

# Dinámica Molecular entre Nanopartículas y el Péptido $\beta$ Amiloide

Sairi Izchel Robles Torres<sup>1</sup> y Dra. Susana Figueroa-Gerstenmaier<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidad Autónoma de Zacatecas UACQ Q.F.B Carretera Zac-Gdl. Km. 6, ejido “La Escondida” Campus Universitario UAZ Siglo XXI 98160 Zacatecas, Zac.

<sup>2</sup> Universidad de Guanajuato, DCI, campus León, Loma del Bosque #103, Lomas del Campestre 37150 León.

## RESUMEN

Actualmente las enfermedades neurodegenerativas son la principal causa de discapacidad en la etapa adulta, una de ellas es la enfermedad de Alzheimer que causa demencia, en los últimos años las investigaciones para encontrar y probar nuevos fármacos que combatan este padecimiento desde la causa de sus lesiones neuropatológicas en las que el factor protagonista es el péptido beta amiloide, han aumentado. Se ha comprobado la efectividad de éstos pero su mecanismo de acción está aún bajo estudio. En este trabajo a partir de simulaciones de Dinámica Molecular se modeló la interacción entre un derivado del fullereno C<sub>60</sub> y un pentámero del péptido beta amiloide para determinar las interacciones específicas.

**Palabras clave:** C3-TADEM; Dinámica Molecular; GROMACS; Alzheimer.

## 1.-INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por dos tipos de lesiones, una es de carácter intracelular que produce ovillos neurofibrilares y la otra es de tipo extracelular, que genera placas seniles; entre los componentes de estas últimas se encuentran: ubiquitina, apolipoproteína E, hidrolasas lisosomales y el péptido  $\beta$  amiloide (P $\beta$ A), que provocan la muerte neuronal [Espinosa y Días-Rubio, 1996].

El principal componente de las placas seniles y ovillos neurofibrilares es el P $\beta$ A, un péptido hidrofóbico con estructura  $\beta$ -laminar derivado de la ruptura de la proteína precursora amiloide (APP), correspondiendo a la parte cercana al extremo carboxilo que se forma debido a la acción de las  $\beta$  y  $\gamma$  secretasas, que resulta ser tóxico para las células [Espinosa y Días-Rubio, 1996].

El P $\beta$ A patológico tiene una longitud de unos 42 aminoácidos, el cual se agrega de forma más rápida que sus isoformas de 40 aminoácidos y produce el depósito de sus equivalentes y su posterior agregación en forma fibrilar; se ha demostrado que el uso de nanopartículas, como los derivados anfipáticos del fullereno (C<sub>60</sub>) son prometedoras alternativas para inhibir la agregación de la forma fibrilar del P $\beta$ A.

Algunos experimentos demostraron a partir de ensayos de intensidad de la fluorescencia, usando un derivado del fullereno, dimetoximetano fullereno (DMF), que a mayor concentración de éste existe menor agregación del P $\beta$ A en etapas tempranas de la enfermedad. Viéndose además que se une especialmente a la región central hidrofóbica con la secuencia KLVFF de aminoácidos. Por otro lado muestra ser un fármaco eficaz ya que su IC<sub>50</sub> es mayor comparado con la melatonina, que es un inhibidor de la agregación del P $\beta$ A conocido [Kim y Lee, 2003].

Con ayuda del modelado que utiliza simulaciones de Dinámica Molecular (DM) la cuál es un método numérico para estudiar un sistema compuesto de muchas partículas, fundamentándose en la solución de las ecuaciones de movimiento de partículas individuales y siguiendo su trayectoria a través del tiempo. Se puede analizar su comportamiento, obtener propiedades termodinámicas y estructurales, y así entender cómo interacciona un sistema.

En otro trabajo, haciendo uso de esta herramienta se realizaron estudios para comprender la interacción entre el derivado de fullereno y el P $\beta$ A, y así analizar el mecanismo de unión entre ambos. Para ellos se usó un hexámero del P $\beta$ A y el derivado dimetoximetano fullereno (DMF) y partiendo la simulación desde tres sitios iniciales distintos, siguieron la trayectoria y analizaron distintos parámetros como la distancia de enlace, presencia de interacciones electrostáticas, enlaces tipo Van der Waals, energía de enlace y energía libre del sistema, concluyendo que existen tres sitios de unión principales, uno en la región del aminoácido 17-21, otro entre el 27-31 y finalmente entre la región C-terminal de los aminoácidos 31-41 [Zhou, Xi, Luo, Cao y Wei, 2014].

En este trabajo se realizó el análisis de la probabilidad de formar interacciones entre un derivado del fullereno, el isómero con simetría C<sub>3</sub> del trisaducto con sustituyente dietil malonato (C3-TADEM) y un pentámero del P $\beta$ A para determinar cuáles son las posiciones más favorables en ambos compuestos para interactuar entre ellos, con el fin de entender el

comportamiento del C3-TADEM, un derivado soluble del fullereno, y determinar si puede ser utilizado para el tratamiento de esta enfermedad.

## 2.-MÉTODOS Y MATERIALES

### **Ísmero con simetría C<sub>3</sub> del trisaducto con sustituyente dietil malonato**

La estructura del trisaducto fue construida con el editor molecular Avogadro 1.2.0 , y contiene tres sustituyentes malonato de dietilo (DEM), posteriormente la estructura se envió a la base de datos de ATB 2.2 generando los archivos para la molécula cuya fórmula es C<sub>81</sub>H<sub>30</sub>O<sub>12</sub> necesarios para correr la DM usando GROMACS (archivos itp y pdb usando el campo de fuerza, GROMOS 54A7). La figura 1 muestra la estructura de esta molécula [Avogadro, 2016; ATB, 2016].

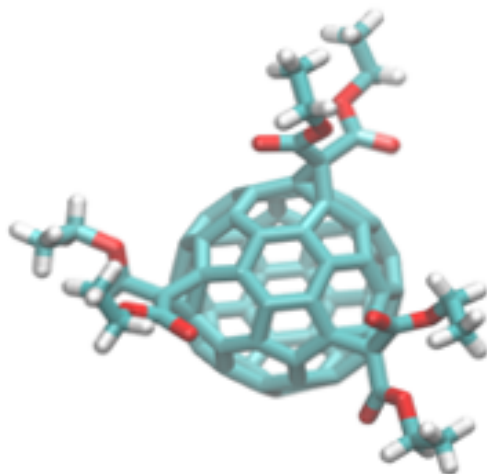


Figura 1. Isómero con simetría C<sub>3</sub> del trisaducto de fullereno con sustituyente dietil malonato.

**Péptido beta amiloide** La estructura fibrilar del pentámero fue adquirida de la base de datos del Protein Data Bank (PDB) tomando un modelo proveniente de la especie humana (ID: 2BEG). El pentámero de la proteína fibrilar consiste de 5 cadenas con 42 aminoácidos cada una conformada por la misma secuencia [Luhrs, Ritter, Adrian, Riek-Loher y Bohrmann, 2005].

## Simulación de Dinámica Molecular

*Detalles de simulación.* La simulación se llevó a cabo utilizando el software GROMACS 5.1.4 con el campo de fuerza CHARMM36 para el P $\beta$ A, debido a que éste es utilizado especialmente para proteínas y GROMOS 54A7 para C3-TADEM, y el modelo de agua TIP3.

*Compatibilidad de archivos.* El uso de dos campos de fuerza implicó hacer uso del comando editconf para producir el archivo \*.gro del C3-TADEM a partir del archivo \*.pdb descargado y se utilizó el archivo \*.itp obtenido de la base de datos para agregarlo a la topología del sistema.

*Preparación de la simulación.* Un pentámero de la proteína se colocó en una caja rectangular de dimensiones 5x3x3 nm, posteriormente se insertaron dos moléculas de C3-TADEM al sistema con el comando insert-molecules, a continuación, se solvató el sistema y las moléculas de agua agregadas fueron 2705 de manera de obtener una densidad cercana a la del agua pura. Entonces se procedió a neutralizar el sistema agregando 5 iones de sodio.

*Replicación del sistema.* El sistema utiliza condiciones periódicas de contorno y se replicó el sistema 8 veces con el comando genconf, resultando un total de 8 pentámeros del P $\beta$ A, 16 moléculas de C3-TADEM y 21640 moléculas de agua.

*Control.* Una simulación de DM para P $\beta$ A en solución sin C3-TADEM se ejecutó a condiciones isotérmicas (310.15 K) e isobáricas (1 bar), NPT, realizando minimización de energía y equilibración posterior para observar el comportamiento del P $\beta$ A en solución.

El algoritmo utilizado para la minimización de energía es steepest descent, y en el caso de la equilibración y ejecución de la simulación es mediante DM. En primer lugar, se equilibra a condiciones NVT para luego realizarlo a NPT, haciendo uso del algoritmo de restricción de posiciones para permitir al programa procesar el sistema. Al terminar se quitan las restricciones de posición y se corre la equilibración con el termostato v-rescale y el barostato Parrinello-Rahman. La simulación una vez equilibrada se corrió por 5000000 pasos con un paso de tiempo de 0.001.

*Sistema Ternario.* Igualmente, el pentámero del P $\beta$ A, dos moléculas de C3-TADEM y agua fueron simuladas bajo condiciones NPT, a 310.15 K y 1 bar, realizando las fases de equilibración previamente explicadas.

**Análisis** Al término de las simulaciones se llevó a cabo el cálculo y comparación de diferentes propiedades fisicoquímicas, como es la energía total del sistema, formación de puentes de hidrógeno, función de distribución radial, distancia mínima y trayectoria de simulación, todo esto se analizó mediante los softwares GROMACS, GRACE y VMD.

### 3.-RESULTADOS

*Energía total del sistema.* Para comprobar que el sistema ha llegado al equilibrio se realizó el análisis de la energía total, con respecto al tiempo de las dos simulaciones. En ambos casos se llegó al equilibrio.

*Interacción entre C3-TADEM y P $\beta$ A.* Una forma por la cual interactúan las moléculas en solución es mediante la formación de puentes de hidrógeno por lo que se realizó el análisis de la formación de estos entre la proteína y la molécula de C3-TADEM mostrando que a través del curso de la simulación efectivamente se formaron estas interacciones y algunas de ellas estuvieron a una distancia de 0.35 nm, esto se observa en la figura 2 [GROMACS, 2017; GRACE, 2005].

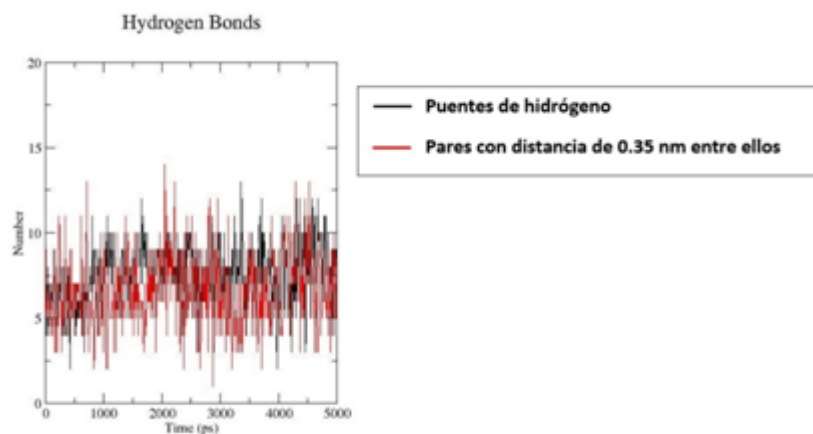


Figura 2. Número de puentes de hidrógeno entre P $\beta$ A y la molécula de C3-TADEM durante la simulación.

*Función de distribución radial (rdf).* Esta función,  $g(r)$ , nos describe la probabilidad de encontrar una cierta molécula en función del radio, que parte de un punto de referencia. Primero al examinar los resultados todas las moléculas de C3-TADEM tienen la misma densidad numérica conforme la distancia aumenta como se observa en la figura 3, alcanzando una mayor densidad a un radio de 1 nm aproximadamente. Para los cálculos posteriores se tomó en cuenta sólo uno de los fullerenos ya que sus resultados son similares.

Se hizo el cálculo alrededor de los tres puntos de referencia localizados por Zhou et al. [2014], y de acuerdo a los resultados existe mayor probabilidad de encontrar a la molécula de C3-TADEM cerca de los aminoácidos 31 a 41, cuya secuencia de aminoácidos es la siguiente: IIGLMVGGVVI, seguido de la región de aminoácidos 17-21 y por último del 27 a 31, como se observa en la figura 4 [GROMACS, 2017; GRACE, 2005].

*Distancia mínima.* Para corroborar los resultados de los cálculos de función de distribución radial, la distancia mínima fue calculada, entre las tres regiones de referencia y nuestra molécula de C3-TADEM (LTB5), los resultados demuestran que la molécula se encuentra más cercana a las dos regiones previamente mencionadas, como se muestra en la figura 5 [GROMACS, 2017; GRACE, 2005].

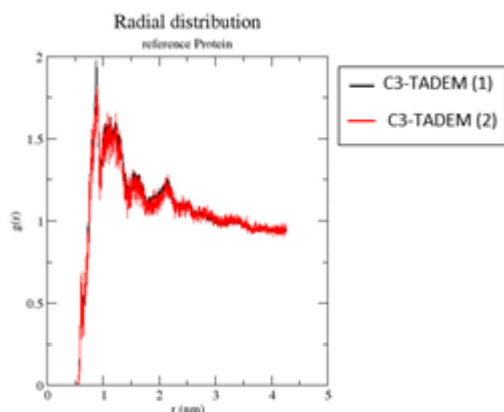


Figura 3. Distribución radial equivalente entre los dos fullerenos que se insertaron en cada caja

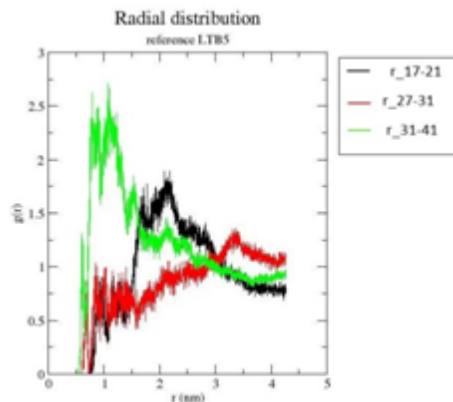


Figura 4. Existe mayor distribución radial en la región de aminoácidos 31 a 41 a comparación con las otras dos regiones.

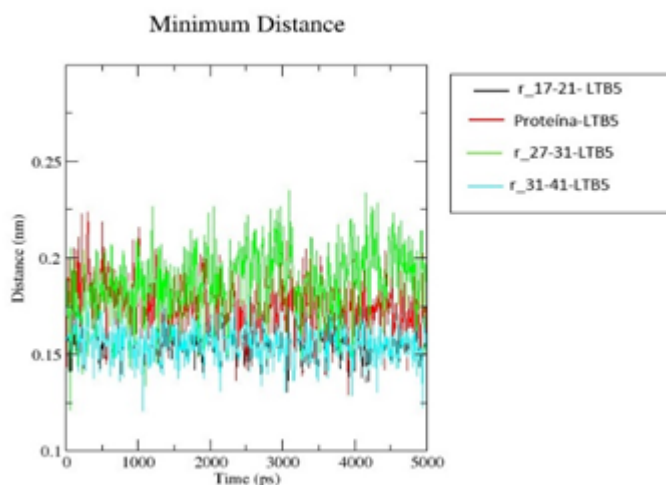


Figura 5. Distancia mínima entre la proteína y sus tres regiones con respecto a la molécula de C3-TADEM a lo largo de la simulación.

*Interacción entre moléculas.* Para determinar qué átomos participan en la interacción entre el P $\beta$ A y C3-TADEM se analizaron el rdf y la distancia mínima entre la región que contiene los aminoácidos 31 a 41 y los átomos que componen la molécula de fullereno en estudio, los átomos fueron identificados mediante el archivo pdb del fullereno, y se observó que en esta región del P $\beta$ A los átomos que cuentan con mayor probabilidad de encontrarse cerca son aquellos que corresponden a los sustituyentes malonato de dietilo (DEM) del trisaducto, comparando con los átomos de la estructura esférica típica de los fullerenos C<sub>60</sub>; para identificar cuáles son los átomos que se unen específicamente al pentámero se llevó a cabo el cálculo de rdf y distancia mínima, tomando de referencia uno de los tres sustituyentes

DEM, el cálculo de rdf demuestra que solo los átomos de un lado del DEM tienen una mayor probabilidad de estar cerca del pentámero, la figura 6 muestra la comparación entre los rdf de los átomos más externos de ambos lados del sustituyente DEM más un átomo que forma parte de la estructura esférica del C3-TADEM (C57), y la figura 7 muestra la distribución espacial de los átomos del sustituyente DEM [GROMACS, 2017; GRACE, 2005, VMD, 1996]. De acuerdo al rdf de los átomos, se identifica como el más cercano el oxígeno 9, para verificar este dato se realizó el cálculo de la distancia mínima entre los átomos más cercanos del DEM y el carbono 57, la figura 8 muestra los resultados [GROMACS, 2017; GRACE, 2005].

Por último, se muestra en la figura 9 una imagen generada con el visualizador VMD que muestra una molécula de C3-TADEM cerca de los aminoácidos 31 a 41 (azul oscuro) y 17 a 21 (azul celeste) [VMD, 1996].

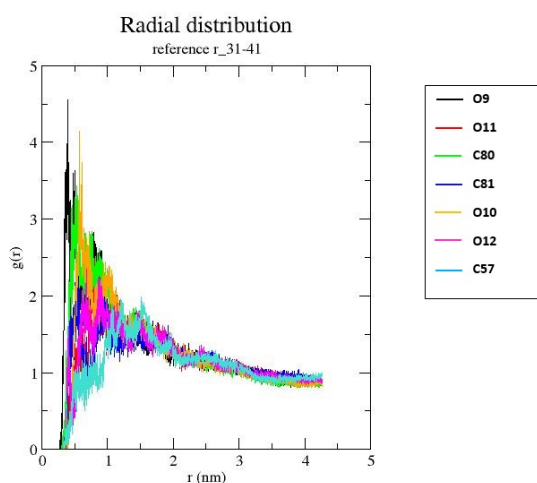


Figura 6. Frecuencia de distribución radial de los átomos del sustituyente DEM, comparación de los dos oxígenos de carbonilo, último carbono y oxígeno del grupo etoxi, los átomos más cercanos son el oxígeno 11, carbono 80 y oxígeno 10, el carbono 57 forma parte de la esfera típica de un fullereno C<sub>60</sub>.

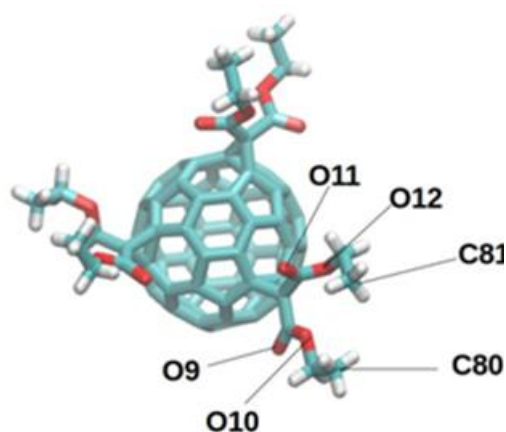


Figura 7. Distribución de los átomos del sustituyente DEM, los átomos mencionados en la figura 8 corresponden a un lado del malonato.



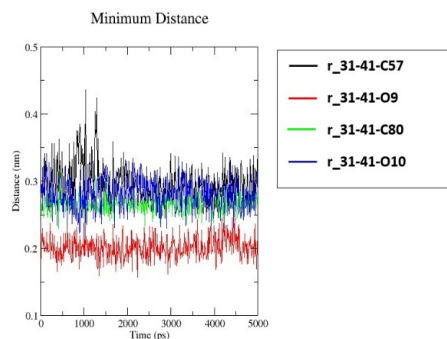


Figura 8. El átomo más cercano durante la simulación es el oxígeno 9, debido a que es un oxígeno perteneciente al grupo carbonilo, la diferencia de electronegatividad dota a este oxígeno de una carga parcialmente negativa y por lo tanto muy reactivo.

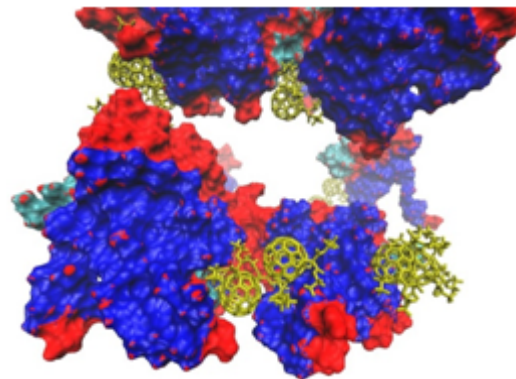


Figura 9. Interacción entre la molécula C3-TADEM y la región de la proteína c-terminal del aminoácido 31 a 41 (azul oscuro) en la parte superior e inferior y aminoácidos 17 a 21 (azul celeste), en la parte superior.

De acuerdo a los resultados alcanzados con las simulaciones de Dinámica Molecular se ha identificado como el sitio de interacción más probable entre el P $\beta$ A y la molécula de C3-TADEM la región de los aminoácidos 31 a 41 que corresponde a la secuencia IIGLMVGGVVI, donde la molécula de C3-TADEM interactúa con su sustituyente DEM principalmente con los átomos de oxígeno.

Debido a la complejidad del sistema, ya que se trata de una proteína y varias moléculas de fármaco, se optó por el uso de DM, usando GROMACS, GRACE, VMD como herramientas de análisis de nuestros datos.

## 5.-CONCLUSIÓN

Se puede observar que el derivado trisaducto del fullereno, C3-TADEM, es una molécula capaz de detener la agregación de monómeros del P $\beta$ A debido a la formación de interacciones tipo puente de hidrógeno mediante su sustituyente dimetil malonato, que se une a la región terminal entre los aminoácidos 31 al 41 especialmente.

## Agradecimientos

A mi tutora la Dra. Susana Figueroa-Gersteinmaier que me guió durante toda la investigación, gracias por su paciencia, hospedaje y amabilidad, a la Universidad Autónoma de Zacatecas por su apoyo y aliento, a mis familiares y amigos por ser un soporte incondicional durante el proceso.

## REFERENCIAS

1. Automated Topology Builder (ATB) and Repository (2.2) [Software]. (2016) Recuperado de: <https://atb.uq.edu.au/molecule.py?molid=118652>
2. Giménez, C. (1996). “Procesamiento de la proteína precursora del  $\beta$  amiloide” en Espinos D., Díaz-Rubio, M. y Portera-Sánchez, A. (coords.) *Enfermedad de Alzheimer: Bases moleculares*, Madrid; Editorial Medica Panamericana, [pp. 117-119].
3. Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., "VMD - Visual Molecular Dynamics", J. Molec. Graphics 1996, 14.1, 33-38.
4. Kim, J., Lee M. (2003). “Fullerene inhibits  $\beta$ -amyloid peptide aggregation” en *Biochemical and Biophysical Research Communications*, No. 2, Vol. 303 Abril 4, [pp. 576-579].
5. Lurhs, T, et al, (2005). 3D Structure of Alzheimer’s A $\beta$ (1-42) fibrils. Recuperado de: <https://www.rcsb.org/structure/2BEG>
6. Marcus D Hanwell, Donald E Curtis, David C Lonie, Tim Vandermeersch, Eva Zurek y Geoffrey R Hutchison; “Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform” *Journal of Cheminformatics* **2012**, 4:17.
7. M.J. Abraham, D. van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, and the GROMACS development team, GROMACS User Manual version 5.1.5, [www.gromacs.org](http://www.gromacs.org)
8. Turner PJ. XMGRACE, Version 5.1.19. Center for Coastal and Land-Margin Research, Oregon Graduate Institute of Science and Technology, Beaverton, OR; 2005. (2017).
9. Zhou, X., Xi, W., Luo, Y., Cao, S., Wei, G. (2014). “Interactions of Water-Soluble Fullerene Derivative with Amyloid- $\beta$  Protofibrils: Dynamics, Binding Mechanism, and the Resulting Salt-Bridge Disruption” en American Chemical Society, Num. 118, Vol. 24. Mayo 23, [pp. 6733-6741].