



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO COMPUTACIONAL DE LAS INTERACCIONES  
MOLECULARES ENTRE LA PROTEÍNA TAU  
Y UN DÍMERO DE ALFA Y BETA TUBULINAS**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO**

**PRESENTA**

**VÍCTOR HUGO CALVO JIMÉNEZ**



**Ciudad Universitaria, CDMX**

**AÑO 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES**

**VOCAL:**                   **Profesor: JUAN RAÚL ÁLVAREZ IDABOY**

**SECRETARIO:**           **Profesor: LAURA DOMÍNGUEZ DUEÑAS**

**1er. SUPLENTE:**       **Profesor: FÉLIX MORALES FLORES**

**2° SUPLENTE:**           **Profesor: ZURISADAI PADILLA GÓMEZ**

**EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLÓ EN EL CUBÍCULO 230, EDIFICIO F  
DE LA FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNAM.**

**ASESOR DEL TEMA:**

---

DRA. LAURA DOMÍNGUEZ DUEÑAS

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

---

QFB GUILLERMO DAVID GOODE ROMERO

**SUSTENTANTE:**

---

VÍCTOR HUGO CALVO JIMÉNEZ

## **AGRADECIMIENTOS**

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).

# ÍNDICE

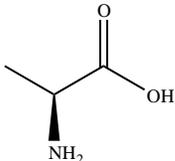
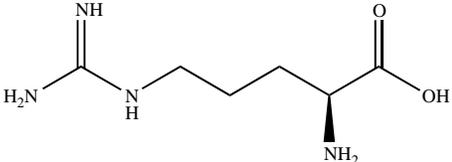
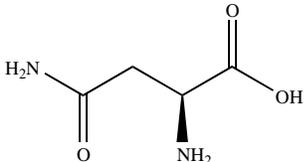
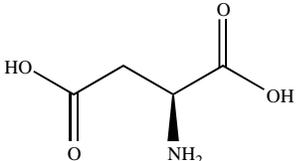
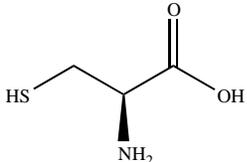
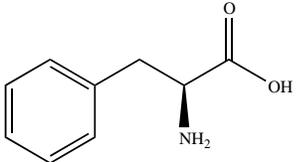
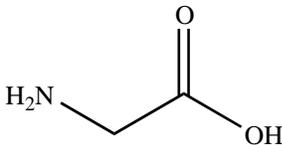
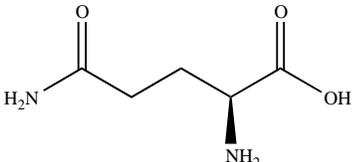
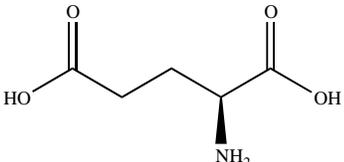
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS .....	III
RESUMEN .....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	2
2. ANTECEDENTES .....	3
2.1 Enfermedad de Alzheimer .....	3
2.2 Microtúbulos (MTs) .....	4
2.3 Proteína Tau .....	5
2.3.1 Fosforilación de la proteína Tau .....	6
2.4 Dinámica Molecular .....	8
2.4.1 Muestreo de Sombrilla ( <i>Umbrella Sampling</i> ) .....	8
2.4.2 Mecánica molecular: área superficial Poisson-Boltzmann (MM-PBSA) .....	10
3. JUSTIFICACIÓN .....	12
4. HIPÓTESIS .....	12
5. OBJETIVOS .....	13
5.1 Objetivo general .....	13
5.2 Objetivos particulares .....	13
6. METODOLOGÍA .....	14
6.1 Metodología general .....	14
6.2 Preparación del sistema .....	15
6.3 Dinámica molecular .....	17
6.4 Muestreo de sombrilla ( <i>Umbrella Sampling</i> ) .....	19
6.5 MM-PBSA .....	20
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	21
7.1 Muestreo de Sombrilla ( <i>Umbrella Sampling</i> ) .....	24

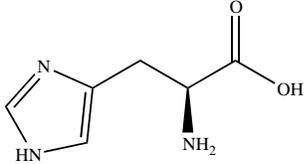
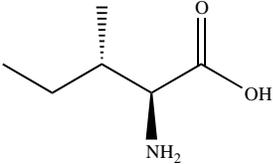
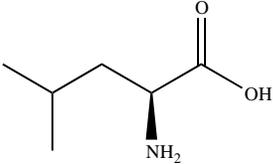
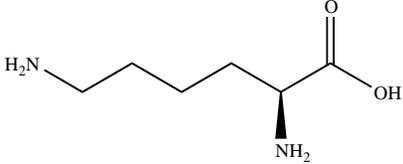
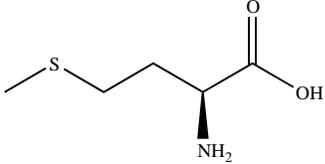
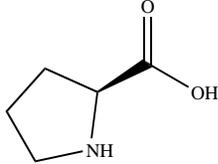
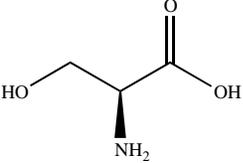
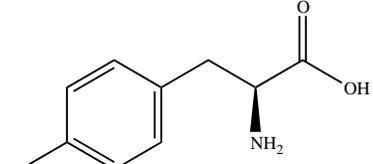
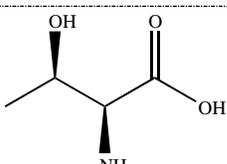
7.2 MM-PBSA.....	29
8. CONCLUSIONES.....	34
9. REFERENCIAS.....	35
10. APÉNDICES.....	40

## SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

$\ddot{r}_i$	Segunda derivada de la posición respecto del tiempo
CHARMM	<i>Chemistry at Harvard Molecular Mechanics</i>
E	Energía
EA	Enfermedad de Alzheimer
$F_i$	Fuerza de $i$
GROMACS	<i>Groningen Machine for Chemical Simulations</i>
K	Kelvin
kcal	Kilocaloría (1 cal = 4.184 J)
MAP	Proteína asociada a microtúbulos
MD	Dinámica Molecular
$m_i$	Masa de $i$
MM-PBSA	Mecánica Molecular: área superficial Poisson-Boltzman
MTs	Microtúbulos
NPT	Ensamble isotérmico-isobárico
ns	Nanosegundo
NVT	Ensamble canónico
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PMF	Potencial de fuerza media
ps	Picosegundo
$r_i$	Posición de $i$
RMSD	Raíz de la desviación cuadrática media
RMSF	Raíz de la fluctuación cuadrática media
US	Muestreo de sombrilla
V	Potencial
WHAM	Método de análisis de histogramas ponderados
$\alpha T$	Alfa tubulina
$\beta T$	Beta tubulina
$\Delta E$	Diferencia de energía
$\xi$	Coordenada de reacción
$\tau$	Tau

## Aminoácidos

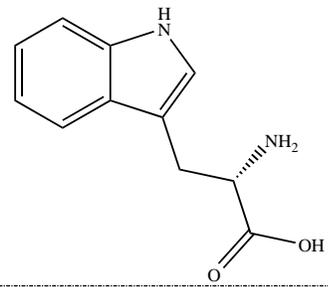
Nombre	Abreviatura	Símbolo	Estructura
Alanina	Ala	A	
Arginina	Arg	R	
Asparagina	Asn	N	
Ácido aspártico	Asp	D	
Cisteína	Cys	C	
Fenilalanina	Phe	F	
Glicina	Gly	G	
Glutamina	Gln	Q	
Ácido glutámico	Glu	E	

Histidina	His	H	
Isoleucina	Ile	I	
Leucina	Leu	L	
Lisina	Lys	K	
Metionina	Met	M	
Prolina	Pro	P	
Serina	Ser	S	
Tirosina	Tyr	Y	
Treonina	Thr	T	

Triptófano

Trp

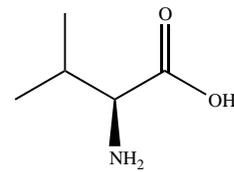
W



Valina

Val

V



## **RESUMEN**

El presente trabajo comprende la simulación de dinámica molecular entre la proteína Tau y un dímero de beta y alfa tubulinas. Esto se realizó con el fin de estimar la energía de unión al separar la proteína Tau del heterodímero de tubulinas mediante métodos computacionales. Paralelamente, se hizo una modificación al residuo Ser293 de la proteína Tau, dicho residuo se fosforiló. Una vez hecho esto, se realizó nuevamente una simulación de MD, la estimación de la energía de unión y con esto se analizó cómo cambia el valor de la energía entre el sistema no fosforilado y el sistema fosforilado; ya que se ha propuesto que una de las principales causas de la EA es la hiperfosforilación de la proteína Tau. Los resultados obtenidos en este trabajo aportarán una posible explicación energética de cómo la fosforilación de la proteína Tau afecta las interacciones con el heterodímero de tubulinas, promoviendo de esta manera, la desestabilización de los microtúbulos y, por lo tanto, la posible contribución al progreso de la EA.

Todas las simulaciones de MD se trabajaron con el programa computacional GROMACS, así como el uso de diferentes módulos de análisis con los cuales se obtienen los resultados de las simulaciones; estos son los gráficos RMSD, RMSF, US, WHAM y MM-PBSA.

## 1. INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad degenerativa y una de las causas más comunes de demencia, caracterizada por la pérdida de funciones cognitivas. Se estima que para el año 2050 habrá un gran número de personas enfermas, aproximadamente 152 millones en todo el mundo, ya que en la actualidad no existe un tratamiento eficiente para esta enfermedad.<sup>1,2</sup>

Una de las alteraciones típicas de la EA es la aparición de ovillos neurofibrilares, ocasionados por la hiperfosforilación de la proteína Tau, la cual funge como ensambladora y estabilizadora de los Microtúbulos (MTs). Sin embargo, por mecanismos que aún no son completamente identificados, la proteína Tau comienza a fosforilarse en diferentes sitios lo que provoca que pierda afinidad por los MTs, durante el desarrollo de la EA.

Este trabajo de tesis se centra en la dinámica molecular de la proteína Tau y un dímero de beta ( $\beta$ T) y alfa ( $\alpha$ T) tubulinas. Las simulaciones de dinámica molecular realizadas al sistema proteína Tau-MTs se analizaron con desviaciones cuadráticas medias (RMSD) y fluctuaciones cuadráticas medias (RMSF), las cuales se aplicaron a la proteína Tau, ya que al heterodímero de  $\alpha\beta$ -tubulinas se le colocó una restricción de movimiento. Se aplicó el método de US y WHAM para estimar el potencial de fuerza media (PMF), así como el procedimiento MM-PBSA para evaluar energías de unión por residuo. De esta forma se analiza el comportamiento energético que tiene el heterodímero de tubulinas con la proteína Tau cuando se encuentra en un estado no fosforilado y fosforilado en su residuo Ser293.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad cerebral degenerativa y una de las causas más comunes de demencia. La demencia se caracteriza por la disminución de memoria, lenguaje, resolución de problemas y algunas otras habilidades cognitivas que afectan las capacidades de los individuos para realizar actividades diarias. Dicha disminución ocurre debido a que las neuronas involucradas en la función cognitiva han sido dañadas o destruidas. La EA, descrita inicialmente por el neurólogo alemán Alois Alzheimer, es una enfermedad en la que el daño y la destrucción de las neuronas finalmente afectan a otras partes del cerebro (Figura 2.1), incluidas aquellas que le permiten a un individuo llevar a cabo funciones básicas como lo es el caminar o el comer. Se estima que para el año 2050 habrá un aproximado de 152 millones de personas con la EA en todo el mundo.<sup>1-4</sup>

Los pacientes con EA, presentan una gran pérdida neuronal y la presencia de dos alteraciones típicas: el ovillo neurofibrilar y la placa senil. El ovillo neurofibrilar es una lesión intracelular de un conjunto anormal de proteínas que afecta principalmente a las neuronas. El principal constituyente es la proteína Tau, una proteína asociada a microtúbulos (MAP) la cual se fosforila de manera anormal en el caso de la EA, lo que altera su solubilidad y unión con los microtúbulos.<sup>5, 6</sup>

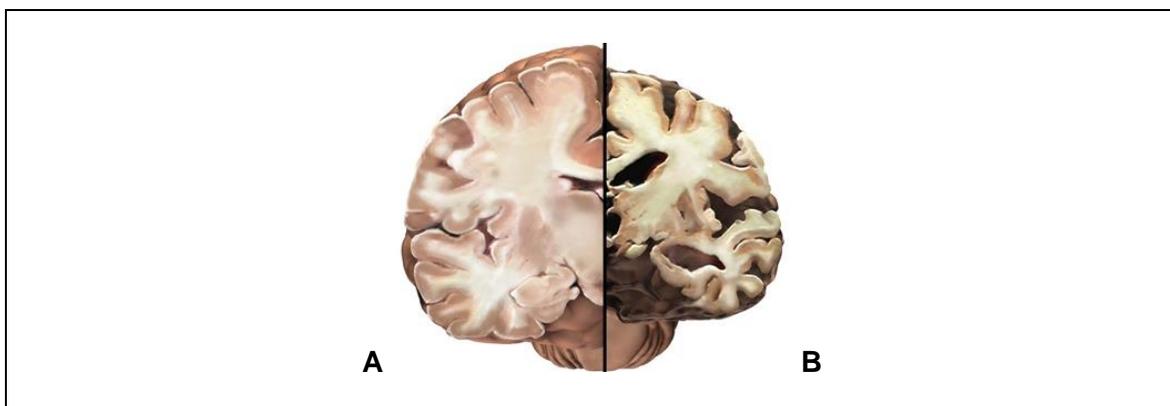


Figura 2.1. Corte transversal del cerebro A. Cerebro sano B. Cerebro en etapa avanzada de EA. (Imagen modificada de Alzheimer's Association).

## 2.2 Microtúbulos (MTs)

Los microtúbulos son agregados cilíndricos huecos, estos están presentes en el citoplasma de las células eucariotas. Los microtúbulos son utilizados por las células para diferentes propósitos, estando vitalmente involucrados en la motilidad y división celular, así como en la organización celular, por mencionar algunos.<sup>7</sup> Estos están compuestos por 13 protofilamentos de beta ( $\beta$ T) y alfa ( $\alpha$ T) tubulina, además de proteínas asociadas (MAP) (Figura 2.2). Poseen un diámetro de aproximadamente 25 nm, los cuales se encuentran orientados longitudinalmente. Las diversas proteínas asociadas (MAP-1, MAP-2, Tau) regulan la estabilidad de los microtúbulos y además promueven su polimerización.<sup>8</sup>

Los MTs son ensamblados a partir de heterodímeros de  $\beta$ T y  $\alpha$ T en polímeros huecos los cuales varían en longitud desde 1  $\mu$ m a 100  $\mu$ m. Estas subunidades heterodiméricas de tubulina se denominan  $\alpha\beta$ -tubulina, dímeros de tubulina o simplemente tubulina. El polímero en tubo hueco resultante es polar, con un extremo positivo de rápido crecimiento que tiene expuesta a la  $\beta$ T y un extremo negativo de crecimiento lento con  $\alpha$ T expuesta.<sup>9</sup>

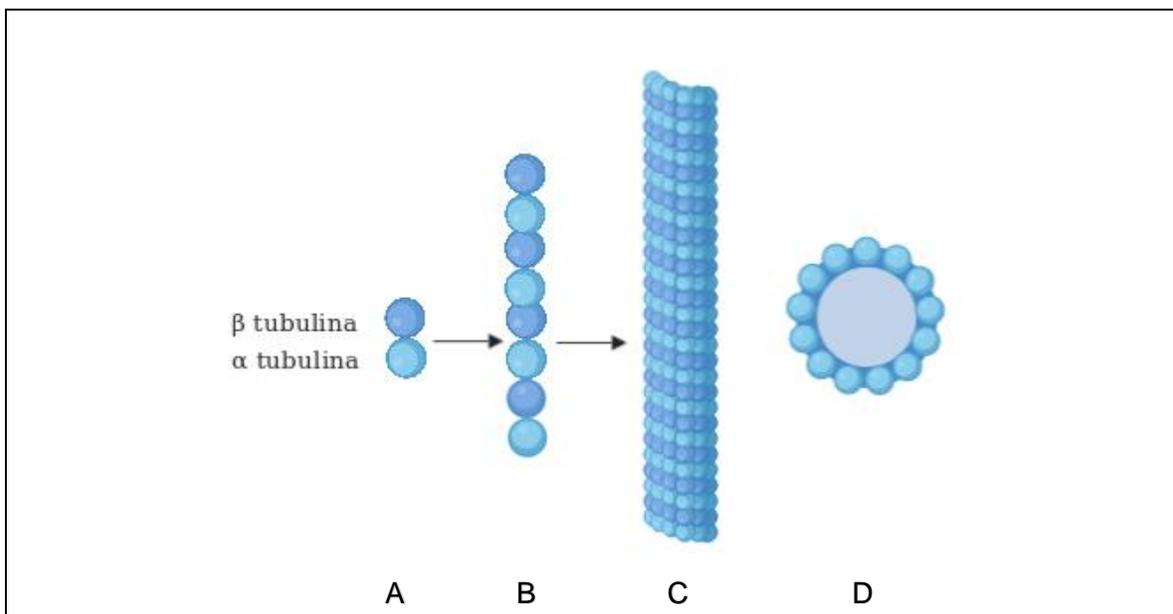


Figura 2.2. Representación del ensamblaje de los microtúbulos. A) Heterodímeros de beta y alfa tubulina. B) Protofilamentos de beta y alfa tubulinas. C) Microtúbulo. D) Vista superior del microtúbulo.<sup>10</sup>

Cada monómero de  $\beta$ T y  $\alpha$ T se ensambla en heterodímeros que forman el cuerpo de los MTs. Ambas tubulinas se unen a un nucleótido de GTP, las cuales poseen dos sitios de unión, el sitio N (no intercambiable) en  $\alpha$ T situada en la interfaz monomérica y se le ha asignado un papel estructural. El nucleótido en el sitio E (intercambiable) en  $\beta$ T se expone sobre la superficie de un dímero no polimerizado, ya que solo esta subunidad  $\beta$  hidroliza su GTP, formando GDP, en el curso de la polimerización normal de los MTs.<sup>11,12</sup>

### 2.3 Proteína Tau

La proteína Tau pertenece a la familia de proteínas asociadas a microtúbulos (MAP), las cuales se expresan principalmente en neuronas. En el sistema nervioso central, la proteína Tau es la MAP principal en las neuronas, ya que promueve el ensamblaje y estabilización de los MTs; los cuales contribuyen al mantenimiento de la forma celular (Figura 2.3).<sup>13,14</sup>

La proteína Tau interactúa con los heterodímeros de beta ( $\beta$ T) y alfa ( $\alpha$ T) tubulina para dar lugar a la formación de los microtúbulos. La proteína Tau se divide aproximadamente en dos partes: primero, el extremo amino terminal, que constituye el dominio de proyección debido a que sobresale de la superficie del microtúbulo y no está vinculado directamente a él y segundo, la zona carboxilo terminal, la cual contiene tres o cuatro repeticiones de una secuencia de 31 o 32 residuos de aminoácidos, dependiendo de las isoformas. Esta zona o dominio de repetición constituye la región de unión a los microtúbulos. El grado de fosforilación de la proteína Tau regula la estabilidad con los MTs. Más de 30 de los 80 residuos de serina o treonina existentes en la proteína Tau pueden fosforilarse.<sup>15</sup>

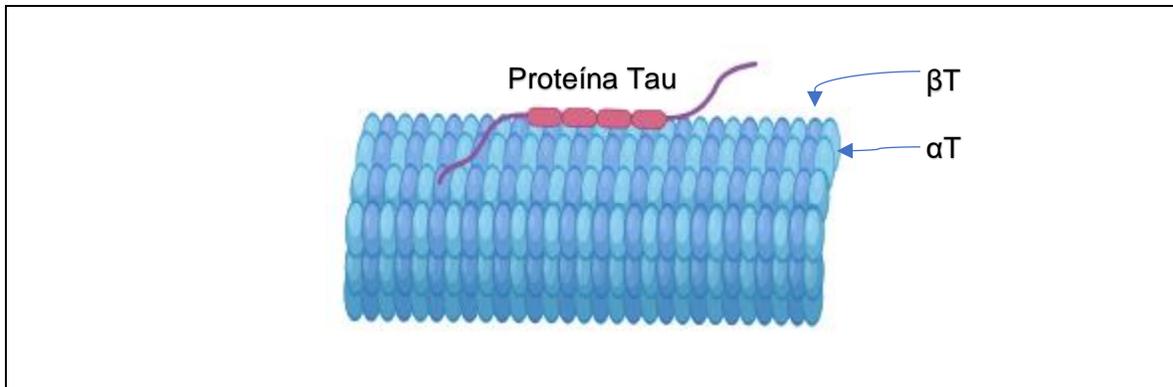


Figura 2.3. Representación de la interacción y posición que tiene la proteína Tau de manera longitudinal con los MTs. La proteína interactúa con los heterodímeros de  $\beta$ T y  $\alpha$ T.<sup>10</sup>

### 2.3.1 Fosforilación de la proteína Tau

En un cerebro normal, el equilibrio entre fosforilación y desfosforilación de la proteína Tau origina distintos cambios estructurales y conformacionales, lo que regula la estabilidad del citoesqueleto. Sin embargo, durante el desarrollo de la EA y por mecanismos que aún no son completamente identificados, la proteína Tau comienza a fosforilarse en múltiples sitios provocando que disminuya su afinidad por los MTs.<sup>16</sup> La hiperfosforilación es el resultado del desequilibrio de la acción de diferentes cinasas y fosfatasas, por ejemplo, la cinasa 3b de la glicógeno sintetasa (GSK3 b), cinasa ciclin-dependiente (cdk5 y cdc2) y cinasa p38, por mencionar algunas, las cuales afectan su función biológica normal.<sup>17-21</sup>

Cuando la proteína Tau se encuentra bajo estas circunstancias comienza a agregarse originando unos complejos proteicos denominados ovillos neurofibrilares que son hallazgos característicos de la EA (Figura 2.4).<sup>14</sup>

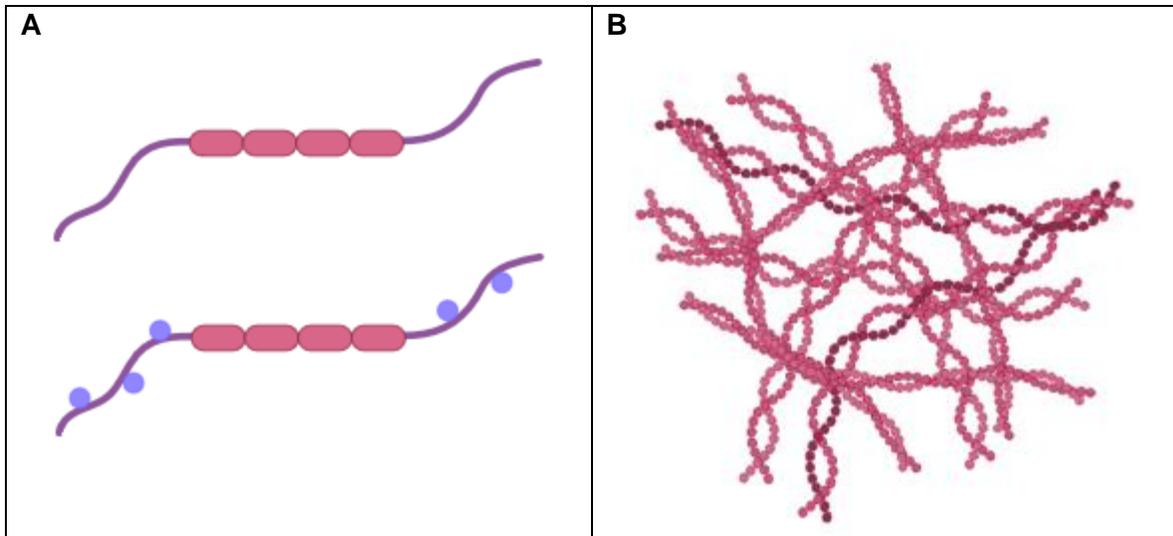


Figura 2.4. A) Representación de la proteína Tau. En la imagen superior se observa la proteína en un estado no fosforilado, mientras que la imagen inferior hace alusión a los sitios en los que la proteína puede fosforilarse. En este trabajo solo se fosforila el residuo Ser293. B) Ovillo Neurofibrilar, agregados de la proteína Tau.<sup>10</sup>

Para analizar el comportamiento a lo largo de un determinado tiempo en los sistemas antes mencionados (proteína Tau-MTs), se puede hacer uso de herramientas computacionales, las cuales permiten simular grandes estructuras con detalle atómico. Con estas metodologías, se puede estudiar cómo la proteína Tau interactúa de manera directa con los MTs, como se describe a continuación.

## 2.4 Dinámica Molecular

Las simulaciones de dinámica molecular (MD) predicen cómo cada uno de los átomos en una proteína u otro sistema molecular se mueve con el tiempo respecto a un modelo general de la física que gobierna las interacciones interatómicas. La idea detrás de una MD es sencilla, es decir, dadas las posiciones de todos los átomos en un sistema molecular (por ejemplo, una proteína rodeada por agua) se puede calcular la fuerza ejercida sobre cada átomo por todos los otros átomos del sistema.<sup>22</sup> Las simulaciones de dinámica molecular resuelven las ecuaciones de Newton para un sistema que posee  $N$  partículas que interactúan, esto automáticamente implica el uso de la mecánica clásica para describir el movimiento de los átomos:

$$m_i \ddot{r}_i = \mathbf{F}_i; i = 1, \dots, N$$

Las fuerzas son derivadas negativas de una función potencial  $V(r_1, r_2, \dots, r_n)$ .

$$\mathbf{F}_i = -\frac{\partial V}{\partial r_i}$$

Dichas ecuaciones se resuelven numéricamente y de manera simultánea para cada átomo y para pequeños lapsos de tiempo. El sistema se sigue durante un periodo de tiempo, cuidando que los valores de temperatura y presión se mantengan en el intervalo requerido, mientras que las coordenadas se escriben en un archivo de salida. Las coordenadas, que se encuentran en función del tiempo, representan una trayectoria del sistema. Después de un cierto tiempo, el sistema generalmente alcanza un estado de equilibrio.<sup>23</sup>

### 2.4.1 Muestreo de Sombrilla (*Umbrella Sampling*)

Las simulaciones de MD han sido utilizadas de manera exitosa para estudiar las interacciones entre proteínas, lípidos y algunas otras pequeñas moléculas para proporcionar a nivel atómico detalles de ciertos fenómenos que pueden ocurrir, siendo una herramienta ideal para estudiar este tipo de sistemas.

Una técnica especialmente útil para analizar interacciones macromoleculares es el muestreo de sombrilla (US), en este método una serie de configuraciones son generadas a lo largo de una coordenada de reacción ( $\xi$ ), entre las dos especies que están interactuando (Figura 2.5). Una de las especies interactuantes sirve como referencia, es decir, se mantiene en una posición fija, mientras que al otro grupo se le coloca un vector de desplazamiento a una distancia creciente de la referencia, el cual puede ser ubicado en el centro de masa o en algún punto específico de la molécula cuya posición se mantiene por un potencial de polarización. A estas distancias crecientes se les conoce como “ventana de muestreo”, en las cuales se realizan simulaciones independientes para generar un conjunto de configuraciones a lo largo de la llamada coordenada de reacción ( $\xi$ ). Cada uno de los valores generados a través de las ventanas nos permite calcular el potencial de fuerza media (PMF). Para ensamblar una curva de PMF a lo largo de toda la coordenada de reacción, los valores de energía en las ventanas de muestreo contiguas se vuelven a ensamblar de modo que produzcan una función continua.<sup>24-27</sup>

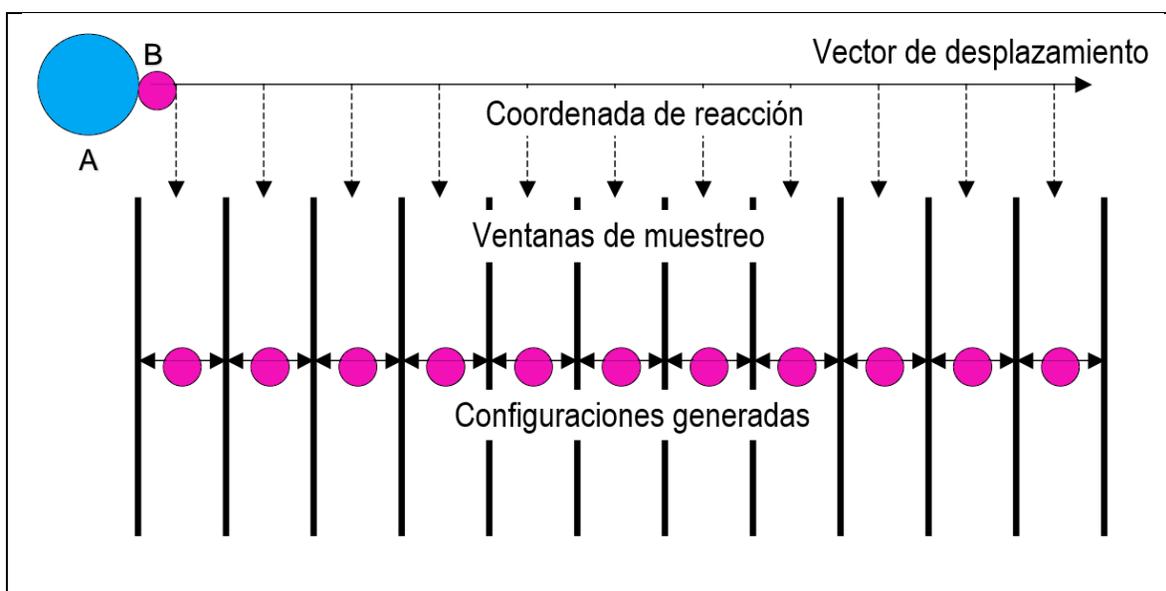


Figura 2.5. Representación de la metodología US. El vector de desplazamiento separa al sistema “B” del sistema “A” a lo largo de una coordenada de reacción. Posteriormente se generan un cierto número de configuraciones con las cuales se estima el PMF.<sup>25</sup>

El método de análisis de histogramas ponderados (WHAM) es una extensión de la simulación US, la cual permite calcular el PMF o un estimado de las energías libres a partir de un conjunto de simulaciones de MD. El método produce la energía libre asociada con una simulación dada, así como la distribución de probabilidad de cada una de las configuraciones del sistema molecular mediante la extracción de la información contenida en todas las simulaciones (ventanas de muestreo).<sup>28</sup>

#### 2.4.2 Mecánica molecular: área superficial Poisson-Boltzmann (MM-PBSA)

La mecánica molecular de área superficial Poisson-Boltzmann es un método que permite estimar las energías libres de interacción utilizando un conjunto de estructuras en los estados inicial y final. Este método también se puede utilizar para estimar la contribución energética por residuo a la energía de unión (Figura 2.6).

El método MM-PBSA se ha aplicado para predecir las energías de unión y evaluar las estabildades de diferentes estructuras. Combina tres términos energéticos con los cuales se puede explicar el cambio en la energía de unión. El primer término asociado corresponde a un cambio en la energía potencial en el vacío, este incluye los términos de enlace, ángulos y energías de torsión, así como los términos de no enlace pertenecientes a las fuerzas de Van der Waals e interacciones electrostáticas. El segundo término nos habla de la solvatación de las diferentes especies en el medio y se determina mediante la suma de dos términos energéticos, la energía de solvatación polar y no polar. Por último, el tercer término expresa la entropía de configuración asociada con la formación de complejos.<sup>29</sup>

En el método MM-PBSA, la energía libre se estima a partir de la siguiente suma:

$$\Delta G = E_{bnd} + E_{elec} + E_{vdW} + G_{pol} + G_{np} - TS$$

Donde los primeros tres términos ( $E_{bnd}$ ,  $E_{elec}$ ,  $E_{vdW}$ ) hacen referencia a la energía de mecánica molecular de las interacciones de enlace (enlaces, ángulos y ángulos diedros), electrostáticas y Van der Walls.  $G_{pol}$  y  $G_{np}$  son las contribuciones polares y no polares de las energías libres de solvatación, mientras que el último término de

la ecuación es la temperatura absoluta  $T$  multiplicada por la entropía  $S$ , la cual se estima por un análisis en modo normal de las frecuencias vibratorias.<sup>30</sup>

Los promedios de la ecuación anterior deben estimarse a partir de las simulaciones del complejo (C), la proteína (P) y el ligando (L), quedando así:

$$\Delta G = G_C - G_P - G_L$$

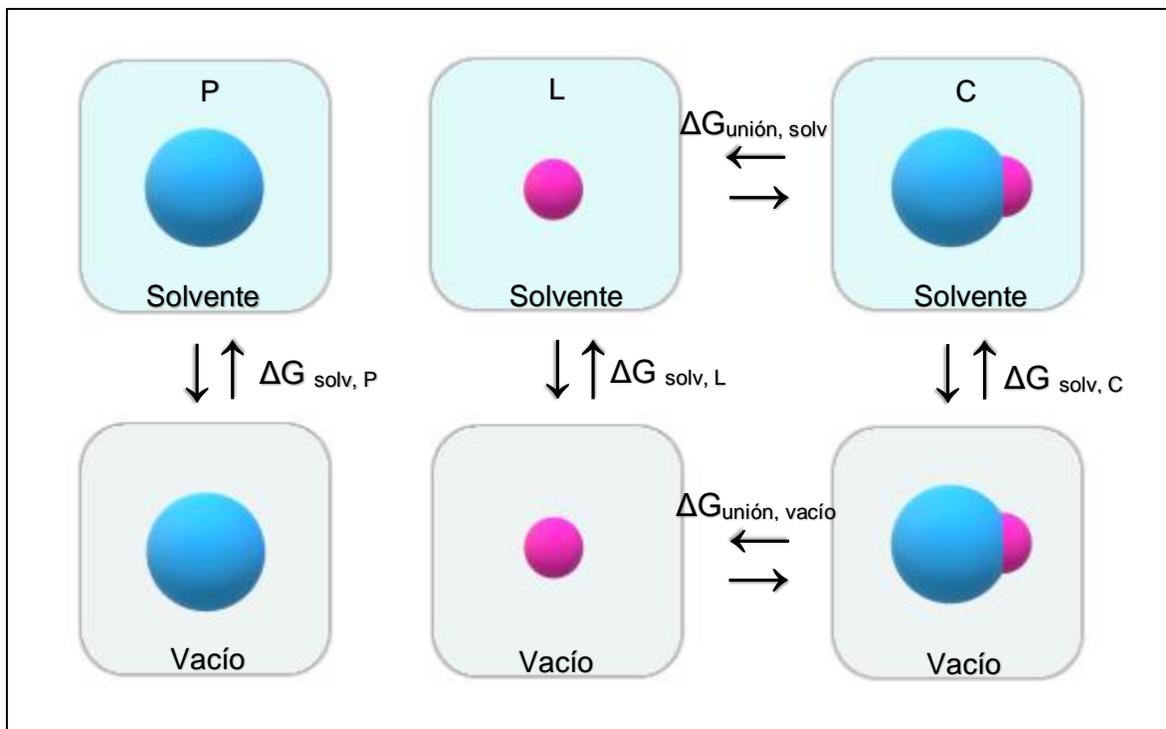


Figura 2.6. Ciclo termodinámico para el cálculo de MM-PBSA. Donde P es la proteína, L el ligando y C el complejo PL.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Al día de hoy, la EA es una de las causas más importantes de demencia; es una enfermedad progresiva y degenerativa del cerebro la cual provoca deterioro de la memoria.

Se ha estudiado que los MTs, así como la proteína Tau, pueden ser parte importante en la aparición de dicha enfermedad. La estabilidad asociada al sistema MTs-proteína Tau se puede estudiar con herramientas computacionales para estimar la energía de enlace y determinar si los estados fosforilados de la proteína Tau, específicamente la fosforilación del residuo Ser293,<sup>31</sup> afectan las interacciones con los MTs provocando la desestabilización del sistema y, por lo tanto, la posible aparición de la EA.

### **4. HIPÓTESIS**

Haciendo uso de herramientas computacionales de dinámica molecular, MM-PBSA y US, se puede estimar la energía de unión entre la proteína Tau y los MTs compuestos por  $\beta$ T y  $\alpha$ T, así como la relación energética donde el estado fosforilado disminuirá la energía de interacción con el heterodímero de tubulinas.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

Mediante el uso de herramientas computacionales de simulación de dinámica molecular se evaluará la estabilidad que posee la proteína Tau en su estado no fosforilado y fosforilado en el residuo Ser293 con el heterodímero de  $\beta$ T y  $\alpha$ T como un posible precursor de la EA.

### **5.2 Objetivos particulares**

- Realizar simulaciones de dinámica molecular del modelo de  $\beta$ T y  $\alpha$ T con la proteína Tau en su estado no fosforilado y fosforilado.
- Estimar mediante herramientas computacionales (US y MM-PBSA) la energía necesaria para separar a la proteína Tau del heterodímero de tubulinas para comparar cómo afecta la presencia del fosfato la interacción del sistema.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Metodología general

El procedimiento general utilizado en este trabajo de tesis se muestra a continuación en la Figura 6.1.

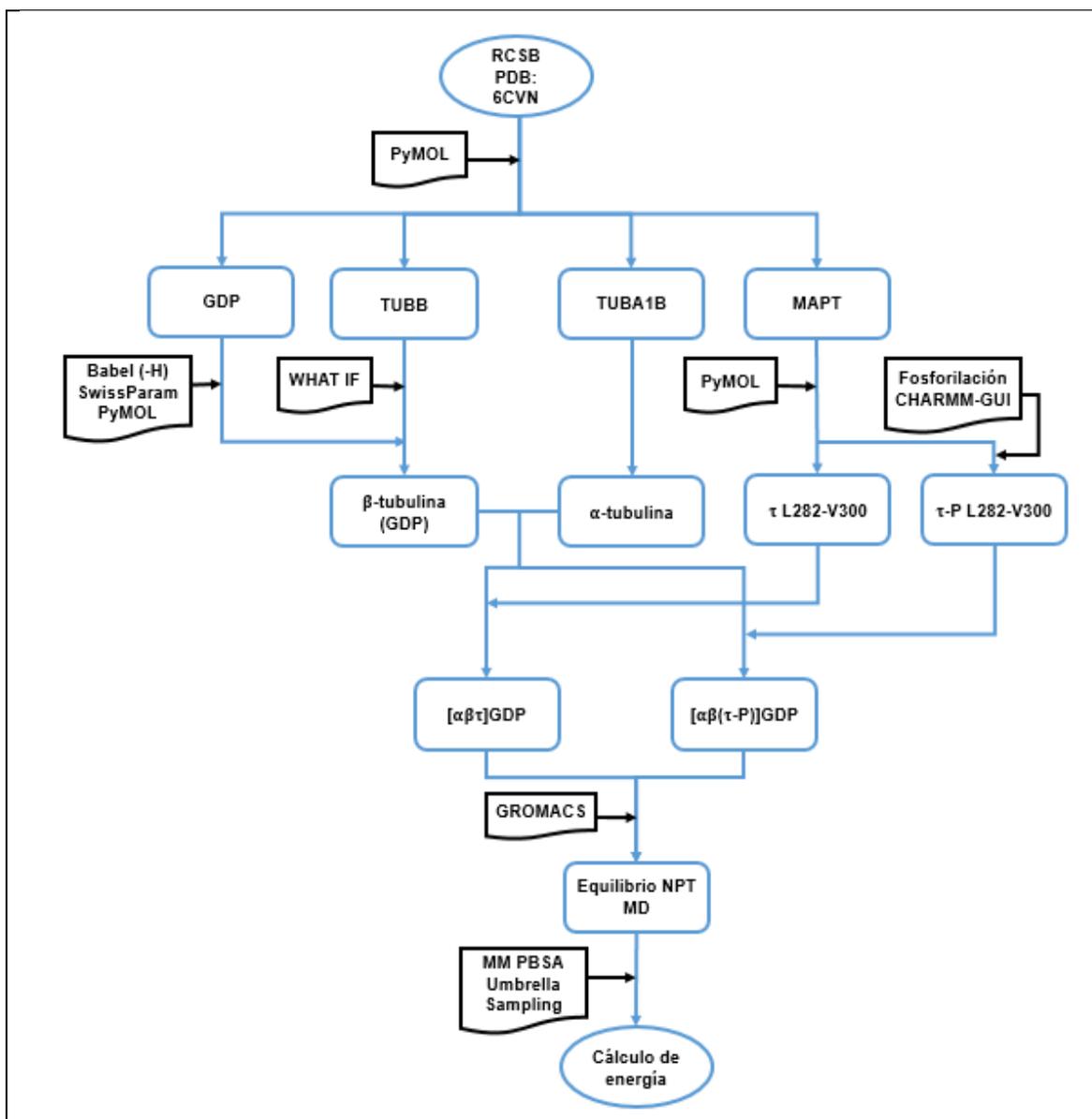


Figura 6.1. Metodología general empleada. Babel (-H) permite completar los átomos de hidrógeno faltantes a la molécula GDP y SwissParam proporciona la topología. CHARMM-GUI permite fosforilar el residuo seleccionado (Ser293). Se generan los sistemas  $[\alpha\beta\tau]$ GDP (no fosforilado) y  $[\alpha\beta(\tau-P)]$ GDP (fosforilado). GROMACS genera la simulación del sistema. MM-PBSA y US para estimar la energía de ambos sistemas.

## 6.2 Preparación del sistema

Se utilizó la estructura resuelta por crío-microscopía electrónica a 3.9 Å (PDB: 6CVN).<sup>31</sup> La estructura inicial, compuesta por la proteína Tau, dos monómeros de  $\beta$ T con un nucleótido de GDP unido a cada una de ellas y un monómero de  $\alpha$ T, la cual tiene unido un nucleótido de GTP junto con un ion magnesio ( $Mg^{2+}$ ) para estabilizar la carga de los fosfatos, fue tratada con el visor molecular PyMOL,<sup>32</sup> para generar la estructura que se utilizó en el estudio de dinámica molecular. Esta nueva estructura comprende un monómero de  $\beta$ T junto con su nucleótido GDP, un monómero de  $\alpha$ T a la cual se le retiró el nucleótido de GTP debido a que se encontraba expuesto en la interfase, así como el ion magnesio ( $Mg^{2+}$ ) y, por último, la proteína Tau, la cual fue recortada desde el residuo Lys274 hasta el residuo Lys281, quedando así, una estructura de 19 aminoácidos la cual comienza en Leu282 y termina en el residuo Val300 (Figura 6.2).

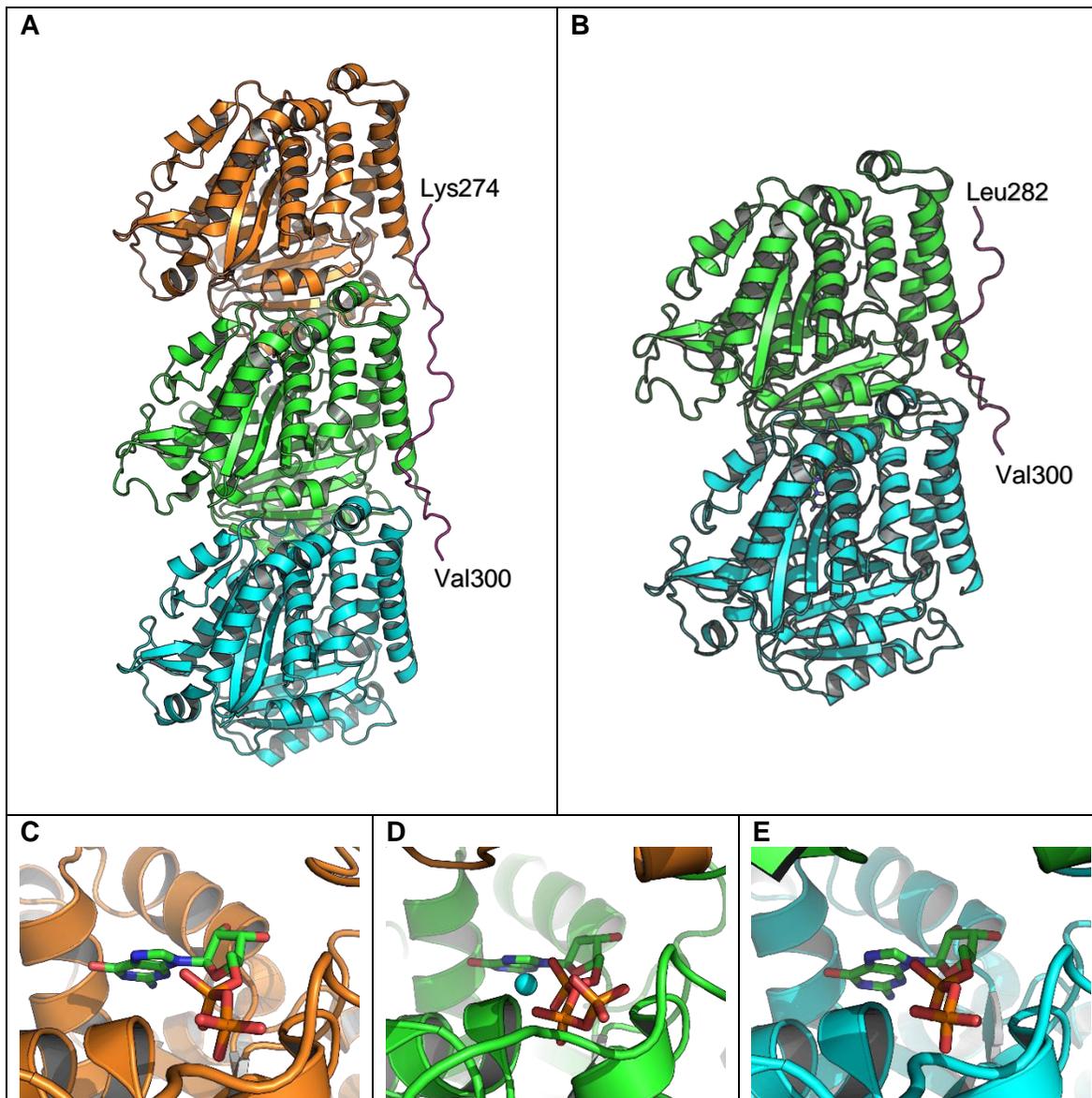


Figura 6.2. A) Sistema original (PDB: 6CVN). La estructura naranja y la estructura azul corresponden a  $\beta$ T, la estructura verde corresponde a  $\alpha$ T y la estructura morada corresponde a la proteína Tau. B) Estructura utilizada durante la simulación molecular compuesta por el monómero de  $\beta$ T,  $\alpha$ T y la proteína Tau. C) Nucleótido GDP en  $\beta$ T (naranja). D) Nucleótido GTP y ión  $Mg^{2+}$  (retirado) en  $\alpha$ T (verde). E) Nucleótido GDP en  $\beta$ T (azul).

Las cadenas laterales faltantes de la  $\beta$ T se añadieron a la estructura con ayuda del servidor web WHAT IF.<sup>32</sup> Con la herramienta química computacional Open Babel,<sup>33</sup> se le adicionaron los átomos de hidrógeno (-H) faltantes a la molécula de GDP, mientras que la topología se obtuvo con ayuda del servidor SwissParam.<sup>34</sup>  $\alpha$ T no se modificó, se mantuvo como en el PDB original.

Por otro lado, haciendo uso del servidor CHARMM-GUI,<sup>35,36</sup> el cual genera diversos sistemas de simulación molecular, se procede a fosforilar la proteína Tau en el residuo Ser293, con la cual, se genera un segundo sistema de las mismas características al ya antes mencionado, utilizando el campo de fuerza CHARMM27,<sup>37</sup> siendo el residuo fosforilado de Tau la única diferencia en el sistema de proteínas. Esta segunda estructura también se utilizó para el estudio de simulación de dinámica molecular.

### 6.3 Dinámica molecular

Cada uno de los sistemas se encuentra embebido en una caja de (8.0, 12.7, 22.0) nm, con agua y iones (0.15 mol/L), generada por el software GROMACS<sup>38-40</sup> (Figura 6.3). El sistema no fosforilado consiste en las tubulinas, el nucleótido GDP y la proteína Tau, 69,507 moléculas de agua, 233 iones de sodio y 202 iones de cloro; mientras que el sistema fosforilado consiste en las tubulinas, el nucleótido GDP y la proteína Tau con el residuo Ser293 fosforilado, 69,432 moléculas de agua, 234 iones de sodio y 202 iones de cloro. El sistema de proteínas no se centra en la caja, sino que es colocado en una posición (3.9, 6.1, 5.0) nm, debido a que durante la dinámica de US se requiere un cierto espacio adicional para poder aplicar el vector de fuerza asociado al desplazamiento de la proteína Tau. Este método se describe más adelante.

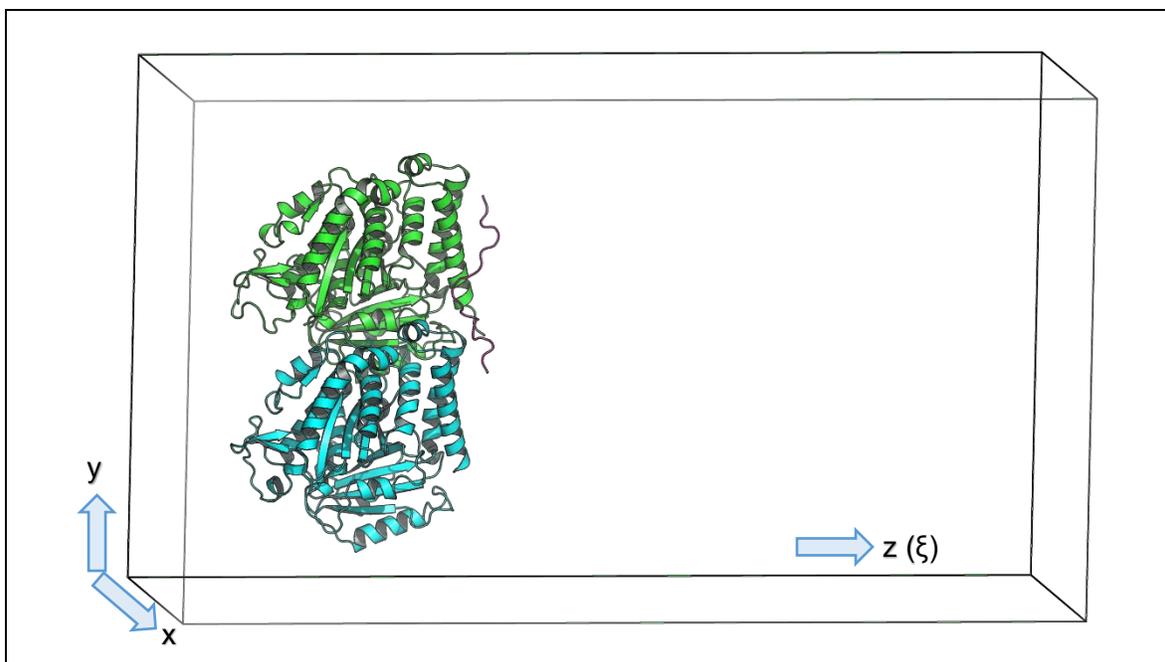


Figura 6.3. Caja en la cual esta embebido y es simulado el sistema no fosforilado y fosforilado. En esta representación se omite la presencia de moléculas de agua y iones.

Los sistemas fueron minimizados y equilibrados energéticamente con dinámicas NVT y NPT, los cuales se simularon durante 100 ps con un paso de 2 fs. La temperatura se fijó a 310 K haciendo referencia a la temperatura corporal, esto mediante el termostato Nosé-Hoover y la presión fue fijada a 1.0 bar mediante al algoritmo Parrinello-Rahman.

Las simulaciones se realizaron con el programa GROMACS 5.0.7 y 5.0.4,<sup>38-40</sup> con el campo de fuerza CHARMM27<sup>41</sup> para el sistema no fosforilado y para el sistema fosforilado, así como un modelo de agua TIP3P. Para las simulaciones de dinámica molecular se aplicó una restricción de movimiento al heterodímero de tubulinas dejando libre a la proteína Tau, las cuales se realizaron durante 30 ns, bajo las mismas condiciones de equilibrio antes mencionadas. Finalmente, las simulaciones de MD fueron analizadas con las herramientas de GROMACS.

#### 6.4 Muestreo de sombrilla (*Umbrella Sampling*)

Una vez realizados los equilibrios NVT y NPT, se procede a realizar una nueva simulación la cual es llamada dinámica molecular de jalado (*md pull*),<sup>24</sup> dicha dinámica se realiza durante 1 ns bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. En esta simulación se observa la separación de la proteína Tau a lo largo de la coordenada de reacción, en este caso el eje z, que es donde se genera todo el movimiento de la proteína debido al vector de fuerza colocado sobre el residuo Leu282 para generar una simulación asociada a un movimiento de cierre (*zipper*). Esta simulación de MD se realiza para ambos sistemas (no fosforilado y fosforilado).

Posteriormente a la MD de jalado, la cual es utilizada para generar el muestreo de sombrilla, se generan un número de configuraciones sobre la coordenada de reacción, algunas de estas configuraciones se usarán para realizar las ventanas de muestreo las cuales ayudan a obtener el potencial de fuerza media. Dichas configuraciones se obtienen cada 0.2 nm mediante el script `setupUmbrella.py`, las cuales se simulan de manera individual.<sup>25</sup> Primero, se realiza un nuevo equilibrio NPT asociado al muestro de sombrilla, bajo las mismas condiciones de la simulación original (MD de jalado) durante 0.1 ns, una vez terminado este proceso se procede a realizar una MD durante 5 ns para posteriormente comenzar el análisis llamado método de análisis de histograma ponderado (WHAM, por sus siglas en inglés).<sup>28,42</sup> Dicho análisis nos permitirá estimar la energía de unión existente entre la proteína tau y el heterodímero de tubulinas. Este análisis se realiza utilizando las herramientas computacionales de GROMACS.

## 6.5 MM-PBSA

Para realizar el análisis MM-PBSA se utiliza la herramienta computacional GROMACS `g_mmpbsa`<sup>29,43</sup>, con la cual se estima la energía libre de interacción aplicando una constante dieléctrica de 2.

Una vez finalizada la MD de 30 ns, se realiza un análisis para cada uno de los sistemas (no fosforilado y fosforilado) este se divide en dos partes. Para la primera parte del análisis, se utiliza el sistema completo, es decir, los 30 ns de simulación se analizan con la herramienta computacional `g_mmpbsa` generando tres gráficos, en los cuales se observan las interacciones por residuo de la proteína Tau,  $\beta$ T y  $\alpha$ T, el cual corresponde a un promedio de las interacciones durante todo el tiempo de simulación. En la segunda parte del análisis, se divide el sistema total en porciones de 5 ns haciendo uso de GROMACS, generando un total de 6 subsistemas con lo cual se obtienen un total de 18 gráficos para analizar la interacción de los componentes del sistema en tiempos más específicos de la MD.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como primer análisis se presentan los gráficos de RMSD y RMSF del sistema no fosforilado y fosforilado (Figura 7.1 y Figura 7.2). Es importante mencionar, que durante la simulación de dinámica molecular el heterodímero de tubulinas tiene un movimiento restringido, por lo que los gráficos (RMSD y RMSF) se centran en el movimiento de la proteína Tau, ya que el estudio principal es analizar cómo afecta la fosforilación a la energía de interacción. Estos parámetros permiten hacer un seguimiento del cambio general durante la simulación, los cuales utilizan las coordenadas iniciales como referencia, así como evaluar el movimiento que presentan los residuos durante el tiempo de simulación. En las imágenes que se presentan a lo largo de los análisis se ocultan las moléculas de agua, así como la presencia de los iones.

En la figura 7.1 se observan los gráficos RMSD y RMSF del sistema no fosforilado, así como el estado inicial y final de la simulación donde se aprecia el movimiento de la proteína Tau. Se puede observar que la estructura, durante los primeros 15 ns de simulación no alcanza un estado de equilibrio; sin embargo, posterior a este tiempo, se pueden observar distintos estados de equilibrio con un incremento del RMSD. Al analizar la gráfica de RMSF, podemos notar un ligero movimiento en la zona del amino inicial, así como el residuo 293; sin embargo, la parte del carboxilo terminal es la zona de la proteína Tau que más movimiento presenta durante la simulación de dinámica molecular. Esto se puede observar de manera más clara en la figura 7.1 C y 7.1 D, donde con el paso del tiempo se nota la pérdida de interacciones entre tau y las tubulinas hasta llegar a formarse una posible interacción entre los mismos residuos de la proteína Tau.

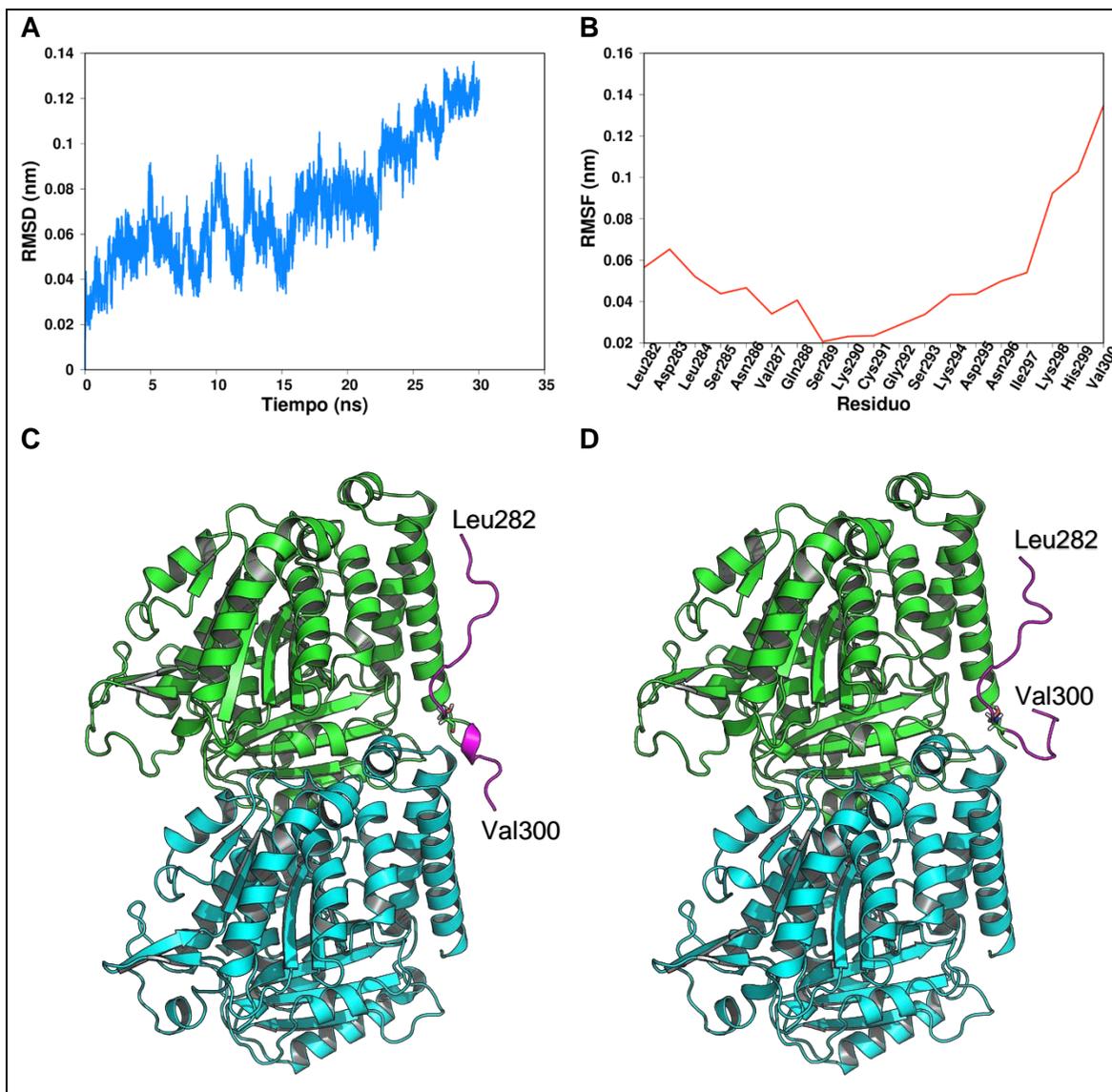


Figura 7.1. Sistema no fosforilado A) Desviación cuadrática media (RMSD) del esqueleto de la proteína Tau. B) Fluctuación cuadrática media (RMSF) de las cadenas laterales de la proteína Tau. C) Estado inicial del sistema no fosforilado (0 ns). D) Estado final del sistema no fosforilado (30 ns), se puede observar el movimiento del carboxilo terminal.

Por otro lado, en la figura 7.2, se muestran los gráficos RMSD y RMSF del sistema fosforilado, así como los estados que presenta el sistema respecto del tiempo. Se puede observar de la gráfica RMSD que, durante la mayor parte del tiempo no se observa un completo estado de equilibrio en el sistema, en el tiempo correspondiente a 23 ns, aproximadamente, se mantiene estable para posteriormente disminuir el valor de RMSD. Al igual que en el sistema no fosforilado,

se puede observar que la parte amino inicial presenta un movimiento considerable a lo largo de la dinámica, el residuo fosforilado (Ser293) mantiene las interacciones con  $\alpha$ T, pero la parte del carboxilo terminal, nuevamente, presenta el mayor movimiento durante la simulación, podemos observar en la figura 7.2 C y 7.2 D, la posición de la proteína Tau al inicio y después de los 30 ns de dinámica.

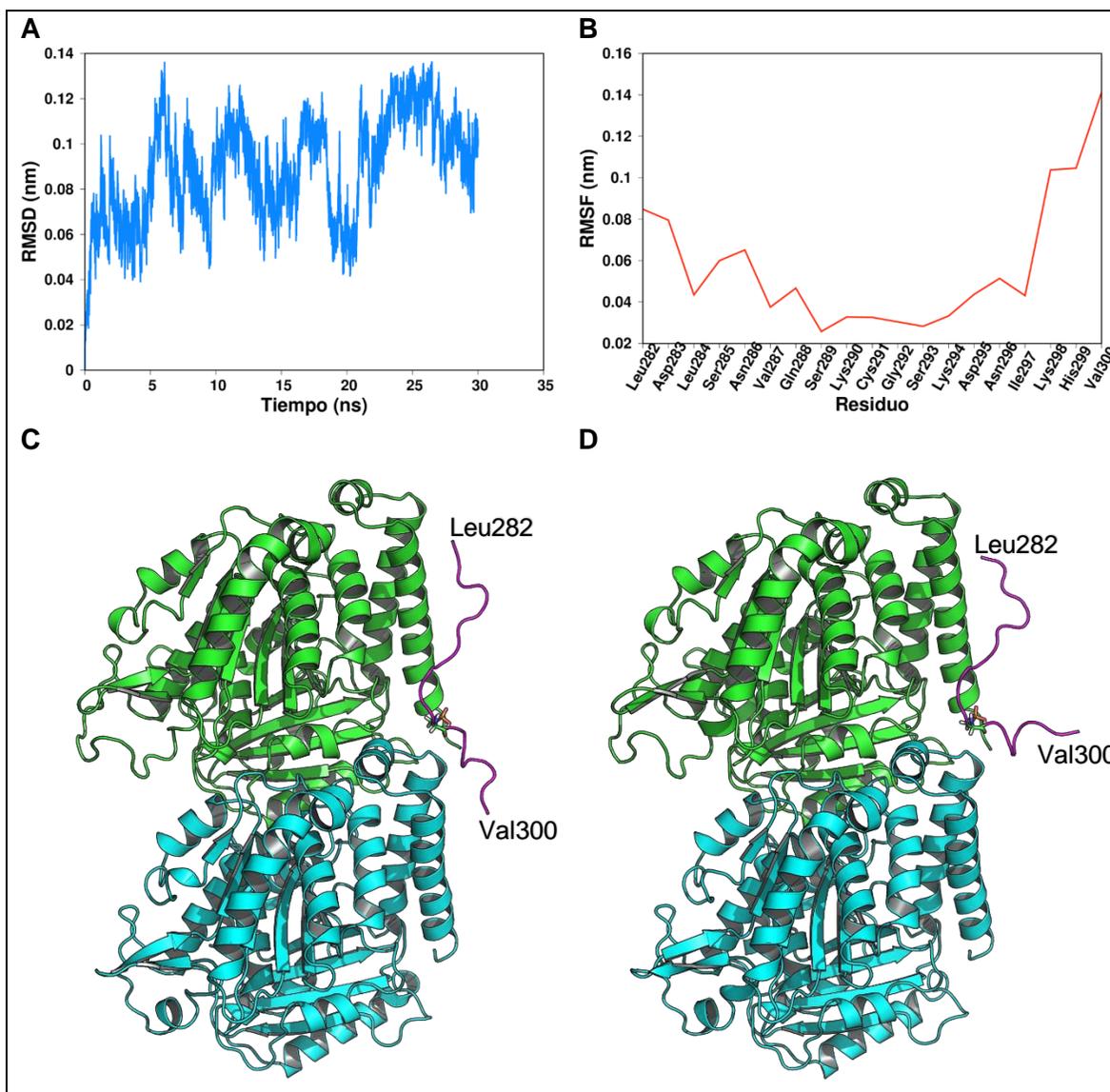


Figura 7.2. Sistema fosforilado A) Desviación cuadrática media (RMSD) del esqueleto de la proteína Tau. B) Fluctuación cuadrática media (RMSF) de las cadenas laterales de la proteína Tau. C) Estado inicial del sistema fosforilado (0 ns). D) Estado final del sistema fosforilado (30 ns).

## 7.1 Muestreo de Sombrilla (*Umbrella Sampling*)

Se utilizaron los primeros 700 ps de las simulaciones de US (Figura 7.3) de los sistemas fosforilado y no fosforilado, con los cuales, se generaron cada una de las configuraciones en un intervalo de 0.2 nm a lo largo de la coordenada de reacción (eje z), esto permitió estimar la energía de enlace en cada uno de los sistemas. A continuación, se muestra la gráfica PMF, así como el estado inicial y final de cada uno de los sistemas a lo largo del US.

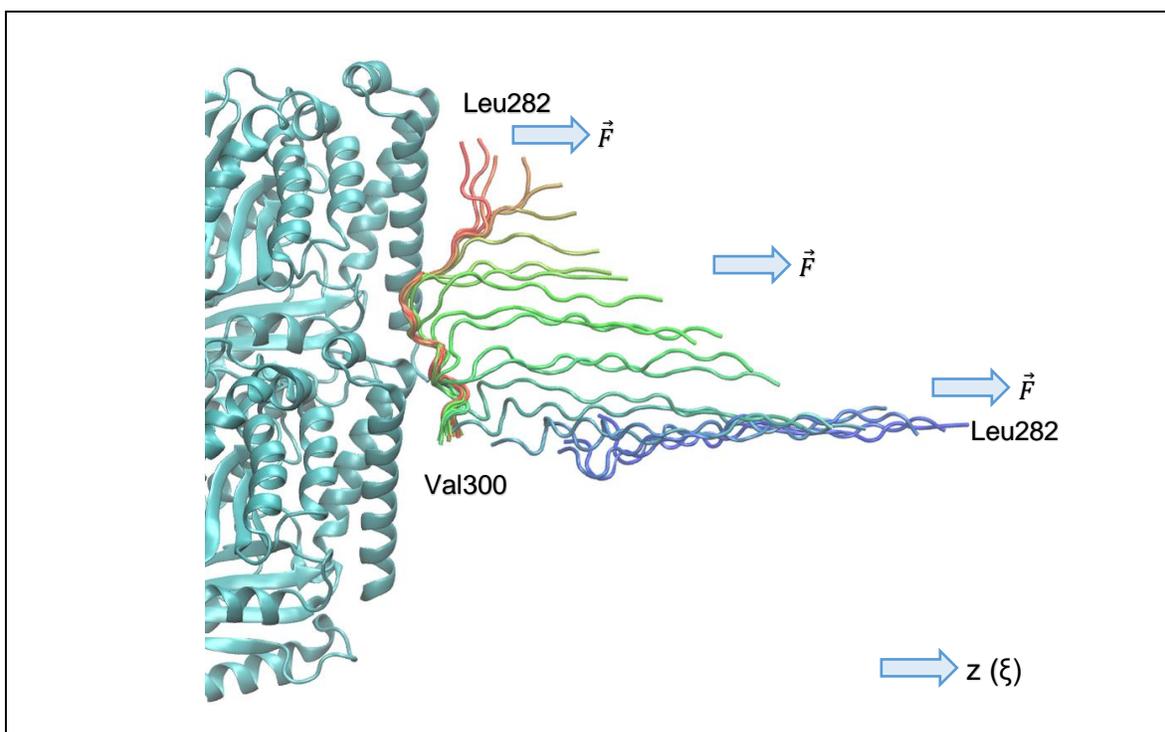


Figura 7.3. Representación de la proteína Tau a lo largo de la simulación de US, se realiza la simulación con un movimiento de cierre colocando el vector de fuerza ( $\vec{F}$ ) sobre el residuo Leu282. Cada una de las configuraciones generadas se simula de manera individual para obtener el análisis WHAM.

Para el sistema no fosforilado se generaron un total de 350 configuraciones de las cuales, se utilizaron 53 para realizar el análisis WHAM y obtener la gráfica PMF (Figura 7.4), cada una de estas configuraciones se simuló con un equilibrio NPT, así como una MD de 5 ns. Estas configuraciones se muestran en la figura 7.4 A en la gráfica de frecuencia, las cuales generan una distribución acampanada, conocida como ventana de muestreo. En algunas zonas, a lo largo de la coordenada de

reacción, se puede observar un sobremuestreo debido a que las configuraciones son similares entre sí, mas no iguales y ya que para generar el PMF asociado al análisis es necesario que las campanas se toquen entre sí en cualquier punto, la existencia de este sobremuestreo en algunas zonas ayuda a que la gráfica de energía sea una función continua, ya que si estas curvas no se tocaran en algún punto se observaría una caída de potencial asociada a la falta de configuraciones con lo cual se tendría que hacer un nuevo análisis considerando nuevas estructuras dentro de las ya obtenidas a lo largo de la coordenada de reacción. Para este sistema no fosforilado se estimó una energía de unión de aproximadamente  $44.27 \text{ kcal mol}^{-1}$ .

En el sistema fosforilado, se obtuvieron un total de 350 configuraciones, mismas que en el anterior sistema; sin embargo, para este solo se utilizaron 34 estructuras de las obtenidas para realizar el análisis WHAM y obtener la gráfica PMF (Figura 7.5). La gráfica de frecuencia (Figura 7.5 A) no muestra un sobremuestreo como en el sistema no fosforilado; es importante mencionar que el número de configuraciones utilizadas durante el análisis es irrelevante siempre y cuando estas formen una función continua y cubran todo el intervalo en el que la proteína fue desplazada, es decir, que se toquen en algún punto de la coordenada de reacción para obtener el valor estimado de PMF. En el caso del sistema fosforilado la energía de unión estimada es de aproximadamente  $30.66 \text{ kcal mol}^{-1}$ .

Tanto para el sistema no fosforilado, como para el fosforilado, se muestra la configuración inicial y final del análisis de US (Figura 7.4 B y Figura 7.5 B), se puede apreciar la diferencia entre las configuraciones finales de ambos sistemas, ya que la configuración inicial no presenta ninguna diferencia. A pesar de que el vector de fuerza asociado al análisis se coloca en el mismo residuo (Leu282) este genera un movimiento de la proteína Tau totalmente aleatorio debido al medio y a las interacciones que pueda tener con este.

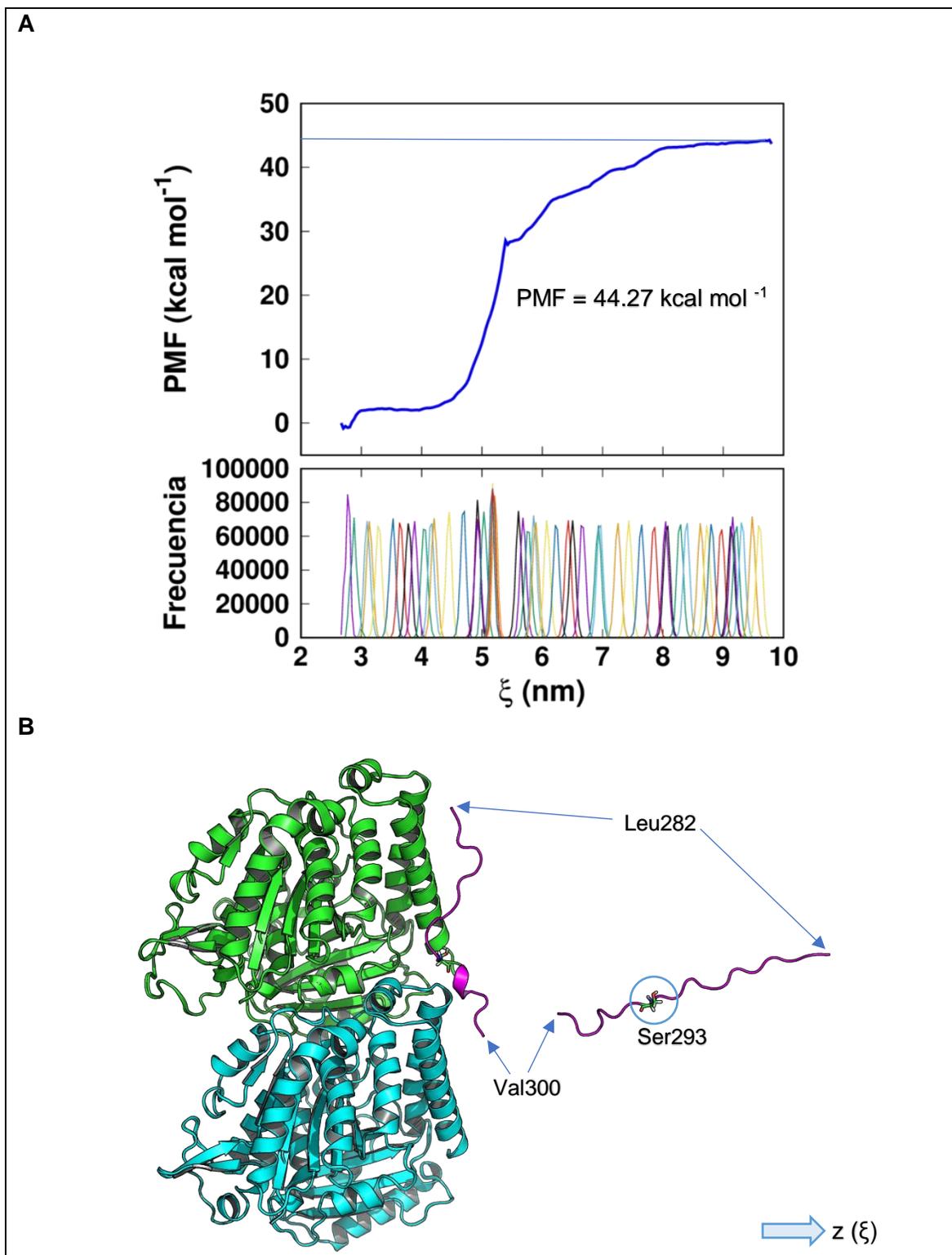


Figura 7.4. A) Gráfica PMF del sistema no fosforilado. B) Sistema no fosforilado (Ser293) durante la simulación de US. Se muestra solo el estado inicial (0 ps) y final de la proteína Tau (700 ps).

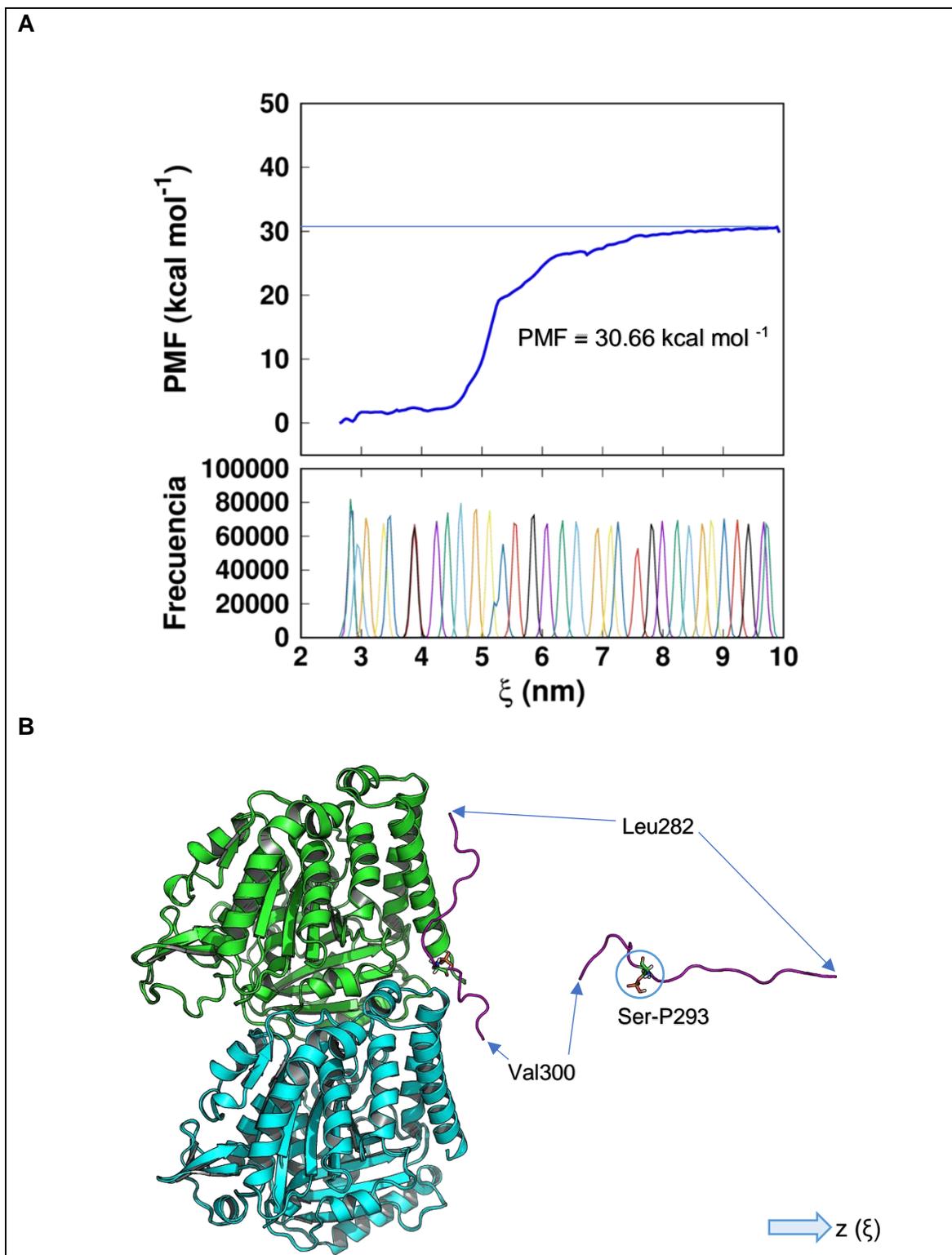


Figura 7.5. A) Gráfica PMF del sistema fosforilado. B) Sistema fosforilado (Ser-P293) durante la simulación de US. Se muestra solo el estado inicial (0 ps) y final de la proteína Tau (700 ps).

Por último, se realiza una gráfica comparativa (Figura 7.6) en la cual se presenta el PMF del sistema no fosforilado y el fosforilado, cabe resaltar que la única y gran diferencia entre los sistemas es el fosfato en el residuo Ser293, con lo que se puede demostrar que la presencia del fosfato en la proteína Tau afecta las interacciones entre ésta y el heterodímero de tubulinas, dando lugar a un sistema menos estable donde la diferencia energética entre ambos sistemas es de aproximadamente  $13.61 \text{ kcal mol}^{-1}$ .

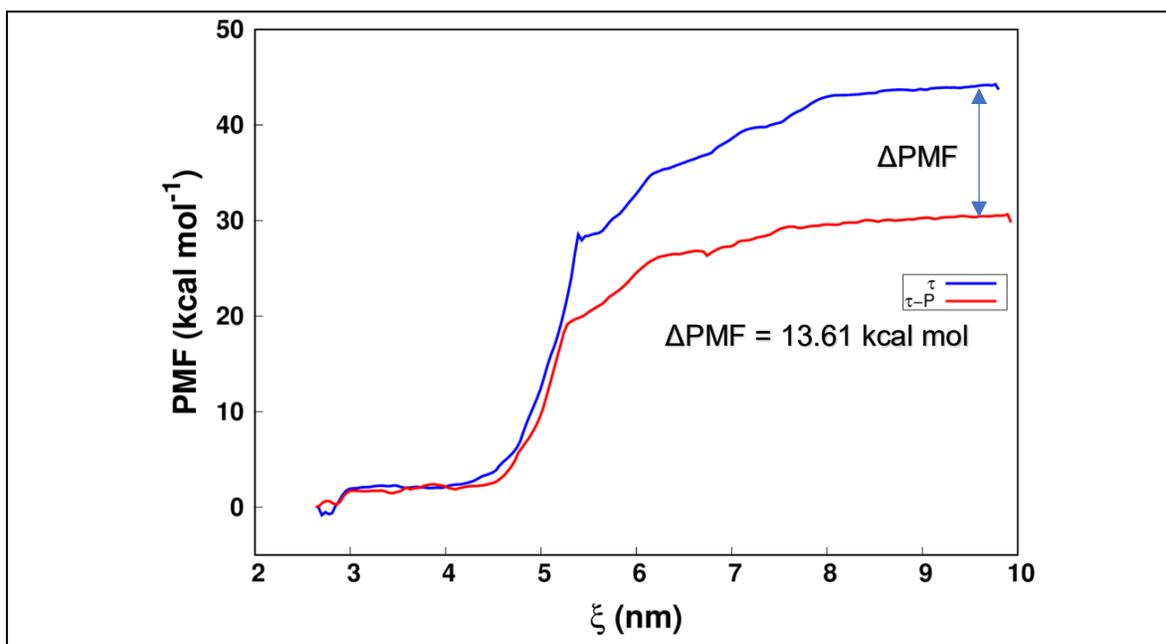


Figura 7.6. Gráfica PMF de los sistemas no fosforilado ( $\tau$ ) y fosforilado ( $\tau$ -P). La diferencia energética entre ambos sistemas es de aproximadamente  $13.61 \text{ kcal mol}^{-1}$ .

## 7.2 MM-PBSA

Para el análisis de MM-PBSA se utilizan las gráficas obtenidas al tratar el sistema no fosforilado y fosforilado, los cuales se simularon durante 30 ns, ya que se observó que para los subsistemas particionados en porciones de 5 ns, mencionados en la metodología, la energía estimada no varía en relación al sistema total (30 ns), las gráficas obtenidas para los subsistemas se muestran como parte del apéndice.

En la figura 7.7 se muestra la contribución energética de unión por residuo de la proteína Tau en el sistema no fosforilado y fosforilado (Figura 7.7 A y Figura 7.7 B). Se puede notar que la mayor diferencia entre estas radica en el residuo que fue modificado, mientras que en el sistema no fosforilado la contribución asociada a la Ser293 es de alrededor de  $-1.13 \text{ kcal mol}^{-1}$ , en el sistema fosforilado la Ser293, que es precisamente el residuo fosforilado, presenta una energía de unión de aproximadamente  $89.55 \text{ kcal mol}^{-1}$ , haciendo ver nuevamente que la presencia del fosfato disminuye la interacción entre la proteína Tau y las tubulinas.

En la figura 7.8 se muestra la diferencia de energía asociada a ambos sistemas, donde se observa claramente que el residuo Ser293, el cual es modificado con el fosfato, es el que mayor diferencia de energía posee; este valor se estima en  $90.68 \text{ kcal mol}^{-1}$ . El resto de los aminoácidos prácticamente no presentan gran diferencia de energía, con excepción del último residuo Val300; sin embargo, en resultados anteriores se observa que la zona carboxilo terminal es la que mayor movilidad presenta en la proteína Tau, por lo que la adición de fosfato sigue siendo la principal causa en la disminución de energía.

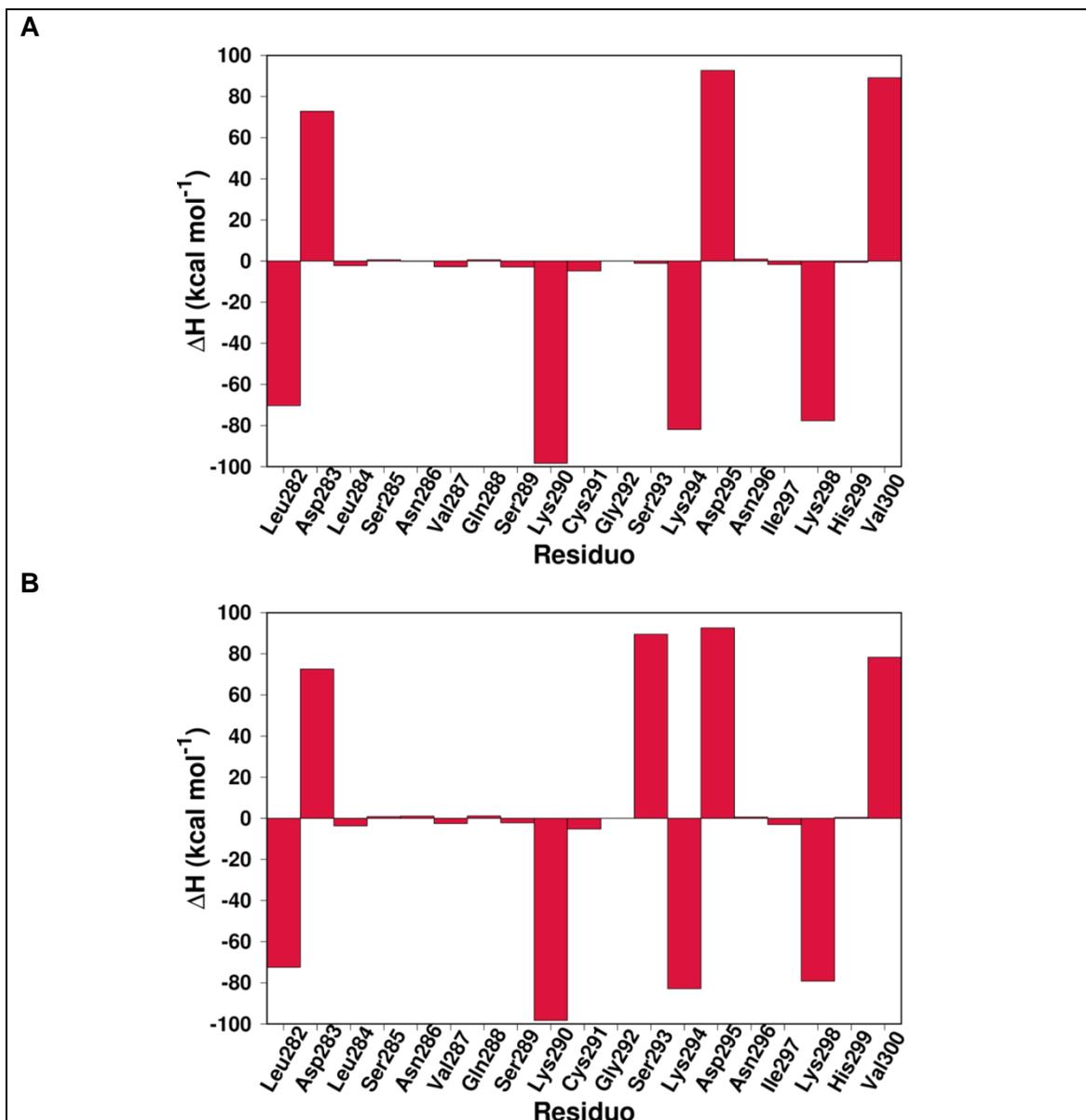


Figura 7.7. Análisis MM-PBSA en la cual se muestra la contribución energética por residuo.

A) Proteína Tau del sistema no fosforilado. B) Proteína Tau del sistema fosforilado.

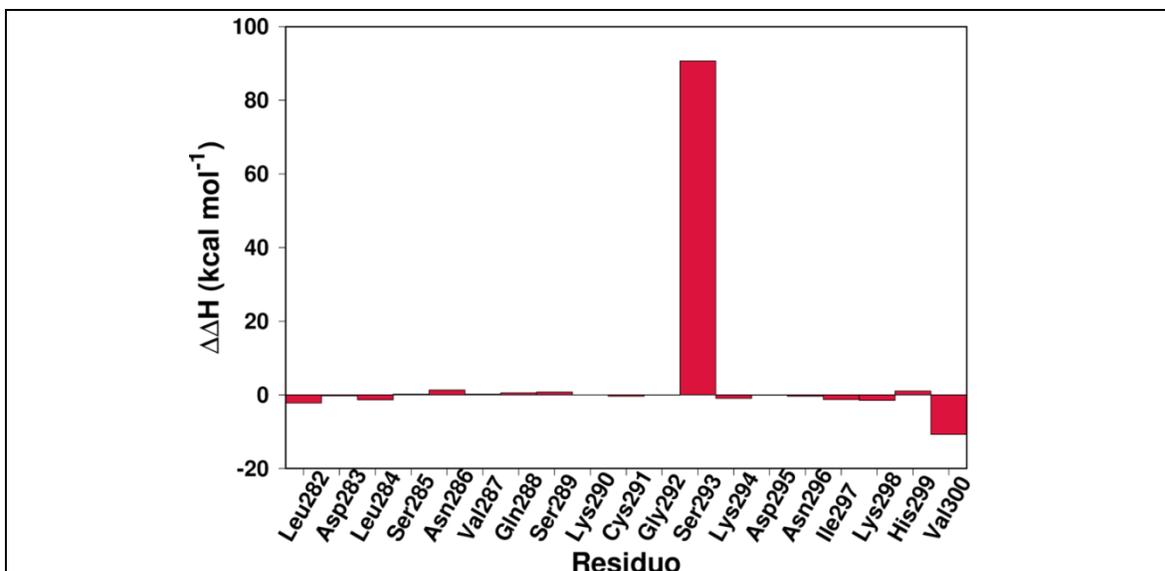


Figura 7.8. Diferencia de la energía de unión entre la proteína Tau del sistema no fosforilado y del sistema fosforilado. Se puede observar que el residuo con menos contribución energética de interacción es la Ser293 para el caso del sistema no fosforilado.

Por otro lado, en la figura 7.9 y figura 7.10 se muestra la contribución energética por aminoácido de  $\beta T$  y de  $\alpha T$ . El primer caso que se analiza es la  $\beta T$ ; el sistema no fosforilado (Figura 7.9 A) y el sistema fosforilado (Figura 7.9 B) presentan interacciones en regiones pequeñas las cuales no pasan de las 5 y -5 kcal mol<sup>-1</sup>. La mayor contribución energética de la  $\beta T$  se presenta alrededor del residuo número 400, es importante mencionar que esta zona es la más cercana a la proteína Tau. Para el caso del sistema fosforilado, la gran mayoría de los residuos presentan valores positivos, asociados a pocas o nulas interacciones con los elementos más cercanos a la tubulina.

Sin embargo, para el caso de  $\alpha T$  del sistema no fosforilado (Figura 7.10 A), así como del sistema fosforilado (Figura 7.10 B), se nota una mayor diferencia respecto a la  $\beta T$  antes mencionada. Las interacciones energéticas tanto positivas, como negativas del sistema no fosforilado tienen valores muy por encima en comparación a las del sistema fosforilado; al igual que en  $\beta T$ , aproximadamente a partir del residuo 390 se presentan las interacciones más cercanas a la proteína Tau, ya que la mayor zona de contacto se encuentra precisamente interactuando con  $\alpha T$ . Para el caso de  $\beta T$  solo la zona terminal de la proteína Tau es la que se encuentra en

interacción con esta. El residuo Ser293 se encuentra cerca del residuo Glu433, Glu434 y Val435 de  $\alpha T$ , mientras que los residuos más cercanos y con probable interacción, debido a la distancia, de  $\beta T$  son Arg401 y Lys402.

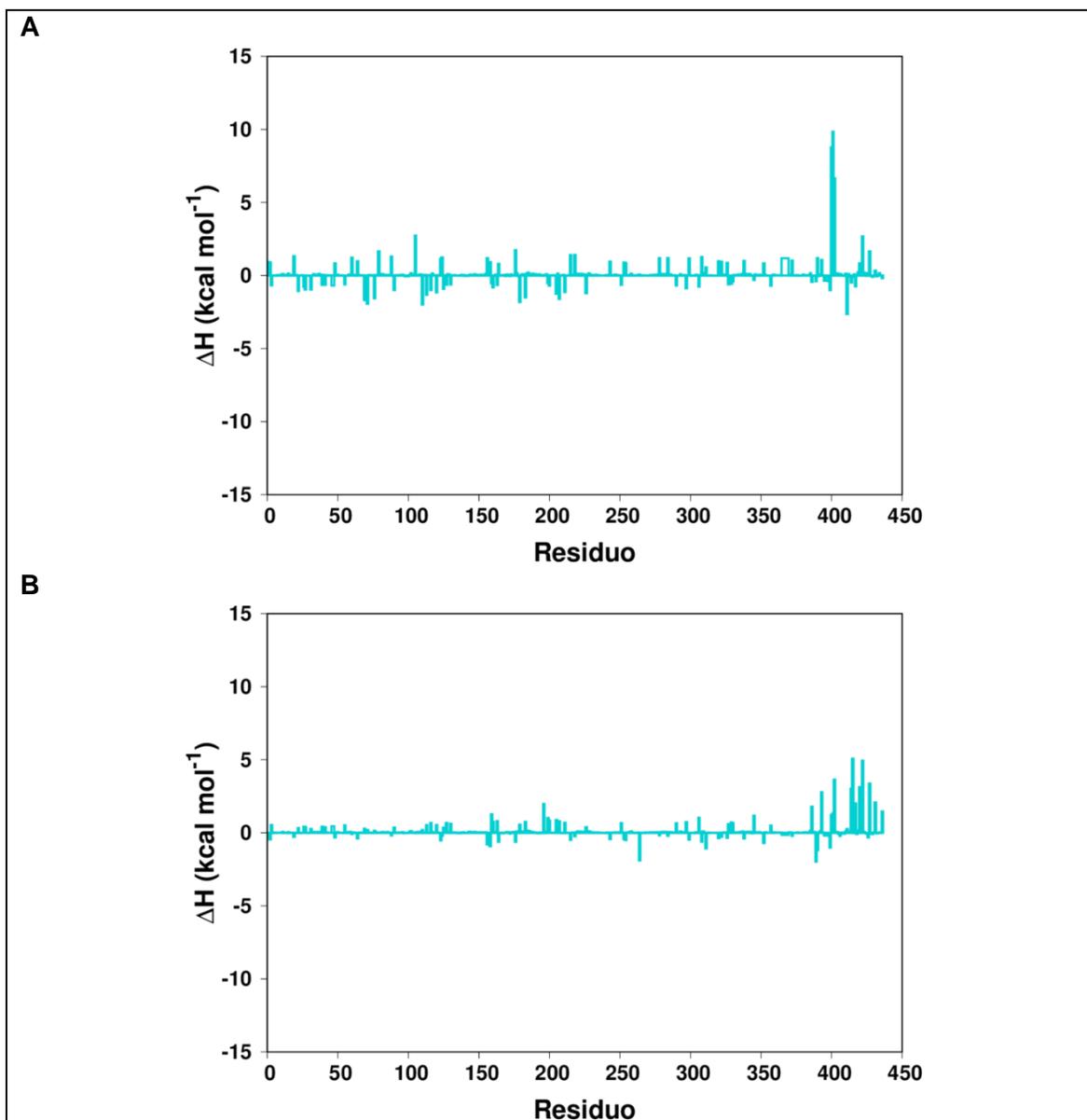


Figura 7.9. Contribución energética  $\beta T$  MD (30ns). A) Análisis MM-PBSA del sistema no fosforilado. B) Análisis MM-PBSA del sistema fosforilado.

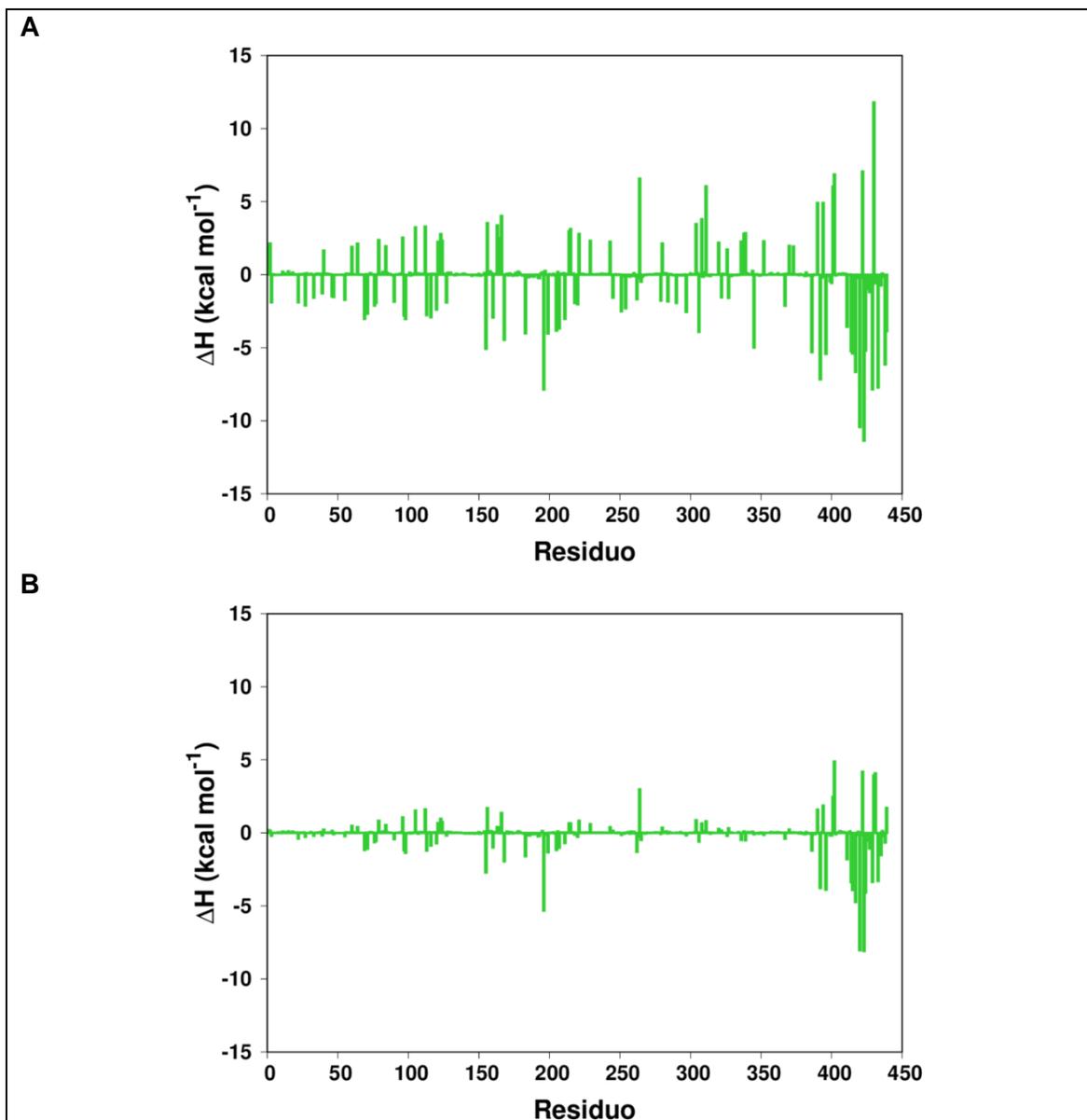


Figura 7.10. Contribución energética de alfa tubulina MD (30 ns). A) Análisis MM-PBSA del sistema no fosforilado. B) Análisis MM-PBSA del sistema fosforilado.

## **8. CONCLUSIONES**

Se llevó a cabo la simulación de dinámica molecular con la cual fue posible determinar la energía necesaria para romper las interacciones moleculares existentes entre las tubulinas y la proteína Tau con su residuo Ser293 en su forma fosforilada y no fosforilada. Con esto, podemos constatar que el sistema no fosforilado requiere más energía para lograr la separación de la proteína Tau, mientras que el sistema fosforilado, debido a la presencia del fosfato en el residuo 293 requiere menor cantidad de energía para romper las interacciones que están presentes. Es decir, cuando la proteína Tau se encuentra en un estado fosforilado o hiperfosforilado, se promueve la separación de esta y, por lo tanto, la desintegración de los microtúbulos contribuyendo con la posible aparición de la EA.

## 9. REFERENCIAS

1. OMS. Demencia. (2019). Available at: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>.
2. Anand, R., Gill, K. D. & Mahdi, A. A. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology* **76**, 27–50 (2014).
3. Kumar, A., Singh, A. & Ekavali. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: An update. *Pharmacol. Reports* **67**, 195–203 (2015).
4. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement. J. Alzheimer's Assoc.* **12**, 459–509 (2016).
5. Selkoe, D. J. Alzheimer ' s Disease : Genes , Proteins , and Therapy. **81**, 741–766 (2019).
6. Herrera-Rivero, M., Hernández-Aguilar, M. E., Manzo, J. & Aranda-Abreu, G. E. Enfermedad de Alzheimer: Inmunidad y diagnóstico. *Rev. Neurol.* **51**, 153–164 (2010).
7. Valiron, O., Caudron, N. & Job, D. Microtubule dynamics. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 2069–2084 (2001).
8. Tresguerres, J. A. F. *Fisiología Humana*. (McGraw Hill, 2005).
9. Goodson, H. V & Jonasson, E. M. Microtubules and Microtubule-Associated Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* (2019).
10. Created with BioRender.com.
11. Alushin, G. M. *et al.* High resolution microtubule structures reveal the structural transitions in  $\alpha\beta$ -tubulin upon GTP hydrolysis. *Cell* **157**, 1117–1129 (2014).

12. Downing, K. H. STRUCTURAL BASIS FOR THE INTERACTION OF TUBULIN WITH PROTEINS AND DRUGS THAT AFFECT MICROTUBULE DYNAMICS. *Cell Dev. Biol.* **16**, 89–111 (2000).
13. Johnson, G. V. W. & Jenkins, S. M. Tau Protein in Normal and Alzheimer ' s Disease. *J. Alzheimer's Dis.* **1**, 307–328 (1999).
14. García, T. & Jay, D. Fosforilación de tau y enfermedad de Alzheimer. *Gac. Med. Mex.* **140**, 329–333 (2004).
15. Jouanne, M., Rault, S. & Voisin-Chiret, A. S. Tau protein aggregation in Alzheimer's disease: An attractive target for the development of novel therapeutic agents. *Eur. J. Med. Chem.* **139**, 153–167 (2017).
16. Charafeddine, R. A. *et al.* Conserved tau microtubule-binding repeat histidines confer pH-dependent tau-microtubule association. *bioRxiv* 486688 (2018). doi:10.1101/486688
17. Hernandez, F., Lucas, J. J. & Avila, J. GSK3 and tau: Two convergence points in Alzheimer's disease. *Adv. Alzheimer's Dis.* **3**, 141–144 (2012).
18. Hooper, C., Killick, R. & Lovestone, S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **104**, 1433–1439 (2008).
19. Kimura, T., Ishiguro, K. & Hisanaga, S. Physiological and pathological phosphorylation of tau by Cdk5. *Front. Mol. Neurosci.* **7**, 1–10 (2014).
20. Patrick, G. N. *et al.* Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* **402**, 615–622 (1999).
21. Zhu, X. *et al.* Activation of P38 kinase links  $\pi$  phosphorylation, oxidative stress and cell cycle-related events in Alzheimer disease. *Neurobiol. Aging* **21**, 267 (2003).
22. Hollingsworth, S. A. & Dror, R. O. Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron* **99**, 1129–1143 (2018).

23. Abraham, M., Hess, B., Spoel, D. van der & Lindahl, E. *GROMACS Manual-5.0.7. Www.Gromacs.Org* (2015). doi:10.1007/SpringerReference\_28001
24. Lemkul, J. A. & Bevan, D. R. Assessing the stability of Alzheimer's amyloid protofibrils using molecular dynamics. *J. Phys. Chem. B* **114**, 1652–1660 (2010).
25. Lemkul, J. A. From Proteins to Perturbed Hamiltonians: A Suite of Tutorials for the GROMACS-2018 Molecular Simulation Package [Article v1.0]. *Living J. Comput. Mol. Sci.* **1**, 1–53 (2018).
26. Torrie, G. M. & Valleau, J. P. Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation: Umbrella sampling. *J. Comput. Phys.* **23**, 187–199 (1977).
27. Kästner, J. Umbrella sampling. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **1**, 932–942 (2011).
28. Souaille, M. & Roux, B. Extension to the weighted histogram analysis method: combining umbrella sampling with free energy calculations. *Comput. Phys. Commun.* **135**, 40–57 (2001).
29. Kumari, R., Kumar, R. & Lynn, A. G-mmpbsa -A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. *J. Chem. Inf. Model.* **54**, 1951–1962 (2014).
30. Genheden, S. & Ryde, U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opin. Drug Discov.* **10**, 449–461 (2015).
31. Kellogg, E. H. *et al.* Near-atomic model of microtubule-tau interactions. *Science (80-. )*. **1780**, 1242–1246 (2018).
32. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.
33. Boyle, N. M. O. *et al.* Open Babel: An open chemical toolbox.

*Cheminformatics* 1–14 (2011). doi:10.1186/1758-2946-3-33

34. Zoete, V. , Cuendet, M. A., Grosdidier, A. and Michielin, O. SwissParam: A Fast Force Field Generation Tool for Small Organic Molecules. *J. Comput. Chem.* **32**, 2359–2368 (2011).
35. Jo, Sunhwan, Kim, T. CHARMM-GUI: A Web-Based Graphical User Interface for CHARMM. *J. Comput. Chem.* **29**, 1859–1865 (2018).
36. Jo, S. *et al.* CHARMM-GUI PDB manipulator for advanced modeling and simulations of proteins containing nonstandard residues. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **96**, 235–265 (2014).
37. Huang, J. & Mackerell, A. D. CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *J. Comput. Chem.* **34**, 2135–2145 (2013).
38. Berendsen, H. J. C., van der Spoel, D. & van Drunen, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comput. Phys. Commun.* **91**, 43–56 (1995).
39. Van Der Spoel, D. *et al.* GROMACS: Fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem.* **26**, 1701–1718 (2005).
40. Abraham, M. J. *et al.* Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* **1–2**, 19–25 (2015).
41. Brooks, B. R. *et al.* CHARMM: The Biomolecular Simulation Program. *J. Comput. Chem.* **30**, 1545–1614 (2010).
42. Kumar, S., Rosenberg, J. M., Bouzida, D., Swendsen, R. H. & Kollman, P. A. The Weighted Histogram Analysis Method for Free-Energy Calculations on Biomolecules. I. The method. *J. Comput. Chem.* **13**, 1011–1021 (1992).
43. Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J. & McCammon, J. A.

Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 10037–10041 (2001).

44. Kufareva, I. & Abagyan, R. Methods of protein structure comparison. *Struct. Bioinforma.* 231–257 (2012). doi:10.1002/0471721204.ch25
45. Bornot, A., Etchebest, C. & De Brevern, A. G. Predicting protein flexibility through the prediction of local structures. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **79**, 839–852 (2011).

## 10. APÉNDICES

### 10.1. RMSD

La desviación cuadrática media (RMSD) es la medida cuantitativa más utilizada de la similitud entre dos coordenadas atómicas las cuales son superpuestas. Los valores de RMSD se presentan en Å y se calculan mediante la siguiente ecuación.<sup>44</sup>

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{M} \sum_{i=1}^n m_i |r_i(t_j) - r_i^{ref}|^2}$$

Donde M es la masa total,  $m_i$  es la masa del átomo i-ésimo,  $r_i(t_j)$  es la posición del átomo i a un tiempo  $t_j$  y  $r_i^{ref}$  es la posición de referencia.

### 10.2. RMSF

La fluctuación cuadrática media (RMSF) es una medida de la amplitud de los movimientos de cada átomo o residuo en la estructura de la proteína durante la simulación de MD, esta se calcula de la siguiente forma.<sup>45</sup>

$$RMSF = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t_j=1}^T |r_i(t_j) - r_i^{ref}|^2}$$

Donde T es el tiempo en el cual se quiere promediar.

### 10.3. MM-PBSA

Se realizó el análisis de Poisson-Boltzman dividiendo el sistema cuya MD fue de 30 ns en partes más pequeñas de 5 ns, para analizar el comportamiento de la proteína Tau con las tubulinas a lo largo de la simulación.

A continuación, se muestran los gráficos obtenidos en las porciones de 5 ns haciendo una comparación del sistema no fosforilado y fosforilado.

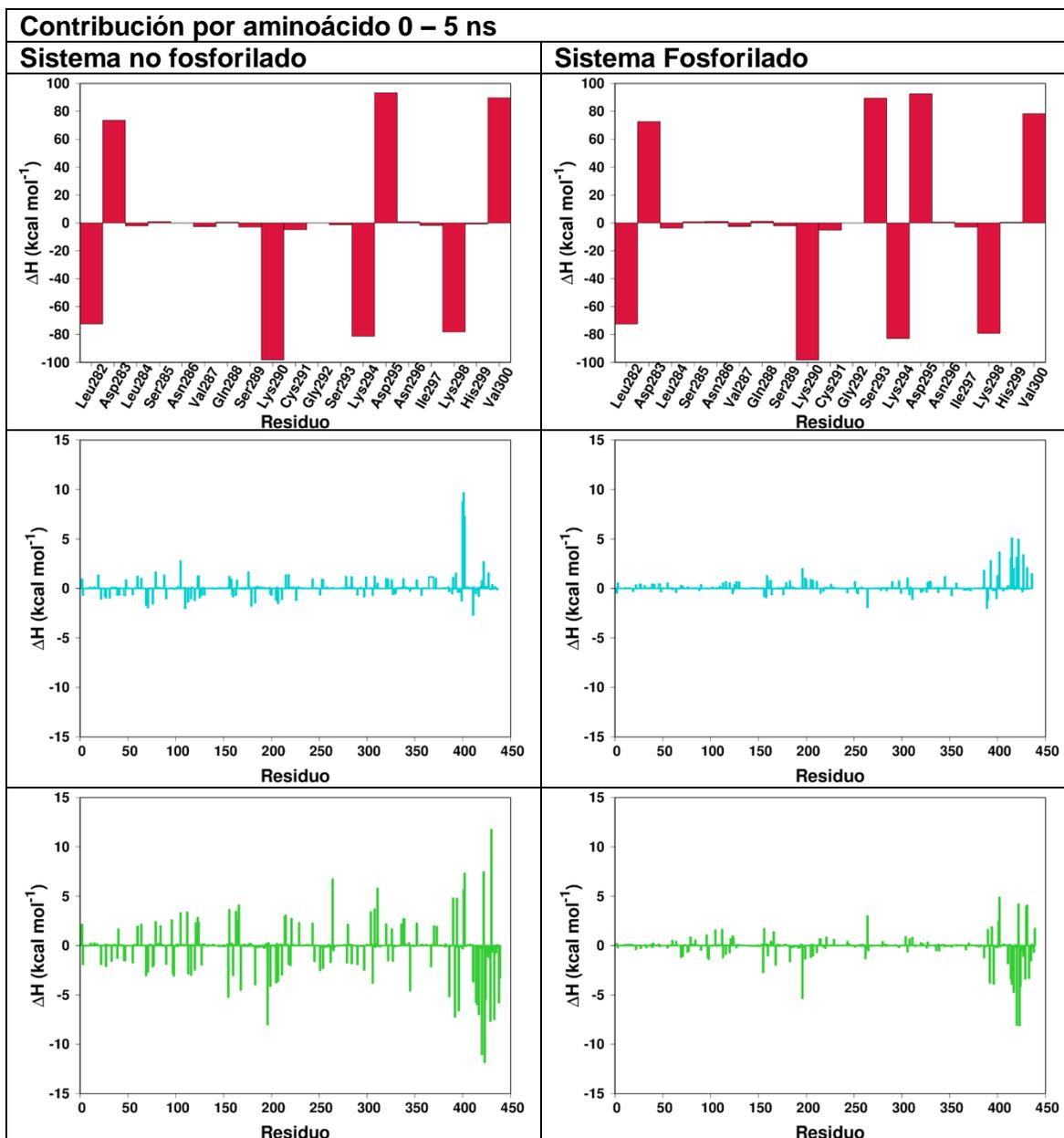


Figura 10.1. Contribución energética por aminoácido en cada uno de los componentes del sistema en un intervalo de 0-5 ns. De arriba hacia abajo se presenta: la proteína Tau,  $\beta$ T y  $\alpha$ T.

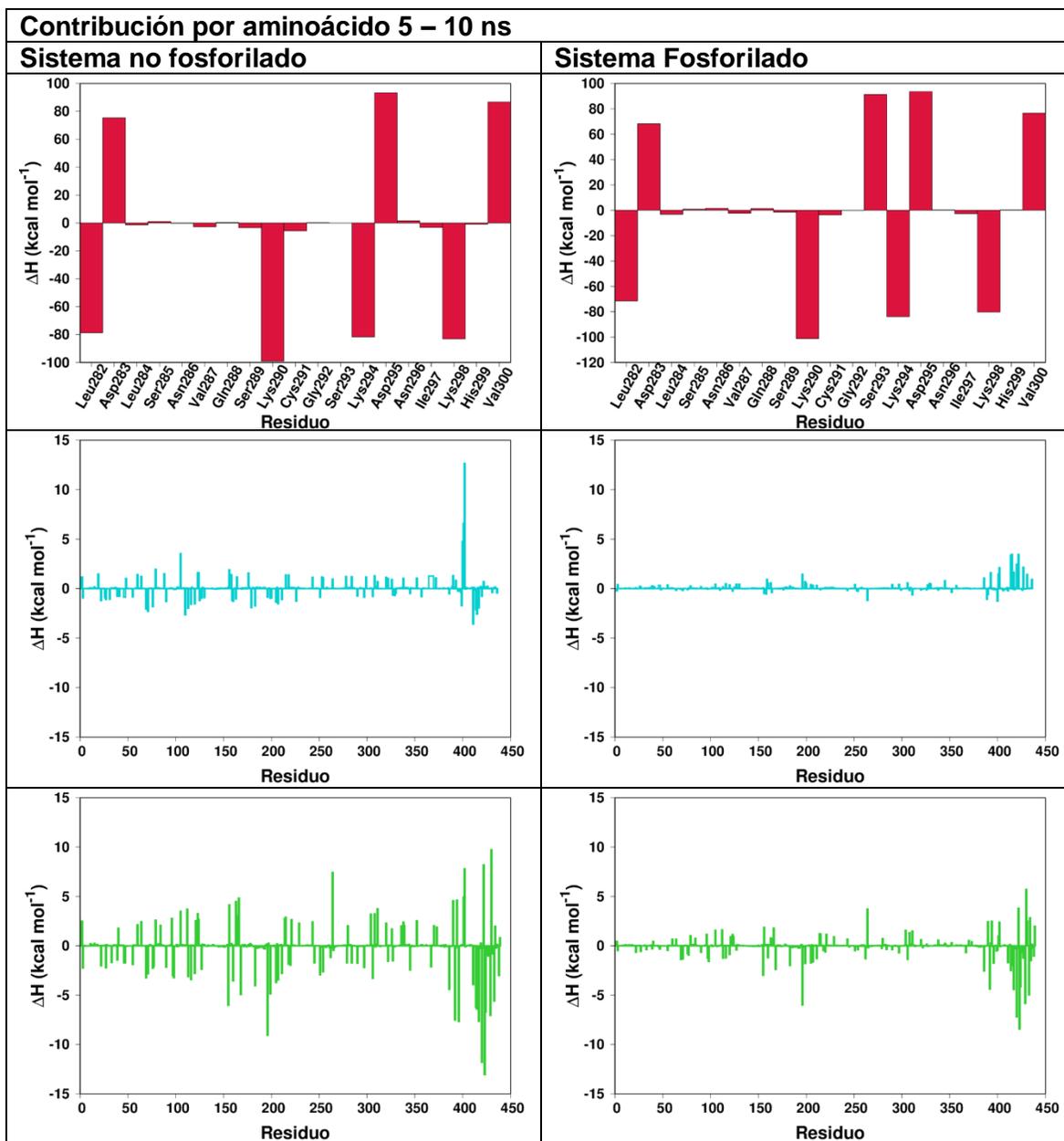


Figura 10.2. Contribución energética por aminoácido en cada uno de los componentes del sistema en un intervalo de 5-10 ns. De arriba hacia abajo se presenta: la proteína Tau,  $\beta$ T y  $\alpha$ T.

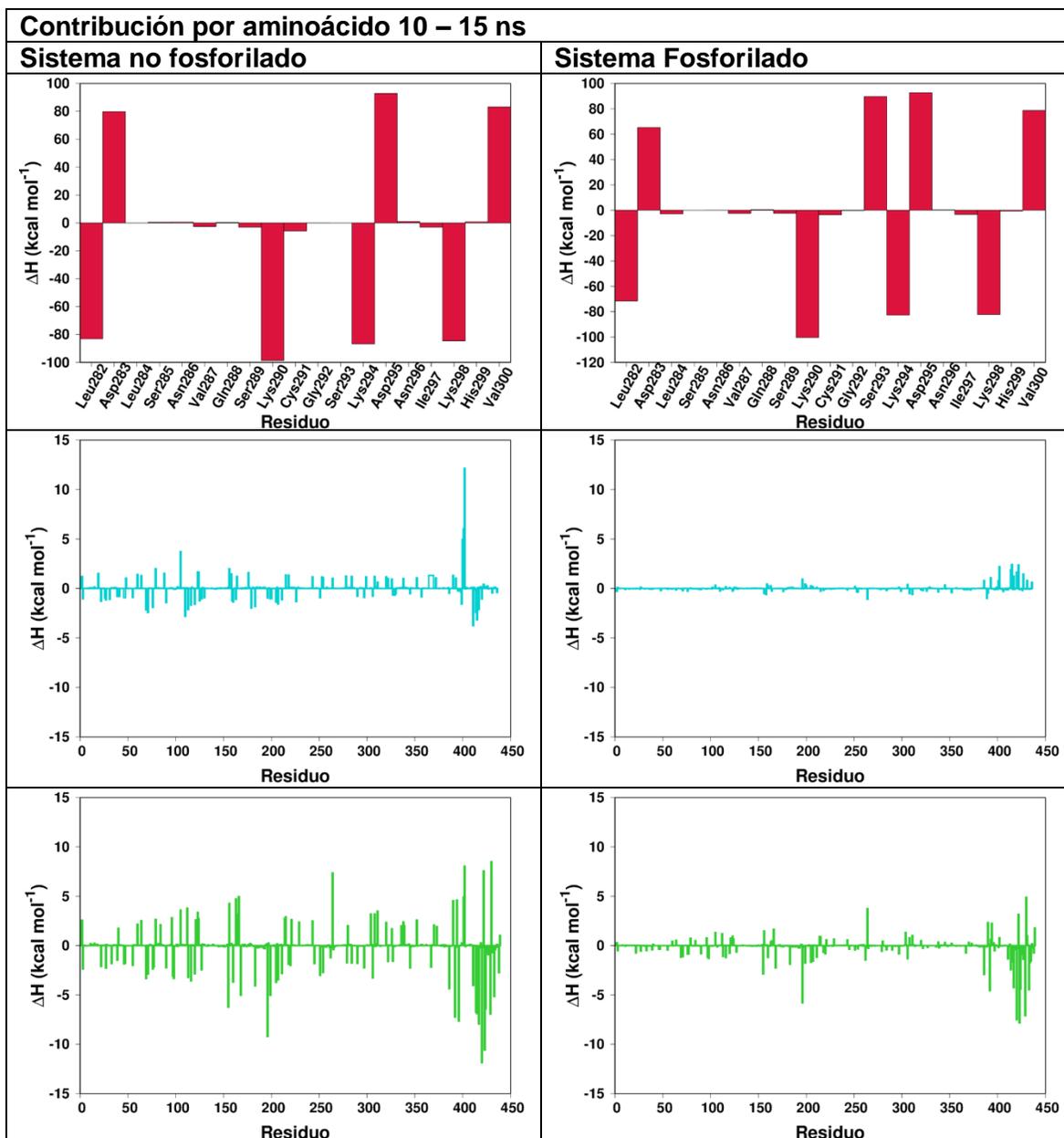


Figura 10.3. Contribución energética por aminoácido en cada uno de los componentes del sistema en un intervalo de 10-15 ns. De arriba hacia abajo se presenta: la proteína Tau,  $\beta$ T y  $\alpha$ T.

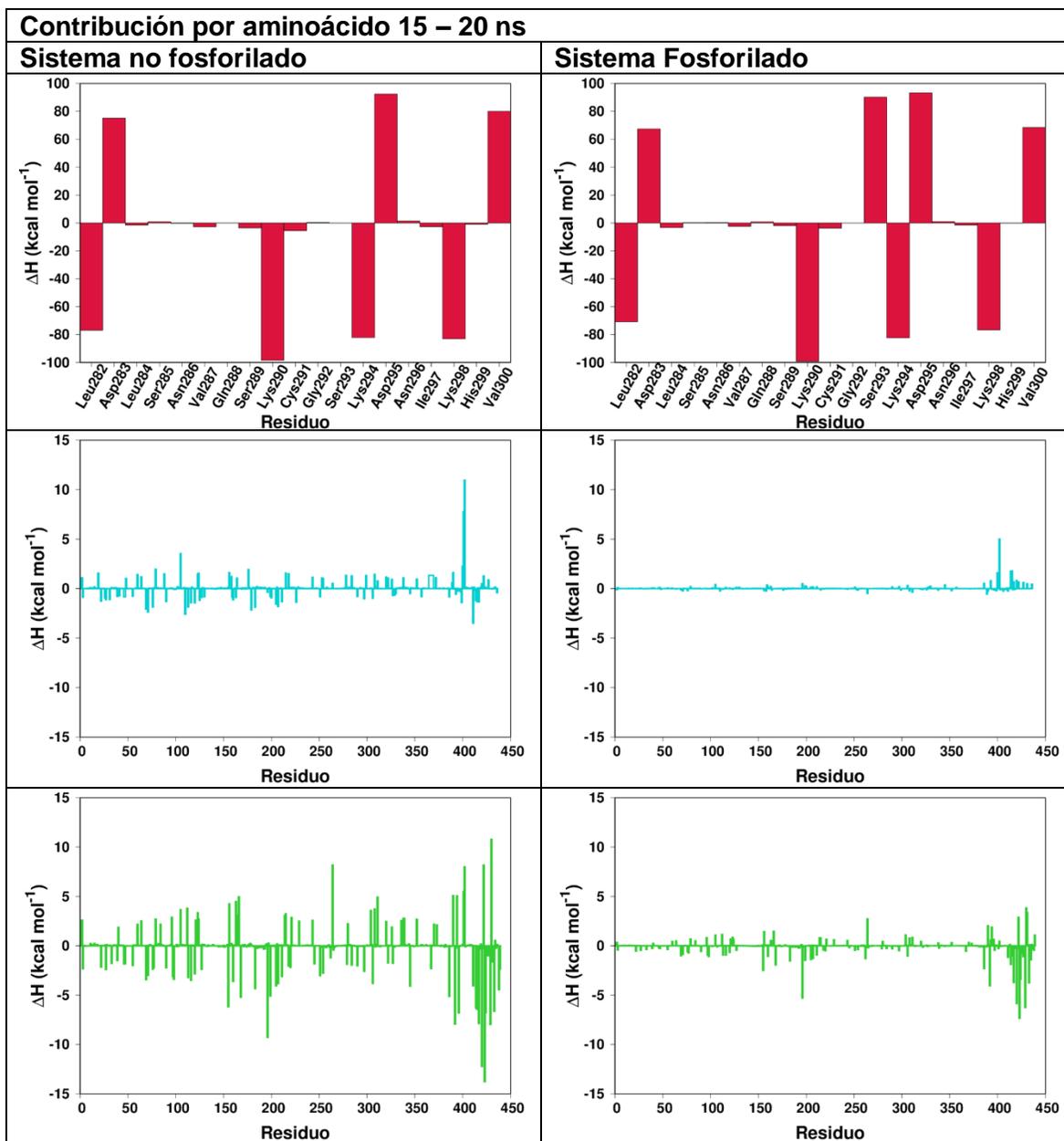


Figura 10.4. Contribución energética por aminoácido en cada uno de los componentes del sistema en un intervalo de 15-20 ns. De arriba hacia abajo se presenta: la proteína Tau,  $\beta$ T y  $\alpha$ T.

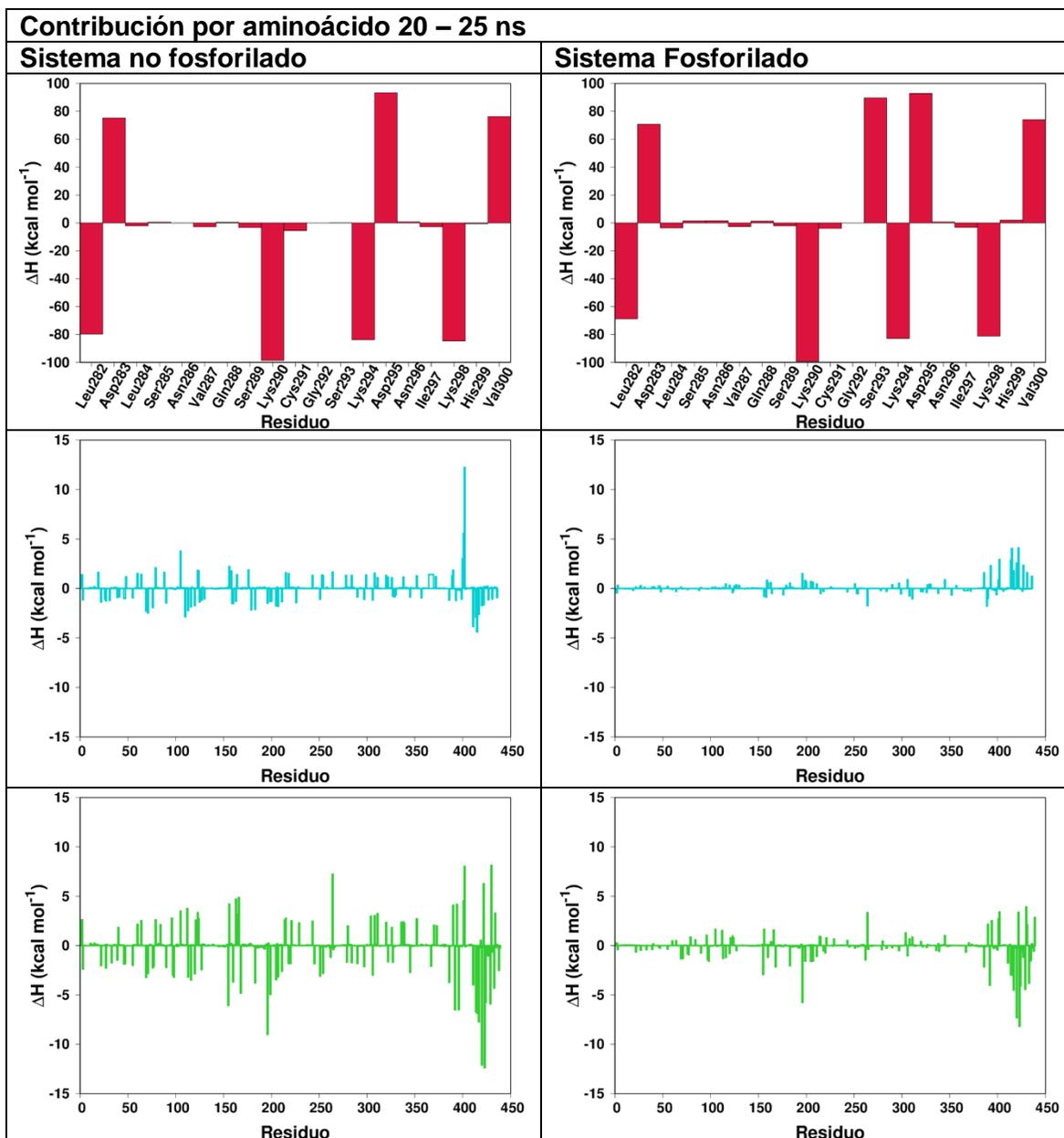


Figura 10.5. Contribución energética por aminoácido en cada uno de los componentes del sistema en un intervalo de 20-25 ns. De arriba hacia abajo se presenta: la proteína Tau,  $\beta$ T y  $\alpha$ T.

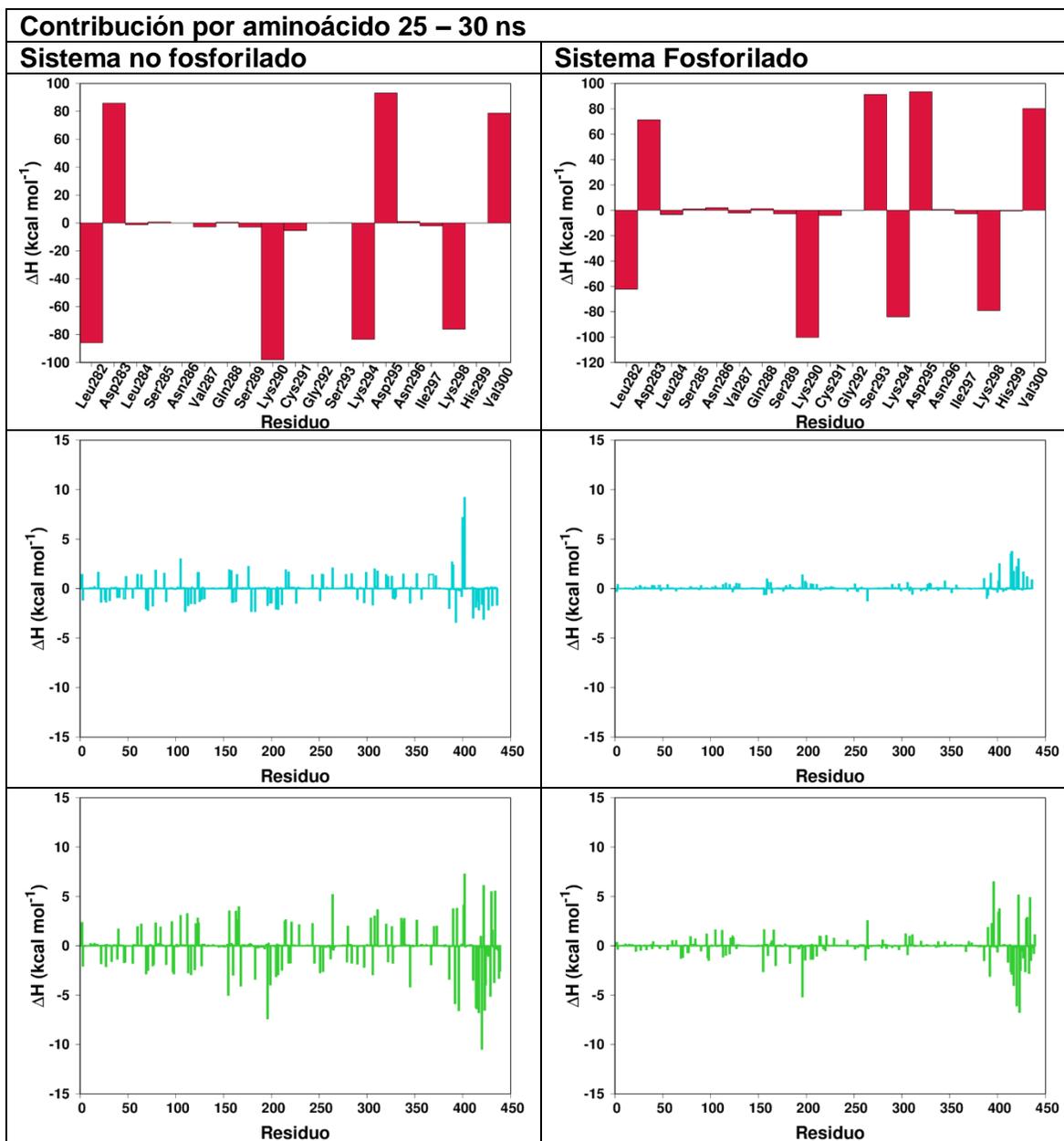


Figura 10.6. Contribución energética por aminoácido en cada uno de los componentes del sistema en un intervalo de 25-30 ns. De arriba hacia abajo se presenta: la proteína Tau,  $\beta$ T y  $\alpha$ T.