



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Regulación de γ -secretasa: Un acercamiento desde la simulación molecular

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Lic. en Neurociencias José María Montes Montiel

TUTORA PRINCIPAL

Dra. Laura Domínguez Dueñas, Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Rodrigo Aguayo Ortiz, Facultad de Química

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco, Facultad de Medicina

Ciudad de México, noviembre de 2024.



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.



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE
INTEGRIDAD Y HONESTIDAD ACADÉMICA Y
PROFESIONAL
(Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado: "Regulación de γ -secretasa: Un acercamiento desde la simulación molecular" que presenté para obtener el grado de maestro es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

José María Montes Montiel

No. de cuenta: 419066996

Agradecimientos institucionales

A la Universidad Nacional Autónoma de México que me proporciono una excelente educación, entre muchas otras cosas más.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONACHYT) por proporcionarme el apoyo económico en mis estudios de maestría (CVU. 1228480)

A la Dra. Lucía Chávez-Gutiérrez quien me permitió realizar una estancia de investigación en la KU Leuven. Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) y al Proyecto de Ciencia Básica CONACHYT (A1-S-8866) por el apoyo económico para realizar dicha estancia.

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

A los miembros de mi comité tutor por todas sus observaciones y consejos a lo largo del proyecto.

A los miembros del jurado por sus correcciones y buenos comentarios que contribuyeron a mejorar este trabajo:

Dr. Rudiño Piñera Enrique	Presidente
Dr. Gonzales Andrade Martin	Secretario
Dra. Pastor Colón Carmen Nina	Vocal
Dr. Medina Franco José Luis	Vocal
Dra. Auvynet Constance Genevieve Jeanne Henriette	Vocal

Agradecimientos personales

Primero que nadie me gustaría agradecer a mi padre José Montes Calderón, quien siempre ha dado todo por toda su familia, sin su apoyo incondicional todo esto sería tan solo un sueño. De igual forma agradezco a mi familia por siempre preocuparse por mí, tratar de comprenderme y apoyarme de infinitas maneras en mis decisiones.

A la Dra. Laura Domínguez Dueñas quien me permitió ser parte de su grupo de investigación, donde yo creo que crecí muchísimo. Muchas gracias por su paciencia, guía y apoyo.

Al Dr. Rodrigo Aguayo Ortiz, la Dra. Dulce Consuelo Guzmán Ocampo y el Dr. Andrés Felipe Marmolejo Valencia a quienes les agradezco infinitamente todas sus enseñanzas y su amistad. Fueron una parte fundamental en este proceso.

A todos los integrantes del laboratorio SIMQ-230 que me recibieron y orientaron siempre de la mejor manera.

A Javier Bello Avalos por toda su comprensión y por ayudarme a sostenerme cuando flaqueé.

Mis más sinceras gracias.

Índice General

1. Resumen	1
2. Introducción	1
2.1 Enfermedades neurodegenerativas	1
2.2. Enfermedad de Alzheimer	2
2.3 Hipótesis amiloide	4
2.4 El complejo γ -secretasa	6
2.5 Interacción con el sustrato	7
2.6 Regulación por otras proteínas	8
2.8 Regulación por moléculas pequeñas.....	9
2.9 Quimioinformática y cálculos de simulaciones de dinámica molecular	11
3. Hipótesis.....	13
4. Objetivos	14
4.1 Objetivo general	14
4.2 Objetivos particulares	14
5. Metodología	15
5.1 Modulación de γ -secretasa por moléculas pequeñas	16
5.1.1 Simulaciones de dinámica molecular atomísticas	16
5.1.2 Análisis de las simulaciones de dinámica molecular	18
5.1.3 Simulaciones de dinámica molecular aplicando Umbrella sampling.....	20
5.1.4 Acoplamiento molecular	21
5.1.5 Predicción de propiedades.....	22
5.1.6 Búsqueda de nuevos ligandos	22
5.2 Análisis de los sitios de unión de moduladores proteicos	23

5.2.1 Obtención de modos de unión para las Tspan	23
5.2.2 Simulación en grano grueso	24
6. Resultados y discusión: Modulación de γ -secretasa por moléculas pequeñas	26
6.1 Modulación mediada por E2012.....	26
6.1.1 Cálculos de dinámica molecular	26
6.1.2 Caracterización del sitio alostérico	32
6.1.3 Análisis de otros GSM.....	34
6.2 Propuestas de nuevos grupos estructurales.....	36
6.3 Conclusiones.....	38
7. Resultados y discusión: Análisis de los sitios de unión de moduladores proteicos	39
7.1 Interacción con la proteína Tspan6	39
7.2 Conclusiones.....	44
8. Perspectivas	45
9. Bibliografía.....	46
10. Índice de Figuras	69
11. Índice de Tablas	69
12. Índice de Abreviaturas.....	70

1. Resumen

Los péptidos β -amiloide ($A\beta$) son el resultado del procesamiento secuencial de la proteína precursora amiloide (APP) por la proteasa γ -secretasa (GS). La GS escinde de forma secuencial, múltiples veces a la APP, lo que genera péptidos $A\beta$ de distintas longitudes. Las alteraciones en la producción de péptidos $A\beta$, así como su acumulación en agregados proteicos, se han asociado con diversas enfermedades, especialmente con la enfermedad de Alzheimer (EA).

La patogenia de la EA está asociada a una mayor producción de péptidos $A\beta$ largos respecto a los péptidos cortos. En los últimos años se han buscado moduladores de la actividad de γ -secretasa (GSM), con la finalidad de corregir de forma farmacológica la producción aberrante de péptidos $A\beta$. Esta labor de búsqueda ha sido favorecida con el avance en los estudios estructurales en la GS, pues se ha reportado la estructura del complejo enzima sustrato, así como la estructura de la GS unida a algunas moléculas pequeñas.

Este trabajo buscó: 1) describir la interacción de la GS con el GSM de nombre E2012, 2) proponer variaciones estructurales que permitan la generación de nuevos ligandos, y 3) analizar posibles modos de unión de las proteínas Tspan, las cuales regulan de forma endógena la actividad de la GS. Para investigar lo anteriormente mencionado, se emplearon diversas técnicas computacionales a lo largo del estudio.

Entre los resultados destacan la propuesta de una variación de anillo para el grupo metilimidazol, al igual se proponen variaciones en el patrón de sustitución del grupo fenilimidazol, con el fin de explorar nuevos andamios con afinidad hacia la GS y optimizar las propiedades farmacocinéticas de los GSM. Además, se propuso un modo de unión entre la proteína Tspan6 y la GS.

El análisis de la modulación de la GS es indispensable para una eficiente búsqueda de potenciales nuevos fármacos enfocados en tratar a la EA.

2. Introducción

2.1 Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas (END) son trastornos que comprometen el sistema nervioso. Se diferencian de condiciones agudas, como la isquemia cerebral, por la pérdida gradual o el deterioro de poblaciones neuronales específicas¹, lo que puede resultar no solo en muerte celular sino también en alteraciones de la eficiencia sináptica².

El envejecimiento se destaca como el principal factor de riesgo para las END, pues está estrechamente asociado con diversos procesos fisiológicos y moleculares. Entre éstos, se incluyen el incremento de células senescentes, la disfunción mitocondrial, la alteración en la detección de nutrientes, la pérdida de proteostasis y, significativamente, la inestabilidad cromosómica inducida por disfunciones en el complejo protector conocido como telómero/shelterina^{3,4}. Otros factores de riesgo incluyen predisposición genética, estilo de vida y exposición a toxinas⁵.

Estos trastornos a menudo implican proteínas disfuncionales, que sirven como biomarcadores y criterios de clasificación. Se reconocen nueve categorías principales basadas en el tipo de acumulación proteica patológica: taupatías, α -sinucleopatías, TDP-43 proteinopatías, enfermedades por repetición de trinucleótidos, enfermedades priónicas, FUS/FET proteinopatías, neuroserpinopatías, ferritinopatías y enfermedades amiloidogénicas⁶.

Debe tenerse en claro que, aunque existen formas puras en donde sólo existe una proteína alterada, a lo largo de la última década se ha aceptado la idea de que las END se presentan de manera frecuente como un mosaico de diferentes proteínas disfuncionales.⁷ Las END son el reflejo de un conjunto multifactorial que desencadena una pérdida de las funciones cognitivas y/o motoras⁸.

2.2. Enfermedad de Alzheimer

Dentro de las END, la enfermedad de Alzheimer (EA) representa la principal causa de demencia. Clínicamente, se caracteriza por una pérdida progresiva de memoria y un deterioro cognitivo. En términos patológicos, es notable la acumulación de ovillos neurofibrilares intracelulares y de placas de péptidos β -amiloides ($A\beta$) extracelulares⁹.

En el año 2021 en Estados Unidos habían cerca de 6.2 millones de habitantes mayores de 65 años que vivían con demencia ocasionada por la EA; se prevé que esta cifra aumente a 13.8 millones para 2060¹⁰. Por otro lado, en México en el año 2014 alrededor de 860,000 personas padecían esta enfermedad y se proyectó que para el 2050 esta cifra alcanzará los 3.5 millones. Estas tendencias se pueden explicar parcialmente debido al envejecimiento de la población, y muestran una creciente necesidad de atender esta problemática de salud pública¹¹.

La EA provoca una atrofia cerebral progresiva que incide principalmente en el hipocampo y la corteza entorrinal. A medida que avanza la enfermedad, se evidencia la extensión de los ovillos neurofibrilares y las placas amiloides hacia otras regiones del cerebro, tal como se ilustra en la Figura 1^{12,13}.

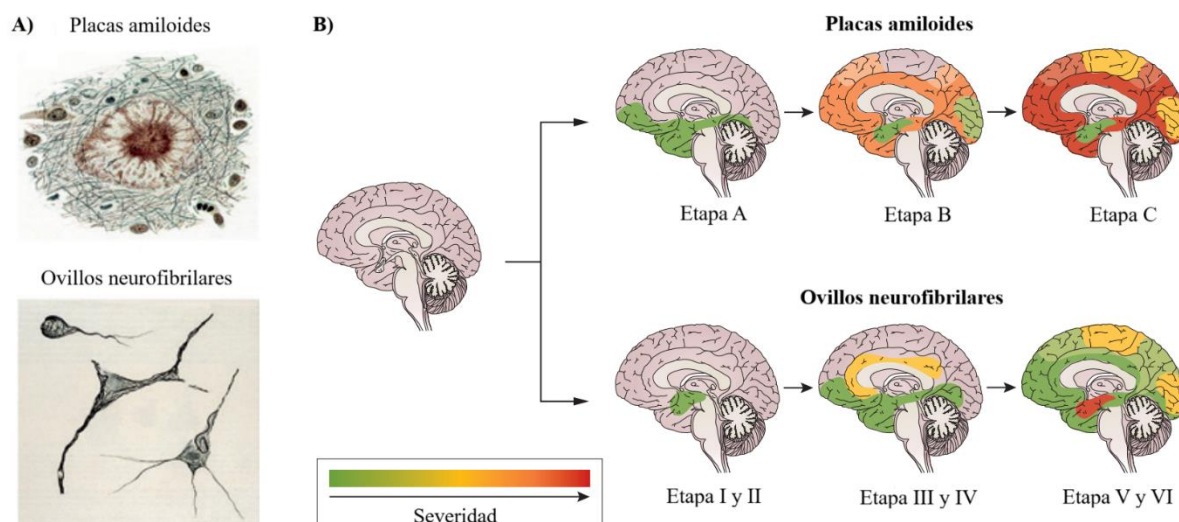


Figura 1 Evolución de agregados proteicos en la EA. Imagen tomada de Masters, C. L *et al.* 2015. A) se muestran tejidos histológicos teñidos con el método Bielschowsky el cual consiste en una tinción argéntica que permite visualizar los agregados proteicos. B) Se ilustra la extensión de los agregados proteicos a lo largo del cerebro conforme evoluciona la EA¹².

Según estudios de asociación del genoma completo o GWAS, se han detectado 40 *loci* asociados con la EA, entre los que están APP, PSEN1/2, APOE, CR1, BIN1, TREM2, CLU, SORL1, ADAM10, ABCA7, CD33, SPI1 y PILRA. Dentro de las funciones que tienen las proteínas codificadas por estos genes se encuentran el metabolismo de lípidos, la participación de procesos de muerte celular, procesos de inflamación, procesos inmunológicos, y participación en vías de endocitosis, entre otros.^{14,15}

Los tratamientos actuales para la EA se centran en el uso de inhibidores de la acetilcolinesterasa y de antagonistas de los receptores de glutamato del tipo N-metil-D-aspartato (Figura 2). Estos tratamientos buscan preservar la función colinérgica y prevenir la excitotoxicidad que puede llevar a la muerte celular. Aunque estos fármacos no curan la EA, proporcionan cuidados paliativos para los pacientes. Paralelamente, la investigación terapéutica avanza hacia estrategias para impedir la formación de agregados proteicos y placas de péptidos A β ¹⁶⁻¹⁸.

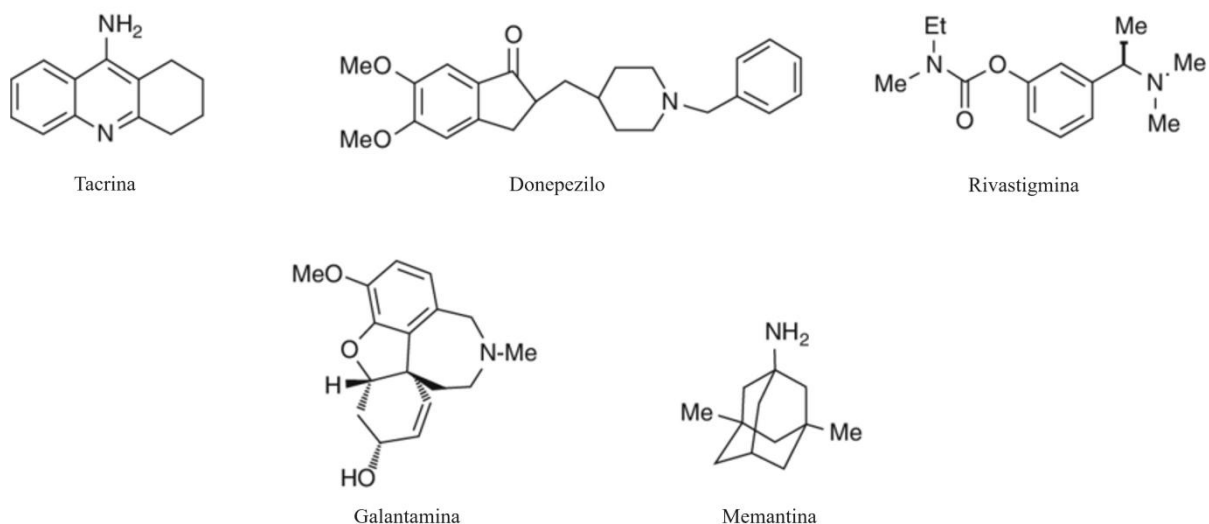


Figura 2 Fármacos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés). En la parte superior se muestran las estructuras químicas de los fármacos que actúan como inhibidores de la acetilcolinesterasa, los cuales aumentan la concentración de acetilcolina en el cerebro al inhibir su degradación, ayudando a mejorar la neurotransmisión colinérgica. En la parte inferior se ilustran los antagonistas de los receptores de glutamato del tipo N-metil-D-aspartato, que regulan la actividad del glutamato para prevenir la excitotoxicidad neuronal^{19,20}.

2.3 Hipótesis amiloide

La hipótesis amiloide postula que los péptidos A β son el desencadenante más temprano de la EA. Su respaldo inicial provino cuando se encontró una relación entre la enfermedad de Alzheimer de tipo familiar, con mutaciones en ciertas proteínas como en la proteína precursora de amiloide (APP) y en las isoformas de las proteínas presenilina (PS1/2). Estas mutaciones alteran la proporción con la que se producen los péptidos A β de distinta longitud²¹. Esta idea se fortaleció con la observación de una acumulación de péptidos A β en etapas tempranas, e incluso asintomáticas de la enfermedad, sugiriendo que los agregados de péptidos A β preceden a la formación de ovillos neurofibrilares, los cuales están asociados a la hiperfosforilación de la proteína Tau; y a posteriores procesos de degeneración neuronal²². Además, el uso de inmunoterapia dirigida a los péptidos A β ha proporcionado evidencia adicional, ya que ha demostrado reducir las concentraciones de la proteína Tau fosforilada²³.

La APP es una proteína transmembranal de tipo 1, lo que significa que cruza la membrana una sola vez y que su extremo N-terminal se encuentra direccionado al ambiente extracelular. Esta proteína, además de estar asociada con la producción de péptidos A β ,

desempeña papeles en procesos de desarrollo neuronal, regulación sináptica, y regulación transcripcional, entre otros^{24,25}.

La APP puede ser procesada por dos vías (Figura 3): 1) En la vía no amiloidogénica la APP es escindida en el dominio amiloide por α -secretasa (ADAM10). Esta escisión da como resultado un péptido soluble y una proteína membranar de 83 residuos de aminoácidos, conocida como C83. Posteriormente, C83 es escindido por la aspartil proteasa γ -secretasa (GS), generando un péptido extracelular llamado p3 y un péptido intracelular de nombre AICD; 2) La segunda vía, conocida como amiloidogénica, inicia con la escisión de la APP por la β -secretasa (BACE-1) produciendo un péptido de mayor longitud, denominado C99. Este péptido membranar es procesado por la GS, dando como productos finales a los péptidos A β y AICD²⁶.

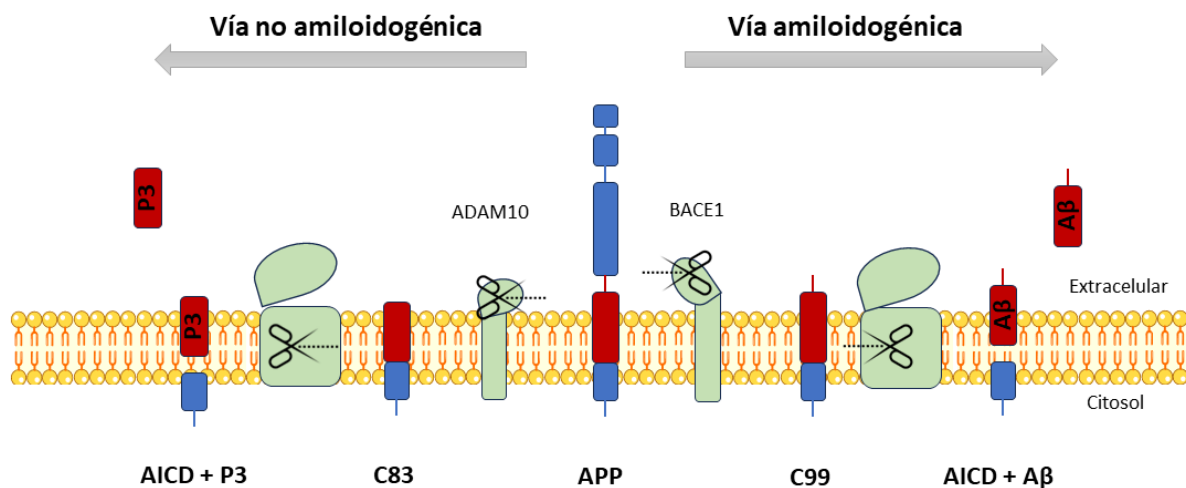


Figura 3 Vías de procesamiento de la APP. Imagen de ambas vías del procesamiento de la APP. El primer paso en ambas vías consta de la escisión del ectodominio por ADAM10, la principal α -secretasa, o por la β -secretasa (BACE-1). La remoción del ectodominio es un paso fundamental para el posterior procesamiento por la enzima GS.

Ambas vías de procesamiento difieren en localización pues se ha reportado que la vía no amiloide ocurre de manera mayoritaria en la superficie celular, mientras que la vía amiloide ocurre dentro de compartimentos intracelulares de pH ácido. Esta variación en el pH favorece la actividad de la BACE-1 y de la GS que escinden a la APP^{27,28}.

Estudios realizados en animales y en cerebros *post mortem* revelan que la vía no amiloide es más abundante en estadios tempranos, mientras que la vía amiloide se correlaciona positivamente con el envejecimiento²⁵.

La hipótesis amiloidogénica, aunque ha regido el pensamiento sobre la patogenia de la EA por más de 30 años, es continuamente examinada y hay evidencia en contra, por lo que no debe ser tomada como la única explicación de esta enfermedad, que es multifactorial y con múltiples vías de desarrollo involucradas.

2.4 El complejo γ -secretasa

La GS es una aspartil proteasa conformada por 4 subunidades. Dichas subunidades se ilustran en la Figura 4 y consisten en: la faringe anterior defectuosa (APH1) en color rosado; la presenilina (PS) en color azul; el potenciador de presenilina 2 (PEN2) en color azul tenue, y la nicastrina (NCST) en color gris. A su vez la nicastrina se puede subdividir en un lóbulo mayor, un lóbulo menor y una tapa²⁹.

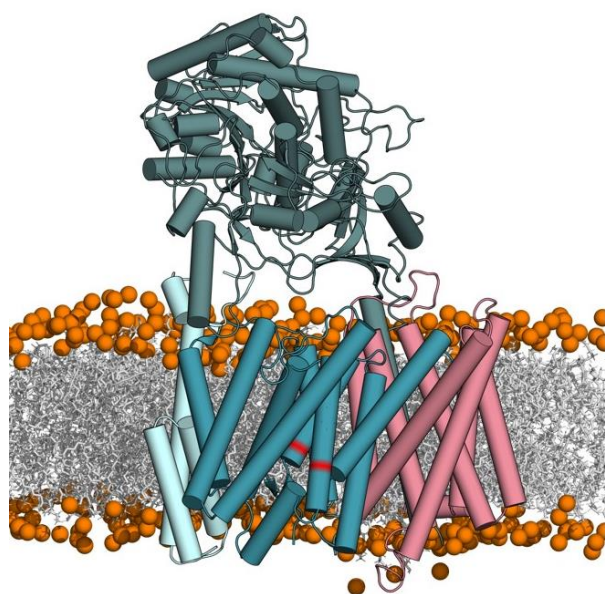


Figura 4 Estructura tridimensional de la GS PDB:7D8X³⁰. Representación del complejo proteico embebido en una membrana lipídica. En esferas naranjas se muestran los átomos de fosforo correspondientes a la fosfatidilcolina, mientras que los residuos de ácidos grasos se muestran en gris. Dentro de la PS en color rojo se muestra la posición de los aspárticos catalíticos 257 y 385 en las hélices transmembranales 6 y 7 respectivamente. Imagen creada con PyMol³¹.

La PS es la subunidad catalítica de la GS; se compone de 9 hélices transmembranales (TM). Los aspárticos catalíticos se encuentran en las hélices TM6 y TM7. Debido a una endoproteólisis necesaria para la maduración del complejo, la PS está dividida en sus dominios N-terminal y C-terminal, los cuales se componen de los segmentos que van de TM1 a TM6 y de TM7 a TM9 respectivamente³². El dominio N terminal interactúa con el PEN2 la cual contiene 3 hélices TM, mientras que el dominio C terminal interactúa con la APH1, la cual a su vez se compone de 7 hélices TM. En el caso de la NCST es una glicoproteína con un ectodominio extracelular de gran tamaño. La NCST está anclada por un dominio transmembranal en el extremo C terminal, que interactúa con la APH1²⁹.

2.5 Interacción con el sustrato

Se ha reportado que la GS puede escindir al menos 148 sustratos distintos además de la APP, dentro de los cuales se encuentran Notch, E-cadherina, Fraktalkina, Efrina, IGF-1R, IL-1R, etc. Estos sustratos son proteínas transmembranales de tipo I, que para su procesamiento por la GS requieren un ectodominio extracelular corto o previamente escindido. El ingreso del sustrato a la subunidad catalítica de la GS es controlado por la NCST, la cual impide estéricamente que proteínas con ectodominios grandes puedan entrar a la PS^{33,34}.

Al igual que otras aspartil proteasas, la GS hidroliza a los sustratos mediante un mecanismo ácido-base que involucra los dos residuos de ácido aspártico y una molécula de agua (Figura 5, panel A). De manera general lo que ocurre es un ataque nucleofílico hacia el grupo carbonilo, favorecido por la polarización de la molécula de agua debida a la interacción con el carboxilato. Este ataque nucleofílico genera un intermediario gem-diol, previo a la proteólisis del sustrato. Mediante métodos computacionales se ha propuesto que el aspártico catalítico 385 es aquél que se protona de manera preferente en presencia del sustrato y a pH fisiológico^{28,35,36}.

Durante el procesamiento de la APP por la GS, se producen péptidos A β de longitudes que varían de 51 a 37 aminoácidos (Figura 5, panel B). La longitud de estos péptidos depende del sitio donde la GS realiza el primer corte, este sitio es conocido como sitio ϵ . De manera predominante se pueden generar dos líneas de producción, las cuales inician con la generación de péptidos A β 49 o A β 48. Posterior al corte inicial, la GS realiza entre tres y cuatro cortes adicionales, cada tres residuos de aminoácidos. Los péptidos A β de 40 y 42 aminoácidos son los que se liberan en mayor abundancia. Cabe resaltar que los péptidos A β con una longitud mayor o igual a 42 residuos de aminoácidos son considerados como péptidos largos³⁵.

En la EA, se ha reportado un aumento en la producción de péptidos A β largos en comparación con los cortos. La relación entre los péptidos A β 42 y A β 40, y en particular la proporción entre (A β 42 + A β 43) y (A β 37 + A β 38 + A β 40), es considerada un indicador crítico de la patogenia de la EA. Basándose en estos hallazgos, la comunidad científica ha propuesto como objetivo terapéutico reducir los péptidos A β de mayor longitud y favorecer la generación de formas más cortas³⁷⁻³⁹.

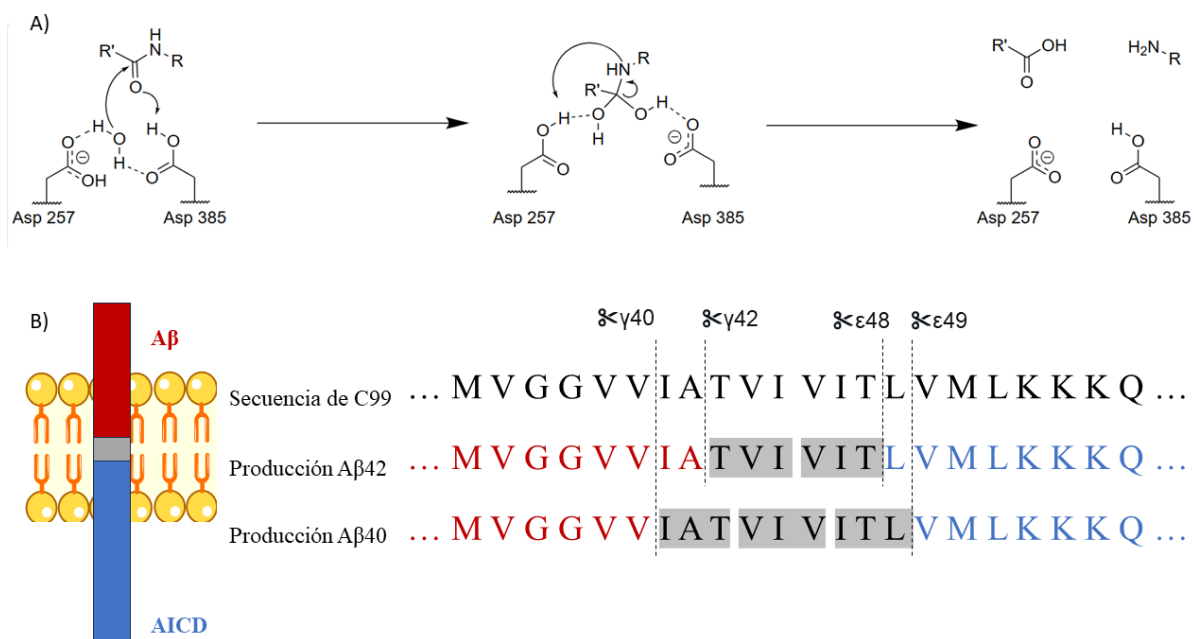


Figura 5 Proteólisis de C99 por la γ -secretasa. A) Mecanismo de reacción ácido base por el cual se escinde al sustrato. El mecanismo inicia por la polarización del agua y el ataque nucleofílico al carbonilo; posterior se muestra el intermediario gem-diol y por último los productos finales. Figura realizada mediante *ChemDraw*. B) Escisión secuencial de C99. Se muestra una comparativa del primer sitio de corte o sitio ϵ en las vías de producción de péptidos Aβ42 y Aβ40; también se muestra la producción de tripéptidos, así como el último corte que se realiza o corte γ .

2.6 Regulación por otras proteínas

Las proteínas Tspan son una familia de proteínas (con 33 miembros en mamíferos) que constan de cuatro hélices TM. Estas proteínas están presentes en casi todos los tipos de células de mamífero⁴⁰. A diferencia de otras proteínas de membrana, las Tspan no tienen un ligando específico y suelen formar micro dominios que facilitan la interacción con diversas proteínas⁴¹. Se ha reconocido que ciertos miembros de la familia de las proteínas transmembranales Tspan desempeñan un papel endógeno en la modulación de la producción de péptidos Aβ. Diferentes estudios han identificado mecanismos independientes a la GS, aunque también se ha postulado la interacción directa con el complejo enzimático^{42,43}. El grupo de P. Saftig reportó que la Tspan3 interactúa con la APP, la ADAM10 y la GS, y que su sobreexpresión puede disminuir la liberación de los péptidos Aβ⁴². Además, se ha reportado que el extremo N-terminal de la PS se co-inmunoprecipita con la Tspan3, insinuando una interacción directa entre estas proteínas.⁴² De manera independiente, el grupo de Bart De Strooper afirma que las proteínas Tspan28 y

Tspan29 interactúan con la GS y regulan la actividad sobre el procesamiento de la APP⁴³. Asimismo, han identificado que la Tspan6 favorece la generación de péptidos A β 40 en detrimento de A β 42, implicando una regulación del sistema vesicular. Este grupo aboga por una investigación más profunda sobre cómo la Tspan6 afecta la procesividad de la GS⁴⁴. La regulación de las proteínas Tspan sobre la GS puede observarse incluso sobre otros sustratos. En estudios sobre la proteólisis de Notch se ha reportado que las Tspan5 y Tspan33 parecen mejorar el corte mediado por la GS. Además, se ha reportado una redundancia funcional entre las subfamilias de estas proteínas⁴⁵.

2.8 Regulación por moléculas pequeñas

Además de analizar moduladores endógenos de la GS, en los últimos años se han tratado de buscar moléculas con propiedades farmacológicas que alteren la actividad de la GS. Inicialmente se buscaron inhibidores con el objetivo de impedir la formación de péptidos A β . En este proceso se encontraron varias problemáticas, ya que los inhibidores de la GS (GSI) interfieren en la señalización dependiente de Notch1, lo cual resulta catastrófico, generando problemas cognitivos, alteraciones gastrointestinales y una mayor probabilidad de desarrollar cáncer de piel⁴⁶.

Posteriormente, se dirigió la investigación hacia la búsqueda de moléculas moduladoras de la actividad de la GS (GSM), las cuales, en lugar de inhibir completamente la enzima, modulan su actividad para reducir la producción de los péptidos A β largos y promover la producción de péptidos A β más cortos, los cuales son más solubles y menos propensos a la agregación⁴⁷. Uno de los grupos representativos de los GSM, son las moléculas que poseen derivados del grupo fenilimidazol (PhIm). Estos ligandos se caracterizan por tener cuatro o más anillos consecutivos. Esto se esquematiza en la Figura 6, la cual ilustra al GSM E2012⁴⁸.

La búsqueda de GSM ha presentado problemáticas en las etapas preclínicas puesto que las moléculas tienden a ser sumamente lipofílicas, lo que puede dificultar su distribución en el organismo y su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica. Además, es fundamental que los nuevos GSM no interfieran con otras proteínas importantes, como los citocromos CYP, que son esenciales para el metabolismo de fármacos; ni con el canal de potasio hERG, cuya inhibición podría llevar a efectos adversos cardíacos⁴⁸.

Si bien existen desafíos, la investigación en torno a la búsqueda de nuevos GSM sigue siendo un campo de estudio activo. En 2019 y 2021 se publicaron cuatro estructuras de la GS que fueron resueltas por criomicroscopía electrónica. Estas estructuras revelaron los sitios de

unión del sustrato C83, así como los sitios de unión de tres distintos GSI y del GSM E2012 (Figura 6)⁴⁹. Estos últimos avances en el estudio de la estructura de la GS impulsan el camino a descubrir los mecanismos de modulación de la GS y a proponer nuevos y mejores ligandos para esta proteína.

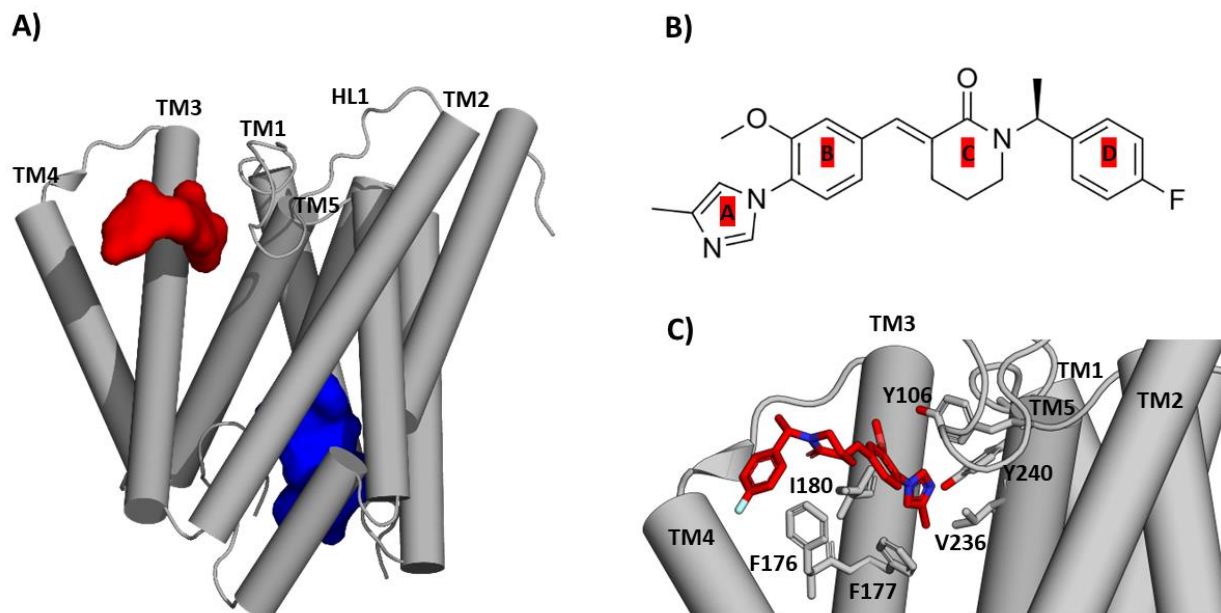


Figura 6 Interacción de la subunidad catalítica PS con moléculas pequeñas. A) Se muestra la subunidad catalítica de la proteasa GS; las coordenadas provienen del PDB 7D8X⁴⁹. Se resaltan las hélices TM1, TM2, TM3 y TM4, así como el bucle que conecta a las hélices TM1 y TM2. En azul se muestra la superficie del GSI L685458 unido al sitio activo de la enzima, mientras que en rojo se muestra al GSM E2012 unido a un sitio alostérico. B) Estructura de E2012: los anillos A y B son los constituyentes del grupo fenilimidazol que comparten varios GSM. C) Modo de unión de E2012 (en rojo). Este modulador interacciona mediante un puente de hidrogeno con la Tyr 106 ubicada en el bucle1, además mantiene interacciones hidrofóbicas con aminoácidos no polares de las hélices uno, tres y cinco. Figura creada con PyMol³¹.

A pesar de contar con estructuras de la GS unida a algunas moléculas pequeñas, cabe mencionar que existen más de 785 moléculas reportadas en la literatura, capaces de actuar como GSM o GSI. Es importante resaltar que, si bien muchas de estas moléculas tienen actividad comprobada, no todas han sido resueltas estructuralmente junto con la proteína. Para algunas de ellas se desconoce el sitio de unión a la GS o el mecanismo por el cual modulan la producción de péptidos A β ⁵⁰.

La modulación de la actividad de la GS ya sea mediante proteínas endógenas como las Tspan o mediante pequeñas moléculas exógenas, ofrece una vía prometedora para el desarrollo

de terapias farmacológicas contra la EA⁵¹. Sin embargo, este campo de estudio es complejo y requiere un entendimiento detallado de las interacciones moleculares entre la GS y sus moduladores, así como de las características específicas de estos últimos⁵².

Estudiar cómo estos moduladores, tanto naturales como artificiales, influyen en la actividad de la GS permite desentrañar los mecanismos moleculares subyacentes. Este conocimiento no solo ayuda a comprender cómo se puede regular la actividad de la GS, sino que también abre la puerta a la optimización de estos moduladores. Por ejemplo, al conocer los sitios de unión y las interacciones clave, es posible diseñar variaciones estructurales en los ligandos para mejorar su eficacia y especificidad⁵³.

2.9 Quimioinformática y cálculos de simulaciones de dinámica molecular

La quimioinformática es una disciplina que, mediante herramientas computacionales, permite predecir fenómenos o características químicas⁵⁴. Se basa en el aprendizaje inductivo, utilizando grandes conjuntos de datos para generar modelos predictivos que pueden anticipar resultados en una amplia gama de procesos químicos⁵⁵.

En el contexto del diseño de fármacos, la quimioinformática se aplica en el modelado de farmacóforos y en estudios cuantitativos de relación estructura-actividad⁵⁶. Las técnicas quimioinformáticas se utilizan principalmente para diseñar nuevos ligandos a partir de cálculos de descriptores y sustituciones de grupos funcionales. Además, la afinidad de ligandos hacia sus respectivos objetivos biológicos puede predecirse mediante métodos de acoplamiento molecular, lo que optimiza el proceso de desarrollo de nuevos fármacos⁵⁷.

Por otro lado, los cálculos de simulaciones de dinámica molecular (DM) son un conjunto de metodologías computacionales que permiten el análisis temporal de sistemas compuestos por átomos⁵⁸. En estas simulaciones, uno de los objetivos es estudiar sistemas que hayan alcanzado un equilibrio termodinámico. Esto asegura que las propiedades del sistema, como la energía y la estructura, sean representativas de un estado estable⁵⁸.

De manera clásica realizar simulaciones de DM se logra a partir de la integración de las ecuaciones de movimiento de Newton y el uso de un campo de fuerza que permita representar las energías potenciales de enlace (enlaces, ángulos de enlace, ángulos de torsión) y de no enlace (van der Waals, coulombica)⁵⁹. De esta manera, se puede predecir, bajo condiciones específicas, la posición de cada átomo en función del tiempo^{58,60}. Estas metodologías han sido ampliamente utilizadas en el estudio de biomoléculas dado que permiten entender cambios conformacionales en las proteínas, mecanismos de unión de ligandos, e interacciones proteína-proteína, entre

otros⁶¹. Existen múltiples campos de fuerza empeñados en el estudio de biomoléculas tales como los campos de fuerza de CHARMM, AMBER, GROMOS y OPLS⁵⁸.

De forma general una limitante que tiene la DM es el tiempo de cómputo necesario para resolver las ecuaciones que describen al sistema, por lo que con dinámica convencional se puede acceder a tiempos de simulación que van desde los picosegundos a los microsegundos⁶². Una de las metodologías propuestas para resolver esta limitante es realizar simulaciones de DM de grano grueso. Estas se denominan así porque se utilizan “esferas” o “perlas” que agrupan y representan el comportamiento de un grupo de átomos. De esta forma, se pierde precisión, pero se gana en eficiencia, ya que se deben resolver las ecuaciones de movimiento para menos elementos⁶³.

Estudios previos de DM han proporcionado información sobre la GS. En 2017 se caracterizaron el estado activo e inactivo de la PS, midiendo la distancia entre la díada catalítica y los ángulos de inclinación de algunas hélices TM. Los autores asociaron una distancia mayor a 1 nm con un estado inactivo, mientras que distancias más cortas correspondían a un estado activo, capaz de efectuar el mecanismo de proteólisis⁶⁴. Investigaciones realizadas en 2018 han reportado cómo la GS interactúa con diferentes composiciones de lípidos y cómo esto afecta su actividad^{65,66}. Además, se ha estudiado el impacto de diferentes mutaciones en la dinámica de la GS^{67,68} y se han examinado sus interacciones con varios sustratos y ligandos^{28,69–71}. Estos datos son cruciales para la búsqueda y el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos contra la EA.

Se propone que nuevos estudios aprovechando las ventajas que ofrece las simulaciones de DM, así como las técnicas quimioinformáticas, podrían permitir tener un mejor entendimiento de la modulación de la GS, así como encontrar nuevos GSM. Por ejemplo, modificar de manera metodológica el andamio de PhIm de E2012 podría optimizar los GSM basados en este grupo funcional. Aunque los GSM derivados de PhIm han mostrado eficacia en la modulación de la GS, es esencial explorar nuevas estructuras químicas que puedan mejorar su afinidad y selectividad por el sitio alostérico de la GS, y reducir posibles efectos secundarios indeseables.

Por otro lado, la interacción entre las proteínas Tspan y la subunidad catalítica PS sugiere la existencia de mecanismos endógenos de regulación que podrían ser aprovechados o modulados farmacológicamente. Comprender estas interacciones es fundamental para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas, ya que podrían ofrecer una vía adicional o complementaria a la modulación directa mediante pequeñas moléculas, abriendo la puerta a nuevas intervenciones en la actividad de la GS y, por ende, en la producción de péptidos Aβ.

3. Hipótesis

Al modificar el andamio de fenilimidazol de E2012 y con la búsqueda de nuevas estructuras químicas con características similares, se encontrarán nuevos ligandos que presenten afinidad por el sitio alostérico de la GS.

La proteína Tspan interaccionará con la presenilina, específicamente cerca de la hélice TM6, que contiene uno de los residuos catalíticos. Se propone que estas interacciones proteína-proteína puedan constituir un mecanismo adicional de modulación de la actividad enzimática de la GS.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Identificar posibles mecanismos para modular la actividad de la enzima GS.

4.2 Objetivos particulares

- Diseñar nuevos andamios moleculares con afinidad por la cavidad alostérica del complejo enzimático GS.
- Describir las propiedades estructurales de la enzima GS en su forma Apo, complejo Enzima-Sustrato y complejo Enzima-Sustrato-Modulador.
- Identificar las regiones de importancia para la interacción complejo Enzima-Sustrato-E2012.
- Proponer variaciones estructurales al anillo de fenilimidazol el cual compone a múltiples moduladores de la GS.
- Proponer un modelo de unión de la proteína Tspan6 al complejo GS mediante predictores de interacciones proteína-proteína y simulaciones de dinámica molecular.
- Describir el posible modo de unión de la proteína Tspan6 al complejo GS.

5. Metodología

En este proyecto se utilizaron aproximaciones computacionales para poder cumplir los objetivos propuestos. La metodología general se esquematiza en la Figura 7 y se describe con detalle a lo largo del capítulo.

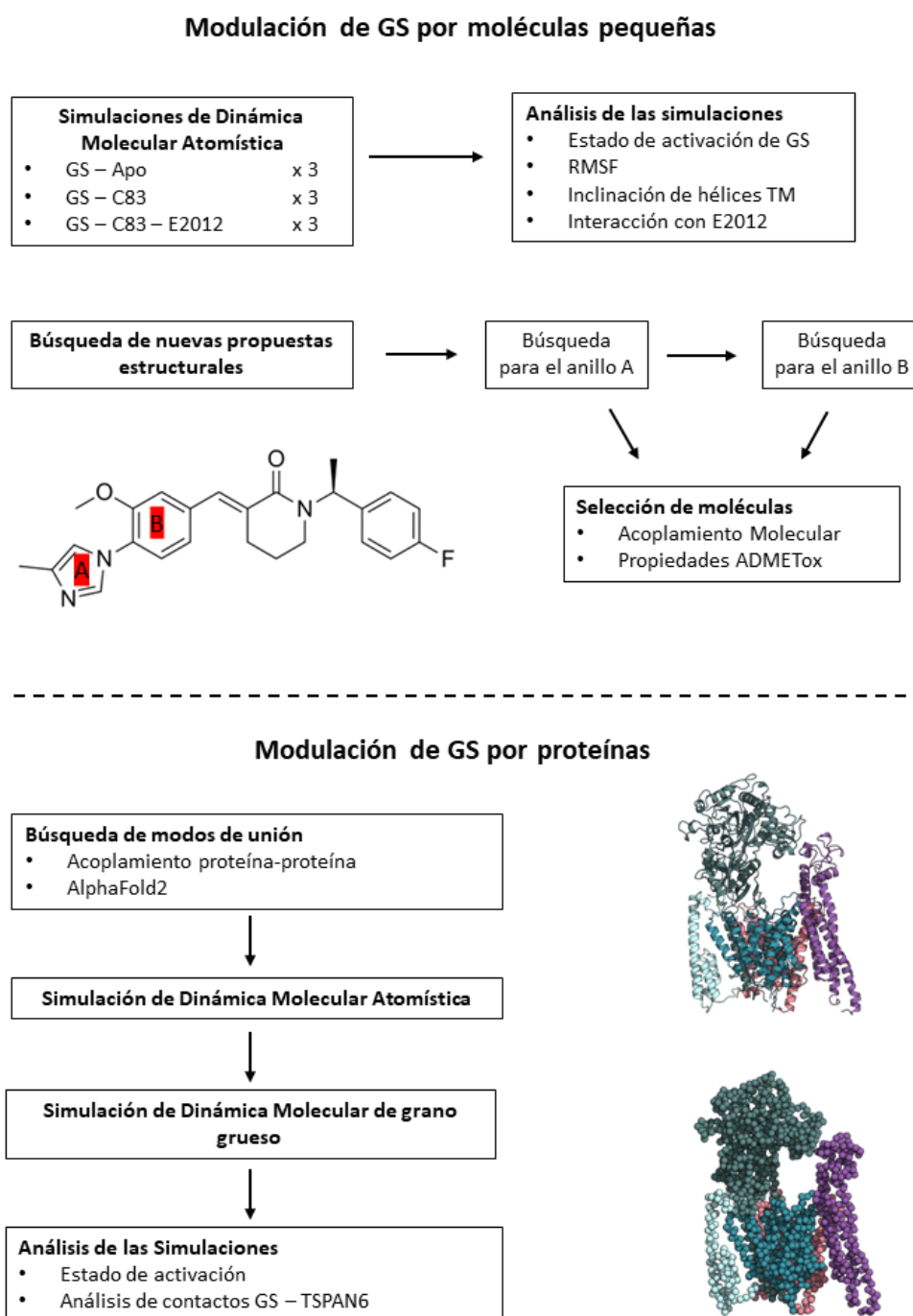


Figura 7 Metodología general. Esquema general de la metodología empleada en este trabajo.

Inicialmente se realizaron simulaciones de DM del complejo enzimático GS en forma Apo, así como en complejo con el sustrato C83 y en complejo con el sustrato C83 junto con el modulador E2012. Aunque el sustrato C83 no es el precursor de los péptidos A β , se utilizó en este estudio debido a que estructuralmente sólo difiere del sustrato C99 en la longitud del ectodominio N-terminal, ambos sustratos son procesados de manera similar por la GS^{72,73}, y a diferencia de C99, el complejo GS-C83 se encuentra determinado de forma experimental y reportado en el PDB⁷⁴. Dichas simulaciones de DM se realizaron con la finalidad de comparar el comportamiento de los tres sistemas previamente mencionados, así como de identificar las regiones de importancia con las cuales interactúa el modulador E2012.

Una vez identificados las regiones de importancia con las cuales se genera la interacción entre E2012 y el complejo enzima-sustrato, se realizó una búsqueda de nuevas estructuras o andamios moleculares como alternativa al grupo fenilimidazol, el cual está presente en E2012 y otros GSM. Se utilizó herramientas quimioinformáticas como los servidores ADMETLab⁷⁵ y SwissADME^{76,77} para poder jerarquizar y seleccionar estructuras.

Con el objetivo de proponer un modo de unión de la proteína Tspan6 al complejo enzimático GS, se utilizaron técnicas para la predicción de hetero multímeros. Posteriormente, se realizaron simulaciones de DM de grano grueso para analizar el comportamiento del complejo GS-Tspan6 en escalas de tiempo más largas que las obtenidas en simulaciones atomísticas.

5.1 Modulación de γ -secretasa por moléculas pequeñas

5.1.1 Simulaciones de dinámica molecular atomísticas

Con el objetivo de comparar las características estructurales de la GS en su forma Apo, en complejo enzima sustrato y en complejo enzima sustrato E2012, se prepararon sistemas del complejo proteico embebido en una membrana homogénea de 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina (POPC). La elección de usar POPC se basa en que se ha reportado que los lípidos que contienen fosfatidilcolina están enriquecidos en neuronas y en otras células gliales⁷⁸. Además, se ha reportado que la GS es activa en ambientes compuestos únicamente por POPC^{79,80}.

A partir de las coordenadas del PDB 7D8X⁴⁹, retirando el modulador E2012 y al inhibidor L685-458 se preparó el sistema Apo. Para analizar el complejo enzima-sustrato, se trabajó con las coordenadas del PDB 6IYC⁷⁴, la cual contiene al sustrato C83 unido a la GS. Este sistema, al cual se nombrará en adelante como “Sus”, se le completó los residuos del

extremo N-terminal (Asp 24 a Asn 28, numeración A β) cuyas coordenadas no fueron determinadas en la entrada del PDB. También se corrigió la mutación del sustrato (V25C, numeración A β), así como la mutación de la PS (Q112C), que se introdujeron experimentalmente para poder obtener la estructura. En el servidor de *CHARMM-GUI Membrane Builder*^{81–87} se embebió a la proteína en una membrana homogénea con 180 moléculas de POPC por cada monocapa. Se solvató con un modelo de agua de 3 puntos (TIP3P) y de acuerdo con lo reportado anteriormente se protonó el Asp 385 de la PS^{28,68}. El sistema se neutralizó con una concentración de 0.15 M de cloruro de sodio para emular las condiciones fisiológicas y asegurar la estabilidad electrostática del complejo enzimático durante la simulación^{88,89}.

Partiendo de una estructura proporcionada por Guzmán-Ocampo D, *et al.*⁹⁰, se obtuvo el sistema GS-C83-E2012 (referido en este trabajo como sistema “Cpx”). Guzmán-Ocampo D, *et al.* construyeron el sistema partiendo de la entrada del PDB 6IYC⁷⁴ y realizaron simulaciones de metadinámica para posicionar al modulador E2012 en el sitio descrito del PDB 7D8X⁴⁹. Al igual que los sistemas Apo y Sus, el sistema Cpx se embebió en una membrana homogénea de POPC.

Para realizar los cálculos de simulaciones de DM se utilizó el *software* Amber22^{91,92}, empleando los campos de fuerza ff14SB⁹³, LIPID21⁹⁴, TIP3P⁹⁵ y GAFF2^{96,97}. Se utilizaron los *inputs* generados por *CHARMM-GUI Membrane Builder*^{81–87,98} para simular los sistemas correspondientes a la GS^{81,84}(Tabla 1).

Tabla 1 Simulaciones atomísticas. Descripción general de las simulaciones atomísticas empleadas en este estudio.

Sistema	Tiempo de simulación	Núm. replicas	Núm. Átomos
Apo (PDB: 7D8X)	1500 ns	3	240802
Sus (PDB: 6IYC)	1500 ns	3	242994
Cpx (PDB: 6IYC)	1500 ns	3	246124

La minimización se llevó a cabo para reducir tensiones iniciales en el sistema. El proceso incluyó un total de 5000 ciclos de minimización, utilizando 2500 ciclos iniciales con el algoritmo de descenso pronunciado, seguido de 2500 ciclos utilizando gradiente conjugado. Para calcular las interacciones no enlazadas, se aplicó un corte de 9.0 Å. Se utilizaron restricciones posicionales para los residuos proteicos y para los grupos cabeza de los lípidos

con una constante de fuerza de $10.0 \text{ kcal/mol} \cdot \text{\AA}^2$ para las proteínas y $2.5 \text{ kcal/mol} \cdot \text{\AA}^2$ para la membrana.

El protocolo de equilibrio consistió en una serie de simulaciones NVT y NPT para estabilizar la temperatura y la presión del sistema.

Se realizaron dos fases de simulación NVT. Cada una de las fases consistió en equilibrar 125 ps, utilizando pasos de integración de 1 fs. El sistema fue llevado a una temperatura de 310.15 K utilizando un termostato de Langevin con un coeficiente de fricción de 1.0 ps^{-1} . Las restricciones posicionales en la primera fase NVT fueron aplicadas con constantes de fuerza de $10.0 \text{ kcal/mol} \cdot \text{\AA}^2$ para proteínas y $2.5 \text{ kcal/mol} \cdot \text{\AA}^2$ para la membrana, posteriormente en la segunda fase las constantes se redujeron a $5.0 \text{ kcal/mol} \cdot \text{\AA}^2$ y $2.5 \text{ kcal/mol} \cdot \text{\AA}^2$ de manera respectiva.

La simulación NPT consistió en cuatro fases sucesivas, cada una con una duración de 500 ps, con pasos de integración de 2 fs. La temperatura se mantuvo a 310.15 K. Se utilizó un barostato de Berendsen acoplado semi-isotrópicamente para mantener la presión en 1 bar y se estableció una constante de tiempo de presión (τ_{p}) de 1.0 ps. Durante estas fases, las restricciones posicionales se redujeron progresivamente, comenzando en $2.5 \text{ kcal/mol} \cdot \text{\AA}^2$ para proteínas y $1.0 \text{ kcal/mol} \cdot \text{\AA}^2$ para la membrana, y finalmente eliminándose en la última fase de NPT.

Tras la etapa de equilibrio, se realizaron simulaciones de producción bajo condiciones NPT para un total de 1500 ns. Este tiempo fue seleccionado con base en el análisis preliminar de RMSD, el cual indicó que el sistema alcanzaba el equilibrio aproximadamente a los 500 ns; por lo tanto, se decidió realizar 1 μs adicional de simulación para asegurar una buena representación del comportamiento dinámico del sistema en equilibrio.

5.1.2 Análisis de las simulaciones de dinámica molecular

El análisis de las trayectorias de cada uno de los sistemas se realizó con CPPTRAJ de Amber y MDAnalysis^{99–101}. Por otro lado, los análisis estadísticos se realizaron mediante la paquetería de Python SciPy¹⁰².

La desviación cuadrática media (RMSD, por sus siglas en inglés) es una medida comúnmente utilizada para comparar la similitud conformacional entre dos estructuras o para analizar los cambios conformacionales de una estructura a lo largo del tiempo. Para calcular el RMSD, se deben seguir dos pasos fundamentales 1) Paso de alineación: Se establece una correspondencia uno a uno entre los átomos equivalentes de ambas estructuras. 2) La estructura

se rota y traslada de manera que se minimice la suma de los cuadrados de las distancias entre átomos equivalentes¹⁰³.

En el contexto de simulaciones de DM, donde se requiere analizar la similitud conformacional a lo largo del tiempo, el cálculo del RMSD se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$RMSD(x, x^{ref}) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N [(R \cdot x_i(t) + \tau) - x_i^{ref}]^2}$$

Donde x^{ref} es la estructura de referencia, R es el factor de rotación, τ es la traslación aplicada para minimizar las distancias, y N es el número de átomos¹⁰⁰. En este trabajo los cálculos de RMSD se realizaron utilizando únicamente los átomos del esqueleto de la proteína, ya que las fluctuaciones de las cadenas laterales no representan cambios conformacionales significativos a nivel global¹⁰³.

La fluctuación cuadrática media (RMSF, por sus siglas en inglés) es una medida que cuantifica la flexibilidad de una molécula o de regiones específicas de ella. A diferencia del RMSD, que mide el desplazamiento promedio de toda la estructura en un instante dado, el RMSF evalúa la fluctuación o vibración de un átomo o grupo de átomos en relación con una estructura de referencia¹⁰⁴.

Para el cálculo del RMSF en el contexto de simulaciones de DM, se utiliza un conjunto de estructuras que representan la evolución temporal de la molécula. La estructura de referencia puede ser la estructura media, en la cual cada átomo se encuentra en la posición promedio de todas las posiciones registradas, o la estructura representativa, que es aquella más similar a todas las demás estructuras del conjunto, calculada mediante un análisis de RMSD por pares⁹⁸. La ecuación utilizada para calcular el RMSF de un átomo i es la siguiente:

$$RMSF_i = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{j=1}^T (\vec{r}_{j,i}) - \frac{1}{T} \sum_{k=1}^T \vec{r}_{k,i}}^2$$

Donde $r_{j,i}$ representa las coordenadas del átomo i en la estructura j, y T es el número total de estructuras consideradas. Se asume que las coordenadas han sido rotadas y trasladadas previamente para minimizar las distancias con una estructura de referencia¹⁰⁵.

En este trabajo, se aplicó de forma independiente el algoritmo de agrupamiento *K-means* a las simulaciones de dinámica molecular para los sistemas Apo, Sus y Cpx. Esto permitió obtener la estructura más representativa, que se utilizó como estructura de referencia. Los

cálculos de RMSF se realizaron para cada residuo de aminoácido, considerando todos los átomos de cada residuo.

El análisis de las hélices TM se realizó empleando la librería MDAnalysis en Python, utilizando el submódulo HELANAL^{99,100}, que permite caracterizar la geometría de hélices de al menos nueve residuos de aminoácidos. HELANAL se basa en la metodología propuesta por Sugeta y Miyazawa, y utiliza ventanas móviles que cubren cuatro carbonos alfa¹⁰⁶.

El método consiste en seleccionar cuatro carbonos alfa consecutivos para ajustar un vector, denominado "eje local", que se extiende desde el origen de esa sección de la hélice hasta el último carbono alfa de la ventana seleccionada. A partir del conjunto de ejes locales, se ajusta un vector de dirección general para toda la hélice, llamado "eje global", que permite medir el ángulo de inclinación (*tilt*) respecto al eje z. Adicionalmente, al contar con múltiples ejes locales, es posible calcular el ángulo de desviación o *kink* mediante la comparación del ángulo entre un eje local y otro que esté separado por tres ventanas (Figura 8). HELANAL define que una hélice presenta una desviación significativa si el ángulo de desviación excede los 20°.

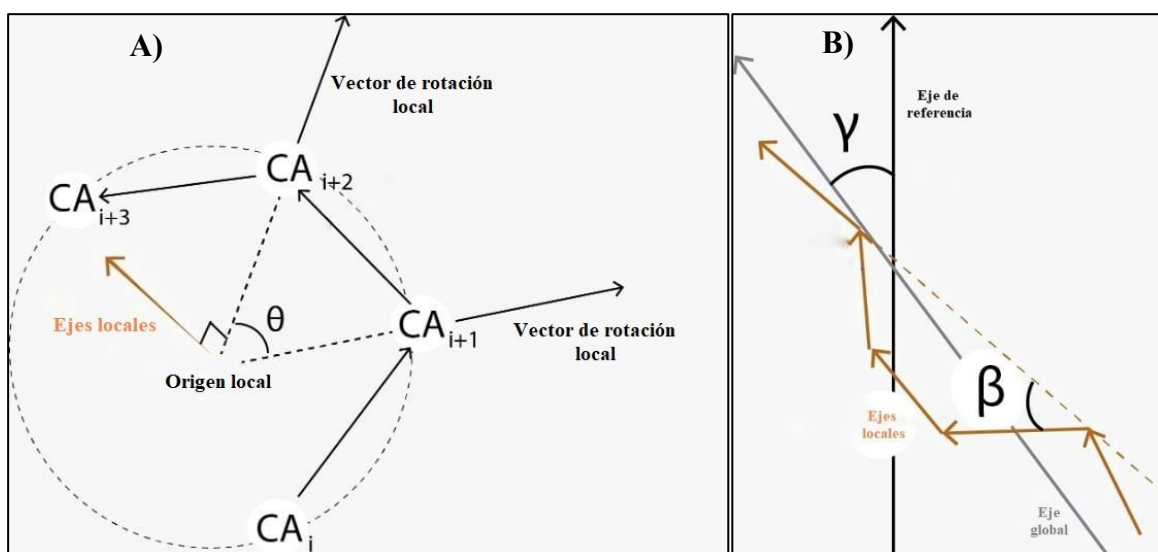


Figura 8 Análisis por ventanas de HELANAL. A) La hélice se analiza en grupos de cuatro residuos de aminoácidos, calculándose parámetros como los orígenes locales y los vectores de rotación local. B) Un vector global ajustado a la hélice permite calcular el ángulo de inclinación (γ) con respecto al eje z de referencia. A partir de los ejes locales también se puede determinar el ángulo de desviación local (β).

5.1.3 Simulaciones de dinámica molecular aplicando Umbrella sampling

Siguiendo la metodología recomendada para Amber¹⁰⁷, el proceso inicio a partir de una membrana previamente equilibrada, compuesta por 90 moléculas de POPC en cada monocapa.

En esta se ubicó en el centro de la membrana al compuesto 1-(2-Metoxifenil)-4-metil-1H-imidazol, el cual es el fragmento estructural de E2012 que corresponde al anillo PhIm.

La simulación inició con una etapa de minimización realizando 5000 ciclos iniciales mediante el algoritmo de descenso pronunciado, posteriormente se realizó la misma cantidad de ciclos utilizando gradiente conjugado. Este paso fue seguido de una etapa de calentamiento gradual. En este calentamiento, la temperatura del sistema fue elevada de 0 a 100 K en 2.5 ps, con restricciones en las posiciones de los lípidos para evitar distorsiones estructurales. Posteriormente, el sistema fue calentado de 100 a 310 K en un periodo de 50 ps bajo un control de temperatura mediante dinámica de Langevin y con el barostato isotrópico aplicado, manteniendo la presión en 1 atm. Durante estas simulaciones se utilizaron pasos de integración de 2 fs.

Conforme a lo descrito en la literatura, se aplicó una fuerza para arrastrar el centro de masas de E2012 desde el centro de la membrana hacia la región acuosa externa, a una velocidad de 1 Å/ns hasta alcanzar una distancia de 40 Å del centro de la membrana¹⁰⁸.

Posterior a esta etapa de arrastre, se generaron ventanas de simulación cada 1 Å, representando así posiciones progresivas del grupo fenilimidazol de E2012 con respecto al centro de la membrana. Cada ventana se simuló de forma independiente durante 5 ns mediante dinámica molecular convencional, con el objetivo de calcular el perfil de energía libre, por lo que se empleó el método de histogramas ponderados junto con el enfoque descrito por Lee *et al.*^{109–111}.

5.1.4 Acoplamiento molecular

Se realizaron acoplamientos moleculares empleando tres programas diferentes, AutoDock Vina v.1.2.0¹¹², Gnina^{113–116} e HYBRID^{117–121}. Para los acoplamientos realizados con AutoDock Vina v.1.2.0¹¹², se prepararon los ligandos y el receptor en formato PDBQT y se definió una caja de 20x20x20 Å, centrada en el sitio ocupado por E2012 en la estructura Cpx, se utilizó un valor de exhaustividad de 32, para asegurar resultados consistentes. En el caso de Gnina^{113–116}, se generó automáticamente una caja tomando como referencia la posición de E2012. Para HYBRID^{117–121}, el receptor fue preparado de tal manera que se identificara la cavidad ocupada por E2012 en complejo Cpx antes del acoplamiento, se generaron hasta 6000 conformaciones por ligando utilizando la herramienta OMEGA¹²¹. En los tres casos, la proteína se mantuvo rígida, mientras que los ligandos se trataron como flexibles.

Con el fin de integrar y comparar las predicciones de interacción entre los distintos compuestos, se calculó la eficiencia del ligando, que permite normalizar los puntajes de

acoplamiento en función del tamaño molecular. En este trabajo, la eficiencia del ligando se define como el promedio de los tres puntajes de acoplamiento obtenidos con cada *software*, dividido entre el número de átomos pesados del ligando (átomos distintos a hidrógeno) y multiplicado por -1. Un valor más alto en esta métrica indica una mejor interacción relativa por átomo pesado, facilitando así la comparación entre compuestos de diferente tamaño.

5.1.5 Predicción de propiedades

Para predecir propiedades de permeabilidad, se utilizó el servidor web PERMM^{122,123}, una herramienta basada en modelos de solubilidad-difusión que calcula la permeabilidad de moléculas bioactivas a través de la barrera hematoencefálica y otras membranas. Este servidor predice los coeficientes de permeabilidad y la energía de unión a membranas, optimizando la posición espacial de la molécula mientras atraviesa la membrana, lo que facilita el análisis de rutas de translocación pasiva.

Por otro lado, SwissADME^{76,77} y ADMETLab⁷⁵ se emplearon para obtener una evaluación integral de propiedades físicoquímicas, farmacocinéticas y de toxicidad, permitiendo así una mayor cantidad de descriptores para el análisis. SwissADME⁷⁶ proporciona predicciones sobre biodisponibilidad, absorción y afinidad hacia la química médica utilizando modelos como BOILED-Egg⁷⁷ para permeabilidad y filtros de alerta estructural para detectar posibles fragmentos tóxicos. ADMETLab⁷⁵, en cambio, realiza predicciones de propiedades de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad utilizando modelos que se entrenan con datos experimentales extensos, y aplica una combinación de técnicas de clasificación y regresión para una mayor precisión. Ambas herramientas se validan mediante técnicas de aprendizaje automático que aseguran una robustez confiable de sus modelos predictivos.

5.1.6 Búsqueda de nuevos ligandos

Con el objetivo de proponer nuevas estructuras que pudieran sustituir al grupo PhIm, se buscaron bioisómeros para los dos anillos que constituyen a este grupo. El proceso se llevó a cabo mediante el *software* BROOD de la compañía OpenEye¹²⁴, el cual permite identificar fragmentos similares a una estructura objetivo, considerando tanto su forma como sus características electrostáticas. La búsqueda de bioisómeros se realizó utilizando la base de datos proporcionada por OpenEye la cual cuenta con 20.7 millones de fragmentos, derivados de la base de datos ChEMBL 31¹²⁵.

El primer paso consistió en buscar bioisómeros para el anillo imidazol. A cada una de las moléculas propuestas por *BROOD*¹²⁴ se les aplicaron aproximaciones rápidas y de bajo costo computacional. Para evaluar características de permeabilidad, se utilizó el servidor web PERMM, que predice la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y la energía de unión a membranas biológicas^{122,123}. Además, se calcularon propiedades fisicoquímicas y predicciones farmacocinéticas usando los servidores SwissADME^{76,77} y ADMETlab⁷⁵. Los cálculos de acoplamiento molecular se llevaron a cabo con los programas AutoDock Vina v.1.2.0¹¹², Gnina^{113–116} e HYBRID de OpeEye^{117–121}.

Posteriormente, se filtraron las moléculas propuestas según los criterios de Lipinski y Veber^{126,127}. Se seleccionaron aquellas con una masa molecular menor a 500 Da, un LogP y LogD_{7.4} inferiores a 5, menos de 10 átomos aceptores de hidrógeno y menos de 5 átomos donadores de hidrógeno, menos de 8 enlaces rotables, una superficie topológica polar menor a 140 Å², y una accesibilidad sintética menor a 5.0. Adicionalmente, las moléculas seleccionadas debían tener una eficiencia de ligando igual o superior a la de E2012, y se priorizaron aquellas con predicciones favorables para la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.

Finalmente, el mismo proceso se repitió para identificar alternativas al segundo anillo del grupo PhIm, el anillo metoxifenilo.

5.2 Análisis de los sitios de unión de moduladores proteicos

5.2.1 Obtención de modos de unión para las Tspan

Para las proteínas Tspan3 (UniProt ID: O60637), Tspan5 (UniProt ID: P62079), Tspan6 (UniProt ID: O43657), Tspan33 (UniProt ID: Q86UF1), se utilizó la estructura reportada en la base de datos de estructuras proteicas de *AlphaFold*^{128,129}. Estas estructuras predichas presentan valores promedio de diferencia de distancia local predicha (pLDDT, por sus siglas en inglés) de 88.7, lo que indica una alta confiabilidad. Junto con las estructuras de las proteínas Tspan28 (PDB: 5TCX¹²⁸) y Tspan29 (PDB: 6K4J¹²⁹) se realizó acoplamientos proteína-proteína con la GS.

La estructura de la GS se obtuvo aplicando el algoritmo de agrupamiento *K-means* a las trayectorias derivadas de las simulaciones de DM del sistema Apo, descritas en el apartado 5.1.1. Este procedimiento permitió seleccionar la estructura más representativa de la simulación. Los acoplamientos se realizaron utilizando el servidor web *ClusPro*^{130–133}, sin aplicar restricciones en las predicciones de las interacciones entre la GS y las proteínas Tspan,

debido a la insuficiencia de información sobre residuos específicos que permita definir restricciones en dichas predicciones.

Adicionalmente, se utilizó el servidor *Cosmic*¹³⁴ para predecir multímeros mediante *AlphaFold2*^{135–137}. En este proceso, se generaron 10 predicciones por modelo, utilizando la base de datos disponible hasta el 30 de mayo de 2023. Para la Tspan6 se seleccionaron dos modos de unión a la GS, uno basado en la predicción de multímeros y otro obtenido mediante el acoplamiento proteína-proteína.

5.2.2 Simulación en grano grueso

Utilizando la estructura propuesta por *AlphaFold2*^{135,137} para la Tspan6, y siguiendo el protocolo descrito en la sección 5.1.1, se realizó una simulación atomística convencional de 100 ns para equilibrar la proteína en una membrana de POPC. Posteriormente, se construyeron dos modos de unión para el complejo GS-Tspan6, empleando la misma estructura de la GS utilizada en los estudios previos de acoplamiento molecular proteína-proteína. Los modos de unión del complejo GS-Tspan6 fueron simuladas de forma atomística durante 30 ns siguiendo la misma metodología descrita para otras simulaciones atomísticas.

A continuación, se llevaron a cabo simulaciones de DM en grano grueso con *Gromacs* 2021.4^{138,139} para estudiar a la GS en su forma Apo, así como en el complejo GS-Tspan6 (Tabla 2). Cada estructura fue insertada en una membrana de POPC y solvatada con una concentración de 0.15 M de NaCl usando el script de *Python insane*¹⁴⁰.

Tabla 2 Simulaciones de grano grueso. Descripción general de las simulaciones de grano grueso empleadas en este estudio.

Sistema	Tiempo de simulación.	Núm. replicas
Apo (PDB: 7D8X editado)	5000 ns	3
Modo 1 (<i>AlphaFold2</i>)	5000 ns	3
Modo 2 (<i>ClusPro</i>)	5000 ns	3

La conversión de las estructuras atomísticas a grano grueso se realizó, generando enlaces armónicos entre las perlas de la cadena principal para mantener la integridad estructural. Se utilizó una red elástica con una constante de fuerza de 500 kJ/mol/nm², y los límites de corte de los enlaces elásticos se establecieron en 0.5 nm y 0.9 nm, respectivamente.

Para las simulaciones en grano grueso, se utilizó el campo de fuerza Martini v2.2¹⁴¹. La minimización de energía se realizó con 1000 pasos del algoritmo de descenso de gradiente, utilizando un esquema de corte Verlet. Las interacciones electrostáticas se modelaron con el método de campo de reacción, aplicando un radio de corte de 1.1 nm y una constante dieléctrica relativa de 15.

Después de la minimización, se llevó a cabo la fase de equilibrio del sistema, en la cual se aplicaron restricciones de posición a la proteína, permitiendo que la membrana y el solvente se acomodaran libremente. El paso de integración utilizado fue de 0.02 ps, y se llevaron a cabo 5,000,000 pasos en total. El acoplamiento de temperatura se mantuvo en 310 K utilizando el algoritmo de reescala en V. La presión fue controlada de manera semi-isotrópica mediante el barostato de Berendsen.

Finalmente, las simulaciones de producción se llevaron a cabo durante 5000 ns. Se simuló este tiempo para poder observar a una escala de tiempo mayor las interacciones entre el complejo proteico la GS y la Tspan6. Se empleó el barostato de Parrinello-Rahman para un control más preciso de la presión, manteniendo el mismo acoplamiento de temperatura y presión que en la fase de equilibrio. Se utilizó el mismo esquema de corte para las interacciones no enlazadas, con un radio de corte de 1.1 nm para las interacciones de van der Waals y las electrostáticas. Las velocidades iniciales se generaron a partir de una distribución de Maxwell-Boltzmann, ajustadas a 310 K, y se aplicó un paso de integración de 0.02 ps.

El análisis de las trayectorias de cada uno de los sistemas se realizó mediante las funciones de *Gromacs 2021.4*^{138,139} y *MDAnalysis*^{99–101}.

6. Resultados y discusión: Modulación de γ -secretasa por moléculas pequeñas

6.1 Modulación mediada por E2012

6.1.1 Cálculos de dinámica molecular

Una vez preparados los tres sistemas, Apo, Sus y Cpx (Figura 9, panel A), se realizaron tres simulaciones de 1500 ns para cada uno. El análisis de RMSD se empleó para evaluar la desviación de las estructuras simuladas respecto al primer cuadro de la trayectoria, con el fin de determinar si el sistema había alcanzado el equilibrio. Este análisis se realizó tanto para el complejo enzimático completo como para cada subunidad de manera independiente (Figura 9, panel B). En particular, los valores de RMSD y en particular los asociados a la subunidad catalítica PS, indican que los sistemas comenzaron a estabilizarse alrededor de los 500 ns. Por lo tanto, el último microsegundo de simulación fue utilizado para los análisis posteriores.

Las distribuciones temporales de RMSD de la PS sugieren que la presencia del sustrato estabiliza los cambios conformacionales dentro la subunidad catalítica (Figura 9, panel B). De manera similar la presencia del modulador E2012, dentro del sitio alostérico, refleja menores magnitudes de RMSD tanto en la PS como en C83.

Posteriormente, se analizaron los valores de RMSF del complejo proteico. Esta métrica permite evaluar las regiones flexibles de la proteína. Los valores de RMSF de mayor magnitud indican regiones más móviles. En la Figura 10 se presentan los valores de RMSF para cada una de las subunidades del complejo enzimático GS, así como del sustrato C83.

Los cambios más notables en la flexibilidad de la PS se encuentran en la región localizada entre las hélices TM2 y TM3, así como en la región C-terminal, adyacente a la hélice TM6, también conocida como extremo 6CT (Figura 10, panel B). Estos cambios indican una disminución de la flexibilidad cuando el sustrato se encuentra unido al sitio activo. Por otro lado, en el sistema Cpx se evidenció una mayor estabilización, particularmente en el extremo N-terminal del sustrato C83, que presenta mayor rigidez (Figura 10, panel E). Esto indica que no solo el sustrato, sino que también el modulador E2012 estabilizan al complejo enzima sustrato.

El efecto estabilizador de E2012 sobre el complejo enzima-sustrato es consistente con lo reportado en la literatura, donde se ha señalado que la desestabilización de la GS favorece la liberación de péptidos A β de mayor longitud, mientras que los estabilizadores del complejo incrementan la procesividad del sustrato¹⁴². En estudios experimentales, E2012 ha mostrado

reducir la producción de péptidos A β 42 y A β 40, y aumentar la producción de péptidos A β 38^{143,144}.

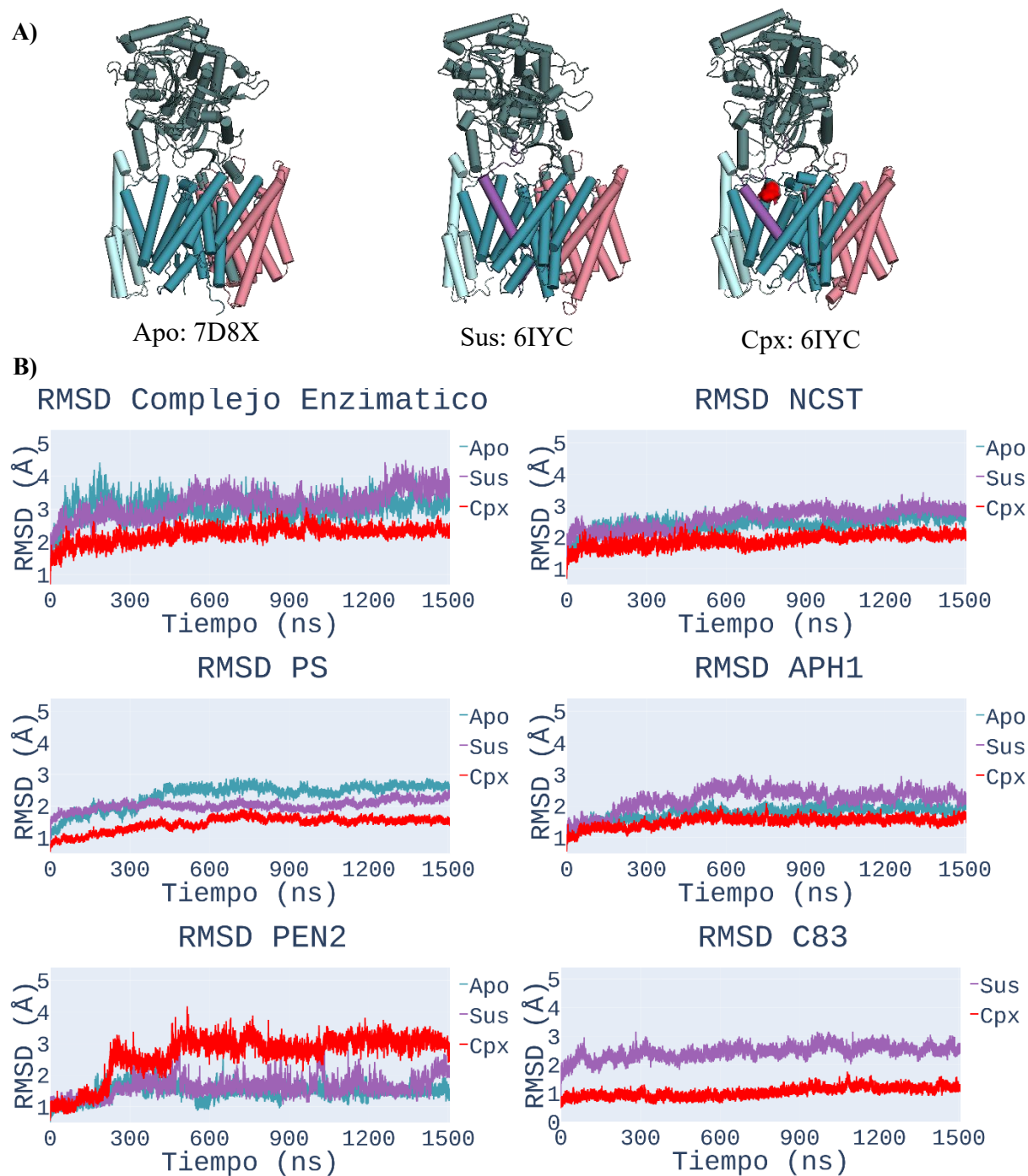
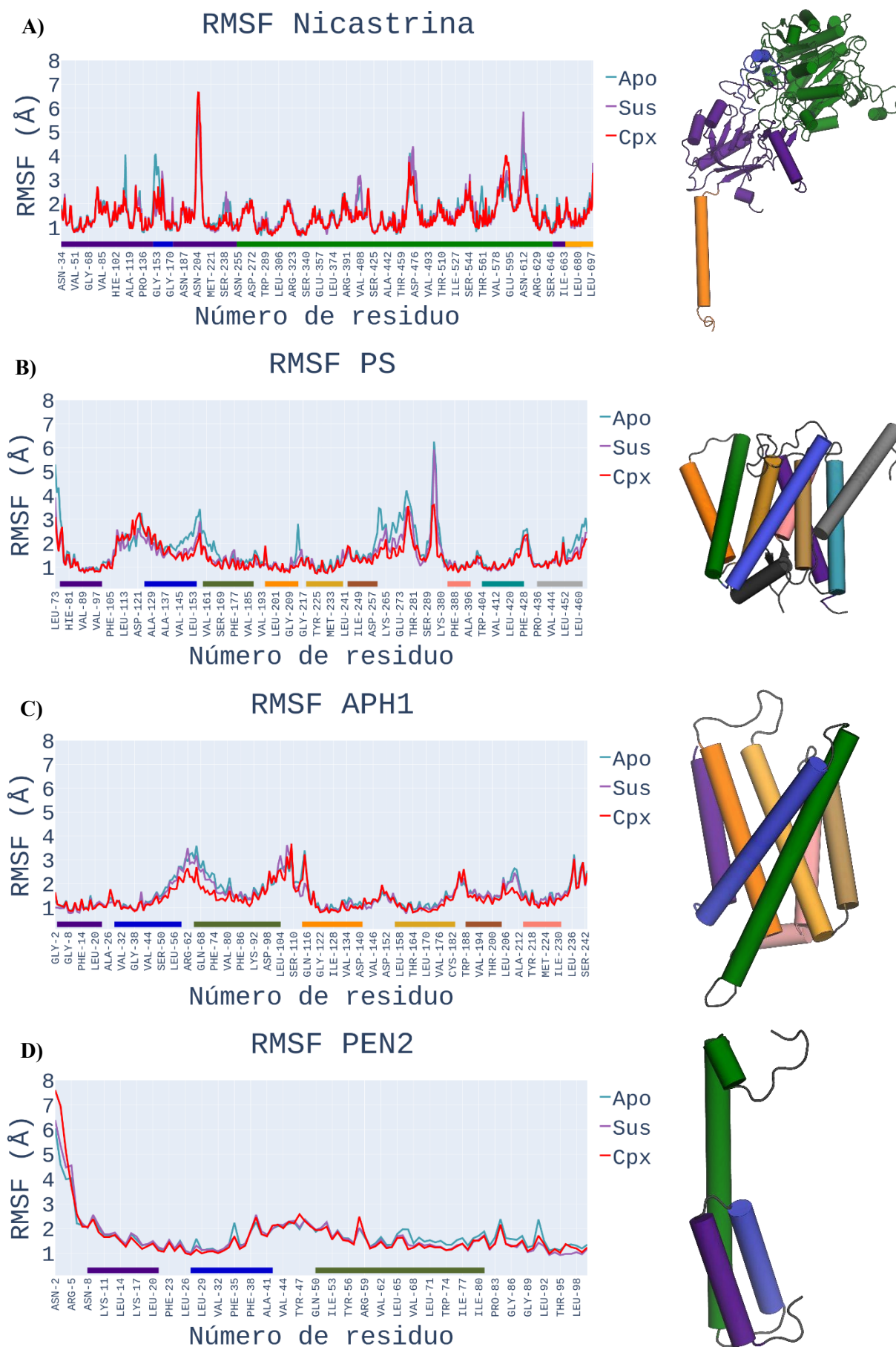


Figura 9 Evolución temporal de γ -secretasa. A) Representación de los complejos proteicos en los sistemas Apo, Sus y Cpx. En color gris se observa a la NCST, en azul oscuro la subunidad catalítica PS, en color rosa la APH1, en azul claro el PEN2, el sustrato C83 se muestra en morado y el modulador E2012 se muestra en rojo. B) Evolución temporal de RMSD para el complejo proteico GS y para cada una de las subunidades.



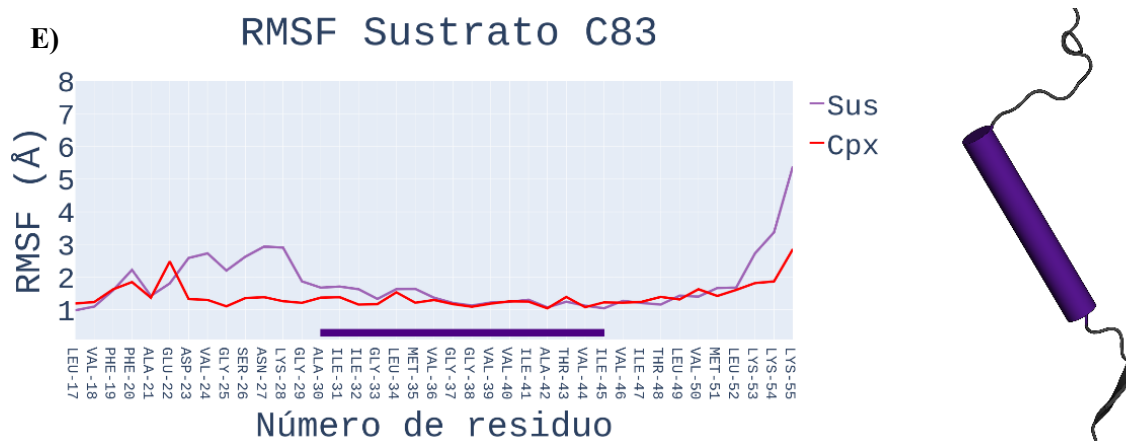


Figura 10 Analisis de RMSF. Se presentan los valores de RMSF correspondientes a cada sistema y cada subunidad. A) Subunidad de nicastrina: el lóbulo menor se representa en color morado, el lóbulo mayor en verde, la tapa en azul y la hélice TM en naranja. Los paneles de B a E muestran los valores de RMSF para cada subunidad y el sustrato. Los rectángulos de colores indican la posición de cada una de las hélices TM, mientras que los bucles que conectan dichas hélices se representan en color negro. A la derecha de cada gráfico, se muestra la estructura proteica con la misma paleta de colores.

Durante las simulaciones de DM en presencia de sustrato y/o modulador, se observa una disminución en la flexibilidad de varias regiones de la estructura de la PS. Con el fin de evaluar si estos cambios afectan la formación de estructuras secundarias más definidas, en la Figura 11 se analiza la estructura de hoja beta que se forma entre los extremos ubicados entre TM6 y TM7 de la PS. Esta lámina beta es relevante, ya que se ha propuesto que varios sustratos de la GS pueden inducir la formación de una hoja beta con los extremos de la PS^{74,145}.

En la Figura 11, panel A, se muestra la fracción de tiempo en la que cada aminoácido se encuentra estructurado en lámina beta. Los aminoácidos de la PS no presentan diferencias significativas en cuanto a esta fracción bajo diferentes condiciones experimentales. Sin embargo, el sustrato exhibe una mayor fracción de hoja beta cuando forma un complejo con E2012. En el sistema Sus, esta hoja beta está presente en promedio 0.28 del tiempo, con una desviación estándar de 0.07, mientras que en el sistema Cpx alcanza un promedio de 0.54 del tiempo, con una desviación estándar de 0.03. Este aumento es significativo de acuerdo con una prueba de Mann-Whitney de una cola y un umbral de $p < 0.05$.

En la Figura 11, panel B, se analiza la estructura helicoidal en dos regiones: primero, la alfa hélice ubicada naturalmente en el extremo 6CT de la PS, cuya fracción de tiempo en estructura helicoidal permanece constante en presencia del sustrato. En segundo lugar, se evalúa

la estructura secundaria del sustrato C83, mostrando que la fracción de alfa hélice es mayor cuando C83 se encuentra en un complejo con la GS y en presencia del modulador E2012. En promedio, los residuos de C83 en el sistema Sus tienen una fracción de vida de 0.59, con una desviación estándar de 0.02, mientras que para el sistema Cpx la fracción de vida promedio es de 0.66, con una desviación estándar de 0.02.

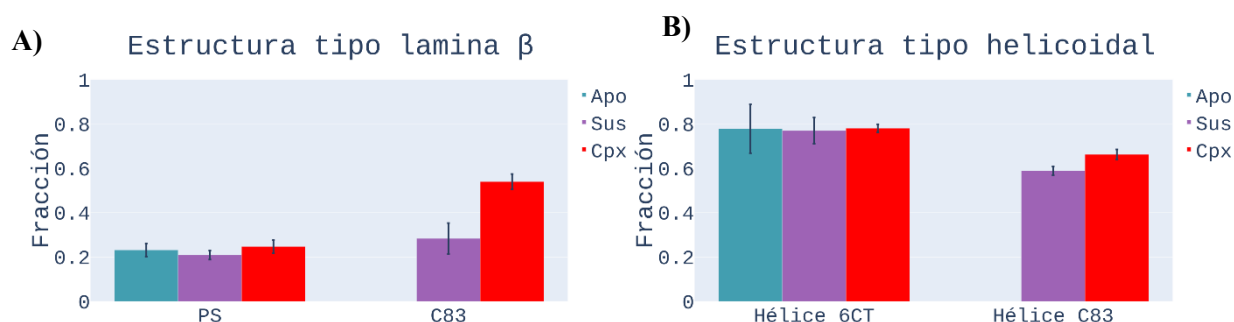


Figura 11 Análisis de estructura secundaria. A) Fracción de tiempo en la que los aminoácidos Gln276 a Gly384 de la PS y Val50 a Lys54 del sustrato (numeración A β) se encuentran estructurados en lámina beta. B) Fracción de tiempo en la que los aminoácidos Lys265 a Gln276 de la PS y Phe19 a Thr48 de C83 están estructurados en forma helicoidal. Las barras de error representan la desviación estándar, indicando la variabilidad entre simulaciones.

Estudios previos han relacionado la inclinación de las hélices TM6 y TM7 de la PS, que contienen la díada catalítica, así como la distancia entre estos residuos, con el estado de activación de la proteasa. Se ha planteado que una mayor separación entre los residuos aspárticos corresponde a un estado inactivo de la enzima, mientras que una distancia menor permite la proteólisis, indicando un estado activo⁶⁴. Por esta razón, se cuantificó tanto el ángulo de inclinación de las hélices TM respecto a la normal de la membrana, como la distancia entre los aspárticos catalíticos.

En la Figura 12, panel A, se grafica la inclinación media junto con la desviación estándar asociada a cada una de las hélices TM de la PS, así como la hélice del sustrato C83. Se observa que algunas hélices, como TM4 y TM9, mantienen una media de ángulo de inclinación relativamente constante en los tres sistemas analizados. En contraste, la hélice TM3 muestra una tendencia a una mayor inclinación en el sistema Apo, es decir, en ausencia del sustrato. Estos cambios han sido evaluados como significativos mediante análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba post-hoc de Bonferroni, utilizando un umbral de significancia de $p < 0.05$.

El cambio de inclinación de esta hélice en presencia del sustrato se puede explicar debido a que el sitio de unión de este mismo está ubicado entre las hélices TM2 y TM3, y entre TM6 y TM7.

Cabe destacar que se evidencia un cambio significativo en el ángulo de inclinación del sustrato C83 entre los sistemas Sus y Cpx, apreciable en la Figura 12, panel A. Este cambio se atribuye a la presencia del modulador E2012 en el sitio alostérico.

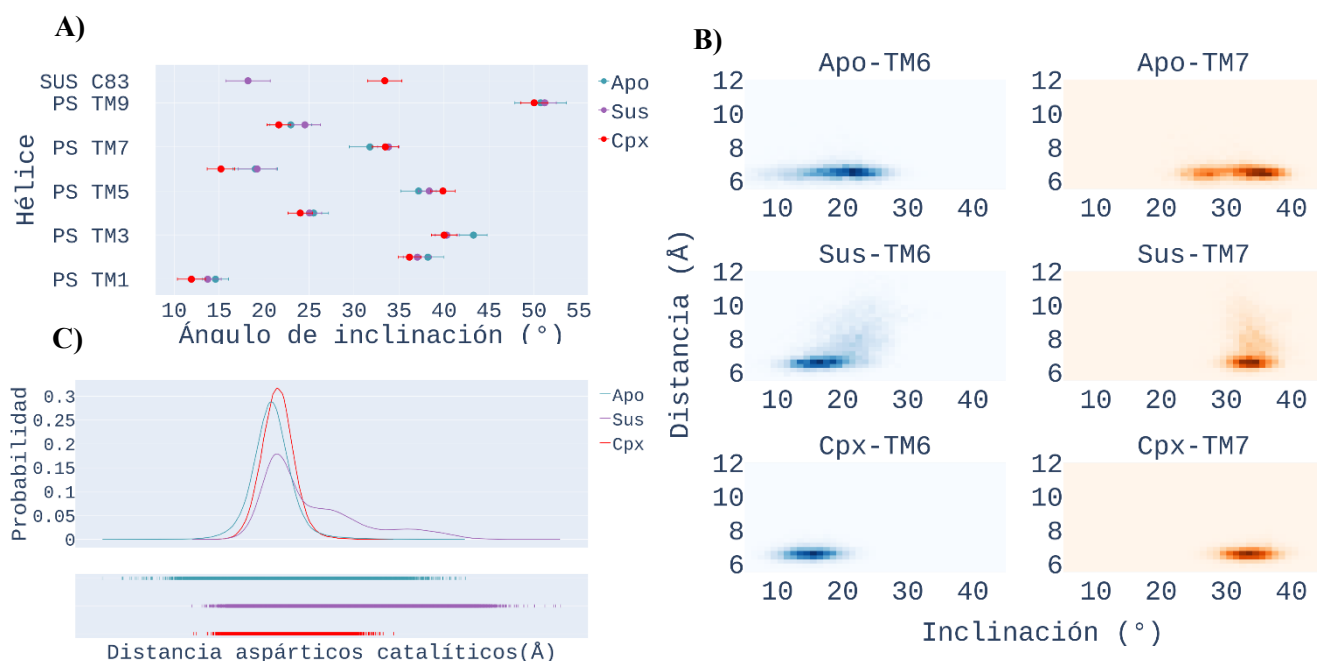


Figura 12 Ángulos de inclinación de las hélices transmembranales. A) Ángulos de inclinación de las hélices TM que componen la subunidad catalítica y el sustrato. En círculos se representa la media de la distribución y en líneas se traza una desviación estándar. B) Histograma 2D, en azul se muestra el histograma que relaciona la distancia entre los carbonos gamma de los aspárticos catalíticos y la inclinación de TM6 mientras que en color naranja se relaciona esta misma distancia con la inclinación de TM7. C) Distribución de la distancia de los carbonos gamma de los aspárticos catalíticos.

En la Figura 12, panel B, se observa que, la distribución de los ángulos de inclinación presenta una menor desviación estándar, en presencia del sustrato. Además, las medias de distancia entre los residuos de la díada catalítica fueron de 6.48 Å, 7.43 Å y 6.58 Å para los sistemas Apo, Sus y Cpx, respectivamente. Es interesante destacar que, aunque los sistemas Sus y Cpx muestran distribuciones similares en los ángulos de inclinación, la distancia entre los

aspárticos 257 y 385 es mayor en el sistema Sus. Esto sugiere que la presencia del modulador E2012 podría estar promoviendo un estado activo de la proteasa.

6.1.2 Caracterización del sitio alostérico

Utilizando el módulo de *Cavity* de *LigBuilderv3*¹⁴⁶ y considerando el sitio de unión de E2012, se identificó la lista de los residuos que conforman la cavidad del sitio alostérico en el sistema Cpx. Este sitio está compuesto por 38 residuos de aminoácidos localizados a lo largo de las hélices TM1, TM3, TM5 de la PS, el sustrato C83 y los residuos 242 y 243 de la NCST. Estos residuos son congruentes con los descritos previamente por Yang, G., *et al.* en 2021³⁰, quienes caracterizaron el sitio de unión de E2012 en una estructura de la GS en complejo con el inhibidor L-685458 y en ausencia del sustrato. El análisis confirma estos residuos en el contexto específico de un complejo GS-sustrato, proporcionando una base más precisa para explorar interacciones alostéricas en presencia del sustrato e informando sobre los residuos específicos del sustrato que interactúan con E2012 en esa posición.

Posterior a la identificación del sitio de unión se utilizó la dinámica del sistema Cpx para analizar las fluctuaciones de E2012 y sus efectos en la cavidad. Se alineó la trayectoria del sistema Cpx utilizando las coordenadas iniciales de la proteína y se calculó el RMSD del modulador a lo largo del tiempo. Utilizando el mismo módulo de *LigBuilderv3* se determinó el volumen de la cavidad a lo largo de la trayectoria, obteniendo una media de $288 \pm 78.8 \text{ \AA}^3$ (Figura 13, panel A).

Se ejecutó un análisis de contactos entre E2012 y la cavidad proteica. Para obtener un análisis más detallado se dividió la estructura de E2012 en cinco partes: Imidazol, metoxifenilo, piperidinona, metilo y fluorofenilo (Figura 13, panel B). E2012 interacciona con múltiples residuos de la enzima. Especialmente el puente de hidrogeno formado entre el anillo de imidazol y el residuo de Tyr 106 es una interacción importante. De igual forma existe una alta fracción de contacto entre el residuo de Tyr 240 y el anillo metoxifenilo; esta interacción se asocia a una interacción de tipo *pi-stacking* entre ambos anillos aromáticos. El modulador E2012 mantiene interacciones hidrofóbicas con los residuos de Phe 177, Ile 180, Val 236. Además, se destaca la interacción del anillo de metoxifenilo y piperidinona de E2012 con los residuos del sustrato Met 35 y Val 36, utilizando numeración de A β .

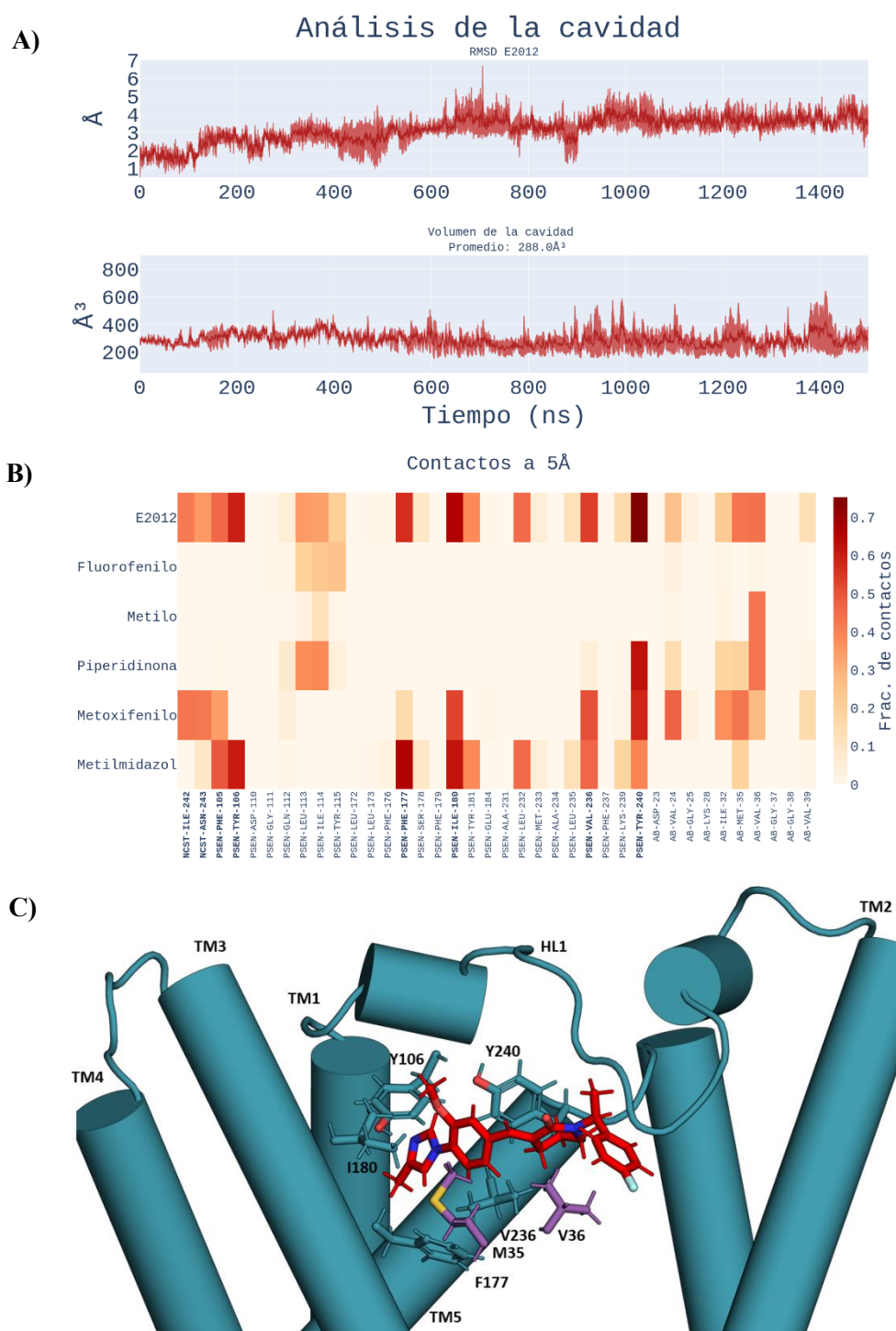


Figura 13 Caracterización del sitio alostérico. A) Comparación entre las fluctuaciones en las posiciones de E2012 y el volumen del sitio alostérico. Se muestra en color sólido la media de tres réplicas del sistema Cpx, mientras que en color más tenue se ilustra la desviación estándar asociada al tiempo. B) Mapa de contactos de E2012 con los residuos que conforman la cavidad. C) Residuos importantes con los interacciona E2012. En morado se muestran los residuos que

pertenecen al Sustrato, mientras que en azul aquellos que pertenecen a la PS. Figura generada con PyMol³¹.

6.1.3 Análisis de otros GSM

Es deseable que los GSM tengan características lipofílicas, pues su objetivo es unirse a una cavidad proteica que se encuentra embebida en la membrana lipídica. Con el objetivo de tener una herramienta de bajo costo computacional que permita describir las propiedades de las moléculas en membranas biológicas, se realizó la comparación del perfil energético del anillo PhIm calculado mediante el servidor PERMM¹⁴⁷ y mediante la metodología de *Umbrella Sampling*. Para este caso el servidor PERMM proporcionó cálculos rápidos, que predijeron un perfil energético del anillo PhIm de manera congruente a la metodología *Umbrella Sampling* (Figura 14). Al analizar el perfil energético de E2012 se obtienen mínimos energéticos entre 10 y 14 Å, con respecto al centro de la membrana (Figura 14, panel A).

Ángel Santiago, *et al.*⁵⁰ desarrollaron en 2021 una base de datos con 785 compuestos, con el objetivo de mapear los ligandos de la GS en un espacio químico y analizarlos según sus propiedades estructurales. En este trabajo, se utilizaron los 340 compuestos tipo fenilimidazol presentes en dicha base de datos para calcular la eficiencia de ligando y realizar predicciones de sus características de Absorción, Distribución, Metabolismo y Toxicidad (propiedades ADMETox). Se prestó atención en particular a sus propiedades de lipofilia, eficiencia de ligando y accesibilidad sintética, ya que estos parámetros son fundamentales en la fase de diseño de nuevos ligandos. La lipofilia es relevante porque los GSM deben actuar en un entorno de membrana, la eficiencia de ligando permite comparar la afinidad relativa de cada molécula en función de su tamaño, y la accesibilidad sintética es esencial para evaluar la viabilidad de su síntesis y escalado en laboratorio.

El parámetro LogP representa el logaritmo del coeficiente de partición de un soluto entre octanol y agua. Este es un indicador clave en el desarrollo de fármacos, ya que su valor refleja la capacidad de una molécula para atravesar membranas lipídicas. En el caso de medicamentos orales, un LogP entre 0 y 5 se considera óptimo, ya que valores fuera de este rango pueden afectar la biodisponibilidad del fármaco. Por otro lado, el LogD7.4 corresponde al logaritmo del coeficiente de distribución a pH 7.4, lo cual tiene en cuenta tanto la forma ionizada como no ionizada de la molécula, permitiendo evaluar su comportamiento en el entorno fisiológico¹⁴⁸.

En la Figura 14 se evidencia que los GSM anteriormente propuestos tienden a tener valores elevados de LogP y LogD7.4, lo cual es consistente con su diseño para actuar a nivel de membrana. Sin embargo, esta alta lipofilia es una característica ambivalente: aunque facilita

la interacción con la membrana, valores demasiado altos de LogP pueden asociarse a una mayor toxicidad, ya que la afinidad elevada por los lípidos podría llevar a su acumulación en tejidos grasos, dificultando su eliminación y aumentando el riesgo de efectos secundarios adversos¹⁴⁹.

El 66% de los GSM tipo fenilimidazol analizados presentan valores de eficiencia de ligando menores a 3 kcal/mol, considerados subóptimos para el diseño de moléculas bioactivas. Estudios realizados por equipos de Pfizer sugieren que, para que un compuesto sea un candidato clínico viable, su eficiencia de ligando debe superar al menos 0.3 kcal/mol por átomo pesado. Esta recomendación se basa en la observación de que, durante el proceso de optimización para mejorar la afinidad, el peso molecular de los compuestos tiende a aumentar, lo cual puede comprometer propiedades críticas como la absorción y la permeabilidad. Por lo tanto, comenzar con compuestos que sobrepasen este umbral de 0.3 kcal/mol contribuye a mantener la eficiencia y a minimizar problemas en las etapas avanzadas del desarrollo^{150,151}.

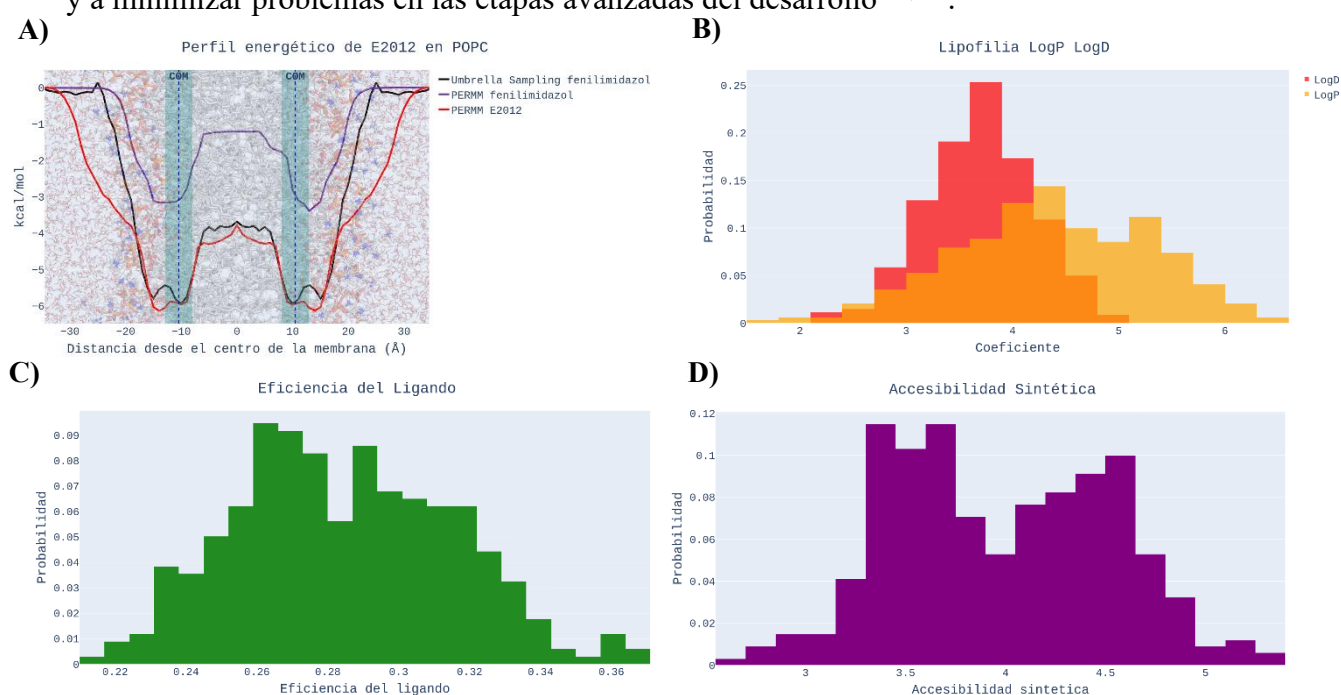


Figura 14 Análisis de múltiples GSM. A) Perfiles energéticos calculados para el fragmento de fenilimidazol de E2012 y para la molécula completa de E2012. En el fondo de la gráfica se representa una membrana de POPC, en color gris se muestran las cadenas de ácido graso, en naranja y azul se ilustran los átomos de fósforo y nitrógeno de las cabezas de lípidos y en rojo en los extremos del gráfico se muestran las moléculas de agua. B) Comparación de las métricas LogP y LogD. C y D) Distribución de eficiencia de ligando y accesibilidad sintética de múltiples GSM.

6.2 Propuestas de nuevos grupos estructurales

Se buscaron variaciones para el anillo imidazol de E2012 utilizando el *software* BROOD de la compañía OpenEye¹²⁴. BROOD es un *software* que busca generar nuevos compuestos que satisfagan las características isostéricas y químicas, al mismo tiempo que incorporen viabilidad sintética, de tal forma que de una molécula *hit* puedes generar bioisósteros con forma y características electrostática similares.

Siguiendo esta metodología se obtuvo 6,161 moléculas similares a E2012 en las que se modificó el anillo imidazol. A cada una de estas moléculas se le realizaron análisis de ADMETox y de acoplamiento molecular para seleccionar aquellas con mejores propiedades. Se obtuvo un total de cuatro variaciones al anillo original de E2012. El cambio más drástico en la estructura se presenta en la molécula de la Figura 15, panel B, que incorporó un anillo de metilpirrol-ol; por otro lado, las tres moléculas restantes realizaron cambios más discretos al anillo imidazol (Fig15, paneles C-E). A estas moléculas se les referirá como Brood1, Brood2, Brood3 y Brood4 respectivamente.

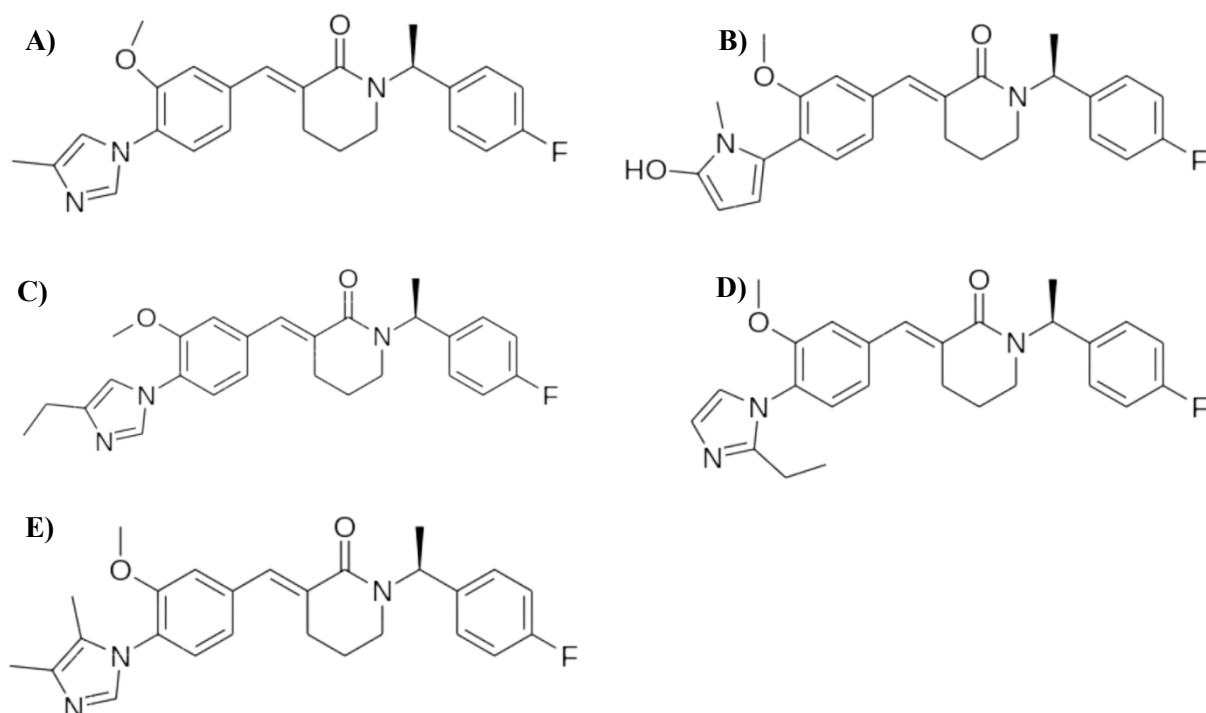


Figura 15 Variaciones del anillo de imidazol de E2012. A) E2012 B) Brood1 con anillo de metilpirrol-ol, C, D) Brood2 Brood3 con anillos de etilimidazol E) Brood4 con anillo de dimetilimidazol.

La molécula Brood1 resulta particularmente interesante, ya que, aunque parece apartarse del modelo de farmacóforo clásico, sugiere la posibilidad de reemplazar el anillo

imidazol por un grupo donador de puente de hidrógeno. El puente de hidrógeno entre el residuo Tyr 106 de la PS y E2012 se establece con la cadena lateral del residuo. Se ha reportado que, aunque es menos frecuente, la cadena lateral de la tirosina puede actuar como aceptor de puentes de hidrógeno¹⁵²; por lo tanto, la ambivalencia del grupo hidroxilo permite considerar el metilpirrol-ol como un andamio de interés.

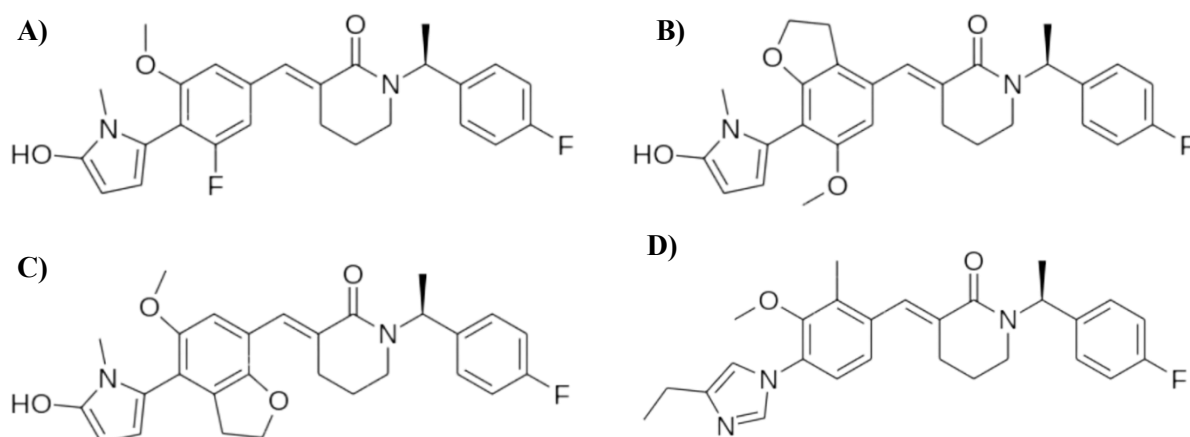


Figura 16 Variaciones del anillo de metoxifenilo. A) Brood1_1 con un anillo de fluorometoxifenilo B, C) Brood1_2 y Brood1_3 con anillo de dihidrobenzofurano, D) Brood2_1 con un anillo de metil metoxifenilo.

Posteriormente tanto las moléculas Brood como el modulador E2012 se sometieron a variaciones del anillo de metoxifenilo, siguiendo el mismo flujo de trabajo para el anillo imidazol. La búsqueda se enfocó en mejorar los puntajes del acoplamiento molecular y las propiedades ADMETox. En este punto sólo derivados de la molécula Brood1 y Brood 2 satisficieron los filtros, lo cual dio lugar a las moléculas Brood1_1, Brood1_2, Brood1_3 y Brood2_1, las cuales se muestran en la Figura 16.

Cambios estructurales discretos en cada anillo mejoraron las características ADMETox de las moléculas propuestas. Esto se ejemplifica en la Tabla 3 en donde se compara a E2012, con Brood1_1 y la duloxetina, un fármaco aprobado por la FDA. La duloxetina, un antidepresivo que actúa en el sistema nervioso central y debe atravesar la barrera hematoencefálica, sirve como un punto de referencia útil, dado que su receptor y sitio de unión están igualmente inmersos en la membrana plasmática, al igual que la GS¹⁵³. Los datos mostrados son los generados por el servidor ADMETLab⁷⁵. En el caso de la duloxetina las predicciones generadas por el servidor son congruentes con lo reportado en la literatura^{154–156}. La molécula Brood1_1 muestra una disminución en la lipofilia, un ligero aumento en la

eficiencia de ligando y una menor probabilidad de toxicidad en comparación con la molécula de duloxetina y E2012. Si bien se presenta un ligero decaimiento en la accesibilidad sintética, y aunque este parámetro es relevante, la predicción se encuentra dentro del rango compartido por otros GSM (Figura 16, panel D).

Tabla 3 Comparación de propiedades ADMETox.

	E2012	Brood1_1	Duloxetina
LogP	4.47	4.65	4.43
LogD	3.78	3.64	3.68
Átomos Pesados	31	33	21
Eficiencia de ligando (kcal mol ⁻¹ por átomo pesado)	0.33	0.34	0.36
Permeable a BHE	SI	SI	SI
Donadores de Puente de Hidrogeno	0	1	1
Aceptores de Puente de Hidrogeno	5	5	2
Probabilidad de bloquear a h-ERG	0.94	0.44	0.94
Probabilidad de ser Hepatotóxico	0.885	0.792	0.94

6.3 Conclusiones

Los resultados de los análisis de RMSD y RMSF simulaciones sugieren que el sustrato C83 estabiliza la estructura del complejo GS. El modulador E2012 promueve la inclinación del sustrato C83 dentro del complejo enzima sustrato, a su vez limita los cambios conformacionales en el complejo enzima-sustrato y favorece un estado conformacional donde la diada catalítica de presenilina permanece próxima.

La identificación de bioisómeros del grupo fenilimidazol y el diseño de moléculas como el andamio de metilpirrol-ol sugieren alternativas viables a los moduladores actuales. Estos nuevos compuestos presentan perfiles de ADMETox y afinidades similares a las de moduladores clínicamente relevantes.

7. Resultados y discusión: Análisis de los sitios de unión de moduladores proteicos

7.1 Interacción con la proteína Tspan6

Las proteínas Tspan son proteínas con cuatro hélices TM, las cuales poseen un dominio extramembranal entre las hélices TM3 y TM4. Se sugiere que algunos miembros de estas proteínas como la Tspan6 pueden modular a la GS. Al desconocer el sitio exacto por el cual las proteínas Tspan regulan la actividad de la GS, se utilizaron a seis miembros de las proteínas Tspan para realizar acoplamientos proteína-proteína. En este análisis se identificaron dos modos de unión posibles en los cuales tanto las Tspan como la GS mantuvieron posiciones viables dentro de la membrana, garantizando que los dominios extracelulares de las proteínas Tspan y la NCST estuvieran orientados al mismo sitio. Estos modos de unión se conservaron para las diferentes proteínas Tspan. El modo de unión 1 ubica a la proteína Tspan cerca de la subunidad catalítica PS; por otra parte, en el modo de unión 2 la Tspan se encuentra alejada del sitio activo, en contacto con la NCST y la APH1 (Figura 17, panel A).

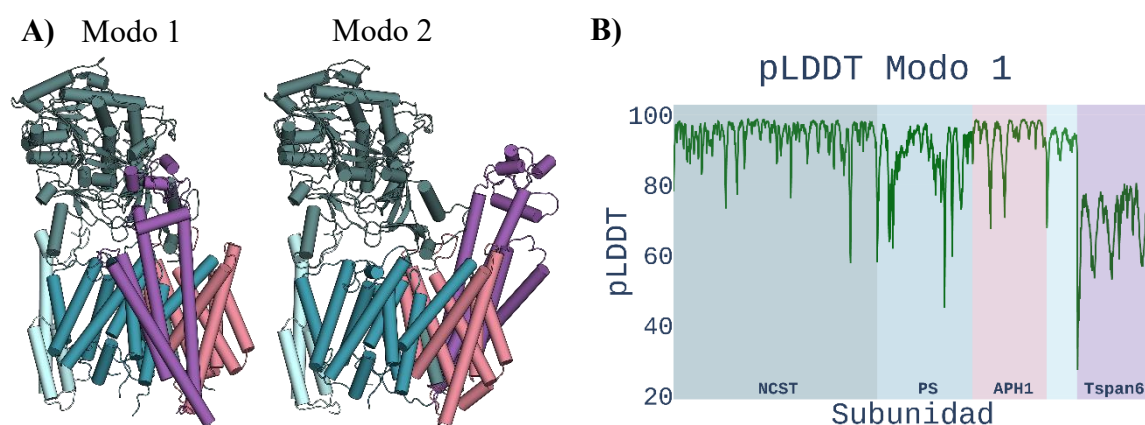


Figura 17 Interacción GS-Tspan. A) Posibles modos de unión de la proteína Tspan6 al complejo enzimático. Se muestra en color gris a la NCST, en color azul intenso la PS, en color rosado la APH1, en color azul tenue el PEN2, mientras que la proteína Tspan6 está en color morado. Estos modos de unión se conservan para las proteínas Tspan3, Tspan5, Tspan6, Tspan28, Tspan29 y Tspan33 B) Valores del puntaje pLDDT para el complejo GS-Tspan6.

Al predecir mediante *AlphaFold2*^{135–137} la estructura del complejo GS-Tspan6, se obtuvo un modelo que de manera interesante concordó con el modo de unión 1. En la Figura 17, panel B, se grafican los valores de pLDDT asociados a esta predicción. La mayoría de los residuos correspondientes a la GS presentan valores de pLDDT superiores a 70, lo que indica una buena predicción del complejo enzimático. Sin embargo, los residuos de la Tspan6 en el

contexto de este complejo muestran valores de pLDDT inferiores, con un promedio de 68.7, lo cual se considera de baja confianza. Este valor sugiere que la predicción estructural de Tspan6 en el complejo no es completamente segura, lo cual puede deberse, en parte, a la falta de datos experimentales sobre el complejo GS-Tspan6, a diferencia de la GS, cuyo modelo ha sido reportado en múltiples entradas del PDB. No obstante, en la base de datos de estructuras de proteínas de AlphaFold2, la Tspan6 presenta un pLDDT promedio de 88.58, lo que refleja una alta confianza en la estabilidad de su conformación aislada^{135,137}.

Cada uno de los posibles modos de unión se equilibró en simulaciones atomísticas para posteriormente ser simulados 5 μ s en grano grueso. Por cada sistema se realizó un total de tres réplicas, además de que se simuló a la GS en forma Apo como punto de comparación.

Los análisis de RMSD de las simulaciones revelaron que, en la subunidad catalítica, las fluctuaciones en esta métrica son bastante similares en los tres sistemas analizados (Figura 18). Sin embargo, se presentan mayores valores de RMSD en la proteína Tspan6 en comparación con otras subunidades de la GS, lo que sugiere que experimenta mayor desviación de su conformación inicial. Específicamente, cuando la Tspan6 se encuentra en el modo de unión 1, parece requerir cambios conformacionales más pronunciados, respecto al modo de unión 2, para lograr un equilibrio en la interacción con la GS.

Se cuantificó la distancia entre la diada catalítica, esto debido a que distancias cortas entre los aspárticos se asocian con un estado activo de la proteasa. En la Figura 18, panel H, se grafica la distribución de distancias cuando se descarta el primer microsegundo y medio de simulación. Interesantemente, a pesar de que no hay cambios en el RMSD de la PS, sí se observa una diferencia en los estados de activación. En el sistema Apo la distancia entre los residuos de aspartato alcanza una media de 10.9 Å, lo cual podría representar un estado inactivo⁶⁴. En presencia de la Tspan6 esta distancia tiene una media de 8.46 y 8.39 Å respectivamente para el modo de unión 1 y el modo de unión 2.

Se calculó el ángulo de inclinación, respecto a la normal de la bicapa lipídica, para cada una de las hélices TM (Figura 19). Existen hélices en donde la inclinación está muy bien conservada entre el sistema atomístico y el sistema de grano grueso, tales como las hélices TM6 y TM7 de la PS. Por otra parte, las hélices que se encuentran en las orillas del complejo enzimático tienden a ser menos similares al sistema atomístico, por ejemplo, la hélice TM de la NCST, y las hélices del PEN2.

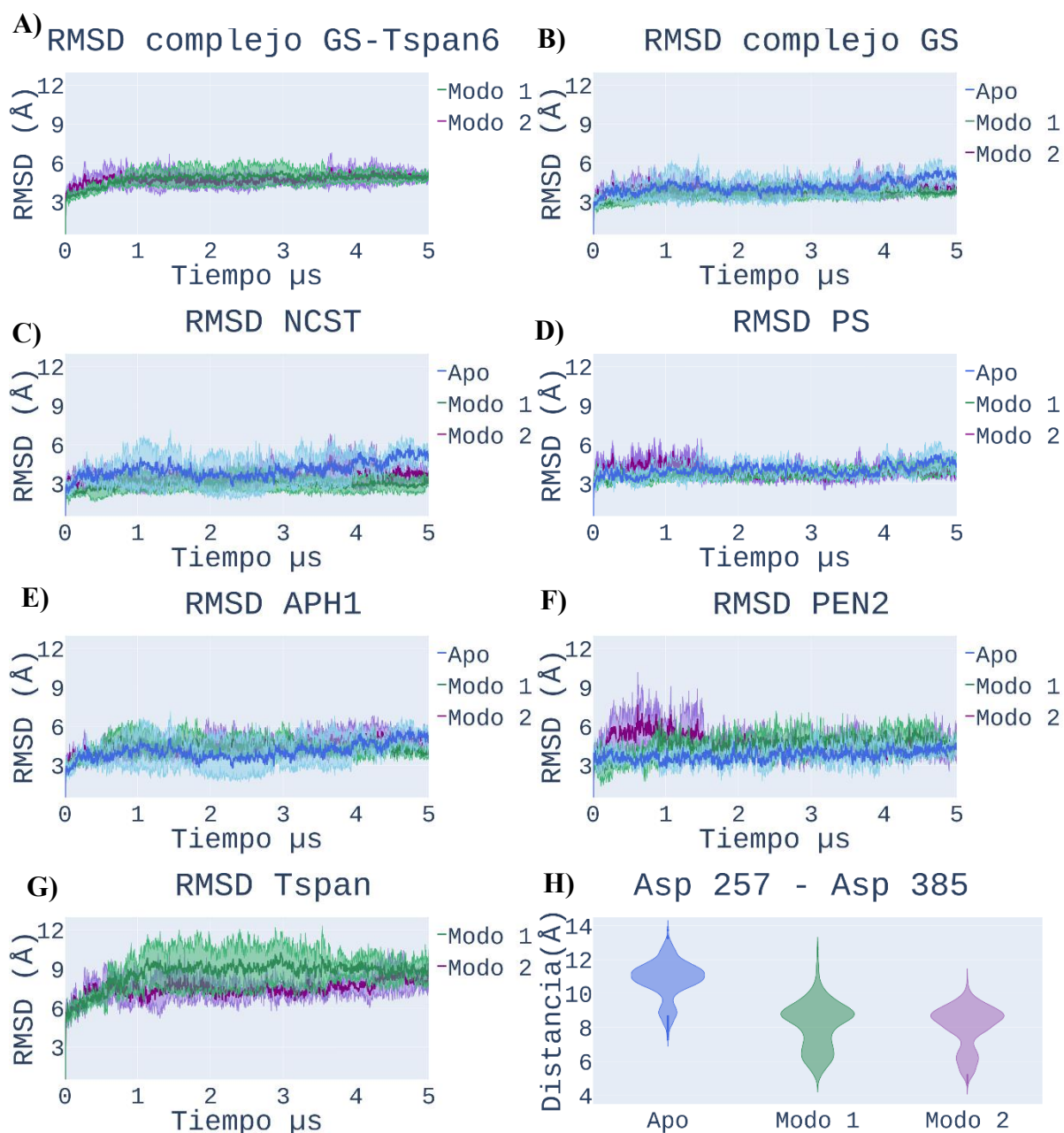


Figura 18 RMSD de las simulaciones en grano grueso. A) Evolución temporal de RMSD del complejo GS-Tspan6, B) Evolución temporal del complejo enzimático GS C-G) Evolución temporal de las subunidades proteicas de la GS y Tspan6, H) Distribución de la distancia entre la diada catalítica.



Figura 19 Ángulos de inclinación de las hélices transmembranales del complejo GS-Tspan6. Se muestra una comparación entre los ángulos de inclinación de los sistemas Apo simulados de forma atomística (AT) y en grano grueso (CG) así como de los complejos GS-Tspan6.

Tanto en el modo de unión 1 como en el modo de unión 2 las hélices de la Tspan6, TM2 y TM3 son aquellas que están orientadas hacia la GS, mientras que las hélices de la Tspan6 TM1 y TM4 son aquellas que están orientadas a los lípidos. Esto puede explicar porque la hélice TM2 de la Tspan6 tiene distribuciones con poca desviación estándar. Por otro lado, la hélice TM1 de esta misma proteína tiene desviaciones estándar más grandes que TM2 (Figura 19).

Al analizar los contactos de la Tspan6 con el complejo GS, así como los contactos entre las hélices de la Tspan6, para ambos modos de unión se encontró que los contactos aumentan conforme el tiempo de simulación, lo cual indica que el complejo se estabiliza a lo largo de la dinámica (Figura 20, paneles A y B).

Especialmente la hélice TM3 de la Tspan6 aumenta el número de contactos a lo largo de la simulación (Figura 20, paneles C y D). En caso del modo de unión 1 aumentan los contactos con las hélices TM2 y TM3 de la PS, mientras que en el modo de unión 2 aumentan los contactos con la hélice TM de la NCST y la hélice TM7 de la APH1.

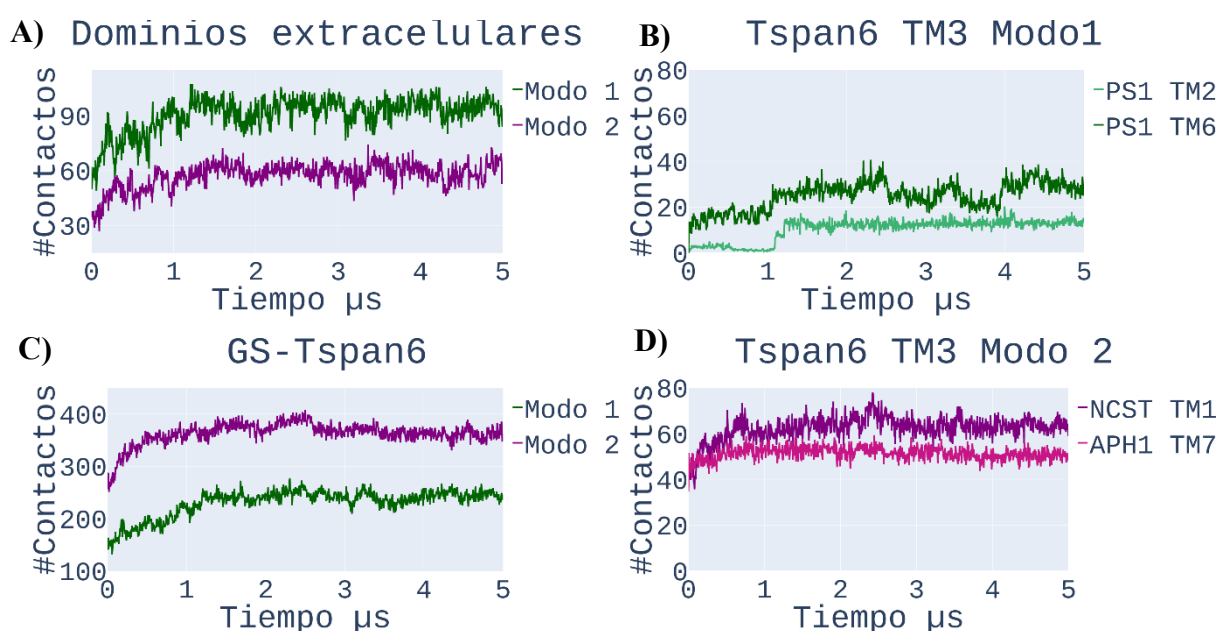


Figura 20 Contactos entre la Tspan6 y la GS. En verde se muestran los resultados obtenidos de las simulaciones del modo de unión 1 mientras que en morado los resultados obtenidos del modo de unión 2. A) Número de contactos entre el dominio extracelular de la Tspan6 y el dominio extracelular de la NCST. B) Número de contactos entre todo el complejo GS y la Tspan6. C) Número de contactos entre la hélice TM3 de la Tspan6 y TM2 de la PS (verde claro) y entre la hélice TM3 de la Tspan6 y TM2 de la PS (verde oscuro). D) Número de contactos entre la hélice TM3 de la Tspan6 y la hélice TM de la NCST (morado) y entre la hélice TM3 de la Tspan6 y TM7 de la APH1 (rosa).

Se analizaron aquellos residuos que aumentaron el número de contactos a lo largo de la simulación (Figura 21). En el caso del modo de unión 1 la hélice TM3 y el bucle entre TM1 y TM2 aumentan el número de contactos, mientras que en el modo de unión 2 los contactos aumentan entre TM1 y TM2, así como en algunas regiones del dominio extracelular.

Ambos modos de unión pueden considerarse viables en términos de interacción entre la GS y Tspan6. El modo de unión 1, en proximidad a la PS, podría representar un mecanismo de modulación directa, mientras que el modo de unión 2 sugiere una posible modulación alostérica menos evidente, aunque más estable según nuestros datos.

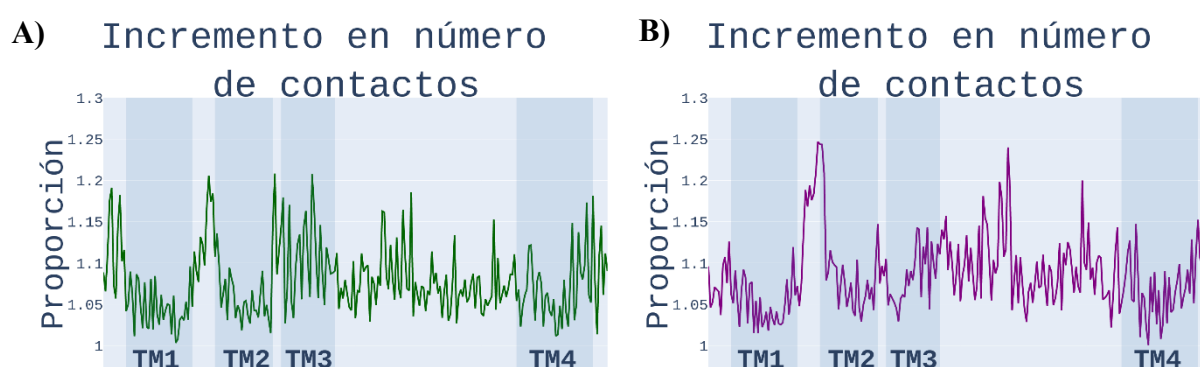


Figura 21 Incremento en el número de contactos en la Tspan6. A) En verde se muestran los resultados obtenidos de las simulaciones para el modo de unión 1 B) Se muestran en morado los resultados obtenidos para el modo de unión 2. En regiones sombreadas se señala la región correspondiente a cada una de las hélices TM.

7.2 Conclusiones

Este estudio propone dos modos de unión viables para la proteína Tspan6 en su interacción con la GS. En ambos modos, las hélices TM2 y TM3 de la Tspan6 establecen contactos significativos con la GS, aunque presentan diferencias notables en su proximidad a la subunidad catalítica. El modo de unión 1, al encontrarse cerca de la PS, sugiere un mecanismo de modulación directa, mientras que el modo de unión 2, que posiciona a la Tspan6 en una región más distal, podría representar una modulación alostérica.

Las simulaciones de dinámica molecular realizadas indican que ambos modos de unión estabilizan un estado activo de la proteasa. Estos hallazgos abren la posibilidad de que modulaciones alostéricas por parte de proteínas como la Tspan6 puedan ser un mecanismo adicional y relevante para la regulación de la GS.

8. Perspectivas

En futuras investigaciones, se plantea una exploración detallada de las moléculas propuestas como alternativas al anillo fenilimidazol de E2012. Simulaciones de dinámica molecular con un muestreo exhaustivo y cálculos precisos de afinidad en el bolsillo alostérico de la PS permitirán evaluar y validar la funcionalidad de estas estructuras en términos de estabilización y afinidad. Complementariamente, en el ámbito experimental, la síntesis de estas moléculas y la evaluación *in vitro* de su efecto sobre la producción de péptidos A β constituirán un paso esencial para confirmar su potencial modulador.

La integración de enfoques computacionales y experimentales es fundamental para avanzar en el diseño de moléculas con propiedades ADMETox favorables y con eficacia terapéutica, lo que contribuiría al desarrollo de moduladores específicos para la GS en el contexto de enfermedades amiloides.

Por otra parte, resulta relevante investigar mediante simulaciones de dinámica molecular atómica los mecanismos de modulación de la GS por la Tspan6 y determinar si estos mecanismos son conservados entre diferentes miembros de la familia Tspan. Esta línea de investigación permitirá una comprensión más amplia de la interacción proteína-proteína en el contexto de la modulación enzimática, abriendo nuevas posibilidades para intervenciones terapéuticas basadas en la modulación alostérica.

9. Bibliografia

- (1) Gorman, A. M. Neuronal Cell Death in Neurodegenerative Diseases: Recurring Themes around Protein Handling. *J Cell Mol Med* **2008**, *12* (6a), 2263–2280. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00402.x>.
- (2) Camandola, S.; Mattson, M. P. Brain Metabolism in Health, Aging, and Neurodegeneration. *EMBO J* **2017**, *36* (11), 1474–1492. <https://doi.org/10.15252/emboj.201695810>.
- (3) Kritsilis, M.; V. Rizou, S.; Koutsoudaki, P.; Evangelou, K.; Gorgoulis, V.; Papadopoulos, D. Ageing, Cellular Senescence and Neurodegenerative Disease. *Int J Mol Sci* **2018**, *19* (10), 2937. <https://doi.org/10.3390/ijms19102937>.
- (4) Hou, Y.; Dan, X.; Babbar, M.; Wei, Y.; Hasselbalch, S. G.; Croteau, D. L.; Bohr, V. A. Ageing as a Risk Factor for Neurodegenerative Disease. *Nat Rev Neurol* **2019**, *15* (10), 565–581. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0244-7>.
- (5) Armstrong, R. What Causes Neurodegenerative Disease? *Folia Neuropathol* **2020**, *58* (2), 93–112. <https://doi.org/10.5114/FN.2020.96707>.
- (6) Kovacs, G. G. Concepts and Classification of Neurodegenerative Diseases. *Handb Clin Neurol* **2018**, *145*, 301–307. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802395-2.00021-3>.
- (7) Kovacs, G. G. Are Comorbidities Compatible with a Molecular Pathological Classification of Neurodegenerative Diseases? *Curr Opin Neurol* **2019**, *32* (2), 279–291. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000664>.
- (8) Armstrong, R. What Causes Neurodegenerative Disease? *Folia Neuropathol* **2020**, *58* (2), 93–112. <https://doi.org/10.5114/fn.2020.96707>.
- (9) Wong, P. C.; Savonenko, A.; Li, T.; Price, D. L. Neurobiology of Alzheimer’s Disease. In *Basic Neurochemistry*; Elsevier, 2012; pp 815–828. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374947-5.00046-8>.

- (10) 2021 Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimer's & Dementia* **2021**, *17* (3), 327–406. <https://doi.org/10.1002/alz.12328>.
- (11) Gutiérrez-Robledo, L.; Arrieta-Cruz I. Demencias En México: La Necesidad de Un Plan de Acción. *Gac Med Mex.* **2015**, *151*, 667–673.
- (12) Masters, C. L.; Bateman, R.; Blennow, K.; Rowe, C. C.; Sperling, R. A.; Cummings, J. L. Alzheimer's Disease. *Nat Rev Dis Primers* **2015**, *1* (1), 15056. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.56>.
- (13) Breijyeh, Z.; Karaman, R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules* **2020**, *25* (24), 5789. <https://doi.org/10.3390/molecules25245789>.
- (14) Andrews, S. J.; Fulton-Howard, B.; Goate, A. Interpretation of Risk Loci from Genome-Wide Association Studies of Alzheimer's Disease. *Lancet Neurol* **2020**, *19* (4), 326–335. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30435-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30435-1).
- (15) Nikolac Perkovic, M.; Pivac, N. Genetic Markers of Alzheimer's Disease; 2019; pp 27–52. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9721-0_3.
- (16) Knopman, D. S.; Amieva, H.; Petersen, R. C.; Chételat, G.; Holtzman, D. M.; Hyman, B. T.; Nixon, R. A.; Jones, D. T. Alzheimer Disease. *Nat Rev Dis Primers* **2021**, *7* (1), 33. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00269-y>.
- (17) Vaz, M.; Silvestre, S. Alzheimer's Disease: Recent Treatment Strategies. *Eur J Pharmacol* **2020**, *887*, 173554. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173554>.
- (18) Jucker, M.; Walker, L. C. Alzheimer's Disease: From Immunotherapy to Immunoprevention. *Cell* **2023**, *186* (20), 4260–4270. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.08.021>.
- (19) Gómez-Ganau, S.; de Julián-Ortiz, J. V.; Gozalbes, R. Recent Advances in Computational Approaches for Designing Potential Anti-Alzheimer's Agents. *Neuromethods* **2018**, *132*, 25–59. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7404-7_2.

- (20) Yadav, M. R.; Barmade, M. A.; Chikhale, R. V.; Murumkar, P. R. Computational Modelling of Kinase Inhibitors as Anti-Alzheimer Agents. *Neuromethods* **2018**, *132*, 347–417. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7404-7_14.
- (21) Hampel, H.; Hardy, J.; Blennow, K.; Chen, C.; Perry, G.; Kim, S. H.; Villemagne, V. L.; Aisen, P.; Vendruscolo, M.; Iwatsubo, T.; Masters, C. L.; Cho, M.; Lannfelt, L.; Cummings, J. L.; Vergallo, A. The Amyloid- β Pathway in Alzheimer's Disease. *Mol Psychiatry* **2021**, *26* (10), 5481–5503. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01249-0>.
- (22) Ord, C.; Jack, R.; Knopman, D. S.; Jagust, W. J.; Shaw, L. M.; Aisen, P. S.; Weiner, M. W.; Petersen, R. C.; Trojanowski, J. Q. Personal View Hypothetical Model of Dynamic Biomarkers of the Alzheimer's Pathological Cascade. *Lancet Neurol* **2010**, *9*, 119–128. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70299-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70299-6).
- (23) Frisoni, G. B.; Altomare, D.; Thal, D. R.; Ribaldi, F.; van der Kant, R.; Ossenkoppele, R.; Blennow, K.; Cummings, J.; van Duijn, C.; Nilsson, P. M.; Dietrich, P.-Y.; Scheltens, P.; Dubois, B. The Probabilistic Model of Alzheimer Disease: The Amyloid Hypothesis Revised. *Nat Rev Neurosci* **2022**, *23* (1), 53–66. <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00533-w>.
- (24) Cho, Y.; Bae, H.-G.; Okun, E.; Arumugam, T. V.; Jo, D.-G. Physiology and Pharmacology of Amyloid Precursor Protein. *Pharmacol Ther* **2022**, *235*, 108122. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2022.108122>.
- (25) Dunot, J.; Ribera, A.; Pousinha, P. A.; Marie, H. Spatiotemporal Insights of APP Function. *Curr Opin Neurobiol* **2023**, *82*, 102754. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2023.102754>.
- (26) Zhao, J.; Liu, X.; Xia, W.; Zhang, Y.; Wang, C. Targeting Amyloidogenic Processing of APP in Alzheimer's Disease. *Front Mol Neurosci* **2020**, *13*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00137>.

- (27) Grimm, M. O. W.; Mett, J.; Grimm, H. S.; Hartmann, T. APP Function and Lipids: A Bidirectional Link. *Front Mol Neurosci* **2017**, *10*.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00063>.
- (28) Guzmán-Ocampo, D. C.; Aguayo-Ortiz, R.; Velasco-Bolom, J.-L.; Gupta, P. L.; Roitberg, A. E.; Dominguez, L. Elucidating the Protonation State of the γ -Secretase Catalytic Dyad. *ACS Chem Neurosci* **2023**, *14* (2), 261–269.
<https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.2c00563>.
- (29) Aguayo-Ortiz, R.; Dominguez, L. Simulating the γ -Secretase Enzyme: Recent Advances and Future Directions. *Biochimie* **2018**, *147*, 130–135.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.01.007>.
- (30) Yang, G.; Zhou, R.; Guo, X.; Yan, C.; Lei, J.; Shi, Y. Structural Basis of γ -Secretase Inhibition and Modulation by Small Molecule Drugs. *Cell* **2021**, *184* (2), 521–533.e14.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.11.049>.
- (31) Schrödinger LLC. *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.5.4*; 2015.
- (32) Wolfe, M. S. Unraveling the Complexity of γ -Secretase. *Semin Cell Dev Biol* **2020**, *105*, 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.01.005>.
- (33) Hitzenberger, M.; Götz, A.; Menig, S.; Brunschweiler, B.; Zacharias, M.; Scharnagl, C. The Dynamics of γ -Secretase and Its Substrates. *Semin Cell Dev Biol* **2020**, *105*, 86–101.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.04.008>.
- (34) Güner, G.; Lichtenthaler, S. F. The Substrate Repertoire of γ -Secretase/Presenilin. *Semin Cell Dev Biol* **2020**, *105*, 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.05.019>.
- (35) Funamoto, S.; Tagami, S.; Okochi, M.; Morishima-Kawashima, M. Successive Cleavage of β -Amyloid Precursor Protein by γ -Secretase. *Semin Cell Dev Biol* **2020**, *105*, 64–74.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.04.002>.

- (36) Polgár, L. The Mechanism of Action of Aspartic Proteases Involves ‘Push-Pull’ Catalysis. *FEBS Lett* **1987**, *219* (1), 1–4. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)81179-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)81179-1).
- (37) Zhang, Y.; Chen, H.; Li, R.; Sterling, K.; Song, W. Amyloid β -Based Therapy for Alzheimer’s Disease: Challenges, Successes and Future. *Signal Transduct Target Ther* **2023**, *8* (1), 248. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01484-7>.
- (38) Wolfe, M. S. γ -Secretase: Once and Future Drug Target for Alzheimer’s Disease. *Expert Opin Drug Discov* **2023**, 1–4. <https://doi.org/10.1080/17460441.2023.2277350>.
- (39) Petit, D.; Fernández, S. G.; Zoltowska, K. M.; Enzlein, T.; Ryan, N. S.; O’Connor, A.; Szaruga, M.; Hill, E.; Vandenberghe, R.; Fox, N. C.; Chávez-Gutiérrez, L. A β Profiles Generated by Alzheimer’s Disease Causing PSEN1 Variants Determine the Pathogenicity of the Mutation and Predict Age at Disease Onset. *Mol Psychiatry* **2022**, *27* (6), 2821–2832. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01518-6>.
- (40) Dharan, R.; Sorkin, R. Tetraspanin Proteins in Membrane Remodeling Processes. *J Cell Sci* **2024**, *137* (14). <https://doi.org/10.1242/JCS.261532>.
- (41) Zhou, Z.; Yang, Z.; Zhou, L.; Yang, M.; He, S. The Versatile Roles of Tetraspanins in Cancer from Intracellular Signaling to Cell–Cell Communication: Cell Membrane Proteins without Ligands. *Cell Biosci* **2023**, *13* (1), 59. <https://doi.org/10.1186/s13578-023-00995-8>.
- (42) Seipold, L.; Damme, M.; Prox, J.; Rabe, B.; Kasperek, P.; Sedlacek, R.; Altmeyden, H.; Willem, M.; Boland, B.; Glatzel, M.; Saftig, P. Tetraspanin 3: A Central Endocytic Membrane Component Regulating the Expression of ADAM10, Presenilin and the Amyloid Precursor Protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2017**, *1864* (1), 217–230. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.11.003>.

- (43) Wakabayashi, T.; Craessaerts, K.; Bammens, L.; Bentahir, M.; Borgions, F.; Herdewijn, P.; Staes, A.; Timmerman, E.; Vandekerckhove, J.; Rubinstein, E.; Boucheix, C.; Gevaert, K.; De Strooper, B. Analysis of the γ -Secretase Interactome and Validation of Its Association with Tetraspanin-Enriched Microdomains. *Nat Cell Biol* **2009**, *11* (11), 1340–1346. <https://doi.org/10.1038/ncb1978>.
- (44) Guix, F. X.; Sannerud, R.; Berditchevski, F.; Arranz, A. M.; Horr , K.; Snellinx, A.; Thathiah, A.; Saido, T.; Saito, T.; Rajesh, S.; Overduin, M.; Kumar-Singh, S.; Radaelli, E.; Corthout, N.; Colombelli, J.; Tosi, S.; Munck, S.; Salas, I. H.; Annaert, W.; De Strooper, B. Tetraspanin 6: A Pivotal Protein of the Multiple Vesicular Body Determining Exosome Release and Lysosomal Degradation of Amyloid Precursor Protein Fragments. *Mol Neurodegener* **2017**, *12* (1), 25. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0165-0>.
- (45) Becic, A.; Leifeld, J.; Shaukat, J.; Hollmann, M. Tetraspanins as Potential Modulators of Glutamatergic Synaptic Function. *Front Mol Neurosci* **2022**, *14*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.801882>.
- (46) Hur, J.-Y. γ -Secretase in Alzheimer’s Disease. *Exp Mol Med* **2022**, *54* (4), 433–446. <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00754-8>.
- (47) Nie, P.; Vartak, A.; Li, Y.-M. γ -Secretase Inhibitors and Modulators: Mechanistic Insights into the Function and Regulation of γ -Secretase. *Semin Cell Dev Biol* **2020**, *105*, 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.03.002>.
- (48) Hall, A.; Velter, A. I. Targeting γ -Secretase for the Treatment of Alzheimer’s Disease. In *Comprehensive Medicinal Chemistry III*; Elsevier, 2017; pp 280–325. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.13789-8>.
- (49) Yang, G.; Zhou, R.; Guo, X.; Yan, C.; Lei, J.; Shi, Y. Structural Basis of γ -Secretase Inhibition and Modulation by Small Molecule Drugs. *Cell* **2021**, *184* (2), 521–533.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.11.049>.

- (50) Santiago, Á.; Guzmán-Ocampo, D. C.; Aguayo-Ortiz, R.; Dominguez, L. Characterizing the Chemical Space of γ -Secretase Inhibitors and Modulators. *ACS Chem Neurosci* **2021**, *12* (15), 2765–2775. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.1c00313>.
- (51) Wolfe, M. S. Probing Mechanisms and Therapeutic Potential of γ -Secretase in Alzheimer's Disease. *Molecules* **2021**, *26* (2). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26020388>.
- (52) Tautermann, C. S. Current and Future Challenges in Modern Drug Discovery. *Methods Mol Biol* **2020**, *2114*, 1–17. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0282-9_1.
- (53) Luo, J. E.; Li, Y. M. Turning the Tide on Alzheimer's Disease: Modulation of γ -Secretase. *Cell Biosci* **2022**, *12* (1). <https://doi.org/10.1186/S13578-021-00738-7>.
- (54) Saldívar-González, F. I.; Medina-Franco, J. L. Chemoinformatics Approaches to Assess Chemical Diversity and Complexity of Small Molecules. *Small Molecule Drug Discovery: Methods, Molecules and Applications* **2020**, 83–102. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818349-6.00003-0>.
- (55) Padhy, I.; Mahapatra, A.; Banerjee, B.; Sharma, T. Computational Approaches in Drug Discovery from Phytochemicals. *Phytochemistry, Computational Tools, and Databases in Drug Discovery* **2023**, 57–88. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90593-0.00014-9>.
- (56) Pandit, S.; Singh, P.; Parthasarathi, R. Quantum Chemical and Informatics-Based Approaches for Probing Biomolecular Systems Toxicology. *Comprehensive Computational Chemistry, First Edition: Volume 1-4* **2024**, *1*, 193–201. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821978-2.00138-0>.
- (57) Kumar, R.; Lathwal, A.; Nagpal, G.; Kumar, V.; Raghav, P. K. Impact of Chemoinformatics Approaches and Tools on Current Chemical Research. *Chemoinformatics and Bioinformatics in the Pharmaceutical Sciences* **2021**, 1–26. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821748-1.00001-4>.

- (58) Hollingsworth, S. A.; Dror, R. O. Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron* **2018**, 99 (6), 1129. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2018.08.011>.
- (59) Frenkel, D.; Smit, B. Understanding Molecular Simulation: From Algorithms to Applications, Third Edition. *Understanding Molecular Simulation: from Algorithms to Applications, Third Edition* **2023**, 1–728. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-63921-0>.
- (60) Collier, T. A.; Piggot, T. J.; Allison, J. R. Molecular Dynamics Simulation of Proteins; 2020; pp 311–327. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9869-2_17.
- (61) Wu, X.; Xu, L.; Li, E.; Dong, G. Application of Molecular Dynamics Simulation in Biomedicine. *Chem Biol Drug Des* **2022**, 99 (5), 789–800. <https://doi.org/10.1111/cbdd.14038>.
- (62) Bradley, R.; Radhakrishnan, R. Coarse-Grained Models for Protein-Cell Membrane Interactions. *Polymers (Basel)* **2013**, 5 (3), 890–936. <https://doi.org/10.3390/polym5030890>.
- (63) Jefferies, D.; Khalid, S. Atomistic and Coarse-Grained Simulations of Membrane Proteins: A Practical Guide. *Methods* **2021**, 185, 15–27. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2020.02.007>.
- (64) Aguayo-Ortiz, R.; Chávez-García, C.; Straub, J. E.; Dominguez, L. Characterizing the Structural Ensemble of γ -Secretase Using a Multiscale Molecular Dynamics Approach. *Chem Sci* **2017**, 8 (8), 5576–5584. <https://doi.org/10.1039/C7SC00980A>.
- (65) Aguayo-Ortiz, R.; Straub, J. E.; Dominguez, L. Influence of Membrane Lipid Composition on the Structure and Activity of γ -Secretase. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2018**, 20 (43), 27294–27304. <https://doi.org/10.1039/C8CP04138E>.
- (66) Hitzenberger, M.; Zacharias, M. γ -Secretase Studied by Atomistic Molecular Dynamics Simulations: Global Dynamics, Enzyme Activation, Water Distribution and Lipid Binding. *Front Chem* **2019**, 6. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00640>.

- (67) Chávez-García, C.; Aguayo-Ortiz, R.; Dominguez, L. Quantifying Correlations between Mutational Sites in the Catalytic Subunit of γ -Secretase. *J Mol Graph Model* **2019**, *88*, 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.jmglm.2019.02.002>.
- (68) Chen, S.-Y.; Zacharias, M. How Mutations Perturb γ -Secretase Active Site Studied by Free Energy Simulations. *ACS Chem Neurosci* **2020**, *11* (20), 3321–3332. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.0c00440>.
- (69) Velasco-Bolom, J.-L.; Domínguez, L. Mechanistic Regulation of γ -Secretase by Their Substrates. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2022**, *24* (32), 19223–19232. <https://doi.org/10.1039/D2CP01714H>.
- (70) Chen, S.-Y.; Feilen, L. P.; Chávez-Gutiérrez, L.; Steiner, H.; Zacharias, M. Enzyme-Substrate Hybrid β -Sheet Controls Geometry and Water Access to the γ -Secretase Active Site. *Commun Biol* **2023**, *6* (1), 670. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05039-y>.
- (71) Bhattarai, A.; Devkota, S.; Bhattarai, S.; Wolfe, M. S.; Miao, Y. Mechanisms of γ -Secretase Activation and Substrate Processing. *ACS Cent Sci* **2020**, *6* (6), 969–983. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c00296>.
- (72) Orzeł, U.; Jakowiecki, J.; Młynarczyk, K.; Filipek, S. The Role of Cholesterol in Amyloidogenic Substrate Binding to the γ -Secretase Complex. *Biomolecules* **2021**, *11* (7), 935. <https://doi.org/10.3390/biom11070935>.
- (73) Siegel, G.; Gerber, H.; Koch, P.; Bruestle, O.; Fraering, P. C.; Correspondence, L. R. The Alzheimer's Disease γ -Secretase Generates Higher 42:40 Ratios for b-Amyloid Than for P3 Peptides. *Cell Rep* **2017**, *19*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.034>.
- (74) Zhou, R.; Yang, G.; Guo, X.; Zhou, Q.; Lei, J.; Shi, Y. Recognition of the Amyloid Precursor Protein by Human γ -Secretase. *Science (1979)* **2019**, *363* (6428). <https://doi.org/10.1126/science.aaw0930>.

- (75) Xiong, G.; Wu, Z.; Yi, J.; Fu, L.; Yang, Z.; Hsieh, C.; Yin, M.; Zeng, X.; Wu, C.; Lu, A.; Chen, X.; Hou, T.; Cao, D. ADMETlab 2.0: An Integrated Online Platform for Accurate and Comprehensive Predictions of ADMET Properties. *Nucleic Acids Res* **2021**, *49* (W1), W5–W14. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab255>.
- (76) Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. *Sci Rep* **2017**, *7* (1), 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>.
- (77) Daina, A.; Zoete, V. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. *ChemMedChem* **2016**, *11* (11), 1117–1121. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600182>.
- (78) Fitzner, D.; Bader, J. M.; Penkert, H.; Bergner, C. G.; Su, M.; Weil, M. T.; Surma, M. A.; Mann, M.; Klose, C.; Simons, M. Cell-Type- and Brain-Region-Resolved Mouse Brain Lipidome. *Cell Rep* **2020**, *32* (11), 108132. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2020.108132>.
- (79) Holmes, O.; Paturi, S.; Ye, W.; Wolfe, M. S.; Selkoe, D. J. The Effects of Membrane Lipids on the Activity and Processivity of Purified γ -Secretase. *Biochemistry* **2012**, *51* (17), 3565. <https://doi.org/10.1021/BI300303G>.
- (80) Osenkowski, P.; Ye, W.; Wang, R.; Wolfe, M. S.; Selkoe, D. J. Direct and Potent Regulation of Gamma-Secretase by Its Lipid Microenvironment. *J Biol Chem* **2008**, *283* (33), 22529–22540. <https://doi.org/10.1074/JBC.M801925200>.
- (81) Lee, J.; Cheng, X.; Swails, J. M.; Yeom, M. S.; Eastman, P. K.; Lemkul, J. A.; Wei, S.; Buckner, J.; Jeong, J. C.; Qi, Y.; Jo, S.; Pande, V. S.; Case, D. A.; Brooks, C. L.; MacKerell, A. D.; Klauda, J. B.; Im, W. CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the

- CHARMM36 Additive Force Field. *J Chem Theory Comput* **2016**, *12* (1), 405–413.
<https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00935>.
- (82) Jo, S.; Kim, T.; Iyer, V. G.; Im, W. CHARMM-GUI: A Web-Based Graphical User Interface for CHARMM. *J Comput Chem* **2008**, *29* (11), 1859–1865.
<https://doi.org/10.1002/jcc.20945>.
- (83) Lee, J.; Hitzenberger, M.; Rieger, M.; Kern, N. R.; Zacharias, M.; Im, W. CHARMM-GUI Supports the Amber Force Fields. *J Chem Phys* **2020**, *153* (3), 035103.
<https://doi.org/10.1063/5.0012280>.
- (84) Brooks, B. R.; Brooks, C. L.; Mackerell, A. D.; Nilsson, L.; Petrella, R. J.; Roux, B.; Won, Y.; Archontis, G.; Bartels, C.; Boresch, S.; Caflisch, A.; Caves, L.; Cui, Q.; Dinner, A. R.; Feig, M.; Fischer, S.; Gao, J.; Hodoscek, M.; Im, W.; Kuczera, K.; Lazaridis, T.; Ma, J.; Ovchinnikov, V.; Paci, E.; Pastor, R. W.; Post, C. B.; Pu, J. Z.; Schaefer, M.; Tidor, B.; Venable, R. M.; Woodcock, H. L.; Wu, X.; Yang, W.; York, D. M.; Karplus, M. CHARMM: The Biomolecular Simulation Program. *J Comput Chem* **2009**, *30* (10), 1545–1614. <https://doi.org/10.1002/jcc.21287>.
- (85) 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.; Im, W. CHARMM-GUI Membrane Builder toward Realistic Biological Membrane Simulations. *J Comput Chem* **2014**, *35* (27), 1997–2004. <https://doi.org/10.1002/jcc.23702>.
- (86) Lee, J.; Patel, D. S.; Stähle, J.; Park, S.-J.; Kern, N. R.; Kim, S.; Lee, J.; Cheng, X.; Valvano, M. A.; Holst, O.; Knirel, Y. A.; Qi, Y.; Jo, S.; Klauda, J. B.; Widmalm, G.; Im, W. CHARMM-GUI Membrane Builder for Complex Biological Membrane Simulations with Glycolipids and Lipoglycans. *J Chem Theory Comput* **2019**, *15* (1), 775–786.
<https://doi.org/10.1021/acs.jctc.8b01066>.

- (87) Jo, S.; Lim, J. B.; Klauda, J. B.; Im, W. CHARMM-GUI Membrane Builder for Mixed Bilayers and Its Application to Yeast Membranes. *Biophys J* **2009**, *97* (1), 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.04.013>.
- (88) Ibragimova, G. T.; Wade, R. C. Importance of Explicit Salt Ions for Protein Stability in Molecular Dynamics Simulation. *Biophys J* **1998**, *74* (6), 2906. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77997-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77997-4).
- (89) Hub, J. S.; De Groot, B. L.; Grubmüller, H.; Groenhof, G. Quantifying Artifacts in Ewald Simulations of Inhomogeneous Systems with a Net Charge. *J Chem Theory Comput* **2014**, *10* (1), 381–390. https://doi.org/10.1021/CT400626B/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CT-2013-00626B_0007.GIF.
- (90) Guzmán-Ocampo, D. C.; Aguayo-Ortiz, R.; Dominguez, L. Understanding the Modulatory Role of E2012 on the γ -Secretase-Substrate Interaction. *J Chem Inf Model* **2024**, *64* (9), 3855–3864. https://doi.org/10.1021/ACS.JCIM.3C01993/SUPPL_FILE/CI3C01993_SI_001.PDF.
- (91) D.A. Case; H.M. Aktulga; K. Belfon; I.Y. Ben-Shalom; J.T. Berryman; S.R. Brozell; D.S. Cerutti; T.E. Cheatham, I.; G.A. Cisneros; V.W.D. Cruzeiro; T.A. Darden; N. Forouzes; G. Giambasu; T. Giese; M.K. Gilson; H. Gohlke; A.W. Goetz; J. Harris; S. Izadi; S.A. Izmailov; K. Kasavajhala; M.C. Kaymak; E. King; A. Kovalenko; T. Kurtzman; T.S. Lee; P. Li; C. Lin; J. Liu; T. Luchko; R. Luo; M. Machado; V. Man; M. Manathunga; K.M. Merz; Y. Miao; O. Mikhailovskii; G. Monard; H. Nguyen; K.A. O’Hearn; A. Onufriev; F. Pan; S. Pantano; R. Qi; A. Rahnamoun; D.R. Roe; A. Roitberg; C. Sagui; S. Schott-Verdugo; A. Shajan; J. Shen; C.L. Simmerling; N.R. Skrynnikov; J. Smith; J. Swails; R.C. Walker; J. Wang; J. Wang; H. Wei; X. Wu; Y. Wu; Y. Xiong; Y. Xue; D.M. York; S. Zhao; Q. Zhu; P.A. Kollman. Amber 2022. University of California: San Francisco.

- (92) Case, D. A.; Aktulga, H. M.; Belfon, K.; Cerutti, D. S.; Cisneros, G. A.; Cruzeiro, V. W. D.; Forouzes, N.; Giese, T. J.; Götz, A. W.; Gohlke, H.; Izadi, S.; Kasavajhala, K.; Kaymak, M. C.; King, E.; Kurtzman, T.; Lee, T.-S.; Li, P.; Liu, J.; Luchko, T.; Luo, R.; Manathunga, M.; Machado, M. R.; Nguyen, H. M.; O’Hearn, K. A.; Onufriev, A. V.; Pan, F.; Pantano, S.; Qi, R.; Rahnamoun, A.; Risheh, A.; Schott-Verdugo, S.; Shajan, A.; Swails, J.; Wang, J.; Wei, H.; Wu, X.; Wu, Y.; Zhang, S.; Zhao, S.; Zhu, Q.; Cheatham, T. E.; Roe, D. R.; Roitberg, A.; Simmerling, C.; York, D. M.; Nagan, M. C.; Merz, K. M. AmberTools. *J Chem Inf Model* **2023**, *63* (20), 6183–6191. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.3c01153>.
- (93) Maier, J. A.; Martinez, C.; Kasavajhala, K.; Wickstrom, L.; Hauser, K. E.; Simmerling, C. Ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from Ff99SB. *J Chem Theory Comput* **2015**, *11* (8), 3696–3713. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00255>.
- (94) Dickson, C. J.; Walker, R. C.; Gould, I. R. Lipid21: Complex Lipid Membrane Simulations with AMBER. *J Chem Theory Comput* **2022**, *18* (3), 1726–1736. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.1c01217>.
- (95) Mark, P.; Nilsson, L. Structure and Dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E Water Models at 298 K. *J Phys Chem A* **2001**, *105* (43), 9954–9960. <https://doi.org/10.1021/jp003020w>.
- (96) Wang, J.; Wang, W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Automatic Atom Type and Bond Type Perception in Molecular Mechanical Calculations. *J Mol Graph Model* **2006**, *25* (2), 247–260. <https://doi.org/10.1016/j.jmglm.2005.12.005>.
- (97) Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Development and Testing of a General Amber Force Field. *J Comput Chem* **2004**, *25* (9), 1157–1174. <https://doi.org/10.1002/jcc.20035>.

- (98) Jo, S.; Kim, T.; Iyer, V. G.; Im, W. CHARMM-GUI: A Web-Based Graphical User Interface for CHARMM. *J Comput Chem* **2008**, *29* (11), 1859–1865. <https://doi.org/10.1002/jcc.20945>.
- (99) Gowers, R.; Linke, M.; Barnoud, J.; Reddy, T.; Melo, M.; Seyler, S.; Domański, J.; Dotson, D.; Buchoux, S.; Kenney, I.; Beckstein, O. MDAAnalysis: A Python Package for the Rapid Analysis of Molecular Dynamics Simulations; 2016; pp 98–105. <https://doi.org/10.25080/Majora-629e541a-00e>.
- (100) Michaud-Agrawal, N.; Denning, E. J.; Woolf, T. B.; Beckstein, O. MDAAnalysis: A Toolkit for the Analysis of Molecular Dynamics Simulations. *J Comput Chem* **2011**, *32* (10), 2319–2327. <https://doi.org/10.1002/jcc.21787>.
- (101) Roe, D. R.; Cheatham, T. E. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *J Chem Theory Comput* **2013**, *9* (7), 3084–3095. <https://doi.org/10.1021/ct400341p>.
- (102) Virtanen, P.; Gommers, R.; Oliphant, T. E.; Haberland, M.; Reddy, T.; Cournapeau, D.; Burovski, E.; Peterson, P.; Weckesser, W.; Bright, J.; van der Walt, S. J.; Brett, M.; Wilson, J.; Millman, K. J.; Mayorov, N.; Nelson, A. R. J.; Jones, E.; Kern, R.; Larson, E.; Carey, C. J.; Polat, İ.; Feng, Y.; Moore, E. W.; VanderPlas, J.; Laxalde, D.; Perktold, J.; Cimrman, R.; Henriksen, I.; Quintero, E. A.; Harris, C. R.; Archibald, A. M.; Ribeiro, A. H.; Pedregosa, F.; van Mulbregt, P.; Vijaykumar, A.; Bardelli, A. Pietro; Rothberg, A.; Hilboll, A.; Kloeckner, A.; Scopatz, A.; Lee, A.; Rokem, A.; Woods, C. N.; Fulton, C.; Masson, C.; Häggström, C.; Fitzgerald, C.; Nicholson, D. A.; Hagen, D. R.; Pasechnik, D. V.; Olivetti, E.; Martin, E.; Wieser, E.; Silva, F.; Lenders, F.; Wilhelm, F.; Young, G.; Price, G. A.; Ingold, G. L.; Allen, G. E.; Lee, G. R.; Audren, H.; Probst, I.; Dietrich, J. P.; Silterra, J.; Webber, J. T.; Slavič, J.; Nothman, J.; Buchner, J.; Kulick, J.; Schönberger, J. L.; de Miranda Cardoso, J. V.; Reimer, J.; Harrington, J.; Rodríguez, J. L. C.; Nunez-

- Iglesias, J.; Kuczynski, J.; Tritz, K.; Thoma, M.; Newville, M.; Kümmerer, M.; Bolingbroke, M.; Tartre, M.; Pak, M.; Smith, N. J.; Nowaczyk, N.; Shebanov, N.; Pavlyk, O.; Brodtkorb, P. A.; Lee, P.; McGibbon, R. T.; Feldbauer, R.; Lewis, S.; Tygier, S.; Sievert, S.; Vigna, S.; Peterson, S.; More, S.; Pudlik, T.; Oshima, T.; Pingel, T. J.; Robitaille, T. P.; Spura, T.; Jones, T. R.; Cera, T.; Leslie, T.; Zito, T.; Krauss, T.; Upadhyay, U.; Halchenko, Y. O.; Vázquez-Baeza, Y. SciPy 1.0: Fundamental Algorithms for Scientific Computing in Python. *Nature Methods* **2020**, *17* (3), 261–272. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0686-2>.
- (103) Coutsiás, E. A.; Wester, M. J. RMSD and Symmetry. *J Comput Chem* **2019**, *40* (15), 1496–1508. <https://doi.org/10.1002/jcc.25802>.
- (104) Martínez, L. Automatic Identification of Mobile and Rigid Substructures in Molecular Dynamics Simulations and Fractional Structural Fluctuation Analysis. *PLoS One* **2015**, *10* (3), e0119264. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119264>.
- (105) Pitera, J. W. Expected Distributions of Root-Mean-Square Positional Deviations in Proteins. *J Phys Chem B* **2014**, *118* (24), 6526–6530. <https://doi.org/10.1021/jp412776d>.
- (106) Sugeta, H.; Miyazawa, T. General Method for Calculating Helical Parameters of Polymer Chains from Bond Lengths, Bond Angles, and Internal-Rotation Angles. *Biopolymers* **1967**, *5* (7), 673–679. <https://doi.org/10.1002/bip.1967.360050708>.
- (107) Dickson, C. J. *AMBER-Umbrella_COM_restraint_tutorial*. GitHub. https://github.com/callumjd/AMBER-Umbrella_COM_restraint_tutorial (accessed 2023-10-24).
- (108) Filipe, H. A. L.; Moreno, M. J.; Róg, T.; Vattulainen, I.; Loura, L. M. S. How To Tackle the Issues in Free Energy Simulations of Long Amphiphiles Interacting with Lipid Membranes: Convergence and Local Membrane Deformations. *J Phys Chem B* **2014**, *118* (13), 3572–3581. <https://doi.org/10.1021/jp501622d>.

- (109) Lee, C. T.; Comer, J.; Herndon, C.; Leung, N.; Pavlova, A.; Swift, R. V.; Tung, C.; Rowley, C. N.; Amaro, R. E.; Chipot, C.; Wang, Y.; Gumbart, J. C. Simulation-Based Approaches for Determining Membrane Permeability of Small Compounds. *J Chem Inf Model* **2016**, *56* (4), 721–733. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00022>.
- (110) Alan Grossfield. WHAM: The Weighted Histogram Analysis Method Version 2.0.10.
- (111) Kumar, S.; Rosenberg, J. M.; Bouzida, D.; Swendsen, R. H.; Kollman, P. A. Multidimensional Free-Energy Calculations Using the Weighted Histogram Analysis Method. *J Comput Chem* **1995**, *16* (11), 1339–1350. <https://doi.org/10.1002/jcc.540161104>.
- (112) Eberhardt, J.; Santos-Martins, D.; Tillack, A. F.; Forli, S. AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. *J Chem Inf Model* **2021**, *61* (8), 3891–3898. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203>.
- (113) Francoeur, P. G.; Masuda, T.; Sunseri, J.; Jia, A.; Iovanisci, R. B.; Snyder, I.; Koes, D. R. Three-Dimensional Convolutional Neural Networks and a Cross-Docked Data Set for Structure-Based Drug Design. *J Chem Inf Model* **2020**, *60* (9), 4200–4215. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c00411>.
- (114) McNutt, A. T.; Francoeur, P.; Aggarwal, R.; Masuda, T.; Meli, R.; Ragoza, M.; Sunseri, J.; Koes, D. R. GNINA 1.0: Molecular Docking with Deep Learning. *J Cheminform* **2021**, *13* (1), 43. <https://doi.org/10.1186/s13321-021-00522-2>.
- (115) Hochuli, J.; Helbling, A.; Skaist, T.; Ragoza, M.; Koes, D. R. Visualizing Convolutional Neural Network Protein-Ligand Scoring. *J Mol Graph Model* **2018**, *84*, 96–108. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2018.06.005>.
- (116) Ragoza, M.; Hochuli, J.; Idrobo, E.; Sunseri, J.; Koes, D. R. Protein–Ligand Scoring with Convolutional Neural Networks. *J Chem Inf Model* **2017**, *57* (4), 942–957. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00740>.

- (117) OpenEye, C. M. S. Inc. OEDOCKING 4.2.1.1. <http://www.eyesopen.com>.: Santa Fe, NM.
- (118) McGann, M. FRED Pose Prediction and Virtual Screening Accuracy. *J Chem Inf Model* **2011**, *51* (3), 578–596. <https://doi.org/10.1021/ci100436p>.
- (119) McGann, M. FRED and HYBRID Docking Performance on Standardized Datasets. *J Comput Aided Mol Des* **2012**, *26* (8), 897–906. <https://doi.org/10.1007/s10822-012-9584-8>.
- (120) Kelley, B. P.; Brown, S. P.; Warren, G. L.; Muchmore, S. W. POSIT: Flexible Shape-Guided Docking For Pose Prediction. *J Chem Inf Model* **2015**, *55* (8), 1771–1780. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00142>.
- (121) Hawkins, P. C. D.; Skillman, A. G.; Warren, G. L.; Ellingson, B. A.; Stahl, M. T. Conformer Generation with OMEGA: Algorithm and Validation Using High Quality Structures from the Protein Databank and Cambridge Structural Database. *J Chem Inf Model* **2010**, *50* (4), 572–584. <https://doi.org/10.1021/ci100031x>.
- (122) Lomize, A. L.; Pogozheva, I. D. Physics-Based Method for Modeling Passive Membrane Permeability and Translocation Pathways of Bioactive Molecules. *J Chem Inf Model* **2019**, *59* (7), 3198–3213. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00224>.
- (123) Lomize, A. L.; Hage, J. M.; Schnitzer, K.; Golobokov, K.; LaFaive, M. B.; Forsyth, A. C.; Pogozheva, I. D. PerMM: A Web Tool and Database for Analysis of Passive Membrane Permeability and Translocation Pathways of Bioactive Molecules. *J Chem Inf Model* **2019**, *59* (7), 3094–3099. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00225>.
- (124) OpenEye, C. M. S. BROOD 3.2.1.1. <http://www.eyesopen.com>.: Santa Fe, NM.
- (125) Zdrazil, B.; Felix, E.; Hunter, F.; Manners, E. J.; Blackshaw, J.; Corbett, S.; de Veij, M.; Ioannidis, H.; Lopez, D. M.; Mosquera, J. F.; Magarinos, M. P.; Bosc, N.; Arcila, R.; Kizilören, T.; Gaulton, A.; Bento, A. P.; Adasme, M. F.; Monecke, P.; Landrum, G. A.;

- Leach, A. R. The ChEMBL Database in 2023: A Drug Discovery Platform Spanning Multiple Bioactivity Data Types and Time Periods. *Nucleic Acids Res* **2024**, 52 (D1), D1180–D1192. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAD1004>.
- (126) Eynde, V.; Barretta, R.; Kralj, S.; Jukič, M.; Bren, U. Molecular Filters in Medicinal Chemistry. *Encyclopedia* 2023, Vol. 3, Pages 501-511 **2023**, 3 (2), 501–511. <https://doi.org/10.3390/ENCYCLOPEDIA3020035>.
- (127) Li, G.; Shao, K.; Umeshappa, C. S. Recent Progress in Blood-Brain Barrier Transportation Research. *Brain Targeted Drug Delivery Systems: A Focus on Nanotechnology and Nanoparticulates* **2019**, 33–51. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814001-7.00003-2>.
- (128) Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O.; Tunyasuvunakool, K.; Bates, R.; Žídek, A.; Potapenko, A.; Bridgland, A.; Meyer, C.; Kohl, S. A. A.; Ballard, A. J.; Cowie, A.; Romera-Paredes, B.; Nikolov, S.; Jain, R.; Adler, J.; Back, T.; Petersen, S.; Reiman, D.; Clancy, E.; Zielinski, M.; Steinegger, M.; Pacholska, M.; Berghammer, T.; Bodenstein, S.; Silver, D.; Vinyals, O.; Senior, A. W.; Kavukcuoglu, K.; Kohli, P.; Hassabis, D. Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold. *Nature* **2021**, 596 (7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
- (129) Varadi, M.; Bertoni, D.; Magana, P.; Paramval, U.; Pidruchna, I.; Radhakrishnan, M.; Tsenkov, M.; Nair, S.; Mirdita, M.; Yeo, J.; Kovalevskiy, O.; Tunyasuvunakool, K.; Laydon, A.; Žídek, A.; Tomlinson, H.; Hariharan, D.; Abrahamson, J.; Green, T.; Jumper, J.; Birney, E.; Steinegger, M.; Hassabis, D.; Velankar, S. AlphaFold Protein Structure Database in 2024: Providing Structure Coverage for over 214 Million Protein Sequences. *Nucleic Acids Res* **2024**, 52 (D1), D368–D375. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAD1011>.

- (130) Zimmerman, B.; Kelly, B.; McMillan, B. J.; Seegar, T. C. M.; Dror, R. O.; Kruse, A. C.; Blacklow, S. C. Crystal Structure of a Full-Length Human Tetraspanin Reveals a Cholesterol-Binding Pocket. *Cell* **2016**, *167* (4), 1041-1051.e11. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.09.056>.
- (131) Umeda, R.; Satouh, Y.; Takemoto, M.; Nakada-Nakura, Y.; Liu, K.; Yokoyama, T.; Shirouzu, M.; Iwata, S.; Nomura, N.; Sato, K.; Ikawa, M.; Nishizawa, T.; Nureki, O. Structural Insights into Tetraspanin CD9 Function. *Nat Commun* **2020**, *11* (1). <https://doi.org/10.1038/S41467-020-15459-7>.
- (132) Kozakov, D.; Hall, D. R.; Xia, B.; Porter, K. A.; Padhorny, D.; Yueh, C.; Beglov, D.; Vajda, S. The ClusPro Web Server for Protein–Protein Docking. *Nat Protoc* **2017**, *12* (2), 255–278. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.169>.
- (133) Vajda, S.; Yueh, C.; Beglov, D.; Bohnuud, T.; Mottarella, S. E.; Xia, B.; Hall, D. R.; Kozakov, D. New Additions to the <sc>C</Sc> Lus <sc>P</Sc> Ro Server Motivated by <sc>CAPRI</Sc>. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2017**, *85* (3), 435–444. <https://doi.org/10.1002/prot.25219>.
- (134) Desta, I. T.; Porter, K. A.; Xia, B.; Kozakov, D.; Vajda, S. Performance and Its Limits in Rigid Body Protein-Protein Docking. *Structure* **2020**, *28* (9), 1071-1081.e3. <https://doi.org/10.1016/j.str.2020.06.006>.
- (135) Kozakov, D.; Beglov, D.; Bohnuud, T.; Mottarella, S. E.; Xia, B.; Hall, D. R.; Vajda, S. How Good Is Automated Protein Docking? *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2013**, *81* (12), 2159–2166. <https://doi.org/10.1002/prot.24403>.
- (136) Cianfrocco, M. A.; Wong-Barnum, M.; Youn, C.; Wagner, R.; Leschziner, A. COSMIC2. In *Proceedings of the Practice and Experience in Advanced Research Computing 2017 on Sustainability, Success and Impact*; ACM: New York, NY, USA, 2017; pp 1–5. <https://doi.org/10.1145/3093338.3093390>.

- (137) Richard Evans; Michael O'Neill; Alexander Pritzel; Natasha Antropova; Andrew Senior; Tim Green; Augustin Žídek; Russ Bates; Sam Blackwell; Jason Yim; Olaf Ronneberger; Sebastian Bodenstein; Michal Zielinski; Alex Bridgland; Anna Potapenko; Andrew Cowie; Kathryn Tunyasuvunakool; Rishub Jain; Ellen Clancy; Pushmeet Kohli; John Jumper; Demis Hassabis. Protein Complex Prediction with AlphaFold-Multimer. *bioRxiv* **2022**.
- (138) Erik Lindahl; Mark James Abraham; Berk Hess; David van der Spoel. GROMACS 2021.4. Zenodo November 5, 2021.
- (139) Abraham, M. J.; Murtola, T.; Schulz, R.; Páll, S.; Smith, J. C.; Hess, B.; Lindahl, E. GROMACS: High Performance Molecular Simulations through Multi-Level Parallelism from Laptops to Supercomputers. *SoftwareX* **2015**, 1–2, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>.
- (140) Wassenaar, T. A.; Ingólfsson, H. I.; Böckmann, R. A.; Tieleman, D. P.; Marrink, S. J. Computational Lipidomics with *Insane*: A Versatile Tool for Generating Custom Membranes for Molecular Simulations. *J Chem Theory Comput* **2015**, 11 (5), 2144–2155. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00209>.
- (141) De Jong, D. H.; Singh, G.; Drew Bennett, W. F.; Arnarez, C.; Wassenaar, T. A.; Schä, L. V.; Periole, X.; Peter, D.; Marrink, S. J. Improved Parameters for the Martini Coarse-Grained Protein Force Field. **2012**. <https://doi.org/10.1021/ct300646g>.
- (142) Szaruga, M.; Munteanu, B.; Lismont, S.; Veugelen, S.; Horré, K.; Mercken, M.; Saido, T. C.; Ryan, N. S.; De Vos, T.; Savvides, S. N.; Gallardo, R.; Schymkowitz, J.; Rousseau, F.; Fox, N. C.; Hopf, C.; De Strooper, B.; Chávez-Gutiérrez, L. Alzheimer's-Causing Mutations Shift A β Length by Destabilizing γ -Secretase-A β n Interactions. *Cell* **2017**, 170 (3), 443–456.e14. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2017.07.004>.

- (143) Pozdnyakov, N.; Murrey, H. E.; Crump, C. J.; Pettersson, M.; Ballard, T. E.; Am Ende, C. W.; Ahn, K.; Li, Y. M.; Bales, K. R.; Johnson, D. S. γ -Secretase Modulator (GSM) Photoaffinity Probes Reveal Distinct Allosteric Binding Sites on Presenilin. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, *288* (14), 9710–9720. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.398602>.
- (144) *PI-236: E2012: A novel gamma-secretase modulator-pharmacology part*. <https://alz-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1016/j.jalz.2010.05.787?src=getfr> (accessed 2024-02-19).
- (145) Zhou, R.; Yang, G.; Guo, X.; Zhou, Q.; Lei, J.; Shi, Y. Recognition of the Amyloid Precursor Protein by Human γ -Secretase. *Science (1979)* **2019**, *363* (6428). <https://doi.org/10.1126/science.aaw0930>.
- (146) Yuan, Y.; Pei, J.; Lai, L. LigBuilder V3: A Multi-Target de Novo Drug Design Approach. *Front Chem* **2020**, *8*. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00142>.
- (147) Lomize, A. L.; Hage, J. M.; Schnitzer, K.; Golobokov, K.; LaFaive, M. B.; Forsyth, A. C.; Pogozheva, I. D. PerMM: A Web Tool and Database for Analysis of Passive Membrane Permeability and Translocation Pathways of Bioactive Molecules. *J Chem Inf Model* **2019**, *59* (7), 3094–3099. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00225>.
- (148) Blumenfeld, Z.; Bera, K.; Castrén, E.; Lester, H. A. Antidepressants Enter Cells, Organelles, and Membranes. *Neuropsychopharmacology* **2023**, *49* (1), 246–261. <https://doi.org/10.1038/s41386-023-01725-x>.
- (149) Berger, T. A.; Berger, B. K.; Kogelman, K. Chromatographic Separations and Analysis: Supercritical Fluid Chromatography for Chiral Analysis and Semi-Preparative Purification. *Comprehensive Chirality* **2024**, 355–393. <https://doi.org/10.1016/B978-0-32-390644-9.00013-5>.

- (150) Schultes, S.; De Graaf, C.; Haaksma, E. E. J.; De Esch, I. J. P.; Leurs, R.; Krämer, O. Ligand Efficiency as a Guide in Fragment Hit Selection and Optimization. *Drug Discov Today Technol* **2010**, 7 (3), e157–e162. <https://doi.org/10.1016/J.DDTEC.2010.11.003>.
- (151) Hopkins, A. L.; Groom, C. R.; Alex, A. Ligand Efficiency: A Useful Metric for Lead Selection. *Drug Discov Today* **2004**, 9 (10), 430–431. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(04\)03069-7](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03069-7).
- (152) Pace, C. N.; Horn, G.; Hebert, E. J.; Bechert, J.; Shaw, K.; Urbanikova, L.; Scholtz, J. M.; Sevcik, J. Tyrosine Hydrogen Bonds Make a Large Contribution to Protein Stability. *J Mol Biol* **2001**, 312 (2), 393–404. <https://doi.org/10.1006/JMBI.2001.4956>.
- (153) Xue, W.; Yang, F.; Wang, P.; Zheng, G.; Chen, Y.; Yao, X.; Zhu, F. What Contributes to Serotonin-Norepinephrine Reuptake Inhibitors' Dual-Targeting Mechanism? The Key Role of Transmembrane Domain 6 in Human Serotonin and Norepinephrine Transporters Revealed by Molecular Dynamics Simulation. *ACS Chem Neurosci* **2018**, 9 (5), 1128–1140. https://doi.org/10.1021/ACSCHEMNEURO.7B00490/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CN-2017-00490A_M001.GIF.
- (154) Vuppalachchi, R.; Hayashi, P. H.; Chalasani, N.; Fontana, R. J.; Bonkovsky, H.; Saxena, R.; Kleiner, D.; Hoofnagle, J. H. Duloxetine Hepatotoxicity: A Case-Series from the Drug-Induced Liver Injury Network. *Aliment Pharmacol Ther* **2010**, 32 (9), 1174. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2036.2010.04449.X>.
- (155) Fischer, F.; Vonderlin, N.; Seyler, C.; Zitron, E.; Schernus, B.; Katus, H.; Scholz, E. Acute and Subacute Effects of the Selective Serotonin-Noradrenaline Reuptake Inhibitor Duloxetine on Cardiac HERG Channels. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **2013**, 386 (9), 795–804. <https://doi.org/10.1007/S00210-013-0878-8>.

- (156) Jaramillo, D. N.; Millán, D.; Guevara-Pulido, J. Design, Synthesis and Cytotoxic Evaluation of a Selective Serotonin Reuptake Inhibitor (SSRI) by Virtual Screening. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2023**, *183*, 106403. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2023.106403>.

10. Índice de Figuras

Figura 1 Evolución de agregados proteicos en la EA.	3
Figura 3 Vías de procesamiento de la APP	5
Figura 4 Estructura tridimensional de la GS PDB:7D8X	6
Figura 5 Proteólisis de C99 por la γ -secretasa	8
Figura 6 Interacción de la subunidad catalítica PS con moléculas pequeñas	10
Figura 7 Metodología general	15
Figura 8 Análisis por ventanas de HELANAL	20
Figura 9 Evolución temporal de γ -secretasa	27
Figura 10 Análisis de RMSF	29
Figura 11 Análisis de estructura secundaria	30
Figura 12 Ángulos de inclinación de las hélices transmembranales	31
Figura 13 Caracterización del sitio alostérico	33
Figura 14 Análisis de múltiples GSM	35
Figura 15 Variaciones del anillo de imidazol de E2012	36
Figura 16 Variaciones del anillo de metoxifenilo	37
Figura 17 Interacción GS-Tspan	39
Figura 18 RMSD de las simulaciones en grano grueso.	41
Figura 19 Ángulos de inclinación de las hélices transmembranales del complejo GS-Tspan6	42
Figura 20 Contactos entre la Tspan6 y la GS	43
Figura 21 Incremento en el número de contactos en la Tspan6	44

11. Índice de Tablas

Tabla 1 Simulaciones atomísticas	17
Tabla 2 Simulaciones de grano grueso	24
Tabla 3 Comparación de propiedades ADMETox	38

12. Índice de Abreviaturas

A

APH1 Faringe anterior defectuosa	6
APP Proteína precursora de amiloide	4
A β Péptidos β -amiloides	2

D

DM Dinámica molecular	11
-----------------------------	----

E

EA Enfermedad de Alzheimer	2
END Enfermedades neurodegenerativas	1

G

GS γ -secretasa GS,	5
GSI Inhibidores de γ -secretasa	9

N

NCST Nicastrina	6
-----------------------	---

P

PEN2 Potenciador de Presenilina 2	6
PhIm Grupo fenilimidazol	9
pLDDT diferencia de distancia local predicha	23
POPC 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina	16
PS Presenilina	6

R

RMSD	
desviación cuadrática media	18
RMSF	

fluctuación cuadrática media 19

T

TM Hélice transmembranal 6