



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

Caracterización estructural y dinámica de la enzima  $\gamma$ -secretasa relacionada con la enfermedad de Alzheimer

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. en C. Rodrigo Aguayo Ortiz

Dra. Laura Domínguez Dueñas  
Departamento de Físicoquímica, Facultad de Química, UNAM

Ciudad de México, marzo de 2019



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.

---

---

## **JURADO ASIGNADO**

<b>Presidente</b>	Dra. Adela Rodríguez Romero	Instituto de Química, UNAM
<b>Vocal</b>	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres	Facultad de Química, UNAM
<b>Vocal</b>	Dr. Arturo Rojo Domínguez	UAM-Cuajimalpa
<b>Vocal</b>	Dr. Martín González Andrade	Facultad de Medicina, UNAM
<b>Secretario</b>	Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig	Instituto de Química, UNAM

## **COMITÉ TUTOR DE EVALUACIÓN SEMESTRAL**

Dra. Laura Domínguez Dueñas	Departamento de Físicoquímica, Facultad de Química, UNAM
Dr. Fernando Cortés Guzmán	Departamento de Físicoquímica, Instituto de Química, UNAM
Dr. Arturo Rojo Domínguez	Departamento de Ciencias Naturales, UAM Cuajimalpa

## **LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA**

El presente trabajo de tesis se realizó en el Cubículo 230 del Edificio F, Facultad de Química de Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección de la Dra. Laura Dominguez. Los cálculos computacionales se llevaron a cabo en la supercomputadora HP Cluster Platform 3000SL "Miztli".

---

Parte de este proyecto se presentó en los siguientes congresos:

- “Caracterización estructural y dinámica de la enzima  $\gamma$ -secretasa, relacionada con la enfermedad de Alzheimer”. Presentación oral. XV Reunión Mexicana de Físicoquímica Teórica, celebrada en la Ciudad de Mérida, Yuc. México, los días 17 al 19 de noviembre de 2016.
- “Characterizing the structural ensemble of  $\gamma$ -secretase using a multiscale molecular dynamics approach”. Presentación oral y Cartel. Premio al mejor cartel. 6° Congreso de la Rama de Físicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas, Edición 2017, celebrado en la Ciudad de Durango, Durango los días 06 al 10 de noviembre de 2017.
- “Predicting the effects of congenial mutations and the epigallocatechin gallate binding site on human  $\gamma$ D-crystallin employing alchemical free energy calculations”. Cartel. - Cuarto Simposio de Tendencias actuales en la búsqueda y desarrollo de fármacos, celebrado en el vestíbulo del Auditorio A de la Facultad de Química de la UNAM, Cd. Mx., el 14 de junio de 2018.

Los resultados de esta tesis dieron lugar a las siguientes publicaciones:

- Aguayo-Ortiz, R; Dominguez, L. “Generation of amyloid- $\beta$  peptides by  $\gamma$ -secretase”. *Israel Journal of Chemistry, Special Issue*, 2017, 57: 574-585. (doi: 10.1002/ijch.201600073)
- Aguayo-Ortiz, R; Chávez-García, C; Straub, JE; Dominguez, L. “Characterizing the structural ensemble of  $\gamma$ -secretase using a multiscale molecular dynamics approach”. *RSC Chemical Science*, 2017, 8: 5576-5584. (doi: 10.1039/c7sc00980a)
- Aguayo-Ortiz, R and Dominguez, L. “Simulating the  $\gamma$ -secretase enzyme: recent advances and future directions”. *Biochimie*, 2018, 147: 130-135. (doi: 10.1016/j.biochi.2018.01.007)
- Aguayo-Ortiz, R; Straub, JE; Dominguez, L. “Influence of membrane lipid composition on the structure and activity of  $\gamma$ -secretase”. *RSC Physical Chemistry Chemical Physics*, 2018, 20: 27294-27304. (doi: 10.1039/c8cp04138e)
- Chávez-García, C; Aguayo-Ortiz, R; Dominguez, L. “Quantifying correlations between mutational sites in the catalytic subunit of  $\gamma$ -secretase”. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2019, 88: 221-227. (doi: 10.1016/j.jmgm.2019.02.002)

Durante la estancia doctoral se participó en la elaboración de siguientes publicaciones relacionadas con el uso de métodos computacionales:

- Aguayo-Ortiz, R; Fernández-de Gortari, E. CHAPTER 2: Overview of Computer-Aided Drug Design for Epigenetic Targets. Editor: José L. Medina-Franco; Book: Epi-Informatics: Discovery and Development of Small Molecule Epigenetic Drugs and Probes Using Computational Approaches. Elsevier, 2016.

- 
- Aguayo-Ortiz, R\*; Cano-González, L\*; Hernández-Campos, A; Castillo, R; Dominguez, L. “Structure-based approaches for the design of benzimidazole-2-carbamate derivatives as tubulin polymerization inhibitors”. *Chemical Biology and Drug Design*, 2017, 90(1): 40-51. (doi: 10.1111/cbdd.12926)
  - Gutiérrez-Gutiérrez, F; Palomo-Ligas, L; Hernández-Hernández, JM; Pérez-Rangel, A; Aguayo-Ortiz, R; Hernández-Campos, A; Castillo, R; González-Pozos, S; Cortés-Zárate, R; Ramírez-Herrera, MA; Mendoza-Magaña, ML; Castillo-Romero, A. “Curcumin alters the cytoskeleton and microtubule organization on trophozoites of *Giardia lamblia*”. *Acta Tropica*, 2017, 172: 113-121. (doi: 10.1016/j.actatropica.2017)
  - Flores-Carrillo, P; Velázquez-López, JM; Aguayo-Ortiz, R; Hernández-Campos, A; Trejo-Soto, PJ; Yépez-Mulia, L; Castillo R. “Synthesis, antiprotozoal activity and chemoinformatic analysis of novel 2-(methylthio)-1*H*-benzimidazole-5-carboxamide derivatives: Identification of new selective giardicide and trichomonicide compounds”. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2017, 132: 211-220. (doi: 10.1016/j.ejmech.2017.05.058)
  - Aguayo-Ortiz, R; Meza-Cervantez, P; Castillo, R; Hernández-Campos, A; Dominguez, L; Yépez-Mulia, L. “Insights into the *Giardia intestinalis* enolase and Human Plasminogen interaction”. *RSC Molecular Biosystems*, 2017, 13: 2015-2023. (doi: 10.1039/c7mb00252a)
  - Guzmán-Ocampo, DC\*; Aguayo-Ortiz, R\*; Cano-González, L, Castillo, R; Hernández-Campos, A; Dominguez, L. “Effects of the protonation state of titratable residues and the presence of water molecules on the Nocodazole binding to  $\beta$ -tubulin”. *ChemMedChem*, 2018, 13: 20-24. (doi: 10.1002/cmdc.201700530)
  - López-Méndez, LJ; González-Méndez, I; Aguayo-Ortiz, R; Dominguez, L.; Alcaraz-Estrada, L; Guadarrama, P; Rojas-Aguirre, Y. “Synthesis of a poly(ester) dendritic  $\beta$ -cyclodextrin derivative by ‘click’ chemistry: Combining the best of two worlds for complexation enhancement”. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 184: 20-29. (doi: 10.1016/j.carbpol.2017.12.049)
  - Tabatabaei-Dakhili, SA; Aguayo-Ortiz, R; Dominguez, L; Velázquez-Martínez, CA. “Untying the knot of transcription factor druggability: molecular modeling study of FOXM1 inhibitors”. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2018, 80: 197-201. (doi: 10.1016/j.jmgm.2018.01.009)

---

---

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente a la Facultad de Química, por brindarme todas las herramientas necesarias para formarme en el ámbito profesional y personal.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría (No. de becario 288862). Asimismo, agradezco al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) y al Posgrado en Ciencias Químicas por el apoyo económico brindado para la asistencia a congresos e impresión de tesis.

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

A la Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC) de la UNAM, por el soporte recibido para el uso de la supercomputadora HP Cluster Platform 3000SL "Miztli" (LANCAD-UNAM-DGTIC-306).

A la Dra. Laura Domínguez Dueñas, por haberme permitido formar parte de su grupo de investigación, por el gran apoyo brindado durante la realización del proyecto y por todas las oportunidades que me otorgó para mi realización académica.

A Frida S. Herrera Vázquez, por todo el apoyo y comprensión que me otorgó durante los buenos y malos momentos que involucraron la elaboración de este trabajo.

A mis compañeros del cubículo, Cecilia García, Augusto J. González, Guillermo Goode, Dulce C. Guzmán, Alejandro Álvarez, Humberto T. Flores y Víctor Calvo, por todas las enseñanzas y los buenos momentos que compartimos.

A los miembros del comité tutor y jurado por sus valiosas correcciones y contribuciones al presente trabajo de tesis.

---

*A mis padres,  
hermanos  
y Frida*

Índice

<b>Abreviaturas y Acrónimos .....</b>	<b>4</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>6</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>6</b>
<b>I. Introducción.....</b>	<b>7</b>
<b>II. Antecedentes.....</b>	<b>8</b>
II.1. Enfermedades neurodegenerativas .....	8
II.2. Enfermedad de Alzheimer .....	9
II.2.1. Etiología y patología.....	10
II.3. El complejo de $\gamma$ -secretasa .....	13
II.3.1. Reconocimiento del sustrato .....	15
II.3.2. Internalización del sustrato al sitio activo .....	15
II.3.3. Mecanismo de acción de PS.....	16
II.3.4. Factores que modifican la actividad de $\gamma$ -secretasa.....	16
II.4. Simulaciones de dinámica molecular .....	21
II.4.1. Otros estudios de dinámica molecular de $\gamma$ -secretasa .....	21
<b>III. Planteamiento del problema .....</b>	<b>23</b>
<b>IV. Hipótesis.....</b>	<b>23</b>
<b>V. Objetivos .....</b>	<b>23</b>
V.1. Objetivo General .....	23
V.2. Objetivo Particulares .....	23
<b>VI. Análisis estructural de la enzima <math>\gamma</math>-secretasa.....</b>	<b>24</b>
VI.1. Metodología .....	24
VI.2. Resultados y Discusión .....	24
VI.2.1. Posible sitio de reconocimiento del sustrato y motivos glicosilables en NCT.....	29
VI.2.2. Descripción de los estados conformacionales de PS1 .....	30
VI.2.3. Comparación de APH-1A con GPCRs .....	31
VI.2.4. Predicción de la estructura de PEN-2 .....	32
<b>VII. Caracterización dinámica de la enzima <math>\gamma</math>-secretasa.....</b>	<b>33</b>
VII.1. Metodología .....	33
VII.1.1. Preparación de los modelos .....	33
VII.1.2. Simulaciones de dinámica molecular atomísticas (AA).....	34
VII.1.3. Simulaciones de dinámica molecular de grano grueso (CG) .....	34



VII.1.4. Muestreo de sombrilla.....	35
VII.2. Resultados y Discusión .....	36
VII.2.1. Estados conformacionales de PS1 .....	42
VII.2.2. Movimiento del dominio extracelular de NCT.....	45
VII.2.3. Formación de la cavidad de agua en APH-1A .....	47
<b>VIII. Sitio de reconocimiento del sustrato en el complejo de <math>\gamma</math>-secretasa.....</b>	<b>54</b>
VIII.1. Metodología .....	54
VIII.1.1. Preparación de los modelos .....	54
VIII.1.2. Acoplamiento molecular .....	55
VIII.1.3. Simulaciones de dinámica molecular de grano grueso enzima-sustrato.....	55
VIII.2. Resultados y Discusión .....	56
VIII.2.1. Reconocimiento de la región N-terminal de C99 y Notch-1 por NCT-ECD.....	57
VIII.2.2. Interacción de la región transmembranal de C99 y Notch-1 con GS-TM.....	58
VIII.2.3. Caracterización dinámica de la unión de C99 y Notch-1 a $\gamma$ -secretasa.....	59
<b>IX. Efecto de la composición de la membrana en la actividad de <math>\gamma</math>-secretasa.....</b>	<b>63</b>
IX.1. Metodología .....	63
IX.1.1. Simulaciones de dinámica molecular de grano grueso (CG) .....	63
IX.1.2. Simulaciones de dinámica molecular atomísticas (AA).....	64
IX.2. Resultados y Discusión .....	65
IX.2.1. Efecto de la carga del lípido en el ensamble y actividad de $\gamma$ -secretasa.....	65
IX.2.2. Influencia del grosor de la membrana en el ensamble conformacional de PS1.....	69
IX.2.3. Sitios de unión y efecto de la concentración de CHOL en $\gamma$ -secretasa.....	70
IX.2.4. NCT-ECD adopta la conformación compacta en la balsa lipídica.....	73
<b>X. Interacción del inhibidor DAPT con el sitio activo de PS1 .....</b>	<b>75</b>
X.1. Metodología .....	75
X.1.1. Cálculo de la energía de unión con FEP .....	75
X.2. Resultados y Discusión .....	78
X.2.1. Identificación del medio de interacción preferente de DAPT .....	78
X.2.2. Efecto de DAPT en la protonación de los residuos de aspártico catalíticos de PS1.....	79
X.2.3. Caracterización dinámica del complejo GS-DAPT.....	81
<b>XI. Efecto de mutaciones de <i>PSEN1</i> en la producción del péptido A<math>\beta</math> .....</b>	<b>84</b>
XI.1. Metodología .....	85
XI.2. Resultados y Discusión .....	86
<b>XII. Hallazgos importantes .....</b>	<b>90</b>

<b>XIII. Conclusiones</b> .....	<b>92</b>
<b>XIV. Perspectivas</b> .....	<b>93</b>
<b>XV. Referencias</b> .....	<b>94</b>
<b>XVI.1. Apéndice I</b> .....	<b>107</b>
<b>XVI.2. Apéndice II</b> .....	<b>109</b>
<b>XVI.3. Apéndice III</b> .....	<b>112</b>
XVI.3.1. Estados conformacionales de PS1.....	112
XVI.3.2. Movimiento del domino extracelular de NCT.....	116
XVI.3.3. Formación de la cavidad de agua en APH-1A.....	117
<b>XVI.4. Apéndice IV</b> .....	<b>123</b>
<b>XVI.5. Apéndice V</b> .....	<b>127</b>
XVI.5.1. Efecto de la composición de la membrana.....	127
XVI.5.2. Interacción del inhibidor DAPT con el sitio activo de PS1.....	134
XVI.5.3. Efecto de las mutaciones de PSEN1 en la producción de péptido A $\beta$ .....	137
<b>XVI.6. Apéndice VI</b> .....	<b>138</b>
XVI.6.1. Métodos alquímicos para el cálculo de la energía libre.....	138
<i>XVI.6.1.1. Método de perturbación de la energía libre al equilibrio</i> .....	139
<i>XVI.6.1.2. Método de Crooks al no equilibrio</i> .....	140
<i>XVI.6.1.3. Potencial de núcleo blando</i> .....	141
<i>XVI.6.1.4. Parámetros para el cálculo de energía libre</i> .....	141
XVI.6.2. Predicción de la estabilidad termodinámica en proteínas solubles y membranales.....	142
<i>XVI.6.2.1. Cristalina <math>\gamma</math>D de humano</i> .....	142
<i>XVI.6.2.2. Proteínas de barril <math>\beta</math> de la membrana externa de E. coli</i> .....	148
<i>XVI.6.2.3. Proteasa romboidal GlpG de E. coli</i> .....	155
<b>XVI.7. Apéndice VII</b> .....	<b>160</b>

## Abreviaturas y Acrónimos

Aβ <sub>n</sub>	Péptido β-amiloide de <i>n</i> aminoácidos	DPPC	1,2-Dipalmitoil-fosfatidilcolina
aa	Aminoácido	DSPC	1,2-Disteroil-fosfatidilcolina
AA	Todos los átomos	E1	Estado 1 (inactivo)
nAChR	Receptor de acetilcolina	E2	Estado 2 (activo)
ADAM	Proteína con dominios desintegrina y metaloproteinasas	EC	Extracelular
AICD	Dominio Intracelular de APP	ECD	Dominio extracelular
AMPC	Adenosín monofosfato cíclico	EcGlpG	Serín proteasa romboidal GlpG intramembranal de <i>Escherichia coli</i>
AMPA	Receptor del ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolopropiónico	EcOmp	Proteína de la membrana externa de <i>Escherichia coli</i>
APH-1	Faringe anterior-defectuoso 1	EROs	Especies Reactivas de Oxígeno
APP	Proteína precursora amiloide	FAD	Enfermedad de Alzheimer familiar
sAPP	Fragmento soluble de APP	FEP	Perturbación de la energía libre
Asp <sup>-</sup>	Aspartato	FO	Factor de ocupación
Asp-H	Ácido aspártico	GPCR	Receptor acoplado a proteína G
BACE1	Enzima que corta a APP en el sitio β ( )	GS-C99	Complejo de γ-secretasa con C99
BS	Sitio de unión	GS-DAPT	Complejo de γ-secretasa con DAPT
PDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro	GS-TM	Región transmembranal de γ-secretasa
C83	Fragmento C-terminal de 83 aminoácidos de APP	GSI	Inhibidor de γ-secretasa
C99	Fragmento C-terminal de 99 aminoácidos de APP	GSK3	Glucógeno sintasa cinasa 3
CaM	Calmodulina	GSM	Modulador de γ-secretasa
CaMKII	Proteína cinasa dependiente de Ca <sup>2+</sup> /Calmodulina II	GSMbs	Sitio de unión de GSMs
CBS	Sitio de unión de colesterol	HB	Puente de hidrógeno
CDK5	Cinasa dependiente de ciclina 5	HL1	Asa hidrofílica 1
CG	Grano grueso	HsCRYGD	Cristalina γD de <i>Homo sapiens</i>
CHOL	Colesterol	HY	Hélice yuxtamembranal
CREB	Elemento de respuesta a cAMP	IC	Intracelular
Crio-EM	Criomicroscopía electrónica	I <sub>TM</sub>	Ángulo de inclinación de la TM respecto al vector normal de la membrana
CT	Segmento carboxilo terminal	IH	Índice de hidropatía
CTF	Fragmento C-terminal	KAr	Receptor de kainato
D <sub>max</sub>	Distancia máxima del complejo	LBS	Sitio de unión de lípidos
dd <sub>Asp</sub>	Distancia entre los aspárticos catalíticos	μH	Momento hidrofóbico
DGPC	1,2-Digondoil-fosfatidilcolina	MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
DLP	Depresión a largo plazo	MBAR	Índice de aceptación multiestado de Bennett
DLPC	1,2-Dilauril-fosfatidilcolina	MD	Dinámica molecular
MI	Monocapa inferior	POPE	1-Palmitoil-2-oleil-fosfatidiletanolamina

### Abreviaturas y Acrónimos

MS	Monocapa superior	POPC	1-Palmitoil-2-oleil-fosfatidilcolina
NCT	Nicestrina	PS	Presenilina
NMDAR	Receptor de <i>N</i> -metil-D-aspartato	PP1	Proteína fosfatasa 1
NPT	Ensamble isotérmico-isobárico	RMSD	Raíz de la desviación cuadrática media
NT	Segmento amino terminal	RMSF	Raíz de la fluctuación cuadrática media
NTF	Fragmento N-terminal	SBS	Sitio de unión del sustrato
NVT	Ensamble canónico	sc	Núcleo blando
Omp	Proteína de la membrana externa	SCAM	Método de accesibilidad por sustitución de cisteínas
OMS	Organización Mundial de la Salud	SE	Sitio de entrada al sitio activo
OPM	<i>Orientation of Proteins in Membranes</i>	SED	Sitio de entrada de DAPT al sitio activo
PC	Fosfatidilcolina	SNP	Polimorfismos de un solo nucleótido
PCA	Análisis de componentes principales	T <sub>m</sub>	Temperatura de fusión
PDB	<i>Protein Data Bank</i>	TM	Hélice transmembranal
PEN-2	Potenciador de presenilina 2	TrkBr	Receptor de tirosina cinasa B
PLP	Potenciación a largo plazo	US	Muestreo de sombrilla
PME	Partícula en la malla de Ewald	VGCC	Canales de calcio dependientes de voltaje
PMF	Potencial de fuerza media	WHAM	Análisis de histogramas ponderados
POPA	1-Palmitoil-2-oleil-fosfato	WT	Silvestre

## Resumen

La enfermedad de Alzheimer es un desorden neurodegenerativo que causa pérdida de memoria y deterioro de las funciones cognitivas. A la fecha, no existe un tratamiento eficiente para esta condición. El desarrollo de la enfermedad de Alzheimer ha sido relacionado principalmente con la formación de placas amiloides en el cerebro de los pacientes. Las placas amiloides se forman a partir de la oligomerización y acumulación aberrante de péptidos  $\beta$ -amiloides de 42 aminoácidos ( $A\beta_{42}$ ). El péptido  $A\beta_{42}$  se genera del procesamiento endoproteolítico del péptido precursor amiloide (APP) por la aspartil proteasa intramembranal de cuatro componentes llamada  $\gamma$ -secretasa. Se han realizado avances importantes en los estudios estructurales de este complejo proteico en busca de un tratamiento de la enfermedad. Sin embargo, los detalles del mecanismo de activación y los factores que afectan su función proteolítica siguen sin conocerse. En este trabajo, se emplearon diferentes enfoques de modelado computacional multiescala para caracterizar el ensamble estructural y el mecanismo de activación de la enzima. Además, se estudió el efecto en la actividad de (1) variaciones en la composición de la bicapa lipídica, (2) agentes externos que inhiben la función proteolítica y (3) mutaciones en el componente catalítico. En general, este estudio provee información estructural y dinámica valiosa acerca de la activación y función de la enzima  $\gamma$ -secretasa. Los resultados contribuirán a tener una mejor comprensión de la enzima para el desarrollo de nuevos tratamientos para la enfermedad de Alzheimer.

## Abstract

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disorder that causes memory loss and cognitive decline. To date, there is not an efficient treatment for this condition. Alzheimer's disease development has been associated primarily to the formation of amyloid plaques in patients' brain. Amyloid plaques are formed through the oligomerization and aberrant accumulation of amyloid- $\beta$  peptides of 42 amino acids ( $A\beta_{42}$ ).  $A\beta_{42}$  peptide is generated from the endoproteolytic processing of the amyloid precursor protein (APP) by the four-component membrane-embedded aspartyl protease called  $\gamma$ -secretase. Significant recent advances have been made in structural studies of this membrane protein complex seeking for a treatment of the disease. However, details of the mechanism of activation and factors that affect its proteolytic function remain unclear. In this work, different multiscale computational modeling approaches were employed to characterize the structural ensemble and activation mechanism of the enzyme. Furthermore, the effect of (1) variations in the bilayer lipid composition, (2) external agents that inhibit the proteolytic cleavage, and (3) mutations in the catalytic component were studied. Overall, this study provides valuable insight into the structure and dynamics in the activation and function of  $\gamma$ -secretase. The results will contribute to a better understanding of the enzyme for the development of novel Alzheimer's disease treatments.

## I. Introducción

La enfermedad de Alzheimer es la forma más común de demencia progresiva en adultos mayores, la cual se caracteriza por el deterioro del sistema nervioso y la pérdida de las funciones cognitivas. En el año 2017 se reportó que más del 9.18 % del total de las muertes en adultos mayores en México fueron causadas por este y otros padecimientos neurodegenerativos. Actualmente, no existe un tratamiento eficiente para detener o revertir el deterioro de esta enfermedad.

El desarrollo de la enfermedad de Alzheimer se ha relacionado con la acumulación de agregados tóxicos de la proteína  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) en el cerebro. El mecanismo de generación del péptido  $A\beta$  involucra el procesamiento proteolítico de la proteína precursora amiloide (APP) en dos pasos. El primer paso involucra el corte en la región extracelular de APP por la proteína  $\beta$ -secretasa, lo que genera un péptido intramembranal de 99 aminoácidos (C99) pertenecientes a la región C-terminal de APP. En el segundo paso, C99 es escindida en su región transmembranal por el complejo enzimático de  $\gamma$ -secretasa, dando lugar a la formación de los péptidos  $A\beta$ . Dado que la enzima  $\gamma$ -secretasa no es muy precisa, normalmente se generan péptidos  $A\beta$  de diferentes longitudes. La isoforma más común en individuos sanos es el péptido  $A\beta$  de 40 aminoácidos ( $A\beta_{40}$ ). Sin embargo, las personas que padecen la enfermedad producen una mayor proporción de la isoforma  $A\beta_{42}$  sobre  $A\beta_{40}$ , siendo la primera isoforma más tóxica y propensa a agregarse. Los factores que determinan las variaciones en el proceso de corte de la  $\gamma$ -secretasa no han sido determinadas, aunque se ha propuesto que mutaciones, variaciones en la composición de la membrana y agentes externos inciden en la producción de los diferentes fragmentos de  $A\beta$ .

La enzima  $\gamma$ -secretasa es una aspartil proteasa intramembranal que procesa más de 80 proteínas sustrato en su región transmembranal. Este complejo enzimático está constituido por cuatro componentes: (1) presenilina 1 (*presenilin*, PS1), (2) potenciador de presenilina 2 (*presenilin enhacer 2*, PEN-2), (3) *faringe anterior-defectuoso 1* (*anterior pharynx-defective 1*, APH-1) y (4) nicastrina (*nicastrin*, NCT). El componente PS1 es la subunidad catalítica con actividad de aspartil proteasa constituida por nueve hélices transmembranales (TMs), encontrándose los residuos de aspártico catalíticos en la región intramembranal de la sexta y séptima TMs. Las subunidades PEN-2 y APH-1A facilitan la maduración y estabilización de PS1 en el complejo. Finalmente, el componente NCT es una glicoproteína transmembranal de tipo I cuyo dominio extracelular (ECD) podría ser el responsable del reclutamiento de sustrato para su internalización al sitio activo de PS1.

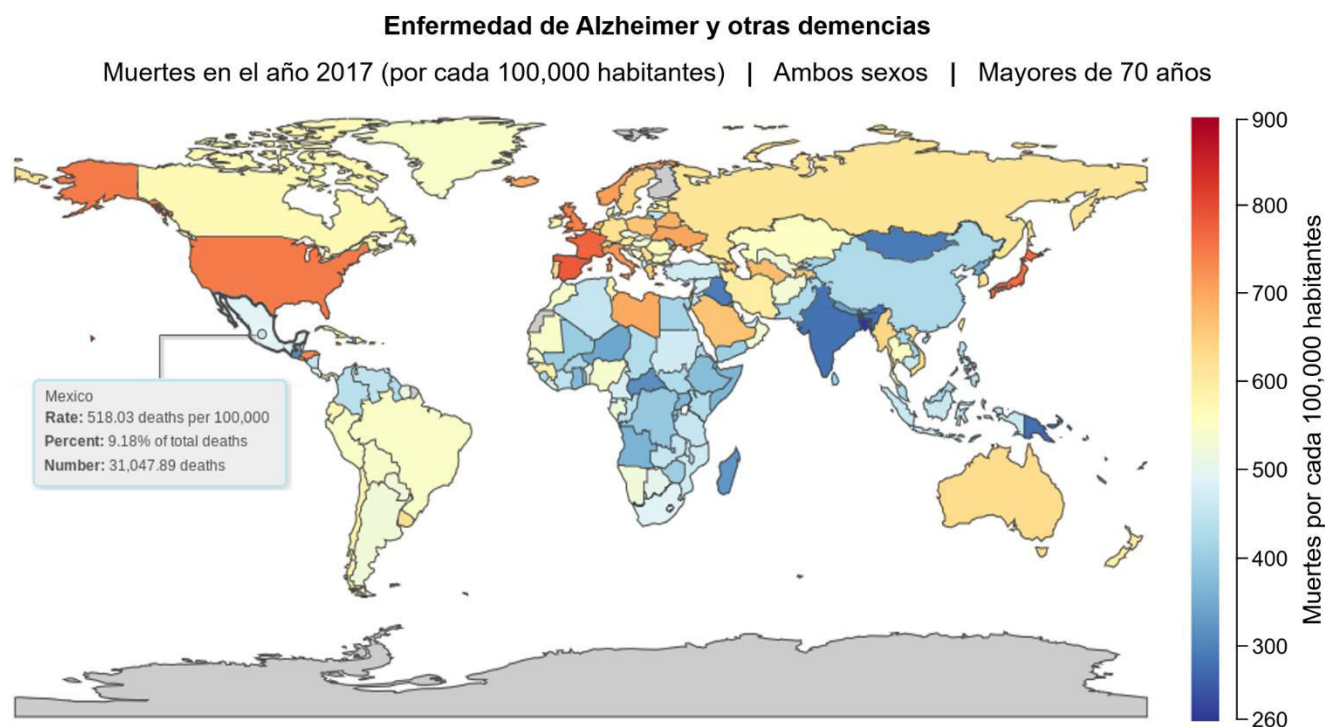
A pesar de los grandes avances en el conocimiento de la estructura y función de la enzima  $\gamma$ -secretasa, la información experimental es aún insuficiente para determinar el comportamiento dinámico del complejo. Es por lo anterior que, en este trabajo de investigación, se llevó a cabo la caracterización estructural y dinámica del complejo enzimático de  $\gamma$ -secretasa. El estudio describe el ensamble estructural del complejo y su comportamiento dinámico, mediante el empleo de metodologías de dinámica molecular multiescala. Además, se reportan los posibles sitios de reconocimiento inicial del sustrato C99 y la influencia de factores que afectan su actividad proteolítica, dentro de los que se encuentran: (1) diferentes composiciones de lípidos en la membrana, (2) presencia del inhibidor DAPT en el sitio activo y (3) mutaciones en la secuencia de la subunidad catalítica de PS1. La información generada a partir de este estudio permitirá tener una mejor comprensión del comportamiento dinámico del complejo de  $\gamma$ -secretasa y para que posteriormente pueda emplearse en el diseño de nuevos fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

## II. Antecedentes

### II.1. Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas son un conjunto multifactorial de padecimientos que se caracterizan por el deterioro progresivo de la estructura y función del sistema nervioso central o periférico.<sup>1</sup> Este deterioro involucra la disrupción crónica de vías de señalización a nivel de neuronas, resultando en alteraciones de las funciones cognitivas o locomotoras.<sup>2</sup> En la actualidad, las enfermedades de Alzheimer, Parkinson, Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica son algunos de los padecimientos neurodegenerativos de mayor importancia a nivel mundial.<sup>3</sup> Existen diferentes factores ambientales, genéticos y relacionados a la edad que se asocian a la aparición y progresión de estas patologías, dentro de los que se encuentran: agregación de proteínas, modificaciones postraduccionales desreguladas, disfunción mitocondrial, aumento en las especies reactivas de oxígeno (EROs), aumento en la concentración de metales y muerte neuronal.<sup>4</sup>

Las demencias son el grupo de trastornos neurodegenerativos más recurrentes a nivel mundial causados por diversas afecciones genéticas, de la edad o lesiones cerebrovasculares. Dentro de este grupo de padecimientos se encuentra la enfermedad de Alzheimer, la cual se caracteriza por el deterioro de funciones como la memoria, la capacidad de aprendizaje, el pensamiento, la orientación, la comunicación, entre otros.<sup>5</sup> La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el número de personas con demencia irá en aumento debido al incremento en el índice de esperanza de vida en países desarrollados y en vías de desarrollo.<sup>6</sup> En concordancia, en el año 2017 el 8.72 % de las muertes a nivel mundial se asoció a personas que padecían la enfermedad de Alzheimer u otra demencia.<sup>7,8</sup> En ese mismo año, México reportó que el 9.18 % del total de las muertes (31,048 casos) de adultos mayores de 70 años fueron ocasionadas por estos trastornos (*Figura 2.1*).



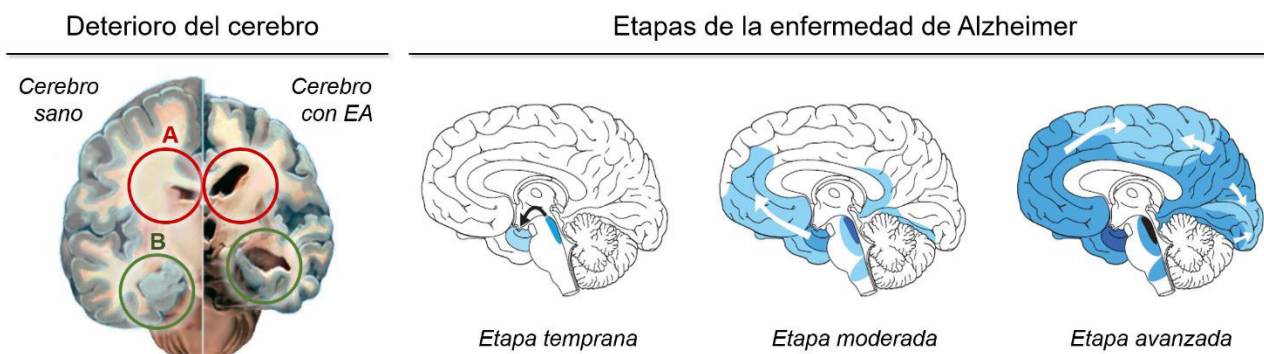
**Figura 2.1.** Distribución y número de muertes a nivel mundial causadas por la enfermedad de Alzheimer y otras demencias en el año 2017. Imagen generada con el servidor *GBD Compare* del *Institute for Health, Metrics and Evaluation* (IHME).<sup>7,8</sup>

II.2. Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es la forma más común de demencia crónica asociada a la pérdida de memoria y al deterioro progresivo de las habilidades cognitivas. El primer caso clínico fue reportado en 1906 por el psiquiatra alemán Alois Alzheimer, al cual debe su nombre esta enfermedad.<sup>9</sup> En ese estudio, el Dr. Alzheimer reportó el caso de una mujer de 51 años con un tipo de demencia temprana, la cual describió con base en las alteraciones histopatológicas observadas en el cerebro de la paciente durante su evaluación *post mortem*.<sup>10</sup>

La pérdida de tejido nervioso en el cerebro es una de las principales características fisiopatológicas de las personas que padecen esta enfermedad, lo que conlleva a un aumento en el diámetro de los ventrículos cerebrales y a la reducción del hipocampo y de la corteza del encéfalo (*Figura 2.2*).<sup>11,12</sup> Este deterioro progresivo del cerebro es concomitante con la pérdida de funciones cognitivas, cuyo avance suele describirse a partir de un modelo de tres etapas preclínicas y tres etapas clínicas. En las etapas preclínicas el padecimiento es asintomático, pero se puede definir por (1) el inicio de la agregación de proteínas en el cerebro, (2) adelgazamiento de la corteza cerebral o atrofia del hipocampo y (3) evidencia de cambios sutiles en la resolución de pruebas cognitivas.<sup>13</sup> Por su parte, las etapas clínicas se describen de acuerdo con el grado en el que el paciente ha perdido la capacidad para abordar tareas cotidianas (*Figura 2.2*),<sup>10-12,14</sup> por lo que se dividen en:

- *Etapa temprana*: el paciente presenta problemas para recordar el lugar donde dejó un objeto, palabras o nombres durante una conversación, y se le dificulta planear y organizar tareas. Las pruebas psicológicas son cruciales para el diagnóstico de la enfermedad en esta etapa.
- *Etapa moderada*: los síntomas de la enfermedad son más evidentes y el paciente requiere de ayuda con las actividades cotidianas, presenta problemas para resolver cálculos aritméticos simples, olvida historias personales, tiene una memoria a corto plazo deficiente, presenta dificultad para hablar o entender y suele tener periodos de confusión.
- *Etapa avanzada*: el paciente presenta cambios severos en la personalidad y en el estado de ánimo debido a la incapacidad de reconocer lugares o personas. Requiere de asistencia para realizar tareas cotidianas y actividades de aseo personal, con pérdida del control intestinal y de la vejiga. Asimismo, se observa un déficit de atención y problemas para recordar detalles personales. En la fase terminal de esta etapa de la enfermedad, el individuo es incapaz de responder a estímulos externos.



**Figura 2.2.** Representación (A) del aumento en los ventrículos cerebrales y la reducción del (B) hipocampo y de la corteza del encéfalo (contorno azul) de un corte coronal del cerebro de una persona con la enfermedad de Alzheimer (EA), y zonas del cerebro afectadas en las etapas temprana, moderada y avanzada de este padecimiento.<sup>11,12</sup>



### II.2.1. Etiología y patología

A la fecha, se han propuesto un gran número de teorías que buscan explicar la causalidad del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, dentro de las cuales se encuentran: alteraciones por envejecimiento, factores genéticos, afecciones cerebrovasculares, neurodegeneración, neuroinflamación, alimentación (ej. toxicidad por aluminio), forma de vida y factores ambientales. Estas teorías se han originado a partir de estudios patológicos que relacionan la aparición de la enfermedad con la agregación de proteínas, procesos inflamatorios, distrofia neuronal, estrés oxidante y reducción en los niveles del neurotransmisor acetilcolina.<sup>15</sup>

Al igual que otros trastornos neurodegenerativos, el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer se ha asociado primordialmente a la agregación de proteínas en el cerebro, en este caso, por (1) la formación de ovillos neurofibrilares intracelulares y (2) la presencia de placas  $\beta$ -amiloides en la región extracelular (*Figura 2.3*).<sup>16</sup> El estudio de estos agregados proteicos ha permitido plantear dos principales hipótesis que explican la aparición y progresión de la enfermedad, las cuales son:

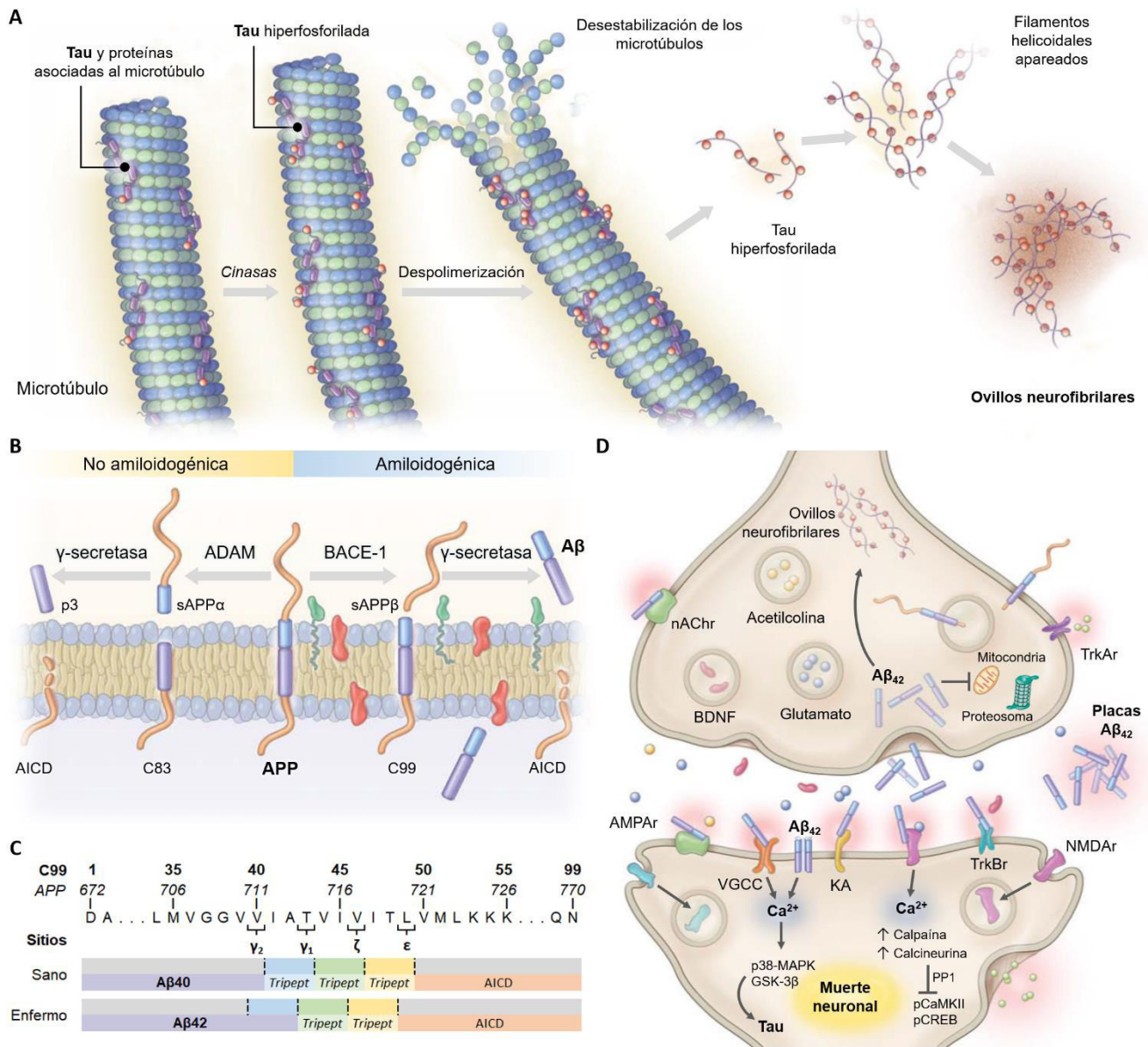
#### (a) Hipótesis de Tau

La proteína Tau ( $\tau$ ) está asociada a microtúbulos que permite mantener el equilibrio dinámico de polimerización/despolimerización de los heterodímeros de  $\alpha/\beta$ -tubulina, los cuales son componentes esenciales en el mantenimiento, transporte y división celular (*Figura 2.3A*). Los procesos neurodegenerativos involucran la desregulación de cinasas que hiperfosforilan a Tau (ej. p38-MAPK, GSK-3 $\beta$ , CDK5), lo cual resulta en su disociación de los microtúbulos y en la subsecuente desestabilización y despolimerización de estos. La proteína Tau hiperfosforilada libre se oligomeriza en filamentos helicoidales apareados, para finalmente agregarse y formar los llamados ovillos neurofibrilares. Estos agregados se acumulan paulatinamente en el espacio intracelular de la neurona hasta llevarla a apoptosis.<sup>17,18</sup>

#### (b) Hipótesis de la cascada amiloidogénica

Las placas  $\beta$ -amiloides en el cerebro se generan por la oligomerización y agregación aberrante del péptido  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ).<sup>19,20</sup> Este péptido se produce a partir de cortes secuenciales de la proteína precursora amiloide (APP, por sus siglas en inglés) en su región extracelular e intramembranal.<sup>21</sup> Dependiendo de las enzimas involucradas, APP puede ser procesada por una vía no amiloidogénica o amiloidogénica (*Figura 2.3B*). En la primera vía, APP es proteolizada por la enzima  $\alpha$ -secretasa (*' $\alpha$  disintegrin and metalloproteinase domain'*, ADAM9/10/17) que produce un fragmento N-terminal soluble (sAPP $\alpha$ ) y un fragmento C-terminal intramembranal de 83 aminoácidos (C83).<sup>22</sup> Mientras que sAPP $\alpha$  es liberado para realizar funciones neuroprotectoras, el péptido C83 es procesado por la enzima  $\gamma$ -secretasa para generar un dominio intracelular de APP (AICD, por sus siglas en inglés), que cumple funciones de señalización a nivel del núcleo celular, y un péptido N-terminal soluble no amiloidogénico con propiedades neuroprotectoras (p3).<sup>23,24</sup>

La segunda vía involucra un paso inicial de procesamiento de APP por la enzima  $\beta$ -secretasa ( *$\beta$ -site APP-cleaving enzyme 1*, BACE1) para producir un fragmento N-terminal soluble (sAPP $\beta$ ) y un fragmento C-terminal de 99 aminoácidos (C99).<sup>25</sup> Finalmente, el péptido C99 es escindido en la región intramembranal por la enzima  $\gamma$ -secretasa para liberar al segmento AICD y al péptido A $\beta$ .



**Figura 2.3.** Agregación de la proteína tau y del péptido β-amiloide (Aβ). (A) La hiperfosforilación de la proteína Tau por cinasas promueve la desestabilización y despolimerización de los heterodímeros de α/β-tubulina de los microtúbulos. La proteína Tau hiperfosforilada se asocia en filamentos helicoidales apareados para finalmente agregarse y formar los ovillos neurofibrilares. (B) Liberación de ectodominios y proteólisis secuencial intramembranal de la proteína precursora amiloide (APP) por las enzimas ADAM (α-secretasa), BACE-1 (β-secretasa) y γ-secretasa implicadas en las vías amiloidogénica y no amiloidogénica. (C) Representación de los sitios alternativos de corte ε, ζ y γ de la enzima γ-secretasa que conducen a la formación de diferentes productos del péptido Aβ. (D) Disfunción sináptica asociada a la modulación de receptores y canales postsinápticos por su interacción con monómeros y oligómeros del péptido Aβ42 y la presencia de la placa β-amiloide. El influjo desregulado de iones Ca<sup>2+</sup> a la neurona postsináptica promueve la activación de cinasas (p38-MAPK, GSK-3β, CDK5) y otras proteínas dependientes de calcio (calpaína y calcineurina) que alteran la acción de proteínas involucradas en el mantenimiento y supervivencia de la neurona (pCaMKII y pCREB).<sup>26</sup>

Para la producción del péptido Aβ, la enzima γ-secretasa procesa de forma secuencial a C99 en cuatro sitios de corte: ε, ζ, γ<sub>1</sub> y γ<sub>2</sub> (Figura 2.3C).<sup>27</sup> El primer corte de la enzima ocurre entre los residuos Leu49 y Val50 (sitio ε)

para generar un péptido A $\beta$  de 49 aminoácidos (A $\beta$ 49) y liberar al fragmento AICD. El producto A $\beta$ 49 es posteriormente procesado entre los residuos Val46 e Ile47 (sitio  $\zeta$ ) para generar al péptido A $\beta$ 46 y a un tripéptido C-terminal (Ile47-Thr48-Leu49). Finalmente, A $\beta$ 46 es escindido en el sitio  $\gamma_1$  (Thr43-Val44) o  $\gamma_1$  y  $\gamma_2$  (Val40-Ile41) para producir los péptidos A $\beta$ 43 o A $\beta$ 40, respectivamente.<sup>28</sup> Sin embargo, el procesamiento inicial de  $\gamma$ -secretasa puede presentar un error de corte al desfasarse un solo aminoácido en el sitio  $\epsilon$  (Thr48-Leu49), llevando a la formación de los productos A $\beta$ 38 y A $\beta$ 42. Actualmente, se sabe que A $\beta$ 42 es el péptido más propenso a formar oligómeros y agregados, y que el aumento en la proporción de A $\beta$ 42 sobre A $\beta$ 40 es la causa principal del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.<sup>29</sup> Además, se ha demostrado que los oligómeros solubles de A $\beta$ 42 son los principales agentes implicados en la disrupción de la comunicación sináptica, debido a su interacción con receptores postsinápticos, a la formación de canales iónicos de barril  $\beta$  y a su agregación en placas.<sup>30-32</sup> En conjunto, estos mecanismos explican la alta toxicidad de los oligómeros A $\beta$ 42 en la plasticidad neuronal.<sup>33-35</sup>

La plasticidad neuronal es un proceso continuo que permite la reorganización del estímulo sináptico en periodos de corto, mediano o largo plazo.<sup>36</sup> Para la memoria y el aprendizaje, el hipocampo requiere una potenciación a largo plazo (PLP), la cual resulta de una transmisión sináptica excitadora mediada por los receptores ionotrópicos de NMDA (*N*-metil-D-aspartato), AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato) y KA (kainato).<sup>37</sup> La activación de estos receptores por el neurotransmisor glutamato estimula el proceso de despolimerización de la neurona postsináptica vía el influjo de iones  $\text{Ca}^{2+}$  (NMDAr) y  $\text{Na}^+$  (AMPAr y KA).<sup>38</sup> El aumento en la concentración intracelular de iones  $\text{Ca}^{2+}$  promueve su asociación con la calmodulina (CaM), proteína involucrada en la activación de la proteína cinasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina II (CaMKII).<sup>39</sup> Este proceso permite que la CaMKII se autofosforile (pCaMKII) y regule la fosforilación del factor de transcripción CREB (*cAMP response element-binding*), el cual se encarga de sintetizar proteínas relacionadas con la plasticidad sináptica a largo plazo.<sup>40</sup>

En el caso de las personas que padecen la enfermedad de Alzheimer (*Figura 2.3D*), existe un influjo constante de iones  $\text{Ca}^{2+}$  en la neurona postsináptica debido a la formación de los canales iónicos de barril  $\beta$  y a la interacción de los oligómeros del péptido A $\beta$ 42 con NMDAr y con canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC).<sup>26</sup> El influjo sostenido de iones  $\text{Ca}^{2+}$  induce una activación desregulada de cinasas (ej. p38-MAPK), fosfatasa (ej. calcineurina) y proteasas (ej. calpaína) que alteran la plasticidad de la neurona.<sup>41</sup> Uno de los casos más importantes es el de la activación de la calcineurina, la cual es una fosfatasa dependiente de calcio que cataliza la desfosforilación de pCaMKII y pCREB vía la activación de la proteína fosfatasa 1 (PP1).<sup>42-45</sup> Esto último resulta en la reducción de la PLP y el subsecuente aumento en la depresión a largo plazo (DLP), promoviendo la internalización y degradación de los receptores NMDAr y AMPAr.<sup>46,47</sup> De forma paralela, la fosfatasa PP1 activa a la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3) que, al igual que otras cinasas, se encarga de fosforilar a la proteína Tau asociada a los microtúbulos.<sup>48-50</sup> Además, los oligómeros del péptido A $\beta$ 42 impiden la transducción de señales entre neuronas al bloquear la interacción del neurotransmisor acetilcolina con su receptor (nAChR), así como la del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) con el receptor de tirosina cinasa B (TrkB).<sup>51</sup> Estos procesos alteran funciones vitales del proteosoma y la mitocondria, resultando en un aumento de las EROs hasta culminar con la muerte neuronal.<sup>21</sup>

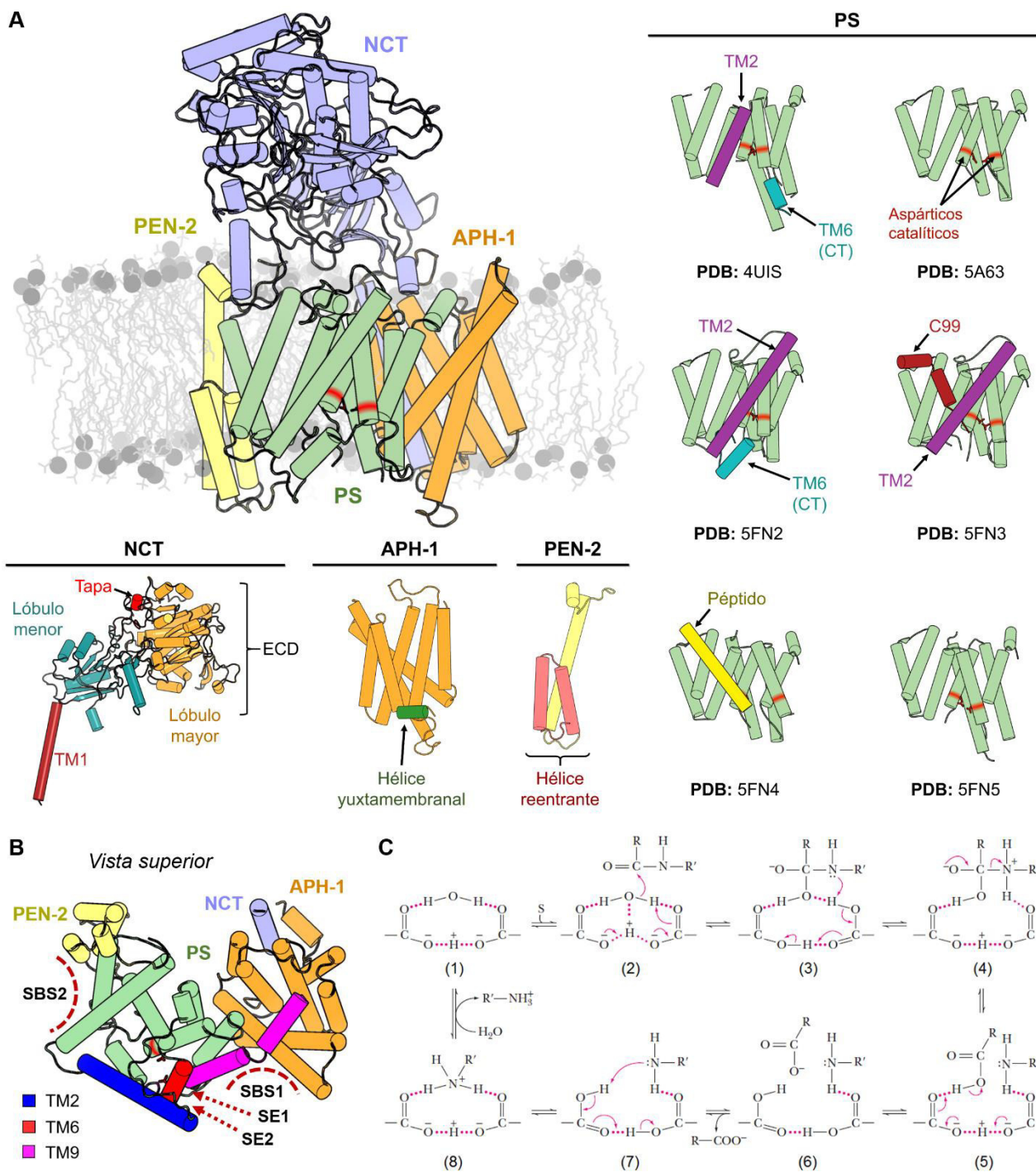
Dado que la hipótesis amiloidogénica cubre un gran número de aspectos que explican el origen y progresión de la enfermedad de Alzheimer, varios grupos de investigación se han enfocado en estudiar a las enzimas  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasa para el desarrollo de moléculas que modulen su actividad proteolítica.<sup>52,53</sup> Actualmente, se han propuesto y evaluado un gran número de inhibidores de  $\beta$ -secretasa como potenciales fármacos para el tratamiento de la enfermedad; algunos de los cuales se encuentran en ensayo clínicos o se han cocrystalizado con la enzima.<sup>54,55</sup> La información biológica y cristalográfica de esta enzima ha sido de gran utilidad para optimizar la estructura de los compuestos líderes (*lead optimization*) por medio de herramientas computacionales.<sup>56</sup> Sin embargo, el diseño de inhibidores de  $\beta$ -secretasa ha mostrado grandes limitaciones debido a la preferencia del sitio activo por moléculas polares con baja permeabilidad en la barrera hematoencefálica.<sup>57</sup> Por otro lado, se han propuesto un menor número de compuestos que actúan a nivel de la enzima  $\gamma$ -secretasa debido a la poca información estructural.<sup>58</sup> No obstante, estudios recientes de criomicroscopía electrónica (crio-EM) permitieron determinar la estructura tridimensional de  $\gamma$ -secretasa entre 3.4 y 4.4 Å de resolución, proporcionado información valiosa para su estudio.

### II.3. El complejo de $\gamma$ -secretasa

La enzima  $\gamma$ -secretasa es un complejo proteico intramembranal con actividad de aspartil proteasa involucrado en el procesamiento de más de 90 péptidos sustrato en su región transmembranal.<sup>59</sup> El complejo está constituido por cuatro subunidades (*Figura 2.4A*): presenilina (*presenilin*, PS), potenciador de presenilina 2 (*presenilin enhacer 2*, PEN-2), faringe anterior-defectuoso 1 (*anterior pharynx-defective 1*, APH-1) y nicastrina (*nicastrin*, NCT). En la *Tabla 2.1* se reporta la información más relevante referente a la función y topología de estos componentes en la enzima  $\gamma$ -secretasa.

**Tabla 2.1.** Información de las subunidades que conforman a la enzima  $\gamma$ -secretasa

Nombre ( <i>name</i> )	Acrónimo	Gen <sup>60</sup>	Descripción
Presenilina ( <i>presenilin</i> )	PS1	<i>PSEN1</i> (14q24.2)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Componente catalítico<sup>27</sup></li> <li>• 9 hélices transmembranales (TMs)<sup>61</sup></li> <li>• Dos residuos de aspártico catalíticos:<sup>62</sup> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Asp257 en TM6 y Asp385 en TM7</li> </ul> </li> <li>• Autoproteólisis en el asa que une a TM6 y TM7 para su activación y maduración<sup>63</sup> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Fragmento N-terminal (NTF, TMs 1-6)</li> <li>○ Fragmento C-terminal (CTF, TMs 7-9)</li> </ul> </li> </ul>
	PS2	<i>PSEN2</i> (1q42.13)	
Potenciador de presenilina 2 ( <i>presenilin enhacer 2</i> )	PEN-2	<i>PSENE1</i> (19q13.12)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Facilita la maduración autocatalítica de PS<sup>64,65</sup></li> <li>• 3 TMs con un asa reentrante entre TM1 y TM2</li> <li>• Interactúa con el NTF de PS</li> </ul>
Faringe anterior-defectuoso 1 ( <i>anterior pharynx-defective 1</i> )	APH-1A	<i>APH1A</i> (1q21.2)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Permite el ensamblaje del complejo<sup>64,65</sup></li> <li>• 7 TMs y una hélice yuxtamembranal</li> <li>• Interactúa con el CTF de PS</li> </ul>
	APH-1B	<i>APH1B</i> (15q22.2)	
Nicastrina ( <i>nicastrin</i> )	NCT	<i>NCSTN</i> (1q23.2)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Involucrado en el reconocimiento del sustrato, maduración y ensamblaje del complejo<sup>66</sup></li> <li>• Una TM y un ectodominio (ECD)</li> <li>• Por su flexibilidad, el ECD está dividido en un lóbulo menor, un lóbulo mayor y una tapa</li> </ul>



**Figura 2.4.** (A) Representación de la estructura tridimensional del complejo  $\gamma$ -secretasa y sus componentes PS (verde), PEN-2 (amarillo), APH-1 (naranja) y NCT (violeta). Las ilustraciones de los componentes en la parte inferior y derecha de la figura muestran de forma particular las características y regiones estructurales más importantes de dichas subunidades. (B) Vista superior del complejo, sin la región ECD de NCT, que muestra las propuestas de los sitios de unión del sustrato (SBS) y los posibles sitios de entrada (SE) al sitio activo. (C) Representación del posible mecanismo de acción de los aspárticos catalíticos de PS para el procesamiento de proteínas transmembranales tipo 1: (1) Puente de hidrógeno entre los aspárticos catalíticos y una molécula de agua; (2) ataque nucleofílico del oxígeno del agua al carbono  $sp^2$  del carbonilo del sustrato; (3-4) transferencia de protón a la amina y ruptura del enlace peptídico; (5-6) transferencia de protón del ácido carboxílico a un aspártico y liberación del segmento N-terminal del sustrato; (7-8) formación de la amina cuaternaria y liberación del fragmento C-terminal vía el desplazamiento por una molécula de agua.<sup>67-72</sup>

En el año 2015, se depositaron en el *Protein Data Bank* (PDB) seis estructuras determinadas por crio-EM del complejo de  $\gamma$ -secretasa de humano: 4UIS (4.4 Å), 5A63 (3.4 Å), 5FN2 (4.2 Å), 5FN3 (4.1 Å), 5FN4 (4.0 Å) y 5FN5 (4.3 Å).<sup>68-70</sup> Estas estructuras proporcionaron por primera vez (1) la arquitectura general del complejo, (2) la topología de las subunidades y (3) las interacciones entre las hélices transmembranales (TMs) (*Figura 2.4A*). De estos modelos, el componente PS fue el único en presentar cambios conformacionales significativos y diferencias en la resolución de las TMs. La ausencia estructural más evidente en todos los modelos fue la del asa intracelular que une a las hélices transmembranales 6 (TM6) y 7 (TM7) de PS (aminoácidos 264 a 377), en la cual se sabe ocurre el proceso autoproteolítico de maduración del complejo. De esta asa, sólo fue posible elucidar un pequeño segmento de la región carboxilo terminal (CT) de TM6 en 4UIS y 5FN2. Por otra parte, los modelos 4UIS, 5FN2 y 5FN3 fueron los únicos en los que se logró determinar la posición exacta de la TM2 de PS, debido a la alta movilidad del dominio. Además, se identificaron péptidos externos en los sitios activos de 5FN3 y 5FN4, mientras que en 5FN2 se observó una densidad perteneciente al inhibidor DAPT (la estructura no fue asignada a las coordenadas finales). Los autores plantearon la posibilidad de que el péptido asociado a 5FN3 fuese el sustrato C99, aportando información estructural relevante para comprender su procesamiento.<sup>70</sup>

### II.3.1. Reconocimiento del sustrato

Para que el complejo  $\gamma$ -secretasa pueda procesar a sus sustratos, es necesario que el péptido sea reconocido inicialmente por los componentes APH-1, PEN-2 o NCT para su posterior traslocación al sitio activo de PS. Con base en información experimental, se han propuesto dos posibles sitios de unión de los sustratos (SBS) a  $\gamma$ -secretasa, los cuales se encuentran conformados por: (1) TM2, TM6 y TM9 de PS1 y APH-1 (SBS1) y (2) PS-NTF, PEN-2 y ECD de NCT (SBS2) (*Figura 2.4B*). El primer sitio fue descrito por el grupo de investigación de Tomita e Iwatsubo<sup>73</sup>, en el que demostraron a través de mutantes de PS y estudios de entrecruzamiento que el sustrato dependía de la interacción inicial con estas TMs para su procesamiento. En este estudio, los autores observaron que las mutaciones en los residuos expuestos a la membrana de TM2 y TM6 impedían el reconocimiento del sustrato y que, por su cercanía, TM9 y APH-1 podrían estar involucrados en este proceso. Por otro lado, Fukumori y Steiner<sup>74</sup> demostraron recientemente que C99 se une de forma inicial a exositos del ECD de NCT y PEN-2, permitiendo el desplazamiento del sustrato hacia el NTF de PS para finalmente ser translocado al sitio SBS1.

También se sabe que el ECD de NCT tiene un papel importante en los mecanismos de reconocimiento y selectividad de los sustratos. Inicialmente, se pensaba que el lóbulo mayor del ECD tenía la capacidad de girar en torno al lóbulo menor para reorientar un asa con función de “tapa” y así exponer un potencial sitio de reconocimiento del amino terminal del sustrato.<sup>68</sup> Además, el modelo sugería que el sustrato anclado ECD era trasladado al sitio activo al regresar el lóbulo mayor a su posición original. Sin embargo, la información estructural reciente y otros estudios experimentales permitieron establecer que el ECD de NCT funge únicamente como un obstáculo estérico que bloquea el ingreso de sustratos con ectodominios largos.<sup>66</sup>

### II.3.2. Internalización del sustrato al sitio activo

Una vez que el complejo  $\gamma$ -secretasa reconoce al sustrato, se requiere que este ingrese al sitio activo de PS para ser proteolizado. Actualmente se han llevado a cabo varios estudios experimentales que buscan

comprender este proceso, con los cuales se han propuesto dos sitios de entrada (SE) del sustrato: (1) entre TM6 y TM9 (SE1) y (2) entre TM2 y TM6 (SE2) (*Figura 2.4B*). El primer sitio fue caracterizado por el grupo de Tomita e Iwatsubo<sup>73</sup>, en el cual emplearon el método de accesibilidad por sustitución a cisteínas (*substituted-cysteine accessibility method*, SCAM) y ensayos de inhibición competitiva para identificar las regiones de PS involucradas en la internalización. El estudio mostró que el sustrato era trasladado a través del motivo PAL de TM9 y TM6 para llegar al sitio conformado por TM6, TM7 y el NT de TM9.<sup>75</sup> Sin embargo, los nuevos datos estructurales sugieren que la alta flexibilidad de TM2 podría estar relacionada con la apertura del sitio de entrada del sustrato.<sup>74</sup> Además, un estudio reciente realizado por Tomita e Iwatsubo demostró que la región N-terminal de TM2 y la extensa asa hidrofílica que conecta a TM1 y TM2 (llamado HL1) están involucrados en la unión del sustrato y en su traslado al sitio activo a través de TM2 y TM6.<sup>76</sup>

### II.3.3. Mecanismo de acción de PS

El componente PS contiene dos residuos de aspártico catalíticos en los motivos intramembranales VTD<sub>257</sub> en TM6 y LGLGD<sub>385</sub> en TM7.<sup>77</sup> Estos residuos se encuentran orientados hacia el lado convexo del conjunto de TMs en forma de “herradura” (*horseshoe*), en la zona inferior de la cavidad de PS y cerca de la superficie de la membrana lipídica del espacio citoplasmático.<sup>61</sup> Al igual que otras aspartil proteasas, se cree que el mecanismo de reacción de PS involucra la formación inicial de un puente de hidrógeno intramolecular entre un aspártico desprotonado (Asp<sup>-</sup>) y uno protonado (Asp-H) que coordinan a una molécula de agua catalítica (*Figura 2.4C*).<sup>77-79</sup> El sistema permite la abstracción de un protón de la molécula de agua para llevar a cabo el ataque nucleofílico por parte del oxígeno al carbono sp<sup>2</sup> del carbonilo del péptido sustrato. Finalmente, se transfiere un protón a la amina del péptido para promover la ruptura del enlace peptídico y liberar los fragmentos N- y C-terminales vía una serie de transferencias protónicas. Además, se sabe que la etapa inicial del mecanismo ácido-base de las aspartil proteasas requiere que los grupos carboxilo de los residuos de aspártico catalíticos se encuentren a una distancia menor de 5.0 Å para favorecer su interacción y coordinación con la molécula de agua.<sup>61</sup>

### II.3.4. Factores que modifican la actividad de $\gamma$ -secretasa

La actividad proteolítica del componente catalítico PS puede ser regulada por factores internos y externos que involucran la inactivación del complejo de  $\gamma$ -secretasa o la alteración en su secuencia de corte. Algunos de los factores más importantes son: (1) la composición de la membrana lipídica en la que se encuentra embebida  $\gamma$ -secretasa, (2) moléculas exógenas que inhiben o modulan el reconocimiento o procesamiento del sustrato, y (3) mutaciones en los genes que codifican para el péptido APP y la isoforma 1 de PS (PS1).

#### II.3.4.1. Composición de la membrana

Puesto que  $\gamma$ -secretasa es una enzima transmembranal, la composición de los lípidos de la membrana, en la cual se encuentra embebida, juega un papel clave durante su maduración, activación y mecanismo proteolítico. El complejo  $\gamma$ -secretasa fue identificado por primera vez en su estado activo en balsas lipídicas (*lipid rafts*) localizadas en la membrana plasmática de las neuronas.<sup>80,81</sup> Un análisis lipídómico reciente mostró que la enzima se encuentra asociada a 53 especies moleculares pertenecientes a 11 diferentes clases principales de lípidos,

siendo los esfingolípidos, fosfatidilcolina y colesterol los mayoritarios.<sup>82</sup> Esta composición de lípidos es consistente con la caracterización lipidómica realizada a cerebros de ratón y humano que presentaban la enfermedad de Alzheimer.<sup>83</sup> Cabe mencionar que la composición no sólo regula la actividad de la enzima, pues también es parte fundamental para su integridad y señalización en las neuronas.<sup>84,85</sup>

El grupo de investigación de Selkoe<sup>86</sup> estudió la actividad del complejo  $\gamma$ -secretasa en diferentes membranas de composición homogénea y heterogénea, en donde observaron que la enzima presentaba una actividad óptima al componerse la membrana únicamente por lípidos con cabeza de fosfatidilcolina (PC). El uso de membranas heterogéneas mostró un aumento en la producción del péptido A $\beta$ 40, excepto cuando el PC constituía el 50 % o menos del sistema. También se observó un aumento en la formación de A $\beta$ 40 al incrementar la proporción de colesterol, explicando así la diferencia de actividad en las membranas de los diferentes organelos celulares.

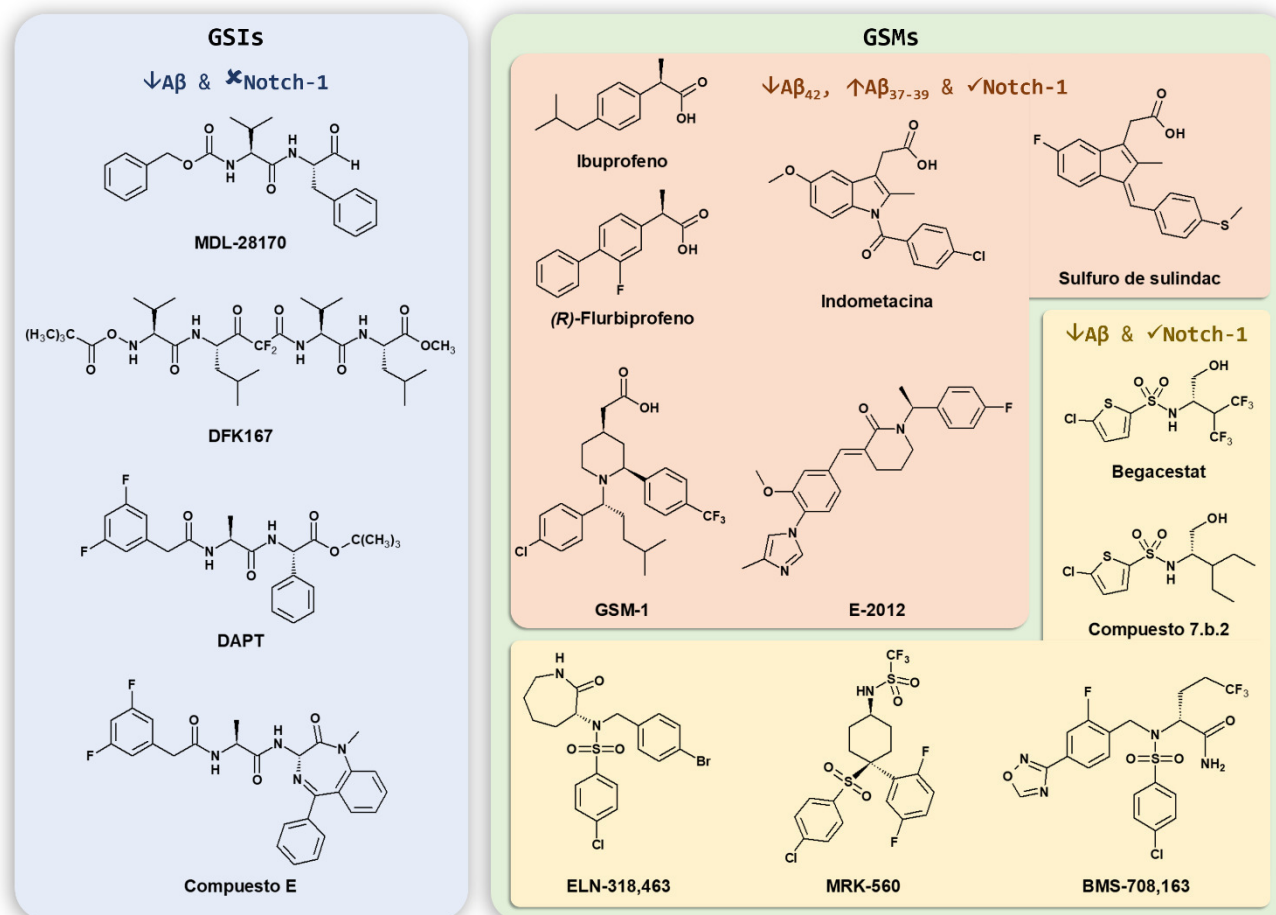
#### II.3.4.2. Inhibidores y moduladores

Existen diferentes péptidos y moléculas pequeñas que interfieren con la producción de los fragmentos de A $\beta$ , los cuales han sido clasificados con base en el efecto que producen en la actividad de la enzima como: inhibidores (GSIs) y moduladores (GSMs) de  $\gamma$ -secretasa. Los GSIs inhiben la formación del péptido A $\beta$  al impedir que el sustrato ingrese al sitio activo y que la enzima desempeñe su actividad proteolítica; mientras que los GSMs modulan el patrón de corte de C99 para reducir o inhibir la producción de A $\beta$ 42, sin alterar la proteólisis de otros sustratos.<sup>87</sup> A continuación se describen algunos de los GSIs y GSMs que han sido identificados como potenciales fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (*Figura 2.6*).

##### (a) Inhibidores de $\gamma$ -secretasa

Los aldehídos peptídicos (ej. *MDL-28170*) fueron el primer grupo de GSIs que mostraron una disminución en la generación de los productos p3 y A $\beta$  a través de la inhibición de  $\gamma$ -secretasa.<sup>88</sup> La forma hidratada de estos péptidos genera análogos del estado de transición que se unen al sitio catalítico de la enzima y la inactivan. Tomando como referencia este mecanismo de acción, se diseñaron péptidos helicoidales y análogos del estado de transición basados en la estructura del sustrato (ej. *DFK167*).<sup>89</sup> A pesar de que ambos fueron diseñados con base en la estructura del sustrato, ensayos de inhibición competitiva demostraron que los análogos del estado de transición se unen al sitio catalítico, mientras que los péptidos helicoidales actúan en el sitio activo inicial del sustrato (SBS1/SBS2).<sup>90</sup> Por otra parte, un estudio de optimización hit-a-líder (*hit-to-lead*) identificó a un péptido inhibidor con alta potencia, denominado *DAPT*.<sup>91</sup> La optimización de este compuesto líder llevó a la obtención de derivados de benzodiazepina con alta potencia, dentro de los que se encuentra el *compuesto E* y sus análogos.<sup>92</sup> Estudios posteriores de marcaje por fotoafinidad demostraron que *DAPT* y estos compuestos presentaban sitios de unión diferentes, puesto que la fenilglicina de *DAPT* interactúa con la región CTF de PS y el núcleo de benzodiazepina del *compuesto E* se une a la región NTF.<sup>93</sup> En el mapa de densidad de 5FN2, los autores confirmaron que el grupo fenilglicina interactuaba con TM7 y TM9, mientras que el sustituyente 3,5-difluorofenilo tuvo mayor número de contactos con TM2 y TM3.<sup>70</sup>





**Figura 2.6.** Estructura química de inhibidores (GSIs) y moduladores (GSMs) de la enzima  $\gamma$ -secretasa. Cada recuadro representa el efecto que tienen los compuestos en la producción del péptido A $\beta$  ( $\uparrow$ aumento o  $\downarrow$ disminución) e inhibición ( $\times$ ) o producción ( $\checkmark$ ) de Notch-1.<sup>20</sup>

### (b) Moduladores de $\gamma$ -secretasa

A pesar de que los GSIs presentan alta potencia y selectividad a la enzima  $\gamma$ -secretasa, se han observado una gran cantidad de efectos adversos debido a la interferencia de estos compuestos con el procesamiento de otros sustratos (ej. Notch-1).<sup>94</sup> Por su parte, los GSMs no afectan el procesamiento de otros sustratos y reducen significativamente la formación de péptidos A $\beta$ . Dependiendo del mecanismo de modulación, los GSMs se dividen en (1) reductores de A $\beta_{42}$  y (2) ahorradores de Notch-1.<sup>52</sup> El primer grupo incluye a moléculas que reducen la producción de A $\beta_{42}$  e incrementan la formación de fragmentos más cortos (A $\beta_{37-39}$ ).<sup>95</sup> Algunos de los compuestos más importantes que componen a este grupo son los antiinflamatorios no esteroideos (*ibuprofeno*, *(R)-flurbiprofeno*, *indometacina* y *sulfuro de sulindac*) y compuestos con propiedades ácidas (ej. *GSM-1*) y no ácidas (ej. *E-2012*).<sup>96-98</sup> Por otra parte, el segundo grupo de GSMs se encarga de inhibir la producción de todos los productos A $\beta$ , sin alterar el procesamiento de Notch-1 (ej. *Begacestat* y *Compuesto 7.b.2*).<sup>99,100</sup> Actualmente, las empresas farmacéuticas Elan (*ELN-318,463*), Merck (*MRK-560*) y Bristol-Myers Squibb (*BMS-708,163*) se encuentran desarrollando derivados de arilsulfonamidas como potenciales fármacos para el tratamiento de la enfermedad.<sup>101-103</sup>

### II.3.4.3. Mutaciones en los genes APP y PSEN1

El descubrimiento de mutaciones autosómicas dominantes (*Familial Alzheimer's disease*, FAD) en los genes que codifican para APP (*APP*) y PS (*PSEN1* y *PSEN2*) fueron un punto clave para el sustento y aprobación de la hipótesis amiloidogénica.<sup>104</sup> Actualmente, se conocen un gran número de mutaciones FAD asociadas al desarrollo temprano (entre los 30 y 60 años) de la enfermedad de Alzheimer (ver *Tablas A1.1* y *A1.2* del *Apéndice I*).<sup>105</sup> La información de estas y otras mutaciones se ha depositado en el servidor Alzforum, el cual mantiene una actualización constante de su base de datos.<sup>106</sup> Algunas de las mutaciones más relevantes relacionadas con la aparición de la enfermedad se describen en las siguientes subsecciones.<sup>20</sup>

#### (a) Mutaciones en el gen APP

El péptido C99 está constituido por los codones 672 a 770 del gen *APP*, siendo las variantes de esta región las que afectan la actividad de  $\gamma$ -secretasa (*Figura 2.5A*). La mutación en el codón 717 (V717I) fue la primera variante asociada al desarrollo de la enfermedad a causa de un factor hereditario.<sup>107</sup> Estudios posteriores demostraron que esta y otras mutaciones en el mismo codón (V717G/F/L) y en las posiciones 714 (T714I), 715 (V715M/A), 716 (I716V/F), 723 (L723P) y 724 (K53M/N) causan un incremento en la producción de A $\beta$ 42 sobre A $\beta$ 40.<sup>108-110</sup> Por su parte, la mutación T719P (T48P en C99) mostró una sobreproducción de A $\beta$ 38 debido a su localización en el sitio  $\epsilon$  alternativo (Thr48-Leu49).<sup>111</sup> Adicionalmente, se identificaron siete mutaciones patogénicas en los aminoácidos que componen la hélice yuxtamembranal de C99 (K687N, A692G, E693G/K/Q/ $\Delta$ , y D694N).<sup>112-114</sup> De estas variantes, se encontró que la mutación E693G facilitaba la formación de fibras A $\beta$ , mientras que su delección o mutación por lisina o glutamina reduce la producción del péptido.<sup>115</sup>

#### (b) Mutaciones en el gen PSEN1

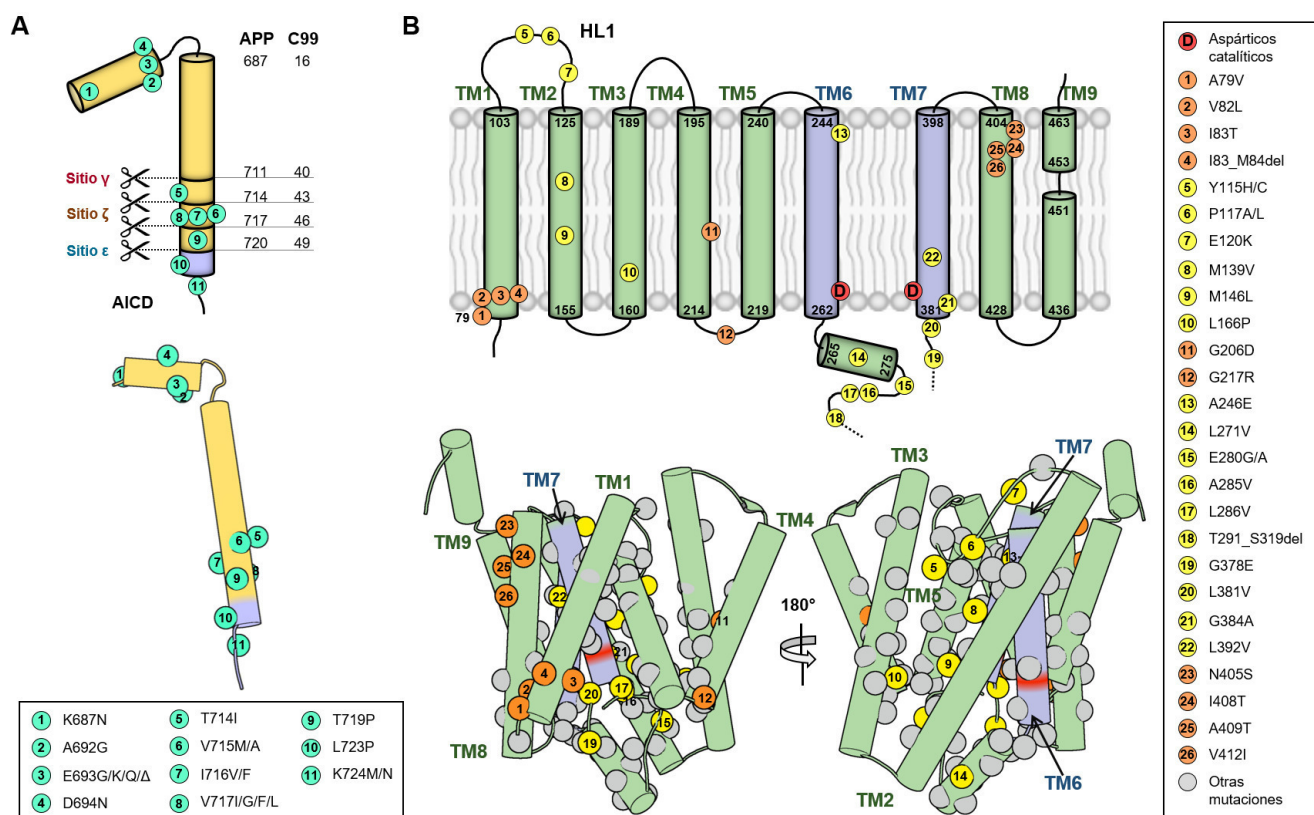
Las mutaciones en el gen *PSEN1* (isoforma PS1) son la causa más común del desarrollo temprano de la enfermedad, mientras que los casos de mutaciones en *PSEN2* suelen ser atípicos. A la fecha, se conocen más de 300 variantes del gen *PSEN1*,<sup>106</sup> la mayoría de las cuales se localizan en las TMs que conforman el sitio activo (TM2, TM6 y TM7), y siendo las mutantes M139V (TM2), M146L (TM2), L166P (TM2), A246E (TM6), G378E (TM7), L381V (TM7), G384A (TM7) y L392V (TM7) las relacionadas con el aumento en la proporción A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 debido a cambios conformacionales en el complejo PS1-C99.<sup>116</sup> El aumento en la producción de A $\beta$ 42 a causa de alteraciones conformacionales también fue observado en mutaciones del asa que une a TM6 y TM7 (T291\_S319del, L271V, E280G, E280A, A285V y L286V).<sup>117,118</sup> Por otro lado, las mutaciones reportadas en TM1, TM4 y TM5 se localizan principalmente en las asas e interfaces formadas con otras TMs de PS1. Se sabe que las mutaciones Y115H/C, P117A/L, y E120K del asa HL1 (TM1-TM2) están involucradas en la sobreproducción de A $\beta$ 42.<sup>119,120</sup>

Existen mutaciones del gen *PSEN1* involucrados en la interacción con las subunidades APH-1 y PEN-2, encontrándose ocho y dos variantes en las respectivas interfaces. En el caso de las mutaciones en la interface PS1-APH-1, se ha reportado que la delección de los aminoácidos I83 y M84 (I83\_M84del) en TM1 resulta en un incremento de A $\beta$ 42, mientras que V82L reduce su producción y A79V no genera ningún cambio.<sup>121,122</sup> Las

mutaciones restantes de TM1 (I83T) y TM8 (N405S, I408T, A409T, V412I), así como las mutaciones G217D/R en la interface PS1-PEN-2, no inducen alteraciones en la producción del péptido Aβ. Un estudio reciente relacionó la mutación G206D en TM4 con la pérdida de interacción de PS1 con PEN-2 y con el incremento en la producción de Aβ42.<sup>123</sup>

(c) Otras mutaciones

En el caso de las subunidades restantes de γ-secretasa, se han reportado pocas variantes asociadas al padecimiento. Del gen *PSENEN* (PEN-2) se conocen deleciones en el promotor, mutaciones sencillas (S73F, D90N) y polimorfismos de un solo nucleótido (SNP); sin embargo, no ha sido posible asociarlas con alguna función patogénica.<sup>124</sup> Por otro lado, el componente APH-1 presenta tres isoformas (APH-1AL, APH-1AS y APH-1B), de las cuales, las dos isoformas APH-1A han mostrado un rol importante en la enfermedad.<sup>125</sup> Sin embargo, estudios previos reportaron seis diferentes polimorfismos en los genes de APH-1A/B que no presentaron ninguna relación con su aparición.<sup>126</sup> Finalmente, dos mutaciones en el dominio hidrofóbico DYIGS del ECD de NCT (D336 y Y337) mostraron una sobreproducción de Aβ, con un decremento al presentarse una deleción del segmento.<sup>127</sup>

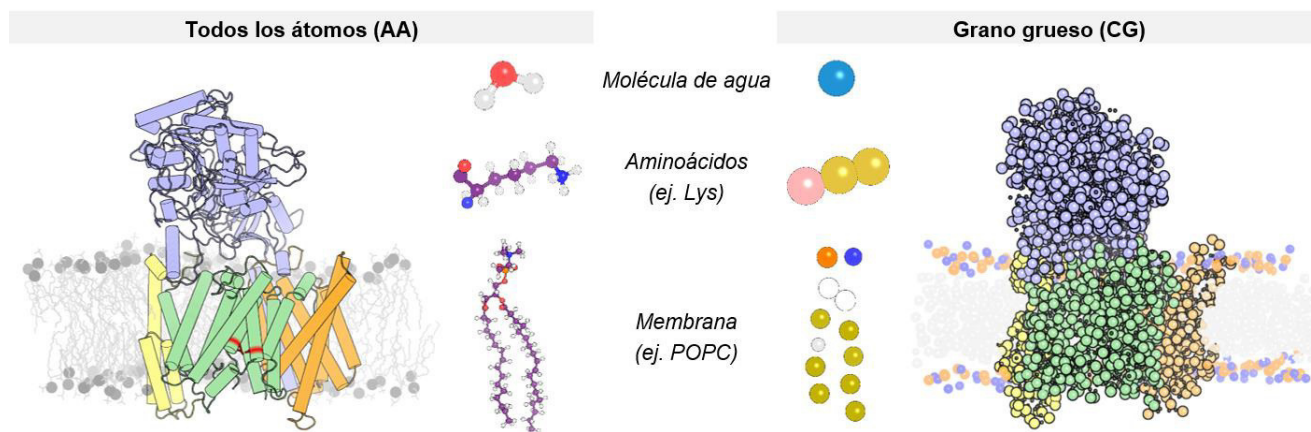


**Figura 2.5.** Representación de las principales mutaciones en las estructuras de (A) APP/C99 y (B) PS1. Las esferas de color amarillo muestran las variantes localizadas en el sitio activo de PS1 y las de color naranja las de las interfaces entre TMs de PS1 u otros componentes de γ-secretasa.<sup>20</sup>

#### II.4. Simulaciones de dinámica molecular

La dinámica molecular (MD, por sus siglas en inglés) es una metodología computacional que permite estudiar el comportamiento de un sistema de átomos en función del tiempo. Para esto, se requiere de la integración de las ecuaciones de movimiento y el empleo de un campo de fuerza que describa de forma continua el tratamiento de las interacciones enlazantes y no enlazantes del conjunto de átomos. La simulación de un sistema nos permite generar un conjunto de estados conformacionales de los que se pueden analizar cambios estructurales y propiedades termodinámicas.<sup>128</sup>

Esta metodología ha sido extensamente empleada para describir el comportamiento dinámico de macromoléculas biológicas, principalmente proteínas, en donde se busca comprender mecanismos como: cambios conformacionales, transporte de iones/agua a través de canales, unión e interacción con moléculas pequeñas u otras macromoléculas, plegamiento/desplegamiento de proteínas, entre otros.<sup>129</sup> Sin embargo, el tiempo de simulación requerido para emular varios de estos procesos a nivel atómico (*all-atom*, AA) se encuentra limitado por el número de partículas en el sistema, el campo de fuerza empleado y los recursos computacionales a los que se tienen acceso. Es por lo anterior que se han implementado metodologías de muestreo acelerado que facilitan la transición entre estados conformacionales de la macromolécula (ej. intercambio de réplicas) o que reducen el número de partículas al considerar un medio continuo (solvente implícito) o al simplificar el sistema de todos los átomos mediante el uso de modelos de grano grueso (*coarse grained*, CG).<sup>130</sup> En este último, se emplean partículas/perlas (*beads*) que representan conjuntos de átomos asociados con base en la conectividad molecular, omitiendo hidrógenos no polares y manteniendo propiedades topológicas y electrónicas. La *Figura 2.7*, muestra los modelos de la enzima  $\gamma$ -secretasa y ejemplos de moléculas que componen al sistema en las representaciones de AA y CG.<sup>72</sup> La información referente a la construcción y preparación de los sistemas se describirá con mayor detalle en la sección de Metodología del presente trabajo.



**Figura 2.7.** Representación de los modelos de todos los átomos (AA) y grano grueso (CG) de la enzima  $\gamma$ -secretasa y ejemplificación de ambas representaciones en la molécula de agua, lisina y lípido.

##### II.4.1. Otros estudios de dinámica molecular de $\gamma$ -secretasa

Debido a su reciente elucidación estructural, existen en la actualidad pocos reportes de dinámica molecular de la enzima  $\gamma$ -secretasa.<sup>72</sup> Los dos primeros estudios computacionales, previos a la publicación de las estructuras, emplearon modelos por homología de la subunidad aislada de PS1 generados a partir de la

estructura de PS del organismo *Methanoculleus marisnigri* (PDB: 4HYG<sup>63</sup>). El primer estudio fue realizado por Kong y colaboradores a principios del 2015,<sup>131</sup> en el que llevaron a cabo simulaciones de MD atomísticas de 200 ns del modelo de PS1 en membranas de 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina (POPC) y etanolamina (POPE). En ese estudio se analizó la distribución conformacional de los dominios NT y CT, así como del movimiento de la puerta de entrada del sustrato entre TM2 y TM6 (SE2) y el posible mecanismo de inhibición por POPE al interactuar con los aspárticos catalíticos. Por su parte, Somavarapu y Kepp<sup>132</sup> construyeron un modelo de PS1 que incluía el segmento intracelular que conecta a TM6 y TM7 en la forma madura e inmadura (sin corte autoproteolítico). Para este estudio, se realizaron simulaciones por triplicado de cada sistema por un periodo de 500 ns, analizando únicamente los últimos 200 ns. Al igual que Kong y colaboradores<sup>131</sup>, el análisis de componentes principales (PCA) mostró una alta flexibilidad de las TMs que componen el posible sitio de ingreso del sustrato (SE2), así como del asa HL1 (TM1-TM2) que sugieren podría intervenir como bisagra de la puerta. Además, dichos autores identificaron una amplia distribución conformacional en la forma madura debido al corte en el asa intracelular. Cabe mencionar que los cambios conformacionales observados en estos estudios podrían deberse a artefactos de la simulación asociados a la ausencia de las subunidades APH-1A, PEN-2 y NCT y a las variaciones en el modelo.

Los trabajos más recientes han empleado las estructuras de crio-EM de  $\gamma$ -secretasa para identificar el posible sitio de unión inicial del sustrato C99 en el complejo. El primero de estos fue reportado por Han y colaboradores<sup>133</sup>, en el que emplearon el PDB: 5FN2 para llevar a cabo simulaciones multiescala (AA y CG) de la región transmembranal de  $\gamma$ -secretasa (sin el dominio extracelular de NCT) con los sustratos C99 (aminoácidos 26 a 55, C99<sub>26-55</sub>) y Notch-1. El análisis de agrupamiento (*clustering*) de las simulaciones de CG mostró una alta probabilidad de unión de los sustratos por el sitio SBS1, cuya estabilidad fue posteriormente caracterizada con simulaciones atomísticas. De forma similar, Somavarapu y Kepp<sup>134</sup> realizaron tres simulaciones atomísticas de 500 ns con la estructura PDB: 5FN3 de  $\gamma$ -secretasa, a la que reemplazaron la subunidad PS1 por el modelo reportado en su primer artículo (*vide supra*). En este estudio, los autores lograron caracterizar tres estados conformacionales (cerrado, semiabierto y abierto) de PS1 con base en la distancia entre los aspárticos catalíticos y TM2/TM3. El estudio de acoplamiento molecular del péptido A $\beta$ , realizado en las tres conformaciones, sugirió que la unión del sustrato está controlada por la conformación de PS1, teniendo una mayor preferencia por la forma semiabierta (compacta). Esto último les permitió establecer una posible relación entre la alta afinidad y el tiempo de retención del sustrato en la conformación semiabierta con la generación de los fragmentos más cortos de A $\beta$ . Además, los modelos fueron empleados para proponer un posible mecanismo de ingreso por SE2 a partir del sitio SBS2. El último estudio publicado fue realizado por Dal Peraro y colaboradores<sup>135</sup>, en el cual se llevaron a cabo simulaciones de CG de 4  $\mu$ s del complejo  $\gamma$ -secretasa con seis péptidos C99<sub>15-55</sub> colocados de forma aleatoria en una balsa lipídica compuesta por 32 lípidos diferentes y 54.7 % de colesterol. Las simulaciones mostraron una preferencia inicial de la región N-terminal de C99<sub>15-55</sub> por el dominio ECD de NCT, lo que promueve su traslado a cualquiera de los dos SBSs para su posterior transporte al sitio activo. También observaron que la localización de C99<sub>15-55</sub> en la membrana era dependiente de la concentración de colesterol en esa región.

Estos estudios computacionales proveen información relevante de la estructura y dinamismo del complejo de  $\gamma$ -secretasa; sin embargo, faltan por describir varios de los mecanismos que regulan el ensamble conformacional y actividad de la enzima, algunos de los cuales son abordados en el presente trabajo.

### III. Planteamiento del problema

El incremento en la incidencia y prevalencia de la enfermedad de Alzheimer ha incentivado el interés de varios grupos de investigación y empresas farmacéuticas por desarrollar nuevos tratamientos terapéuticos que puedan controlar o curar los síntomas asociados a este padecimiento. Uno de los blancos terapéuticos más importantes es el complejo de  $\gamma$ -secretasa, al ser una enzima clave en la producción de los péptidos amiloidogénicos tóxicos asociados al desarrollo de la enfermedad. En la actualidad, se han realizado grandes avances en el conocimiento de la estructura y función de la enzima  $\gamma$ -secretasa; sin embargo, la información experimental es aún insuficiente para determinar su comportamiento dinámico y poder explicar diferentes procesos involucrados en el desarrollo de la enfermedad. Los estudios actuales de dinámica molecular realizados con la subunidad catalítica PS1 y con el complejo  $\gamma$ -secretasa han permitido tener una primera aproximación hacia la caracterización química, estructural y dinámica a nivel atómico del complejo  $\gamma$ -secretasa. Sin embargo, se requiere continuar con la investigación para contribuir a la explicación de mecanismos esenciales de la enzima, conocer el origen de la enfermedad de Alzheimer y poder llegar al desarrollo de moléculas bioactivas o fármacos.

### IV. Hipótesis

El uso de herramientas computacionales permitirá describir el comportamiento dinámico y el ensamble conformacional del complejo de  $\gamma$ -secretasa a nivel atómico.

### V. Objetivos

#### V.1. *Objetivo General*

Emplear metodologías de química y bioquímica computacional para caracterizar las propiedades estructurales y dinámicas de la enzima  $\gamma$ -secretasa.

#### V.2. *Objetivo Particulares*

- Describir el ensamble estructural del complejo proteico de  $\gamma$ -secretasa utilizando metodologías de dinámica molecular multiescala.
- Realizar un análisis estructural y dinámico del posible sitio inicial de unión y del mecanismo de reconocimiento de los sustratos C99 y Notch-1 por el complejo de  $\gamma$ -secretasa.
- Emplear metodologías de dinámica molecular multiescala para describir el comportamiento del complejo en presencia de factores que afectan su actividad proteolítica, dentro de los que se encuentran: diferentes composiciones de lípidos en la membrana, interacción con un inhibidor y mutaciones en la secuencia de la subunidad catalítica PS1.

## VI. Análisis estructural de la enzima $\gamma$ -secretasa

En este capítulo se presenta el estudio de: (1) la distribución y propiedades de los aminoácidos en  $\gamma$ -secretasa; (2) los residuos que intervienen en la interacción entre sus subunidades y (3) las características particulares de las cuatro subunidades que componen al complejo enzimático.

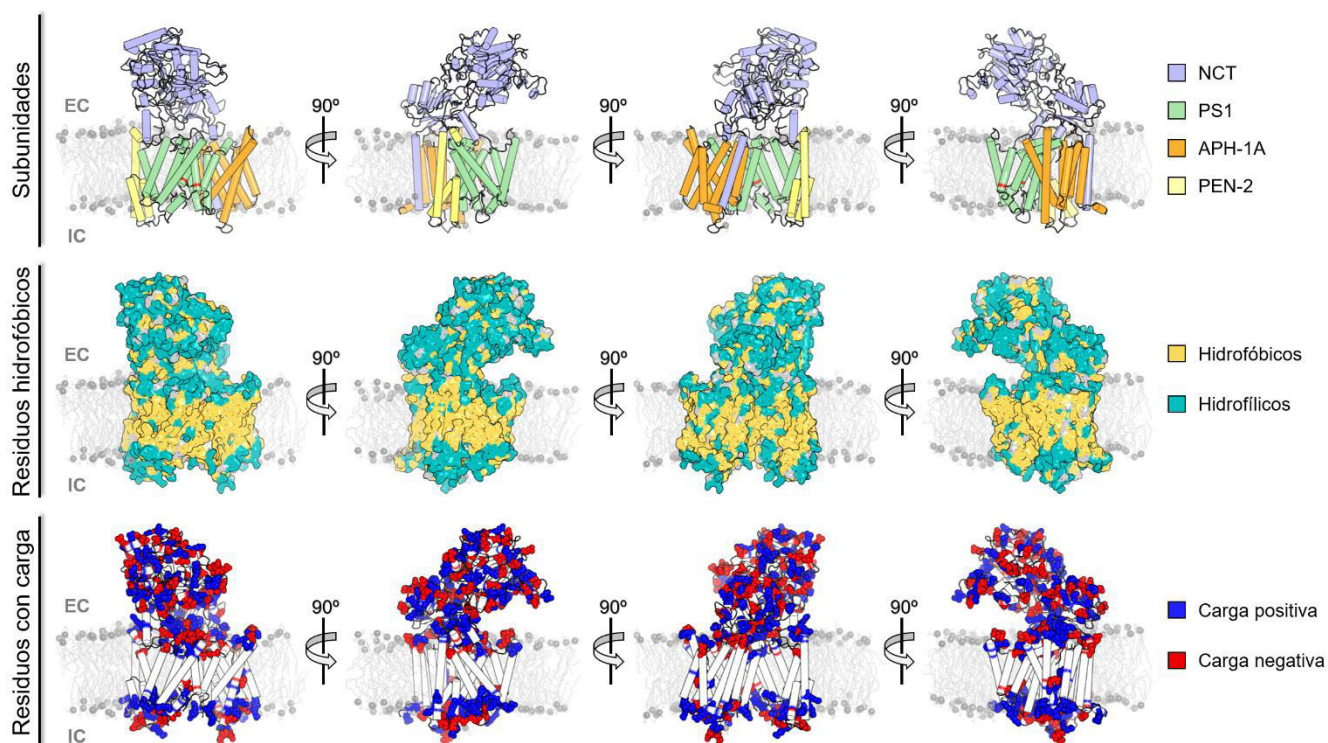
### VI.1. Metodología

Se tomó como modelo inicial de referencia al complejo de  $\gamma$ -secretasa con clave PDB: 5FN2 (4.2 Å), al ser la estructura disponible más completa. Con este modelo, se realizó la identificación y selección de los residuos hidrofóbicos e hidrofílicos empleando la escala de hidropatía reportada por Kyte & Doolittle para cada una de las cadenas laterales de los aminoácidos.<sup>136</sup> Esta escala también se usó para el cálculo del índice de hidropatía (IH) por residuo de las cuatro subunidades de  $\gamma$ -secretasa, en la que se tomó un rango de 9 aminoácidos para su obtención. Los IHS fueron posteriormente empleados para establecer la orientación del complejo en la membrana con ayuda del programa LAMBADA.<sup>137</sup> Por otra parte, se identificaron los residuos con carga (positivos: His, Lys y Arg, y negativos: Glu y Asp), el cinturón aromático (His, Trp y Tyr)<sup>138</sup> y su distribución en la región transmembranal.<sup>139</sup> Los aminoácidos con interacciones intra- e intersubunidad fueron identificados con ayuda del servidor PISA.<sup>140</sup> Se analizaron las propiedades estructurales y conformacionales específicas de cada componente del complejo para relacionar su topología con funciones y mecanismos característicos de la enzima.

### VI.2. Resultados y Discusión

La inserción y orientación de una proteína membranal en una bicapa lipídica es dependiente de la topología y distribución de los aminoácidos de su superficie, estos definen la forma en que la proteína interactúa con los lípidos de la membrana, interviniendo en procesos de plegamiento, estabilidad termodinámica y actividad biológica.<sup>141</sup> Es por esto último que, antes de caracterizar el comportamiento dinámico de la enzima  $\gamma$ -secretasa, es necesario estudiar su distribución topológica y composición de aminoácidos.

La *Figura 6.1* muestra una visualización de 360° de las subunidades que componen al complejo, así como de la representación de superficie de las regiones hidrofóbicas y la localización de los residuos con carga formal positiva y negativa. Al igual que en otras proteínas membranales, la mayor proporción de residuos de la región transmembranal de  $\gamma$ -secretasa son hidrofóbicos, mientras que los que componen la región extramembranal, incluyendo el ECD de NCT, son en su mayoría hidrofílicos. Esto último se evidencia al presentarse una mayor distribución de residuos con carga en la región extramembranal, los cuales tienen la capacidad de interactuar con las cabezas de los lípidos o con las moléculas de agua que los rodean.<sup>142</sup> Un gran número de estos residuos fueron localizados en las TMs del complejo, cuantificándose una mayor proporción de los residuos de lisina y arginina expuestas a la región intracelular en comparación con la región extracelular (IC: 32 residuos y EC: 12 residuos, regla del “positivo adentro”<sup>143</sup>). Los residuos con carga localizados en la interfase lípido/agua están comúnmente involucrados en la estabilidad de las proteínas y en cambios conformacionales, por lo que su correcta orientación en la membrana es fundamental para su estudio en procesos dinámicos.

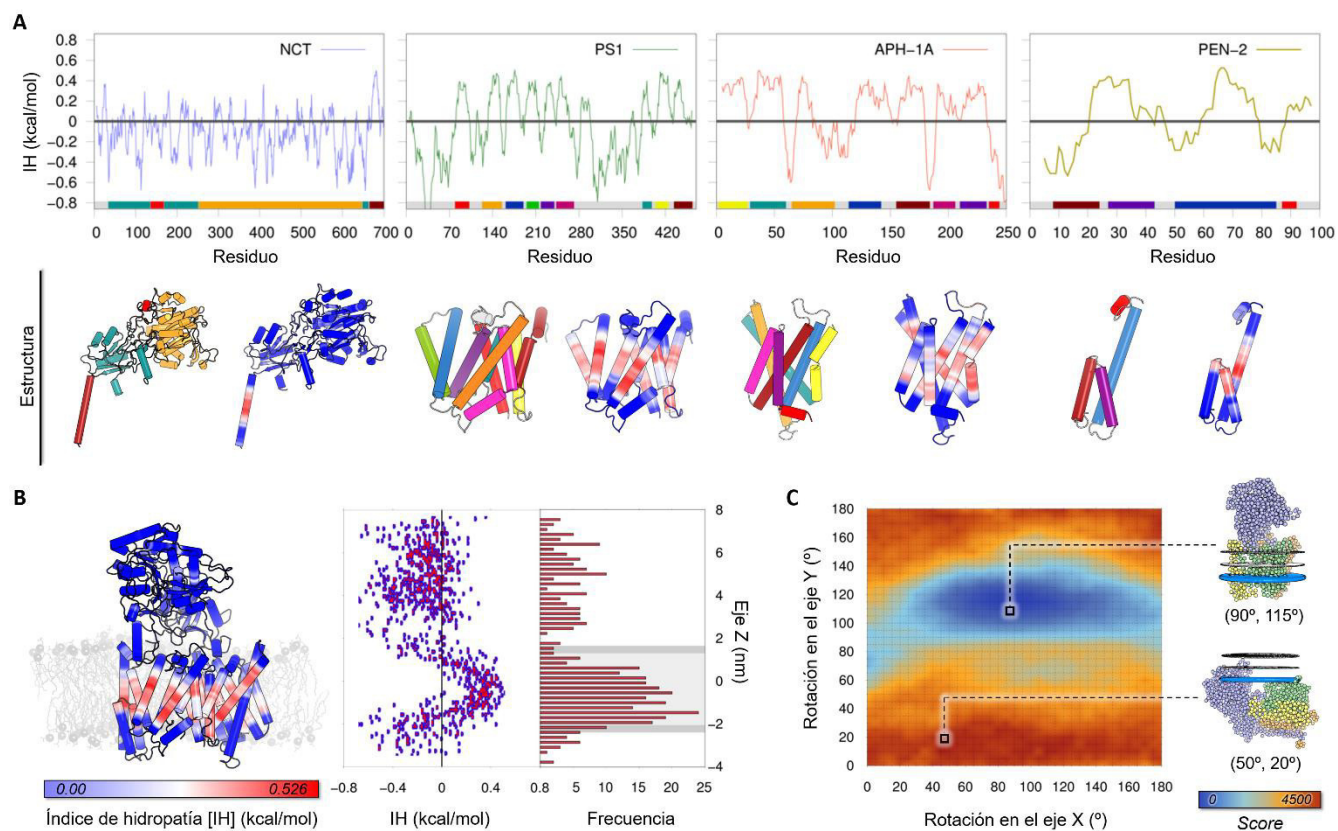


**Figura 6.1.** Representación de 360° de las subunidades NCT, PS1 (aspárticos catalíticos en rojo), APH1A y PEN-2 del complejo de  $\gamma$ -secretasa embebida en una bicapa lipídica. La imagen también muestra la representación en superficie de las regiones hidrofóbicas y la localización de los residuos cargados.

La escala de hidropatía de Kyte & Doolittle se empleó para definir las regiones del complejo de  $\gamma$ -secretasa con mayor probabilidad de encontrarse embebidas en la membrana. La *Figura 6.2A* muestra los gráficos y la distribución estructural de los índices de hidropatía (IH) calculados por residuo para cada subunidad del complejo. En estas representaciones es posible observar que los residuos con valores altos de IH se localizan en las regiones medias de las TMs, confirmando su alta probabilidad de encontrarse embebidas en un medio hidrofóbico. Por otra parte, los segmentos de la estructura con valores bajos de IH se observan en las regiones terminales de las TMs y en el ECD de NCT. Una excepción a este comportamiento fue el de la TM3 de APH-1A, en el cual se obtuvo un valor bajo de IH en su segmento C-terminal a causa del gran número de aminoácidos cargados presentes en la parte interna de la región transmembranal (ver *Figura 6.1*). Algo similar ocurre en las regiones C-terminal de TM6 y N-terminal de TM7 del componente PS1, en las cuales se observa una reducción del IH debido a la presencia de los residuos de aspártico catalíticos.

La representación tridimensional y frecuencia de la distribución de los valores de IH en el complejo de  $\gamma$ -secretasa permitió determinar la región (en el eje Z) con mayor probabilidad de encontrarse embebida en la membrana (*Figura 6.2B*). Con base en esta orientación del eje Z, se rotó al complejo en los ejes X y Y con el programa LAMBADA hasta identificar la posición en la que el cinturón hidrofóbico se encontrase paralelo al plano XY de la bicapa lipídica (*Figura 6.2C*). La orientación final del complejo se tomó como referencia para la construcción de los sistemas empleados en este trabajo.

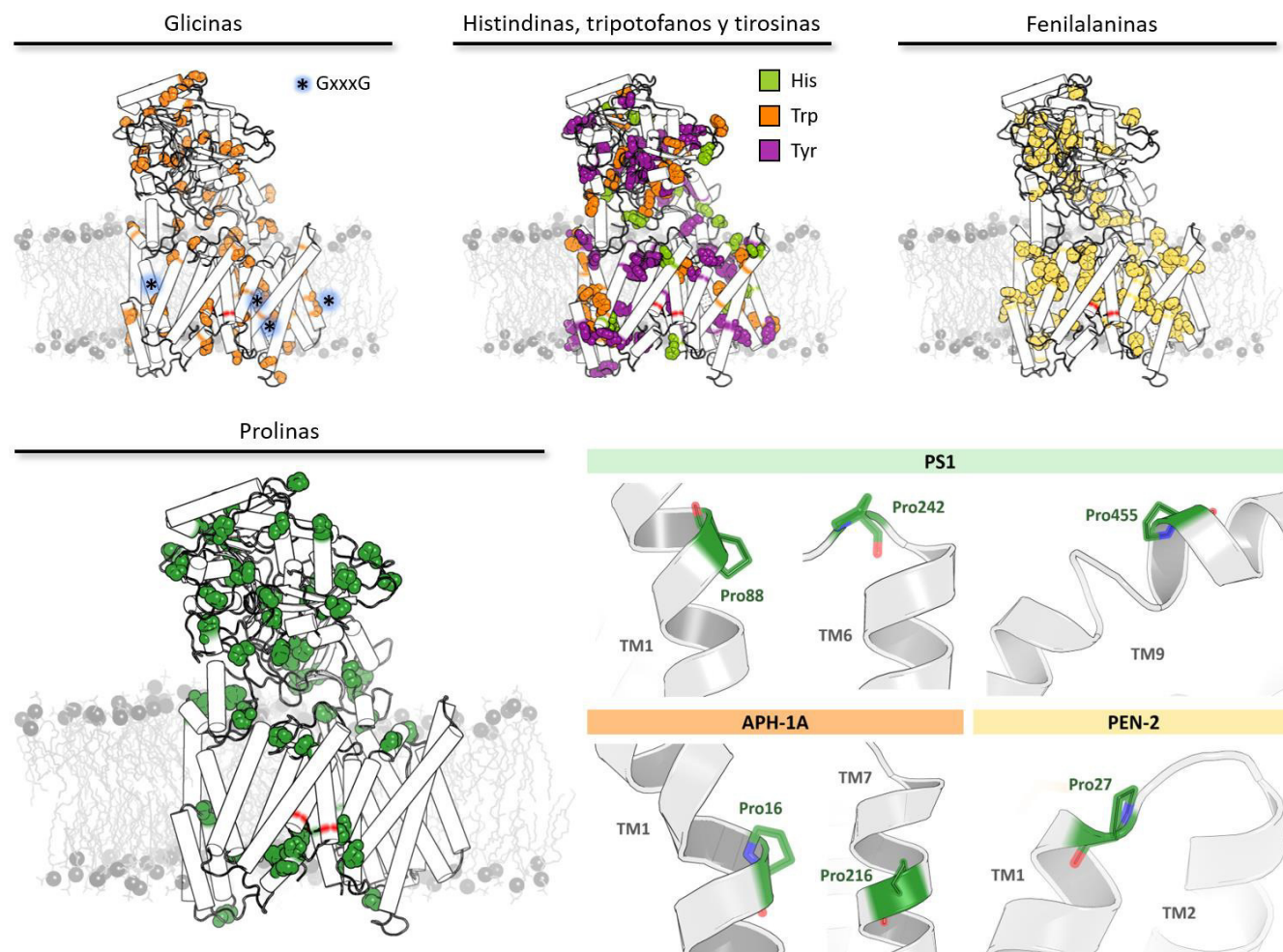




**Figura 6.2.** (A) Diagramas de distribución y representación estructural de los índices de hidropatía (IH) por residuo calculados para las subunidades NCT, PS1, APH-1A y PEN-2 de la enzima  $\gamma$ -secretasa con la escala de hidropatía reportada por Kyte & Doolittle. (B) Estructura del complejo de  $\gamma$ -secretasa coloreado por los valores calculados de IH y cuantificación de los residuos con IH superiores a cero en el eje Z. (C) Diagrama de rotación del complejo en los ejes X y Y para su orientación en el plano XY de la bicapa lipídica. La escala de puntuación (*Score*) del programa LAMBADA representa el grado de aproximación del cinturón hidrofóbico a dicho plano XY.

Además de las propiedades hidrofóbicas y electrónicas, es importante identificar de forma individual los diferentes tipos de aminoácidos que componen al complejo para definir las implicaciones de estos en la estabilidad de la estructura (Figura 6.3). Algunos de los estudios más relevantes realizados a proteínas membranales han asociado dicha estabilidad y dinamismo con la localización en la región transmembranal de los aminoácidos Gly, Pro, Arg, Lys y aromáticos (His, Phe, Tyr y Trp). Para el caso de Gly, se identificaron los motivos  $GxxxG$  en las TMs en busca de “cremalleras de glicina”, encontrándose únicamente tres en APH-1A (uno en TM6 y dos en TM4) y uno en PS1 (TM4). Sin embargo, ningún par se encontró formando contacto directo entre ambos dominios de cremallera.<sup>144</sup> Es importante señalar que la TM6 de APH-1A presenta un motivo del tipo  $GxxxGxxxLxxxG$  orientado hacia la región transmembranal, el cual podría fungir como sitio de reconocimiento de péptidos transmembranales con dominios similares (por ejemplo, C99).<sup>145</sup>

La presencia de residuos de prolina en las TMs se ha asociado con la interrupción de la estructura helicoidal de las hélices  $\alpha$  debido a la ausencia del puente de hidrógeno en su cadena principal.<sup>146</sup> En la Figura 6.3 se muestran las interrupciones de hélices causadas por residuos de prolina, todas ellas con isomería *trans*, en la región transmembranal de los componentes PS1, APH-1A y PEN-2.

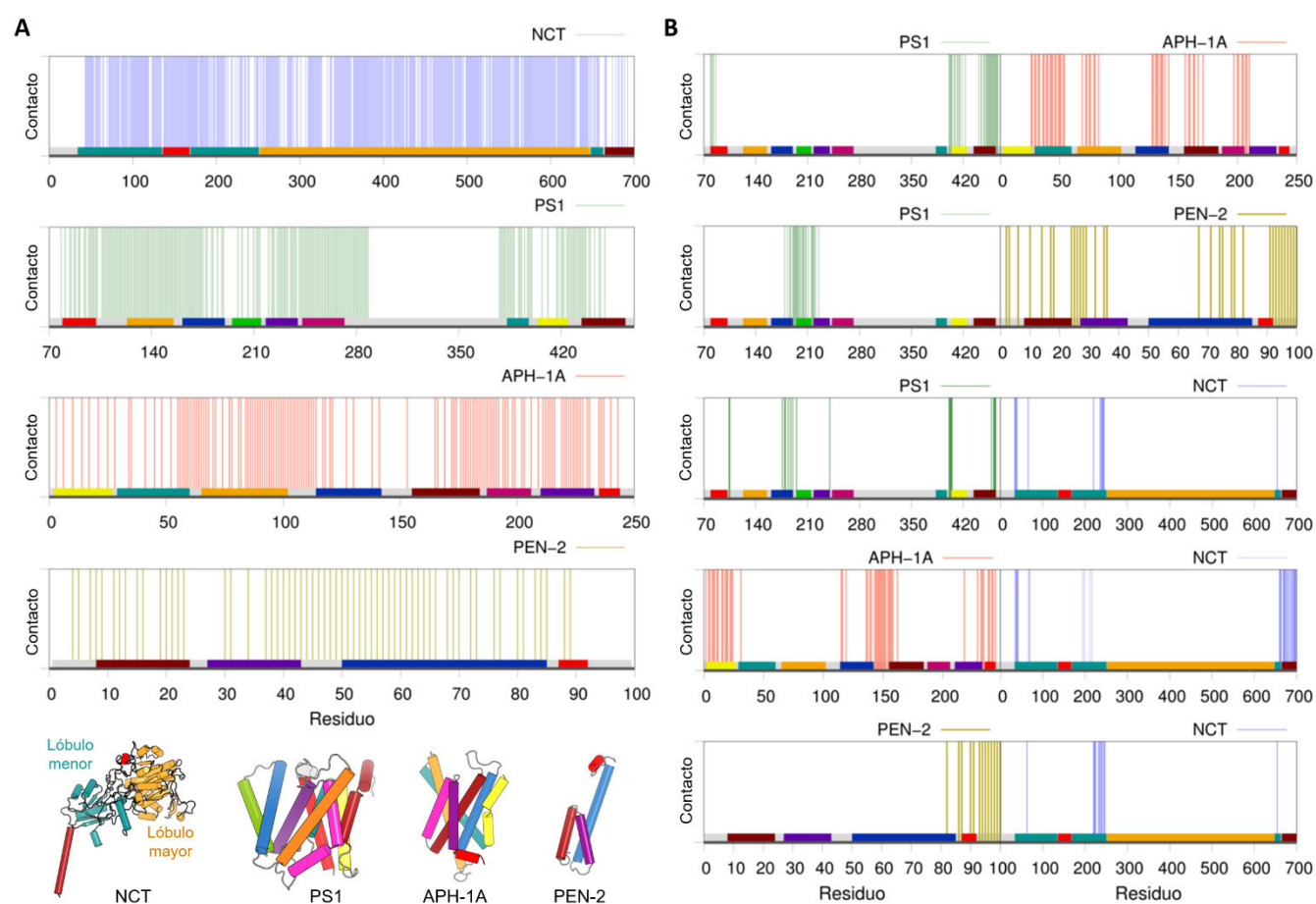


**Figura 6.3.** Representación esquemática de la distribución de los residuos de Gly, His, Trp, Tyr, Phe y Pro en el complejo de  $\gamma$ -secretasa. En la figura inferior izquierda se muestran todas las prolinas presentes en la región transmembranal.

La disposición de los aminoácidos His, Trp y Tyr (“*cinturón aromático*”<sup>138</sup>) en la interfase lípido/agua permite que los residuos aromáticos establezcan el complejo al formar interacciones del tipo catión- $\pi$  con las cabezas de los lípidos, así como puentes de hidrógeno de los grupos polares con las moléculas de agua. La distribución de estos residuos en el complejo de  $\gamma$ -secretasa es consistente con dicha aseveración, pues se observa una preferencia de este grupo de aminoácidos en la interfase membrana/agua. Por otra parte, los residuos de fenilalanina se encuentran distribuidos de forma heterogénea a lo largo de la estructura, pues, al igual que otras proteínas membranales, su localización podría estar involucrada en la interacción con ligandos aromáticos en la parte interna de la proteína.

Los aminoácidos que componen las subunidades del complejo de  $\gamma$ -secretasa se disponen en dos formas principales: (1) interactuando con la misma subunidad o una subunidad contigua, o (2) expuestos hacia los lípidos de la membrana o al medio acuoso. En la *Figura 6.4* se reportan, a manera de gráficos de impulsos, los residuos que se encuentran en contacto directo con (A) la misma u (B) otra subunidad del complejo enzimático (ver *Figuras A.2.1 a 4* del Apéndice II). Al realizar un análisis comparativo de los diagramas de contactos intra- e intersubunidades se aprecia una relación directa entre la ausencia de contactos internos con la presencia de

interacciones entre subunidades. Un ejemplo es el caso de PS1, en la que la ausencia de contactos internos en TM1, TM8 y TM9 se complementa con las interacciones intersubunidad con el componente APH-1A, al igual que lo hacen TM3, TM4 y TM5 con PEN-2. Por su parte, la TM1 de NCT se encuentra en contacto con TM1 y TM4 de APH-1A, presentado pocos contactos con las regiones extracelulares de los componentes PS1 y PEN-2. Resulta interesante que todos los contactos de PS1 con el lóbulo menor de NCT se comparten con los sitios de interacción de APH-1A y PEN-2. El lóbulo menor ECD de NCT y el componente PS1 son los únicos en presentar contacto directo con todas las subunidades del complejo, mientras que el lóbulo mayor de NCT es el único dominio que no interactúa con ninguno de los componentes transmembranales. La conservación de las interacciones antes mencionadas es clave para la caracterización del comportamiento dinámico, pues de estas depende el complejo enzimático para permanecer ensamblado durante la simulación.

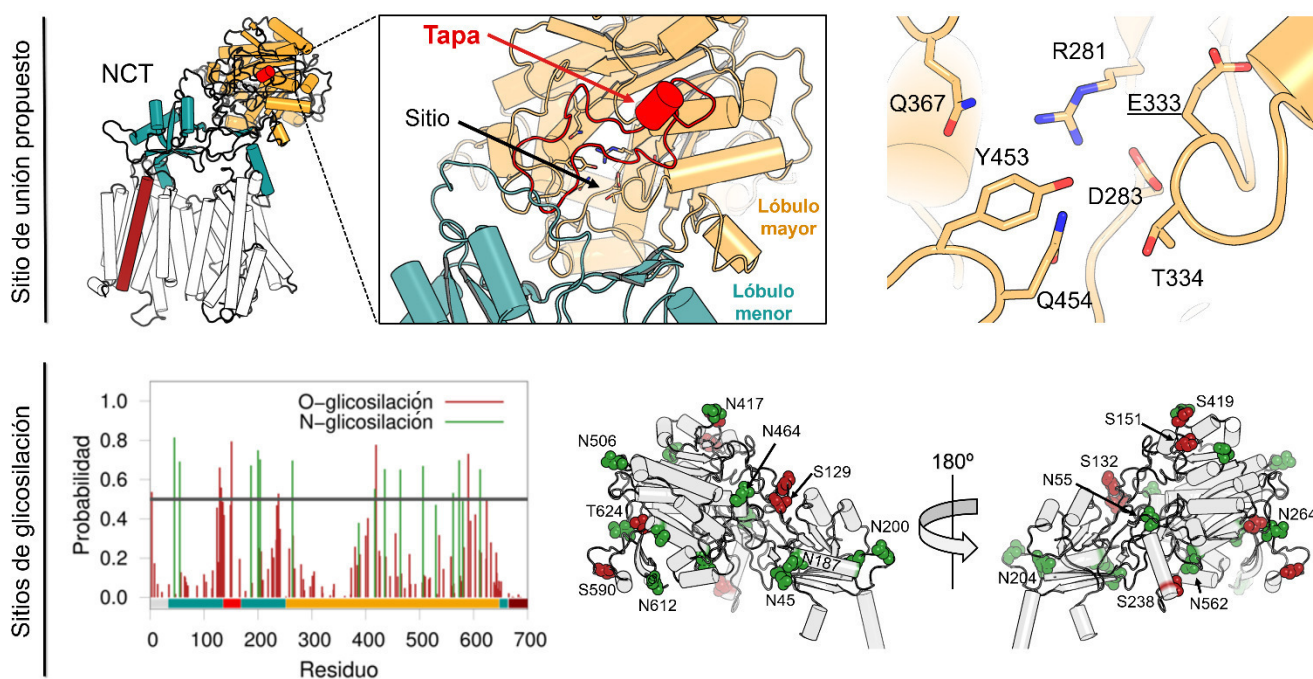


**Figura 6.4.** Gráficos de impulsos en función de los contactos entre residuos de (A) una misma o (B) con otra subunidad del complejo de  $\gamma$ -secretasa. Las TMs de los componentes se encuentran representadas con la banda de colores localizada en la parte inferior de los gráficos, y cuyos colores se definieron con base en las estructuras tridimensionales mostradas en la parte inferior de (A).

## VI.2.1. Posible sitio de reconocimiento del sustrato y motivos glicosilables en NCT

Se han postulado varias teorías acerca del mecanismo por el cual el ECD de NCT reconoce al sustrato para trasladarlo al sitio activo de PS1. Una de estas teorías sugiere que el aminoácido Glu333, junto con otros residuos del lóbulo mayor de ECD, forma un sitio de unión para el reconocimiento del amino N-terminal del sustrato (Figura 6.5).<sup>147</sup> Este mecanismo involucra el desplazamiento de un asa del lóbulo menor con función de “tapa” del sitio, la cual permite la libre rotación del lóbulo mayor con la subsecuente exposición del Glu333 hacia los componentes transmembranales.<sup>68</sup> Sin embargo, un trabajo posterior demostró que la Glu333 sólo es esencial para la maduración del complejo, pero no para la actividad proteolítica de la enzima.<sup>148</sup> Un estudio reciente demostró que la función real del ECD de NCT es la de impedir el ingreso de sustratos con dominios N-terminal voluminosos, por lo que se requiere que sean escindidos de forma inicial por las secretasas ADAM o BACE-1.<sup>66</sup> La caracterización dinámica de este trabajo buscó dictaminar los mecanismos más viables de reconocimiento acorde a los postulados expuestos.

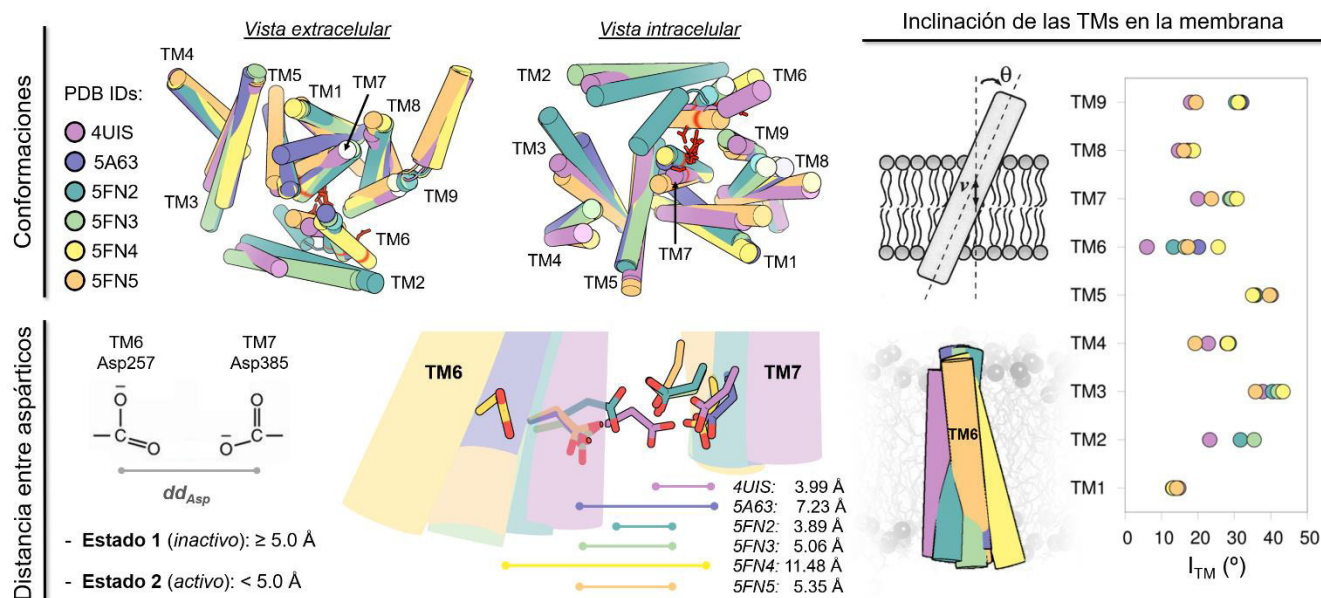
Además del mecanismo de reconocimiento del sustrato, se sabe que el dominio extracelular de NCT presenta varios sitios de glicosilación en su estructura. Para su identificación, se calculó la probabilidad de *N*-glicosilación de asparaginas y *O*-glicosilación de treoninas y serinas con los programas NetNGlyc v1.0 y NetOGlyc v4.0, respectivamente.<sup>149</sup> El reconocimiento de sitios glicosilables se realizó a partir de la identificación de dominios NxS/T en la secuencia, determinando la probabilidad de que ocurriese la modificación postraduccional con base en el grado de exposición del residuo. La Figura 6.5 muestra los sitios predichos con mayor probabilidad de presentar *N*- u *O*-glicosilaciones.



**Figura 6.5.** Representación del posible sitio de unión del amino N-terminal de los sustratos de  $\gamma$ -secretasa localizado en el lóbulo mayor del ECD de NCT (imagen superior). Caracterización de los potenciales sitios de *N*- u *O*-glicosilación del dominio extracelular de NCT.

## VI.2.2. Descripción de los estados conformacionales de PS1

Como se mencionó anteriormente, PS1 fue el único componente en presentar cambios conformacionales significativos entre las seis estructuras determinadas por crio-EM. La superposición de las estructuras de PS1 mostrada en la *Figura 6.6* permite visualizar cambios importantes en la orientación y disposición principalmente de las TMs que contienen a los residuos de aspártico catalíticos (i.e. TM6 y TM7). Para la descripción de estos cambios conformacionales, se emplearon dos parámetros de orden: (1) la distancia entre los carbonos  $\gamma$  de los aspárticos catalíticos ( $dd_{Asp}$ ) y (2) el ángulo de inclinación de la hélice relativo al vector normal del plano XY de la membrana ( $I_{TM}$ ). Para el caso de la distancia, se observa una amplia distribución de valores de  $dd_{Asp}$  entre los 3.89 y 11.48 Å. Cabe recordar que para definir la forma *activa* (*estado 2*) de una proteasa se requiere un valor de  $dd_{Asp}$  menor a 5.00 Å, por lo que los modelos 4UIS y 5FN2 serían los únicos en dicho estado (ver *Figura 6.6*).<sup>61</sup> Las estructuras 5FN3 y 5FN5 se encuentran en un estado *semiactivo*, mientras que el valor de  $dd_{Asp}$  en los modelos 5A63 y 5FN4 sugiere que estos presentan una conformación *inactiva* (*estado 1*). La representación tridimensional de la distancia entre los aspárticos catalíticos sugiere que el parámetro  $dd_{Asp}$  está directamente relacionado con la inclinación de TM6. Esto se confirmó al analizar la distribución del  $I_{TM}$  de TM6, pues las formas *activas* presentan valores de  $I_{TM}$  inferiores a 15°, siendo superiores a este en el caso de las estructuras en el estado *inactivo*. Resulta interesante observar que TM2 sólo se resolvió en las estructuras con valores de  $dd_{Asp}$  bajos, lo que sugiere una posible relación entre la flexibilidad y/u orientación de esta TM con el ángulo de inclinación de TM6. Esta relación se explica además por la proximidad que presentan estas TMs en la estructura. Las TMs restantes no muestran una relación directa entre  $dd_{Asp}$  e  $I_{TM}$ . Debido a su gran funcionalidad en la descripción conformacional, se emplearán los parámetros de orden  $dd_{Asp}$  e  $I_{TM}$  a lo largo del presente trabajo.

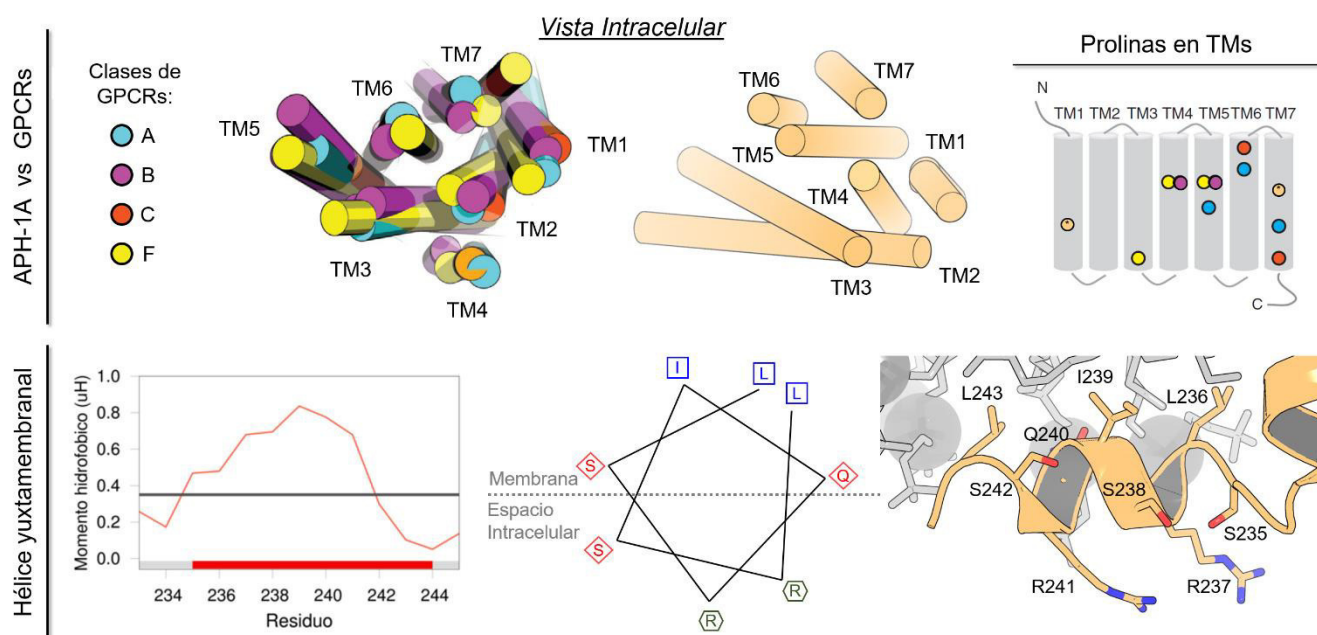


**Figura 6.6.** Vista extracelular e intracelular de la superposición del componente PS1 de las estructuras de crio-EM de  $\gamma$ -secretasa (PDB IDs: 4UIS, 5A63, 5FN2, 5FN3, 5FN4 y 5FN5). Representación de la distancia entre los aspárticos catalíticos ( $dd_{Asp}$ ) y gráfico del ángulo de inclinación de las TMs respecto a la membrana ( $I_{TM}$ ).<sup>72</sup>

## VI.2.3. Comparación de APH-1A con GPCRs

En el año 2015, Sun y colaboradores<sup>67</sup> reportaron por primera vez la estructura de APH-1A, y señalaron que las siete TMs que componen dicha subunidad se disponen de una forma nunca antes descrita. La presencia de las siete TMs sugirió en primera instancia una posible relación con la topología de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Sin embargo, el orden y disposición de las TMs difiere entre ellas.<sup>150</sup> La *Figura 6.7* muestra la comparación topológica entre las cuatro clases de GPCRs y el componente APH-1A. En esta figura se aprecia que la disposición espacial de TM4 y TM5 difiere entre ambas estructuras, así como el ángulo de inclinación de TM2 y TM3. Además, APH-1A presenta una prolina que interrumpe la estructura helicoidal de TM1, la cual no se encuentra en los GPCRs. La única relación estructural que comparten los GPCRs y APH-1A es la presencia de una hélice yuxtamembranal en el segmento C-terminal de TM7 (*Figura 6.7*). Al calcular el momento hidrofóbico ( $\mu\text{H}$ )<sup>151,152</sup> de esta hélice es posible apreciar una distribución homogénea de los aminoácidos en los giros de la misma, donde los residuos hidrofóbicos (Ile y Leu) se disponen hacia la región transmembranal y los hidrofílicos hacia las cabezas de los lípidos (Ser y Gln) o al medio intracelular (Arg).

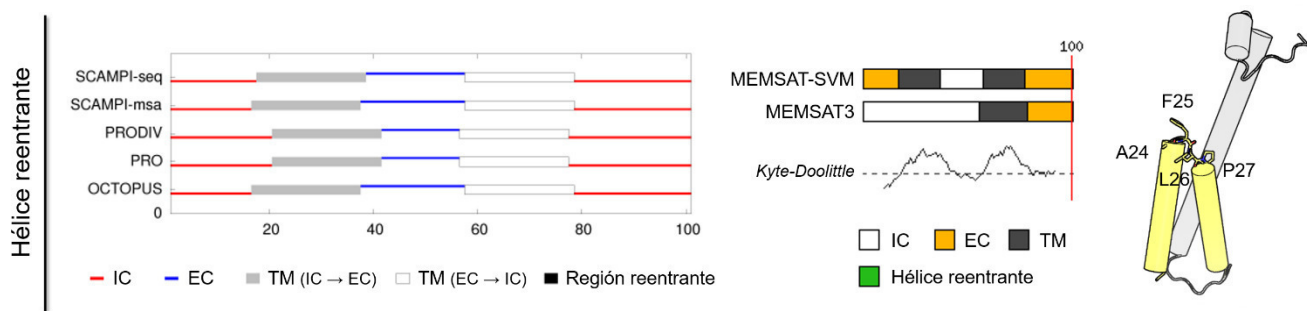
Durante la descripción de la estructura, el grupo de Yigong Shi<sup>67</sup> mencionó que la cavidad central de APH-1A, la cual se encuentra ocupada por el segmento C-terminal del PS1, es similar al sitio de reconocimiento de moléculas pequeñas en los GPCRs. Además, nuestro análisis de IH y distribución de residuos cargados sugieren que la región interna de APH-1A podría estar involucrada en la interacción con moléculas exógenas polares o cargadas, por lo que la región C-terminal de PS1 podría estar cumpliendo una función moduladora de reconocimiento.



**Figura 6.7.** Comparación de la topología y localización de prolina transmembranales de APH-1A con la superposición de las cuatro clases de GPCRs reportada por Venkatakrisnan y colaboradores<sup>150</sup>. Determinación del momento hidrofóbico ( $\mu\text{H}$ ) de la hélice yuxtamembranal y representación de su orientación en la interfase lípido/agua.

## VI.2.4. Predicción de la estructura de PEN-2

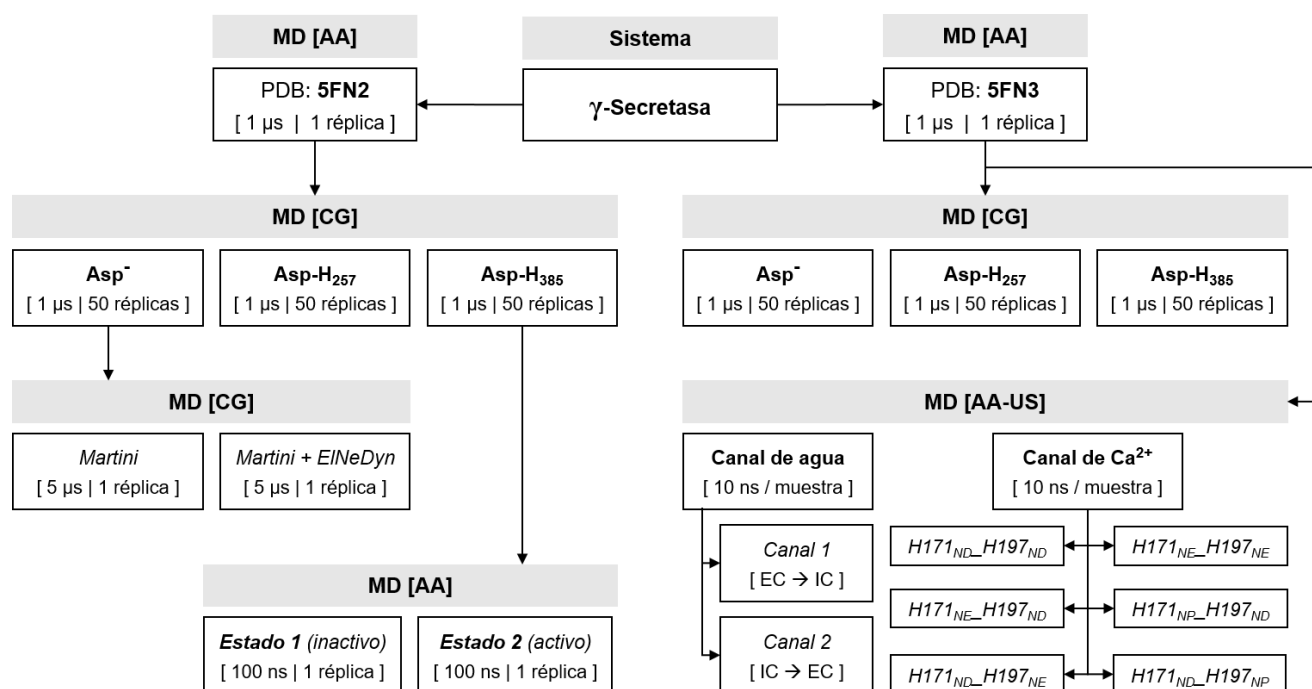
Estudios experimentales iniciales determinaron que PEN-2 estaba constituido por 2 hélices transmembranales, exponiendo las regiones N- y C-terminal al espacio extracelular.<sup>65,153</sup> Sin embargo, la estructura resuelta por el grupo de Yigong Shi<sup>67</sup> mostró que la primera TM presenta una región reentrante entre los aminoácidos Ala24 y Pro27. Al igual que en APH-1A, la topología observada para PEN-2 es única para su secuencia, pues ninguno de los predictores de regiones transmembranales empleados en este trabajo (OCTOPUS<sup>154</sup> y MEMSAT<sup>155</sup>) fue capaz de identificar la presencia de la hélice reentrante de este componente (ver *Figura 6.8*). Una posible explicación a la formación de esta estructura es la interrupción de la forma helicoidal causada por Pro27. El análisis de contactos muestra que la formación de esta región reentrante es fundamental para que PEN-2 interactúe con TM3, TM4 y TM5 de PS1, favoreciendo posiblemente la interacción y estabilidad dinámica entre ambas subunidades.



**Figura 6.8.** Predicción de las regiones transmembranales de PEN-2 con los programas OCTOPUS y MEMSAT, y representación de los aminoácidos que componen la región reentrante en la hélice.

## VII. Caracterización dinámica de la enzima $\gamma$ -secretasa

En este capítulo se describen las simulaciones de dinámica molecular (MD) multiescala, a nivel de todos los átomos (AA) y de grano grueso (CG), del complejo  $\gamma$ -secretasa (PDB: 5FN2 y 5FN3<sup>70</sup>) realizadas en este proyecto de investigación. Las simulaciones AA sirvieron como referencia para la generación de los modelos de CG, así como para el “muestreo de sombrilla” (*Umbrella Sampling*, US) empleado para describir un posible canal de agua en el componente APH-1A. Con los modelos de CG se estudió el efecto de la protonación de los residuos de aspártico catalíticos mediante la evaluación de su forma desprotonada (Asp<sup>-</sup>) y de los estados monoprotonados (Asp-H<sub>257</sub> y Asp-H<sub>385</sub>).<sup>156</sup> El *Esquema 7.1* muestra el algoritmo general de trabajo seguido en esta sección.



**Esquema 7.1.** Diagrama de trabajo empleado para la caracterización dinámica del complejo de  $\gamma$ -secretasa.

### VII.1. Metodología

#### VII.1.1. Preparación de los modelos

Se emplearon a los complejos de  $\gamma$ -secretasa con claves PDB: 5FN2 y 5FN3 como modelos de referencia por ser las estructuras de crio-EM con la mayor información estructural y al encontrarse el componente PS1 en el *estado 2 (activo,  $dd_{Asp} = 3.89 \text{ \AA}$ )* y el *estado 1 (semiaactivo o inactivo,  $dd_{Asp} = 5.06 \text{ \AA}$ )*, respectivamente. El asa intracelular que conecta a TM6 y TM7 del componente PS1 (aminoácidos 264 a 377) fue la única región que no logró resolverse en estas estructuras, y cuya longitud difiere entre ambas por la presencia del fragmento de aminoácidos 264 a 288 en 5FN2. Debido a la extensión de la secuencia y a la poca información estructural, no se modeló esta asa en el presente trabajo. Se completaron las cadenas laterales faltantes en las estructuras con el servidor web WHAT IF<sup>157</sup>. Finalmente, se empleó el programa LAMBADA y el servidor web *Orientation of Proteins in Membranes* (OPM)<sup>158</sup> para orientar los modelos 5FN2 y 5FN3 respecto a la bicapa lipídica.



### VII.1.2. Simulaciones de dinámica molecular atomísticas (AA)

Cada modelo se embebió en una membrana de 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina (POPC) al ser la bicapa lipídica donde  $\gamma$ -secretasa presenta el 100 % de actividad según Osenkowski y colaboradores<sup>86</sup>. El sistema se construyó con la herramienta *membrane builder*<sup>159</sup> del servidor web CHARMM-GUI<sup>160</sup>. Los complejos generados se solvataron con moléculas de agua (modelo TIP3P), algunas de las cuales se reemplazaron de forma estocástica por iones Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> para neutralizar la carga del sistema y alcanzar una concentración 0.15 M. El sistema derivado de 5FN2 consistió en el complejo proteico, 320 lípidos de POPC, 46078 moléculas de agua, 143 iones Cl<sup>-</sup> y 148 iones Na<sup>+</sup>; mientras que el sistema derivado de 5FN3 lo conformó el complejo proteico, 326 lípidos de POPC, 46827 moléculas de agua, 145 iones Cl<sup>-</sup> y 150 iones Na<sup>+</sup>. Se llevaron a cabo aproximadamente 5,000 pasos de minimización de energía para cada sistema empleando el algoritmo *steepest descent*. Los sistemas optimizados se sometieron a dos ensambles canónicos (NVT) y un ensamble isotérmico-isobárico (NPT) durante periodos de 250 ps y paso de tiempo ( $\Delta t$ ) de 0.001 ps, a los cuales siguieron tres ensambles NPT de 1,000 ps con  $\Delta t$  de 0.002 ps. Para las simulaciones se fijó la temperatura a 310 K con el termostato de Nosé-Hoover<sup>161</sup>, estableciendo en los ensambles NPT una presión de 1.0 bar y un acoplamiento semi-isotrópico con el baróstato de Parinello-Rahman<sup>162</sup>. En cada equilibrio se emplearon diferentes valores de constantes de fuerza en las restricciones armónicas definidas para los iones, moléculas de agua, lípidos (cabezas y colas) y proteína (cadenas laterales y cadena principal). Con los sistemas resultantes, se llevaron a cabo simulaciones de MD por un periodo de 1,000 ns (1  $\mu$ s) con un tiempo de integración de 0.002 ps. El cálculo del potencial de Lennard-Jones se truncó entre los 0.9 y 1.2 nm, mientras que las interacciones electrostáticas se calcularon entre los 0.0 y 1.2 nm, después de los cuáles se calcularon con el método de la partícula en la malla de Ewald (PME). La lista de vecinos se actualizó cada 20 pasos y se constriñeron los enlaces que involucraban hidrógenos no polares con el algoritmo de LINCS<sup>163</sup>. Ambas simulaciones se llevaron a cabo con el campo de fuerza CHARMM36<sup>164</sup> en el programa GROMACS 5.0.6<sup>165</sup>.

Para la obtención de la raíz de la desviación cuadrática media (RMSD), raíz de la fluctuación cuadrática media (RMSF), representación del factor B calculado [ $factor\ B_{calculado} = (8/3)\pi^2(RMSF_{backbone})^2$ ], helicidad y curvatura de las TMs, análisis de componentes principales (PCA) y contactos entre residuos se emplearon las herramientas de análisis de GROMACS. El cálculo de las contribuciones por residuo de las interacciones no polares entre subunidades se realizó con el script *g\_mmpbsa.py*<sup>166</sup>. Con las librerías de *MdAnalysis*<sup>167</sup> implementadas en Python se calcularon: las distancias entre átomos o centros de masa/geometría (*distances*), el ángulo de inclinación de las TMs en la membrana (*helanal*), puentes de hidrógeno (*hbonds*), mapas de densidad (*density*) y posición de partículas en el espacio (*coordinates*). El cálculo del pK<sub>a</sub> (pH = 7) de los aminoácidos titulables se realizó con el módulo PROPKA v3.1<sup>168</sup> del servidor web PDB2PQR<sup>169</sup>. Las cavidades y canales se analizaron con el servidor web CHEXVIS<sup>170</sup> y con el programa CAVER v3.0<sup>171</sup> ( $r_{átomo\_prueba} = 0.08$  nm). Los gráficos se generaron con el programa Gnuplot v5.0<sup>172</sup> y las figuras con los visualizadores PyMOL v0.9 y VMD v1.9.2<sup>173</sup> (módulo: Bendix<sup>174</sup>).

### VII.1.3. Simulaciones de dinámica molecular de grano grueso (CG)

Se construyeron tres modelos de grano grueso (CG) de los posibles estados de protonación de los aspárticos catalíticos para cada complejo de  $\gamma$ -secretasa: un sistema desprotonado (Asp<sup>-</sup>) y dos con la monoprotonación de los aspárticos (Asp-H<sub>257</sub> y Asp-H<sub>385</sub>). Cada complejo proteico se embebió en una membrana de POPC con el

módulo *Martini Maker*<sup>175</sup> del servidor web CHARMM-GUI, utilizando el campo de fuerza Martini v2.2<sup>130</sup> con el modelo de moléculas de agua polarizables.<sup>176</sup> Se minimizó la energía de los sistemas para posteriormente ser sometidos a cinco ensambles NPT de 1,000 ps con valores de  $\Delta t$  de 0.002, 0.005, 0.010, 0.015 y 0.020 ps. Para las simulaciones se fijó una temperatura de 310 K con el termostato modificado de Berendsen (*V-rescale*)<sup>177</sup> y una presión de 1.0 bar con un acoplamiento semi-isotrópico del baróstato de Berendsen<sup>178</sup>. Al igual que las simulaciones atomísticas, se emplearon diferentes constantes de fuerza para las restricciones armónicas de los componentes del sistema durante los equilibrios. Se simularon 50 réplicas de MD para cada uno de los sistemas de los modelos 5FN2 y 5FN3 por un periodo de 1  $\mu$ s por réplica (total = 300  $\mu$ s). Adicionalmente, se comparó la estabilidad del sistema y el método de muestreo conformacional del modelo de Martini v2.2 convencional y uno modelo con redes elásticas (EINeDyn)<sup>179</sup>, realizando dos simulaciones de 5  $\mu$ s del sistema 5FN2.

Se seleccionaron las conformaciones más representativas del *estado 1 (inactivo)* y *estado 2 (activo)* en el sistema monoprotonado Asp-H<sub>385</sub> de 5FN2 realizando un agrupamiento (*clustering*) de conformaciones con valores de RMSD menores a 0.20 nm de las 50 trayectorias. Los sistemas fueron traducidos de CG a AA con el script *backward.py*<sup>180</sup> y simulados durante 100 ns de MD, siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

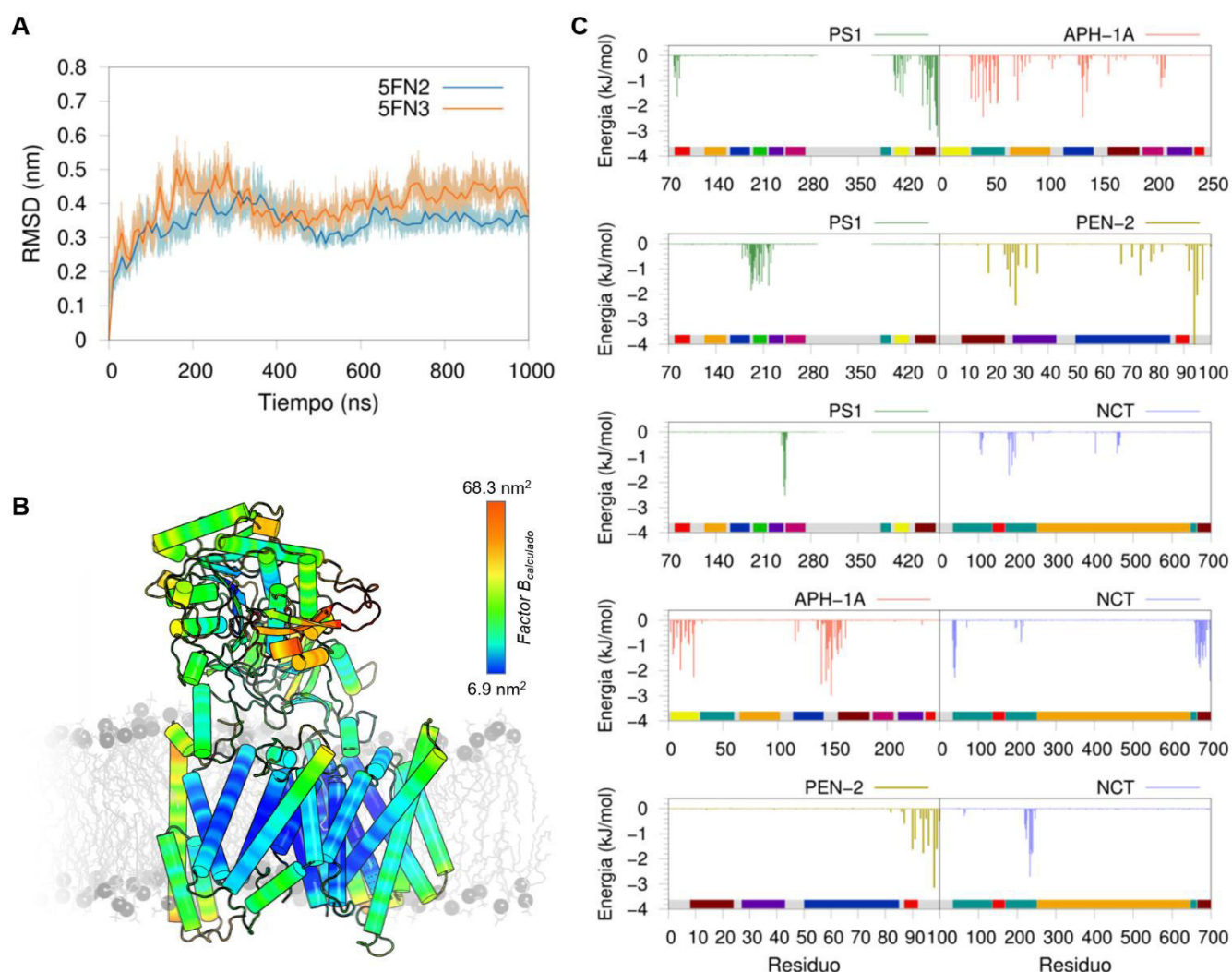
#### VII.1.4. Muestreo de sombrilla

Se calculó el tiempo de residencia y factor de ocupación de las moléculas de agua en las simulaciones atomísticas de 5FN2 y 5FN3 con la herramienta *select* de GROMACS y la librería *density* de MdAnalysis. De las moléculas de agua que cruzaban a través del componente APH-1A de 5FN3, se describieron los canales de transporte extracelular a intracelular (*Canal 1*, EC  $\rightarrow$  IC) y viceversa (*Canal 2*, IC  $\rightarrow$  EC) con la librería *coordinates* de MdAnalysis. Se empleó la trayectoria de una molécula de agua por canal para establecer las coordenadas de reacción ( $\xi$ ) en el eje Z de cada sistema. La definición de este último se utilizó para extraer las configuraciones de las moléculas de agua cada 0.15 nm, resultando en 35 configuraciones para el *Canal 1* y 20 para el *Canal 2*. Los sistemas de cada configuración se sometieron a simulaciones de *Umbrella Sampling* (US) por periodos de 10 ns (total = 550 ns) aplicando una constante de fuerza de 500 kJ mol<sup>-1</sup> nm<sup>-2</sup> a la partícula de agua seleccionada. A partir del método de análisis de histogramas ponderados (WHAM) realizado a los últimos 8 ns de cada configuración se calculó el perfil del potencial de fuerza media (PMF) de las moléculas de agua.

En las simulaciones atomísticas también se calculó la posición, distancias, ángulos y ángulos diedros de las interacciones entre el ion Na<sup>+</sup> y los aminoácidos Gln83, His171, His197 de APH-1A e Ile467 de PS1 con las herramientas *mindist* y *gangle* de GROMACS. Se intercambié el ion Na<sup>+</sup> por un ion Ca<sup>2+</sup> para definir el  $\xi$  en el eje Z con base en la información del *Canal 1*, llevando a la neutralidad el sistema con el reemplazo estocástico de un ion Na<sup>+</sup> por una molécula de agua o ion Cl<sup>-</sup>. Con el sistema generado se muestreó la posición del ion Ca<sup>2+</sup> a lo largo del eje Z durante 500 ps de simulación aplicando una constante de fuerza a la partícula de 500 kJ mol<sup>-1</sup> nm<sup>-2</sup> con una velocidad de 0.01 nm ps<sup>-1</sup>. De la trayectoria resultante se extrajeron configuraciones cada 0.15 nm, las cuales se sometieron a simulaciones de 10 ns de US con una constante de fuerza de 500 kJ mol<sup>-1</sup> nm<sup>-2</sup>. Para este estudio se generaron y simularon con US las coordenadas del transporte del ion Ca<sup>2+</sup> para las seis posibles combinaciones de tautómeros (ND o NE) y protómeros (NP) de las histidinas 171 y 197: (1) H171<sub>ND</sub>\_H197<sub>ND</sub>, (2) H171<sub>ND</sub>\_H197<sub>NE</sub>, (3) H171<sub>NE</sub>\_H197<sub>ND</sub>, (4) H171<sub>NE</sub>\_H197<sub>NE</sub>, (5) H171<sub>NP</sub>\_H197<sub>ND</sub> y (6) H171<sub>ND</sub>\_H197<sub>NP</sub>.

## VII.2. Resultados y Discusión

Se realizaron simulaciones de dinámica molecular (MD) multiescala, combinando modelos de todos los átomos (AA) y de grano grueso (CG), para estudiar los diferentes estados conformacionales en las estructuras 5FN2 y 5FN3 del complejo de  $\gamma$ -secretasa. Las estructuras iniciales presentan dos diferencias importantes: (1) 5FN3 carece del fragmento C-terminal de TM6 en PS1 (aminoácidos 264 a 288) presente en el modelo 5FN2 y (2) 5FN3 tiene una distancia mayor entre los residuos de aspártico catalíticos (5.06 Å) comparado con 5FN2 (3.89 Å). Los sistemas generados con los modelos AA fueron simulados por 1,000 ns (1  $\mu$ s) con la finalidad de estabilizar al complejo en la membrana de POPC y estudiar su comportamiento dinámico al equilibrio.

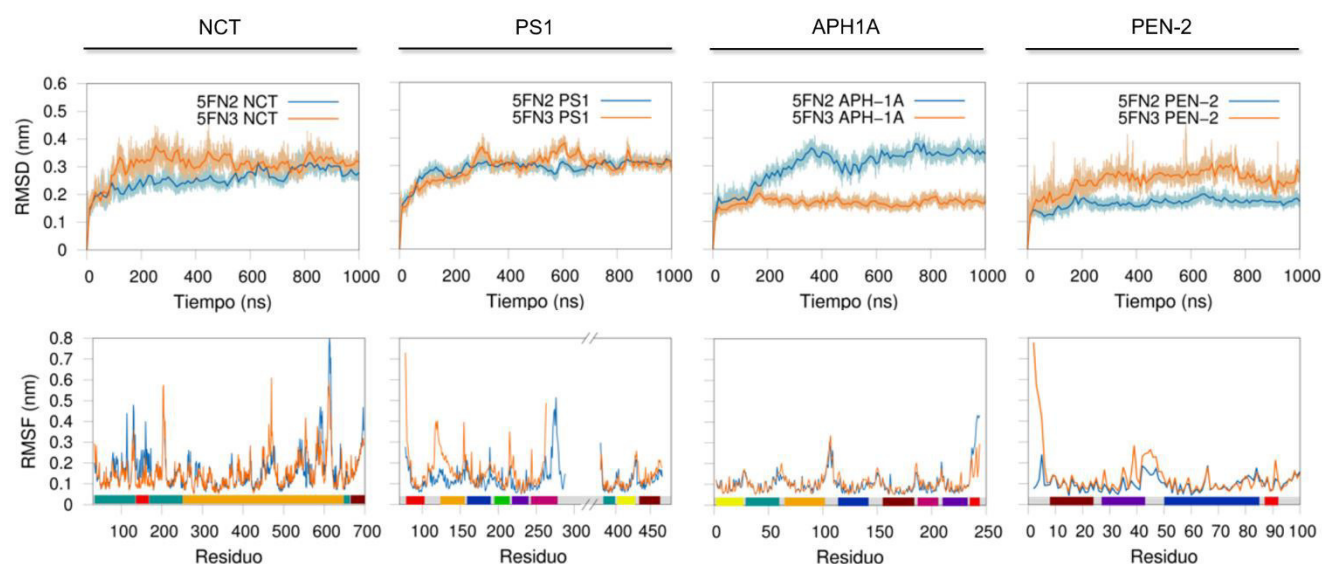


**Figura 7.1.** (A) Gráfico de la raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) de la cadena principal, (B) representación estructural del factor B calculado a partir de la fluctuación cuadrática media (RMSF) de la cadena principal del modelo 5FN2, y (C) contribuciones por residuo de la energía de interacción no polar calculada entre subunidades.

En el gráfico de RMSD de la *Figura 7.1A* se observa que ambos complejos de  $\gamma$ -secretasa alcanzaron la condición de equilibrio después de los 600 ns de simulación. Por su parte, el análisis de fluctuación de la cadena

principal (factor  $B_{calculado}$ ) reveló la alta movilidad del dominio ECD de NCT y la relativa baja movilidad de las TMs (*Figura 7.1B*). Sin embargo, la exposición a la bicapa lipídica y el bajo número de contactos proteína-proteína de PEN-2, TM5-7 de APH-1A y PS1-TM2 propició una alta movilidad de estas regiones en comparación con el núcleo de la estructura. Estos hallazgos son consistentes con reportes experimentales previos, en los que se ha descrito la importancia de PEN-2 y APH-1A en la estabilización de PS1.<sup>73</sup> Asimismo, estos resultados explican la alta movilidad e inestabilidad observadas en las simulaciones realizadas por otros grupos de investigación con el componente PS1 aislado.<sup>131,132</sup> Por otra parte, en los gráficos de RMSD por subunidad de la *Figura 7.2* se observa que los cambios conformacionales de cada componente son menores a los 0.45 nm. El RMSF de las cadenas laterales calculado para los últimos 400 ns de simulación mostró que los residuos del dominio ECD de NCT son los que presentan la mayor fluctuación, debido a que estos se encuentran en asas expuestas al medio acuoso. Los componentes transmembranales muestran una baja movilidad de las cadenas laterales presentes en las TMs con fluctuaciones moderadas en las asas que las conectan. En el caso de PS1, se obtuvieron valores altos de RMSF en el asa HL1 (*hydrophilic loop*) que conecta a TM1 y TM2 en 5FN3, la cual se cree que está involucrada en el mecanismo de reconocimiento e internalización del sustrato.<sup>76,181</sup> Además, se observa una alta movilidad de la región C-terminal de TM6 y N-terminal de TM7 de PS1 debido a la ausencia estructural del asa intracelular.

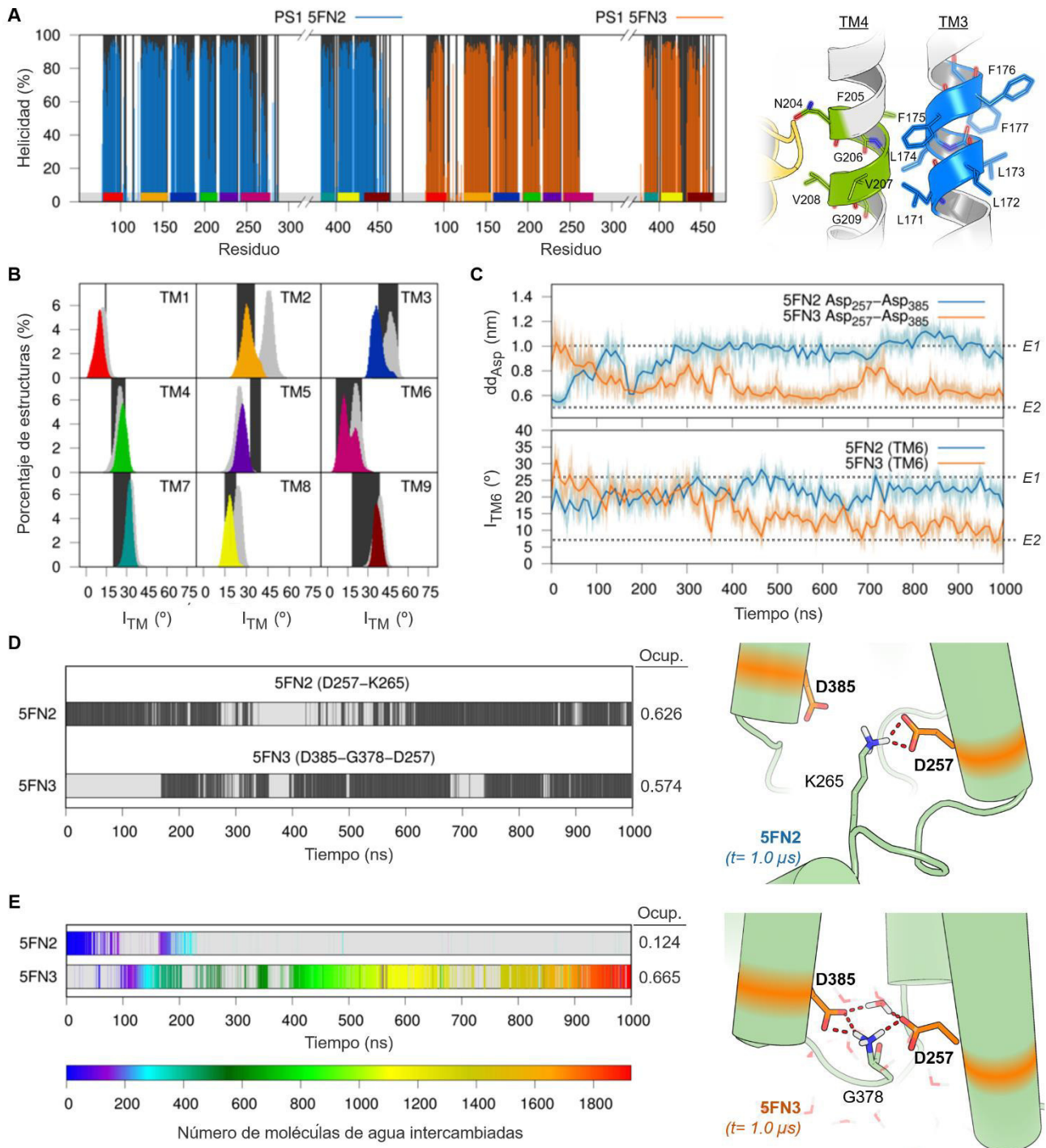
El análisis de la contribución de las interacciones no polares intersubunidad mostró que TM1, TM8 y TM9 de PS1 se encuentran involucradas en la interacción con APH-1A, siendo la región C-terminal de TM9 la de mayor contribución debido a su disposición en la estructura de este componente (*Figura 7.1C*). Por su parte, el asa reentrante, TM3 y el fragmento C-terminal de PEN-2 están involucrados en la interacción con TM3, TM4 y TM5 de PS1. Además, los fragmentos C-terminales de PEN-2-TM3 y PS1-TM5 presentan contactos significativos con el dominio ECD de NCT, al igual que el asa que conecta TM4-TM5 en APH-1A. Al comparar estos resultados con los mapas de contactos generados con el modelo inicial en la sección anterior (ver *Figura 6.1.4B*), podemos constatar la alta conservación de las interacciones entre subunidades durante la simulación.



**Figura 7.2.** Gráficos de RMSD de cadena principal y RMSF de cadena lateral por subunidad del complejo de  $\gamma$ -secretasa.

Los pequeños cambios a nivel estructural y en las interacciones intersubunidad demuestran que el componente catalítico PS1 se mantuvo estable en el complejo a lo largo de las simulaciones de MD. Para confirmar la conservación de la estructura secundaria en las TMs de PS1, se calculó el porcentaje de helicidad por residuo de los últimos 700 ns de simulación de cada sistema (*Figura 7.3A*). En estos se observa que las TMs de PS1 mantuvieron un alto porcentaje de helicidad al compararse con las estructuras iniciales; sin embargo, la región intermedia de TM4 presenta una reducción en el valor esperado de helicidad. Esto último se debe a la presencia del motivo GxxxG (ver capítulo anterior), cuya interacción con el asa reentrante de PEN-2 y el motivo LLLLLFF de TM3 da lugar a un cambio en la curvatura de la TM que interrumpe el puente de hidrógeno de cadena principal de TM4, resultando en la pérdida de su estructura helicoidal. Es importante señalar que esto también afecta a la hélice de TM3, pues el motivo LLLLLFF presenta una disminución significativa del porcentaje de helicidad en el sistema de 5FN3.

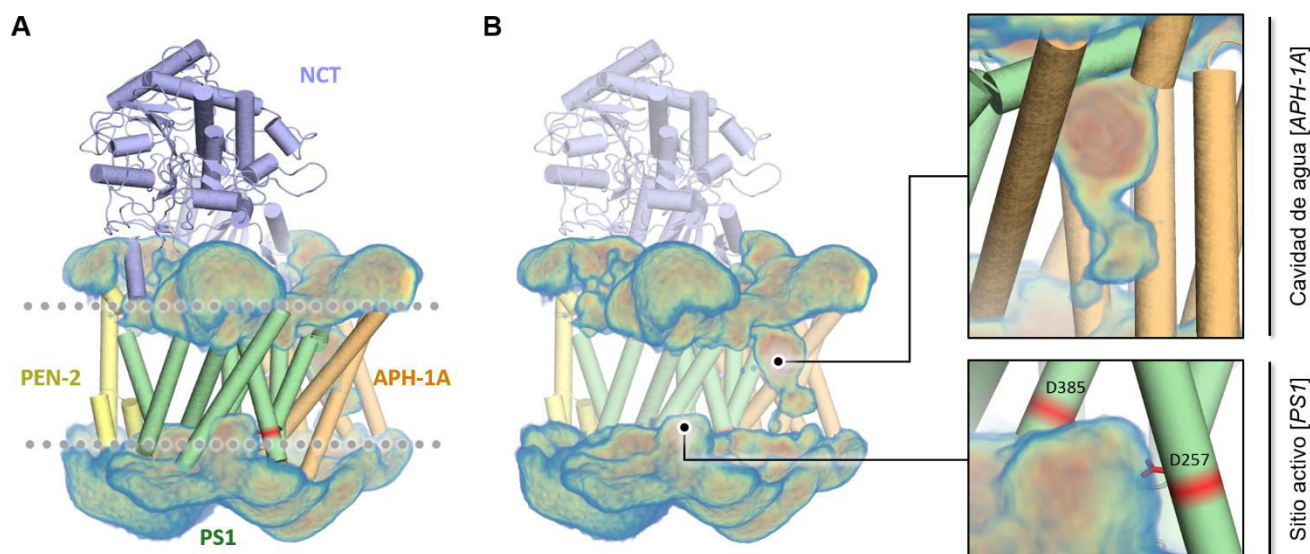
Durante el análisis estructural de PS1, realizado en el capítulo anterior de este trabajo, se demostró que los parámetros de orden de (1) distancia entre los residuos de aspártico catalíticos TM6-Asp257 y TM7-Asp385 ( $dd_{Asp}$ ) y (2) el ángulo de inclinación de las TMs respecto a la membrana ( $I_{TM}$ ) permiten describir el *estado 1* (*inactivo*) y *estado 2* (*activo*) de este componente. Estos parámetros se emplearon como referencia en esta sección para estudiar el cambio conformacional de PS1 a lo largo de las trayectorias de AA-MD de los sistemas 5FN2 y 5FN3. En los diagramas de distribución de los valores de  $I_{TM}$  de la *Figura 7.3B* se observa que la mayoría de las TMs mantuvieron ángulos de inclinación dentro del rango observado en las seis estructuras de crio-EM. La excepción a este comportamiento fue el caso de TM5, el cual presentó un  $I_{TM}$  con distribución similar en ambos sistemas, por lo que su modificación podría asociarse al rearrreglo dinámico de PS1 en la membrana. Como se mencionó en el capítulo anterior, el valor de  $I_{TM}$  de TM6 es uno de los parámetros que permite relacionar directamente el cambio conformacional con los estados de activación, encontrándose a la forma *activa* (*estado 2*,  $dd_{Asp} < 5.0 \text{ \AA}$ ) con valores de  $I_{TM}$  menores  $15^\circ$  y mayores a este valor para la forma *inactiva* (*estado 1*,  $dd_{Asp} \geq 5.0 \text{ \AA}$ ). En este caso, la media de distribución de TM6 en el sistema 5FN2 es de  $21.0^\circ$ , mientras que 5FN3 muestra una distribución bimodal con modas de  $12.1^\circ$  y  $20.4^\circ$ , respectivamente. Esto último sugiere que el componente PS1 de 5FN2 se inactivó durante la simulación, mientras que en 5FN3 visitó ambos estados, manteniéndose la mayor parte del tiempo en la forma *activa*. Además, el aumento observado en el ángulo de inclinación de TM2 en 5FN2 confirma nuestra hipótesis de que este cambio está relacionado directamente con el aumento en el ángulo de inclinación de TM6. Asimismo, la transición del estado *inactivo* al *activo* en 5FN3 conllevó a la disminución del ángulo de inclinación inicial de TM2 ( $I_{TM2} = 35.9^\circ$ ) hasta los  $30.0^\circ$ . Para estudiar la relación entre los estados de activación definidos por  $dd_{Asp}$  y los cambios de  $I_{TM}$  observados, se analizaron ambos parámetros en función del tiempo de simulación para cada sistema (*Figura 7.3C*). En los gráficos se observa que 5FN3 inicia con un valor de  $dd_{Asp}$  cercano a los 0.9 nm y un  $I_{TM6}$  entre  $20\text{-}25^\circ$  (E1), pero conforme avanza la simulación la distancia disminuye hasta los 6.0 Å con un ángulo de inclinación menor a los  $10^\circ$  (E2). Por otro lado, la simulación de 5FN2 sufre el comportamiento contrario, dando lugar a un aumento en los valores de  $dd_{Asp}$  e  $I_{TM6}$  desde los primeros 100 ns hasta el final de la simulación (E2  $\rightarrow$  E1). Estos resultados confirman la relación existente entre los parámetros de orden empleados y su utilidad para describir el cambio conformacional de PS1 entre los dos estados de activación.



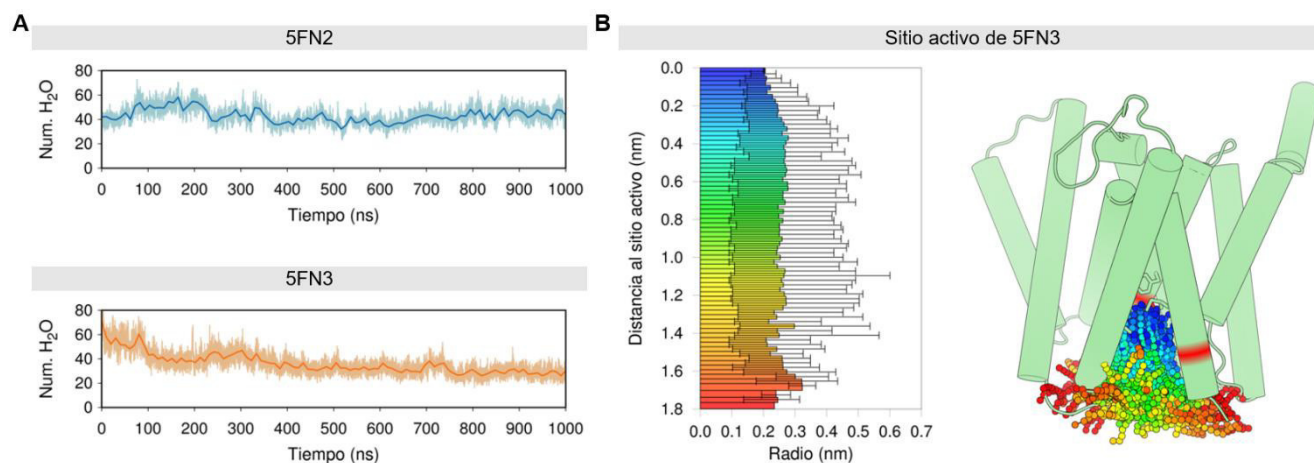
**Figura 7.3.** (A) Porcentaje de helicidad de las TMs de PS1 en los últimos 700 ns de las simulaciones de los sistemas derivados de 5FN2 y 5FN3, comparados con los valores de las estructuras de crío-EM (negro). El esquema de la derecha muestra la interacción del motivo GxxxG en TM4 con TM3 y PEN-2. (B) Gráficos de distribución del ángulo de inclinación de las TMs ( $I_{TM}$ ) de PS1 en la membrana durante las simulaciones de MD de 5FN2 (gris) y 5FN3 (color), y comparación con el rango de valores provenientes de las estructuras de crío-EM (negro). (C) Distancia entre los aspárticos ( $dd_{Asp}$ ) y ángulo de inclinación de TM6 ( $I_{TM6}$ ) en función del tiempo de simulación. Los cambios conformacionales de las estructuras se denotan con base en el estado 1 ( $E1$ ) y estado 2 ( $E2$ ) de PS1. (D) Frecuencia de formación de puentes de hidrógeno de los residuos de aspártico catalíticos con los residuos cercanos y (E) de la interacción de los aspárticos por puenteo con moléculas de agua. El valor del factor de ocupación (Ocup.) de las interacciones se muestra al final de cada diagrama. Las estructuras de la derecha representan las interacciones en el tiempo final de la simulación.

Para dar una explicación a los cambios conformacionales observados en los sistemas 5FN2 y 5FN3, se analizó la interacción por puente de hidrógeno de los residuos de aspártico catalíticos con los aminoácidos y moléculas de agua cercanas. En la *Figura 7.3D-E* se presentan los diagramas de frecuencia de formación de puentes de hidrógeno por parte de los residuos de aspártico catalíticos con los residuos cercanos y su interacción por puenteo con moléculas de agua. En el sistema de 5FN2 se observa que el Asp257 interacciona durante el 62.6 % de la simulación con el residuo de Lys265 presente en el fragmento C-terminal de TM6, lo que lleva al distanciamiento de los aspárticos catalíticos y la consecuente pérdida de puenteo por moléculas de agua. Por otro lado, la ausencia del fragmento C-terminal de TM6 en 5FN3 permitió que ambos aspárticos se aproximaran vía la interacción con el amino N-terminal de Gly378, promoviendo así la formación de puentes mediados por moléculas de agua (D257-HOH-D385) durante el 66.5 % del tiempo de simulación.

Es importante recordar que PS1 requiere de la coordinación de una molécula de agua vía la interacción con los aspárticos catalíticos para ejercer su actividad proteolítica. Por esta razón, se analizó la distribución de las moléculas de agua cercanas a los componentes transmembranales del sistema 5FN3 con la representación del factor de ocupación con mapas de densidad (*Figura 7.4A*). Este mapa está coloreado en un gradiente de azul a rojo en el que se describen, respectivamente, las zonas con menor y mayor tiempo de ocupación por moléculas de agua. Como se observó en el análisis anterior, el sitio activo presentó una alta densidad de probabilidad de encontrar moléculas de agua en las cercanías de los aspárticos catalíticos. El distanciamiento entre los aspárticos en la simulación con el modelo 5FN2 propició un aumento en el tamaño de la cavidad y el número de moléculas de agua que ingresaban al interior de esta (ver *Figura 7.5A*). Por otro lado, la simulación de 5FN3 mostró una reducción del número de moléculas de agua en la cavidad durante el transcurso de la simulación, lo cual se relacionó con el cambio en la inclinación de TM6 y la distancia entre los aspárticos catalíticos ocurridos durante la transición de *E1* a *E2*. En la *Figura 7.5B* se muestra la caracterización del sitio activo del sistema 5FN3, en el cual se observa que la cavidad presentó un diámetro de entre 0.1 y 1.2 nm durante la simulación.



**Figura 7.4.** (A) Mapa de densidad en el que se representan las regiones de mayor (rojo) a menor (azul) probabilidad de ocupación por moléculas de agua en la simulación atomística del sistema 5FN3. (B) Sitios principales de ocupación de moléculas de agua en las regiones transmembranales.



**Figura 7.5.** (A) Número de moléculas de agua presentes en la cavidad del sitio activo del componente PS1 durante los 1,000 ns de simulación atomística con los modelos 5FN2 y 5FN3. (B) Caracterización de las dimensiones del sitio activo durante los 1,000 ns de la simulación atomística del modelo 5FN3. El histograma representa el valor promedio del radio obtenido durante el análisis, así como el valor mínimo y máximo del radio durante el tiempo simulado. El radio del átomo de prueba fue de 0.09 nm. Los gráficos se encuentran coloreados en un rango de menor (azul) a mayor (rojo) distancia del átomo de prueba con respecto a los aspárticos catalíticos. La estructura tridimensional a la derecha del gráfico muestra la posición y disposición espacial de las partículas empleadas para describir a la cavidad.

A pesar de que el sitio activo es la región de las que más se sabe existe influjo de moléculas de agua para llevar a cabo la catálisis, la mayor densidad de probabilidad de moléculas de agua se observó en el componente APH-1A, en donde se observa la formación de un semicanal que cruza por la parte media de su estructura (*Figura 7.4B*). Esto último explicaría la razón por la cual existe un gran número de residuos polares en la región transmembranal de APH-1A (ver capítulo anterior). Ambos hallazgos sugieren que el componente APH-1A podría presentar una función adicional a la estabilización y maduración del complejo de  $\gamma$ -secretasa.

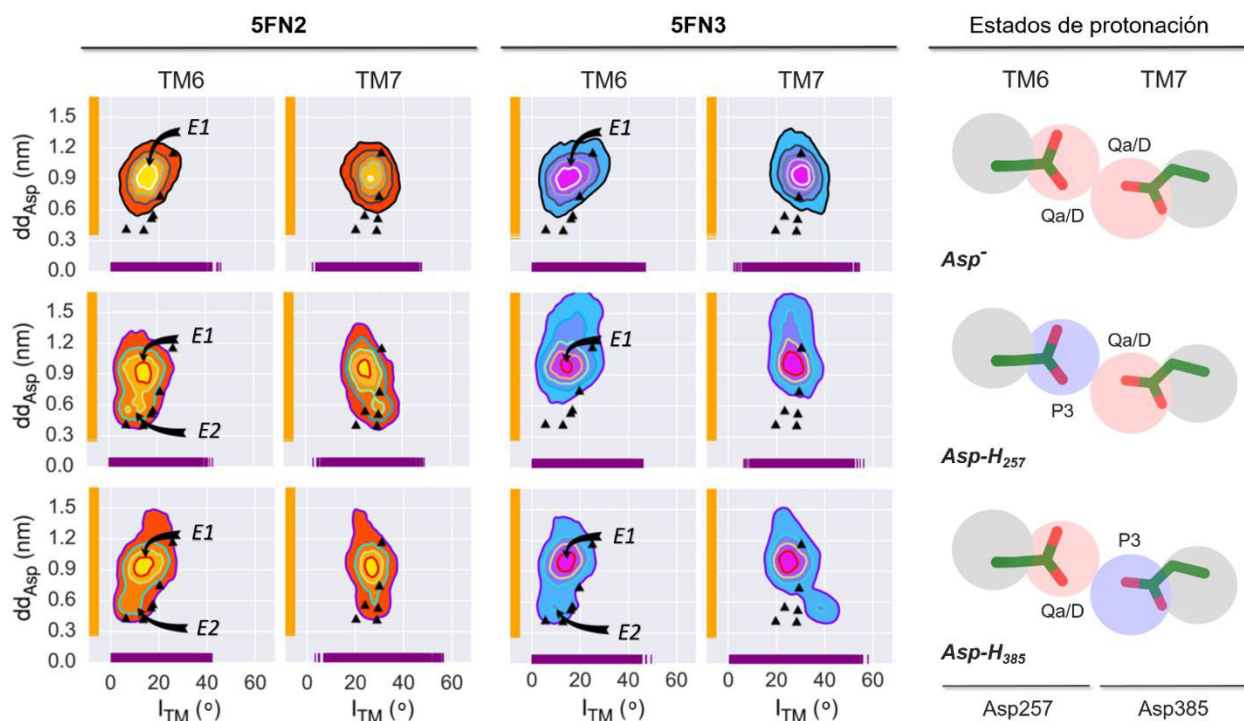
Con base en la información obtenida de las simulaciones atomísticas de 5FN2 y 5FN3, se lograron identificar tres comportamientos dinámicos importantes a estudiar para la correcta caracterización del complejo de  $\gamma$ -secretasa: (1) estados conformacionales de PS1, (2) movilidad del ECD de NCT y (3) formación de la cavidad de agua en APH-1A.



## VII.2.1. Estados conformacionales de PS1

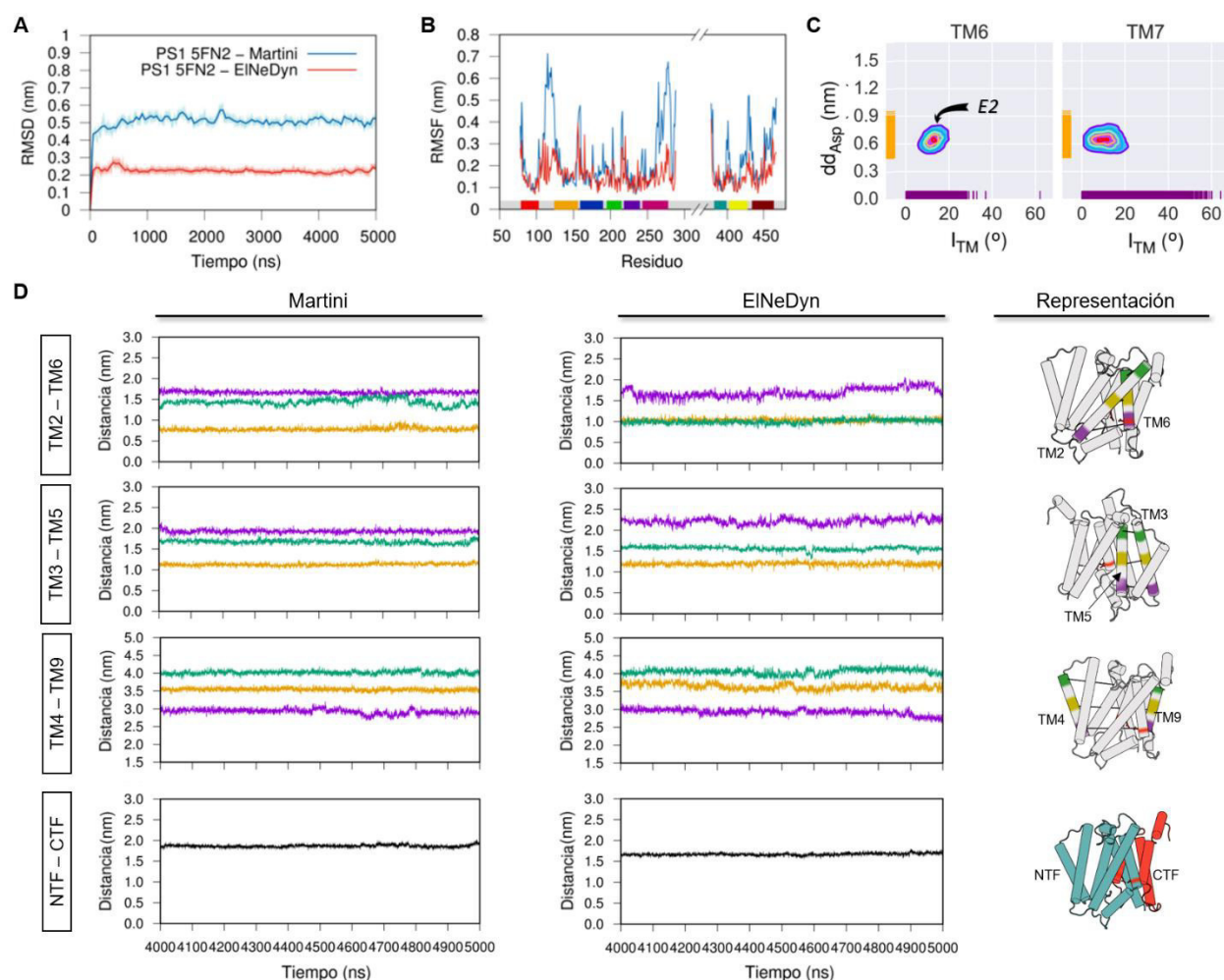
Al igual que otras aspartil proteasas, se cree que el mecanismo catalítico de PS1 involucra la formación inicial de un puente de hidrógeno intramolecular entre un aspártico en su forma desprotonada ( $\text{Asp}^-$ ) y otro en su forma protonada ( $\text{Asp-H}$ ).<sup>77-79</sup> Esta interacción es esencial para la coordinación de la molécula de agua catalítica en el sitio y para que se lleve a cabo el paso de transferencia protónica durante la reacción enzimática.<sup>182</sup> La formación de este puente de hidrógeno requiere que los residuos de aspártico catalíticos se encuentren a una distancia menor de 5.0 Å (*estado 2 o activo*), por lo que el aumento en este valor reduce significativamente la probabilidad de que se lleve a cabo la proteólisis (*estado 1 o inactivo*). El cálculo de los valores de  $\text{pK}_a$  de los residuos de aspártico catalíticos sugiere que el Asp385 ( $\text{pK}_a = 9.91$ ) tiene mayor probabilidad de encontrarse en el estado monoprotonado, mientras que el Asp257 ( $\text{pK}_a = 5.12$ ) se encontraría en su forma desprotonada. Sin embargo, la transferencia de protón entre ambos residuos y los cambios conformacionales del sistema podrían conferir un equilibrio en el estado de protonación de ambos aspárticos.

Con base en la idea anterior, se llevaron a cabo simulaciones de MD con resolución de grano grueso (CG) de la forma desprotonada ( $\text{Asp}^-$ ) y los estados monoprotonados ( $\text{Asp-H}_{257}$  y  $\text{Asp-H}_{385}$ ) de los modelos 5FN2 y 5FN3 del complejo de  $\gamma$ -secretasa en una membrana de POPC. De cada uno de los seis sistemas se generaron 50 réplicas, las cuales se evaluaron durante un periodo de simulación de 1  $\mu\text{s}$  cada una (ver Figuras A3.1 a A3.3 del Apéndice III). Para la representación de los estados de protonación en los modelos de CG se empleó una partícula (*bead*) del tipo Qa/D (carga negativa) para el carboxilato y P3 (polar neutra) para el ácido carboxílico.



**Figura 7.6.** Diagramas de distribución de las 50 trayectorias de simulación de CG proyectado respecto a la distancia entre los aspárticos ( $dd_{\text{Asp}}$ ) y el ángulo de inclinación ( $I_{\text{TM}}$ ) de TM6 y TM7 en los sistemas con aspárticos catalíticos desprotonados y monoprotonados derivados de los modelos 5FN2 y 5FN3. En estos se indican las zonas de distribución y de probabilidad (contorno) del *estado 1* (E1) y *estado 2* (E2), y los datos experimentales de las estructuras de crío-EM (triángulos). La figura de la derecha ejemplifica la representación de las partículas empleadas para emular el estado de protonación.

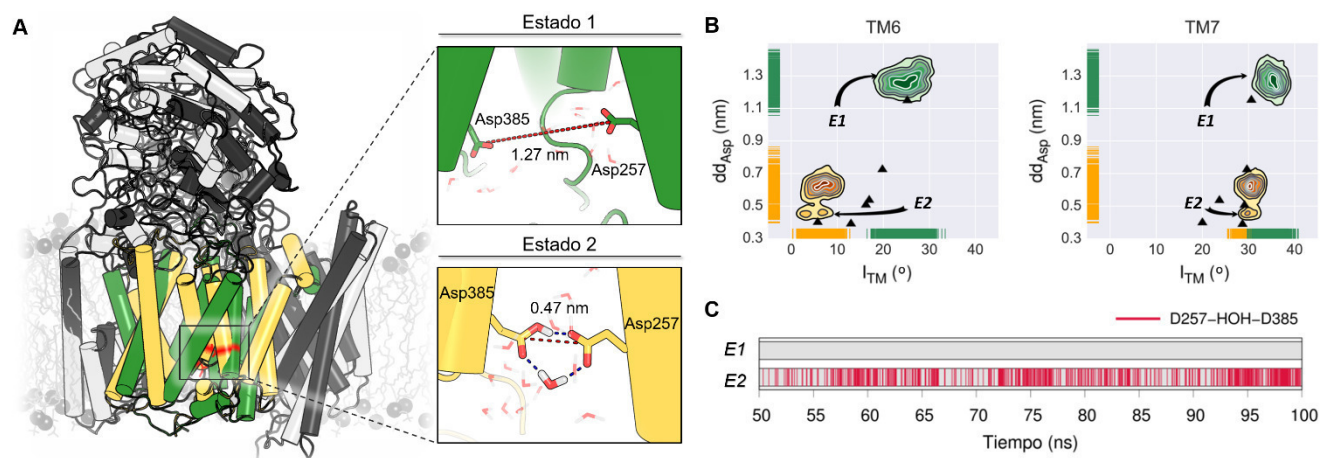
La *Figura 7.6* muestra el análisis de distribución conformacional de PS1 basado en los parámetros de orden  $dd_{Asp}$  e  $I_{TM}$  de las 50 trayectorias de los seis sistemas. En esta figura se observa que los estados monoprotonados de los aspárticos aumentan la probabilidad de formación del estado *activo* (*E2*), mientras que las formas desprotonadas se presentan únicamente en el estado *inactivo* (*E1*). Estos resultados concuerdan con información experimental previa relacionada al mecanismo de activación de las proteasas.<sup>61</sup> Además, la transición entre los estados conformacionales se presentó en varias ocasiones a lo largo de las trayectorias de simulación, demostrando que los sistemas pueden visitar ambos estados de forma periódica (ver *Figura A3.4* del *Apéndice III*). Es importante señalar que la diferencia observada entre los valores de  $dd_{Asp}$  experimentales y los de CG se deben principalmente a la resolución de los modelos, pues la distancia mínima para una interacción electrostática favorable entre partículas es de 5.0 Å.<sup>183</sup> Asimismo, la desviación en los valores del parámetro  $I_{TM}$  se asocia a las restricciones en la curvatura y torsiones de las hélices utilizadas en los modelos de CG (ver *Figuras A3.5* e *A3.6* del *Apéndice III*). Sin embargo, las torsiones de las TMs en los modelos de CG son consistentes con los observados en las simulaciones atómicas (ver *Figura A3.7* del *Apéndice III*).



**Figura 7.7.** (A) RMSD y (B) RMSF de las simulaciones de 5 ms con los modelos de Martini y EINEDyn derivados del sistema desprotonado de 5FN2. (C) Diagrama de distribución de los parámetros  $dd_{Asp}$  e  $I_{TM}$  en la simulación con el modelo de EINEDyn. (D) Distancias entre los centros de geometría de diferentes secciones de las TMs y de los dominios C-terminal (CTF) y N-terminal (NTF) del componente PS1 de los últimos 1000 ns de las simulaciones.

Además de las correcciones a las interacciones y a la curvatura de las hélices, se sabe que la simplificación en los modelos de CG puede afectar la estabilidad en las simulaciones. Es por lo anterior que se suelen emplear redes elásticas que permitan mantener la integridad de las proteínas durante la simulación.<sup>179</sup> Para este trabajo, se comparó la estabilidad de nuestro modelo de Martini con un modelo de Martini con redes elásticas (EINeDyn) mediante dos simulaciones de 5  $\mu$ s del estado desprotonado del sistema 5FN2 (Figura 7.7). Como era de suponerse, el análisis del RMSD y RMSF de las simulaciones muestran que el modelo de EINeDyn presenta fluctuaciones conformacionales en comparación con el modelo de Martini. Sin embargo, las restricciones en el modelo de EINeDyn no permitió mostrar la transición del estado inicial *E2* de 5FN2 al estado *inactivo*, siendo además que ambos aspárticos se encontraban en su forma desprotonada. Los cambios conformacionales en el modelo de Martini (sin red elástica) no alteraron la integridad de la estructura. Esto último se debe a que la membrana de POPC cumple la función de las redes elásticas al restringir la movilidad del complejo.

Con el fin de obtener una descripción atomística de los estados conformacionales de PS1, se transformaron a representaciones de AA los conformeros más representativas del *estado 1* y el *estado 2* provenientes de las simulaciones de CG del sistema monoprotonado Asp-H<sub>385</sub> de 5FN2. Los dos sistemas se evaluaron durante 100 ns de MD, en los cuales se analizaron los cambios conformacionales del componente PS1 y la coordinación de moléculas de agua (Figura 7.8). En la simulación del sistema con la conformación inicial *E2* se observó una fluctuación en los valores de  $dd_{Asp}$  ( $0.40 \text{ nm} < dd_{Asp} < 0.75 \text{ nm}$ ), lo que resultó en la formación de un estado *activo* y uno *semiactivo*. Este equilibrio *activo/semiactivo* en *E2* se asocia a la flexibilidad de las cadenas laterales de los aspárticos catalíticos, razón por la cual no se observan cambios en los valores de  $I_{TM}$ . La formación del estado *activo* permitió la coordinación de moléculas de agua por parte de los aspárticos catalíticos durante el 43.9 % de los últimos 50 ns de simulación. Por otra parte, el conformero *E1* no formó puentes de hidrógeno con moléculas de agua y mantuvo el estado *inactivo* durante toda la simulación, al igual que en los modelos de CG.

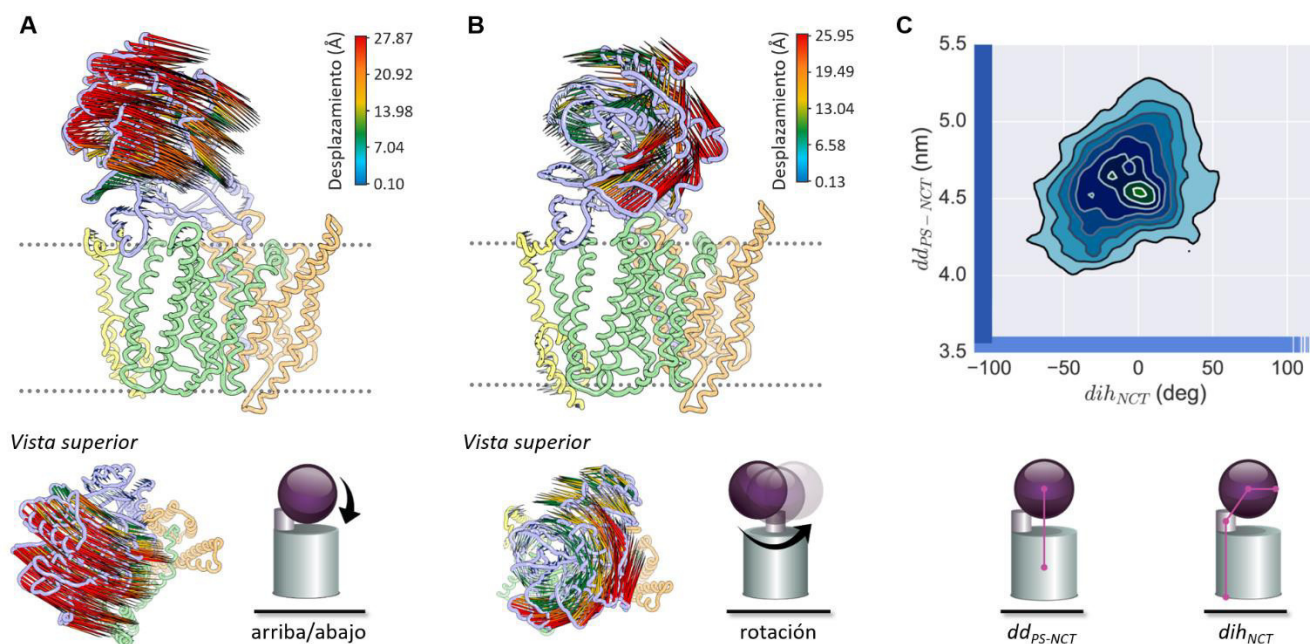


**Figura 7.8.** (A) Superposición de las estructuras atomísticas de 5FN2 en el *estado 1* (*inactivo*) y *estado 2* (*activo*) extraídas a partir de las simulaciones de CG del sistema monoprotonado Asp-H<sub>385</sub>. (B) Diagramas de distribución de las simulaciones atomísticas de 100 ns de los sistemas en los estados *E1* y *E2*. (C) Puentes de hidrógeno formados entre una molécula de agua y los dos residuos de aspártico catalíticos durante los últimos 50 ns de simulación de ambos estados.

## VII.2.2. Movimiento del dominio extracelular de NCT

Estudios experimentales en los que se empleó microscopía electrónica para estudiar la variabilidad conformacional de la enzima  $\gamma$ -secretasa demostraron que los cambios estructurales en el complejo se debían principalmente a la movilidad del dominio ECD de NCT.<sup>184,185</sup> Este movimiento del dominio de NCT se observó durante el análisis de las fluctuaciones de cadena principal y por residuo de las simulaciones atómicas. Para su caracterización en las simulaciones de CG, se identificaron los movimientos colectivos más significativos de los seis sistemas mediante un análisis de componentes principales (PCA). Este último demostró que los dos primeros movimientos, los cuales involucraban la mayor parte del movimiento del complejo (23.0 %), se debían a fluctuaciones en el lóbulo mayor de ECD de NCT. El análisis conformacional proyectado en los dos eigenvectores de los componentes principales (PC) revelaron que el primero de ellos estaba relacionado con un movimiento de “arriba/abajo”, mientras que el segundo correspondía a una “rotación” de izquierda a derecha. Estos movimientos también fueron observados en la simulación con el modelo EIneDyn (Figura A3.8 del Apéndice III). En la Figura 7.9 se muestran estos dos movimientos con ayuda de una representación de puercoespín.

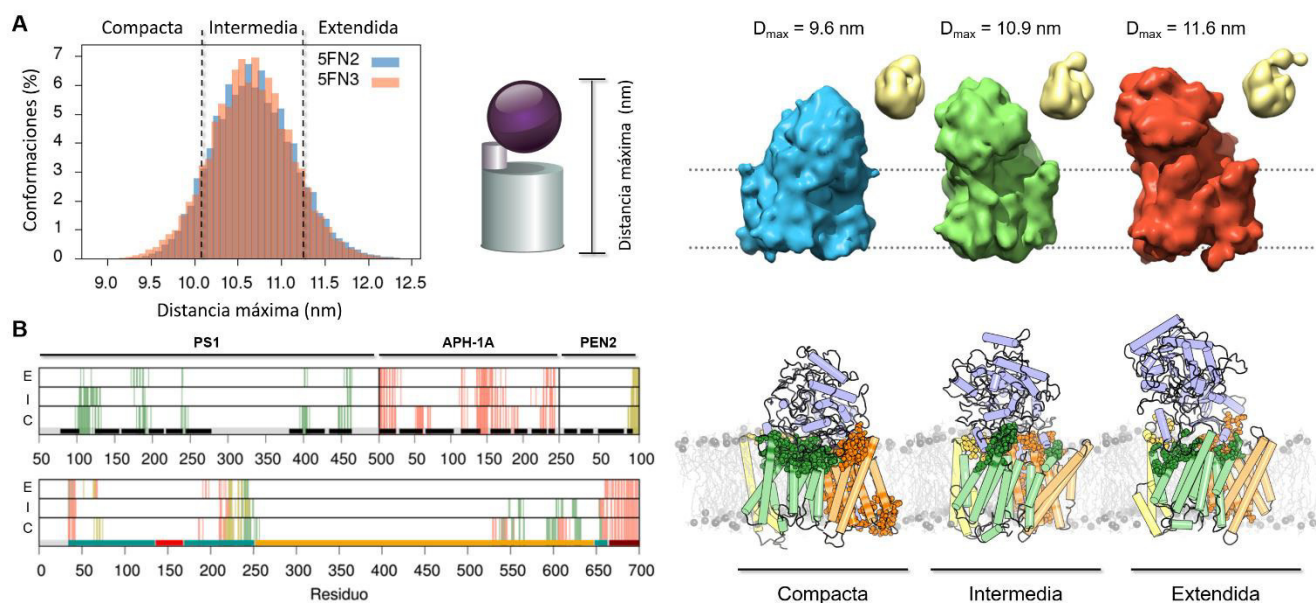
Con base en estos dos movimientos, es posible describir las fluctuaciones estructurales del complejo mediante dos parámetros de orden (Figura 7.9C). El primer movimiento se puede caracterizar al medir la distancia entre el centro geométrico de PS1 y el centro geométrico del lóbulo mayor de NCT ( $dd_{PS-NCT}$ ). Por otro lado, el movimiento rotacional se describe con un ángulo diedro ( $dih_{NCT}$ ) entre los aminoácidos (1) C-terminal y (2) N-terminal de la TM de NCT con (3) el centro de masa del lóbulo mayor y (4) los residuos Arg583 a Asp588 (localizados en la parte distal del lóbulo mayor). El análisis de distribución de estos dos parámetros muestra una dependencia directa entre ambos, pues la rotación hacia la derecha ( $dih_{NCT} > 0$ ) permite que el lóbulo mayor se desplace hacia arriba, mientras que la rotación hacia la izquierda ( $dih_{NCT} < 0$ ) lo desplaza hacia abajo.



**Figura 7.9.** Representación de puercoespín del (A) movimiento de “arriba/bajo” y (B) la rotación del lóbulo mayor del ECD de NCT obtenidos del PCA. (C) Distribución poblacional basada en los parámetros de orden que describen ambos movimientos ( $dd_{PS-NCT}$  y  $dih_{NCT}$ ).

Los resultados obtenidos de este estudio podrían explicar el mecanismo de unión del sustrato propuesto por Yu y colaboradores<sup>147</sup>, pues el primer movimiento podría estar involucrado en el reconocimiento inicial y el segundo en el traslado al sitio activo. En ese estudio experimental se propuso que ambos mecanismos estaban guiados por la interacción del aminoácido Glu333 del lóbulo mayor con el amino N-terminal del sustrato. Como se mencionó en el capítulo anterior de este trabajo, para que esta interacción ocurra es necesario que el asa en forma de “tapa” del lóbulo menor exponga el sitio de unión donde se encuentra Glu333.<sup>68</sup> Sin embargo, no se observó ninguna relación entre el giro del lóbulo mayor y la distancia de la “tapa” al centro geométrico de Glu333 (ver *Figura A3.9 del Apéndice III*). Este resultado podría explicar un trabajo previo realizado por el grupo de Bart de Strooper, en el que se demuestra que Glu333 es importante sólo para la maduración del complejo pero no para su actividad proteolítica.<sup>148</sup>

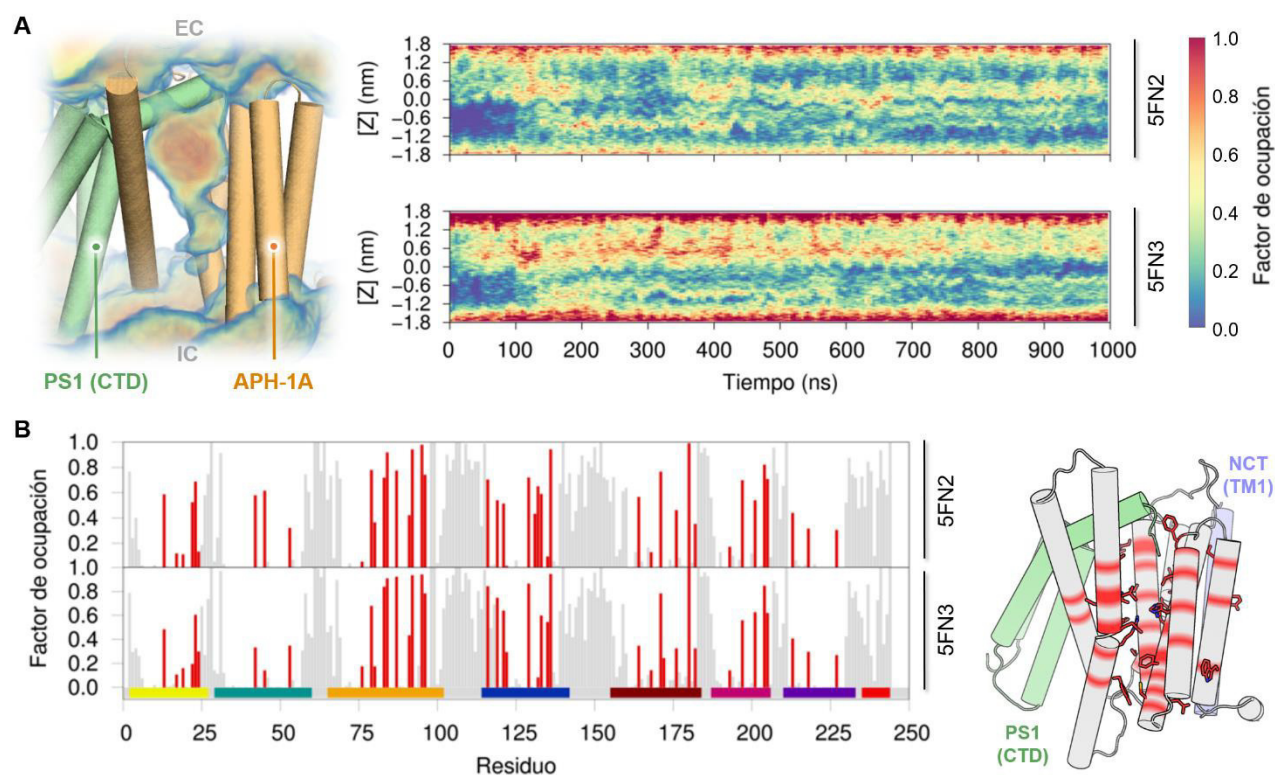
El movimiento de “arriba/abajo” fue caracterizado inicialmente en estudios de microscopía electrónica realizados por el grupo de Chávez-Gutiérrez.<sup>184</sup> En ese trabajo, los autores describieron tres conformaciones del complejo de  $\gamma$ -secretasa dependientes de la posición del ECD de NCT, las cuales son: compacta, intermedia y extendida. De manera comparativa, analizamos la distancia máxima ( $D_{max}$ ) en el eje Z de los complejos 5FN2 y 5FN3 en las diferentes simulaciones de CG (*Figura 7.10A*), con las cuales nos fue posible identificar estas tres conformaciones. Al igual que en el trabajo de Chávez-Gutiérrez, encontramos una mayor distribución poblacional en la conformación intermedia ( $10.1 \text{ nm} < D_{max} < 11.3 \text{ nm}$ ) en comparación con la compacta ( $D_{max} < 10.1 \text{ nm}$ ) y la extendida ( $D_{max} > 11.3 \text{ nm}$ ). La transición entre estados conformacionales involucra interacciones distintivas entre el ECD de NCT y la región transmembranal (*Figura 7.10B*). En la forma extendida, el lóbulo mayor de NCT no interactúa con ninguna otra subunidad, al igual que en la estructura inicial de 5FN2, mientras que en la forma intermedia se forman contactos de este lóbulo con HL1 de PS1. La forma compacta es la que presenta mayor número de contactos del lóbulo mayor, interactuando con el asa que conecta TM2-TM3 en APH-1A y con PS1-HL1. Los resultados son consistentes con el estudio experimental de Chávez-Gutiérrez.



**Figura 7.10.** (A) Distribución y representación de las conformaciones compacta (C), intermedia (I) y extendida (E) extraídas de las simulaciones de CG de 5FN2 y 5FN3. (B) Análisis de contactos de las estructuras representativas de cada estado.

## VII.2.3. Formación de la cavidad de agua en APH-1A

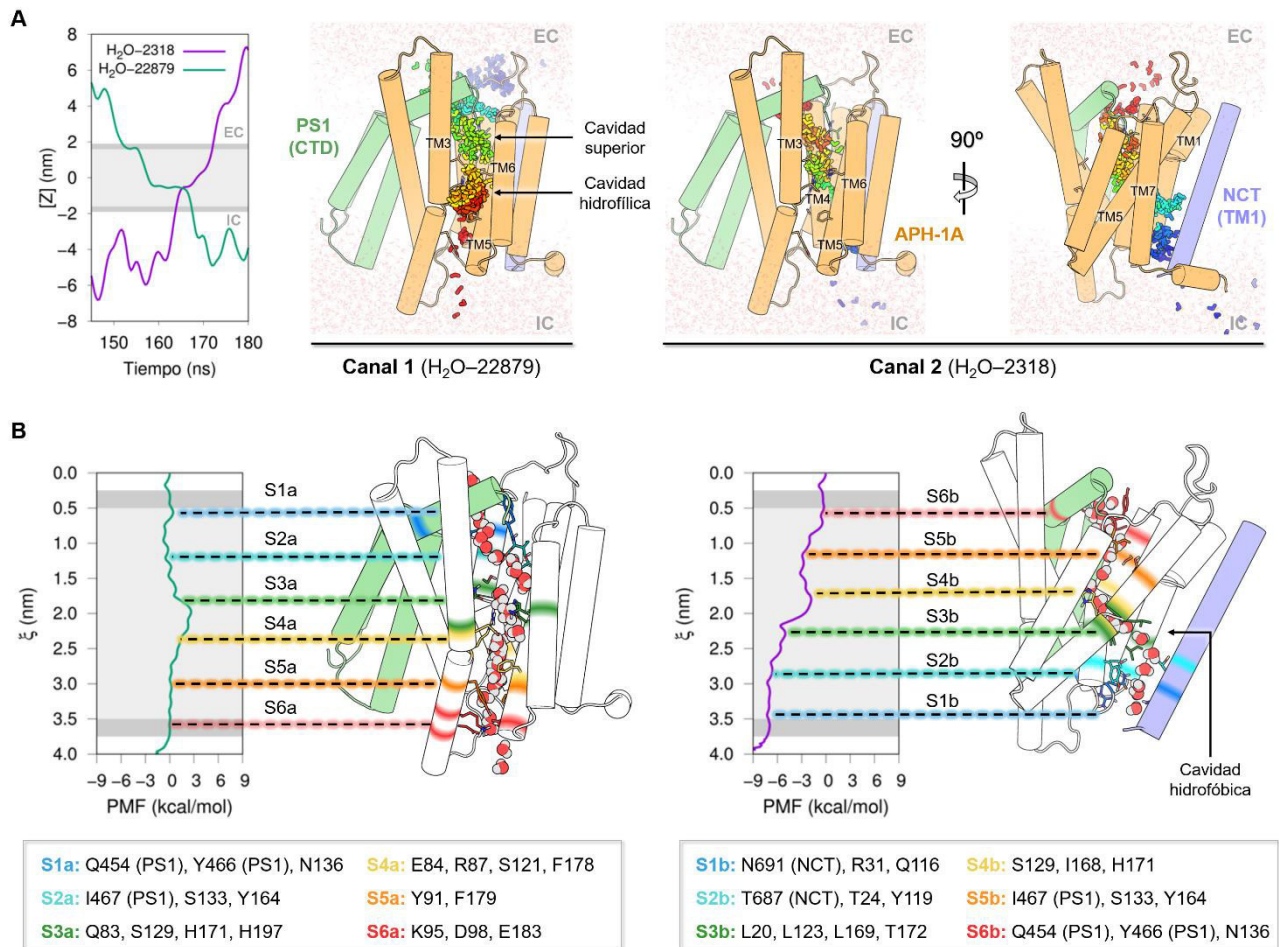
El mapa de densidad de probabilidad de encontrar moléculas de agua, generado a partir de la simulación atómica de 5FN3, permitió identificar un cúmulo de agua en la cavidad central del componente APH-1A (ver *Figura 7.4*). En la *Figura 7.11* se muestra un fragmento de este mapa de densidad y los diagramas de distribución del tiempo de ocupación de las moléculas de agua en ambas simulaciones de AA. En el mapa de densidad se puede apreciar que la región superior de la cavidad ( $Z > 0.0$  nm) tiene una mayor ocupación por moléculas de agua en comparación con la región inferior ( $Z < 0.0$  nm), tal y como se describe en los diagramas de distribución. Además, en estos diagramas se observa que el ingreso de agua a la región inferior ocurre hasta después de los 100 ns, mientras que la región superior se observa desde el inicio de las simulaciones. Este comportamiento se puede observar en ambas trayectorias, pero con mayor ocupación en el modelo de 5FN3. El mapa de densidad de este sistema muestra dos regiones de baja densidad de agua en los poros que conectan con el espacio extracelular (EC), sugiriendo que el ingreso de moléculas de agua está regulado por la hélice C-terminal de PS1-TM9. Por su parte, el análisis del factor de ocupación del componente APH-1A confirma la participación de los residuos hidrofílicos de TM3 en la retención de moléculas de agua en esta cavidad (ver *Figura A3.10* del *Apéndice III*). Estos resultados sugieren que, a pesar de las diferencias topológicas, los GPCRs y APH-1A comparten la formación de una cavidad central en su estructura ocupada por moléculas de agua.<sup>186</sup> Hasta donde sabemos, esta es la primera vez que se describe la formación de este cúmulo de agua en el complejo de  $\gamma$ -secretasa, estudios anteriores se han enfocado en la caracterización de la cavidad del sitio activo de PS1.<sup>187</sup>



**Figura 7.11.** (A) Representación de un fragmento del mapa de densidad (izquierda) y los gráficos de distribución del factor de ocupación de moléculas de agua en APH-1A para cada una de las simulaciones atómicas de los sistemas 5FN2 y 5FN3. (B) Factor de ocupación de la interacción de moléculas de agua por residuo del componente APH-1A de ambas simulaciones atómicas (5FN2 y 5FN3) de  $\gamma$ -secretasa.

El análisis de estos resultados derivó en el planteamiento de dos preguntas clave para comprender la función de este depósito de agua: (1) ¿Existe alguna relación entre el estado de activación de PS1 y la presencia de moléculas de agua en APH-1A? y (2) ¿Las moléculas de agua cruzan a través del componente APH-1A dándole función de canal de agua? El primer cuestionamiento surge de la observación de que la simulación de 5FN3, que muestrea la mayor parte del tiempo de simulación el *estado 2* o estado *activo* de PS1, presenta una alta ocupación de moléculas de agua en esta cavidad. Por el contrario, en la simulación de 5FN2 se observó la presencia mayoritaria del *estado 1 (inactivo)* y un reducido número de moléculas de agua en la cavidad. Algo similar ocurrió en las trayectorias de CG de 5FN2 (ver *Figura A3.11 del Apéndice III*), donde se observa una mayor presencia de partículas de agua en las trayectorias del estado monoprotonado del Asp385 (conformaciones *activas* e *inactivas* de PS1) que en las del estado desprotonado (conformaciones *inactivas*). Sin embargo, en las simulaciones de CG del sistema 5FN3 ambos estados de protonación presentaron una baja incidencia de moléculas de agua en APH-1A, descartando su relación con el estado conformacional de PS1 y sugiriendo que la activación de PS1 y la presencia de moléculas de agua en la cavidad de APH-1A son procesos independientes.

Se sabe que el flujo continuo de moléculas de agua hacia la cavidad central de los GPCRs permite el transporte ocasional de moléculas de agua de un compartimento celular a otro.<sup>188,189</sup> Lo mismo ocurre en las simulaciones atomísticas del complejo de  $\gamma$ -secretasa, donde se detectaron un total de 16 cruces de moléculas de agua a través del componente APH-1A del sistema 5FN2 y 39 cruces en el de 5FN3 (ver *Figura A3.12 del Apéndice III*). El tiempo de transporte de estas moléculas varió entre los 15 y 500 ns en ambas simulaciones, observándose un mayor tiempo de residencia de agua en la región media inferior ( $-1.0 < Z < 0.0$ ). Asimismo, el análisis de las trayectorias de estas moléculas demostró que el transporte podía llevarse a cabo en ambos sentidos, es decir, de la región extracelular a la intracelular ( $EC \rightarrow IC$ ) o de la intracelular a la extracelular ( $IC \rightarrow EC$ ). En la *Figura 7.12A* se ejemplifican ambas rutas de transporte empleando dos moléculas de agua que cruzaron durante la simulación atomística del sistema 5FN3. Lo primero que se observa en este ejemplo es que la trayectoria de ambos sentidos difiere en los sitios de contacto de la cavidad inferior, lo cual contribuye a la explicación de la baja densidad de agua asignada a esa región. En el camino  $EC \rightarrow IC$  (*Canal 1*), el agua ingresa por el espacio entre TM9-CT de PS1 y TM4 de APH-1A para de ahí dirigirse a la cavidad superior, ( $0.0 < Z < 1.0$ ) entre TM3, TM5 y TM6, la cual guía a la región intracelular de TM4-TM5 de APH-1A para ser liberadas al medio intracelular. Por otro lado, en la ruta de transporte  $IC \rightarrow EC$  (*Canal 2*) las moléculas de agua ingresan por una pequeña cavidad entre NCT-TM1 y APH-1A (TM1, TM4, TM5 y TM7) para posteriormente trasladarse hacia TM4 y TM5 y salir por el espacio entre TM9-CT de PS1 y TM4 de APH-1A. La diferencia en los tiempos de residencia ( $t_R$ ) entre el *Canal 1* ( $t_R = 20$  ns) y el *Canal 2* ( $t_R = 9$  ns) se debe a que en el primer canal las moléculas de agua son retenidas ( $t_R = 11$  ns) en una pequeña cavidad hidrofílica ( $-1.0 < Z < 0.0$ ; Asn83<sub>TM3</sub>, Glu84<sub>TM3</sub>, Arg87<sub>TM3</sub>, His171<sub>TM5</sub> e His197<sub>TM6</sub>), evitando su cruce hacia el espacio IC. Este comportamiento se observó en todas las moléculas de agua que cruzaron por APH-1A en ambas simulaciones. La caracterización de dichos canales mostró que la cavidad superior es la que presenta el mayor radio de apertura ( $r = 0.24 \pm 0.51$  nm), formando el poro de salida hacia el espacio EC durante el 69.2 % de la simulación. Por su parte, los poros hacia el espacio IC del *Canal 1* y *Canal 2* se presentaron, respectivamente, durante el 5.2 y 3.5 % del tiempo (ver *Figuras A3.13 y A.14 del Apéndice III*). Esta información podría explicar los poros observados en los mapas de crio-EM en la parte superior e inferior del complejo de  $\gamma$ -secretasa.<sup>190</sup>



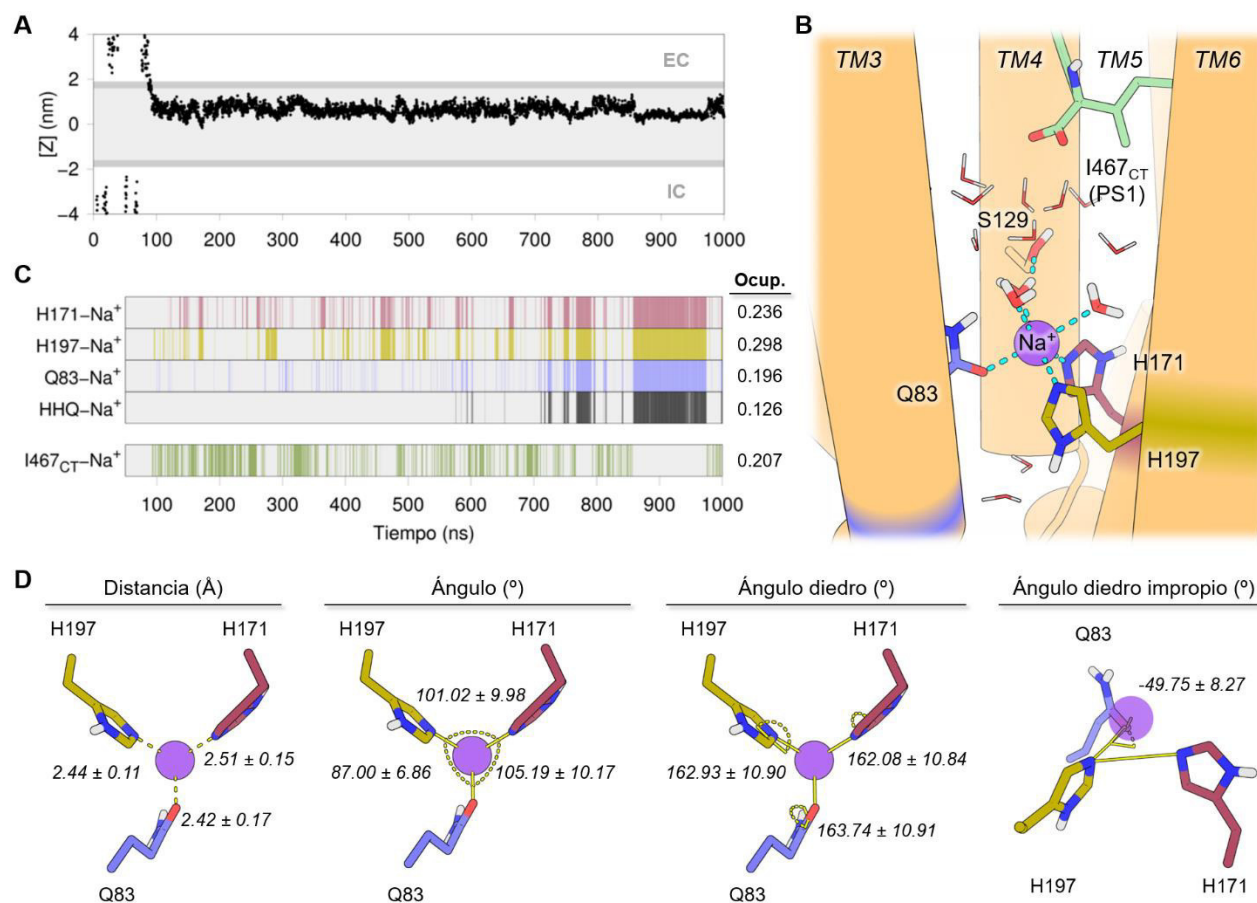
**Figura 7.12.** Caracterización del transporte ocasional de moléculas de agua por el componente APH-1A. (A) Posición en función del tiempo de las moléculas de agua de la simulación atómica de 5FN3 para representar el transporte entre el espacio extracelular (EC) y el intracelular (IC). Las estructuras 3D muestran un gradiente de la posición inicial (azul) y final (rojo) de las moléculas de agua en el *Canal 1* y *Canal 2*, así como las TMs involucradas en el transporte y formación de cavidades. (B) Perfiles del potencial de fuerza media (PMF) en la coordenada de reacción ( $\xi$ ) de las configuraciones extraídas de la simulación atómica de 5FN3 para la descripción de los sitios de contacto (S1-6) en ambos canales.

Con el fin de tener una descripción más detallada de la trayectoria y la dinámica de moléculas de agua que cruzan por APH-1A, se realizaron simulaciones atómicas de “muestreo de sombrilla” (*Umbrella Sampling*, US) utilizando los ejemplos anteriores para la selección de configuraciones de la coordenada de reacción ( $\xi$ ) en el eje Z (*Figura 7.12B*). De estas simulaciones se analizaron los histogramas del muestreo para confirmar la superposición entre las ventanas de muestreo y así poder obtener un buen muestreo con una función de energía continua (ver *Figura A3.15* del *Apéndice III*). Los perfiles del potencial de fuerza media (PMF) resultantes de estas simulaciones muestran que las moléculas de agua cruzan libremente por ambos canales y señalan varios sitios de interacción agua-proteína claves para su transporte (S1-S6). El ligero aumento en el valor del PMF observado entre los sitios S3a y S4a del *Canal 1* (PMF = 2.38 kcal/mol) sugiere que las moléculas de agua pierden interacciones con la cavidad superior (S3a) para ser transferida a la cavidad hidrofílica (S4a) debido a la presencia de dos histidinas (His171 e His197) localizadas entre ambos sitios, similar al comportamiento observado en otros transportadores.<sup>191</sup> Esto último explica a su vez la región de menor densidad localizada entre las dos regiones de



la simulación de 5FN3. En la pequeña cavidad hidrofílica se encuentra además la Arg87 que, similar a lo observado en otros estudios de canales de agua, puede favorecer el traslado de moléculas de agua de un compartimiento a otro.<sup>192</sup> A diferencia del *Canal 1*, el *Canal 2* tiene una cavidad hidrofóbica (*S3b*) en su región intermedia flanqueada por sitios hidrofílicos (*S1b*, *S2b* y *S4b*). En este canal, las moléculas de agua ingresan a la cavidad inferior y son retenidas en los sitios *S1b* y *S2b*, como se observa en el perfil de PMF ( $\xi < 1.25$  nm) y en el mapa de densidad poblacional (ver *Figura 7.11*,  $Z < -1.2$  nm). Sin embargo, el transporte de estas moléculas por el sitio *S3b* hacia la cavidad superior (*S5b* y *S6b*) conlleva a un aumento en la energía (PMF  $\approx 5.0$  kcal/mol) debido a las interacciones repulsivas con residuos hidrofóbicos. Estos resultados confirman que las moléculas de agua pueden ser transportadas de forma ocasional por ambos canales, con mayor probabilidad de situarse en la cavidad superior de APH-1A durante su traslado.

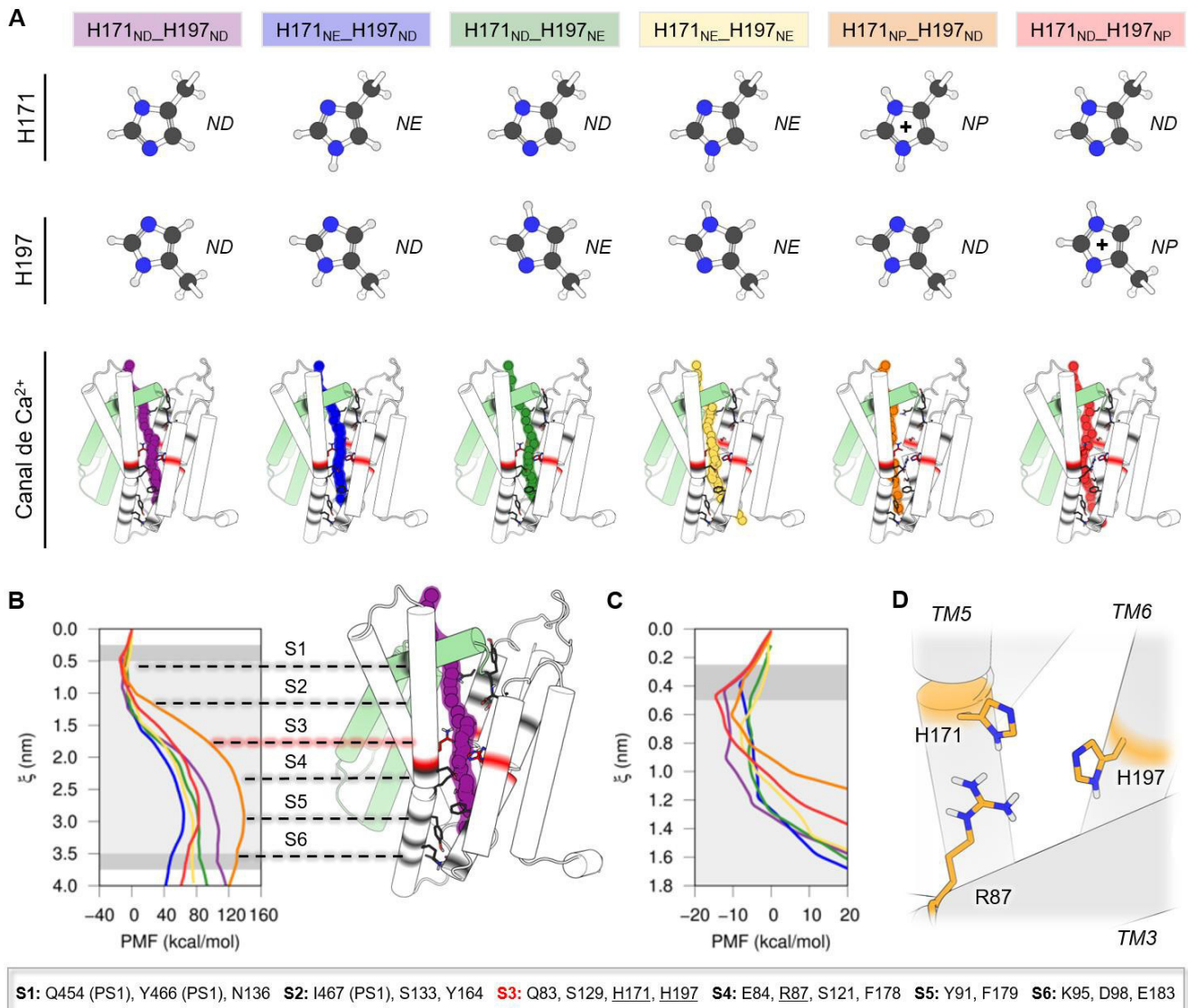
La formación de poros de agua en la región EC e IC de APH-1A abrió el cuestionamiento de si estos podrían permitir el influjo de iones hacia el interior del componente. Al igual que para las moléculas de agua, se analizó la posición de los iones cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) y sodio ( $\text{Na}^+$ ) en el eje Z durante la simulación atomística de 5FN3. En este, se encontró que un ion  $\text{Na}^+$  ingresó por el espacio EC hacia el interior de APH-1A después de los primeros 89 ns de simulación (*Figura 7.13A*), permaneciendo en la cavidad superior durante todo el tiempo restante.



**Figura 7.13.** Caracterización del influjo del ion sodio ( $\text{Na}^+$ ) al interior de APH-1A. (A) Posición en el eje Z del ion  $\text{Na}^+$  que ingresó a la cavidad en función del tiempo de la simulación atomística de 5FN3. (B) Representación de la cavidad superior y de los aminoácidos involucrados en la interacción con el ion. (C) Número de contactos entre el ion  $\text{Na}^+$  y los residuos de His171, His197 y Gln83, así como de la coordinación con estos tres (HHQ), en APH-1A y el carboxilo terminal de Ile467 (I467<sub>CT</sub>) de PS1. (D) Distancias, ángulos, ángulos diedros y ángulo diedro impropio de la coordinación del  $\text{Na}^+$  con HHQ.

La residencia del ion  $\text{Na}^+$  en la cavidad superior de APH-1A se asoció a su interacción con los residuos His171, His197 y Gln83 de APH-1A (*Figura 7.13B-C*) durante el 19.6 y 29.8 % del tiempo de simulación en el que se encontró este ion en la cavidad superior de APH-1A ( $t = 92.5$  a  $1000$  ns). De este tiempo, el 12.6 % ( $t_R = 114.3$  ns) logró coordinarse simultáneamente con los tres residuos (HHQ). El ion  $\text{Na}^+$  presentó una geometría de coordinación tipo octaédrica con HHQ y tres moléculas de agua aledañas que se intercambiaban durante la simulación. La Ser129 facilita la coordinación de la molécula de agua cercana a H171, al fijar el ángulo diedro de los átomos CA-CB-OH-HG1 ( $dih_{S129}$ ) entre los  $-60^\circ$  y  $-90^\circ$  (ver *Figura A3.16* del *Apéndice III*). La coordinación del ion presentó una baja fluctuación entre las distancias y ángulos de interacción con los nitrógenos épsilon (NE) de las histidinas y el oxígeno épsilon (OE1) de la glutamina. En la *Figura 7.13A* se observa el periodo de estabilización del ion  $\text{Na}^+$  en el eje Z durante los intervalos de tiempo en los que ocurrió la coordinación. Asimismo, el ion  $\text{Na}^+$  se coordinó con el grupo carboxilato del aminoácido C-terminal Ile467 ( $I_{467_{CT}}$ ) de PS1 durante el 20.7 % del tiempo ( $t_R = 187.9$  ns), ocurriendo de forma independiente a la interacción con los residuos His171, His197 y Gln83. El 49.5 % restante del tiempo el ion se mantuvo solvatado por moléculas de agua, interactuando de forma ocasional con otros residuos de la cavidad.

Resulta interesante el hecho de que en la simulación atómica de 5FN2 también ocurre el influjo de un ion  $\text{Na}^+$  a la cavidad superior de APH-1A (ver *Figura A3.17* del *Apéndice III*). Sin embargo, en esta simulación, el ion interactuó menos del 5.6 % del tiempo con los residuos His171, H197 y Q83, coordinándose con esta triada HHQ en una sola ocasión. En cambio, tuvo una mayor interacción con la Tyr466 (77.5 %) y la  $I_{467_{CT}}$  (89.2 %), con los cuales también logró coordinarse de manera conjunta durante el 53.7 % del tiempo de simulación. Las diferencias observadas en las interacciones del ion  $\text{Na}^+$  entre las simulaciones de 5FN2 y 5FN3 se debieron principalmente a que el reducido número de moléculas de agua en la cavidad superior del sistema 5FN2 evitó que el ion ingresara hasta la región de HHQ. Para tener una mejor comprensión de las diferencias estructurales de ambos sistemas simulados, se analizó el ángulo de inclinación ( $I_{APH1A-TM}$ ) y la curvatura de las hélices TMs de APH-1A (ver *Figuras A3.18* a *A3.20* del *Apéndice III*), donde se encontró que las hélices TMs de APH-1A presentan ángulos de inclinación muy similares en ambas simulaciones, siendo la media de distribución de TM5 la que más difiere ( $I_{5FN2-APH1A-TM5} = 35.4^\circ$  y  $I_{5FN3-APH1A-TM5} = 29.8^\circ$ ). Asimismo, la curvatura de las hélices en las dos simulaciones es muy similar, encontrándose únicamente un ligero aumento en la curvatura de la TM3 de APH-1A en ambas simulaciones al compararse con las estructuras de crío-EM. El dato más interesante de curvatura corresponde al de TM4 del sistema de 5FN3, pues presenta un aumento considerable ( $8.7^\circ$ ) comparado con las estructuras de crío-EM, en cambio en 5FN2 conserva un valor similar durante la simulación. Puesto que TM4 de APH-1A se encuentra próximo a la región C-terminal de TM9 ( $TM9_{CT}$ ) de PS1, el cambio en la curvatura del primero podría modificar la posición de  $TM9_{CT}$ , alterando la formación de los poros hacia el espacio EC. El ángulo de inclinación de  $TM9_{CT}$  ( $I_{TM9-CT}$ ) es menor en la simulación de 5FN3 ( $I_{TM9-CT} = 62.9^\circ$ ) comparado con 5FN2 ( $I_{TM9-CT} = 72.9^\circ$ ), una posición más perpendicular de  $TM9_{CT}$  con respecto al componente APH-1A reduce el volumen de la cavidad (ver *Figura A3.21* del *Apéndice III*). Sin embargo, si continúa la disminución del ángulo de  $TM9_{CT}$  se bloquea el influjo de moléculas de agua hacia el interior de la cavidad, tal como ocurre con el cambio de inclinación ( $I_{TM9-CT} < 60.0^\circ$ ) en los últimos 300 ns de la simulación de 5FN3 (ver *Figura 7.11*).



**Figura 7.14.** Caracterización del transporte de iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) a través del componente APH-1A. (A) Representación de los tautómeros (NE y ND) y del estado protonado (NP) de los residuos de His171 e His197 en los seis sistemas empleados para el estudio de *Umbrella sampling*. (B) Perfil del potencial de fuerza media (PMF) en la coordenada de reacción ( $\xi$ ) de las diferentes configuraciones del ion  $\text{Ca}^{2+}$  en el sistema 5FN3. (C) Acercamiento a la región de menor energía del perfil de PMF mostrado en (B). (D) Representación de la posición de Arg87, His171 e His197 en la cavidad de APH-1A. Estos residuos se encuentran subrayados en el recuadro de identificación de los diferentes sitios de unión.

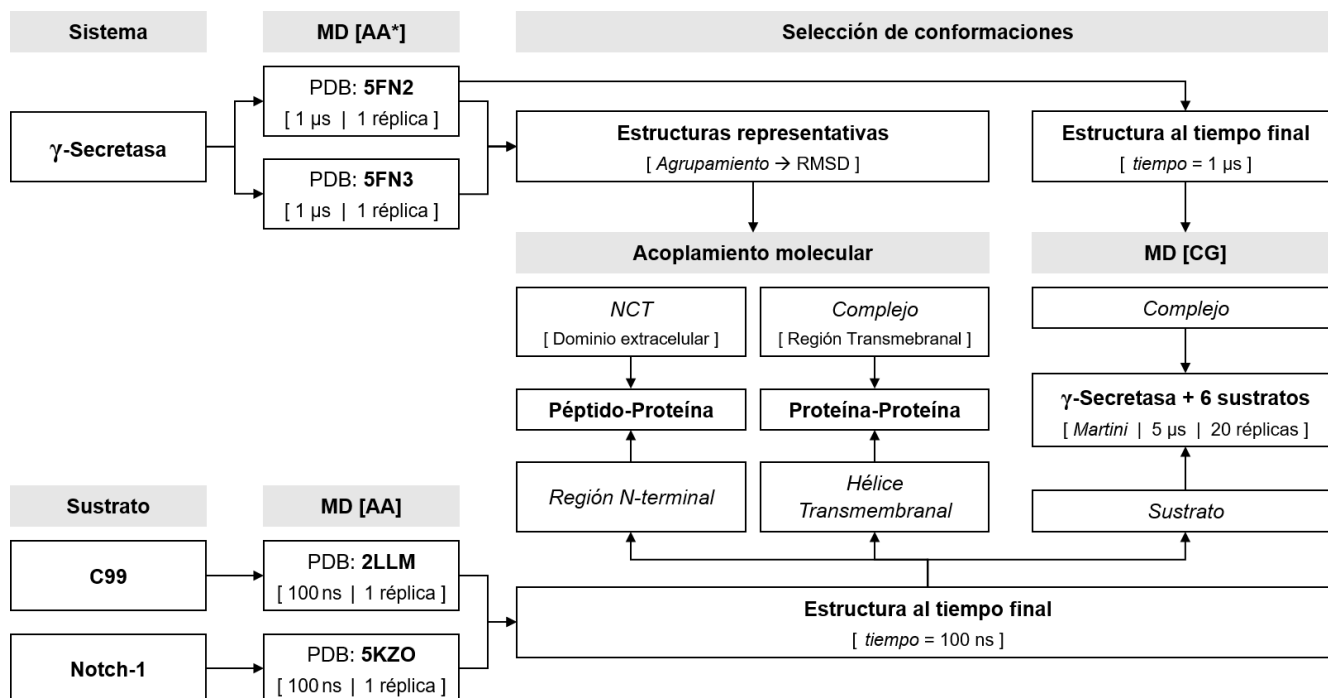
Varios estudios experimentales han propuesto que algunas mutantes de PS1, en su forma independiente del complejo de  $\gamma$ -secretasa, permiten el flujo de iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) del retículo endoplásmico a la región citoplasmática.<sup>193–199</sup> Este transporte de iones  $\text{Ca}^{2+}$  al espacio IC induce la activación desregulada de cinasas, fosfatasa y proteasas que alteran la plasticidad de la neurona.<sup>41</sup> La función de PS1 como canal de  $\text{Ca}^{2+}$  continúa siendo controversial, un estudio realizado por el grupo de investigación de Foskett no logró encontrar evidencia suficiente que confirmara dicho mecanismo.<sup>200</sup> Con base en los resultados de este trabajo, se planteó la hipótesis de que el componente APH-1A podría ser el encargado de reconocer iones  $\text{Ca}^{2+}$  de la región EC, como lo hizo con

el ión  $\text{Na}^+$  y transportarlos a la región IC a través del *Canal 1*. Partiendo de esta hipótesis, se generaron una serie de configuraciones del ion  $\text{Ca}^{2+}$  a través del *Canal 1* tomando como referencia la ruta de transporte de las moléculas de agua y el mecanismo de ingreso del ion  $\text{Na}^+$  a la cavidad superior. Estudios anteriores de MD de canales iónicos han demostrado que la isomería de las histidinas es clave para el transporte de aniones y cationes<sup>191,201</sup>, en nuestro caso, los residuos de His171 e His197 afectaron el flujo de moléculas de agua a la cavidad hidrofílica e impidieron el transporte del ion  $\text{Na}^+$ . Con ese argumento, se evaluaron los tautómeros y protómeros más probables del anillo de imidazol acorde a la orientación de estos residuos. Dicha consideración resultó en seis sistemas de 5FN3 con diferentes tautómeros/protómeros (*Figura 7.14*), en los que se varió la posición del hidrógeno en el nitrógeno delta (ND) y épsilon (NE) de su estado neutro y de su forma protonada (NP). Posteriormente, se generaron entre 21 y 33 configuraciones del ion  $\text{Ca}^{2+}$  a lo largo del canal para describir la coordenada de reacción en los seis sistemas (ver *Figura A3.22 del Apéndice III*), evaluándose cada sistema con el método de US por un periodo de 10 ns de simulación atómica (*total = 1,670 ns*). En el perfil de PMF de la *Figura 7.14B* se observa que el ion  $\text{Ca}^{2+}$  se une fuertemente a los residuos de los sitios S1 y S2, mostrando un mejor perfil de interacción en los sistemas no protonados con preferencia por el tautómero ND de His171 ( $\text{His171}_{\text{ND}}$ ) (ver *Figura 7.14B*). Sin embargo, los sistemas presentaron un incremento significativo de energía durante el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  del sitio S2 a S3, la cual continúa aumentando hasta el final de la coordenada de reacción. Este resultado sugiere que, independientemente de la isomería de las histidinas, el ion  $\text{Ca}^{2+}$  no pueda ser transportado a través de APH-1A debido a la presencia del residuo Arg87 (carga formal positiva) en la parte media del canal (ver *Figura 7.14C*) repele la interacción con el ion. Esto último explica también la razón por la cual el ion  $\text{Na}^+$  permaneció en la cavidad superior durante las simulaciones y no logró cruzar a la región intracelular, como lo hicieron las moléculas de agua. El aminoácido Arg87 también está presente en la isoforma APH-1B y no existen reportes acerca de mutaciones en este sitio, por lo que su alta conservación reduce la probabilidad de que el transporte ocurra en alguna variante del sistema.<sup>202</sup>

Con los resultados de este estudio se puede concluir que el componente APH-1A tiene la capacidad de almacenar moléculas de agua en su cavidad superior y cavidad hidrofílica, transportando de forma ocasional algunas de estas moléculas al interior o exterior de la célula. Además, APH-1A permite el influjo de cationes  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  a la cavidad superior, siendo retenidos por sus interacciones con residuos hidrofílicos. Finalmente, se rechaza la posibilidad de que APH-1A forme un canal para el transporte de iones  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior de la célula.

### VIII. Sitio de reconocimiento del sustrato en el complejo de $\gamma$ -secretasa

Para la identificación del sitio de unión inicial del sustrato C99 (SBS) al complejo de  $\gamma$ -secretasa, se llevaron a cabo estudios de acoplamiento molecular proteína-proteína y simulaciones de dinámica molecular de grano grueso (CG) con conformaciones extraídas de simulaciones atómicas (AA) de los modelos 5FN2 y 5FN3. Adicionalmente, se realizó un estudio comparativo, usando las mismas metodologías, de la interacción de la enzima con el sustrato Notch-1. En el *Esquema 8.1* se muestra el algoritmo general de trabajo seguido.



**Esquema 8.1.** Diagrama de trabajo empleado para la identificación del sitio de unión inicial de los sustratos C99 y Notch-1 al complejo de  $\gamma$ -secretasa. (\*) Simulaciones atómicas generadas en el capítulo anterior.

#### VIII.1. Metodología

##### VIII.1.1. Preparación de los modelos

(a) *Complejo de  $\gamma$ -secretasa.* Se seleccionaron las estructuras más representativas del (1) ECD de NCT y (2) de la región transmembranal del complejo de  $\gamma$ -secretasa (PS1, APH-1A, PEN-2 y NCT-TM1) mediante un análisis de agrupamiento (*clustering*) conformacional basado en el RMSD de los últimos 500 ns de las simulaciones atómicas de 5FN2 y 5FN3. Para la formación de los grupos (*clusters*), se empleó el método de selección *gromos* con un valor de 0.15 nm de RMSD como límite entre conformaciones. Se extrajeron las estructuras más representativas de cada uno de los grupos generados con base en la media de distribución de los valores de RMSD. De estas estas estructuras, se seleccionaron a aquellas con mayor población conformacional en el grupo y cuyo conjunto representaban más del 90 % de las conformaciones muestreadas durante los últimos 500 ns de cada simulación. Por otro lado, se extrajo la estructura al tiempo final de la simulación de 5FN2 para su conversión a un modelo de CG.

(b) *Sustratos*. Se descargaron del PDB las estructuras determinadas por resonancia magnética nuclear (RMN) de los péptidos transmembranales C99 (PDB: 2LLM<sup>203</sup>, Modelo 2) y Notch-1 (PDB: 5KZO<sup>204</sup>, Modelo 1). A la estructura de C99 se le completó la región N-terminal (aa. 1 a 14) con el programa MODELLER v9.16<sup>205</sup> y el segmento C-terminal (aa. 56 a 99) con el modelo publicado por Straub y colaboradores<sup>206</sup>. Debido a la extensión de la secuencia y a la poca información estructural, no se modeló la región C-terminal de Notch-1 (aa. 1772 a 2555), empleándose así únicamente la información estructural depositada en el PDB (aa. 1721-1771). Cada sustrato se orientó respecto a una membrana de POPC para su posterior preparación con la herramienta *membrane builder* del servidor web CHARMM-GUI. Los sistemas fueron evaluados durante 100 ns (310 K y 1.0 bar) de simulación de MD atómica con el campo de fuerza CHARMM36 en el programa GROMACS 5.1.4, empleando la misma metodología de preparación, producción y parámetros descritos en el capítulo anterior de este trabajo. A diferencia de las simulaciones anteriores, se usaron tiempos de 25 y 100 ps, respectivamente, para los dos módulos de ensambles NVT y NPT.

### VIII.1.2. Acoplamiento molecular

Se realizó el acoplamiento molecular péptido-proteína en las estructuras más representativas del ECD de NCT (NCT-ECD) empleando el servidor web ClusPro PeptiDock<sup>207</sup> con los primeros diez aminoácidos de la región N-terminal de C99 (C99<sub>1-10</sub>) y Notch-1 (Notch-1<sub>1721-1730</sub>). Con el servidor web ClusPro v2.0<sup>208</sup> se llevaron a cabo acoplamientos moleculares de las estructuras al tiempo final de las TMs de C99 (C99<sub>15-55</sub> y C99<sub>28-55</sub>) y Notch-1 (C99<sub>1721-1762</sub> y C99<sub>1733-1762</sub>) en las conformaciones más representativas de la región transmembranal del complejo de  $\gamma$ -secretasa (GS-TM). Para ambos acoplamientos se solicitó una búsqueda exhaustiva en la superficie de los receptores, identificando a los mejores acoplamientos con base en su modo de unión y en las interacciones electrostáticas y de van der Waals (vdW). Se emplearon las herramientas *mindist* y *select* de GROMACS para la identificación y caracterización de los sitios de unión más probables.

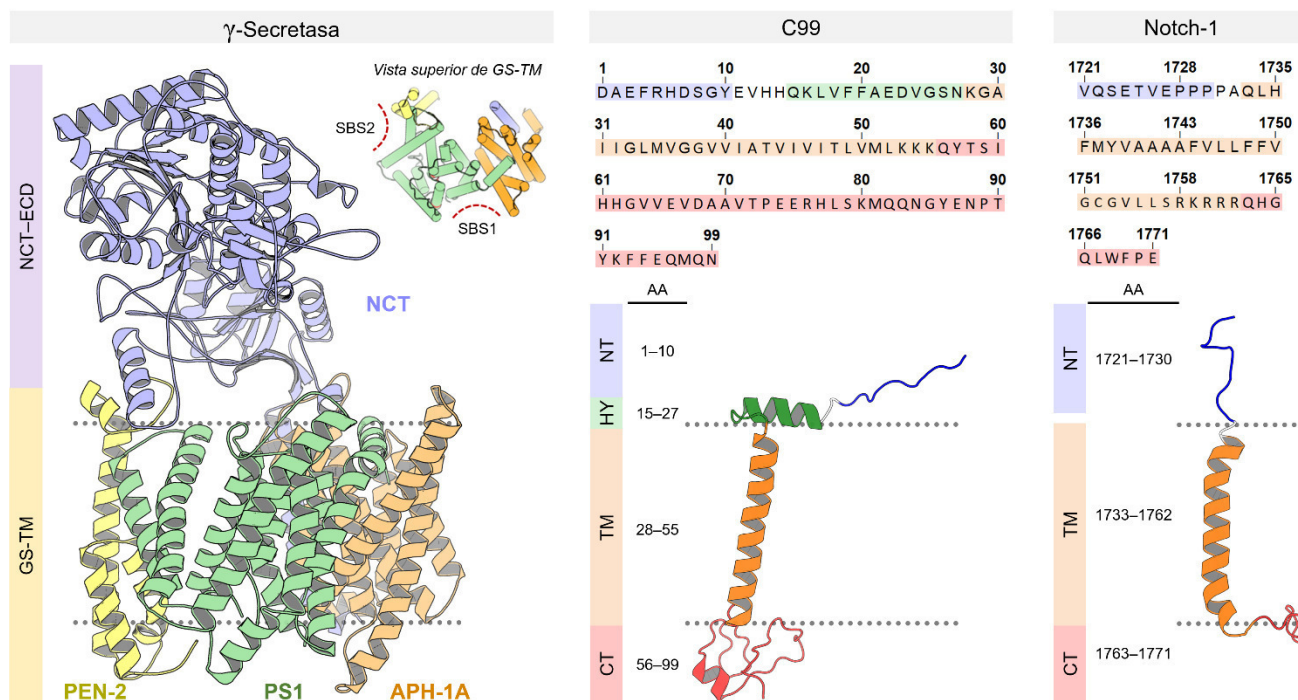
### VIII.1.3. Simulaciones de dinámica molecular de grano grueso enzima-sustrato

Se generaron dos sistemas del complejo de  $\gamma$ -secretasa rodeado por seis péptidos sustrato (GS+C<sub>99</sub> y GS+Notch-1) empleando las estructuras al tiempo final de las simulaciones atómicas de 5FN2, C99 (C99<sub>1-99</sub>) y Notch-1 (Notch-1<sub>1721-1771</sub>). Los péptidos se colocaron a una distancia de 4.5 nm respecto al complejo con ayuda de la herramienta *insert-molecules* de la paquetería de GROMACS, en la cual se definió la caja de inserción en la región transmembranal y la libre rotación del sustrato en el eje Z. Cada sistema se transformó a una representación de CG y se embebió en una membrana de POPC con el programa *insane*<sup>209</sup>, utilizando el campo de fuerza Martini v2.2. Se empleó la misma metodología y parámetros descritos en el capítulo anterior para la preparación, equilibrio y producción de ambos sistemas. Se simularon 20 réplicas de cada uno de los sistemas durante un periodo de tiempo de 5  $\mu$ s por réplica (total = 200  $\mu$ s). Del conjunto de ambas trayectorias, se analizó la posición de los péptidos en función del tiempo, el tiempo de residencia de los péptidos en el complejo y el factor de ocupación de los contactos por residuo utilizando herramientas de GROMACS (*mindist* y *select*) y MdAnalysis (*distances* y *density*).

## VIII.2. Resultados y Discusión

Como se mencionó en el *Capítulo II* de este trabajo, estudios experimentales han propuesto dos posibles sitios de unión de sustratos (SBS) en el complejo de  $\gamma$ -secretasa. El primer sitio (*SBS1*) se encuentra conformado por TM2, TM6 y TM9 de PS1 y APH-1A, mientras que el segundo sitio (*SBS2*) se localiza entre PS1-NTF, PEN-2 y el ECD de NCT.<sup>73,74</sup> Durante la caracterización del mecanismo de unión a *SBS2*, se encontró que los primeros diez aminoácidos de la región N-terminal de C99 (C99-NT o C99<sub>1-10</sub>) constituyen el primer sitio de contacto del sustrato con el ECD de NCT (NCT-ECD) (ver *Figura A4.1* del *Apéndice IV*). Esta interacción ocurre de forma simultánea a la unión de los residuos que conforman la hélice yuxtamembranal del sustrato (C99-HY o C99<sub>15-27</sub>) con exositos del componente PEN-2. Los contactos permiten que C99 sea desplazado por el NTF de PS1 hasta *SBS1* vía interacciones de su dominio transmembranal (C99-TM o C99<sub>28-55</sub>) para finalmente ser translocado al sitio activo.<sup>74</sup>

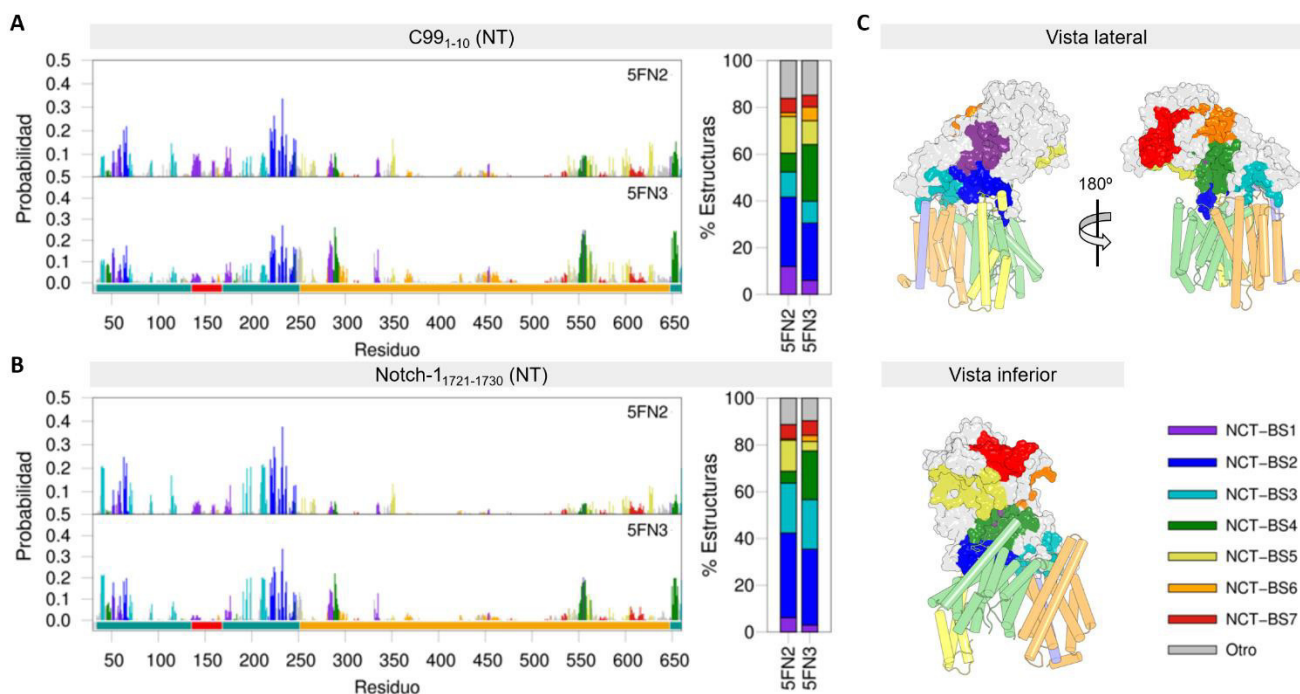
Para este trabajo, se caracterizaron los posibles sitios de unión de la región C99-NT (C99<sub>1-10</sub>) en el NCT-ECD mediante estudios de acoplamiento molecular péptido-proteína (*Figura 8.1*). Asimismo, se realizaron acoplamientos proteína-proteína del dominio C99-HY/TM (C99<sub>15-55</sub>) y C99-TM (C99<sub>28-55</sub>) para la identificación de los sitios en los componentes transmembranales de  $\gamma$ -secretasa (GS-TM). Estos estudios fueron seguidos por simulaciones de CG para la caracterización dinámica del mecanismo de reconocimiento del péptido completo (C99<sub>1-99</sub>) por parte del complejo de  $\gamma$ -secretasa. Los resultados generados se compararon con la información experimental y con los datos de acoplamiento del sustrato Notch-1, esto con la finalidad de identificar sitios claves para la inhibición selectiva de C99.<sup>210</sup>



**Figura 8.1.** Representación tridimensional del complejo de  $\gamma$ -secretasa y de los sustratos C99 y Notch-1, coloreados con base en los componentes y regiones estructurales características. En el complejo de  $\gamma$ -secretasa se identifica el ectodominio de NCT (NCT-ECD) y la región transmembranal (GS-TM), mientras que para los sustratos se muestran los segmentos N-terminal (NT) y C-terminal (CT), y las hélices yuxtamembranal (HY) y transmembranal (TM).

## VIII.2.1. Reconocimiento de la región N-terminal de C99 y Notch-1 por NCT-ECD

Para este estudio, se extrajeron 20 conformaciones representativas del NCT-ECD a partir del análisis de agrupamiento de las simulaciones atomísticas de los sistemas 5FN2 y 5FN3. Estas conformaciones fueron sometidas a acoplamiento molecular con las regiones NT de los sustratos C99 y Notch-1 empleando el programa ClusPro PeptiDock<sup>207</sup>, de los que se obtuvieron aproximadamente 4,000 complejos por sistema (total  $\approx$  16,000 complejos). El uso de motivos de los fragmentos de las secuencias facilitó la identificación de los potenciales sitios de interacción en el NCT-ECD. La *Figura 8.2* muestra los gráficos de probabilidad de interacción de los segmentos NT con NCT-ECD y los respectivos sitios de unión caracterizados a partir de los complejos resultantes. En general, se observa que la región NT de los sustratos tiene una alta preferencia por el lóbulo menor de NCT (aa 34 a 251 y 648 a 665) y por regiones cercanas a la membrana del lóbulo mayor (aa 252 a 300 y 550 a 647). El resultado es congruente con el contexto estructural, dado que el tamaño del segmento NT anclado a la región TM sólo permitiría interactuar con las regiones próximas a la membrana. Entre los sitios identificados, la región NT mostró en su mayoría una preferencia por el sitio NCT-BS2, el cual concuerda con los datos experimentales reportados por Fukumori y Steiner<sup>74</sup> al encontrarse próximo al sitio SBS2 de las TMs (ver *Figura A4.1* del Apéndice IV). Además de este sitio, en el sistema 5FN3 se presentaron varios complejos en donde el NT interactuó de forma preferente con NCT-BS4, el cual se encuentra entre ambos SBSs. Este último permitiría explicar la posible interacción de los sustratos en ambos sitios o representar una posible vía de transporte desde SBS2 hasta SBS1. Por otra parte, se caracterizó el primer sitio de reconocimiento propuesto (NCT-BS1). Sin embargo, el residuo Glu333, el cual se creía que estaba involucrado en la interacción con NT, presentó pocos contactos con los sustratos ( $0.006 < P < 0.024$ ). Finalmente, el sitio NCT-BS3 mostró una alta preferencia de interacción por Notch-1, cuya cercanía con NCT-BS2 se podría relacionar a la unión en SBS2.



**Figura 8.2.** Sitios de interacción de las regiones NT de los sustratos (A) C99 y (B) Notch-1 en el dominio extracelular de NCT. Los sitios de interacción se encuentran coloreados con base en la representación del inciso (C).



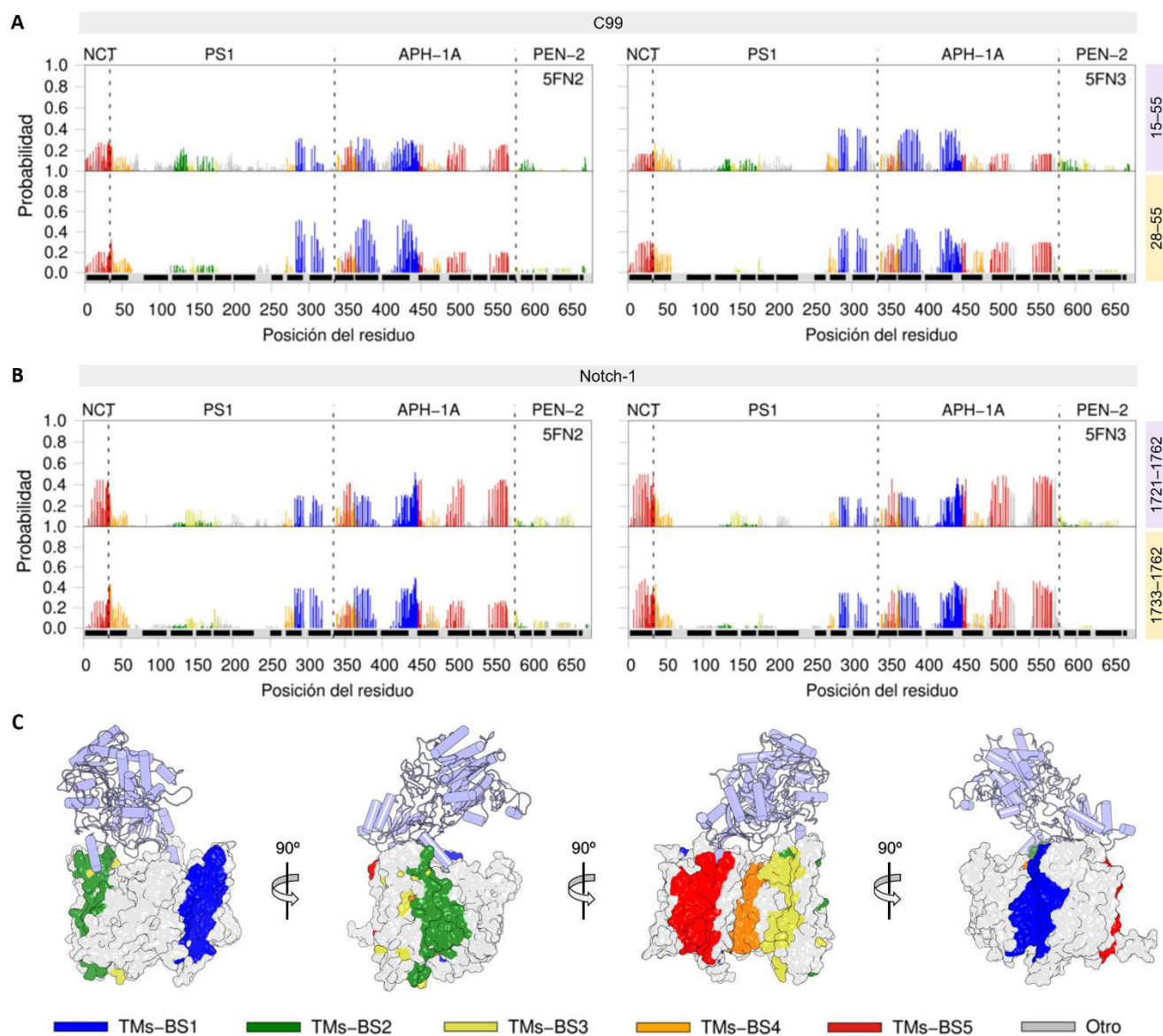
### VIII.2.2. Interacción de la región transmembranal de C99 y Notch-1 con GS-TM

El análisis de agrupamiento realizado a la región transmembranal de  $\gamma$ -secretasa (GS-TM) de las simulaciones atomísticas de 5FN2 y 5FN3 arrojó 5 conformaciones de cada sistema que representaban más del 95 % de los últimos 500 ns del tiempo simulado. Por parte de los sustratos, se tomó la estructura al tiempo final de las simulaciones atomísticas de 100 ns realizadas a C99 y Notch-1 para llevar a cabo los acoplamientos proteína-proteína con las conformaciones de GS-TM (ver Figuras A4.2 y A4.3 del Apéndice IV). Para los acoplamientos se emplearon los segmentos TM y HY/TM de C99, y NT/TM de Notch-1 como estructuras iniciales. Del resultado de los acoplamientos se conservaron únicamente a aquellos complejos en los que las TMs de los sustratos presentaron un ángulo de inclinación respecto al eje z menor o igual a  $35^\circ$  y una posición de  $\pm 1.0$  nm respecto a la posición original en la membrana. Estos parámetros se establecieron con base en los datos extraídos del estudio de la caracterización dinámica de los sustratos. Las consideraciones anteriores resultaron en la obtención de diferentes números de complejos para cada segmento de los sustratos: C99-TM (143), C99-HY/TM (184), Notch-1-NT/TM (210), Notch-1-TM (99).

El análisis de probabilidad de formación de complejos y sitios de interacción de los segmentos de los sustratos con las TMs de sistemas 5FN2 y 5FN3 se muestran en la Figura 8.3. Estos resultados de acoplamiento muestran una alta preferencia de todos los segmentos por la formación de complejos con el sitio TMs-BS1 (SBS1). En el caso de Notch-1, se observó la formación de un gran número de complejos que interactuaron con el sitio TMs-BS5, cuya cercanía con NCT-BS3 corrobora la preferencia de Notch-1 por esta región de  $\gamma$ -secretasa. Por su parte, el sitio con mayor probabilidad de interacción para el sustrato C99 fue TMs-BS1, el cual se encuentra próximo al sitio NCT-BS4. Resulta interesante notar que la presencia de la hélice yuxtamembranal en C99 (C99-HY/TM o C99<sub>15-55</sub>) favorece un ligero aumento en la probabilidad de ocupación ( $0.074 < P < 0.198$ ) del sustrato en el sitio TMs-BS2 (SBS2), en comparación con los segmentos de Notch-1 ( $P < 0.024$ ) y C99 sin HY ( $P < 0.015$ ). Este resultado coincide con los datos experimentales de Fukumori y Steiner, en los que observaron que los aminoácidos que componen a HY (aa 15-27) interactúan de forma inicial con PEN-2 y PS1 (ver Figura A4.1 del Apéndice IV). Por tanto, la presencia de la región HY podría comprometer la unión del sustrato al sitio SBS2 de  $\gamma$ -secretasa.

Los resultados obtenidos a partir de los estudios de acoplamiento proteína-proteína son consistentes con los datos generados del acoplamiento de NT con NCD-ECD. De ambos estudios es posible concluir que C99 tiene una alta probabilidad de unirse al sitio SBS1 (TMs-BS1) mediante la interacción inicial de su región NT con NCT-BS4. Sin embargo, la presencia de HY en C99 permite que el sustrato pueda tener una interacción inicial con el sitio SBS2 (TMs-BS2), la cual se vería favorecida por su interacción con el sitio NCT-BS2 por parte del segmento NT. Por otro lado, el sustrato Notch-1 tiene mayor probabilidad de reconocer de forma inicial a los sitios NCT-BS1 o NCT-BS3 por parte de su región NT, facilitando el acoplamiento de su hélice transmembranal con el sitio TMs-BS5 de  $\gamma$ -secretasa. Ambos sustratos podrían ser transportados con ayuda de NCT-BS4 al sitio SBS1, el cual tiene un acoplamiento preferencial en ambos sistemas puesto que se encuentra próximo a cualquiera de los dos posibles sitios de ingreso al sitio activo (SE1 y SE2, ver Figura 2.4 de la sección de Antecedentes).

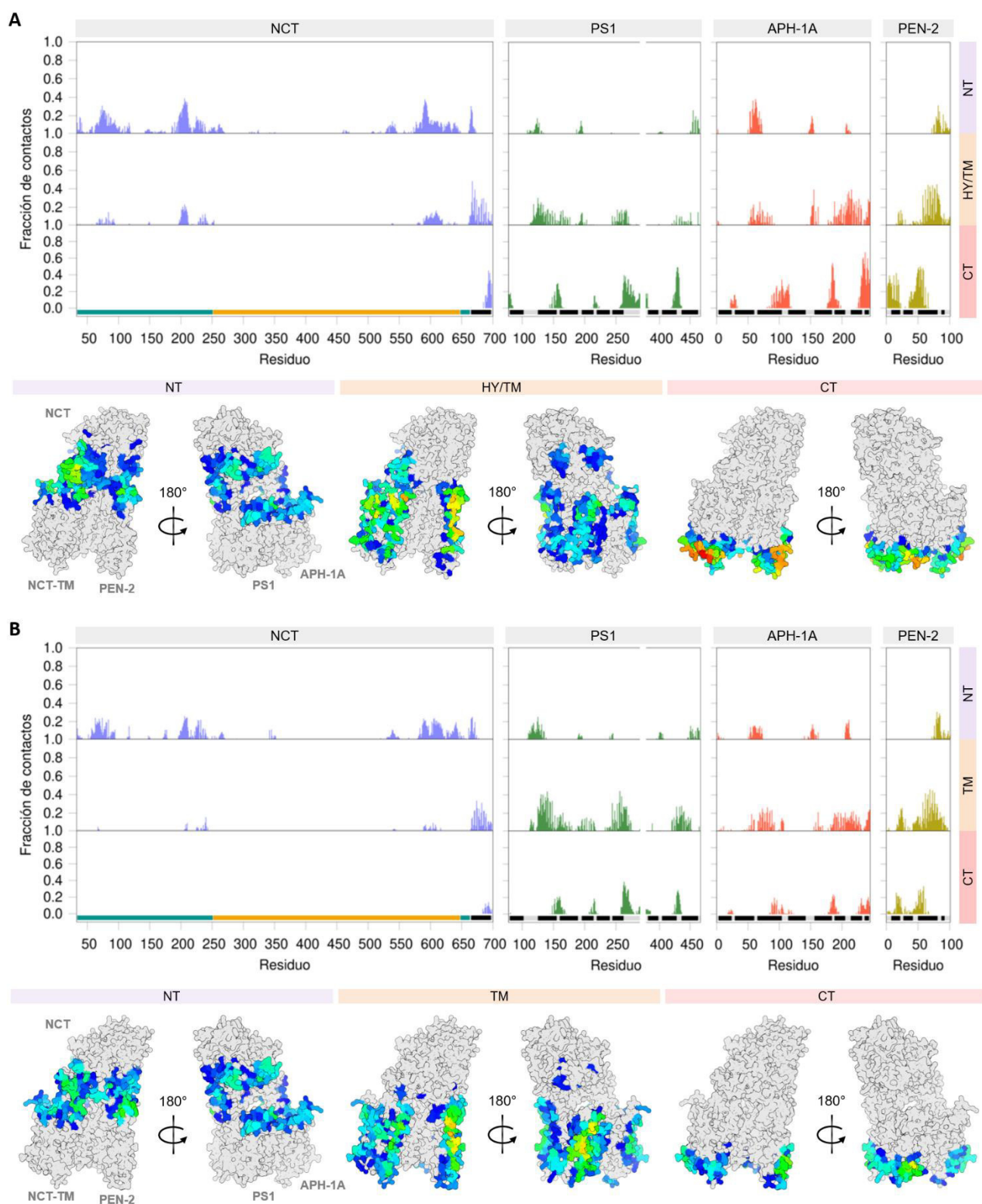
Los estudios de acoplamiento ofrecieron un panorama general de los sitios más probables de interacción de los diferentes segmentos de los sustratos con  $\gamma$ -secretasa; sin embargo, la caracterización dinámica de los sistemas completos podría proveer datos adicionales al mecanismo de reconocimiento.



**Figura 8.3.** Sitios de interacción de las regiones transmembranales de los sustratos (A) C99 y (B) Notch-1 en los dominios TM de  $\gamma$ -secretasa en los sistemas 5FN2 y 5FN3. Los sitios de interacción se encuentran coloreados con base en la representación del inciso (C).

### VIII.2.3. Caracterización dinámica de la unión de C99 y Notch-1 a $\gamma$ -secretasa

Para esta sección se realizaron 20 réplicas de dinámica molecular de grano grueso de 5  $\mu$ s cada una con el sistema 5FN2 de  $\gamma$ -secretasa en presencia de 6 unidades de un sustrato colocadas a una distancia mínima 4.5 nm respecto a ellas y al complejo enzimático. En esta ocasión se emplearon las estructuras completas de ambos sistemas extraídas de las conformaciones al tiempo final de las simulaciones atomísticas de 1,000 ns y 100 ns de  $\gamma$ -secretasa y el sustrato, respectivamente. En la *Figura 8.3* se muestran los gráficos de fracción de contactos de los sustratos C99 y Notch-1 con las cuatro diferentes subunidades del complejo enzimático. Con el fin de simplificar el análisis de los datos, se evaluó el promedio de la fracción de contactos de los últimos 3  $\mu$ s de simulación de las 20 réplicas en las tres principales regiones estructurales de los sustratos.



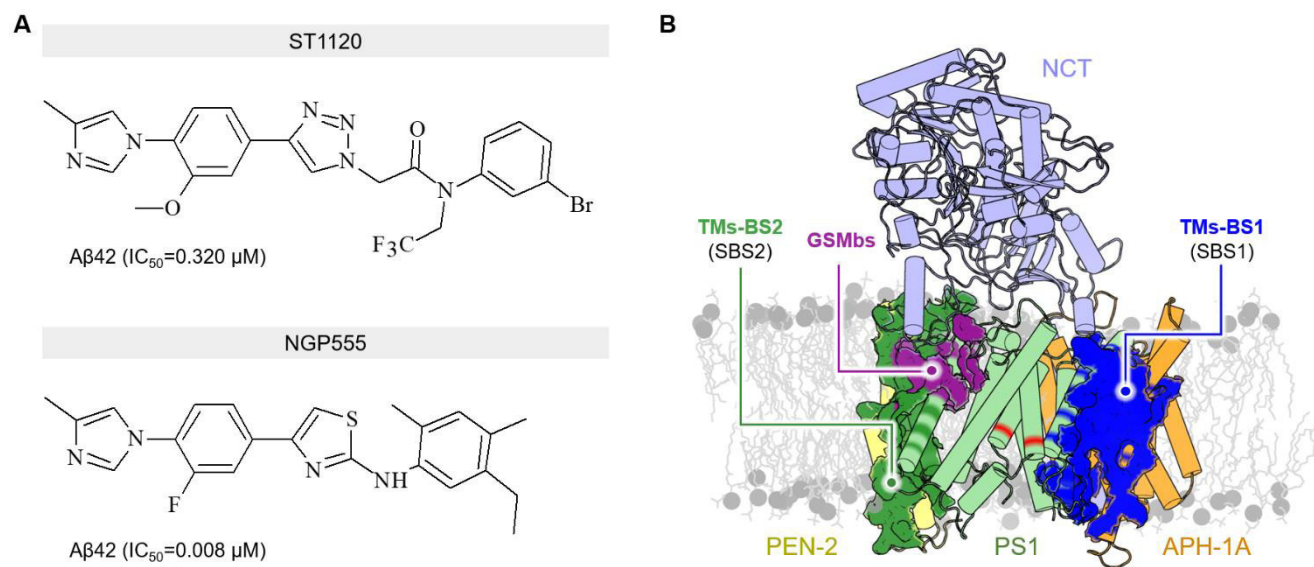
**Figura 8.4.** Fracción de contactos promedio calculado a partir de las 20 réplicas de simulación de CG de los sistemas de  $\gamma$ -secretasa con las 6 unidades de los sustratos (A) C99 y (B) Notch-1. Los gráficos muestran los sitios de interacción de cada una de las regiones de los sustratos, cuya fracción de contactos se representa de forma esquemática en las estructuras inferiores usando rango de colores que indican los sitios de mayor (rojo) a menor (azul) número de contactos.

Con base en el análisis de la fracción de contactos en los diferentes sistemas fue posible observar que los segmentos estructurales de ambos sustratos compartían un patrón de interacción muy similar en las diferentes subunidades del complejo de  $\gamma$ -secretasa (ver *Figura A4.4 del Apéndice IV*). Las diferencias presentes en el número de contactos de la región CT se relacionan directamente con el tamaño del segmento en ambos péptidos, siendo mayor en C99 por un total de 35 aminoácidos. Como se mencionó anteriormente, la interacción del NT con el NCT-ECD es un paso esencial para el reconocimiento inicial del sustrato por el complejo enzimático. Los resultados de las simulaciones muestran que el NT se acopla tanto al lóbulo menor como al lóbulo mayor del NCT-ECD en ambos sistemas, involucrando principalmente a los sitios de unión descritos anteriormente como NCT-BS2, NCT-BS3 y NCT-BS7. El gran número de contactos con los sitios NCT-BS2 y NCT-BS3 es consistente con los resultados de los acoplamiento péptido-proteína obtenidos en la sección anterior. Por su parte, la interacción con NCT-BS7 resulta del cambio conformacional del complejo hacia la forma compacta (ver capítulo anterior), donde la interacción del ECD con las tres subunidades transmembranales y las cabezas de los lípidos permite aproximar este dominio hacia el segmento NT del sustrato. El grupo de Dal Parero<sup>135</sup> observó un comportamiento similar en sus simulaciones de MD-CG, donde el uso de una membrana mixta favoreció la forma compacta del complejo y, por tanto, la interacción del NT de C99 con NCT-BS7. Su estudio también permitió identificar un segundo sitio probable de interacción, el cual correspondería al también identificado sitio NCT-BS3. Además de la composición de la membrana, ese estudio difiere del reportado en este trabajo al haber realizado sólo una réplica de simulación y al emplear únicamente el segmento HY/TM de C99 (C99<sub>15-55</sub>); sin embargo, se utilizó el mismo número de sustratos y tiempo de simulación. De nuestras simulaciones, resultó interesante identificar una alta tasa de contactos del segmento NT con la región CT de PEN-2, la cual se encuentra próxima a NCT-BS2 y constituye una parte esencial del sitio de reconocimiento SBS2.

Por su parte, la región TM de ambos sustratos mostró una alta preferencia de interacción por TM3 de PEN-2, ocupando el sitio TMs-BS2 y una región cercana entre este y TMs-BS3. Estos resultados difieren de la baja probabilidad de interacción observada en los estudios de acoplamiento molecular para estos sitios; sin embargo, los nuevos datos concuerdan con la descripción experimental del sitio SBS2 reportado por Fukumori y Steiner<sup>74</sup> (ver *Figura A4.1 del Apéndice IV*). El análisis de las simulaciones también muestra a un segundo grupo más frecuente de contactos, en el cual se presenta a la unión de la TMs de los sustratos con TM2, TM6 y TM9 de PS1 y TM2-TM3 de APH-1A. Este patrón de interacción constituye las regiones del complejo de  $\gamma$ -secretasa que conforman a TMs-BS1 (SBS1), el cual se definió como el sitio más probable de unión de C99 durante el acoplamiento molecular. La alta probabilidad de unión a este sitio es congruente con los datos experimentales reportados por el grupo de Tomita e Iwatsubo.<sup>73</sup> De forma similar, el estudio de MD-CG realizado por Han y colaboradores mostró que al simular únicamente las TMs de estos sustratos se favorece en gran medida la interacción por este sitio en específico. Sin embargo, la ausencia de la región NT/HY de C99 y NCT-ECD de  $\gamma$ -secretasa en ese estudio pudieron haber dado lugar a artefactos de interacción durante las simulaciones. Finalmente, un tercer y último grupo de contactos involucró la interacción de los sustratos con el sitio TMs-BS5 (TM1 de NCT y TM6-TM7 de APH-1A) en nuestras simulaciones, relacionándose este sitio con la interacción inicial del fragmento NT con NCT-BS3. Resulta interesante notar que las regiones con alto número de contactos concuerdan con los sitios de unión más probables observados durante acoplamiento moleculares.

Es importante mencionar que en varias de las simulaciones de CG se observó la asociación de oligómeros de C99 al complejo de  $\gamma$ -secretasa (ver *Figura A4.5* del *Apéndice IV*). La formación de estos multímeros podría alterar la afinidad del sustrato por el sitio inicial de la proteína, lo que resulta ser un artefacto de la simulación asociado a la concentración del péptido en la membrana. Sin embargo, se sabe que el sustrato C99 tiene una alta predisposición a la formación de homodímeros, lo cual también fue observado durante estas simulaciones y podría explicar la preferencia por la generación de estos multímeros previo o durante su reconocimiento por el complejo de  $\gamma$ -secretasa.<sup>211</sup>

Los resultados en conjunto sugieren que el segmento NT de C99 tiene una mayor probabilidad de unirse al sitio NCT-BS2 del ECD, lo que promueve la interacción de HY/TM con TMs-BS2 (SBS2) del complejo de  $\gamma$ -secretasa. Por otro lado, el fragmento NT de Notch-1 tiene más probabilidad de acoplarse al sitio NCT-BS3, facilitando la unión de su región TM con el sitio TMs-BS1 (SBS1). Ambos sitios de unión identificados para los sustratos concuerdan con los descritos en estudios experimentales previos.<sup>73,74</sup> Además, la presencia de la hélice yuxtamembranal de C99 mostró ser una región estructural clave para el reconocimiento y unión al sitio TMs-BS2. Estos resultados permitirían explicar a su vez el posible mecanismo de acción de los moduladores *ST1120* y *NGP555*, los cuales se sabe experimentalmente se unen a un sitio cercano a TMs-BS2 (*Figura 8.5*).<sup>98,212</sup> Este sitio alostérico de los GSMs (GSMbs) comprende las regiones HL1, TM3 y TM4 de PS1 y TM3 de PEN-2, cuya interacción se ha relacionado con la disminución en la generación del péptido A $\beta$ 42 sin mostrar alteraciones en la proteólisis de Notch-1. Por tanto, la unión de los compuestos a este sitio contiguo a TMs-BS2 bloquearía directamente el reconocimiento inicial de C99, mientras que Notch-1 podría seguir siendo reconocido debido a que tiene mayor probabilidad de ser reconocido por el sitio TMs-BS1 del complejo de  $\gamma$ -secretasa.



**Figura 8.5.** (A) Estructura química de los moduladores de  $\gamma$ -secretasa (GSM) *ST1120* y *NGP555* y sus valores de concentración inhibitoria 50 ( $IC_{50}$ ) de la formación del péptido A $\beta$ 42.<sup>98,212</sup> (B) Representación del posible sitio de unión de los moduladores (GSMbs, púrpura) y sitios de reconocimiento del sustrato TMs-BS1 (SBS1, verde), TMs-BS2 (SBS2, azul) en el complejo enzimático de  $\gamma$ -secretasa.

## IX. Efecto de la composición de la membrana en la actividad de $\gamma$ -secretasa

Se sabe que la naturaleza y composición de los lípidos en una bicapa lipídica son factores clave que afectan a la estructura y actividad de las proteínas de membrana.<sup>213,214</sup> Esto también ocurre en el complejo de  $\gamma$ -secretasa, en el que se ha observado que al modificar el ambiente lipídico de la enzima se altera directamente la actividad proteolítica del componente PS1. El grupo de investigación de Selkoe<sup>86</sup> reportó que  $\gamma$ -secretasa presenta el 100 % de actividad en membranas compuestas únicamente por lípidos con cabeza PC, mientras que otras membranas homogéneas reducen su actividad de manera significativa o en su totalidad. Además, se ha demostrado que membranas de PC con alta concentración de CHOL y balsas lipídicas aumentan la actividad de la enzima.<sup>215</sup>

Para realizar una descripción detallada del efecto de la composición de la membrana en el ensamble conformacional y dinamismo del complejo de  $\gamma$ -secretasa, se evaluó (1) el perfil de presión lateral de la membrana, (2) la transición entre los estados *activo/inactivo* del componente PS1 y (3) el comportamiento general de los lípidos que rodean a la enzima. El perfil de presión lateral (PL) permite estudiar las alteraciones en la activación y asociación de proteínas debido a variaciones en la presión relacionado a las interacciones entre las cabezas de los lípidos, la región interfacial o las cadenas alifáticas.<sup>216</sup> Por tanto, las alteraciones en la presión lateral de la membrana podrían interferir en la transición entre el *estado 1 (inactivo)* y *estado 2 (activo)* del componente PS1. Para estudiar esto último, se emplearon los parámetros de orden de distancia entre los residuos de aspártico catalíticos ( $dd_{Asp}$ ) e inclinación de TM6 respecto a la membrana ( $I_{TM6}$ ), los cuales fueron descritos en el *capítulo VI*. Finalmente, se caracterizaron las interacciones proteína-lípido para describir el comportamiento general de los lípidos que rodearon a  $\gamma$ -secretasa durante las simulaciones.<sup>217</sup>

En esta sección se llevaron a cabo simulaciones de MD multiescala, combinando modelos de grano grueso (CG) y de todos los átomos (AA), para describir alteraciones en ensamble conformacional del complejo de  $\gamma$ -secretasa en diferentes composiciones de bicapas lipídicas. Para esto, se construyeron un total de 12 membranas, en las cuales se evaluó el efecto de (1) la carga en la cabeza del lípido, (2) el grosor de la bicapa, (3) la concentración de colesterol y (4) la presencia de mezclas heterogéneas de lípidos similares a las balsas lipídicas. En el *Esquema 9.1* se detalla el algoritmo de trabajo empleado para esta parte del estudio.

### IX.1. Metodología

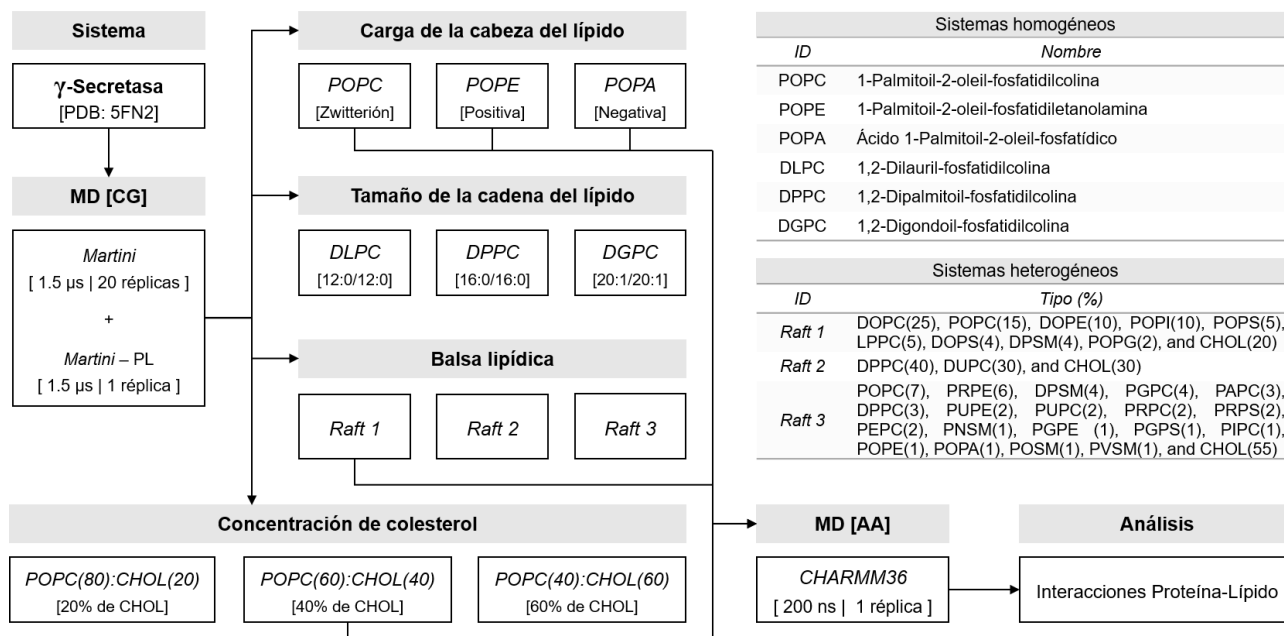
#### IX.1.1. Simulaciones de dinámica molecular de grano grueso (CG)

Los modelos de CG del estado desprotonado ( $Asp^-$ ) y monoprotonado ( $Asp-H_{385}$ ) de Asp385 del sistema 5FN2 de  $\gamma$ -secretasa fueron embebidos en las diferentes membranas lipídicas usando el módulo *Martini Maker* del servidor web CHARMM-GUI y el campo de fuerza Martini v2.2. Se empleó la misma metodología que la descrita en el *capítulo VII* de este trabajo para la preparación, equilibrio y producción de los sistemas. En los equilibrios y la producción, se fijó la temperatura a 315 K con el termostato modificado de Berendsen (*V-rescale*), manteniendo la presión a 1.0 bar con el acoplamiento semi-isotrópico del baróstato de Berendsen. Los sistemas se neutralizaron mediante el reemplazo de moléculas de agua con iones  $Na^+$  y  $Cl^-$  llevando a una concentración 0.15 M, con excepción del sistema con lípidos POPA. Se evaluaron 20 réplicas para cada uno de los sistemas en

los diferentes estados de protonación durante un tiempo de simulación de 1.5  $\mu$ s por réplica (60  $\mu$ s/sistema) con el programa GROMACS 5.0.6. Las simulaciones de MD se analizaron con herramientas de GROMACS (*mindist*, *select*, *g\_lomepro*<sup>218</sup>, *hbond*, *mdmat*), librerías de MdAnalysis para Python (*distances*, *helanal*, *density*, *leaflet*, *visualization.streamlines*) y los programas FATSLiM<sup>219</sup> y GridMAT-MD<sup>220</sup>. Para el cálculo de la presión lateral se realizaron simulaciones de 1.5  $\mu$ s de cada sistema con la versión modificada GROMACS\_LP 4.5<sup>221,222</sup>, calculando la presión local en los ejes XY de los últimos 500 ns de cada simulación (10,000 *frames*). Las figuras se generaron con el visualizador PyMOL v0.9 y los gráficos con los programas Gnuplot v5.0 y Matplotlib v2.2<sup>223</sup>.

### IX.1.2. Simulaciones de dinámica molecular atomísticas (AA)

Se construyeron cinco sistemas atomísticos del modelo de 5FN2 con las composiciones de membrana de POPC, POPE, POPA, POPC(60):CHOL(40) y la balsa lipídica *Raft 1*. Esta selección se realizó con base en los resultados experimentales reportados por Osenkowski y colaboradores<sup>86</sup>, los cuales demostraron que el complejo de  $\gamma$ -secretasa se inactiva en presencia de membranas homogéneas de POPE y POPA, registrando un aumento de su actividad en bicapas lipídicas con colesterol y mezclas de lípidos. Los sistemas fueron minimizados energéticamente y equilibrados usando las condiciones y parámetros descritos en el *capítulo VII* de este trabajo. Los equilibrios fueron seguidos por 200 ns de producción almacenando la información cada 2 ps de tiempo. Al igual que en las simulaciones de CG, se fijó una temperatura de 315 K para los cinco sistemas usando el algoritmo del termostato de Nosé-Hoover. Todas las simulaciones fueron realizadas con el campo de fuerza CHARMM36 implementado en el programa GROMACS 5.0.6.



**Esquema 9.1.** Diagrama de trabajo empleado para caracterizar el efecto de la composición de la membrana en la actividad y ensamblaje del complejo de  $\gamma$ -secretasa. Las tablas muestran la composición de los sistemas empleados.

## IX.2. Resultados y Discusión

### IX.2.1. Efecto de la carga del lípido en el ensamble y actividad de $\gamma$ -secretasa

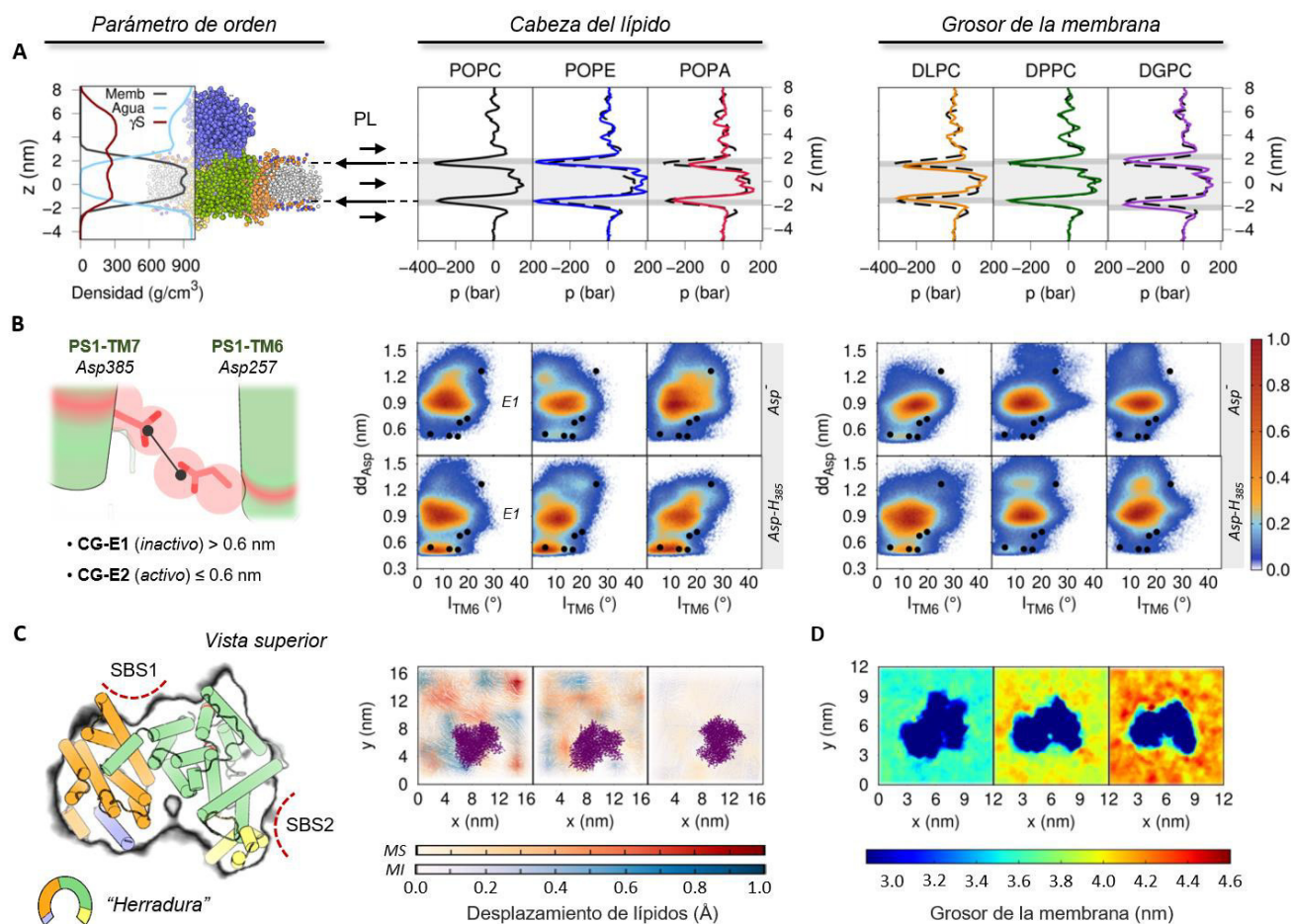
Para estudiar el efecto de la carga en las cabezas de los lípidos se realizaron simulaciones de  $\gamma$ -secretasa embebida en membranas homogéneas con cabezas zwitterónicas (fosfatidilcolina, PC), donador de puente de hidrógeno (fosfatidiletanoalmina, PE) y carga negativa (fosfatidilfosfato, PA), conservando la cadena alifática de 1-pamitoil-2-oleilo (PO, 16:0/18:1) (Figura 9.1A). Los gráficos de RMSD y RMSF de las simulaciones de las simulaciones se reportan en las Figuras A5.1 a A5.5 del Apéndice V. El perfil de presión lateral en XY del sistema control con POPC mostró una distribución homogénea de la presión en la región transmembranal, con una disminución característica en la región interfacial ( $z \approx 1.8$  nm and  $z \approx -1.8$  nm) y un ligero aumento en la zona de las cabezas ( $z \approx 2.2$  nm and  $z \approx -2.2$  nm) y cadenas alifáticas ( $1.5 > z > -1.5$  nm) de los lípidos debido a interacciones repulsivas. Las fluctuaciones de la presión lateral observadas en la región superior de los gráficos ( $z > 2.0$  nm) se derivan de las colisiones de las moléculas de agua con el ECD de NCT, tal y como se representa en el gráfico de densidad. Al igual que en los resultados anteriores, los diagramas de distribución generados con los parámetros de orden  $dd_{Asp}$  e  $I_{TM6}$  para las simulaciones de los sistemas con POPC mostraron que la forma protonada Asp-H<sub>385</sub> de PS1 facilita la transición al *estado 2*, mientras que la forma Asp<sup>-</sup> predomina en el *estado 1* (Figura 9.1B). Como se mencionó anteriormente, la distancia mínima para una interacción electrostática estable en modelos de CG es de 5.0 Å, la cual correspondería a la distancia máxima para considerar una conformación *activa* de PS1. Es por esto último que los intervalos de  $dd_{Asp}$  en las estructuras de crio-EM fueron recalculados empleando las estructuras optimizadas, con restricciones en la cadena principal, de los modelos de CG. Esto permitió definir que en las estructuras de crio-EM a resolución de CG se encuentran en el *estado 1* (E1) cuando  $dd_{Asp}$  es menor a 6.0 Å, mientras que el *estado 2* se presenta por arriba de este valor (E2).

El perfil de presión lateral del sistema con POPE mostró un ligero incremento en la presión transmembranal en comparación con el perfil de POPC, lo cual concuerda con resultados computacionales previos.<sup>224</sup> Resulta interesante observar que este aumento de la presión favorece la presencia de conformaciones activas de PS1 en las simulaciones con el sistema Asp<sup>-</sup>. Para corroborar el impacto del incremento de la presión en estado conformacional de PS1, se realizaron tres simulaciones de 1.5  $\mu$ s de CG a diferentes presiones en la región XY con el modelo Asp<sup>-</sup> de  $\gamma$ -secretasa en membranas de POPC (ver Figura A5.6 del Apéndice V). La distribución de probabilidad resultante de estas simulaciones confirmó que al incrementar la presión del sistema se promueve la transición hacia el *estado activo* (E2). Este proceso podría ser contraproducente, pues se requiere de un estado menos compacto para el reconocimiento e ingreso del sustrato.<sup>134</sup>

En el sistema con la membrana de POPA se observó un aumento en la presión interfacial de la monocapa superior debido a la presencia de interacciones repulsivas entre el complejo y los lípidos, resultando en modificaciones estructurales de la membrana asociadas al dinamismo del sistema. Por otro lado, la disminución de la presión ejercida por las cabezas de los lípidos en la monocapa inferior se atribuye a interacciones atractivas electrostáticas entre estas y los residuos de aminoácidos con carga positiva localizados en la región intracelular. Cabe recordar que existe una mayor proporción de estos residuos en la región intracelular de los complejos transmembranales de  $\gamma$ -secretasa, en comparación con los residuos localizados en la región extracelular. Las



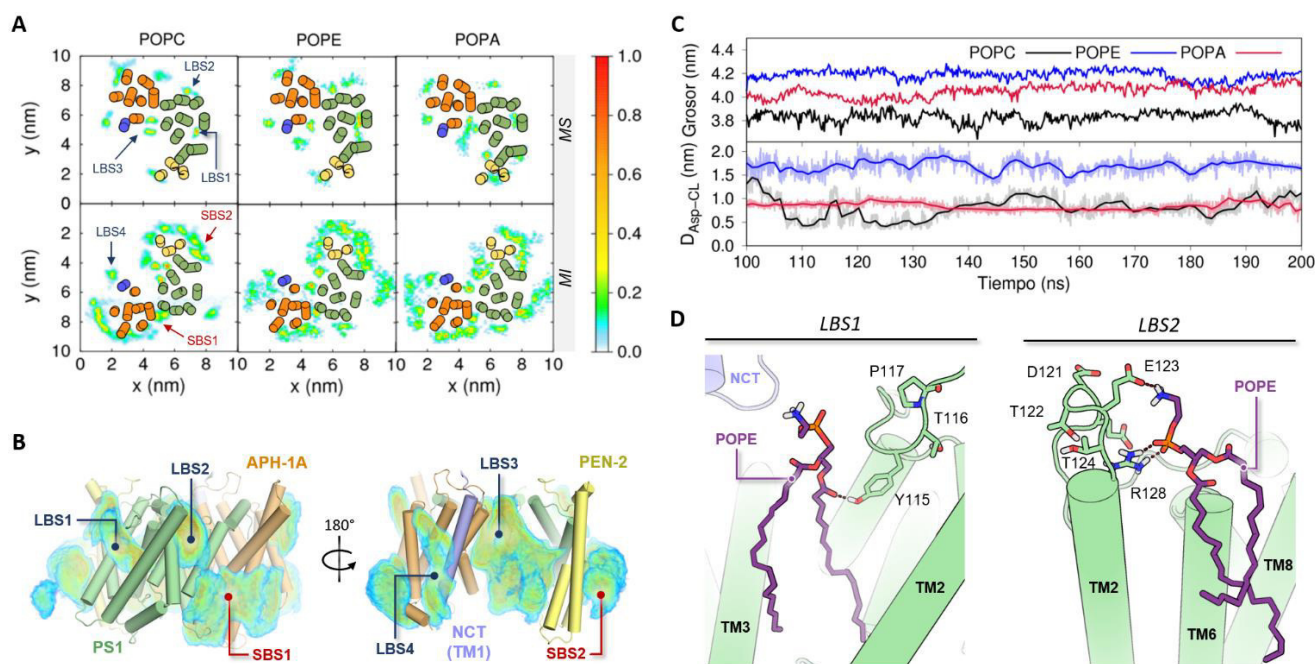
variaciones en la presión lateral permiten explicar la causa de la distribución anormal de la inclinación de TM6 en los sistemas desprotonados, así como el poco desplazamiento de los lípidos de POPA en la superficie de las monocapas en relación con las membranas de POPC y POPE (Figura 9.1C).



**Figura 9.1.** Efecto de la carga en la cabeza de los lípidos (POPC, POPE y POPA) y el grosor de la membrana (DLPC, DPPC y DGPC) en el ensamble estructural de los modelos de CG derivados de 5FN2. (A) Densidad del sistema y perfiles de la presión lateral (PL) como función de la composición de lípidos. La línea negra punteada muestra el perfil del sistema con POPC y las sombras grises describen la región de las cabezas (gris oscuro) y colas (gris claro) de los lípidos en la bicapa. (B) Diagramas de distribución de las 20 trayectorias de simulación de CG de los sistemas con Asp385 en su forma desprotonada (Asp<sup>-</sup>) y monoprotonada (Asp-H<sub>385</sub>). La escala de color a la derecha define la población relativa de la distribución. Los círculos negros corresponden a la información de los modelos optimizados de CG de las estructuras de crio-EM. (C) Representación del desplazamiento de lípidos en las monocapas inferior (MI) y superior (MS) de la membrana. La figura a la izquierda representa la perspectiva del complejo de  $\gamma$ -secretasa empleada para visualización de los gráficos en (C) y (D), así como los posibles sitios de unión iniciales del sustrato (SBS1 y SBS2). (D) Análisis del grosor local de la bicapa lipídica en los sistemas embebidos en DLPC, DPPG y DGPC.

Las simulaciones con los modelos de CG fueron de utilidad para obtener una visión general del comportamiento del complejo de  $\gamma$ -secretasa cuando se modifica la cabeza de los lípidos. Sin embargo, para describir las interacciones del complejo con los lípidos y explorar el origen de los cambios en la actividad de la

enzima, se realizaron simulaciones atómicas de 200 ns de  $\gamma$ -secretasa en las tres diferentes membranas. En estas simulaciones se analizó el tiempo de residencia de los lípidos cercanos al complejo, esto con el fin de identificar a aquellos que estuviesen en contacto con los componentes transmembranales durante más del 70 % del tiempo. Para esto, se analizó la distribución espacial y los factores de ocupación en ambas monocapas de los lípidos identificados para su localización y caracterización en la estructura de  $\gamma$ -secretasa. La *Figura 9.2* se muestra la vista superior, inferior y lateral de los mapas de distribución generados con las simulaciones atómicas de los tres sistemas. En estos, se observa una mayor población de lípidos en la monocapa inferior (MI) debido a las interacciones electrostáticas de los grupos fosfato en las cabezas de los lípidos con los residuos con carga positiva de la región intracelular. Además, se observa que los lípidos capaces de formar puentes salinos (POPE y POPA) aumentan el grosor de la membrana en comparación con la bicapa zwitteriónica (POPC) debido a sus interacciones atractivas y repulsivas con  $\gamma$ -secretasa (*Figura 9.2C*).



**Figura 9.2.** Simulaciones atómicas del complejo de  $\gamma$ -secretasa en las membranas con los lípidos POPC, POPE y POPA. (A) Gráficos de ocupación de los lípidos localizados en la monocapa superior (MS) e inferior (MI) con tiempos de residencia superiores al 70 % en los últimos 100 ns de las simulaciones. La escala de color a la derecha define los valores de ocupación de la distribución. (B) Representación tridimensional de la densidad de distribución de los lípidos de POPC con altos tiempos de residencia en la superficie de  $\gamma$ -secretasa. Los sitios de unión de los lípidos (LBS) y sustratos (SBS) se indican en azul y rojo, respectivamente. (C) Grosor de la membrana y distancia entre los aspárticos catalíticos y las cabezas de los lípidos ( $dd_{Asp-CL}$ ) calculados durante los últimos 100 ns de las simulaciones. (D) Interacciones de POPE en LBS1 y LBS2.

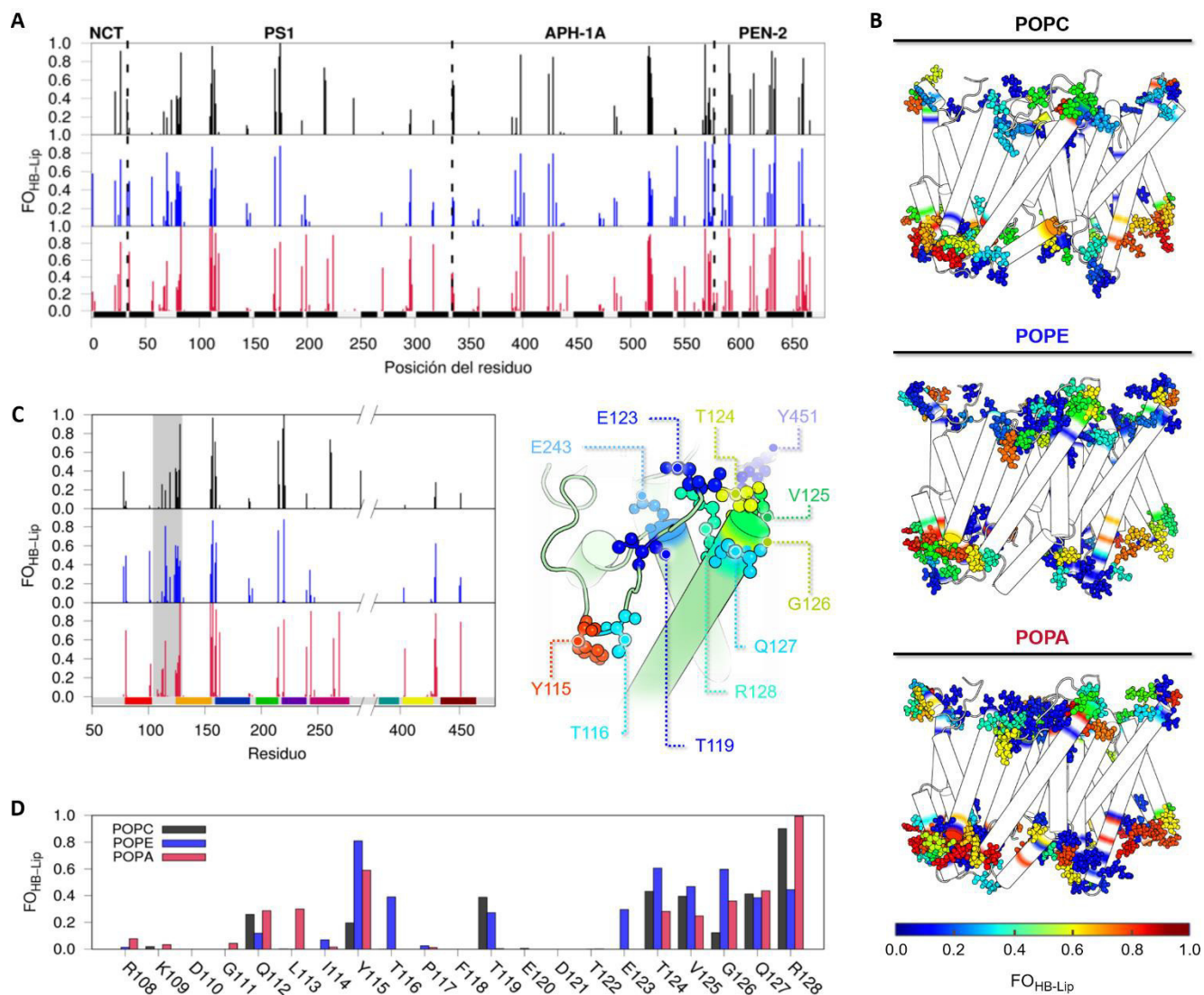
El grupo de investigación de Kong<sup>131</sup> realizó un estudio de dinámica molecular del componente PS1 en una membrana de POPC(30):POPE(70), en donde encontró que uno de los lípidos de POPE ingresó al sitio activo e interactuó con los aspárticos catalíticos. Con el fin de comparar dicho resultado, se calculó la distancia mínima entre los aspárticos catalíticos y las cabezas de los lípidos ( $dd_{Asp-CL}$ ) en los tres sistemas (*Figura 9.2C*). Contrario a lo observado por Kong y colaboradores<sup>131</sup>, ninguna de las cabezas de los lípidos cargados ingresó al sitio activo

para interactuar con los aspárticos catalíticos, sugiriendo que el mecanismo de inhibición de POPE y POPA no involucra el contacto directo con estos residuos. Las simulaciones de Kong y colaboradores<sup>131</sup> no incluyen los componentes estabilizadores (APH-1A y PEN-2), por lo que en consecuencia el lípido de POPE pudo ingresar entre TM2 y TM6 debido al distanciamiento entre el NTD y el CTD de PS1 que se obtuvo durante sus simulaciones.

Los mapas de distribución de probabilidad de las simulaciones atomísticas también permitieron identificar cuatro sitios de unión de lípidos (LBS) con altos valores de ocupación en los tres sistemas (*Figura 9.2A y B*). Los sitios *LBS1* y *LBS2* fueron asignados a las densidades localizadas en la interfaz de TM2-TM3 y de TM2-TM6 del componente PS1, respectivamente. Por su parte, las densidades de distribución localizadas en la región interna de la “herradura” del complejo de  $\gamma$ -secretasa y en las proximidades de la hélice yuxtamembranal de APH-1A fueron llamadas respectivamente sitios *LBS3* y *LBS4*. Cabe mencionar que en la estructura de PDB 5A63<sup>69</sup> se lograron resolver dos lípidos de 1,2-distearoil-fosfatidilcolina (DSPC) en estos dos últimos sitios, corroborando los resultados de ocupación obtenidos durante las simulaciones (*ver Figura A5.7 del Apéndice V*). Además de los sitios antes mencionados, se observó una alta prevalencia de lípidos de la monocapa inferior en las regiones previamente identificadas como posibles sitios de unión del sustrato (SBS). Esta observación sugiere que es necesario el desplazamiento inicial de los lípidos residentes en estas regiones para el reconocimiento de C99.

La *Figura 9.3A* muestra el factor de ocupación de los puentes de hidrógeno formados entre el complejo de  $\gamma$ -secretasa y los lípidos de membrana ( $FO_{\text{HB-Lip}}$ ), donde se observa que los tres sistemas tienen un perfil de interacción muy similar. El sistema con la membrana de POPA es el que presenta los valores de  $FO_{\text{HB-Lip}}$  más altos en los residuos intracelulares, confirmando que los altos tiempos de residencia se deben a las interacciones con los residuos de arginina y lisina presentes en esta región (*Figura 9.3B*). Al analizar de forma independiente los valores de  $FO_{\text{HB-Lip}}$  del componente PS1, se encontró que los residuos del asa HL1 (TM1-TM2) son los que exhiben las mayores diferencias de interacción entre los sistemas (*Figura 9.3C*). Con base en esto, fue posible determinar que los lípidos de POPE fueron los que presentaron un mayor número de puentes de hidrógeno con HL1 (*Figura 9.3D*) gracias a que el aumento del grosor de la membrana facilitó su residencia en los sitios *LBS1* y *LBS2* (*Figura 9.2D*). Fue debido a este aumento en las interacciones que al analizar la diferencia entre los valores de RMSF de POPC con POPE y POPA ( $\Delta\text{RMSF}_{\text{POPC-POPE}}$ ) se presentan alteraciones en la flexibilidad de HL1, tanto en las simulaciones atomísticas como en las de CG (*ver Figuras A5.2, A5.3 y A5.5 del Apéndice V*). En los sistemas con POPE se observa un aumento de los valores de  $\Delta\text{RMSF}_{\text{POPC-POPE}}$  que indica una clara reducción en las fluctuaciones de HL1, debido al puente de hidrógeno que forman estos lípidos con la Tyr115. Se sabe que estos residuos de tirosina son idóneos para la interacción con los grupos fosfodiéster de los lípidos o moléculas cargadas positivamente.<sup>213</sup> Además, estudios previos han demostrado que el aminoácido Tyr115 de PS1 desempeña un papel importante durante la estabilización del sustrato en el sitio activo para su procesamiento.<sup>98,225</sup> Los resultados explicarían entonces la relación entre la interacción de los lípidos de POPE con este residuo y la consecuente disminución en la flexibilidad de HL1 con la inactivación del complejo.

Finalmente, los altos valores de ocupación obtenidos en la monocapa inferior de las simulaciones atomísticas del sistema con POPA, junto con el aumento en la presión interfacial de la capa superior y el bajo desplazamiento de los lípidos en la membrana, sugieren que este lípido podría inactivar a PS1 por medio de restricciones en la movilidad, lo que posiblemente afecte el reconocimiento del sustrato y su ingreso al sitio activo.



**Figura 9.3.** Factor de ocupación de los puentes de hidrógeno formados entre el complejo de  $\gamma$ -secretasa y los lípidos (POPC, POPE y POPA) que componen los diferentes sistemas ( $FO_{HB-Lip}$ ). (A) Gráfico y (B) representación tridimensional de los valores de  $FO_{HB-Lip}$  en la región transmembranal del complejo. (C) Representación tridimensional de los residuos de HL1 (zona gris) con alta ocupación obtenidos a partir de la simulación con POPE y (D) análisis comparativo entre los aminoácidos 108 a 128 de HL1 en las simulaciones de los tres sistemas.

### IX.2.2. Influencia del grosor de la membrana en el ensamble conformacional de PS1

En el estudio realizado por Selkoe y colaboradores<sup>86</sup> también se demostró que el grosor de la membrana lipídica afecta el patrón de corte del sustrato C99, generando diferentes fragmentos del péptido A $\beta$ .<sup>86</sup> En ese trabajo encontraron que las membranas con menor grosor favorecen la producción de la isoforma tóxica A $\beta$ 42, mientras que las de mayor grosor genera al péptido A $\beta$ 40. En un estudio posterior, ese mismo grupo de investigación confirmó que al incrementar el número de carbonos en la cadena también aumentaba la actividad del complejo de  $\gamma$ -secretasa, reduciendo la proporción A $\beta$ 42/A $\beta$ 40.<sup>226</sup> A pesar de la información de estos estudios, el mecanismo por el cual se producen las diferentes fragmentos de A $\beta$  continúa en controversia.<sup>227</sup> En

este apartado se buscó caracterizar el comportamiento del complejo de  $\gamma$ -secretasa en membranas con lípidos de menor (DLPC, 12:0/12:0), mayor (DGPC, 20:1/20:1) e igual (DPPC, 16:0/16:0) tamaño que POPC. En la *Figura 9.1* se presenta los perfiles de presión lateral, junto con los diagramas de distribución del ensamble conformacional del componente PS1 y el análisis del grosor de la membrana obtenidos con las simulaciones de CG del complejo en estos tres sistemas. Sin considerar la diferencia en la distribución asociada al grosor de la membrana, se puede apreciar que los tres sistemas presentan perfiles de presión lateral similares a los de POPC. La bicapa de DPPC es la que tiene mayores similitudes con el sistema de POPC dado que ambas tienen la misma longitud de la cadena alifática, difiriendo únicamente por la insaturación en el grupo oleico de POPC. En el análisis del grosor de la membrana (*Figura 9.1D*) se encontró que en los sistemas de DPPC y DGPC hay una región de mayor grosor característica en el sitio *SBS1* de  $\gamma$ -secretasa, lo que concuerda con la posición de la distribución de densidad observada en las simulaciones atomísticas de POPC (ver *Figura 9.2B*).

El desacoplamiento de las regiones hidrofóbicas entre una proteína y una membrana lipídica puede inducir cambios conformacionales en la inclinación y rotación de las hélices con el fin de eliminar esta disparidad y presentar el mayor número de contactos favorables entre ambos sistemas.<sup>228</sup> Este desajuste hidrofóbico observado en las simulaciones de  $\gamma$ -secretasa parece modular los estados conformacionales explorados por PS1. La bicapa de menor grosor (DLPC) muestra un incremento de la población en el *estado activo* (*E2*), mientras que la de mayor grosor (DGPC) exhibe una distribución más amplia de las conformaciones de PS1 con valores de  $dd_{Asp}$  mayores a 1.1 nm. En general, las simulaciones de la forma protonada de Asp385 en las tres membranas mostró una menor población conformacional en el estado *E2* al compararse con las simulaciones de POPC. La ausencia de la cadena insaturada en los lípidos de DLPC y DPPC parecen alterar el rearrreglo espacial y empaquetamiento de la proteína, dificultando la transición entre las conformaciones del *estado inactivo* (*E1*) y *activo* (*E2*). Este resultado concuerda con lo observado por el grupo de Selkoe<sup>226</sup>, quien demostró que las cadenas alifáticas monoinsaturadas de los lípidos de PC incrementan la actividad de la enzima. Por otro lado, la presencia de las insaturaciones en las cadenas de DGPC resultan en una amplia distribución de probabilidad conformacional en el estado *E1*, reduciendo la población en *E2*. El estudio de Holmes *et al.*<sup>226</sup> mostró que la posición de la insaturación es crucial para la actividad de  $\gamma$ -secretasa, siendo la monoinsaturación en la posición  $\omega$ -9 del ácido oleico la que presentaba la mayor actividad proteolítica. Esos resultados sugieren que la actividad de  $\gamma$ -secretasa podría no estar asociada únicamente al grosor, sino también depender del isómero y localización de la insaturación. Por esto último, es crítico estudiar el efecto en la actividad al modificar el grosor en membranas heterogéneas, donde la enzima ha presentado mayor actividad.

### IX.2.3. Sitios de unión y efecto de la concentración de CHOL en $\gamma$ -secretasa

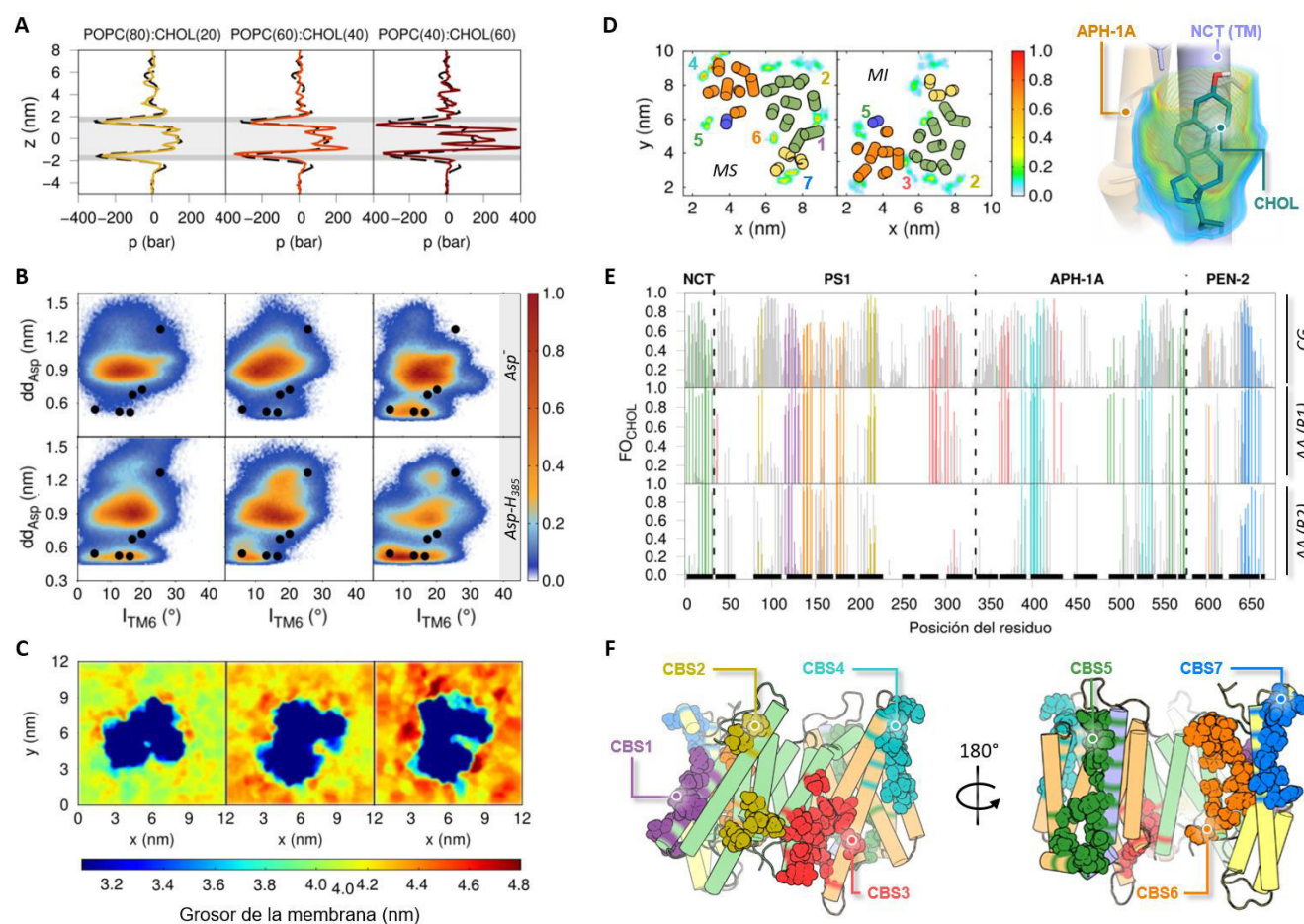
El colesterol es una molécula esencial en la composición de las balsas lipídicas, cuya alta concentración en el cerebro de pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer se ha relacionado con el aumento en la actividad de  $\gamma$ -secretasa.<sup>215,229</sup> En el estudio de Osenkowski *et al.*<sup>86</sup> se observó que la producción de A $\beta$  era directamente proporcional a la concentración de CHOL en diferentes membranas lipídicas. La abundancia relativa de CHOL en las balsas lipídicas varía de 20 a 25 % en la membrana plasmática y de 40 a 55 % en el tejido cerebral de pacientes con la enfermedad de Alzheimer.<sup>82,83</sup>

Para estudiar la influencia de la concentración de CHOL en el ensamble estructural del complejo de  $\gamma$ -secretasa, se realizaron simulaciones de CG de tres sistemas de POPC:CHOL variando las concentraciones de CHOL entre el 20, 40 y 60 %. La *Figura 9.4* muestra el perfil de presión lateral, la probabilidad de distribución de la distancia  $dd_{Asp}$  y el ángulo  $I_{TM6}$ , así como el análisis del grosor de la membrana en los diferentes sistemas. El aumento en la abundancia de CHOL en las membranas de POPC resultó en un incremento notorio de la presión lateral en la región transmembranal y en un aumento del grosor de la bicapa.<sup>183,230–232</sup> Como se observó anteriormente, el aumento de la presión lateral en la región transmembranal promovió el aumento en la población de conformaciones en el *estado activo* (E2) de PS1, incluso en las simulaciones del estado desprotonado (Asp). Este resultado sugiere que las altas concentraciones de CHOL facilitan la transición del *estado inactivo* al *estado activo* del componente PS1 de  $\gamma$ -secretasa. Sin embargo, el aumento en la concentración también reduce la flexibilidad del complejo (ver *Figuras A5.2 y A5.3 del Apéndice V*), lo cual podría interferir con el movimiento de TM2 durante el ingreso del sustrato al sitio activo.

Un estudio experimental reciente reportó sólo el 8 % del CHOL presente en una membrana, que contiene una abundancia relativa del 43 % de esta molécula se une al complejo de  $\gamma$ -secretasa.<sup>82</sup> Para caracterizar los posibles sitios de unión de CHOL (CBS) en  $\gamma$ -secretasa, se llevaron a cabo dos réplicas (R1 y R2) de simulaciones atomísticas de 200 ns del complejo enzimático embebido en una membrana de POPC(60):CHOL(40). Al analizar esta simulación fue posible observar en primera instancia un aumento de 0.4 nm en el grosor de la membrana de POPC por la presencia de CHOL, así como también se comprobó que ninguna de estas moléculas interactuó con los residuos de aspártico catalíticos (ver *Figura A5.8 del Apéndice V*). Las moléculas de CHOL con tiempos de residencia mayores al 70 % de las simulaciones permitieron identificar siete potenciales sitios de unión de CHOL en la estructura (*Figura 9.4D*). A diferencia de lo observado con los lípidos de PC, en los diagramas de distribución se observó que las moléculas de CHOL tienen una mayor ocupación en los sitios de la monocapa superior. Con el análisis del factor de ocupación por residuo ( $FO_{CHOL}$ ) se identificaron las regiones con mayor número de contactos entre  $\gamma$ -secretasa y CHOL (*Figura 9.4E*). Resulta interesante observar que los sitios de interacción identificados en ambas simulaciones atomísticas también se presentaron en las 20 trayectorias de los modelos de CG. De estas simulaciones se aprecia una alta preferencia del CHOL por los aminoácidos localizados en TM2, TM3, TM5, TM6 y el motivo PAL (TM8-TM9) de PS1; TM1 de NCT; TM3, TM6, TM7 y HY de APH-1A; y TM3 de PEN-2 (*Figura 9.4F y Tabla A5.1 del Apéndice V*). Los sitios *CBS1*, *CBS3* y *CBS5* involucraron los mismos aminoácidos que los sitios de unión a lípidos *LBS1*, *LBS4* y *SBS1*, presentándose un aumento en el grosor de la membrana próximo al sitio *CBS3*, al igual que el observado para los sistemas con DPPC y DGPC.

Durante la simulación atomística R2 del sistema POPC(60):CHOL(40) no se identificaron moléculas de CHOL en el sitio *CBS3*, sugiriendo una baja tasa de intercambio con otros lípidos presentes en este sitio. Asimismo, se observaron bajos valores de ocupación en los aminoácidos del *CBS2* de esta simulación, mostrando un intercambio de las moléculas por un sitio cercano a este. La interacción en el sitio cercano localizado en las regiones N-terminales de TM2 y TM6 sugieren una preferencia de la molécula de CHOL por la interface entre estas TMs que por su interacción con R1. Al igual que en las membranas de POPE, la unión de CHOL a *CBS2* resulta en la disminución de la flexibilidad de HL1, lo que explicaría la modulación de esta molécula en la producción del péptido A $\beta$  (ver *Figuras A5.2, A5.3 y A5.5 del Apéndice V*). Finalmente, la proximidad entre *CBS4* y *CBS7* a los SBSs

sugiere que la molécula de CHOL podría participar en el reconocimiento inicial de C99 al posicionarse entre este y el complejo de  $\gamma$ -secretasa.<sup>233,234</sup>



**Figura 9.4.** Alteraciones en el ensamble estructural de los modelos de CG (A-C) y atomísticos (D-F) derivados de 5FN2 en membranas de POPC que contienen concentraciones de colesterol (CHOL) del 20, 40 y 60 %. (A) Perfiles de la presión lateral como función de la concentración de CHOL. La línea negra punteada muestra el perfil del sistema con POPC y las sombras grises describen la región de las cabezas (gris oscuro) y colas (gris claro) de los lípidos en la bicapa. (B) Diagramas de distribución de las 20 trayectorias de simulación de CG de los sistemas con Asp385 en su forma desprotonada (Asp<sup>-</sup>) y mono-protonada (Asp-H<sub>385</sub>). La escala de color a la derecha define la población relativa de la distribución. Los círculos negros corresponden a la información de los modelos optimizados de CG de las estructuras de crio-EM. (C) Análisis del grosor local de la bicapa lipídica en los tres sistemas. (D) Gráficos de ocupación de las moléculas de CHOL localizadas en la monocapa superior (MI) e inferior (MI) con tiempos de residencia superiores al 70 % en los últimos 100 ns de la simulación atomística del sistema POPC(60):CHOL(40). La escala de color a la derecha define los valores de ocupación de la distribución. La estructura a la derecha ejemplifica la interacción de una molécula de CHOL con los componentes NCT y APH-1A. (E) Factor de ocupación de los contactos de CHOL con el complejo de  $\gamma$ -secretasa (FO<sub>CHOL</sub>) en la simulación de CG y en las dos réplicas de las simulaciones atomísticas (R1 y R2). (f) Representación de los aminoácidos involucrados en los sitios de unión de colesterol (CBS) en la región transmembranal de  $\gamma$ -secretasa.

Para evaluar el efecto de la concentración de CHOL en membranas heterogéneas se realizaron simulaciones de CG de tres sistemas (*Raft 1* a 3) con diferentes mezclas de lípidos obtenidas a partir de datos experimentales

y teóricos de la composición de balsas lipídicas (ver *Tabla del Esquema 9.1*). El sistema *Raft 1* se construyó a partir de la información derivada de la caracterización de los lípidos asociados al complejo de  $\gamma$ -secretasa (20 % de CHOL), el cual fue realizado por Aycirix y colaboradores<sup>82</sup>. Para el sistema *Raft 2*, se empleó la composición de las balsas lipídicas estudiadas por Risselada y Marrink<sup>83</sup> con simulaciones de CG (30 % de CHOL).<sup>235</sup> Finalmente, el análisis lipídico realizado por el grupo de Di Paolo al cerebro de un paciente con la enfermedad de Alzheimer fue usado para la construcción de *Raft 3* (55 % de CHOL). En la *Figura 9.5A* se observa que el perfil de presión lateral de *Raft 1* es muy similar al de la membrana de POPC, mientras que *Raft 2* y *Raft 3* muestran alteraciones de la presión en las regiones interfaciales y en las cabezas de los lípidos. Sin embargo, la presión de la región transmembranal en estos dos últimos no mostró cambios significativos como los observados en las membranas de POPC:CHOL. Esto sugiere que la presencia de mezclas complejas de lípidos en las balsas lipídicas reduce el efecto de la presión transmembranal ocasionado por la alta concentración de CHOL. Además, la distribución conformacional de los parámetros  $dd_{Asp}$  e  $I_{TM6}$  en las simulaciones del sistema *Raft 1* con el estado protonado de Asp385 muestra un comportamiento similar al de las simulaciones de POPC, observándose también un grosor de la membrana uniforme y una alta flexibilidad de las TMs de PS1 (ver *Figuras A5.2 y A5.3 del Apéndice V*).

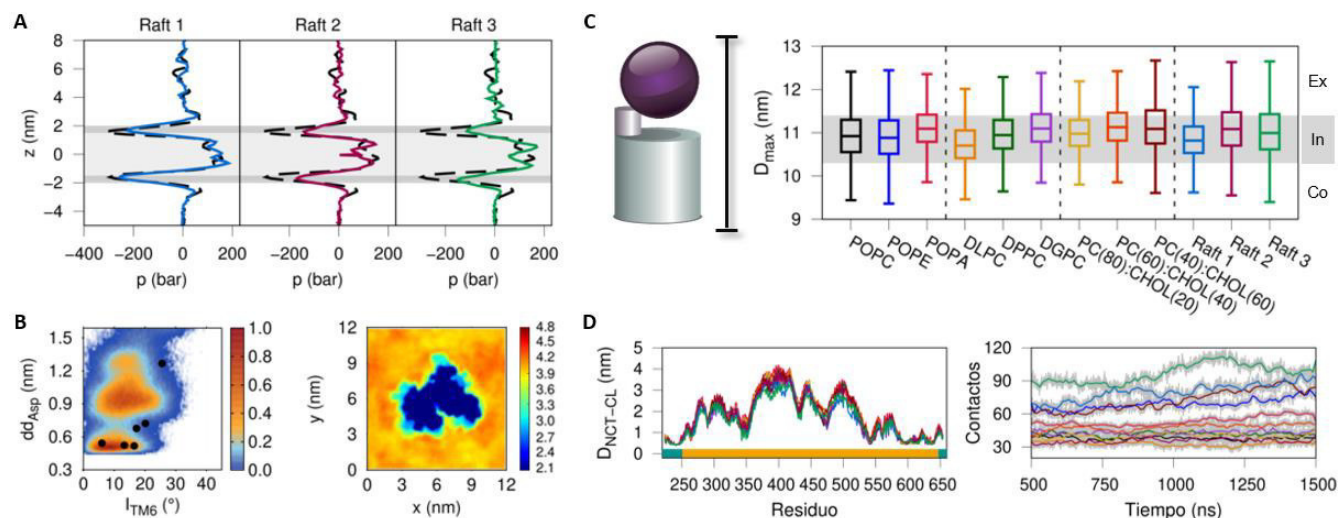
De forma complementaria, se analizaron las simulaciones atomísticas del sistema 5FN2 embebido en las membranas de POPC, POPE, POPA, POPC(60):CHOL(40) y *Raft 1* para conocer las implicaciones de las mismas en el ingreso de moléculas de agua en el sitio activo y en la cavidad central de APH-1A (ver *Figura A5.9 del Apéndice V*). Con este estudio fue posible observar que el sistema con POPC fue el que presentó el mayor número de moléculas de agua en el sitio activo, esto debido a que el distanciamiento de los aspárticos aumentó el volumen de la cavidad y, por tanto, el ingreso de moléculas de agua. La cavidad formada en los cinco sistemas no mostró una relación directa con el ingreso de moléculas de agua, puesto que el fragmento CT de TM6 localizado a 0.8 nm del sitio activo fue el encargado de regular el influjo de estas. Por otro lado, el sistema con la membrana de POPE fue la que presentó el menor volumen del canal en APH-1A, formando el canal superior únicamente el 8.8% de la simulación y limitando el influjo de moléculas de agua hacia la cavidad central del componente. Puesto que la cavidad podría tener una función reguladora en el complejo de  $\gamma$ -secretasa, su alteración en el sistema con POPE podría interferir con la actividad o ensamble del complejo.

#### IX.2.4. NCT-ECD adopta la conformación compacta en la balsa lipídica

Durante la caracterización dinámica del complejo enzimático de  $\gamma$ -secretasa fue posible identificar tres conformaciones del ECD de NCT: compacta, intermedia y extendida (ver *Capítulo VII*). Utilizando el mismo parámetro de distancia máxima ( $D_{max}$ ), calculamos la distribución conformacional del complejo de  $\gamma$ -secretasa para las 20 réplicas de las simulaciones de CG de todos los sistemas estudiados. La *Figura 9.5C* muestra el gráfico de distribución de  $D_{max}$ , donde la sombra en gris representa la región de distribución de la forma intermedia ( $10.3 \leq D_{max} \leq 11.3$  nm) y las zonas blancas superior e inferior a las conformaciones extendidas ( $D_{max} > 11.3$ ) y compactas ( $D_{max} < 10.3$ ), respectivamente. Al igual que en los resultados anteriores, se observa que la conformación intermedia es la que predomina en la mayoría de las simulaciones. Resulta interesante observar que los sistemas *Raft 1-3* presentan un amplio movimiento de arriba/abajo del ECD de NCT con una media de distribución cercana al de la conformación compacta. Esta proximidad del ECD de NCT a la monocapa superior también fue reportada



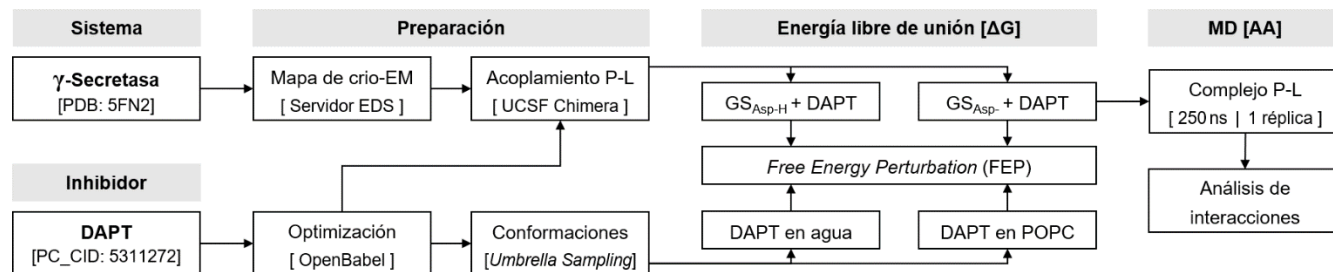
en las simulaciones de CG realizadas por el grupo de Dal Peraro<sup>135</sup> en una membrana de composición similar a la del sistema *Raft 3*. Para explicar este comportamiento, se midió la distancia entre el centro de masa del ECD de NCT y las cabezas de los lípidos de la monocapa superior ( $D_{NCT-CL}$ ) en todas las simulaciones (Figura 9.5D). Este análisis mostró que el lóbulo mayor del ECD de NCT en el sistema de *Raft 3* se aproxima ligeramente a las cabezas de los lípidos (valores bajos de  $D_{NCT-CL}$ ). El número de contactos del ECD de NCT con las cabezas de los lípidos confirmó que el lóbulo mayor se encuentra más próximo a los lípidos que componen las membranas de *Raft 1* y *3*, lo que favorece su preferencia por la conformación compacta.



**Figura 9.5.** Efecto de diferentes composiciones de balsas lipídicas (*Raft 1* a *3*) en el ensamblaje estructural de los modelos de CG derivados de 5FN2. (A) Perfiles de la presión lateral de los tres sistemas. La línea negra punteada muestra el perfil del sistema con POPC y las sombras grises describen la región de las cabezas (gris oscuro) y colas (gris claro) de los lípidos en la bicapa. (B) Diagramas de distribución de las 20 trayectorias de simulación de CG del sistema *Raft 1* con Asp385 en su forma monoprotonada (Asp-H<sub>385</sub>). La escala de color a la derecha define la población relativa de la distribución. Los círculos negros corresponden a la información de los modelos optimizados de CG de las estructuras de crio-EM. El gráfico a la derecha muestra el análisis del grosor local de la bicapa lipídica en el sistema *Raft 1*. (C) Distribución de la distancia máxima ( $D_{max}$ ) en el eje Z del complejo de  $\gamma$ -secretasa en las simulaciones de CG de todos los sistemas estudiados en esta sección del capítulo. La sombra en gris representa la región de distribución de la forma intermedia, mientras que las áreas blancas superior e inferior corresponden a las conformaciones extendidas y compactas, respectivamente. (D) Distancias entre los centros de masa del ECD de NCT con las cabezas de los lípidos ( $D_{NCT-CL}$ , izquierda) y número de contactos entre ambos grupos (derecha) calculados para todas las simulaciones de CG. Los colores de cada sistema corresponden a los asignados en el inciso (C) de esta figura.

## X. Interacción del inhibidor DAPT con el sitio activo de PS1

Para esta subsección se llevaron a cabo cálculos de energía libre de unión del inhibidor de  $\gamma$ -secretasa (GSI) DAPT en el sitio activo de PS1 para comprender el efecto de su interacción en los estados de protonación de los residuos de aspártico catalíticos. La preparación de los sistemas involucró la orientación de DAPT en el sitio activo usando los mapas de densidad de crio-EM del modelo 5NF2,<sup>70</sup> mientras que el perfil energético del compuesto desacoplado se determinó mediante la transición entre los medios acuoso y lipídico (POPC) usando el método de muestreo de sombrilla (*Umbrella Sampling*, US). La información generada a partir del complejo de  $\gamma$ -secretasa-DAPT (GS-DAPT) y los sistemas desacoplados se emplearon como referencia para el cálculo de la energía libre de unión con el método de perturbación de la energía libre (*Free Energy Perturbation*, FEP). Los resultados obtenidos servirán como base para la correcta asignación del estado de protonación de los residuos de aspártico catalíticos de PS1 y la caracterización dinámica del inhibidor DAPT en el complejo de  $\gamma$ -secretasa. En el *Esquema 10.1* se muestra el algoritmo general de trabajo seguido en esta subsección.



**Esquema 10.1.** Diagrama de trabajo empleado para la caracterización de la interacción del inhibidor DAPT en el sitio activo del componente PS1 de  $\gamma$ -secretasa.

### X.1. Metodología

#### X.1.1. Cálculo de la energía de unión con FEP

Los cálculos de perturbación de la energía libre (*Free Energy Perturbation*, FEP) se llevaron a cabo con el campo de fuerza modificado AMBER99SB-ILDN<sup>236</sup> implementado en la paquetería de GROMACS 5.1.4<sup>165</sup>. Se empleó el campo de fuerza AMBER99SB-ILDN puesto que estudios previos han demostrado que este presenta una mayor concordancia con los datos experimentales que otros campos de fuerza.<sup>237</sup> La interfaz de ACPYPE<sup>238</sup> fue empleado para la construcción de las topologías del ligando DAPT y el cálculo de las cargas parciales con el método AM1-BCC en el marco del campo de fuerza AMBER. Los parámetros de los lípidos de POPC para AMBER fueron tomados del repositorio de lípidos del campo de fuerza Slipids<sup>239</sup> (*Stockholm Lipids*). Los cálculos de energía libre de unión absoluta para DAPT en agua y POPC y el complejo GS-DAPT se realizaron siguiendo el ciclo termodinámico implementado en GROMACS por Biggin y colaboradores<sup>237,240</sup> (consultar *Sección 6.1 del Apéndice VI*). El número de transmutaciones atómicas o transiciones alquímicas realizadas al compuesto DAPT hacia átomos fantasma (*dummy atoms*) en su forma desacoplada y unida se establecieron mediante la realización de varios ensayos en los que se determinó el tiempo de simulación y el paso de transmutación más adecuado para el sistema. En las siguientes subsecciones se describe de forma detallada metodología seguida para la preparación de los sistemas.

(A) *Preparación de DAPT*. Para el cálculo de la energía de solvatación ( $\Delta G_{\text{solv}}$ ) del compuesto DAPT se estudió la transición alquímica de su estructura en un sistema acuoso ( $\Delta G_{\text{agua}}$ ) y en la bicapa lipídica de POPC ( $\Delta G_{\text{POPC}}$ ).

(A1) *Optimización de la geometría*. Se descargó de la base de datos de PubChem<sup>241</sup> la estructura química optimizada en 3D del compuesto DAPT (CID: 5311272). La estructura fue sometida a una segunda minimización de energía usando el campo de fuerza MMFF94 implementado en la herramienta *obminimize* del programa OpenBabel.<sup>242</sup>

(A2) *DAPT en agua – Simulación de MD*. La estructura optimizada de DAPT se solató en una caja cúbica usando el modelo TIP3P de moléculas de agua con el programa GROMACS 5.1.4 y usando el campo de fuerza AMBER99SB-ILDN. El sistema se sometió a una minimización de energía con el algoritmo *steepest descent* para sus posteriores equilibrios NVT y NPT. Estos equilibrios se realizaron por un periodo de 1 ns a una temperatura de 310 K y 1.0 bar usando el termostato de Berendsen<sup>178</sup> y el baróstato de Parrinello-Rahman<sup>162</sup>, respectivamente. Por último, el sistema se sometió a 10 ns de simulación de MD atomística usando un paso de integración de 2 fs. De los últimos 5 ns de la simulación se extrajeron las tres conformaciones más representativas mediante un agrupamiento por RMSD, usando el método de gromos con un valor límite de 0.15 nm.

(A3) *DAPT en POPC – Umbrella Sampling*. La estructura más representativa de la simulación se empleó como modelo inicial para realizar el estudio de US, el cual tiene como finalidad estimar el perfil de energía libre del compuesto DAPT al ser permeado a través de una bicapa lipídica de POPC e identificar la posición más favorable de esta interacción. Para esto, primero se generó un sistema en el cual la molécula de DAPT se posicionó a 4.0 nm de distancia respecto al centro de masa (COM) de una membrana pre-equilibrada de POPC (100 lípidos). El sistema fue solvado con moléculas de agua usando el modelo TIP3P, para posteriormente ser sometido a minimización de energía y equilibrios a una temperatura de 310 K con el termostato de Nosé-Hoover<sup>161</sup> y una presión de 1.0 bar con acoplamiento semi-isotrópico usando el baróstato de Parrinello-Rahman<sup>162</sup>. El sistema al equilibrio se empleó para muestrear las configuraciones de DAPT a través del sistema acuoso y la membrana de POPC por un tiempo de 250 ps aplicando una constante de fuerza a la molécula de  $500 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$  a una velocidad de  $0.01 \text{ nm ps}^{-1}$ . Se generaron un total de 30 configuraciones a lo largo del eje z de la coordenada de reacción ( $\xi$ ) para ser empleados durante el muestreo con US. Cada configuración fue sometida a una minimización de energía y equilibrio NVT previo a la producción NPT de 10 ns. Con el método de análisis de histogramas ponderados (WHAM)<sup>243</sup> se obtuvo el perfil del potencial de fuerza media (PMF), el cual permitió la identificación de las configuraciones de DAPT en  $\xi$  con mayor y menor energía en la membrana.

Las conformaciones finales de los sistemas en agua y POPC se emplearon como modelos iniciales para el cálculo de energía libre de unión con el método de FEP.

(B) *Preparación del complejo GS-DAPT*. Como se mencionó en un inicio, la estructura de 5FN2 fue resuelta con el inhibidor DAPT acoplado al sitio activo. Sin embargo, su estructura no fue asignada en el modelo depositado en el PDB. En este trabajo se empleó el mapa de densidad de crio-EM de 5FN2 como molde para la

correcta asignación del modo de unión de DAPT en el sitio activo de PS1. Puesto que NCT-ECD no participa en la interacción de  $\gamma$ -secretasa con DAPT, se decidió eliminar este dominio con el fin de reducir el tamaño del sistema y optimizar el tiempo para el cálculo de energía.

(B1) *Construcción del complejo GS-DAPT.* La estructura previamente optimizada de DAPT fue sometida a un acoplamiento molecular en el sitio activo del componente PS1 del complejo de  $\gamma$ -secretasa 5FN2 con el programa AutoDock Vina<sup>244</sup>. El mejor modo de unión fue empleado como referencia para su posterior ajuste al mapa de densidad usando la herramienta ‘fit in map’ del programa Chimera v1.11.2<sup>245</sup>. Se realizaron varios muestreos durante el ajuste para constatar la obtención de la mejor orientación de DAPT en el sitio.

(B2) *GS-DAPT – Preparación.* Se empleó el programa PROPKA v3.1<sup>168</sup> para la predicción de los valores de pKa de los residuos de aspártico catalíticos Asp257 y Asp385 a un pH=7 y usando el campo de fuerza de AMBER. La forma desprotonada ( $\text{Asp}^-_{257}$ ) y protonada ( $\text{Asp-H}_{257}$ ) de Asp257 en el complejo GS-DAPT se embebieron en una bicapa lipídica de POPC con ayuda de la herramienta *membrane builder* de CHARMM-GUI<sup>159</sup>. Dado que el campo de fuerza Slipids para lípidos en AMBER emplea la misma nomenclatura que el campo de fuerza CHARMM36, se emplearon los archivos de coordenadas iniciales del sistema para su implementación el marco del campo de fuerza AMBER99SB-ILDN.<sup>246</sup> Los sistemas fueron solvatados con moléculas de agua TIP3P y neutralizados empleando una solución de NaCl 0.15 M. A los sistemas finales se les realizó una minimización de energía y diferentes equilibrios NVT/NPT como preparación previa a los cálculos con FEP.

(B3) *GS-DAPT – Umbrella Sampling.* El sistema GS-DAPT al equilibrio se empleó para muestrear las configuraciones de DAPT a través de los posibles sitios de entrada entre TM2 y TM3 (SED1) y TM2 y TM6 (SED2). Para la obtención de ambas coordenadas de reacción ( $\xi$ ) se realizó un muestreo aplicando una constante de fuerza a la molécula de  $1000 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$  a una velocidad de  $0.01 \text{ nm ps}^{-1}$  por un tiempo de 500 ps, generándose un total de 65 y 70 configuraciones para SED1 y SED2, respectivamente. Cada configuración fue sometida a una minimización de energía y equilibrio NVT previo a la producción NPT de 5 ns, obteniéndose finalmente el perfil de PMF con el método WHAM.

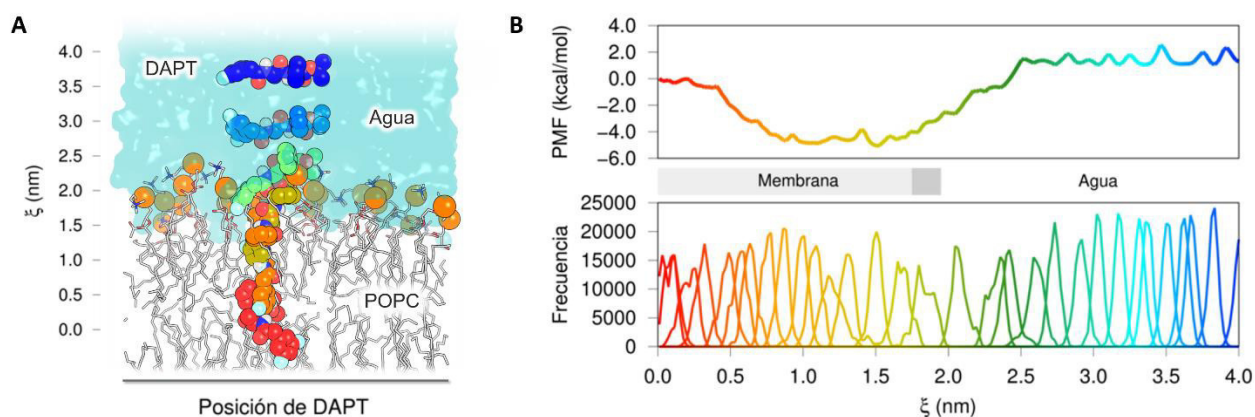
(C) *Cálculo de energía libre de unión ( $\Delta G_{unión}$ ).* Las interacciones electrostáticas y de dispersión del ligando fueron desacoplados durante las simulaciones usando un total de 42 transiciones para ambos complejos GS-DAPT y 31 transiciones para DAPT en agua y DAPT en POPC. A cada ventana de transición se le minimizó su energía y equilibró durante 1,000 ps usando ensambles canónico e isotérmico-isobárico. Posterior a los equilibrios, se realizaron producciones de 10 ns para cada ventana de los complejos GS-DAPT ( $\Delta G_{elec+vdw+restr}^{GS\_desprot}$  y  $\Delta G_{elec+vdw+restr}^{GS\_prot}$ ) y de DAPT en solución ( $\Delta G_{elec+vdw}^{agua}$  y  $\Delta G_{elec+vdw}^{POPC}$ ). Se restringió (*restr*) la posición relativa de DAPT en el sitio activo de PS1 usando potenciales harmónicos en un valor de distancia ( $r$ ,  $K_r=1000 \text{ kcal mol}^{-1}$ ), dos ángulos ( $\theta_1$  y  $\theta_2$ ,  $K_\theta=10 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ rad}^2$ ) y tres ángulos diedros ( $\varphi_1$ ,  $\varphi_2$  y  $\varphi_3$ ,  $K_\varphi=10 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ rad}^2$ ) (ver *Figura A5.10* del Apéndice V). Las restricciones en la forma desacoplada de DAPT ( $\Delta G_{restr}^{solv}$ ) fueron calculadas de forma analítica usando la ecuación de Boresch *et al*<sup>247</sup> (ver Apéndice V). Finalmente, se calculó la energía libre de unión como se muestra la ecuación (1):  $\Delta G_{unión} = \Delta G_{elec+vdw}^{solv} + \Delta G_{restr}^{solv} - \Delta G_{elec+vdw+restr}^{GS}$  (1)

## X.2. Resultados y Discusión

La presencia de inhibidores en los sitios activos de aspartil proteasas (ej. BACE-1 y HIV-1) se ha relacionado con alteraciones en los estados de protonación de los residuos de aspártico catalíticos, lo que imposibilita el reconocimiento y procesamiento del sustrato.<sup>182,248</sup> Este comportamiento permite especular que la interacción del inhibidor DAPT con el sitio activo del componente PS1 también podría modificar el estado de protonación de la diada catalítica. Por lo que en esta sección se aborda el efecto de la interacción del inhibidor DAPT en el sitio activo del componente PS1 de  $\gamma$ -secretasa mediante el cálculo de su energía libre de unión en la forma protonada y desprotonada de los aspárticos. Pevio a ese cálculo, fue necesario estudiar el comportamiento de DAPT en medios acuoso y lipídico para determinar el sistema más adecuado para la estimación de la energía de solvatación. La información generada a partir de los cálculos de energía libre permitió establecer el estado de protonación más probable para la posterior caracterización dinámica del complejo GS-DAPT.

### X.2.1. Identificación del medio de interacción preferente de DAPT

Un estudio reciente realizado por el grupo de Róg demostró que los neurotransmisores con sitios de unión embebidos en la membrana suelen tener una alta afinidad por la superficie de la bicapa lipídica, mientras que los neurotransmisores con sitios de unión en la región extracelular tienen poca interacción con los lípidos.<sup>249</sup> Además, los neurotransmisores afines a la membrana presentan valores de  $\log P$  entre los -2.09 y 1.15, siendo menores a -2.89 en el caso de los neurotransmisores solubles en agua. Por lo tanto, dado que el inhibidor DAPT ( $\log P_{\text{calculado}} = 3.70$ ) se une a un sitio embebido en la membrana, se esperaba que este compuesto presentase un perfil de interacción similar al observado en los neurotransmisores afines a la membrana. En la *Figura 10.1* se muestra la coordenada de reacción ( $\xi$ ) empleada durante las simulaciones de US para la obtención del perfil de potencial de fuerza media (PMF) expuesto en el inciso B de la misma figura. Este perfil energético corrobora la hipótesis anterior, al obtenerse el menor valor de PMF cuando DAPT se encuentra embebido en la membrana y próximo a las cabezas de los lípidos ( $1.0 < z < 2.0$  nm). Sin embargo, el desplazamiento hacia la parte media de la bicapa ( $z = 0.0$  nm) resultó en un aumento de la energía asociado a la alta movilidad de las colas de los lípidos. Estos resultados también permiten suponer que DAPT podría ingresar al sitio activo a través de su difusión por la membrana en lugar de por el medio acuoso.

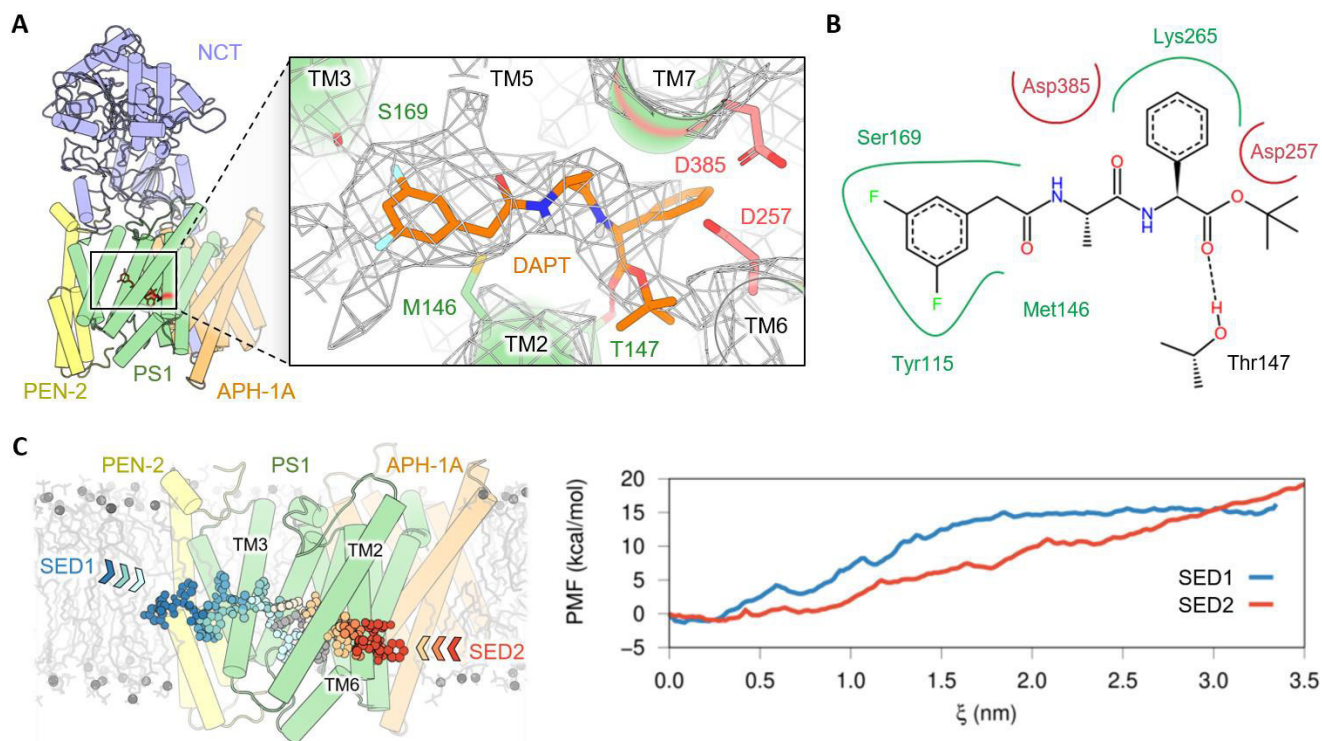


**Figura 10.1.** Representación de la coordenada de reacción ( $\xi$ ) de la difusión de DAPT entre los medios acuoso y membranal. (B) Perfil del potencial de fuerza media e histograma de las configuraciones de DAPT en función de  $\xi$ .

## X.2.2. Efecto de DAPT en la protonación de los residuos de aspártico catalíticos de PS1

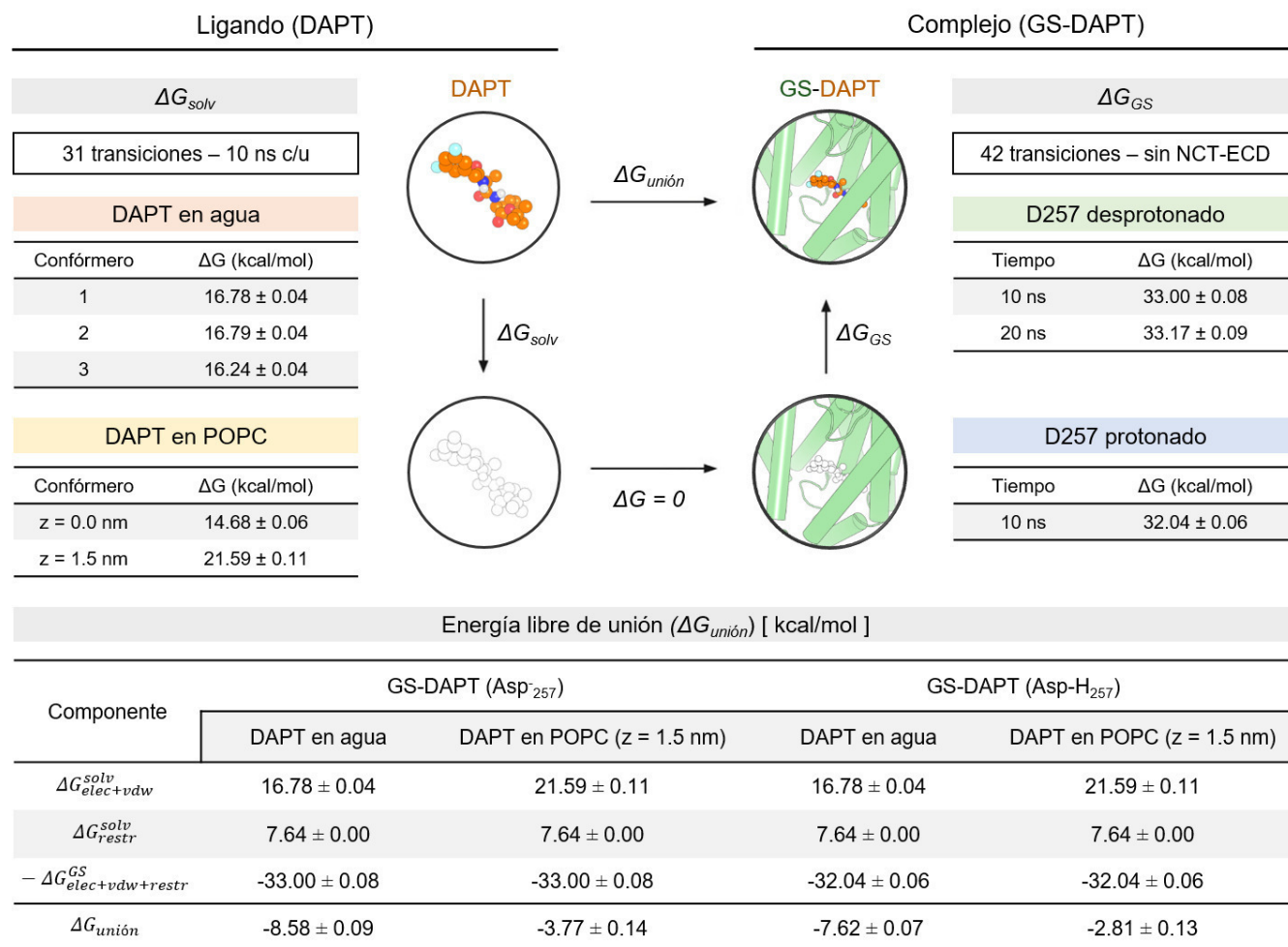
El ajuste del inhibidor DAPT al mapa de densidad de 5FN2 permitió determinar el modo de unión más probable del compuesto en el sitio activo de PS1 (ver *Figura 10.2A*), localizándose finalmente en la parte central del sitio catalítico rodeado por TM2, TM3, TM5, TM6 y TM7 de PS1. El sustituyente 3,5-difluorobencilo de DAPT se posicionó entre TM2 y TM3, orientando los átomos de flúor hacia los residuos Tyr115 (HL1), Met146 (TM2) y Ser169 (TM3) (*Figura 10.2*). La asignación de la densidad de este grupo fue clave para el correcto ajuste del sistema, dado que la disposición y orientación de los átomos de flúor es el más evidente en el mapa de densidad.<sup>70</sup> Por su parte, los grupos *tert*-butóxido y fenilo se dispusieron hacia los residuos de aspártico catalíticos, posicionándose el sustituyente fenilo entre ambos aspárticos y el *tert*-butóxido en un sitio contiguo a Asp257, formando además un puente de hidrógeno con el residuo Thr147 (TM2). Este modo de unión es muy similar al reportado por el grupo de Bahar, siendo la orientación del grupo *tert*-butóxido la única diferencia entre ambos modelos; sin embargo, en ambos se conserva el puente de hidrógeno con Thr147.<sup>225</sup>

Como se observa en la *Figura 10.2A*, existen dos posibles sitios de entrada del inhibidor DAPT (SED) al sitio activo de PS1 a través de la membrana: entre TM2 y TM3 (*SED1*) o entre TM2 y TM6 (*SED2*). Al trazar las coordenadas de reacción de ambos mecanismos de internalización y realizar el muestreo configuracional con US, fue posible determinar que el ingreso de DAPT era más probable por *SED1* al presentar menor número de restricciones energéticas durante su traslado (*Figura 10.2C*). Esto último se debe a que el ingreso de DAPT por *SED2* depende del desplazamiento de TM2, como ocurre durante el ingreso del sustrato.



**Figura 10.2.** (A) Representación del mapa de densidad y modo de unión del inhibidor DAPT en el sitio activo del componente PS1 de  $\gamma$ -secretasa (PDB: 5FN2).<sup>70</sup> (B) Mapa de interacciones en 2D de DAPT con los residuos cercanos de PS1. Representación de la coordenada de reacción ( $\xi$ ) y PMF del mecanismo de ingreso de DAPT por los sitios de entrada (SED) localizados entre TM2 y TM3 (*SED1*) y TM2 y TM6 (*SED2*).

Con el complejo GS-DAPT resultante se calculó el pKa de los residuos de aspártico catalíticos con el programa PROPKA v3.1 a un pH=7, en el que se encontró que el Asp257 (pKa = 11.60) tiene mayor probabilidad de encontrarse protonado que el Asp385 (pKa = 7.88). Esto último podría deberse a que la presencia de un agente hidrofóbico en este sitio reduce el área accesible al solvente del residuo Asp257; además, su protonación favorecería la formación de un puente de hidrógeno con el grupo protector *tert*-butóxido. Con base en esta información, se decidió estudiar al complejo GS-DAPT en la forma desprotonada (Asp<sup>-</sup><sub>257</sub>) y protonada (Asp-H<sub>257</sub>) del residuo catalítico Asp257.



**Figura 10.3.** Ciclo termodinámico (*diagrama central*) empleado para el cálculo del  $\Delta G_{unión}$  de DAPT en PS1, en donde se muestra la transmutación o transición atómica del compuesto DAPT hacia los átomos fantasma (*dummy atoms*) para el cálculo de  $\Delta G_{solv}$  en su forma desacoplada y  $\Delta G_{GS}$  en el complejo GS-DAPT. Las tablas de resultados en los extremos de la figura muestran información referente a la energía  $\Delta G_{solv}$  (*izquierda*) de DAPT en agua y en las posiciones z=0.0 nm y z=1.5 nm respecto al centro de la membrana, así como de la energía  $\Delta G_{solv}$  (*derecha*) del compuesto acoplado a  $\gamma$ -secretasa en los estados protonado y desprotonado del residuo catalítico Asp257 de PS1. La Tabla inferior muestra la energía libre de unión ( $\Delta G_{unión}$ ) en kcal/mol de DAPT acoplado en la forma desprotonada (Asp<sup>-</sup><sub>257</sub>) y protonada (Asp-H<sub>257</sub>) del aspártico catalítico Asp257 de  $\gamma$ -secretasa.

Como se mencionó anteriormente, el cálculo de la energía libre de unión ( $\Delta G_{\text{unión}}$ ) de DAPT en PS1 se realizó con el método de perturbación de la energía libre (FEP). Para este último se calculó la energía de solvatación ( $\Delta G_{\text{solv}}$ ) de DAPT en un medio acuoso y lipídico (POPC), así como su energía de interacción con  $\gamma$ -secretasa ( $\Delta G_{\text{GS}}$ ) en los estados Asp<sup>-</sup><sub>257</sub> y Asp-H<sub>257</sub> de PS1. La determinación por triplicado del  $\Delta G_{\text{solv}}$  de DAPT en agua demostró que los parámetros empleados en la metodología permiten obtener datos de energía de forma precisa y repetible (ver *Figura 10.3*). Por otra parte, al comparar los valores de  $\Delta G_{\text{solv}}$  de DAPT en agua con los datos de energía del compuesto en la membrana de POPC se puede encontrar un comportamiento similar al observado en el perfil de PMF obtenido durante las simulaciones de US (ver subsección anterior). De forma similar, el cálculo de DAPT en POPC a una distancia de 1.5 nm respecto al centro de la membrana presentó un  $\Delta G_{\text{solv}} = 21.59 \pm 0.11$  kcal/mol, lo cual sugiere una alta preferencia por la interacción del compuesto con esta región en comparación con el medio acuoso ( $\Delta \Delta G_{\text{agua-POPCz1.5}} = -4.99$  kcal/mol) y el centro de la membrana ( $\Delta \Delta G_{\text{POPCz0.0-POPCz1.5}} = -6.91$  kcal/mol). Por otro lado, para establecer el tiempo de simulación de la interacción de DAPT en el complejo GS-DAPT se calculó su energía de interacción con  $\gamma$ -secretasa ( $\Delta G_{\text{GS}}$ ) en la forma desprotonada a 10 y 20 ns de simulación por transición. Al ser la diferencia de energía de tan sólo 0.17 kcal/mol entre ambos tiempos, se estableció como tiempo suficiente 10 ns para realizar las transiciones de DAPT en el estado Asp-H<sub>257</sub>.

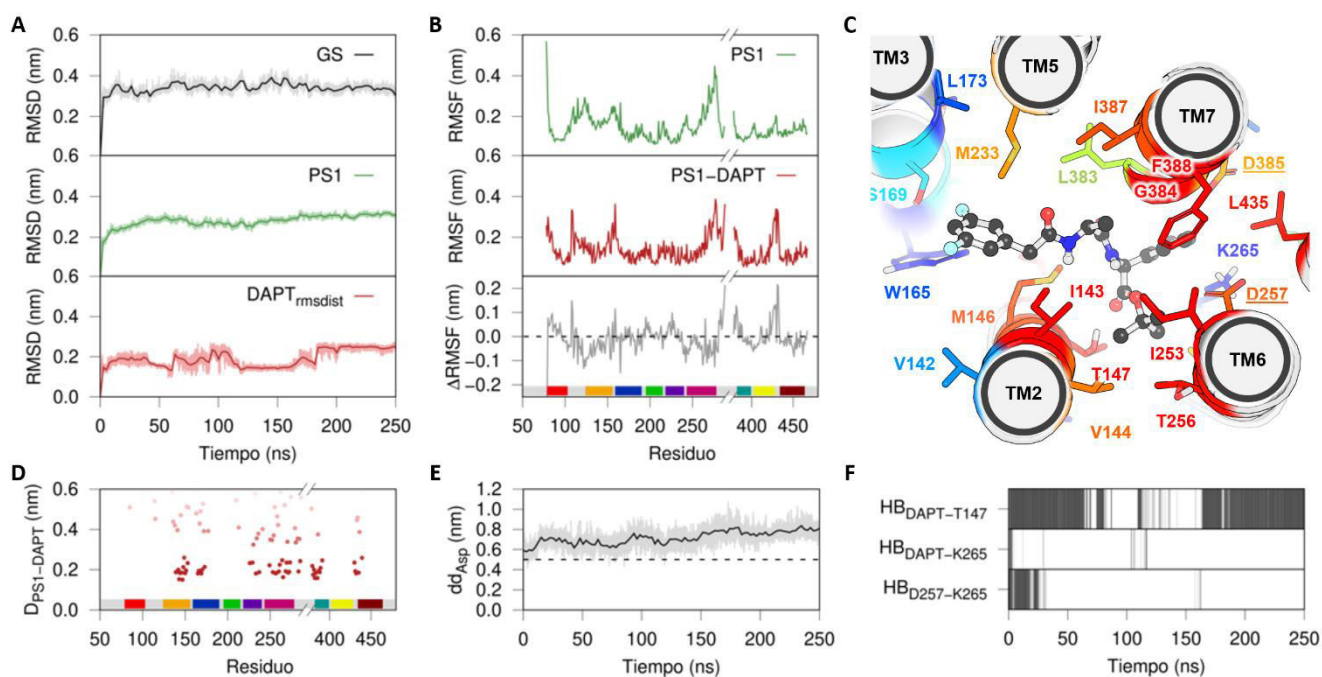
La tabla en la parte inferior de la *Figura 10.3* resume los datos de energía obtenidos a partir de los cálculos de FEP en los diferentes sistemas desacoplados y acoplados de DAPT (ver *Tabla A5.2* del *Apéndice V*). En esta tabla también se reporta el valor de energía libre de unión ( $\Delta G_{\text{unión}}$ ) obtenida a partir de la ecuación (1) de todas las combinaciones de los sistemas estudiados. Con estos datos es posible concluir que DAPT presenta una mayor afinidad al sitio activo de PS1 (menor  $\Delta G_{\text{unión}}$ ) cuando ambos aspárticos se encuentran desprotonados que por el estado protonado Asp-H<sub>257</sub> propuesto por el programa Propka v3.1. Este resultado concuerda con los datos obtenidos a partir de simulaciones de intercambio de réplicas de pH (*pH-REMD*) realizados por nuestro grupo de investigación, donde se demostró que la cercanía del residuo Lys265 en TM6-CT al sitio activo y la presencia del inhibidor DAPT afectan el estado de protonación de Asp257 y se favorece la forma desprotonada de la diada catalítica (ver *Figura A5.11* del *Apéndice V*).<sup>250</sup> Por último, el cálculo con el método de FEP sugiere una mayor preferencia de DAPT por su interacción con el sitio activo desprotonado que con los medios acuoso y lipídico, siendo menor para este último dada su alta hidrofobicidad y predilección por la interacción con la cabeza de los lípidos, tal y como se observó durante las simulaciones de US.

### X.2.3. Caracterización dinámica del complejo GS-DAPT

A partir del complejo GS-DAPT en el estado desprotonado de la diada catalítica y en presencia de NCT-ECD, se llevó a cabo una simulación atomística de 250 ns con el programa GROMACS 5.1.4 empleando el campo de fuerza AMBER99SB-ILDN. En la *Figura 10.4* se muestran los gráficos y datos resultantes de la caracterización dinámica de DAPT en el sitio activo de PS1. El RMSD del complejo de  $\gamma$ -secretasa y PS1 permitió asegurar que el sistema alcanzó el equilibrio en el periodo de tiempo simulado (*Figura 10.4A*). Por su parte, el RMSD de la posición de DAPT confirmó que el compuesto se mantuvo en el sitio activo durante la simulación, presentando un cambio respecto a su posición inicial menor a 0.25 nm. Al compara el RMSF del tiempo 150 a 250 ns de la simulación atomística de 5FN2 sin ligando (ver *Capítulo VII*) con la simulación de GS-DAPT se aprecia una clara



disminución de la movilidad de HL1, TM2 y TM6-CT como resultado de la interacción de DAPT (Figura 10.4B). Sin embargo, la presencia de este compuesto también promueve un aumento en la movilidad del asa que conecta a TM8 con TM9 (motivo PAL) debido a su interacción con Leu435. Un estudio experimental previo reportó que la presencia de la mutación L435F en PS1 conduce a la pérdida total de la actividad proteolítica de  $\gamma$ -secretasa, lo cual podría deberse a que el grupo fenilo de la fenilalanina podría estar bloqueando la interacción de los aspárticos, similar a lo observado con el grupo fenilo del inhibidor DAPT.



Residuo	Contribución al $\Delta G$ (kcal/mol)	Residuo	Contribución al $\Delta G$ (kcal/mol)	Residuo	Contribución al $\Delta G$ (kcal/mol)	Residuo	Contribución al $\Delta G$ (kcal/mol)
I143	-1.946 ± 0.706	L435	-0.785 ± 0.233	I140	-0.437 ± 0.132	F237	-0.194 ± 0.110
M146	-1.061 ± 0.441	L383	-0.732 ± 0.400	L268	-0.414 ± 0.381	V142	-0.178 ± 0.207
L150	-1.033 ± 0.406	I387	-0.714 ± 0.188	L271	-0.403 ± 0.477	F283	-0.149 ± 0.149
T147	-0.902 ± 0.366	V144	-0.669 ± 0.289	L432	-0.368 ± 0.583	V272	-0.147 ± 0.148
G384	-0.890 ± 0.525	K430	-0.597 ± 0.452	A260	-0.362 ± 0.165	I148	-0.146 ± 0.050
I253	-0.853 ± 0.386	T256	-0.540 ± 0.155	L166	-0.343 ± 0.390	L149	-0.104 ± 0.039
F388	-0.794 ± 0.230	M233	-0.493 ± 0.204	V151	-0.216 ± 0.217	F386	-0.100 ± 0.029

**Figura 10.4.** Caracterización dinámica del complejo GS-DAPT. (A) Gráficos de RMSD de la cadena principal del complejo de  $\gamma$ -secretasa (GS) y PS1, y RMSD de posición del inhibidor DAPT respecto al componente PS1. (B) RMSF de cadenas laterales por residuo de PS1 en el intervalo 150 a 250 ns de las simulaciones atómicas de 5FN2 en su forma desacoplada (PS1) y acoplada con DAPT (PS1-DAPT). El gráfico inferior muestra la diferencia de los valores de RMSF de PS1-DAPT respecto a PS1. (C) Residuos involucrados en la interacción de DAPT con PS1. El rango de colores representa a los residuos de mayor (rojo) a menor (azul) número de contactos con el compuesto. (D) Distancia por residuo de PS1 respecto a DAPT ( $D_{PS1-DAPT}$ ). (E) Distancia de los aspárticos catalíticos Asp257 y Asp385 ( $dd_{Asp}$ ) durante la simulación. La línea punteada indica la distancia por debajo de la cual se considera al sistema en su estado activo. (F) Número de puentes de hidrógeno (HB) formados entre el compuesto DAPT y los residuos Thr147 y Lys265, y Asp257 y Lys265 durante los 250 ns de simulación. La tabla debajo de la figura muestra la contribución a la energía libre de unión por aminoácido calculada con el método de MM-PBSA.

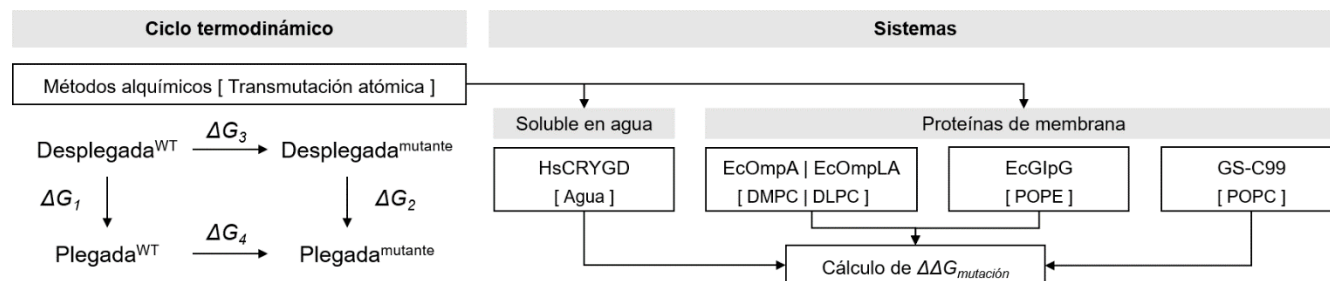
La *Figura 10.4C* expone los aminoácidos involucrados en la interacción de DAPT durante los 250 ns de simulación, empleándose un rango de colores que muestra los residuos de mayor (rojo) a menor (azul) número de contactos. Con los cambios observados en la interacción fue posible determinar que DAPT sufrió un rearrreglo conformacional durante la simulación que involucró el distanciamiento del grupo 3,5-difluorobencilo de la hélice TM3. Además, se observa que el compuesto mantuvo los contactos nativos con los residuos hidrofóbicos Ile143 (TM2), Ile253 (TM6), Gly384 (TM7), Phe388 (TM7) y Leu435 (TM9) durante la mayor parte de la simulación (*Figura 10.4C y D*). Cabe mencionar que los residuos involucrados en la interacción con DAPT mantuvieron una contribución a la energía libre de unión similar durante los 250 ns de MD (ver *Figura A5.12 del Apéndice V*). Los residuos con las mayores contribuciones ( $\Delta G < -0.60$  kcal/mol), ordenados de forma descendente, fueron: Ile143, Met146, Thr147, Leu150, Gly384, Ile253, Phe388, Leu435, Leu383, Ile387 y Val144 (ver tabla inferior de la *Figura 10.4E*). Esto demuestra que el ligando se mantuvo en el sitio durante todo el tiempo de simulación, y que el rearrreglo conformacional por la alta flexibilidad del grupo 3,5-difluorobencilo no afectó su estabilidad o interacciones nativas en el sitio activo. Asimismo, la interacción con estos residuos favoreció que el sustituyente fenilo de DAPT se mantuvieran entre los residuos de aspártico catalíticos, impidiendo que estos se aproximaran (*Figura 10.4E*). Además de las interacciones hidrofóbicas, DAPT presentó un puente de hidrógeno por parte de su grupo *tert*-butóxido con el grupo hidroxilo de Thr147 ( $t = 54.6$  %) y, en un menor tiempo, con el amino de Lys265 ( $t = 0.7$  %) (ver *Figura 10.4F*). Como se mencionó anteriormente, Lys265 mostró ser un residuo clave durante las simulaciones de pH-REMD debido a que su interacción con Asp257 reducía la probabilidad de protonación de este último. En este estudio sólo se presentó el puente de hidrógeno entre Asp257 y Lys265 durante el 8.8 % de la simulación; sin embargo, la cercanía de este residuo al sitio catalítico y la menor movilidad de TM6-CT sugiere que podría seguir interfiriendo con el estado de protonación del residuo catalítico.

## XI. Efecto de mutaciones de *PSEN1* en la producción del péptido A $\beta$

Un estudio reciente realizado por el grupo de Chávez-Gutiérrez<sup>251</sup> demostró que la presencia de mutaciones desestabilizadoras en el componente PS1 de  $\gamma$ -secretasa reducen la estabilidad de intermediarios peptídicos A $\beta$  en el sitio activo (GS-C99), disminuyendo su procesividad y promoviendo la formación del péptido amiloidogénico A $\beta$ 42. Por el contrario, la presencia de mutaciones estabilizadoras en el gen que codifica para PS1 (*PSEN1*) se asoció al aumento en la procesividad de los subproductos y a la formación de péptidos no tóxicos más cortos (A $\beta$ 38 y A $\beta$ 40). Los resultados de este estudio permiten establecer una relación directa entre la estabilidad del complejo GS-C99 y la generación de la forma tóxica A $\beta$ 42. Por tanto, la predicción del efecto de las mutaciones de PS1 en el complejo GS-C99 resulta de gran interés para tener información de la estructura patogénica y determinar la probabilidad de que un paciente pueda desarrollar la enfermedad de Alzheimer.

Los métodos experimentales empleados para la determinación de la estabilidad de una macromolécula involucran el aumento progresivo de la temperatura del sistema o la adición de agentes desnaturizantes al medio (ej. urea, cloruro de guanidinio). El análisis estadístico de los datos resultantes dan a conocer la temperatura media de fusión ( $T_m$ ) o la energía libre ( $\Delta G$ ) del cambio entre los estados plegado y desplegado de la macromolécula (ver *Esquema 9.3*).<sup>252</sup> Los parámetros térmicos y energéticos también permiten determinar si una proteína mutante aumenta o disminuye la estabilidad de la estructura al compararse con los datos de la proteína silvestre (*Wild type*, WT). Al relacionar la energía libre de la proteína WT ( $\Delta G_1$ ) con el de la mutante ( $\Delta G_2$ ) es posible calcular la doble diferencia de energía libre ( $\Delta\Delta G_{mutación} = \Delta G_1 - \Delta G_2$ ), cuyos valores positivos se relacionan con mutaciones desestabilizadoras y los negativos a las estabilizadoras.

Actualmente, existe una gran variedad de métodos computacionales que predicen el  $\Delta\Delta G_{mutación}$  como resultando de reemplazos simples o múltiples de aminoácidos en una proteína;<sup>253</sup> sin embargo, la herramienta *MPddG* del programa Rosetta es la única que intenta predecir el efecto de mutaciones en proteínas membranales.<sup>254</sup> En este trabajo se propuso implementar el método de transmutación atómica (PMX), previamente descrito por Gapsys y colaboradores<sup>255-259</sup> con proteínas solubles en agua, para su uso en proteínas membranales (*Sección 6.1 del Apéndice VI*). Dada la complejidad de simular el mecanismo de desnaturización de una proteína, en este método se calcula la energía libre asociada a la transición del residuo de interés de su forma WT a la mutante a partir de los estados desplegado ( $\Delta G_3$ ) y plegado ( $\Delta G_4$ ) (ver *Esquema 11.1*). Previo a su implementación en el complejo GS-C99, los parámetros y tiempos de simulación empleados fueron estudiados: (1) la cristalina  $\gamma$ D de humano (HsCRYGD), dos proteínas de barril  $\beta$  de la membrana externa de *Escherichia coli* (EcOmpA y EcOmpLA) y una proteasa intramembranal de *E. coli* (EcGlpG) (*Sección 6.2 del Apéndice VI*).

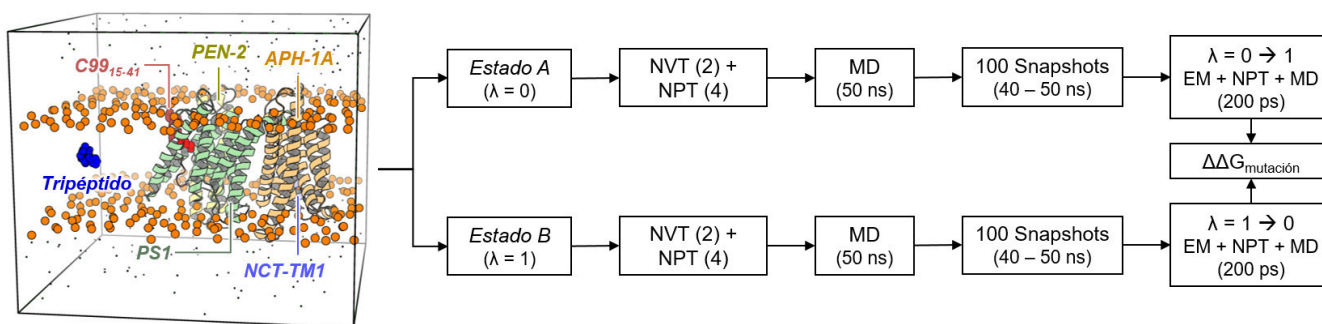


**Esquema 11.1.** Diagrama general de trabajo empleado para la predicción del efecto de mutaciones en diferentes sistemas.

## XI.1. Metodología

(a) *Preparación de los modelos.* Para la construcción del complejo GS-C99, se utilizó como molde la estructura de crio-EM de  $\gamma$ -secretasa con clave 5FN3.<sup>70</sup> Como se mencionó en la sección de antecedentes, esta estructura se resolvió con un péptido sin secuencia definida (cadena de polialaninas) similar al sustrato C99. Con base en un análisis de similitud de la estructura secundaria del péptido C99 utilizado en el capítulo anterior y la predicción de estructura terciaria con el programa Modeller v9.17, fue posible asignar la secuencia de aminoácidos 15 a 41 a dicho péptido. Al igual que con el complejo GS-DAPT, se decidió omitir la región NCT-ECD para reducir el tamaño del sistema y así poder optimizar el tiempo de cómputo. Además, se consideró el estado protonado del residuo catalítico Asp385, puesto que los resultados de pH-REMD reportados por nuestro grupo de investigación demuestran que este se encuentra protonado durante el acoplamiento de C99.<sup>250</sup> El modelo final de GS-C99 se orientó con respecto a una bicapa lipídica de referencia con el servidor OPM.

(b) *MD atomística.* El complejo GS-C99 se sometió a 200 ns de simulación de MD atomística empleando el campo de fuerza AMBER99SB-ILDN implementado en el programa GROMACS 5.1.4. Con base en la información experimental y en estudios previos de dinámica molecular, se embebió a la proteína en una bicapa lipídica de POPC.<sup>86,156</sup> El complejo proteína-membrana se construyó con la herramienta *membrane builder*<sup>159</sup> del servidor web CHARMM-GUI<sup>160</sup>. Para estas simulaciones se utilizó la misma metodología de preparación, producción, parámetros y condiciones (310 K y 1.0 bar) descritas en el *Capítulo VII* de este trabajo. Finalmente, se llevó a cabo un análisis de agrupamiento basado en el RMSD de la cadena principal de GS-C99 (*cut-off* = 0.15 nm) para la selección de la estructura más representativa de los últimos 100 ns de simulación. Se extrajo únicamente la conformación más representativa del complejo GS-C99 para su uso como modelo inicial durante los cálculos de energía libre.



**Esquema 11.2.** Diagrama general de trabajo empleado para el cálculo de  $\Delta\Delta G$  de las mutantes del complejo GS-C99.

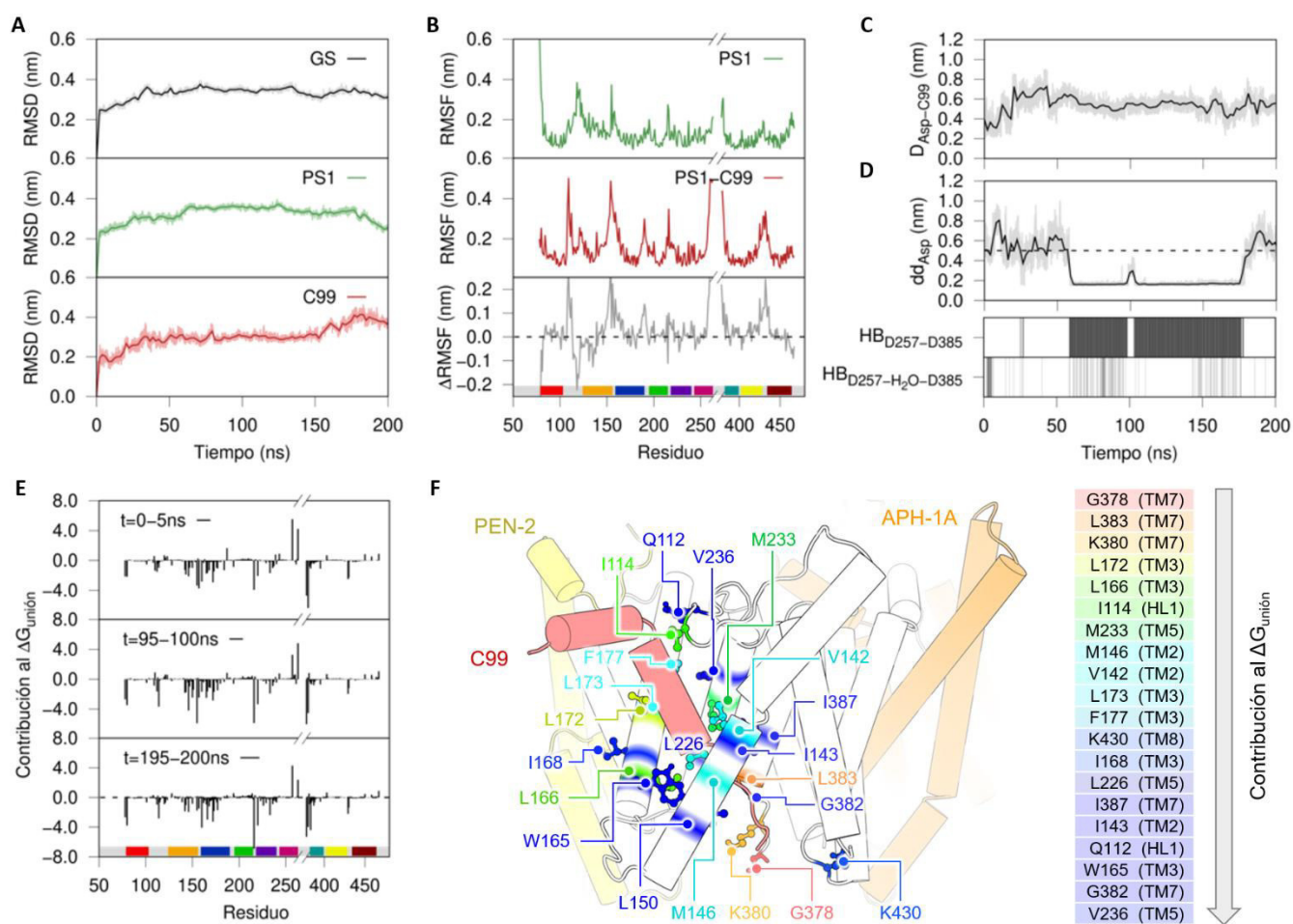
(c) *Cálculos de energía libre.* Se recopilaron los datos de  $\Delta T_m$  de las mutaciones Y115H, M139V, G384A y L435F del sistema GS-C99 relacionadas con la inestabilidad del complejo.<sup>251</sup> Para esta proteasa se empleó el modelo de 2-sistemas/1-caja, posicionando al tripéptido en la misma membrana lipídica que la de la proteína (ver *Esquema 11.2*). El tripéptido se colocó a una distancia aproximada de 3.0 nm respecto a la proteína, manteniendo la misma posición en el eje Z que la del residuo a transmutar en la proteína y restringiendo la movilidad del C $\alpha$  del residuo central del tripéptido y el del residuo Leu226 de la proteína. Para la preparación del sistema fue necesario construir la membrana con el método de expansión/ensamble de lípidos implementado en el programa

InflateGRO.<sup>137</sup> Se llevaron a cabo varios ciclos de ensamble de lípidos antes de colocar al tripéptido en la posición correspondiente. El sistema se solvató usando el modelo de agua TIP3P y neutralizó con una solución de NaCl 0.15 M. Los *estados A* (Proteasa<sub>WT</sub> + tripéptido<sub>mutante</sub>) y *B* (Proteasa<sub>mutante</sub> + tripéptido<sub>WT</sub>) se sometieron a minimizaciones energéticas y a los equilibrios antes descritos para proteínas membranales, empleando los mismos parámetros y tiempos de simulación (ver *Capítulo VII*). A los equilibrios le siguieron simulaciones de 50 ns de MD para cada estado usando el campo de fuerza AMBER99SB-ILDN implementado en la paquetería de GROMACS 4.6.7. De los últimos 10 ns de simulación de cada sistema se extrajeron 100 conformaciones (*snapshots*), las cuales se minimizaron y equilibraron previo a la realización de 100 transiciones químicas independientes de 200 ps. Para estas transiciones se empleó el potencial *soft-core* (sc) y un  $\lambda$  inicial de 0 ( $\Delta\lambda = 0.00001$ ) y 1 ( $\Delta\lambda = -0.00001$ ) para los *estados A* y *B*, respectivamente. Finalmente, la doble diferencia de energía de las mutaciones se calculó con el método CGI.<sup>260</sup>

## XI.2. Resultados y Discusión

Actualmente se conocen más de 300 mutaciones en el gen *PSEN1* relacionadas con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.<sup>106</sup> Se sabe que varias de estas mutaciones inducen cambios conformacionales en el componente PS1 que alteran su asociación con el sustrato C99, resultando en la pérdida parcial o total del procesamiento proteolítico.<sup>261</sup> El cambio en la estabilidad de las variantes de PS1 se debe principalmente a la presencia de residuos hidrofílicos en la región transmembranal que desacoplan las interacciones hidrofóbicas del complejo de  $\gamma$ -secretasa con la membrana.<sup>262</sup> Este desacoplamiento modifica el modo de unión del sustrato en el sitio activo, lo que conlleva a un cambio en el sitio de corte y, por tanto, al aumento en la relación A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 o pérdida de la actividad proteolítica.<sup>263,264</sup> Un estudio realizado por *Sun et al.*<sup>265</sup> reportó que de 138 mutaciones reportadas de PS1 el 75 % (104 variantes) reducían la producción tanto de A $\beta$ 42 como de A $\beta$ 40 y el 25 % restante (34 variantes) aumentaban la producción de A $\beta$ 42, pero sólo 13 de estas mutaciones incrementaban significativamente la relación A $\beta$ 42/A $\beta$ 40. Recientemente, el grupo de Chávez-Gutiérrez<sup>251</sup> demostró, mediante estudios de termoestabilidad, que la presencia de mutaciones desestabilizadoras en el componente PS1 alteran la asociación del complejo de  $\gamma$ -secretasa con intermediarios peptídicos de A $\beta$  (GS-C99), disminuyendo su procesividad y promoviendo la formación del péptido amiloidogénico A $\beta$ 42. Por el contrario, la presencia de mutaciones estabilizadoras se asoció al aumento en la procesividad de los subproductos y a la formación de péptidos no tóxicos más cortos (A $\beta$ 38 y A $\beta$ 40).

Con el fin de caracterizar el efecto de las variantes de PS1 estudiadas por Chávez-Gutiérrez y colaboradores<sup>251</sup> en la estabilidad termodinámica del complejo GS-C99, se empleó la metodología de transmutación química para proteínas de membrana implementada en el presente trabajo de tesis (ver *Apéndice VI*). Para llevar a cabo este estudio, se empleó como modelo inicial al complejo de  $\gamma$ -secretasa 5FN3 sin el NCT-ECD, reemplazando la cadena de polialaninas del péptido sustrato encontrado en el sitio activo de PS1 por el segmento de aminoácidos 15 a 41 de APP (C99<sub>15-41</sub>). Con base en los resultados de pH-REMD de nuestro grupo de investigación, se consideró la forma protonada del aspártico catalítico Asp385 durante la construcción y preparación del modelo. El modelo final se sometió a una simulación de MD atómica de 200 ns para estudiar la estabilidad del complejo GS-C99 y caracterizar las interacciones y alteraciones en el ensamble a través del tiempo (ver *Figura 11.1*).



Residuo	Contribución al ΔG (kcal/mol)	Residuo	Contribución al ΔG (kcal/mol)	Residuo	Contribución al ΔG (kcal/mol)	Residuo	Contribución al ΔG (kcal/mol)
G378	-5.32 ± 0.81	I114	-2.82 ± 0.52	F177	-1.70 ± 0.43	I143	-1.01 ± 0.39
L383	-4.39 ± 0.86	M233	-2.38 ± 0.43	K430	-1.34 ± 0.28	Q112	-0.95 ± 0.36
K380	-3.98 ± 2.01	M146	-1.94 ± 0.57	I168	-1.20 ± 0.26	W165	-0.92 ± 0.57
L172	-3.25 ± 0.53	V142	-1.86 ± 0.48	L226	-1.11 ± 0.24	G382	-0.90 ± 0.42
L166	-2.98 ± 0.48	L173	-1.82 ± 0.26	I387	-1.10 ± 0.25	V236	-0.89 ± 0.17

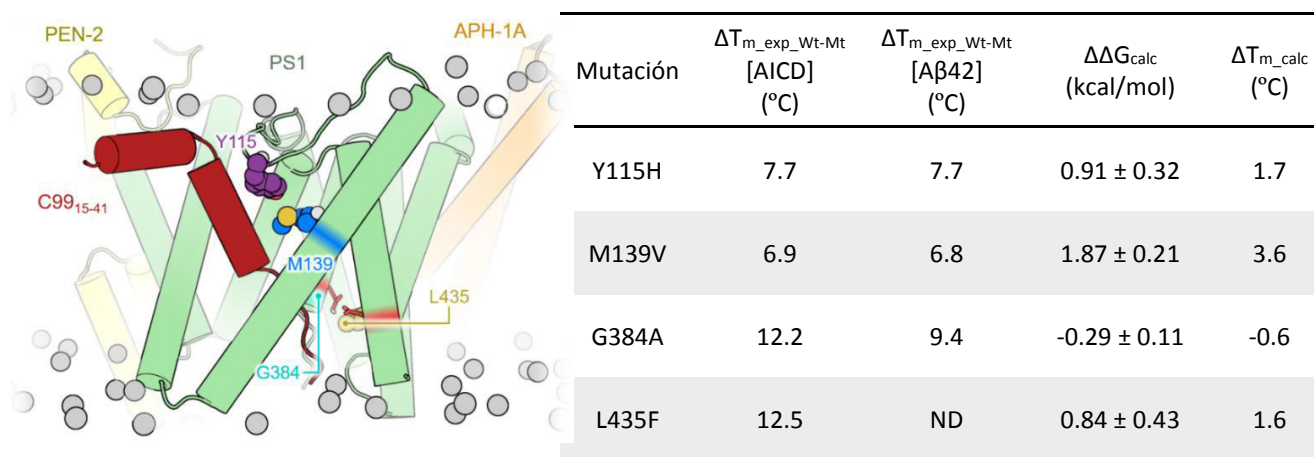
**Figura 11.1.** Caracterización dinámica de la forma protonada del complejo GS-C99. Gráficos de RMSD de la cadena principal del complejo de  $\gamma$ -secretasa (GS), y C99. (B) RMSF de cadenas laterales por residuo de PS1 en el intervalo 100 a 200 ns de las simulaciones atomísticas de 5FN3 en su forma desacoplada (PS1) y acoplada con C99 (PS1-C99). El gráfico inferior muestra la diferencia de los valores de RMSF de PS1-C99 respecto a PS1. (C) Distancia mínima de los residuos de aspártico catalíticos respecto a C99 ( $D_{Asp-C99}$ ). (D) Distancia entre los aspárticos ( $dd_{Asp}$ ) e interacción entre ambos residuos mediada por la formación de un puente de hidrógeno directo ( $HB_{D257-D385}$ ) y un puente mediado por una molécula de agua ( $HB_{D257-H2O-D385}$ ). (E) Contribución a la energía libre de unión ( $\Delta G_{unión}$ ) por residuo de la interacción de C99 con PS1 calculado con el método de MM-PBSA en los lapsos de tiempo ( $t$ ) 0 a 5, 95 a 100 y 195 a 200 ns de la simulación atomística de 200 ns del complejo GS-C99. (F) Representación 3D de la región transmembranal del complejo de  $\gamma$ -secretasa en donde se colorean los aminoácidos del componente PS1 con mayor contribución a la energía libre de unión de C99. El código de color de la figura muestra el rango de mayor (rojo) a menor (azul) contribución por residuo a la interacción PS1-C99. La tabla debajo de la figura muestra la contribución a la energía libre de unión por residuo y su error asociado en los últimos 5 ns (195 a 200 ns) de la simulación atomística del sistema GS-C99.

Los gráficos de RMSD mostrados en la *Figura 11.1A* confirman la estabilidad del complejo GS-C99 durante la simulación, observándose únicamente una ligera perturbación de C99 en los últimos 25 ns. Por su parte, el análisis de RMSF (*Figura 11.1B*) muestra que la asociación de C99 con PS1 disminuye la flexibilidad del asa HL1 y aumenta la movilidad del segmento C-terminal de TM2 y del sitio PAL (asa entre TM8 y TM9). Este comportamiento también se observa al simular el complejo GS-C99 en el estado desprotonado de los residuos de aspártico catalíticos (ver *Figura A5.13* del *Apéndice V*). Cabe mencionar que las fluctuaciones en la flexibilidad de HL1 y en el sitio PAL son muy similares a las observadas durante la interacción de DAPT con el sitio activo, lo que sugiere una alta relación entre la movilidad de estas regiones y la actividad proteolítica del complejo. La simulación del complejo GS-C99 también mostró que el sustrato se mantuvo próximo a los aspárticos catalíticos ( $D_{Asp-C99} \leq 6.0 \text{ \AA}$ ) durante los últimos 150 ns del tiempo simulado (*Figura 11.1C*). Además, los residuos catalíticos se mantuvieron a una distancia menor a  $5.0 \text{ \AA}$  entre ellos ( $dd_{Asp}$ ) durante el 72.6 % de la simulación, formando además un puente de hidrógeno entre el ácido carboxílico del Asp385 y el carboxilato del Asp257 el 64.5 % del tiempo y un puente con una molécula de agua durante el 19.1 % de la simulación (*Figura 11.1D*). Este resultado demuestra que, a diferencia del inhibidor DAPT, la presencia del sustrato C99 en el sitio activo favorece la activación del componente PS1 para su procesamiento. Finalmente, el análisis de la contribución a la energía libre de unión mostrado en las *Figuras 9.10E y F* permitió identificar los 20 aminoácidos de PS1 que favorecen la interacción con el sustrato C99. De estos residuos, los de mayor contribución se localizaron en la región N-terminal de TM7 (i.e. G378, L383 y K380), interactuando con la estructura desplegada del segmento C-terminal de C99. Por otro lado, el segmento helicoidal de la región transmembranal de C99 mantuvo el mayor número de contactos favorables con los residuos localizados en TM2, TM3 y TM5. Es interesante mencionar que varios de los residuos identificados presentan mutaciones asociadas al desarrollo temprano de la enfermedad de Alzheimer, cuyas variantes son: G378E/V, L166H/P/R/V, M233I/T/V, M146I/L/V, L173F/W, F177L/S, I168T, L226F/R, I143F/M/N/T/V, y W165C/G.<sup>106</sup> Nuestro estudio sugiere que la modificación en el patrón de corte de C99 causado por estas mutaciones puede deberse a que el cambio en el perfil de interacción del sustrato con el sitio altera directamente su modo de unión y orientación.

El estudio realizado por el grupo de Chávez-Gutiérrez<sup>251</sup> mostró que la desestabilización del complejo GS-C99 por mutaciones puntuales en PS1 afecta la actividad de endopeptidasa y carboxipeptidasa de la enzima.<sup>251</sup> La función de endopeptidasa involucra el corte inicial en el sitio  $\epsilon$  para la formación de los fragmentos C99 y AICD, mientras que la actividad de carboxipeptidasa se presenta cuando la enzima realiza el procesamiento secuencial de la región C-terminal de C99 para dar lugar a los péptidos A $\beta$ . En ese trabajo de investigación se estudiaron a las mutaciones P88L, Y115H, M139V, L166P, R278I, E280A, G384 y L435F del componente PS1. Estas variantes mostraron un orden ascendente de estabilización similar durante la evaluación de su actividad de endopeptidasa (P88L < L166P < L435F < G384A < R278I < Y115H < M139V < E280A) y carboxipeptidasa para la formación de la isoforma A $\beta$ 42 (L166P < G384A < Y115H < M139V < E280A). De esta última función no se reportaron los valores de desnaturalización térmica para las mutaciones P88L, R278I y L435F.

Para estudiar el efecto en la estabilidad termodinámica de estas mutaciones en el complejo GS-C99, se tomó como modelo inicial a la estructura más representativa de los últimos 100 ns de la simulación atómica. Dado que el complejo mantiene una forma semi-desnaturalizada activa durante los ensayos, para los cálculos de

estabilidad con el método de PMX se posicionó al tripéptido que mimetiza la forma desplegada en la membrana lipídica, manteniendo la misma posición en el eje Z que la del residuo correspondiente en la proteína. Para este trabajo se descartaron a las variantes P88L y L166P debido a que involucran la transmutación de un residuo de prolina, que no es posible realizar hasta el momento empleando métodos alquímicos. Por su parte, la ausencia de la región C-terminal de TM6 en el modelo 5FN3 no permitió la preparación de las variantes R278I y E280A. En la *Figura 11.2* se muestra la representación en 3D de las mutaciones Y115H, M139V, G384A y L435F en el componente PS1 y los datos experimentales de desnaturalización térmica ( $\Delta T_{m\_exp\_Wt-Mt}$ ) asociados a la producción de los péptidos AICD (endopeptidasa) y A $\beta$ 42 (carboxipeptidasa). Además, en la tabla de esta figura se reporta la doble diferencia de energía obtenida con el método de PMX ( $\Delta\Delta G_{calc}$ ) y los valores de  $\Delta T_m$  calculados a partir de la ecuación de Rees y Robertson<sup>266</sup> (ver *sección 6.2.1 del Apéndice VI*). A pesar de haber utilizado la misma metodología y parámetros que los establecidos durante los ensayos de estabilidad termodinámica con las proteínas de *Escherichia coli* (EcOmpA, EcOmpLA y EcGlpG, ver *Apéndice VI*), los resultados obtenidos para el complejo GS-C99 muestran que no hay relación entre los datos calculados y los experimentales. Más aún, los datos calculados presentan una relación inversa con los experimentales, donde la mutación más desestabilizadora de la actividad de carboxipeptidasa (i.e. G384A) se predice como la menos desestabilizadora (menor  $\Delta\Delta G_{calc}$ ), mientras que la variante más estable del complejo (i.e. M139V) predice el mayor comportamiento desestabilizador (mayor  $\Delta\Delta G_{calc}$ ). Teniendo en cuenta que el método es predictivo para otras proteínas de membrana, la disparidad entre los datos con el complejo GS-C99 sugiere que debe replantearse el modelo utilizado para la correcta predicción. Uno de los factores más importantes a considerar y, por el cual, posiblemente ocurrió esta disimilitud entre resultados, es el tamaño del segmento de C99 empleado durante el estudio. Por lo tanto, resulta importante establecer de forma inicial la estructura completa de C99 en el sitio activo para realizar los estudios de transmutación alquímica.



**Figura 11.2.** Representación de la estructura 3D de la región transmembranal del complejo GS-C99 donde se colorean los residuos mutados durante el estudio de transmutación alquímica: Y115 (púrpura), M139 (azul), G384 (cian) y L435 (mostaza). La tabla reporta los datos experimentales de desnaturalización térmica ( $\Delta T_{m\_exp\_WT-Mt}$ ) asociados a la formación de los péptidos AICD y AB42, y los valores de la doble diferencia de energía libre ( $\Delta\Delta G_{calc}$ ) y desnaturalización térmica ( $\Delta T_{m\_calc}$ ) calculados con el método de PMX para el complejo GS-C99.



## XII. Hallazgos importantes

### XII.1. Análisis estructural de la enzima $\gamma$ -secretasa

- El dominio extracelular de NCT presenta 18 sitios con alta probabilidad de experimentar modificaciones postraduccionales de N- u O-glicosilación.
- La distancia entre los residuos de aspártico catalíticos ( $dd_{Asp}$ ) y el ángulo de inclinación de TM6 relativo al vector normal de la membrana ( $I_{TM6}$ ) son parámetros de orden fundamentales para la descripción de la forma inactiva (*estado 1*,  $dd_{Asp} > 5.0 \text{ \AA}$  e  $I_{TM6} > 15^\circ$ ) y activa (*estado 2*,  $dd_{Asp} < 5.0 \text{ \AA}$  e  $I_{TM6} < 15^\circ$ ) del componente PS1.
- El componente APH-1A presenta una baja similitud en su topología y distribución de residuos en comparación con los GPCRs, a pesar de estar igualmente constituido por siete TMs y una hélice yuxtamembranal.
- La secuencia de aminoácidos de la hélice reentrante de PEN-2 difiere de la información de las bases de datos utilizadas para la predicción de estos motivos.

### XII.2. Caracterización dinámica de la enzima $\gamma$ -secretasa

- Es necesario que uno de los residuos de aspártico catalíticos se encuentre en el estado monoprotonado (neutro) y el otro en el estado desprotonado (carga negativa) para la activación del componente PS1, esto como resultado de la formación de un puente de hidrógeno intramolecular y la coordinación de una molécula de agua entre los residuos de aspártico catalíticos.
- El dominio extracelular de NCT presenta dos movimientos principales que podrían estar relacionados con el reconocimiento y reclutamiento del sustrato, los cuales son: “arriba/abajo” y “rotación”. El primero de ellos fue caracterizado inicialmente por el grupo de Chávez-Gutiérrez<sup>184</sup> mediante estudios de crio-EM, donde se definieron las conformaciones compacta, intermedia y extendida también observadas en este trabajo. Ninguno de los dos movimientos observados en NCT presentó una relación directa con el estado de activación de PS1.
- El componente APH-1A exhibe una cavidad hidrofílica que puede almacenar moléculas de agua y cationes  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , permitiendo el flujo ocasional de únicamente moléculas de agua a través de su estructura. Además, el ingreso de moléculas de agua a la cavidad mostró no tener relación con el estado de activación del componente PS1.

### XII.3. Sitio de reconocimiento del sustrato en el complejo de $\gamma$ -secretasa

- El análisis estructural y dinámico de la interacción de los sustratos C99 y Notch-1 con el complejo de  $\gamma$ -secretasa permitió determinar que C99 tiene una mayor probabilidad de unirse al sitio SBS2 (PS1 – PEN-2) identificado por Fukumori y Steiner<sup>74</sup>, mientras que Notch-1 tiene una mayor preferencia por la unión al sitio SBS1 (PS1 – APH-1A) descrito por el grupo de Tomita e Iwatsubo<sup>73</sup>.

- La predilección de los sustratos por diferentes sitios de unión a la enzima se relacionó a la presencia de la hélice yuxtamembranal de C99 y a su ausencia en Notch-1.
- La información generada sugiere que el mecanismo de acción de los GSMs *ST1120* y *NGP55* es a través del bloqueo directo de la interacción de GS-C99 al presentar un sitio de unión cercano a *SBS2*, explicando además la razón por la cual no afectan el reconocimiento y procesamiento de Notch-1.

#### *XII.4. Factores que modifican la actividad del componente PS1 de $\gamma$ -secretasa*

- Los lípidos con grupos formadores de puentes de hidrógeno (POPE) o carga negativa (POPA) en sus cabezas reducen la movilidad del asa HL1 y la flexibilidad de la región transmembranal de la enzima debido a sus interacciones con los residuos polares y cargados. El aumento en el grosor de la membrana y la ausencia o cambio en la posición de las insaturaciones en las cadenas alifáticas reducen la probabilidad de que PS1 alcance el estado activo. El incremento de la presión en la región transmembranal, como resultado del aumento en la concentración de moléculas de colesterol en la membrana, favorecen la formación del estado activo de la enzima. Sin embargo, este incremento conlleva a la pérdida de la flexibilidad del sistema, disminuyendo a su vez la probabilidad de ingreso del sustrato al sitio activo. La presión en la región transmembranal en bicapas lipídicas con alta concentración de colesterol disminuye cuando se usan mezclas heterogéneas de lípidos similares a las presentes en las balsas lipídicas. Además, estas mezclas de lípidos favorecen la formación del estado compacto del complejo debido a la interacción con el dominio extracelular de NCT.
- La preferencia del inhibidor DAPT por la superficie de la bicapa lipídica de POPC sugiere que este compuesto ingresa al sitio activo a través de TM2 y TM3 de PS1 vía su difusión en la membrana. La presencia de este compuesto en el sitio activo bloquea la interacción entre los residuos de aspártico catalíticos, favoreciendo la formación del estado desprotonado de sus residuos e impidiendo su interacción.
- Es posible predecir la estabilidad termodinámica de proteínas membranales mediante el uso de métodos alquímicos de transmutación atómica; sin embargo, para describir el efecto de mutaciones en la estabilidad y actividad de  $\gamma$ -secretasa se requiere del uso de un modelo completo de C99 acoplado en el sitio activo de PS1 en el complejo enzimático.

### **XIII. Conclusiones**

El empleo de métodos computacionales permitió describir el ensamble estructural del complejo de  $\gamma$ -secretasa y caracterizar su comportamiento dinámico en presencia de diferentes factores externos e internos que pueden modificar su actividad de aspartil proteasa.

Las estructuras de crio-EM de la enzima  $\gamma$ -secretasa depositadas en el PDB proporcionaron información relevante con relación a la composición y distribución conformacional de sus cuatro componentes.

Por medio de la aplicación de diferentes aproximaciones de dinámica molecular fue posible caracterizar el comportamiento dinámico del complejo en una membrana de POPC. Las simulaciones con resolución de todos los átomos y de grano grueso proporcionaron información relevante para comprender el mecanismo de activación del componente PS1.

El uso de herramientas de acoplamiento molecular proteína-proteína y simulaciones de dinámica molecular permitieron describir el sitio de unión inicial de los sustratos C99 y Notch-1 al complejo de  $\gamma$ -secretasa, dando además una posible explicación a la modulación selectiva en la producción del péptido A $\beta$ .

El empleo de metodologías de dinámica molecular multiescala permitieron determinar las alteraciones en el ensamble y dinamismo del complejo de  $\gamma$ -secretasa durante el estudio de diferentes composiciones de lípidos en la membrana, la presencia del inhibidor DAPT en el sitio activo y mutaciones en la secuencia de la subunidad catalítica PS1.

En este estudio fue posible caracterizar el comportamiento dinámico de la enzima  $\gamma$ -secretasa, aportando información relevante acerca del mecanismo de activación, unión al sustrato y factores que afectan su función proteolítica. Esto último contribuirá a la comprensión de la función y estructura de la enzima para el diseño de nuevos agentes moduladores para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

## XIV. Perspectivas

Los resultados de dinámica molecular multiescala reportados en esta tesis contribuyen a la comprensión del ensamble estructural y dinámico del complejo de  $\gamma$ -secretasa, proporcionando información relevante acerca de la influencia de factores externos e internos en la activación de la enzima. El producto de este trabajo también derivó en planteamiento de nuevas interrogantes, las cuales sería imperativo abordar para enriquecer el entendimiento de la función del complejo enzimático:

- Construir un modelo del complejo de  $\gamma$ -secretasa que incluya el asa intracelular que conecta a TM6 y TM7 del componente PS1 (aminoácidos 264 a 377). Utilizando esta estructura como modelo inicial, estudiar el comportamiento de la región intracelular en el estado inmaduro y maduro de la enzima mediante simulaciones de dinámica molecular multiescala.
- Determinar si existe alguna relación directa entre la formación del canal de APH-1A y la activación de la enzima. Asimismo, resultaría interesante estudiar si la isoforma 1B tiene la capacidad de formar la cavidad central y el canal de agua.
- Caracterizar mediante estudios de muestreo de sombrilla (*umbrella sampling*) el posible sitio de ingreso del sustrato C99 al sitio activo de la enzima.
- Estudiar el efecto del pH y la presencia del sustrato en el sitio activo en los estados de protonación de los residuos de aspártico catalíticos.
- Construir un modelo de  $\gamma$ -secretasa que contenga la estructura completa de C99 en el sitio activo para predecir la estabilidad termodinámica de variantes de PS1 con la metodología de transmutación atómica descrita en este trabajo.
- Realizar simulaciones de dinámica molecular del modelo anterior con la metodología de QM/MM para describir el mecanismo de acción de la enzima.
- Identificar y caracterizar el sitio de unión de moduladores de  $\gamma$ -secretasa utilizando diferentes herramientas de modelado molecular. Asimismo, se propone identificar nuevos compuestos bioactivos que modulen la actividad de la enzima mediante la realización de estudios de relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR, por sus siglas en inglés).
- Emplear las nuevas estructuras determinadas por crio-EM de  $\gamma$ -secretasa con los sustratos C99 (PDB: 6IYC<sup>267</sup>) y Notch-1 (PDB: 6IDF<sup>268</sup>) para determinar el efecto de las mutaciones de PS1 en la estabilidad del complejo utilizando la metodología de PMX descrita en este trabajo.

Los resultados que se generen a partir de estos estudios proporcionarán una visión más general del comportamiento del complejo de  $\gamma$ -secretasa, así como también contribuirán al diseño racional de nuevos fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

## XV. Referencias

1. Yacoubian, T. A. in *Drug Discovery Approaches for the Treatment of Neurodegenerative Disorders* **2017**, 1–16.
2. Palop, J. J., Chin, J. and Mucke, L. A network dysfunction perspective on neurodegenerative diseases. *Nature* **2006**, 443, 768–773.
3. WHO. Neurological Disorders: Public Health Challenges. *World Health Organization* **2018**, Available at: [http://www.who.int/mental\\_health/neurology/neurodiso/en/](http://www.who.int/mental_health/neurology/neurodiso/en/). (Accessed: 28th March 2018)
4. Sheikh, S., Safia, Haque, E. and Mir, S. S. Neurodegenerative Diseases: Multifactorial Conformational Diseases and Their Therapeutic Interventions. *J. Neurodegener. Dis.* **2013**, 2013, 1–8.
5. OMS. Trastornos mentales. *Organización Mundial de la Salud* **2018**, Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs396/es/>. (Accessed: 28th March 2018)
6. WHO. Comprehensive mental health action plan 2013–2020. *World Health Organization* **2018**, Available at: [http://www.who.int/mental\\_health/action\\_plan\\_2013/en/](http://www.who.int/mental_health/action_plan_2013/en/). (Accessed: 28th March 2018)
7. Kassebaum, N. J. et al. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 315 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE), 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* **2016**, 388, 1603–1658.
8. Collaborators, G. 2015 Daly. and H. Interactive visualisation of GBD 2016 results. Available at: <https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/>. (Accessed: 28th March 2018)
9. Alzheimer, A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Zeitschrift für Psychiatr. und Psych. Medizin* **1907**, 64, 146–148.
10. Holtzman, D. M., Morris, J. C. and Goate, A. M. Alzheimer's Disease: The Challenge of the Second Century. *Sci. Transl. Med.* **2011**, 3, 1–17.
11. Alzheimer's Association. Get inside the human brain. **2017**, Available at: [https://www.alz.org/alzheimers\\_disease\\_4719.asp](https://www.alz.org/alzheimers_disease_4719.asp). (Accessed: 20th January 2018)
12. Jucker, M. and Walker, L. C. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* **2013**, 501, 45–51.
13. Sperling, R. A. et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* **2011**, 7, 280–292.
14. AlzOrg. Stages of Alzheimer's. *Alzheimer's Association* **2018**, Available at: [https://www.alz.org/alzheimers\\_disease\\_stages\\_of\\_alzheimers.asp](https://www.alz.org/alzheimers_disease_stages_of_alzheimers.asp). (Accessed: 28th March 2018)
15. Amtul, Z. Why therapies for Alzheimer's disease do not work: Do we have consensus over the path to follow? *Ageing Res. Rev.* **2016**, 25, 70–84.
16. Skovronsky, D. M., Lee, V. M.-Y. and Trojanowski, J. Q. Neurodegenerative Diseases: New Concepts of Pathogenesis and Their Therapeutic Implications. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2006**, 1, 151–170.
17. Mandelkow, E. M. and Mandelkow, E. Biochemistry and cell biology of Tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, 3, 1–25.
18. Iqbal, K. et al. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **2005**, 1739, 198–210.
19. Mucke, L. Neuroscience: Alzheimer's disease. *Nature* **2009**, 461, 895–7.
20. Aguayo-Ortiz, R. and Dominguez, L. Generation of Amyloid- $\beta$  Peptides by  $\gamma$ -Secretase. *Isr. J. Chem.* **2017**, 57, 574–585.
21. LaFerla, F. M., Green, K. N. and Oddo, S. Intracellular amyloid- $\beta$  in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, 8, 499–509.
22. Deuss, M., Reiss, K. and Hartmann, D. Part-Time  $\alpha$ -Secretases: The Functional Biology of ADAM 9, 10 and 17. *Curr. Alzheimer Res.* **2008**, 5, 187–201.
23. Corrigan, F. et al. The neuroprotective domains of the amyloid precursor protein, in traumatic brain injury, are located in the two growth factor domains. *Brain Res.* **2011**, 1378, 137–143.
24. Han, W., Ji, T., Mei, B. and Su, J. Peptide p3 may play a neuroprotective role in the brain. *Med. Hypotheses* **2011**, 76, 543–546.
25. Vassar, R. BACE1: the beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease. *J. Mol. Neurosci.* **2004**, 23, 105–114.
26. Querfurth, H. W. and Laferla, F. M. Alzheimer's Disease. *Clin. Trials* **2010**, 9, 329–344.
27. Tomita, T. and Iwatsubo, T. Structural biology of presenilins and signal peptide peptidases. *J. Biol. Chem.* **2013**, 288, 14673–14680.
28. Takami, M. et al.  $\gamma$ -Secretase: Successive Tripeptide and Tetrapeptide Release from the Transmembrane Domain of -Carboxyl Terminal Fragment. *J. Neurosci.* **2009**, 29, 13042–13052.

29. Palop, J. J. and Mucke, L. Amyloid- $\beta$ -induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat. Neurosci.* **2010**, 13, 812–818.
30. Kim, T. et al. Human LILRB2 is a  $\beta$ -amyloid receptor and its murine homolog PirB regulates synaptic plasticity in an Alzheimer's model. *Science*. **2013**, 341, 1399–1404.
31. Jang, H., Ma, B., Lal, R. and Nussinov, R. Models of toxic beta-sheet channels of protegrin-1 suggest a common subunit organization motif shared with toxic Alzheimer beta-amyloid ion channels. *Biophys. J.* **2008**, 95, 4631–4642.
32. Xiao, Y. et al. A $\beta$ (1-42) fibril structure illuminates self-recognition and replication of amyloid in Alzheimer's disease. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2015**, 22, 499–505.
33. Jiang, L. et al. Structure-based discovery of fiber-binding compounds that reduce the cytotoxicity of amyloid beta. *Elife*. **2013**, 2013, 2–4.
34. Sengupta, U., Nilson, A. N. and Kaye, R. The role of amyloid- $\beta$  oligomers in toxicity, propagation, and immunotherapy. *EBioMedicine* **2016**, 6, 42–49.
35. Izzo, N. J. et al. Alzheimer's Therapeutics Targeting Amyloid Beta 1 – 42 Oligomers II : Sigma-2 / PGRMC1 Receptors Mediate A $\beta$  42 Oligomer Binding and Synaptotoxicity. *PLoS One*. **2014**, 9, e111899.
36. Duffau, H. *Brain Plasticity and Reorganization Before, During, and After Glioma Resection*. *Glioblastoma Elsevier*, **2016**, doi:10.1016/B978-0-323-47660-7.00018-5
37. Lopez, J., Gamache, K., Schneider, R. and Nader, K. Memory Retrieval Requires Ongoing Protein Synthesis and NMDA Receptor Activity-Mediated AMPA Receptor Trafficking. *J. Neurosci.* **2015**, 35, 2465–2475.
38. Yu, J. T., Chang, R. C. C. and Tan, L. Calcium dysregulation in Alzheimer's disease: From mechanisms to therapeutic opportunities. *Prog. Neurobiol.* **2009**, 89, 240–255.
39. Marambaud, P., Dreses-Werringloer, U. and Vingtdeux, V. Calcium signaling in neurodegeneration. *Mol. Neurodegener.* **2009**, 4, 1–15.
40. Wang, N. et al. Active calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) regulates nmda receptor mediated postsynaptic long-term potentiation (i-LTP) by promoting the interaction between CaMKII and NMDA receptors in ischemia. *Neural Plast.* **2014**, 2014,
41. Campos-Peña, V. and Meraz-Rios, M. A. in *Neurochemistry* **2014**, 285–315. doi:10.5772/57367
42. C. Reese, L. and Tagliavola, G. A Role for Calcineurin in Alzheimer's Disease. *Curr. Neuropharmacol.* **2011**, 9, 685–692.
43. Kubokawa, M., Nakamura, K. and Komagiri, Y. Interaction between Calcineurin and Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin Kinase-II in Modulating Cellular Functions. *Enzyme Res.* **2011**, 2011, 1–5.
44. Ghosh, A. and Giese, K. P. Calcium/calmodulin-dependent kinase II and Alzheimer's disease. *Mol. Brain* **2015**, 8, 1–7.
45. Ly, P. T. T. and Song, W. Loss of activated CaMKII at the synapse underlies Alzheimer's disease memory loss. *J. Neurochem.* **2011**, 119, 673–675.
46. Reinders, N. R. et al. Amyloid- $\beta$  effects on synapses and memory require AMPA receptor subunit GluA3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, 113, E6526–E6534.
47. Danysz, W. and Parsons, C. G. Alzheimer's disease,  $\beta$ -amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine - Searching for the connections. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, 167, 324–352.
48. Kirouac, L., Rajic, A. J., Cribbs, D. H. and Padmanabhan, J. Activation of Ras-ERK Signaling and GSK-3 by Amyloid Precursor Protein and Amyloid Beta Facilitates Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *Eneuro* **2017**, 4, ENEURO.0149-16.2017.
49. Lee, J. K. and Kim, N.-J. Recent Advances in the Inhibition of p38 MAPK as a Potential Strategy for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Molecules* **2017**, 22, 1287.
50. Chuderland, D. and Seger, R. Calcium regulates ERK signaling by modulating its protein-protein interactions. *Commun. Integr. Biol.* **2008**, 1, 4–5.
51. Wong, J. Neurotrophin signaling and Alzheimer's Disease neurodegeneration - Focus on BDNF/TrkB signaling. *Trends cell Signal. pathways neuronal fate Decis.* **2013**, 181–194. doi:43841
52. Wolfe, M. S.  $\gamma$ -Secretase inhibitors and modulators for Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **2012**, 120, 89–98.
53. Ghosh, A. K. and Osswald, H. L. BACE1 ( $\beta$ -secretase) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 6765–6813.
54. Peters, F. et al. BACE1 inhibition more effectively suppresses initiation than progression of  $\beta$ -amyloid pathology. *Acta Neuropathol.* **2018**, 1–16. doi:10.1007/s00401-017-1804-9
55. Vassar, R. BACE1 inhibitor drugs in clinical trials for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Res. Ther.* **2014**, 6, 1–14.
56. Semighini, E. P. In Silico design of beta-secretase inhibitors in Alzheimer's disease. *Chem. Biol. Drug Des.* **2015**, 86, 284–290.
57. Barão, S., Moechars, D., Lichtenthaler, S. F. and De Strooper, B. BACE1 Physiological Functions May Limit Its Use as

- Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Trends Neurosci.* **2016**, 39, 158–169.
58. Bursavich, M. G., Harrison, B. A. and Blain, J. F. Gamma secretase modulators: New Alzheimer's drugs on the horizon? *J. Med. Chem.* **2016**, 59, 7389–7409.
  59. Haaspasalo, A. and Kovacs, D. M. The many substrates of Presenilin/ $\gamma$ -Secretase. *J. Alzheimer's Dis.* **2012**, 25, 3–28.
  60. Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J. and Wheeler, D. L. GenBank. *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 34–38.
  61. Li, X. et al. Structure of a presenilin family intramembrane aspartate protease. *Nature* **2013**, 493, 56–61.
  62. Wolfe, M. S. et al. Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* **1999**, 398, 513–517.
  63. Dang, S. et al. Cleavage of amyloid precursor protein by an archaeal presenilin homologue PSH. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, 112, 201502150.
  64. Takasugi, N. et al. The role of presenilin cofactors in the  $\gamma$ -secretase complex. *Nature* **2003**, 422, 438–441.
  65. Francis, R. et al. aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling,  $\gamma$ -secretase cleavage of  $\beta$ AAPP, and presenilin protein accumulation. *Dev. Cell* **2002**, 3, 85–97.
  66. Bolduc, D. M., Montagna, D. R., Gu, Y., Selkoe, D. J. and Wolfe, M. S. Nicastrin functions to sterically hinder  $\gamma$ -secretase–substrate interactions driven by substrate transmembrane domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, 113, E509–E518.
  67. Sun, L. et al. Structural basis of human  $\gamma$ -secretase assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, 112, 6003–6008.
  68. Xie, T. et al. Crystal structure of the  $\gamma$ -secretase component nicastrin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, 111, 13349–13354.
  69. Bai, X. et al. An atomic structure of human  $\gamma$ -secretase. *Nature* **2015**, 525, 212–7.
  70. Bai, X.-C., Rajendra, E., Yang, G., Shi, Y. and Scheres, S. H. Sampling the conformational space of the catalytic subunit of human  $\gamma$ -secretase. *Elife* **2015**, 4, e11182.
  71. Garrett, R. H. and Grisham, C. M. in *Biochemistry* (eds. Garret, R. H. & Grisham, C. M.) **University of Virginia**, **2013**, 470. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
  72. Aguayo-Ortiz, R. and Dominguez, L. Simulating the  $\gamma$ -secretase enzyme: Recent advances and future directions. *Biochimie* **2018**, 147, 130–135.
  73. Watanabe, N., Takagi, S., Tominaga, A., Tomita, T. and Iwatsubo, T. Functional analysis of the transmembrane domains of presenilin 1: Participation of transmembrane domains 2 and 6 in the formation of initial substrate-binding site of  $\gamma$ -secretase. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 19738–19746.
  74. Fukumori, A. and Steiner, H. Substrate recruitment of  $\gamma$ -secretase and mechanism of clinical presenilin mutations revealed by photoaffinity mapping. *EMBO J.* **2016**, 35, 1628–43.
  75. Sato, C., Takagi, S., Tomita, T. and Iwatsubo, T. The C-Terminal PAL Motif and Transmembrane Domain 9 of Presenilin 1 Are Involved in the Formation of the Catalytic Pore of the  $\gamma$ -Secretase. *J. Neurosci.* **2008**, 28, 6264–6271.
  76. Takagi-Niidome, S. et al. Cooperative Roles of Hydrophilic Loop 1 and the C-Terminus of Presenilin 1 in the Substrate-Gating Mechanism of  $\gamma$ -Secretase. *J. Neurosci.* **2015**, 35, 2646–56.
  77. Steiner, H. et al. Glycine 384 is required for presenilin-1 function and is conserved in bacterial polytopic aspartyl proteases. *Nat. Cell Biol.* **2000**, 2, 848–851.
  78. Northrop, D. B. Follow the Protons: A Low-Barrier Hydrogen Bond Unifies the Mechanisms of the Aspartic Proteases. **2001**, 34, 790–797.
  79. Erez, E., Fass, D. and Bibi, E. How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. *Nature* **2009**, 459, 371–8.
  80. Hur, J. Y. et al. Active  $\gamma$ -secretase is localized to detergent-resistant membranes in human brain. *FEBS J.* **2008**, 275, 1174–1187.
  81. Eckert, G. P. and Müller, W. E. Presenilin 1 modifies lipid raft composition of neuronal membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, 382, 673–677.
  82. Ayciriex, S. et al. The lipidome associated with the  $\gamma$ -secretase complex is required for its integrity and activity. *Biochem. J.* **2016**, 473, 321–334.
  83. Chan, R. B. et al. Comparative lipidomic analysis of mouse and human brain with Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 2678–2688.
  84. Eehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C. and Simons, K. Amyloidogenic processing of the Alzheimer  $\beta$ -amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J. Cell Biol.* **2003**, 160, 113–123.
  85. Hicks, D. A., Nalivaeva, N. N. and Turner, A. J. Lipid rafts and Alzheimer's disease: Protein-lipid interactions and perturbation of signaling. *Front. Physiol.* **2012**, 3 JUN, 1–18.
  86. Osenkowski, P., Ye, W., Wang, R., Wolfe, M. S. and Selkoe, D. J. Direct and potent regulation of  $\gamma$ -secretase by its lipid microenvironment. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 22529–22540.

87. Golde, T. E., Koo, E. H., Felsenstein, K. M., Osborne, B. A. and Miele, L.  $\gamma$ -Secretase inhibitors and modulators. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2013**, 1828, 2898–2907.
88. Higaki, J., Quon, D., Zhong, Z. Y. and Cordell, B. Inhibition Of  $\beta$ -Amyloid Formation Identifies Proteolytic Precursors and Subcellular Site Of Catabolism. *Neuron* **1995**, 14, 651–659.
89. Wolfe, M. S. et al. A substrate-based difluoro ketone selectively inhibits Alzheimer's  $\gamma$ -secretase activity. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 6–9.
90. Esler, W. P. et al. Transition-state analogue inhibitors of gamma-secretase bind directly to presenilin-1. *Nat. Cell Biol.* **2000**, 2, 428–434.
91. Dovey, H. F. et al. Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. *J. Neurochem.* **2001**, 76, 173–181.
92. Seiffert, D. et al. Presenilin-1 and -2 are molecular targets for  $\gamma$ -secretase inhibitors. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 34086–34091.
93. Fuwa, H. et al. Divergent Synthesis of Multifunctional Molecular. *ACS Chem. Biol.* **2007**, 2, 408–418.
94. Flajole, M. et al. Regulation of Alzheimer's disease amyloid-beta formation by casein kinase I. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, 104, 4159–4164.
95. Zettl, H., Weggen, S., Schneider, P. and Schneider, G. Exploring the chemical space of  $\gamma$ -secretase modulators. *Trends Pharmacol. Sci.* **2010**, 31, 402–410.
96. Ohki, Y. et al. Phenylpiperidine-type  $\gamma$ -secretase modulators target the transmembrane domain 1 of presenilin 1. *EMBO J.* **2011**, 30, 4815–4824.
97. Weggen, S. et al. A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature* **2001**, 414, 212–216.
98. Takeo, K. et al. Allosteric regulation of  $\gamma$ -secretase activity by a phenylimidazole-type  $\gamma$ -secretase modulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, 111, 10544–9.
99. Cole, D. C. et al. (S)-N-(5-Chlorothiophene-2-sulfonyl)- $\beta$ , $\beta$ -diethylalaninol a Notch-1-sparing  $\gamma$ -secretase inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 926–929.
100. Mayer, S. C. et al. Discovery of begacestat, a Notch-1-sparing gamma-secretase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 7348–7351.
101. Zhao, B. et al. Identification of  $\gamma$ -secretase inhibitor potency determinants on presenilin. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 2927–2938.
102. Gillman, K. W. et al. Discovery and evaluation of BMS-708163, a potent, selective and orally bioavailable  $\gamma$ -secretase inhibitor. *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, 1, 120–124.
103. Best, J. D. et al. The Novel  $\gamma$ -Secretase Inhibitor. *Pharmacology* **2007**, 320, 552–558.
104. Goate, A. and Hardy, J. Twenty years of Alzheimer's disease-causing mutations. *J. Neurochem.* **2012**, 120, 3–8.
105. Mendez, M. F. Early-Onset Alzheimer Disease. *Neurol. Clin.* **2017**, 35, 263–281.
106. Alzforum. Repository of variants in genes linked to Alzheimer's disease. *Biomedical Research Forum* Available at: <https://www.alzforum.org/mutations>.
107. Goate, A. et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* **1991**, 349, 704–706.
108. Goate, A. M. Monogenetic determinants of Alzheimer's disease: APP mutations. *Cell. Mol. Life Sci.* **1998**, 54, 897–901.
109. Park, H. K., Duk, L. N., Lee, J. H., Kim, J. W. and Ki, C. S. Identification of PSEN1 and APP gene mutations in Korean patients with early-onset Alzheimer's disease. *J. Korean Med. Sci.* **2008**, 23, 213–217.
110. Guardia-Laguarta, C. et al. Clinical, neuropathologic, and biochemical profile of the amyloid precursor protein I716F mutation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2010**, 69, 53–59.
111. Ghidoni, R. et al. Novel T719P A $\beta$ PP Mutation Unbalances the Relative Proportion of Amyloid- $\beta$  Peptides. *J. Alzheimer's Dis.* **2009**, 18, 295–303.
112. De Jonghe, C. et al. Flemish and Dutch mutations in amyloid beta precursor protein have different effects on amyloid beta secretion. *Neurobiol. Dis.* **1998**, 5, 281–6.
113. Levy, E., Prelli, F. and Frangione, B. Studies on the first described Alzheimer's disease amyloid beta mutant, the Dutch variant. *J. Alzheimer's Dis.* **2006**, 9, 329–39.
114. Basun, H. et al. Clinical and Neuropathological Features of the Arctic APP Gene Mutation Causing Early-Onset Alzheimer Disease. *Arch Neurol* **2008**, 65, 499–505.
115. Nilsberth, C. et al. The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation. *Nat. Neurosci.* **2001**, 4, 887–893.
116. Berezovska, O. et al. Familial Alzheimer's Disease Presenilin 1 Mutations Cause Alterations in the Conformation of



- Presenilin and Interactions with Amyloid Precursor Protein. *J. Neurosci.* **2005**, 25, 3009–3017.
117. Kwok, J. B. J. et al. Presenilin-1 mutation L271V results in altered exon 8 splicing and Alzheimer's disease with non-cored plaques and no neuritic dystrophy. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 6748–6754.
118. Thinakaran, G. et al. Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron* **1996**, 17, 181–190.
119. Murayama, O. et al. Enhancement of amyloid  $\beta$ 42 secretion by 28 different presenilin 1 mutations of familial Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* **1999**, 265, 61–63.
120. Kauwe, J. S. K., Wang, J., Chakraverty, S., Goate, A. M. and Henao-Martinez, A. F. Novel presenilin 1 variant (P117A) causing Alzheimer's disease in the fourth decade of life. *Neurosci. Lett.* **2008**, 438, 257–259.
121. Shioi, J. et al. FAD mutants unable to increase neurotoxic A $\beta$ 42 suggest that mutation effects on neurodegeneration may be independent of effects on A $\beta$ . *J. Neurochem.* **2007**, 101, 674–681.
122. Steiner, H. et al. A Pathogenic Presenilin-1 Deletion Causes Aberrant A $\beta$ 42 Production in the Absence of Congophilic Amyloid Plaques. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 7233–7239.
123. Chen, W. T. et al. G206D Mutation of Presenilin-1 Reduces Pen2 Interaction, Increases A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 Ratio and Elevates ER Ca<sup>2+</sup> Accumulation. *Mol. Neurobiol.* **2014**, 52, 1835–1849.
124. Andreoli, V. et al. Presenilin enhancer-2 gene: Identification of a novel promoter mutation in a patient with early-onset familial Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* **2011**, 7, 574–578.
125. Shirotani, K., Edbauer, D., Prokop, S., Haass, C. and Steiner, H. Identification of distinct  $\gamma$ -secretase complexes with different APH-1 variants. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 41340–41345.
126. Poli, M. et al. Association analysis between anterior-pharynx defective-1 genes polymorphisms and Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* **2003**, 350, 77–80.
127. Yu, G. et al. Nicastrin modulates presenilin-mediated notch / glp-1 signal transduction and  $\beta$ APP processing. *Nature* **2000**, 407, 48–54.
128. Hospital, A., Goñi, J. R., Orozco, M. and Gelpi, J. Molecular dynamics simulations: Advances and applications. *Adv. Appl. Bioinforma. Chem.* **2015**, 8, 37–47.
129. Dror, R. O., Dirks, R. M., Grossman, J. P., Xu, H. and Shaw, D. E. Biomolecular Simulation: A Computational Microscope for Molecular Biology. *Annu. Rev. Biophys.* **2012**, 41, 429–452.
130. Marrink, S. J., Risselada, H. J., Yefimov, S., Tieleman, D. P. and Vries, A. H. De. The MARTINI Force Field : Coarse Grained Model for Biomolecular Simulations The MARTINI Force Field : Coarse Grained Model for Biomolecular Simulations. *J. Phys. Chem. B.* **2007**, 111, 7812–7824.
131. Kong, R., Chang, S., Xia, W. and Wong, S. T. C. Molecular dynamics simulation study reveals potential substrate entry path into  $\gamma$ -secretase/presenilin-1. *J. Struct. Biol.* **2015**, 191, 120–129.
132. Somavarapu, A. K. and Kepp, K. P. The dynamic mechanism of presenilin-function: Sensitive gate dynamics and loop unplugging control protein access. *Neurobiol. Dis.* **2016**, 89, 147–156.
133. Li, S., Zhang, W. and Han, W. *Initial Substrate Binding of  $\gamma$ -Secretase: The Role of Substrate Flexibility.* *ACS Chemical Neuroscience* **2017**, doi:10.1021/acscemneuro.6b00425
134. Somavarapu, A. K. and Kepp, K. P. Membrane dynamics of  $\gamma$ -secretase provides a molecular basis for A $\beta$  binding and processing. *ACS Chem. Neurosci.* **2017**, 1, acscemneuro.7b00208.
135. Audagnotto, M., Kengo Lorkowski, A. and Dal Peraro, M. Recruitment of the amyloid precursor protein by  $\gamma$ -secretase at the synaptic plasma membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, 498, 334–341.
136. Kyte, J. and Doolittle, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **1982**, 157, 105–132.
137. Schmidt, T. H. and Kandt, C. LAMBADA and InflateGRO2: Efficient membrane alignment and insertion of membrane proteins for molecular dynamics simulations. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, 52, 2657–2669.
138. Ulmschneider, M. B. and Sansom, M. S. P. Amino acid distributions in integral membrane protein structures. *Biochim Biophys Acta* **2001**, 1512, 1–14.
139. DeLano, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System, DeLano Scientific LLC, Palo Alto, CA. **2007**, <http://www.pymol.org>.
140. Evgeny, K. Crystal contacts as nature's docking solutions. *J. Comput. Chem.* **2010**, 31, 133–143.
141. Lomize, A. L., Pogozheva, I. D., Lomize, M. A. and Mosberg, H. I. Positioning of proteins in membranes: A computational approach. *Protein Sci.* **2006**, 15, 1318–1333.
142. Deol, S. S., Bond, P. J., Domene, C. and Sansom, M. S. P. Lipid-protein interactions of integral membrane proteins: A comparative simulation study. *Biophys. J.* **2004**, 87, 3737–3749.
143. van Heijne, G. and Gavel, Y. Topogenic signals in integral membrane proteins. *Eur. J. Biochem.* **1988**, 174, 671–678.

144. Kim, S. et al. Transmembrane glycine zippers: physiological and pathological roles in membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, 102, 14278–83.
145. Kienlen-Campard, P. et al. Amyloidogenic processing but not Amyloid Precursor Protein (APP) intracellular C-terminal domain production requires a precisely oriented APP dimer assembled by transmembrane GXXXG motifs. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 7733–7744.
146. Williams, K. A. and Deber, C. M. Proline Residues in Transmembrane Helices: Structural or Dynamic Role? *Biochemistry* **1991**, 30, 8919–8923.
147. Shah, S. et al. Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell* **2005**, 122, 435–447.
148. Chávez-Gutiérrez, L. et al. Glu332 in the nicastrin ectodomain is essential for  $\gamma$ -secretase complex maturation but not for its activity. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 20096–20105.
149. Steentoft, C. et al. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO J.* **2013**, 32, 1478–1488.
150. Venkatakrisnan, A. J. et al. Structured and disordered facets of the GPCR fold. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2014**, 27, 129–137.
151. Bleasby, A. hmoment. **2001**,
152. Eisenberg, D., Weiss, R. M. and Terwilliger, T. C. The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1984**, 81, 140–144.
153. Crystal, A. S. et al. Membrane topology of  $\gamma$ -secretase component PEN-2. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 20117–20123.
154. Viklund, H. and Elofsson, A. OCTOPUS: Improving topology prediction by two-track ANN-based preference scores and an extended topological grammar. *Bioinformatics* **2008**, 24, 1662–1668.
155. Jones, D. T. Improving the accuracy of transmembrane protein topology prediction using evolutionary information. *Bioinformatics* **2007**, 23, 538–544.
156. Aguayo-Ortiz, R., Chávez-García, C., Straub, J. E. and Dominguez, L. Characterizing the structural ensemble of  $\gamma$ -secretase using a multiscale molecular dynamics approach. *Chem. Sci.* **2017**, 8, 5576–5584.
157. Hekkelman, M. L. et al. WIWS: A protein structure bioinformatics web service collection. *Nucleic Acids Res.* **2010**, 38, 719–723.
158. Lomize, M. A., Pogozheva, I. D., Joo, H., Mosberg, H. I. and Lomize, A. L. OPM database and PPM web server: Resources for positioning of proteins in membranes. *Nucleic Acids Res.* **2012**, 40, 370–376.
159. Jo, S., Lim, J. B., Klauda, J. B. and Im, W. CHARMM-GUI membrane builder for mixed bilayers and its application to yeast membranes. *Biophys. J.* **2009**, 97, 50–58.
160. Jo, S., Kim, T., Iyer, V. G. and Im, W. CHARMM-GUI: A Web-Based Graphical User Interface for CHARMM. *J. Comput. Chem.* **2008**, 29, 1859–1865.
161. Braga, C. and Travis, K. P. A configurational temperature Nosé-Hoover thermostat. *J. Chem. Phys.* **2005**, 123, 0–15.
162. Parrinello, M. and Rahman, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J. Appl. Phys.* **1981**, 52, 7182–7190.
163. Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C. and Fraaije, J. G. E. M. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.* **1997**, 18, 1463–1472.
164. Huang, J. and Mackerell, A. D. CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *J. Comput. Chem.* **2013**, 34, 2135–2145.
165. Abraham, M. J. et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* **2015**, 1–2, 19–25.
166. Kumari, R., Kumar, R., Source, O., Discovery, D. and Lynn, A. g\_mmpbsa - A GROMACS Tool for High-Throughput MM-PBSA Calculations. *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, 54, 1951–1962.
167. Gowers, R. J. et al. MDAnalysis: A Python Package for the Rapid Analysis of Molecular Dynamics Simulations. **2016**, 98–105.
168. Olsson, M. H. M., Chresten, R. S., Rostkowski, M. and Jensen, J. H. PROPKA3: consistent treatment of internal and surface residues in empirical pKa predictions. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, 2, 525–537.
169. Dolinsky, T. J., Nielsen, J. E., McCammon, J. A. and Baker, N. A. PDB2PQR: An automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, 665–667.
170. Masood, T. Bin, Sandhya, S., Chandra, N. and Natarajan, V. CHEXVIS: A tool for molecular channel extraction and visualization. *BMC Bioinformatics* **2015**, 16, 1–19.
171. Chovancova, E. et al. CAVER 3.0: A Tool for the Analysis of Transport Pathways in Dynamic Protein Structures. *PLoS Comput. Biol.* **2012**, 8, 23–30.
172. Williams, T. and Kelley, C. Gnuplot: an interactive plotting program. **2016**,

173. Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **1996**, 14, 33–8, plates, 27–28.
174. Dahl, A. C. E., Chavent, M. and Sansom, M. S. P. Bendix: Intuitive helix geometry analysis and abstraction. *Bioinformatics* **2012**, 28, 2193–2194.
175. Qi, Y. et al. CHARMM-GUI Martini Maker for Coarse-Grained Simulations with the Martini Force Field. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, 11, 4486–4494.
176. Yesylevskyy, S. O., Schäfer, L. V., Sengupta, D. and Marrink, S. J. Polarizable water model for the coarse-grained MARTINI force field. *PLoS Comput. Biol.* **2010**, 6, 1–17.
177. Bussi, G., Donadio, D. and Parrinello, M. Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* **2007**, 126, 1–7.
178. Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., Van Gunsteren, W. F., Dinola, A. and Haak, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* **1984**, 81, 3684–3690.
179. Periole, X., Cavalli, M., Marrink, S. J. and Ceruso, M. A. Combining an elastic network with a coarse-grained molecular force field: Structure, dynamics, and intermolecular recognition. *J. Chem. Theory Comput.* **2009**, 5, 2531–2543.
180. Wassenaar, T. A., Pluhackova, K., Böckmann, R. A., Marrink, S. J. and Tieleman, D. P. Going backward: A flexible geometric approach to reverse transformation from coarse grained to atomistic models. *J. Chem. Theory Comput.* **2014**, 10, 676–690.
181. Kornilova, A. Y., Bihel, F., Das, C. and Wolfe, M. S. The initial substrate-binding site of  $\gamma$ -secretase is located on presenilin near the active site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, 102, 3230–5.
182. Sussman, Fredy; Villaverde, M. Carmen; L. Dominguez, Jose; Danielson, U. H. On the Active Site Protonation State in Aspartic Proteases: Implications for Drug Design. *Curr. Pharm. Des. Vol. 19, Number 23* **2013**, 19, 4257–4275.
183. De Jong, D. H. et al. Improved parameters for the martini coarse-grained protein force field. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, 9, 687–697.
184. Elad, N. et al. The dynamic conformational landscape of  $\gamma$ -secretase. *J. Cell Sci.* **2015**, 128, 589–98.
185. Li, Y. et al. Structural interactions between inhibitor and substrate docking sites give insight into mechanisms of human PS1 complexes. *Structure* **2014**, 22, 125–135.
186. Angel, T. E., Chance, M. R. and Palczewski, K. Conserved waters mediate structural and functional activation of family A (rhodopsin-like) G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, 106, 8555–8560.
187. Tolia, A. Contribution of Presenilin Transmembrane Domains 6 and 7 to a Water-containing Cavity in the  $\gamma$ -Secretase Complex \* □. **2006**, 281, 27633–27642.
188. Tomobe, K., Yamamoto, E., Kholmurodov, K. and Yasuoka, K. Water permeation through the internal water pathway in activated GPCR rhodopsin. *PLoS One.* **2017**, 12, 3–14.
189. Yuan, S., Filipek, S., Palczewski, K. and Vogel, H. Activation of G-protein-coupled receptors correlates with the formation of a continuous internal water pathway. *Nat. Commun.* **2014**, 5, 4733.
190. Lazarov, V. K. et al. Electron microscopic structure of purified, active  $\gamma$ -secretase reveals an aqueous intramembrane chamber and two pores. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, 103, 6889–6894.
191. Atkovska, K. and Hub, J. S. Energetics and mechanism of anion permeation across formate-nitrite transporters. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 1–14.
192. Armstrong, C. T., Mason, P. E., Anderson, J. L. R. and Dempsey, C. E. Arginine side chain interactions and the role of arginine as a gating charge carrier in voltage sensitive ion channels. *Sci. Rep.* **2016**, 6, 1–10.
193. Tu, H. et al. Presenilins Form ER Ca<sup>2+</sup> Leak Channels, a Function Disrupted by Familial Alzheimer’s Disease-Linked Mutations. *Cell* **2006**, 126, 981–993.
194. Nelson, O. et al. Familial Alzheimer disease-linked mutations specifically disrupt Ca<sup>2+</sup> leak function of presenilin 1. *J. Clin. Invest.* **2007**, 117, 1230–1239.
195. Nelson, O. et al. Mutagenesis mapping of the presenilin 1 calcium leak conductance pore. *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 22339–22347.
196. Supnet, C. and Bezprozvanny, I. Presenilins function in ER calcium leak and Alzheimer’s disease pathogenesis. *Cell Calcium* **2011**, 50, 303–309.
197. Zhang, S., Zhang, M., Cai, F. and Song, W. Biological function of Presenilin and its role in AD pathogenesis. *Transl. Neurodegener.* **2013**, 2, 1–13.
198. Bezprozvanny, I. Presenilins and Calcium Signaling--Systems Biology to the Rescue. *Sci. Signal.* **2013**, 6, pe24-pe24.
199. Kuo, I. Y., Hu, J., Ha, Y. and Ehrlich, B. E. Presenilin-like GxGD membrane proteases have dual roles as proteolytic enzymes and ion channels. *J. Biol. Chem.* **2015**, 290, 6419–6427.
200. Shilling, D., Mak, D. O. D., Kang, D. E. and Foskett, J. K. Lack of evidence for presenilins as endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak channels. *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 10933–10944.

201. Ullmann, R. T., Andrade, S. L. A. and Ullmann, G. M. Thermodynamics of transport through the ammonium transporter amt-1 investigated with free energy calculations. *J. Phys. Chem. B.* **2012**, 116, 9690–9703.
202. Serneels, L. et al.  $\gamma$ -Secretase Heterogeneity in the Aph1 Subunit: Relevance for Alzheimer's Disease. *Science.* **2009**, 324, 639–643.
203. Nadezhdin, K. D., Bocharova, O. V., Bocharov, E. V. and Arseniev, A. S. Structural and dynamic study of the transmembrane domain of the amyloid precursor protein. *Acta Naturae* **2011**, 3, 69–76.
204. Deatherage, C. L. et al. Structural and biochemical differences between the Notch and the amyloid precursor protein transmembrane domains. *Sci. Adv.* **2017**, 3, e1602794.
205. Webb, B. and Sali, A. Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr. Protoc. Bioinforma.* **2016**, 2016, 5.6.1-5.6.37.
206. Pantelopulos, G. A., Straub, J. E., Thirumalai, D. and Sugita, Y. Structure of APP-C991–99 and implications for role of extra-membrane domains in function and oligomerization. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2018**, in press. doi:10.1016/j.bbmem.2018.04.002
207. Porter, K. A. et al. ClusPro PeptiDock: Efficient global docking of peptide recognition motifs using FFT. *Bioinformatics* **2017**, 33, 3299–3301.
208. Kozakov, D. et al. The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nat. Protoc.* **2017**, 12, 255–278.
209. Wassenaar, T. A., Ingólfsson, H. I., Böckmann, R. A., Tieleman, D. P. and Marrink, S. J. Computational lipidomics with insane: A versatile tool for generating custom membranes for molecular simulations. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, 11, 2144–2155.
210. Xu, T. H. et al. Alzheimer's disease-associated mutations increase amyloid precursor protein resistance to  $\gamma$ -secretase cleavage and the A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ratio. *Cell Discov.* **2016**, 2, 16026.
211. Dominguez, L., Foster, L., Meredith, S. C., Straub, J. E. and Thirumalai, D. Structural heterogeneity in transmembrane amyloid precursor protein Homodimer is a consequence of environmental selection. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 9619–9626.
212. Kounnas, M. Z., Lane-Donovan, C., Nowakowski, D. W., Herz, J. and Comer, W. T. NGP 555, a  $\gamma$ -secretase modulator, lowers the amyloid biomarker, A $\beta$ 42 in cerebrospinal fluid while preventing Alzheimer's disease cognitive decline in rodents. *Alzheimer's Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* **2017**, 3, 65–73.
213. Palsdottir, H. and Hunte, C. Lipids in membrane protein structures. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2004**, 1666, 2–18.
214. Dickey, A. and Faller, R. Examining the Contributions of Lipid Shape and Headgroup Charge on Bilayer Behavior. *Biophys. J.* **2008**, 95, 2636–2646.
215. Xiong, H. et al. Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase activities and A $\beta$  production. *Neurobiol. Dis.* **2008**, 29, 422–437.
216. Vanegas, J. M., Torres-Sánchez, A. and Arroyo, M. Importance of Force Decomposition for Local Stress Calculations in Biomembrane Molecular Simulations. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, 10, 691–702.
217. Aguayo-Ortiz, R., Straub, J. and Dominguez, L. Influence of membrane lipid composition on the structure and activity of  $\gamma$ -secretase. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, doi:10.1039/C8CP04138E
218. Gapsys, V., De Groot, B. L. and Briones, R. Computational analysis of local membrane properties. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2013**, 27, 845–858.
219. Buchoux, S. FATSlim: A fast and robust software to analyze MD simulations of membranes. *Bioinformatics* **2017**, 33, 133–134.
220. Allen, W. J., Lemkul, J. A. and Bevan, D. R. GridMAT-MD: A Grid-Based Membrane Analysis Tool for Use With Molecular Dynamics. *J. Comput. Chem.* **2009**, 30, 1952–1958.
221. Ollila, O. H. S. et al. 3D Pressure field in lipid membranes and membrane-protein complexes. *Phys. Rev. Lett.* **2009**, 102, 078101.
222. Kasson, P. M., Hess, B. and Lindahl, E. Probing microscopic material properties inside simulated membranes through spatially resolved three-dimensional local pressure fields and surface tensions. *Chem. Phys. Lipids* **2013**, 169, 106–112.
223. Hunter, J. D. Matplotlib: A 2D graphics environment. *Comput. Sci. Eng.* **2007**, 9, 99–104.
224. Qi, Y. et al. CHARMM-GUI HMMM Builder for Membrane Simulations with the Highly Mobile Membrane-Mimetic Model. *Biophys. J.* **2015**, 109, 2012–2022.
225. Lee, J. Y., Feng, Z., Xie, X.-Q. and Bahar, I. Allosteric Modulation of Intact  $\gamma$ -Secretase Structural Dynamics. *Biophys. J.* **2017**, 113, 2634–2649.
226. Holmes, O., Paturi, S., Ye, W., Wolfe, M. S. and Selkoe, D. J. Effects of membrane lipids on the activity and processivity of purified  $\gamma$ -secretase. *Biochemistry* **2012**, 51, 3565–3575.

227. Tominaga, A., Cai, T., Takagi-Niidome, S., Iwatsubo, T. and Tomita, T. Conformational Changes in Transmembrane Domain 4 of Presenilin 1 Are Associated with Altered Amyloid-42 Production. *J. Neurosci.* **2016**, 36, 1362–1372.
228. Lee, A. G. Lipid-protein interactions in biological membranes: A structural perspective. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2003**, 1612, 1–40.
229. Sun, J.-H., Yu, J.-T. and Tan, L. The Role of Cholesterol Metabolism in Alzheimer's Disease. *Mol. Neurobiol.* **2015**, 51, 947–965.
230. Cantor, R. S. Lipid composition and the lateral pressure profile in bilayers. *Biophys J* **1999**, 76, 2625–2639.
231. Patra, M. Lateral pressure profiles in cholesterol-DPPC bilayers. *Eur. Biophys. J.* **2005**, 35, 79–88.
232. Samuli Ollila, O. H., Róg, T., Karttunen, M. and Vattulainen, I. Role of sterol type on lateral pressure profiles of lipid membranes affecting membrane protein functionality: Comparison between cholesterol, desmosterol, 7-dehydrocholesterol and ketosterol. *J. Struct. Biol.* **2007**, 159, 311–323.
233. Beel, A. J. and Sanders, C. R. Substrate specificity of  $\gamma$ -secretase and other intramembrane proteases. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, 65, 1311–1334.
234. Panahi, A., Bandara, A., Pantelopulos, G. A., Dominguez, L. and Straub, J. E. Specific Binding of Cholesterol to C99 Domain of Amyloid Precursor Protein Depends Critically on Charge State of Protein. *J. Phys. Chem. Lett.* **2016**, 7, 3535–3541.
235. Risselada, H. J. and Marrink, S. J. The molecular face of lipid rafts in model membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, 105, 17367–17372.
236. Lindorff-Larsen, K. et al. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2010**, 78, 1950–1958.
237. Aldeghi, M., Heifetz, A., Bodkin, M. J., Knapp, S. and Biggin, P. C. Predictions of ligand selectivity from absolute binding free energy calculations. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 946–957.
238. Sousa, A. W. and Vranken, W. F. ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interfacE. *BMC Res. Notes* **2012**, 5, 367.
239. Jämbeck, J. P. M. and Lyubartsev, A. P. An extension and further validation of an all-atomistic force field for biological membranes. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, 8, 2938–2948.
240. Aldeghi, M., Heifetz, A., Bodkin, M. J., Knapp, S. and Biggin, P. C. Accurate calculation of the absolute free energy of binding for drug molecules. *Chem. Sci.* **2016**, 7, 207–218.
241. Kim, S. et al. PubChem substance and compound databases. *Nucleic Acids Res.* **2016**, 44, D1202–D1213.
242. O'Boyle, N. M. et al. Open Babel: An Open chemical toolbox. *J. Cheminform.* **2011**, 3, 1–14.
243. Kumar, S., Rosenberg, J. M., Bouzida, D., Swendsen, R. H. and Kollman, P. A. The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method. *J. Comput. Chem.* **1992**, 13, 1011–1021.
244. Trott, O. and Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J. Comput. Chem.* **2009**, 31, 455–461.
245. Pettersen, E. F. et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, 25, 1605–1612.
246. Larsson, P. and Kasson, P. M. Lipid Converter, A Framework for Lipid Manipulations in Molecular Dynamics Simulations. *J. Membr. Biol.* **2014**, 247, 1137–1140.
247. Boresch, S., Tettinger, F., Leitgeb, M. and Karplus, M. Absolute binding free energies: A quantitative approach for their calculation. *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 9535–9551.
248. Chen, J. et al. Insights into the functional role of protonation states in the HIV-1 protease-BEA369 complex: Molecular dynamics simulations and free energy calculations. *J. Mol. Model.* **2009**, 15, 1245–1252.
249. Postila, P. A., Vattulainen, I. and Róg, T. Selective effect of cell membrane on synaptic neurotransmission. *Sci. Rep.* **2016**, 6, 1–10.
250. Guzmán-Ocampo, D. C., Aguayo-Ortiz, R. and Dominguez, L. Sampling the protonation states of  $\gamma$ -secretase catalytic aspartics using pH-REMD simulations. *Prog. Pend.*
251. Szaruga, M. et al. Alzheimer's-Causing Mutations Shift A $\beta$  Length by Destabilizing  $\gamma$ -Secretase-A $\beta$ n Interactions. *Cell* **2017**, 170, 443–456.e14.
252. Ramprakash, J. et al. Comparison of the chemical and thermal denaturation of proteins by a two-state transition model. *Anal. Biochem.* **2008**, 374, 221–230.
253. Pucci, F., Bernaerts, K. V., Kwasigroch, J. M. and Rooman, M. Quantification of biases in predictions of protein stability changes upon mutations. *Bioinformatics* **2018**, bty348–bty348. doi:10.1093/bioinformatics/bty348
254. Alford, R. F. et al. An Integrated Framework Advancing Membrane Protein Modeling and Design. *PLoS Comput. Biol.* **2015**, 11, 1–23.
255. Gapsys, V., Seeliger, D. and Groot, B. L. De. New Soft-Core Potential Function for Molecular Dynamics Based Alchemical

- Free Energy Calculations. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, 2373–2382.
256. Gapsys, V., Michielssens, S., Seeliger, D. and De Groot, B. L. pmx: Automated protein structure and topology generation for alchemical perturbations. *J. Comput. Chem.* **2015**, 36, 348–354.
257. Gapsys, V., Michielssens, S., Peters, J. H., de Groot, B. L. and Leonov, H. in *Molecular Modeling of Proteins: Second Edition* **2015**, 1215, 173–209.
258. Gapsys, V., Michielssens, S., Seeliger, D. and de Groot, B. L. Accurate and Rigorous Prediction of the Changes in Protein Free Energies in a Large-Scale Mutation Scan. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2016**, 55, 7364–7368.
259. Gapsys, V. and De Groot, B. L. pmx Webserver: A User Friendly Interface for Alchemistry. *J. Chem. Inf. Model.* **2017**, 57, 109–114.
260. Goette, M. and Grubmüller, H. Accuracy and convergence of free energy differences calculated from nonequilibrium switching processes. *J. Comput. Chem.* **2009**, 30, 447–456.
261. De Strooper, B. Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease. *EMBO Rep.* **2007**, 8, 141–146.
262. Somavarapu, A. K. and Kepp, K. P. Loss of stability and hydrophobicity of presenilin 1 mutations causing Alzheimer's Disease. *J. Neurochem.* **2016**, 137, 101–111.
263. Tang, N. and Kepp, K. P. A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ratios of presenilin 1 mutations correlate with clinical onset of Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* **2018**, accepted.
264. Imai, S., Cai, T., Yoshida, C., Tomita, T. and Futai, E. Specific mutations in presenilin 1 cause conformational changes in  $\gamma$ -secretase to modulate. *J. Biochem.* **2018**, Pend.
265. Sun, L., Zhou, R., Yang, G. and Shi, Y. Analysis of 138 pathogenic mutations in presenilin-1 on the in vitro production of A $\beta$ 42 and A $\beta$ 40 peptides by  $\gamma$ -secretase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2017**, 114, E476–E485.
266. Rees, D. C. and Robertson, A. D. Some thermodynamic implications for the thermostability of proteins. *Protein Sci.* **2001**, 10, 1187–1194.
267. Zhou, R. et al. Recognition of amyloid precursor protein by human  $\gamma$ -secretase. *Science.* **2019**, 0930, 690.
268. Yang, G. et al. Structural basis of Notch recognition by human  $\gamma$ -secretase. *Nature* **2019**, 565, 192–197.
269. Zwanzig, R. W. High-Temperature Equation of State by a Perturbation Method. I. Nonpolar Gases. *J. Chem. Phys.* **1954**, 22, 1420–1426.
270. Xiong, H., Crespo, A., Marti, M., Estrin, D. and Roitberg, A. E. Free energy calculations with non-equilibrium methods: Applications of the Jarzynski relationship. *Theor. Chem. Acc.* **2006**, 116, 338–346.
271. Wu, D. Understanding free-energy perturbation calculations through a model of harmonic oscillators: Theory and implications to improve the sampling efficiency by molecular simulation. *J. Chem. Phys.* **2010**, 133, 244116.
272. Shirts, M. R. and Mobley, D. L. in *Biomolecular Simulations: Methods and Protocols* **2013**, 924, 271–311.
273. Crooks, G. No equilibrium measurement of free energy. *J. Stat. Phys.* **1990**, 90, 1481–1487.
274. Massey, F. J. The Kolmogorov-Smirnov test for goodness of fit. *J. Am. Stat. Assoc.* **1951**, 46, 68–78.
275. Klimovich, P. V., Shirts, M. R. and Mobley, D. L. Guidelines for the analysis of free energy calculations. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2015**, 29, 397–411.
276. Beutler, T. C., Mark, A. E., van Schaik, R., Gerber, P. R. and Van Gunsteren, W. F. Avoiding singularities and numerical instabilities in free energy calculations based on molecular simulations. *Chem. Phys. Lett.* **1994**, 222, 529–539.
277. Cheng, B. et al. Protein denaturation at a single-molecule level: The effect of nonpolar environments and its implications on the unfolding mechanism by proteases. *Nanoscale* **2015**, 7, 2970–2977.
278. Tanford, C. Protein denaturation. *Adv. Protein Chem.* **1968**, 23, 121–282.
279. Pucci, F., Bourgeas, R. and Rooman, M. Predicting protein thermal stability changes upon point mutations using statistical potentials: Introducing HoTMuSiC. *Sci. Rep.* **2016**, 6, 1–9.
280. Chong, S. H. and Ham, S. Interaction with the surrounding water plays a key role in determining the aggregation propensity of proteins. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, 53, 3961–3964.
281. Hong, H. Toward understanding driving forces in membrane protein folding. *Arch. Biochem. Biophys.* **2014**, 564, 297–313.
282. Lampi, K. J. et al. Sequence analysis of betaA3, betaB3, and betaA4 crystallins completes the identification of the major proteins in young human lens. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 2268–2275.
283. Bloemendal, H. et al. Ageing and vision: Structure, stability and function of lens crystallins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2004**, 86, 407–485.
284. Mahendiran, K., Elie, C., Nebel, J. C., Ryan, A. and Pierscionek, B. K. Primary sequence contribution to the optical function of the eye lens. *Sci. Rep.* **2014**, 4, 20–23.
285. Vendra, V. P. R., Khan, I., Chandani, S., Muniyandi, A. and Balasubramanian, D. Gamma crystallins of the human eye

- lens. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2016**, 1860, 333–343.
286. Hejtmancik, J. F. Congenital Cataracts and their Molecular Genetics. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2008**, 19, 134–149.
287. Kosinski-Collins, M. S. and King, J. In vitro unfolding, refolding, and polymerization of human  $\gamma$ D crystallin, a protein involved in cataract formation. *Protein Sci.* **2003**, 12, 480–490.
288. Hains, P. G. and Truscott, R. J. W. Age-dependent deamidation of lifelong proteins in the human lens. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2010**, 51, 3107–3114.
289. Sharma, K. K. and Santhoshkumar, P. Lens aging: Effects of crystallins. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2009**, 1790, 1095–1108.
290. Moreau, K. L. and King, J. A. Protein misfolding and aggregation in cataract disease and prospects for prevention. *Trends Mol. Med.* **2012**, 18, 273–282.
291. Yang, G., Chen, Z., Zhang, W., Liu, Z. and Zhao, J. Novel mutations in CRYGD are associated with congenital cataracts in Chinese families. *Sci. Rep.* **2016**, 6, 1–5.
292. Wilmarth, P. A. et al. Age-Related Changes in Human Crystallins Determined from Comparative Analysis of Post-translational Modifications in Young and Aged Lens : Does Deamidation Contribute to Crystallin Insolubility ? research articles. *J. Proteome Res.* **2006**, 5, 2554–2566.
293. Basak, A. et al. High-resolution X-ray crystal structures of human  $\gamma$ D crystallin (1.25 Å) and the R58H mutant (1.15 Å) associated with aculeiform cataract. *J. Mol. Biol.* **2003**, 328, 1137–1147.
294. Flaugh, S. L., Kosinski-Collins, M. S. and King, J. Interdomain side-chain interactions in human  $\gamma$ D crystallin influencing folding and stability. *Protein Sci.* **2005**, 14, 2030–2043.
295. Kong, F. and King, J. Contributions of aromatic pairs to the folding and stability of long-lived human  $\gamma$ D-crystallin. *Protein Sci.* **2011**, 20, 513–518.
296. Serebryany, E. and King, J. A. Wild-type human  $\gamma$ D-crystallin promotes aggregation of its oxidation-mimicking misfolding-prone W42Q mutant. *J. Biol. Chem.* **2015**, 290, 11491–11503.
297. Serebryany, E. et al. An internal disulfide locks a misfolded aggregation-prone intermediate in cataract-linked mutants of human  $\gamma$ D-crystallin. *J. Biol. Chem.* **2016**, 291, 19172–19183.
298. Witvliet, D. K. et al. ELASPIC web-server: Proteome-wide structure-based prediction of mutation effects on protein stability and binding affinity. *Bioinformatics* **2016**, 32, 1589–1591.
299. Pires, D. E. V., Ascher, D. B. and Blundell, T. L. DUET: a server for predicting effects of mutations on protein stability using an integrated computational approach. *Nucleic Acids Res.* **2014**, 42, W314–W319.
300. Pires, D. E. V., Ascher, D. B. and Blundell, T. L. mCSM: Predicting the effects of mutations in proteins using graph-based signatures. *Bioinformatics* **2014**, 30, 335–342.
301. Dehouck, Y., Kwasigroch, J. M., Gilis, D. and Rooman, M. PoPMuSiC 2.1: A web server for the estimation of protein stability changes upon mutation and sequence optimality. *BMC Bioinformatics* **2011**, 12, 1–12.
302. Savojardo, C., Fariselli, P., Martelli, P. L. and Casadio, R. INPS-MD: a web server to predict stability of protein variants from sequence and structure. *Bioinformatics* **2016**, 32, 2542–2544.
303. Yin, S., Ding, F. and Dokholyan, N. V. Eris: An automated estimator of protein stability. *Nat. Methods* **2007**, 4, 466–467.
304. Giollo, M., Martin, A. J. M., Walsh, I., Ferrari, C. and Tosatto, S. C. E. NeEMO: A method using residue interaction networks to improve prediction of protein stability upon mutation. *BMC Genomics* **2014**, 15, 1–11.
305. Laimer, J., Hofer, H., Fritz, M., Wegenkittl, S. and Lackner, P. MAESTRO--multi agent stability prediction upon point mutations. *BMC Bioinformatics* **2015**, 16, 116.
306. Capriotti, E., Fariselli, P. and Casadio, R. I-Mutant2.0: Predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure. *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 306–310.
307. Fariselli, P., Martelli, P. L., Savojardo, C. and Casadio, R. INPS: Predicting the impact of non-synonymous variations on protein stability from sequence. *Bioinformatics* **2015**, 31, 2816–2821.
308. Capriotti, E., Fariselli, P., Rossi, I. and Casadio, R. A three-state prediction of single point mutations on protein stability changes. *BMC Bioinformatics* **2008**, 9, 1–9.
309. Cang, Z. and Wei, G. W. Analysis and prediction of protein folding energy changes upon mutation by element specific persistent homology. *Bioinformatics* **2017**, 33, 3549–3557.
310. Pandurangan, A. P., Ochoa-Montaño, B., Ascher, D. B. and Blundell, T. L. SDM: A server for predicting effects of mutations on protein stability. *Nucleic Acids Res.* **2017**, 45, W229–W235.
311. Parthiban, V., Gromiha, M. M. and Schomburg, D. CUPSAT: Prediction of protein stability upon point mutations. *Nucleic Acids Res.* **2006**, 34, 239–242.
312. Cheng, J., Randall, A. and Baldi, P. Prediction of protein stability changes for single-site mutations using support vector machines. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2005**, 62, 1125–1132.

313. Cang, Z. and Wei, G. TopologyNet: Topology based deep convolutional and multi-task neural networks for biomolecular property predictions. *PLoS Comput. Biol.* **2017**, 13, 1–27.
314. Quan, L., Lv, Q. and Zhang, Y. STRUM: Structure-based prediction of protein stability changes upon single-point mutation. *Bioinformatics* **2016**, 32, 2936–2946.
315. Zhang, W. et al. The congenital cataract-linked G61C mutation destabilizes  $\gamma$ D-crystallin and promotes non-native aggregation. *PLoS One.* **2011**, 6, 1–9.
316. Pande, a et al. Molecular basis of a progressive juvenile-onset hereditary cataract. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, 97, 1993–1998.
317. Das, P., King, J. A. and Zhou, R. Aggregation of  $\gamma$ -crystallins associated with human cataracts via domain swapping at the C-terminal  $\beta$ -strands. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, 108, 10514–10519.
318. Pande, A. et al. Crystal cataracts: Human genetic cataract caused by protein crystallization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, 98, 6116–6120.
319. Santhiya, S. T. et al. Molecular analysis of cataract families in India: new mutations in the CRYBB2 and GJA3 genes and rare polymorphisms. *Mol. Vis.* **2010**, 16, 1837–47.
320. Messina-Baas, O. M., Gonzalez-Huerta, L. M. and Cuevas-Covarrubias, S. A. Two affected siblings with nuclear cataract associated with a novel missense mutation in the CRYGD gene. *Mol. Vis.* **2006**, 12, 995–1000.
321. Li, F. et al. Mutation G61C in the CRYGD gene causing autosomal dominant congenital coralliform cataracts. *Mol. Vis.* **2008**, 14, 378–86.
322. Ji, F., Jung, J. and Gronenborn, A. M. Structural and biochemical characterization of the childhood cataract-associated R76S mutant of human  $\gamma$ D-crystallin. *Biochemistry* **2012**, 51, 2588–2596.
323. Ji, F., Jungs, J., Koharudin, L. M. I. and Gronenborn, A. M. The human W42R  $\gamma$ D-crystallin mutant structure provides a link between congenital and age-related cataracts. *J. Biol. Chem.* **2013**, 288, 99–109.
324. Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B. and Denamur, E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, 8, 207–217.
325. Chatterjee, S. N. and Chaudhuri, K. in *Outer Membrane Vesicles of Bacteria* **2012**, 2, 15–34.
326. Burgess, N. K., Dao, T. P., Stanley, A. M. and Fleming, K. G.  $\beta$ -Barrel proteins that reside in the *Escherichia coli* outer membrane in vivo demonstrate varied folding behavior in vitro. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 26748–26758.
327. Koebnik, R., Locher, K. P. and Van Gelder, P. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: Barrels in a nutshell. *Mol. Microbiol.* **2000**, 37, 239–253.
328. Gessmann, D. et al. Outer membrane  $\beta$ -barrel protein folding is physically controlled by periplasmic lipid head groups and BamA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, 111, 5878–5883.
329. Pautsch, A. and Schulz, G. E. High-resolution structure of the OmpA membrane domain. *J. Mol. Biol.* **2000**, 298, 273–282.
330. Snijder, H. J. et al. Structural evidence for dimerization-regulated activation of an integral membrane phospholipase. *Nature* **1999**, 401, 717–721.
331. Hong, H. et al. Role of Aromatic Side Chains in the Folding and Thermodynamic Stability of Integral Membrane Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 8320–8327.
332. Khalid, S., Bond, P. J., Carpenter, T. and Sansom, M. S. P. OmpA: Gating and dynamics via molecular dynamics simulations. *Biochim Biophys Acta* **2008**, 1778, 1871–1880.
333. Moon, C. P. and Fleming, K. G. Side-chain hydrophobicity scale derived from transmembrane protein folding into lipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, 108, 25–28.
334. Fleming, P. J., Freitas, J. A., Moon, C. P., Tobias, D. J. and Fleming, K. G. Outer membrane phospholipase A in phospholipid bilayers: A model system for concerted computational and experimental investigations of amino acid side chain partitioning into lipid bilayers ☆. *BBA - Biomembr.* **2012**, 1818, 126–134.
335. Song, W. et al. Understanding Voltage Gating of Providencia stuartii Porins at Atomic Level. *PLoS Comput. Biol.* **2015**, 11, 1–18.
336. Ortiz-Suarez, M. L., Samsudin, F., Piggot, T. J., Bond, P. J. and Khalid, S. Full-Length OmpA: Structure, Function, and Membrane Interactions Predicted by Molecular Dynamics Simulations. *Biophys. J.* **2016**, 111, 1692–1702.
337. Urban, S. Taking the plunge: integrating structural, enzymatic and computational insights into a unified model for membrane-immersed rhomboid proteolysis. *Biochem. J.* **2010**, 425, 501–512.
338. Brooks, C. L. and Lemieux, M. J. Untangling structure-function relationships in the rhomboid family of intramembrane proteases. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2013**, 1828, 2862–2872.
339. Uritsky, N., Shokhen, M. and Albeck, A. The catalytic machinery of rhomboid proteases: Combined MD and QM simulations. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, 8, 4663–4671.



340. Urban, S. Making the cut: Central roles of intramembrane proteolysis in pathogenic microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, 7, 411–423.
341. Bondar, A.-N. and White, S. H. Hydrogen bond dynamics in membrane protein function. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2012**, 1818, 942–950.
342. Bondar, A. N., del Val, C. and White, S. H. Rhomboid Protease Dynamics and Lipid Interactions. *Structure* **2009**, 17, 395–405.
343. Cho, S., Dickey, S. W. and Urban, S. Crystal Structures and Inhibition Kinetics Reveal a Two-Stage Catalytic Mechanism with Drug Design Implications for Rhomboid Proteolysis. *Mol. Cell* **2016**, 61, 329–340.
344. Baker, R. P. and Urban, S. Architectural and thermodynamic principles underlying intramembrane protease function. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, 8, 759–768.
345. Harris, N. J. and Booth, P. J. Folding and stability of membrane transport proteins in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, 1818, 1055–1066.

XVI.1. Apéndice I

En las *Tablas A1.1* y *A1.2* se enlistan las mutaciones reportadas en la proteína precursora amiloide (APP) y en la subunidad catalítica Presenilina (PS1) de la enzima  $\gamma$ -secretasa relacionadas con la aparición de la enfermedad de Alzheimer.

**Tabla A1.1.** Mutaciones reportadas en la proteína precursora amiloide

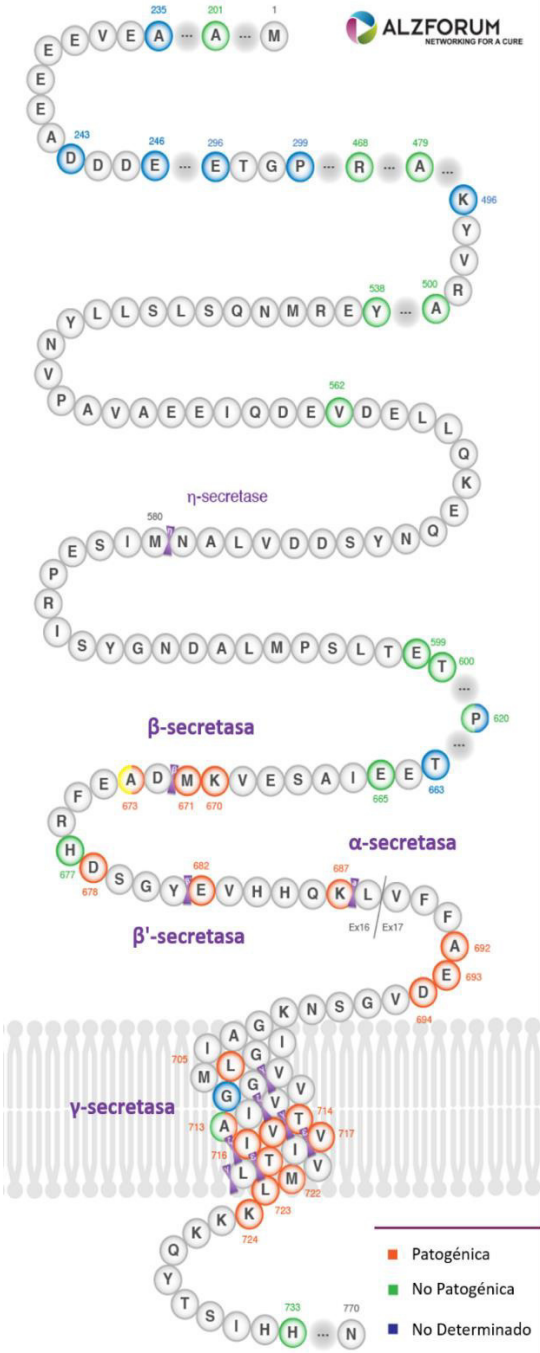
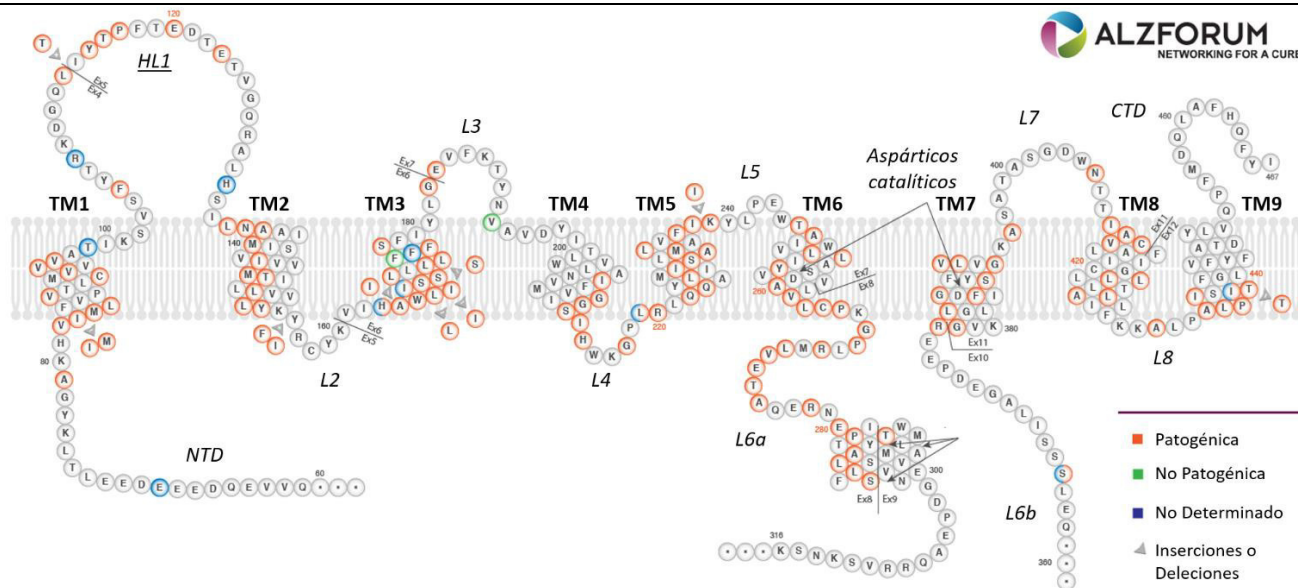
	Región	Mutaciones
<b>Fragmento N-terminal</b>	<i>Sitio <math>\alpha</math></i>	K687N
	<i>Sitio <math>\beta</math></i>	KM670/671NL ( <i>Swedish</i> )
	<i>Sitio <math>\beta'</math></i>	E682K ( <i>Leuven</i> )
<b>Región transmembranal</b>	<i>Sitio <math>\gamma</math></i>	T714A ( <i>Iranian</i> ), T714I ( <i>Austrian</i> ), V715A ( <i>German</i> ), V715M ( <i>French</i> )
	<i>Sitio <math>\zeta</math></i>	I716F ( <i>Iberian</i> ), I716M, I716T, I716V ( <i>Florida</i> )
	<i>Sitio <math>\epsilon</math></i>	V717F ( <i>Indiana</i> ), V717G, V717I ( <i>London</i> ), V717L, T719P
	<i>Otros</i>	G708G, G709S, A713T, A713V, M722K
<b>Fragmento C-terminal</b>		L723P ( <i>Australian</i> ), K724N ( <i>Belgian</i> ), H733P, IVS17 83-88deIAAGTAT

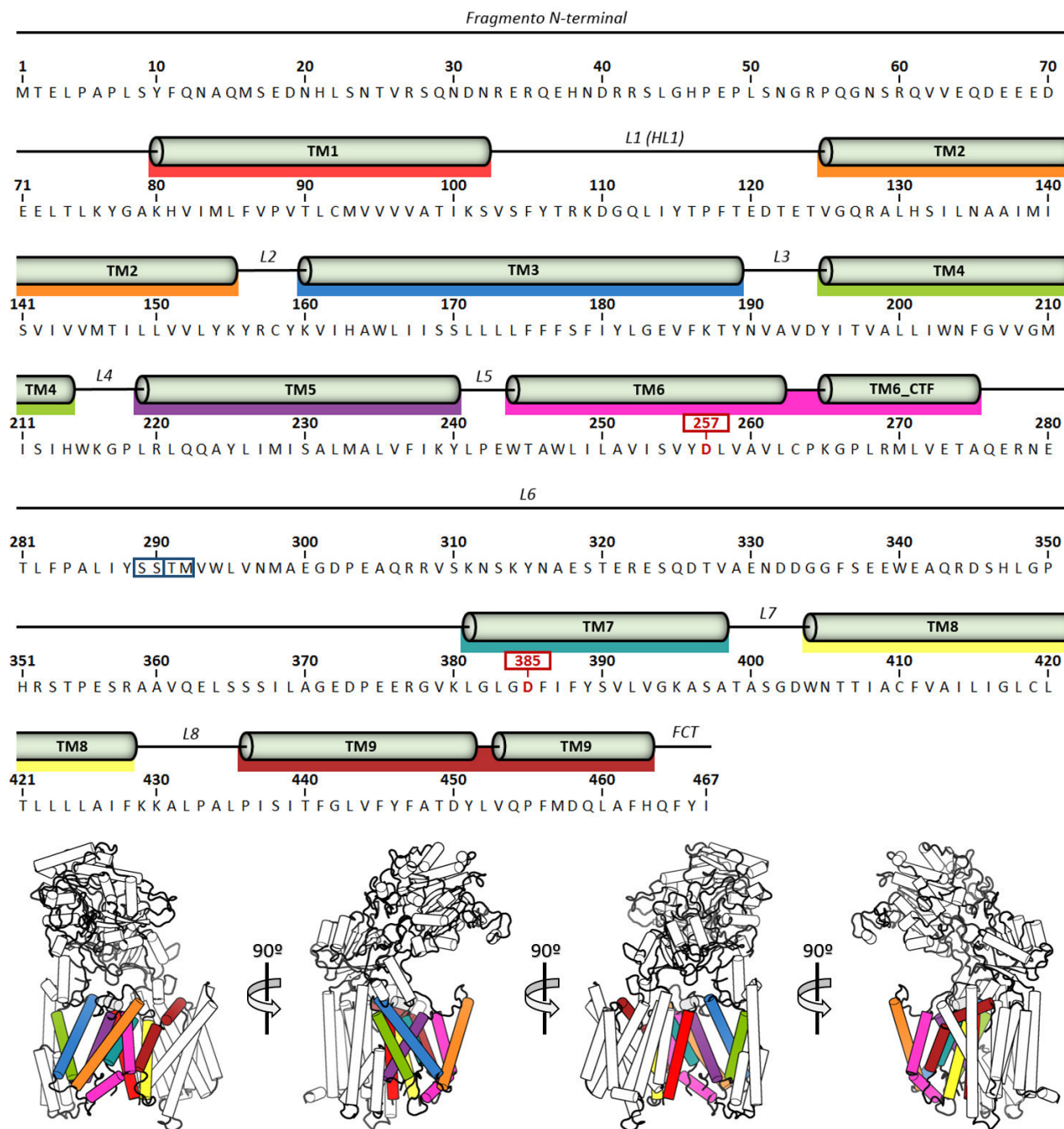
Tabla A1.2. Mutaciones reportadas en la subunidad PS1 de  $\gamma$ -secretasa



Región	Mutaciones
NTD	E69D, A79V
TM1	V82L, $\Delta$ I83/M84, I83T, L85P, V89L, C92S, V94M, V96F, V97L, T99A
HL1	F105C, F105I, F105L, F105V, R108Q, L113_I114insT, L113Q, Y115C, Y115D, Y115H, T116I, T116N, T116R, P117A, P117L, P117R, P117S, E120D, E120G, E120K, E123K, H131R
TM2	L134R, N135D, N135S, N135Y, A136G, M139I, M139K, M139T, M139V, I143F, I143M, I143N, I143T, I143V, M146I, M146L, M146V, T147I, T147P, L150P, L153V, Y154C, Y154N
L2	K155_Y156insFI
TM3	H163P, H163R, H163Y, A164V, W165C, W165G, L166H, L166P, L166R, L166V, $\Delta$ L166, $\Delta$ I167, $\Delta$ I168, I168T, S169L, S169P, S170F, L171P, L173F, L173W, L174M, L174R, F175S, F176L, F177L, F177S, S178P
L3	E184D, E184G, V191A
TM4	I202F, G206A, G206D, G206S, G206V, G209A, G209E, G209R, G209V, S212Y, I213F, I213T
L4	H214D, H214N, H214Y, G217D, G217R, L219F, L219P, L219R
TM5	R220P, Q222H, Q222R, Q223R, L226F, L226R, I229F, S230I, S230R, A231P, A231T, A231V, M233I, M233T, M233V, L235P, L235R, L235V, F237I, F237L, I238
L5	K239N
TM6	T245P, A246E, A246P, L248P, L248R, L250S, L250V, Y256S, A260V, V261F, V261L, L262F, L262V, C263F, C263R, P264L
L6	G266S, P267A, P267L, P267S, R269G, R269H, L271V, V272A, E273A, E273G, T274R, A275V, R278I, R278K, R278S, R278T, E280A, E280G, E280K, L282F, L282R, L282V, P284L, P284S, A285V, L286P, L286V, T291P, S365A, S365Y, R377M, R377W, G378E, G378V, G378fs
TM7	L381F, L381V, G384A, F386I, F386S, F388L, S390I, S390N, V391F, L392P, L392V, G394V, A396T
L7	N405S
TM8	I408T, A409T, C410Y, L418F, L420R, L424F, L424H, L424R, L424V, A426P
L8	A431E (Jalisco), A431V
TM9	A434C, A434T, L435F, P436Q, P436S, I437V, I439S, I439V, T440del, $\Delta$ E9, I238_K239insI, $\Delta$ E9Finn

XVI.2. Apéndice II

En este apéndice se reporta la información complementaria al análisis estructural de la enzima  $\gamma$ -secretasa. Las Figuras A2.1 a A2.4 muestran la secuencia de aminoácidos de cada subunidad con la información de estructura secundaria correspondiente. Las secuencias se encuentran coloreadas con base en las estructuras terciarias mostradas en la parte inferior de cada imagen.



**Figura A2.1.** Representación de la secuencia de aminoácidos, estructura secundaria y terciaria del componente PS1. Los residuos de aspártico catalíticos se encuentran coloreados en rojo, mientras que en los recuadros azules (aminoácidos 289 a 292) se enmarcan los dos sitios en donde se lleva a cabo el corte autoproteolítico.

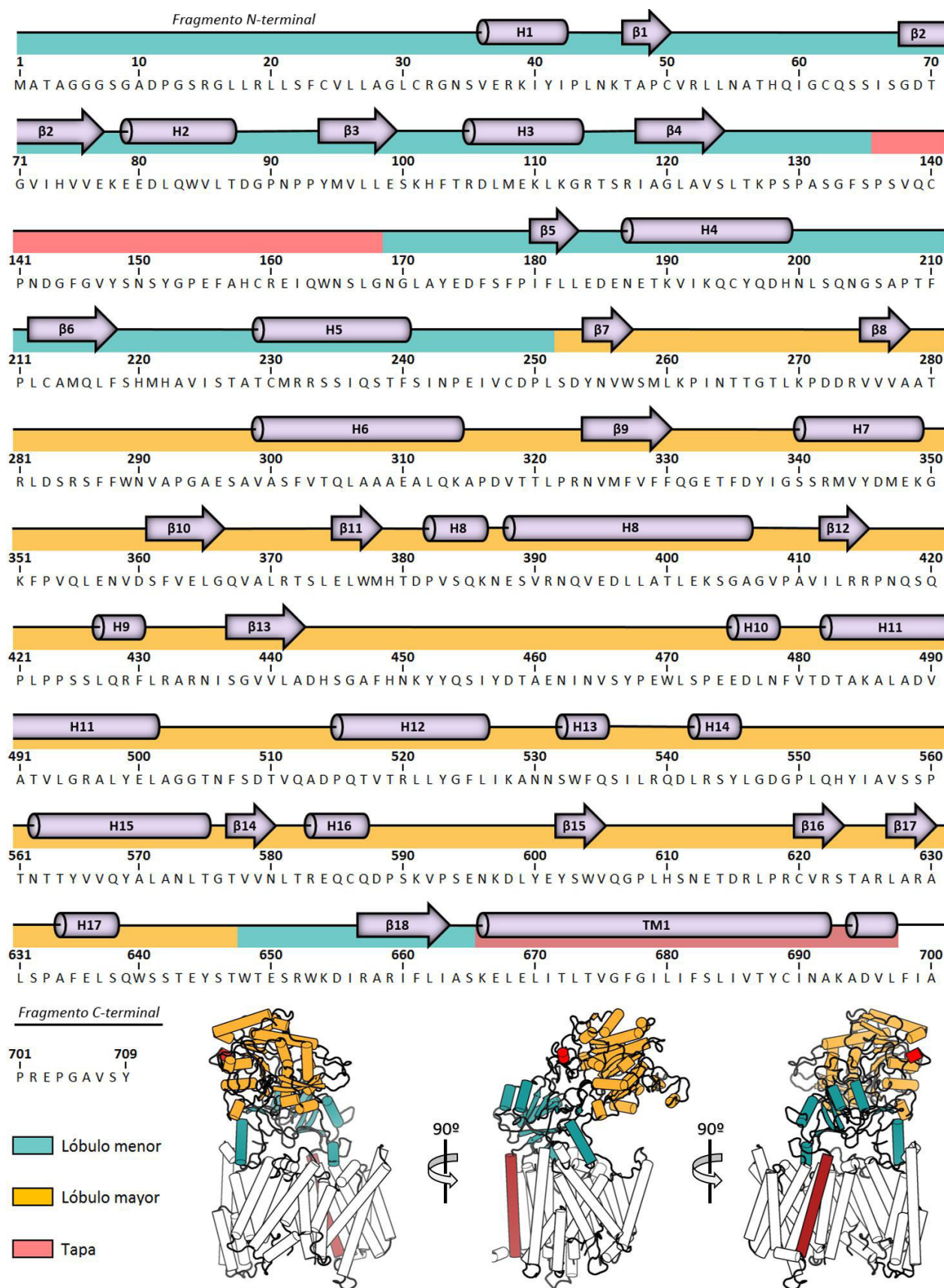


Figura A2.2. Representación de la secuencia de aminoácidos, estructura secundaria y terciaria del componente NCT.

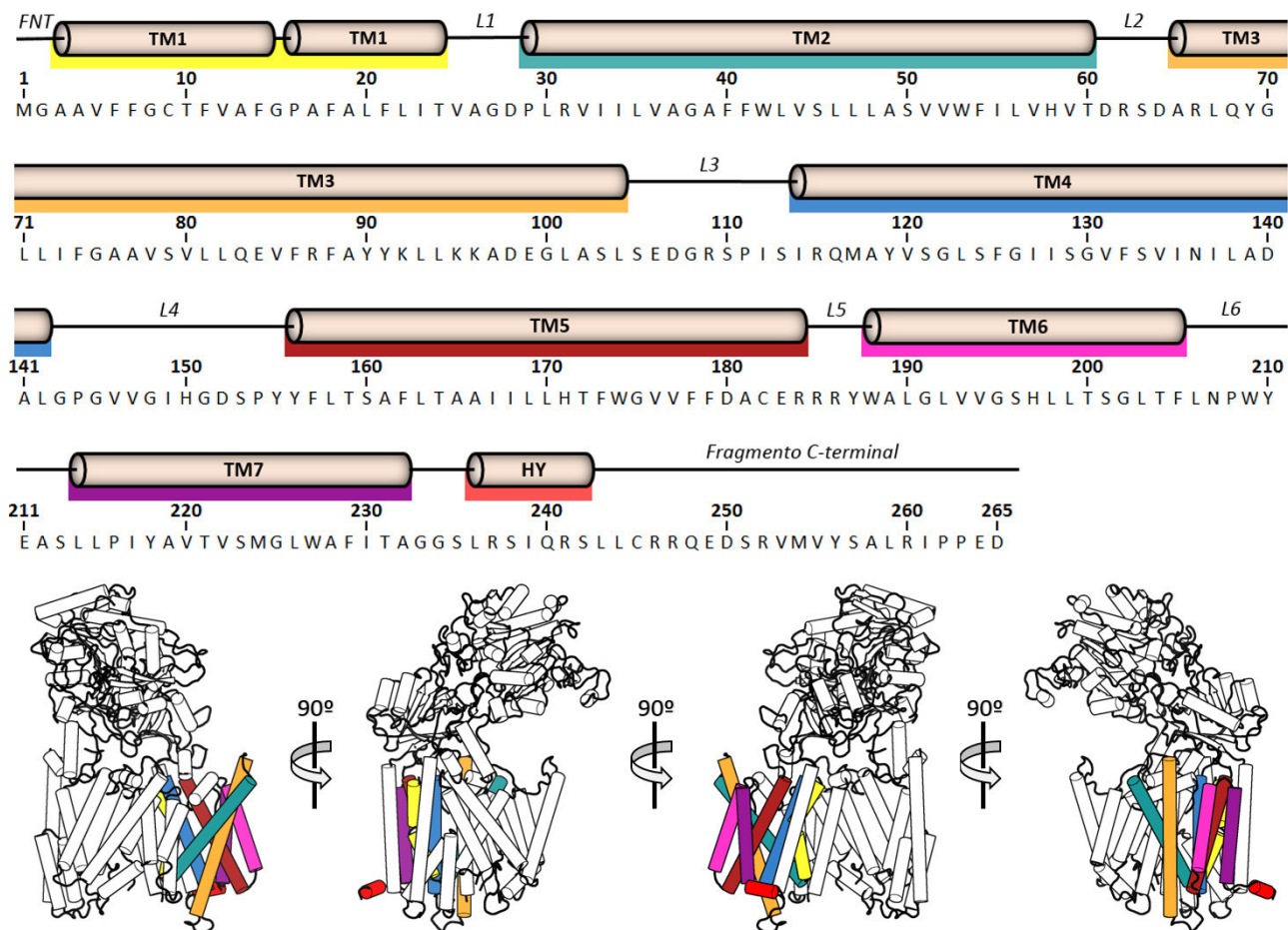


Figura A2.3. Representación de la secuencia de aminoácidos, estructura secundaria y terciaria del componente APh-1A.

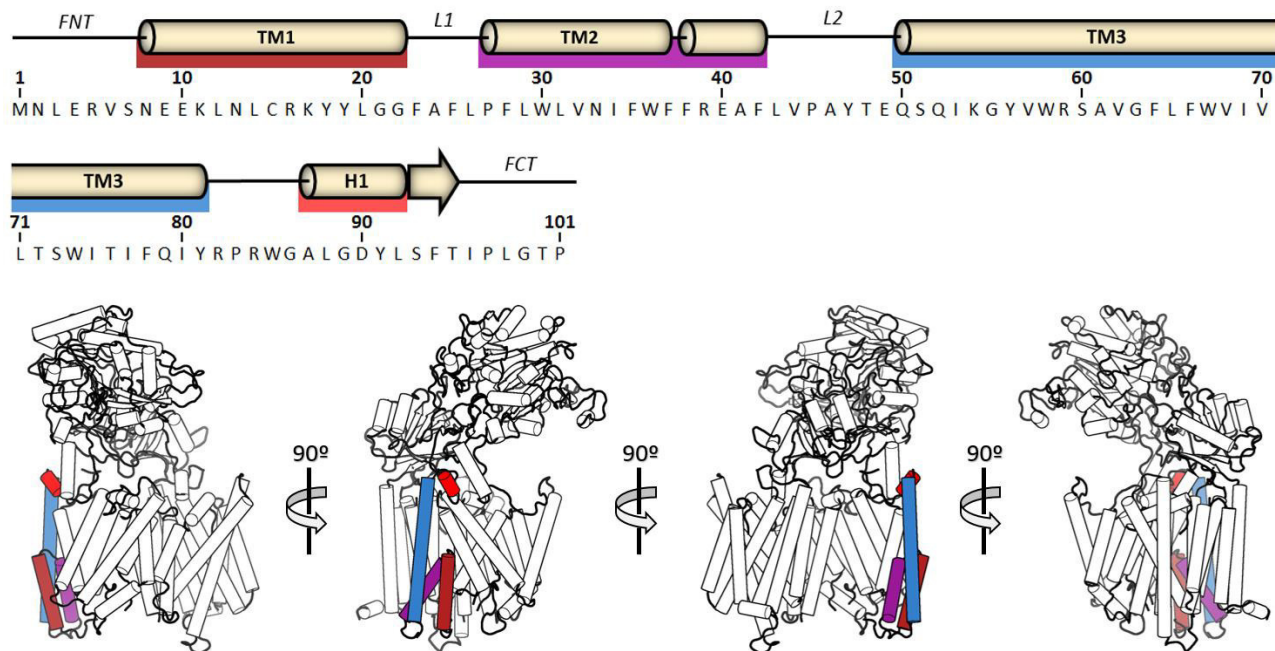


Figura A2.4. Representación de la secuencia de aminoácidos, estructura secundaria y terciaria del componente PEN-2.

XVI.3. Apéndice III

Este apéndice contiene información complementaria a los estudios de dinámica molecular (MD) atómica (AA) y de grano grueso (CG) de los estados desprotonados ( $\text{Asp}^-$ ) y monoprotonados ( $\text{Asp-H}_{257}$  y  $\text{Asp-H}_{385}$ ) de PS1 en los complejos de  $\gamma$ -secretasa derivados de 5FN2 y 5FN3. Los resultados se exponen de acuerdo con las siguientes secciones: (1) estados conformacionales de PS1, (2) movimiento del dominio extracelular de NCT y (3) formación del canal de agua en APH-1A.

XVI.3.1. Estados conformacionales de PS1

Para el análisis de RMSD, RMSF e inclinación y torsión de las hélices transmembranales (TMs) en las simulaciones de CG se promedió la información de las 50 trayectorias de 1  $\mu\text{s}$  para cada uno de los seis sistemas evaluados. En los diagramas de fluctuaciones por residuo se calculó la diferencia ( $\Delta\text{RMSF}$ ) entre el RMSF del estado protonado ( $\text{RMSF}_{\text{Asp-H}}$ ) con el RMSF del estado desprotonado ( $\text{RMSF}_{\text{Asp}^-}$ ). La curvatura de las TMs se graficó en función del total de pasos de simulación (*frames*) de las 50 trayectorias.

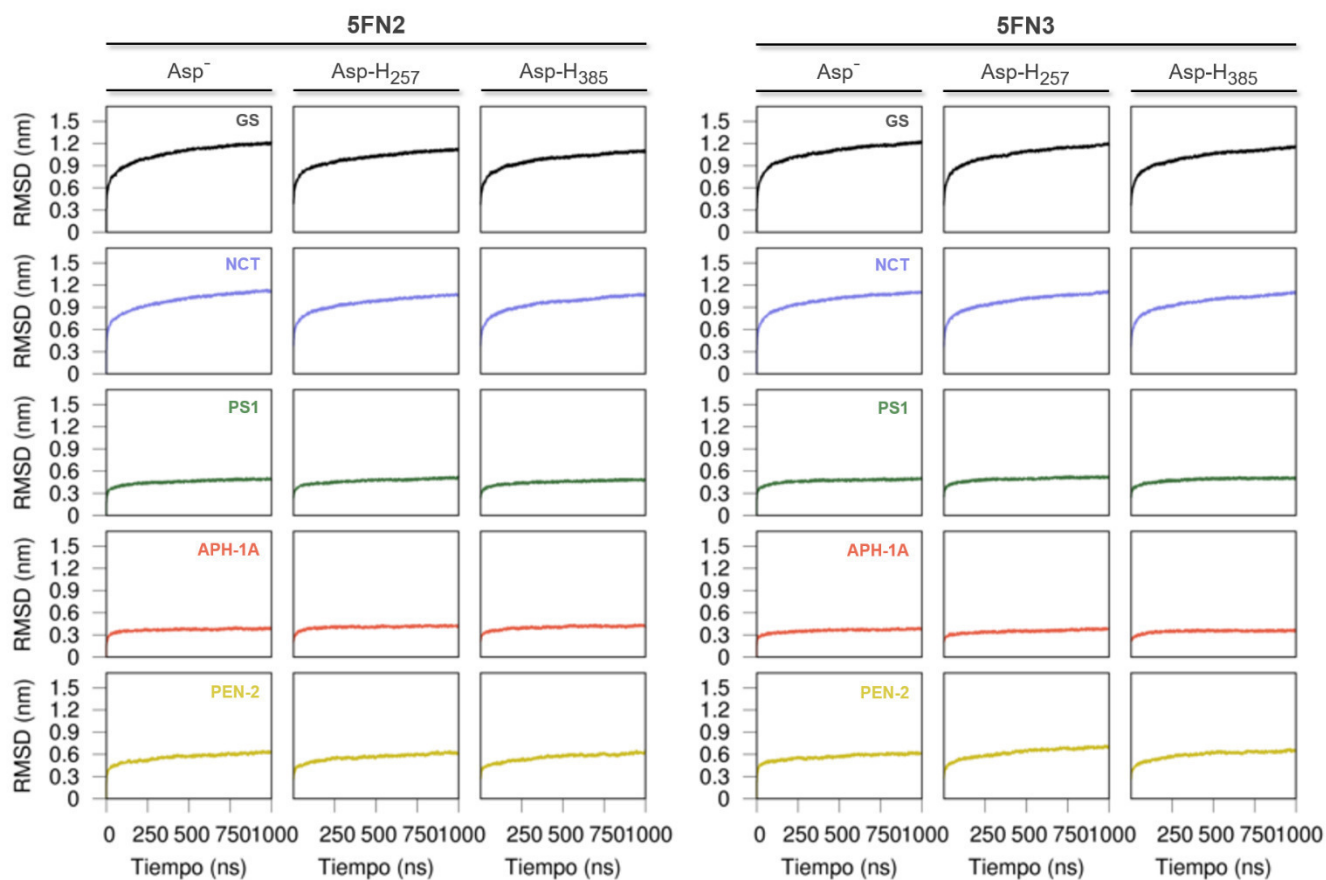
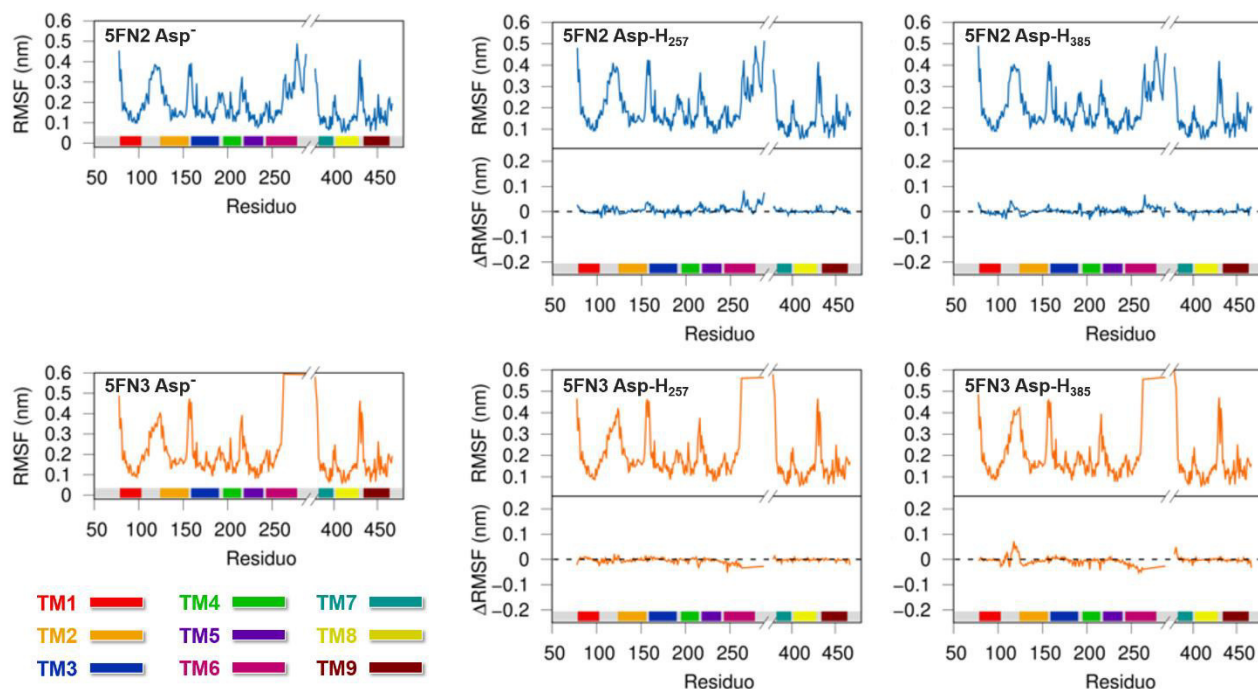
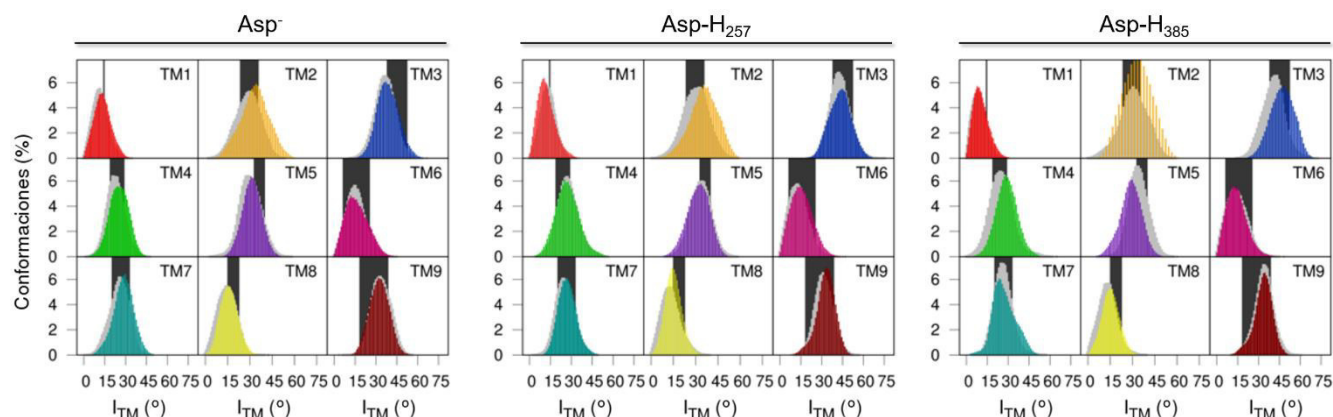


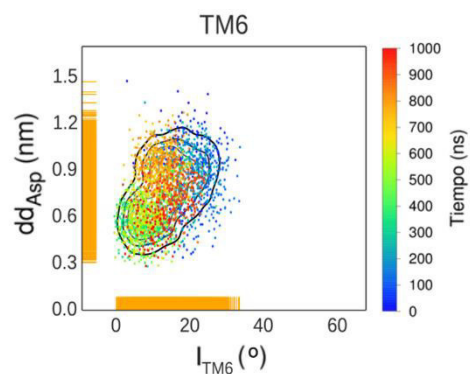
Figura A3.1. RMSD promedio de las 50 trayectorias de CG en los tres estados de protonación de los complejos de  $\gamma$ -secretasa (5FN2 y 5FN3) y de sus componentes: NCT (morado), PS1 (verde), APH-1A (naranja) y PEN-2 (amarillo).



**Figura A3.2.** RMSF promedio por residuo y  $\Delta$ RMSF de las 50 trayectorias de CG en los tres estados de protonación de los complejos de  $\gamma$ -secretasa derivados de 5FN2 y 5FN3.

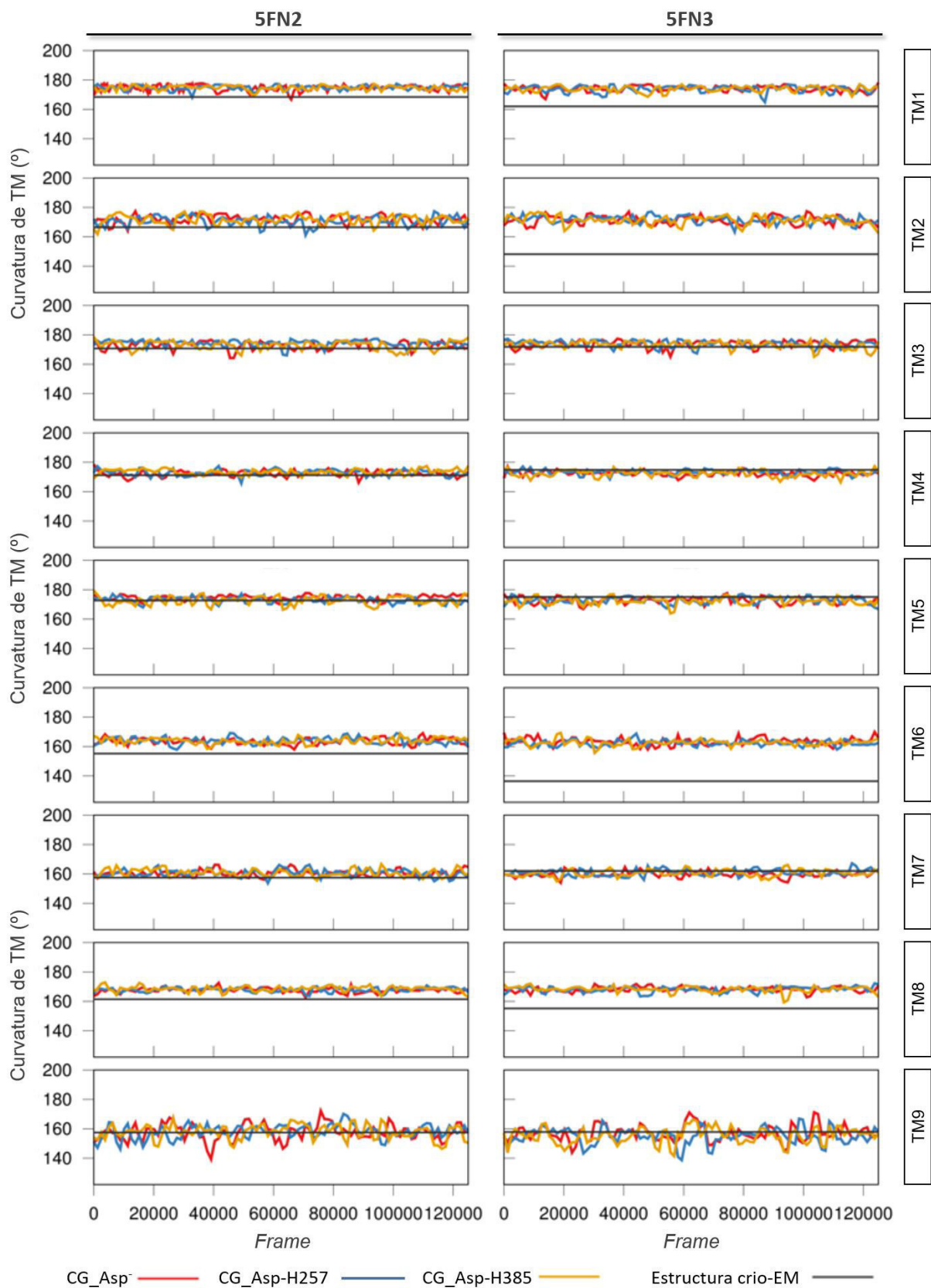


**Figura A3.3.** Distribución del promedio de los ángulos de inclinación de las TMs ( $I_{TM}$ ) de las 50 trayectorias de CG en los tres estados de protonación de los complejos de  $\gamma$ -secretasa 5FN2 (gris) y 5FN3 (color). En negro se muestra el rango de valores provenientes de las estructuras de crío-EM.



**Figura A3.4.** Distribución conformacional de la distancia entre los aspárticos catalíticos ( $dd_{Asp}$ ) y el ángulo de inclinación de TM6 ( $I_{TM6}$ ) coloreada en función del tiempo de simulación para una de las 50 trayectorias de CG del sistema 5FN2 Asp-H<sub>385</sub>.





**Figura A3.5.** Curvatura de las TMs en función de los pasos (*frame*) de simulación de las 50 trayectorias de CG en los tres estados de protonación de los complejos de  $\gamma$ -secretasa derivados de 5FN2 y 5FN3.

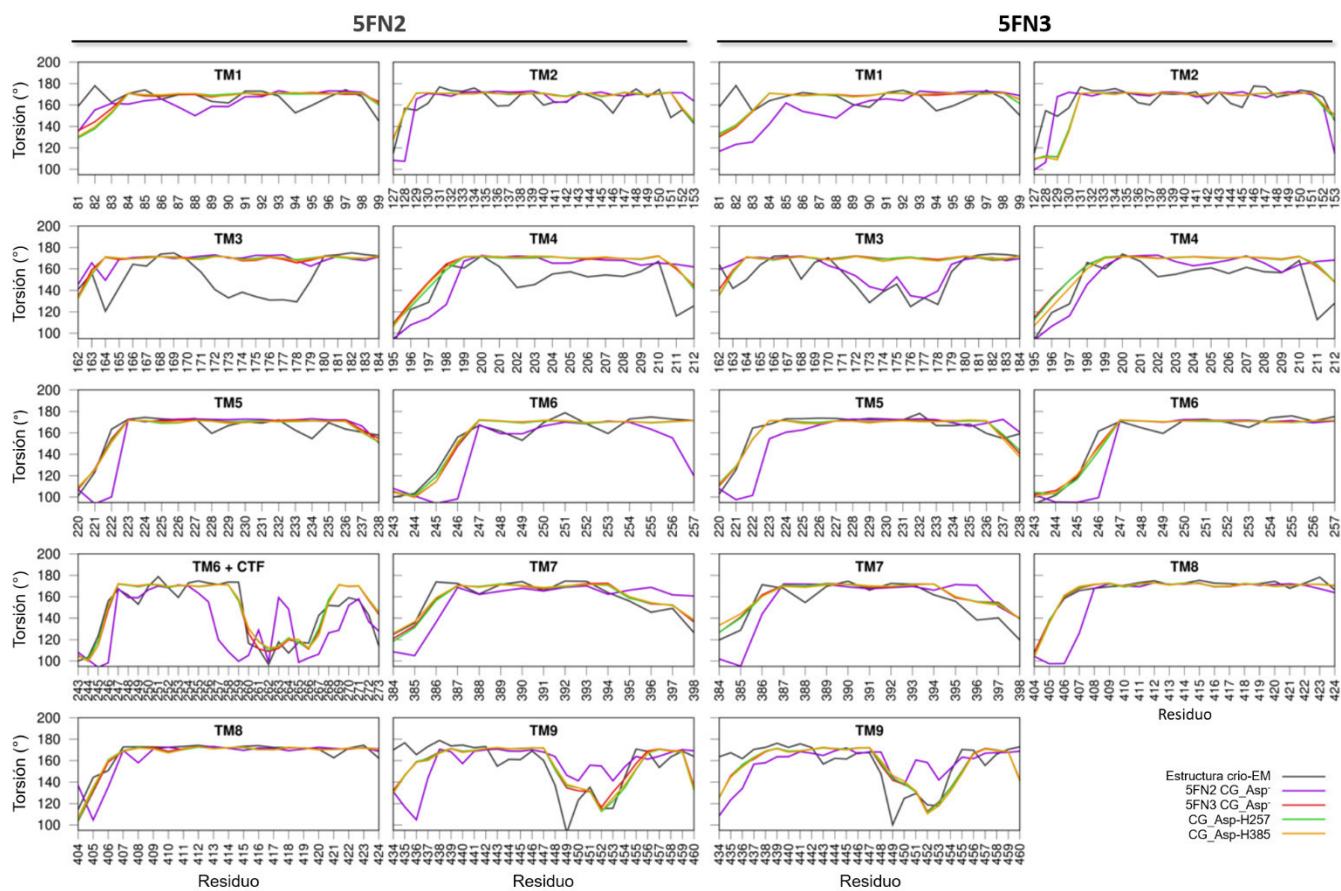


Figura A3.6. Promedio del ángulo de torsión por residuo de las 50 trayectorias de CG en los tres estados de protonación de los complejos de  $\gamma$ -secretasa derivados de 5FN2 y 5FN3.

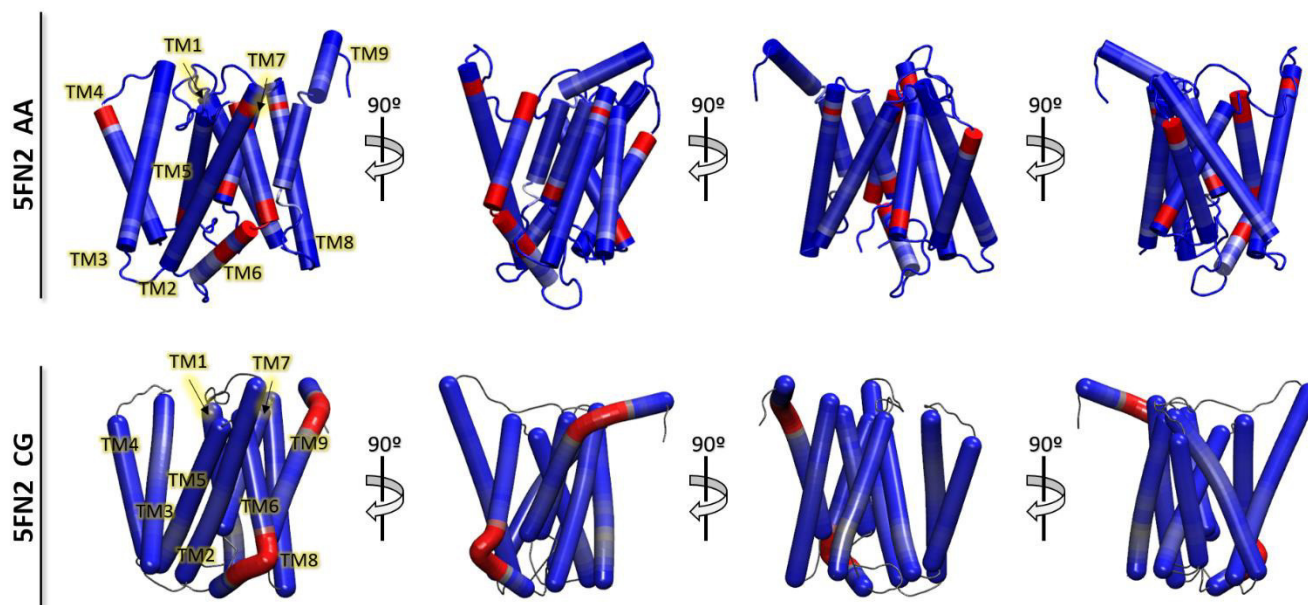
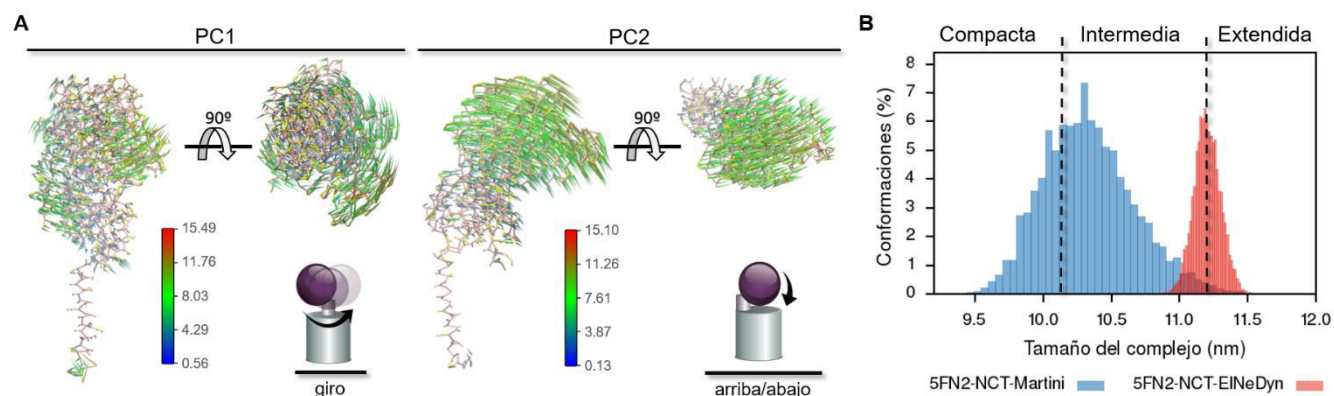


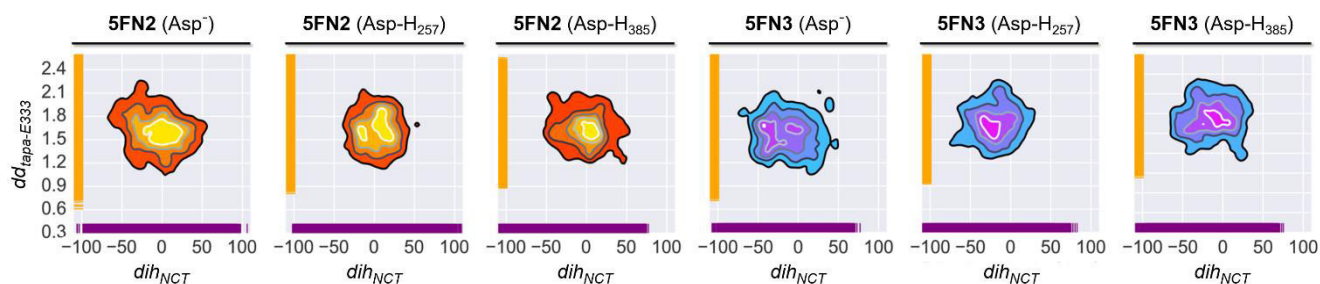
Figura A3.7. Representación esquemática de las regiones con mayor (rojo) y menor (azul) ángulo de torsión con base en la información de las trayectorias de simulación de AA y CG de los sistemas derivados de 5FN2.

XVI.3.2. Movimiento del domino extracelular de NCT

En la *Figura A3.8* se muestra el análisis conformacional de los dos primeros componentes (PCs) del PCA de la simulación de 5  $\mu$ s del modelo de EIneDyn, así como la distribución de las conformaciones compacta, intermedia y extendida presentes en esta simulación y la de 5  $\mu$ s del modelo de Martini. La *Figura A3.9* muestra los diagramas de distribución provenientes de la comparación de la distancia entre el centro geométrico de la “tapa” y el residuo Glu333 ( $dd_{tapa-E333}$ ) del ECD con el ángulo diedro que describe la rotación del lóbulo mayor del ECD de NCT ( $dih_{NCT}$ ).



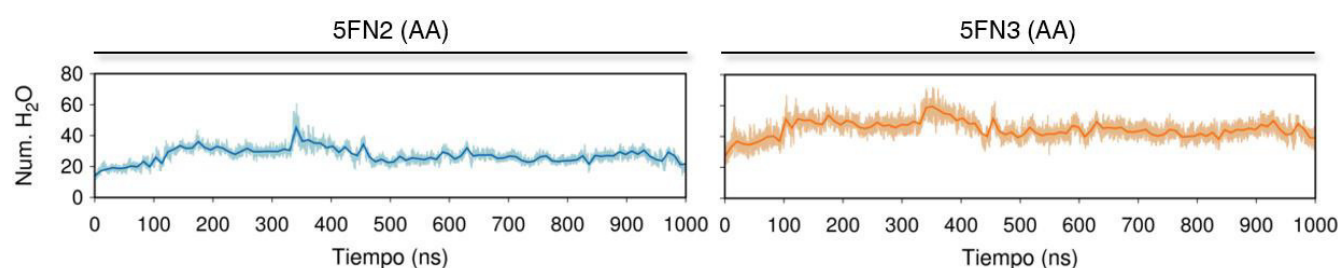
**Figura A3.8.** (A) Representación de puercoespín de los primeros componentes del PCA (PC1 y PC2) obtenidos de la simulación de 5  $\mu$ s del modelo de EIneDyn que describen la “rotación” o “giro” y el movimiento de “arriba/abajo” del ECD de NCT. (B) Distribución de las conformaciones compacta, intermedia y extendida proveniente de las simulaciones de 5  $\mu$ s de los modelos de EIneDyn y Martini.



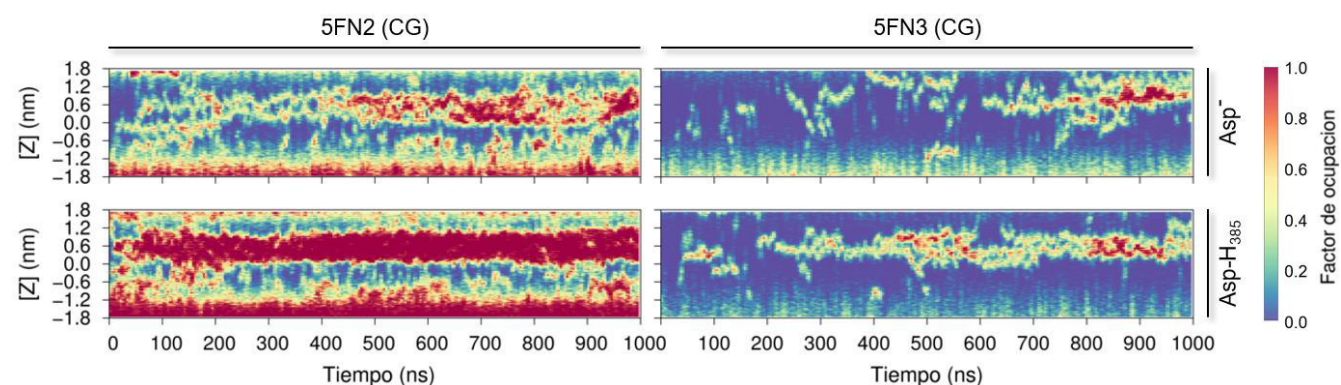
**Figura A3.9.** Distribución la distancia entre el centro geométrico de la “tapa” y el residuo Glu333 ( $dd_{tapa-E333}$ ) del ECD con el ángulo diedro que describe la rotación del lóbulo mayor del ECD de NCT ( $dih_{NCT}$ ) de las 50 trayectorias de CG en los tres estados de protonación de los complejos de  $\gamma$ -secretasa 5FN2 y 5FN3.

XVI.3.3. Formación de la cavidad de agua en APH-1A

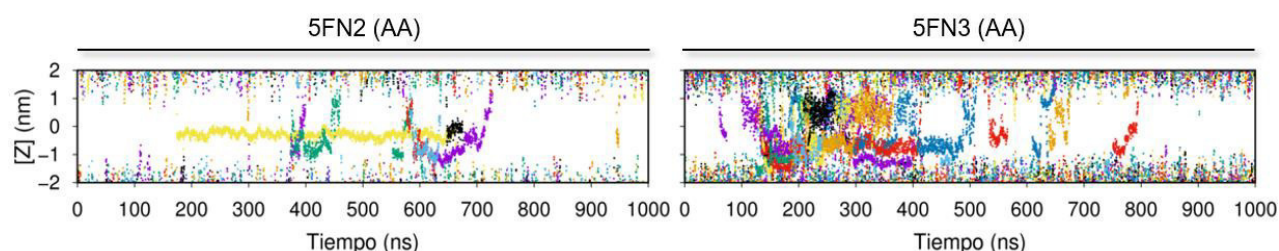
En la *Figura A3.11* se muestra el número de moléculas de agua identificadas en la cavidad de APH-1A durante las simulaciones atomísticas de los sistemas 5FN2 y 5FN3. La *Figura A3.11* muestra la distribución de probabilidad de la presencia de moléculas de agua en APH-1A de las simulaciones de CG. La información complementaria a la caracterización del canal de agua en la simulación atomística de 5FN3 y los resultados provenientes del estudio de *Umbrella Sampling* (US) se presenta en las *Figuras A3.12 a A.15*. En las *Figuras A3.16 y A.17* se expone la información referente a la interacción del ion  $\text{Na}^+$  con la cavidad superior de APH-1A. Los cambios en la inclinación, curvatura y torsión de las TMs en APH-1A durante las simulaciones atomísticas se reportan en las *Figuras A3.18 a A3.21*. Finalmente, la *Figura A3.22* muestra los histogramas de las configuraciones empleadas para el estudio de US en la caracterización del canal de calcio.



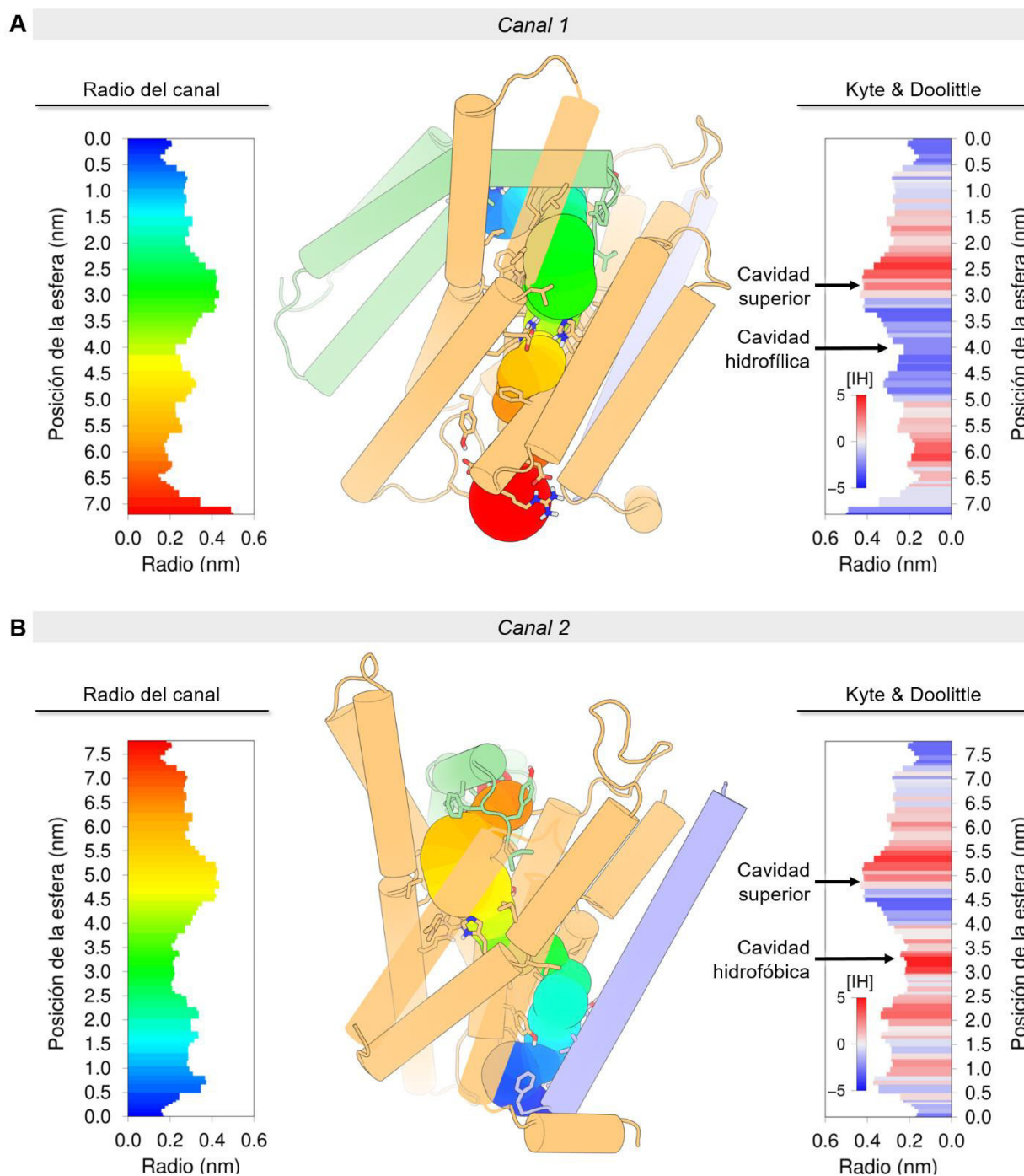
**Figura A3.10.** Número de moléculas de agua identificadas en la región transmembranal de APH-1A durante las simulaciones atomísticas de los sistemas 5FN2 y 5FN3 de  $\gamma$ -secretasa.



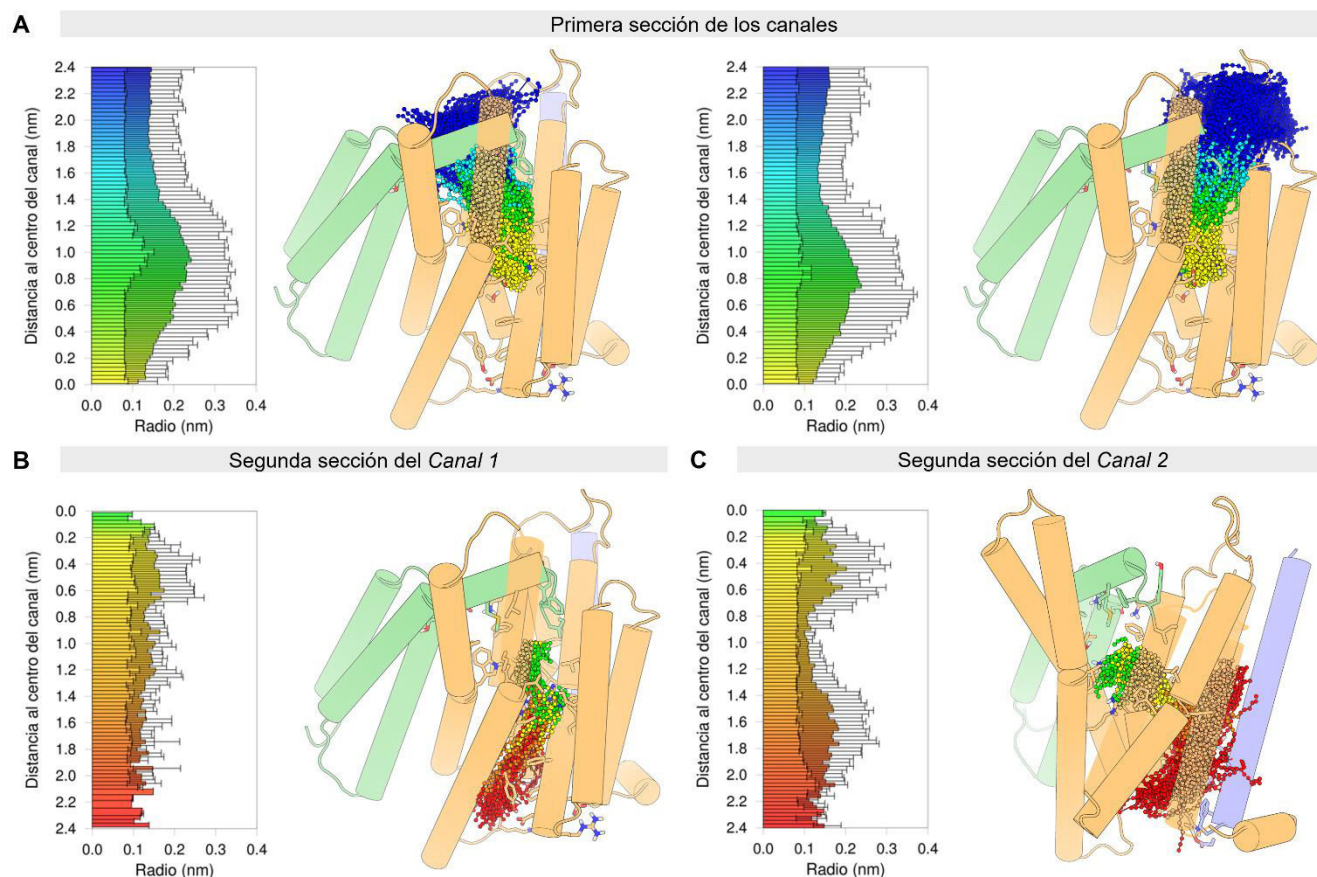
**Figura A3.11.** Diagramas distribución del factor de ocupación de moléculas de agua en APH-1A de las simulaciones de grano grueso para la forma desprotonada ( $\text{Asp}^-$ ) y protonada ( $\text{Asp-H}_{385}$ ) del Asp385 en los sistemas 5FN2 y 5FN3.



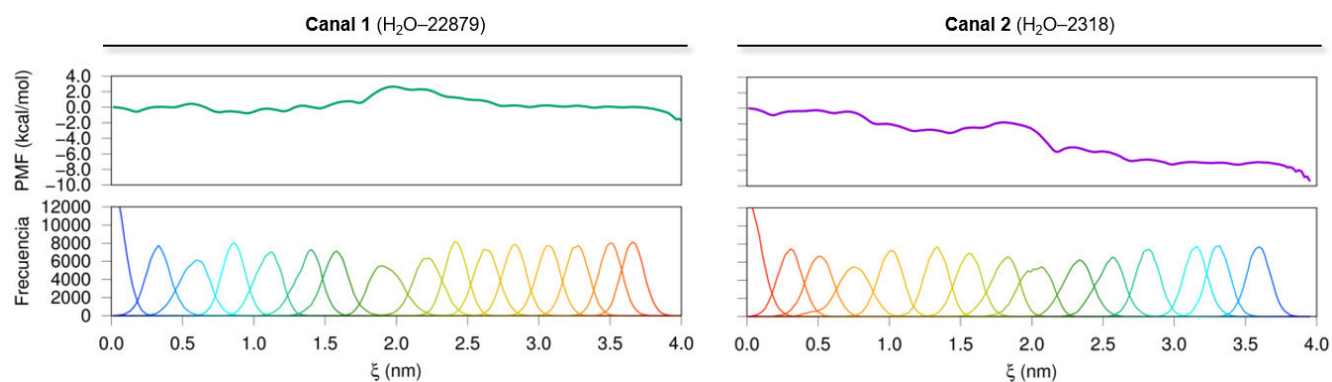
**Figura A3.12.** Posición de las moléculas de agua en función del tiempo que cruzan por APH-1A en los sistemas 5FN2 Y 5FN3.



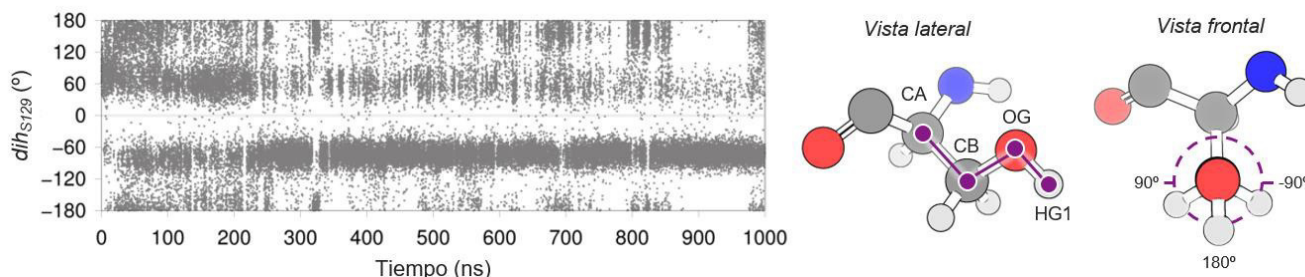
**Figura A3.13.** Representación del radio del (A) *Canal 1* y (B) *Canal 2* a los 150 ns de simulación atómica en el modelo 5FN3. El gráfico de la izquierda muestra la posición y radio de la esfera empleado para la descripción del canal mostrado en la figura central. El gráfico de la derecha muestra la misma información que el anterior, pero en este se colorean las barras del histograma con base en los índices de hidropatía (IH) calculados con la escala de hidropatía de Kyte & Doolittle para los residuos involucrados en la formación del canal. La caracterización del radio de los canales se realizó con el servidor web CHEXVIS (<http://vgl.serc.iisc.ernet.in/chexvis/>).



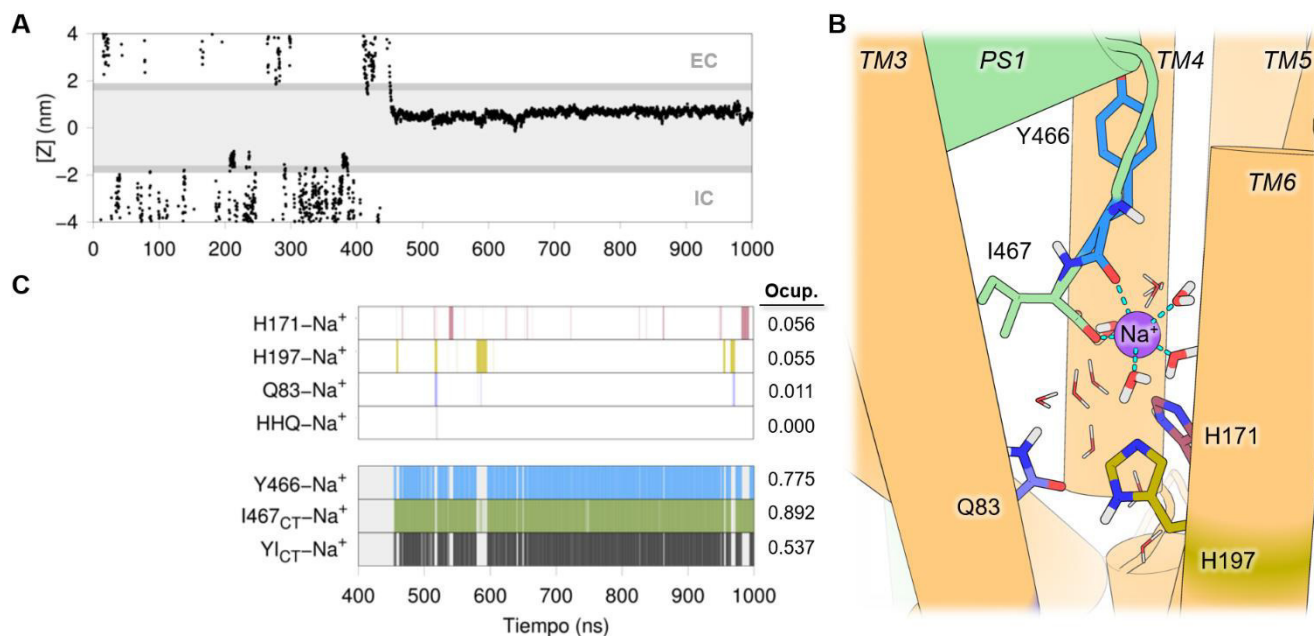
**Figura A3.14.** Representación del radio de la (A) primera y segunda sección del (B) *Canal 1* y (C) *Canal 2* obtenido durante los 1,000 ns de la simulación atómica del modelo 5FN3. El histograma representa el valor promedio del radio obtenido durante el análisis, así como el valor mínimo y máximo del radio durante el tiempo simulado. El radio del átomo de prueba fue de 0.08 nm, el cual corresponde al valor mínimo calculado. Los gráficos se encuentran coloreados en un rango de menor (azul) a mayor (rojo) distancia del átomo de prueba con respecto al poro de la región EC. Las estructuras tridimensionales a la derecha de los gráficos muestran la posición y disposición espacial de los canales identificados. La caracterización del radio de los canales a través del tiempo se realizó con el programa CAVER v3.0.



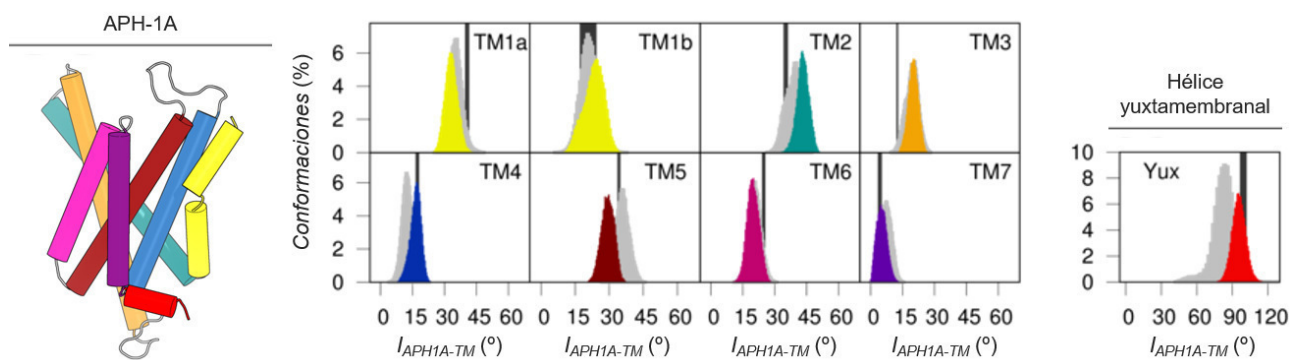
**Figura A3.15.** Perfiles de potencial de fuerza media (PMF) e histogramas de las configuraciones en función de la coordenada de reacción ( $\xi$ ) de las moléculas de agua en el *Canal 1* (H<sub>2</sub>O-22879) y *Canal 2* (H<sub>2</sub>O-2318) extraídas de la simulación atómica de 5FN3.



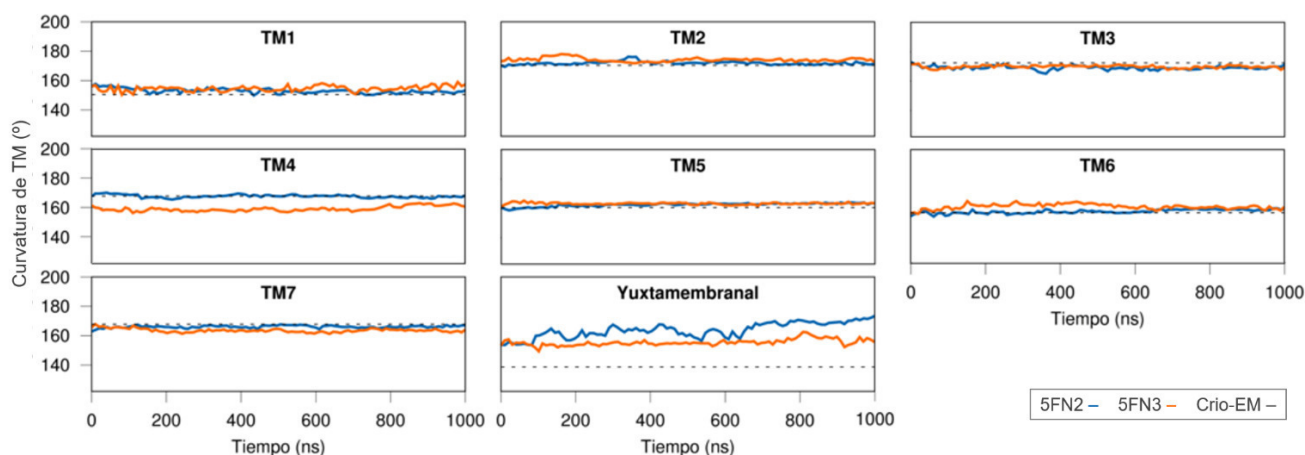
**Figura A3.16.** Gráfico y representación de ángulo diedro formado entre los átomos CA-CB-OH-HG1 de Ser129 ( $dih_{S129}$ ) del componente APH-1A en la simulación atómica de 5FN3.



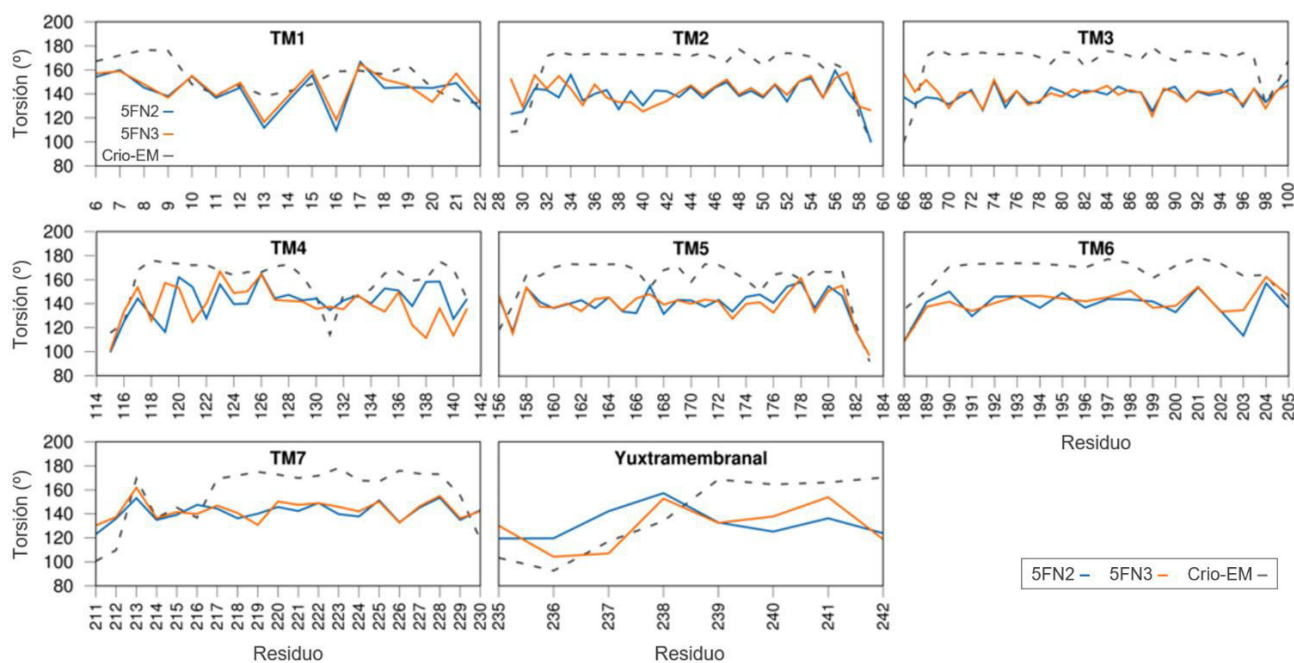
**Figura A3.17.** (A) Posición en el eje Z del ion Na<sup>+</sup> que ingresó a la cavidad en función del tiempo de la simulación atómica de 5FN2. (B) Representación de los aminoácidos involucrados en la interacción con el ion. (C) Número de contactos entre el ion Na<sup>+</sup> y los residuos de His171, His197 y Gln83, así como de la coordinación con estos tres (HHQ), en APH-1A, y Tyr466 y el carboxilo terminal de Ile467 (I467<sub>CT</sub>) de PS1 y la coordinación con ambos (YI<sub>CT</sub>).



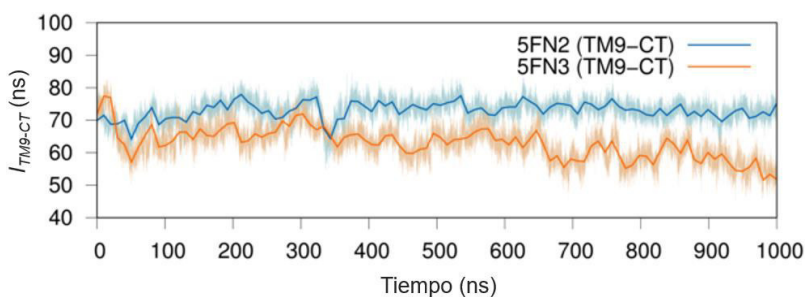
**Figura A3.18.** Distribución de los ángulos de inclinación de las TMs de APH-1A ( $I_{APH1A-TM}$ ) en las simulaciones atómicas de 5FN2 (gris) y 5FN3 (color). En negro se muestra el rango de valores provenientes de las estructuras de crió-EM.



**Figura A3.19.** Curvatura de las TMs de APH-1A en función del tiempo de las simulaciones atomísticas de 5FN2 y 5FN3, y comparación con la información de las estructuras de crio-EM.

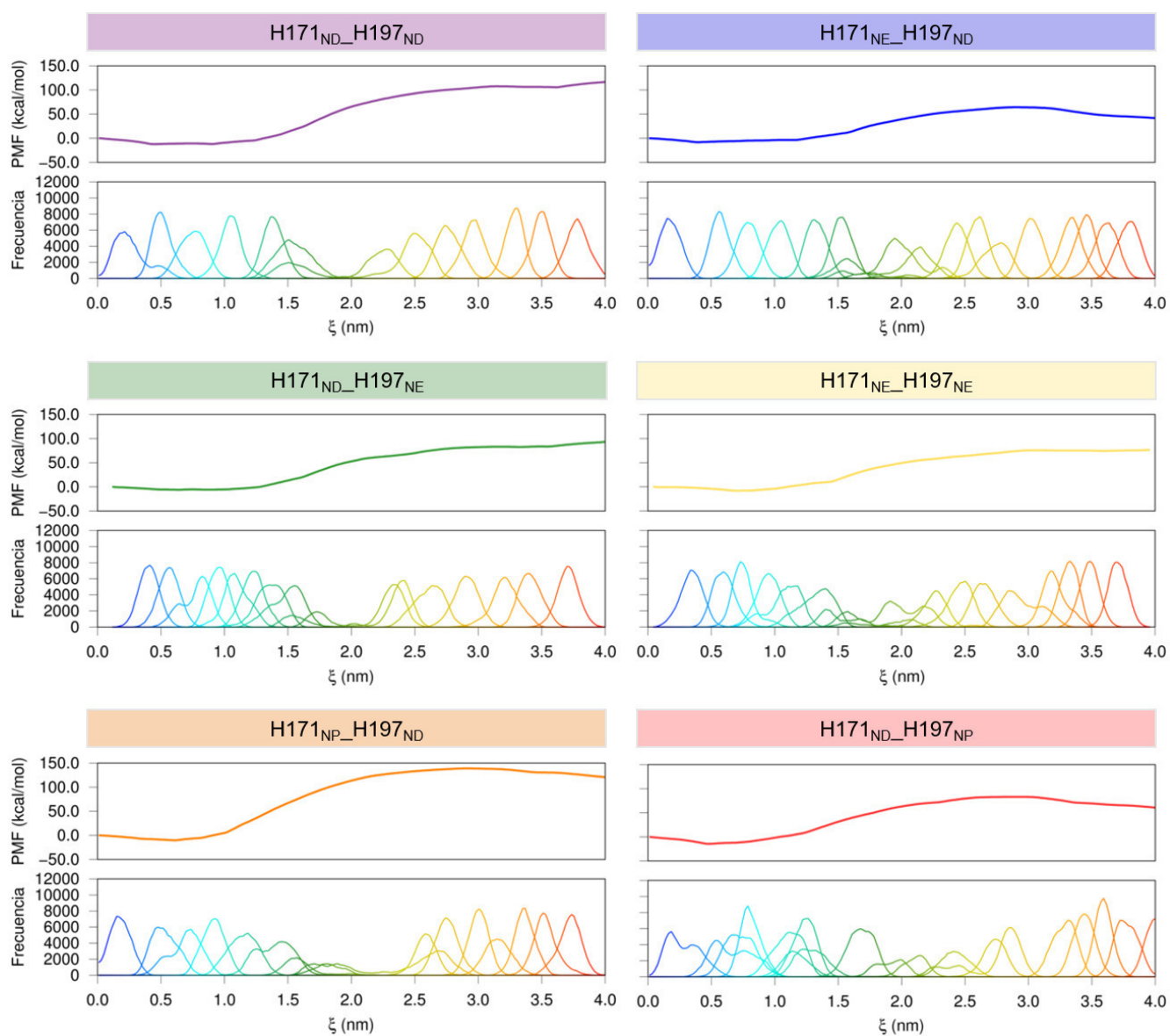


**Figura A3.20.** Torsión de las TMs de APH-1A por residuo calculado a partir de las simulaciones atomísticas de 5FN2 y 5FN3, y comparación con la información de las estructuras de crio-EM.



**Figura A3.21.** Ángulo de inclinación de la región C-terminal de la TM9 de PS1 ( $I_{TM9-CT}$ ) en función del tiempo de las simulaciones atomísticas de 5FN2 y 5FN3.

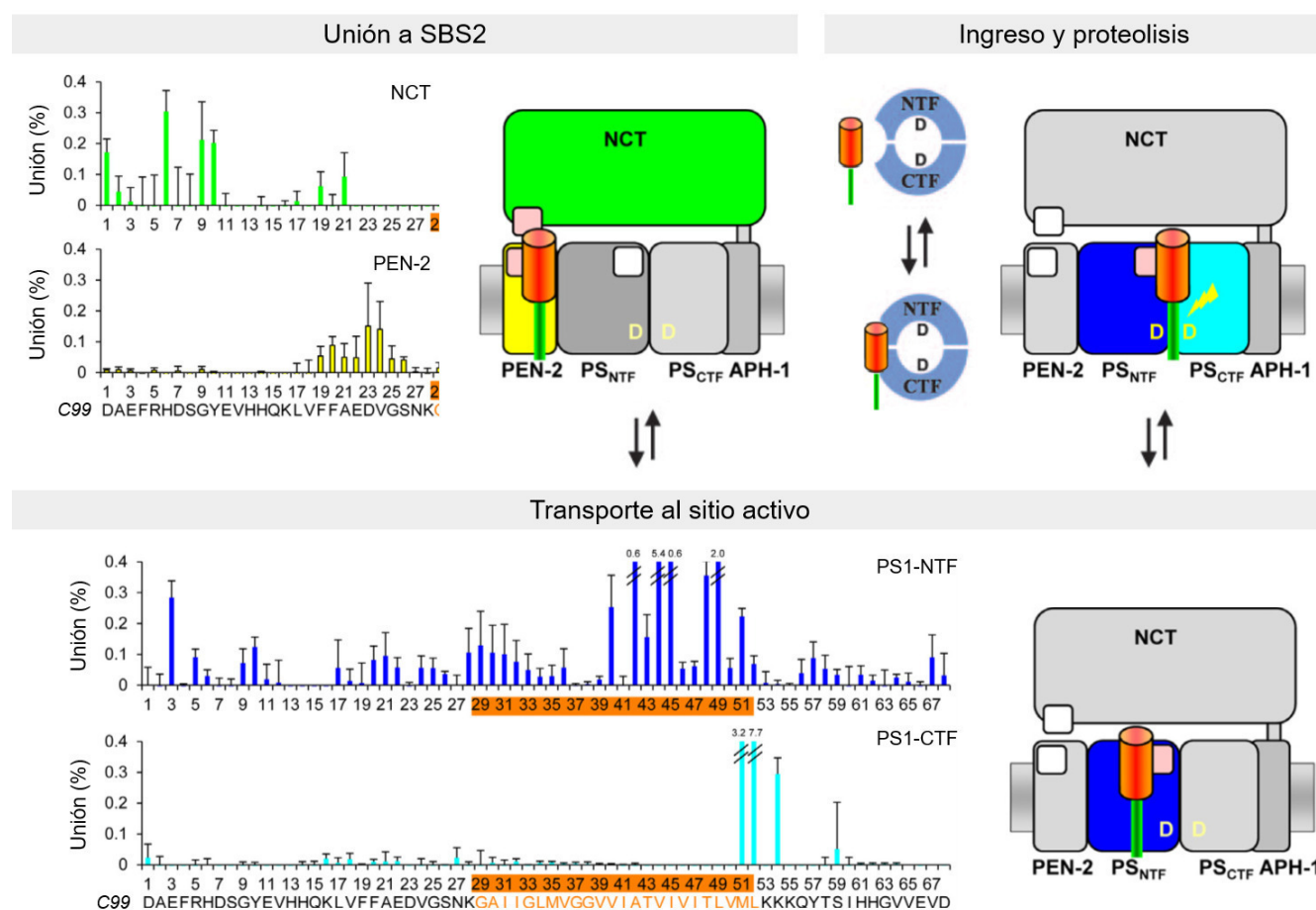




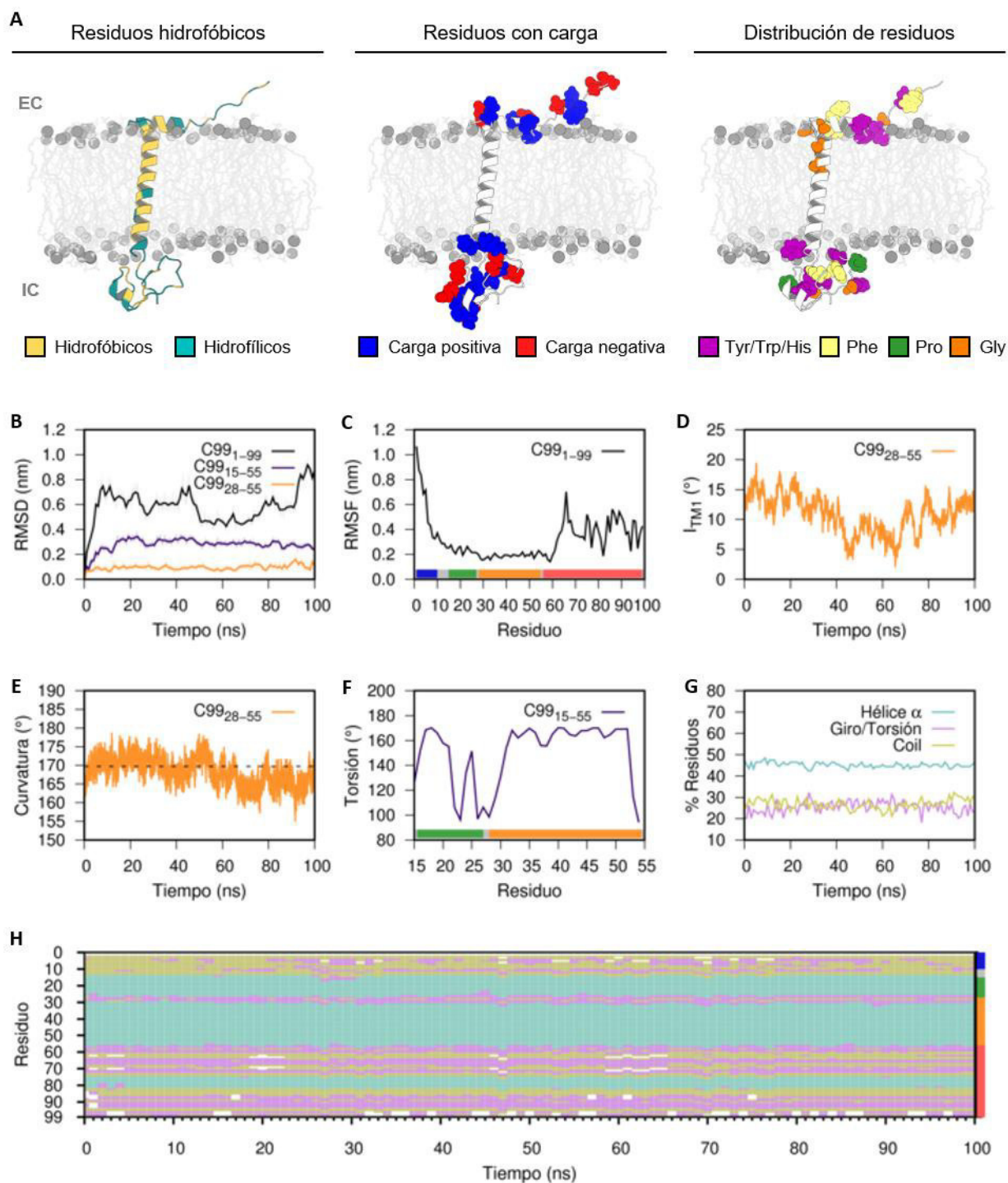
**Figura A3.22.** Perfiles de potencial de fuerza media (PMF) e histogramas de las configuraciones en función de la coordenada de reacción ( $\xi$ ) de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  en el *Canal 1* de los diferentes tautómeros (NE/ND) y protómero (NP) del núcleo de imidazol de los residuos His171 e His197 en el modelo de 5FN3.

XVI.4. Apéndice IV

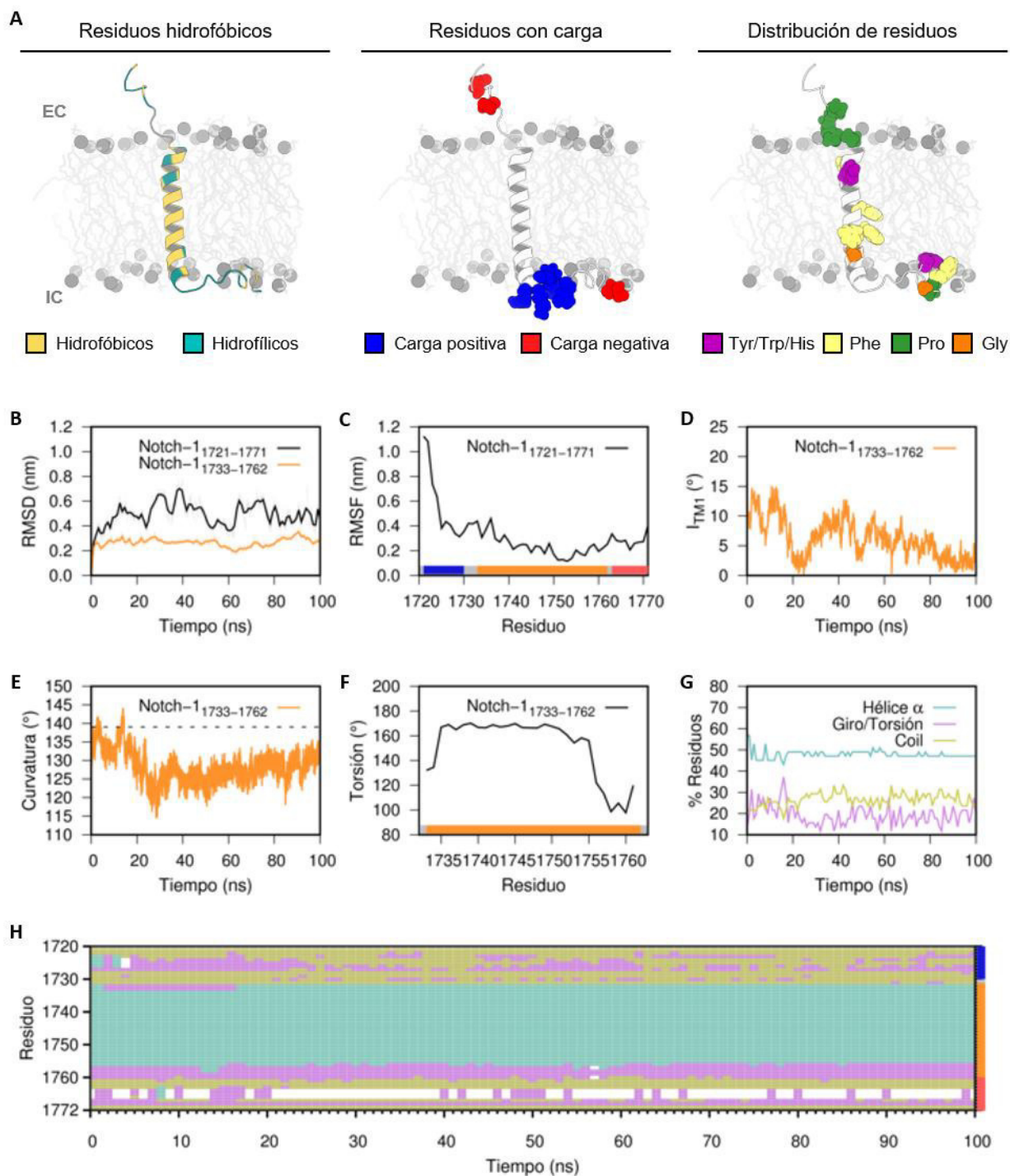
En este apéndice se reporta la información complementaria a la caracterización de los posibles sitios de reconocimiento de los sustratos C99 y Notch-1 por parte del complejo enzimático de  $\gamma$ -secretasa. La *Figura A4.1* muestra los datos experimentales reportados por Fukumori y Steiner para la descripción del sitio inicial de reconocimiento de C99 y el mecanismo de traslado hacia el sitio activo de PS1. En las *Figuras A4.2* y *A4.3* se reportan los datos provenientes de la caracterización estructural y dinámica de los sustratos C99 y Notch-1 obtenidos a partir de simulaciones atómicas de 100 ns. Por último, las *Figuras A.4.4* y *A.4.5* contienen información del número de contactos promedio de los sustratos C99 y Notch-1 para cada una de las 20 réplicas de los últimos 3  $\mu$ s de simulación de grano grueso (CG) realizadas con el sistema 5FN2 del complejo de  $\gamma$ -secretasa.



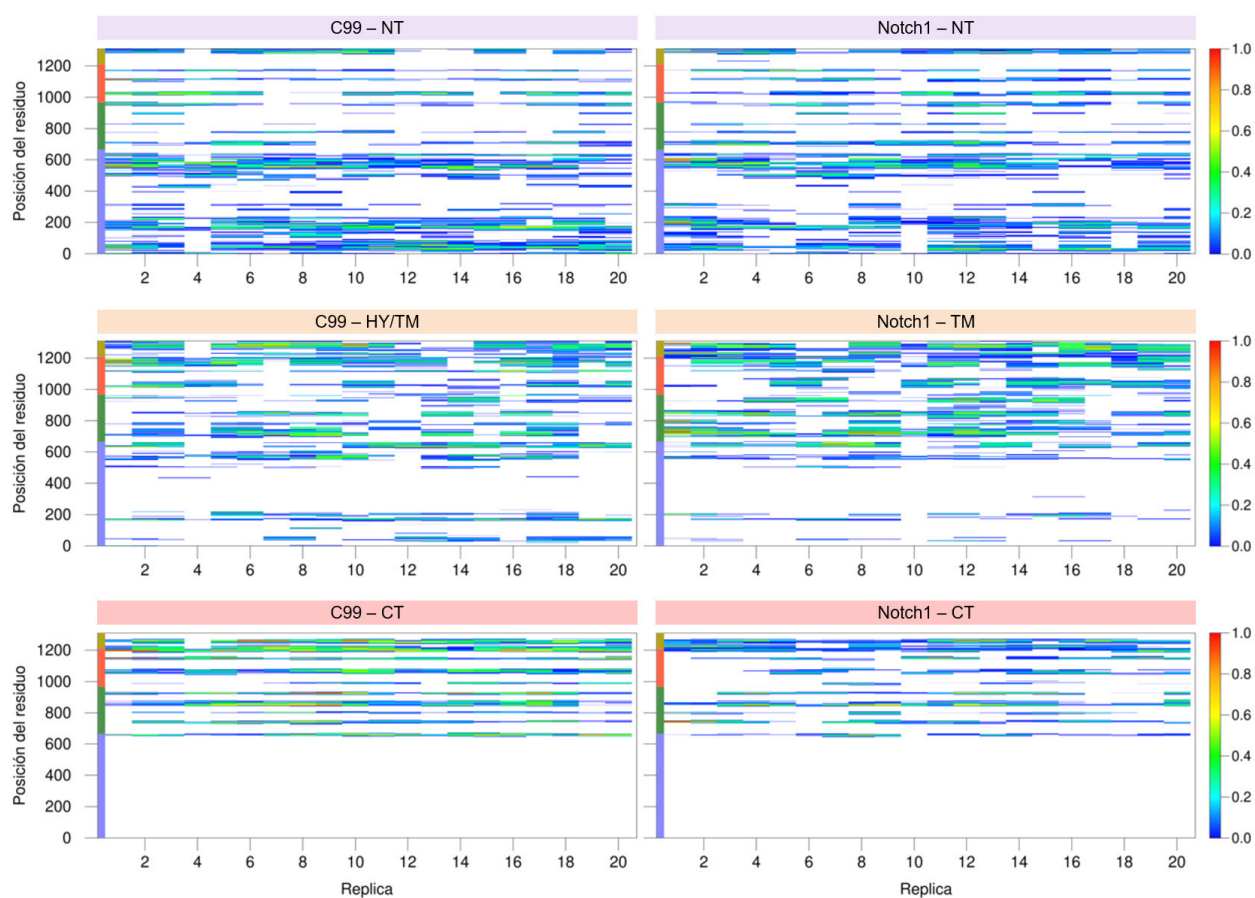
**Figura A4.1.** Información experimental referente al porcentaje de unión de C99 (rojo/verde) a las subunidades PEN-2 (amarillo), NCT (verde) y los fragmentos N-terminal (PS1-NTF) y C-terminal (PS1-CTF) de PS1 del complejo de  $\gamma$ -secretasa. Los gráficos se acompañan por una descripción esquemática de los diferentes sitios con los que entra en contacto C99 durante su traslado al sitio activo. En la primera sección (arriba a la izquierda) se muestran los datos referentes al primer sitio de reconocimiento de C99 que involucra la interacción de su segmento NT con PEN-2 y NCT. El esquema en la parte inferior muestra el sitio de reconocimiento de la TM de C99 por parte de PS1-NTF y los residuos involucrados en la interacción. La última sección (arriba a la derecha) muestra la posición final de C99 para ser ingresado y proteolizado en el sitio activo. La información y esquemas fueron extraídos de las publicaciones de Watanabe<sup>73</sup>, Fukumori<sup>74</sup> y Kornilova<sup>181</sup>.



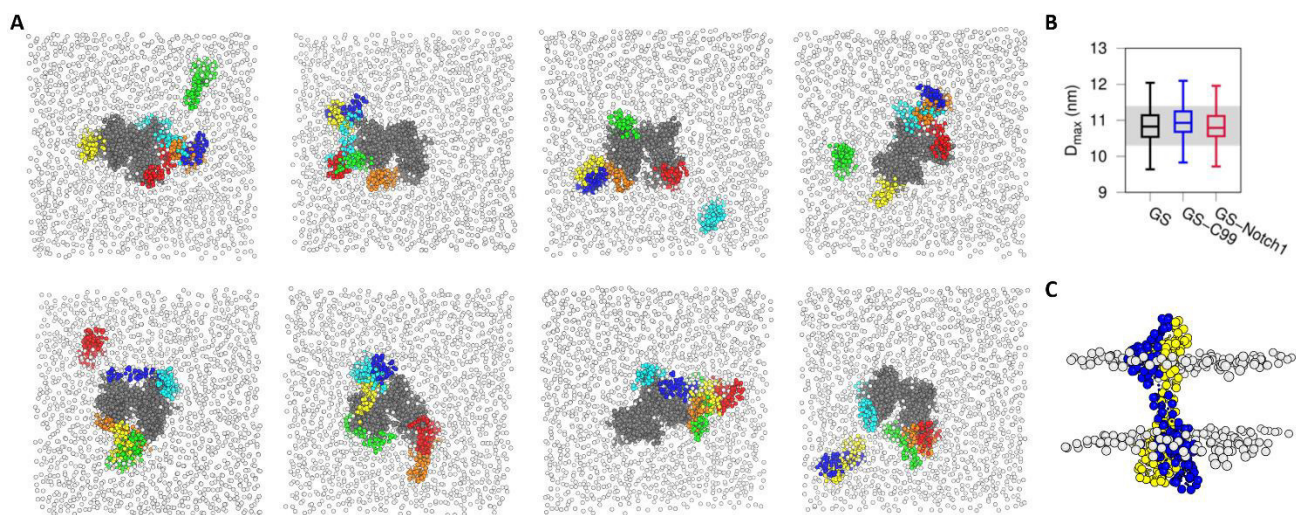
**Figura A4.2.** Sustrato C99. (A) Representación de la distribución de los aminoácidos con propiedades hidrofóbicas, carga, aromáticos (Tyr, Trp, His y Phe) y modificadores de hélices transmembranales (Pro y Gly). (B) Gráfico de RMSD de la estructura completa de C99<sub>1-99</sub> y los segmentos transmembranales (C99<sub>15-55</sub> y C99<sub>28-55</sub>). (C) RMSF por residuo de las cadenas laterales del sistema C99<sub>1-99</sub>. (D) Ángulo de inclinación de la hélice transmembranal C99<sub>28-55</sub>. (E) Curvatura de C99<sub>28-55</sub> durante los 100 ns de simulación. (F) Ángulo de torsión por residuo del segmento yuxtamembranal y transmembranal (C99<sub>15-55</sub>). Análisis de la estructura secundaria determinado por (G) porcentaje de residuos y (H) residuo a través del tiempo de simulación.



**Figura A4.3.** Sustrato Notch-1. (A) Representación de la distribución de los aminoácidos con propiedades hidrofóbicas, carga, aromáticos (Tyr, Trp, His y Phe) y modificadores de hélices transmembranales (Pro y Gly). (B) Gráfico de RMSD de la estructura completa de Notch-1<sub>1721-1771</sub> y la hélice transmembranal (Notch-1<sub>1733-1762</sub>). (C) RMSF por residuo de las cadenas laterales del sistema Notch-1<sub>1721-1771</sub>. (D) Ángulo de inclinación de la hélice transmembranal. (E) Curvatura de la hélice durante los 100 ns de simulación. (F) Ángulo de torsión por residuo del segmento transmembranal. Análisis de la estructura secundaria determinado por (G) porcentaje de residuos y (H) residuo a través del tiempo de simulación.



**Figura A4.4.** Fracción de contactos promedio calculado a partir de las 6 unidades del sustrato presentes en las 20 réplicas de simulación de CG del complejo de  $\gamma$ -secretasa. Los gráficos se dividen de acuerdo con los segmentos N-terminal (NT), transmembranal (TM) y C-terminal (CT) estudiados para los sustratos C99 y Notch-1. El rango de colores indica los sitios de mayor (1.0, rojo) a menor (0.001, azul) fracción del número de contactos. La posición del residuo se delimita por la barra de cuatro colores que indica la región perteneciente a NCT (violeta), PS1 (verde), APH-1A (naranja) y PEN-2.



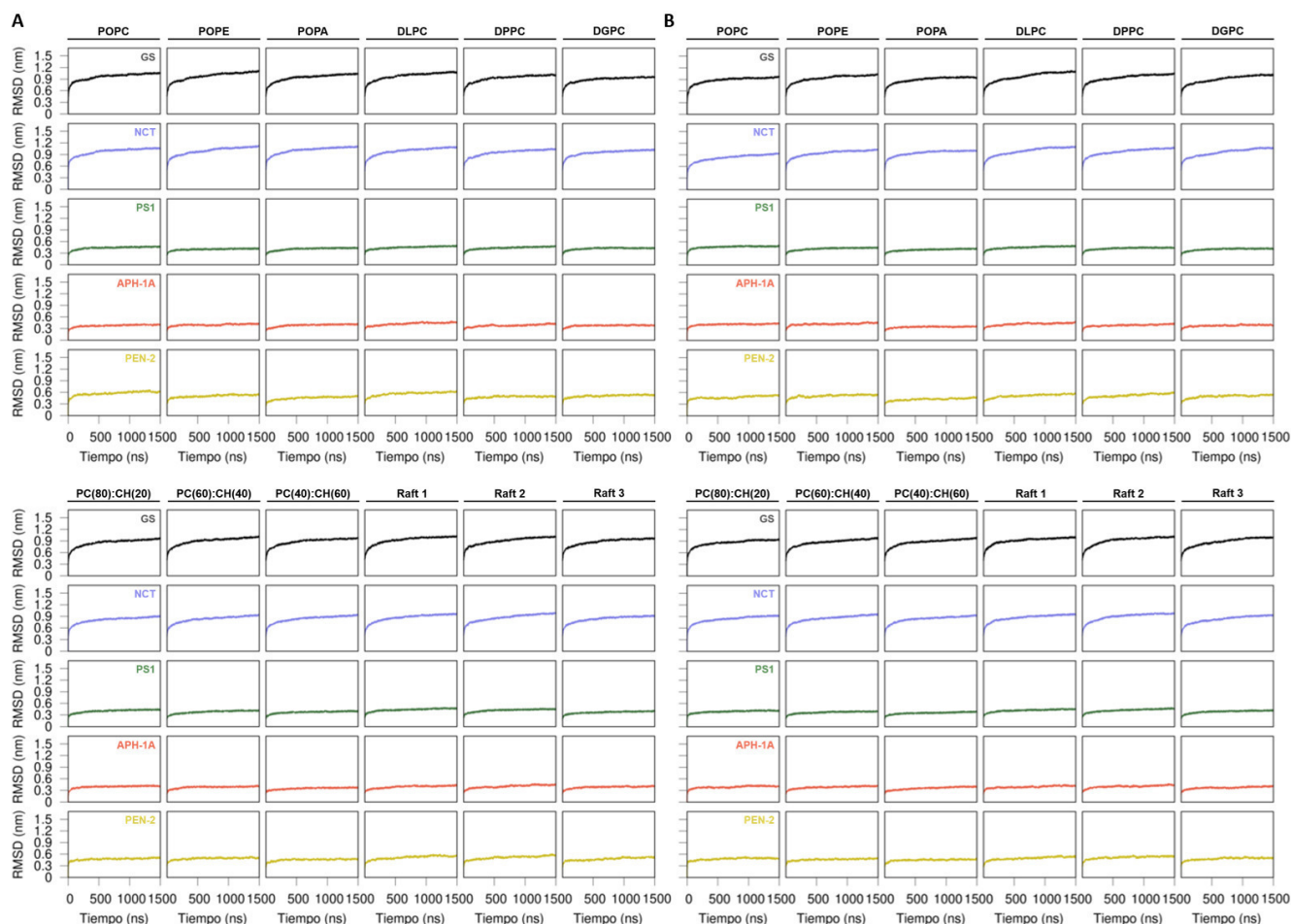
**Figura A4.5.** (A) Representación de la formación de homomultímeros de C99 (azul, cian, verde, amarillo, naranja y rojo) y su asociación con el complejo de  $\gamma$ -secretasa (gris) en la membrana de POPC (esferas blancas) durante las simulaciones de CG. (B) Distancia máxima ( $D_{max}$ ) de  $\gamma$ -secretasa en los sistemas con (azul y rojo) y sin sustrato (negro). (C) Representación 3D de la formación de un dímero de C99 observado durante las simulaciones.

XVI.5. Apéndice V

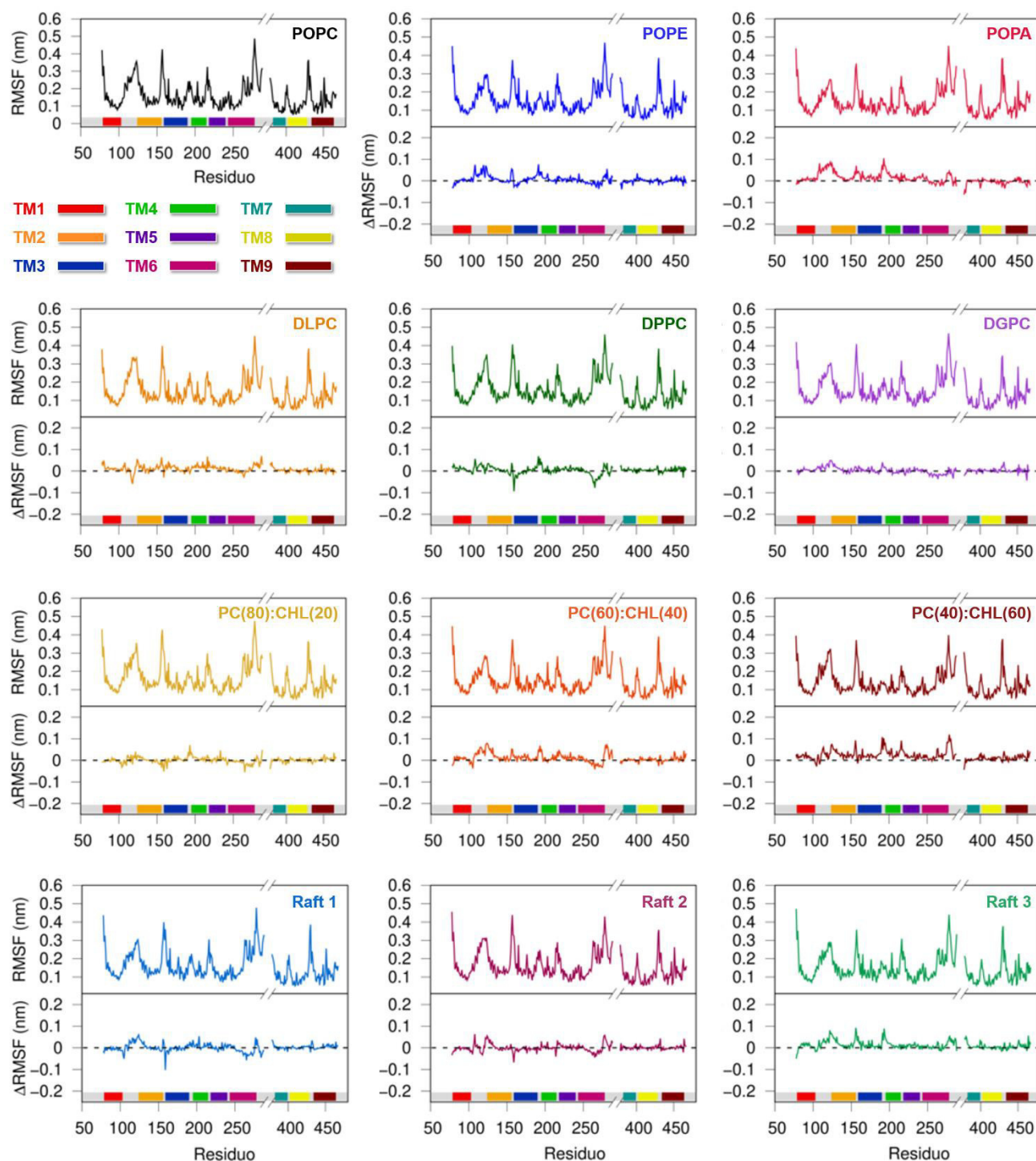
En las subsecciones de este apéndice se reporta información complementaria referente a los estudios de dinámica molecular (MD) realizados para la caracterización de factores que alteran el ensamble conformacional y actividad del complejo de  $\gamma$ -secretasa. Los resultados se exponen de acuerdo con los siguientes apartados: (1) efecto de la composición de la membrana, (2) interacción del inhibidor DAPT con el sitio activo de PS1 e (3) inestabilidad de  $\gamma$ -secretasa por mutaciones en PS1.

XVI.5.1. Efecto de la composición de la membrana

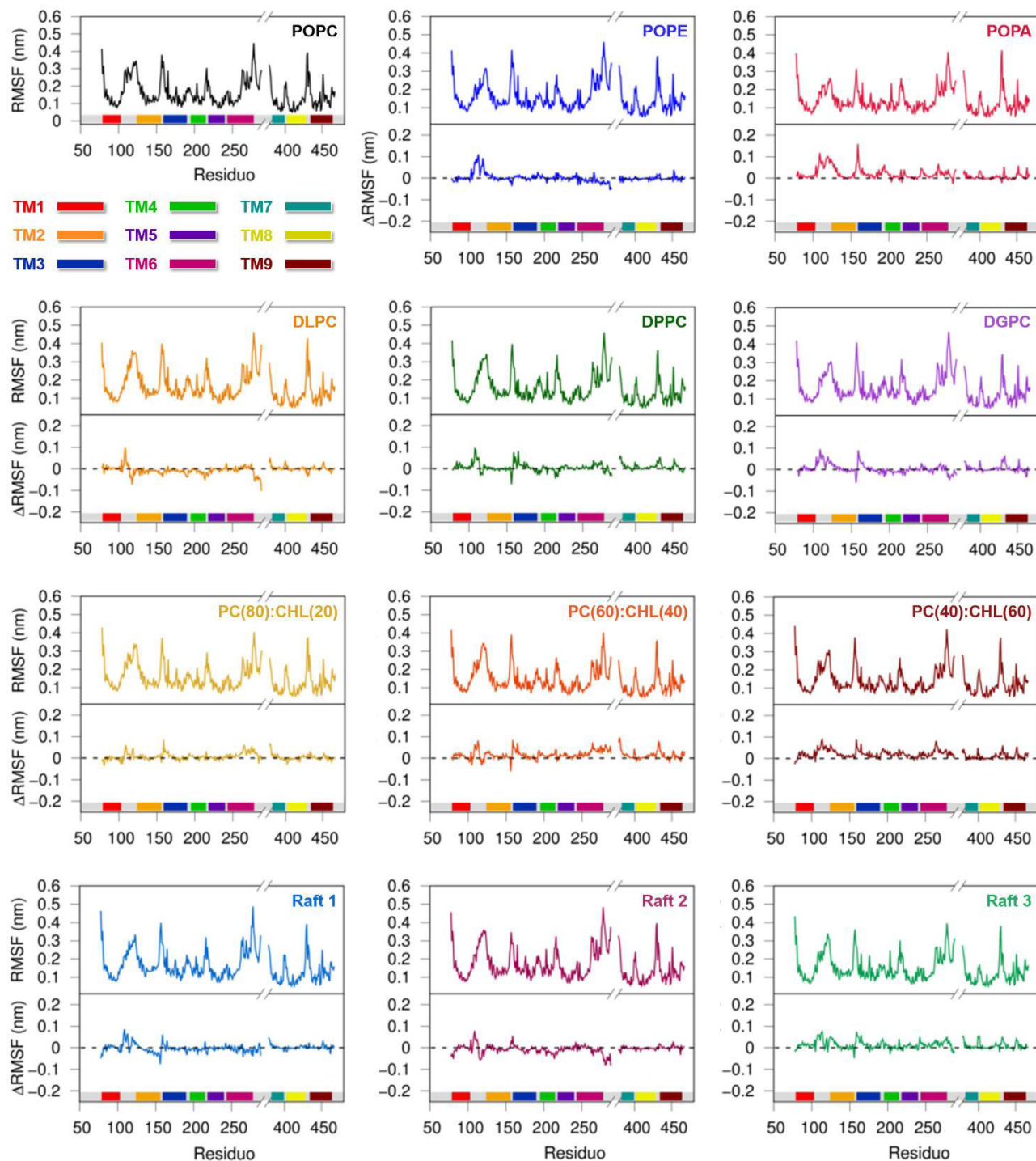
Para el análisis de RMSD, RMSF e inclinación y torsión de las hélices transmembranales (TMs) en las simulaciones de grano grueso (CG) se promedió la información de las 20 trayectorias de 1.5  $\mu$ s para cada uno de los sistemas evaluados. En los diagramas de fluctuaciones por residuo de las simulaciones de CG y atomísticas se calculó la diferencia ( $\Delta$ RMSF) entre el RMSF de la simulación en membrana de POPC con el RMSF del sistema a comparar.



**Figura A5.1.** RMSD promedio de las 20 trayectorias de CG en los estados (A) desprotonado ( $\text{Asp}^-$ ) y (B) monoprotonado ( $\text{Asp-H}_{385}$ ) del sistema 5FN2 de  $\gamma$ -secretasa (negro), y de sus componentes: NCT (morado), PS1 (verde), APH-1A (naranja) y PEN-2 (amarillo), en las 12 bicapas lipídicas estudiadas.

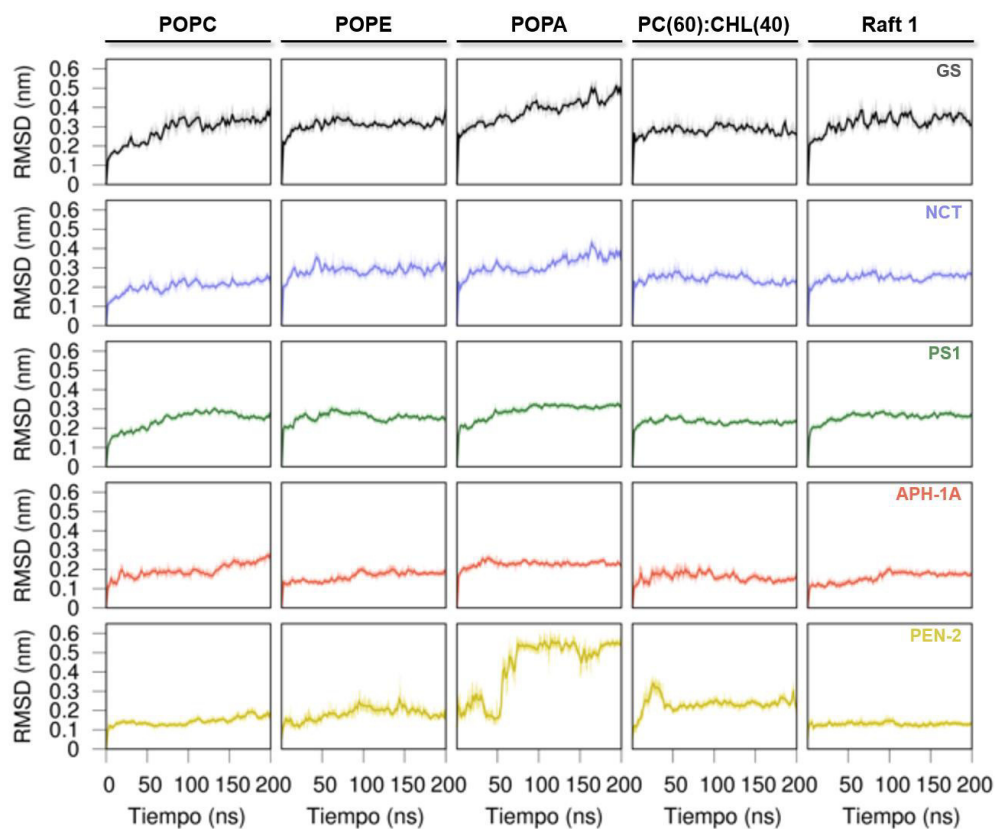


**Figura A5.2.** RMSF promedio por residuo y  $\Delta$ RMSF (diferencia con POPC) de las 20 simulaciones de CG en el estado desprotonado (Asp) de Asp385 del modelo 5FN2 en los sistemas con membranas de POPC, POPE, POPA, DLPC, DPPC, DGPC, POPC(80):CHOL(20), POPC(60):CHOL(40), POPC(40):CHOL(60) y las balsas lipídicas *Raft 1*, *Raft 2* y *Raft 3*.

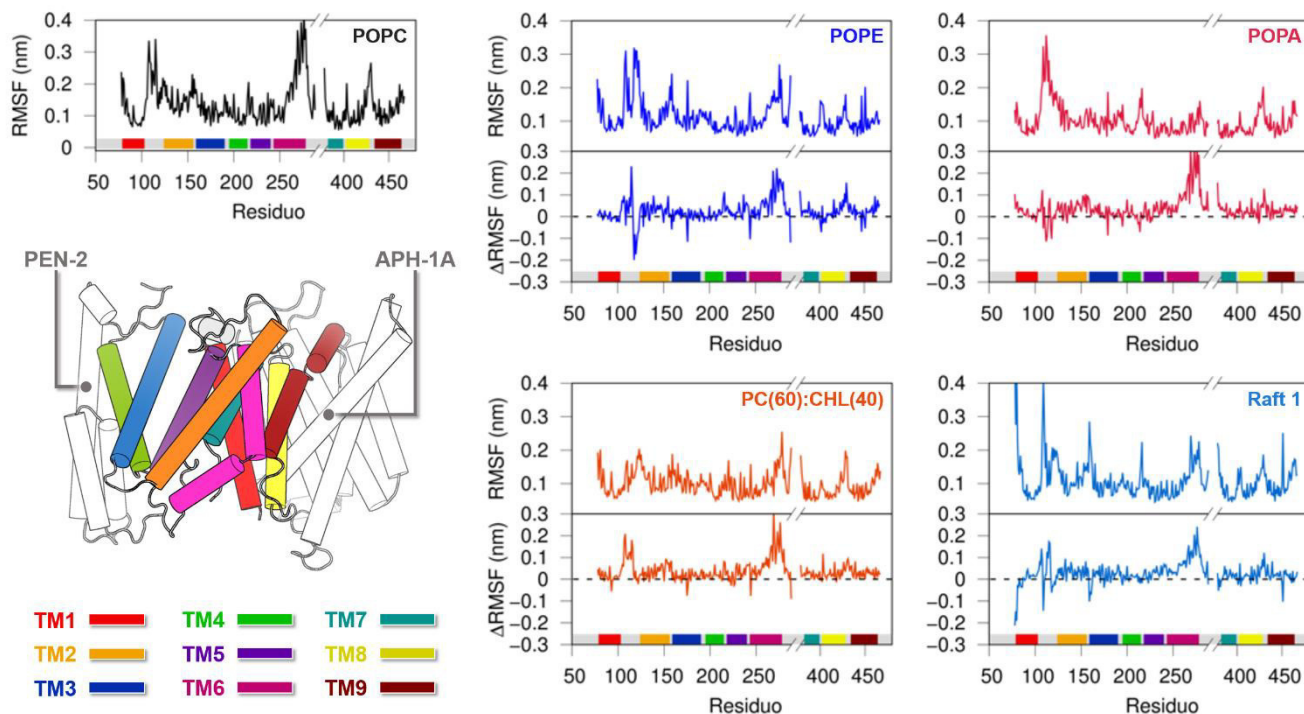


**Figura A5.3.** RMSF promedio por residuo y  $\Delta$ RMSF (diferencia con POPC) de las 20 simulaciones de CG en el estado protonado (Asp-H<sub>385</sub>) de Asp385 del modelo 5FN2 en los sistemas con membranas de POPC, POPE, POPA, DLPC, DPPC, DGPC, POPC(80):CHOL(20), POPC(60):CHOL(40), POPC(40):CHOL(60) y las balsas lipídicas *Raft 1*, *Raft 2* y *Raft 3*.

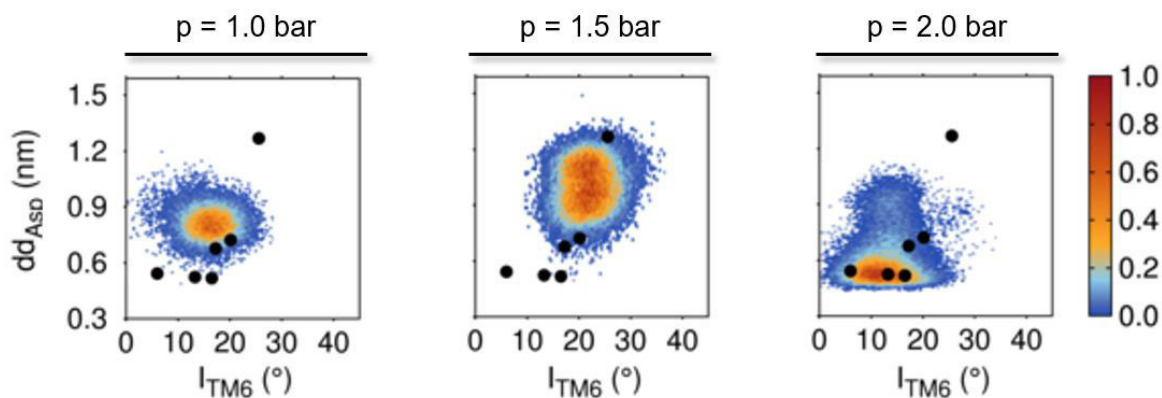




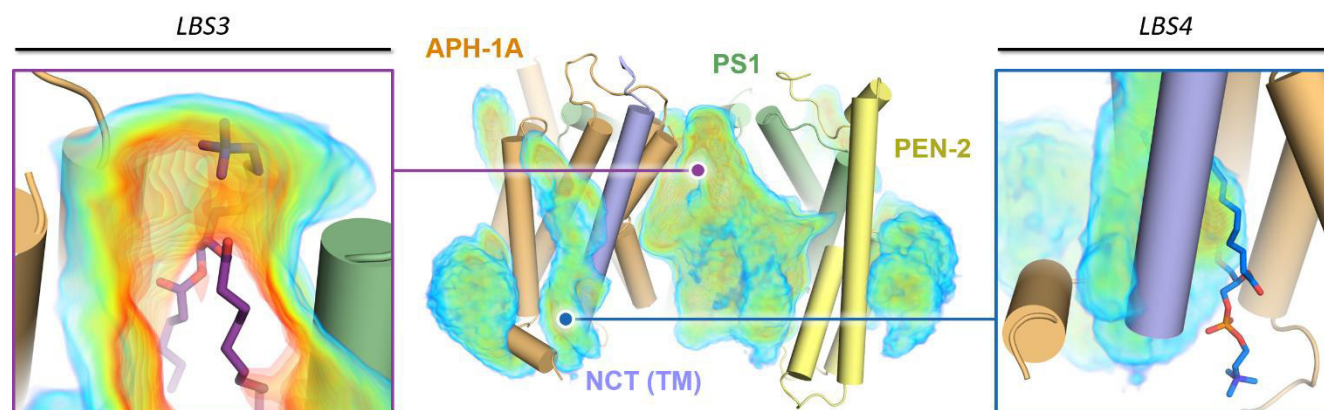
**Figura A5.4.** RMSD de las simulaciones atómicas con las membranas de POPC, POPE, POPA, POPC(60):CHOL(40) y la balsa lipídica *Raft 1* del sistema 5FN2 de  $\gamma$ -secretasa (negro): NCT (morado), PS1 (verde), APH-1A (naranja) y PEN-2 (amarillo).



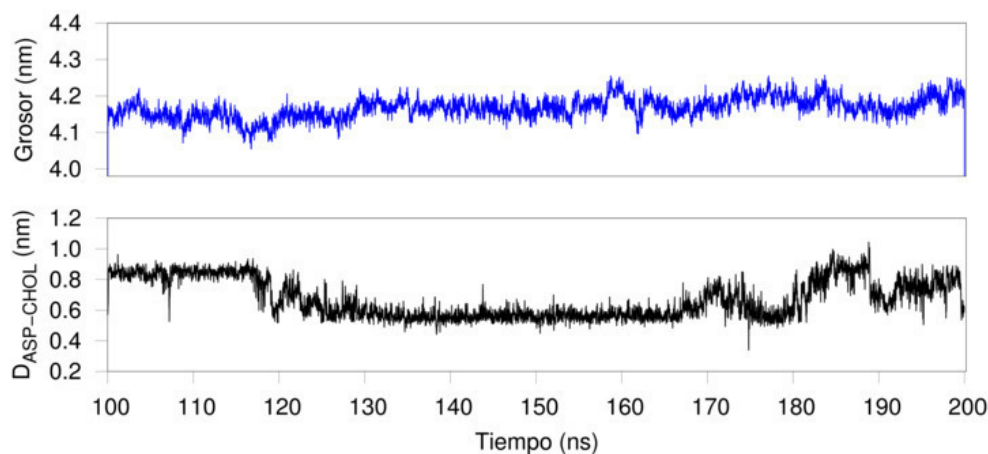
**Figura A5.5.** RMSF por residuo y  $\Delta$ RMSF (diferencia con POPC) de las simulaciones atómicas con las membranas de POPC, POPE, POPA, POPC(60):CHOL(40) y la balsa lipídica *Raft 1* del sistema 5FN2 de  $\gamma$ -secretasa.



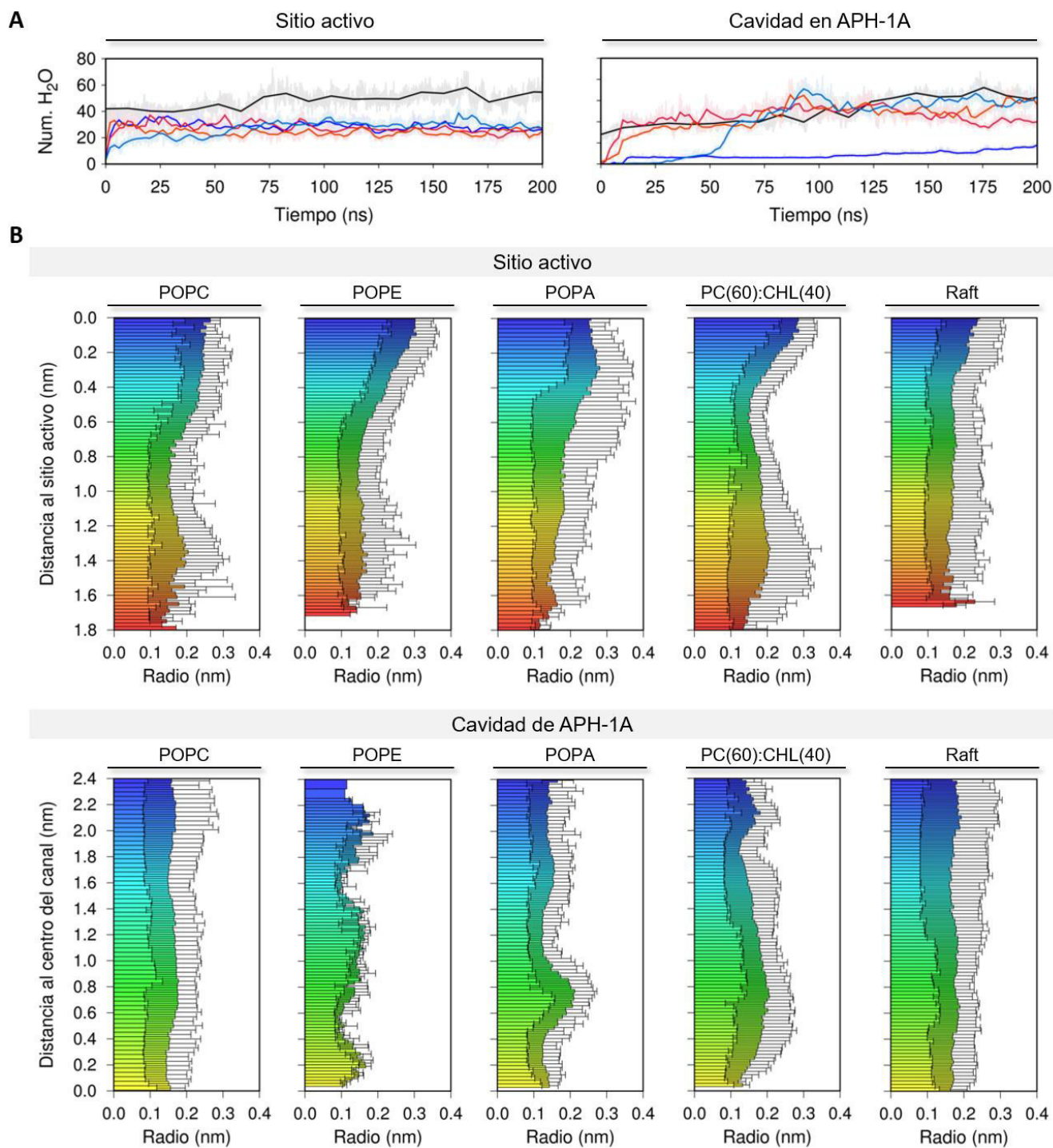
**Figura A5.6.** Distribución conformacional de la distancia entre los residuos de aspártico catalíticos ( $dd_{Asp}$ ) y el ángulo de inclinación de TM6 ( $I_{TM6}$ ) en función del tiempo de simulación obtenido para las trayectorias de 1  $\mu$ s de CG del sistema 5FN2 Asp<sup>-</sup> evaluado a diferentes presiones en el plano XY ( $p$ ).



**Figura A5.7.** Representación tridimensional de los mapas de distribución de los sitios de unión de lípidos LBS3 y LBS4, en los que además se muestran los lípidos de DSPC resueltos en la estructura del PDB 5A63.



**Figura A5.8.** (A) Evolución temporal del grosor de la membrana POPC(60):CHOL(40) en la simulación atómica R1 con el modelo de  $\gamma$ -secretasa 5FN2 y (B) la distancia mínima entre las moléculas de colesterol y los residuos de aspártico catalíticos ( $D_{ASP-CHOL}$ ) durante la misma simulación.



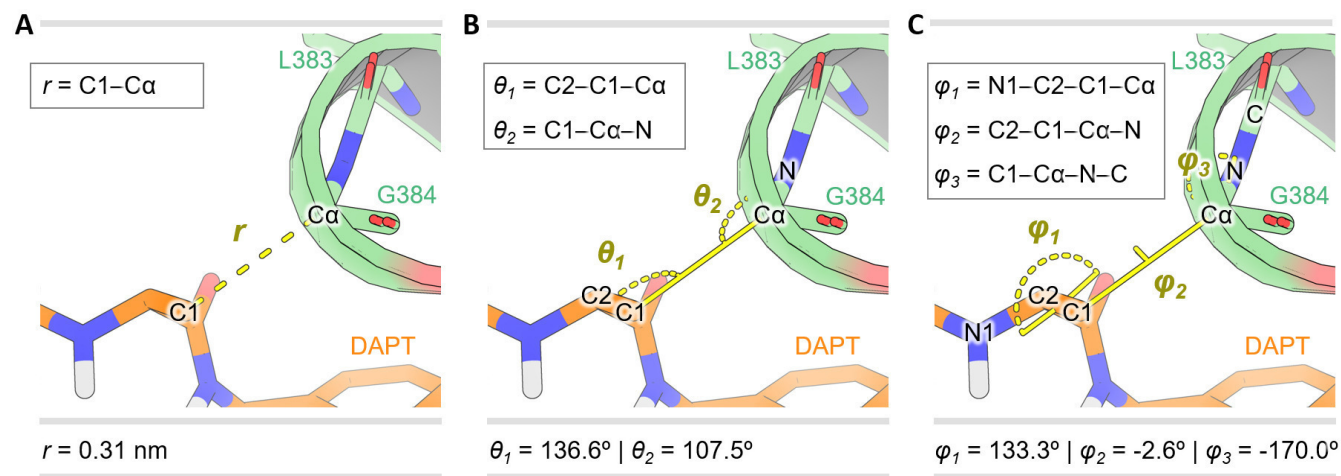
**Figura A5.9.** (A) Número de moléculas de agua identificadas en el sitio activo y la cavidad de APH-1A durante las simulaciones atomísticas del sistema 5FN2 de  $\gamma$ -secretasa en membranas de POPC (negro), POPE (azul), POPA (rojo), POPC(60):CHOL(40) (naranja) y *Raft 1* (azul claro). (B) Los histogramas representan el valor promedio del radio obtenido durante el análisis de la cavidad del sitio activo y la primera sección del canal de APH-1A, así como el valor mínimo y máximo del radio durante el tiempo simulado. El radio del átomo de prueba fue de 0.08 nm para el sitio activo y 0.09 para el canal de APH-1A. Los gráficos se encuentran coloreados en un rango de menor (azul) a mayor (rojo) distancia del átomo de prueba con respecto a los residuos de aspártico catalíticos.

**Tabla A5.1.** Aminoácidos que constituyen los sitios de unión a lípidos (LBS) y colesterol (CBS)

Sitios de unión	Subunidad	Aminoácidos
<b>SBS1</b>	PS1	I416, C419, L420, L423, L424, I427, F428, K430, P433, I437, F441, V444
	APH-1A	L30, I33, A37, F40, F41, V44, L81, L82, V85, F86, F88, A89, K92, L93, K96, A97, L101, Y187, L190, V194, L198
<b>SBS2</b>	PS1	W203, V207, I211, W215
	PEN-2	R16, K17, Y19, L20, G21, F23, F25, W30, Y56, W58, R59, V62, L65, F66, W67, I69, V70
<b>LBS1</b>	PS1	Q112, I114, Y115, V142, M146, L149, W165, I168, S169, L172, L173, F176, F177, M233, V236, F237, Y240
<b>LBS2</b>	PS1	V125, R128, A129, L130, I133, L134, I140, I143, E243, W244, L248, I249, V252, T256
<b>LBS3</b>	PS1	V87, T90, L91, V94, V95, A98, K101, S102, Y181, L182, Y189, L201, F205, R220, L221, A224, I227, M228, W404, T407, I408, F411
	PEN-2	F28, L31
<b>LBS4</b>	NCT	E667, L670, I671, T674, V675, F677, G678, I679, F682, I685, V686, C689, I690, K693, L697
	APH-1A	P16, L20, Y119, L158, T159, F162, L169, F173, L215, Y218, V222, L226, F229, L236, R237, I239, Q240, S242, L243, L244
<b>CBS1</b>	PS1	K160, V161, A164, W165, I168, L171, L172, F175, F176
<b>CBS2</b>	PS1	V125, A129, L130, I133, L134, A136, I140, V144, W244, L248, I249, A251, V252, V255, T256, L258, V259, C263, P264
<b>CBS3</b>	PS1	V82, I416, C419, L420, L423, L424, F428, A434, I437, V444
	APH-1A	L30, I33, A37, F40, F41, L93, L101
<b>CBS4</b>	APH-1A	L56, T60, R66, L67, Y69, G70, L71, I73, F74, A77, L81, V194, G195, L198, G202, F205
<b>CBS5</b>	NCT	I671, V675, I679, F682, V686, C689, I690, K693, L697
	APH-1A	G27, Y155, L158, F162, F173, G225, F229, I239, S242, L243
<b>CBS6</b>	PS1	Y181, L182, V185, F186, Y189, V191, L201, F205, R220, L221, A224, M228
	PEN-2	F28
<b>CBS7</b>	PEN-2	F66, I69, V70, S73, W74, I77, Y81, W85, L88

XVI.5.2. Interacción del inhibidor DAPT con el sitio activo de PS1

La Figura A5.10 muestra el esquema de restricciones de distancia ( $r$ ), ángulos ( $\theta$ ) y ángulos diedros ( $\varphi$ ) de la forma acoplada del compuesto DAPT en el sitio activo de PS1 empleado para el cálculo de la energía libre de unión con el método de perturbación de la energía libre (FEP).



**Figura A5.10.** Representación de las restricciones de (A) distancia ( $r$ ), (B) ángulos ( $\theta$ ) y (C) ángulos diedros ( $\varphi$ ) de la forma acoplada de DAPT (naranja) con los residuos Leu383 y Gly384 (verde) del componente PS1 de  $\gamma$ -secretasa. Los recuadros en las figuras muestran la nomenclatura y orden de asignación de los átomos involucrados en la restricción. Los valores de la distancia y ángulos respectivos se reportan en la parte inferior de las figuras.

Las restricciones en la forma desacoplada de DAPT ( $\Delta G_{restr}^{solv}$ ) fueron calculadas de forma analítica usando la ecuación de Boresch *et al*<sup>247</sup>:

$$\Delta G_{restr}^{solv} = RT \ln \left[ \frac{8\pi^2 V^0}{r_0^2 \sin\theta_{1,0} \sin\theta_{2,0}} \frac{(K_r K_{\theta_1} K_{\theta_2} K_{\varphi_1} K_{\varphi_2} K_{\varphi_3})^{1/2}}{(2\pi kT)^3} \right]$$

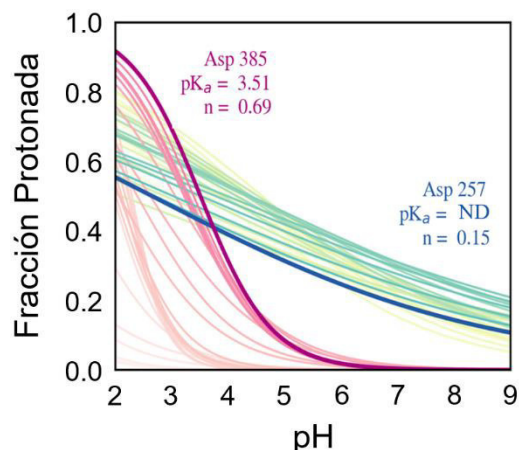
Donde  $R$  es la constante del gas ideal [ $1.987 \times 10^{-3} \text{ kcal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ];  $T$  es la temperatura [310 K];  $V^0$  es el volumen correspondiente al estado estándar uno molar [ $1.66 \text{ nm}^3$ ];  $r_0$  es la distancia de referencia de la restricción [0.31 nm];  $\theta_1$  y  $\theta_2$  son los ángulos de restricción ( $\theta_1 = 136.6^\circ$  y  $\theta_2 = 107.5^\circ$ );  $K_x$  es la constante de fuerza para las restricciones de distancia ( $K_r = 1000 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ ), de los dos ángulos y los tres ángulos diedros ( $K_{\theta,\varphi} = 10 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ rad}^{-2}$ ).

En la Tabla A5.2 se reporta la energía libre de las transiciones electrostáticas (*elec*) y de dispersión (*vdW*) calculadas con el método *Multistate Bennett Acceptance Ratio* (MBAR) para la obtención de la energía libre de solvatación ( $\Delta G_{solv}$ ) en la forma desacoplada del inhibidor DAPT en agua ( $\Delta G_{elec+vdw}^{agua}$ ) y en la membrana de POPC ( $\Delta G_{elec+vdw}^{POPC}$ ). Asimismo, se reportan las transiciones de DAPT en el complejo GS-DAPT tomando en cuenta el efecto de las restricciones (*restr*) y el estado desprotonado ( $\Delta G_{elec+vdw+restr}^{GS\_desprot}$ ) y protonado ( $\Delta G_{elec+vdw+restr}^{GS\_prot}$ ) del residuo catalítico Asp257.

**Tabla A5.2.** Energía libre de las transiciones calculadas con el método *Multistate Bennett Acceptance Ratio* (MBAR)

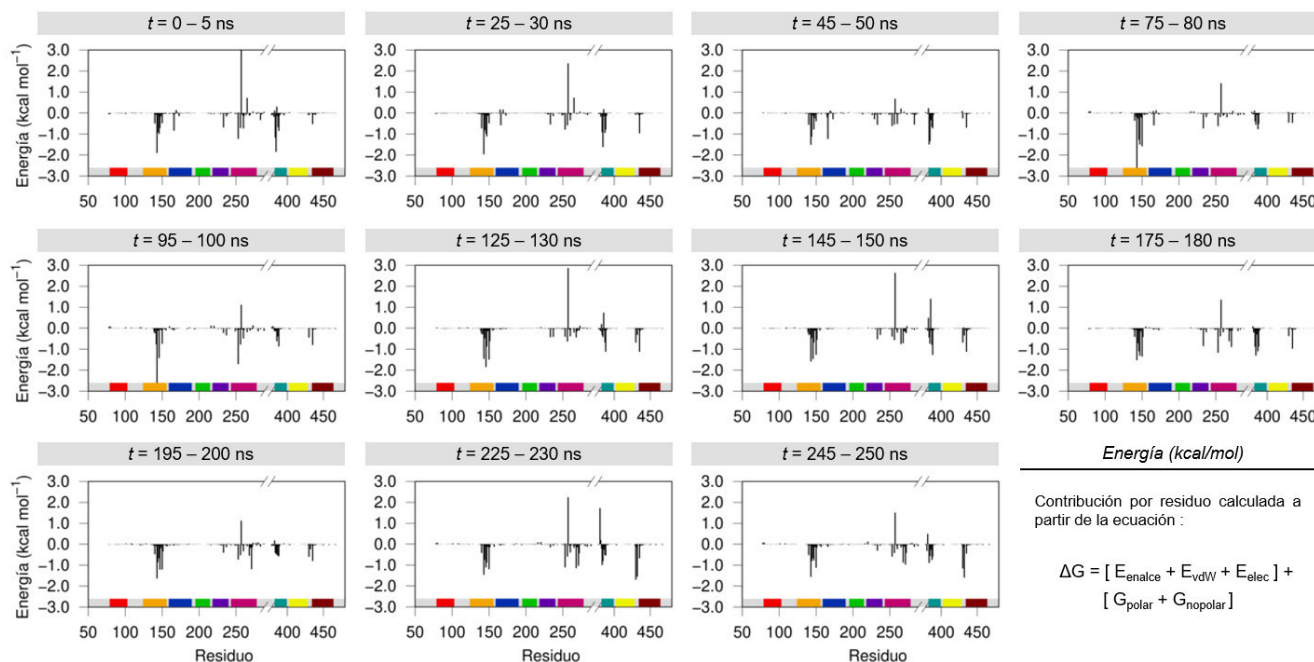
Estados	MBAR (kcal mol <sup>-1</sup> )			
	DAPT (ligando)		GS-DAPT (complejo)	
	$\Delta G_{elec+vdw}^{agua}$	$\Delta G_{elec+vdw}^{POPC}$	$\Delta G_{elec+vdw+restr}^{GS\_desprot}$	$\Delta G_{elec+vdw+restr}^{GS\_prot}$
0 – 1	4.748 ± 0.011	3.142 ± 0.002	0.404 ± 0.001	0.334 ± 0.001
1 – 2	3.960 ± 0.008	2.503 ± 0.002	0.565 ± 0.001	0.441 ± 0.001
2 – 3	3.258 ± 0.006	1.925 ± 0.002	0.841 ± 0.001	0.605 ± 0.001
3 – 4	2.617 ± 0.005	1.371 ± 0.002	0.730 ± 0.001	0.484 ± 0.001
4 – 5	2.038 ± 0.004	0.891 ± 0.002	0.639 ± 0.001	0.402 ± 0.001
5 – 6	1.534 ± 0.003	0.524 ± 0.002	1.071 ± 0.002	0.658 ± 0.001
6 – 7	1.101 ± 0.002	0.266 ± 0.002	0.877 ± 0.001	0.548 ± 0.001
7 – 8	0.728 ± 0.002	0.084 ± 0.002	1.390 ± 0.003	0.931 ± 0.002
8 – 9	0.394 ± 0.002	-0.057 ± 0.003	1.951 ± 0.008	1.528 ± 0.004
9 – 10	0.069 ± 0.002	-0.185 ± 0.003	1.646 ± 0.006	1.571 ± 0.006
10 – 11	1.079 ± 0.001	1.809 ± 0.004	1.245 ± 0.002	1.337 ± 0.007
11 – 12	1.051 ± 0.001	1.780 ± 0.005	1.194 ± 0.002	1.600 ± 0.014
12 – 13	1.018 ± 0.001	1.704 ± 0.006	0.914 ± 0.002	0.974 ± 0.007
13 – 14	0.979 ± 0.001	1.603 ± 0.008	0.725 ± 0.002	0.661 ± 0.002
14 – 15	0.935 ± 0.001	1.520 ± 0.010	0.591 ± 0.002	0.494 ± 0.001
15 – 16	0.885 ± 0.001	1.450 ± 0.012	0.483 ± 0.002	0.378 ± 0.001
16 – 17	0.825 ± 0.001	1.385 ± 0.012	0.384 ± 0.002	0.280 ± 0.001
17 – 18	0.753 ± 0.002	1.326 ± 0.010	0.282 ± 0.002	0.182 ± 0.001
18 – 19	0.666 ± 0.002	1.271 ± 0.009	0.169 ± 0.002	0.075 ± 0.001
19 – 20	0.556 ± 0.002	1.192 ± 0.011	0.040 ± 0.002	-0.053 ± 0.001
20 – 21	0.409 ± 0.003	1.082 ± 0.013	-0.105 ± 0.002	-0.210 ± 0.002
21 – 22	0.201 ± 0.004	0.951 ± 0.014	1.653 ± 0.003	1.949 ± 0.002
22 – 23	-0.101 ± 0.006	0.804 ± 0.015	1.678 ± 0.005	1.914 ± 0.003
23 – 24	-0.574 ± 0.01	0.568 ± 0.012	1.688 ± 0.008	1.834 ± 0.005
24 – 25	-1.508 ± 0.018	0.063 ± 0.006	1.674 ± 0.011	1.710 ± 0.009
25 – 26	-2.936 ± 0.021	-0.920 ± 0.016	1.644 ± 0.018	1.574 ± 0.012
26 – 27	-3.346 ± 0.010	-1.762 ± 0.060	1.559 ± 0.023	1.500 ± 0.010
27 – 28	-2.578 ± 0.004	-2.208 ± 0.062	1.407 ± 0.026	1.470 ± 0.006
28 – 29	-1.508 ± 0.002	-1.745 ± 0.039	1.269 ± 0.024	1.432 ± 0.004
29 – 30	-0.477 ± 0.002	-0.752 ± 0.030	1.190 ± 0.022	1.393 ± 0.005
30 – 31	-	-	1.100 ± 0.025	1.377 ± 0.011
31 – 32	-	-	0.985 ± 0.022	1.294 ± 0.022
32 – 33	-	-	0.914 ± 0.012	1.070 ± 0.025
33 – 34	-	-	0.835 ± 0.005	0.890 ± 0.014
34 – 35	-	-	0.652 ± 0.005	0.687 ± 0.006
35 – 36	-	-	0.405 ± 0.005	0.391 ± 0.008
36 – 37	-	-	-0.109 ± 0.005	0.093 ± 0.017
37 – 38	-	-	-0.547 ± 0.010	-0.510 ± 0.010
38 – 39	-	-	-0.505 ± 0.029	-0.633 ± 0.004
39 – 40	-	-	-0.488 ± 0.029	-0.314 ± 0.010
40 – 41	-	-	-0.040 ± 0.027	-0.301 ± 0.034
<b>Coulomb</b>	20.447 ± 0.017	10.465 ± 0.007	16.038 ± 0.013	13.219 ± 0.020
<b>vdW</b>	-3.669 ± 0.033	11.121 ± 0.108	16.964 ± 0.082	18.821 ± 0.060
<b>Total</b>	16.778 ± 0.037	21.587 ± 0.108	33.001 ± 0.083	32.040 ± 0.063

La *Figura A5.11* muestra las curvas de titulación de los residuos catalíticos Asp257 y Asp385 de PS1 en presencia del inhibidor DAPT en el sitio activo obtenidas a partir de las simulaciones de intercambio de réplicas de pH (*pH-REMD*) realizadas por la Q. Dulce Consuelo Guzmán Ocampo en nuestro grupo de investigación.<sup>250</sup> En este gráfico se observa que la curva de Asp257 se encuentra amortiguada debido a su interacción con el residuo Lys265, por lo que no se determinó el valor de pKa de este ácido aspártico.



**Figura A5.11.** Curvas de titulación de los residuos catalíticos Asp257 (azul) y Asp385 (magenta) de PS1 en presencia del ligando DAPT.<sup>250</sup> El degradado de color indica las predicciones de menor (claro) a mayor (oscuro) tiempo de simulación. En la parte superior de las curvas se reporta el valor de pKa y coeficiente de Hill (n) para cada uno de los ácidos aspárticos.

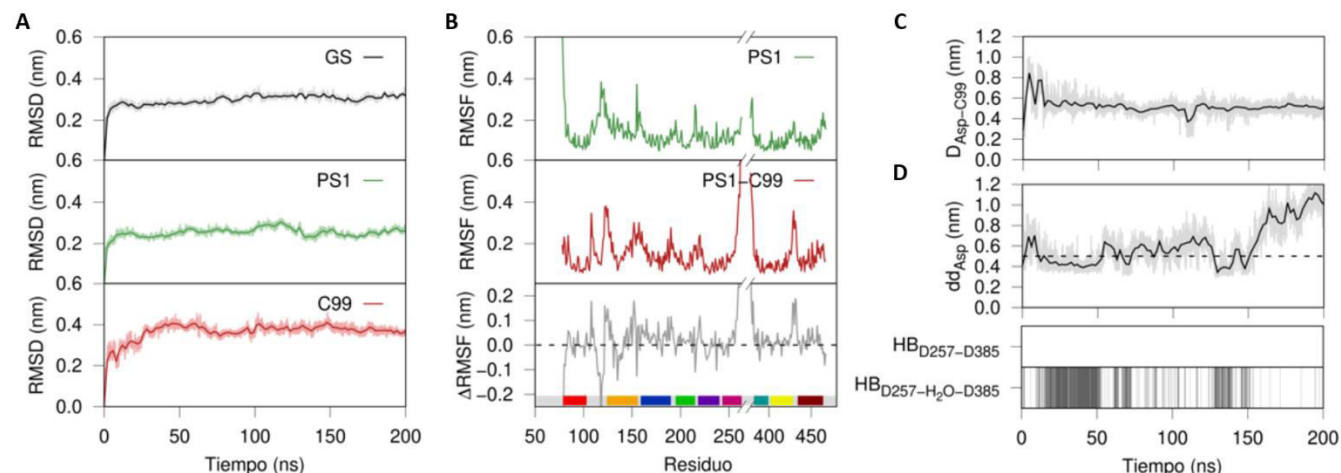
En los gráficos de la *Figura A5.12* se muestra la contribución a la energía libre de unión por aminoácido de la interacción del ligando DAPT con PS1 calculado en 11 diferentes lapsos de tiempo de la simulación atomística de 250 ns. La energía se calculó con el método MM/PBSA implementado en la herramienta *g\_mmpbsa*<sup>166</sup> del programa GROMACS 5.1.4.



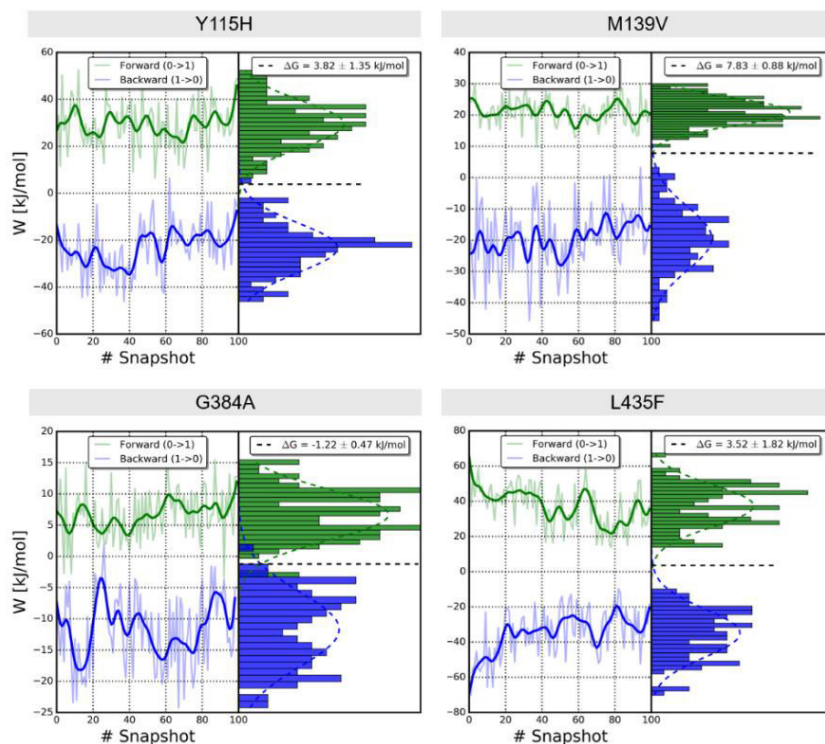
**Figura A5.12.** Contribución a la energía libre de unión por residuo de la interacción del inhibidor DAPT con PS1 en 11 diferentes lapsos de tiempo (*t*) que comprenden varios periodos del inicio y término de la simulación atomística de 250 ns del complejo GS-DAPT.

XVI.5.3. Efecto de las mutaciones de PSEN1 en la producción de péptido A $\beta$

La Figura A5.13 muestra la información complementaria referente a las simulaciones de MD del complejo GS-C99. Por su parte, en la Figura A5.14 se reportan los gráficos de distribución de trabajo generados con el análisis de la intersección de la gaussiana de Crooks (CGI)<sup>260</sup> de las predicciones de termoestabilidad.



**Figura A5.13.** Caracterización dinámica de la forma desprotonada del complejo GS-C99. Gráficos de RMSD de la cadena principal del complejo de  $\gamma$ -secretasa (GS), y C99. (B) RMSF de cadenas laterales por residuo de PS1 en el intervalo 100 a 200 ns de las simulaciones atómicas de 5FN3 en su forma desacoplada (PS1) y acoplada con C99 (PS1-C99). El gráfico inferior muestra la diferencia de los valores de RMSF de PS1-C99 respecto a PS1. (C) Distancia mínima de los aspárticos catalíticos respecto a C99 ( $D_{Asp-C99}$ ). (D) Distancia entre los aspárticos ( $dd_{Asp}$ ) e interacción mediada por la formación de un puente de hidrógeno directo ( $HB_{D257-D385}$ ) y un puente mediado por una molécula de agua ( $HB_{D257-H2O-D385}$ ).



**Figura A5.14.** Resultados de las simulaciones al no equilibrio obtenidas a partir de las simulaciones alquímicas con el complejo GS-C99 para las mutaciones puntuales Y115H, M139V, G384 y L435F del componente PS1. Los gráficos de la izquierda muestran los valores de trabajo ( $W$ ) obtenidos para cada una de las transmutaciones realizadas a los 100 *snapshots* del estado A y estado B del complejo GC-C99. Por su parte, los gráficos de la derecha muestran la distribución de los cálculos obtenidos a partir del análisis con el método de CGI. La línea punteada intermedia muestra la intersección entre las distribuciones, correspondientes al valor de energía libre del sistema.

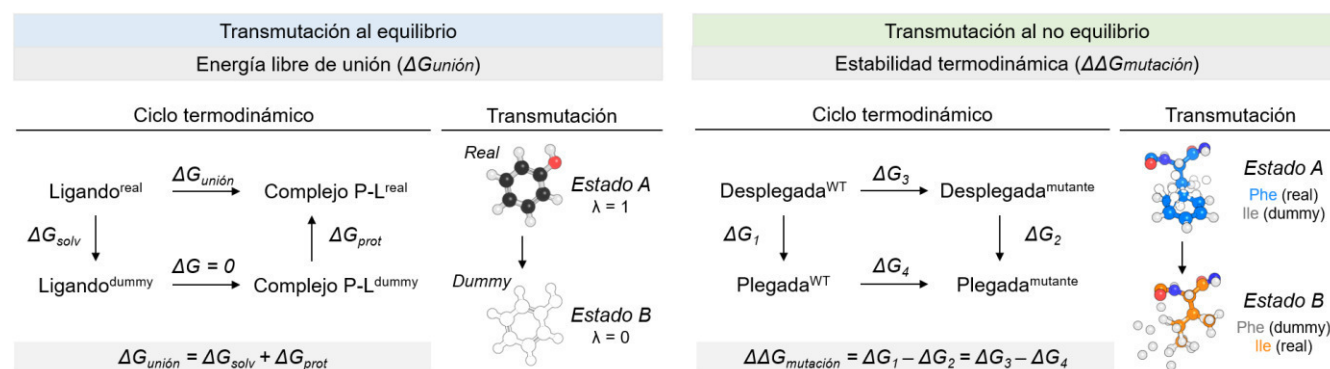


XVI.6. Apéndice VI

En este apéndice se presenta la información complementaria a los cálculos realizados durante el presente trabajo para la estimación de energías libres mediante el uso de métodos alquímicos. En la *sección XVI.6.1* se describen brevemente los fundamentos de los métodos alquímicos utilizados para la estimación de la energía libre de unión de DAPT en el sitio activo del componente PS1 y para la predicción de los cambios en la termoestabilidad del complejo de C99 con  $\gamma$ -secretasa debido a la presencia de mutaciones puntuales en PS1. Finalmente, en la *sección XVI.6.2* se reporta de forma detallada la metodología y resultados obtenidos referentes a la predicción de los cambios en la estabilidad de una proteína soluble en agua (HsCRYGD), dos proteínas membranales con estructura de barril  $\beta$  (EcOmA y EcOmpLA) y una proteasa membranal (EcGlpG).

XVI.6.1. Métodos alquímicos para el cálculo de la energía libre

Los métodos alquímicos permiten calcular la energía libre de Gibbs ( $\Delta G_{AB}$ ) necesaria para transformar el estado inicial (*estado A*) de una molécula a un estado final (*estado B*), evaluando el cambio progresivo entre ambos estados a través simulaciones de dinámica molecular ( $\Delta G_{AB} = G_B - G_A$ ).<sup>257</sup> El cambio entre estados involucra la transición o transmutación de uno o varios átomos de la molécula desde un estado real hasta la formación de átomos fantasmas (*dummy*).<sup>237</sup> El estado fantasma refiere a la condición en el que el o los átomos transmutados carecen de contribución electrónica y de van der Waals al sistema. Esta transmutación atómica puede llevarse a cabo en simulaciones al equilibrio y al no equilibrio. En la primera de ellas ocurre la desaparición total y paulatina de los átomos seleccionados, mientras que en la segunda involucra la desaparición de un grupo de átomos de forma concomitante a la aparición de un segundo grupo en la misma u otra posición. En ambos casos, la diferencia de energía resultante de la transición entre estados es independiente a la dirección del proceso seguido entre ellos; sin embargo, se requiere de un muestro exhaustivo para la convergencia de sus valores energéticos. La recolección de los datos resultantes del muestreo se obtiene a partir del monitoreo de una serie de pasos introducidos mediante un parámetro  $\lambda$  que modula la energía potencial del sistema, estableciéndose con un valor de 0 en el *estado A*, un valor de 1 en el *estado B* y  $0 < \lambda < 1$  para los múltiples estados intermedios no físicos. La implementación de los métodos alquímicos permite determinar con mayor precisión cálculos de energía libre que involucran la estimación de la afinidad de un ligando a un sitio en una macromolécula ( $\Delta G_{unión}$ ) o el cambio en la termoestabilidad de una proteína debido a una mutación ( $\Delta\Delta G$ ) (*Figura A6.1.1*).



**Figura A6.1.1.** Representación de los ciclos termodinámicos no físicos y del proceso de transmutación involucrado en el cálculo de la energía libre en simulaciones al equilibrio (izquierda) y al no equilibrio (derecha).

En este trabajo, se realizaron transmutaciones al equilibrio para calcular el  $\Delta G_{\text{unión}}$  del inhibidor DAPT en el sitio activo del componente PS1 de  $\gamma$ -secretasa utilizando el método de perturbación de la energía libre (*Free Energy Perturbation*, FEP).<sup>240</sup> Asimismo, se llevaron a cabo transmutaciones al no equilibrio con el método de Crooks para determinar el efecto de mutaciones puntuales de PS1 en la estabilidad del sustrato C99 en el complejo de  $\gamma$ -secretasa.<sup>256</sup>

#### XVI.6.1.1. Método de perturbación de la energía libre al equilibrio

El método de FEP fue introducido en 1954 por Zwanzig derivado de la implementación de la ecuación (1):<sup>269</sup>

$$\Delta G_{AB} = -\frac{1}{\beta} \ln \langle \exp(-\beta[H_B - H_A]) \rangle_A \quad (1)$$

Donde  $\beta$  es  $1/\kappa_B T$  ( $\kappa_B$  es la constante de Boltzmann y  $T$  la temperatura) y  $H$  el Hamiltoniano clásico que describe el movimiento del sistema, el cual es dependiente de las coordenadas, el momento y el parámetro externo  $\lambda$ .<sup>270</sup> En la ecuación se representa el ensamble promedio tomado sobre el *estado A*, mientras que el proceso equivalente en el *estado B* estaría representado por  $-1/\beta \ln \langle \exp(-\beta[H_A - H_B]) \rangle_B$ . La evaluación del ensamble puede llevarse a cabo en cualquiera de los dos estados; sin embargo, la precisión del método es dependiente de la superposición resultante entre ambos.<sup>257</sup> Para evitar una pobre superposición de los datos, se generan múltiples estados intermedios no físicos a partir de la modificación del valor del parámetro  $\lambda$  ( $\Delta\lambda$ ). La descripción de los términos de enlace y no enlace del campo de fuerza utilizado pueden escribirse entonces como una combinación lineal dependiente de  $\lambda$ .<sup>271</sup> Finalmente, las diferencias resultantes en la energía potencial en ambas direcciones entre los dos estados permiten estimar la energía libre asociada al sistema (*Figura A6.1.1A*).

Para este trabajo se empleó la metodología de FEP implementada por el grupo de Biggin,<sup>240</sup> en el cual el cálculo de la energía libre de unión del compuesto se obtiene a partir del análisis estadístico de transiciones independientes en las que se desacoplan las interacciones de van der Waals con un  $\Delta\lambda = 0.05$  y se anulan las cargas con un  $\Delta\lambda = 0.1$ . Asimismo, se desacoplan las restricciones del ligando unido a la macromolécula (complejo P-L) utilizando una distribución no uniforme de valores de  $\Delta\lambda$ . Para el esquema de restricciones se considera una distancia ( $r$ ), dos ángulos ( $\theta_1$  y  $\theta_2$ ) y tres ángulos diedros ( $\varphi_1$ ,  $\varphi_2$  y  $\varphi_3$ ) del ligando respecto a un grupo de átomos cercanos de la macromolécula. Dicha contribución se resuelve en el estado desacoplado del ligando de forma analítica con la ecuación de Boresch *et al*<sup>247</sup> (ver sección XVI.5.2 del Apéndice V). Para el análisis de las transiciones se utilizó el índice de aceptación multiestado de Bennett (*Multistate Bennett Acceptance Ratio*, MBAR),<sup>270</sup> el cual permite evaluar los datos de todos los estados intermedios y predecir la energía libre de las regiones no muestreadas siguiendo la ecuación (2):<sup>272</sup>

$$G_i = -\frac{1}{\beta} \ln \sum_{\kappa=1}^K \sum_{n=1}^{N_\kappa} \frac{\exp[-\beta U_i]}{\sum_{\kappa=1}^K N_\kappa \exp[\beta G_\kappa - \beta U_\kappa]} \quad (2)$$

Donde  $i$  es el número de corridas entre 1 y  $K$ ,  $G_i$  son las energías libres de cada estado, y  $G_\kappa$  y  $U_\kappa$  son la energía libre y el potencial, respectivamente, correspondientes al  $\kappa$ -ésimo estado. Finalmente, se fija la primera transición respecto al estado inicial como referencia para la obtención de las diferencias de energía libre.

XVI.6.1.2. Método de Crooks al no equilibrio

En 1997 Jarzynski estableció la siguiente relación exponencial entre el promedio del trabajo ( $W$ ) realizado durante las transiciones al no equilibrio y la diferencia en la energía libre de un ensamble canónico:

$$e^{-\beta\Delta G_{AB}} = \langle e^{-\beta W} \rangle \quad (3)$$

Para que se cumpla dicha igualdad es necesario que (1) las transiciones entre estados comiencen a partir de ensambles al equilibrio y (2) que el valor promedio exponencial converja dada la realización de varios muestreos.<sup>270</sup> Tiempo después de la publicación de la ecuación (3), Crooks<sup>273</sup> propuso una relación más general que permite obtener la combinación de los valores de distribución del trabajo a partir de las transiciones de ida ( $A \rightarrow B$ ) y de regreso ( $B \rightarrow A$ ) para la rápida obtención de la energía libre:

$$\ln \frac{P_i(W)}{P_r(-W)} = \beta W - \beta \Delta G \quad (4)$$

Donde  $P_i(W)$  y  $P_r(-W)$  corresponden a las distribuciones del trabajo durante las transiciones de ida y de regreso, respectivamente. Al igual que el método de Jarzynski, se requiere que los estados iniciales de las transiciones se encuentren al equilibrio, sin ser necesario que este sea alcanzado en el estado al final de la transición.<sup>257</sup> El traslape entre las distribuciones del trabajo generado a partir de las transiciones contribuye a la estimación de la energía libre, omitiéndose la información de las medias generadas en el resto del histograma de muestreo. Para este estudio, se analizaron los histogramas del trabajo de las transiciones utilizando el método de la intersección de la gaussiana de Crooks (*Crooks Gaussian Intersection, CGI*),<sup>260</sup> la cual se expresa como:

$$\Delta G = \frac{\frac{\langle W_f \rangle_{n_f}}{\sigma_f^2} - \frac{\langle W_r \rangle_{n_r}}{\sigma_r^2} \pm \sqrt{\frac{1}{\sigma_f^2 \sigma_r^2} \left( \langle W_f \rangle_{n_f} + \langle W_r \rangle_{n_r} \right)^2 + 2 \left( \frac{1}{\sigma_f^2} - \frac{1}{\sigma_r^2} \right) \ln \frac{\sigma_r^2}{\sigma_f^2}}}{\frac{1}{\sigma_f^2} - \frac{1}{\sigma_r^2}} \quad (5)$$

Donde  $\langle W_f \rangle_{n_f}$  y  $\langle W_r \rangle_{n_r}$  son el promedio del trabajo y  $\sigma_f^2$  y  $\sigma_r^2$  son las varianzas asociadas a la distribución de los valores del trabajo para las transiciones de ida y de regreso, respectivamente. Las distribuciones gaussianas son inicialmente validadas con el método de Kolmogorov-Smirnov<sup>274</sup> para la posterior identificación del punto de intersección correspondiente al valor final de energía libre.

XVI.6.1.2.1. Estimación de la estabilidad termodinámica

El proceso de transmutación atómica de un residuo de aminoácido requiere del establecimiento de las formas plegada y desplegada de la proteína de interés en sus formas WT y mutante (ver *Figura A6.1.1B*). Para el caso de la forma desplegada, se emplea un tripéptido del tipo GXG con grupos protectores acetilo y N-metilo en los extremos N- y C-terminales, respectivamente.<sup>256</sup> El estado A (WT) de ambos plegamientos contiene a su vez los átomos fantasma (*dummy*) pertenecientes al residuo del estado B (mutante), a lo que se le denomina topología dual.<sup>257</sup> El proceso de transmutación de la forma desplegada ( $\Delta G_3$ ) y plegada ( $\Delta G_4$ ) se puede llevar a cabo en dos sistemas diferentes (2-sistemas/2-cajas), haciendo el cálculo de la doble diferencia de energía al

final de los procesos. Sin embargo, existen mutaciones que involucran un cambio de carga en el sistema, modificando las condiciones de neutralidad. Es por esto último que se prefiere la preparación de un único sistema que contenga a las formas desplegada y plegada de la proteína a una distancia mínima de 3.0 nm entre ellas (2-sistemas/1-caja). Para evitar que el tripéptido se aproxime a la proteína durante la simulación, se establecen restricciones de distancia entre el C $\alpha$  del residuo a mutar en el tripéptido y la proteína. En este modelo, el sistema en el *estado A* contiene a la proteína WT y al tripéptido mutante, mientras que el *estado B* invierte el orden de asignación de estos (i.e., proteína mutante y tripéptido WT). La ventaja de este modelo en comparación al de 2-sistemas/2-cajas radica en que el cálculo de  $\Delta\Delta G_{\text{mutación}}$  se obtiene directamente del análisis estadístico de CGI; sin embargo, puede generar ligeros artefactos asociados a las interacciones de largo alcance.

### XVI.6.1.3. Potencial de núcleo blando

En las simulaciones de MD, los potenciales de las contribuciones no enlazantes de Coulomb y Lennard-Jones presentan una singularidad cuando la distancia entre partículas es igual a cero ( $r = 0$ ).<sup>257</sup> Esta singularidad aparece en las transiciones no físicas cuando el sistema con topología dual se aproxima a los estados finales, puesto que el átomo fantasma se superpone durante el proceso de transmutación con el átomo real.<sup>275</sup> Para evitar este artefacto del cálculo se emplea un potencial de núcleo blando (*soft-core*), en cual se “suavizan” las interacciones no enlazantes utilizando la siguiente aproximación:<sup>276</sup>

$$V_{ij}(r_{ij}) = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r (\alpha_Q(1-\lambda) + r_{ij}^p)^{1/p}} + 4\lambda\epsilon_{ij} \left( \frac{1}{(\alpha_{LJ}(1-\lambda) + (r_{ij}/\sigma_{ij})^s)^{12/s}} - \frac{1}{(\alpha_{LJ}(1-\lambda) + (r_{ij}/\sigma_{ij})^s)^{6/s}} \right) \quad (6)$$

Donde  $p$  y  $s$  son parámetros de integración,  $r_{ij}$  es la distancia interatómica,  $q_i$  y  $q_j$  representan las cargas parciales de las partículas  $i$  y  $j$ ,  $\epsilon_{ij}$  y  $\sigma_{ij}$  son los parámetros de Lennard-Jones (fuerza y longitud),  $\epsilon_0$  y  $\epsilon_r$  son la constante dieléctrica del vacío y la constante dieléctrica relativa, respectivamente.<sup>257</sup>

### XVI.6.1.4. Parámetros para el cálculo de energía libre

En este trabajo se empleó una  $\lambda$  inicial (*init-lambda*) de 0 para el *estado A* y 1 para el *estado B*, generando un archivo de salida de la relación  $\delta H/\delta\lambda$  durante la transición (*nstdhdl*). Para el caso de las transmutaciones independientes del *estado A* al *B* realizadas durante los cálculos de estabilidad termodinámica se fijó un  $\Delta\lambda = 0.00001$  (*delta-lambda*), el cual se estableció a partir de la relación de  $\pm 1$  entre el número de pasos utilizados para llevar a cabo 200 ps de la transición con un paso de tiempo de 2 fs (#pasos = 100,000). Para el potencial de núcleo blando se emplearon valores de  $\alpha = 0.5$  y  $\sigma = 0.3$  durante el cálculo de la energía libre de unión con el método de FEP, y  $\alpha = 0.3$  y  $\sigma = 0.25$  para la estimación de la estabilidad termodinámica. Estudios anteriores realizados por los grupos de investigación de Biggin<sup>237,240</sup> y Gapsys & de Groot<sup>256-259</sup> han demostrado que el uso de los parámetros anteriores permite predecir con alta precisión los cálculos de energía libre, reduciendo los artefactos causados por la singularidad de las transiciones con los valores  $\alpha$  y  $\sigma$  definidos para el potencial de núcleo blando.

### XVI.6.2. Predicción de la estabilidad termodinámica en proteínas solubles y membranales

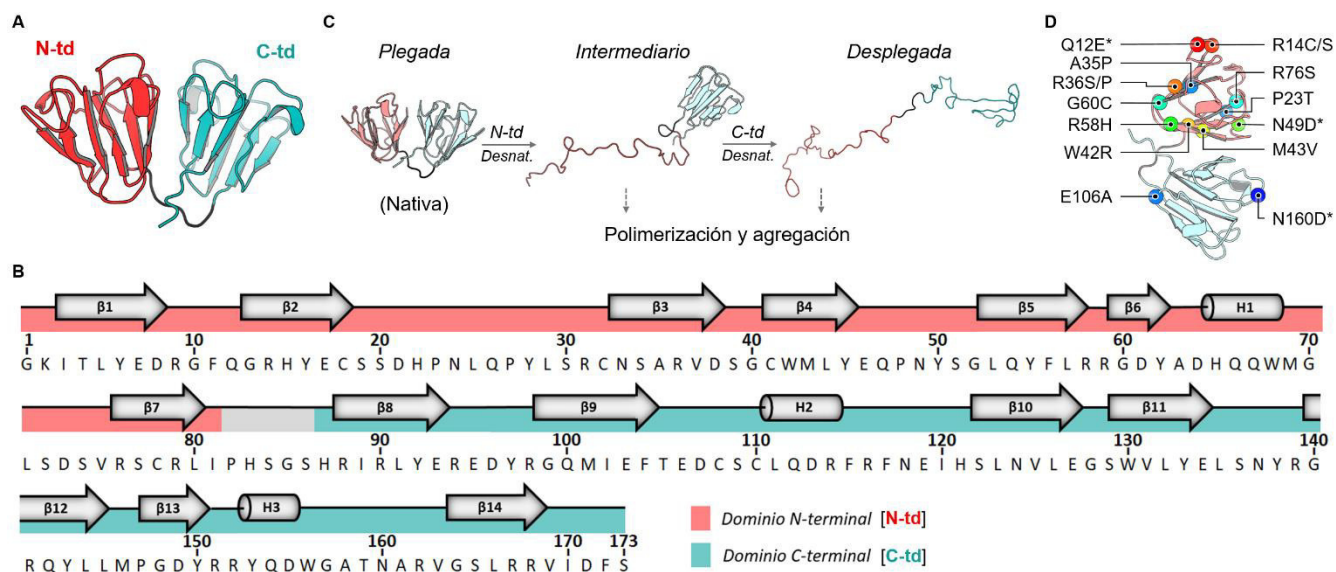
La mayor parte de las proteínas se pliegan en estructuras tridimensionales que les permiten ejercer funciones de mantenimiento, estructurales, metabolismo, transporte, entre otros.<sup>277</sup> La desnaturalización de la estructura tridimensional puede presentarse cuando se modifican de manera drástica las condiciones térmicas o químicas del medio en el que se encuentra la proteína, resultando a su vez en la pérdida parcial o total de sus funciones biológicas.<sup>278</sup> El punto de fusión ( $T_m$ ) es un parámetro que permite determinar la temperatura a la cual la proteína pierde su estructura nativa,<sup>279</sup> modificándose la energía libre ( $\Delta G$ ) del sistema debido a cambios en el proceso de solvatación durante la transición plegamiento/desplegamiento.<sup>280,281</sup> Los datos de  $T_m$  o  $\Delta G$  son comúnmente utilizados para estimar el grado de estabilidad de una proteína nativa respecto a sus mutantes ( $\Delta T_m$ ,  $\Delta \Delta G$ ).

En esta sección se empleó el método de transmutación atómica PMX para predecir los cambios en la estabilidad de una proteína soluble en agua (HsCRYGD), dos proteínas membranales con estructura de barril  $\beta$  (EcOmA y EcOmpLA) y una proteasa membranal (EcGlpG). Se recopilaron los datos experimentales de  $\Delta \Delta G$  o  $\Delta T_m$  de diferentes mutantes para validar la predicción del método y comparar su confiabilidad respecto a los valores calculados con diferentes servidores en línea y, en el caso de las proteínas membranales, con el algoritmo de RosettaMP. La implementación del método en proteínas membranales sirvió como referencia para su aplicación en el complejo GS-A $\beta$ , con el objetivo de caracterizar las mutaciones reportadas experimentalmente como desestabilizadoras relacionadas con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

#### XVI.6.2.1. Cristalina $\gamma D$ de humano

Las cristalinas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  constituyen cerca del 90 % del total de las proteínas solubles contenidas en el lente ocular del humano.<sup>282</sup> La cristalina  $\gamma$  es una proteína monomérica estructural constituida por 175 aminoácidos que forman cuatro motivos de llave griega (ocho hojas  $\beta$  intercaladas) organizados en dominios N-terminal (N-td) y C-terminal (C-td) (Figura A6.2.1A/B).<sup>283</sup> Los motivos de llave griega de estas proteínas se han relacionado con el incremento en la refracción de luz en el lente y con su alta estabilidad estructural debido a la formación de puentes salinos intramoleculares.<sup>284</sup> Actualmente se conocen 7 diferentes tipos de cristalinas  $\gamma$  ( $\gamma A$ -  $\gamma F$ ,  $\gamma S$ ), de las cuales  $\gamma C$ ,  $\gamma D$  y  $\gamma S$  localizan en el lente del humano.<sup>285</sup> La cristalina  $\gamma D$  de humano (HsCRYGD) es uno de los isotipos más abundantes, cuya agregación se ha asociado al desarrollo de la enfermedad de cataratas.<sup>282</sup>

La enfermedad de cataratas es una patología ocular que involucra la opacificación del lente causado por la ruptura de su microarquitectura o por la polimerización y agregación de cristalinas desplegadas.<sup>286</sup> El mecanismo de desplegamiento de la estructura de HsCRYGD involucra dos estados: (1) un estado intermedio en el que el N-td se encuentra mayoritariamente desplegado y el C-td se mantiene plegado, y (2) un estado final que presenta la forma completamente desplegada de ambos dominios (Figura A6.2.1C).<sup>287</sup> Se sabe que las mutaciones puntuales y las modificaciones postraduccionales en HsCRYGD son la causa principal de la desnaturalización de su estructura debido a la pérdida de interacciones nativas en sus motivos de llave griega.<sup>288-290</sup> A la fecha se conocen 20 mutaciones congénitas en HsCRYGD relacionadas con la aparición de cataratas: 12 mutaciones con cambio de sentido, 2 mutaciones con cambio en el marco de lectura (terminación prematura) y 6 mutaciones sin sentido (Figura A6.2.1D).<sup>285,291</sup> Además, se han reportado modificaciones postraduccionales que involucran procesos de desamidación, oxidación, metilación, carbamilación y formación de puentes disulfuro.<sup>292</sup>



**Figura A6.2.1.** Proteína HsCRYGD. (A) Representación de la estructura de HsCRYGD coloreada por sus dominios N-terminal (rojo) y C-terminal (cian). (B) Secuencia de aminoácidos y estructura secundaria. (C) Mecanismo de desplegamiento o desnaturalización (Desnat.) propuesto a partir de su forma nativa. (D) Representación de las mutaciones con cambio de sentido y desamidaciones reportadas.

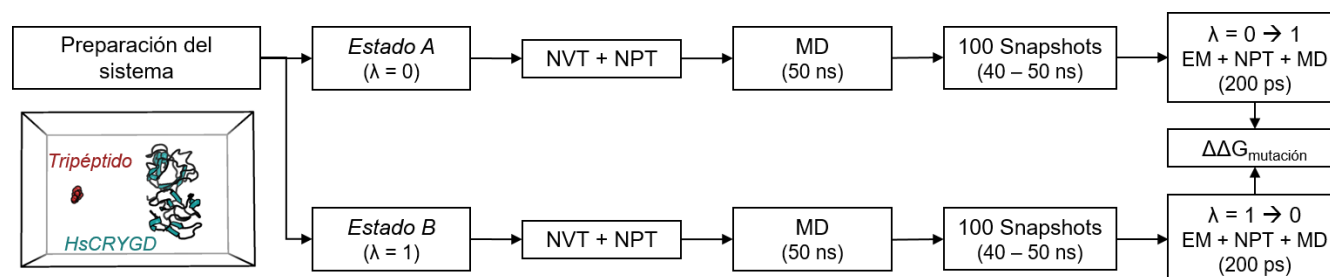
#### XVI.6.2.1.1. Metodología

(a) *Preparación del modelo.* Se descargó del PDB la estructura de rayos X de la cristalina  $\gamma$ D de *Homo sapiens* (HsCRYGD) con clave 1HK0 (1.25 Å).<sup>293</sup> La cadena lateral faltante del residuo Glu17 se completó con el programa WhatIF y se fijaron las posiciones alternas de los residuos con los valores más altos de ocupación.

(b) *MD atomística.* Se realizó una simulación de MD atomística con la estructura de HsCRYGD empleando el campo de fuerza AMBER99SB-ILDN<sup>236</sup> implementado en la paquetería de GROMACS 5.1.4<sup>165</sup>. El modelo se solvató utilizando el modelo de agua TIP3P en una caja cúbica, neutralizando la carga total con una solución 0.15 M de NaCl. El sistema fue sometido a una minimización de energía con el algoritmo *steepest-descent* y a equilibrios de 5 ns mediante el uso de ensambles NVT y NPT. Después de los equilibrios se realizó una producción de 200 ns de MD con un pso de tiempo de 2 fs. La temperatura del sistema se mantuvo a 300 K con el termostato acoplado *V-rescale*<sup>177</sup> y la presión se fijó a 1.0 bar en condiciones isotrópicas con el barostato de Parrinello-Rahman. El potencial de Lennard-Jones se calculó dentro de un radio de corte de 1.0 nm. Las interacciones electrostáticas de corto alcance fueron calculadas en un rango de entre 0 y 1.2 nm, después de lo cual se calcularon las interacciones de largo alcance con la aproximación de la partícula en la maya de Ewald. Los enlaces que involucraban hidrógenos fueron restringidos usando el algoritmo LINCS. Se realizó un análisis de agrupamiento basado en el RMSD de la cadena principal de HsCRYGD (*cut-off* = 0.10 nm) para realizar la selección de la estructura más representativa de los últimos 100 ns de simulación.

(c) *Cálculos de energía libre.* Se calculó el  $\Delta\Delta G$  de 22 mutaciones<sup>294,295</sup> reportadas de HsCRYGD usando el método de transmutaciones alquímicas descrito por Gapsys y colaboradores para el programa GROMACS (ver *Esquema 6.2.1*).<sup>255-259</sup> Las estructuras híbridas (átomos reales + átomos fantasma) y las topologías de las mutantes de HsCRYGD se prepararon con el programa PMX<sup>256</sup>, mientras que las estructuras de los tripéptidos se

descargaron del servidor web de PMX<sup>259</sup>. Para este estudio, se utilizó el modelo de 2-sistemas/1-caja con la finalidad de mantener al sistema neutro durante las transmutaciones que involucraban cambio de carga y conservar las mismas condiciones de cálculo en todos los sistemas. Los tripéptidos se colocaron a una distancia aproximada de 3.0 nm respecto a la estructura de HsCRYGD, restringiendo la movilidad del C $\alpha$  del residuo central del tripéptido y el del residuo His83 de la proteína. Ambos sistemas se solvataron utilizando el modelo de agua TIP3P y neutralizaron con una solución de NaCl 0.15 M. Los *estados A* (HsCRYGD<sub>WT</sub> + tripéptido<sub>mutante</sub>) y *B* (HsCRYGD<sub>mutante</sub> + tripéptido<sub>WT</sub>) se sometieron a minimizaciones energéticas y equilibrios (ensambles NVT y NPT), seguidos por simulaciones de 50 ns de MD para cada estado usando el campo de fuerza AMBER99SB-ILDN implementado en la paquetería de GROMACS 4.6.7. Se emplearon los mismos parámetros de simulación descritos para la simulación atómica. De los últimos 10 ns de simulación de cada sistema se extrajeron 100 conformaciones (*snapshots*), las cuales se minimizaron y equilibraron previo a la realización de 100 transiciones alquímicas independientes de 200 ps. Para estas transiciones se empleó el potencial *soft-core* (sc) y un  $\lambda$  inicial de 0 ( $\Delta\lambda = 0.00001$ ) y 1 ( $\Delta\lambda = -0.00001$ ) para los *estados A* y *B*, respectivamente. Por último, se extrajeron los datos del trabajo requerido para realizar la transición atómica en cada sistema con el fin de estimar la doble diferencia de energía con el método *Crooks Gaussian Intersection* (CGI).<sup>260</sup>



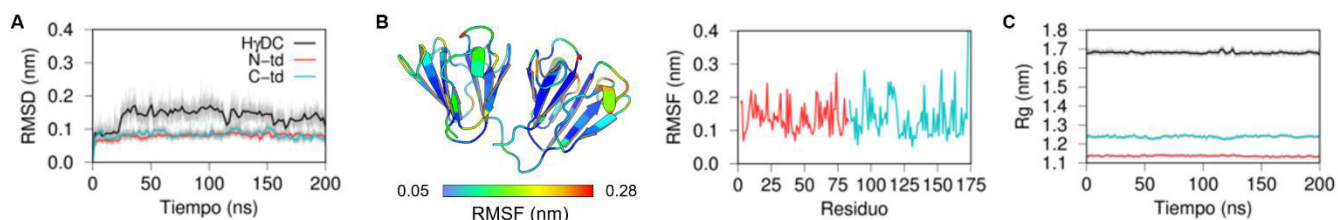
**Esquema A6.2.1.** Diagrama general de trabajo empleado para el cálculo de  $\Delta\Delta G$  de las mutantes de la proteína HsCRYGD.

#### XVI.6.2.1.2. Resultados y Discusión

Para entender el efecto de las mutaciones puntuales en el desplegamiento de HsCRYGD de su forma nativa, el grupo de King realizó estudios de mutagénesis por escaneo de alaninas en el que modificó seis residuos aromáticos del N-td (Tyr6, Phe11, Tyr16, Tyr28, Tyr45 y Tyr50) y cuatro residuos involucrados en la interacción interdominio (Gln54, Arg79, Gln142 y Met146).<sup>295,296</sup> Los resultados de esos trabajos demostraron que el reemplazo de los residuos aromáticos por alaninas desestabiliza en gran medida al motivo de llave griega de N-td, mientras que sólo dos mutaciones puntuales de residuos en el interdominio afectaron la estabilidad del HsCRYGD. Estos y otros trabajos realizados por este grupo de investigación han demostrado que el estudio de la estabilidad de HsCRYGD es de gran importancia para la predicción e identificación temprana de mutaciones que puedan llevar a la formación de cataratas.<sup>297</sup>

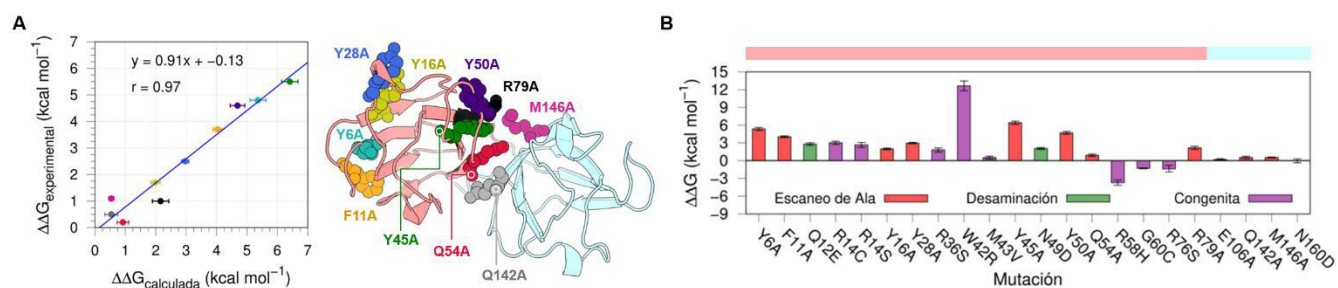
Con el fin de establecer las condiciones y parámetros apropiados para el cálculo de  $\Delta\Delta G$  con el método de transmutación alquímica (PMX), se tomaron como referencia los datos experimentales de  $\Delta\Delta G$ s de las 10 mutaciones de escaneo de alaninas reportados por King y colaboradores. Se tomó como estructura inicial para

el estudio la conformación más representativa de los últimos 100 ns de la simulación de dinámica molecular de HsCRYGD, la información de la simulación se muestra en la *Figura A6.2.2*. La metodología fue posteriormente utilizada para determinar de las propiedades de estabilidad de 9 de las mutaciones con cambio de sentido y 3 desamidaciones. Estas últimas tres fue posible calcularlas debido a que su modificación involucra la conversión de un residuo de glutamina por un ácido glutámico o el de una asparagina por un ácido aspártico. Se descartaron de forma inicial las mutaciones P23T, A35P y R36P debido a que el método PMX no permite actualmente realizar transiciones con el residuo de prolina.<sup>257</sup>



**Figura A6.2.2.** (A) RMSD de la cadena principal calculado a partir de toda la proteína (negro) y sus dominios independientes. (B) Representación 3D de la estructura de HsCRYGD colorada por los valores de RMSF y gráfico de RMSF por residuo de los últimos 100 ns de simulación. (C) Radio de giro (Rg) de la proteína (negro) y sus dominios.

En la *Figura A6.2.3A* se muestra el gráfico de los datos de  $\Delta\Delta G$  calculados contra los experimentales. El coeficiente de correlación  $r = 0.97$  de la regresión lineal confirma que los parámetros y condiciones utilizados con el método de PMX permiten predecir con gran precisión el comportamiento de estabilidad observado de forma experimental. Al igual que lo descrito por King y colaboradores, mutar residuos aromáticos por alaninas desestabiliza la estructura de HsCRYGD ( $\Delta\Delta G_{\text{calculada}} > 1.5$  kcal/mol), principalmente con las mutaciones Y6A, F11A, Y45A y Y50A. Es importante mencionar que el método de PMX obtuvo el mejor valor de correlación en comparación con otros 20 predictores de  $\Delta\Delta G$  en línea, seguido de cerca por ELASPIC<sup>298</sup>, DUET<sup>299</sup>, mCSM<sup>300</sup> y PoPMuSic v2.1<sup>301</sup> (ver *Tabla A6.2.1*). Estos resultados sugieren que los cálculos alquímicos de energía libre son los más indicados para ser utilizados para predecir el efecto de mutaciones en la proteína HsCRYGD.



**Figura A6.2.3.** (A) Regresión lineal de los valores experimentales de  $\Delta\Delta G$  ( $\Delta\Delta G_{\text{experimental}}$ ) con los calculados ( $\Delta\Delta G_{\text{calculada}}$ ) por el método PMX. La estructura de HsCRYGD a la derecha muestra las mutaciones coloreadas de acuerdo con el código de color del gráfico. (B) Valores de  $\Delta\Delta G$  calculados de las mutaciones con cambio de sentido y desamidaciones localizadas en el N-td y en la interfaz de los dos dominios.



**Tabla A6.2.1.** Doble diferencia de energía libre ( $\Delta\Delta G$ ) calculada con 21 diferentes predictores de estabilidad y datos estadísticos provenientes de la regresión lineal con los datos experimentales

Predictor	Valores de $\Delta\Delta G$ del escaneo de alaninas (kcal/mol)										Estadísticos		
	Y6	F11	Y16	Y28	Y45	Y50	Q54	R79	Q142	M146	r	r <sup>2</sup>	$\sigma$
Experimental <sup>294,295</sup>	4.80	3.70	1.70	2.50	5.50	4.60	0.20	1.00	0.50	1.10	-	-	-
PMX <sup>256</sup>	5.36	4.04	1.99	2.97	6.41	4.69	0.92	2.16	0.54	0.54	0.97	0.95	0.48
ELASPIC <sup>298</sup>	3.55	2.65	ND	ND	4.20	2.65	0.59	1.41	1.07	0.65	0.96	0.92	0.65
DUET <sup>299</sup>	-4.49	-2.73	-2.71	-2.06	-4.62	-2.99	-1.37	-2.08	-1.58	-1.87	-0.91	0.82	0.88
mCSM <sup>300</sup>	-4.35	-2.52	-2.49	-1.98	-4.42	-2.81	-1.25	-2.05	-1.43	-1.92	-0.90	0.80	0.91
PoPMuSIC v2.1 <sup>301</sup>	2.82	2.51	2.44	1.46	3.70	2.49	1.35	1.60	1.33	1.77	0.88	0.77	0.99
INPS – 3D <sup>302</sup>	-1.97	-2.56	-1.89	-1.56	-2.30	-2.04	-0.84	-0.81	-0.88	-0.79	-0.86	0.74	1.05
Eris (Flex BB) <sup>303</sup>	9.50	7.38	8.30	3.72	10.00	10.00	2.49	6.63	3.14	5.78	0.82	0.67	1.18
HotMuSIC <sup>279</sup>	-5.77	-6.73	-6.58	-4.24	-9.28	-7.40	-3.50	-5.59	-2.52	-3.88	-0.81	0.66	1.20
NeEMO <sup>304</sup>	3.29	2.48	2.27	0.69	3.83	1.15	0.28	1.50	0.58	0.76	0.77	0.59	1.33
MAESTROweb <sup>305</sup>	2.90	1.46	1.53	0.29	3.66	1.38	0.79	1.41	0.75	1.47	0.72	0.51	1.45
I-Mutant2.0 – PDB <sup>306</sup>	-1.85	-2.63	-1.84	-1.99	-1.89	-1.77	-0.33	-1.41	-0.34	-1.21	-0.72	0.51	1.44
INPS – Seq <sup>307</sup>	-1.33	-2.87	-1.70	-1.55	-1.78	-1.97	-0.57	-0.76	-0.59	-0.32	-0.70	0.49	1.48
I-Mutant3.0 – Seq <sup>308</sup>	-1.59	-2.33	-1.74	-1.89	-1.74	-1.66	-0.52	-1.26	-0.60	-1.38	-0.68	0.46	1.52
TML-MP <sup>309</sup>	-2.03	-0.48	-1.55	-0.99	-1.95	-1.46	0.48	-2.20	-0.03	-1.03	-0.55	0.30	1.73
SDM <sup>310</sup>	-1.20	-0.62	-1.43	-0.80	-2.63	-0.19	0.31	0.89	-0.85	-1.15	-0.52	0.27	1.76
I-Mutant2.0 – Seq <sup>306</sup>	-2.86	-2.06	-2.97	-1.85	-2.23	-2.10	-1.01	-1.99	-0.97	-2.36	-0.52	0.27	1.77
CUPSAT <sup>311</sup>	1.15	-1.24	-2.42	1.84	-4.70	-1.28	1.83	-0.55	0.15	1.32	-0.51	0.27	1.77
MUpro (SVM v1.1) <sup>312</sup>	-1.23	-1.37	-1.08	-1.13	-0.95	-1.43	-0.88	-0.84	-0.81	-1.38	-0.47	0.22	1.82
I-Mutant3.0 – PDB <sup>308</sup>	-2.56	-1.73	-2.43	-1.53	-1.93	-1.67	-1.01	-1.83	-0.99	-2.16	-0.45	0.20	1.85
TDL-MP <sup>313</sup>	-1.30	-0.15	-0.03	-0.77	-2.13	-1.28	0.42	-2.56	-0.24	ND	-0.44	0.20	1.91
STRUM <sup>314</sup>	-0.17	-0.50	-0.55	-0.42	-0.01	-0.44	-0.05	0.08	0.00	-0.40	-0.19	0.04	2.03

El gráfico de la *Figura A.6.2.3B* presenta los valores calculados de  $\Delta\Delta G$  para las 9 mutaciones puntuales y las 3 modificaciones postraduccionales (ver *Tabla A6.2.2*). Estudios experimentales han demostrado que las mutaciones R14C/S no producen modificaciones importantes en la estabilidad térmica de la proteína, pero promueven la formación de agregados debido a que sufren modificaciones postraduccionales tales como formación de puentes disulfuro y O-glicosidaciones.<sup>315,316</sup> Sin embargo, los cálculos de  $\Delta\Delta G$  indican que las mutaciones en Arg14 causan una ligera desestabilización en HsCRYGD debido a la ruptura del puente salino que forma este residuo con Glu7, descrito anteriormente por Das *et al.*<sup>317</sup> en un estudio de MD. De forma similar a estas mutaciones, la ruptura del puente salino Arg36-Asp61 resultó en una ligera disminución de la estabilidad de HsCRYD.<sup>318</sup> Por otro lado, la mutación M43V ha sido identificada en pacientes sanos, lo que explicaría su nulo efecto desestabilizador obtenido durante el cálculo ( $\Delta\Delta G = 0.53$  kcal/mol).<sup>319</sup> Actualmente no se tiene información de alteraciones estructurales causadas por la mutación E106A, sólo se ha reportado que esta origina una pequeña disminución en la solubilidad de HsCRYGD.<sup>320</sup> Sin embargo, al comparar la mutación E106A con las

mutaciones Q142A, M146A y N160D, es posible inferir que las mutaciones o modificaciones afectan en mayor medida la estabilidad de HsCRYGD cuando estas ocurren en el N-td (ej. Q12E y N49D), lo que explicaría además la razón por la cual es el primer dominio en desnaturalizarse.

**Tabla A6.2.2.** Valores calculados de la doble diferencia de energía libre ( $\Delta\Delta G_{\text{calc}}$ ) y desnaturalización térmica ( $\Delta T_{m\_calc}$ ) de las 9 mutaciones puntuales y 3 desamidaciones

Mutación	$\Delta\Delta G_{\text{calc}}$ (kcal/mol)	$\Delta T_{m\_calc}$ (°C)	Mutación	$\Delta\Delta G_{\text{calc}}$ (kcal/mol)	$\Delta T_{m\_calc}$ (°C)	Mutación	$\Delta\Delta G_{\text{calc}}$ (kcal/mol)	$\Delta T_{m\_calc}$ (°C)
Q12E	2.81 ± 0.23	8.5	W42Q	8.69 ± 0.43	26.3	R76S	-1.37 ± 0.56	-4.1
R14C	3.03 ± 0.27	9.1	M43V	0.53 ± 0.23	1.6	E106A	0.18 ± 0.14	0.5
R14S	2.67 ± 0.41	8.1	N49D	2.06 ± 0.15	6.2	N160D	-0.02 ± 0.32	-0.1
R36S	1.80 ± 0.35	5.4	R58H	-3.71 ± 0.43	-11.2			
W42R	12.64 ± 0.82	38.2	G60C	-1.29 ± 0.08	-3.9			

De las 22 mutaciones, fueron R58H, G60C y R76S las únicas en presentar valores negativos de  $\Delta\Delta G$  (efecto estabilizador), lo que concuerda con reportes experimentales que demuestran que estas mutaciones no afectan la estabilidad de HsCRYGD.<sup>293,318,321,322</sup> Por su parte, la mutación W42R fue la que presentó el mayor efecto desestabilizador, lo que también coincide con datos experimentales previos realizados por el grupo de King.<sup>297,323</sup> En el estudio de Serebryany *et al.* se demostró que las mutaciones W42R/Q afectan al motivo de llave griega de N-td, reduciendo las interacciones intermoleculares hidrofóbicas y favoreciendo el ingreso de moléculas de agua hacia el interior de los motivos de llave griega.<sup>296</sup> Con la finalidad de comparar los datos experimentales de desnaturalización térmica ( $\Delta T_{m\_exp}$ ) de las mutaciones W42R/Q con nuestros resultados, se calculó el ( $\Delta T_{m\_calc}$ ) a partir de los valores de  $\Delta\Delta G$  utilizando la ecuación de Rees y Robertson<sup>266</sup>:  $\Delta T_{m\_calc} = \Delta\Delta G / Nk$ ; donde  $N$  es el número de residuos en la proteína (173 aminoácidos) y  $k$  es una constante ( $0.00191 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1} \text{ residuo}^{-1}$ ). En la *Tabla 6.2.3* se reportan los valores experimentales y calculados de  $\Delta T_m$  de ambas mutaciones de Trp42 y las del escaneo de alaninas. Al comparar ambos resultados es posible asegurar que las mutaciones W42R/Q son las más desestabilizadoras al tener los valores más altos de  $\Delta T_{m\_calc}$ , y que el comportamiento calculado es consistente con la información experimental.

**Tabla A6.2.3.** Datos experimentales ( $\Delta T_{m\_exp}$ ) y calculados ( $\Delta T_{m\_calc}$ ) de desnaturalización térmica de las mutaciones por escaneo de alaninas<sup>295</sup> y W42R/Q<sup>297</sup>

Mutación	$\Delta T_{m\_exp}$ (°C)	$\Delta T_{m\_calc}$ (°C)	$\Delta\Delta T_m$ (°C)	Mutación	$\Delta T_{m\_exp}$ (°C)	$\Delta T_{m\_calc}$ (°C)	$\Delta\Delta T_m$ (°C)
Y6A	8.9	16.2	7.3	W42R	28.9	38.2	9.3
F11A	7.5	12.2	4.7	W42Q	30.4	26.3	-4.1
Y16A	4.5	6.0	1.5	Y45A	8.7	19.4	10.7
Y28A	4.9	9.0	4.1	Y50A	8.0	14.2	6.2

Los resultados obtenidos con la proteína HsCRYGD demuestran que el método de PMX puede predecir de forma confiable el efecto de mutaciones puntuales en la estabilidad de la estructura de proteínas, por lo que se espera que su implementación en proteínas membranales sea igualmente viable.

### XVI.6.2.2. Proteínas de barril $\beta$ de la membrana externa de *E. coli*

*Escherichia coli* es una bacteria Gram-negativa que habita la microbiota intestinal de la mayoría de los organismos vertebrados.<sup>324</sup> Al igual que otras bacterias Gram-negativas, *E. coli* presenta una membrana interna constituida por fosfolípidos y una membrana externa compuesta principalmente por lipopolisacáridos en su monocapa externa y fosfolípidos en su monocapa interna.<sup>325</sup> Actualmente se conocen una gran variedad de proteínas de la membrana externa (*outer membrane proteins*, OMPs) de *E. coli* que cumplen funciones de estabilidad, protección y mantenimiento en la bacteria.<sup>326</sup> Dentro de este grupo de OMPs se encuentran las proteínas con estructura de barril  $\beta$  OmpA y OmpLA. La proteína OmpA (EcOmpA) cumple funciones de anclaje en la membrana al facilitar la interacción de la membrana externa con el polímero de peptidoglicano.<sup>327</sup> Por su parte, OmpLA (EcOmpLA) es una enzima integral de la membrana que se encarga principalmente de la hidrólisis de fosfolípidos (fosfolipasa). La relevancia de ambas OMPs en las funciones de la bacteria ha impulsado el interés de diferentes grupos de investigación por el estudio de su estabilidad.<sup>328</sup>

#### XVI.6.2.2.1. Metodología

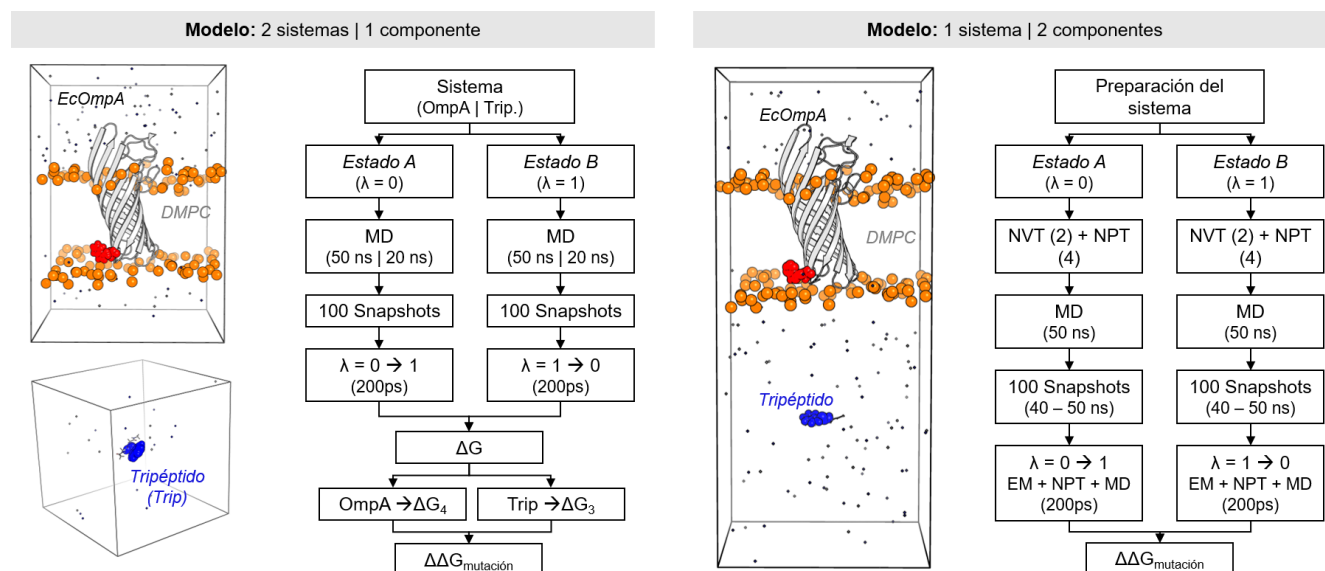
(a) *Preparación de los modelos.* Se obtuvieron del PDB las estructuras monoméricas de rayos X de las proteínas de la membrana externa de *E. coli* OmpA (EcOmpA; PDB: 1QJP, 1.65 Å)<sup>329</sup> y OmpLA (EcOmpLA; PDB: 1QD6, 2.10 Å)<sup>330</sup>. Se eliminaron los lípidos co-cristalizados y otros agentes externos, se fijaron las posiciones alternas con mayor ocupación, se completaron las cadenas laterales no asignadas con el programa WhatIF y se modelaron los segmentos faltantes de EcOmpA (aa 18 a 30, 64 a 70 y 146 a 159) con el programa Modeller v9.17<sup>205</sup>. Los modelos finales se orientaron con respecto a la bicapa lipídica con el servidor web OPM<sup>158</sup>.

(b) *MD atómica.* Ambos sistemas fueron sometidos a 500 ns de simulación de MD atómica empleando el campo de fuerza AMBER99SB-ILDN implementado en el programa GROMACS 5.1.4. Con base en la información experimental y en estudios previos de dinámica molecular, se embebió a EcOmpA en una membrana homogénea de 1,2-dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC),<sup>331,332</sup> mientras que la fosfolipasa EcOmpLA se embebió en una bicapa lipídica homogénea constituida por lípidos del tipo 1,2-dilauril-fosfatidilcolina (DLPC).<sup>333,334</sup> Ambos complejos proteína-membrana fueron generados con la herramienta *membrane builder*<sup>159</sup> del servidor web CHARMM-GUI<sup>160</sup>. Para estas simulaciones se utilizó la misma metodología de preparación, producción, parámetros y condiciones (310 K y 1.0 bar) descritas en el *capítulo VII* de este trabajo. Finalmente, se llevó a cabo un análisis de agrupamiento basado en el RMSD de las cadenas principales de las Omps (*cut-off* = 0.15 nm) para la selección de la estructura más representativa de los últimos 300 ns de las simulaciones. Los complejos proteína-membrana se extrajeron para su uso como modelos iniciales durante los cálculos de energía libre.

(c) *Cálculos de energía libre.* Se recopilaron los datos experimentales de  $\Delta\Delta G$  de 17 y 18 mutaciones de EcOmpA<sup>331</sup> y EcOmpLA<sup>333</sup>, respectivamente. Al igual que para la proteína HsCRYGD, se utilizó el modelo de 2-sistemas/1-caja para cada una de las proteínas, ensayando además el modelo de 2-sistemas/2-cajas para EcOmpA (ver *Esquema A6.2.2*). En esta ocasión, el tripéptido se colocó a una distancia aproximada de 4.0 nm en dirección al eje Z respecto a la estructura de la proteína, manteniendo a este último en la bicapa lipídica y al primero en el medio acuoso. Ambos sistemas se solvataron usando el modelo de agua TIP3P y neutralizaron con una solución de NaCl 0.15 M. Los *estados A* (EcOmp<sub>WT</sub> + tripéptido<sub>mutante</sub>) y *B* (EcOmp<sub>mutante</sub> + tripéptido<sub>WT</sub>) se

sometieron a minimizaciones energéticas y a los equilibrios antes descritos para proteínas membranales (2 ensamblajes NVT y 4 ensamblajes NPT), empleando los mismos parámetros y tiempos de simulación. A los equilibrios le siguieron simulaciones de 50 ns de MD para cada estado usando el campo de fuerza AMBER99SB-ILDN implementado en la paquetería de GROMACS 4.6.7. De los últimos 10 ns de simulación de cada sistema se extrajeron 100 conformaciones (*snapshots*), las cuales se minimizaron y equilibraron previo a la realización de 100 transiciones alquímicas independientes de 200 ps. Para estas transiciones se emplearon el potencial *soft-core* (sc) y un  $\lambda$  inicial de 0 ( $\Delta\lambda = 0.00001$ ) y 1 ( $\Delta\lambda = -0.00001$ ) para los *estados A* y *B*, respectivamente. Finalmente, la doble diferencia de energía de las mutaciones se calculó con el método CGI.<sup>260</sup>

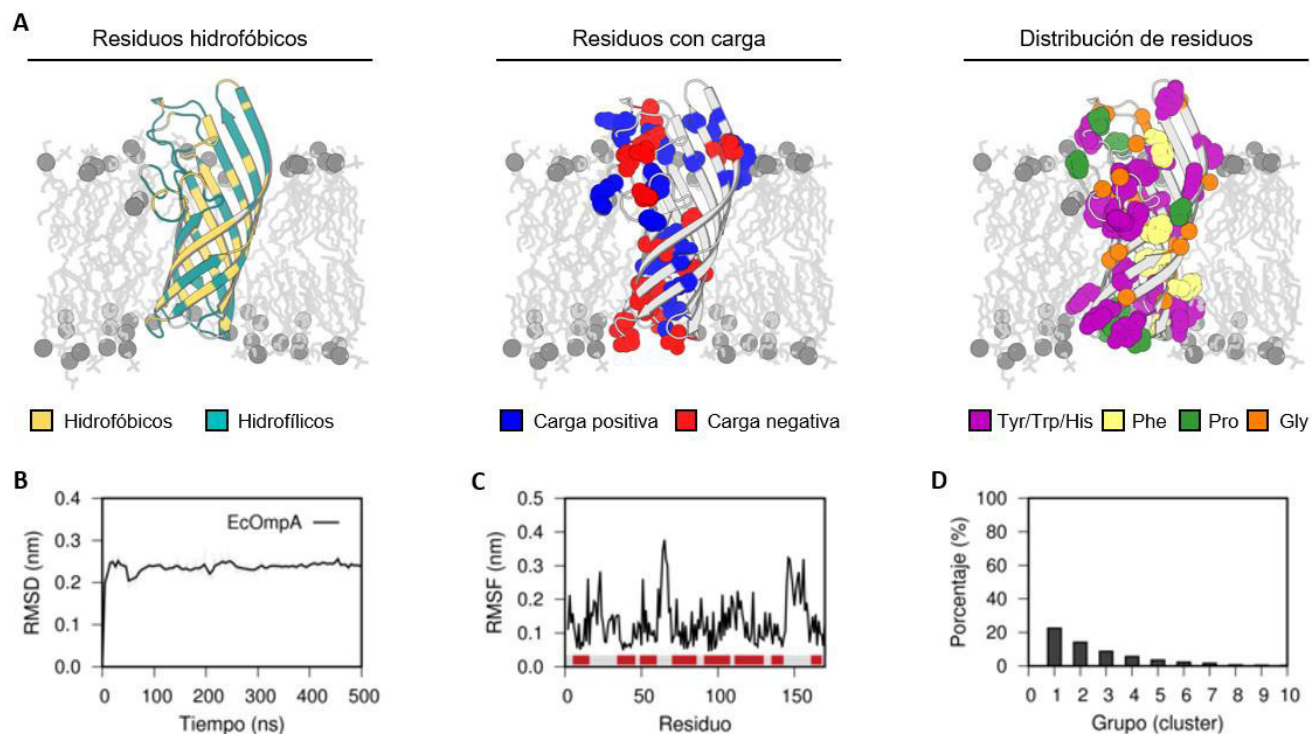
Para las simulaciones de la proteína EcOmpA con el modelo de 2-sistemas/2-cajas no fue necesario realizar los equilibrios previos a la simulación de 50 ns, esto debido a que se empleó el sistema directamente extraído de la simulación atomística. Por otro lado, el tripéptido se simuló en una caja de agua durante 20 ns, extrayendo de igual forma 100 snapshots de los últimos 10 ns para las trasmutaciones.<sup>256</sup> El método CGI permitió calcular de forma independiente el  $\Delta G_4$  por parte de EcOmpA, mientras que el  $\Delta G_3$  se obtuvo a partir de las transmutaciones alquímicas del tripéptido. Los valores de energía obtenidos de forma independiente fueron empleados para calcular la doble diferencia de energía libre ( $\Delta\Delta G_{mutación} = \Delta G_3 - \Delta G_4$ ).



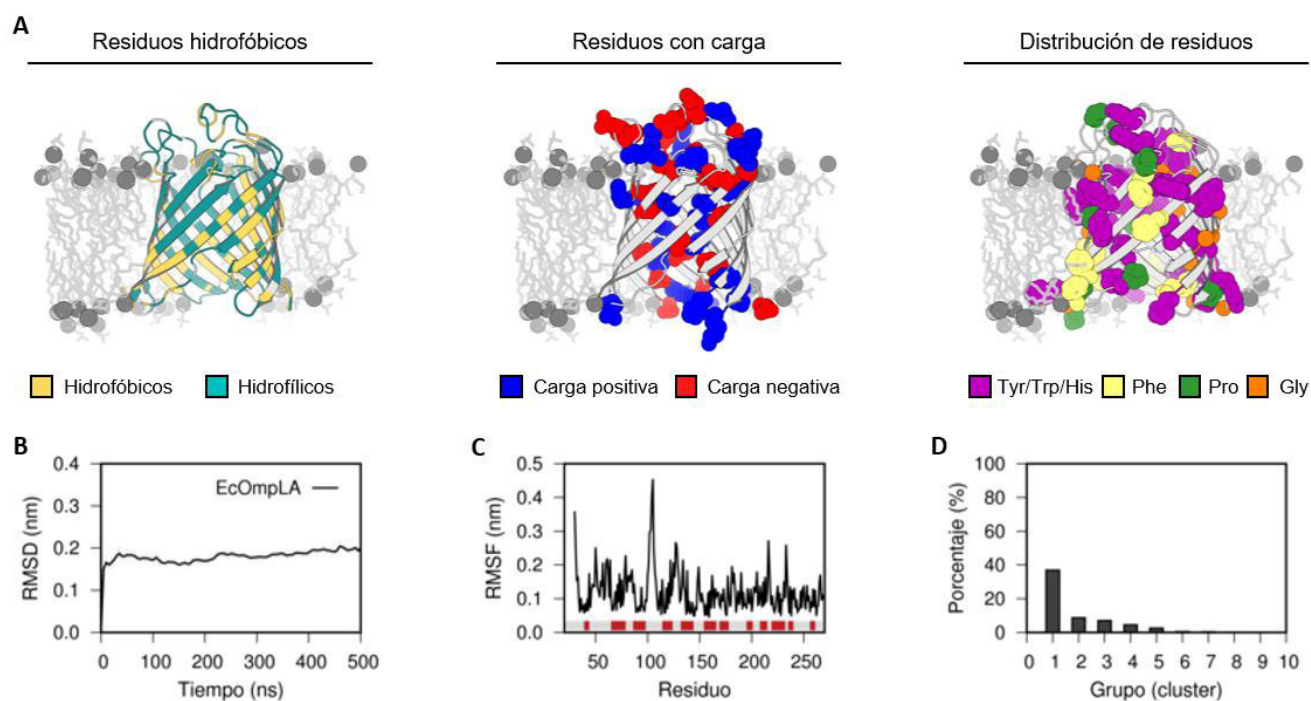
**Esquema A6.2.2.** Diagrama general de trabajo empleado para el cálculo de  $\Delta\Delta G$  de las mutantes de EcOmpA y EcOmpLA.

### XVI.6.2.2.2. Resultados y Discusión

En las Figuras A6.2.4 y A6.2.5 se muestran los resultados de la caracterización estructural y dinámica de las proteínas de barril  $\beta$  de la membrana externa de *E. coli* OmpA y OmpLA, respectivamente, obtenidos a partir de simulaciones atomísticas de 500 ns. En ambas proteínas se observa una distribución homogénea de residuos hidrofóbicos e hidrofílicos en la superficie, orientándose estos últimos hacia el interior del barril  $\beta$ . Los gráficos de RMSD y RMSF confirman la estabilidad de las proteínas durante la simulación, presentando regiones de alta flexibilidad en las asas que conectan a las hojas  $\beta$ . El análisis de agrupamiento permitió extraer la estructura más representativa de las simulaciones de cada proteína.



**Figura A6.2.4.** EcOmpA. (A) Representación de la distribución de los aminoácidos con propiedades hidrofóbicas, carga, aromáticos (Tyr, Trp, His, Phe) y modificadores de hojas  $\beta$  (Pro y Gly). (B) Gráfico de RMSD de la cadena principal durante los 500 ns de simulación. Gráficos de (C) RMSF por residuo y (D) agrupamiento calculados a partir de los últimos 200 ns.

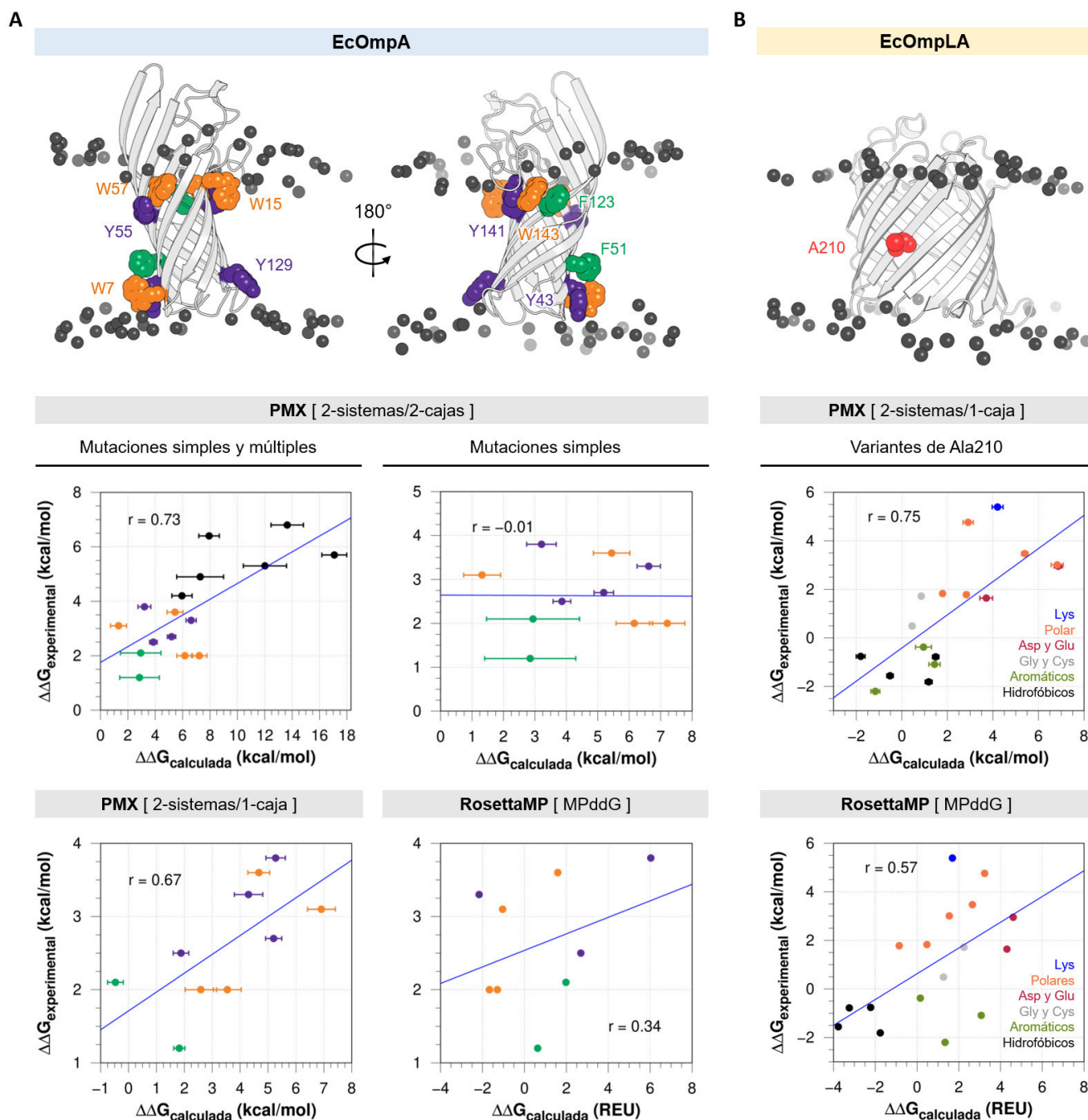


**Figura A6.2.5.** EcOmpLA. (A) Representación de la distribución de los aminoácidos con propiedades hidrofóbicas, carga, aromáticos (Tyr, Trp, His, Phe) y modificadores de hojas  $\beta$  (Pro y Gly). (B) Gráfico de RMSD de la cadena principal durante los 500 ns de simulación. Gráficos de (C) RMSF por residuo y (D) agrupamiento calculados a partir de los últimos 200 ns.

Un trabajo realizado por Tamm y colaboradores con la proteína EcOmpA demostró que las mutaciones en el cinturón aromático de la estructura de barril  $\beta$  altera la estabilidad de la macromolécula.<sup>331</sup> En ese estudio se reportaron los valores de energía libre de desplazamiento de la estructura WT y de 16 mutantes de EcOmpA en medio acuoso ( $\Delta\Delta G_{\text{desnat,H}_2\text{O}}$  o  $\Delta\Delta G_{\text{experimental}}$ ) como resultado de su desnaturalización química con urea en la membrana. Los residuos aromáticos de triptófano, tirosina y fenilalanina presentes en el cinturón aromático fueron mutados por alanina, generando un total de 10 mutaciones simples, 5 dobles y 1 triple (ver *Figura A6.2.6A*). En esta ocasión se empleó el modelo de 2-sistemas/2-cajas para calcular el  $\Delta\Delta G$  de las mutaciones con el método de PMX, dado que con este modelo es posible llevar a cabo transacciones independientes de mutaciones múltiples sin necesidad de aumentar el tamaño del sistema. Para las simulaciones se empleó una membrana homogénea compuesta por el lípido DMPC, en la cual se ha observado una alta estabilidad de la proteína en estudios de cristalografía de rayos X y dinámica molecular.<sup>332,335,336</sup> En la *Figura A6.2.6A* se muestra el gráfico que correlaciona los datos calculados de  $\Delta\Delta G$  para las 16 mutantes con los datos experimentales (ver *Figura A5.15* y *Tabla A5.5* del Apéndice V). El resultado de la regresión lineal muestra una alta correlación entre ambos datos de energía ( $r = 0.73$ ); sin embargo, dicha relación se obtiene como resultado de la alta desestabilización causada por las mutaciones múltiples y los bajos valores de  $\Delta\Delta G$  de las mutaciones simples. Al eliminar las mutaciones múltiples se observa una pérdida total de la correlación entre los datos experimentales y calculados, demostrando que el modelo de 2-sistemas/2-cajas no es indicado para estos sistemas, por lo que decidió implementar en su lugar el modelo de 2-sistemas/1-caja.

**Tabla A6.2.4.** Datos experimentales ( $\Delta\Delta G_{\text{exp}}$ ) y calculados ( $\Delta\Delta G_{\text{calc}}$ ) de la doble diferencia de energía libre de las mutaciones puntuales estudiadas en la proteína EcOmpA

Mutación	PMX – Modelo 1				PMX – Modelo 2	RosettaMP
	$\Delta\Delta G_{\text{exp}}$ (kcal/mol)	$\Delta G_{3\_calc}$ (kcal/mol)	$\Delta G_{4\_calc}$ (kcal/mol)	$\Delta\Delta G_{\text{calc}}$ (kcal/mol)	$\Delta\Delta G_{\text{calc}}$ (kcal/mol)	$\Delta\Delta G_{\text{calc}}$ (REU)
W7A	3.6		-6.98 ± 0.42	5.44 ± 0.58	4.67 ± 0.39	1.59
W15A	2.0	-12.42 ± 0.40	-5.22 ± 0.39	7.21 ± 0.56	2.59 ± 0.56	-1.67
W57A	2.0		-6.26 ± 0.41	6.16 ± 0.58	3.54 ± 0.50	-1.29
W143A	3.1		-11.10 ± 0.43	1.32 ± 0.59	6.91 ± 0.50	-1.04
Y43A	3.8		15.29 ± 0.47	3.21 ± 0.47	5.27 ± 0.35	6.03
Y55A	2.5	12.08 ± 0.07	15.94 ± 0.27	3.86 ± 0.28	1.88 ± 0.28	2.69
Y129A	2.7		17.26 ± 0.30	5.19 ± 0.31	5.20 ± 0.29	-12.77
Y141A	3.3		18.70 ± 0.37	6.62 ± 0.37	4.30 ± 0.51	-2.16
F51A	1.2	-8.22 ± 1.45	-5.38 ± 0.12	2.85 ± 1.45	1.82 ± 0.20	0.63
F123A	2.1		-5.28 ± 0.29	2.94 ± 1.48	-0.47 ± 0.28	1.98
W7A-Y43A	6.4	-0.34 ± 0.41	7.59 ± 0.63	7.93 ± 0.75	ND	ND
Y55A-W57A	4.2	-0.34 ± 0.41	5.61 ± 0.62	5.95 ± 0.74	ND	ND
F123A-W143A	4.9	-20.65 ± 1.50	-13.37 ± 0.81	7.28 ± 1.71	ND	ND
F123A-Y141	5.3	3.85 ± 1.45	15.86 ± 0.63	12.01 ± 1.58	ND	ND
Y141A-W143A	5.7	-0.34 ± 0.41	16.74 ± 0.82	17.08 ± 0.91	ND	ND
F123A-Y141A-W143A	6.8	-8.57 ± 0.58	5.07 ± 1.03	13.64 ± 1.18	ND	ND



**Figura A6.2.6.** Proteínas de la membrana externa EcOmpA y EcOmpLA. Representación de la estructura tridimensional con los sitios de mutación coloreados y regresiones lineales de los valores experimentales y calculados de  $\Delta\Delta G$  para los sistemas (A) EcOmpA y (B) EcOmpLA. Las esferas en color negro de las estructuras representan las cabezas de los lípidos de DMPC y DLPC empleados para las simulaciones de EcOmpA y EcOmpLA, respectivamente. Las barras en los gráficos generados con el método PMX representan el error asociado a la predicción. Las diferencias de energía calculadas con el método *MPddG* del programa RosettaMP se presentan en unidades de *Rosetta Energy Units* (REU). Los datos graficados para EcOmpA se encuentran coloreados respecto al tipo de residuo mutado (Trp – naranja, Tyr – púrpura, Phe – verde), mostrando en color negro a las mutaciones múltiples. En los gráficos EcOmpLA se colorean los datos respecto a las propiedades del residuo por el que fue mutado el aminoácido Ala210: Lys – azul, Polares (His, Ser, Thr, Asn y Gln) – naranja, Asp y Glu – rojo, Gly y Cys – gris, Aromáticos (Phe, Tyr y Trp) – verde e Hidrofóbicos (Gly, Leu, Ile, Met y Val) – negro.

La implementación del modelo de 2-sistemas/1-caja con las 10 mutaciones simples en EcOmpA mostró una mejoría significativa en la predicción del efecto desestabilizador de las variantes al presentar un coeficiente de correlación  $r = 0.67$ , con errores asociados a la predicción menores a 0.60 kcal/mol (ver Tabla A6.2.4). A pesar de la dispersión de los valores, los datos calculados permiten determinar, al igual que en los datos experimentales, que las mutaciones de las fenilalaninas no afectan la estabilidad de EcOmpA, y que las mutaciones Y43A, Y141A y W143A son las más desestabilizadoras. Además, el método PMX mostró ser más predictivo que el método *MPddG* del programa RosettaMP, en el que además se descartó a la mutación Y129A debido a que su valor de energía (*Rosetta Energy Units*, REU) se encontraba fuera del intervalo esperado ( $-10 \leq \text{REU} \leq 10$  kcal/mol).<sup>254</sup>

En el caso de la proteína EcOmpLA, el grupo de Fleming determinó la energía libre de transferencia de 19 variantes del aminoácido Ala210 desde su estado plegado en membranas de DLPC a su forma desnaturalizada en agua ( $\Delta\Delta G_{\text{denat,H}_2\text{O}}$  o  $\Delta\Delta G_{\text{experimental}}$ ), usando cloruro de guanidinio como agente desnaturalizante.<sup>333</sup> El aminoácido mutado Ala210 se localiza en la región media de la proteína, orientando su residuo hacia la interfaz de las monocapas de la membrana de DLPC (ver *Figura A6.2.6B*). Los resultados experimentales mostraron que la modificación de este aminoácido por residuos hidrofóbicos (Phe, Leu, Ile, Pro, Tyr, Val, Met y Trp) contribuía a la estabilidad de la proteína en la membrana, mientras que el cambio por Gly o residuos polares y cargados favorecía su transición al medio acuoso. Para la predicción de  $\Delta\Delta G$  con el método de PMX, se descartó de forma inicial la mutación A210P dada la imposibilidad de calcular transiciones atómicas con el residuo de prolina.<sup>257</sup> Además de esta mutación, se descartó la variante A210R debido a la gran diferencia de energía calculada durante la transición del residuo en los medios acuoso y transmembranal ( $\Delta\Delta G_{\text{A210R}} = 16.93$  kcal/mol). Este artefacto en la predicción se debe a que la carga formal positiva del residuo de arginina tiene mayor preferencia por un medio hidrofílico (agua) que por un medio hidrofóbico (lípidos). Lo mismo ocurre con los residuos cargados de Asp ( $\Delta\Delta G_{\text{A210D}} = 23.81$  kcal/mol), Glu ( $\Delta\Delta G_{\text{A210E}} = 27.21$  kcal/mol) y Lys ( $\Delta\Delta G_{\text{A210K}} = 22.05$  kcal/mol), por lo que para estos se llevaron a cabo las transmutaciones de la forma neutra en ambos medios (i.e. Asp y Glu protonados y Lys desprotoando). En la *Figura A6.2.6B* se muestra la regresión lineal de los datos de  $\Delta\Delta G$  calculados contra los experimentales, formando seis grupos diferentes de las variantes de acuerdo con las propiedades del residuo por lo que se mutó a Ala210: (1) Lys, (2) Polares (His, Ser, Thr, Asn y Gln), (3) Asp y Glu, (4) Gly y Cys, (5) Aromáticos (Phe, Tyr y Trp) y (6) Hidrofóbicos (Gly, Leu, Ile, Met y Val) – negro. El gráfico obtenido muestra una correlación aceptable ( $r = 0.75$ ) entre los datos predichos y los experimentales, mostrando además valores inferiores a los 0.35 kcal/mol del error asociado a la predicción (ver Tabla A6.2.5). Con los resultados del cálculo se corrobora que la modificación del residuo de Ala210 por grupos hidrofóbicos, en los que se incluyen los aromáticos, favorecen la estabilidad de EcOmpLA en la membrana ( $\Delta\Delta G < 0.00$  kcal/mol), mientras que la Gly, Cys y los residuos polares promueven su desnaturalización en agua ( $\Delta\Delta G > 0.00$  kcal/mol). Al igual que con el sistema EcOmpA, el método de PMX presentó una mejor predicción del efecto de las mutaciones en la desestabilización de EcOmpLA en comparación con el método *MPddG* del programa RosettaMP. A pesar de la baja correlación, este último también logra representar la tendencia de grupos desestabilizadores /estabilizadores observada de forma experimental y con el método de PMX.



**Tabla A6.2.5.** Datos experimentales ( $\Delta\Delta G_{\text{exp}}$ ) y calculados ( $\Delta\Delta G_{\text{calc}}$ ) de la doble diferencia de energía libre de las mutaciones puntuales estudiadas en la proteína EcOmplA

Mutación	$\Delta\Delta G_{\text{exp}}$ (kcal/mol)	PMX	RosettaMP	Mutación	$\Delta\Delta G_{\text{exp}}$ (kcal/mol)	PMX	RosettaMP
		$\Delta\Delta G_{\text{calc}}$ (kcal/mol)	$\Delta\Delta G_{\text{calc}}$ (REU)			$\Delta\Delta G_{\text{calc}}$ (kcal/mol)	$\Delta\Delta G_{\text{calc}}$ (REU)
A210C	0.49	0.45 ± 0.08	1.27	A210M	-0.76	-1.81 ± 0.20	-2.22
A210D	2.95	6.86 ± 0.18	4.61	A210N	3.47	5.40 ± 0.14	2.66
A210E	1.64	3.71 ± 0.28	4.31	A210Q	3.01	6.82 ± 0.26	1.55
A210F	-2.20	-1.16 ± 0.19	1.34	A210R	3.71	ND	1.16
A210G	1.72	0.85 ± 0.09	2.25	A210S	1.83	1.79 ± 0.07	0.47
A210H	4.76	2.91 ± 0.22	3.24	A210T	1.78	2.84 ± 0.12	-0.85
A210I	-1.56	-0.52 ± 0.14	-3.77	A210V	-0.78	1.49 ± 0.14	-3.24
A210K	5.39	4.20 ± 0.24	1.70	A210W	-0.38	0.95 ± 0.35	0.16
A210L	-1.81	1.18 ± 0.16	-1.76	A210Y	-1.09	1.44 ± 0.25	3.08

Los resultados obtenidos con las proteínas de la membrana externa de *E. coli* permiten concluir que el método de PMX es confiable en la predicción de la estabilidad de sistemas embebidos en membranas lipídicas. Además, durante los estudios fue posible determinar tres puntos clave a considerar durante la transmutación de residuos en este tipo de proteínas de membrana:

- (1) Se prefiere el modelo de 2-sistemas/1-caja sobre el modelo de 2-sistemas/2-cajas.
- (2) Se requiere utilizar especies neutras en mutaciones que involucren aminoácidos cargados expuestos a la región intramembranal de la bicapa lipídica. Una segunda opción sería utilizar la especie neutra en la membrana y la cargada en el agua, transmutando de forma paralela un ion de la solución.
- (3) El error asociado a la predicción debe ser menor a 1.00 kcal/mol para poder ser considerado.

### XVI.6.2.3. Proteasa romboidal GlpG de *E. coli*

La enzima GlpG de *E. coli* (EcGlpG) es una serín proteasa romboidal intramembranal constituida por seis TMs, la cual contiene un residuo catalítico de serina en TM4 (Ser201) (ver *Figura A6.2.8A*).<sup>337</sup> En presencia de un péptido sustrato, el residuo Ser201 forma un puente de hidrógeno con His254 (TM6) que promueve la transferencia del hidrógeno hacia el grupo imidazol, generando al grupo oxianión en la serina que conlleva de manera concertada un ataque nucleofílico al enlace peptídico del sustrato.<sup>338</sup> Un estudio computacional realizado por Albeck y Shokhen<sup>339</sup> demostró que ambos residuos catalíticos se encuentran normalmente en su forma neutra en la membrana, llevándose a cabo la desprotonación de Ser201 por His254 únicamente cuando el sustrato ha ingresado al sitio activo. A diferencia de las OMPs, esta proteasa se localiza en la membrana interna de la bacteria rodeándose mayoritariamente por fosfolípidos del tipo POPE.<sup>340</sup> Estudios de MD previos han demostrado que la proteína es completamente estable en simulaciones con membranas homogéneas de POPE a 310 K, presentando variaciones en las interacciones intramoleculares cuando se reemplaza por POPC.<sup>341,342</sup>

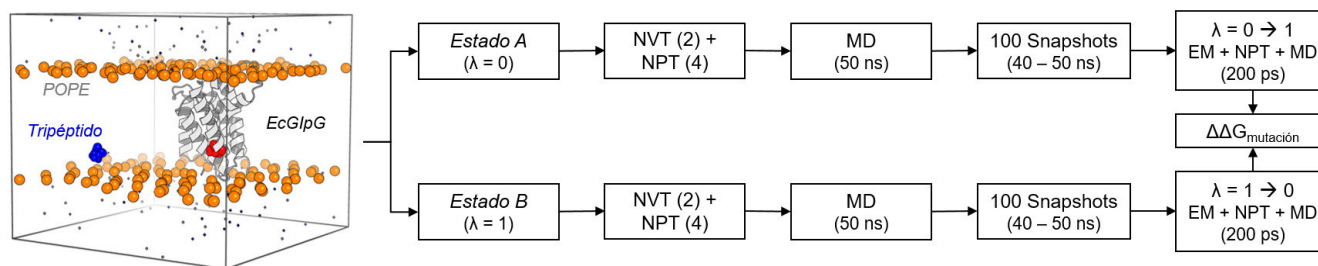
#### XVI.6.2.3.1. Metodología

(a) *Preparación de los modelos.* Se descargó del PDB la estructura de rayos X de la proteasa romboidal GlpG de *E. coli* (EcGlpG) con clave 5F5B (2.30 Å)<sup>343</sup> y se eliminó el péptido inhibidor co-cristalizado en el sitio activo. El modelo final se orientó respecto a una bicapa lipídica de referencia con el servidor OPM.

(b) *MD atomística.* La proteasa EcGlpG se sometió a 200 ns de simulación de MD atomística empleando el campo de fuerza AMBER99SB-ILDN implementado en el programa GROMACS 5.1.4. Con base en la información experimental y en estudios previos de dinámica molecular, se embebió a la proteasa EcGlpG en una membrana homogénea de 1-palmitoil-2-oleil-fosfatidiletanolamina (POPE).<sup>344</sup> El complejo proteína-membrana se construyó con la herramienta *membrane builder*<sup>159</sup> del servidor web CHARMM-GUI<sup>160</sup>. Para estas simulaciones se utilizó la misma metodología de preparación, producción, parámetros y condiciones (310 K y 1.0 bar) descritas en el *Capítulo VII* de este trabajo. Finalmente, se llevó a cabo un análisis de agrupamiento basado en el RMSD de la cadena principal (*cut-off* = 0.15 nm) para la selección de la estructura más representativa de los últimos 100 ns de simulación. Se extrajo únicamente la conformación más representativa de la proteína para su uso como modelo inicial durante los cálculos de energía libre.

(c) *Cálculos de energía libre.* Se recopilaron un total de 97 valores de  $\Delta T_m$  para la proteasa de EcGlpG.<sup>344</sup> Para esta proteasa empleó el modelo de 2-sistemas/1-caja, posicionando al tripéptido en la misma membrana lipídica que la de la proteína (ver *Esquema A6.2.3*). El tripéptido se colocó a una distancia aproximada de 3.0 nm respecto a la proteína, manteniendo la misma posición en el eje Z que la del residuo a transmutar en la proteína y restringiendo la movilidad del C $\alpha$  del residuo central del tripéptido y el del residuo Val176 de la proteína. Para la preparación del sistema fue necesario construir la membrana con el método de expansión/ensamble de lípidos implementado en el programa InflateGRO.<sup>137</sup> Se llevaron a cabo varios ciclos de ensamble de lípidos antes de colocar al tripéptido en la posición correspondiente. El sistema se solvató usando el modelo de agua TIP3P y neutralizó con una solución de NaCl 0.15 M. Los *estados A* (Proteasa<sub>WT</sub> + tripéptido<sub>mutante</sub>) y *B* (Proteasa<sub>mutante</sub> + tripéptido<sub>WT</sub>) se sometieron a minimizaciones energéticas y a los equilibrios antes descritos para proteínas membranales, empleando los mismos parámetros y tiempos de simulación (ver *Capítulo VII*). A los equilibrios le

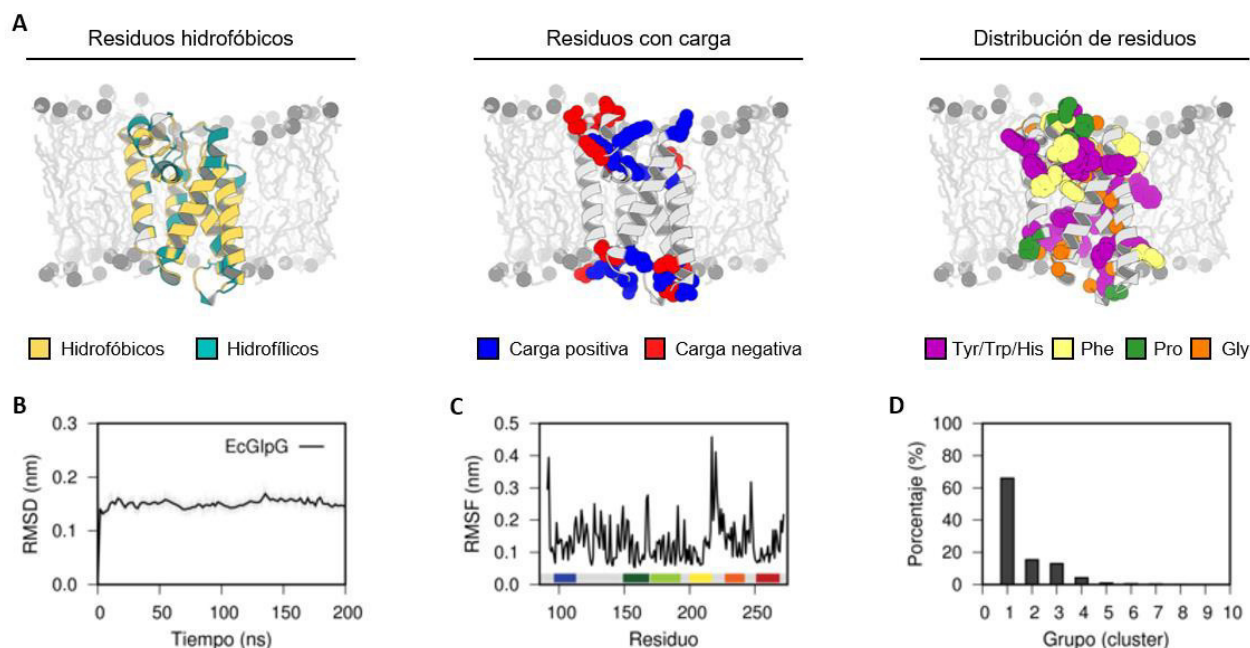
siguieron simulaciones de 50 ns de MD para cada estado usando el campo de fuerza AMBER99SB-ILDN implementado en la paquetería de GROMACS 4.6.7. De los últimos 10 ns de simulación de cada sistema se extrajeron 100 conformaciones (*snapshots*), las cuales se minimizaron y equilibraron previo a la realización de 100 transiciones alquímicas independientes de 200 ps. Para estas transiciones se empleó el potencial *soft-core* (sc) y un  $\lambda$  inicial de 0 ( $\Delta\lambda = 0.00001$ ) y 1 ( $\Delta\lambda = -0.00001$ ) para los *estados A* y *B*, respectivamente. Finalmente, la doble diferencia de energía de las mutaciones se calculó con el método CGI.<sup>260</sup>



**Esquema A6.2.3.** Diagrama general de trabajo empleado para el cálculo de  $\Delta\Delta G$  de las mutantes de la proteasa transmembranal EcGlpG.

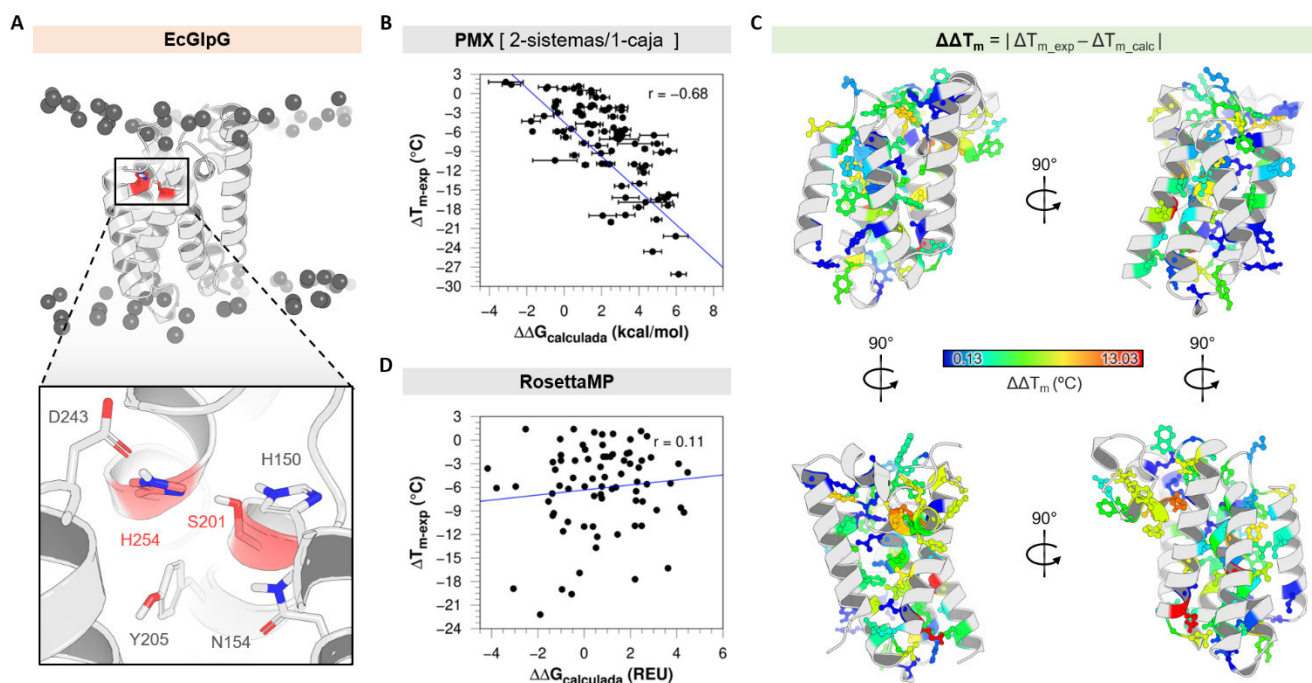
### XVI.6.2.3.2. Resultados y Discusión

La *Figura A6.2.7* muestra la información estructural y dinámica de la proteasa transmembranal GlpG de *E. coli* obtenida a partir de simulación atomística de 200 ns. La simulación de MD permite corroborar que la proteasa logra estabilizarse en los primeros nanosegundos de la simulación, mostrando pocos cambios conformacionales respecto a la estructura inicial asociados a la movilidad de las asas que conectan a las TMs.



**Figura A6.2.7.** Proteasa transmembranal EcGlpG. (A) Representación de la distribución de los aminoácidos con propiedades hidrofóbicas, carga, aromáticos (Tyr, Trp, His, Phe) y modificadores de hélices transmembranales (Pro y Gly) en la estructura 3D de la proteasa EcGlpG. (B) Gráfico de RMSD de la cadena principal durante los 200 ns de simulación. Gráficos de (C) RMSF por residuo y (D) agrupamiento calculados a partir de los últimos 100 ns.

Con el fin de estudiar la estabilidad termodinámica de la proteasa EcGlpG, Baker y Urban llevaron a cabo determinaciones de desnaturalización térmica de un total de 143 variantes de la macromolécula.<sup>344</sup> La información generada les permitió identificar a los residuos clave en el mantenimiento de la arquitectura y actividad de la enzima. El ensayo de termoestabilidad se realizó a 104 variantes con mutaciones simples y 39 con mutaciones múltiples, de las que se reportaron para cada una los valores de temperatura de fusión ( $T_m$ ). Los datos de estabilidad térmica se obtuvieron a partir de la diferencia de los valores de  $T_m$  de las variantes con el de la WT ( $\Delta T_m = T_{m\_mut} - T_{m\_WT}$  [71.08 °C]). Además, las autoras realizaron determinaciones de la actividad proteolítica de EcGlpG en condiciones desnaturalizantes, demostrando una relación directa entre el efecto desestabilizador/estabilizador y la pérdida/aumento de la actividad en la mayoría de las mutantes.



**Figura A6.2.8.** Proteasa EcGlpG. (A) Representación de la estructura y del microambiente en el que se encuentra la diada catalítica de Ser201 (TM4) e His254 (TM6). (B) Regresión lineal de los datos calculados de  $\Delta\Delta G$  con el método PMX y los valores experimentales de desnaturalización térmica ( $\Delta T_{m\_exp}$ ). (C) Representación del valor absoluto de la diferencia entre los datos de  $\Delta T_m$  calculados ( $\Delta T_{m\_calc}$ ) y experimentales ( $\Delta\Delta T_m = |\Delta T_{m\_exp} - \Delta T_{m\_calc}|$ ), utilizando un código de color que denota los residuos con las menores (azul) y mayores (rojo) diferencias. (D) Regresión lineal de los datos calculados de  $\Delta\Delta G$  con el método MPdG del programa RosettaMP (*Rosetta Energy Units*, REU) y los valores experimentales de desnaturalización térmica.

Con base en la información experimental, se consideró para este estudio la formación de un producto intermedio de desnaturalización de EcGlpG embebido en la membrana como representación del estado desplegado de la proteína.<sup>281,345</sup> Es por lo anterior que para los cálculos de estabilidad termodinámica con el método de PMX se posicionó al tripéptido en la membrana lipídica, manteniendo la misma posición en el eje Z que la del residuo correspondiente en la proteína. Para este estudio se descartaron las 39 variantes con mutaciones múltiples y los cambios de residuo que involucraran prolina, conservando al final un total de 97 de

las 151 mutaciones. Una vez realizados los cálculos, se eliminaron 12 de esas 97 variantes debido a que durante el análisis de CGI de las 100 simulaciones independientes de alguno de los estados se determinó una baja calidad en la distribución de datos. En la *Figura A6.2.8B* se muestra el gráfico de regresión lineal de los valores de  $\Delta\Delta G$  calculados contra los datos experimentales de  $\Delta T_m$  de las 85 variantes finales (ver *Tabla A6.2.6*). En este gráfico se observa que existe una relación directa aceptable entre ambas determinaciones, permitiendo predecir las mutaciones con propiedades estabilizadoras ( $\Delta\Delta G_{calculada} < 0.00$  kcal/mol) y desestabilizadoras ( $\Delta\Delta G_{calculada} > 2.00$  kcal/mol). Las mutaciones que involucraban un cambio en la carga formal del residuo (i.e. D268A, K173A, R214A, E134A) fueron las únicas en presentar errores en la predicción mayores a 1.00 kcal/mol. Los datos de  $\Delta\Delta G$  fueron utilizados para calcular el  $\Delta T_m$  ( $\Delta T_{m\_calc}$ ) con la ecuación de Rees y Robertson<sup>266</sup> ( $\Delta T_{m\_calc} = \Delta\Delta G / Nk$ ), permitiendo relacionar directamente los datos experimentales con los calculados al computar el valor absoluto de la diferencia entre ambos ( $\Delta\Delta T_m = | \Delta T_{m\_exp} - \Delta T_{m\_calc} |$ ) (ver *Tabla A6.2.6*). En la *Figura A6.2.8C* se muestra la representación del  $\Delta\Delta T_m$  en la estructura de EcGlpG utilizando un código de color que denota los aminoácidos con menores (azul) y mayores (rojo) diferencias entre sus valores de  $\Delta T_m$ . Este análisis sugiere que no existe una relación entre la posición del aminoácido en la estructura y el nivel de predicción del método. Finalmente, es importante mencionar que, al igual que en las OMPs, los datos de estabilidad de EcGlpG calculados con el método *MMddG* de RosettaMP fueron menos predictivos que los obtenidos con el método PMX (*Figura A6.2.8D*).

Los resultados obtenidos con las OMPs y esta proteasa permiten concluir que el método de PMX tiene una predicción aceptable en proteínas membranales y que puede ser utilizado tanto para estructuras compuestas por barriles  $\beta$  como para hélices transmembranales. Esto también sugiere que el método podría predecir de forma confiable el efecto de mutaciones en el sistema de estudio GS-A $\beta$ .

**Tabla A6.2.6.** Datos experimentales de  $\Delta T_{m\_exp}$  y valores calculados de la doble diferencia de energía libre ( $\Delta\Delta G$ ) y desnaturalización térmica ( $\Delta T_{m\_calc}$ ) con el método de PMX para la proteasa EcGlpG

Mutación	$\Delta T_{m\_exp}$ (°C)	PMX		Rosetta	Mutación	$\Delta T_{m\_exp}$ (°C)	PMX		Rosetta
		$\Delta\Delta G_{calc}$ (kcal/mol)	$\Delta T_{m\_calc}$ (°C)	$\Delta\Delta G_{calc}$ (REU)			$\Delta\Delta G_{calc}$ (kcal/mol)	$\Delta T_{m\_calc}$ (°C)	$\Delta\Delta G_{calc}$ (REU)
C104A	-3.8	3.14 ± 0.09	9.07	-1.25	T140A	-9.6	0.54 ± 0.24	1.57	-1.36
M111A	-4.8	1.61 ± 0.46	4.67	-0.48	H141A	-18.9	3.28 ± 0.50	9.49	-3.06
Q112A	-4.7	1.27 ± 0.66	3.68	0.89	L143A	-12.3	4.26 ± 0.28	12.31	0.57
M120A	-3.0	0.85 ± 0.23	2.46	1.98	M144A	-6.9	2.79 ± 0.35	8.05	0.72
L123A	-9.3	1.97 ± 0.49	5.70	-1.31	H145A	-22.2	5.97 ± 0.66	17.27	-1.90
E134A	-7.8	3.80 ± 0.94	10.98	-1.54	H145F	-19.6	4.94 ± 0.29	14.29	-0.54
W136F	-11.0	3.75 ± 0.31	10.85	0.00	H145Q	-19.0	2.06 ± 0.74	5.97	-0.96
W136Y	-4.3	-1.77 ± 0.50	-5.12	1.60	F146A	-5.5	0.38 ± 0.25	1.10	3.73
R137K	-16.2	3.29 ± 0.72	9.51	10.35	S147A	-11.0	2.42 ± 0.17	7.00	0.38
Y138F	-6.8	0.09 ± 0.26	0.26	-1.38	H150A	-5.9	2.15 ± 0.29	6.23	-2.96
F139A	-7.8	4.98 ± 0.30	14.39	2.53	I151A	-3.6	2.61 ± 0.25	7.55	-4.17

\*REU: Rosetta Energy Units

**Tabla A6.2.6. Continuación.** Datos experimentales de  $\Delta T_{m\_exp}$  y valores calculados de la doble diferencia de energía libre ( $\Delta\Delta G$ ) y desnaturalización térmica ( $\Delta T_{m\_calc}$ ) con el método de PMX para la proteasa EcGlpG

Mutación	$\Delta T_{m\_exp}$ (°C)	PMX		Rosetta	Mutación	$\Delta T_{m\_exp}$ (°C)	PMX		Rosetta
		$\Delta\Delta G_{calc}$ (kcal/mol)	$\Delta T_{m\_calc}$ (°C)	$\Delta\Delta G_{calc}$ (REU)			$\Delta\Delta G_{calc}$ (kcal/mol)	$\Delta T_{m\_calc}$ (°C)	$\Delta\Delta G_{calc}$ (REU)
F153A	-1.2	-0.40 ± 0.22	-1.14	0.04	Y205A	1.8	-3.12 ± 0.93	-9.02	-4.67
L155A	-8.6	4.32 ± 0.14	12.48	4.18	A206G	-5.3	2.65 ± 0.06	7.66	2.29
W157F	-0.6	1.71 ± 0.35	4.95	0.80	A206V	-17.4	5.55 ± 0.33	16.05	30.53
W158F	-3.0	-0.34 ± 0.25	-0.98	4.08	L207A	-17.7	3.98 ± 0.27	11.51	2.20
Y160F	-2.8	0.68 ± 0.19	1.96	-1.35	G209A	-1.7	-0.45 ± 0.14	-1.29	1.85
G162A	0.8	-0.95 ± 0.08	-2.76	37.60	G209V	-8.1	1.81 ± 0.52	5.24	19.30
G162V	-24.6	4.74 ± 0.48	13.70	44.69	Y210F	-10.9	2.22 ± 0.48	6.43	2.20
L169A	-3.5	-1.08 ± 0.53	-3.11	2.36	R214A	-7.1	2.94 ± 1.04	8.49	0.43
G170A	-11.1	1.14 ± 0.17	3.28	9.00	G215V	-8.9	5.59 ± 0.44	16.16	80.57
G170V	-14.0	4.02 ± 0.38	11.63	15.31	S221A	-1.9	0.84 ± 0.15	2.43	-1.00
S171A	-5.8	3.09 ± 0.20	8.93	-1.06	Y224A	-0.6	2.08 ± 0.35	6.01	-0.06
K173A	-10.4	-0.49 ± 1.19	-1.42	-0.70	Q226A	-4.9	1.52 ± 0.40	4.40	0.36
L174A	-16.3	5.40 ± 0.21	15.61	3.63	I230A	0.7	0.03 ± 0.38	0.09	0.78
T178A	-5.9	-0.38 ± 0.22	-1.08	0.77	I237A	1.1	0.78 ± 0.27	2.25	2.46
S181A	0.1	0.84 ± 0.14	2.42	-1.03	G240A	-1.8	1.51 ± 0.18	4.37	1.24
L183A	0.8	0.52 ± 0.25	1.50	1.25	L244A	-2.1	3.08 ± 0.34	8.91	1.13
G186V	-15.9	5.57 ± 0.51	16.12	12.01	F245A	-2.2	2.41 ± 0.43	6.97	2.89
Q190A	1.4	-2.83 ± 0.49	-8.17	-0.45	M247A	-2.1	1.41 ± 0.35	4.06	0.96
S193A	-2.1	-0.51 ± 0.13	-1.49	0.83	M249A	0.5	1.45 ± 0.50	4.18	2.72
G194V	-11.2	4.36 ± 0.35	12.60	35.13	A253V	-7.7	1.06 ± 0.24	3.05	2.24
W196A	-2.6	2.17 ± 0.25	6.27	-0.39	H254A	1.0	-0.88 ± 0.50	-2.54	0.44
F197A	-6.5	3.11 ± 0.42	8.99	2.25	G257A	-5.9	-1.69 ± 0.10	-4.89	60.37
F197V	-9.2	5.20 ± 0.42	15.03	4.31	G257V	-14.4	3.08 ± 0.38	8.90	498.07
G198V	-6.5	4.80 ± 0.76	13.88	97.75	L258A	-5.6	3.26 ± 0.31	9.42	2.71
L200A	-11.6	4.14 ± 0.23	11.98	-0.91	G261A	-20.0	2.50 ± 0.13	7.24	177.71
S201A	-6.2	1.41 ± 0.11	4.08	-0.68	G261V	-28.1	6.13 ± 0.41	17.71	581.65
S201C	-6.0	2.83 ± 0.10	8.19	1.37	L262A	-2.6	3.07 ± 0.31	8.88	-1.00
S201T	-3.4	0.96 ± 0.17	2.78	0.71	A265G	0.1	1.47 ± 0.26	4.25	2.00
G202A	-5.9	-0.05 ± 0.06	-0.14	0.02	A265V	-16.5	5.03 ± 0.40	14.55	126.36
G202V	-15.7	5.58 ± 0.51	16.14	13.65	D268A	-16.9	4.35 ± 1.45	12.59	-0.20
V203A	-10.9	2.02 ± 0.12	5.83	2.49	S269A	-2.6	2.20 ± 0.20	6.37	1.72
V204A	-8.9	2.54 ± 0.11	7.34	3.13					

\*REU: Rosetta Energy Units

---

**XVI.7. Apéndice VII**

---

# Generation of Amyloid- $\beta$ Peptides by $\gamma$ -Secretase

Rodrigo Aguayo-Ortiz and Laura Dominguez<sup>\*,[a]</sup>

**Abstract:**  $\gamma$ -Secretase is a four-component membrane-embedded aspartyl protease involved in the final cleavage step of the amyloid precursor protein (APP) to generate the amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) peptide. Different amino-acid lengths of A $\beta$  peptide can be produced by this enzyme, of which the oligomerization and aberrant accumulation of the product containing 42 amino acids (A $\beta$ 42) has been associated with the de-

velopment and formation of amyloid- $\beta$  plaques in the brain of Alzheimer's disease (AD) patients. Herein, we review some of the most important topics associated with the structure and activity of  $\gamma$ -secretase and the factors that alter the substrate cleavage pattern, critical to the formation of the different isoforms of the amyloid- $\beta$  peptides.

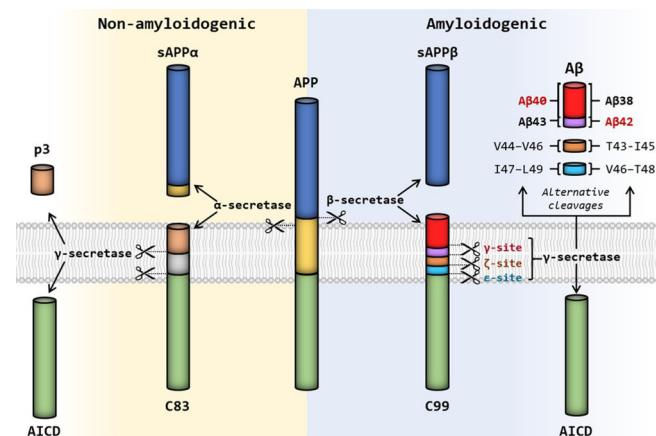
**Keywords:** Alzheimer's disease · amyloid beta-peptides · amyloid precursor protein · enzymes,  $\gamma$ -secretase

## 1. Introduction

The development and progression of Alzheimer's disease (AD) has been associated with the aberrant oligomerization and aggregation of the amyloid- $\beta$  peptide (A $\beta$ ).<sup>[1–3]</sup> It has been proposed that A $\beta$  oligomers are implicated in disturbing the synapses on nerve cells through binding to immunoglobulin-like receptors, forming toxic  $\beta$ -barrel ion channels or interacting with membrane lipids, and in creating A $\beta$  plaques that lead to nerve-cell death.<sup>[4–9]</sup> A $\beta$  monomers can be produced by the sequential ectodomain shedding and regulated intramembrane proteolysis (RIP) of amyloid precursor protein (APP), undertaken by the enzymes  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -secretase (Figure 1).<sup>[10]</sup> The APP can be proteolytically processed by the nonamyloidogenic pathway or by the alternative, the amyloidogenic pathway

that releases A $\beta$ . In the first, APP is initially cleaved by a disintegrin and metalloproteinase (ADAM9, ADAM10, or ADAM17)  $\alpha$ -secretase to produce a soluble N-terminal fragment (sAPP $\alpha$ ) and an 83-residue C-terminal fragment (C83).<sup>[11–13]</sup> While the sAPP $\alpha$  fragment is released to perform neuroprotective and neurotrophic functions, the C83 peptide is subsequently processed by  $\gamma$ -secretase to yield APP intracellular domain (AICD) that mediates nuclear signaling and a short soluble nonamyloidogenic N-terminal peptide (p3) with neuroprotective function.<sup>[13–17]</sup> Nevertheless, peptide p3 has also been identified as a constituent of preamyloid and diffuse amyloid deposits in Down's syndrome and AD brains, respectively.<sup>[17–19]</sup>

The second pathway is triggered by the cleavage of APP by  $\beta$ -secretase ( $\beta$ -site APP-cleaving enzyme 1, BACE1) to produce a soluble N-terminal fragment (sAPP $\beta$ ) and the 99-residue C-terminal fragment of amyloid precursor protein (C99).  $\beta$ -Secretase is a membrane-associated aspartic protease that cleaves APP on the luminal side of the membrane, and its activity has been proposed to be the rate-limiting step of A $\beta$  production.<sup>[20,21]</sup> After the  $\beta$ -secretase cleavage, the intramembrane cleavage of C99 by  $\gamma$ -secretase leads to the production of the AICD fragment and the A $\beta$  peptide. Natural variation in the process of cleavage leads to the production of different isoforms (lengths) of A $\beta$ . A $\beta$ 40 is the predominant



**Figure 1.** Sequential ectodomain shedding and regulated intramembrane proteolysis (RIP) of amyloid precursor protein (APP) involved in the amyloidogenic and nonamyloidogenic pathways. Alternative cleavage series of the  $\epsilon$ -,  $\zeta$ -, and  $\gamma$ -cleavage sites lead to the formation of different A $\beta$  products.

[a] R. Aguayo-Ortiz, L. Dominguez  
Departamento de Físicoquímica  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Ciudad de México 04510 (México)  
Tel.: (+52) 55-562-23773  
e-mail: lauradd@unam.mx



Cite this: *Chem. Sci.*, 2017, 8, 5576

# Characterizing the structural ensemble of $\gamma$ -secretase using a multiscale molecular dynamics approach†

Rodrigo Aguayo-Ortiz,<sup>a</sup> Cecilia Chávez-García,<sup>a</sup> John E. Straub<sup>b</sup>  
and Laura Dominguez<sup>id</sup>\*<sup>a</sup>

$\gamma$ -Secretase is an intramembrane-cleaving aspartyl protease that plays an essential role in the processing of a variety of integral membrane proteins. Its role in the ultimate cleavage step in the processing of amyloid precursor protein to form amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) peptide makes it an important therapeutic target in Alzheimer's disease research. Significant recent advances have been made in structural studies of this critical membrane protein complex. However, details of the mechanism of activation of the enzyme complex remain unclear. Using a multiscale computational modeling approach, combining multiple coarse-grained microsecond dynamic trajectories with all-atom models, the structure and two conformational states of the  $\gamma$ -secretase complex were evaluated. The transition between enzymatic state 1 and state 2 is shown to critically depend on the protonation states of the key catalytic residues Asp257 and Asp385 in the active site domain. The active site formation, related to our  $\gamma$ -secretase state 2, is observed to involve a concerted movement of four transmembrane helices from the catalytic subunit, resulting in the required localization of the catalytic residues. Global analysis of the structural ensemble of the enzyme complex was used to identify collective fluctuations important to the mechanism of substrate recognition and demonstrate that the corresponding fluctuations observed were uncorrelated with structural changes associated with enzyme activation. Overall, this computational study provides essential insight into the role of structure and dynamics in the activation and function of  $\gamma$ -secretase.

Received 2nd March 2017

Accepted 5th June 2017

DOI: 10.1039/c7sc00980a

rsc.li/chemical-science

## Introduction

$\gamma$ -Secretase is a membrane-embedded aspartyl protease that cleaves different integral membrane proteins within the lipid bilayer including amyloid precursor protein (APP), Notch, N-cadherin and ErbB4.<sup>1</sup> APP is initially cleaved by  $\beta$ -secretase to release the APP C-terminal fragment (APP-C99), which is subsequently processed by  $\gamma$ -secretase to yield a variety of amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) peptides of different lengths. The pattern of cleavage of APP-C99 results in a primary isoform, A $\beta$ 40 consisting of 40 amino acids, in addition to minor isoforms including A $\beta$ 38 and A $\beta$ 42.<sup>2</sup> Aberrant accumulation of A $\beta$ 42 over A $\beta$ 40 has been associated with the formation of amyloid- $\beta$  plaques in the brain of Alzheimer's disease (AD) patients.<sup>2,3</sup> As such, developing an understanding of the mechanism of cleavage of APP-C99 by  $\gamma$ -secretase is an important goal for the field.

The mature  $\gamma$ -secretase consists of four components (Fig. 1A): presenilin 1 (PS1), presenilin enhancer 2 (PEN-2),

anterior pharynx-defective 1A (APH-1A) and nicastrin (NCT).<sup>4-6</sup> PS1 is the catalytic component of  $\gamma$ -secretase. It contains nine transmembrane helices (TMs) organized into a horseshoe-shaped structure with two catalytic Asp residues located at TM6 (Asp257) and TM7 (Asp385) within the convex side of the

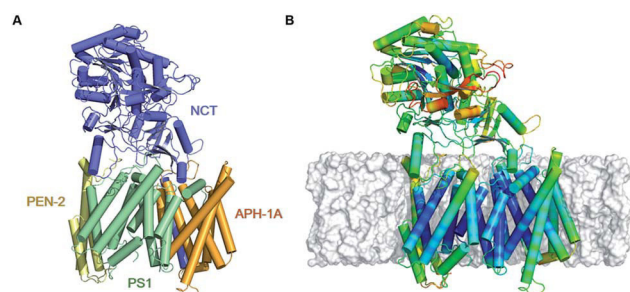


Fig. 1 (A) Depiction of the all atom model of  $\gamma$ -secretase, derived from the 5FN2 PDB structure, colored by its subunits: PS1, NCT, PEN-2, and APH-1A in green, blue, yellow, and orange, respectively. (B) Fluctuation analysis of 5FN2-derived atomistic model of  $\gamma$ -secretase in POPC bilayer (gray) color-coded by the normalized per-residue root mean square fluctuation (RMSF) from more flexible (red) to less flexible (blue). The analysis was performed during the last 500 ns of the simulation.

<sup>a</sup>Departamento de Físicoquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, 04510, Mexico. E-mail: lauradd@unam.mx

<sup>b</sup>Department of Chemistry, Boston University, Boston, Massachusetts 02215, USA

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c7sc00980a





## Mini-review

# Simulating the $\gamma$ -secretase enzyme: Recent advances and future directions

Rodrigo Aguayo-Ortiz, Laura Dominguez\*

Facultad de Química, Departamento de Fisicoquímica, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, México, 04510, Mexico



## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 27 November 2017

Accepted 27 January 2018

Available online 2 February 2018

## Keywords:

 $\gamma$ -secretase

Presenilin

Amyloid- $\beta$  peptide

Alzheimer's disease

Molecular dynamics

Computational approaches

## ABSTRACT

$\gamma$ -secretase is an intra-membrane aspartyl protease involved in the production of amyloid- $\beta$  peptides. Aberrant cleavage of the 99-residue C-terminal fragment of the amyloid precursor protein leads to the formation of a 42-amino-acid isoform (A $\beta$ 42). Further oligomerization and aggregation of this isoform is implicated in the onset and progression of Alzheimer's disease. Recent elucidation of  $\gamma$ -secretase by cryo-electron microscopy techniques have opened a new horizon in the structural and dynamic characterization of the enzyme. Currently, only a few molecular dynamics studies have been carried out to explore the mechanism of substrate recognition and entry, or the transition between active and inactive states of the catalytic subunit. Herein, we briefly review the computational approaches and their most relevant findings. The general picture of the current GS simulation studies will open new questions to understand the behavior of the enzyme dynamics and explain the modulation mechanisms for the treatment of Alzheimer's disease.

© 2018 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

## 1. Introduction

$\gamma$ -secretase (GS) is an intramembrane-cleaving aspartyl protease involved in the last processing step of amyloid precursor protein (APP) to produce different amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) isoforms [1]. Normal processing of 99-residue C-terminal fragment of APP (C99) by GS leads to the production of the 40-amino acid length isoform (A $\beta$ 40). Aberrant C99 cleavage results in an increased production of the longer and toxic 42-amino acid species of A $\beta$  (A $\beta$ 42) over the less toxic A $\beta$ 40 [2] that leads to their oligomerization and aggregation in the brain and that have been associated with the development and progression of Alzheimer's disease [3,4].

Human GS is a multi-subunit complex consisting of four components: presenilin 1 (PS1), presenilin enhancer 2 (PEN-2), anterior pharynx-defective 1A (APH-1A) and nicastrin (NCT) (Fig. 1a) [5,6]. PS1 comprise nine transmembrane helices (TM 1–9) and contains the catalytic aspartate residues in its TM6 (Asp257) and TM7 (Asp385). This subunit consists in a N-terminal (NTF, TM1–6) and C-terminal (CTF, TM7–9) fragments obtained as a result of the auto-proteolytic process that occurs during GS maturation [7]. These

fragments interact with PEN-2 (3 TMs) and APH-1A (7 TMs) subunits, which have important roles in the maturation and assembly of the GS complex [8]. Finally, NCT is a type-1 transmembrane glycoprotein formed by a single TM in its C-terminal region and a large N-terminal extracellular domain (ECD). It has been proposed that the NCT ECD has a key role in preventing the entry of bulky substrates into the active site [9].

Currently, six cryo-electron microscopy (cryo-EM) structures of human GS have been deposited in the Protein Data Bank (PDB): 4UI2, 5A63, 5FN2, 5FN3, 5FN4 and 5FN5 [10–13]. The fragment comprising the large PS1 region between TM6 and TM7 was not assigned in any of these structures. And PS TM2 could only be resolved in 4UI2, 5FN2 and 5FN3. Moreover, 5FN3 and 5FN4 were resolved with two unidentified external peptides at the active site, while the density map of DAPT inhibitor was reported at the same site for the 5FN2 structure. Structural and conformational differences of these structures were reviewed elsewhere [14].

Experimental studies of GS have provided valuable information related to its structure and biological functions [15,16]; however, details of its mechanisms of activation, substrate recruitment and cleavage remain unclear. Employing the available GS structures and experimental data, different research groups have focused on studying key dynamic features of the PS1 component and the whole GS complex, such as its structural ensemble, activation

\* Corresponding author. Avenida Universidad 3000, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510, CDMX, Mexico.

E-mail address: [lauradd@unam.mx](mailto:lauradd@unam.mx) (L. Dominguez).



Cite this: *Phys. Chem. Chem. Phys.*,  
2018, 20, 27294

# Influence of membrane lipid composition on the structure and activity of $\gamma$ -secretase<sup>†</sup>

Rodrigo Aguayo-Ortiz,<sup>a</sup> John E. Straub<sup>b</sup> and Laura Dominguez<sup>ib</sup>\*<sup>a</sup>

$\gamma$ -Secretase (GS) is a multi-subunit membrane-embedded aspartyl protease that cleaves more than 80 integral membrane proteins, including the amyloid precursor protein (APP) to produce the amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) peptide. Oligomerization and aggregation of the 42-amino acid length A $\beta$  isoform in the brain has been associated with the development and progression of Alzheimer's disease (AD). Based on recent experimental structural studies and using multiscale computational modeling approaches, the conformational states and protein–membrane interactions of the GS complex embedded in six homogeneous and six heterogeneous lipid bilayers were characterized. In order to identify potential lipid and cholesterol binding sites, GS regions with high lipid/cholesterol occupancy values were analyzed using atomistic and coarse-grained simulations. Long lipid residence times were observed to be correlated with a large number of hydrogen bonds between the charged headgroups and key GS amino acids. This observation provides a plausible explanation for the inhibition of GS by charged lipids observed in previous experimental studies. Computed lateral pressure profiles suggest that higher transmembrane pressures favor active state conformations of the catalytic subunit. A probable mechanism for the regulation of the local stress response in cholesterol-rich multicomponent lipid bilayers is identified. Finally, it is demonstrated that interactions between the nicastrin extracellular domain and lipid headgroups leads to a compact structural conformation of the GS complex. Overall, this study provides valuable insight into the effect of bilayer lipid composition on the GS structural ensemble and its function.

Received 29th June 2018,  
Accepted 12th October 2018

DOI: 10.1039/c8cp04138e

rsc.li/pccp

## Introduction

$\gamma$ -Secretase (GS) is an intramembrane aspartyl protease involved in the ultimate step in the cleavage of amyloid precursor protein (APP) to generate amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) peptides.<sup>1</sup> In the penultimate step in this process, APP is cleaved by the membrane-associated  $\beta$ -site APP-cleaving enzyme 1 (BACE1,  $\beta$ -secretase) to produce an intramembrane 99-residue C-terminal fragment (C99).<sup>2</sup> The intramembrane cleavage of the C99 fragment by GS leads to the formation of the APP intracellular domain (AICD), which mediates nuclear signaling, and A $\beta$  peptides of varying length.<sup>3</sup> Normal variation in the cleavage of C99 leads to the production of a 40-amino acid length isoform of A $\beta$  (A $\beta$ 40). However, aberrant processing of C99 by GS can increase the production of the toxic and more amyloidogenic 42-amino acid species (A $\beta$ 42).<sup>4</sup> Oligomerization of the A $\beta$ 42 isoform in the brain has been proposed to be the causative agent of Alzheimer's disease (AD).<sup>5</sup>

GS is a multi-subunit integral membrane protein complex consisting of four components: presenilin 1 (PS1), presenilin enhancer 2 (PEN-2), anterior pharynx-defective 1A (APH-1A) and nicastrin (NCT) (Fig. 1A).<sup>6</sup> PS1 is the catalytic component comprised of nine transmembrane helices (TM1-9) in which the two catalytic aspartate residues are located at TM6 (D257) and TM7 (D385).<sup>7</sup> GS maturation involves the autoproteolytic processing of the intracellular loop connecting TM6 and TM7 of this subunit leading to the formation of N-terminal (NTF, TM1-6) and C-terminal (CTF, TM7-9) fragments.<sup>8</sup> These fragments are stabilized by PEN-2 and APH-1A, which have key structural roles during the maturation and assembly of the complex.<sup>9</sup> NCT is a type-1 transmembrane glycoprotein formed by a single TM helix and a large extracellular domain (ECD). It has been proposed that NCT plays a critical role in the recruitment of GS substrates.<sup>10</sup> To date, only six cryo-electron microscopy (cryo-EM) structures of the complete human GS complex have been deposited in the Protein Data Bank (PDB): 4UI2, 5A63, 5FN2, 5FN3, 5FN4 and 5FN5.<sup>11–14</sup>

The production of different A $\beta$  isoforms by GS is regulated by structural and external factors that alter the protease activity of the enzyme.<sup>15</sup> Some of the factors that regulate GS activity are (1) autosomal-dominant mutations in the substrate and/or the PS1 component, (2) external agents that inhibit or modulate

<sup>a</sup> Facultad de Química, Departamento de Físicoquímica, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, 04510, Mexico. E-mail: lauradd@unam.mx

<sup>b</sup> Department of Chemistry, Boston University, Boston, Massachusetts 02215, USA

<sup>†</sup> Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c8cp04138e