of the complex. *J Biol Chem.* 2009;284(49):33982-33988.
- [21] Morris OM, Torpey JH, Isaacson RL. Intrinsically disordered proteins: modes of binding with emphasis on disordered domains. *Open Biol.* 2021;11(10):210222.
- [22] Stelzer AC, Frazee RW, Van Huis C, Cleary J, Oipari AW, Glick GD, et al. NMR studies of an immunomodulatory benzodiazepine binding to its molecular target on the mitochondrial F1F0-ATPase. *Biopolymers.* 2010;93(1):85-92.

- [23] Allen MP, Tildesley DJ. *Computer Simulation of Liquids*. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press; 2017.
- [24] Huang J, Rauscher S, Nawrocki G, Ran T, Feig M, de Groot BL, et al. CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. *Nat Methods*. 2017;14(1):71-73.
- [25] Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*. 2015;1-2:19-25.
- [26] Walker JE. The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochem Soc Trans*. 2013;41(1):1-16.
- [27] Pinke G, Zhou L, Sazanov LA. Cryo-EM structure of the entire mammalian F-type ATP synthase. *Nat Struct Mol Biol*. 2020;27(11):1077-1085.
- [28] Giorgio V, Fogolari F, Lippe G, Bernardi P. OSCP subunit of mitochondrial ATP synthase: role in regulation of enzyme function and of its transition to a pore. *Br J Pharmacol*. 2019;176(22):4247-4257.
- [29] Bernardi P, Gerle C, Halestrap AP, Jonas EA, Karch J, Mnatsakanyan N, et al. Identity, structure, and function of the mitochondrial permeability transition pore: controversies, consensus, recent advances, and future directions. *Cell Death Differ*. 2023;30(8):1869-1885.
- [30] Carraro M, Giorgio V, Sileikyte J, Sartori G, Forte M, Lippe G, et al. Channel formation by yeast F-ATP synthase and the role of dimerization in the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem*. 2014;289(23):15980-15985.
- [31] Antoniel M, Jones K, Antonucci S, Spolaore B, Fogolari F, Petronilli V, et al. The unique histidine in OSCP subunit of F-ATP synthase mediates inhibition of the permeability transition pore by acidic pH. *EMBO Rep*. 2018;19(2):257-268.
- [32] Giorgio V, Burchell V, Schiavone M, Bassot C, Minervini G, Petronilli V, et al. Ca²⁺ binding to F-ATP synthase β subunit triggers the mitochondrial permeability transition. *EMBO Rep*. 2017;18(7):1065-1076.

- [33] Bonora M, Morganti C, Morciano G, Pedriali G, Lebedzinska-Arciszewska M, Aquila G, et al. Mitochondrial permeability transition involves dissociation of F1FO ATP synthase dimers and C-ring conformation. *EMBO Rep.* 2017;18(7):1077-1089.
- [34] Campanella M, Parker N, Tan CH, Hall AM, Duchen MR. IF1: setting the pace of the F1Fo-ATP synthase. *Trends Biochem Sci.* 2009;34(7):343-350.
- [35] Bason JV, Montgomery MG, Leslie AGW, Walker JE. Pathway of binding of the intrinsically disordered mitochondrial inhibitor protein to F1-ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111(31):11305-11310.
- [36] Cabezon E, Butler PJG, Runswick MJ, Walker JE. Modulation of the oligomerization state of the bovine F1-ATPase inhibitor protein, IF1, by pH. *J Biol Chem.* 2000;275(33):25460-25464.
- [37] García-Bermúdez J, Cuezva JM. The ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1): A master regulator of energy metabolism and of cell survival. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1857(8):1167-1182.
- [38] Campanella M, Casswell E, Chong S, Farah Z, Wieckowski MR, Abramov AY, et al. Regulation of mitochondrial structure and function by the F1Fo-ATPase inhibitor protein, IF1. *Cell Metab.* 2008;8(1):13-25.
- [39] Faccenda D, Nakamura J, Gorini G, Dhoot GK, Piacentini M, Yoshida M, et al. Control of mitochondrial remodeling by the ATPase inhibitory factor 1 unveils a pro-survival relay via OPA1. *Cell Rep.* 2017;18(8):1869-1883.
- [40] García-Bermúdez J, Sánchez-Aragó M, Soldevilla B, del Arco A, Nuevo-Tapióles C, Cuezva JM. PKA phosphorylates the ATPase inhibitory factor 1 and inactivates its capacity to bind and inhibit the mitochondrial H⁺-ATP synthase. *Cell Rep.* 2015;12(12):2143-2155.
- [41] Gu J, Zhang L, Zong S, Guo R, Liu T, Yi J, et al. Cryo-EM structure of the mammalian ATP synthase tetramer bound with inhibitory protein IF1. *Science.* 2019;364(6445):1068-1075.
- [42] Carbajo RJ, Kellas FA, Runswick MJ, Montgomery MG, Walker JE, Neuhaus D. Structure of the F1-binding domain of the stator of bovine F1Fo-ATPase and how it binds an α -subunit. *J Mol Biol.* 2005;351(4):824-838.

- [43] Galber C, Minervini G, Cannino G, Boldrin F, Petronilli V, Tosatto S, et al. The f subunit of human ATP synthase is essential for normal mitochondrial morphology and permeability transition. *Cell Rep.* 2021;35(6):109111.
- [44] Uversky VN. Functional roles of transiently and intrinsically disordered regions within proteins. *FEBS J.* 2015;282(7):1182-1189.
- [45] Wright PE, Dyson HJ. Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015;16(1):18-29.
- [46] Zerze GH, Zheng W, Best RB, Mittal J. Evolution of All-Atom Protein Force Fields to Improve Local and Global Properties. *J Phys Chem Lett.* 2019;10(9):2227-2234.
- [47] Vollmayr-Lee K. Introduction to molecular dynamics simulations. *Am J Phys.* 2020;88(5):401-422.
- [48] Piana S, Lindorff-Larsen K, Shaw DE. Atomic-level description of ubiquitin folding. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110(15):5915-5920.
- [49] Nosé S. A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics methods. *J Chem Phys.* 1984;81(1):511-519.
- [50] Parrinello M, Rahman A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J Appl Phys.* 1981;52(12):7182-7190.
- [51] Darden T, York D, Pedersen L. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *J Chem Phys.* 1993;98(12):10089-10092.
- [52] Jo S, Kim T, Iyer VG, Im W. CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. *J Comput Chem.* 2008;29(11):1859-1865.
- [53] Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, Lindahl E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX.* 2015;1-2:19-25.
- [54] Michaud-Agrawal N, Denning EJ, Woolf TB, Beckstein O. MDAAnalysis: A toolkit for the analysis of molecular dynamics simulations. *J Comput Chem.* 2011;32(10):2319-2327.
- [55] Harris CR, Millman KJ, van der Walt SJ, Gommers R, Virtanen P, Cournapeau D, et al. Array programming with NumPy. *Nature.* 2020;585(7825):357-362.

- [56] Kabsch W, Sander C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*. 1983;22(12):2577-2637.
- [57] Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021;596(7873):583-589.
- [58] Klein F, Barrera EE, Pantano S. Assessing SIRAH's Capability to Simulate Intrinsically Disordered Proteins and Peptides. *J Chem Theory Comput*. 2021;17(2):599-604.
- [59] Balatti GE, Barletta GP, Parisi G, Tosatto SCE, Bellanda M, Fernandez-Alberti S. Intrinsically Disordered Region Modulates Ligand Binding in Glutaredoxin 1. *J Phys Chem B*. 2021;125(49):13366-13375.
- [60] Darré L, Machado MR, Brandner AF, González HC, Ferreira S, Pantano S. SIRAH: A structurally unbiased coarse-grained force field for proteins with aqueous solvation and long-range electrostatics. *J Chem Theory Comput*. 2015;11(2):723-739.
- [61] Wang T, Ma F, Qian HL. Defueling the cancer: ATP synthase as an emerging target in cancer therapy. *Mol Ther Oncolytics*. 2021;23:82-95.
- [62] Zhang M, Luo X, Zhang B, Luo D, Huang L, Long Q. Unveiling OSCP as the potential therapeutic target for mitochondrial dysfunction-related diseases. *Life Sci*. 2024;336:122293.

9. ANEXOS

Anexo I: Glosario de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
ATP	Adenosín trifosfato
ADP	Adenosín difosfato
CCAD	Centro de Computación de Alto Desempeño (UNC, Córdoba)
CD	Dicroísmo circular
CyPD	Ciclofilina D
DM	Dinámica molecular
DSSP	Define Secondary Structure of Proteins
GPU	Unidad de procesamiento gráfico
IF1	Factor Inhibidor de la ATPase 1 (ATP5IF1)
IDR / IDP	Región / proteína intrínsecamente desordenada
IP	Inmunoprecipitación
MD	Molecular Dynamics (Dinámica Molecular)
NPT	Ensamble isobárico-isotérmico
NVE	Ensamble microcanónico
NVT	Ensamble canónico
OSCP	Oligomycin Sensitivity Conferring Protein
OXPHOS	Fosforilación oxidativa
PBC	Condiciones de contorno periódicas
PDB	Protein Data Bank
PLA	Proximity Ligation Assay
PME	Particle Mesh Ewald
PTP	Poro de transición de permeabilidad
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMSD	Desviación cuadrática media
RMSF	Fluctuación cuadrática media
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SAXS	Dispersión de rayos X en ángulos pequeños
SLURM	Sistema de gestión de colas para supercomputación
TIP3P	Modelo de agua de tres sitios

Anexo II: Archivos de Configuración de GROMACS

A continuación se presenta el contenido del archivo de parámetros de producción (md.mdp) utilizado para la simulación de 100 ns de los tres sistemas:

; Archivo de parámetros para simulación de producción (NPT, 100 ns) ;
Generado con CHARMM-GUI y adaptado para GROMACS 2021

```
integrator      = md          ; leap-frog integrator
nsteps         = 500000000    ; 2 fs * 500000000 = 1000 ns (Sistema B y C);
250000000 para Sistema A (500 ns)
dt             = 0.002       ; 2 fs time step
nstxout        = 5000        ; save coordinates every 10 ps
nstvout        = 5000        ; save velocities every 10 ps
nstenergy      = 5000        ; save energies every 10 ps
nstlog         = 5000        ; update log file every 10 ps
continuation    = yes        ; continuing from NPT equilibration
constraint_algorithm = lincs  ; holonomic constraints
constraints     = h-bonds    ; hydrogen bonds constrained
lincs_iter     = 1
lincs_order    = 4
cutoff-scheme   = Verlet
ns_type         = grid
nstlist        = 10
rcoulomb       = 1.2
rvdw           = 1.2
rvdw-switch    = 1.0
vdw-modifier    = force-switch
DispCorr       = no
coulombtype     = PME
pme_order      = 4
fourierspacing = 0.12
tcoupl         = Nose-Hoover
tc-grps        = Protein Non-Protein
tau_t          = 1.0 1.0
ref_t          = 300 300
pcoupl         = Parrinello-Rahman
pcoupltype     = isotropic
tau_p          = 5.0
ref_p          = 1.0
compressibility = 4.5e-5
gen_vel        = no          ; velocities from equilibration
```

Anexo III: Comandos de Análisis Utilizados en GROMACS

A continuación se detallan los comandos principales utilizados para el análisis de trayectorias:

```
# RMSD de átomos Cα respecto a estructura inicial
gmx rms -s production.tpr -f production.xtc -o rmsd_backbone.xvg -tu ns

# RMSF por residuo
gmx rmsf -s production.tpr -f production.xtc -o rmsf_residue.xvg -res

# Radio de giro
gmx gyrate -s production.tpr -f production.xtc -o radius_gyration.xvg

# Estructura secundaria (DSSP)
gmx do_dssp -s production.tpr -f production.xtc -o ss_map.dat -sc ss_count.xvg

# Puentes de hidrógeno intermoleculares
gmx hbond -s production.tpr -f production.xtc -num hbnum.xvg

# Distancia mínima entre grupos de residuos
gmx mindist -s production.tpr -f production.xtc -od mindist.xvg -on numclose.xvg

# Energías de interacción
gmx energy -f production.edr -o energy_terms.xvg
```

— FIN DE LA TESINA —