

ESTUDIO TEÓRICO DE LA FORMACIÓN DE DÍMEROS A PARTIR DE  
(50-56) $\beta$ -2-MICROGLOBULINA

DEISY YURLEY RODRÍGUEZ SARMIENTO

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA

2011

ESTUDIO TEÓRICO DE LA FORMACIÓN DE DÍMEROS A PARTIR DE  
(50-56) $\beta$ -2MICROGLOBULINA

DEISY YURLEY RODRÍGUEZ SARMIENTO

Trabajo de grado para obtener el título de  
QUÍMICA

Director

CRISTIAN BLANCO TIRADO

Químico PhD.

Codirector

MARIO ALBERTO BARÓN RODRÍGUEZ

Químico

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2011

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, porque simplemente sin Él no sería la persona y la profesional que soy hoy.

A mi familia, que a su manera lograron motivarme para ser una excelente persona y una profesional. En especial a mi tío Orlando y mi hermana Ludy que siempre tuvieron palabras de apoyo cuando las necesité.

A mi familia GIFTEX, en especial a Mario Barón, por su gran ayuda en la dirección de este trabajo, al profesor Cristian Blanco por ser la cabeza de este proyecto y brindarnos días que serán inolvidables. A Juliana, Yorguin, Laurita, Sonia, Jorge, Gato, Cesar y Luisa que hacían que el trabajo en el laboratorio fuera verdaderamente agradable, y junto con ellos me llevo gratos recuerdos.

A mis grandes amigas, Sese por siempre estar ahí dándome una palabra de apoyo. Tere por ser tan excelente amiga y escucharme cuando tenía un mundo de palabras por decir, Adriana por enseñarme lo que es una amistad sincera y finalmente a mi Andre; para ella no tengo palabras que describan todo lo que significa para mi, solo puedo decirle de todo corazón, Gracias!

A mis compañeros de carrera que hicieron de mi estadía en la UIS, una parte de mi vida super divertida e inolvidable, en especial quiero agradecerle a Marcela Domínguez, Andrés Rueda, Jorge Ardila, Jeny Chiqui, Diana Chiqui, Pili, Lelys, Mayra Albarracín, Jorge Rodríguez, Bochis, Raúl, Pollo en fin a todos los que me alegraron la vida en algún momento.

Finalmente a tres grandes amigos de toda la vida, Nando, Yeizon y Gherson los cuales siempre estuvieron apoyándome, dándome consejos y creyendo en mi.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>16</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
<b>1. MARCO TEÓRICO</b>	<b>19</b>
1.1 Amiloidosis	19
1.1.1 Amiloidosis Relacionada con Diálisis	19
1.2 $\beta$ -2Microglobulina	19
1.2.1 Forma Estructural	19
1.2.2 Forma Funcional	20
1.3 Interacciones no Covalentes	21
1.3.1 Interacciones Electrostáticas	21
1.3.2 Puentes de Hidrógeno	22
1.3.3 Interacciones de Van der Waals	23
1.4 Herramientas Computacionales	23
1.4.1 Docking Molecular	23
ZDOCK	24
1.4.2 pKa aminoácidos	24
PROPKA	25
1.4.3 Campo de Fuerza	25
AMBER94	25
1.4.4 Dinámica Molecular	26
GROMACS	26
Función Energía Libre	27
Puentes de Hidrógeno	30
Área Superficial Accesible al Solvente - ASAS	31
<b>2 ESTADO DEL ARTE</b>	<b>33</b>
<b>3 METODOLOGÍA</b>	<b>39</b>

3.1 Selección de estructuras de partida	39
3.1.1 Estructura Flexible	39
3.1.2 Estructura Rígida	40
3.2 Docking Molecular	42
3.3 Optimización de Estructuras	42
3.4 Cálculo de pKa	42
3.5 Dinámica Molecular	43
3.5 Cálculo de Propiedades Fisicoquímicas	43
<b>4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>44</b>
4.1 Dímero formado a pH 5	44
4.1.1 Docking Molecular	44
4.1.2 Cálculo de pKa	46
4.1.3 Dinámica Molecular	48
4.2 Dímero formado a pH 7	55
4.2.1 Docking Molecular	55
4.2.2 Cálculo de pKa	57
4.2.3 Dinámica Molecular	59
4.3 Validación de Resultados	66
<b>5 CONCLUSIONES</b>	<b>67</b>
<b>6 RECOMENDACIONES</b>	<b>68</b>
<b>7 ANEXOS</b>	<b>69</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>72</b>

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tablas 1.</b> Energía potencial de cada uno de los dímeros obtenidos a pH 5	<b>45</b>
<b>Tabla 2.</b> pKa Teórico y Calculado de cada uno de los aminoácidos que conforman el péptido de estudio a pH 5	<b>47</b>
<b>Tabla 3.</b> pKa calculados y teóricos para cada uno de los aminoácidos con cadena lateral ionizables dentro del péptido de estudio a pH 5	<b>47</b>
<b>Tabla 4.</b> pKa Teórico y Calculado de cada uno de los aminoácidos que conforman el péptido de estudio a pH 7	<b>49</b>
<b>Tabla 5.</b> pKa calculados y teóricos para cada uno de los aminoácidos con cadena lateral ionizables dentro del péptido de estudio a pH 5	<b>50</b>
<b>Tabla 6.</b> Desviación media cuadrática de los dímeros obtenidos de dinámica a pH 5	<b>52</b>
<b>Tabla 7.</b> Ubicación de los puentes de hidrógeno formados por los dímeros flexibles a pH 5	<b>56</b>
<b>Tabla 8.</b> Ubicación de los puentes de hidrógeno formados por los dímeros rígidos a pH 7	<b>58</b>
<b>Tabla 9.</b> Energía potencial de cada uno de los dímeros obtenidos a pH 7	<b>58</b>
<b>Tabla 10.</b> Desviación media cuadrática de los dímeros obtenidos de dinámica a pH 7	<b>60</b>
<b>Tabla 11.</b> Ubicación de los puentes de hidrógeno formados por los dímeros flexibles a pH 7	<b>61</b>
<b>Tabla 12.</b> Ubicación de los puentes de hidrógeno formados por los dímeros rígidos a pH 7	<b>63</b>

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura terciaria de la $\beta$ 2m código <i>Protein Data Bank</i> 1DUZ <sup>[22]</sup>	<b>20</b>
<b>Figura 2.</b> Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH-I) código <i>Protein Data Bank</i> 1DUZ <sup>[19]</sup> . En azul la $\beta$ 2m.	<b>21</b>
<b>Figura 3.</b> Esquema de interacción electrostática	<b>21</b>
<b>Figura 4.</b> Esquema general de un puente de hidrógeno	<b>22</b>
<b>Figura 5.</b> Energía de interacción de Van der Waals en función de la distancia entre dos átomos	<b>23</b>
<b>Figura 6.</b> Ciclos de energía libre. A. Cálculo de $\Delta G_{12}$ , la diferencia de energía libre entre el inhibidor <b>I</b> y la enzima <b>E</b> y <b>E'</b> . B. Cálculo de $\Delta G_{12}$ , la diferencia de energía libre entre inhibidores <b>I</b> e <b>I'</b> hacia la enzima <b>E</b> <sup>[36]</sup>	<b>28</b>
<b>Figura 7.</b> Criterio geométrico de los puentes de hidrógeno <sup>[37]</sup>	<b>30</b>
<b>Figura 8.</b> Representación área superficial de Conolly	<b>32</b>
<b>Figura 9.</b> Esquema general del proceso de amilodosis relacionada a diálisis <sup>[40]</sup>	<b>34</b>
<b>Figura 10.</b> Estructura de $\beta$ 2m, resaltando la secuencia NHVTL SQ	<b>36</b>
<b>Figura 11.</b> Imágenes de microscopia electrónica. C) Heptapéptido de $r\beta$ 2m, no se presentan fibras aún cuando se somete a condiciones favorables para su formación. E) Heptapéptido de $h\beta$ 2m, formación de fibras de material amiloide. <sup>[15]</sup>	<b>36</b>
<b>Figura 12.</b> a) Conformación mayormente poblada del dímero formado por la secuencia NHVTL SQ de $h\beta$ 2m. b) Conformación mayormente poblada por la secuencia KHDSMAE de $r\beta$ 2m. c) Conformación mayormente poblada por la secuencia QVLHTSN de $h\beta$ 2m <sup>[45]</sup>	<b>37</b>
<b>Figura 13.</b> Modelo de formación del dímero. Se observa la interacción D-D <sup>[16]</sup>	<b>38</b>
<b>Figura 14.</b> Interacción detallada de los aminoácidos implicados en la formación del dímero de $\beta$ 2m. Se resaltan los aminoácidos Glu50 – Lys58 <sup>[23]</sup>	<b>38</b>
<b>Figura 15.</b> A) Modelo más representativo de la estructura optimizada	<b>40</b>

del heptapéptido (Aguamarina) y su estructura nativa (Rosa), Energía potencial =  $-1,2378 \cdot 10^5$  kJ, carga neta de -1 y desviación del *backbone* r.m.s. = 2.035Å entre el monómero obtenido de docking y el monómero de la proteína nativa.

**Figura 16.A)** Modelo más representativo de la estructura optimizada del heptapéptido (Verde) y su estructura nativa (Rosa).Energía potencial =  $-1,2925 \cdot 10^4$ kJ , carga neta de -2 y desviación del *backbone* r.m.s. = 0.948Å entre el monómero obtenido de docking y el monómero de la proteína nativa **40**

**Figura 17. A)** Modelo más representativo de la estructura optimizada del heptapéptido (Azul) y su estructura nativa (Aguamarina). Energía potencial =  $-1.2618 \cdot 10^5$  kJ carga neta de -1 y desviación del *backbone* r.m.s. = 0.113Å entre el monómero obtenido de docking y el monómero de la proteína **41**

**Figura 18A)** Modelo más representativo de la estructura optimizada del heptapéptido (Naranja) y su estructura nativa (Aguamarina).Energía potencial =  $-1.2426 \cdot 10^4$ kJ carga neta de -2 y desviación del *backbone* r.m.s. = 0.098Å entre el monómero obtenido de docking y el monómero de la proteína **41**

**Figura 19.A,B y C** representan los modelos más representativos de las conformaciones flexibles. A corresponde a 5 conformaciones, B a 4 conformaciones y C a 1 conformación. Los modelos D,E y F representan las conformaciones rígidas, donde D representa a 5 conformaciones, E a 4 conformaciones y F a 1 conformación. **44**

**Figura 20.**Conformaciones con la más baja energía en cada uno de los modelos más representativos, tanto en condiciones flexibles (A), como en condiciones rígidas (B). **46**

**Figura 21.A,B y C** representan los modelos más representativos de las conformaciones flexibles. A corresponde a 5 conformaciones, B a 4 conformaciones y C a 1 conformación. Los modelos D,E y F representan las conformaciones rígidas, donde D representa a 4 conformaciones, E a 4 conformaciones y F a 2 conformaciones. **48**

**Figura 22.**Puentes de hidrógeno (A) y energía potencial (B) de cada **50**

conformación en condiciones flexibles.	
<b>Figura 23.</b> Formación de uno de los puentes de hidrógeno más representativos (HD23:Leu5 <sub>A</sub> – O:Glu8 <sub>B</sub> en la conformación del modelo B)	<b>51</b>
<b>Figura 24.</b> Puentes de hidrógeno (A) y energía potencial (B) de cada conformación en condiciones rígidas	<b>52</b>
<b>Figura 25.</b> Formación de uno de los puentes de hidrógeno más representativos (OC2:Phe7 <sub>A</sub> – HB2:Leu12 <sub>B</sub> en la conformación del modelo E).	<b>53</b>
<b>Figura 26.A.</b> Representación gráfica de ASAS de cada uno de los dímeros a pH 5 bajo condiciones flexibles. <b>Azul:</b> ASAS del péptido A. <b>Rojo:</b> ASAS del péptido B. <b>Verde:</b> ASAS del dímero formado. <b>B.</b> Comportamiento del área superficial del monómero a pH5 bajo condiciones flexibles, a lo largo de los 5ns de dinámica.	<b>53</b>
<b>Figura 27. A.</b> Representación gráfica de ASAS de cada uno de los dímeros a pH 5 bajo condiciones rígidas. <b>Azul:</b> ASAS del péptido A. <b>Rojo:</b> ASAS del péptido B. <b>Verde:</b> ASAS del dímero formado. <b>B.</b> Comportamiento del área superficial del monómero a pH5 bajo condiciones rígidas, a lo largo de los 5ns de dinámica.	<b>54</b>
<b>Figura 28.</b> Comparación de energía libre de enlace de las conformaciones en condiciones flexibles (azul) y las conformaciones en condiciones rígidas (rojo).	<b>55</b>
<b>Figura 29.</b> A,B y C representan los modelos más representativos de las conformaciones flexibles. A corresponde a 5 conformaciones, B a 3 conformaciones y C a 2 conformaciones. Los modelos D,E y F representan las conformaciones rígidas, donde D representa a 4 conformaciones, E a 3 conformaciones y F a 3 conformaciones.	<b>56</b>
<b>Figura 30.</b> Conformaciones con la más baja energía en cada uno de los modelos mas representativos, tanto en condiciones flexibles (A), como en condiciones rígidas (B).	<b>57</b>
<b>Figura 31.</b> A,B y C representan los modelos más representativos de las conformaciones flexibles. A corresponde a 5 conformaciones, B a 3 conformaciones y C a 2 conformaciones. Los modelos D,E y F	<b>59</b>

representan las conformaciones rígidas, donde D representa a 4 conformaciones, E a 3 conformaciones y F a 3 conformaciones

**Figura 32.** Puentes de hidrógeno (A) y energía potencial (B) de cada conformación en condiciones flexibles. **61**

**Figura 33.** Formación de uno de los puentes de hidrógeno más representativos (HE2:Phe7<sub>A</sub> – ND1:His9<sub>B</sub> en la conformación del modelo A). **62**

**Figura 34.** Puentes de hidrógeno (A) y energía potencial (B) de cada conformación en condiciones rígidas **62**

**Figura 35.** Formación de uno de los puentes de hidrógeno más representativos (O:Leu5<sub>A</sub> – H:Ser10<sub>B</sub> en la conformación del modelo D). **63**

**Figura 36. A.** Representación gráfica de ASAS de cada uno de los dímeros bajo condiciones flexibles. **Azul:** ASAS del péptido A. **Rojo:** ASAS del péptido B. **Verde:** ASAS del dímero formado. **B.** Comportamiento del área superficial del monómero a pH7 bajo condiciones flexibles, a lo largo de los 5ns de dinámica. **64**

**Figura 37. A.** Representación gráfica de ASAS de cada uno de los dímeros bajo condiciones rígidas. **Azul:** ASAS del péptido A. **Rojo:** ASAS del péptido B. **Verde:** ASAS del dímero formado. **B.** Comportamiento del área superficial del monómero a pH7 bajo condiciones rígidas, a lo largo de los 5ns de dinámica. **65**

**Figura 38.** Comparación de energía libre de enlace de las conformaciones flexibles (A) y las conformaciones rígidas (B). **65**

## LISTA DE ANEXOS

1. Valores obtenidos de energía libre de Gibbs de las conformaciones trabajadas a pH 5	<b>69</b>
2. Valores obtenidos de energía libre de Gibbs de las conformaciones trabajadas a pH 7	<b>69</b>
3. Valores obtenidos $\Delta H$ para los dímeros trabajados a pH 5	<b>70</b>
4. Valores obtenidos $\Delta S$ para los dímeros trabajados a pH 5	<b>70</b>
5. Valores obtenidos $\Delta H$ para los dímeros trabajados a pH 7	<b>71</b>
6. Valores obtenidos $\Delta S$ para los dímeros trabajados a pH 7	<b>71</b>

## RESUMEN

**TÍTULO:** ESTUDIO TEÓRICO DE LA FORMACIÓN DE DÍMEROS A PARTIR DE (50-56) $\beta$ 2-MICROGLOBULINA\*

**AUTOR:** DEISY YURLEY RODRÍGUEZ SARMIENTO, MARIO A. BARÓN-RODRÍGUEZ, CRISTIAN BLANCO TIRADO\*\*

**PALABRAS CLAVES:** AMILOIDOSIS,  $\beta$ 2-MICROGLOBULINA, DINÁMICA MOLECULAR, PEPTIDOS AMILOIDOGENICOS.

## DESCRIPCIÓN

La  $\beta$ 2-microglobulina es una proteína que forma material amiloide en pacientes con deficiencia renal, sometidos a largos tratamientos de diálisis. Durante el proceso de oligomerización de la proteína se observa en la primera etapa, la formación de dímeros de  $\beta$ 2m. Basados en estudios realizados por Miranker y colaboradores en los que la  $\beta$ 2m-P32A, muestra en la interfaz del dímero formado por dos monómeros de  $\beta$ 2m, la interacción entre los heptapéptidos formados por los aminoácidos Glu50 – Phe56.

Con esto en mente se decidió realizar un estudio teórico mediante el cual se realizó inicialmente un análisis de docking molecular, obteniendo las conformaciones más estables de dicho dímero.

Posteriormente un estudio de dinámica molecular, mostró que efectivamente este heptapéptido tenía la capacidad de formar aglomerados, esto ayudado con el hecho que los heptapéptidos en las conformaciones más estables se encontraban en posiciones antiparalelas, y posteriormente el análisis del área superficial accesible al solvente mostró que el área del monómero del heptapéptido disminuía a medida que el dímero iba siendo formado, esto indicando que los monómeros se agrupaban permitiendo la formación de puentes de hidrógeno, los cuales se observaron entre los aminoácidos Leu54(Heptapéptido 1) y Phe56(Heptapéptido 2). En este estudio también se analizó la energía libre de Gibbs observando que este proceso de presenta de manera espontánea.

\*Proyecto de grado

\*\*Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Director Dr. Cristian Blanco Tirado

## ABSTRACT

**TITLE:**  $\beta$ 2-MICROGLOBULIN SEGMENT FORMS DIMER WHICH RESEMBLES NATIVE PROTEIN AGGREGATES

**AUTOR:** DEISY YURLEY RODRÍGUEZ SARMIENTO, MARIO A. BARÓN RODRÍGUEZ, CRISTIAN BLANCO TIRADO.

**KEYWORDS:** AMYLOIDOSIS,  $\beta$ -2-MICROGLOBULIN, MOLECULAR DYNAMICS, PEPTIDES AMYLOIDOGENICS

## DESCRIPTION

$\beta$ 2-microglobulin forms amyloid fibers in patients with chronic renal disease. It has been shown that precipitation of proteins starts by formation of dimers, followed by tetramers, then hexamers before nucleation of these subunits. Miranker and coworkers suggested that the first interaction between the dimers takes place among the Glu50-Phe56 amino acids of each monomer, however it is unclear the microscopic mechanism by which both protein units assembled together. In this work we would like to shed light on this issue by using molecular simulations.

We carried out docking simulations to ascertain how two Glu50-Phe56 subunits of  $\beta$ 2-m aggregate. Several conformations with higher docking scores were refined using molecular dynamics and compared with structural data from experiments of  $\beta$ 2-m dimers.

We found that antiparallel conformations are the most stable. Formation of dimers is in general spontaneous, which give credence to the idea that strong nonbonding interactions play an important role in formation of amyloids. In particular we found that interactions between Leu54 and Phe56 strongly stabilized antiparallel conformations. On the other hand, the solvent accessible surface area data show the decrease area while the dimer was formed, in excellent agreement with previous experimental results.

\*Degree project

\*\* Universidad Industrial de Santander, Department of Chemistry, Director Dr. Cristian Blanco Tirado.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente, existen más de 20 enfermedades incluyendo el Alzheimer, Parkinson y la enfermedad Prion causadas por aglomeración de proteínas. A este proceso de formación de fibras se ha dado el nombre de Amiloidosis<sup>1-3</sup>. En la amiloidosis inducida por largos tratamientos de diálisis, (DRA por sus siglas en inglés: *Dyalisis Related Amyloidosis*), el material amiloide está formado principalmente por beta-2-microglobulina<sup>4</sup> la cual precipita en el sistema musculoesquelético de pacientes con deficiencia renal crónica.<sup>5</sup> La  $\beta$ 2m en condiciones normales es liberada del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I y llevada a los riñones para ser degradada.<sup>6</sup> Cuando la falla renal aparece, la proteína soluble se agrega formando material amiloide, el cual es depositado causando dolencias como inflamación de las articulaciones y la enfermedad del túnel de Carpio<sup>4</sup>. La formación del material amiloide inicia con la formación de fibras, las cuales son agregados de proteína que se forman normalmente en condiciones fisiológicas cuando el cobre divalente está presente<sup>7</sup> o cuando existe determinado segmento de proteína, que facilita la formación de aglomerados. *In vitro* este proceso sucede bajo condiciones ácidas de pH<sup>8</sup>.

La primera etapa de la formación de fibras amiloides es la coordinación del Cu(II) en la  $\beta$ 2m, el cual se encuentra principalmente en las membranas de la diálisis<sup>7</sup>. Estudios de RMN mostraron que el Cu(II) se coordina principalmente con las histidinas (His13 e His31)<sup>10</sup>. Este complejo es el inicio de la polimerización de la proteína, por adiciones sucesivas de unidades que forman dímeros, tetrámeros, hexámeros hasta lograr la formación completa de las fibras<sup>9</sup>.

Otro factor importante es la evidencia de secuencias específicas de aminoácidos que juegan un papel fundamental en la amiloidogénesis de la  $\beta$ 2m. Tres segmentos de  $\beta$ 2m inducen la formación de fibras aun cuando estos fueron totalmente aislados; la Ser20-Lys41<sup>11</sup>, Asp59-Thr71<sup>12</sup> y Pro72-Met99<sup>13</sup>. La observación que pequeños péptidos pueden formar fibras<sup>14</sup> sugiere que la

proteína expuesta a algunos péptidos, segmentos de la misma, pueden iniciar un proceso de nucleación para generar material amiloide<sup>15</sup>.

Miranker y colaboradores<sup>16</sup>, realizaron un estudio con  $\beta$ 2m P32A (cambiaron Pro32 por Ala) y observaron que en la interfaz del dímero formado se encontraba el segmento Glu50-Phe56 de la  $\beta$ 2m. Evidenciando la interacción inicial de segmentos antes de la conformación final del dímero.

En este trabajo, con la finalidad de contribuir al entendimiento de las bases moleculares de la formación del dímero, se realizaron simulaciones de dinámica molecular con la secuencia Glu50-Phe56. A su vez, se evaluaron diferentes conformaciones, energías y áreas superficiales asociadas los dímeros formados. Entender el mecanismo de formación de material amiloide ayudará, en principio, a explicar este fenómeno biológico y probablemente a desarrollar estrategias para diseños de procedimientos o fármacos que controlen esta patología.

## OBJETIVOS

### General

- Estudiar la formación del dímero Glu50-Phe56 de  $\beta$ 2m mediante simulaciones de mecánica molecular.

### Específicos

- Determinar la conformación más estable del heptapéptido Glu50-Phe56 de  $\beta$ 2m
- Determinar las conformaciones del dímero formado mediante simulaciones de docking y dinámica molecular
- Evaluar las características del dímero formado, tales como: estabilidad, espontaneidad, energía total del sistema, puentes de hidrógeno, pKa y área superficial accesible al solvente

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Amiloidosis

Es un grupo de enfermedades causadas por la deposición anormal de proteínas. A este depósito se le denomina material o fibra amiloide<sup>17</sup> y está formado por la acumulación de unidades de proteínas de bajo peso molecular (5 a 25 KDa)<sup>18</sup>. Las proteínas amiloides pueden ser depositadas en áreas localizadas y no representar ningún riesgo o solamente afectar un determinado tejido en el organismo, este tipo de amiloidosis es llamada “amiloidosis localizada”. El tipo de amiloidosis que afecta varios tejidos del cuerpo simultáneamente se denomina “amiloidosis sistémica”, esta a su vez causa cambios serios en los tejidos que han sido involucrados<sup>19</sup>.

#### 1.1.1 Amiloidosis relacionada con largos tratamientos de diálisis (DRA)

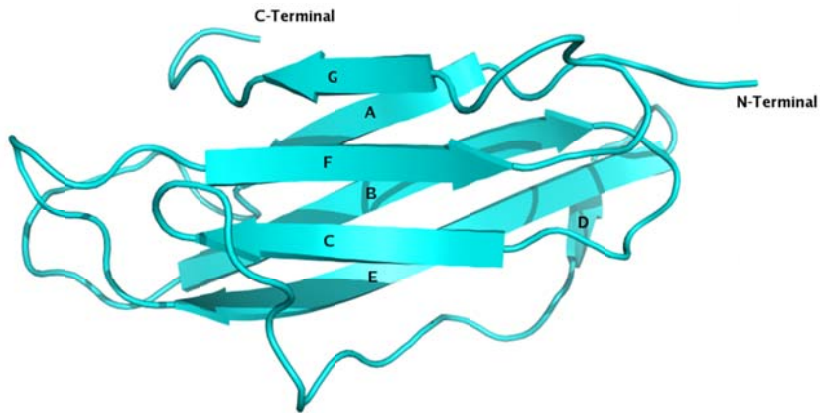
La amiloidosis inducida por diálisis es una patología en la cual la proteína  $\beta$ 2-microglobulina forma material amiloide causando dolencias<sup>4</sup>, como inflamación en las articulaciones e efecto de túnel de Carpio<sup>18</sup>.

En la actualidad el procedimiento clínico que se realiza en casos de insuficiencia renal, es el trasplante de riñón, esto en casos donde la enfermedad ha avanzado lo suficiente como para degradar por completo este órgano. Por tanto la única opción en pacientes con problemas cardiovasculares o de avanzada edad es el desarrollo de nuevos procedimientos o fármacos que permitan controlar esta patología en estadios tempranos.

### 1.2 $\beta$ 2-Microglobulina

#### 1.2.1 Forma Estructural

La  $\beta$ 2-microglobulina ( $\beta$ 2m) es una proteína globular que contiene en su estructura primaria una secuencia de 99 aminoácidos, estos a su vez se pliegan para dar forma a su estructura secundaria de 7 hojas plegadas tipo  $\beta$  (Hebras A,B,C,D,E,F,G).



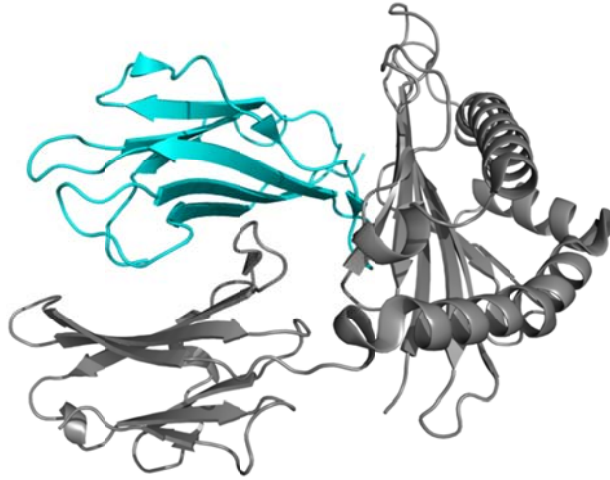
**Fig 1.** Estructura terciaria de la  $\beta 2m$

La estructura terciaria de la  $\beta 2m$  está conformada principalmente por 2 hojas plegadas tipo  $\beta$  de diferente tamaño, la hoja de mayor tamaño está conformada por las hojas A,B,D,E, y la hoja de menor tamaño por C, F,G. Esta estructura es altamente estabilizada por la presencia de un puente disulfuro entre la Cys25 y Cys80<sup>21</sup>.

### 1.2.2 Forma Funcional

La  $\beta 2m$  tiene un peso aproximado de 12KDa, está expresada en la superficie de todas las células, esto debido a que se une de manera no covalente con el Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo I<sup>21</sup> que a su vez está conformado por diferentes proteínas que ayudan en el reconocimiento de agentes patógenos en el organismo para luego ser eliminados<sup>22</sup>.

El MHC-I se encuentra en la superficie celular, principalmente en los linfocitos, también en sangre y orina, en pequeñas cantidades. Cuando existe una falla renal, los niveles normales de  $\beta 2m$  (0.1  $\mu M$ ) aumentan casi 60 veces, esta concentración. Aun así estas cantidades de  $\beta 2m$  no son suficientes para iniciar la formación de material amiloide<sup>23</sup>.



**Fig 2.** Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo I (MHC I).CodigoPDB: 1DUZ<sup>22</sup>, en azul la  $\beta 2m$ .

### 1.3 Interacciones No Covalentes

Las interacciones moleculares no covalentes son la esencia de la vida. Estas fuerzas no covalentes, de poca intensidad, ejercen papeles fundamentales en la replicación del ADN, en el plegamiento de proteínas, en el reconocimiento específico de determinadas enzimas hacia el sustrato o en la detección de moléculas señalizadoras. De hecho, todas las estructuras en procesos biológicos dependen tanto de interacciones covalentes y no covalentes. Existen cuatro tipos de interacciones no covalentes, estas son *Interacciones Electroestáticas*, *Puentes de Hidrógeno*, *Interacciones de Van der Waals*.<sup>24</sup>

#### 1.3.1 Interacciones Electroestáticas

Una interacción electrostática depende de las cargas eléctricas de los átomos.



**Fig 3.** Esquema de interacción electrostática

La energía de una interacción de este tipo viene dada por la Ley de Coulomb:

$$V = kq_1q_2/D_r$$

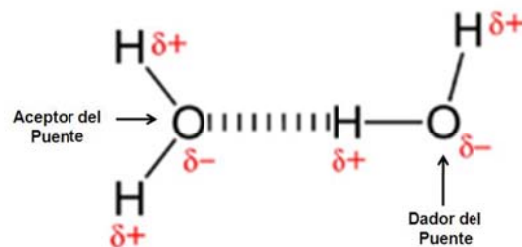
**Ec 1.** Ley de Coulomb

Donde,  $E$  es la energía,  $q_1$  y  $q_2$  las cargas de los dos átomos involucrados,  $r$  la distancia entre estos mismos,  $D$  la constante dieléctrica y  $k$  una constante de proporcionalidad<sup>24</sup>.

Las interacciones electrostáticas son de tres tipos: carga-carga, carga-dipolo y dipolo-dipolo. Las interacciones carga-carga favorecen altamente el plegamiento y estabilidad de las proteínas cuando las cadenas laterales de los aminoácidos se encuentran cargados. Las interacciones carga-dipolo se presentan cuando dichas cadenas laterales de los aminoácidos interactúan con el dipolo del agua.

### 1.3.2 Puentes de Hidrógeno

Los puentes de hidrógeno son interacciones electrostáticas relativamente débiles, pero son cruciales para macromoléculas biológicas, tales como el ADN o proteínas. Estas interacciones son las causantes de muchas de las propiedades del agua que hacen de ella un solvente especial. El átomo de hidrógeno en un puente es parcialmente compartido entre dos átomos relativamente electronegativos, tales como el nitrógeno o el oxígeno. En los puentes de hidrógeno se hace referencia al dador o aceptor de puentes, dador de puente se le denomina al átomo o grupo que se encuentra más fuertemente ligado al hidrógeno, y átomo o grupo aceptor de puente es aquel que se encuentra de manera más alejada del hidrógeno.



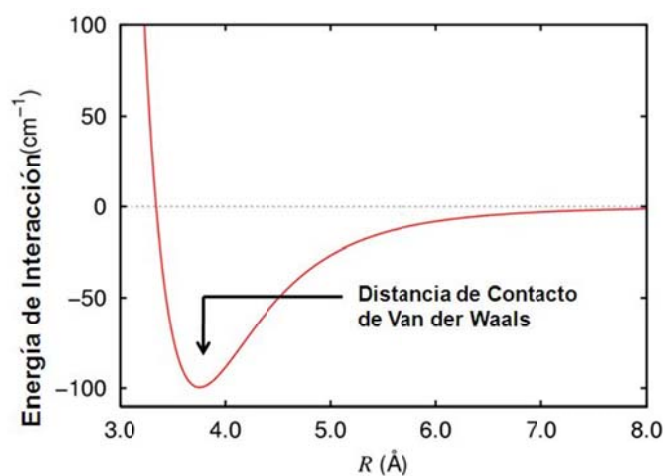
**Fig 4.** Esquema general de un puente de hidrógeno

Como se observa en la figura 4, los puentes de hidrógeno son fundamentalmente interacciones electrostáticas. El átomo relativamente electronegativo al cual el hidrógeno está unido por covalencia atrae gran parte de la densidad electrónica del hidrógeno causándole así, una carga parcial positiva ( $\delta+$ ) y dicho átomo queda con carga parcial negativa ( $\delta-$ ). En cuanto a

las energías y distancias de los puentes de hidrógeno, estos tienen una energía asociada de 1-3 kcal/mol y en una distancia aproximada de 1.5 – 3.0 Å<sup>24</sup>.

### 1.3.3 Interacciones de van der Waals

La base de las interacciones de van der Waals es que la distribución de carga electrónica en torno de un átomo cambia con el tiempo. En un instante dado, la distribución de cargas no es perfectamente simétrica. Esta asimetría temporal en la carga eléctrica alrededor de un átomo actúa a través de interacciones electrostáticas produciendo una asimetría en la distribución de los electrones en los alrededores de los átomos vecinos. La atracción resultante entre determinado par de átomos aumenta a medida que se acercan, hasta que estén separados por la distancia de contacto de van der Waals (ver Figura 5).



**Fig 5.** Energía de interacción de van der Waals en función de la distancia entre dos átomos.

Se observa que a una menor distancia, predominan las fuerzas de repulsión ya que las nubes externas de electrones se superponen.

Las energías asociadas a interacciones de van der Waals entre dos átomos son muy pequeñas (0.5 – 1.0 kcal/mol)<sup>24</sup>.

## 1.4 Herramientas Computacionales

### 1.4.1 Docking Molecular

La mayoría de procesos biológicos dependen de la habilidad de las moléculas para enlazar o rechazar entre una molécula u otra. La habilidad de formar complejos no covalentes es sumamente importante en interacciones de macromoléculas biológicas, estas asociaciones son esenciales para muchas funciones, e.g. catálisis, transporte, traducción de señales o en algunos casos enfermedades.

El docking entre proteínas es la predicción de la estructura 3D del complejo proteína – proteína a partir de las coordenadas de los componentes de su estructura.. En este proceso el complejo es separado y luego se une nuevamente. Al obtener los cambios conformacionales de las estructuras, estas son ligeramente refinadas hasta obtener un número pequeño de conformaciones las cuales son ordenadas por medio de funciones de energía que tienen en cuenta los previos cambios conformacionales<sup>26</sup>, el algoritmo utilizado generalmente es el de transformada de Fourier rápida<sup>27</sup>.

- **ZDOCK**

Para la formación de los dímeros del heptapéptido Glu50-Phe56, se utilizó el programa ZDOCK<sup>28</sup>. ZDOCK es una herramienta adecuada para predecir las posibles conformaciones del dímero, mediante un procedimiento conocido como *docking ciego* o *blind docking*<sup>28</sup>

#### **1.4.2 pK<sub>a</sub> de aminoácidos**

Es el pH en el cual los grupos ionizables de los aminoácidos cambian su estado de ionización, protonándose o desprotonándose. La mayoría de aminoácidos poseen solamente dos valores de pK<sub>a</sub>, equivalentes a los grupo carbonilo terminal y amino terminal. Existen a su vez siete aminoácidos que presentan grupos funcionales ionizables, los cuales poseen valores de pK<sub>a</sub>. Estos son cisteína, tirosina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, histidina.

Los efectos de solvatación y las interacciones dentro de las proteínas pueden causar variaciones en los valores de pK<sub>a</sub> de los grupos ionizables, esta propiedad está asociada a la naturaleza química de su entorno. Con base en esto, se ha desarrollado un programa que predecir los valores de pK<sub>a</sub>,

basándose en la ubicación espacial y entorno químico de los grupos ionizables<sup>29</sup>.

- **PROPKA**

Programa escrito en FORTRAN y diseñado para calcular el valor de pKa de los grupos ionizables, basado en las relaciones mencionadas anteriormente, en proteínas.

### 1.4.3 Campo de Fuerza

La mecánica molecular se encarga de buscar los cambios de energía potencial de una molécula, teniendo en cuenta todas las contribuciones que esta posee, tales como: estiramiento del enlace ( $V_{\text{ten}}$ ), flexión del ángulo de enlace ( $V_{\text{flex}}$ ), rotación interna en torno a los enlaces ( $V_{\text{tor}}$ ), atracciones y repulsiones de Van der Waals entre átomos no ligados ( $V_{\text{vdW}}$ ) e interacciones electrostáticas entre átomos ( $V_{\text{el}}$ ). La suma de cada una de estas interacciones (Ecuación 2) da como resultado la Energía Potencial de la mecánica molecular para el movimiento de los átomos en una molécula.

$$V = V_{\text{ten}} + V_{\text{flex}} + V_{\text{tor}} + V_{\text{vdW}} + V_{\text{el}}$$

**Ec 2.** Suma de las interacciones para la obtención de la energía potencial de una molécula

El conjunto de parámetros que definen cada una de estas ecuaciones se denomina *Campo de Fuerza*<sup>30</sup>, debido a que la derivada de estas ecuaciones con respecto a la posición determina las fuerzas sobre los átomos.

- **AMBER94**

El campo de fuerza AMBER94<sup>31</sup> fue validado para ser utilizado en sistemas biomoleculares. La función del potencial está dada por la ecuación:

$$E_{\text{Total}} = \sum_{\text{enlace}} K_r (r - r_{\text{eq}})^2 + \sum_{\text{angular}} K_{\theta} (\theta - \theta_{\text{eq}})^2 +$$

$$\sum_{\text{torcional}} \frac{V_r}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \sum_{i < j} \left[ \frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right]$$

**Ec 3.** *Función de energía del campo de fuerza AMBER94.*

Donde el primer término representa las energías de los enlaces;  $K_r$  es la constante y  $r_{eq}$  es la distancia de equilibrio del enlace. El segundo término representa la energía angular, donde  $K_\theta$  es la constante y  $\theta_{eq}$  es el ángulo de equilibrio entre tres átomos. El tercer término representa la energía de torsión, donde  $V_r$  es la componente de Fourier,  $\phi$  es el ángulo de torsión y  $\gamma$  es el factor de desfase. El último término incluye: i) las interacciones de vdW, donde  $A_{ij}$  y  $B_{ij}$  son parámetros de interacciones de repulsión y atracción, respectivamente,  $R_{ij}$  es la distancia interatómica. y ii) las interacciones electrostáticas, donde  $q$  es la carga puntual de cada átomo y  $\epsilon$  representa la constante dieléctrica del medio.

#### 1.4.4 Dinámica Molecular

Es una técnica de simulación en la que se permite la evolución de los átomos que constituyen el sistema molecular en función del tiempo, de acuerdo con las leyes de movimiento de Newton. La dinámica molecular permite el estudio de movimientos vibracionales y moleculares que se pueden relacionar con observables experimentales. La validez de los resultados de la dinámica molecular dependen de la calidad de los parámetros utilizados en el campo de fuerza.

Dichas simulaciones de dinámica molecular solucionan la ecuación (ecuación 4) de Newton para el movimiento de un sistema de  $N$  átomos.

$$m_i a_i = \partial^2 r_i / \partial t^2 = F_i, \quad i = 1 \dots N$$

**Ec 4.** *Segunda ley de Newton*

Por otro lado, las fuerzas son igual a la derivada negativa de una función de potencial  $V$  (ecuación 5) en función de las posiciones, e.g.  $V(r_1, r_2, \dots, r_N)$ .

$$F_i = -\partial V / \partial r_i$$

***Ec 5. Fórmula para calcular las fuerzas de los átomos con el potencial.***

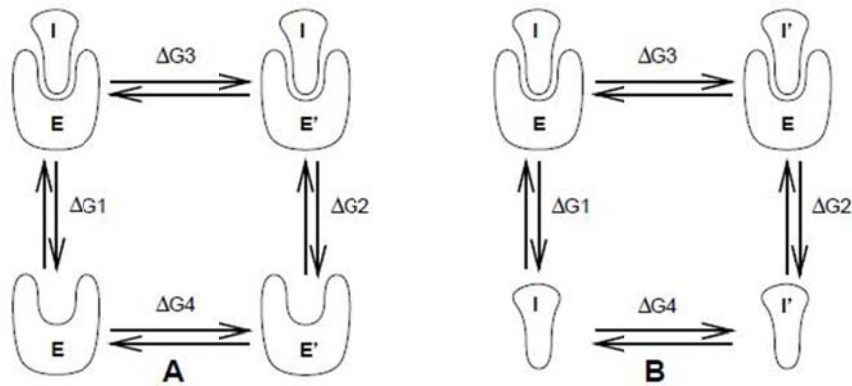
Estas ecuaciones son solucionadas simultáneamente con pasos de tiempo pequeños. El sistema es seguido por algún tiempo, teniendo en cuenta que la temperatura y la presión mantienen los valores requeridos. Las coordenadas en función del tiempo, son escritas en un archivo de salida en intervalos regulares y representan la trayectoria del sistema. Después de los cambios iniciales, el sistema usualmente llegara a un estado general de equilibrio. Calculando el promedio de las trayectorias en equilibrio, varias propiedades macroscópicas se pueden calcular.

- **GROMACS**

GROMACS<sup>33-36</sup> es un programa de alto rendimiento, de código abierto, multiplataforma, utilizado para realizar simulaciones de dinámica molecular de sistemas con cientos de miles de partículas. Fue originalmente diseñado en la universidad de Groningen, para biomoléculas; como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, que poseen un alto grado de complejidad en cuando a interacciones de tipo enlazantes. Actualmente, GROMACS ha venido mostrando un excelente desarrollo en interacciones de tipo no enlazante, convirtiendolo en una herramienta bastante útil en el análisis de otro tipo de materiales, como polímeros.

- **Función de Energía Libre.**

Las diferencias de energía libre entre dos diferentes especies moleculares pueden ser calculadas en GROMACS usando el método “slow-growth”<sup>37</sup>. De hecho, las diferencias de energía libre entre especies moleculares diferentes son físicamente medibles, pero se necesitan cantidades significativas para ser empleadas en un ciclo termodinámico. Como ejemplo se presenta el ciclo de energía libre entre un inhibidor **I** y una enzima **E**.



**Fig 6.** Ciclos de energía libre. **A:** Cálculo de  $\Delta G_{12}$ , la diferencia de energía libre entre el inhibidor **I** y la enzima **E** y **E'**. **B:** Cálculo de  $\Delta G_{12}$ , la diferencia de energía libre entre inhibidores **I** e **I'** hacia la enzima **E** (adaptado de 36).

El método requiere una simulación durante la cual el Hamiltoniano del sistema varíe suavemente de describir el sistema (A) a describir el sistema (B) (Figura 7). El cambio debe ser suave para que durante el proceso no se altere el equilibrio del sistema, si el proceso es reversible, el cambio de (A) a (B) arrojará los mismos resultados, pero con diferente signo.

La modificación requerida del Hamiltoniano  $H$  es realizada haciendo  $H$  una función dependiente del *parámetro de acoplamiento*  $\lambda$ :  $H = H(p,q;\lambda)$ , de tal manera que  $\lambda = 0$ , describe al sistema (A) y  $\lambda = 1$  describe el sistema (B) quedando:

$$H(p,q;0) = H^A(p,q) ; H(p,q;1) = H^B(p,q)$$

**Ec 6.** Hamiltoniano dependiente de  $\lambda$ .

En GROMACS, la dependencia de  $\lambda$  es diferente para cada campo de fuerza. La energía libre de Helmholtz  $A$  está relacionada a la función de partición  $Q$  de un ensamble canónico ( $N,V,T$ ), el cual se asume es el ensamble en equilibrio cuando la simulación se realiza a volumen y temperatura constante. Generalmente siempre se utiliza más la energía libre de Gibbs la cual se obtiene si se realizan las simulaciones con un ensamble donde se mantienen constantes la presión y la temperatura.

$$A(\lambda) = -k_B T \ln Q \quad \text{Ec 7.}$$

$$Q = c \iint \exp[-\beta H(p, q; \lambda)] dp dq \quad \text{Ec 8.}$$

$$G(\lambda) = -k_B T \ln \Delta \quad \text{Ec 9.}$$

$$\Delta = c \iiint \exp[-\beta H(p, q; \lambda) - \beta p V] dp dq dV \quad \text{Ec 10.}$$

$$G = A + pV \quad \text{Ec 11.}$$

**Ec (7-11):** Funciones de partición, de cada ensamble y la respectiva energía libre.

Donde,  $\beta = 1/(k_B T)$  y  $c = (N! h^{3N})^{-1}$ . Estas integrales sobre el espacio no pueden desarrollarse en una simulación, pero si es posible la evaluación de la derivada respecto a  $\lambda$  del promedio del ensamble:

$$dA/d\lambda = \iint (\partial H/\partial \lambda) \exp[-\beta H(p, q; \lambda)] dp dq / \iint \exp[-\beta H(p, q; \lambda)] dp dq$$

**Ec 12.** Derivada respecto a  $\lambda$

$$dA/d\lambda = \langle \partial H/\partial \lambda \rangle_{NVT; \lambda}$$

**Ec 13.** Derivada respecto a  $\lambda$  del promedio del ensamble

Existe una relación similar con  $dG/d\lambda$  en el ensamble  $N, p, T$ . La diferencia en la energía libre entre (A) y (B), se puede encontrar integrando la derivada sobre  $\lambda$ .

$$A^B(V, T) - A^A(V, T) = \int_{NVT; \lambda} d\lambda$$

**Ec 14.** Integral sobre la derivada respecto a  $\lambda$  en la energía libre de Helmholtz

$$G^B(p, T) - G^A(p, T) = \int_{NpT; \lambda} d\lambda$$

**Ec 15.** Integral sobre la derivada respecto a  $\lambda$  en la energía libre de Gibbs

Al calcular  $G^B(p, T) - G^A(p, T)$ , se debe realizar la simulación bajo condiciones isobáricas. Sin embargo, este valor se puede obtener también de una simulación “slow-growth” a volumen constante, iniciando en sistema (A) con presión  $p$  y volumen  $V$  constante y terminando con el sistema (B) con presión  $p_B$ . Para esto se debe aplicar la siguiente corrección:

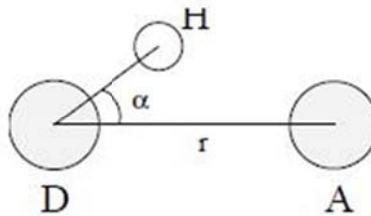
$$G^B(p) - G^A(p) = A^B(V) - A^A(V) - \int_{V^A(p)}^{V^B(p)} V dp'$$

**Ec 16.** Corrección para calcular energía libre de Gibbs

Se ha omitido la constante T de la notación. Esta corrección es aproximadamente igual a  $-1/2(p^B - p)\Delta V = (\Delta V)^2/(2kV)$ , donde  $\Delta V$  es el cambio de volumen, p y k son la compresibilidad isotérmica. Otro aspecto a tener en cuenta es que en coordenadas cartesianas, el término de energía cinética en el Hamiltoniano depende solamente del momento y puede ser integrado por partes y ser removida de las ecuaciones. Cuando las masas no cambian hay contribución de la energía cinética, de otro modo la contribución a la energía libre será de  $-3/2k_B T \ln(m^B/m^A)^{37}$ .

### ➤ Cálculo de Puentes de Hidrógeno

GROMACS utiliza el sub-programa *g\_hbond*, para analizar los puentes de hidrógeno entre todos los posibles donadores D y aceptores A<sup>37</sup>. Para determinar si un puente de hidrógeno existe se tienen en cuenta varios criterios geométricos.



**Fig 7.** Criterio geométrico de los puentes de hidrógeno (adaptado de 36).

Estos se basan principalmente en la distancia y en los ángulos (Figura 8).

$$r \leq r_{HB} = 0.35 \text{ nm}$$

$$\alpha \leq \alpha_{HB} = 30^\circ$$

El valor de  $r = 0.35$  corresponde al primer mínimo de la función de distribución radial para el agua. El sub-programa *g\_hbond* analiza los puentes de hidrógeno existentes de las siguientes maneras:

- Distribución de la distancia ( $r$ ) entre donadores y aceptores de los enlaces H
- Distribución de los ángulos ( $\alpha$ ) entre hidrógeno – donador – aceptor, de todos los enlaces H
- El número total de enlaces H en cada intervalo de tiempo
- El número de enlaces H en determinado tiempo entre los residuos, dividido entre los grupos  $n-n+i$ , donde  $n$  y  $n+i$  son el número de residuos e  $i$  va de 0 a 6. El grupo en el cual  $i = 6$  también incluye todos los enlaces H donde  $i > 6$ . Esos grupos también incluyen los enlaces H  $n - n+3$ ,  $n - n+4$ ,  $n - n+5$ , donde proveen una medida para la formación de  $\alpha$ -Hélices y Hojas  $\beta$ .
- El tiempo de vida de los enlaces H es calculado del promedio sobre todas las funciones de autocorrelación de las funciones existentes (también 0 y 1) de todos los enlaces H.

$$C(\tau) = \langle s_i(t) s_i(t + \tau) \rangle$$

*Ec 17. Ecuación para calcular el tiempo de vida de los enlaces H.*

Donde  $s_i(t) = \{0,1\}$  para un enlace H  $i$  en un tiempo  $t$ . La integral de  $C(\tau)$  da una estimación aproximada del tiempo de vida de un enlace H  $\tau_{HB}$ .

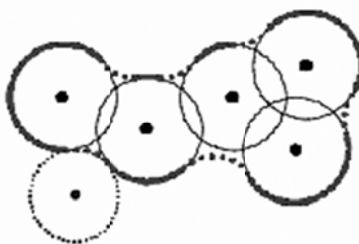
$$\tau_{HB} = \int_0^{\infty} C(\tau) d\tau$$

*Ec 18. Integral para calcular el tiempo de vida de un enlace H.*

- Un mapa de enlaces H, se puede graficar en dos dimensiones:  
*# Enlaces H \* # Intervalos de tiempo.*
- Los archivos de salida contienen la información de todos los grupos analizados. Todos los pares de átomos tanto donadores como aceptores de enlaces H.
- La influencia del solvente en el análisis de enlaces H puede ser analizada. En este caso se selecciona un grupo adicional que identifica el solvente que fue seleccionado.

➤ **Cálculo de área superficial accesible al solvente – ASAS**

GROMACS, se basa principalmente en el concepto de la superficie de Connolly el cual, en 1983, definida como la superficie delimitada al hacer rodar una esfera de radio  $r$  sobre la superficie de van der Waals, definida originalmente por Lee y Richards<sup>38</sup>. La superficie va quedando delimitada por el contacto entre la superficie de van der Waals de la molécula y la esfera, a su vez el radio de la esfera determina la forma y área de la superficie ya que mientras menor sea la esfera, mayor será el número de detalles detectados. Usualmente, se selecciona un radio de  $1.4\text{\AA}$ , ya que corresponde al radio aproximado de una molécula de agua.



**Fig 8.** Representación área superficial de Connolly.

En esta figura se representa el área por medio de líneas gruesas, observando la diferencia con las áreas de van der Waals. Esta superficie no presenta áreas bruscas, sino suavizadas. Además, este modelo se caracteriza por su alta densidad de puntos, por su exactitud, y por la precisión con la que define la superficie.

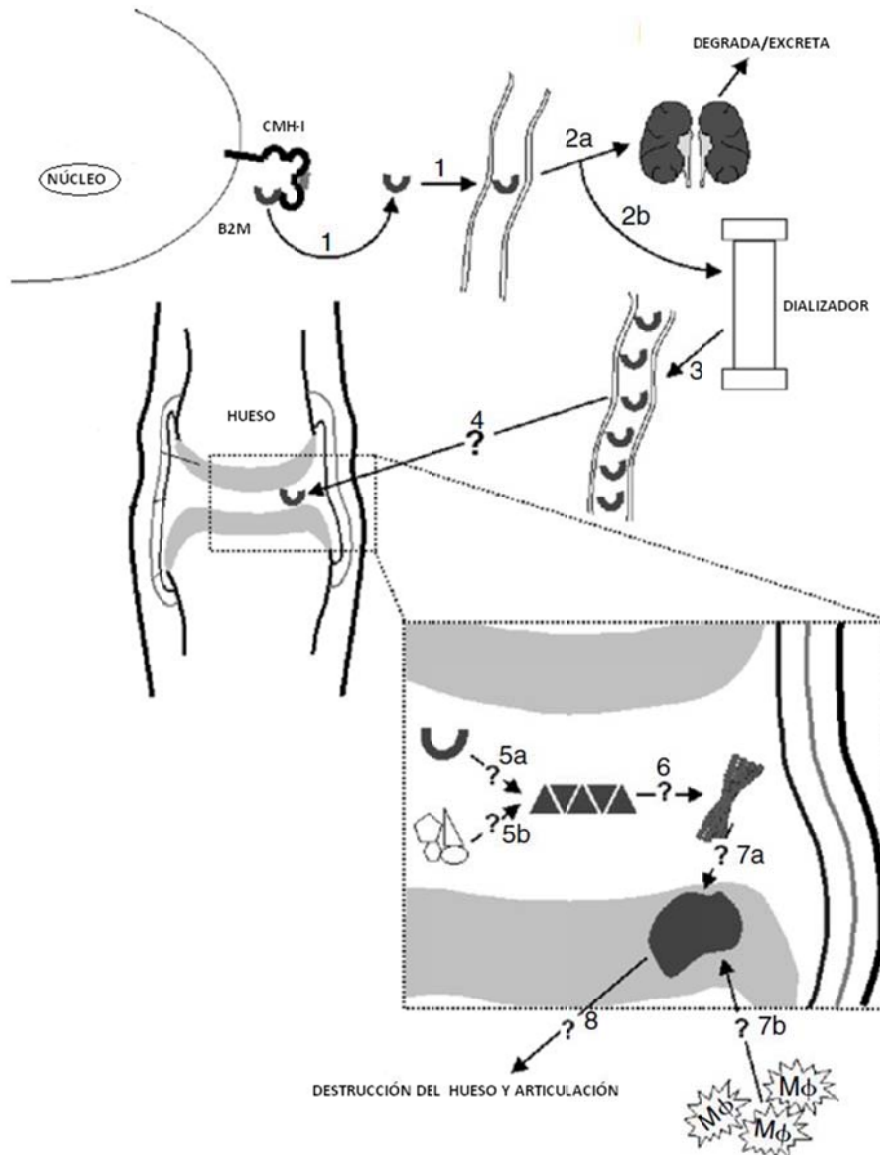
## 2. ESTADO DEL ARTE

La amiloidosis es un proceso mediante el cual se forman fibras de material amiloide, las cuales son causa de determinadas enfermedades como por ejemplo Alzheimer<sup>39</sup>, Parkinson<sup>40</sup> y amiloidosis relacionada a diálisis (ARD)<sup>4</sup>. Aunque, el mecanismo de formación de dichas fibras no es conocido con claridad, estudiar este proceso es de gran importancia, no solo para explicar dicho fenómeno sino para desarrollar nuevos procedimientos o fármacos que ayuden a controlar esta enfermedad.

La ARD, como su nombre lo indica es un tipo de amiloidosis asociada a  $\beta 2m$ <sup>4</sup>. En la figura 10 se representa el proceso de ARD. En la etapa (1) la  $\beta 2m$  es liberada del MHC-I y entra como monómero al suero plasmático. En personas sanas, la  $\beta 2m$  es llevada a los riñones para su posterior degradación y excreción (2a). En (2b) se observa que la sangre es transportada al dializador para filtración en pacientes con insuficiencia renal crónica.

En la etapa (3), se presenta un aumento en la concentración de  $\beta 2m$  en suero, casi 60 veces su valor normal (0.1  $\mu M$ ). Esto debido a que las membranas de diálisis no remueven eficazmente la proteína de la sangre. Aún así, estas concentraciones altas de  $\beta 2m$  no están correlacionados con la ARD<sup>23</sup>.

La  $\beta 2m$  es llevada a las articulaciones por un mecanismo desconocido (4), donde pasa a un estado de forma pre-fibrilar (5a), posiblemente ayudada por algunos factores biológicos (5b). Seguidamente la  $\beta 2m$  en el estado pre-fibrilar pasa a formar fibras amiloides (6), que finalmente se depositan en las articulaciones (7a), causando la infiltración de Macrófagos ( $M\phi$ )(7b). Cuando los macrófagos están activados liberan una serie de citocinas que conllevan a la destrucción de las articulaciones y los huesos (8), que se traduce en el inicio de la fase sintomática de la ARD.



**Fig 9.** Esquema general del proceso de amiloidosis relacionada a diálisis. (Adaptado de 40)

La causa de la formación de fibras *in vivo* no se conoce con claridad, aunque , existen otros factores *in vitro* que preceden la formación de material amiloide de  $\beta$ 2m.

Las fibras de  $\beta$ 2m pueden ser generadas por la eliminación de los primeros seis aminoácidos<sup>42</sup>, se pueden formar también bajo condiciones ácidas de pH (<6.0)<sup>43</sup>, al mezclar la  $\beta$ 2m con colágeno a pH = 6.4<sup>44</sup>, por la acumulación de

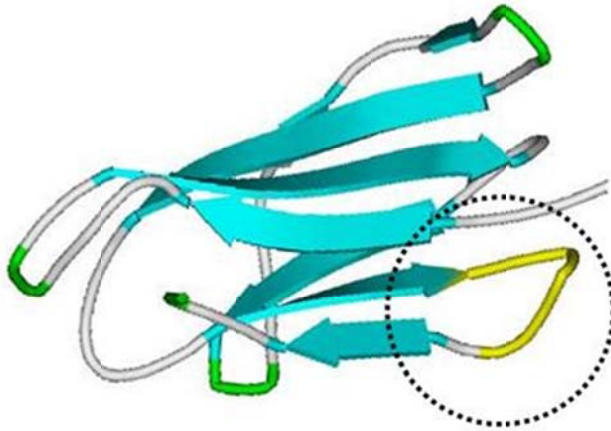
$\beta$ 2m en condiciones fisiológicas, en contacto con cantidades estequiométricas de  $\text{Cu(II)}$ <sup>8</sup> y por la presencia de determinadas secuencias de péptidos los cuales anteriormente se han denominado “péptidos amiloidogénicos” por su gran facilidad de formar fibras de amiloides<sup>14-15</sup>.

Este último factor es de gran relevancia, en los procesos *in vitro*. En la etapa [5] del desarrollo de la DRA (figura 10) se han sugerido factores directamente relacionados con la terapia de diálisis, a estar implicados en el paso de la forma nativa de  $\beta$ 2m a insolubles fibras amiloides. Uno de los factores fisiológicamente relevantes, capaz de afectar la conformación y por tanto la agregación de proteínas/péptidos es la presencia de determinadas secuencias de aminoácidos capaces de formar material amiloide, aún cuando han sido totalmente aislados<sup>11-13</sup>.

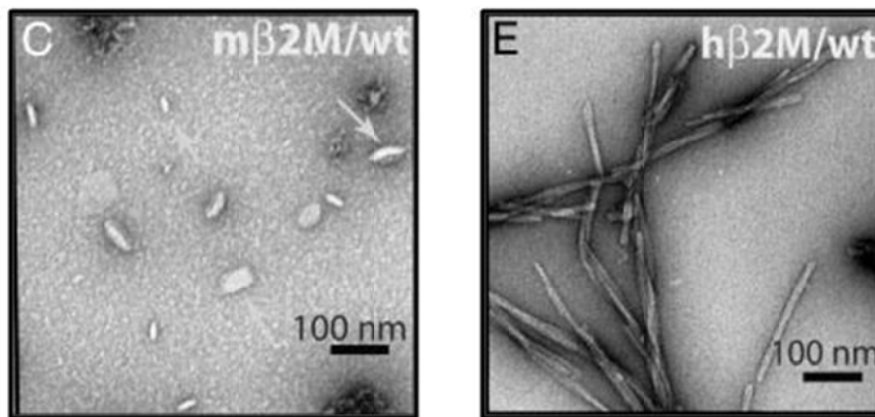
En 2004, Eisenberg et al.<sup>15</sup>, estudió el hecho que la formación de material amiloide en ratones, no se presentaba, aún cuando estos tienen también en su organismo  $\beta$ 2m (r $\beta$ 2m), la cual es similar a la  $\beta$ 2m humana (h $\beta$ 2m) en un 70%. Entre estas diferencias se encontró una serie de siete aminoácidos (NHVTL $\text{S}^{\text{Q}}$ ) en la h $\beta$ 2m, la cual formaba material amiloide *in vitro*. Basaron su estudio en modelos que describen las interacciones de amiloides que se forman a partir de solo un pequeño segmento de la proteína.

Estos modelos que describen la formación de material amiloide, sientan sus bases en lo que denominan “ganancia de interacción”, en la cual se enfocan en la formación de nuevos enlaces intermoleculares que son aportados por determinado segmento de la proteína. La formación de estos enlaces intermoleculares, podría en principio depender de una secuencia específica de aminoácidos, no solamente de su composición general. Al realizar el estudio, escogieron la secuencia NHVTL $\text{S}^{\text{Q}}$ , los cuales corresponden a los aminoácidos 83-89 de h $\beta$ 2m (Figura 11).

Inicialmente sometieron las dos secuencias (NHVTL $\text{S}^{\text{Q}}$  de h $\beta$ 2m y KHDSMAE de r $\beta$ 2m), en condiciones favorables para la formación de fibras, y observaron que r $\beta$ 2m no presentaba la formación de amiloides (Figura 12).



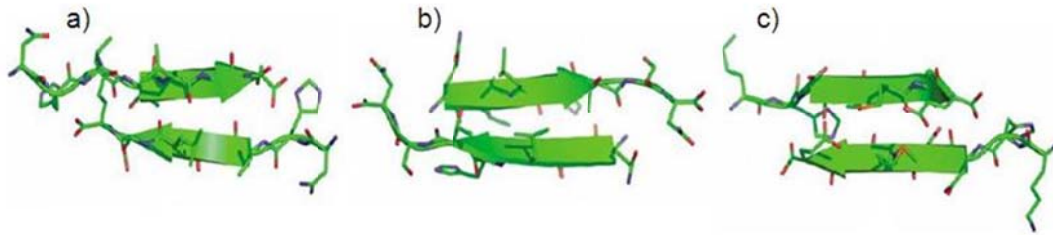
**Fig 10.** Estructura de  $\beta 2m$ , resaltado en amarillo la secuencia NHVTLSQ.



**Fig 11.** Imágenes de microscopía electrónica. C) Heptapéptido de  $r\beta 2m$ , no se presentan fibras aún cuando se somete a condiciones favorables para su formación. E) Heptapéptido de  $h\beta 2m$ , formación de fibras de material amiloide. (Adaptado de 15)

Finalmente, cambiaron aleatoriamente la secuencia del heptapéptido estudiado (QVLHTSN), observando también que no se presentaba la formación de fibras.

Luego en 2006, Duan et al.<sup>45</sup> realizaron simulaciones de dinámica molecular, con el dímero formado por la secuencia NHVTLSQ, la secuencia QVLHTSN de la  $h\beta 2m$  y también realizaron estudios con la secuencia KHDSMAE proveniente de  $r\beta 2m$ . Los primeros resultados mostraron, las conformaciones más representativas (Figura 13).

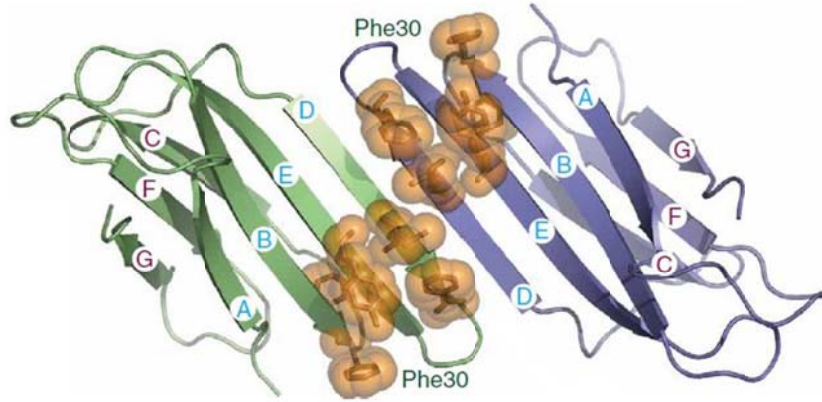


**Fig 12.** a) Conformación mayormente poblada del dímero formado por la secuencia NHVTLSQ de  $h\beta 2m$ . b) Conformación mayormente poblada por la secuencia KHDSMAE de  $r\beta 2m$ . c) Conformación mayormente poblada por la secuencia QVLHTSN de  $h\beta 2m$ . (Adaptado de 45)

Analizando, encontraron una mayor población en las conformaciones del dímero de NHVTLSQ (figura 13a), este se asume que es altamente estabilizado por las interacciones hidrofóbicas, mayormente presentadas entre los residuos Leu-Leu de cada péptido, también esta estabilización se puede presentar debido al arreglo antiparalelo en el cual se formaron, ya que se ven ayudadas por la atracción de cargas de los N-terminal.

De otra manera, las simulaciones realizadas con las secuencias QVLHTSN (figura 13c) de  $h\beta 2m$  y KHDSMAE (figura 13b) de  $r\beta 2m$ , no presentaron una alta población en las conformaciones obtenidas, debido a esto se sugiere que las formas monoméricas de estos heptapéptidos poseen una mayor solubilidad que el heptapéptido NHVTLSQ, además, la secuencia de  $r\beta 2m$  posee un residuo adicional de Lisina, lo cual aumenta su carga neta a (+3) y a su vez se encuentra más cerca del residuo N-terminal aumentando sus fuerzas de repulsión. Además, esta alta fuerza de repulsión es esperada, particularmente cuando los péptidos están muy próximos entre si.

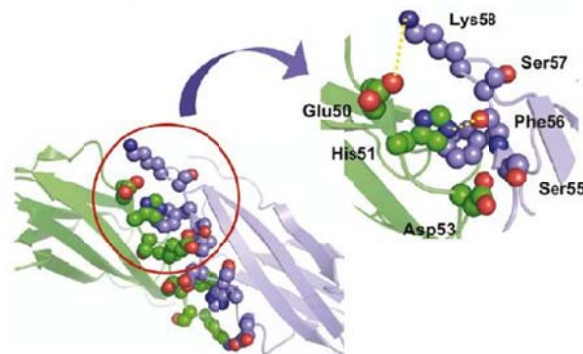
Posteriormente en el mismo año, Miranker et al.<sup>16</sup> realizó una modificación en la  $\beta 2m$  nativa, la P32A,. Al estimular esta  $\beta 2m$  mutada bajo las condiciones favorables para formación de fibras, observó en la primera etapa del proceso, e.g. la formación del dímero, una serie de siete aminoácidos, que jugaban un rol fundamental en la estabilización. El segmento, corresponde a la secuencia de aminoácidos EHSDLSF, los cuales se ubican en las posiciones 50 – 56 de  $\beta 2m$ . (Figura 14)



**Fig 13.** Modelo de formación del dímero. Se observa la interacción D-D (Adaptado de 16)

En este estudio, se observó que la posición de cada una de las  $\beta 2m$  se daba de manera tal, que la conformación del dímero formado presentaba con un tipo de isomería óptica. En cuanto a la proteína nativa se observó que la gran estabilidad del dímero formado era debido a la interacción entre los aminoácidos Leu54 y Phe56.

Finalmente en 2010, Mendoza et al.<sup>23</sup> realizaron docking molecular, con lo cual se observó el mismo fenómeno presencia de las interacciones D-D (Figura 14). Demostrando así que este heptapéptido posea gran capacidad de formar dímeros de  $\beta 2m$ .



**Fig 14.** Interacción detallada de los aminoácidos implicados en la formación del dímero de  $\beta 2m$ . Se resaltan los aminoácidos Glu50 – Lys58. (Adaptado de 23)

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 Selección de estructuras del heptapéptido de partida

Para desarrollar los estudios de docking molecular y dinámica molecular, fueron extraídos los parámetros geométricos del heptapéptido Glu50 – Phe56 de la  $\beta$ 2m incorporados en el CMH-I (código PDB 1DUZ). Adicionalmente, se agregaron explícitamente todos los hidrógenos.

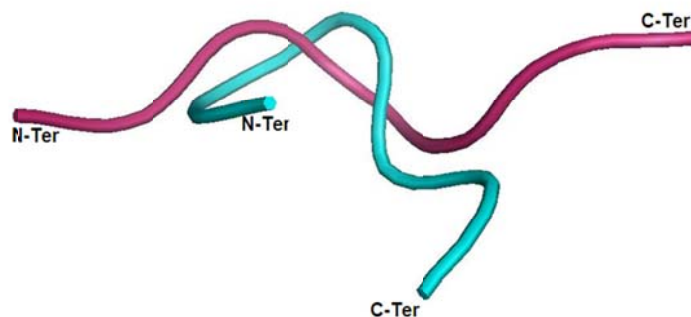
Con el objeto de obtener una conformación representativa en medio acuoso, el heptapéptido se introdujo en una caja cúbica (con un volumen total de 10.648 nm<sup>3</sup>), se solvató con moléculas de H<sub>2</sub>O utilizando el modelo ffamber\_tip3p<sup>32</sup> y se optimizó su geometría, mediante el modelo “*Steepestdescent*”<sup>38</sup>, bajo condiciones periódicas de contorno y con el campo de fuerza AMBER94<sup>32</sup>. Para esta etapa se utilizó el programa GROMACS 3.3.3<sup>33-36</sup>. Las interacciones de van der Waals (vdW) se evaluaron mediante el potencial de 6 -12 de Lenard-Jones y las interacciones electrostáticas mediante el potencial de Coulomb.

##### 3.1.1 Estructura Flexible

Con el objeto de valorar el péptido en condiciones libres, i.e., libre de la  $\beta$ 2m, se optimizó sin restricciones.

- pH 5

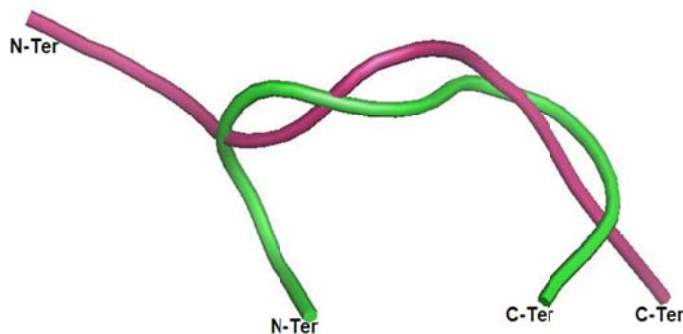
Teniendo en mente la obtención de conformaciones representativas a pH 5 se realizó la optimización de la estructura teniendo en cuenta la carga de los aminoácidos. De esta manera se protonó el anillo de imidazol de la histidina en la posición delta y el ácido glutámico en el grupo amino terminal. Así mismo, se cargó negativamente la cadena lateral del ácido glutámico, ácido aspártico y el grupo carboxilo terminal. Con esto la carga total del heptapéptido es de -1.



**Fig 15.** A) Modelo representativo de la estructura optimizada del heptapéptido (Azul) y su estructura nativa (Roja), Energía potencial =  $-1,2378 \cdot 10^5$  kJ, carga neta de -1 y desviación del backbone  $m.s.=2.035\text{Å}$  entre el monómero obtenido de docking y el monómero de la proteína nativa.

- **pH 7**

Teniendo en mente la obtención de una configuración representativas a pH 7, la histidina se mantuvo neutra como se muestra en los resultados de Esposito y colaboradores 2002<sup>42</sup>. El amino terminal se trabajó cargado positivamente y de manera negativa se trabajó la cadena lateral del ácido glutámico y del ácido aspártico. Con esta configuración se realizó la optimización de la estructura a pH7. Por tanto, la carga total del heptapéptido es de -2.



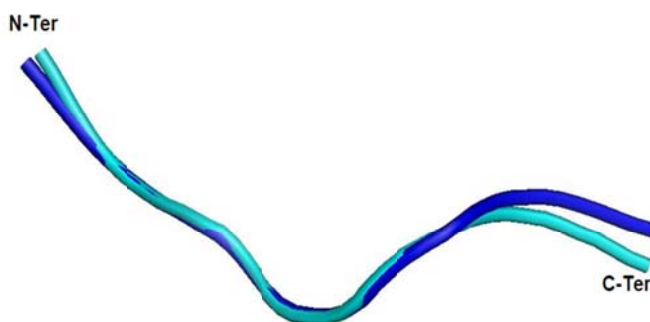
**Fig 16.** A) Modelo representativo de la estructura optimizada del heptapéptido (Verde) y su estructura nativa (Rosa). Energía potencial =  $-1,2925 \cdot 10^4$  kJ, carga neta de -2 y desviación del backbone  $m.s.=0.948\text{Å}$  entre el monómero obtenido de docking y el monómero de la proteína nativa.

### 3.1.2 Estructura Rígida

Con el objeto de evidenciar el comportamiento del heptapéptido como parte de la  $\beta 2m$ , se desarrollo un modelo semi-rígido del péptido. Para lograr este propósito, se realizó el mismo procedimiento con el heptapéptido que para la

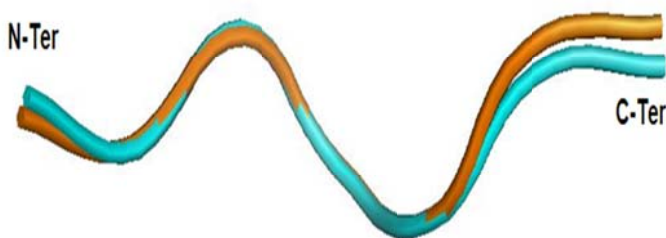
estructura flexible, salvo que se incluyeron restricciones de posiciones de los átomos del *backbone* (manteniendo flexible el grupo funcional de los aminoácidos). Estas restricciones se realizan usando tres diferentes constantes de fuerza provenientes del potencial de restricción de posiciones, las cuales se pueden activar o desactivar en cada dimensión espacial, lo que implica que los átomos pueden ser armónicamente restringidos a un plano o a una línea. Estas restricciones de posición se aplican a una lista fija de átomos ( En este caso los pertenecientes al *backbone*), en GROMACS<sup>33-36</sup>. A este tipo de estructura también se aplicaron los criterios de diferencia de pH, obteniendo los siguientes resultados.

- pH 5



**Fig 17.** A) Modelo representativo de la estructura optimizada del heptapéptido (Azul) y su estructura nativa (Aguamarina). Energía potencial =  $-1.2618 \cdot 10^5$  kJ carga neta de -1 y desviación del backbone *r.m.s.* = 0.113Å entre el monómero obtenido de docking y el monómero de la proteína

- pH 7



**Fig 18.** A) Modelo representativo de la estructura optimizada del heptapéptido (Naranja) y su estructura nativa (Aguamarina). Energía potencial =  $-1.2426 \cdot 10^4$  kJ carga neta de -2 y desviación del backbone *r.m.s.* = 0.098Å entre el monómero obtenido de docking y el monómero de la proteína

### 3.2 Docking Molecular

Con el objeto de evaluar la forma de acoplamiento entre los heptapéptidos se realizó *docking* péptido-péptido. El *docking* se realizó con cada una de las cuatro estructuras mencionadas en el numeral anterior, para estudiar todas las posibles conformaciones del dímero formado. Las simulaciones de *docking* se realizaron con el programa ZDOCK<sup>28-29</sup>.

ZDOCK provee una puntuación para todas las posibles conformaciones obtenidas. Para cada simulación se tomaron las 10 conformaciones de mayor puntaje y cada conformación representa el dímero formado por el heptapéptidoGlu50-Phe56.

De esta manera, se realizaron cuatro simulaciones de *docking* péptido-péptido, i.e., flexible a pH 5, flexible a pH 7, rígido a pH 5 y rígido a pH 7. Cada conformación representa el dímero formado por el heptapéptidoGlu50-Phe56.

### 3.3 Optimización de estructuras

Con las respectivas conformaciones obtenidas del *docking*, se realizó optimización de estructuras teniendo en cuenta las condiciones rígidas y flexibles de cada una de ellas. Esto se desarrolló en GROMACS<sup>33-36</sup>, con el campo de fuerza AMBER94<sup>31</sup>. El procedimiento realizado para los dímeros obtenidos fue similar al realizado para el monómero del heptapéptido, es decir, en una caja cubica de aproximadamente 10.648 nm<sup>3</sup> de volumen, solvatados con el modelo tip3p<sup>31</sup> y la optimización, con el modelo "steepestdescent"<sup>37</sup>, bajo condiciones periódicas de contorno.

### 3.4 Cálculo de pKa

Con las estructuras obtenidas de las respectivas optimizaciones, se calculó el valor de pKa de cada aminoácido relacionado al su entorno químico. Se evaluó tanto el monómero como los dímeros, a pH 5, pH 7 bajo condiciones flexibles y rígidas.

### **3.5 Dinámica Molecular**

Las simulaciones de dinámica molecular fueron desarrolladas durante 5ns. Estas simulaciones se llevaron a cabo a una temperatura de 310K con condiciones periódicas de contorno en un ensamble nPT, con el campo de fuerza AMBER94<sup>31</sup> implementado en GROMACS<sup>33-36</sup>

### **3.6 Evaluación de propiedades fisicoquímicas**

Con las estructuras obtenidas después de las simulaciones de dinámica molecular, se evaluaron diferentes propiedades fisicoquímicas para un mejor entendimiento del proceso en sí. Las propiedades que fueron calculadas son:

- Energía interna
- pKa
- Puentes de hidrogeno
- Área superficial accesible al solvente
- Energía libre de Gibbs

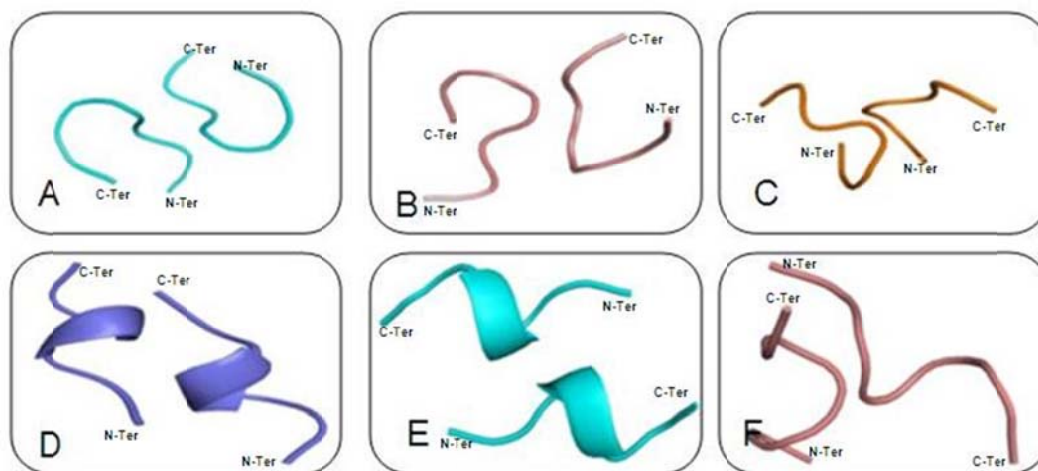
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Dímero formado a pH 5

#### 4.1.1 Docking Molecular

Se realizó docking entre heptapéptidos Glu50-Phe56 manteniendo la estructura del péptido flexible y rígida.

Las conformaciones se agruparon por modelos más representativos de los dímeros obtenidos (figura 19). Bajo condiciones flexibles, los dímeros 1, 2, 3, 4 y 10 son representados por el modelo A, los dímeros 5, 6, 7 y 9 por el modelo B y el dímero 8 por el modelo C. Mientras, en las conformaciones rígidas los dímeros 1, 2, 8, 9 y 10 son representados por el modelo D, los dímeros 3, 4, 5 y 6 por el modelo E y el dímero 7 por el modelo F.



**Fig 19.** A, B y C representan los modelos más representativos de las conformaciones flexibles. A corresponde a 5 conformaciones, B a 4 conformaciones y C a 1 conformación. Los modelos D,E y F representan las conformaciones rígidas, donde D representa a 5 conformaciones, E a 4 conformaciones y F a 1 conformación.

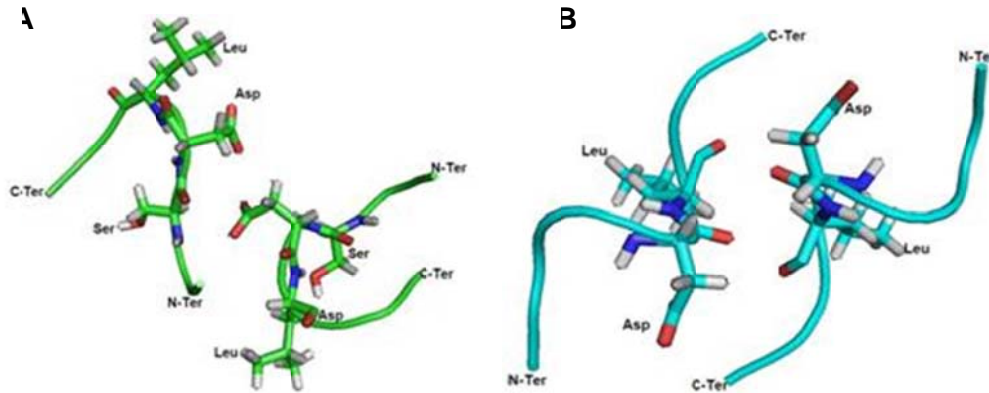
Se puede observar que gran parte de las conformaciones diméricas obtenidas presentaron estructura tipo hélice  $\alpha$ , después de la optimización rígida del

dímero, i.e. D y E. Este hecho puede ser explicado por la presencia del hidrógeno delta (H  $\delta$ ) del anillo de imidazol, asociado a pH 5, el cual permite la formación de interacciones de tipo puentes de hidrógeno con el oxígeno  $\delta$  del ácido aspártico. Estas interacciones presentan energías suficientes para vencer las barreras energéticas que favorecen el plegamiento del péptido. También se nota la preferencia en el alineamiento **antiparalelo** de los péptidos.

Dímero	Energía Interna (kJ) Flexible	Energía Interna (kJ) Rígido
Dímero 1	-9.9381*10 <sup>3</sup>	-8.9493*10 <sup>3</sup>
Dímero 2	-1.0299*10 <sup>4</sup>	-9.2269*10 <sup>3</sup>
Dímero 3	-7.9395*10 <sup>3</sup>	-9.5153*10 <sup>3</sup>
Dímero 4	-1.0221*10 <sup>4</sup>	-9.3602*10 <sup>3</sup>
Dímero 5	-9.9789*10 <sup>3</sup>	-1.0317*10 <sup>4</sup>
Dímero 6	-1.0785*10 <sup>4</sup>	-9.4061*10 <sup>3</sup>
Dímero 7	-1.0310*10 <sup>4</sup>	-9.0890*10 <sup>3</sup>
Dímero 8	-1.0451*10 <sup>4</sup>	-9.7023*10 <sup>3</sup>
Dímero 9	-8.9876*10 <sup>3</sup>	-7.3354*10 <sup>3</sup>
Dímero 10	-1.1736*10 <sup>4</sup>	-1.0011*10 <sup>4</sup>

**Tabla 1.** Energía interna de cada uno de los dímeros obtenidos bajo condiciones flexibles.

Los valores de energía interna de las estructuras optimizadas (Tabla 2) permiten establecer cuales son las conformaciones más estables. En el modelo A se presentan algunos de los valores de más baja energía. Consideramos que la voluminosidad de las histidinas permite que se establezca la estructura debido a las interacciones electrostáticas entre las dos cadenas de péptidos. También las interacciones electrostáticas entre los aminoácidos serina, ácido aspártico y leucina (Figura 20) contribuyen a estabilizar los dímeros. Por el contrario, los modelos B y C muestran distancias que no favorecen la interacción entre las dos cadenas peptídicas. Para el caso de las estructuras con esqueleto cadena rígida los valores más bajos de energía se obtienen con las configuraciones del modelo E, donde se observa que los aminoácidos ácido aspártico y leucina se encuentran en la interface entre los dos péptidos.



**Fig 20.** Conformaciones con la más baja energía en cada uno de los modelos mas representativos. A. Dimerio 10 que representa el modelo A(en condiciones flexibles);B. Dimerio 5 que representa el modelo F(en condiciones rígidas).

Comparando los dos tipos de estructura, se observa que los dímeros formados bajo condiciones rígidas presentan mayores valores de energía potencial, haciendo sus estructuras más inestables. Esto es posiblemente a que el esqueleto de este tipo de estructura se encuentra más tensionado ya presenta determinadas restricciones de posición, lo que le impide adoptar conformaciones que sean más estables termodinámicamente. Aunque presenta interacciones de van der Waals y electrostáticas, estas no aportan grandes valores de energía lo cual no permite una gran estabilización de la estructura. Además, en el dímero 7 del modelo F(figura 20-b) se observa que solo 2 aminoácidos están participando en interacciones directas, mientras que en el dímero 1 del modelo A (figura 20-a) son 3 aminoácidos, lo cual le brinda mayor estabilidad a la molécula.

#### 4.1.2 pKa

Utilizando el programa PROPKA<sup>[29]</sup>, se calculó el valor de pKa de cada uno de los aminoácidos presentes, con esto se ayuda a visualizar como altera el entorno químico las propiedades de los aminoácidos.

En la siguiente tabla se muestran los valores de pKa de los diferentes aminoácidos del péptido.

Aminoácido	pKa	Flexible	Rígido
	Reportado	pKa Calculado	pKa Calculado
Ácido Aspártico	3.80	3.75	3.88
Ácido Glutámico	4.50	4.58	4.53
Histidina	6.50	6.51	7.07
Carbonilo Terminal	3.20	2.58	3.21
Amino Terminal	8.00	8.32	7.93

**Tabla 2.** pKa Reportado y Calculado de cada uno de los aminoácidos que conforman el péptido de estudio.

De los datos de la tabla se establece que no hay variaciones fundamentales en el pKa de los aminoácidos calculados utilizando el péptido flexible o rígido. Existen pequeñas diferencias que se deben principalmente a los cambios del ambiente químico alrededor cada uno de los aminoácidos. Cabe destacar que los aminoácidos nitrogenados, así como el amino terminal, muestran las mayores variaciones. Creemos que este comportamiento se debe a la al ambiente químico de esos aminoácidos.

A continuación se muestran los resultados de pKa para el dímero 1 bajo conformaciones flexibles.

Aminoácido	pKa	Flexible		Rígido	
	Reportado	pKa - A	pKa - B	pKa - A	pKa - B
A. Aspártico	3.80	3.77	3.87	4.34	4.27
A. Glutámico	4.50	4.56	4.69	3.55	3.45
Histidina	6.50	6.28	6.36	6.31	6.31
Carb. Term.	3.20	3.46	3.06	3.26	3.32
Amin. Term	8.00	7.64	7.74	7.83	7.84

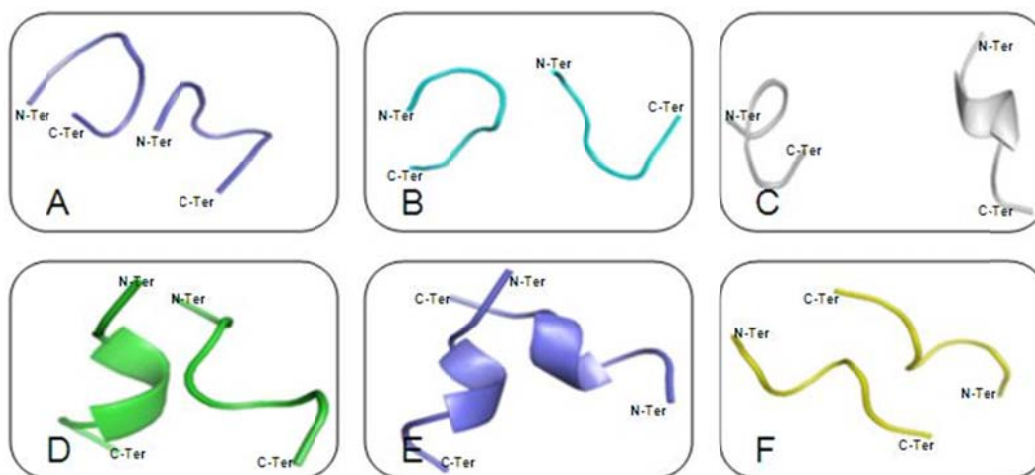
**Tabla 3.** pKa calculados y reportados para cada uno de los aminoácidos con cadena lateral ionizables dentro del péptido de estudio.

Se observa que la histidina y el amino terminal del ácido glutámico disminuyeron su pKa en un factor de ~0.2 0.3 unidades de pH tanto en condiciones flexibles como en condiciones rígidas, se cree que este efecto es debido a que el ambiente químico de dichos aminoácidos no varía de gran manera, respecto al movimiento que pueda tener el esqueleto del péptido.

También se observó que el ácido aspártico y el carbonilo terminal de la fenilalanina aumentaron en un factor de aproximadamente 0.5 y 0.1 respectivamente, lo que indica un aumento en la acidez de dichos aminoácidos ocasionado por el ambiente químico. Finalmente, la cadena lateral del ácido glutámico, en la estructura rígida, disminuye su pKa en aproximadamente 1.0 unidad, este resultado debe ser consecuencia del acoplamiento de las dos cadenas o se deduce del hecho que al mantener rígido el *backbone* del péptido la cadena lateral de este aminoácido queda cerca de la cadena lateral de la histidina el cual es su aminoácido vecino, y voluminoso.

#### 4.1.3 Dinámica Molecular

Se realizaron simulaciones de dinámica molecular utilizando como partida las conformaciones obtenidas en el docking. En la siguiente figura se muestra el agrupamiento de las conformaciones de acuerdo con las veces que se repiten en la misma trayectoria. Se agruparon las diez conformaciones en tres modelos flexibles y tres modelos rígidos, respectivamente.



**Fig 21.** A, B y C son los modelos más representativos de las conformaciones flexibles. A corresponde a 4 conformaciones, B a 5 conformaciones y C a 1 conformación. Los modelos D, E y F representan las conformaciones rígidas, donde D corresponde a 4 conformaciones, E a 4 conformaciones y F a 2 conformaciones.

El modelo A representa los dímeros 1, 4, 7 y 8, el modelo B representa los dímeros 2, 3, 5, 9, 10 y el modelo C el dímero 6 de las conformaciones

flexibles. Por tanto el modelo D representa los dímeros 1, 2, 6 y 10, el modelo E los dímeros 3, 7, 8, 9 y el modelo F los dímeros 4 y 5 de las conformaciones rígidas.

Los resultados de las simulaciones muestran conformaciones flexibles que promueven la separación de los péptidos. Por otra parte, en las conformaciones obtenidas por dinámica molecular con restricción en la posición de los átomos del esqueleto se obtuvieron estructuras similares (helices  $\alpha$ ) a las obtenidas en el proceso de docking (figura 10). Debido a que los grupos de las cadenas laterales, no tuvieron suficiente energía para romper los puentes de hidrógeno formados dentro del péptido.

Con el objeto de analizar cual fue la variación total entre cada una de dichas estructuras, i.e., las obtenidas del docking y las resultantes de las simulaciones de dinámica molecular, se realizó un cálculo de la desviación media cuadrática de la posición para visualizar el cambio sufrido por cada una de ellas (Tabla 5).

Dímero	RMS(Å) Flexible	RMS(Å) Rígido
Dímero 1	10.214	0.406
Dímero 2	2.859	0.351
Dímero 3	7.115	0.357
Dímero 4	4.303	0.177
Dímero 5	5.462	0.261
Dímero 6	8.411	0.295
Dímero 7	2.975	0.562
Dímero 8	3.617	0.399
Dímero 9	4.154	0.419
Dímero 10	5.149	0.506

**Tabla 4.** Desviación media cuadrática de cada uno de los dímeros obtenidos de dinámica, respecto a los obtenidos por el docking.

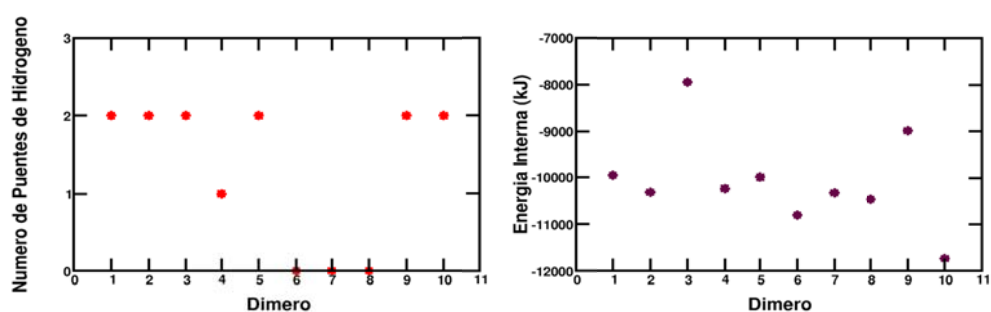
De acuerdo con los valores de desviación, las conformaciones rígidas variaron muy poco con respecto a las conformaciones de partida, , como resultado de la poca movilidad del esqueleto de los péptidos cadena principal. Por el contrario,

los resultados de dinámica molecular del sistema flexible muestra una gran desviación de las posiciones de equilibrio, como era de esperarse.

Para entender estos comportamientos se calcularon varias propiedades fisicoquímicas de cada uno de los dímeros formados, lo cual brinda un mejor entendimiento del proceso de formación de los dímeros.

- **Puentes de Hidrógeno**

Se determinaron los puentes de hidrógeno entre los heptapéptidos de los dímeros flexibles (Tabla 6). Se observa con claridad que la ser52, glu50 y asp54 son los aminoácidos esencialmente involucrados en la formación de los puentes de hidrógeno.



**Fig 22.** Puentes de hidrógeno (A) y energía interna (B) de cada conformación, en condiciones flexibles.

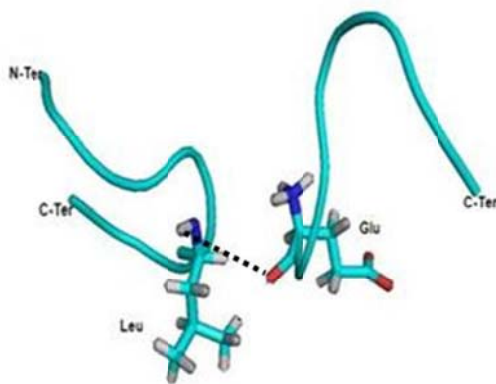
La mayoría de los dímeros flexibles presentan formación de 2 puentes de hidrógeno (Tabla 6). Como se esperaba, mayor número de puentes de hidrógeno se traduce en mayor estabilidad de la estructura.

Dímero	Número de Puentes	Ubicación	Distancia (Å)
Dímero 1(A)	2	H1:Glu1 – OE2:Glu8	2.957
		HG:Ser3 – ND1:His9	2.332
Dímero 2(B)	2	HD1:His2 – OE1:Glu8	2.935
		HG:Ser6 – HD1:His9	2.292
Dímero 3(B)	2	H:Asp4 – OG:Ser10	2.936
		HD1:His9 – OE2:Glu1	2.707
Dímero 4(A)	1	HG:Ser13 – OE1:Glu1	2.535

Dímero 5(B)	2	HG:Ser3 – OC1:Phe14	2.486
		HG:Ser10 – OD1:Asp4	2.733
Dímero 6(C)	0	NO	-
Dímero 7(A)	0	NO	-
Dímero 8(A)	0	NO	-
Dímero 9(B)	2	HD1:His2 – OG:Ser13	2.756
		H1:Glu8 – OD2:Asp4	2.559
Dímero 10(B)	2	HG:Ser3 – OG:Ser10	2.930
		H:Phe7 – OE2:Glu8	2.706

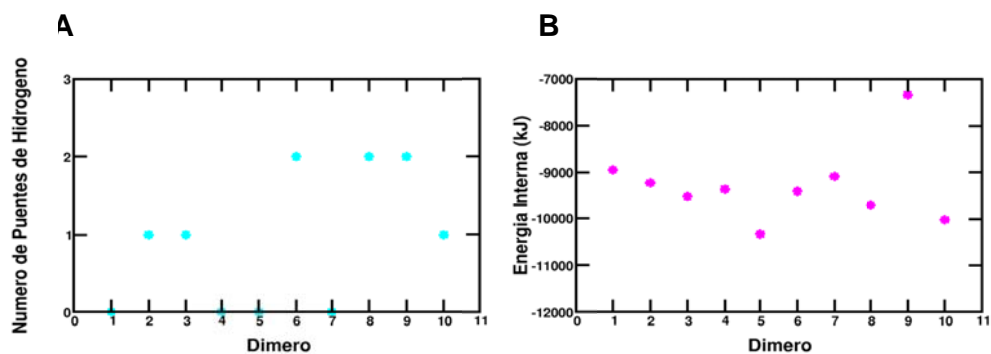
**Tabla 5.** Ubicación de cada uno de los puentes de hidrógeno formados y sus distancias respectivas.

Para el caso del modelo B, se encontró que los puentes de hidrógeno más recurrentes están relacionados con los aminoácidos serina y fenilalanina (figura 23).



**Fig 23.** Formación de uno de los puentes de hidrógeno más representativos ( $HD23:Leu5_A - O:Glu8_B$  modelo B)

Por otra parte, en el caso de los dímeros rígidos se observa que el dímero 5 del modelo E presenta la menor energía potencial (figura 25-b). Adicionalmente, se observa que esta conformación no presenta formación de puentes de hidrógeno (figura 25-a). Por lo tanto la estabilidad de este sistema se debe principalmente a interacciones del tipo van der Waals y electrostáticas. Adicionalmente, la estabilidad se logra por el acoplamiento de las dos cadenas y la formación de hélices  $\alpha$ .

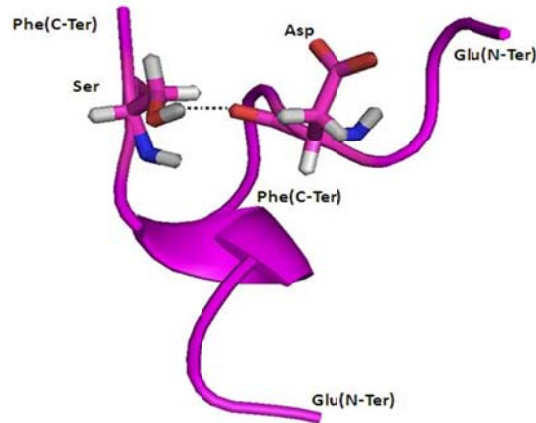


**Fig 24.** Puentes de hidrógeno (A) y energía interna (B) de cada conformación en condiciones rígidas.

En el caso de la dinámica molecular de estructuras rígidas se observa mayor prevalencia de la formación de puentes de hidrógeno por parte de la ser 52 (figura 26). Contrario a lo que ocurre con las simulaciones de las estructuras flexibles, no se observa la formación de puentes de hidrógeno entre el ácido glutámico y la serina.

Dímero	Número de Puentes	Ubicación	Distancia (Å)
Dímero 1(D)	0	NO	
Dímero 2(D)	1	H1:Glu1 – ND1:His9	2.587
Dímero 3(E)	1	HG:Ser3 – OG:Ser10	2.628
Dímero 4(F)	0	NO	
Dímero 5(F)	0	NO	
Dímero 6(D)	2	HE2:His2 – NE2:His9 HG:Ser3 – OG:Ser10	2.434 2.891
Dímero 7(E)	0	NO	
Dímero 8(E)	2	HG:Ser3 – OG:Ser13 HG:Ser6 – OG:Ser10	2.283 2.781
Dímero 9(E)	2	H:Asp4 – OC1:Phe14 H:Ser10 – OC1:Phe7	2.981 2.324
Dímero 10(D)	1	HG:Ser13 – OD2:Asp4	2.576

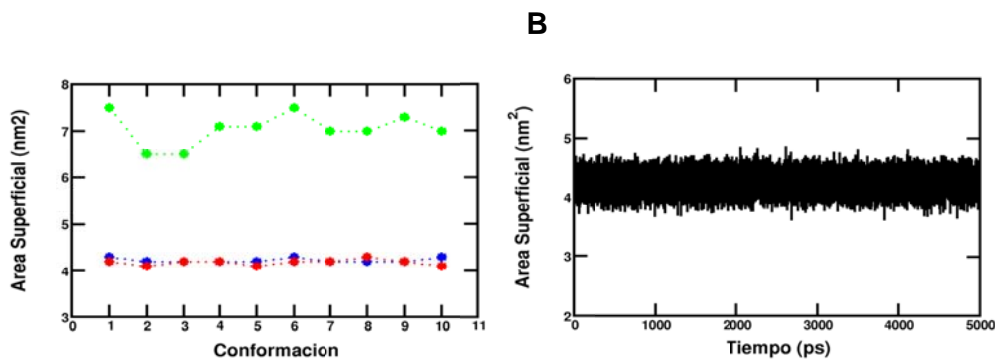
**Tabla 6.** Ubicación de cada uno de los puentes de hidrógeno formados y sus distancias respectivas



**Fig 25.** Formación de uno de los puentes de hidrógeno más representativos (HG:Ser13 – OD2:Asp4 en la conformación del modelo D).

- **Área superficial accesible al solvente (ASAS)**

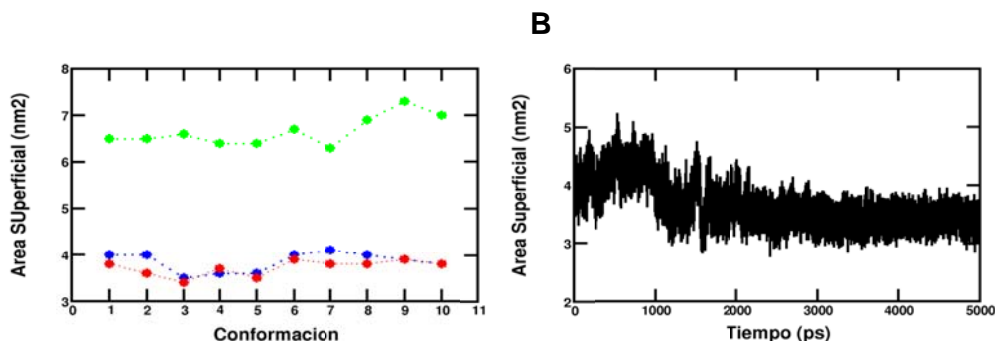
Con el objeto de investigar como varia el área superficial de los péptidos cuando están en su forma monomérica y después cuando forman el respectivo dímero, se calculó el área superficial accesible al solvente de cada uno de ellos, a partir de las estructuras obtenidas de la dinámica con el sub-programa *g\_sas* de GROMACS<sup>[33-36]</sup>.



**Fig 26. A.** ASAS de cada uno de los dímeros a pH 5 bajo condiciones flexibles. **Azul:** ASAS promedio del péptido A. **Rojo:** ASAS promedio del péptido B. **Verde:** ASAS promedio del dímero formado. **B.** Comportamiento del área superficial del monómero a pH5 bajo condiciones flexibles, a lo largo de los 5ns de dinámica correspondiente al monómero A de la conformación 1.

En la Figura 27-A se observa que el área total del dímero corresponde aproximadamente al doble del área de los monómeros, es decir un área de

promedio  $7\text{nm}^2$ . Que el área del dímero casi duplique la de los monómeros implica que existen puntos de contacto entre los dos péptidos. Sin embargo, como esperabamos, las estructuras flexibles muestran muy poco acercamiento, debido principalmente a la multiplicidad de configuraciones durante la dinámica.

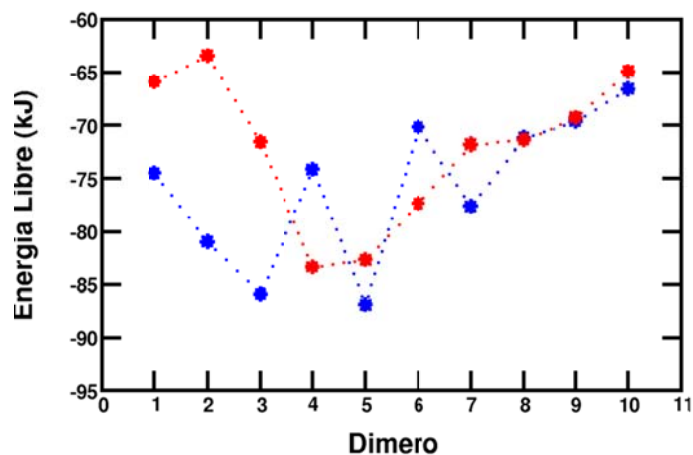


**Fig 27.A.** ASAS de cada uno de los dímeros a pH 5 bajo condiciones flexibles. **Azul:** ASAS promedio del péptido A. **Rojo:** ASAS promedio del péptido B. **Verde:** ASAS promedio del dímero formado. **B.** Comportamiento del área superficial del monómero a pH5 bajo condiciones rígidas, a lo largo de los 5ns de dinámica correspondiente al monómero B de la conformación 3.

La Figura 28-A muestra el mismo análisis para las estructuras rígidas. En este caso se observa una disminución en el área promedio de los monómeros, lo cual se ve reflejado en el ASAS de los dímeros (aproximadamente  $6.5\text{nm}^2$  comparada con  $7.0\text{nm}^2$  de las conformaciones flexibles caso anterior). Esta diferencia demuestra que efectivamente se forman estructuras complejas que se asemejan a las encontradas cuando dos unidades de beta-2-microglobulina se unen.

- **Energía libre de Gibbs**

La siguiente Figura 28 muestra los valores de la diferencia de la energía libre de Gibbs promedio para cada una de las simulaciones. De la gráfica se puede concluir que el proceso de formación de dímeros del péptido estudiado es espontáneo. (Ver anexo 1). Como se ve en la discusión de los resultados anteriores, factores entrópicos favorecen la espontaneidad de la agregación de los péptidos (Ver anexos 3 y 4).



**Fig 28.** Comparación de los promedios de energía libre de enlace de las conformaciones flexibles (azul) y las conformaciones rígidas (rojo).

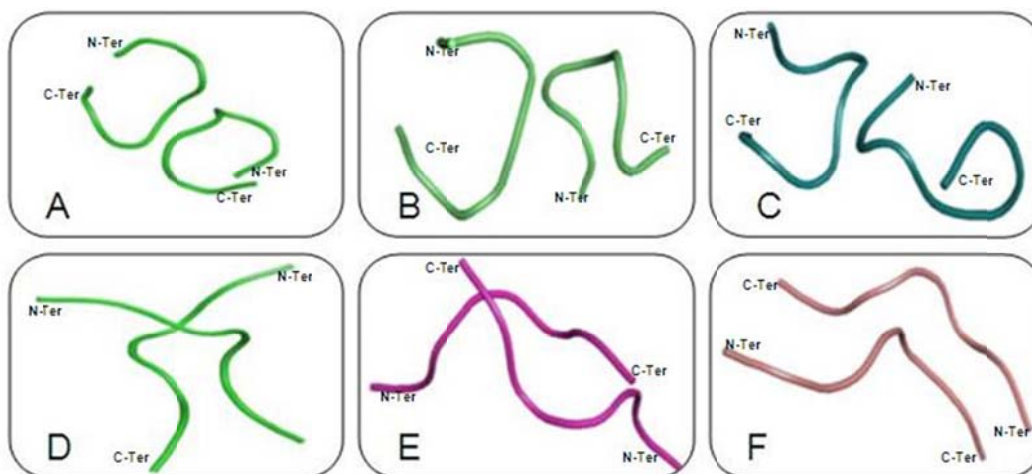
## 4.2 Dímero formado a pH 7

### 4.2.1 Docking Molecular

Se realizó docking con las conformaciones del péptido Glu50-Phe56 a pH 7 bajo condiciones flexibles y rígidas.

En este proceso el anillo imidazol, de la histidina (His51), se presentó neutra. Debido a que el pka del anillo imidazol en el histidina es de 6.06. Así, esta fue la única modificación del péptido con el estudio anterior a pH 5.i.e., que se desprotonó el hidrógeno que corresponde al nitrógeno  $\delta$  cuando se alcanza un pH de 6,04. Por tanto, este es el único cambio respecto a los átomos presentes que sufre dicho péptido al aumentar su pH.

Las conformaciones se agruparon por modelos más representativos de los dímeros obtenidos (figura 33). Bajo condiciones flexibles, los dímeros 1, 2, 3, 5 y 6 son representados por el modelo A; los dímeros 4, 9 y 7 por el modelo B y los dímeros 8 y 10 por el modelo C. Mientras, en las conformaciones rígidas los dímeros 1, 7, 9 y 10 son representados por el modelo D; los dímeros 2, 3 y 4 por el modelo E y los dímeros 5, 6 y 8 por el modelo F.



**Fig 29.** A,B y C representan los modelos más representativos de las conformaciones flexibles. A corresponde a 5 conformaciones, B a 3 conformaciones y C a 2 conformaciones. Los modelos D,E y F representan las conformaciones rígidas, donde D representa a 4 conformaciones, E a 3 conformaciones y F a 3 conformaciones.

Debido a esta pérdida del hidrógeno, se observa que no se presentó el plegamiento en forma de hélice  $\alpha$  como se observó en el caso de las conformaciones a pH 5. Sin embargo, en las conformaciones rígidas se observa también que la posición en las que se unieron los monómeros, son principalmente de manera **Antiparalela**. Corroborando nuestros resultados con los reportados en la literatura.

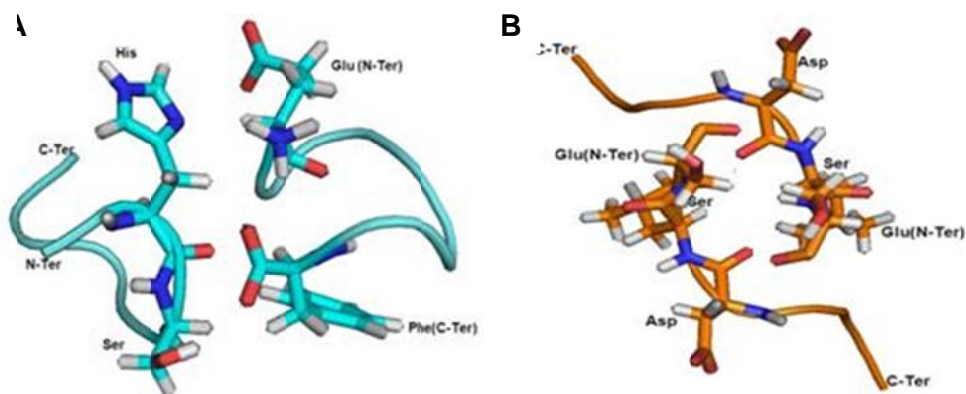
Dímero	Energía Interna (kJ)	
	Flexible	Rígido
Dímero 1	$-1.0700 \cdot 10^4$	$-7.6125 \cdot 10^3$
Dímero 2	$-1.0323 \cdot 10^4$	$-9.5253 \cdot 10^3$
Dímero 3	$-1.0673 \cdot 10^4$	$-9.0358 \cdot 10^3$
Dímero 4	$-1.0081 \cdot 10^4$	$-8.1607 \cdot 10^3$
Dímero 5	$-1.1113 \cdot 10^4$	$-8.4048 \cdot 10^3$
Dímero 6	$-9.1545 \cdot 10^3$	$-9.4855 \cdot 10^3$
Dímero 7	$-1.1008 \cdot 10^4$	$-8.9997 \cdot 10^3$
Dímero 8	$-1.0405 \cdot 10^4$	$-7.7981 \cdot 10^3$
Dímero 9	$-1.1555 \cdot 10^4$	$-8.5903 \cdot 10^3$
Dímero 10	$-1.2383 \cdot 10^4$	$-1.0197 \cdot 10^4$

**Tabla 7.** Energía interna de cada uno de los dímeros formados a pH 7

Los resultados de la tabla 8 presentan los valores de energía interna de cada uno de los dímeros obtenidos, mostrando que las conformaciones que son representadas por el modelo A tienen valores bajos de energía. Sin embargo, este modelo no logra obtener la conformación con la más baja energía ya que esta la obtiene el dímero 10, representado por el modelo C.

La energía interna de los dímeros formados bajo condiciones rígidas, fue mayor que los de condiciones flexibles. Esto es debido, como a pH 5, a que los dímeros flexibles pueden mapear más conformaciones y encontrar mínimos globales de energía interna; mientras que los dímeros rígidos encuentran rápidamente mínimos locales

En el caso del dímero 10, que posee el menor valor de energía interna está siendo representado por el modelo D. En este modelo el área interfacial del dímero que se compare directamente es pequeña (figura 34-B) y los extremos de cada uno de los péptidos se encuentran distantes. De esta manera, las interacciones electrostáticas y de van der Waals ejercen una fuerza mayor ayudando a estabilizar el sistema.



**Fig 30.** Conformaciones con la más baja energía en cada uno de los modelos mas representativos, estructura flexible (A), estructura rígida (B).

#### 4.2.2 pKa

De la misma manera que se realizó el cálculo para el monómero y dímero a pH 5, se realizó el cálculo de pKa. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Aminoácido	pKa	Flexible	Rígido
	Reportado	pKa Calculado	pKa Calculado
Ácido Aspártico	3.80	4.05	3.87
Ácido Glutámico	4.50	3.70	4.53
Histidina	6.50	6.37	7.16
Carbonilo Terminal	3.20	2.68	3.24
Amino Terminal	8.00	8.46	7.93

**Tabla 8.** pKa reportado y calculado para cada aminoácido perteneciente al péptido de estudio.

El ácido aspártico y el ácido glutámico sufren cambios drásticos respecto a sus valores de pKa. En el primer caso, en condiciones flexibles el Asp aumenta su pKa en 0.2; mientras que el aumento en condiciones rígidas es muy bajo. En condiciones flexibles, se observa un aumento en la acidez, lo que se cree es debido por la cercanía con la ser52. En el caso desarrollado del monómero a pH 5, se observa que el Glu50 disminuye su acidez, precedido por la presencia de la his51, la cual en este caso en particular ya ha perdido el protón del nitrógeno δ de su cadena lateral, aumentando su basicidad y disminuyendo la acidez de sus vecinos. Pero esta misma his51, bajo condiciones rígidas disminuye su basicidad, lo que se presenta asumiendo que se da debido a que su ambiente está rodeado por dos aminoácidos ácidos (Glu50 y Ser52), y en cuanto al carbonilo terminal y el amino terminal, se acentuaron más sus propiedades ácidas y básicas.

Aminoácido	pKa	Flexible		Rígido	
	Reportado	pKa - A	pKa - B	pKa - A	pKa - B
A. Aspártico	3.80	2.96	3.94	4.08	4.11
A. Glutámico	4.50	4.70	4.29	3.06	3.76
Histidina	6.50	6.45	6.40	6.33	6.31
Carb. Term.	3.20	3.27	3.34	3.39	3.41
Amin. Term	8.00	7.87	7.85	7.89	7.88

**Tabla 9.** pKa reportados y calculados para cada uno de los aminoácidos con cadena lateral ionizables dentro del péptido de estudio.

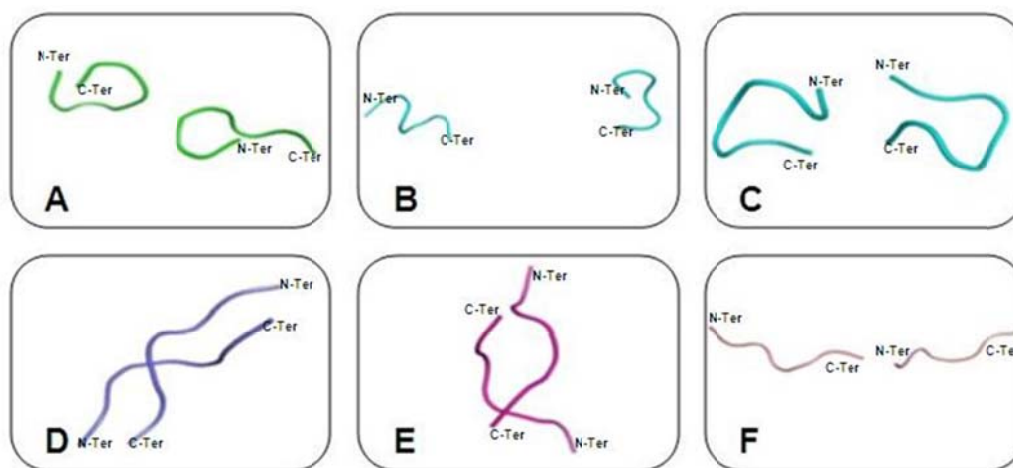
En este estudio se observa principalmente, que Asp53 y glu50 sufrieron grandes cambios en sus valores de pKa, en el Asp53 se observa que el

monómero A bajo condiciones flexibles disminuyó en aproximadamente 0.8, lo que implica un gran aumento en su acidez, es decir, se encuentra rodeado por un ambiente básico. Y en el caso del glu50 se observa que bajo condiciones rígidas su pKa disminuye en un factor de 1.5 haciendo que aumente su acidez, ocasionado por un ambiente químico extremadamente básico. Respecto a los cambios sufridos por los aminoácidos pertenecientes a los dímeros, sus resultados son similares a los obtenidos por el monómero.

#### 4.2.3 Dinámica Molecular

Nuevamente, se tomaron como partida las configuraciones obtenidas del docking. De la misma manera se agruparon de acuerdo con las veces que se repiten en la misma trayectoria. Las diez conformaciones se representaron en tres modelos flexibles y tres modelos rígidos, respectivamente

En la figura 35, se observa que el modelo A representa los dímeros 1, 3, 7, 10 obtenidos bajo condiciones flexibles, el modelo B a los dímeros 4, 5, 8, 9 y el modelo C a los dímeros 2 y 6. Por otro lado, el modelo D representa los dímeros 2, 3, 4 bajo condiciones rígidas, el modelo E los dímeros 1, 7, 8, 9 y finalmente, el modelo F representa los dímeros 5, 6 y 10.



**Fig 31.** A, B y C representan los modelos más representativos de las conformaciones flexibles. A corresponde a 4 conformaciones, B a 4 conformaciones y C a 2 conformaciones. Los modelos D, E y F representan las conformaciones rígidas, donde D representa a 4 conformaciones, E a 3 conformaciones y F a 3 conformaciones.

Las conformaciones obtenidas de dinámica, comparadas con las obtenidas por el docking, no variaron en gran medida, solamente se observa un cambio notable en los dímeros representados por los modelos B y F en los cuales se distanciaron los monómeros.

Al igual que en las conformaciones a pH 5, se calculó la desviación media cuadrática de cada una de las conformaciones obtenidas de la dinámica, respecto a las obtenidas por medio del docking, observando que las estructuras flexibles variando en 6.89Å y las rígidas en 0.35Å.

Dímero	RMS(Å) Flexible	RMS(Å) Rígido
Dímero 1	4.270	0.505
Dímero 2	4.351	0.554
Dímero 3	5.392	0.543
Dímero 4	9.080	0.771
Dímero 5	9.951	9.015
Dímero 6	4.338	14.814
Dímero 7	5.290	0.448
Dímero 8	10.256	0.477
Dímero 9	9.966	0.493
Dímero 10	6.049	7.771

**Tabla 10.** Desviación media cuadrática de cada uno de los dímeros obtenidos por dinámica, respecto a los obtenidos por el docking.

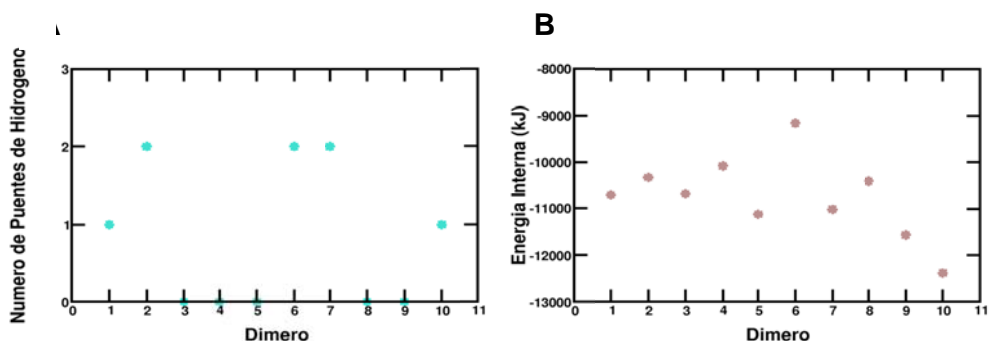
Se observa claramente, que las conformaciones flexibles siguen manteniendo su alta tendencia a cambiar. Como se esperaba, se observa que en las conformaciones flexibles, que son representadas por el modelo B ( 4, 5, 8 y 9) tienen altos valores de desviación media cuadrática, lo que confirma el gran cambio que sufrieron las conformaciones correspondientes a este modelo. Lo mismo se observa en las conformaciones rígidas en las cuales los dímeros representados por el modelo F (5, 6 y 10) fueron los que obtuvieron los valores de desviación media cuadrática más altos, comprobando el gran cambio respecto a las conformaciones obtenidas del docking.

La elevada energía cinética adquirida por los átomos, en la dinámica molecular, ocasionó una separación de los monómeros, en el modelo F.

De la misma manera que con las conformaciones obtenidas a pH 5, se calcularon varias propiedades fisicoquímicas de estos dímeros, siempre tratando de visualizar el comportamiento tanto de las conformaciones flexibles y de las rígidas.

- **Puentes de hidrógeno**

Se estudió la formación de puentes de hidrógeno, presente en cada una de las conformaciones obtenidas de las simulaciones de dinámica, encontrando que en las conformaciones flexibles los aminoácidos his51 y ser52, eran mucho más dispuestos a la formación de dichas interacciones tipo puente de hidrógeno (Tabla 12). Mientras que en las conformaciones rígidas los aminoácidos ser52 y phe56 son los que presentan mayor número de puentes formados. (Tabla 13).



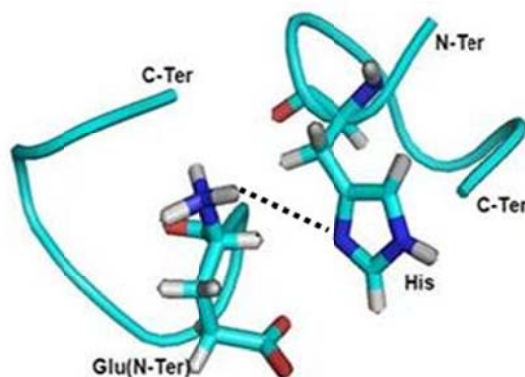
**Fig 32.** Efecto de los puentes de hidrógeno sobre la energía interna de cada conformación en condiciones flexibles.

Dímero	Número de Puentes	Ubicación	Distancia (Å)
Dímero 1(A)	1	HE2:His2 – OE2:Glu8	2.521
Dímero 2(C)	2	H:His2 – ND1:His9	2.723
		HG:Ser3 – OG:Ser10	2.849
Dímero 3(A)	0	NO	
Dímero 4(B)	0	NO	
Dímero 5(B)	0	NO	
Dímero 6(C)	2	HE2:His2 – ND1:His9	2.368
		HE2:His9 – OC1:Phe7	2.595
Dímero 7(A)	2	H1:Glu1 – OG:Ser10	2.768

		H:Ser3 – OD1:Asp11	2.485
Dímero 8(B)	0	NO	
Dímero 9(B)	0	NO	
Dímero 10(A)	2	H:His2 – OG:Ser10	2.801
		HG:Ser3 – OG:Ser13	2.767

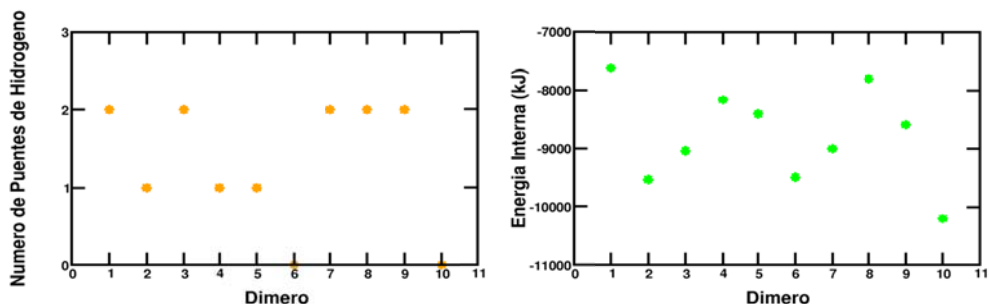
**Tabla 11.** Ubicación de los puentes de hidrógeno encontrados y sus distancias respectivas.

En las conformaciones obtenidas bajo condiciones flexibles, son el 50% de ellas las que no pudieron formar puentes de hidrógeno, pero en las que sí, se nota la tendencia de los aminoácidos his51 y ser55 (figura 38).



**Fig 33.** Formación de uno de los puentes de hidrógeno más representativos (HE1:Glu1<sub>A</sub> – ND:His9<sub>B</sub> de la conformación del modelo A).

En cuanto a las conformaciones rígidas, se aprecia que hubo un porcentaje mayor de dímeros formaron puentes de hidrógeno y en mayor cantidad (figura 39-A).



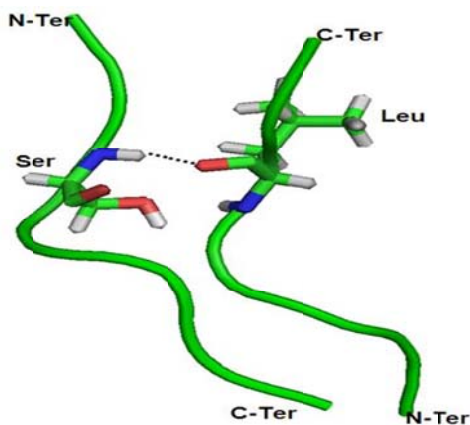
**Fig 34.** Efecto de los puentes de hidrógeno sobre la energía potencial de cada conformación en condiciones rígidas

Los valores obtenidos de energía interna para estas conformaciones (figura 39-B), fueron mayores respecto a las conformaciones flexibles esto debido a la formación de mayor cantidad de puentes de hidrógeno lo que le implica al sistema una mayor energía para poder estabilizarse.

Dímero	Número de Puentes	Ubicación	Distancia (Å)
Dímero 1(E)	2	H:Ser3 – ND1:His9	2.465
		H:Leu5 – OG:Ser13	2.748
Dímero 2(D)	1	HG:Ser13 – OG:Ser13	2.542
Dímero 3(D)	2	H:Ser6 – OG:Ser10	2.594
		HG:Ser6 – OG:Ser13	2.739
Dímero 4(D)	1	HG:Ser6 – OG:Ser13	1.984
Dímero 5(F)	1	H1:Glu1 – NE2:His9	2.696
Dímero 6(F)	0	NO	
Dímero 7(E)	2	HG:Ser3 – OC1:Phe14	2.420
		HG:Ser10 – OC2:Phe7	2.589
Dímero 8(E)	2	H1:Glu1 – OE1:Glu8	2.500
		H:His2 – OC2:Phe14	2.487
Dímero 9(E)	2	H:Ser3 – OG:Ser10	2.617
		HG:Ser6 – OG:Ser13	2.847
Dímero 10(F)	0	NO	

**Tabla 12.** Ubicación de los puentes de hidrógeno encontrados y sus distancias respectivas.

Los aminoácidos serina y leucina presentan la mayor cantidad de puentes de hidrógeno. (figura 40).



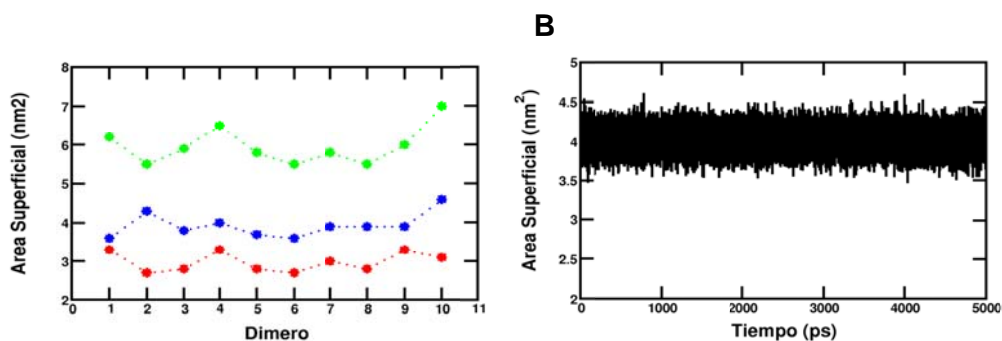
**Fig 35.** Formación de uno de los puentes de hidrógeno más representativos ( $O:Leu5_A - H:Ser10_B$  en la conformación del modelo D).

Al igual que en las conformaciones a pH 5 se observó mayor formación de puentes en las estructuras rígidas, lo que conlleva a deducir que en el proceso

fisiológico se están formando con alta probabilidad puentes de hidrógeno, ya que se presentaron en las conformaciones que simulan parte estructural de la  $\beta 2m$ .

- **Área superficial accesible al solvente**

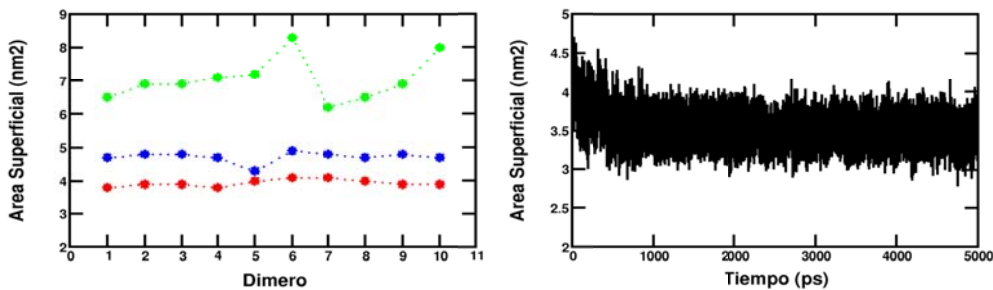
Adicionalmente, se calculó el ASAS para observar las áreas de los monómeros cuando empiezan a hacer parte de los dímeros.



**Fig 36.A.** ASAS de cada uno de los dímeros a pH 7 bajo condiciones flexibles. **Azul:** ASAS promedio del péptido A. **Rojo:** ASAS promedio del péptido B. **Verde:** ASAS promedio del dímero formado. **B.** Comportamiento del área superficial del monómero a pH 7 bajo condiciones flexibles, a lo largo de los 5ns de dinámica correspondiente al péptido A de la conformación 2.

Se aprecia que el área de los dímeros es de un promedio de  $6\text{nm}^2$ , lo que indica que algunos de los dímeros tales como el 4 y el 10 no se encuentran lo suficientemente cerca como para que se hubiera reducido el área total del dímero (figura 42). Cabe resaltar que el dímero 4 se encuentra dentro del modelo B que es en el que los monómeros sufrieron la separación.

**B**

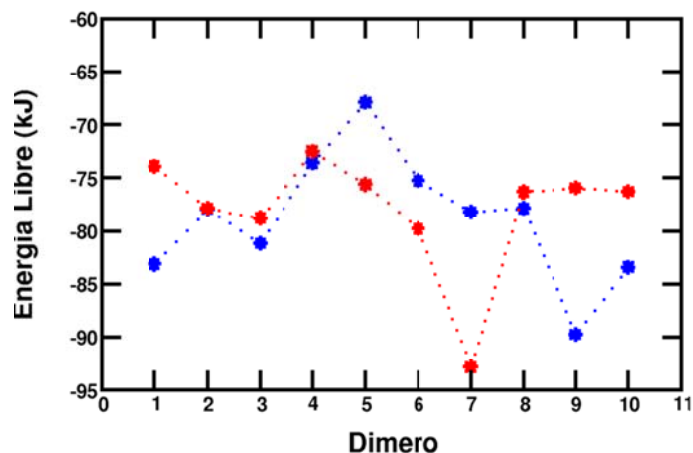


**Fig 37. A.** ASAS de cada uno de los dímeros a pH 7 bajo condiciones rígidas. **Azul:** ASAS promedio del péptido A. **Rojo:** ASAS promedio del péptido B. **Verde:** ASAS promedio del dímero formado. **B.** Comportamiento del área superficial del monómero a pH 7 bajo condiciones rígidas, a lo largo de los 5ns de dinámica correspondiente al péptido B de la conformación 4.

En las conformaciones rígidas, se observa un área con un promedio de  $7\text{nm}^2$ , lo que implica que los monómeros están lo suficientemente juntos, ya que causaron una reducción en el área (figura 44).

- **Energía Libre de Gibbs**

En la gráfica presentada a continuación se observan los valores obtenidos para cada una de las conformaciones, tanto flexibles como rígidas y se puede concluir de manera similar a las simulaciones realizadas a pH 5 que este proceso es llevado a cabo de manera espontánea (Ver anexo 2). Igualmente, factores entrópicos favorecen la espontaneidad del proceso. (Ver anexos 5 y 6).



**Fig 38.** Comparación de energía libre de enlace de las conformaciones en condiciones flexibles y rígidas.

### 4.3 Validación de resultados

Los resultados de las múltiples simulaciones de dinámica molecular, se compararon con los resultados más relevantes reportados en la literatura<sup>[16]</sup>, donde se plantea quien planteó que el heptapéptido Glu50 – Phe 56 de la  $\beta 2m$  se encuentra en el área interfacial del dímero.

También plantea el hecho que son los aminoácidos Ser52 y leu54 son los que tienen la mayor participación en la formación de los puentes de hidrógeno que brindan una gran estabilidad al dímero formado. Esto es apoyado por este trabajo donde se encontró que estos aminoácidos tienen una gran participación en la formación de puentes. (Ver figuras 24, 26, 36, 38 y tablas 6, 7, 12, 13)

En 2010, en un trabajo realizado por Mendoza et al<sup>[23]</sup>. Se plantea que los heptapéptidos son unidos de manera antiparalela. Nuestros resultados, confirman las evidencias experimentales ya que un 75% de las conformaciones obtenidas presentan conformación **antiparalela**, (figuras 19, 21, 31 y 33). Esta conformación favorece un mayor número de interacciones entre los monómeros y valores energéticos favorables.

## 5. CONCLUSIONES

Con base en las simulaciones llevadas a cabo en este trabajo podemos concluir que el proceso de formación de dímeros, a partir del péptido estudiado, es espontáneo.

Nuestros resultados son consistentes con las observaciones experimentales que muestran que los péptidos se precipitan a valores bajos de pH. Sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados también se forman dímeros a valores diferentes de pH, lo que demuestra que el pH no es un factor predominante en la formación de dímeros por parte del péptido de estudio.

Los resultados de este estudio son consistentes con los datos experimentales que muestran que los dímeros formados se organizan de manera antiparalela. Este resultado tiene gran importancia en el entendimiento de la formación de dímeros a partir de unidades de beta-2-microglobulina.

Nuestros resultados también muestran una disminución en el área superficial de los péptidos, cuando se forman los dímeros, consistente con los resultados experimentales reportados en la literatura.

## 6. RECOMENDACIONES

- Consideramos que un mayor refinamiento de los resultados, utilizando un nivel de teoría más alto, puede en principio estudiar el efecto de las cargas de cada aminoácido para tener una mayor idea sobre otro tipo de interacciones electrostáticas.
- Continuar con los estudios de formación de dímeros, con  $\beta 2m$  nativa, para observar la posibilidad de formación de dímeros.
- Realizar el estudio de formación de dímeros con este péptido, mutando algunos de los aminoácidos presentes, para tener una mayor idea de cuales aminoácidos están directamente involucrados en la unión de los monómeros.

## 7. ANEXOS

1. Tabla de los valores obtenidos de energía libre de Gibbs, de las conformaciones a pH 5.

Dímero	Energía Libre (kJ)	
	Flexible	Rígido
Dímero 1	-74.462	-65.875
Dímero 2	-80.965	-63.399
Dímero 3	-85.900	-71.588
Dímero 4	-74.110	-83.363
Dímero 5	-86.876	-82.685
Dímero 6	-70.147	-77.352
Dímero 7	-77.615	-71.781
Dímero 8	-71.168	-71.365
Dímero 9	-69.620	-69.264
Dímero 10	-66.534	-64.889

2. Tabla de los valores obtenidos de energía libre de Gibbs, de las conformaciones obtenidas a pH 7

Dímero	Energía Libre (kJ)	
	Flexible	Rígido
Dímero 1	-83.136	-73.891
Dímero 2	-77.944	-77.867
Dímero 3	-81.167	-78.775
Dímero 4	-73.600	-72.498
Dímero 5	-67.902	-75.619
Dímero 6	-75.253	-79.799
Dímero 7	-78.204	-92.839
Dímero 8	-77.885	-76.324
Dímero 9	-89.744	-75.920
Dímero 10	-83.423	-76.273

3. Valores obtenidos de  $\Delta H$  para los dímeros trabajados a pH 5.

Dímero	$\Delta H$ (kJ)	$\Delta H$ (kJ)
	Flexible	Rígido
Dímero 1	113841.9	114830.7
Dímero 2	113481.0	114553.1
Dímero 3	115840.5	114264.7
Dímero 4	113559.0	114419.8
Dímero 5	113801.1	113463.0
Dímero 6	112995.0	114373.9
Dímero 7	113470.0	114691.0
Dímero 8	113329.0	114077.7
Dímero 9	114792.4	116444.6
Dímero 10	112044.0	113769.0

4. Valores obtenidos de  $\Delta S$  para los dímeros trabajados a pH 5.

Dímero	$\Delta S$ (kJ)	$\Delta S$ (kJ)
	Flexible	Rígido
Dímero 1	367.472	370.634
Dímero 2	366.329	369.731
Dímero 3	373.956	368.827
Dímero 4	366.558	369.365
Dímero 5	367.381	366.276
Dímero 6	364.726	369.198
Dímero 7	366.283	370.202
Dímero 8	365.807	368.223
Dímero 9	370.523	375.851
Dímero 10	361.647	367.206

5. Valores obtenidos de  $\Delta H$  para los dímeros trabajados a pH 7.

Dímero	$\Delta H$ (kJ)	$\Delta H$ (kJ)
	Flexible	Rígido
Dímero 1	2225.0	4813.5
Dímero 2	2602.0	2900.7
Dímero 3	2252.0	3390.2

Dímero 4	2844.0	4265.3
Dímero 5	1812.0	4021.2
Dímero 6	3770.5	2940.5
Dímero 7	1917.0	3426.3
Dímero 8	2520.0	4627.9
Dímero 9	1370.0	3835.7
Dímero 10	542.0	2229.0

---

6. Valores obtenidos de  $\Delta S$  para los dímeros trabajados a pH 7.

Dímero	$\Delta S$ (kJ)	
	Flexible	Rígido
Dímero 1	7.446	15.766
Dímero 2	8.645	9.608
Dímero 3	7.526	11.190
Dímero 4	9.412	13.993
Dímero 5	6.064	13.215
Dímero 6	12.405	9.743
Dímero 7	6.436	11.352
Dímero 8	8.380	15.175
Dímero 9	4.709	12.618
Dímero 10	2.017	7.436

---

## BIBLIOGRAFÍA

1. Cohen, F., Kelly, J. (2003) Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases. *Nature***426**, 905-909.
2. Dobson, C. (2003). Protein folding and misfolding. *Nature* **426**, 884-890.
3. Chiti, F., Dobson, C. (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.***75**, 333-366.
4. Gejyo, F., Homma, N., Suzuki, Y., Arakawa, M. (1986) Serum levels of  $\beta$ 2-microglobulin as a new form of amyloid protein in patients undergoing long-term hemodialysis. *N. Engl. J. Med.* **314**, 585-586.
5. Rochet, J.C. & Lansbury, P.T. (2000) Amyloid Fibrillogenesis: Themes and Variations. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 60-68.
6. Miyata, T., Jadoul, K., Kurokawa, K., Van Ypersele de Strihou, C. (1998)  $\beta$ 2-microglobulin in renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.***9**, 1723-1735.
7. MacParland, V., Kad, M., Kalverda, P., Brown, A., Kirwing, P., Hunter, G., Sunde, M., Radford, E. (2000) Partially unfolded states of  $\beta$ 2-microglobulin and amyloid formation in vitro. *Biochemistry.* **39**, 8735-8746.
8. Morgan, Ch., Gelfand, M., Atreya Ch., Miranker, A. (2001) Kidney Dialysis-associated Amyloidosis: A Molecular Role of Copper in Fiber Formation. *J. Mol. Biol.***309**, 339-345.
9. Antwi, K., Mahar, M., Srikanth, R., Olbris, M., Tyson, J., Vachet, R. (2008) Cu(II) Organizes  $\beta$ -2-microglobulin Oligomers but is Released Upon Amyloid Formation. *Protein Sci.***17**, 748-759.
10. G. Verdone, A. Corazza, P. Viglino, F. Pettirossi, S. Giorgetti, P. Mangione, A. Andreola, M. Stoppini, V. Bellotti, G. Esposito. (2002) The Solution Structure of Human Beta-2-microglobulin Reveals the Prodromes of Its Amyloid Transition. *Protein Sci.* **11**, 487-499.
11. Kozhukh, G. V., Hagihara, Y., Kawakami, T., Hasegawa, K., Naiki, H. & Goto, Y. (2002) Investigation of a Peptide Responsible for Amyloid Fibril Formation of Beta-2-Microglobulin by *Achromobacter* protease I. *J. Biol. Chem.* **277**, 1310–1315.

12. Jones, S., Manning, J., Kad, N. M. & Radford, S. E. (2003) Amyloid-forming Peptides from Beta-2-microglobulin: Insights Into the mechanism of Fibril Formation in Vitro. *J. Mol. Biol.* **325**,249–257.
13. Ivanova, M. I., Gingery, M., Whitson, L. J. & Eisenberg, D. (2003) Rol of the C-Terminal 28 Residues of Beta-2-microglobulin in Amyloid Fibril Formation. *Biochemistry***42**, 13536–13540.
14. Lopez De La Paz, M., Goldie, K., Zurdo, J., Lacroix, E., Dobson, C. M., Hoenger, A. & Serrano, L. (2002) Sequence Determinants of Amyloid Fibril Formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 16052–16057.
15. Ivanova, M., Sawaya, M., Gingery, M., Attinger, A., Eisenberg, D. (2004) An Amyloid-forming Segment of  $\beta$ 2-microglobulin Suggests a Molecular Model for the Fibril. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 10584-10589.
16. Eakin, C., Berman, A., Miranker, A. (2006) A Native to Amyloidogenic Transition Regulated by a *Backbone* Trigger. *Nat. Struct. And Mol. Biol.* **13**, 202-208.
17. Floege, J. & Ehlerding, G. (1996). Beta-2-microglobulin-associated amyloidosis. *Nephron*, **72**, 9-26.
18. Toro, C., Quintana, M., Restrepo, J., Rondón, F., Paéz, O., Iglesias, A. (2007) Manifestaciones Osteoarticulares por Amiloidosis Sistémica. *Rev. Col. Reumat.* **14**, 297-309.
19. <http://www.medicinenet.com/amyloidosis/article.htm>
20. <http://www.amyloidosis.org/whatisit.asp>
21. Rosano, C., Zuccotti, S., Bolognesi, M. (2005) The Three-Dimensional Structure of  $\beta$ 2-microglobulin: Results from X-Ray Crystallography. *Bioch. Et Biophy. Act.* **1753**, 85-91.
22. Khan, A.R., Baker, B.M., Ghosh, P., Biddison, W.E., Wiley, D.C. (2000) The Structure and Stability of an HLA-A\*0201/Octameric Tax Complex with an Empty Conserved Peptide N-Terminal Binding Site. *J. Immunol.* **164**, 6398-6405.
23. Mendoza, V., Antwi, K., Barón-Rodríguez, M., Blanco, C., Vachet, R. (2010) Structure of the Preamyloid Dimer of  $\beta$ 2-microglobulin from Covalent Labeling and Mass Spectrometry. *Biochemistry***49**, 1522-1532.

24. Berg, J., Tymoczko, J., Stryer, L. *Bioquímica* Magalhaes, A., De Campos, J., Motta, P. (Trad.) Editora Guanabara Koogan S.A. 2004. 9-10.
25. <http://www.laguna.fmedic.unam.mx/~estructuraterciariazb.htm>
26. Chen, R., Li, L., Weng, Z. (2003) ZDOCK: An Initial-Stage Protein-Docking Algorithm. *Prot. Struc. Func. And Genet.***52**, 80-87.
27. <http://www.isi.ypc.es/~iea/sld007.htm>
28. Chen, T., Li, L., Weng, Z. (2002) Docking unbound proteins using shape complementary, desolvation and electrostatics. *Proteins.***47**, 281-194.
29. Li, H., Robertson, A., Jensen, J. (2005) Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values. *Proteins.***61**, 704- 721.
30. Levine, I. *Química Cuántica* Requena, A., Bastida, A., Zuñiga, J., (Trad.) Prentice Hall. 2001. 638-646.
31. Cornell, W., Cieplak, P., Bayly, C., Gould, I., Merz, K., Ferguson, D., Spellmeyer, D., Fox, T., Caldwell, J., Kollman, P. (1995) A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules, *J. Am. Chem. Soc.***117**, 5179-5197.
32. Young, D. *Computational Chemistry* John Wiley & Sons, Inc. 2001. 60-62.
33. Bekker, H., Berendsen, H. J. C., Dijkstra, E. J., Achterop, S., van Drunen, R., van der Spoel, D., Sijbers, A., Keegstra, H., Reitsma, B., Renardus, M. K. R. (1993) Gromacs: A parallel computer for molecular dynamics simulations. *Phys. Comp.***92**, 356-367.
34. Berendsen, H. J. C., van der Spoel, D., van Drunen, R. (1995) GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comp. Phys. Comm.***91**, 43-56.
35. Lindahl, E., Hess, B., van der Spoel, D. (2001) Gromacs 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis. *J. Mol. Mod.***7**, 306-317.
36. Van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., Berendsen, H. J. C. (2005) GROMACS: Fast, Flexible and Free. *J. Comp. Chem.***26**, 1701-1718.
37. Van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Van Buuren, A., Apol, E., Meulenhoff, P., Tieleman, P., Sijbers, M., Feenstra, A., Van Drunen H., Berendsen, H. Gromacs User Manual version 4.0, [www.gromacs.org](http://www.gromacs.org) (2005).

38. Conolly, M. (1983) Solvent-Accessible Surfaces of Proteins and Nucleic Acids. *Science*.**221**, 709-713.
39. Serpell, L. (2000) Alzheimer's Amyloid Fibrils: Structure and Assembly. *Bioch. Et Biophys. Act.***1502**, 16-30.
40. Chen, H., Lin, Ch., Wang, V. (2011) Amyloid P Component as a Plasma Marker for Parkinson's Disease Identified by a Proteomic Approach. *Clin. Biochem.***44**, 377-385.
41. Trinh, C., Smith, D., Kalverda, D., Phillips, S., Radford, S. (2002) Crystal Structure of Monomeric Human  $\beta$ 2-microglobulin Reveals Clues to Its Amyloidogenic Properties. *Proc. Natl. Acad. Sci.***99**, 9771-9776.
42. Esposito, G., Michelutti, R., Verdone, G., Viglino, P., Hernandez, H., Robinson, C. V., Amoresano, A., Dal Piaz, F., Monti, M., Pucci, P., Mangione, P., Stoppini, M., Merlini, G., Ferri, G., and Bellotti, V. (2000) Removal of the N-Terminal Hexapeptide from Human  $\beta$ 2-microglobulin Facilitates Protein Aggregation and Fibril Formation. *Protein Sci.* **9**, 831-845.
43. McParland, V. J., Kad, M., Kalverda, P., Brown, A., Kirwin-Jones, P., Hunter, M., Sunde, M. and Radford, S. (2000). Partially unfolded states of  $\beta$ 2-microglobulin and amyloid formation in vitro. *Biochemistry.* **39**, 8735-8746.
44. Relini, A., Canale, C., De Stefano, S., Rolandi, R., Giorgetti, S., Stoppini, M., Rossi, A., Fogolari, F., Corazza, A., Esposito, G., Gliozzi, A., and Bellotti, V. (2006) Collage Plays an Active Role in the Aggregation of  $\beta$ 2-microglobulin under Physiopathological Conditions of Dialysis-Related Amyloidosis. *J. Biol. Chem.***281**, 16521-16529.
45. Lei, H., Wu, Ch., Wang, Z., Duan, Y. (2006) Molecular Dynamics Simulations and Free Energy Analyses on the Dimer Formation of an Amyloidogenic Heptapeptide from Human  $\beta$ 2-microglobulin: Implication for the Protofibril Structure. *J. Mol. Biol.***356**, 1049-1063.