



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

ESTUDIO COMPUTACIONAL DEL MECANISMO DE ACCIÓN  
DE  $\gamma$ -SECRETASA, ENZIMA INVOLUCRADA EN LA  
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Dulce Consuelo Guzmán Ocampo

TUTOR PRINCIPAL

Laura Domínguez Dueñas, Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Marcelino Arciniega Castro, Instituto de Fisiología Celular

Juan Raúl Álvarez Idaboy, Facultad de Química

Ciudad de México, enero de 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Estudio computacional del mecanismo de acción de  
 $\gamma$ -secretasa, enzima involucrada en la enfermedad de  
Alzheimer

---

Dulce Consuelo Guzmán Ocampo

*Enero de 2020*

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas  
Facultad de Química

## Estudio computacional del mecanismo de acción de $\gamma$ -secretasa, enzima involucrada en la enfermedad de Alzheimer

Dulce Consuelo Guzmán Ocampo

- Presidente* Fernández Velasco Daniel Alejandro  
Facultad de Medicina  
Universidad Nacional Autónoma de México
- Vocal* Pastor Colón Carmen Nina  
Centro de Investigación en Dinámica Celular  
Universidad Autónoma del Estado de Morelos
- Vocal* Rojo Domínguez Arturo  
Unidad Cuajimalpa  
Universidad Autónoma Metropolitana
- Vocal* Ireta Moreno Joel  
Unidad Iztapalapa  
Universidad Autónoma Metropolitana
- Secretario* Sosa Peinado Alejandro  
Facultad de Medicina  
Universidad Nacional Autónoma de México
- Asesor* Laura Domínguez Dueñas  
Facultad de Química  
Universidad Nacional Autónoma de México



**Dulce Consuelo Guzmán Ocampo**

*Estudio computacional del mecanismo de acción de  $\gamma$ -secretasa, enzima involucrada en la enfermedad de Alzheimer*

Enero de 2020

Jurado: Fernández Velasco Daniel Alejandro, Pastor Colón Carmen Nina, Rojo Domínguez Arturo, Ireta Moreno Joel, Sosa Peinado Alejandro

Asesor: Laura Domínguez Dueñas

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

Facultad de Química

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, C.P. 04360

-

# Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por proporcionarme las herramientas y los recursos para mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría (No. 794323/630600).

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) y al CONACyT por el apoyo económico y la Beca de Movilidad proporcionada para realizar una estancia de investigación en la Universidad de Florida.

Al Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP 5000-9155), Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IA204716) y al Proyecto de Ciencia Básica de CONACyT (A1-S-8866) por el financiamiento para la compra de equipos de cómputo. También a PAPIIT por la beca brindada para la conclusión de estudios de maestría.

A la Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC), por la proporción de recursos de supercómputo (LANCAD-UNAM-DGTIC-306).

Al Dr. Adrian Roitberg por permitirme realizar una estancia en su grupo de investigación en la Universidad de Florida.

A los miembros de mi comité tutor y jurado por todas sus contribuciones y correcciones en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Laura Domínguez por permitirme formar parte de su grupo de investigación y a mis compañeros por toda su ayuda y compañía.

A Juan Felipe por su apoyo infinito.

A mi familia por todo desde 1994 a la actualidad.

¡GRACIAS!

# Índice general

<b>1</b>	<b>Introducción</b>	<b>1</b>
1.1	Resumen . . . . .	1
1.2	Antecedentes . . . . .	1
1.2.1	La enfermedad de Alzheimer . . . . .	1
1.2.2	Estructura de $\gamma$ -secretasa y su sitio activo . . . . .	3
1.2.3	Mecanismo general ácido-base propuesto para la escisión por aspartil proteasas . . . . .	5
1.2.4	Determinación de los estados de protonación de la díada catalítica de PS1 . . . . .	6
1.2.5	Estudio del mecanismo de escisión de C99 por $\gamma$ -secretasa . . . . .	12
1.3	Objetivo general . . . . .	18
<b>2</b>	<b>Determinación de los valores de pKa de la díada catalítica de <math>\gamma</math>-secretasa</b>	<b>19</b>
2.1	Objetivo particular . . . . .	19
2.2	Hipótesis . . . . .	19
2.3	Metodología general para las simulaciones pH-REMD . . . . .	19
2.3.1	Preparación del sistema . . . . .	19
2.3.2	Detalles generales . . . . .	20
2.4	Resultados y discusión . . . . .	22
2.4.1	Sistema apo-GS . . . . .	22
2.4.2	Sistema GS-C99 <sub>28-55</sub> . . . . .	26
2.5	Conclusiones . . . . .	30
<b>3</b>	<b>Estudio del mecanismo de escisión de <math>\gamma</math>-secretasa sobre el péptido C99<sub>28-55</sub></b>	<b>32</b>
3.1	Objetivo particular . . . . .	32
3.2	Hipótesis . . . . .	32
3.3	Metodología general para el estudio QM/MM . . . . .	32
3.3.1	Preparación del sistema . . . . .	32
3.3.2	Detalles generales . . . . .	32
3.4	Resultados y discusión . . . . .	33
3.4.1	Parte 1 - Formación del intermediario gem-diol . . . . .	34

3.4.2	Modificando la región QM . . . . .	38
3.4.3	Parte 2 - Ruptura del enlace peptídico . . . . .	40
3.4.4	Efecto de la mutación M51F en el mecanismo de escisión . . . . .	43
3.5	Conclusiones . . . . .	44
<b>4</b>	<b>Perspectivas</b>	<b>47</b>
<b>5</b>	<b>Anexos</b>	<b>49</b>
5.1	Estructuras de $\gamma$ -secretasa reportadas . . . . .	49
5.2	Información adicional sobre las metodologías . . . . .	52
5.2.1	Metodología de las simulaciones pH-REMD . . . . .	52
5.2.2	Metodología del estudio QM/MM . . . . .	53
5.3	Información complementaria sobre métodos y técnicas . . . . .	56
5.4	Gráficas complementarias a los resultados y análisis del Capítulo 2 . . . . .	58
5.4.1	Sistema apo-GS . . . . .	58
5.4.2	Sistema GS-C99 <sub>28-55</sub> . . . . .	61
	<b>Bibliografía</b>	<b>64</b>

# Introducción

## 1.1 Resumen

La enzima  $\gamma$ -secretasa (GS) participa en el último paso de la escisión secuencial de la Proteína Precursora Amiloide (APP), que culmina en la formación de los péptidos  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ). Estos péptidos pueden formar agregados extracelulares, cuya acumulación es una de las dos evidencias patológicas de la enfermedad de Alzheimer. La escisión de APP por  $\gamma$ -secretasa conduce a la producción de péptidos  $A\beta$  con diferentes longitudes. De acuerdo con la hipótesis amiloidogénica, un desbalance en la proporción de  $A\beta_{40}$ : $A\beta_{42}$  resulta en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

La asignación de los estados de protonación de los aspárticos catalíticos y la descripción de los cambios conformacionales asociados a la actividad de esta aspartil proteasa son importantes para la comprensión del mecanismo de catálisis. Por otra parte, una descripción de las interacciones principales asociadas al paso a paso del mecanismo podría ayudar a explicar la diferencia en el modo de corte de la enzima y por lo tanto en la producción de las diferentes isoformas de  $A\beta$ . De esta manera, una descripción de su mecanismo de reacción es indispensable para guiar el diseño racional de fármacos enfocados en detener el progreso de la enfermedad.

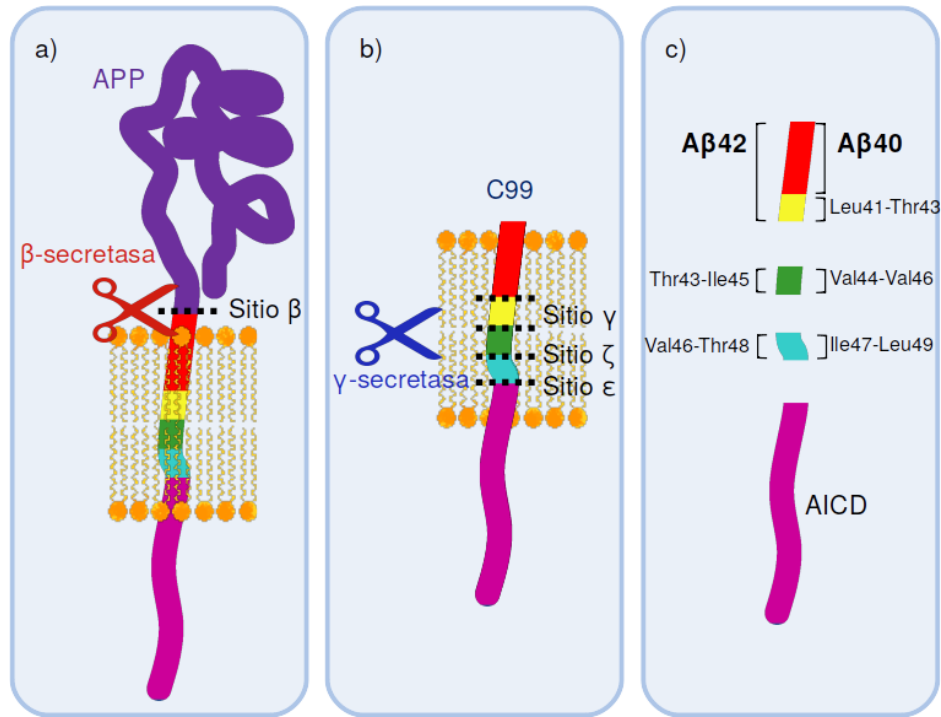
## 1.2 Antecedentes

### 1.2.1 La enfermedad de Alzheimer

La acumulación de placas amiloides –compuestas de péptidos  $A\beta$ – es una de las dos lesiones cerebrales características de la enfermedad de Alzheimer (EA). Los péptidos  $A\beta$  se forman por la escisión secuencial de la Proteína Precursora Amiloide (APP) por dos proteasas:  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasa.

APP es una molécula de adhesión celular que participa en eventos clave del desarrollo neuronal. Esta proteína consta principalmente de tres partes: un gran dominio N-terminal extracelular (ectodominio), un segmento transmembranal y una cola citoplasmática corta (ACID, dominio intracelular de APP) (Fig. 1.1a).<sup>1</sup>

Primero, la enzima  $\beta$ -secretasa escinde a APP (en su sitio escindible  $\beta$ ) removiendo su ectodominio y reduciéndola al fragmento C-terminal de 99 aminoácidos (C99). Posteriormente, la enzima  $\gamma$ -secretasa, mediante su componente proteolítico presenilina, corta a C99 dentro de su dominio transmembranal, produciendo el fragmento AICD y liberando al péptido A $\beta$  de la membrana celular (ver Fig. 1.1).<sup>2,3</sup>



**Fig. 1.1:** Escisión secuencial de APP por a)  $\beta$ -secretasa en el sitio escindible  $\beta$ , liberando el ectodominio y por b)  $\gamma$ -secretasa en los sitios  $\epsilon$ ,  $\zeta$  y  $\gamma$  c) produciendo el fragmento AICD, diferentes triptidos y las isoformas A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42.

La variación natural en el proceso de escisión de C99 por  $\gamma$ -secretasa conduce a la producción de isoformas del péptido A $\beta$  con diferentes longitudes. La isoforma predominante en personas sanas es A $\beta$ 40 –de 40 aminoácidos– que no se considera tóxica; mientras que la segunda isoforma más común es A $\beta$ 42 –de 42 aminoácidos– más propensa a agregarse de manera patológica y predominante en pacientes con la enfermedad de Alzheimer.<sup>2,3</sup>

Se ha identificado la escisión secuencial de tres sitios diferentes de C99 implicados en la formación de los péptidos A $\beta$ , denominados sitios de escisión  $\epsilon$ ,  $\zeta$  y  $\gamma$  (ver Fig. 1.1). La primera escisión se produce en el sitio  $\epsilon$ , entre la Leu49 y la Val50 para generar A $\beta$ 49 y liberar el fragmento AICD. El producto A $\beta$ 49 se escinde en el sitio  $\zeta$  entre la Val46 y la Ile47 para producir A $\beta$ 46 y un triptido. Finalmente, el péptido A $\beta$ 46 se escinde en el sitio  $\gamma$  para producir A $\beta$ 43 o A $\beta$ 40, que liberan uno y dos triptidos respectivamente.

Sin embargo, la modificación del inicio de la escisión secuencial de C99 conduce a la formación de la isoforma A $\beta$ 42 (Fig. 1.1).<sup>2</sup>

El enfoque terapéutico inicial se dirigió a la inhibición de la enzima; sin embargo, debido a que GS tiene varios sustratos, su inhibición genera muchos efectos secundarios.<sup>4</sup> Se ha propuesto que la cantidad de A $\beta$ 42 y su proporción con respecto a A $\beta$ 40 son mediadores clave de la patogénesis de  $\beta$ -amiloides, esta hipótesis es fuertemente apoyada por el hecho de que casi todas las mutaciones autosómicas dominantes de la enfermedad de Alzheimer familiar (FAD) en las presenilinas 1 y 2 y APP aumentan la relación A $\beta$ 42:A $\beta$ 40 (ver [www.alzforum.org/mutations](http://www.alzforum.org/mutations)).<sup>3</sup> Debido a esta evidencia, se sugiere que la inhibición de la producción de todas las isoformas de A $\beta$  o su modulación específica son opciones viables para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.<sup>2,5,6</sup>

Es importante mencionar que la enzima GS tiene dos actividades, en el primer corte tiene actividad de carboxilasa y en los cortes subsecuentes de endopeptidasa. Cómo se puede identificar en la Fig. 1.1c, el primer sitio de corte ( $\epsilon$ ) define principalmente qué isoforma de A $\beta$  será liberada, de manera que este primer paso podría ser la clave de la modulación de la proporción A $\beta$ 42:A $\beta$ 40.

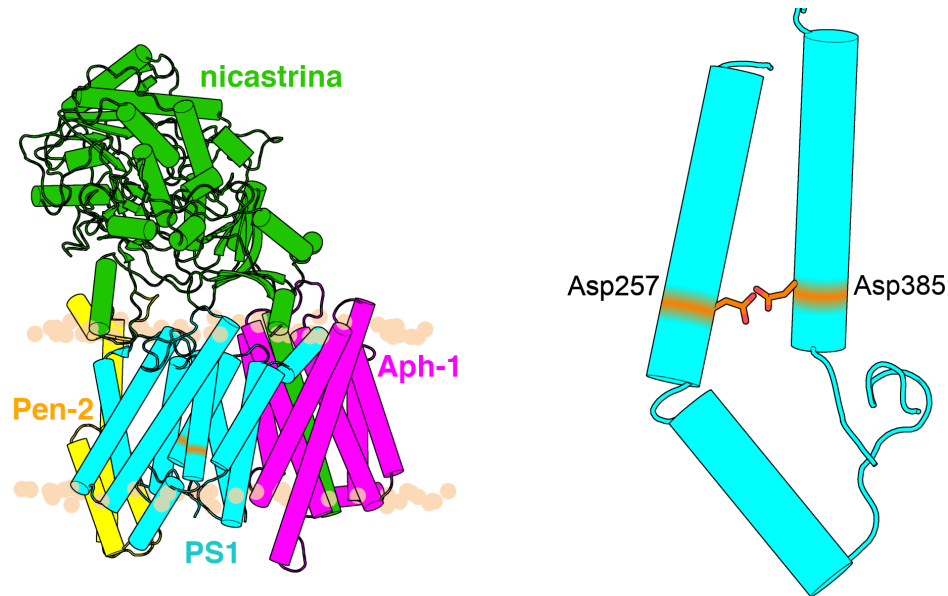
## 1.2.2 Estructura de $\gamma$ -secretasa y su sitio activo

La enzima GS es una aspartil proteasa intramembranal que escinde a varias proteínas, de las cuales APP y Notch son las más estudiadas. Notch es una proteína heterodimérica que reside en la superficie de las células y sirve como receptor de señales, y al igual que APP, también está sujeta a una serie de escisiones proteolíticas.<sup>7</sup>

En la actualidad, se cree que GS tiene más de 90 sustratos, los cuáles sólo tienen la similitud de que son proteínas transmembranales de tipo I (que atraviesan a la membrana una vez) cuyo ectodominio ha sido removido. Algunos productos del procesamiento de la GS funcionan como reguladores de la transcripción, mientras se cree que otros juegan un papel en la señalización, la adhesión celular y la dinámica del citoesqueleto. Esta enzima no sólo escinde a muchos sustratos, sino que también escinde al mismo sustrato en diferentes lugares. Los múltiples sustratos y los múltiples sitios de escisión de GS pueden ser evidencia evolutiva de su función inicial en la degradación regulada de las proteínas transmembranales; sin embargo, incluso si GS fuera simplemente un proteosoma de membrana, su función y su regulación ahora son más complejas.<sup>7</sup>

La enzima GS está formada por cuatro subunidades: presenilina (PS1), Pen-2, Aph-1 y nicastrina (Fig 1.2a). La subunidad catalítica PS1, está conformada por nueve hélices transmembranales (TMs) y contiene a los dos aspárticos catalíticos. Los aspárticos catalíticos Asp257 y Asp385 están localizados en la región intramembranal en las TM6

y TM7 respectivamente (Fig. 1.2b). El Asp257 está localizado en el motivo estructural VTD<sub>257</sub> y el Asp385 en el motivo LGLGD<sub>385</sub>. Durante el ensamblaje de GS, presenilina se autoescinde para producir los fragmentos amino y carboxilo terminal, NTF (TMs 1-6) y CTF (TMs 7-9) respectivamente.<sup>2,8</sup>



(a) GS es un complejo transmembranal con cuatro subunidades. PDB ID: 5FN2.

(b) Los residuos catalíticos de GS están localizados en las TM6 (Asp257) y TM7 (Asp385) de PS1.

**Fig. 1.2:** Estructura de  $\gamma$ -secretasa.

Nicastrina es el componente más grande de GS, tiene sólo una hélice transmembranal y contiene un dominio extracelular grande altamente glicosilado (*ECD*). Se ha propuesto que este dominio es esencial para el reconocimiento del sustrato, y para la maduración y ensamblaje de la enzima. Pen-2 es el componente más pequeño, se encarga de estabilizar el complejo, facilitar la maduración autocatalítica de presenilina y llevar a cabo la actividad catalítica de  $\gamma$ -secretasa. Finalmente, la subunidad Aph-1 es requerida para el autoensamblaje de la enzima por su interacción con PS1 y la TM de nicastrina.<sup>2,8</sup>

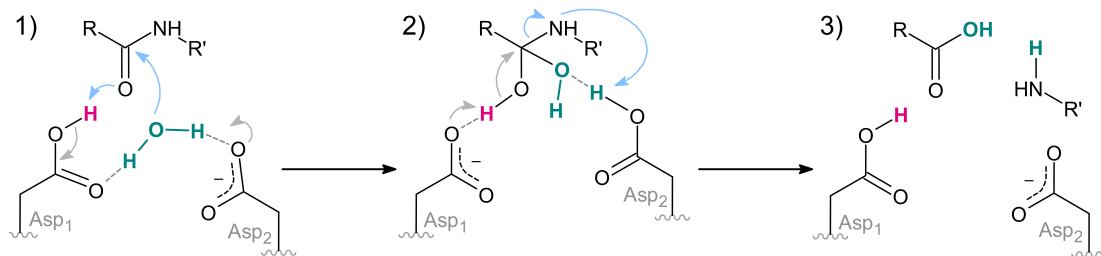
Hasta ahora, han sido depositadas en el *Protein Data Bank* ocho estructuras de criomicroscopía electrónica de GS (PDB IDs: 4UIS, 5A63, 5FN2, 5FN3, 5FN4, 5FN5, 6IDF y 6IYC, para más detalles ver el Anexo 5.1).<sup>8-12</sup> En este trabajo, debido a sus características estructurales, se emplearon las estructuras de GS 5FN2 (4.2 Å) y 6IYC (2.6 Å) para construir las estructuras iniciales apo (apo-GS) y en complejo con el sustrato (GS-C99<sub>28-55</sub>), respectivamente.



La estructura 5FN2 de GS fue obtenida en complejo con DAPT, que es un inhibidor peptidomimético potente, en el sitio activo de PS1. Sin embargo, debido a la resolución limitada, el modo de unión del inhibidor no fue asignada. Por otro lado, las estructuras obtenidas más recientemente 6IDF y 6IYC fueron obtenidas por medio de la estrategia de entrecruzamiento. La estructura de 6IYC fue obtenida de un complejo entrecruzado entre una variante de  $\gamma$ -secretasa con PS1-Q112C y APP-C83 (V695C). Además, para evitar la escisión del sustrato, el Asp385 fue mutado a Ala.<sup>12</sup>

### 1.2.3 Mecanismo general ácido-base propuesto para la escisión por aspartil proteasas

Como para otras aspartil proteasas, el mecanismo de hidrólisis más aceptado para la actividad catalítica de PS1 es un mecanismo general ácido-base que involucra dos residuos de ácido aspártico en el sitio activo y una molécula de agua ubicada entre ellos. Uno de los aminoácidos catalíticos actúa como una base (en su forma de carboxilato) y el otro como un ácido (en su forma de ácido carboxílico). La molécula de agua es polarizada por el carboxilato para iniciar la catálisis por un ataque nucleofílico al grupo carbonilo del enlace escindible del sustrato (Fig. 1.3).<sup>13</sup> El intermediario resultante se estabiliza por la donación del hidrógeno ácido del ácido carboxílico, formando un intermediario gem-diol. Como último paso, se invierten los caracteres ácido-base de los residuos catalíticos, restableciendo sus estados de protonación iniciales y conduciendo a la escisión del enlace peptídico, liberando los N y C terminales correspondientes.<sup>13-16</sup>



**Fig. 1.3:** Mecanismo general ácido-base de la familia de aspartil proteasas. 1) La molécula de agua es polarizada por el carboxilato, 2) el intermediario tetraédrico es estabilizado por la transferencia del protón ácido del ácido carboxílico y 3) el par catalítico recupera sus estados de protonación iniciales conduciendo a la escisión del enlace peptídico.<sup>13-16</sup>

Anteriormente, la sugerencia de proteólisis intramembranal fue recibida con escepticismo. Esto debido a la poca disponibilidad de agua en la región membranal, la cuál es necesaria para la hidrólisis del enlace peptídico.<sup>17</sup> Sin embargo, la ausencia de esta molécula de agua se ha encontrado como un mecanismo de inactivación o inhibición en otras aspartil proteasas.<sup>18-20</sup>

Aunque los mecanismos particulares son dependientes de la identidad exacta de la enzima y su sustrato, este mecanismo general nos revela tres características clave necesarias para que la proteólisis se lleve a cabo: (1) un residuo de ácido aspártico en su estado ácido, (2) un residuo de ácido aspártico en su estado básico y (3) una molécula de agua que se encuentre entre ambos grupos carboxilo catalíticos.

#### 1.2.4 Determinación de los estados de protonación de la díada catalítica de PS1

El valor del pKa es afectado por la naturaleza química del microambiente inmediato a un grupo titulable. Cuando un aminoácido es incorporado a una proteína, el valor del pKa de su cadena lateral es susceptible a cambiar, debido a que la naturaleza química de su entorno es diferente a cuando se encuentra en disolución. Generalmente, los aminoácidos ionizables se encuentran en la superficie de las proteínas; sin embargo, debido a requisitos estructurales y funcionales, a veces se encuentran inmersos en el núcleo de la proteína. Por ejemplo, esto sucede a menudo con aminoácidos que forman parte de sitios activos de enzimas o sitios de unión.<sup>21</sup>

La exposición de cargas eléctricas a un ambiente hidrofóbico es altamente desfavorable; esto se debe a que el entorno no polar carece de los dipolos eléctricos necesarios para enmascarar electrostáticamente las cargas embebidas. Si un aminoácido ionizable queda embebido en un núcleo no polar durante el plegamiento, es probable que esté en su forma neutra.<sup>21</sup> Como resultado, estos aminoácidos tienden a permanecer en su estado eléctricamente neutro, que se expresa como un cambio de pKa. En el caso de los aminoácidos ácidos, el cambio en pKa será hacia arriba, mientras que en el caso de los aminoácidos básicos, hacia abajo.

Cuando un aminoácido ionizable está cerca de otra especie cargada, la interacción electrostática por pares puede afectar su ionización. Cuando las especies tienen cargas opuestas, el valor del pKa favorecerá su ionización; para la especie ácida, el pKa disminuirá y para la básica aumentará. Si el par tiene cargas del mismo signo, entonces la repulsión se opondrá a la ionización.

Otro factor que afecta al pKa de los aminoácidos ionizables es la formación de puentes de hidrógeno con otras especies que no necesariamente son ionizables. Si la interacción se favorece por el estado ionizado o por el estado neutro, el valor del pKa cambiará en consecuencia.

Además, para un aminoácido dentro de una proteína, su microambiente es dinámico, pues éste cambia conforme la conformación de la proteína cambia. Por lo tanto, el valor del pKa de un grupo dentro de una proteína es dependiente de su conformación.

Debido a esto, para determinar los estados de protonación de las cadenas laterales de aminoácidos en una proteína es necesario tomar en cuenta la correlación entre la conformación y el pKa.

Las simulaciones de CpHMD son simulaciones de Dinámica Molecular (MD) en las que el pH es uno de los parámetros termodinámicos externos, como la temperatura y la presión.<sup>22</sup> Estos métodos fueron desarrollados con la finalidad de correlacionar la conformación de la proteína con sus estados de protonación.<sup>23</sup> Empleando métodos de CpHMD se pueden determinar los valores de pKa de los aminoácidos de interés o titulables, en este caso los aspárticos catalíticos de GS. De esta manera, es posible identificar cómo afecta la conformación inicial de la enzima y la presencia de otros agentes en el sitio activo (sustrato o ligando) a los valores de pKa de los residuos catalíticos. Además, esta metodología permite relacionar cambios conformacionales con el pH.

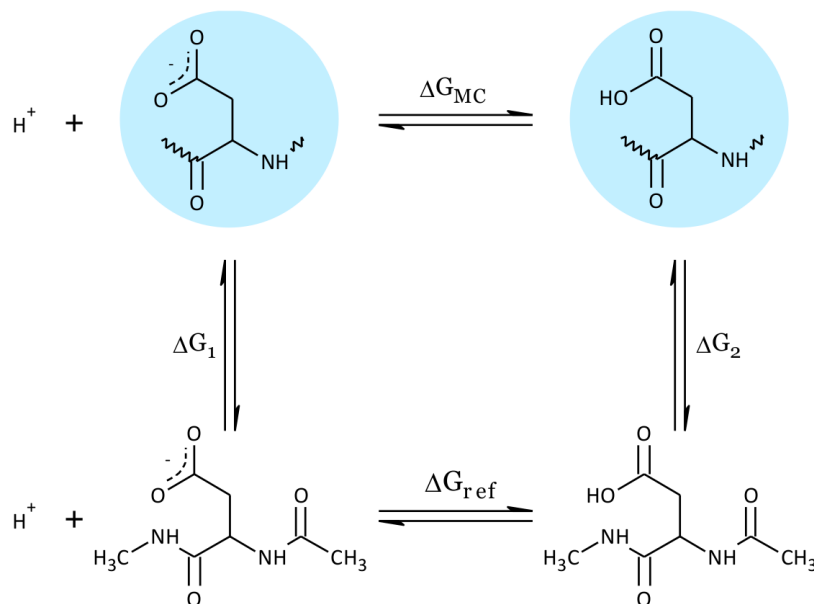
Es importante recordar que los sustratos de la GS son proteínas que atraviesan la membrana, por lo que principalmente tienen un carácter hidrofóbico, de manera que la presencia del sustrato modifica el ambiente electrostático del sitio activo, reduciendo la accesibilidad de moléculas de agua y favoreciendo que la díada catalítica tenga un estado con menor carga electrostática comparado con la forma apo.

En términos del mecanismo general propuesto, para que GS sea catalíticamente activa, es necesario que: (1) su díada catalítica se encuentre en un estado monoprotonado, (2) una molécula de agua interactúe con ambos residuos de ácido aspártico y, por lo tanto, (3) que los aspárticos se encuentren a una distancia que permita esta interacción. Con base en estos aspectos, empleando técnicas de CpHMD es posible trazar un perfil de actividad en función del pH que permita determinar el pH óptimo de la enzima.

En este proyecto se empleó el método de Dinámica Molecular a pH constante con intercambio de réplicas (pH-REMD, por sus siglas en inglés) implementado en AMBER<sup>24</sup> y que fue desarrollado por Mongan *et al.*<sup>25</sup> y modificado por Swails *et al.*<sup>26,27</sup> para llevar a cabo las simulaciones con disolvente explícito y muestreo acelerado de intercambio de réplicas. Este método combina MD con solvatación implícita *Generalized Born* (GB).<sup>28</sup> El muestreo de estados de protonación se lleva a cabo periódicamente mediante transiciones de Monte Carlo (MC) considerando estados de protonación discretos. Entre los pasos de MC, el sistema evoluciona como una simulación de MD estándar.

## Simulaciones de dinámica molecular a pH constante

Mongan *et al.*<sup>25</sup> propusieron emplear solvatación implícita GB para calcular las energías de transición de estados de protonación. El cálculo de energías de transición usando GB es rápido, dado que no hay necesidad de equilibrar el disolvente. Mediante la comparación con datos experimentales de los valores de pKa de la lisozima de clara de huevo de gallina, se demostró que GB es capaz de muestrear los estados de protonación con precisión.<sup>25</sup>



**Fig. 1.4:** Ciclo termodinámico utilizado en simulaciones de CpHMD.  $\Delta G_{MC}$  es la energía libre de transición entre estados, empleada para el muestreo de Monte Carlo.

Para el muestreo MC de estados de protonación de un residuo titulable a un valor de pH dado se emplea el ciclo termodinámico representado en la Fig. 1.4, a partir del cuál la energía libre de transición entre estados es:

$$\Delta G_{MC} = \Delta G_2 - \Delta G_1 - \Delta G_{ref} \quad (1.1)$$

donde  $\Delta G_1$  y  $\Delta G_2$  son las diferencias de potencial del aminoácido cuando forma parte de la proteína con respecto a cuándo se encuentra en la forma del compuesto de referencia en los estados desprotonado y protonado respectivamente. Estas dos diferencias de potencial representan el componente electrostático de la energía libre calculado para el grupo titulable en la proteína:

$$\Delta G_{elec} = \Delta G_2 - \Delta G_1 \quad (1.2)$$

Por otra parte, el  $\Delta G_{ref}$  se separa en sus contribuciones electrostática y no electrostática. La contribución no electrostática comprende la energía de enlace y la energía libre de solvatación del protón. Debido a la dificultad de realizar el cálculo del componente no electrostático, se aproxima que éste tiene el mismo valor independientemente del ambiente electrostático. Bajo esta aproximación, se introduce el compuesto de referencia con pKa conocido para cancelar la porción no electrostática de la energía libre de transición. Entonces,  $\Delta G_{ref}$  se desglosa de la siguiente manera:

$$\Delta G_{ref} = k_B T (pH - pK_{a,ref}) \ln 10 - \Delta G_{elec,ref} \quad (1.3)$$

Dónde  $k_B$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura,  $pK_{a,ref}$  es el pKa del compuesto de referencia apropiado (el compuesto ACE-X-NME correspondiente).

Sustituyendo las ecuaciones 1.2 y 1.3 en la ecuación 1.1, la expresión de la energía total de transición es:

$$\Delta G_{MC} = k_B T (pH - pK_{a,ref}) \ln 10 + \Delta G_{elec} - \Delta G_{elec,ref} \quad (1.4)$$

La energía total de transición  $\Delta G_{MC}$  es la base para aplicar el criterio de Metrópolis<sup>29</sup> y determinar si la transición será aceptada o no. Si es aceptada, la simulación continúa con el grupo tituable en el nuevo estado de protonación; si no, continúa con el estado de protonación no cambiado. La probabilidad de transición  $w(d \rightarrow p)$  está definida por:

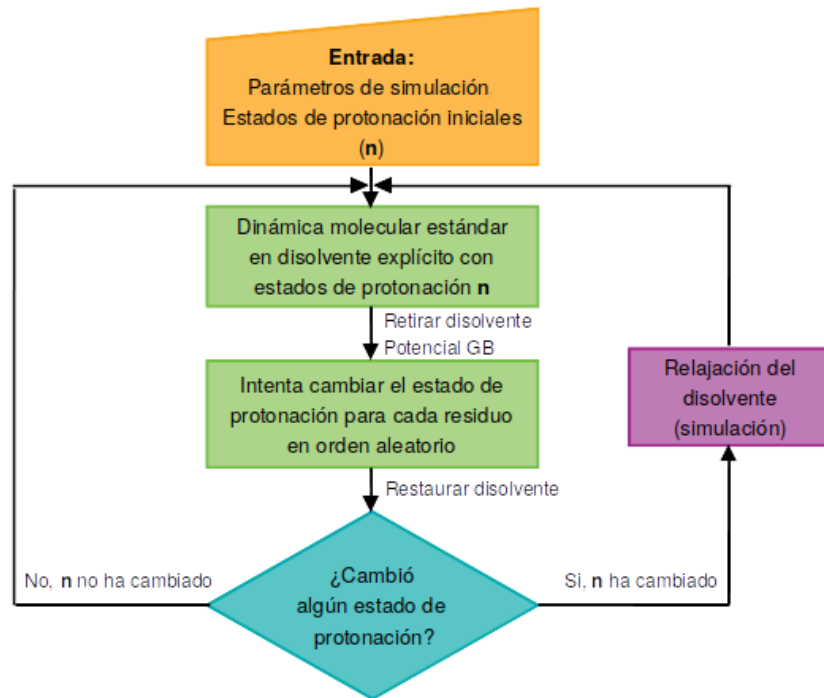
$$w(d \rightarrow p) = \begin{cases} 1, & \text{para } \Delta G_{MC} \leq 0 \\ \exp(-\beta \Delta G_{MC}), & \text{para } \Delta G_{MC} > 0 \end{cases} \quad (1.5)$$

Dónde  $\beta$  es el recíproco del producto  $k_B T$ .

En la implementación de este método en AMBER, para cada residuo que se titula existe un 25 % de probabilidad de que se produzca una titulación multisitio con un residuo vecino; es decir, el cambio propuesto implicará cambios en el estado de protonación tanto del residuo y de su vecino. Dos residuos titulables se consideran "vecinos" si dos átomos de hidrógeno titulantes están a 2 Å o menos uno del otro. La inclusión de cambios de estado de protonación de multisitio es importante para sistemas que tienen residuos titulables que interactúan estrechamente. Sin la consideración de multisitios, las transferencias de protones entre residuos adyacentes titulables implicados en un puente de hidrógeno no ocurrirían debido a la gran penalización que implica interrumpir la interacción añadiendo otro protón o eliminando el protón implicado en el puente de hidrógeno.

## Consideración del disolvente explícito

Swails *et al.*<sup>27</sup> implementaron el tratamiento del disolvente explícito en las simulaciones de MD que se llevan a cabo entre cada paso de Monte Carlo. Ellos se basaron en la definición del sistema y el ensamble que Baptista *et al.*<sup>22</sup> propusieron para las simulaciones CpHMD, en el que las coordenadas del sistema se pueden separar en grados de libertad de soluto y disolvente. La consideración de la solvatación explícita ayuda a aliviar el problema del muestreo de configuraciones no físicas que puede ocurrir cuando el disolvente es modelado implícitamente.



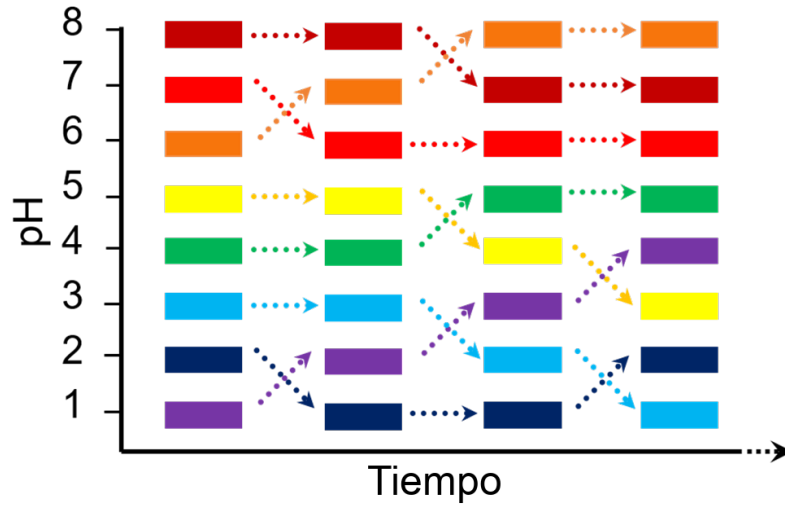
**Fig. 1.5:** Diagrama de flujo empleado para llevar a cabo CpHMD con disolvente explícito.

En la Fig. 1.5 se muestra el diagrama de flujo del proceso de CpHMD con disolvente explícito. Primero, se lleva a cabo una simulación de MD con solvatación explícita con un conjunto de estados de protonación  $n$ , se retira el disolvente y se usa el potencial GB para evaluar el intento de cambio de estado de protonación. Después del paso de MC, se restaura el disolvente y se relaja si  $n$  ha cambiado. El ciclo se repite hasta completar el número de pasos de MC que se han asignado inicialmente.

## Intercambio de réplicas en la dimensión pH

Ha sido ampliamente discutida la necesidad de un mejor muestreo del espacio confor-

protonación. El método de muestreo acelerado de intercambio de réplicas (REMD)<sup>30</sup> es uno de los métodos teóricos más propuesto para superar las barreras de energía libre en el espacio conformacional. Inicialmente se propuso asociar CpHMD con el intercambio de réplicas con diferentes temperaturas o Halmitonianos (T-REMD y H-REMD).<sup>23,31</sup> En 2012, Swails *et al.*<sup>26</sup> implementaron en AMBER el método de pH-REMD descrito por Itoh *et al.*,<sup>32</sup> que consiste en pasear al sistema aleatoriamente entre un conjunto de réplicas con diferentes valores del pH (Fig. 1.6).



**Fig. 1.6:** Esquema de intercambio de réplicas que muestra ocho réplicas a diferentes valores de pH. Los bloques representan las trayectorias de MD, mientras que las flechas representan los intercambios entre réplicas.

La metodología pH-REMD se lleva a cabo construyendo un número de réplicas del sistema que son simuladas a diferentes valores de pH, y periódicamente emplea un paso de transición de Monte Carlo en el que se intenta un intercambio entre los valores de pH de las réplicas. La razón de las probabilidades de transición entre la réplica  $i$  a  $pH_l$  y la réplica  $j$  a  $pH_m$  se calcula:

$$\frac{w(X_i^l, X_j^m \rightarrow X_i^m, X_j^l)}{w(X_i^m, X_j^l \rightarrow X_i^l, X_j^m)} = \exp(-\Delta) \quad (1.6)$$

y

$$\Delta \equiv \ln 10(pH_m - pH_l)(N_i^P - N_j^P) \quad (1.7)$$

En la Eq. 1.7  $N_i^P$  y  $N_j^P$  son los números de residuos que se protonan en las réplicas  $i$  y  $j$  respectivamente. La probabilidad de intercambio de réplicas se obtiene mediante el siguiente criterio:

$$w(X_i^l, X_j^m \rightarrow X_i^m, X_j^l) = \begin{cases} 1, & \text{para } \Delta \leq 0 \\ \exp(-\Delta), & \text{para } \Delta > 0 \end{cases} \quad (1.8)$$

Obsérvese que la relación de aceptación de los intercambios de pH entre réplicas disminuye exponencialmente con la diferencia de los dos valores de pH.

### Estudios de aspartil proteasas utilizando metodologías de MD a pH constante

En la actualidad, se han estudiado los estados de protonación de la díada catalítica de HIV-1 (una aspartil proteasa homodimérica) y BACE-1 ( $\beta$ -secretasa) mediante MD a pH constante en conjunto con la técnica de intercambio de réplicas. McGee *et al.*<sup>33</sup> utilizaron pH-REMD para simular HIV-1 libre y acoplada con 12 inhibidores distintos, para determinar los valores de pKa de la díada Asp en cada caso. Este estudio provee evidencia de que los aspárticos catalíticos están primariamente en una configuración monoprotonada (en forma libre y unida) en el intervalo de pH en el que ocurren la mayoría de los experimentos y simulaciones. Los valores de pKa determinados para la díada catalítica de la enzima libre fueron 1.29 y 7.32.

En el segundo caso, Ellis y Shen<sup>34</sup> emplearon la metodología de MD a pH constante con un modelo de estados de protonación continuo, para elucidar el mecanismo conformacional dependiente del pH que regula la actividad de la BACE-1; ellos determinaron valores de pKa de 4.1 y 1.9 para Asp32 y Asp228 respectivamente.

#### 1.2.5 Estudio del mecanismo de escisión de C99 por $\gamma$ -secretasa

Aunque el mecanismo general propuesto para las aspartil proteasas ha sido ampliamente estudiado, el mecanismo particular de cada enzima involucra los aminoácidos que interactúan con la díada catalítica o con el sitio de corte. Es decir, el mecanismo particular es dependiente de la identidad de la enzima.

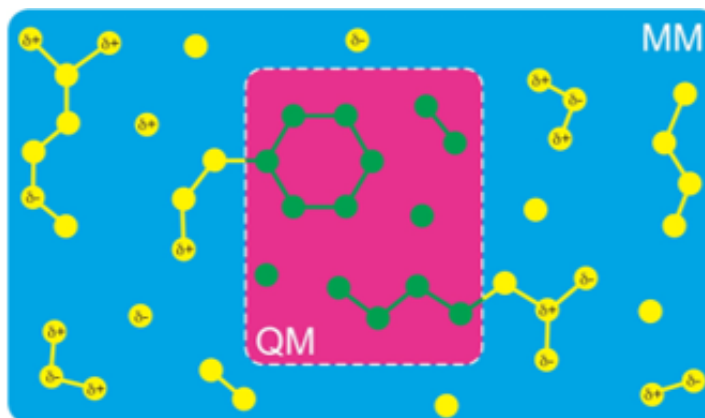
Con base en la hipótesis amiloidogénica, la identificación de los factores que favorecen a que el primer sitio escindible ( $\epsilon$ ) sea entre Leu49-Val50 o entre Thr48-Leu49 proporcionaría información valiosa sobre el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. La comparación entre la energía de activación del corte en los aminoácidos en estos dos



sitios posibles podría dar información sobre si la identidad de los aminoácidos del sitio  $\epsilon$  juega un papel relevante en la producción de las diferentes isoformas de  $A\beta$ .

Para llevar a cabo el estudio de un mecanismo de reacción se necesita emplear una metodología que permita romper y formar enlaces. En las simulaciones de dinámica molecular los enlaces son modelados como osciladores armónicos, por lo que sólo vibran. A su vez, la mayoría de los sistemas bioquímicos, como las enzimas, son demasiado grandes para ser descritos en cualquier nivel de teoría *ab initio*. Para superar las limitaciones de una descripción mecánica cuántica completa y de un tratamiento de mecánica molecular completo se han desarrollado métodos que tratan una pequeña parte del sistema a nivel de la química cuántica (QM), mientras se conserva el campo de fuerza (MM) que es computacionalmente más barato para el resto del sistema. Estos métodos son conocidos como métodos *Hybrid quantum mechanics/molecular mechanics* (QM/MM), la región del sistema en la que tiene lugar el proceso químico se trata a un nivel apropiado de teoría química cuántica, mientras que el resto se describe mediante un campo de fuerza de mecánica molecular (Fig. 1.7). El método QM/MM proporciona energías potenciales y fuerzas. Con estas fuerzas, es posible realizar una simulación de dinámica molecular. Dentro de este enfoque, se puede estudiar la reactividad química en sistemas grandes, como las enzimas.<sup>35</sup>

### Esquema de acoplamiento aditivo



**Fig. 1.7:** Los átomos involucrados en la reacción son considerados con un nivel de teoría QM (magenta), mientras que el resto del sistema es tratado con MM (azul). Figura tomada de la referencia [35].

La energía potencial híbrida QM/MM contiene tres clases de interacciones: interacciones entre átomos en la región QM, entre átomos en la región MM e interacciones entre átomos QM y MM. Las interacciones dentro de las regiones QM y MM son relativamente

sencillas de describir, es decir, a nivel QM y MM, respectivamente. Las interacciones entre los dos subsistemas son más difíciles de describir, y se han propuesto varios enfoques. Estos enfoques pueden dividirse en dos categorías: esquemas de acoplamiento sustractivo y aditivo.<sup>35</sup> Para este estudio se empleó el esquema de acoplamiento aditivo.

En los esquemas aditivos, el sistema QM está integrado en el sistema MM (que es más grande), y la energía potencial para todo el sistema es una suma de términos de energía MM, QM y de acoplamiento QM/MM:

$$V_{QM/MM} = V_{QM}(QM) + V_{MM}(MM) + V_{QM-MM}(QM + MM) \quad (1.9)$$

Aquí, únicamente las interacciones dentro de la región MM se describen en el nivel del campo de fuerza,  $V_{MM}(MM)$ . A diferencia del esquema sustractivo, las interacciones entre los dos subsistemas se tratan explícitamente:  $V_{QM-MM}(QM + MM)$ . Estas interacciones se pueden describir en diferentes grados de sofisticación, principalmente: inmersión mecánica, electrostática y en un ambiente polarizable.<sup>35</sup>

En el enfoque de inmersión electrostática empleado, la interacción de las cargas puntuales MM con los electrones del sistema QM tanto como la interacción entre las cargas puntuales MM y los núcleos QM se toman en cuenta explícitamente. Es decir, la región MM polariza la densidad electrónica QM.<sup>24</sup>

### **Dirigiendo la reacción con un método de muestreo**

El enfoque tradicional para estudiar la reactividad en una computadora ha sido caracterizar puntos estacionarios en la superficie de energía potencial del sistema aislado. Los mínimos se identifican como reactivos y productos, mientras que los puntos de silla de montar de menor energía que conectan estos mínimos se interpretan como los estados de transición. Sin embargo, extender este enfoque a las superficies de energía potencial QM/MM es difícil, debido a la gran dimensionalidad de un sistema QM/MM típico. Como hay muchos más grados de libertad que deben optimizarse, el optimizador de geometría debe ser muy eficiente. Además, el número de mínimos locales en los sistemas de alta dimensión suele ser muy grande. A temperaturas superiores a cero, muchos de estos mínimos están poblados y también hay muchos caminos que los conectan. Por lo tanto, incluso si la optimización se puede llevar a cabo con éxito, podría ser difícil, si no imposible, caracterizar todas las vías que son relevantes para el proceso bajo estudio.

Para comprender la reactividad, se necesita la superficie de energía libre del proceso. Calcular las energías libres requiere un muestreo de la superficie de energía potencial subyacente para generar conjuntos. En equilibrio, la diferencia de energía libre  $\Delta G_{A \rightarrow B}$

entre el estado reactivo (A) y el estado del producto (B), ambos definidos como áreas en el paisaje de energía libre, está determinada por sus poblaciones  $p$ :

$$\Delta G_{A \rightarrow B} = -k_B T \ln \frac{p_B}{p_A} \quad (1.10)$$

dónde  $k_B$  es la constante de Boltzmann y  $T$  la temperatura. Sin embargo, para las reacciones químicas, las barreras que separan los estados A y B son altas, y las transiciones son eventos raros. Por lo tanto, no es probable que ambos estados se muestreen suficientemente en una simulación MD normal para proporcionar una estimación razonable para  $\Delta G_{A \rightarrow B}$ .<sup>35</sup>

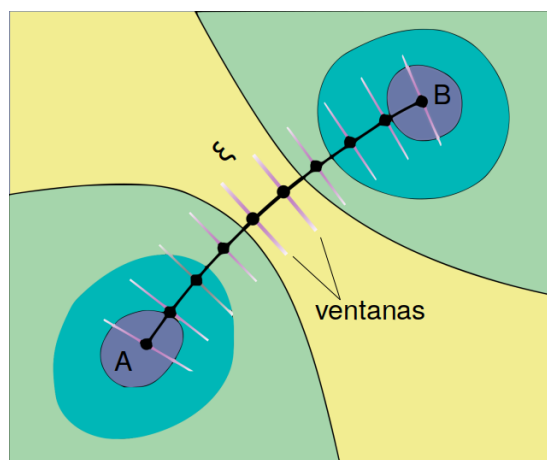
Para un muestreo adecuado de los estados A y B se puede introducir un potencial de sesgo (un término de energía adicional) que conduzca al sistema del estado A al estado B. Después de corregir dicho potencial de sesgo, la energía libre puede calcularse con suficiente precisión. Una sola simulación con un potencial de sesgo no es muy eficiente. Por lo tanto, en la práctica, se realizan varias simulaciones independientes, cada una con un potencial de sesgo diferente. Estos potenciales se llaman paraguas y se colocan en diferentes puntos a lo largo del camino de reacción (Fig. 1.8).<sup>35</sup>

Estos puntos se establecen con base en uno o varios parámetros de orden predefinidos que suelen ser parámetros geométricos, por ejemplo, un estiramiento antisimétrico que involucra al átomo que está siendo transferido y los respectivos átomos donadores y aceptadores.<sup>36</sup> A estos parámetros comúnmente se les conoce como coordenada de reacción ( $\xi$ ).

En cada simulación o ventana, el muestreo se mejora alrededor del centro del paraguas. El muestreo de paraguas (US) produce un conjunto de distribuciones de probabilidad sesgadas. Para generar el perfil de energía libre (conocido como Potencial de Fuerza Media o PMF) para todo el proceso, los resultados de las distintas ventanas se combinan y se corrige el sesgo.<sup>35</sup>

### Método de muestreo de paraguas

El método de *Umbrella Sampling* (US) proporciona la energía libre a lo largo de una coordenada de reacción  $\xi$ . Los potenciales de sesgo pueden tener cualquier forma funcional; a menudo, se emplean potenciales armónicos por su simplicidad. Comúnmente, la combinación de las ventanas y la corrección del sesgo se lleva a cabo mediante el método de análisis de histograma ponderado (WHAM).<sup>37</sup> Para obtener información sobre el algoritmo WHAM, ir al Anexo 5.3.



**Fig. 1.8:** Separación de la coordenada de reacción (línea discontinua) entre dos estados (aquí representados por dos mínimos en la superficie de energía potencial) en ventanas o *paraguas* distintas. El sistema se muestra principalmente perpendicular a la coordenada de reacción en cada ventana. Figura modificada de la Ref. [37]

El potencial de sesgo  $\omega_i$  de la ventana  $i$  es un término de energía adicional, que sólo depende de la coordenada de reacción:

$$E^b(r) = E^u(r) + \omega_i(\xi) \quad (1.11)$$

El superíndice  $b$  denota cantidades sesgadas, mientras que el superíndice  $u$  denota cantidades no sesgadas. Las cantidades sin superíndices son siempre imparciales. Para garantizar el muestreo en todas las regiones de  $\xi$ , el intervalo de interés de  $\xi$  se divide en varias ventanas. En cada ventana, se aplica una función de sesgo para mantener el sistema cerca del punto de referencia  $\xi_i^{ref}$  de la ventana respectiva  $i$ . A menudo, se usa un sesgo armónico simple de fuerza  $K$ :

$$\omega_i(\xi) = K/2(\xi - \xi_i^{ref})^2 \quad (1.12)$$

Después de las simulaciones, las curvas de energía libre se combinan con métodos como WHAM o *Umbrella integration*. Asumiendo un sistema ergódico, la energía no sesgada  $A_i(\xi)$  está dada por la siguiente expresión:

$$A_i(\xi) = -(1/\beta) \ln P_i^b(\xi) - \omega_i(\xi) + F_i \quad (1.13)$$

$P_i^b(\xi)$  se obtiene de una simulación de MD del sistema sesgado y  $\omega_i$  se proporciona analíticamente.

Si las curvas de energía libre  $A_i(\xi)$  de varias ventanas se combinan en una energía libre  $A(\xi)$  global, se debe calcular la  $F_i$  que no se puede obtener directamente del muestreo.

## 1.3 Objetivo general

Utilizando metodologías de la química computacional, determinar con detalle atómico y electrónico el mecanismo de escisión de  $\gamma$ -secretasa, enzima esencial para la producción de los péptidos  $A\beta$  implicados en la enfermedad de Alzheimer.

Con la finalidad de cumplir el objetivo general, este trabajo se desarrolló en dos partes que se presentarán en dos capítulos mencionados a continuación:

En el **Capítulo 2** se desarrollará la determinación de los estados de protonación de la díada catalítica para los sistemas apo-GS y GS-C99<sub>28-55</sub>, comparando los valores de pKa, interacciones y cambios conformacionales obtenidos.

En el **Capítulo 3** se desarrollará la descripción del estudio del mecanismo de escisión de C99 en el sitio de corte  $\epsilon$  (Leu49-Val50), identificando el efecto de la selección QM en los resultados obtenidos, las principales interacciones encontradas y cómo afecta la mutación F51M de C99 en la escisión en este sitio.

Finalmente, en el **Capítulo 4** se presentan las perspectivas para este proyecto y en el **Capítulo 5** la información anexa.

# Determinación de los valores de pKa de la díada catalítica de $\gamma$ -secretasa

## 2.1 Objetivo particular

Determinar del estado de protonación de la díada catalítica de  $\gamma$ -secretasa en su forma apo y en complejo con C99 empleando simulaciones de pH-REMD.

## 2.2 Hipótesis

El ambiente hidrofóbico proporcionado por el péptido disminuirá la acidez de los aspárticos catalíticos con respecto a la forma apo de la enzima. Es decir, favorecerá un estado con menor carga.

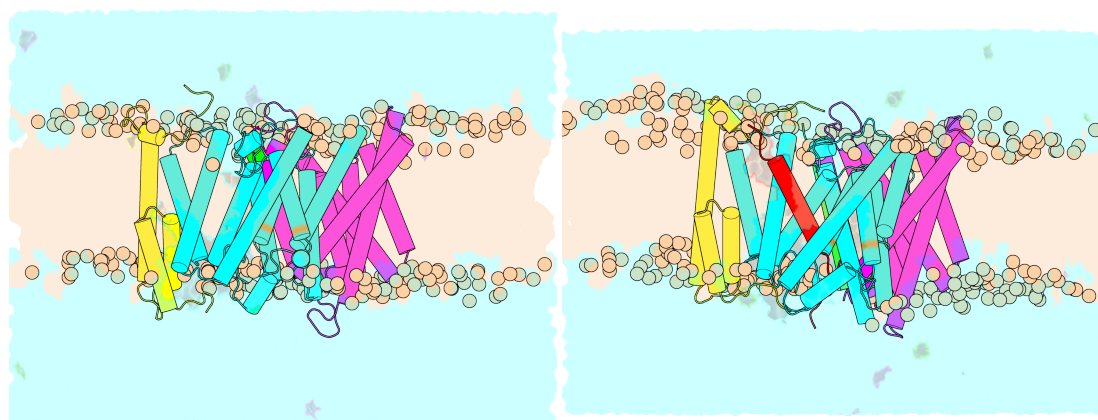
## 2.3 Metodología general para las simulaciones pH-REMD

### 2.3.1 Preparación del sistema

Con la finalidad de 1) determinar el estado de protonación de la díada catalítica de GS a pH fisiológico, 2) identificar la localización preferencial del protón en el estado monoprotonado y 3) comparar el efecto de la unión del sustrato al sitio activo; se llevaron a cabo dos conjuntos de simulaciones de pH-REMD con ocho réplicas a diferentes valores de pH para un modelo de la región transmembranal de GS en su forma apo y otro en su forma unida al sustrato.

Debido a que la estructura 6IYC contiene mutaciones, se llevó a cabo una simulación de dinámica molecular normal para equilibrar el complejo silvestre. El dominio extracelular de nicastrina no fue incluido en las estructuras iniciales debido a que no interactúa directamente con las TMs de PS1 y con la finalidad de reducir el tamaño del sistema. El arreglo especial de los modelos de GS en la membrana de POPC (Palmitoil-oleil-fosfatidil-colina) fue asignado con el servidor web OPM (*Orientation of Proteins in*

Membranes).<sup>38</sup> Ambos modelos se integraron en una membrana de POPC utilizando el constructor de membrana de CHARMM-GUI.<sup>39</sup>



(a) apo-GS

(b) GS-C99<sub>28-55</sub>

**Fig. 2.1:** Modelos de GS empleados para la determinación de los valores de pK de la díada catalítica. Se representan nicastrina (verde), Pen-2 (amarillo), Aph-1 (magenta), PS1 (cian), C99<sub>28-55</sub> (rojo) y la díada catalítica (naranja).

### 2.3.2 Detalles generales

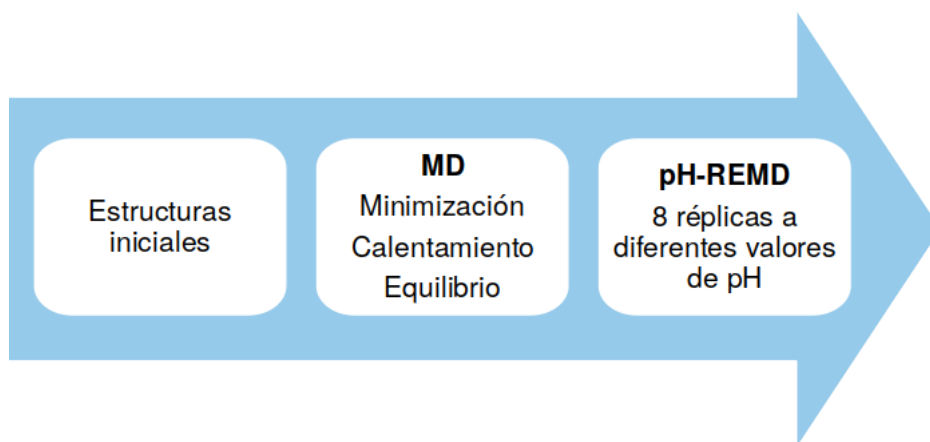
Se empleó el paquete de programas Amber16<sup>24</sup> para llevar a cabo todas las simulaciones en este trabajo. El método de pH-REMD empleado fue el implementado por Swails *et al.*<sup>27</sup> en Amber que considera estados de protonación discretos y solvatación explícita. Los campos de fuerza empleados fueron el campo de fuerza de proteínas *ff14SB*,<sup>40</sup> el campo de fuerza de lípidos *Lipid14*<sup>41</sup> y el campo de fuerza de agua *TIP3P*.<sup>42</sup>

Se llevó a cabo un conjunto de simulaciones de pH-REMD de 100 ns para cada sistema. Los valores de pH de las ocho réplicas fueron asignados por el intervalo de pH de 1 a 8 con separación de una unidad de pH. Entre cada intento de cambio de estado de protonación e intento de intercambio de réplicas se llevaron a cabo 200 fs de simulación MD. Para el sistema apo-GS, además de los Asp catalíticos (Asp257 y Asp385), también se permitió el cambio de los estados de protonación de los aminoácidos titulables (que su estado de protonación puede cambiar) vecinos; los cuáles fueron His81, His163, His214, Glu273, Glu277, Glu280 de PS1, Glu4, Glu9 y Glu10 de Aph-1. Para el sistema GS-C99<sub>28-55</sub>, además de la díada catalítica, se habilitó la modificación de los estados de protonación de los aminoácidos His81, His163, His214, Cys263, Glu273, Glu277, Glu280 de PS1 y Glu4 de Aph-1.



Inicialmente se estableció el mismo intervalo de pH (1 a 8) para los conjuntos de réplicas de ambos sistemas. Para el sistema GS-C99<sub>28-55</sub> este intervalo permitió muestrear los tres estados de protonación de la díada catalítica (diprotonado, monoprotonado y didesprotonado). Sin embargo, al obtener diferentes valores de pKa para la díada catalítica de los dos sistemas; para el sistema apo-GS, no se muestreó el estado diprotonado con el intervalo de pH inicial, por lo que para muestrear los tres estados de protonación fue necesario cambiar el intervalo de pH al intervalo de 0 a 5.6 con separación de 0.8 unidades de pH.

De las simulaciones de pH-REMD se obtuvo el registro de los estados de protonación de los aminoácidos titulables en todo el tiempo de simulación, a partir de cuyo análisis se obtuvieron las fracciones de protonación. En términos generales, la metodología empleada se representa en la Fig. 2.2. Para obtener una descripción detallada sobre la metodología, ir al Anexo 5.2.1.

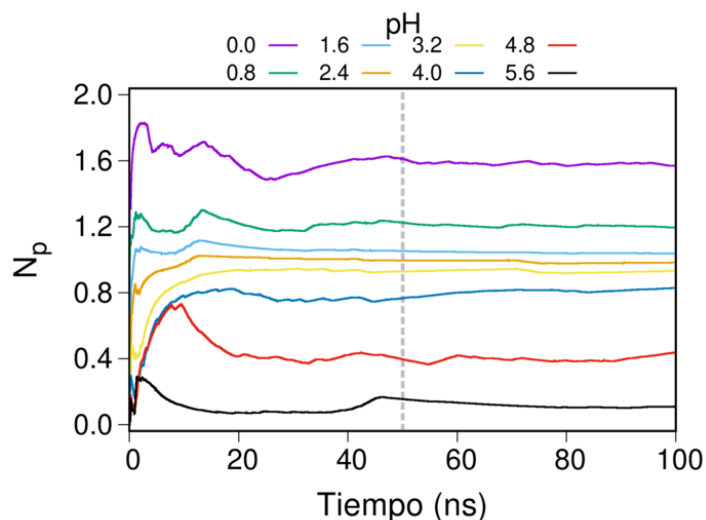


**Fig. 2.2:** Metodología general para la determinación de los estados de protonación de la díada catalítica de GS para los sistemas apo-GS y GS-C99<sub>28-55</sub>.

## 2.4 Resultados y discusión

### 2.4.1 Sistema apo-GS

Se monitoreó el avance de las simulaciones pH-REMD mediante el cálculo de las series de tiempo de las fracciones de protonación ( $f_p$ ) acumulativas de los Asp catalíticos para ambos sistemas de estudio, en la (Fig. 5.3) se representan las del sistema apo-GS. Dado que en este sistema es probable que la titulación de los Asp catalíticos esté acoplada, se consideró la suma de las fracciones de protonación ( $N_p$ ) de Asp257 y Asp385 como criterio de convergencia del muestreo. En la Fig. 2.3 se puede identificar cómo las  $N_p$  son prácticamente constantes a partir de 50 ns. También se puede identificar en la Fig. que el estado monoprotonado ( $N_p = 1$ ) es mayoritario a valores de pH igual a 1.6, 2.4 y 3.2. A su vez, cuando el pH = 0, los estados diprotonado y monoprotonado coexisten en proporciones prácticamente iguales ( $N_p \approx 1.5$ ), por lo que no se tuvo un muestreo a un valor de pH en el que el estado didesprotonado fuera el estado predominante en el intervalo de empleado (con valores de pH positivos). Y finalmente a pH = 5.6, el estado predominante es el estado didesprotonado ( $N_p \approx 0$ ).

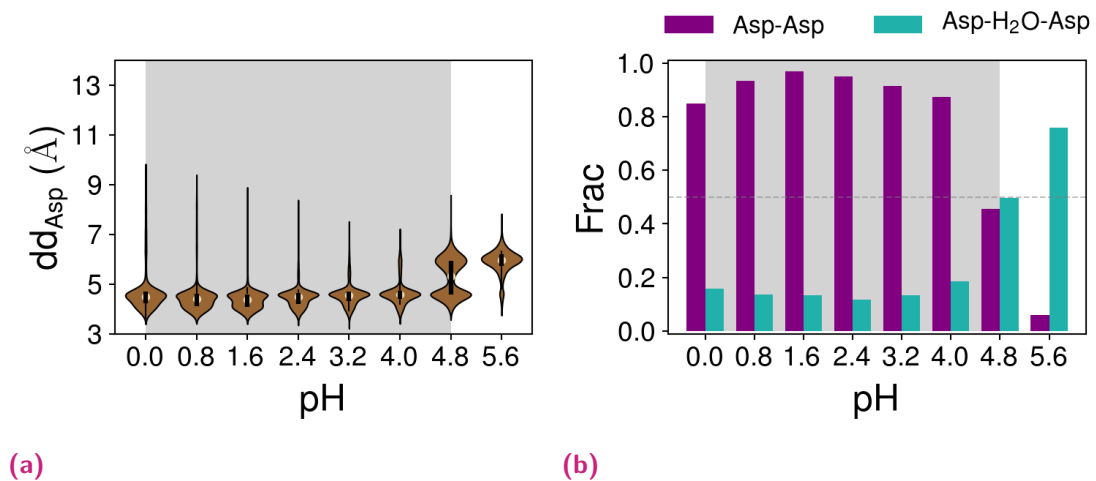


**Fig. 2.3:** Series de tiempo de la suma de las fracciones de protonación ( $N_p$ ) de los Asp catalíticos del sistema apo-GS.

Para llevar a cabo el cálculo de los valores de pKa para cada sistema (apo-GS y GS-C99<sub>28-55</sub>) se evaluó el acoplamiento de las curvas de titulación de los Asp catalíticos, dado que la ecuación a emplear para el cálculo de los valores de pKa depende de ello. En este caso, la titulación podría estar acoplada si la distancia entre los Asp catalíticos ( $dd_{Asp}$ ) es corta y hay una alta probabilidad de formación de puentes de hidrógeno.

En la Fig. 5.4 se representa la distancia  $dd_{Asp}$  a lo largo de las trayectorias a cada valor de pH. En la Fig. 2.4a se representan las gráficas de violín de las  $dd_{Asp}$  en el intervalo de 50 a 100 ns. A valores de pH de 0.0 a 4.0, cuando  $N_p \geq 1$  y existen los estados monoprotonado y diprotonado, se obtuvo una distribución con  $3\text{\AA} < dd_{Asp} < 5\text{\AA}$ . A pH = 5.6, en el que el estado didesprotonado predomina, se obtuvo una distribución de  $dd_{Asp}$  de  $5\text{\AA} < dd_{Asp} < 7\text{\AA}$ . A pH = 4.8, en el que el estado monoprotonado y didesprotonado coexisten en partes iguales ( $N_p \approx 0.5$ ) se tiene una distribución bimodal que se conforma por las dos distribuciones identificadas en el intervalo de pH. Esta distribución bimodal representa la transición de la  $dd_{Asp}$  por el cambio de estado de protonación. En las tendencias de  $dd_{Asp}$  se puede identificar su correlación con los estados de protonación y por lo tanto esta distancia es dependiente del pH.

La Fig. 2.4b muestra que cuando la díada catalítica se encuentra en su estado monoprotonado, está interactuando mediante un puente de hidrógeno (la mayor parte del tiempo). La probabilidad de esta interacción disminuye por la aparición del estado diprotonado (pH = 0.0), en el que las interacciones mediante puentes de hidrógeno están limitadas por geometría. Como es de esperarse, la probabilidad de formación de puentes de hidrógeno entre los Asp catalíticos también disminuye con la aparición del estado didesprotonado (pH  $\geq 4.8$ ) debido a que no hay átomo de hidrógeno que se pueda donar y los grupos carboxilato se repelen. A su vez, la interacción mediante moléculas de agua puente se favorece por la formación de los grupos carboxilatos.



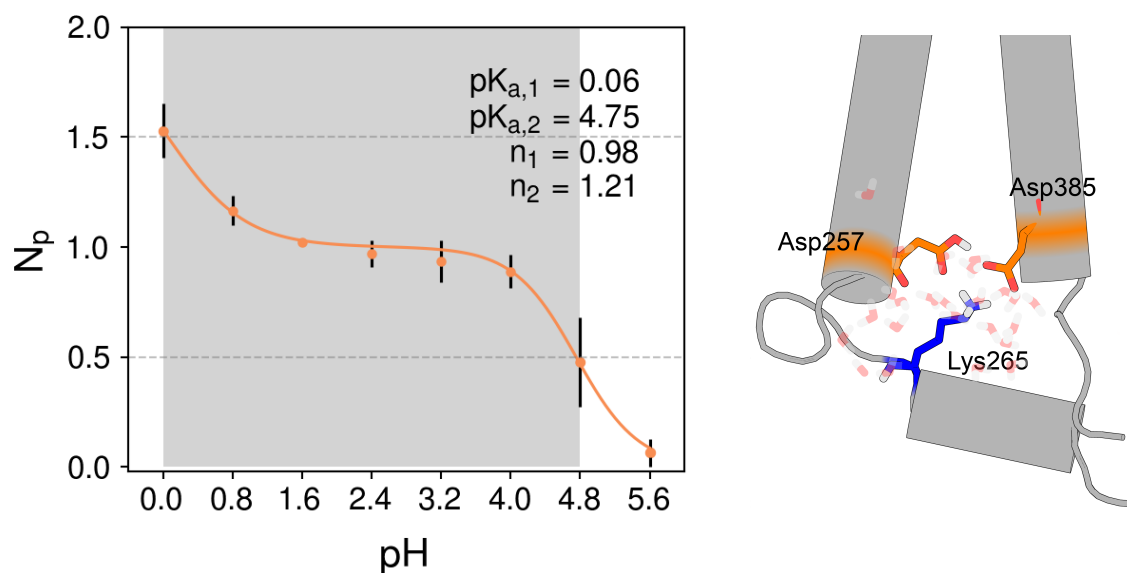
**Fig. 2.4:** La titulación de la díada catalítica del sistema apo-GS se encuentra acoplada. a) Diagramas de violín de las distribuciones de  $dd_{Asp}$  y b) probabilidades de formación de puentes de hidrógeno entre los Asp catalíticos a cada valor de pH.

Con base en el análisis previo se puede consensar que en el sistema apo-GS, la titulación de los Asp catalíticos se encuentra acoplada, por lo que los valores de pKa asociados

a las transiciones de  $N_p$  corresponden a los de un ácido diprótico y no de dos ácidos monopróticos aislados; por lo que estos valores de  $pK_a$  se calculan con la ec. 2.1:

$$N_p = 2 - \frac{1}{1 + 10^{n_1(pK_{a,1} - pH)}} - \frac{1}{1 + 10^{n_2(pK_{a,2} - pH)}} \quad (2.1)$$

De los 50 ns de simulación se determinó  $N_p$  para 5 ventanas de 10 ns. En la Fig. 2.5a se representa la curva de titulación promedio con los valores de  $pK_a$  calculados. El valor del  $pK_a$  del ácido aspártico en disolución acuosa es  $\approx 3.9$ , ambos valores de  $pK_a$  obtenidos son diferentes de este valor. El valor del  $pK_{a,1}$  es de  $0.06 \pm 0.21$  y el valor del  $pK_{a,2}$  es de  $4.75 \pm 0.28$ . Debido a que no se obtuvo un muestreo completo de  $N_p$  ( $0 \leq N_p \leq 2$ ), la determinación del  $pK_{a,1}$  tiene un margen de error grande. Se puede decir que a valores de pH menores que 0, la díada catalítica tendría un estado diprotonado. Tomando en cuenta los valores de  $pK_a$  calculados, el intervalo de predominio del estado monoprotonado es  $0.0 < \text{pH} < 4.75$ , mientras que a valores de pH mayores que 4.75 ambos Asp se encuentran en su estado desprotonado. Es decir, para el sistema apo-GS, a pH fisiológico, la díada catalítica se encuentra en su estado didesprotonado, por lo que de acuerdo con el mecanismo general propuesto, no se puede llevar a cabo la hidrólisis ácido-base en estas condiciones.



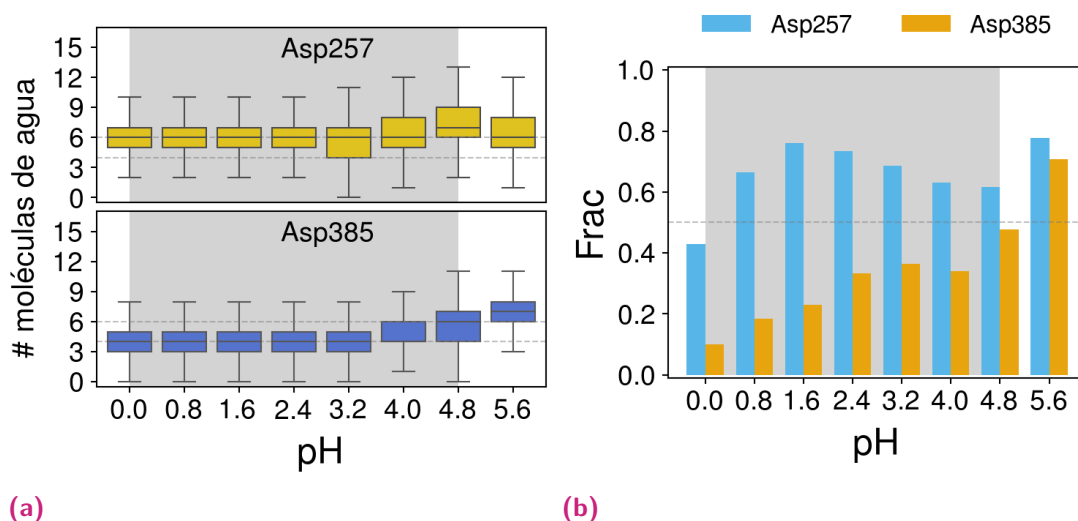
(a) Curva de la titulación. El área sombreada representa la zona de predominio del estado monoprotonado.

(b) Configuración del estado monoprotonado. La Lys265 interactúa con la díada catalítica.

**Fig. 2.5:** Curva de titulación de la díada catalítica de apo-GS.

A pesar de que se identificó que las curvas de titulación de los Asp catalíticos se encuentran acopladas, la Fig 5.3b muestra que el Asp385 tuvo una mayor tendencia

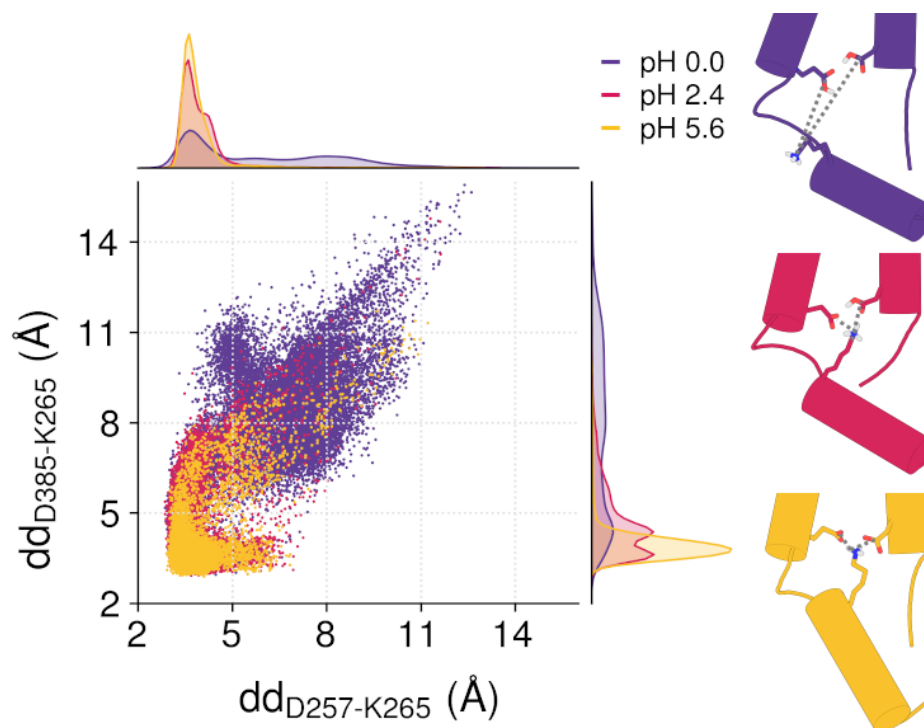
a estar protonado que el Asp257. A su vez, esto está correlacionado con el número de moléculas de agua en la primera capa de hidratación de ambos aminoácidos (Fig. 2.6a); en prácticamente todos los valores de pH muestreados el Asp257 tiene una mediana de 6 moléculas de agua de hidratación (excepto a pH = 4.8, cuya mediana es 7), mientras que el Asp385 tiene más frecuentemente 4 moléculas de agua de hidratación a valores de pH <4.0. Esta tendencia podría implicar que hay un ambiente menos hidrofílico alrededor del Asp385, lo que favorecería su protonación.



**Fig. 2.6:** Principales interacciones de los aspárticos catalíticos del sistema apo-GS. a) Gráficas de cajas para las moléculas de agua en la primera capa de solvatación de los Asp catalíticos. b) Probabilidades de formación de puentes de hidrógeno entre los Asp catalíticos y Lys265 a cada valor de pH.

En búsqueda de las principales interacciones del par catalítico con otros aminoácidos en su entorno, se encontró que la Lys265 es el aminoácido con el que principalmente forman interacciones ambos residuos (Fig. 2.5b). Este aminoácido se encuentra en el extremo C-terminal de TM6 de PS1 (TM6-CT), el cual es formado por su autoescisión. El fragmento TM6-CT se encuentra en contacto con el ambiente acuoso en la superficie de la membrana. En la Fig. 2.6b se representa una mayor probabilidad de formación de puentes de hidrógeno Asp257-Lys265 que Asp385-Lys265. Este puente de hidrógeno sucede cuando el Asp se encuentra desprotonado y es comúnmente conocido como puente salino, ya que se da entre un residuo cargado positivamente y otro cargado negativamente. Con base en esto es posible sugerir que la protonación de un Asp o el otro está relacionada con su capacidad para formar este puente salino.

Debido a que la determinación de puentes de hidrógeno es una selección binaria (hay o no), se calcularon las distancias entre el nitrógeno de la cadena lateral de la Lys265 (NZ) y los carbonos del grupo carboxilato de la cadena lateral de los Asp (CG). En la



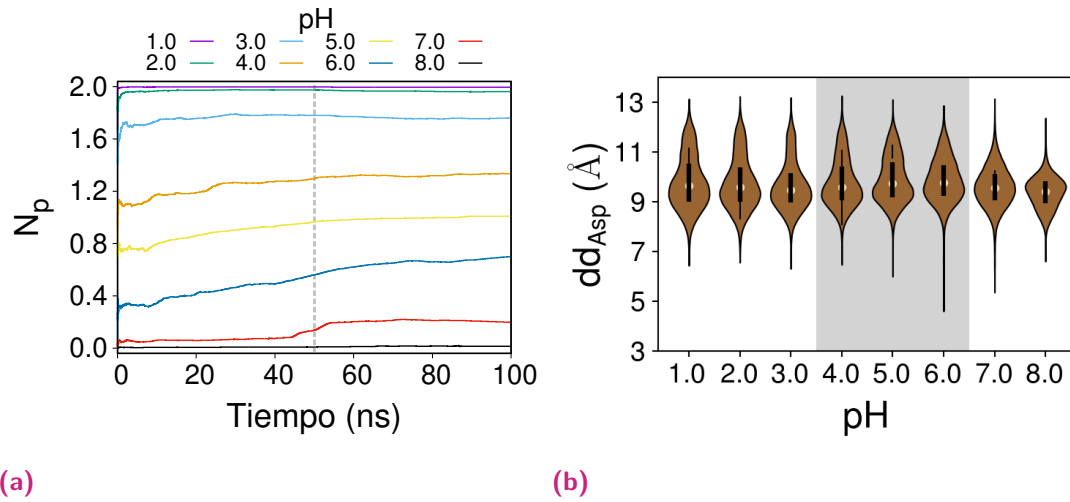
**Fig. 2.7:** Distancias entre las cadenas laterales de Lys265 y de los Asp catalíticos a tres valores de pH diferentes para el sistema apo-GS.

Fig. 5.7 se representan las distancias Asp257-Lys265 en el eje x y Asp385-Lys265 en el eje y el color representa la evolución temporal. Esta representación permite identificar que la evolución de esta distancia es dependiente del pH. En la Fig. 2.7 se muestra la distribución de esta distancia (en la segunda mitad de las simulaciones) a tres valores de pH que representan los tres estados de protonación. Como era de esperarse, a pH = 0.0 en el que coexisten el estado diprotonado y monoprotonado, ambos Asp pierden su capacidad para formar un puente salino con la Lys265, aunque el Asp257 es el que tiene una mayor probabilidad de formarlo. Igualmente, a pH = 2.4 el Asp257 tiene la mayor parte del tiempo una distancia más corta con la Lys265 que el Asp385. Y finalmente, cuando el estado didesprotonado es mayoritario se forma un puente salino entre los tres aminoácidos.

#### 2.4.2 Sistema GS-C99<sub>28-55</sub>

En la Fig. 2.8a se representan las series de tiempo de la suma de las fracciones de protonación del par catalítico del sistema GS-C99<sub>28-55</sub> para cada pH. Comparado con el sistema apo-GS, las  $N_p$  tuvieron menos variación en los primeros 50 ns. De esta gráfica se puede identificar que efectivamente se muestreó todo el espacio de  $N_p$  ( $0 < N_p < 2$ ). El estado diprotonado predomina a pH = 1.0, 2.0, 3.0, el monoprotonado a pH =

4.0, 5.0 y el didesprotonado a pH = 7.0, 8.0. A pH = 6.0 hay una transición entre el estado didesprotonado y monoprotonado como el estado predominante a lo largo de la trayectoria.



**Fig. 2.8:** Las curvas de titulación de los aspárticos catalíticos no se encuentran acopladas en el sistema GS-C99<sub>28-55</sub>, ya que no interactúan directamente entre sí. a) Series de tiempo de la suma de las fracciones de protonación ( $N_p$ ) de los Asp catalíticos. b) Diagramas de violín de las distribuciones de  $dd_{Asp}$  a cada valor de pH.

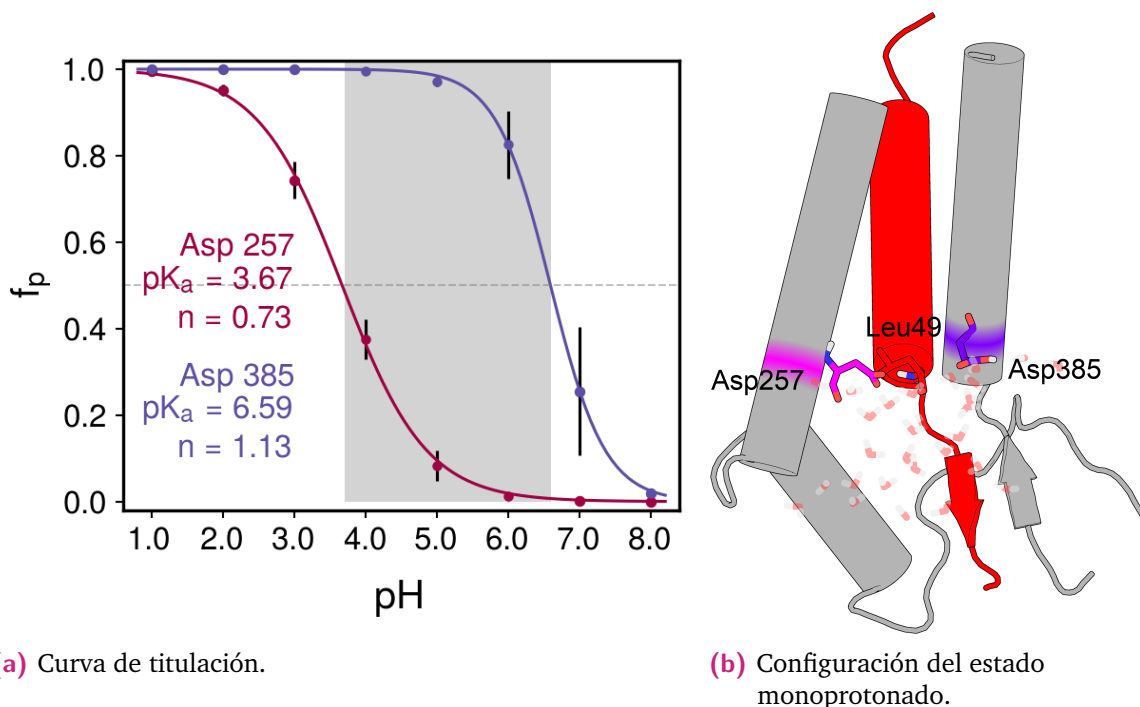
Al igual que para el sistema apo-GS se evaluó si la titulación de los Asp se encontraba acoplada. Como se puede observar en las Fig. 5.9 y 2.8b, las distancias entre los carbonos de los grupos carboxilato laterales (CG) de los Asp catalíticos son grandes como para permitir una transferencia de protón ( $dd_{Asp} > 7$ ) y no se identifica una correlación con el pH. Así mismo, la probabilidad de formación de puentes de hidrógeno entre ellos es prácticamente nula. por lo que la titulación de los Asp no está acoplada en este sistema.

Entonces, los Asp catalíticos tienen valores de pKa independientes y se pueden calcular con la ecuación de Hill:

$$f_p = 1 - \frac{1}{1 + 10^{n(pK_a - pH)}} \quad (2.2)$$

En la que  $f_p$  es la fracción de protonación. Se empleó la segunda parte de las simulaciones para llevar a cabo el cálculo de los valores de pKa y el análisis de interacciones. Se obtuvo  $f_p$  para 5 ventanas de 10 ns. En la Fig. 2.9 se representan las curvas de titulación promedio con los valores de pKa calculados para el Asp257 y el Asp385. El valor del pKa del Asp257 es aproximado al del ácido aspártico libre ( $\approx 3.9$ ), mientras que el valor del pKa del Asp385 es 6.59 que es mucho mayor. De acuerdo con los valores de pKa obtenidos,  $3.67 \pm 0.10$  para el Asp257 y  $6.59 \pm 0.22$  para el Asp385, los intervalos de pH de predominio son:  $pH < 3.67$  para el estado diprotonado,  $3.67 < pH < 6.59$  para

el monoprotonado y  $\text{pH} > 6.59$  para el didesprotonado. Al igual que el sistema apo-GS el Asp385 tiene una tendencia mayor a protonarse que el Asp257, pero en contraste, en este sistema hay una probabilidad de 25.5% de encontrar al Asp385 protonado a  $\text{pH}$  fisiológico ( $\approx 7$ ). Por lo que, en presencia del péptido C99<sub>28-55</sub>, hay una alta probabilidad de que se lleve a cabo el mecanismo general de hidrólisis ácido-base.



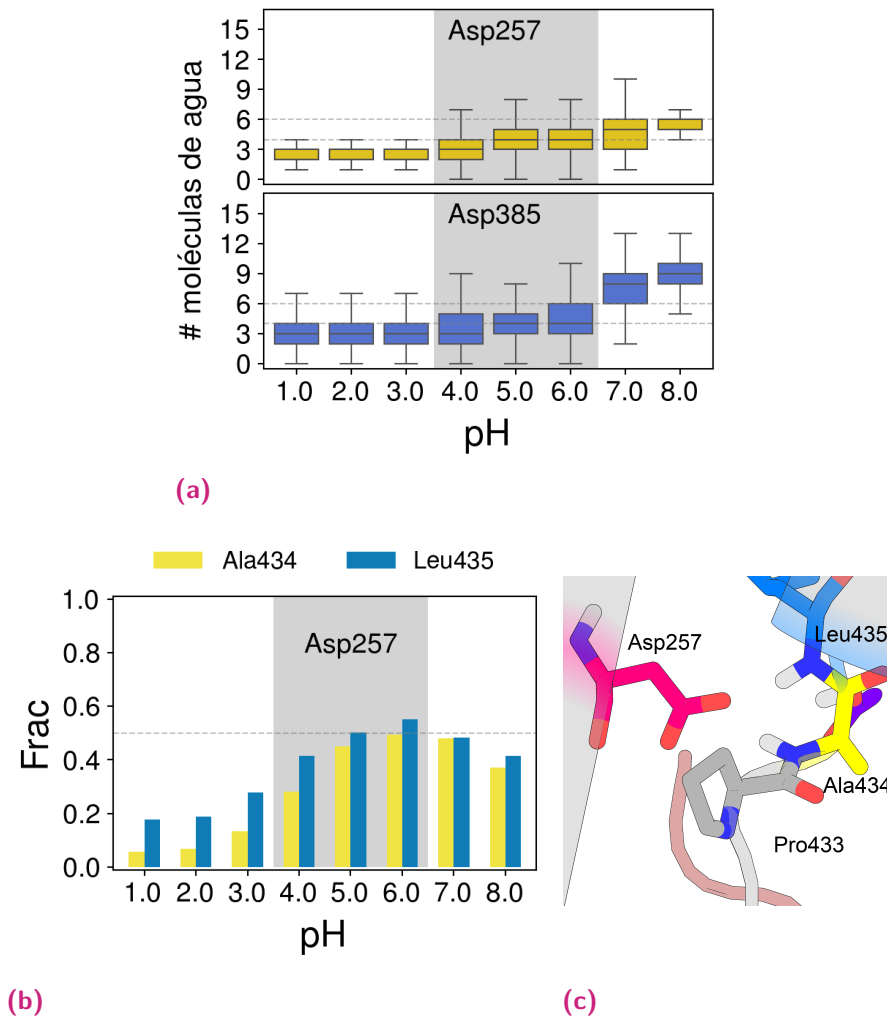
**Fig. 2.9:** Curvas de titulación de la díada catalítica de GS-C99<sub>28-55</sub>.

En promedio, la hidratación es similar para los Asp, excepto a  $\text{pH} > 6.0$ , cuando hay más moléculas de agua solvatando el Asp385 con respecto al Asp257 (Fig. 2.10a).

Para este sistema, la distancia inicial entre los Asp catalíticos y la Lys265 fue larga y se mantuvo así a lo largo de la trayectorias (Fig. 5.13), de manera que no se formaron los puentes salinos observados para apo-GS. Sin embargo, se identificó que la cadena lateral del Asp257 forma interacciones con los átomos del esqueleto de la Ala434 y la Leu435 (Fig. 2.10b), que son dos aminoácidos del sitio conservado PAL,<sup>43,44</sup> del que se sabe que tiene un papel importante en la actividad enzimática, pero que no ha sido explicado. Estas interacciones tienen una tendencia correlacionada al estado monoprotonado de la díada catalítica; es decir, cuando se cumple el criterio de actividad con respecto a los estados de protonación, el Asp257 mayormente desprotonado es estabilizado por estas interacciones de puente de hidrógeno (Fig. 2.10c).

A su vez, los Asp catalíticos tuvieron cierta probabilidad de formar puentes mediante agua con el sitio escindible  $\gamma$  de la vía de escisión que culmina en la formación de A $\beta$ 40



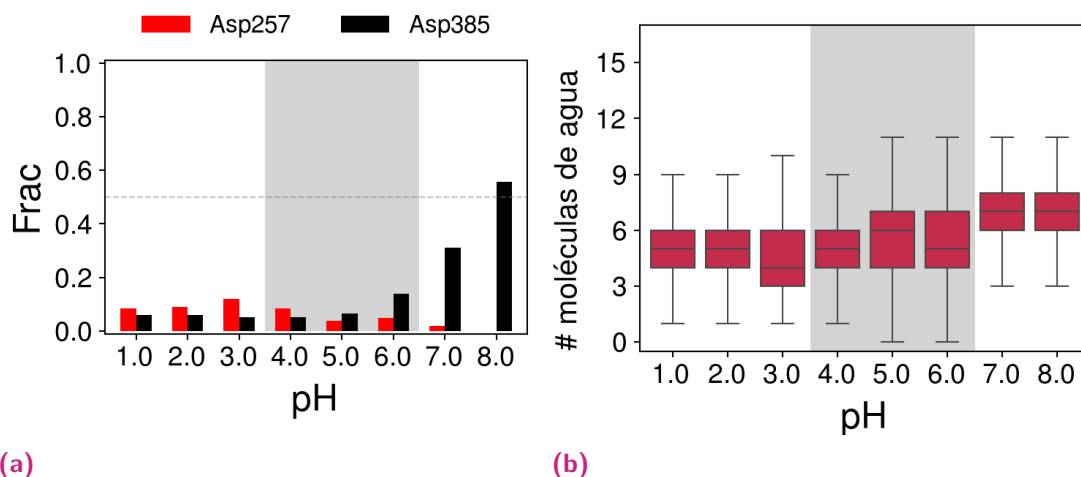


**Fig. 2.10:** Principales interacciones de la díada catalítica del sistema GS-C99<sub>28-55</sub>. a) Gráficas de cajas de las moléculas de agua en la primera capa de solvatación de los Asp catalíticos. b) Probabilidades de formación de puentes de hidrógeno entre los Asp catalíticos y sitio conservado PAL a cada valor de pH. c) El Asp257 desprotonado forma puentes de hidrógeno con la cadena lateral de los aminoácidos Ala434 y Leu435.

(Fig. 2.11a). Aunque esta interacción no sucedió en un alto grado, en promedio, a todos los valores de pH, la Leu49 tuvo al menos 4 moléculas de agua en su primera capa de solvatación (Fig. 2.11b).

La probabilidad de que uno de los Asp catalíticos se encuentre protonado a pH fisiológico, la presencia de interacciones entre un Asp y el sitio conservado PAL, la presencia de moléculas de agua que interactúan con el sitio escindible y la díada catalítica son características que atribuyen a este sistema un estado activado.

Además de la ausencia del puente salino Asp-Lys265, se identificó mediante el *RMSF* (*Root Mean Square Fluctuation*) que el TM6-CT tuvo una mayor movilidad en el sistema

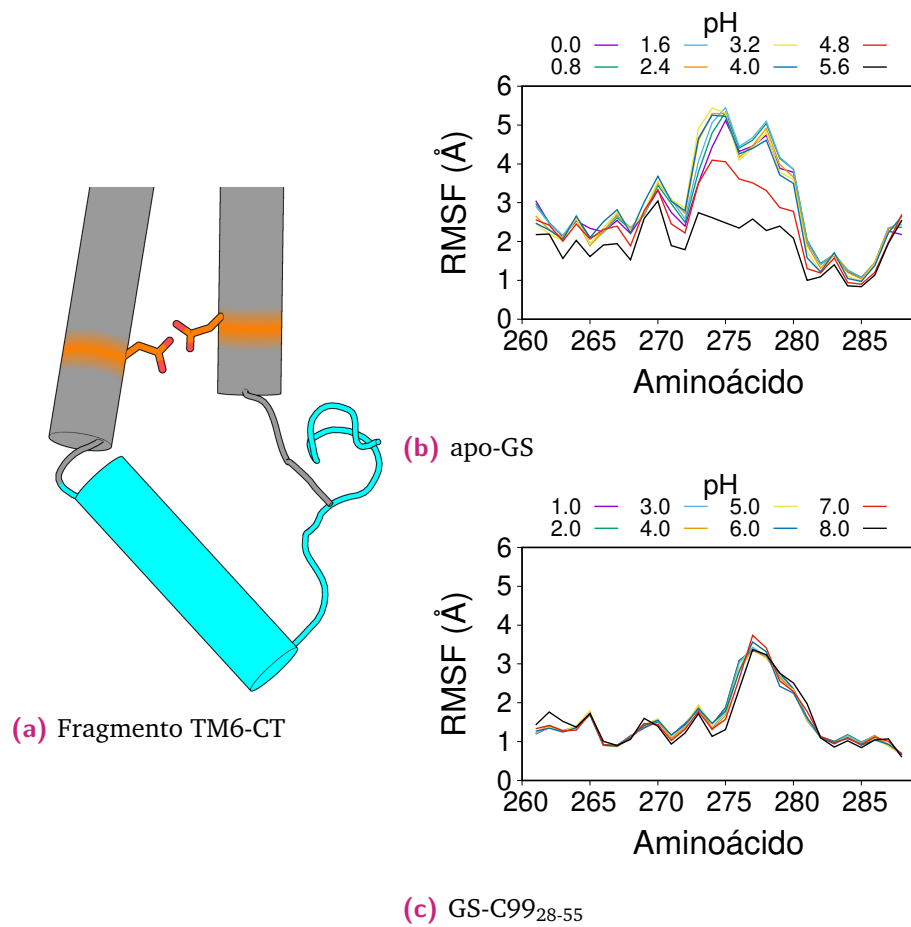


**Fig. 2.11:** Interacciones de la Leu49 de C99 con la díada catalítica y moléculas de agua para el sistema GS-C99<sub>28-55</sub>. a) Probabilidades de formación de puentes de hidrógeno con los aspárticos catalíticos. b) Gráfica de cajas de las moléculas de agua en su primera capa de solvatación a cada valor de pH.

apo-GS (Fig. 2.12). Ya que la distancia inicial entre Lys265 y la díada catalítica para los dos sistemas es diferente, se pueden proponer dos posibilidades: 1) esta distancia y la movilidad de TM6-CT está determinada por la estructura inicial y 2) como se ha observado para otras aspartil proteasas,<sup>18</sup> la ruptura y formación de un puente salino con Lys o Arg asociado a un cambio conformacional puede representar el papel de un mecanismo de activación/inactivación. Es decir, el desplazamiento del TM6-CT y la ruptura del puente salino Lys-Asp podrían conducir a la activación enzimática de GS mediante un ajuste inducido.

## 2.5 Conclusiones

Se determinaron los valores de pKa para los sistemas apo-GS y GS-C99<sub>28-55</sub> y se determinó que para el sistema apo-GS el estado monoprotonado predomina en el intervalo  $0.06 < \text{pH} < 4.75$ , mientras que para el sistema GS-C99<sub>28-55</sub> predomina en el intervalo  $3.67 < \text{pH} < 6.59$ . Se identificaron las principales interacciones de los Asp catalíticos en cada sistema. En el sistema apo-GS, los Asp interactúan principalmente entre sí y con la Lys265, mientras que para el sistema GS-C99 prácticamente no interactúan entre sí ni con la Lys265, pero sí con la Ala434 y la Leu435 del sitio conservado PAL y con la Leu49 (el sitio escindible) de C99. El desplazamiento en el intervalo de predominio del estado monoprotonado y las interacciones encontradas en el sistema GS-C99 proporcionan información sobre la actividad enzimática. Las diferencias entre las distancias



**Fig. 2.12:** RMSF del TM6-CT de PS1 (en el intervalo de 50-100 ns) sobre todas las trayectorias para cada pH.

Asp-Lys265 y la movilidad del TM6-CT proporcionan información sobre un posible cambio conformacional asociado a la activación de la enzima.

# Estudio del mecanismo de escisión de $\gamma$ -secretasa sobre el péptido C99<sub>28-55</sub>

## 3.1 Objetivo particular

Estudiar el mecanismo de escisión de C99 por GS en el sitio escindible  $\epsilon$  con la metodología QM/MM e identificar los aminoácidos que contribuyen al mecanismo de escisión.

## 3.2 Hipótesis

Los aminoácidos conservados de los motivos GXGD y PAL podrían contribuir en el mecanismo de escisión.

## 3.3 Metodología general para el estudio QM/MM

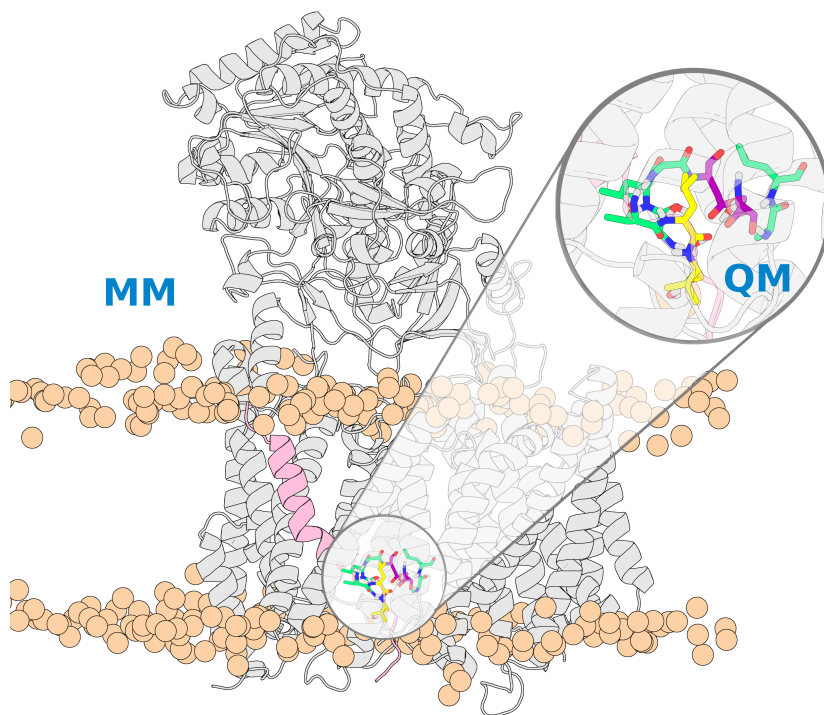
### 3.3.1 Preparación del sistema

Como fue mencionado en la preparación del sistema del capítulo anterior. Se generó un sistema del complejo GS-C99<sub>28-55</sub> a partir de la estructura 6IYC del PDB. Se llevó a cabo una simulación de 200 ns de dinámica molecular normal para este sistema. Se calcularon las distancias entre los carbonos del grupo carboxilo de la cadena lateral de los Asp catalíticos y se seleccionó como estructura inicial la conformación en la que se encontró la distancia más corta en los últimos 10 ns de simulación.

### 3.3.2 Detalles generales

Teniendo una estructura inicial, se eligió la metodología QM/MM para estudiar el mecanismo que se lleva a cabo en el sitio activo con un método QM y el resto del sistema con un campo de fuerza MM (Fig. 3.1). Se empleó el método de *Umbrella Sampling* para dirigir la reacción. La región QM se trató con método DFTB3<sup>45,46</sup> que es un método aproximado de Química Cuántica basado en DFT que no requiere una constante

evaluación de integrales. A su vez, se empleó el enfoque QM/MM implementado en Amber<sup>47</sup> con un esquema de acoplamiento aditivo. Los campos de fuerza empleados para la descripción de la región MM fueron *ff14SB*,<sup>40</sup> *Lipid14*,<sup>41</sup> y *TIP3P*.<sup>42</sup>

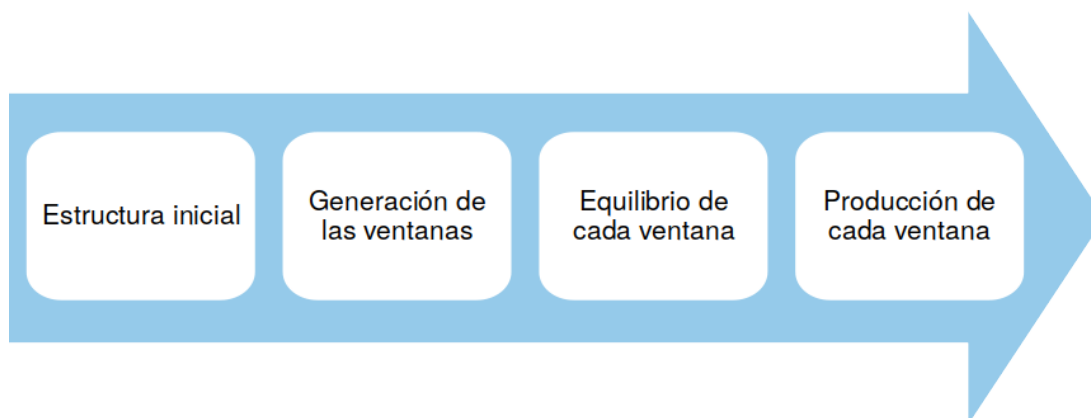


**Fig. 3.1:** Representación de las regiones tratadas con el método QM y con el campo de fuerza de MM para el sistema del complejo GS-C99<sub>28-55</sub>.

La estructura inicial se equilibró seleccionando la región QM. Se generaron cinco réplicas de cada muestreo, excepto del muestreo de espaciamiento de la coordenada de reacción de 0.02 Å (será explicado más adelante). Para la primera parte de la reacción se llevó a cabo un muestreo con una constante de fuerza para ajustar la coordenada de reacción de 50 kcal/molÅ<sup>2</sup>. Para la segunda parte de la reacción, la constante de reacción empleada fue de 100 kcal/molÅ<sup>2</sup> con una restricción en el enlace gem-diol formado de 50 kcal/molÅ<sup>2</sup>. En la Fig. 3.2 se representa de manera general la metodología empleada. Para conocer detalles adicionales sobre la metodología, ir al Anexo 5.2.2.

### 3.4 Resultados y discusión

El estudio del mecanismo de escisión de C99 en el sitio  $\epsilon$ , entre los aminoácidos Leu49 y Val50 por la enzima GS, se llevó a cabo con base en el mecanismo general de hidrólisis ácido-base. Como indica este mecanismo, la reacción se lleva a cabo en dos partes: 1) la

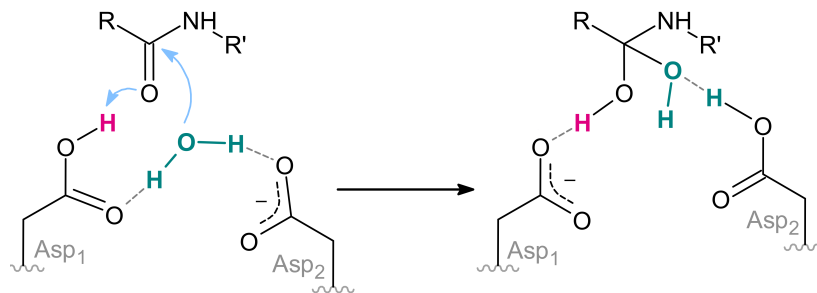


**Fig. 3.2:** Metodología general para el estudio del mecanismo de escisión de C99 por la enzima GS.

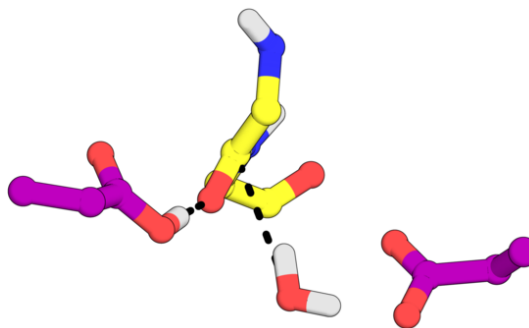
formación del intermediario gem-diol y 2) la ruptura del enlace peptídico. Por lo tanto, el estudio computacional de este mecanismo también se llevó a cabo en dos partes, para las cuales la coordenada de reacción (parámetro geométrico empleado para dirigir la reacción) también fue elegida con base en el mecanismo general.

### 3.4.1 Parte 1 - Formación del intermediario gem-diol

De acuerdo con el mecanismo general de hidrólisis, la formación del intermediario de reacción es promovida por el ataque nucleofílico de una molécula de agua al carbono ( $C=O$ ) y la protonación simultánea del oxígeno del grupo carbonilo ( $C=O$ ) por el hidrógeno ácido (Fig. 3.3a). Tomando en cuenta esto, se definió la coordenada de reacción con base en las dos distancias entre átomos relacionadas con los pasos antes mencionados, la coordenada de reacción está dada por la ec. 3.1.



- (a) Primera parte del mecanismo general de hidrólisis ácido-base de las aspartil proteasas.

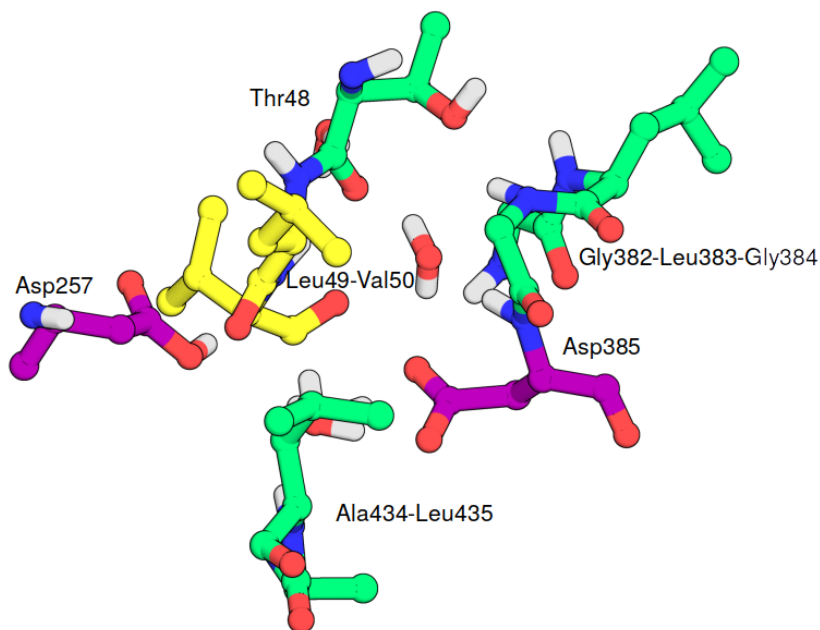


- (b) Configuración inicial de los aminoácidos implicados en la reacción y la molécula de agua. Las líneas punteadas representan las distancias consideradas para la definición del coordenada de la primera parte de la reacción.

$$\xi = -d_{(C_{Leu49}, O_{H_2O})} - d_{(O_{Leu49}, H_{DAsh})} \quad (3.1)$$

**Fig. 3.3:** Definición de la coordenada de la primera parte de la reacción.

La selección inicial de los aminoácidos y moléculas de agua a considerar en la parte QM se llevó a cabo tomando en cuenta las interacciones de puente de hidrógeno que se formaban directa e indirectamente con los aminoácidos implicados en la reacción. En la Fig. 3.4 se representa la selección con la que se llevaron a cabo las dos partes de la reacción.

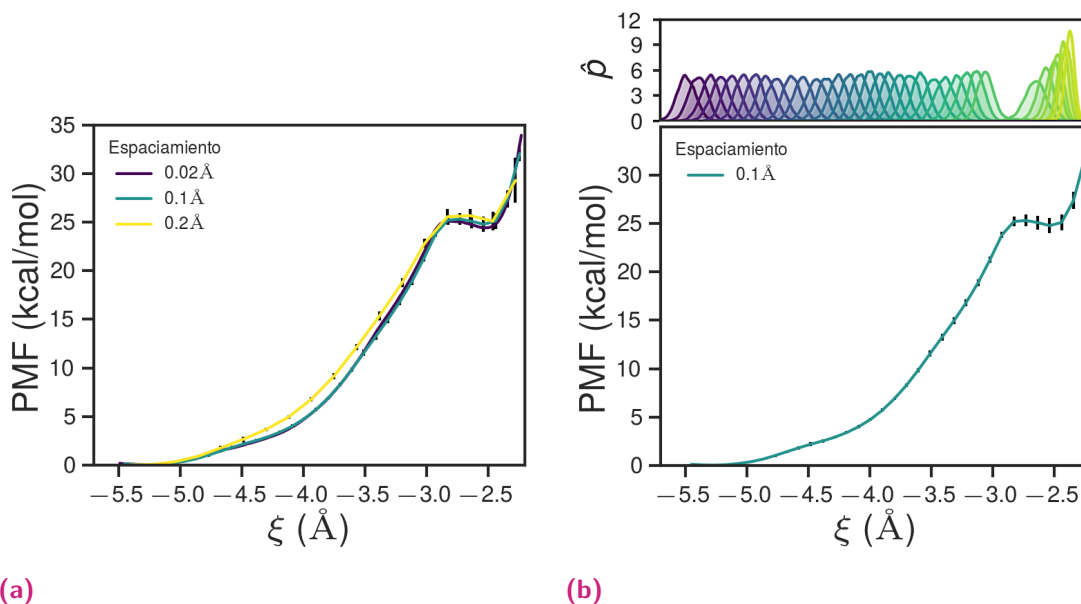


**Fig. 3.4:** Configuración inicial de los aminoácidos y moléculas de agua tomadas en cuenta para el estudio del mecanismo de reacción. La díada catalítica se representa en color púrpura, los aminoácidos que forman el enlace escindible se representan en color amarillo y en color verde se representan los demás aminoácidos tomados en cuenta en la parte QM.

Una vez definidas la coordenada de reacción y la selección de átomos en la región QM, se llevaron a cabo tres muestreos de la coordenada de reacción de  $-5.5 \text{ \AA}$  (de la estructura inicial) a  $-2.0 \text{ \AA}$  (aproximada con base en las distancias de enlace esperadas). Cada uno de estos muestreos se llevó a cabo generando ventanas separadas por  $0.02 \text{ \AA}$ ,  $0.1 \text{ \AA}$  y  $0.2 \text{ \AA}$  respectivamente. Es de esperarse que mientras más próximas se encuentren las ventanas, mejor será el muestreo; sin embargo, un sobremuestreo no es adecuado ya que aumenta el peso de los estados con probabilidades bajas y es más costoso computacionalmente. En la Fig. 3.5a se representan los tres perfiles energéticos obtenidos a partir de estos muestreos. Con el espaciamiento de  $0.1 \text{ \AA}$  y  $0.2 \text{ \AA}$  se llevaron a cabo cinco réplicas, en el caso del espaciamiento de  $0.02 \text{ \AA}$  sólo una, debido a la gran cantidad de ventanas generadas en este muestreo. En esta figura se puede identificar que no hay una variación apreciable entre el PMF obtenido para el espaciamiento de  $0.1 \text{ \AA}$  comparado con el de  $0.02 \text{ \AA}$  y sin embargo, sí hay una gran ventaja en la disminución



de ventanas generadas para el primer caso (0.1 Å). Es por ello que el espaciamiento de 0.1 Å es adecuado para estudiar la primera parte de la reacción (Fig. 3.5b). En la Fig. 3.5b se representan las distribuciones de las ventanas generadas para un muestreo del avance de reacción de la formación del intermediario gem-diol con un intervalo de la coordenada de reacción de -5.5 Å a -2.0 Å cada 0.1 Å.

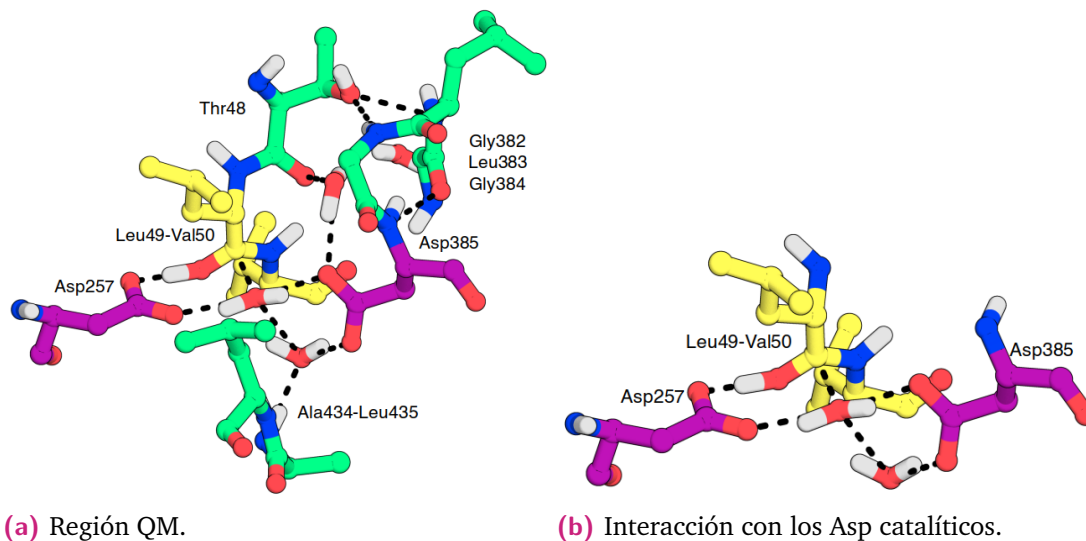


**Fig. 3.5:** Selección del intervalo de muestreo de la coordenada de reacción para la formación del intermediario gem-diol. a) Perfiles energéticos obtenidos de los tres muestreos de la coordenada de reacción con diferente espaciamiento. b) Distribución de las ventanas de *Umbrella Sampling* (arriba). Perfil energético elegido para la descripción del mecanismo (abajo).

### Estado de transición I

Como se puede identificar en la Fig. 3.5b, a pesar de que se generaron ventanas cada 0.1 Å, hay un intervalo que tiene una densidad de probabilidad baja; en este intervalo en el que el sistema se resiste a la restricción de la coordenada de reacción se encuentra el estado de transición. Con una coordenada de reacción de  $\approx -2.73$  Å y una energía de formación de  $\approx 25.3$  kcal/mol, la configuración del estado de transición I se representa en la Fig. 3.6a. Se ha reportado una energía de formación del estado de transición I de la escisión de APP por BACE-1 ( $\beta$ -secretasa) de 19.6 kcal/mol, obtenida mediante un estudio QM/MM (ONIOM:B3LYP/Amber).<sup>48</sup> Si bien la energía obtenida en este estudio es mayor, la distribución de los átomos es similar, a diferencia de que aquí se identificó un aporte adicional de una interacción con el Asp385 mediante la segunda molécula de agua. En este estudio empleamos un método de orden bajo para la región QM debido al

costo energético del método de muestreo, priorizando la caracterización conformacional sobre la precisión. En la Fig. 3.6a se representa cómo el estado de transición no sólo es estabilizado por las interacciones con los Asp catalíticos (Fig. 3.6b), sino también por una red de puentes de hidrógeno con los demás aminoácidos en la región QM.



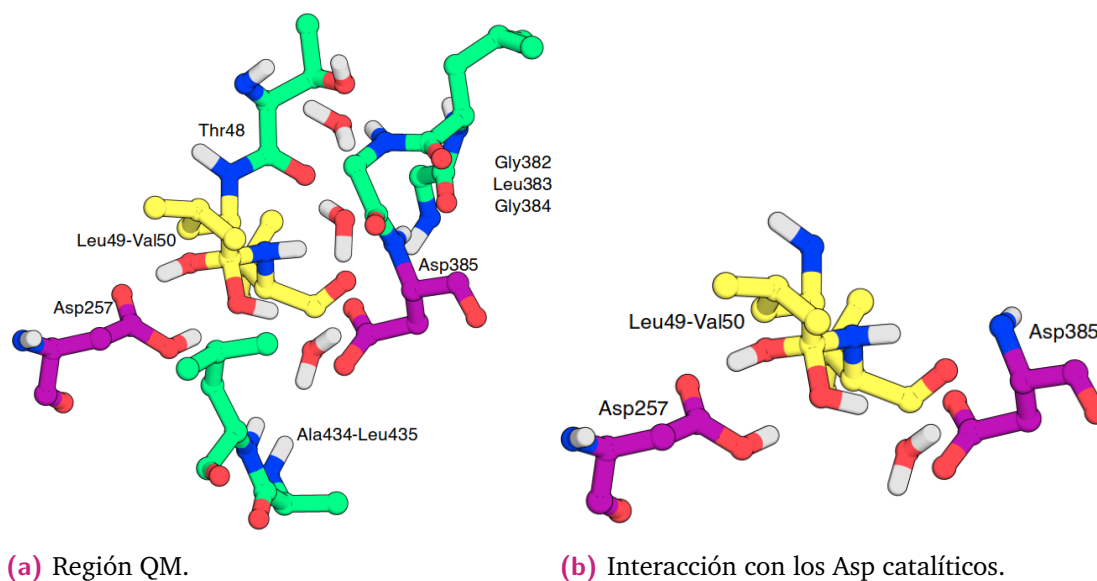
**Fig. 3.6:** Configuración del estado de transición I.

### Intermediario gem-diol

Del perfil energético de la primera parte de la reacción se obtuvo el intermediario con una coordenada de reacción de  $\approx 2.53 \text{ \AA}$  y un potencial de fuerza media de  $\approx 24.8 \text{ kcal/mol}$ . La diferencia de energía entre el estado de transición I y el intermediario de reacción obtenida es de apenas un poco más que  $0.5 \text{ kcal/mol}$ . En contraste con  $4.9 \text{ kcal/mol}$ , diferencia obtenida para la reacción catalizada por BACE-1 (estudio antes mencionado). Esto se debe principalmente a que el estudio citado fue llevado a cabo sólo con optimizaciones puntuales y aquí se llevó a cabo un barrido completo, pero sin optimizaciones. La configuración del intermediario gem-diol se representa en la Fig. 3.7, en la que debido a que la formación y ruptura de enlaces se ha llevado a cabo, la estructura se encuentra en un estado más relajado comparada con el estado de transición I.

### 3.4.2 Modificando la región QM

Una vez que se completó la primera parte de la reacción, hay una pregunta importante qué hacer, ¿todos los aminoácidos tomados en cuenta en la región QM contribuyen a la reacción? No hay estudios reportados sobre el mecanismo de escisión de GS, por lo que



**Fig. 3.7:** Intermediario gem-diol.

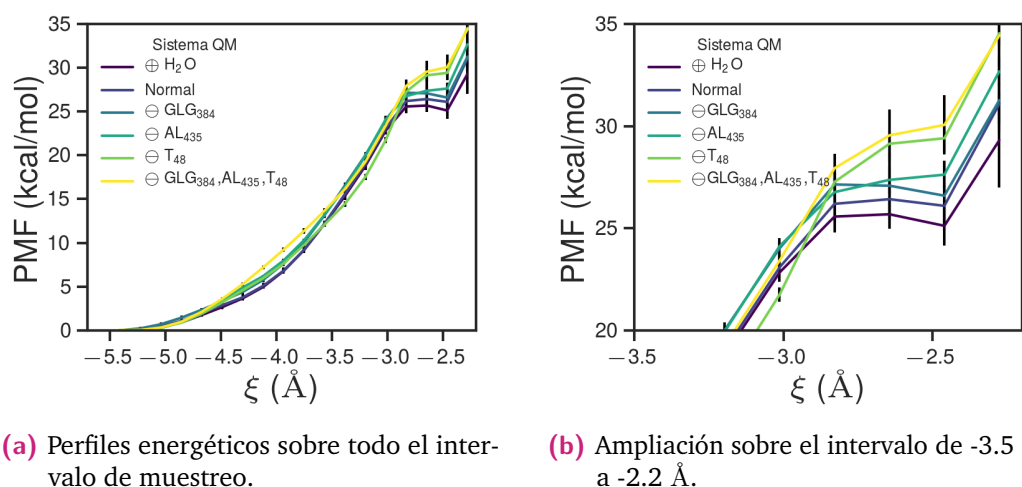
no hay un punto de comparación. Con el objetivo de responder esta pregunta, se llevó a cabo la primera parte de la reacción suprimiendo cada vez algunos aminoácidos de la selección QM. Para esto se empleó el espaciamiento de muestreo de 0.2 Å debido a que en la Fig. 3.5a se puede ver que permite reproducir un PMF adecuado comparado con los otros probados y con un menor número de ventanas (menos tiempo de simulación). Cada muestreo se llevó a cabo por quintuplicado.

Es importante señalar que la selección QM se hizo con base en las interacciones encontradas en la configuración inicial, los aminoácidos seleccionados se pueden separar principalmente en tres fragmentos: AL<sub>435</sub> del motivo conservado PAL, GLG<sub>384</sub> del motivo conservado GXGD y la Thr48, que es un aminoácido implicado en el otro sitio de escisión  $\epsilon$  posible (Thr48-Leu49).

En la Fig. 3.8 se representan los perfiles energéticos obtenidos. Considerando la limitación de emplear un método de bajo orden y posiblemente la falta de optimización, se pueden observar diferencias en los perfiles obtenidos cambiando la selección de la región QM. Las observaciones principales son: 1) como se esperaba, la energía más baja corresponde a la selección de todos los aminoácidos elegidos inicialmente y la más baja cuando sólo se consideran los que participan directamente en la reacción y 2) al remover la Thr48 se observa el mayor cambio en el perfil energético.

Como se puede identificar en la Fig. 3.6a, por una parte el grupo OH de la cadena lateral de la Thr48 forma interacciones con el fragmento GLG y por otra parte, el oxígeno de la cadena principal de la Thr48 participa en la estabilización de una molécula de agua con

un puente Thr48-H<sub>2</sub>O-Asp385. Ya que la supresión del fragmento GLG no tuvo el mismo impacto que la de la Thr48, es muy probable que el cambio se deba a la interacción de la cadena principal de la Thr48 con la molécula de agua. Sin embargo, la interacción de la cadena lateral de la Thr48 con el fragmento GLG es interesante porque cuando el sitio  $\epsilon$  se da entre los aminoácidos Thr48-Leu49, el aminoácido anterior es la Ile47, por lo que no hay un grupo OH en la cadena lateral y esto podría conducir a una diferencia energética entre la escisión de los dos sitios  $\epsilon$  posibles.

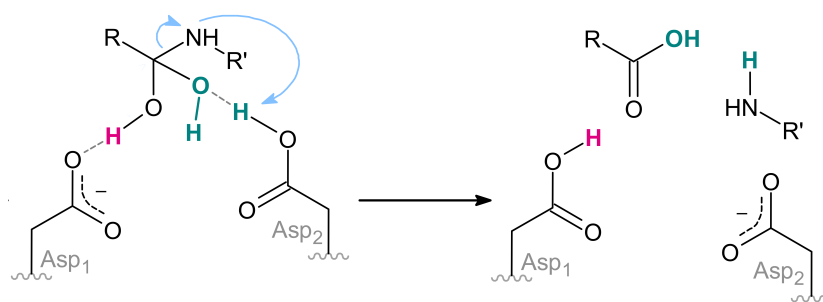


**Fig. 3.8:** Perfiles energéticos de la primera parte de la reacción cambiando la selección de la región QM. *Normal* corresponde a la selección D<sub>257</sub>, GLGD<sub>385</sub>, AL<sub>435</sub>, TLV<sub>50</sub>, 3 H<sub>2</sub>O, mientras que los símbolos  $\oplus$  y  $\ominus$  representan agregar y quitar respectivamente.

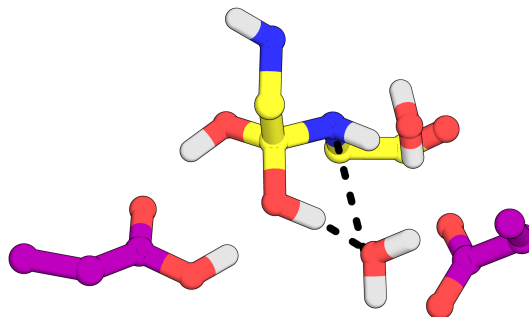
### 3.4.3 Parte 2 - Ruptura del enlace peptídico

La segunda parte del mecanismo general de hidrólisis propone que la ruptura del enlace péptido es promovida por la protonación del grupo amino (en este caso, de la Leu49). Realizando varias pruebas se encontró que se obtiene una caída en el potencial únicamente cuando la transferencia del protón ácido se lleva a cabo mediante una molécula de agua. Por lo tanto, se consideró esta transferencia en la definición de la coordenada de reacción (ec. 3.2)

Para este sistema, el muestreo de la coordenada de reacción se llevó a cabo en el intervalo de -4.0 Å a 2.0 Å cada 0.2 Å, con una ventana intermedia en -0.7 Å. En la Fig. 3.10 se representa el perfil energético de la segunda parte de la reacción. Se obtuvo una diferencia energética de 25.1 kcal/mol entre el estado de transición II y el intermediario gem-diol. Se puede identificar, por la forma triangular del perfil energético obtenido, que en lugar de representar un camino del intermediario gem-diol a productos, el perfil representa dos caminos diferentes que parten o terminan en el estado de transición II



(a) Segunda parte del mecanismo general de hidrólisis ácido-base de las aspartil proteasas.



(b) Intermediario gem-diol equilibrado.

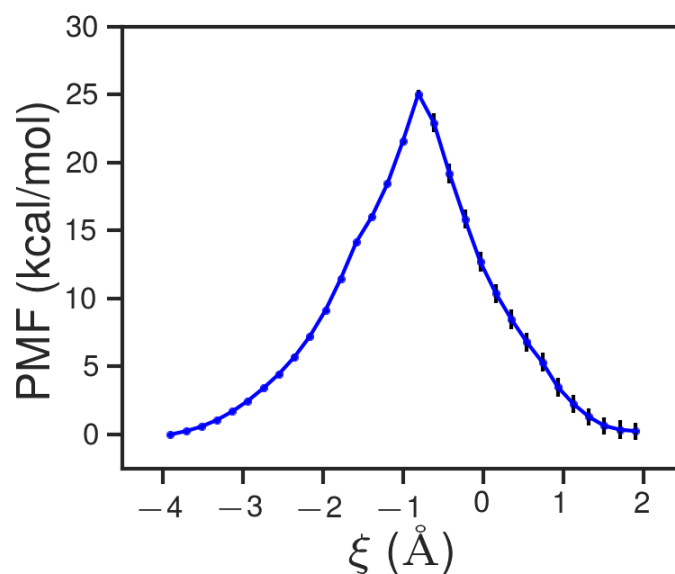
$$\xi = -d_{(O_{H_2O}, H_{gem-diol})} - d_{(N_{Val50}, H_{H_2O})} + d_{(C_{Leu49}, N_{Val50})} \quad (3.2)$$

Fig. 3.9: Definición de la coordenada de la segunda parte de la reacción.

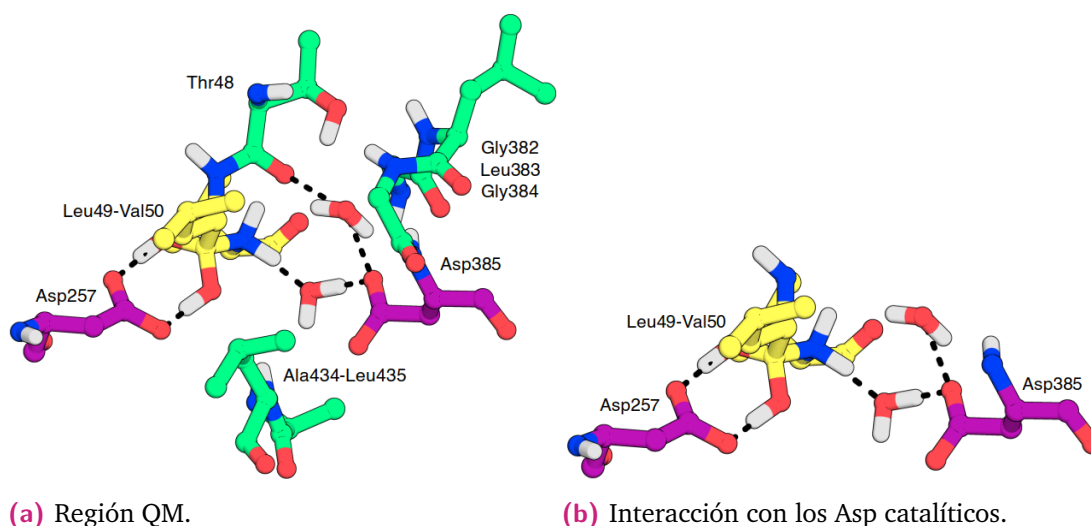
(un camino del intermediario al estado de transición II y otro del estado de transición II a productos. De manera que la forma del perfil y la barrera alta de energía obtenidos, pueden estar relacionados con la elección de una coordenada de reacción no adecuada y la necesidad de llevar a cabo el muestreo de US en más de una dimensión (muestreando más de una coordenada de reacción para trazar la superficie o hipersuperficie energética de la reacción).

### Estado de transición II

En la Fig. 3.11 se representa la estructura del estado de transición II. El grupo gem-diol es estabilizado por interacción con el Asp257 (izquierda), mientras que el grupo amino protonado tiene interacción mediante agua con el Asp385 (derecha). A su vez, el Asp385 interactúa con el oxígeno de la cadena principal de la Thr48 mediante otra molécula de agua. A diferencia del estado de transición I, en este estado no se obtuvo una red de interacciones que incluyera todos los aminoácidos de la selección QM. La diferencia principal con el estado de transición II de la escisión catalizada por BACE-1,<sup>48</sup> es que el grupo amino protonado no interactúa directamente con el Asp catalítico, sino por medio



**Fig. 3.10:** Perfil energético de la segunda parte de la reacción.

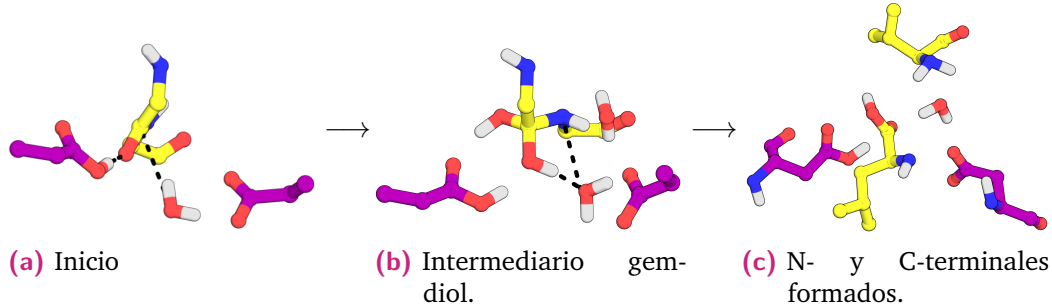


**Fig. 3.11:** Configuración del estado de transición II.

de una molécula de agua. A su vez, en el caso de BACE-1, el Asp que estabiliza al grupo amino interactúa con un grupo OH de una treonina, permitiendo que se distribuya más la carga. Si el Asp385 (derecha) estuviera más cerca del grupo amino, también estaría más cerca de la Thr48, de manera que se podría dar una interacción semejante a la que se da en el sistema de BACE-1 y APP. Es decir, para llevar a cabo la segunda parte de la reacción es posible que se necesite que el Asp385 esté más cerca de la Val50 (y a su vez, de la Thr48). Puede ser conveniente partir de una configuración inicial en la que

se favorezca la interacción entre la Thr48 y el Asp385, o incluso, tomar en cuenta la distancia entre estos dos aminoácidos para llevar a cabo el muestreo de *US*.

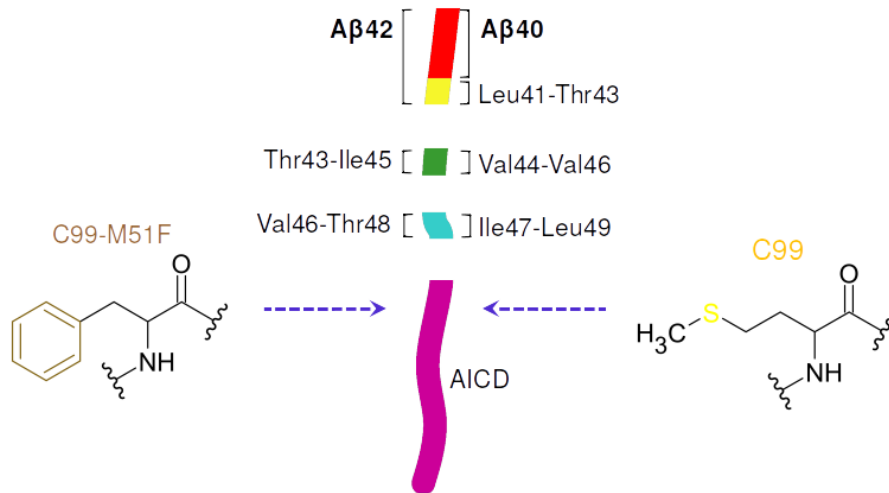
Finalmente, en la Fig. 3.12 se representan los tres estados del mecanismo de hidrólisis ácido-base.



**Fig. 3.12:** Mecanismo de hidrólisis ácido-base del enlace Leu49-Val50 de C99 catalizado por  $\gamma$ -secretasa.

### 3.4.4 Efecto de la mutación M51F en el mecanismo de escisión

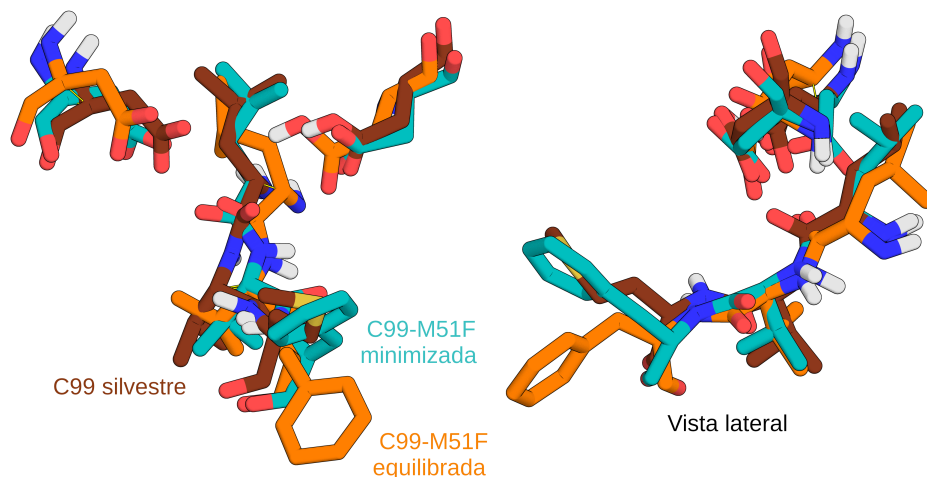
Se ha descrito que la mutación M51F (la metionina en la posición 51 de C99 por una fenilalanina) favorece que el sitio de corte  $\epsilon$  sea entre las Thr48-Leu49 sobre las Leu49-Val50 y por lo tanto favorece a la formación del péptido A $\beta$ 42 sobre del A $\beta$ 40 (Fig. 3.14).<sup>3</sup>



**Fig. 3.13:** La mutación M51F de C99 favorece la vía de formación del péptido A $\beta$ 42.

Con la finalidad de asociar a factores energéticos o conformacionales este fenómeno, se generó una estructura de GS-C99 con la mutación M51F, mutando el aminoácido y

posteriormente llevando a cabo 300 ns de simulación de MD normal. El cambio principal obtenido es la orientación del anillo aromático de la Phe51 con respecto a la Met51 original y la Phe51 del sistema que sólo fue minimizado (y conserva la orientación de la Met51).



**Fig. 3.14:** Comparación entre el sistema con C99 silvestre y los dos sistemas de C99-M51F.

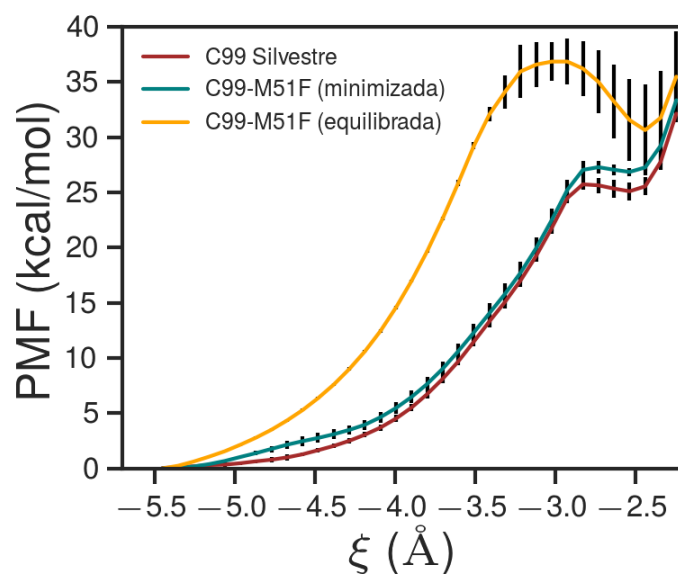
Se llevó a cabo la primera parte de la reacción para los tres sistemas (dado que anteriormente no se consideró la Met51 en la región QM). En la Fig. 3.15 se representan los perfiles energéticos obtenidos. Para el caso de la mutante que sólo fue minimizada, la gráfica de PMF obtenida es muy similar a la del sistema silvestre,  $\approx 1.5$  kcal/mol mayor. Pero para el sistema equilibrado con MD, hubo un cambio drástico del PMF, con una energía de formación del estado de transición de  $\approx 11$  kcal/mol mayor que cuando sólo fue minimizado.

Al comparar los estados de transición (Fig. 3.16) se puede identificar que en el caso de la mutante no hay una interacción directa entre el Asp257 y el estado de transición, de manera que no ocurre el efecto de estabilización que sucede en la silvestre. La mutación M51F conduce a un cambio en la distribución de las moléculas de agua del sistema y a su vez conduce a un cambio en la configuración del estado de transición I del corte en el sitio Leu49-Val50. Sin embargo, este efecto puede no suceder en el corte entre Thr48-Leu49 debido a que la posición 51 es más lejana.

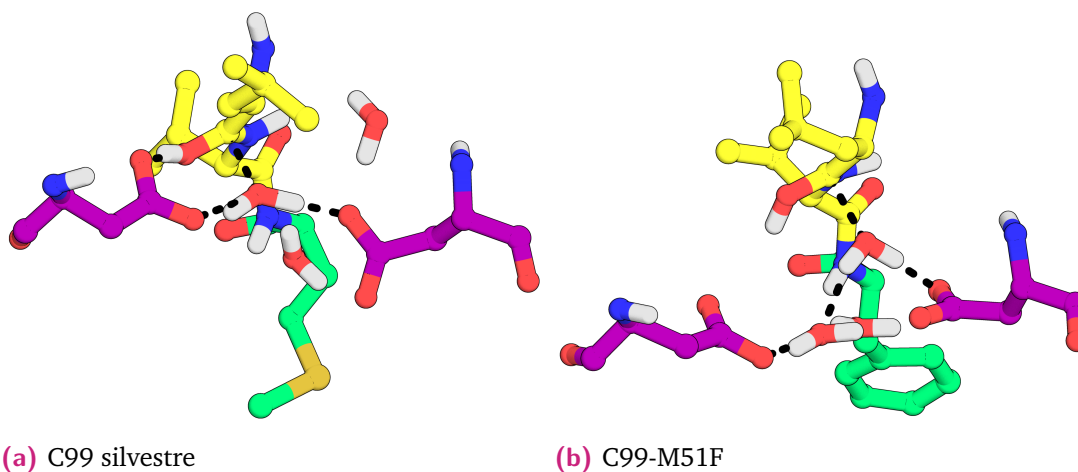
### 3.5 Conclusiones

Se utilizó la metodología QM/MM para describir las dos partes del mecanismo de escisión del primer corte de C99 por  $\gamma$ -secretasa con base en el mecanismo general de hidrólisis propuesto.





**Fig. 3.15:** Perfiles energéticos de la primera parte de la reacción para comparar el corte de C99 silvestre y C99-M51F.



**Fig. 3.16:** Configuración del estado de transición I.

Se identificó que los fragmentos conservados AL<sub>435</sub> del motivo PAL, GLG<sub>384</sub> del motivo GXGD y la Thr48 tienen una aportación directa o indirecta a la estabilización del estado de transición. Sobre todo la Thr48, análoga a una treonina que estabiliza el estado de transición del corte de APP en sitio escindible  $\beta$  por  $\beta$ -secretasa. Si no se considera este aminoácido en la región QM para la primera parte de la reacción, el perfil energético cambia mucho.

En el estudio de la segunda parte de la reacción, el perfil energético obtenido permitió identificar que es necesario modificar la coordenada de reacción o llevar a cabo un

muestreo de *Umbrella Sampling* bi- o n-dimensional para muestrear este paso de la reacción. A su vez, la elección de un configuración inicial que favorezca la interacción del Asp385 con la Thr48 podría proporcionar información acerca de la influencia de este aminoácido en la preferencia de uno de los sitios de corte iniciales.

A diferencia del sistema con C99 silvestre, en el sistema con la mutación M51F el estado de transición I no es estabilizado directamente por ambos Asp catalíticos. En este sistema, se observó principalmente el cambio en la orientación de la cadena lateral del aminoácido en la posición 51 y la distribución de aguas en el sitio activo.

El papel de las Thr48 y Val51 es importante porque se relaciona con la diferencia del sitio escindible  $\epsilon$  que conduce a la producción de  $A\beta_{40}$  y  $A\beta_{42}$ .

## Perspectivas

En este trabajo se encontró que los valores de pKa de la díada catalítica de la enzima  $\gamma$ -secretasa cambian por efecto de la presencia del sustrato. De manera que se favorece el estado monoprotonado a pH fisiológico, que a su vez está directamente relacionado con el estado activo de la enzima.

Al estudiar el mecanismo de escisión de C99 por la enzima  $\gamma$ -secretasa en el sitio escindible  $\epsilon$  (Leu49-Val50), se identificó que los fragmentos conservados GLG<sub>384</sub> y AL<sub>435</sub> y la Thr48 contribuyen a que el mecanismo de acción se lleve a cabo. También se identificó que este sitio de corte  $\epsilon$  podría ser desfavorecido en la escisión de la mutante C99-M51F debido a que la distribución de moléculas de agua en el sitio activo es diferente con respecto a la de C99 silvestre.

El estudio del mecanismo de acción de una enzima requiere considerar una amplia variedad de factores. Este trabajo derivó a nuevas interrogantes que sería interesante abordar con el fin de comprender el mecanismo de la enzima  $\gamma$ -secretasa. Por ejemplo, estudiar el mismo sistema con otra coordenada de reacción, llevar a cabo el muestreo con más de una coordenada de reacción a la vez o conduciendo al intermediario gem-diol a un estado en el que el Asp385 esté más cerca de la Val50 para llevar a cabo la segunda parte de la reacción. También podría ser interesante emplear un método de orden mayor para el tratamiento de la región QM para el mismo sistema e identificar si los perfiles energéticos cambian significativamente.

Como se sabe, la formación del péptido A $\beta$ <sub>40</sub> o del A $\beta$ <sub>42</sub> depende principalmente de la posición en la que se da el primer sitio de corte, ya sea entre las Leu49-Val50 o las Thr48-Leu49 de C99, respectivamente. Debido a esto, estudiar la escisión de C99 por  $\gamma$ -secretasa en este otro sitio de corte  $\epsilon$  y comparar las energías y las interacciones, con la finalidad de explicar por qué la enzima  $\gamma$ -secretasa prefiere un sitio sobre el otro. A su vez, estudiar el corte en este segundo sitio  $\epsilon$  en la mutante C99-M51F permitiría apoyar o descartar la hipótesis propuesta en este trabajo.

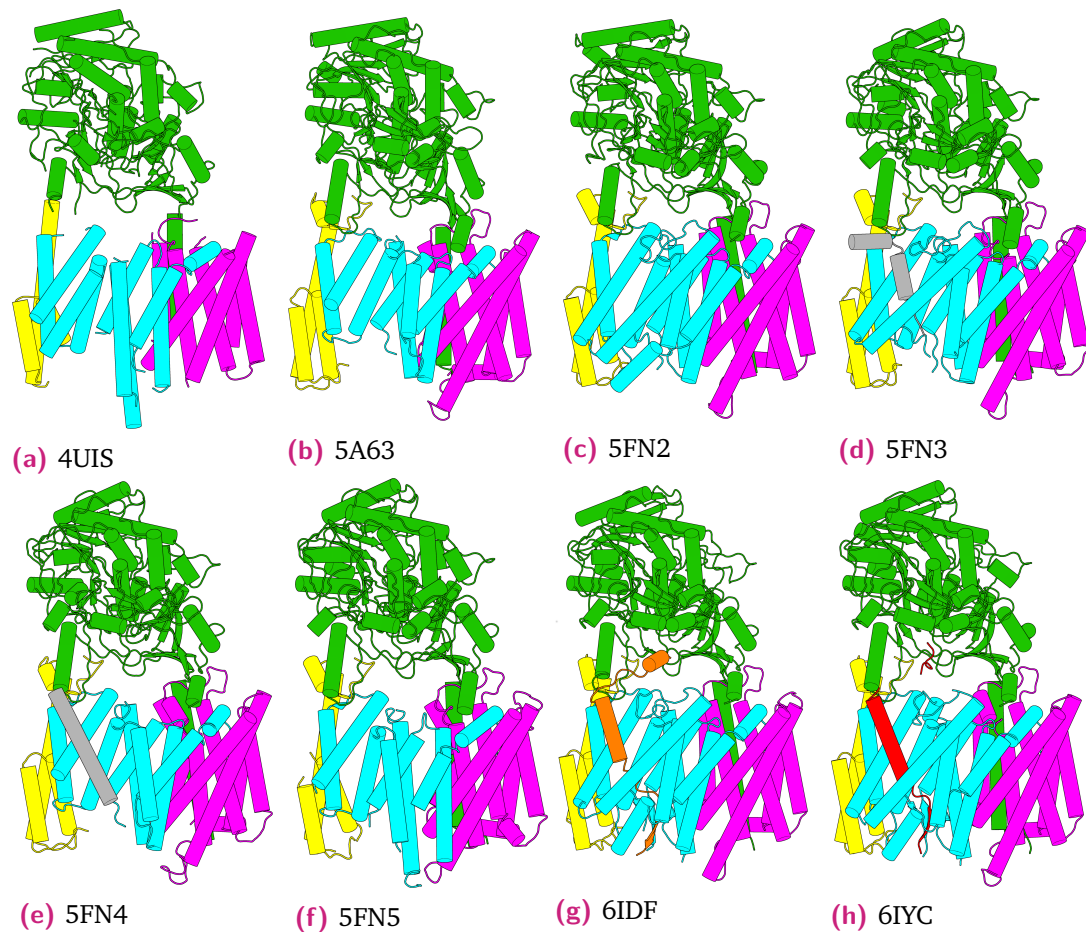
Como ha sido mencionado, el sitio de corte  $\epsilon$  define principalmente qué isoforma de A $\beta$  se formará, por lo que sería de gran interés estudiar los mecanismos de escisión en los sitios escindibles  $\zeta$  y  $\gamma$ , en los que la actividad enzimática ya no es de carboxilasa, sino de endopeptidasa. Esto con la finalidad de buscar diferencias entre los mecanismos en

los que la enzima tiene diferente actividad y obtener información acerca de cómo la enzima reconoce en qué sitio comenzar la escisión secuencial de C99.

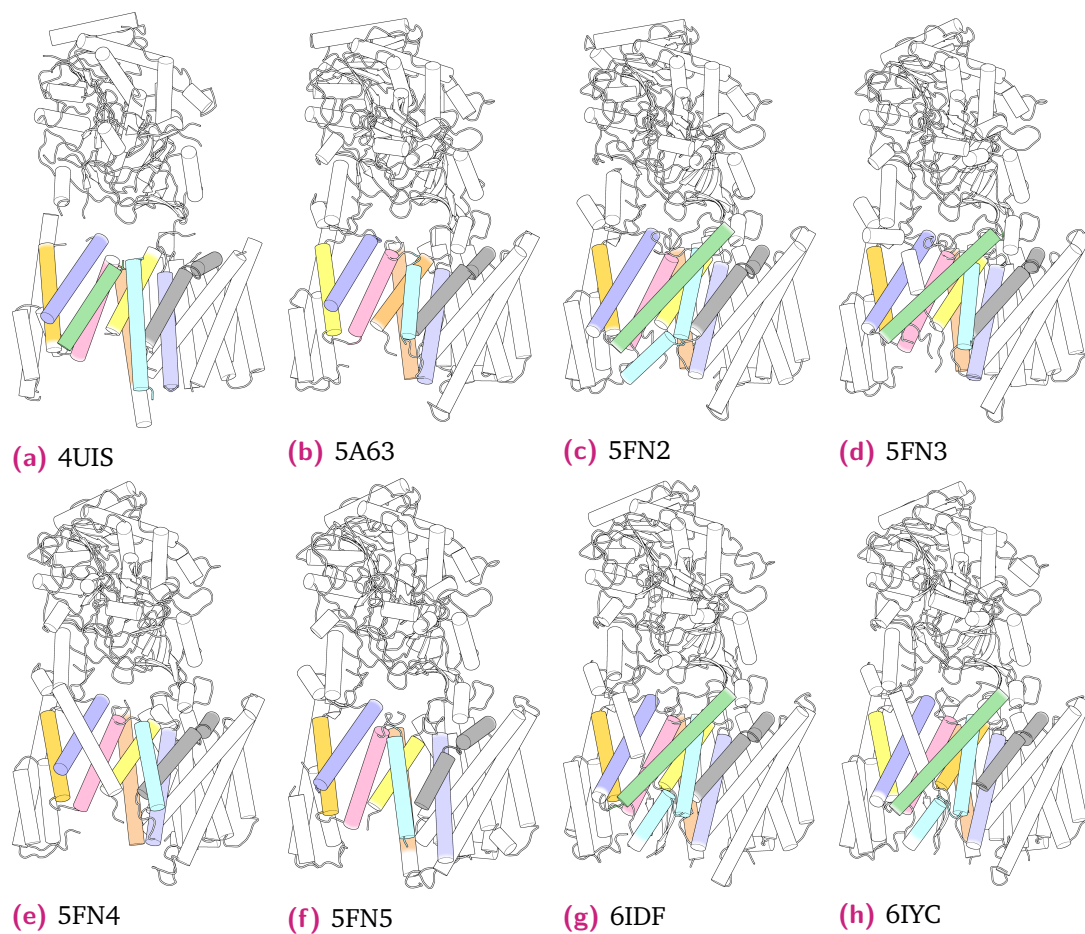
## 5.1 Estructuras de $\gamma$ -secretasa reportadas

PDB ID	Resolución	Mutaciones	Complejo	Asignación de PS1
4UIS	4.4 Å	NO	Lisozima unida al PS1-CT	81-100, 172-189, 201-206, 220-233, 257, 385, 404-423, 442-463 ( <b>102</b> )
5A63	3.4 Å	NO	NO	78-108, 167-261, 379-467 ( <b>215</b> )
5FN2	4.2 Å	NO	Inhibidor DAPT (no asignado)	78-288, 378-467 ( <b>301</b> )
5FN3	4.1 Å	NO	Cadena de poli-alanina (no resuelto)	78-263, 279-288, 378-467 ( <b>286</b> )
5FN4	4.0 Å	NO	Cadena de poli-alanina (no resuelto)	78-108, 167-262, 271, 379-467 ( <b>217</b> )
5FN5	4.3 Å	NO	NO	68-108, 167-264, 379-429, 435-467 ( <b>223</b> )
6IDF	2.7 Å	2	Notch1	73-292, 376-467 ( <b>312</b> )
6IYC	2.6 Å	2	Proteína A $\beta$ A4	73-291, 376-467 ( <b>311</b> )

**Tab. 5.1:** Estructuras reportadas de  $\gamma$ -secretasa.



**Fig. 5.1:** Representación tridimensional de las estructuras de  $\gamma$ -secretasa, las subunidades se representan por color: nicastrina (verde), PS1 (cian), Pen-2 (magenta) y Aph-1 (amarillo). Las cadenas de polialanina se representan en gris, Notch1 se representa en naranja y la proteína A $\beta$  A4 en rojo.



**Fig. 5.2:** Representación tridimensional de las estructuras de  $\gamma$ -secretasa, las hélices transmembranales (TMs) se representan por color: TM1 (naranja), TM2 (verde claro), TM3 (azul claro), TM4 (naranja claro), TM5 (rosa claro), TM6 (cian claro), TM7 (amarillo claro), TM8 (lila) y TM9 (gris).

## 5.2 Información adicional sobre las metodologías

### 5.2.1 Metodología de las simulaciones pH-REMD

#### Información general

Para la preparación del sistema, se empleó el programa *charmmlipid2amber.py* para convertir los nombres de residuos y de los átomos del campo de fuerza CHARMM36 a la nomenclatura del campo de fuerza de AMBER Lipid14. Los archivos de topología se prepararon con el módulo *tleap* de *AmberTools 16* utilizando los campos de fuerza *ff14SB* y *Lipid14* y el modelo de agua *TIP3P*. El archivo de comandos *leaprc.constph* establece parámetros en *tleap* para llevar a cabo la metodología de CpHMD. El programa *cpinutil.py* crea el archivo *cpin*, el cual describe qué residuos deben titularse durante las simulaciones y define los posibles estados de protonación y sus energías relativas. Esta secuencia de comandos de Python también establece los radios de carboxilato personalizados para simulaciones de CpHMD con disolvente explícito.

#### Procedimiento de equilibración

Las interacciones electrostáticas de largo alcance se trataron con el método de partícula en una malla de Ewald<sup>49</sup> y las fuerzas de van der Waals se calcularon con un radio de corte de 10 Å. La energía del sistema se minimizó empleando 1000 pasos del algoritmo *steepest descent*, seguidos por 4000 pasos de gradiente conjugado. Todas las simulaciones de dinámica molecular se realizaron con un paso de tiempo de 2 fs y se restringieron los enlaces que contienen hidrógeno con SHAKE.<sup>50,51</sup> La temperatura se controló con dinámica de Langevin,<sup>52</sup> con frecuencia de colisión de 1 ps<sup>-1</sup>. Excepto por las simulaciones de pH-REMD, en las que se usó una frecuencia de colisión de 5 ps<sup>-1</sup>.

Primero, los sistemas se calentaron a un volumen constante, variando linealmente la temperatura de 0 a 100 K durante 5 ps. Se continuó, con un calentamiento empleando un control anisotrópico de presión y un tiempo de relajación para el baróstato de Berendsen<sup>53</sup> de 2 ps, variando la temperatura linealmente de 100 a 300 K durante 100 ps y empleando un potencial armónico con una constante de fuerza de 10.0 kcal/molÅ<sup>2</sup> para mantener los lípidos fijos.

Los sistemas calentados se simularon durante 5 ns en condiciones NPT a 300 K con un control de presión anisotrópica y tiempo de relajación de presión de 1 ps. Después, se llevó a cabo un equilibrio NPT por 10 ns a 300 K con escalamiento semiisotrópico de presión considerando una superficie (la membrana en este caso) en el plano *xy* para



cada sistema. Esto se llevó a cabo aplicando restricciones cartesianas a las posiciones de las cadenas laterales de la proteína. Posteriormente se llevaron a cabo 20 ns de simulación en las mismas condiciones, pero liberando las restricciones. Previo a las simulaciones pH-REMD que son en condiciones de volumen constante, se llevaron a cabo 20 ns de simulación NVT.

### Detalles sobre las simulaciones pH-REMD

Se realizaron cambios en los estados de protonación e intentos de intercambio de réplicas cada 200 fs. Después de cada cambio de estado de protonación exitoso, se realizó una simulación de 200 fs para relajar el disolvente.

### 5.2.2 Metodología del estudio QM/MM

Todas las simulaciones QM/MM se llevaron a cabo en condiciones NVT a 300 K, con un radio de corte de las interacciones de largo alcance de 8 Å. La parte QM fue tratada con el método DFTB3, con una constante dieléctrica de 40 y una carga de -1.

Las ventanas se generaron mediante equilibrios de 1 ps consecutivos modificando la coordenada de reacción. Posteriormente se equilibró cada ventana generada durante 4 ps. Una vez equilibrada cada ventana se llevó a cabo una producción de 20 ps. La constante de fuerza para ajustar la coordenada de reacción para la primera parte fue de 50 kcal/molÅ<sup>2</sup> y para la segunda parte de 50 kcal/molÅ<sup>2</sup>.

En las tablas 5.2, 5.3 y 5.4 se representa la información sobre el muestreo para la primera parte de la reacción, la segunda parte y para el estudio del efecto de la mutación M51F. En cada caso se señalan los aminoácidos en la selección QM de  $\gamma$ -secretasa (aa<sub>GS</sub>), de C99 (aa<sub>C99</sub>) y el número de moléculas de agua. En la columna  $\xi$  se representa el intervalo de muestreo de la coordenada de reacción y el número de réplicas que se llevaron a cabo en la columna # rep.

aa <sub>GS</sub>	aa <sub>C99</sub>	# H <sub>2</sub> O	$\xi$	# rep
D <sub>257</sub> ,GLGD <sub>385</sub> ,AL <sub>435</sub>	TLV <sub>50</sub>	4	[-5.5,2.0],0.1	5
D <sub>257</sub> ,GLGD <sub>385</sub> ,AL <sub>435</sub>	TLV <sub>50</sub>	4	[-5.5,2.0],0.02	1
D <sub>257</sub> ,GLGD <sub>385</sub> ,AL <sub>435</sub>	TLV <sub>50</sub>	4	[-5.5,2.0],0.2	5
D <sub>257</sub> ,GLGD <sub>385</sub> ,AL <sub>435</sub>	TLV <sub>50</sub>	4	[-5.5,2.0],0.2	5
D <sub>257</sub> ,GLGD <sub>385</sub> ,AL <sub>435</sub>	TLV <sub>50</sub>	3	[-5.5,2.0],0.2	5
D <sub>257</sub> ,GLGD <sub>385</sub> ,AL <sub>435</sub>	LV <sub>50</sub>	3	[-5.5,2.0],0.2	5
D <sub>257</sub> ,D <sub>385</sub> ,AL <sub>435</sub>	TLV <sub>50</sub>	3	[-5.5,2.0],0.2	5
D <sub>257</sub> ,GLGD <sub>385</sub>	TLV <sub>50</sub>	3	[-5.5,2.0],0.2	5
D <sub>257</sub> ,D <sub>385</sub> ,	LV <sub>50</sub>	3	[-5.5,2.0],0.2	5

**Tab. 5.2:** Información sobre los muestreos de *Umbrella Sampling* de la primera parte de la reacción.

aa <sub>GS</sub>	aa <sub>C99</sub>	# H <sub>2</sub> O	$\xi$	# rep
D <sub>257</sub> ,GLGD <sub>385</sub> ,AL <sub>435</sub>	TLV <sub>50</sub>	4	[-5.5,2.0],0.1	5

**Tab. 5.3:** Información sobre los muestreos de *Umbrella Sampling* de la segunda parte de la reacción.

Clave	aa <sub>GS</sub>	aa <sub>C99</sub>	# H <sub>2</sub> O	$\xi$	# rep
Silvestre	D <sub>257</sub> ,GLGD <sub>385</sub> ,AL <sub>435</sub>	TLVM <sub>51</sub>	3	[-5.5,2.0],0.1	5
M51F-min	D <sub>257</sub> ,GLGD <sub>385</sub> ,AL <sub>435</sub>	TLVF <sub>51</sub>	3	[-5.5,2.0],0.1	5
M51F-eq MD	D <sub>257</sub> ,GLGD <sub>385</sub> ,AL <sub>435</sub>	TLVF <sub>51</sub>	3	[-5.5,2.0],0.1	5

**Tab. 5.4:** Información sobre los muestreos de *Umbrella Sampling* de la primera parte de la reacción, para el estudio del efecto de la mutación M51F.

## Análisis de las simulaciones

Las fracciones de protonación fueron calculadas con el programa *cphstats* y los potenciales de fuerza media fueron calculados con el algoritmo WHAM.

Las distancias, los puentes de hidrógeno, el número de moléculas de agua de hidratación y las desviaciones y fluctuaciones cuadráticas promedio (RMSD y RMSF) fueron calculadas con *cpptraj*.<sup>54</sup> Las imágenes de las estructuras se generaron usando *PyMOL* v0.9.<sup>55</sup> Las gráficas se realizaron utilizando *Gnuplot* v5.0<sup>56</sup> y *Python* v2.7<sup>57</sup> (*NumPy*,<sup>58</sup> *SciPy*,<sup>59</sup> *Matplotlib*<sup>60</sup> y *Seaborn*<sup>61</sup>).

## 5.3 Información complementaria sobre métodos y técnicas

### Método DFTB

*Self-consistent charge density functional tight binding* (SCC-DFTB o DFTB2) es un método aproximado de Química Cuántica basado en una expansión de segundo orden de la expresión de la energía total de DFT (*Density Functional Theory*). DFTB2 es una alternativa a los métodos semiempíricos (SE) tradicionales de Química Cuántica, aunque en el sentido estricto no es un método semiempírico, ya que su parametrización está completamente basada en cálculos de DFT y no se lleva a cabo un ajuste a datos empíricos. DFTB2 es comparable en velocidad con los métodos SE, el costo principal del cálculo es la solución del problema del generalizado de valores propios en una base mínima y no se evalúan integrales durante el tiempo de ejecución del programa.<sup>62</sup>

Se han llevado a cabo varios estudios que muestran el gran éxito y las limitaciones de DFTB2. Este método generalmente reproduce adecuadamente las geometrías, al igual que las energías relativas de conformeros de péptidos y las energías de puente de hidrógeno. Mientras que las energías de reacción de DFTB2 son adecuadas, los calores de formación se sobreestiman. En general, se obtienen frecuencias de vibración razonables, pero se han observado fallas graves en ciertos modos vibratorios.<sup>45</sup>

El método DFTB3 mantiene las fortalezas de DFTB2, como el cálculo rápido de sistemas moleculares a gran escala con geometría confiable, pero mejora la transferibilidad y la precisión general de varias propiedades. DFTB3 tiene dos mejoras con respecto a DFTB2. La primera es la función  $\gamma^h$  que mejora la interacción electrón-electrón de la fluctuación de carga. La función  $\gamma^h$  corrige la función original que impone incorrectamente una relación lineal entre la dureza química y el tamaño atómico. La segunda mejora se refiere a la extensión de DFTB2 para incluir términos de tercer orden de la expansión de la serie Taylor de la energía de intercambio-correlación de DFT. Los términos de tercer orden hacen que la dureza química de un átomo (parámetro de Hubbard) dependa de su carga, lo que se vuelve particularmente importante para la descripción de sistemas con cargas localizadas.<sup>45</sup>

Comparando DFTB3 con DFTB2, se mantiene la precisión para las geometrías de moléculas que contienen C, H, N y O. Para las moléculas con carga eléctrica, se encuentra una ligera mejora geométrica, mientras que los enlaces de hidrógeno son consistentemente

demasiado cortos.<sup>45</sup> A continuación se representa la expresión general de la energía de DFTB3:

$$E^{DFTB3} = E^{H0} + E^{\gamma^h} + E^{\Gamma} + E^{rep} \quad (5.1)$$

$E^{H0}$  es la contribución a la energía de un Hamiltoniano de orbital atómico que depende sólo de la densidad de referencia.  $E^{\gamma^h}$  viene el término de segundo orden de la expansión en series de Taylor de la energía de intercambio-correlación con la función  $\gamma$  corregida ( $\gamma^h$ ).  $E^{\Gamma}$  es el contribución de energía de intercambio-correlación de tercer orden y  $E^{rep}$  es la contribución de energía de repulsión.

### Algoritmo WHAM

Quizá el método más empleado para la estimación de  $F_i$  para calcular  $A(\xi)$  es WHAM. El objetivo de WHAM es minimizar el error estadístico en el cálculo de la distribución global  $P^u(\xi)$ .  $P^u(\xi)$  se calcula mediante un promedio ponderado de las distribuciones de las ventanas individuales:

$$P^u(\xi) = \sum_i^{\text{ventanas}} p_i(\xi) P_i^u(\xi) \quad (5.2)$$

Los pesos  $p_i$  se eligen para minimizar el error estadístico de  $P^u$ :

$$\frac{\partial \sigma^2(P^u)}{\partial p_i} = 0 \quad (5.3)$$

bajo la condición  $\sum p_i = 1$ , la expresión de  $p_i$  es:

$$p_i = \frac{a_i}{\sum_j a_j}, a_i(\xi) = N_i \exp[-\beta \omega_i(\xi) + \beta F_i] \quad (5.4)$$

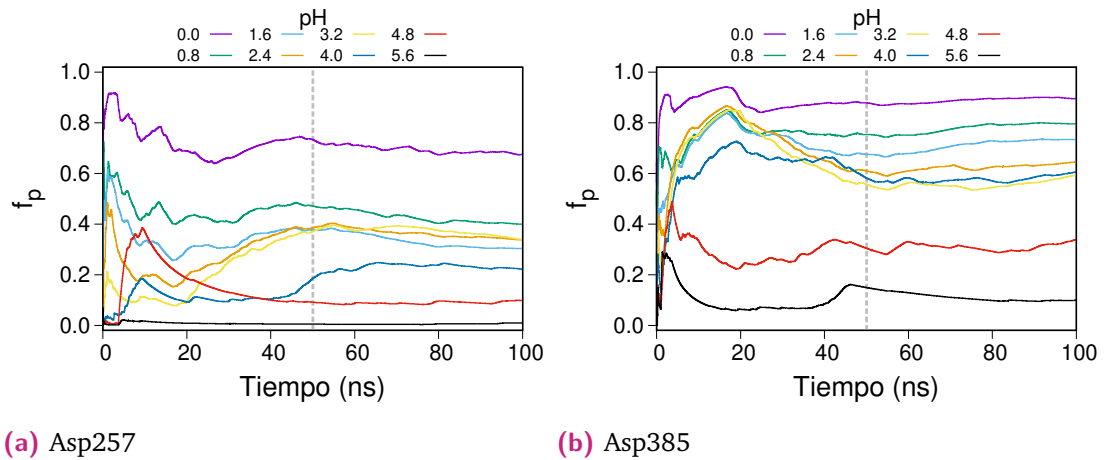
$N_i$  es el número de pasos muestreados para la ventana  $i$ . Las  $F_i$  son calculadas con la Eq. (5.5)

$$\exp(-\beta F_i) = \int P^u(\xi) \exp[-\beta \omega_i(\xi)] d\xi \quad (5.5)$$

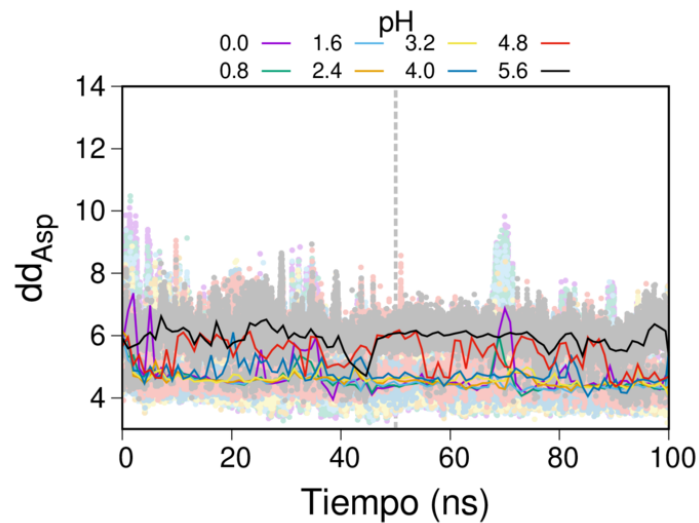
$P^u$  y  $F_i$  son iteradas hasta la convergencia.

## 5.4 Gráficas complementarias a los resultados y análisis del Capítulo 2

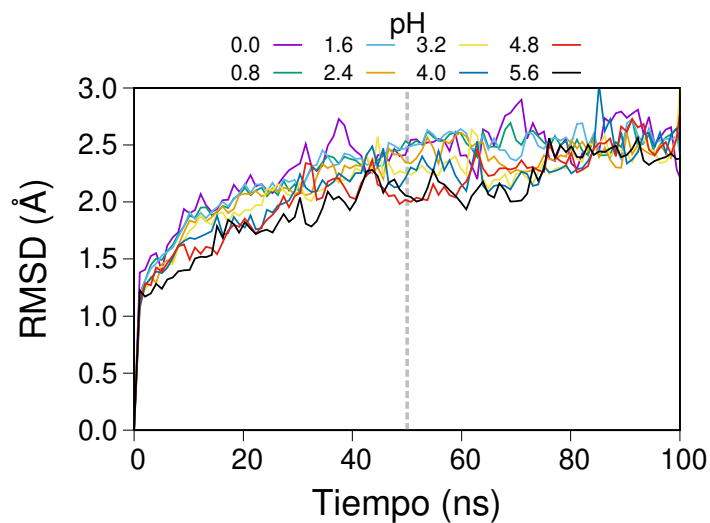
### 5.4.1 Sistema apo-GS



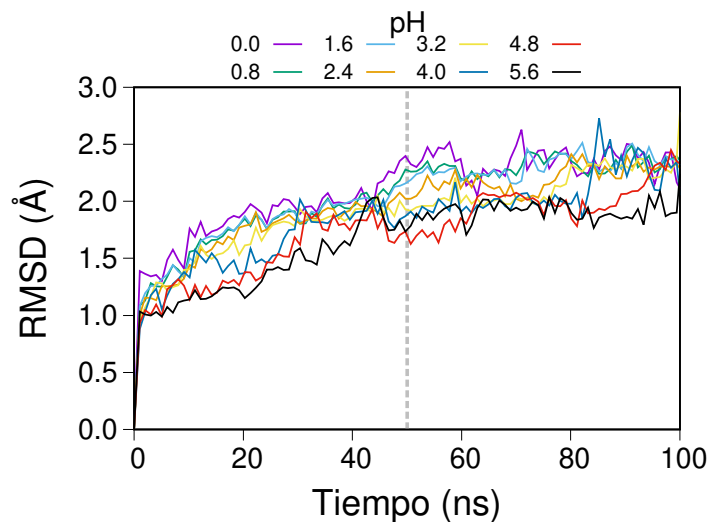
**Fig. 5.3:** Series de tiempo de las fracciones de protonación acumulativas del Asp catalíticos del sistema apo-GS a cada valor de pH de muestreo.



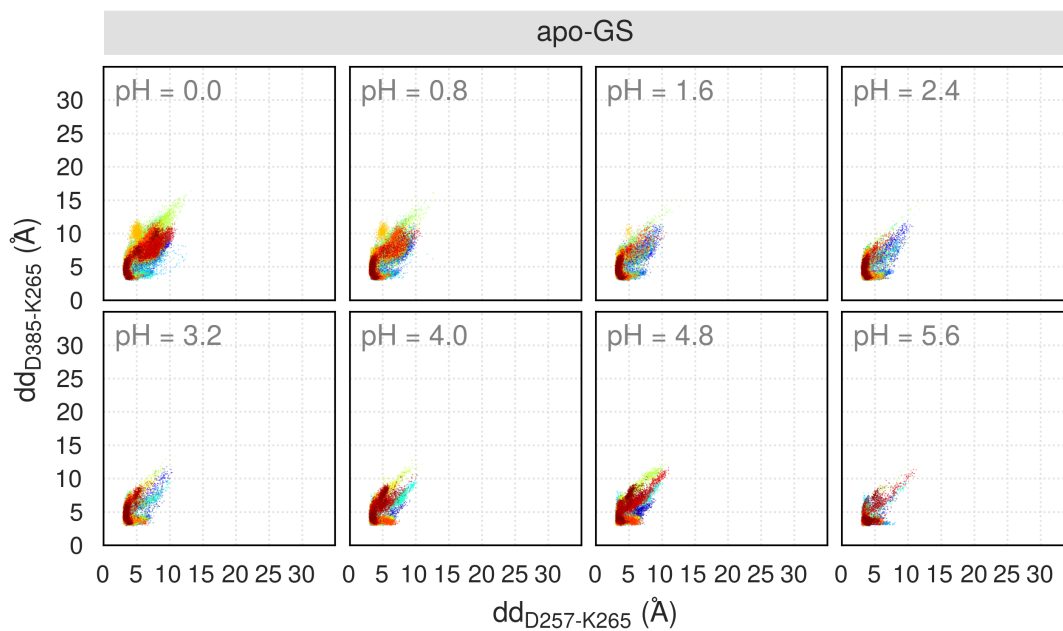
**Fig. 5.4:** Series de tiempo de la distancia entre los CG de los Asp catalíticos para cada trayectoria a cada pH para el sistema apo-GS.



**Fig. 5.5:** Series de tiempo del *Root Mean Square Deviation* (RMSD) del esqueleto del complejo de GS en el sistema apo-GS a cada valor de pH.



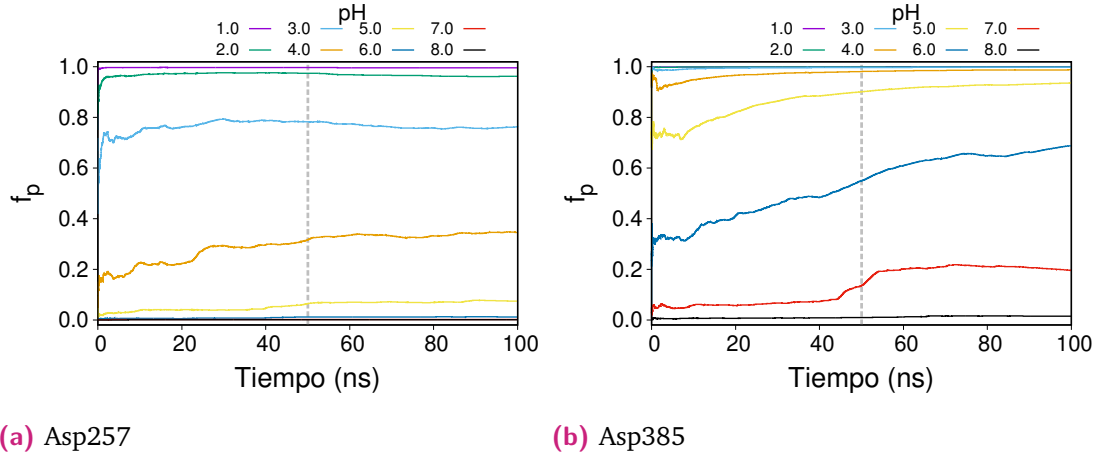
**Fig. 5.6:** Series de tiempo del *Root Mean Square Deviation* (RMSD) del esqueleto de PS1 en el sistema apo-GS a cada valor de pH.



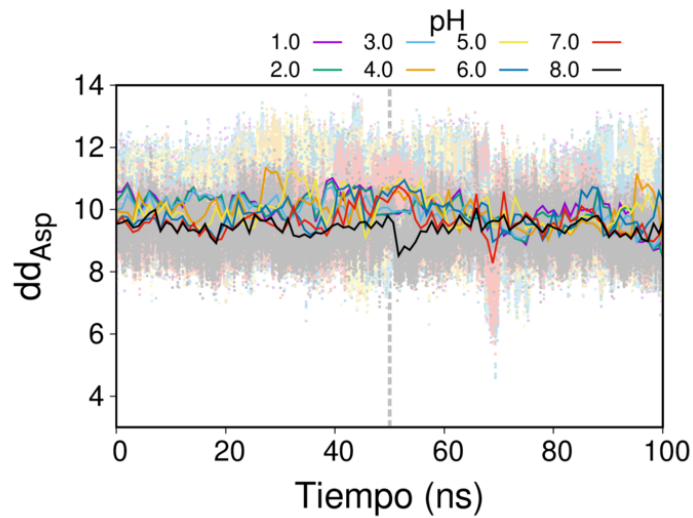
**Fig. 5.7:** Distribuciones de las distancias entre el NZ de Lys265 y los CG de los Asp catalíticos para cada pH de muestreo en el sistema apo-GS. El avance del tiempo se representa de color azul a rojo.



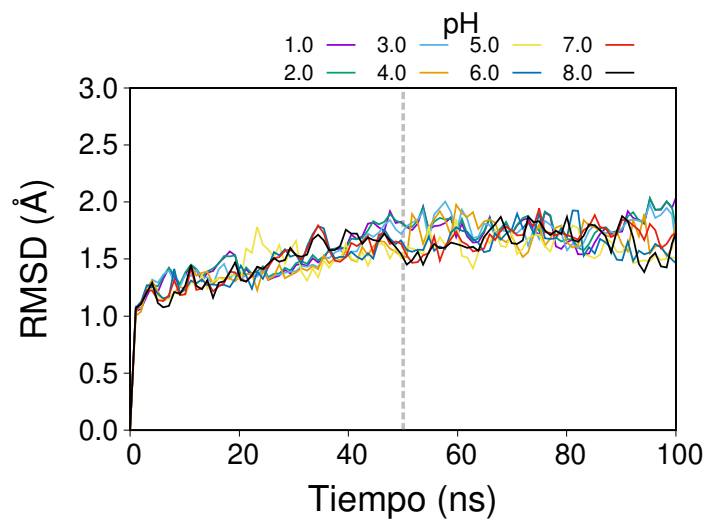
## 5.4.2 Sistema GS-C99<sub>28-55</sub>



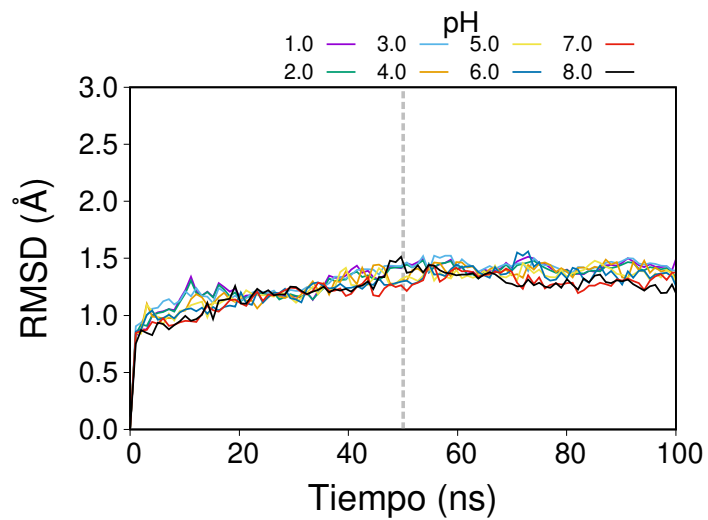
**Fig. 5.8:** Series de tiempo de las fracciones de protonación acumulativas del Asp catalíticos del sistema GS-C99<sub>28-55</sub> a cada valor de pH de muestreo.



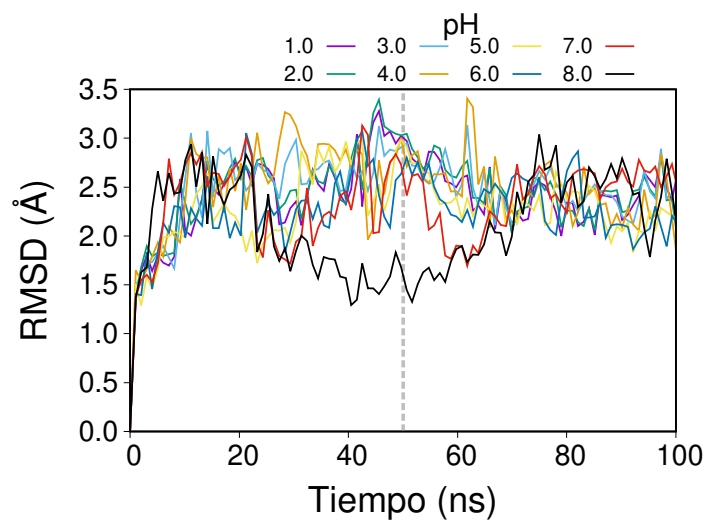
**Fig. 5.9:** Series de tiempo de la distancia entre los CG de los Asp catalíticos para cada trayectoria a cada pH para el sistema GS-C99<sub>28-55</sub>



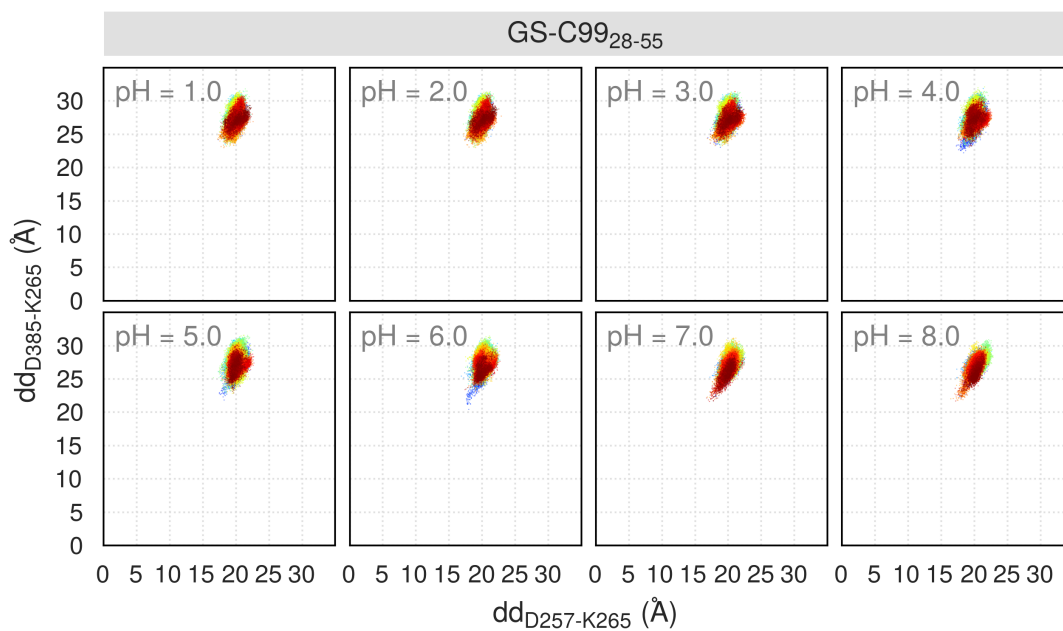
**Fig. 5.10:** Series de tiempo del *Root Mean Square Deviation* (RMSD) del esqueleto del complejo de GS en el sistema GS-C99<sub>28-55</sub> a cada valor de pH.



**Fig. 5.11:** Series de tiempo del *Root Mean Square Deviation* (RMSD) del esqueleto de PS1 en el sistema GS-C99<sub>28-55</sub> a cada valor de pH.



**Fig. 5.12:** Series de tiempo del *Root Mean Square Deviation* (RMSD) del esqueleto del péptido C99<sub>28-55</sub> en el sistema GS-C99<sub>28-55</sub> a cada valor de pH.



**Fig. 5.13:** Distribuciones de las distancias entre el NZ de Lys265 y los CG de los Asp catalíticos para cada pH de muestreo en el sistema GS-C99<sub>28-55</sub>.

## Bibliografía

- (1) Sosa, L. J.; Cáceres, A.; Dupraz, S.; Oksdath, M.; Quiroga, S. y Lorenzo, A. *Journal of Neurochemistry* **2017**, *143*, 11-29.
- (2) Aguayo-Ortiz, R. y Dominguez, L. *Israel Journal of Chemistry* **2016**, *57*, 574-585.
- (3) Bolduc, D. M.; Montagna, D. R.; Seghers, M. C.; Wolfe, M. S. y Selkoe, D. J. *eLife* **2016**, *5*, e17578.
- (4) Bursavich, M. G.; Harrison, B. A. y Blain, J. F. *Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *59*, 7389-7409.
- (5) LaFerla, F. M.; Green, K. N. y Oddo, S. *Nature Reviews Neuroscience* **2007**, *8*, 499-509.
- (6) Mucke, L. *Nature* **2009**, *461*, 895-897.
- (7) Gertsik, N.; Chiu, D. y Li, Y. M. *Frontiers in Aging Neuroscience* **2015**, *6*, 1-10.
- (8) Sun, L.; Zhao, L.; Yang, G.; Yan, C.; Zhou, R.; Zhou, X.; Xie, T. y Zhao, Y. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2015**, *112*, 6003-6008.
- (9) Bai, X. C.; Yan, C.; Yang, G.; Lu, P.; Ma, D.; Sun, L.; Zhou, R.; Scheres, S. H. W. y Shi, Y. *Nature* **2015**, *525*, 212-217.
- (10) Bai, X. C.; Rajendra, E.; Yang, G.; Shi, Y. y Scheres, S. H. *Elife* **2015**, *4*, e11182.
- (11) Yang, G.; Zhou, R.; Zhou, Q.; Guo, X.; Yan, C.; Ke, M.; Lei, J. y Shi, Y. *Nature* **2019**, *565*, 192-197.
- (12) Zhou, R.; Yang, G.; Guo, X.; Zhou, Q.; Lei, J. y Shi, Y. *Science* **2019**, *363*, eaaw0930.
- (13) Suguna, K.; Padlan, E. A.; Smith, C. W.; Carlson, W. D. y Davies, D. R. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1987**, *84*, 7009-7013.
- (14) Coates, L.; Erskine, P. T.; Mall, S.; Gill, R.; Wood, S. P.; Myles, D. A. A. y Cooper, J. B. *European Biophysics Journal* **2006**, *35*, 559-566.

- (15) Coates, L.; Tuan, H. F.; Tomanicek, S.; Kovalevsky, A.; Mustyakimov, M.; Erskine, P. y Cooper, J. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 7235-7237.
- (16) Pearl, L. y Blundell, T. *FEBS Letters* **1984**, *174*, 96-101.
- (17) Strisovsky, K. *FEBS Journal* **2015**, *283*, 1837-1845.
- (18) Chou, K. C. y Howe, W. J. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2002**, *292*, 702-708.
- (19) Marcinkeviciene, J.; Luo, Y.; Graciani, N. R.; Combs, A. P. y Copeland, R. A. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 23790-23794.
- (20) Shimizu, H.; Tosaki, A.; Kaneko, K.; Hisano, T.; Sakurai, T. y Nukina, N. *Molecular and cellular biology* **2008**, *28*, 3663-3671.
- (21) Kessel, A. y Ben-Tal, N., *Introduction to proteins : structure, function, and motion*; CRC Press: 2011, pág. 626.
- (22) Baptista, A. M.; Teixeira, V. H.; Soares, C. M.; Baptista, M y Teixeira, V. H. *The Journal of Chemical Physics* **2002**, *117*, 4184-4200.
- (23) Meng, Y. y Roitberg, A. E. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2010**, *6*, 1401-1412.
- (24) Case, D. A. y col. AMBER 2016., San Francisco, 2016.
- (25) Mongan, J.; Case, D. A. y McCammon, J. A. *Journal of Computational Chemistry* **2004**, *25*, 2038-2048.
- (26) Swails, J. M. y Roitberg, A. E. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2012**, *8*, 4393-4404.
- (27) Swails, J. M.; York, D. M. y Roitberg, A. E. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2014**, *10*, 1341-1352.
- (28) Onufriev, A.; Case, D. A. y Ullmann, G. M. *Biochemistry* **2001**, *40*.
- (29) Metropolis, N.; Rosenbluth, A. W.; Rosenbluth, M. N.; Teller, A. H. y Teller, E. *J. Chem. Phys.* **1953**, *21*, 1087-1092.
- (30) Sugita, Y. y Okamoto, Y. *Chemical Physics Letters* **1999**, *314*, 205-223.
- (31) Sabri Dashti, D.; Meng, Y. y Roitberg, A. E. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 8805-8811.
- (32) Itoh, S. G.; Damjanović, A. y Brooks, B. R. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* **2011**, *79*, 3420-3436.
- (33) McGee, T. D.; Edwards, J. y Roitberg, A. E. *Journal of Physical Chemistry B* **2014**, *118*, 12577-12585.
- (34) Ellis, C. R. y Shen, J. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137*, 9543-9546.

- (35) Groenhof, G. *Methods in Molecular Biology* **2013**, 924, 43-66.
- (36) Lu, X.; Fang, D.; Ito, S.; Okamoto, Y.; Ovchinnikov, V. y Cui, Q. *Molecular Simulation* **2016**, 42, 1056-1078.
- (37) Kästner, J. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* **2011**, 1, 932-942.
- (38) Lomize, M. A.; Pogozheva, I. D.; Joo, H.; Mosberg, H. I. y Lomize, A. L. *Nucleic Acids Research* **2012**, 40, D370-D376.
- (39) Wu, E. L.; Cheng, X.; Jo, S.; Rui, H.; Song, K. C.; Dávila-Contreras, E. M.; Qi, Y.; Lee, J.; Monje-Galvan, V.; Venable, R. M.; Klauda, J. B. e Im, W. *Journal of Computational Chemistry* **2014**, 35, 1997-2004.
- (40) Maier, J. A.; Martinez, C.; Kasavajhala, K.; Wickstrom, L.; Hauser, K. E. y Simmerling, C. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2015**, 11, 3696-3713.
- (41) Dickson, C. J.; Madej, B. D.; Skjervik, Å. A.; Betz, R. M.; Teigen, K.; Gould, I. R. y Walker, R. C. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2014**, 10, 865-879.
- (42) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W. y Klein, M. L. *The Journal of Chemical Physics* **1983**, 79, 926-935.
- (43) Wang, J.; Beher, D.; Nyborg, A. C.; Shearman, M. S.; Golde, T. E. y Goate, A. *Journal of Neurochemistry* **2006**, 96, 218-227.
- (44) Sato, C.; Takagi, S.; Tomita, T. e Iwatsubo, T. *Journal of Neuroscience* **2008**, 28, 6264-6271.
- (45) Gaus, M.; Cui, Q. y Elstner, M. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2011**, 7, 931-948.
- (46) Seabra, G. D. M.; Walker, R. C.; Elstner, M.; Case, D. A. y Roitberg, A. E. *Journal of Physical Chemistry A* **2007**, 111, 5655-5664.
- (47) Walker, R. C.; Crowley, I. F. y Case, D. A. *Journal of Computational Chemistry* **2008**, 29, 1019-1031.
- (48) Barman, A. y Prabhakar, R. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **2013**, 40, 1-9.
- (49) Darden, T.; York, D. y Pedersen, L. *The Journal of Chemical Physics* **1993**, 98, 10089-10092.
- (50) Ryckaert, J. P.; Ciccotti, G. y Berendsen, H. J. C. *Journal of Computational Physics* **1977**, 23, 327-341.
- (51) Miyamoto, S. y Kollman, P. A. *Journal of Computational Chemistry* **1992**, 13, 952-962.

- (52) Lamm, G. y Szabo, A. *The Journal of Chemical Physics* **1986**, *85*, 7334-7348.
- (53) Berendsen, H. J.; Postma, J. P.; Van Gunsteren, W. F.; Dinola, A. y Haak, J. R. *The Journal of Chemical Physics* **1984**, *81*, 3684-3690.
- (54) Roe, D. R. y Cheatham, T. E. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2013**, *9*, 3084-3095.
- (55) DeLano, W. L. PyMOL v0.9., 2007.
- (56) Williams, T. y col. Gnuplot 5.0: An Interactive Plotting Program., 2017.
- (57) Python Software Foundation Python Language Reference, version 2.7., 2016.
- (58) Travies E, O. *USA: Trelgol Publishing* **2006**.
- (59) Jones, E.; Oliphant, T.; Peterson, P. y Others SciPy: Open source scientific tools for Python.
- (60) Hunter, J. D. Matplotlib: A 2D graphics environment., 2007.
- (61) Waskom, M. y col. Seaborn: v0.7.1., 2016.
- (62) Elstner, M. *Theoretical Chemistry Accounts* **2006**, *116*, 316-325.

# Índice de figuras

1.1	Escisión secuencial de APP por a) $\beta$ -secretasa en el sitio escindible $\beta$ , liberando el ectodominio y por b) $\gamma$ -secretasa en los sitios $\epsilon$ , $\zeta$ y $\gamma$ c) produciendo el fragmento ACID, diferentes tripéptidos y las isoformas A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42. . . . .	2
1.2	Estructura de $\gamma$ -secretasa. . . . .	4
1.3	Mecanismo general ácido-base de la familia de aspartil proteasas. 1) La molécula de agua es polarizada por el carboxilato, 2) el intermediario tetraédrico es estabilizado por la transferencia del protón ácido del ácido carboxílico y 3) el par catalítico recupera sus estados de protonación iniciales conduciendo a la escisión del enlace peptídico. <sup>13-16</sup> . . . . .	5
1.4	Ciclo termodinámico utilizado en simulaciones de CpHMD. $\Delta G_{MC}$ es la energía libre de transición entre estados, empleada para el muestreo de Monte Carlo. . . . .	8
1.5	Diagrama de flujo empleado para llevar a cabo CpHMD con disolvente explícito. . . . .	10
1.6	Esquema de intercambio de réplicas que muestra ocho réplicas a diferentes valores de pH. Los bloques representan las trayectorias de MD, mientras que las flechas representan los intercambios entre réplicas. . . . .	11
1.7	Los átomos involucrados en la reacción son considerados con un nivel de teoría QM (magenta), mientras que el resto del sistema es tratado con MM (azul). Figura tomada de la referencia [35]. . . . .	13
1.8	Separación de la coordenada de reacción (línea discontinua) entre dos estados (aquí representados por dos mínimos en la superficie de energía potencial) en ventanas o <i>paraguas</i> distintas. El sistema se muestrea principalmente perpendicular a la coordenada de reacción en cada ventana. Figura modificada de la Ref. [37] . . . . .	16
2.1	Modelos de GS empleados para la determinación de los valores de pK de la díada catalítica. Se representan nicastrina (verde), Pen-2 (amarillo), Aph-1 (magenta), PS1 (cian), C99 <sub>28-55</sub> (rojo) y la díada catalítica (naranja). . . .	20



2.2	Metodología general para la determinación de los estados de protonación de la díada catalítica de GS para los sistemas apo-GS y GS-C99 <sub>28-55</sub> . . . . .	21
2.3	Series de tiempo de la suma de las fracciones de protonación ( $N_p$ ) de los Asp catalíticos del sistema apo-GS. . . . .	22
2.4	La titulación de la díada catalítica del sistema apo-GS se encuentra acoplada. a) Diagramas de violín de las distribuciones de $dd_{Asp}$ y b) probabilidades de formación de puentes de hidrógeno entre los Asp catalíticos a cada valor de pH. . . . .	23
2.5	Curva de titulación de la díada catalítica de apo-GS. . . . .	24
2.6	Principales interacciones de los aspárticos catalíticos del sistema apo-GS. a) Gráficas de cajas para las moléculas de agua en la primera capa de solvatación de los Asp catalíticos. b) Probabilidades de formación de puentes de hidrógeno entre los Asp catalíticos y Lys265 a cada valor de pH. . . . .	25
2.7	Distancias entre las cadenas laterales de Lys265 y de los Asp catalíticos a tres valores de pH diferentes para el sistema apo-GS. . . . .	26
2.8	Las curvas de titulación de los aspárticos catalíticos no se encuentran acopladas en el sistema GS-C99 <sub>28-55</sub> , ya que no interactúan directamente entre sí. a) Series de tiempo de la suma de las fracciones de protonación ( $N_p$ ) de los Asp catalíticos. b) Diagramas de violín de las distribuciones de $dd_{Asp}$ a cada valor de pH. . . . .	27
2.9	Curvas de titulación de la díada catalítica de GS-C99 <sub>28-55</sub> . . . . .	28
2.10	Principales interacciones de la díada catalítica del sistema GS-C99 <sub>28-55</sub> . a) Gráficas de cajas de las moléculas de agua en la primera capa de solvatación de los Asp catalíticos. b) Probabilidades de formación de puentes de hidrógeno entre los Asp catalíticos y sitio conservado PAL a cada valor de pH. c) El Asp257 desprotonado forma puentes de hidrógeno con la cadena lateral de los aminoácidos Ala434 y Leu435. . . . .	29
2.11	Interacciones de la Leu49 de C99 con la díada catalítica y moléculas de agua para el sistema GS-C99 <sub>28-55</sub> . a) Probabilidades de formación de puentes de hidrógeno con los aspárticos catalíticos. b) Gráfica de cajas de las moléculas de agua en su primera capa de solvatación a cada valor de pH. . . . .	30
2.12	RMSF del TM6-CT de PS1 (en el intervalo de 50-100 ns) sobre todas las trayectorias para cada pH. . . . .	31
3.1	Representación de las regiones tratadas con el método QM y con el campo de fuerza de MM para el sistema del complejo GS-C99 <sub>28-55</sub> . . . . .	33
3.2	Metodología general para el estudio del mecanismo de escisión de C99 por la enzima GS. . . . .	34
3.3	Definición de la coordenada de la primera parte de la reacción. . . . .	35

3.4	Configuración inicial de los aminoácidos y moléculas de agua tomadas en cuenta para el estudio del mecanismo de reacción. La díada catalítica se representa en color púrpura, los aminoácidos que forman el enlace escindible se representan en color amarillo y en color verde se representan los demás aminoácidos tomados en cuenta en la parte QM. . . . .	36
3.5	Selección del intervalo de muestreo de la coordenada de reacción para la formación del intermediario gem-diol. a) Perfiles energéticos obtenidos de los tres muestreos de la coordenada de reacción con diferente espaciamiento. b) Distribución de las ventanas de <i>Umbrella Sampling</i> (arriba). Perfil energético elegido para la descripción del mecanismo (abajo). . . . .	37
3.6	Configuración del estado de transición I. . . . .	38
3.7	Intermediario gem-diol. . . . .	39
3.8	Perfiles energéticos de la primera parte de la reacción cambiando la selección de la región QM. <i>Normal</i> corresponde a la selección D <sub>257</sub> , GLGD <sub>385</sub> , AL <sub>435</sub> , TLV <sub>50</sub> , 3 H <sub>2</sub> O, mientras que los símbolos $\oplus$ y $\ominus$ representan agregar y quitar respectivamente. . . . .	40
3.9	Definición de la coordenada de la segunda parte de la reacción. . . . .	41
3.10	Perfil energético de la segunda parte de la reacción. . . . .	42
3.11	Configuración del estado de transición II. . . . .	42
3.12	Mecanismo de hidrólisis ácido-base del enlace Leu49-Val50 de C99 catalizado por $\gamma$ -secretasa. . . . .	43
3.13	La mutación M51F de C99 favorece la vía de formación del péptido A $\beta$ 42. . . . .	43
3.14	Comparación entre el sistema con C99 silvestre y los dos sistemas de C99-M51F. . . . .	44
3.15	Perfiles energéticos de la primera parte de la reacción para comparar el corte de C99 silvestre y C99-M51F. . . . .	45
3.16	Configuración del estado de transición I. . . . .	45
5.1	Representación tridimensional de las estructuras de $\gamma$ -secretasa, las subunidades se representan por color: nicastrina (verde), PS1 (cian), Pen-2 (magenta) y Aph-1 (amarillo). Las cadenas de polialanina se representan en gris, Notch1 se representa en naranja y la proteína A $\beta$ A4 en rojo. . . . .	50
5.2	Representación tridimensional de las estructuras de $\gamma$ -secretasa, las hélices transmembranales (TMs) se representan por color: TM1 (arena), TM2 (verde claro), TM3 (azul claro), TM4 (naranja claro), TM5 (rosa claro), TM6 (cian claro), TM7 (amarillo claro), TM8 (lila) y TM9 (gris). . . . .	51
5.3	Series de tiempo de las fracciones de protonación acumulativas del Asp catalíticos del sistema apo-GS a cada valor de pH de muestreo. . . . .	58

5.4	Series de tiempo de la distancia entre los CG de los Asp catalíticos para cada trayectoria a cada pH para el sistema apo-GS. . . . .	58
5.5	Series de tiempo del <i>Root Mean Square Deviation</i> (RMSD) del esqueleto del complejo de GS en el sistema apo-GS a cada valor de pH. . . . .	59
5.6	Series de tiempo del <i>Root Mean Square Deviation</i> (RMSD) del esqueleto de PS1 en el sistema apo-GS a cada valor de pH. . . . .	59
5.7	Distribuciones de las distancias entre el NZ de Lys265 y los CG de los Asp catalíticos para cada pH de muestreo en el sistema apo-GS. El avance del tiempo se representa de color azul a rojo. . . . .	60
5.8	Series de tiempo de las fracciones de protonación acumulativas del Asp catalíticos del sistema GS-C99 <sub>28-55</sub> a cada valor de pH de muestreo. . . . .	61
5.9	Series de tiempo de la distancia entre los CG de los Asp catalíticos para cada trayectoria a cada pH para el sistema GS-C99 <sub>28-55</sub> . . . . .	61
5.10	Series de tiempo del <i>Root Mean Square Deviation</i> (RMSD) del esqueleto del complejo de GS en el sistema GS-C99 <sub>28-55</sub> a cada valor de pH. . . . .	62
5.11	Series de tiempo del <i>Root Mean Square Deviation</i> (RMSD) del esqueleto de PS1 en el sistema GS-C99 <sub>28-55</sub> a cada valor de pH. . . . .	62
5.12	Series de tiempo del <i>Root Mean Square Deviation</i> (RMSD) del esqueleto del péptido C99 <sub>28-55</sub> en el sistema GS-C99 <sub>28-55</sub> a cada valor de pH. . . . .	63
5.13	Distribuciones de las distancias entre el NZ de Lys265 y los CG de los Asp catalíticos para cada pH de muestreo en el sistema GS-C99 <sub>28-55</sub> . . . . .	63

## Índice de cuadros

5.1	Estructuras reportadas de $\gamma$ -secretasa. . . . .	49
5.2	Información sobre los muestreos de <i>Umbrella Sampling</i> de la primera parte de la reacción. . . . .	54
5.3	Información sobre los muestreos de <i>Umbrella Sampling</i> de la segunda parte de la reacción. . . . .	54
5.4	Información sobre los muestreos de <i>Umbrella Sampling</i> de la primera parte de la reacción, para el estudio del efecto de la mutación M51F. . . . .	54