

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Programa Profesional de Ingeniería Biotecnológica



“Interacción de la región poliglutamínica de la proteína que genera la enfermedad de Huntington con osmolitos orgánicos, por métodos de Bioinformática”

Tesis presentada por la Bachiller:

Haruna Luz Barazorda Ccahuana

Para Optar el Título Profesional de:

Ingeniero Biotecnólogo

Asesor: Ing. Jaime Barreda del Carpio

Co-Asesor: PhD. Badhin Gómez Valdez

Arequipa – Perú
2013

Contenido

Contenido	I
Índice de Figuras	V
Índice de Tablas	XV
Glosario	XVI
Resumen	XVIII
Abstract	XX
1. Introducción	1
Objetivos	3
1.1. Objetivo General	3
1.2. Objetivos Específicos	3
Hipótesis	5
2. Marco Teórico	6
2.1. Enfermedades Neurodegenerativas	6

2.1.1.	Enfermedades neurodegenerativas por repeticiones inestables	7
2.2.	Enfermedad de Huntington	11
2.2.1.	Huntingtina	12
2.2.2.	Patogenicidad de la Huntingtina mutada	14
2.2.3.	Neuropatología de la Enfermedad de Huntington	19
2.2.4.	Fisiopatología	21
2.2.5.	Síntomas físicos y psicológicos	21
2.2.6.	Tratamiento	24
2.3.	Incidencia de la Enfermedad de Huntington en el Mundo	25
2.4.	Terapia con Osmoprotectores	25
2.4.1.	Osmolitos	26
2.4.2.	Función de los osmolitos orgánicos	27
2.5.	Bioinformática	29
2.5.1.	Modelamiento Molecular	30
2.5.2.	Modelamiento Protéico	32
2.5.3.	Campos de fuerza para Modelamiento Molecular	34
2.5.4.	Optimización Geométrica	37
2.5.5.	Dinámica Molecular	40
2.5.6.	Interacción Proteína–Ligando	42
2.5.7.	Validación de estructuras	43
2.5.8.	Termodinámica Estadística	44
3.	Metodología y Detalles Computacionales	46
3.1.	Equipos y Software	46

3.2.	Análisis de la estructura primaria de la proteína Huntingtina	50
3.3.	Construcción del primer exón de la Huntingtina nativa	50
3.4.	Construcción del primer exón de la Huntingtina mutada	50
3.5.	Construcción de los osmolitos orgánicos	51
3.6.	Formulación de nuevos campos de fuerza	53
3.7.	Optimización de la geometría	55
3.8.	Dinámica Molecular de estructuras terciarias	56
3.9.	Docking de estructuras terciarias	57
3.10.	Minimización y Dinámica Molecular de estructuras cuaternarias	57
3.11.	Validación de Estructuras	58
3.12.	Obtención y Estudio de Parámetros Termodinámicos	61
4.	Resultados y Discusión	62
4.1.	Obtención de la estructura de la Huntingtina nativa	62
4.2.	Obtención del primer exón de la Huntingtina nativa	64
4.3.	Construcción de la proteína mutada	70
4.4.	Construcción de los diferentes osmolitos	76
4.4.1.	Betaína	77
4.4.2.	Prolina	79
4.4.3.	Taurina	81
4.4.4.	TMAO	83
4.5.	Interacción Proteína mutada con osmolito	85
4.5.1.	Interacción Httm-Betaína	86
4.5.2.	Interacción Httm-Taurina	93

4.5.3. Interacción Httm-TMAO	101
4.5.4. Interacción Httm-Prolina	110
4.6. Potencial Electrostático	118
4.6.1. Potencial electrostático de Huntingtina mutada	118
4.6.2. Potencial electrostático de Httm-Betaína	120
4.6.3. Potencial electrostático de Httm-Taurina	121
4.6.4. Potencial electrostático de Httm-TMAO	128
4.6.5. Potencial electrostático de Httm-Prolina	135
4.7. Estudio de los parámetros termodinámicos	142
Conclusiones	145
Sugerencias	147
Referencias	148
Apéndice	166
A. Archivos utilizados	167



Índice de Figuras

2.1. El gen It15 localizado en el brazo corto del cromosoma 4	11
2.2. Esquema de la distribución de los aminoácidos de la Huntingtina	13
2.3. Anatomía de cerebros de pacientes con enfermedad de Huntington ...	20
2.4. Movimientos coreicos que se presentan en la Enfermedad de Huntington	23
2.5. Tipos de enlaces	36
2.6. Puntos críticos de una Superficie de Energía Potencial	39
2.7. Steepest descent	39
3.1. Pantalla de Molden	51
3.2. Formato final en el programa de Gedit.	53
4.1. Secuencia de la proteína Huntingtina nativa en formato fasta	63
4.2. Obtención de la estructura tridimensional en el PDB	64
4.3. Estructura molecular del primer exón de la Huntingtina normal	65
4.4. Alineamiento de la secuencia obtenida del PDB y NCBI	65
4.5. Estructuras finales terminada la minimización y dinámica de la Huntingtina nativa. (a) Mínima (b) Dinámica	66

4.6. Energías obtenidas de la dinámica molecular del primer exón de la Huntingtina nativa. (a) Energía Potencial (b) Energía Cinética (c) Energía Total (d) Energía potencial (color negro), Energía Cinética (color rojo) y Energía Total (color verde)	67
4.7. Parámetros de estabilidad de la estructura Huntingtina nativa. (a) Permanencia de puentes de hidrógeno (b) Densidad de estados	68
4.8. Desviación media cuadrática del primer exón de la Huntingtina nativa. (a) RMSD (b) RMSF	68
4.9. Diagrama de Ramachandran de la Huntingtina nativa	69
4.10. Huntingtina mutada creada en Molden	70
4.11. Estructura final de la Huntingtina mutada finalizada la minimización .	71
4.12. Estructura final de la Huntingtina mutada finalizada la simulación de dinámica molecular.	71
4.13. Energías obtenidas de la dinámica molecular del primer exón de la Huntingtina mutada. (a) Energía Potencial (b) Energía Cinética (c) Energía Total (d) Energía potencial (color negro), Energía Cinética (color rojo) y Energía Total (color verde)	73
4.14. Parámetros de estabilidad de la estructura Huntingtina mutada. (a) Permanencia de puentes de hidrógeno (b) Densidad de estados	74
4.15. Desviación media cuadrática del primer exón de la Huntingtina mutada. (a) RMSD (b) RMSF	74
4.16. Diagrama de Ramachandran de la Huntingtina mutada	75
4.17. Optimización de la estructura tridimensional con Gaussian de los diferentes osmolitos. (a) Betaína (b) Prolina (c) Taurina (d) TMAO	76
4.18. Representación molecular del osmolito Betaína. (a)Bolas y Varillas (b) Superficie hidrofóbica e hidrofílica	77

4.19. Densidad de Estados del osmolito Betaína	78
4.20. Desviación media cuadrática del osmolito Betaína. (a) RMSD (b) RMSF	78
4.21. Diagramas de la energía del osmolito Betaína. (a) Energía total (b) Energía potencial (color negro), Energía Cinética (color rojo) y Energía Total (color verde)	79
4.22. Representación molecular del osmolito Prolina. (a)Bolas y Varillas (b) Superficie hidrofóbica e hidrofílica	80
4.23. Densidad de Estados del osmolito Prolina	80
4.24. Desviación media cuadrática del osmolito Prolina. (a) RMSD (b) RMSF	80
4.25. Diagramas de la energía del osmolito Prolina. (a) Energía total (b) Energía potencial (color negro), Energía Cinética (color rojo) y Energía Total (color verde)	81
4.26. Representación molecular del osmolito Taurina. (a)Bolas y Varillas (b) Superficie hidrofóbica e hidrofílica	81
4.27. Densidad de Estados del osmolito Taurina.	82
4.28. Desviación media cuadrática del osmolito Taurina. (a) RMSD (b) RMSF	82
4.29. Diagramas de la energía del osmolito Taurina. (a) Energía total (b) Energía potencial (color negro), Energía Cinética (color rojo) y Energía Total (color verde)	83
4.30. Representación molecular del osmolito TMAO. (a)Bolas y Varillas (b) Superficie hidrofóbica e hidrofílica	84
4.31. Densidad de Estados del osmolito TMAO	84
4.32. Desviación media cuadrática del osmolito TMAO. (a) RMSD (b) RMSF	85
4.33. Diagramas de la energía del osmolito TMAO. (a) Energía total (b) Energía potencial (color negro), Energía Cinética (color rojo) y Energía Total (color verde)	85

4.34. Predicción realizada en el servidor de HEX, para la interacción Httm-Betaína	86
4.35. Estructura tridimensional de la interacción Httm-Betaína	87
4.36. Sitio de unión de la Huntingtina mutada con el osmolito Betaína. . . .	87
4.37. Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) 0.5ns (b) 1ns	88
4.38. Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) 1.5ns (b) 2ns c) 2.5ns (d) 3ns	89
4.39. Desviación media cuadrática de la interacción Httm-Betaína. (a) RMSD de Httm (b) RMSD del sistema interactuante	90
4.40. Fluctuación de la interacción Httm-Betaína. (a) RMSF de Httm (b) RMSF del sistema interactuante	90
4.41. Energías obtenidas luego de concluida la dinámica molecular de Httm-Betaína. (a) Energía Total (b) Energía potencial (color negro), Energía Cinética (color rojo) y Energía Total (color verde)	91
4.42. Diagrama de Ramachandran del sistema Httm-Betaína	92
4.43. Predicción realizada en el servidor de HEX para el osmolito Taurina con la Huntingtina mutada. (a) Predicciones realizadas (b) Predicción óptima	93
4.44. Estructura tridimensional de la interacción Httm-Taurina	94
4.45. Sitio de unión de la Huntingtina mutada con el osmolito Taurina. . . .	94
4.46. Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) Superficie sólida a 0.5ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 0.5ns	95
4.47. Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) Superficie sólida a 1ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 1ns	96

4.48. Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) Superficie sólida a 1.5ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 1.5ns	96
4.49. Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) Superficie sólida a 2ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 2ns .	97
4.50. Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) Superficie sólida a 2.5ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 2.5ns	97
4.51. Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) Superficie sólida a 3ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 3ns .	98
4.52. Desviación media cuadrática de la interacción Httm-Taurina. (a) RMSD de la Httm (b) RMSD del sistema interactuante	98
4.53. Fluctuación de la interacción Httm-Taurina. (a) RMSF de la Httm (b) RMSF del sistema interactuante	99
4.54. Energías obtenidas luego de concluida la dinámica molecular de Httm-Taurina. (a) Energía Total (b) Energía potencial (color negro), Energía Cinética (color rojo) y Energía Total (color verde)	99
4.55. Diagrama de Ramachandran del sistema Httm-Taurina.	100
4.56. Predicción realizada en el servidor de HEX para el osmolito TMAO con la Huntingtina mutada	101
4.57. Sitio de unión de la Huntingtina mutada con el osmolito TMAO. ...	102
4.58. Sitio de unión de la Huntingtina mutada con el osmolito TMAO. ...	102
4.59. Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) Superficie sólida a 0.5ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 0.5ns	103
4.60. Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) Superficie sólida a 1ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 1ns .	104
4.61. Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a)	

Superficie sólida a 1.5ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 1.5ns	104
4.62. Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) Superficie sólida a 2ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 2ns .	105
4.63. Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) Superficie sólida a 2.5ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 2.5ns	105
4.64. Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) Superficie sólida a 3ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 3ns .	106
4.65. Desviación media cuadrática de la interacción Httm-TMAO. (a) RMSD de Httm (b) RMSD del sistema interactuante	106
4.66. Fluctuación de la interacción Httm-TMAO. (a) RMSF de Httm (b) RMSF del sistema interactuante	107
4.67. Energías obtenidas luego de concluida la dinámica molecular de Httm-TMAO. (a) Energía Total (b) Energía potencial (color negro), Energía Cinética (color rojo) y Energía Total (color verde)	108
4.68. Diagrama de Ramachandran del sistema Httm-TMAO.	109
4.69. Predicción realizada en el servidor de HEX para el osmolito Prolina con la Huntingtina mutada. (a) Predicciones realizadas (b) Predicción óptima	110
4.70. Sitio de unión de la Huntingtina mutada con el osmolito Prolina. . . .	111
4.71. Sitio de unión de la Huntingtina mutada con el osmolito Prolina. . . .	111
4.72. Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) Superficie sólida a 0.5ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 0.5ns	112
4.73. Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) Superficie sólida a 1ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 1ns .	112
4.74. Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) Superficie sólida a 1.5ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 1.5ns	113

4.75. Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) Superficie sólida a 2ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 2ns .	113
4.76. Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) Superficie sólida a 2.5ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 2.5ns	114
4.77. Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) Superficie sólida a 3ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 3ns .	114
4.78. Desviación media cuadrática de la interacción Httm-Prolina. (a) RMSD de Httm (b) RMSD del sistema interactuante	115
4.79. Fluctuación de la interacción Httm-Prolina. (a) RMSF de Httm (b) RMSF del sistema interactuante	115
4.80. Energías obtenidas luego de concluida la dinámica molecular de Httm-Prolina. (a) Energía Total (b) Energía potencial (color negro), Energía Cinética (color rojo) y Energía Total (color verde)	116
4.81. Diagrama de Ramachandran del sistema Httm-Prolina.	117
4.82. Proteína Huntingtina mutada pre-interacción. (a) Httm Modelo de Superficie (b) Httm con superficie de potencial electrostático	119
4.83. Proteína Huntingtina mutada pre-interacción con 180° de rotación . (a) Httm Modelo de Superficie (b) Httm con potencial electrostático . . .	119
4.84. Pre-interacción del osmolito Betaína.	120
4.85. Post-interacción del osmolito Betaína.	121
4.86. Pre-interacción del osmolito Taurina.	122
4.87. Post-interacción del osmolito Taurina.	122

4.88. Proteína Huntingtina normal y mutada post-interacción. (a) Httm modelo de superficie (b) Httm-Taurina modelo de superficie (c) Httm modelo de superficie y cintas (d) Httm-Taurina modelo de superficie y cintas (e) Httm con superficie de potencial electrostático (f) Httm-Taurina con superficie de potencial electrostático	124
4.89. Proteína Huntingtina normal y mutada post-interacción con 180° de rotación . (a) Httm modelo de superficie (b) Httm-Taurina modelo de superficie (c) Httm modelo de superficie y cintas (d) Httm-Taurina modelo de superficie y cintas (e) Httm con superficie de potencial electrostático (f) Httm-Taurina con superficie de potencial electrostático .	125
4.90. Proteína Huntingtina normal y mutada post-interacción vista de arriba. (a) Httm modelo de superficie (b) Httm-Taurina modelo de superficie (c) Httm modelo de superficie y cintas (d) Httm-Taurina modelo de superficie y cintas (e) Httm con superficie de potencial electrostático (f) Httm-Taurina con superficie de potencial electrostático	126
4.91. Proteína Huntingtina normal y mutada post-interacción vista de abajo. (a) Httm modelo de superficie (b) Httm-Taurina modelo de superficie (c) Httm modelo de superficie y cintas (d) Httm-Taurina modelo de superficie y cintas (e) Httm con superficie de potencial electrostático (f) Httm-Taurina con superficie de potencial electrostático	127
4.92. Pre-interacción del osmolito TMAO	128
4.93. Post-interacción del osmolito TMAO.	129
4.94. Proteína Huntingtina normal y mutada post-interacción. (a) Httm modelo de superficie (b) Httm-TMAO modelo de superficie (c) Httm modelo de superficie y cintas (d) Httm-TMAO modelo de superficie y cintas (e) Httm con superficie de potencial electrostático (f) Httm-TMAO con superficie de potencial electrostático	130

4.95. Proteína Huntingtina normal y mutada post-interacción con 180° de rotación. (a) Httm modelo de superficie (b) Httm-TMAO modelo de superficie (c) Httm modelo de superficie y cintas (d) Httm-TMAO modelo de superficie y cintas (e) Httm con superficie de potencial electrostático (f) Httm-TMAO con superficie de potencial electrostático	131
4.96. Proteína Huntingtina normal y mutada post-interacción vista de arriba. (a) Httm modelo de superficie (b) Httm-TMAO modelo de superficie (c) Httm modelo de superficie y cintas (d) Httm-TMAO modelo de superficie y cintas (e) Httm con superficie de potencial electrostático (f) Httm-TMAO con superficie de potencial electrostático	133
4.97. Proteína Huntingtina normal y mutada post-interacción vista de abajo. (a) Httm modelo de superficie (b) Httm-TMAO modelo de superficie (c) Httm modelo de superficie y cintas (d) Httm-TMAO modelo de superficie y cintas (e) Httm con superficie de potencial electrostático (f) Httm-TMAO con superficie de potencial electrostático	134
4.98. Pre-interacción del osmolito Prolina	135
4.99. Post-interacción del osmolito Prolina.	135
4.100. Proteína Huntingtina normal y mutada post-interacción. (a) Httm modelo de superficie (b) Httm-Prolina modelo de superficie (c) Httm modelo de superficie y cintas (d) Httm-Prolina modelo de superficie y cintas (e) Httm con superficie de potencial electrostático (f) Httm-Prolina con superficie de potencial electrostático	137
4.101. Proteína Huntingtina normal y mutada post-interacción con 180° de rotación . (a) Httm modelo de superficie (b) Httm-Prolina modelo de superficie (c) Httm modelo de superficie y cintas (d) Httm-Prolina modelo de superficie y cintas (e) Httm con superficie de potencial electrostático (f) Httm-Prolina con superficie de potencial electrostático	138

4.102. Proteína Huntingtina normal y mutada post-interacción vista de arriba. (a) Httm modelo de superficie (b) Httm-Prolina modelo de superficie (c) Httm modelo de superficie y cintas (d) Httm-Prolina modelo de superficie y cintas (e) Httm con superficie de potencial electrostático (f) Httm-Prolina con superficie de potencial electrostático	140
4.103. Proteína Huntingtina normal y mutada post-interacción vista de abajo. (a) Httm modelo de superficie (b) Httm-Prolina modelo de superficie (c) Httm modelo de superficie y cintas (d) Httm-Prolina modelo de superficie y cintas (e) Httm con superficie de potencial electrostático (f) Httm-Prolina con superficie de potencial electrostático	141
4.104. Representación en barras de la energía de interacción de los sistemas interactuantes	144
A.1. Archivo para la minimización, con integrador steep	168
A.2. Archivo para la minimización, con integrador l-bfgs	169
A.3. Archivo de dinámica molecular, para todos los sistemas	170
A.4. Archivo de dinámica molecular para la interacción proteína-osmolito .	171
A.5. Datos para el osmolito Betaína	172
A.6. Datos para el osmolito Creatina	173
A.7. Datos para el osmolito Prolina	174
A.8. Datos para el osmolito Taurina	175
A.9. Datos para el osmolito TMAO	176
A.10. Datos de distancias, ángulos y diedros que forman los átomos	177

Índice de Tablas

2.1. Enfermedades por repeticiones inestables diferentes al CAG	9
2.2. Enfermedades por repeticiones inestables CAG	10
2.3. Síntomas en la enfermedad de Huntington	22
2.4. Sistemas de osmolitos orgánicos	27
2.5. Tipos de bases de datos	35
3.1. Conformaciones para el dockeo de proteínas terciarias	58
4.1. Valores de variación de energía	142
4.2. Valores de variación energía de los sistemas interactuantes	143
4.3. Valores de energía de interacción.	144



Glosario

1. HD. Huntington Disease.
2. EH. Enfermedad de Huntington.
3. Htt. Huntingtina.
4. Httm. Huntingtina mutada.
5. It15. Interesting transcript 15.
6. PolyQ. Poliglutaminas
7. SNC. Sistema Nervioso Central.
8. NCBI. National Center for Biotechnology Information.
9. PDB. Protein Data Bank.
10. FFT. Fast Fourier Transform.
11. MM. Mecánica Molecular.
12. DM. Dinámica Molecular.
13. RMSD. Root Mean Square Deviation.
14. RMSF. Root Mean Square Fluctuation.
15. BET. Betaína
16. PRO. Prolina

17. TAU. Taurina

18. TMAO. Trimetil Amin N-Oxido

19. CRE. Creatina



Resumen

La enfermedad de Huntington (EH) es un trastorno neurodegenerativo, autosómico dominante de penetrancia completa, causada por una mutación específica en el gen de la proteína huntingtina (Htt) esta mutación es ocasionada por la repetición inestable del aminoácido glutamina. A medida que las repeticiones de glutaminas se expanden de un grado normal a uno mutante, la tasa de formación de fibrinas amiloides aumenta, lo cual lleva a proponer que los procesos de agregación son fundamentales en la patogénesis de la enfermedad de Huntington.

Estudios recientes muestran que pequeñas moléculas llamadas osmolitos orgánicos, han sido estudiados en salas de experimentación a concentraciones elevadas con proteínas mutantes que generan agregación, estos osmolitos suelen actuar a concentraciones relativamente altas cuando las células están sometidos a condiciones de estrés pues mejoran la estabilidad termodinámica de las proteínas sin perturbar otros procesos celulares. Estos osmolitos son comunes en una variedad de organismos, incluyendo microorganismos, plantas y animales.

Los osmolitos que se investigaron en la presente tesis fueron: taurina, prolina, TMAO y betaína, siendo la taurina un aminoácido singular, que actúa como antioxidante, modulador de calcio, neuromodulador sináptico y estabilizador de la membrana, abundante en todos los tejidos de los mamíferos, con mayor concentración en corazón, fibras musculares, cerebro y retina. La prolina tiene un efecto en la cinética del mal plegamiento proteico in vivo e in vitro. El osmolito TMAO colabora con el plegamiento proteico, así como corregir defectos de plegado, el osmolito betaína contribuye a minimizar la pérdida de agua contra situaciones de hiperosmolaridad.

Para desarrollar un sistema de estudio más detallado se usó herramientas de bioinformática, donde se logró simular dinámicas moleculares de la proteína htt mutada, los cuatro diferentes osmolitos, así como cuatro sistemas interactuantes: httm–betaína, httm–prolina, httm–tmao y httm–taurina, para ello se realizó en un ensamble canónico NVT a una temperatura de 309,65°K, con solvente implícito.

Finalizada la simulación de dinámica molecular se analizó la estructura final de cada sistema en el diagrama de Ramachandran, así como la estructura de superficie de potencial electrostático para validar las estructuras. Por otra parte se analizó los datos de energía total de todos los sistemas y a partir de ellos se obtuvo la energía de interacción (ΔE_i), donde el sistema Httm–taurina presentó mayor energía de interacción y el de menor energía de interacción fue el sistema Httm–betaína.



Abstract

Huntington's disease (HD) is a neurodegenerative disorder, complete penetrance autosomal dominant, caused by a specific mutation in the gene for the protein huntingtin (Htt) this mutation is caused by the repetition of the amino acid unstable glutamine. As glutamine repeats expand regular grade one mutant, the rate of formation fibrin amyloid increases, which leads to propose that aggregation processes are critical in the pathogenesis of Huntington disease.

Recent studies show that small organic molecules called osmolytes, have been studied in experimental rooms at high concentrations with mutant proteins generated aggregation, these osmolytes usually act at relatively higher when the cells are subjected to stress conditions by improving the thermodynamic stability of proteins without disrupt other cellular processes. These osmolytes are common in a variety of organisms, including microorganisms, plants and animals.

The osmolytes investigated in this thesis were: taurine, proline, TMAO and betaine, taurine is a singular amino acid, which acts as an antioxidant, calcium modulator, neuromodulator synaptic and membrane stabilizer, abundant in all tissues of mammals, with the highest concentration in heart muscle fibers, brain and retina. Proline has an effect on misfolding kinetics protein in vivo and in vitro. The osmolyte TMAO collaborates with protein folding and folding correct defects, the osmolyte betaine helps minimize water loss against situations hyperosmolarity.

To develop a more detailed study of bioinformatics tools was used where it was possible to simulate dynamic molecular mutated htt, four different osmolytes and four interacting systems: httm–betaine, httm–proline, httm–TMAO and httm–taurine, for it

was conducted in an ensemble canonical NVT at a temperature of 309.65°K, implicit solvent.

After the molecular dynamics simulation, analyzed the final structure of each system in the Ramachandran plot and the surface structure electrostatic potential, to validate the structures. Furthermore data was analyzed total energy of all systems and they are obtained starting from the interaction energy (ΔE_i), where the system Httm–taurine showed higher interaction energy and the lowest energy interaction was the system Httm–betaine.



Capítulo 1

Introducción

Las enfermedades neurodegenerativas constituyen un amplio capítulo dentro de la patología neurológica. Bajo este epígrafe se incluyen un grupo de enfermedades de causa desconocida y que tienen como atributo común el curso progresivo de los síntomas, reflejo de la desintegración paulatina de una parte o partes del sistema nervioso.

Algunas enfermedades neurodegenerativas se han asociado con la disfunción en algún canal iónico específico, y los mecanismos patogénicos se han investigado a través de estudios biofísicos, genéticos, y morfológicos, tanto en sistemas de expresión heteróloga como en modelos animales. Por otro lado, con el refinamiento en los métodos de estudio en el campo de la epidemiología genética, y con el surgimiento de la genética molecular se ha mostrado que muchas de estas enfermedades son hereditarias, y están vinculadas a mutaciones en genes específicos; así, es posible catalogarlas como enfermedades monogénicas con transmisión autosómica dominante o autosómica recesiva. En algunas de estas enfermedades monogénicas, el gen afectado posee una expansión de repeticiones de tripletes de nucleótidos; estos padecimientos presentan mecanismos patogénicos muy parecidos.

La Corea o Enfermedad de Huntington (HD), conocida también como el Mal de San Vito, es un ejemplo de estas patologías hereditarias. Fue reconocida en 1872 por el médico norteamericano George Summer Huntington, basado en un estudio realizado

a una madre y su hija que presentaban movimientos coreicos, deterioro mental progresivo y tendencias suicidas. Esta enfermedad es ocasionada por un incremento del aminoácido glutamina en la proteína Huntingtina, actualmente se desconoce la función que tiene la proteína normal, es por eso que la información es escasa aún.

Por otra parte pequeñas moléculas (osmolitos) que normalmente ayudan a la célula a sobrevivir en condiciones de estrés también puede evitar la formación de agregados de proteína que conducen a la enfermedad de Huntington. Por esta razón en la presente investigación se realizará el estudio de la función y el efecto de los osmolitos frente a la agregación protéica, una de las causas de la muerte neuronal en la enfermedad de Huntington.

Durante las últimas décadas hemos tenido la ocasión de vivir una evolución sin precedentes en la simulación computacional de materiales a nivel atómico. Las simulaciones se han convertido en una tercera vía de hacer investigación, a medio camino entre la teoría y el experimento. Es por ello que haciendo uso de herramientas de bioinformática lograremos analizar la simulación de dinámica molecular, la cual nos brindará información de como pequeñas moléculas pueden interactuar con una proteína y de esta forma poder discernir si es que existe algún efecto favorable para contrarrestar el efecto de la proteína huntingtina mutada en la enfermedad de Huntington.

Objetivos

1.1. Objetivo General

Determinar la interacción de osmolitos orgánicos frente a la región poliglutamínica de la huntingtina mutada por métodos de Bioinformática.

1.2. Objetivos Específicos

1. Diseñar el primer exón de la proteína Huntingtina nativa y mutada.
2. Diseñar la estructura de los osmolitos orgánicos.
3. Minimizar las energías de las estructuras proteicas a nivel de mecánica molecular.
4. Minimizar las estructuras de los ligandos (osmolitos) a nivel de mecánica cuántica.
5. Elaborar los campos de fuerza de los diferentes osmolitos.
6. Minimizar y simular la dinámica molecular de las estructuras de los ligandos (osmolitos) a nivel de mecánica molecular.
7. Realizar la simulación de la dinámica molecular del primer hexón de la huntingtina mutada.
8. Realizar el docking de las moléculas interactuantes.

9. Determinar la simulación de la dinámica molecular de los sistemas interactuantes receptor–ligando.
10. Determinar y evaluar la variación de las propiedades termodinámicas de energía interna de interacción (ΔU_i) de los sistemas interactuantes.



Hipótesis

Dado que los métodos de bioinformática permiten analizar estructuras a nivel atómico, es probable determinar la interacción de osmolitos orgánicos con la región poliglutamínica de la proteína que genera la enfermedad de Huntington



Capítulo 2

Marco Teórico

Las enfermedades neurológicas son trastornos del cerebro, la médula espinal así como los nervios de todo el organismo. En conjunto, esos órganos controlan todas las funciones del cuerpo. Cuando se presenta anomalías funcionales en el cerebro es posible, que tenga dificultad para moverse, hablar, ingerir, respirar o el simple proceso de aprender, también puede haber problemas con la memoria, los sentidos o el estado de ánimo. Las enfermedades neurológicas representan un grupo de enfermedades que afectan a la población general con importantes repercusiones socioeconómicas. ¹

Existen más de 600 enfermedades neurológicas registradas hasta el momento. Dentro de estas enfermedades neurológicas se encuentran las enfermedades neurodegenerativas que afectan al sistema nervioso central, causando una disfunción progresiva del sistema nervioso. Estas condiciones debilitantes e incurables se caracterizan por la pérdida de la función de las células neuronales y con frecuencia se asocia con atrofia de las estructuras del sistema nervioso afectado. ²

2.1. Enfermedades Neurodegenerativas

El grupo de enfermedades neurodegenerativas tiene enorme importancia médica no sólo por sus devastadoras manifestaciones clínicas y por su frecuencia sino, porque a pesar del notable esfuerzo en la investigación de los últimos años, su etiología no ha podido dilucidarse plenamente. La mayoría de

las enfermedades tiene un comienzo insidioso y un curso progresivo que puede durar por muchos años.³

Una enfermedad neurodegenerativa es el resultado de accidentes cerebrovasculares o de anomalías producidas en el procesamiento de las proteínas durante el ciclo celular, las cuales acaban por acumularse en las neuronas causando disfunción neuronal.

Estas anomalías conducen al deterioro progresivo del sistema nervioso central (SNC) es decir, a la pérdida de la función cerebral más concretamente de la corteza cerebral, dando lugar a graves problemas cognitivos en la memoria, el lenguaje y el pensamiento, generando que el comportamiento humano se vea afectado.

La apoptosis neuronal en las enfermedades neurodegenerativas es un proceso que ocurre muy lentamente en comparación con la muerte neuronal que resulta de accidentes como traumatismos o infartos cerebrales. La apoptosis neuronal involucra la participación de diferentes eventos como: el estrés oxidativo, alteraciones en las concentraciones de calcio dentro y fuera de las células, malformaciones en las estructuras de las proteínas y en algunos casos, la vulnerabilidad a una estimulación excitadora excesiva de las neuronas.⁴

2.1.1. Enfermedades neurodegenerativas por repeticiones inestables

Las mutaciones inestables, descritas a partir del año 1991, son responsables de un número creciente de enfermedades hereditarias del sistema nervioso y multisistémicas.⁵ La transmisión genética de estas mutaciones constituyen una nueva forma de proliferación de las enfermedades hereditarias. Son segmentos de genes que cambian de tamaño en la línea germinal y como consecuencia a través de las generaciones, hasta alcanzar un tamaño que los hace patológicos. En estos casos no se pueden analizar las genealogías

familiares ni estimar riesgos de recurrencia pensando en el modo mendeliano de herencia; en el cual un gen codifica un rasgo y existe una relación de tipo dominancia-recesividad entre alelos; sino que se debe conocer la cantidad exacta de repeticiones que porta cada miembro de una familia afectada, para hacer estimaciones aproximadas de los riesgos reproductivo, de recurrencia e inclusive de llegar a manifestar síntomas.

Entre las mutaciones inestables, el tipo más frecuente ocurre cuando tres nucleótidos repetidos en forma sucesiva en (tandem) se presentan en una cantidad mayor a la normal en el gen involucrado, produciendo alteración en la función génica, la cual se puede reflejar en anormalidades del metabolismo de los ácidos ribonucleicos (ARNs), o en la ausencia o producción anormal de la proteína. Como consecuencia de esto se produce una enfermedad neurológica o multisistémica, dependiendo del gen afectado.⁶ También se han encontrado mutaciones inestables en las cuales la unidad de repetición no está compuesta por tres nucleótidos, sino por cuatro, como la distrofia miotónica tipo 2, donde se repite el tetranucleótido CCTG⁷, o cinco como en el caso de la ataxia espinocerebelar tipo 10 (SCA 10), en la cual la unidad de repetición es ATTCT⁸, y hasta doce como en la epilepsia mioclónica progresiva⁹ ver tabla2.1.

La cantidad de enfermedades atribuidas a este tipo de mutaciones aumenta conforme avanza la investigación sobre el fundamento molecular de las patologías neurodegenerativas, en 1999 eran dieciocho¹⁰, ahora son veinte, por lo que es probable que en el futuro se continúen identificando otras.

Se puede intentar hacer una clasificación dependiendo de la unidad que se repite, teniendo por un lado a un grupo que son causadas por repeticiones del trinucleótido CAG (citosina, adenina, guanina). En la mayoría de ellas, la mutación se localiza en regiones codificantes de los genes, lo que causa la producción de proteínas con un segmento mayor de poliglutamina ver tabla2.2. A este grupo pertenecen la enfermedad de Huntington, las ataxias espinocerebelares (SCA) tipo 1, 2, 3, 6, 7, 12 y 17; la atrofia muscular espinobulbar o enfermedad de Kennedy y la atrofia dentatorubral-palidoluisiana.

Tabla 2.1: Enfermedades por repeticiones inestables diferentes a CAG

	Localizacion	Tripleta	Nr Rep. Normales	Nr. Rep. Inestables	Gen	Proteína	Influencia Sexo padres
Sindrome X fragil A	Xq27.3	CGG	2-51	52-200 pre. 200-1000 afec.	FMR1 (FRAXIA)	FMRP	Materna
Sindrome X fragil E	Xq28	GCC	6-25	26-200 pre. >200 afec.	FMR2 (FRAXE)	Proteina FMR2	ND
Distrofia Miotonica	19q13.3	CTG	5-37	50. <1000 afec.	DMPK	Miotonina	Materna
Distrofia Miotonica tipo 2	3q21	CCTG	<75	75-11000 afec.	ZNF9	Prot. Dedos de zinc 9	
Ataxia de Friedreich	9q13	GAA	8-22	80-99 pre. 100- 1700 afec.	X25	Frataxina	Materna
Ataxia espinocerebelar tipo 8	13q21	CTG	2-44	45-110 interm. >110 afec.	SCA8 antisentid o	ARN	Materna
Enfermedad similar a Huntington tipo 2	16q24.3	CTG	<40	>40 afec.	JPH3	Juntofilina3	ND
Distrofia muscular oculofaringea	14q11	GCG	6	7 8-13 afec.	PABP2	Proteina2	ND
Epilepsia mioclonica prgresiva	21q22.3	CCCCGC CCCGCG	2-3	13-17 45-70	CSTB (EPM1)	Cistatina B	Paterna
Ataxia espinocerebelar 10	22q13	ATTCT	10-22	920-4140	SCA10	Ataxina 10	Paterna

Tabla 2.2 : Enfermedades por repeticiones inestables CAG

	Localizacion	Tripleta	Nr Rep. Normales	Nr. Rep. Inestables	Gen	Proteina	Influencia Sexo padres
Enfermedad de Huntington	4p163	CAG	6-39	36-150	IT15	Huntingtina	Paterna
Ataxia espinocerebelar Tipo-1	6p23	CAG	6-39	41-81	ATX1	Ataxina-1	Paterna
Ataxia espinocerebelar Tipo-2	12q24.1	CAG	14-32	35-64	ATX2	Ataxina-2	Paterna
Ataxia espinocerebelar Tipo-3 o ataxia Machado-Joseph	14q32.1	CAG	12-40	41-86	ATX3(MJ DI)	Ataxina-3	ND
Ataxia espinocerebelar Tipo-6 / Ataxia episodica 2	19p13	CAG	4-18	21-27 SCA2 y 20-23 AE2	CACNA1 A	Subunidad alfa 1 A (dep. De voltaje) del canal de calcio	Paterna Paterna
Ataxia espinocerebelar Tipo-7	3p12-13	CAG	7-17	38-130	SCA7	Ataxina-7	Paterna
Ataxia espinocerebelar Tipo-12 Tipo-12	5q31-q13	CAG	9-28	55-78	PPP2R2B	Reguladora de PP2A	Paterna
Ataxia espinocerebelar Tipo-17	6q27	CAG	25-42	43-55	SCA17	TBP (proteina que enlaza TATA)	ND
Atrofia muscular Espinobulbar	Xq12	CAG	9-36	38-62		Receptor Androgenos	Paterna
Atrofia dentatorubral-Palidoolusiana	12p1331	CAG	3-36	49-88	DRPLA(B 37)	Atrofia-1 (drplap)	Paterna

Se caracterizan por presentar pérdida neuronal progresiva en diferentes grupos de neuronas dependiendo de la enfermedad. La cadena anormal de poliglutamina confiere propiedades tóxicas a la proteína respectiva, causando como efecto final la muerte celular.

2.2. Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington (**EH**) es una enfermedad neurodegenerativa hereditaria, caracterizada por disfunciones motoras y cognitivas.¹¹ Tiene una prevalencia de 5-10 afectados por cada 100 000 personas, sin distinción de sexo, raza u origen.¹² Presenta una herencia autosómica dominante y está causada por una mutación en el gen IT15 (interesting transcript 15) (ver Figura 2.1), localizado en el brazo corto del cromosoma 4 (4p16.3).¹³ Este gen, codifica para una proteína de 350 kDa llamada Huntingtina (**Htt**).

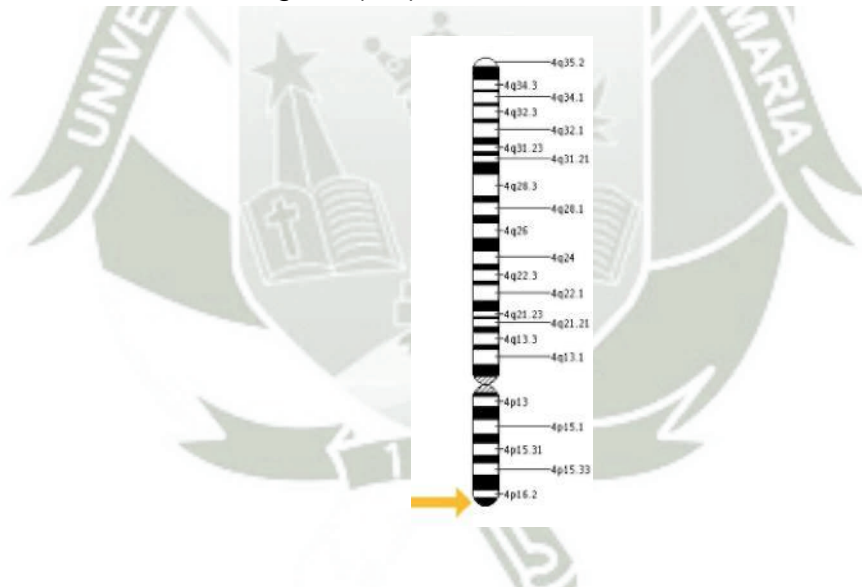


Figura 2.1: El gen It15 localizado en el brazo corto del cromosoma 4

Esta enfermedad suele aparecer entre los 35 y los 50 años de edad y empeora progresivamente hasta la muerte de los pacientes, unos 15-20 años después. Existe también casos de aparición juvenil mucho más severos, de hecho, hay una correlación inversa entre el número de tripletes CAG y la edad de aparición de la enfermedad,

siendo a mayor número de tripletes, los síntomas aparecen temprano y suelen ser más severos.¹⁴

La naturaleza hereditaria de esta corea fue brillantemente descrita en el siglo XIX por el doctor George Huntington, por lo que la enfermedad se designa por su nombre. Con el descubrimiento del gen responsable, las investigaciones se han centrado en encontrar los mecanismos moleculares implicados. El periodo asintomático de la enfermedad se superpone con una fase pre-diagnóstica en la que los pacientes comienzan a mostrar pequeños cambios en la personalidad, la cognición y el control motor. El diagnóstico se realiza cuando estas alteraciones se agudizan y aparece la sintomatología clásica. Aunque el desarrollo de la corea es útil para el diagnóstico, no es un marcador indicativo de la severidad de la enfermedad. Individuos con una edad de comienzo temprana no siempre la desarrollan.

2.2.1. Huntingtina

La Huntingtina es una proteína de 3.144 aminoácidos, tiene una cadena polimórfica de repeticiones del trinucleótido CAG (Citosina, Adenina, Guanina) cerca del extremo **5'** en el primer exón del gen IT15. Las expansiones son traducidas en un segmento de poliglutamina (polyQ) cerca de la región amino terminal.¹⁵

Esta expansión CAG/polyQ tiene de 6 a 39 unidades en individuos normales y de 36 a 180 en pacientes con EH ¹⁶, adquiriendo sus propiedades tóxicas y apareciendo irremediamente los síntomas de la enfermedad.¹⁷ Esta sobreposición entre los rangos normales y patológicos de la expansión polyQ sugiere que la patogenia de la EH es multifactorial e incompletamente penetrante en algunas poblaciones.¹⁸

La estructura de la proteína apenas revela información de su función biológica, y carece de dominios bien definidos. Sin embargo presenta algunas regiones interesantes.

La secuencia polyQ comienza en el decimoctavo aminoácido, y, en individuos no afectados, contiene hasta 34 residuos de glutamina.¹³ En 1994, se demostró que la región polyQ forma parte de una estructura Polar Zipper, y que tiene como función la de unirse a factores de transcripción¹⁹, demostrándose así que la Htt normal interactúa con varias parejas y que la cola de polyQ actúa regulando dicha unión.^{20,21}

En los vertebrados superiores, la región polyQ es seguida por un poliprolina (polyP), que ayuda a mantener la proteína en solución.²² Seguido de esta región están las repeticiones llamadas HEAT (huntingtina, factor de elongación 3, una subunidad de la proteína fosfatasa 2A y TOR1), que son secuencias de aproximadamente 40 aminoácidos que aparecen varias veces dentro de la proteína.^{23,24} (Figura 2.2)



Figura 2.2: Esquema de la distribución de los aminoácidos de la Huntingtina

Otras secuencias activas en el extremo carboxi C-terminal son las llamadas NES (nuclear export signal) y NLS (nuclear localization signal), las cuales podrían estar implicadas en el transporte de moléculas desde el núcleo al citoplasma. Por último, presenta cuatro modificaciones post-transduccionales: sumoilación y ubiquitinación, en varias lisinas a nivel del extremo amino N-terminal; forforilación en las serinas 421 y 434; y palmitoilación, aunque se desconoce la posición exacta del aminoácido. Esta última modificación parece que puede estar implicada en la regulación del tráfico vesicular.

La Htt es predominantemente citoplasmática, y se puede encontrar en el núcleo.²⁵ Se expresa en todas las células humanas, con altas concentraciones en cerebro y testículos, cantidades moderadas en hígado, corazón y pulmón.²⁶

En el cerebro, la proteína se expresa uniformemente en los cuerpos celulares

neuronales y en las dendritas y puede asociarse con vesículas sinápticas y/o microtúbulos,^{27 28} por lo tanto, la huntingtina parece desempeñar un papel importante en el transporte de las vesículas y/o en la unión al citoesqueleto. Intracelularmente, la huntingtina se asocia con varios orgánulos, incluyendo el núcleo, el retículo endoplasmático y aparato de Golgi.^{27 29}

El papel que desempeña la proteína huntingtina aún no está bien entendido. A pesar de su gran tamaño, ha sido difícil establecer la función normal de la huntingtina debido a que contiene muy poca homología con otras proteínas.

La Htt parece ser importante para la embriogénesis, como lo sugiere el hecho de que la eliminación de los dos alelos de la proteína es letal in útero.³⁰ Dando a conocer que la Htt está involucrada en los procesos anti-apoptóticos durante el desarrollo embrionario (conclusión de la gastrulación), formación de somitas y la organogénesis.^{31 32}

Varias líneas de evidencias han demostrado que la Htt normal es capaz de proteger a las células del cerebro de los estímulos apoptóticos^{33, 34, 35} y tiene un efecto neuroprotector in vivo.³⁶ Interesantemente se ha demostrado que la proteína tiene un papel en la endocitosis mediada por clatrina, en el transporte neuronal y en la señalización postsináptica, interactuando con un número de vesículas proteicas sinápticas, las cuales son esenciales para la exocitosis y endocitosis en las terminales sinápticas.³⁷ La Htt tiene un papel pro-supervivencia que se ha observado en diversos tipos de células del cerebro, así como en células aisladas de tejidos periféricos.³⁸

2.2.2. Patogenicidad de la Huntingtina mutada

Múltiples investigaciones han sido llevadas a cabo para determinar la función y efecto patológico de la poliglutamina; todas concluyen que su papel es complejo y que opera en muchos niveles celulares. Estudios recientes demuestran que la degeneración neuronal en la enfermedad resulta de un efecto combinado de ganancia de función en la forma mutada de la huntingtina, con pérdida de función del tipo silvestre.^{39 38}

Existen evidencias que apoyan la hipótesis de que la ganancia tóxica de función,

ocasionada por la huntingtina, conduce a la neurodegeneración en la EH. Esta ganancia de función podría ser debida a la hiperactividad de una función normal o a la introducción de una función novedosa distinta a la actividad biológica de la proteína normal. El proceso patogénico ocasionado por el aumento en el número de residuos de glutamina, podría incluir interacciones novedosas con otras proteínas, lo cual conduciría a una alteración del funcionamiento celular, o a una polimerización para formar grandes agregados insolubles.⁴⁰

La huntingtina interactúa, a través de sus residuos de glutamina, con la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), produciendo una inhibición de su actividad y la consiguiente pérdida en el metabolismo energético.⁴¹ Esta inhibición enzimática apoya la hipótesis de que la neurodegeneración selectiva en la EH es debida a una alteración en el metabolismo energético. La huntingtina también se une a una proteína cuya función se desconoce (proteína asociada a la huntingtina o HAP-1). Esta unión se intensifica con el aumento en el número de residuos de glutamina, con lo cual se produciría un cambio de función.⁴¹ La HAP-1 parece desempeñar un rol muy importante en la patología molecular de la EH, debido a que esta proteína se expresa exclusivamente en el cerebro e interactúa con la dinactina que es un componente citoesquelético⁴², cuya unión a la huntingtina es dependiente de los residuos polyQ.

Se desconoce el mecanismo de la formación de los agregados insolubles, en los cuales la codistribución de la ubiquitina y la huntingtina mutante sugiere que la proteólisis de esta última, dependiente de la ubiquitina, es incompleta. Se ha sugerido que la expansión de los residuos de glutamina forma láminas β condensadas las cuales, mediante enlaces hidrógeno entre los grupos amida de la cadena principal y las cadenas laterales polares, conducen a la agregación y a la precipitación de la huntingtina.⁴³

De hecho, la región terminal amínica de esta proteína forma agregados en un modelo de cultivo celular, solamente cuando se aumenta el número de residuos de glutamina en la cadena polyQ.⁴⁴ In vitro, el umbral para la agregación de la huntingtina se encuentra entre 35 y 45 residuos de glutamina, rango que se aproxima a la cifra crítica para el

desarrollo de la EH.⁴⁵ No se sabe cómo contribuyen los agregados a la alteración de la función celular aunque se piensa que pueden afectar la transcripción del gen, las interacciones entre las proteínas, el transporte de las proteínas dentro del núcleo y el citoplasma, así como el transporte de las vesículas.⁴⁶ Sin embargo, recientemente se demostró que existe una disociación entre la agregación de huntingtina y el patrón selectivo de la pérdida de las neuronas del estriado observado en la EH.

Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que la agregación de la huntingtina no es buen signo para predecir la pérdida neuronal. Más que un precursor de la muerte neuronal, la agregación de la huntingtina mutante puede ser un mecanismo citoprotector contra la neurotoxicidad inducida por la polyQ.⁴⁷ Las propiedades de la huntingtina mutante distintas a su agregación, tales como su proteólisis y las interacciones con otras proteínas que afectan el tráfico de las vesículas y el transporte nuclear, pueden ser suficientes para causar neurodegeneración en el estriado y la corteza. Se deduce, entonces, que la huntingtina mutante interviene en múltiples vías patogénicas que conducen a la muerte neuronal.⁴⁸

La huntingtina también interactúa con otras proteínas como la transglutaminasa, que cataliza la formación de enlaces covalentes entre residuos de glutamina (donante) y de lisina (receptor).⁴⁹ Se ha postulado que la transglutaminasa tisular puede contribuir a la formación de los agregados intraneuronales.⁵⁰

La proteína 1 que interactúa con la huntingtina (HIP1) interviene en la regulación del citoesqueleto; cuando se pierde su interacción normal con la huntingtina puede afectarse la integridad del complejo membrana-citoesqueleto.^{51 52}

La huntingtina también se une a la calmodulina,⁵³ a los microtúbulos^{28 54} y a la enzima cistationina β sintetasa⁵⁵ que convierte la metionina en cisteína y cuya inhibición puede conducir a la acumulación de homocisteína y al daño excitotóxico.

La proteína 2 que interactúa con la huntingtina (HIP2) es una enzima que conjuga la ubiquitina; cuando se pierde esta interacción huntingtina-ubiquitina, no se produce la proteólisis de la huntingtina.⁵⁶ La conjugación de la ubiquitina con una proteína

(en este caso la huntingtina) es una vía comúnmente utilizada para la degradación de las proteínas⁵⁷, por lo que las concentraciones celulares de huntingtina son normalmente reguladas en parte por la proteólisis que depende de la ubiquitina. Es importante destacar que la huntingtina mutante se conjuga con la ubiquitina pero no es degradada^{58 59} lo cual aumenta su propensión a la formación de agregados.

Teoría de la neurotoxicidad de las poliglutaminas como mecanismo patológico de la EH

El exceso de polyQ al parecer induce cambios conformacionales en la huntingtina de individuos afectados, formando agregados intracelulares, que en la mayoría de los casos se manifiestan como inclusiones intranucleares. La agregación de proteínas es un fenómeno muy extendido que se produce durante el plegamiento de proteínas *in vitro* e *in vivo*.^{60 61}

Algunos autores sugieren la posibilidad que el tracto de PolyQ adquiriera una conformación llamada μ -hélice^{62 63 64}, según esta hipótesis, tal conformación sería capaz de formar “poros” ionóforos en la membrana celular. En el trabajo del grupo de investigación de Hirakuta⁶² realizado en bicapas lipídicas, los tractos PolyQ después de formar agregados fueron aparentemente capaces de formar poros en estas membranas. Los autores sugieren que estos poros podrían crear un desequilibrio electrolítico letal en las células y lo proponen como mecanismo de toxicidad en enfermedades como la de Huntington.

Las proteínas con grandes cadenas de PolyQ son poco solubles, y esta característica se ha asociado a su toxicidad y a la muerte celular que produce neurodegeneración en las enfermedades asociadas a polyQ. Esta baja solubilidad depende del tamaño del segmento de glutaminas; el peso molecular de una proteína que contiene una extensión en la cadena de PolyQ se incrementa en varios kilodaltons y, al aumentar la proteína de tamaño, ésta adquiere nuevas conformaciones y mal plegamiento.^{65 66 67}

Las expansiones de PolyQ pueden plegarse sobre sí mismas para formar la configuración denominada lámina beta. Las proteínas con esta estructura pueden agregarse

y formar cuerpos de inclusión. En la SCA1, SCA2, SCA3 y SCA7, estas inclusiones son intranucleares (IIN), en la SCA6 son citoplásmicas (IC), y en la enfermedad de Huntington pueden aparecer ambos tipos.⁶⁷ Debido a la formación de estos IIN y IC, las enfermedades de PolyQ pueden considerarse como proteinopatías cuyo mecanismo patogénico podría ser similar al producido por los depósitos β -amiloides en la enfermedad de Alzheimer, por los cuerpos de Lewy en la enfermedad de Parkinson o bien por las proteínas priónicas en la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob.⁶⁸

Las expansiones de glutaminas no solamente se han encontrado en pacientes afectados fenotípicamente, sino que se han observado después de introducirlas experimentalmente, tanto en células de cultivo como en animales de laboratorio, por lo cual se cree que estas expansiones pueden desencadenar por sí mismas el proceso de neurodegeneración.⁶⁹ Un posible mecanismo patogénico asociado a la formación de IIN y IC a partir de cadenas de PolyQ, involucrando al sistema de señalización de la ubiquitina; este mecanismo de homeostasis intracelular se activa para degradar proteínas con un plegamiento anómalo.⁷⁰

La ubiquitin-proteasa (ubiquitina) es responsable de la degradación de la mayoría de las proteínas celulares con tal eficiencia que es capaz de degradar el 30 % de las proteínas celulares en 10 minutos. A través de las enzimas ubiquitin ligasas E1, E2 y E3 la ubiquitina se une a la proteína a degradar hasta formar un complejo “poliubiquitinizado” para que finalmente el proteosoma 26S desubiquitine al complejo y en el proceso degrada la proteína en pequeños péptidos.⁷¹ Todo parece indicar que las proteínas mutantes con PolyQ se degradan difícilmente y que incluso los fragmentos resultantes continúan siendo insolubles.

El hecho de encontrar los agregados tanto dentro como fuera del núcleo nos hace considerar la posibilidad de más una vía de que conduzca a la muerte celular por PolyQ. Una vez ubiquitinizada, la proteína mutante con la conformación de lámina-beta puede ser introducida al núcleo, en el cual se forman los IIN.^{70 66 72} Por sus características polares la conformación beta tiene la capacidad de funcionar como un cierre de lisina

que podría interferir en la transcripción de algunos genes; esto eventualmente conduciría a la apoptosis celular.^{65 73}

2.2.3. Neuropatología de la Enfermedad de Huntington

A pesar que la proteína mutada se encuentra en muchos lugares a lo largo del SNC,⁷⁴ la neurodegeneración aparece específicamente en el Cuerpo Estriado y en la corteza cerebral. La razón por la cual las lesiones se concentran en estas áreas es desconocido.

El Cuerpo Estriado es parte de los Ganglios Basales, que son un grupo de núcleos de masa gris interconectados que participan en funciones motoras y no motoras.⁷⁵ Se encuentran en la profundidad de la sustancia blanca de cada hemisferio cerebral. Algunos textos se refieren a ellos como Núcleos Basales, sin embargo ese término no es utilizado por la mayoría de los neurocientíficos.⁷⁶

Los Ganglios Basales están asociados principalmente con el inicio y fin de los movimientos voluntarios e involuntarios, así como el control de los ajustes requeridos por los mismos.⁷⁷ La función no motora de los Ganglios Basales se relaciona con procesos cognitivos y la emoción.

Las lesiones en estos núcleos producen alteraciones del movimiento tales como coreas, atetosis, balismos, distonias y tics. Nótese la diferencia respecto a las lesiones en la corteza cerebral que usualmente provocan pérdida total de movimiento.⁷⁵

El Cuerpo Estriado está formado por tres núcleos llamados: Caudado, el Putamen y el Globo Pálido.^{75 76}

- El Núcleo Caudado es una estructura en forma de C que se encuentra superior al tálamo. Tiene tres porciones: cabeza, cuerpo y cola. La Cabeza del Núcleo Caudado se encuentra en contacto con una de las paredes del ventrículo lateral. Está asociado con el Sistema Límbico⁷⁶, especialmente su parte anterior. Por esta razón se dice que tiene relación con emociones tales como ira, placer, docilidad y afecto.⁷⁶ Algunos estudios indican que la actividad de las neuronas en este

núcleo se puede apreciar antes de los movimientos oculares y que está asociado también con procesos cognocitivos.⁷⁷

- El Putamen se encuentra más cerca de la corteza cerebral mientras que el Globo Pálido se encuentra más profundo. La actividad de las neuronas del Putamen precede a los movimientos corporales⁷⁶, especialmente brazo, pierna y cara.
- El Globo Pálido participa en la regulación del tono muscular de ciertos movimientos.

Estos dos ganglios forman una estructura que se conoce como Núcleo Lenticular. En etapas avanzadas de la Enfermedad de Huntington se observa dilatación de los cuernos frontales de los ventrículos laterales y los característicos ventrículos en vagón (atrofia de la cabeza del núcleo caudado)⁷⁴ en la figura 2.3 se observa que el cerebro de un paciente afectado con la EH, tiene un cerebro más pequeño en comparación con la de un paciente sano, esto es debido a la marcada atrofia del núcleo caudado y dilatación ventricular.



Figura 2.3: Anatomía de cerebros de pacientes con enfermedad de Huntington

También existe una retracción de las dendritas, predominantemente en la corteza cerebral. Mientras que la atrofia en los Ganglios Basales explica los trastornos de

movimiento, la lesión en la corteza cerebral tiende a explicar los problemas psiquiátricos, incluida la demencia progresiva asociada a los cambios de personalidad.⁷⁸ El resto de los Ganglios Basales (Clastrum, Núcleo Amigdalino, Núcleo Subtalámico, Sustancia Negra y Roja) no parecieran estar afectado por la Enfermedad de Huntington, sin embargo sí están relacionadas con otras patologías donde se observan trastornos de movimiento, tales como el parkinsonismo.⁷⁷

2.2.4. Fisiopatología

Como se mencionó anteriormente, la expansión de trinucleótidos CAG conduce a la aparición de la proteína Htt mutada con una capacidad anormal de agregación que es directamente proporcional al número de repeticiones. La presencia de esta proteína mutada altera las dendritas y posteriormente produce la muerte neuronal por apoptosis. Hay evidencia de disfunción neuronal inicialmente en el Cuerpo Estriado. En etapas avanzadas de la enfermedad se observa atrofia, especialmente en el Putamen.

Las lesiones también están patológicamente caracterizadas por la proliferación de astrocitos en el SNC (gliosis). Algunos autores mencionan específicamente el proceso de astrocitosis reactiva.⁷⁴ Los astrocitos son las células más grandes de la neuroglía⁷⁵ (células de apoyo del SNC). Se piensa que estas células están relacionadas con la cicatrización del tejido dañado.⁷⁵

2.2.5. Síntomas físicos y psicológicos

En la Enfermedad de Huntington, los trastornos cognitivos y psiquiátricos tienden a aparecer meses o años antes de los motores.^{74 78} Existen estudios que han analizado la posibilidad de detectar el déficit neuropsicológico cuando el paciente aún es presintomático⁷⁸, sin embargo es difícil realizar un diagnóstico apropiado solamente con pruebas psicológicas. El marco de los trastornos cognitivos y psiquiátricos es variable^{74 78} y comprende desde sutiles modificaciones en la personalidad hasta

trastornos psicóticos ⁷⁴ (ver tabla 2.3).

Tabla 2.3: Síntomas en la enfermedad de Huntington

Trastornos psiquiátricos	Trastornos físicos	Anormalidades motoras menores
Depresión	Movimientos coréicos de los miembros	Inquietud
Irritabilidad	Giros de Cabeza	Movimientos oculares
Disminución de memoria	Protusión de lengua	Nistagmo
Pérdida de Autocrítica	Gesticulación facial (muecas)	Hiperreflexia
Distractibilidad	Levantamiento de Hombros	Disartria
Cambios afectivos		Disfagia
Ansiedad		Atetosis
Apatía		Movimientos rápidos y excesivos de los dedos
Agresividad		
Insomnio		
Alucinaciones		
Tendencia al Suicidio		

La demencia es progresiva ^{74 78 79 77} y termina siendo global en etapas avanzadas ^{74 78} y está establecido que es de tipo subcortical. ^{80 74 78} Este tipo está caracterizado por trastornos en el Sistema Activador Reticular Ascendente ⁸⁰, que es el encargado de controlar los estados de despertamiento, alerta y atención y tiene un papel central en el reconocimiento selectivo. ⁷⁵ Estas funciones explican la distractibilidad, el insomnio y en cierta medida los problemas cognitivos. ⁷⁵ Estudios en este tipo de

demencias indican que el paciente muestra dificultad para iniciar el proceso de atención y se distrae con facilidad.⁸⁰ Las respuestas pueden ser acertadas pero requieren una gran cantidad de tiempo para producirlas.⁸⁰

Las manifestaciones físicas se caracterizan por hipercinesias coreicas.^{75 74 79} La corea, es un trastorno del movimiento donde se observan sacudidas súbitas, rápidas, frecuentes e involuntarias^{75 76 78}, en el caso particular de EH, los movimientos son desordenados, arrítmicos, y desordenados en las extremidades y el tronco. Así como la alteración de movimientos oculares y del parpadeo que dificultan el seguimiento de objetos de manera visual, otra alteración motora viene a ser la incoordinación de movimientos finos, como la deglución y el habla (ver Figura 2.4).



Figura 2.4: Movimientos coréicos que se presentan en la Enfermedad de Huntington

Las primeras quejas de los pacientes son: torpeza, dificultades en el equilibrio, movimientos espasmódicos o temblores. Se les caen los objetos, tienen dificultades en la mecanografía, cambio de la letra al escribir, tropiezos frecuentes y problemas para conducir un automóvil. En los estadios tardíos de la enfermedad los pacientes prácticamente no se mueven (acinesia), no hablan, tienen graves contracturas y rigidez de las articulaciones.

La Enfermedad de Huntington Juvenil es rara (menos del 10% de los casos de EH). Suele presentarse antes de los 20 años de edad y se caracteriza por bradicinesia (movimientos lentos), rigidez y distonías (contracturas sostenidas de un grupo muscular). Esta forma rígida y acinética de la enfermedad se denomina variante de Westphal. Se asocia con herencia de la enfermedad por rama paterna y con un alto número de repeticiones (60 o más).

2.2.6. Tratamiento

No existe tratamiento que cure la enfermedad ni que impida la progresión, actualmente el tratamiento se dirige hacia la reducción de la corea y de los trastornos psiquiátricos.

En 2004, Bonelli y colaboradores revisaron la evidencia disponible y no encontraron datos de relevancia clínica. Sobre la evidencia disponible, deciden recomendar: riluzola, olanzapina y amantadita, para el tratamiento del trastorno de movimiento; inhibidores de la recaptación de serotonina y mirtazapina, para el tratamiento de la depresión mayor, y antipsicóticos atípicos, para el tratamiento de los síntomas psicóticos y las alteraciones comportamentales. Proponen también psicoterapia, fisioterapia y terapia del lenguaje como ayudantes.⁸¹ Otros autores sugieren usar dosis pequeñas de neurolépticos de alta potencia, como el háliperidol y la flufenazina o tetrabenazina (que causan disminución de catecolaminas), para suprimir la corea.⁸² Sin embargo, deben administrarse con precaución por la posibilidad de causar distonía aguda, parkinsonismo y disquinesia tardía. También se ha utilizado exitosamente para el control de la corea, sin que se incremente la bradiquinesia, la estimulación bilateral del globo pálido.⁸³ Además, existe un tratamiento de rehabilitación, psiquiátrico y psicológico, nutricional, y sobre todo, de apoyo social.

2.3. Incidencia de la Enfermedad de Huntington en el Mundo

La prevalencia de la EH se considera entre 5 y 10 casos por 100.000 habitantes, algo menor en países del Este asiático y en la población de raza negra. La incidencia anual varía entre 1 y 4 casos por millón de habitantes. Los estudios genealógicos han permitido situar el origen de la enfermedad en el oeste de Europa (Francia, Alemania y Holanda), siendo la emigración de estas familias, probablemente en relación con la dispersión de los hugonotes hacia América, Inglaterra, Sudáfrica y Australia, el origen de la extensión de la enfermedad.

Sin duda que el foco más grande de EH en América Latina se encuentra en Zulia al borde del lago de Maracaibo en Venezuela.⁸⁴ La concentración de pacientes con EH en Zulia representa el más grande foco de casos derivados de un único ancestro común. La alta prevalencia en esta zona fue reportada por primera vez por Negrete⁸⁵, llamando la atención de la comunidad mundial.⁸⁶ Las familias afectadas vivían en pequeños centros poblados alrededor del lago y la combinación de aislamiento social y geográfico permitió la expansión de este desorden genético que puede ocurrir cuando el gen es introducido en una población con una tasa elevada de crecimiento. Los otros focos más importantes de EH en América Latina son Cañete-Lima⁸⁷ y Cotahuasi-Arequipa⁸⁸, ambos en nuestro país.

2.4. Terapia con Osmoprotectores

Frente al estrés osmótico muchas plantas y otros organismos sintetizan y acumulan compuestos denominados osmoprotectores (solutos compatibles). Con el fin de adaptarse a dichas perturbaciones debido a las condiciones extremas, la naturaleza ha creado algunos mecanismos como la acumulación de pequeños solutos orgánicos, también conocidos como osmolitos.⁸⁹ ⁹⁰ Estas son moléculas pequeñas, eléctricamente

neutras que no son tóxicos a concentraciones molares, y estabilizan proteínas y membranas contra el efecto de desnaturalización de altas concentraciones de sales y otros solutos nocivos.⁹¹ Así como proteger a la célula frente al estrés oxidativo como eliminadores de especies de oxígeno reactivo (ROS).

2.4.1. Osmolitos

Los osmolitos son sustancias de bajo peso molecular, tanto iones inorgánicos como pequeñas moléculas orgánicas, que comprenden la mayoría de los solutos osmóticamente activos, y están presentes en todas las células. Estas sustancias forman parte del medio donde se realizan las reacciones bioquímicas de los seres vivos, por lo que es posible que la composición de solutos celulares ha sido objeto de una rigurosa selección. Los osmolitos a menudo se refiere como chaperonas químicas, y normalmente se acumulan en el medio intracelular en concentraciones relativamente altas que pueden aumentar la estabilidad termodinámica de las proteínas plegadas sin perturbar otros procesos celulares.^{92 90 93}

Los osmolitos inorgánicos, principalmente Na^+ , Cl^- y K^+ , sólo son útiles como osmolitos a niveles bajos y relativamente constantes. A niveles mayores inhiben funciones celulares.

Los osmolitos orgánicos afectan menos la actividad enzimática que los inorgánicos, los cuales en altas concentraciones afectan severamente la función metabólica. Así, a los osmolitos orgánicos se les llama “compatibles”, por su ausencia de interacciones con substratos y cofactores y por sus efectos nulos o favorables sobre las interacciones macromoléculas-solventes.⁹²

Existen tres principales sistemas de osmolitos orgánicos:

Tabla 2.4: Sistemas de osmolitos orgánicos

Alcoholes polihídricos o polioles	Aminoácidos y derivados	Urea y metilaminas
Glicerol	Taurina	Glicin-betaína
Sorbitol	Glicina	Glicerofosforilcolina
Inositol	Alanina	
	Glutamina	

2.4.2. Función de los osmolitos orgánicos

Los osmolitos tienen diferentes funciones, como la de protección, debido a que intervienen en reacciones que protegen a la célula, un ejemplo es la taurina, donde puede servir como osmolito importante en graves estados de deshidratación. En algunos casos, los osmolitos pueden ser compatibles, es decir, no perturban las estructuras de proteínas, mientras que al mismo actúan como antioxidantes. Por ejemplo, se ha encontrado que muchos polioles cíclicos como el manitol, que son utilizados por muchas plantas para la retención de agua, también puede eliminar los radicales libres generados durante la sequía y el frío.⁹¹

Otra función importante que tienen algunos osmolitos de la de mantener el equilibrio redox y la protección de la hipoxia, como por ejemplo el glicerol, que en gran medida es compatible con la función de las proteínas, el glicerol puede también ayudar a reducir la producción de radicales de oxígeno. La acumulación de prolina como osmolito en plantas que sufren estrés hídrico también pueden ser básica para el mantenimiento de los estados redox. Recientemente, altos niveles celulares de la trehalosa en las moscas de la fruta y en células transfectadas de mamíferos se ha encontrado que confieren una mayor resistencia a la hipoxia.

Muchos hidratos de carbono pequeños han sido seleccionados como anticongelantes coligativos. Además, ciertos aminoácidos como la prolina también se acumulan

en algunos animales que son tolerantes a las heladas. También constituyen una fuente de energía, listos para usarse después de la congelación. Un segundo grupo de crio-protectores pueden tener la función de estabilización que otros solutos no tiene. En particular, la prolina y la trehalosa parece que se unen a la cabeza de los grupos fos-folípidos de la membrana, en efecto sustitución de las moléculas de agua. Por lo tanto, pueden estabilizar las membranas durante la contracción de la célula.

Han sugerido que los osmolitos de estabilización podrían rescatar a las proteínas mal plegadas en las enfermedades humanas.⁹⁴ Puede inhibir la formación de agregados de proteínas aberrantes en la enfermedad por priones⁹⁵. Osmolitos estabilizadores mejoran la reconstitución de funcionamiento procariotas y eucariotas proteína-membrana⁹⁶ y mejorar la cristalización de proteínas.⁹⁷

A continuación se explica la función de los diferentes osmolitos usados en la investigación.

- Betaina, es un osmolito que juega una crucial función como osmoprotector en plantas, animales, bacterias y archaea.^{98 99} Es un derivado de la colina, catalizada por la enzima colina oxidasa que esta localizada en el interior de la matriz mitocondrial.^{100 101} Además de donante de metilo eficaz, la betaína establece equilibrio osmótico y balance electrolítico dentro y fuera de la célula. Importante en situaciones de stress y ahorro en el gasto energético metabólico.
- Creatina, es esencial en el mantenimiento de los altos niveles de energía necesarios para el desarrollo del cerebro y sus funciones, a través de la regeneración y la amortiguación de los niveles de ATP.^{102 103 104 105} Trabajos recientes sugieren que la creatina en el SNC puede también actuar como neurotransmisor verdadero y uno de los osmolitos principales del SNC.^{106 107} Se han encontrado reportes donde nos muestra que la creatina tiene propiedades antioxidantes.¹⁰⁸
- Prolina, recientemente, se propuso que la prolina en altas concentraciones (> 3M) estabiliza enzimas y también se comporta como un soluto solubilizante

de proteína.⁶⁰ El aminoácido prolina poseen algunas propiedades físicas interesantes. En primer lugar, su solubilidad en agua es muy alta.⁶¹ En segundo lugar, a concentraciones altas, la prolina se comporta como un hidrótopo.¹⁰⁹ Estas propiedades inusuales lleva a investigar su papel como chaperona de plegamiento de proteínas.

- Taurina, Es un β -aminoácido sulfónico, casi completamente zwitterónico a pH fisiológico, de alta solubilidad en agua y baja lipofilia, lo que le confiere menor difusión por membranas que los carboxiaminoácidos, y permite la regulación hormonal y neuronal de su transporte.¹¹⁰ Este compuesto citoprotector actúa como un antioxidante, un modulador de calcio, un neuromodulador sináptico y un estabilizador de la membrana.¹¹¹
- TMAO, trimetil amin N-óxido, es un osmolito que pertenece al grupo de las metilaminas, presente en peces de agua salada como tiburones, rayas, moluscos y crustáceos.¹¹² Tiene las siguientes funciones; como la de aumentar la temperatura de fusión y energía libre de despliegue de proteínas^{113 114}, compensa los efectos desestabilizadores de urea^{115 114}, restablece la actividad de la enzima que se pierde al tratamiento con urea^{116 117}, obliga al plegamiento de proteínas no estructuradas^{118 116 119}, favorece la polimerización de la proteína y la auto-asociación de microtúbulos^{120 121}, corrige defectos de plegado, sensibles a la temperatura¹²² e interferir con la formación de la proteína prion scrape.¹²³

2.5. Bioinformática

La Bioinformática es un área de investigación, en la que se aplican las ciencias de la computación y tecnologías de información al tratamiento de datos biológicos. Confluyen dos de los grandes motores de cambio científico y tecnológico: la biología molecular y las ciencias de la computación. Es una actividad intrínsecamente transversal, es aplicable a todos los ámbitos de las ciencias de la vida y tiene un profundo

impacto en campos tan variados como la salud humana, la industria agropecuaria, el medio ambiente, la energía o la biotecnología, así como, al mundo de la computación.

Su aplicación a la resolución de problemas científicos, ha introducido lo que algunos han llamado “una tercera metodología la investigación científica: la simulación computacional”.¹²⁴

Las simulaciones computacionales proveen una ruta directa desde los detalles microscópicos de un sistema (masa y carga de los átomos, interacciones entre ellos, geometría molecular, etc.) hacia sus propiedades macroscópicas de interés experimental (la ecuación de estado, coeficientes de transporte, parámetros de orden estructural, y demás). Además de ser de interés académico, este tipo de información es útil desde el punto de vista tecnológico. Podría ser muy difícil y hasta imposible realizar experimentos bajo condiciones extremas de temperatura y presión, mientras que una simulación del material bajo estas condiciones es perfectamente realizable. Finalmente, mientras la velocidad de los eventos moleculares es en sí una dificultad experimental, no representa ni un tipo de obstáculo a la hora de realizar simulaciones. De todas formas, la computadora como tal, no ofrece un análisis, solo números. Y, como en un experimento real, estos números tienen incertezas estadísticas.

2.5.1. Modelamiento Molecular

Existen dos grandes áreas en química computacional para el desarrollo de modelos moleculares: las técnicas de Mecánica Molecular (modelos clásicos) y las de Mecánica Cuántica (modelos cuánticos). Ambos métodos pretenden:

- Calcular la energía asociada a una estructura molecular determinada y así poder derivar propiedades asociadas a ésta.
- Encontrar la estructura molecular con menor energía (optimización de geometría o minimización de energía).
- Simular la variación a lo largo del tiempo de una determinada estructura molecu-

lar (dinámica molecular). Aunque tradicionalmente este estudio era exclusivo de la mecánica molecular por su coste y recursos computacionales necesarios, actualmente se empieza a utilizar en sistemas pequeños a través de modelos cuánticos.¹²⁵

Mecánica Molecular

La mecánica molecular considera, los átomos como bolas unidas por muelles (representando los enlaces entre átomos), según los criterios de la física clásica. Por lo tanto, en dicha simplificación, se consideran solo los núcleos de los átomos, no teniendo en cuenta explícitamente los electrones. Los objetivos alcanzables con la mecánica molecular son:

- El sistema de estudio es un sistema grande (macromoléculas).
- Interesa conocer la estructura de una proteína, obtener información de su geometría.
- Se desea realizar análisis conformacionales.
- Se pretende calcular la energía de unión entre proteína y una serie de compuestos, así como la minimización de energía tanto de dichos compuestos como de la proteína problema.

Mecánica cuántica

Llamados métodos de estructura electrónica, permiten determinar la estructura de las moléculas, calcular propiedades espectroscópicas y estudiar procesos reactivos entre otras cosas. Es posible obtener por esta vía información de moléculas que aún no han sido sintetizadas y/o colaborar en la caracterización de un compuesto.

La mecánica cuántica describe el estado de un sistema a través de una función de onda, que depende de las coordenadas de las partículas y del tiempo, contiene toda la información del sistema.^{126 127} Esta función se obtiene resolviendo la

ecuación de Schrödinger dependiente del tiempo.

$$H\psi = E\psi \quad (2.1)$$

El operador hamiltoniano H , contiene información que describe los electrones y el núcleo de un sistema. La función electrónica de onda ψ describe el estado de los electrones en términos de su movimiento y su posición. La energía E es la energía asociada al estado particular del electrón. La ecuación exacta de la ecuación de Schrödinger solo es posible para un sistema de un núcleo y un solo electrón.

2.5.2. Modelamiento Proteico

Las proteínas son macromoléculas presentes en todos los seres vivos y desempeñan multitud de funciones, tales como enzimáticas, defensivas, catalíticas, estructurales, etc. Las proteínas están compuestas por una o varias cadenas de elementos llamados aminoácidos o residuos. Cada proteína posee cadenas de aminoácidos características y existen tan sólo veinte aminoácidos naturales distintos. A partir de la cadena de aminoácidos o secuencia de cada proteína, se forma la estructura de la proteína en el espacio, mediante un proceso dinámico de atracciones y repulsiones físico-químicas. Cada cadena de aminoácidos genera una única estructura tridimensional en el espacio, por lo que se mantiene que toda la información de la estructura de una proteína, reside en su secuencia de aminoácidos.¹²⁸

La predicción de la estructura de las proteínas consiste en determinar la conformación tridimensional de una proteína de la cual se conoce únicamente su cadena de aminoácidos.

Las técnicas más relevantes que se han utilizado en la literatura son:

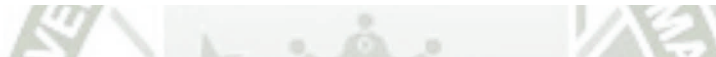
- **Las técnicas estadísticas**, generalmente utilizan clasificadores de Bayes, que realizan un cálculo aproximado, de la probabilidad de que un ejemplo pertenezca a una clase según una serie de variables.

- **El método de Chou-Fasman** ¹²⁹ , desarrollado en 1974, fue el primer algoritmo diseñado para la predicción de estructura secundaria de las proteínas globulares. Consiste en calcular la propensión de cada aminoácido a formar parte de una hélice, una hebra o un giro, a partir del análisis de un número pequeño de estructuras cristalográficas. Es importante recalcar que en el método de Chou-Fasman la preferencia a adquirir una conformación recae en un solo aminoácido. ^{130 129}
- **Garnier, Osguthorpe y Robson (El método GORIV)** es la evolución del algoritmo de Chou-Fasman, propusieron que los residuos vecinos tienen un efecto sobre la conformación que adopta el aminoácido central. ¹³¹ Considerando una ventana de 17 aminoácidos y se supuso que la conformación del residuo central dependía de los vecinos, pero la de los vecinos era independiente de los correspondientes vecinos. La información estadística obtenida se vació en cuatro matrices de 20x17, una para la estructura alfa hélice, otra para la beta, giro y enrollamiento.
- **Las técnicas basadas en modelos de rejillas**, consisten en representar de una forma muy simplificada la distribución en el espacio de los aminoácidos de una proteína, de manera que quedan encajados perfectamente en una rejilla discreta formada en dos o tres dimensiones. Uno de los modelos de rejilla más utilizados es el modelo HP. ¹³² El modelo HP está basado en dos propiedades físico químicas de los aminoácidos: la hidrofobicidad y la polaridad. Se ha demostrado empíricamente que ambas propiedades son de suma importancia en el proceso natural de plegamiento de las proteínas. En concreto, se ha comprobado que todos los aminoácidos más hidrofóbicos de una proteína se sitúan de forma espontánea en el centro de la misma, formándose un núcleo hidrofóbico compacto.
- **Las técnicas basadas en vecinos más cercanos**, están basadas en el principio de que objetos con similares características suelen compartir otro comportamiento desconocido y de interés. En este contexto se espera que proteínas o fragmentos de las mismas con cierto parecido ayuden a revelar la

estructura de una proteína desconocida.¹³³

- **Técnicas basadas en algoritmos evolutivos**, es una técnica de búsqueda, usada en computación para encontrar soluciones exactas o aproximadas a problemas de búsqueda y optimización. Están caracterizados como heurísticas de búsqueda global. Los algoritmos genéticos son una clase particular de algoritmos evolutivos que usan técnicas inspiradas en la biología evolutiva como la herencia, mutación, selección y recombinación.¹³³
- **Técnicas basadas en redes neuronales**, se basan en el funcionamiento de las conexiones sinápticas de las neuronas del cerebro, donde las señales de entrada se procesan en varios niveles y se asignan a un producto final.¹³³ La red neuronal es entrenada para asignar a cada señal de entrada específica una salida deseada. Se incrementa la precisión (75-77%) cuando se usan las redes neurales y la información evolutiva contenida en el alineamiento múltiple.¹³⁴

135 136



Como se muestra en tabla 2.5, las bases de datos se pueden dividir en tres categorías, dependiendo del tipo de información que contienen.¹³⁷ Las primarias guardan secuencias de aminoácidos o de nucleótidos; las secundarias guardan expresiones regulares (patrones), matrices ponderadas (perfiles), motivos alineados (huellas), modelos de Markov ocultos (HMM), motivos alineados (bloques) o expresiones regulares borrosas (patrones). Finalmente, existen las bases de datos que contienen información estructural, como el banco de datos de proteínas cristalizadas (Protein Data Bank).

2.5.3. Campos de fuerza para Modelamiento Molecular

Se denomina campo de fuerza o force field al conjunto que forman las ecuaciones para calcular las contribuciones a la energía y los valores de los parámetros ajustables al equilibrio. Cada campo de fuerza define una ecuación de energía potencial, de manera que la energía de una molécula en una conformación determinada se calcula a partir de la que tendrían idealmente las partes que la constituyen.¹³⁸

Tabla 2.5: Tipos de bases de datos

Base de datos primarios	
PIR	http://pir.georgetown.edu/
MIPS	http://mips.gsf.de/
Swiss-Prot	http://ca.expasy.org/sprot/
TrEMBL	http://ca.expasy.org/sprot/
NRL-3D	http://www.renabi.fr/
Base de datos secundarias	
PROSITE	http://www.ebi.ac.uk/ppsearch/
BLOCKS	http://blocks.fhcrc.org/blocks/
Profiles	http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN
PRINTS	http://www.bioinf.manchester.ac.uk/dbbrowser/PRINTS/
Pfam	http://pfam.sanger.ac.uk/
Base de datos de estructuras	
PDB	http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do

La función de potencial incluye los siguientes términos (Figura 2.5):

- **Interacciones enlazantes:** intervienen átomos unidos por enlaces químicos. Son considerados interacciones enlazantes los términos de enlace, ángulos, ángulos diedros o torsiones y ángulos fuera del plano.¹³⁹
- **Interacciones no enlazantes:** intervienen átomos no unidos de manera directa por enlaces. Constan de términos electrostáticos e interacciones de Van der Waals.
- **Interacciones cruzadas:** modelan el acoplamiento entre los términos anteriores. Se encuentran aquí los términos de ángulo-enlace, ángulo-ángulo.

Se han desarrollado diferentes campos de fuerza para aplicar estas interacciones, de manera que alguno de ellos incluso añaden algunos términos de energía adicionales.

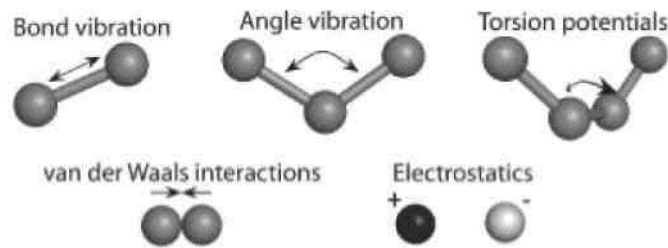


Figura 2.5: Tipos de enlaces

Por lo general un campo de fuerza está compuesto de:

- Atom types, para cada uno de los átomos del sistema según el force field empleado. Éstos permiten asignar a cada átomo sus características según su hibridación, carga y tipo de átomos a los que está unido.
- Ecuación de energía potencial, la cual calcula la energía de la molécula en una configuración determinada. Dicha energía se calcula como la suma de diferentes términos que indican la penalización por el alejamiento de un estado ideal de las distancias de enlace, ángulos de enlace, torsiones.
- Un conjunto de parámetros, como constantes de fuerzas, longitudes de enlace, etc., los cuales permiten ajustar las ecuaciones a los diferentes tipos de átomos. Se suelen obtener a partir de datos experimentales o de resultados de cálculos de mecánica cuántica.

$$E(T) = E(R) + E_{no-union}$$

Donde:

(2.2)

$$E(R) = \sum_{uniones} \frac{ki}{2} (d_i - d_{i,0})^2 + \sum_{angulos} \frac{ki}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{torsiones} \frac{Vn}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma))^2$$

(2.3)

y

$$E_{no-union} = \sum_i \sum_j (4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{o,\pi j}}{r_{ij}} \right)^{12} - \frac{\sigma_{o,\pi j}^8}{r_{ij}} \right] + \sum_i \sum_j \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad (2.4)$$

El primero y segundo término de la ecuación mostrada, describen las energías asociadas a estiramiento y doblamiento de enlaces covalentes. El tercer término está relacionado con movimientos torsionales. Por último, la energía de no-unión (non-bonded) se aplica a los átomos distantes más de 3 enlaces covalentes, y usualmente se describe mediante un potencial electrostático sumado a uno de Lennard-Jones.¹⁴⁰ Existen parametrizaciones más complejas, en las cuales se pueden ubicar cargas en sitios diferentes de los átomos, o bien, se pueden modelar las interacciones electrostáticas mediante dipolos puntuales en lugar de cargas.

Se pueden diferenciar campos de fuerza dirigidos a moléculas pequeñas y medianas (MM2¹³⁸, MM3¹⁴¹, MM4, TRIPOS, MMFF94) y a macromoléculas (AMBER¹⁴², CHARMM¹⁴³, GROMOS¹²⁵, OPLS¹⁴⁴).

Para el siguiente trabajo se hizo uso del campo de fuerza de Amber10, un paquete de programas para realizar y analizar dinámicas moleculares que incluye campos de fuerza de la familia amber.¹⁴⁵

2.5.4. Optimización Geométrica

La optimización de la geometría de un sistema molecular consiste en localizar la estructura molecular con menor energía; por ello se utilizan de manera indistinta los términos de minimización de energía y optimización de geometría.

Los métodos habituales de optimización de geometría se basan en el cálculo de las derivadas de la energía con respecto a los grados de libertad geométricos. Los métodos derivativos se diferencian entre los de orden uno y orden dos.

Los métodos derivativos de orden uno son los basados en el gradiente de energía, los cuales buscan desplazar el sistema en una dirección que conduzca a un valor

menor de energía. Estos métodos presentan el inconveniente de tender a conducir el sistema hacia mínimos de energía próximos a la posición de partida (mínimos locales), los cuales no tienen por qué coincidir con el mínimo global correspondiente a la geometría óptima que se pretende hallar.

$$g = \nabla f = \frac{\delta f}{\delta v_i} \quad (2.5)$$

$$H = \nabla^2 f = \nabla \nabla f = \frac{\delta^2 f}{\delta v_i \delta v_j} \quad (2.6)$$

En la primera ecuación, el vector gradiente o primera derivada de la función, en un punto indica la dirección de la pendiente. En la segunda ecuación, la matriz hessiana o segunda derivada de la función, indica las direcciones en que la función es cóncava (mínimos, valores propios positivos) o convexa (máximos, valores propios negativos).

El gradiente es cero en los puntos estacionarios (máximos, mínimos, puntos de ensilladura o *saddle points*)(Figura 2.6). Para distinguirlos, hace falta evaluar la hessiana; si ésta es convexa en todas direcciones se tratará de un máximo, si es cóncava en todas direcciones (todos los valores propios positivos) será un mínimo, si es cóncava en todas las direcciones menos una, se tratará de un saddle point de primer orden, si es cóncava en todas las direcciones menos dos, un saddle point de segundo orden, etc.

Algunos métodos habituales basados en el gradiente son Steepest descent (*Line Search*) o Conjugate Gradient (con variantes como Fletcher-Reeves o Polack-Ribiere). A continuación se describen brevemente los tres métodos de minimización más comunes:

- **Steepest descent**, resulta útil como primera aproximación en sistemas que están alejados del mínimo local más cercano, ya que desciende rápidamente hacia una zona próxima al mínimo pero no suele converger. Sigue la estrategia de minimización en una línea (*line search*). Mediante cálculos del gradiente, se evalúan

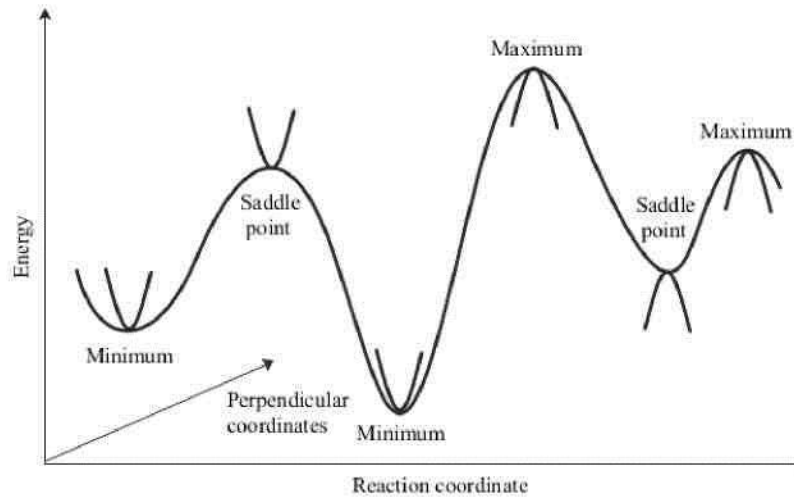


Figura 2.6: Puntos críticos de una Superficie de Energía Potencial

los cambios en la energía del sistema asociados a perturbaciones sobre los grados de libertad geométricos, y se modifica el sistema en la dirección indicada por el gradiente. El proceso se repite hasta que el cambio energético generado por la perturbación de cualquier grado de libertad geométrico es menor que un umbral predefinido. Cada búsqueda es perpendicular a la anterior. Repitiendo el proceso se encuentra el mínimo. Si el mínimo es muy estrecho, el número de evaluaciones de la función puede ser muy elevado (Figura 2.7).

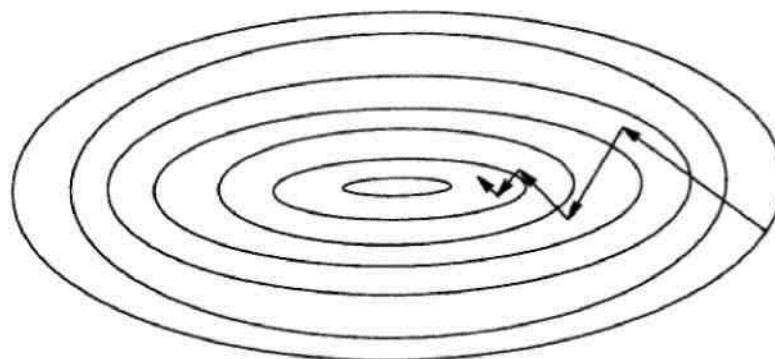


Figura 2.7: Steepest descent

- **Conjugate Gradient**, a diferencia del método anterior, no solo utiliza el gradiente del paso actual, sino que tras cada evaluación de gradiente se tiene en cuenta la información obtenida de evaluar el gradiente del paso anterior para el

paso actual. Ello supone un mayor coste de cálculo, por lo que este método se emplea para explorar geometrías que estén cerca de un mínimo de energía. Según la manera de implementar este método existen diferentes variantes. Fletcher-Reeves propone que una vez encontrado el gradiente y el primer mínimo como en un steepest descent, el siguiente punto se encuentre en una dirección no exactamente perpendicular, sino en la dirección conjugada que garantiza encontrar el mínimo de la función si fuera cuadrática. Polack-Ribiere propone otra dirección, ya que según ellos normalmente las funciones de trabajo no son exactamente cuadráticas.

- **Newton-Raphson**, es un método más costoso computacionalmente, debido a que necesita calcular la hessiana e invertirla para encontrar un nuevo mínimo. Se obtiene así información sobre la velocidad de cambio en la función gradiente y se puede modular adecuadamente la evolución del sistema hacia la geometría óptima.

Todos los métodos de minimización tenderán hacia el mínimo local más cercano. El problema reside en hallar el mínimo global. Para asegurar que se ha hallado un mínimo (segunda derivada positiva), se puede realizar el cálculo de la hessiana al final de la optimización.

2.5.5. Dinámica Molecular

La base teórica para la Dinámica Molecular abarca muchos de los resultados importantes producidos por los grandes nombres de la mecánica analítica, Euler, Hamilton, Lagrange, Newton. Sus contribuciones contienen por un lado observaciones fundamentales acerca del obrar aparente de la naturaleza; y por otro, elegantes reformulaciones que engendraron un desarrollo teórico superior.

Con la dinámica molecular ¹⁴⁶, se simula la evolución del sistema en el tiempo,

utilizando las ecuaciones de movimiento de Newton:

$$F_i = m_i \frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} \quad (2.7)$$

En donde $r_i(t) = x_i(t), y_i(t), z_i(t)$ es el vector de posición de la i -ésima partícula y F_i es la fuerza que actúa sobre la i -ésima partícula al tiempo t y m_i es la masa de la partícula. La integración de esta ecuación da como resultado la posición de los diferentes átomos en el tiempo y una trayectoria del sistema a lo largo del tiempo.

Para comenzar una simulación de DM, es necesario disponer de un conjunto inicial de posiciones atómicas y de velocidades. La estructura de partida normalmente ha de ser refinada energéticamente, utilizando un algoritmo de minimización, para aliviar posibles tensiones locales derivadas de solapamientos atómicos o de distorsiones de enlaces o ángulos.

La Dinámica Molecular es un método determinístico, según esto el estado de un sistema en un tiempo futuro se puede predecir según su estado actual; para una descripción más real del sistema se requiere que la integración de la ecuación de movimiento, sea dividida en series para cortos periodos de del orden 10^{-15} a 10^{-14} segundos. En cada paso de tiempo, las fuerzas en los átomos son calculadas, y combinadas con la posición y velocidad actual generando la nueva posición y velocidad en el instante de tiempo siguiente, considerando durante este periodo que la fuerza que actúa sobre cada átomo es constante. De esta forma se genera la trayectoria que describe cómo las variables dinámicas cambian con el tiempo. ¹⁴⁷

De este modo se han desarrollado diferentes alternativas para simular sistemas en solución:

- **Métodos de solvente explícito:** incluyen explícitamente una cantidad determinada de moléculas de solvente. Concretamente en el programa Amber se pueden añadir un cap (una porción esférica de moléculas de solvente centradas en un punto del soluto), una box, (una caja de solvente de las dimensiones especificadas), un octaedro truncado (una caja con los vértices cortados, consiguiendo una distribución de solvente más uniforme alrededor del soluto), o una shell (añade una capa de solvente irregular siguiendo la

superficie del soluto).

- **Métodos aproximados o solvente implícito:** grupo de técnicas que incorporan el efecto del solvente sin que las moléculas de solvente se encuentren de forma explícita en el sistema. En el trabajo se usó el solvente implícito GB/SA, el cual induce un desplazamiento del estado de transición de plegamiento a estados más “nativos”, lo cual implica que estos solventes favorecen estados de mayor compactación, al menos en conformaciones semi-nativas.¹⁴⁸

Entre los sistemas más utilizados actualmente para simulaciones de dinámica molecular, se encuentra la aplicación GROMACS (GRONingen MACHine for Chemical Simulations). GROMACS es una aplicación de alto rendimiento que fue implementada originalmente en la Universidad de Groningen y que posteriormente ha sido reimplementada como código abierto, por un amplio número de desarrolladores.

GROMACS es un paquete versátil para realizar simulaciones de dinámica molecular, es decir, simular las ecuaciones de Newton del movimiento para sistemas con cientos de millones de partículas. Está diseñado principalmente para moléculas bioquímicas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos que contienen complicadas interacciones en condiciones de servidumbre, pero desde GROMACS es extremadamente rápido el cálculo de estas interacciones no enlazantes (que normalmente dominan las simulaciones), y otros muchos grupos que también se están utilizando para la investigación de sistemas no biológicos, por ejemplo, polímeros.

2.5.6. Interacción Proteína–Ligando

Los programas de docking identifican posibles conformaciones de unión entre ligando y receptor, cada una de las cuales está unida a la cavidad de unión según un modo de unión. En la forma más general del docking no se disponen de datos bioquímicos adicionales, pero disponer de información complementaria facilita el problema del docking considerablemente.

En la presente investigación se hizo uso del servidor online HEX, el cual es un

programa interactivo de gráficos moleculares para calcular y visualizar los modos posibles de conexión de pares de moléculas de proteínas y ADN. Hex también puede calcular la unión proteína-ligando, suponiendo que el ligando es rígido, y superpone pares de moléculas usando sólo el conocimiento de sus formas 3D.¹⁴⁹ Utiliza las esferas polares de Fourier (SPF) acelerando los cálculos, es uno de los pocos programas de conexión que se ha construido en los gráficos para ver el resultado.¹⁵⁰

2.5.7. Validación de estructuras

Existen una serie de herramientas que ayudan a evaluar la fiabilidad de un modelo estructural, y que en términos cristalográficos se conocen con el nombre de validación, de tal modo que el modelo estructural obtenido debe ser continuamente contrastado y validado mediante criterios estereoquímicos consistentes. Es decir, las distancias interatómicas y ángulos de enlace deben ser aceptables.

Una herramienta muy útil es el diagrama de Ramachandran, en él se pueden visualizar todas las combinaciones posibles de ángulos diédricos ψ (psi) contra ϕ (phi) en los aminoácidos de un polipéptido, y que contribuyen a la conformación de la estructura de las proteínas.¹⁵¹ Este gráfico permite, por lo tanto, aproximar *a priori* cual será la estructura secundaria del péptido, ya que existen combinaciones de ángulos típicas para cada estructura (α -hélice y lamina β).

Del mismo modo, los valores de los factores térmicos asociados a cada átomo deben corresponder a valores físicamente aceptables. Estos parámetros vibracionales dan cuenta de la movilidad de diferentes zonas estructurales. Así, en la estructura de una macromolécula, éstos valores deben ser coherentes con las zonas internas o externas de la molécula, siendo en general menores para el interior, y mayores para las zonas externas, próximas al solvente.

Otros métodos para estudiar el resultado del modelamiento molecular es el RMSD (Root Mean Square Deviation), la medida de la distancia media entre los átomos (generalmente los átomos del esqueleto) de proteínas superpuestas, se usa para hacer una comparación cuantitativa entre la estructura de una proteína parcialmente plegada y la estructura del estado nativo, también mide como evoluciona una estructura a lo largo del tiempo. Así como el RMSF (Root Mean Square Fluctuation) que es una medida de flexibilidad local de una estructura.

2.5.8. Termodinámica Estadística

La Termodinámica Estadística nos permite relacionar, las propiedades de moléculas individuales, con las de un gran conjunto de ellas teniendo como objetivo los valores promedio de las cantidades relevantes.

Al estudiar sistemas compuestos por un número muy grande de componentes atómicos se abandona el proyecto de analizar detalladamente trayectorias o estados cuánticos, y se sustituye por un tratamiento estadístico.

Durante el pasaje de la mecánica clásica a la mecánica estadística, que se realiza durante la segunda mitad del siglo XIX, los esquemas basados en probabilidades prevalecen sobre los conceptos de órbitas exactamente prescritas. Maxwell introduce el nombre mecánica estadística en una publicación de 1879. La probabilidad comienza a remplazar la certeza. Sin embargo, paradójicamente, es justamente el enorme número de elementos microscópicos que componen los materiales el que permite resultados estadísticos de gran precisión y confiabilidad. La mecánica estadística del equilibrio - clásica o cuántica conduce a predicciones teóricas acerca del equilibrio térmico de un sistema físico, sobre la base de cuatro etapas conceptuales.

La especificación o enumeración de los estados microscópicos (atómicos) del sistema.

Un conjunto hipotético de sistemas repetidos: ensemble (asamblea o colectivo,

Gibbs, 1902).

El postulado de igual probabilidad de los microestados de un sistema aislado.

Las técnicas para el cálculo de las probabilidades y los promedios de las variables dinámicas del sistema.

Esta parte de la disciplina provee una explicación de la termodinámica clásica a partir de la teoría atómica, y permite el cálculo de los potenciales termodinámicos y de otras propiedades de un cuerpo. La mecánica estadística se ocupa también de procesos fuera de equilibrio, los cuales serán considerados en la última parte de estas notas.

De las trayectorias de dinámica molecular se pueden obtener los valores promediados estadísticamente en el equilibrio para cualquier propiedad del sistema que sea medible directamente en cada punto de la trayectoria (la energía cinética de partes relevantes del sistema, propiedades estructurales, campos eléctricos). A partir de estos valores promedios se pueden derivar también un número importante de propiedades termodinámicas, aunque dos cantidades importantes, la entropía y la energía libre (de Helmholtz o de Gibbs) no se pueden derivar de un promedio estadístico, por ser propiedades globales que dependen de lo extenso que sea el espacio configuracional (o de fase) accesible al sistema molecular.

Los métodos de perturbación e integración termodinámica se basan en que los cambios de energía libre relacionados con pequeñas perturbaciones de un sistema molecular se pueden determinar a partir de una simulación de DM.

Capítulo 3

Metodología y

Detalles

Computacionales

3.1. Equipos y Software

Dentro de los requerimientos para poder realizar la parte computacional, necesitaremos los siguientes equipos:

Hardware:

Computador HPG60-235DX. INTEL PENTIUM DUAL CORE T4200
2.0GHz, 1MB L2 CACHE, 3072MB DDR2 SDRAM, 320GB

Software:

- **Base de Datos NCBI**

Disponible en [http : //www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) el sitio NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica) ha creado bases de datos públicas, dirige investigación en biología computacional, desarrolla software para análisis de datos de genomas, y disemina información biomédica. Entre otros recursos, NCBI tiene varias bases de datos como Gen-Bank, OMIM (herencia mendeliana del hombre), MMDB (modelos por homología de estructuras tridimensionales de proteínas), UniGene (Colección de secuencias de genes humanos), el mapa del genoma humano, el navegador de taxonomía, y el CGAP (proyecto del genoma del cáncer).

- **Base de Datos PDB**

Disponible en [http : //www.rcsb.org/pdb/](http://www.rcsb.org/pdb/), PDB (Protein Data Bank) se encarga del mantenimiento de una base de datos de estructuras tridimensionales de proteínas, determinadas experimentalmente por espectroscopia NMR o cristalografía de rayos x. Tiene un formulario para el envío de estructuras por parte de los investigadores, un tutorial para aprender el manejo del sitio y acceso a los modelos por medio de códigos, palabras clave o autor. Las estructuras contienen información completa que incluye autores, fuente, modelo de la estructura (en varios formatos), publicación, descripción de la estructura, método experimental.

- **Gromacs 4.5 (Hess, 2008).**

Disponible en www.gromacs.org, GROMACS es un programa de simulación de dinámica molecular que utiliza las ecuaciones Newtonianas del movimiento para sistemas de centenas a millones de partículas. Fue especialmente diseñado para realizar simulaciones de moléculas bioquímicas, como las proteínas y los lípidos, con un gran número de interacciones. Dada su gran rapidez, también se utiliza para realizar simulaciones de moléculas no biológicas como los polímeros. Mientras se ejecuta la simulación, GROMACS informa continuamente hasta donde ha llegado, y qué día y a qué hora prevé que finalice.

- **Molden 5.0 (Schaftenaar, 2000).**

Disponible en www.cmbi.ru.nl/molden, Molden es un programa que permite visualizar y crear nuevas moléculas para ello se usan las herramientas de edición de moléculas, siendo Z-Matrix Editor una de las herramientas de Molden que permite al usuario crear y/o manipular estructuras en la pantalla.

- **Gaussian**

Gaussian es un paquete de software comercial de Química Computacional que toma de base las leyes fundamentales de la mecánica cuántica, con las cuales Gaussian predice las energías, estructuras moleculares, las frecuencias vibracionales, propiedades moleculares de las moléculas, y una amplia variedad de reacciones en ambientes químicos.

- **GausView**

GaussView es la interfaz grafica enfocada al usuario para elaborar estructuras de moléculas en 3D, y en la preparación de cálculos de entrada para la ejecución del Gaussian, permitiendo elaborar un análisis visual de los resultados obtenidos por el Gaussian.

- **Chimera 1.6 (Pettersen, 2011).**

Disponible en www.cgl.ucsf.edu/chimera, UCSF Chimera es un programa altamente extensible para la visualización y análisis de estructuras moleculares y datos relacionados, incluyendo mapas de densidad, conjuntos supramoleculares, secuencia de alineaciones, resultados de ataque, trayectorias, y conjuntos conformacionales. Imágenes de alta calidad y animaciones se pueden generar.

- **Aplicación online MolProbity (Chen, 2010)**

Disponible en molprobity.biochem.duke.edu/, Molprobity es un servidor que permite validar estructuras protéicas y ácidos nucleicos evaluando mediante el diagrama de Ramachandran.

- **Pymol (Schrödinger, 2010)**

Disponible en www.pymol.org/, es un software que tendrá que ser instalado en linux, diseñado para visualizar en tiempo real, obteniendo rápida generación de imágenes gráficas y animaciones de alta calidad.

- **HEX**

El servidor de Hex se encuentra disponible en <http://hexserver.loria.fr/>

este servidor se basa en la primera transformada de Fourier (FFT) para el acoplamiento entre proteínas. El servidor requiere dos estructuras de proteínas en formato .pdb que se desean cargar produciendo una lista ordenada de hasta 1000 predicciones de acoplamiento.

- **PDB2PQR**

Disponible en <http://nbcrc-222.ucsd.edu/pdb2pqr1,8/> es un servidor que nos servirá para transformar el archivo de coordenadas .pdb, al formato .pqr el cual será decodificado en el programa de APBS.

- **APBS (Baker, 2001).**

Disponible en www.poissonboltzmann.org/apbs, es un paquete de software que tendrá que ser instalado en linux, este programa permite el modelado biomolecular através de la solución de la ecuación de Poisson-Boltzmann (PBE), uno de los modelos continuos más populares para describir las interacciones electrostáticas entre solutos moleculares en medios salinos y acuosa. El APBS fue diseñado para evaluar eficientemente las propiedades electrostáticas de tales simulaciones para una amplia gama de escalas de longitud para permitir la investigación de moléculas con decenas de millones de átomos.

- **Spartan10**

Software que tendrá que ser instalado en linux, este programa nos permite realizar la minimización, así como poder analizar el potencial electrostático de moléculas, también es usado para visualizar estructuras moleculares.

El Sistema Operativo utilizado en esta investigación es Linux, distribución Ubuntu 11.10 y Ubuntu 12.04

3.2. Análisis de la estructura primaria de la proteína Huntingtina

La base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information), es una importante fuente de información de biología molecular, esta base de datos está disponible en línea de manera gratuita. Usando el buscador del NCBI, se procede a buscar la secuencia del gen IT15.

3.3. Construcción del primer exón de la Huntingtina nativa

El PDB (Protein Data Bank) es una base de datos de la estructura tridimensional de las proteínas y ácidos nucleicos. Estos datos, generalmente obtenidos mediante cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear, son enviados por biólogos y bioquímicos de todo el mundo. Están bajo el dominio público y pueden ser usados libremente.

Se busca la proteína Huntingtina en el buscador del PDB, este archivo se descarga eligiendo la extensión .pdb. Una vez obtenido el archivo este se levanta en el programa Gedit (ubicado por defecto en los accesorios de Ubuntu), ubicado ahí se tendrá que evaluar los componentes del archivo, y si es necesario se tendrá que eliminar restos proteicos que no se usarán en la investigación.

3.4. Construcción del primer exón de la Huntingtina mutada

La proteína obtenida en el punto anterior tendrá que ser levantada en el programa Molden, este programa permite crear proteínas a partir de cero y tiene la capacidad

de modificar las proteínas existentes. La creación y edición de proteínas se lleva a cabo a través de la herramienta Z-Matrix Editor. Haciendo uso de Z-Matrix Editor, se agregará las glutaminas necesarias a la secuencia de huntingtina normal, para volverla huntingtina mutada. En la figura 3.1 se observa el programa y la herramienta de Z-Matrix Editor seleccionada.

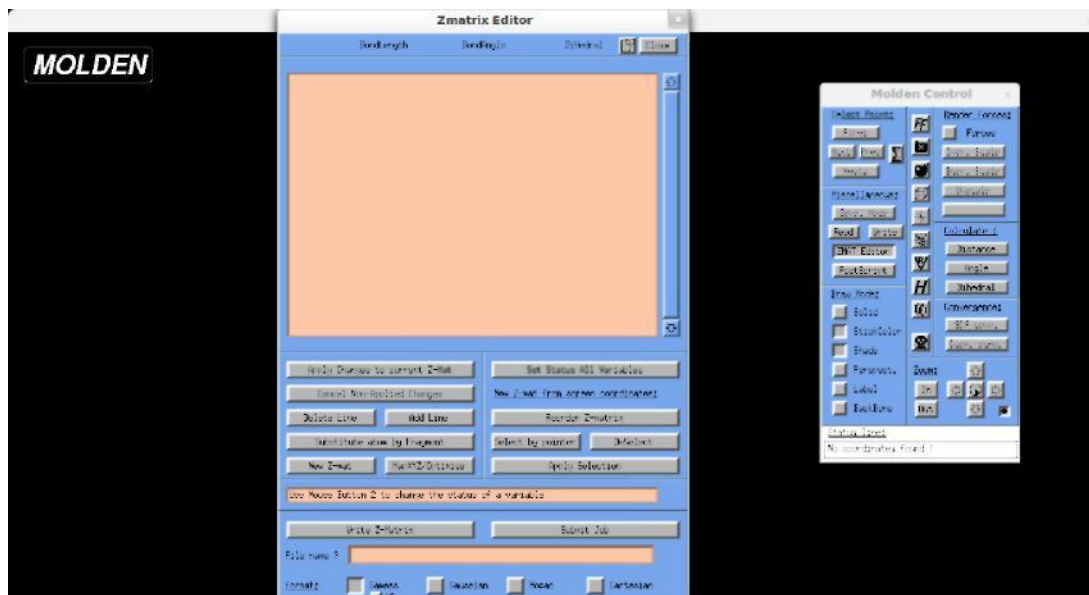


Figura 3.1: Pantalla de Molden.

3.5. Construcción de los osmolitos orgánicos

Usando Z-Matrix Editor, se crearán los osmolitos (Betaína, TMAO, Taurina y Pro-lina), teniendo en cuenta su conformación química, una vez obtenidos los constructos se procede a guardar cada osmolito con la extensión .xyz.

Para obtener la posición real de los átomos de los diferentes osmolitos se usará Gaussian, un paquete de química computacional que usa varios métodos para calcular propiedades de sistemas moleculares y periódicos, usando descripciones mecánico-cuánticas estándar para las funciones de onda o la densidad electrónica. Para ello se debe de modificar el archivo obtenido en Molden, de la siguiente forma:

Abrir el archivo .xyz en el editor de textos.

En la cabecera se determinan el número de procesadores a utilizar en el cálculo, la memoria que se desea reservar, o el nombre del archivo CHECKPOINT, que es dónde se van guardando las cuentas que va haciendo el programa y además es imprescindible para poder lanzar el cálculo en caso de que termine bruscamente y sin error el cálculo. Se coloca %chk=creatina.chk, esta es la única sección del input que no resulta necesaria para realizar el cálculo.

La siguiente sección es la correspondiente a los comandos. Esta comienza siempre con el carácter numeral (#). En ella se explicitan todas las opciones del cálculo tales como el nivel a utilizar, el conjunto de bases, si es una optimización, un cálculo de frecuencias, y demás keywords. En el trabajo usaremos #AM1 Opt Freq, donde AM1 significa Austin Model 1 método semi-empírico, Opt es optimización geométrica y Freq calcula la frecuencia luego de la optimización.

Es necesario dejar una línea en blanco y luego hacer un comentario, haciendo mención al nombre de la estructura.

▀ Luego de tener el nombre de la estructura se vuelve a dejar una línea en blanco.

Las moléculas deben estar neutras, es por ello que luego se debe de colocar los números 0 1, correspondientes a la carga y la multiplicidad.

Encontramos la matriz-Z dónde se proporciona la naturaleza y posición de los átomos del sistema. Al final de la misma es imprescindible dejar una línea en blanco.

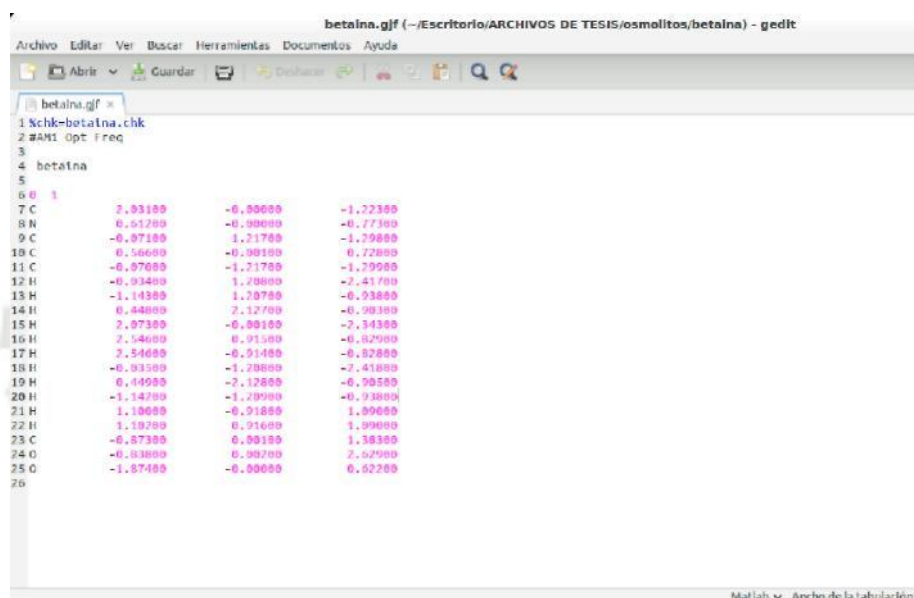
Finalmente se tendrá que guardar el archivo teniendo en cuenta que la extensión sea .gjf.

El archivo final tendrá que presentar el formato que se muestra en la figura 3.2. Una vez obtenido el nuevo archivo con extensión .gjf, se procederá al modelado de

mecánica cuántica, para ello nos ubicaremos en el terminal de linux donde se tendrá que digitar el siguiente comando:

```
g09 nombre-input.gjf > nombre-output.log &
```

Terminado el tiempo el programa nos dará los archivos finales de extensión .log y .chk.



```

beta1na.gjf
1 $chk-beta1na.chk
2 $ANI opt freq
3
4 beta1na
5
6 0 1
7 C 2.93180 -0.90000 -1.22300
8 N 0.51200 -0.90000 -0.77300
9 C -0.07100 3.21700 -1.29800
10 C 0.56600 -0.90100 0.72000
11 C -0.07600 -1.21700 -1.29900
12 H -0.93400 1.20000 -2.41700
13 H -1.14300 1.20700 -0.93800
14 H 0.44800 2.12700 -0.98300
15 H 2.07300 -0.90100 -2.34300
16 H 2.54600 0.91500 -0.82900
17 H 2.54600 -0.91400 -0.82800
18 H -0.03500 -1.20800 -2.41800
19 H 0.44900 -2.12800 -0.98500
20 H -1.14200 -1.20900 -0.93900
21 H 1.10000 -0.91800 1.99000
22 H 1.10200 0.91600 1.99000
23 C -0.07300 0.90100 1.38300
24 O -0.83800 0.90700 2.62900
25 O -1.87400 -0.90000 0.62200
26
  
```

Figura 3.2: Formato final en el programa de Gedit.

3.6. Formulación de nuevos campos de fuerza

En el trabajo se están incorporando nuevas estructuras, los cuales no presentan campos de fuerza, por ello es importante modificar la base de datos del campo de fuerza de AMBER para incorporar las nuevas estructuras. Esto se realiza para evitar que cuando se genera la minimización estos nuevos archivos no sean reconocidos y en tanto no se inicie la minimización.

Se tendrá que realizar para cada osmolito por separado, tomando los siguientes pasos:

Se usan los archivos obtenidos con Gaussian, los que están con una extensión .log y .gjf, en la primera extensión se tendrán todos los cálculos realizados y en especial el resultado final, el cual indica la posición final de las nuevas moléculas.

Se crea un nuevo archivo usando de plantilla el archivo .gjf, reemplazando el resultado final (el cual se encuentra en el archivo .log) por el resultado inicial que muestra. Se guarda con otro nombre y con la extensión .gjf.

Este nuevo archivo se abre en Gauss View y se procederá a calcular con el comando "calculate" y luego en "Method" se elige "Mechanics" y finalmente se elige "Amber", en esta parte el programa lo que hace es mencionar los átomos de la molécula como están establecidos en la base de datos de Amber.

Una vez realizado el cálculo, el programa pedirá que se guarde el nuevo archivo generado. Aquí observaremos que Gauss View te dice que los átomos que se mencionó al inicio de crearse la molécula tienen una denominación diferente en Amber.

Para incorporar la nueva molécula en el campo de fuerza de Amber, se tendrá que ingresar de raíz a la base de datos de Amber, el cual está ubicado en Gromacs/top/Amber, ahí se selecciona el archivo .hbd y se incorpora la nueva molécula donde se tendrá en cuenta el resultado obtenido del Gauss View y se le pondrá un nombre de tres letras.

El archivo .gjf creado por segunda vez, se guardará como un archivo .xyz, el cual nos permitirá crear un archivo .pdb usando el comando Babel en el terminal.

Una vez creado el archivo .pdb se abre con el editor de textos Gedit, y se observa que el nuevo constructo tiene mencionado por defecto LIG, este nombre tendrá que ser reemplazado por el nombre de tres letras ya antes puesto en la base de datos de AMBER.

3.7. Optimización de la geometría

Se cuenta con 6 moléculas; una es la proteína que es el primer exón de la Huntingtina nativa, la segunda es la proteína del primer exón de la Huntingtina mutada y las demás son los osmolitos orgánicos (TMAO, taurina, prolina y betaína).

Luego de tener las estructuras, se elegirá el campo de fuerza adecuado para la siguiente simulación, siendo elegido AMBER el campo de fuerza para todos los sistemas.

Para la minimización se utilizará como entrada el archivo de extensión .pdb, para luego convertirlos a su formato nativo .gro, .top y .itp usando el comando pdb2gmx, que viene incluido en el software de GROMACS, este comando toma el archivo .pdb y genera dos ficheros, un .gro con los átomos y sus coordenadas x-y-z, y un .top con las masas atómicas, sus cargas y enlaces. Una vez creado los archivos de topología .top, .itp y .gro, se procede a preparar el archivo .mdp, el cual presenta los parámetros necesarios para la optimización geométrica de la estructura a estudiar. Para iniciar la minimización se abrirá el terminal de ubuntu y prontamente se digitara en la línea de comando lo siguiente:

```
pdb2gmx -f archivo.pdb -o archivo.gro -p archivo.top -i archivo.itp
```

El comando grompp toma los ficheros .gro, .top y .mdp y genera un fichero .tpr que es la entrada del comando mdrun, para ello se tendrá que digitar en la línea de comando lo siguiente:

```
grompp -f minima.mdp -c archivo.gro -p archivo.top -o archivo.tpr
```

El comando mdrun es el motor de GROMACS, y el responsable del verdadero desplazamiento de los átomos conforme a las leyes de la física (parametrizadas en el fichero de dinámica molecular .mdp, en este fichero se incluye el método steep descendet)(ver anexoA.1), luego de concluida la minimización con el integrador steep, se procederá a realizar una segundo minimización con el integrador Quasi-Newtoniano I - bfgs, para ello se modificará el archivo minima.mdp (ver anexo A.2).

Como salida del comando `mdrun` obtenemos un fichero binario `.trr` de gran tamaño, que contiene el estado del sistema a intervalos de tiempo regulares y también un fichero `.gro` que contiene el estado final de la solución. Para obtener estos archivos finales se tendrá que digitar en la línea de comando lo siguiente:

```
mdrun -s archivo.tpr -o archivo.trr -c archivo-final.gro -e archivo.edr
```

3.8. Dinámica Molecular de estructuras terciarias

El procedimiento para la simulación de Dinámica Molecular, es muy parecido al de la Optimización de la geometría. Mediante el comando `pdb2gmx`, se escoge el campo de fuerza, se convierte el archivo `.pdb` a `.gro` y se obtiene el archivo de topología. Luego se determina el tamaño de la caja con el comando `editconf`, ahí se obtiene un nuevo archivo `.gro`, se vuelve a usar el comando `pdb2gmx`, eligiendo el campo de fuerza AMBER y obtienen los archivos de topología `.pdb`, `.gro` y `.itp`.

Se crea el fichero `.mdp` con solvente implícito y ensamble canónico NV T (ver anexoA.3). Se procede con el uso del comando `grompp`, el cual usa los ficheros `.gro`, `.top` y `.mdp`, generando el fichero `.tpr`. Finalmente se inicia la dinámica molecular con el comando `mdrun`.

Concluida la dinámica, se obtienen los siguientes ficheros: `.xtc`, `.edr`, `.gro` y `.trr`, estos ficheros serán de gran ayuda para determinar las características termodinámicas de cada molécula. Para obtener los archivos finales de dinámica molecular se tendrá que seguir los siguientes pasos:

```
pdb2gmx -f archivo-final.gro -o archivodinamica.gro -p archivodinamica.top -i  
archivodinamica.itp
```

```
grompp -f dinamica.mdp -c archivodinamica.gro -p archivodinamica.top -o  
archivo-dinamica.tpr
```

```
mdrun -f archivodinamica.tpr -o archivodinamica.trr -x archivodinamica.xtc -e  
archivodinamica.edr -c archivodinamica-final.gro -cpi archivodinamica-01.cpt  
-cpo archivodinamica-02.cpt
```

Finalmente para ver el video de dinámica molecular se tendrá que ingresar los archivos finales de extensión .tpr y .trr en el programa de UCSF Chimera, para ello se tendrá que realizar lo siguiente:

Abrir el programa UCSF chimera

Seleccionar “Tools”, “Md/Ensemble Analysis“, “MD Movie” y finalmente abrir los archivos finales ya mencionados.

3.9. Docking de estructuras terciarias

El servidor de HEX, usa ficheros .pdb para realizar la interacción proteína-ligando, para lo cual se debe de cambiar la extensión de los ficheros .gro finales, a una extensión del tipo .pdb.

Para el docking creamos una nueva carpeta y colocamos la protenamutada.pdb y el osmolito.pdb (esto se realiza para todos los 5 osmolitos), primero se ingresa el receptor, que es la proteína mutada y luego se ingresa el ligando, que viene a ser el osmolito, en la tabla 3.1 se muestra las diferentes interacciones que se debe de realizar.

3.10. Minimización y Dinámica Molecular de estructuras cuaternarias

Culminado el proceso de docking es necesario minimizar la energía de los sistemas interactuantes, permitiendo la relajación de todos los átomos, para su comparación y

Tabla 3.1: Conformaciones para el dockeo de proteínas terciarias

Receptor	Osmolito
(Primer exón de la Huntingtina mutada)	Betaína
(Primer exón de la Huntingtina mutada)	Prolina
(Primer exón de la Huntingtina mutada)	Creatina
(Primer exón de la Huntingtina mutada)	Taurina
(Primer exón de la Huntingtina mutada)	TMAO

para obtener una estimación de las entalpías relativas lo que proporciona una indicación de su verosimilitud.

Antes de realizar los procesos de simulación, se debe de revisar el fichero .pdb, ya que por defecto el programa no separa el receptor del ligando. para ello se debe de abrir el fichero .pdb y se separa las dos estructuras.

Se realizará la minimización de las energías de todo el sistema, usando el archivo minima.mdp, donde se usará el integrador I - bfgs (ver anexo A.2).

Algo que también se debe tener en cuenta es el fichero .mdp que se usa para la dinámica molecular, pues se tiene que modificar, (ver anexo A.4).

Finalmente se hace uso de los pasos ya mencionados para la minimización y dinámica molecular de los sistemas.

3.11. Validación de Estructuras

Para evaluar el modelo que se obtuvo, se usa el ploteo de Ramachandran usando el servidor online Molprobit, para ello se tendrá que cambiar el archivo final de extensión .gro a uno de extensión .pdb realizando el cambio en el terminal digitando en la línea de comando lo siguiente:

```
editconf -f archivodinamica-final.gro -o archivodinamica-final.pdb
```

Una vez obtenido el archivo de extensión .pdb, nos ubicamos en el servidor Molpro-bity donde se tendrá que abrir el archivo y este servidor comenzará a realizar diversos cálculos, culminado el análisis se elegirá “Analyze all-atom contacts and geometry” donde se tendrá que seleccionar “Ramachandran plots” y dar inicio al cálculo. El servidor nos proporcionará información en formato .pdf.

Para determinar el potencial electrostático se usará el servidor online de PDB2PQR, este servidor permitirá crear un archivo que podrá ser leído en el programa de APBS, para ello se tendrá que hacer lo siguiente:

- Ingresar al servidor por la dirección electrónica [http : //nbc222.ucsd.edu/pdb2pqr1,8/](http://nbc222.ucsd.edu/pdb2pqr1,8/).
- Abrir el archivo con extensión .pdb y seleccionar el campo de fuerza Amber.
- Seleccionar “submit”
- El servidor generó archivos de salida, estos archivos serán copiados en nuevo archivo de Gedit y guardados tal y como son mostrados en el servidor, obteniendo los archivos de extensión archivodinamica-final.in y archivodinamica-final.pqr.

Los archivos finales serán lanzados en el programa de APBS, para ello se tendrá que digitar en la línea de comando del terminal de ubuntu lo siguiente:

```
apbs archivodinamica-final.in
```

Los archivos finales que se obtendrán en el programa de APBS serán de extensión .mc y .dx, este último archivo será usado para visualizar el potencial electrostático de las proteínas y de los sistemas interactuantes. Para visualizar se tendrá que abrir el programa de UCSF Chimera y abrir el archivo de extensión .pdb recordemos que debe ser el que fue usado en el servidor de PDB2PQR, luego de abrir se tendrá que elegir

la representación molecular de superficie hidrofóbica (seleccionar "Presets" y luego "Interactive 3") finalmente para obtener la representación del potencial electrostático se tendrá que seleccionar "Tools", "Surface/Binding Analysis", "Electrostatic Surface coloring", abrir el archivo de extensión .dx y finalmente seleccionar "color".

Para obtener el potencial electrostático de los diferentes osmolitos se tendrá que usar el programa de Spartan10, para ello se tendrá que usar la extensión .xyz, este archivo será levantado en el programa y prontamente se seguirá los siguientes pasos:

- Abrir archivo .xyz
- Seleccionar "Build" y luego "Minimization"
- Seleccionar en el menú principal "Setup" y "Calculations", en "Calculations" se tendrá que seleccionar "Equilibrium Geometric" y finalmente seleccionar "Sub-mit"
- Seleccionar "Setup" y "Surface", en "Surface" se tendrá que seleccionar "Add" y finalmente elegir la opción de "Electrostatic Potential Map"

Finalmente se usan algunos descriptores moleculares como son: RMSD, RMSF, analizador de puentes de hidrógeno y densidad de estados, estos descriptores vienen incluidos en el paquete de Gromacs. Estos comandos serán digitados en la línea de comando del terminal del siguiente modo:

```
g_rms -s archivodinamica.tpr -f archivodinamica.xtc -o rmsd.xvg g_rmsf -s  
archivodinamica.tpr -f archivodinamica.xtc -o rmsf.xvg g_hbond -s  
archivodinamica.xtc -f archivodinamica.trr -num hbond.xvg g_dos -f  
archivodinamica.trr -s archivodinamica.tpr -dos dos.xvg
```

Ambos archivos serán revisados en Xmgrace, para ello se tendrá que digitar en la línea de comando xmgrace -f rmsd.xvg o xmgrace -f rmsf.xvg.

3.12. Obtención y Estudio de Parámetros Termodinámicos

Para determinar los parámetros termodinámicos de los diferentes sistemas, se tendrá que hacer uso del fichero *.edr* obtenido en la dinámica molecular. Este fichero nos permite encontrar la energía total, energía cinética y energía potencial de todos los sistemas. Para ello se hará uso del comando *g_energy*, para obtener los archivos de energía será necesario usar el comando *g_energy*, donde se colocará lo siguiente en el terminal:

```
g_energy -f archivodinamica.edr -o potencial.xvg -mutot -fluc -nmol  
6,023E-23 -driftcorr -zero 0
```

El archivo *.edr*, muestra los datos de energía obtenidos con la dinámica molecular. El archivo *.xvg*, es la forma en como será leída en el programa de *XMGRACE*, se incorpora *mutot* para calcular el momento dipolar del conjunto de los componentes, el comando *—fluc* es para leer la fluctuación de la proteína, osmolito o sistema inter-actuante, usando *—nmol* es para que nos den datos por residuo en el caso de querer la energía de una proteína, en el caso de los osmolitos, se obvia esta función.

Los resultados obtenidos servirán para calcular la energía de interacción, para ello se tendrá que usar la siguiente ecuación:

$$\Delta E_i = \Delta E_t(H_{ttm} - \text{osmolito}) - (\Delta E_t(H_{ttm}) + \Delta E_t(\text{osmolito})) \quad (3.1)$$

Donde:

$\Delta E_t(H_{ttm})$ es la energía total de la proteína mutada, $\Delta E_t(\text{osmolito})$ la energía total del osmolito y $\Delta E_t(H_{ttm} - \text{osmolito})$ que es la energía total del sistema inter-actuante.

Capítulo 4

Resultados y Discusión

4.1. Obtención de la estructura de la Huntingtina nativa

Se realizó la búsqueda de la secuencia huntingtina en la base de datos del NCBI, la cual nos brindó la secuencia completa de la proteína huntingtina, escogiendo la estructura que corresponde al Homo sapiens. La secuencia se descargó bajo el formato Fasta.

La estructura del archivo obtenido, comienza con una descripción en una única línea (línea de cabecera), seguida por líneas de datos de secuencia. La línea de descripción se distingue de los datos de secuencia por un símbolo > (mayor que) en la primera columna. La palabra siguiente a este símbolo es el identificador de la secuencia. Luego está sólo la secuencia, sin números ni comentarios. La proteína Huntingtina encontrada presenta 3144 aminoácidos (ver figura 4.1), a partir del dieciochoavo aminoácido comienza la región polyQ con 23 glutaminas, luego comienza la región polyP (poliprolinas) con 11 prolinas.

En la presente tesis, no se trabajará con la secuencia completa de la huntingtina normal, debido a que nos interesa estudiar el primer exón de la huntingtina mutada,

```
>gi|90903231|ref|NP_002102.4| huntingtin [Homo sapiens]
MATLEKLMKAFESLKSFQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQPPPPPPPPPPQLPQPPQAPLLPQPQPPPPPPPPPGPAVAEEPLHR
PKKELSATKKDRVNHCLTICENIVAQSVRNSPEFQKLLGIAMELFLLLCSDDAESDVRMVADECLNKVIKALMDSNLPRQLQLELYKEIKK
NGAPRSLRAALWRFAELAHVLRPQKCRPYLVNLLPCLTRTSKRPEESVQETLAAAVPKIMASFGNFANDNEIKVLLKAFIANLKSSSPT
IRRTAAGSAVSIQCQHSRRTQYFYSWLLNVLLGLLVPEDEHSTLLIIGVLLTLRYLVPLLQQVQKDTSLKGSFGVTRKEMEVSPPSAEQL
QVYELTLHHTQHGDHNVVTGALELLQQLFRTPPEPELLQTLTAVGGIGQLTAAKEESGGRSRSRGSIVELIAGGGSSCSPVLSRKQKGVKVL
LGEEEALEDDSESRSDVSSALTASVKDEISGELAASGVSTPGSAGHDIITEQPRSQHTLQADSVDLASCDLTSSATDGDDEEDILSHS
SSQVS AVPSDPAMDLDNGTQASSPISDSSQTTEGPDSAVTPSDSSEIVLDGTDNQYLGQLIGQPQDEDEEATGILPDEASEAFRNS
MALQQAHLKLNMSHCRQPSDSSVDKFLRDEATEPGDQENKPCRIGKDIQSTDDDSAPLVHCVRLLSASFLLTGKKNVLPDRDVRVS
VKALALSCVGAVALHPESFFSKLYKVPDITTEYPEEQYVSDILNYIDHGDQPVRGATAILCGTLICISILSRSRFHVGDWMTIRTLTG
NTFSLADCIPLLRKTLKDESSVTCKLACTAVRNCVMSLCSSSYSELGLQLIIDVLTLRNSSYWLVRTELLETLAEIDFRLVSFLEAKAE
NLHRGAHHYTGLLKLQERVLNNVVIHLLGDEDPVRVHVAASLIRLVKFLYKCDQGGADPVAVARQSSVYLKLLMHETQPPSHFSV
STITRIYRGYNLLPSITDVTMENNLSRVIAAVSHELITSTTRALTFGCEALCLLSTAFPVCIWVSLGWCHGVPPLSASDESRRKSCVTGM
ATMILTLLSSAWFPLDLQDALILAGNLLAASAPKSLRSSWASEEEANPAATKQEEVWPALGDRALVPMVEQLFSLHLKVINICAHV
LDDVAPGPAIKAALPSLTNPPSLSPIRRKGEKEPEGEQASVPLSPKKGSEASASRQSDTSGPVTTSSKSSLSGFYHLPVSYLKLHVDL
ATHANYKVTLDLQNSTEKFGFLRSALDVLSQILELATLQDIGKVEEILGYLKSFCFSREPMMATVCVQQLLKTFLGTNLASQFDGLSS
NPSKSGRAQLRGSSSVRPGLYHYCFMAYTHFTQALADASLRNMVQAEQENDTSGWFDVLQKVSTQLKTNLTSVTKNRADKNAIHNHI
RLEFELVIKALKQYTTTTCVQLQKQVLDLLAQVLQVLRVNYCLLSDQVFIGFVLKQFEYIEVQGFRESEAIIPNIFFLVLLSYERYHS
KQIIGIPKIIQLCDGIMASGRKAVTHAIPALQPIVHDLFVLRGTNKADAGKELETQKEVVVSMMLRLRIQYHQVLEMFILVLQCHKENE
DKWKRLSRQIADIILPMLAKQQMHIDSHEALGVNLTLEIFLAPSSLRPVDMLLRSMFVTPNTMASVSTVQLWISGILAILRVLISQSTE
DIVLSRIQELSFSPYLIISCTVINRLRDGDSTSTLEEHSEKQIKNLPEETFSRFLLQLVGIILEDIVTKQLKVMSEQQHTFYCQELGT
LLMCLIHIFKSGMFRRIATAATRLFRSDGCGGSFYTLDSLNLRARSMITTHPALVLLWCQIILLVNHTDYRWAAEVQOTPKRHSLSSTK
LLSPQMSGEEEDSLAAKLGMCNREIVRRGALILFCDYVCQNLHDSHLEHTLWLVNHIQDLISLSHEPPVQDFISAVHRNSAASGLFIQA
IQSRCENLSTPTMLKKTLCQLEGIHLSQSGAVLTLYVDRLLCTPFRVLARMVDILACRRVEMLLAANLQSSMAQLPMEELNRIQEYLQS
SGLAQRHQRLYSLDRFRLSTMQDLSLSPSPVSSHPLDGDGHVSLVETVSPDKDWYVHLVKSQCWTRSDSALLEGAELVNRIPAEDMNAF
MMNSEFNLSLLAPCLSLGMSEISGGQKSALFEAAREVTLARVSGTVQQLPAVHHVFQPELPAEPAAYWSKLNDFGDAALYQSLPTLAR
ALAQYLVVSKLPSHLHLPPEKEKDIVKVVVATLEALSWHLIHEQIPLSLDLQAGLDCCCLALQLPGLWSVVSSTEFVTHACSLIYCVH
FILEAVAVQPGEQLLSPERRTNTPKAISEEEEEVDPNQNPKYITAACEMVAEMVESLQSVLALGHKRNKSGVPAFLTPLLRNIIISLAR
LPVNSYTRVPLVWKLWSPKPGDFGTAFPEIPVEFLQEKVEFKFEIYRINTLGWTSRTQFEETWATLLGVLVTQPLVMEQEEPPPE
EDTERTQINVLAVQAITSVLVSAMTVPVAGNPAVSCLEQQPRNKPLKALDTRFRGKLSIIRGIVEQEIQAMVSKRENIATHHLYQAWDP
VPSLSPATTGALISHEKLLQINPERELGMSYKLGQVSIHVSWLGNSTIPLREEWDEEEEEADAPAPSSPPTS PVNSRKHHRAGVDI
HSCSQFLELYSRWILPSSSARRTPAILISEVRSLLVSDLFERNQFELMYVTLTELRRVHPSSEDEILAQYLVPAATCKAAAVLGMKD
AVAEVSRLESTLRSSHLP SRV GALHGVLYVLECDLDDTAKQLIPVSDYLLSNLKGIAHCVNIHSQQHVLMCATAFYLIENYPLD
VGPEFSASIIQMCVMLSGSEESTPSIIYHCALRGLERLLLESEQLSRDLAESLVKLSVDRVNVHSPHRAMAALGMLTTCMYTGKEKVS
GRTSDPNPAAPDSESVIVAMERVSFLDRIRKGFPCEARVVARILPQFLDDFFPPQDIMNKVIGEFNSQPPYPQFMATVVYKVFQTLH
STGQSSMVRDWMLSLSNFTQRAPVAMATWSLSCFFVSASTSPWVAAILPHVISRMGKLEQVDVNLFCVLATDFYRHHQIEEELDRRAFQ
SVLEVVAAPGSPYHRLTCLRNHVHVTTTC
```

Figura 4.1: Secuencia de la proteína Huntingtina nativa en formato fasta

la secuencia obtenida del NCBI, nos sirvió como patrón para poder comparar con la estructura obtenida del PDB.

4.2. Obtención del primer exón de la Huntingtina nativa

En el PDB, se encontró el estudio del primer exón de la huntingtina normal bajo la denominación de 3IO4.pdb esta fue obtenida por cristalografía de rayos X (ver figura 4.2).

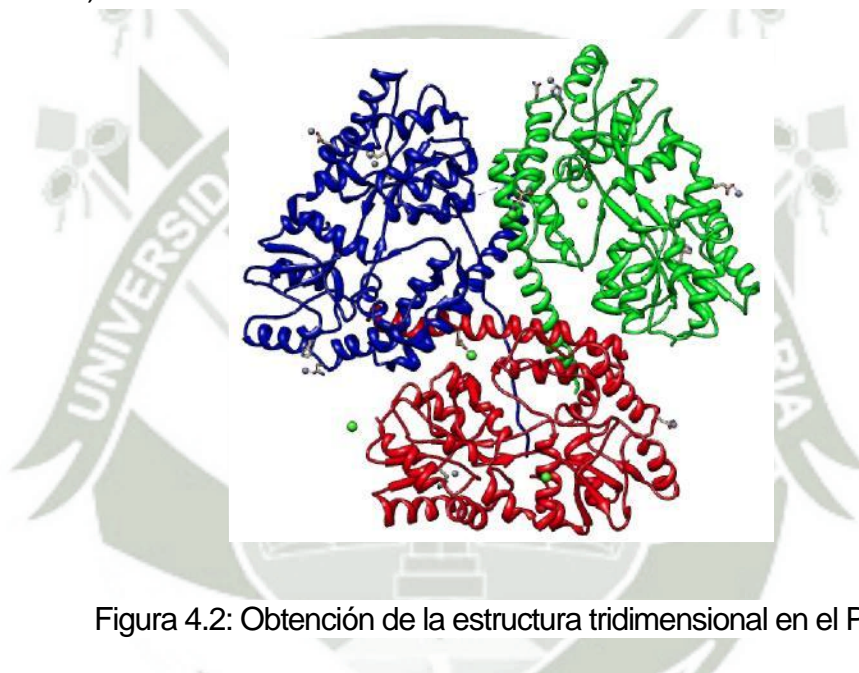


Figura 4.2: Obtención de la estructura tridimensional en el PDB

La secuencia obtenida del PDB, es un conglomerado de varias proteínas, de las cuales identificamos la secuencia del primer exón de la huntingtina, usando el Editor de textos Gedit, se logró eliminar las proteínas que no estudiaremos, obteniendo de esta forma, una única secuencia (ver figura 4.3).

Esta proteína obtenida presenta las siguientes características, es una secuencia proteica de 419 aminoácidos, de acuerdo a la literatura y en comparación con la secuencia obtenida del NCBI (ver figura 4.4), se observa que la secuencia del primer exón de la huntingtina comienza a partir de la MET371, cuenta con una repetición de

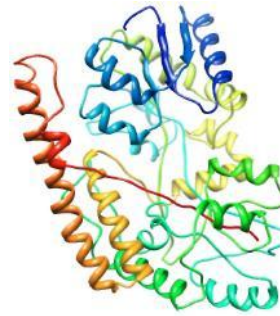


Figura 4.3: Estructura molecular del primer exón de la Huntingtina normal

17 glutaminas, con lo que se comprueba de que la proteína es la del tipo normal. Terminado el análisis de su estructura se procedió a guardar la proteína en formato .pdb con el nombre de 17Q.pdb.

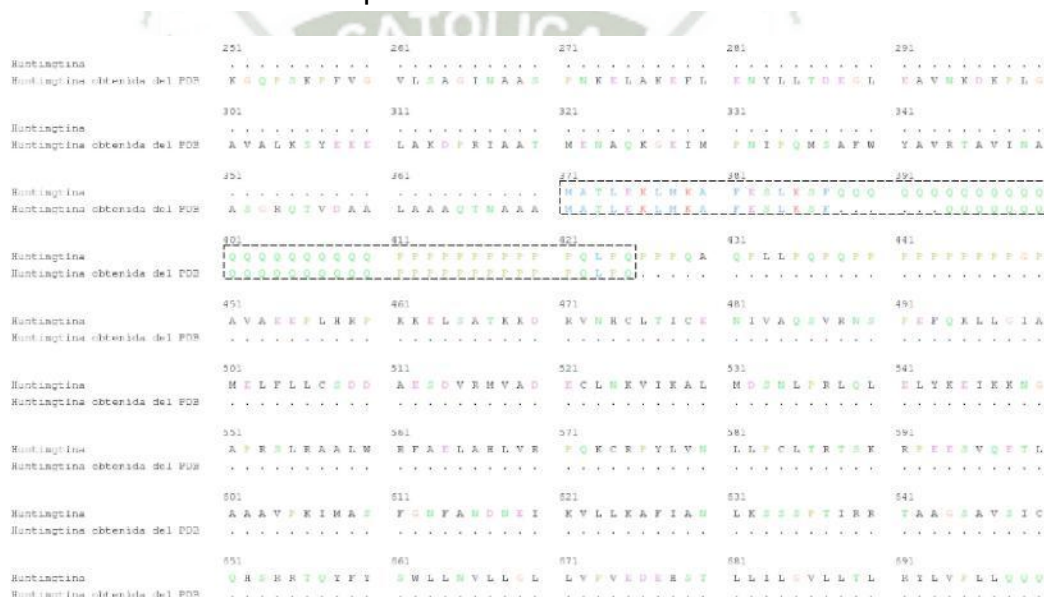


Figura 4.4: Alineamiento de la secuencia obtenida del PDB y NCBI

Obtenido el constructo, se procedió a relajar la estructura, realizando dos minimizaciones, en la primera minimización se usó el integrador steep y en la segunda minimización el integrador I - bfgs, ambas minimizaciones se realizaron a 20000ps, usando el solvente implícito GB/SA.

Culminada la minimización se realizó la dinámica molecular, en el ensamble canónico NVT a una temperatura de 309,65°K, usando una caja cúbica con volumen constante, cada lado de la caja mide 20nm. Las simulaciones se realizaron con condiciones

periódicas de contorno. Las ecuaciones de movimiento fueron integradas usando el algoritmo de *leapfrog*, en pasos de tiempo de $0,001\text{ps} = 1\text{fs}$ (10^{-15}s) por 10000000 pasos de integración, la temperatura fue regulada con el termostato de Nosé-Hoover.

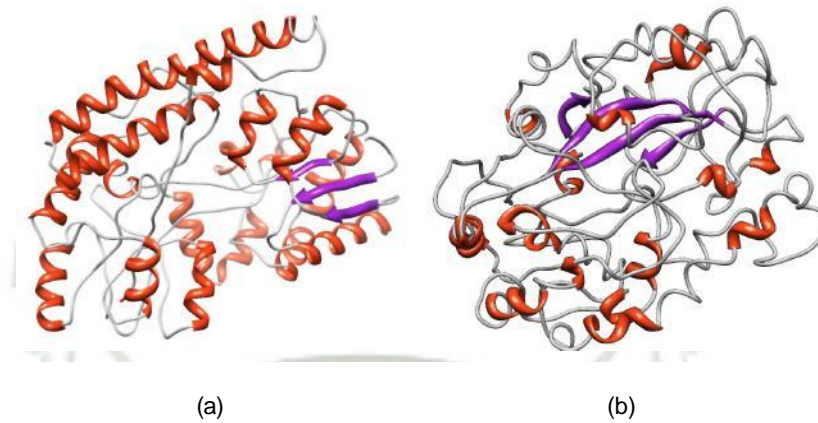


Figura 4.5: Estructuras finales terminada la minimización y dinámica de la Huntingtina nativa. (a) Mínima (b) Dinámica

Como podemos observar en la figura 4.5, la estructura final luego de culminada la minimización presenta tres láminas β y varias α hélices, esta estructura final se sometió a la simulación de dinámica molecular obteniendo una estructura final con 4 láminas β , α hélices bien diferenciadas, así como enlaces de giro.

Los archivos finales generados en la dinámica molecular, nos sirvieron para determinar la energía de la proteína. Se usó el comando *g_energy*, obteniendo la energía potencial, cinética y total. La imagen de la energía total que se muestra en la figura 4.21(a), se observa que la estabilidad de la energía comienza a partir de 620ps , y culminando los 20000ps con la energía estable.

Con la estabilidad energética comprobada, se realizó el análisis de los puentes de hidrógeno, usando el comando *g_hbond*, generando una gráfica en la cual se observa la transitoriedad y permanencia de los puentes de hidrógeno de la estructura durante la Dinámica Molecular, se nota que tanto los puentes de hidrógeno transitorios y permanente se encuentran en una fluctuación constante, indicando así la estabilidad de la estructura terciaria (ver figura 4.7).

Posteriormente haciendo uso del programa *g_dos*, se calcularon los datos de la densidad de estados, en esta se nota claramente la prevalencia de la estructura que más veces se repite con respecto al tiempo.

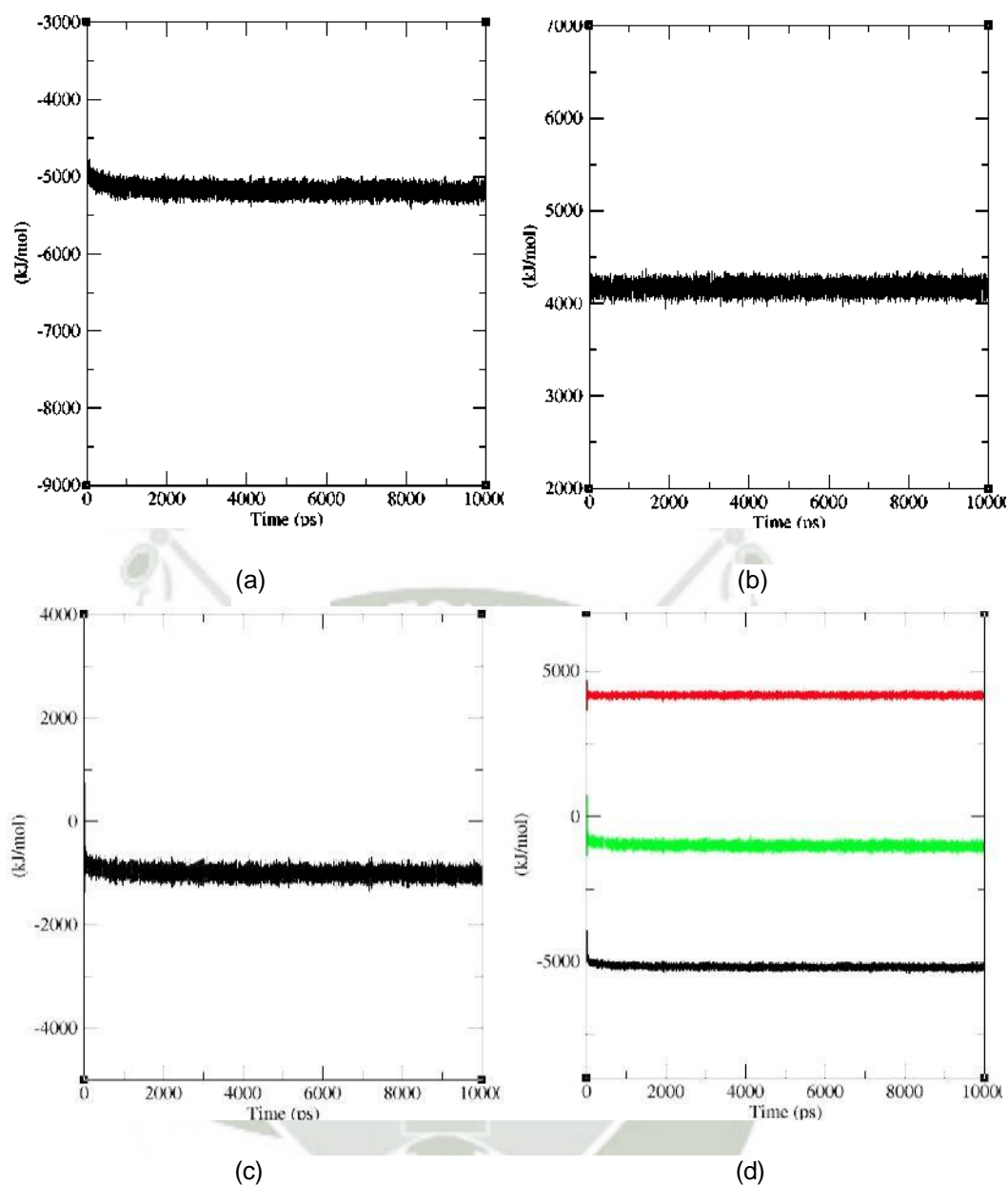


Figura 4.6: Energías obtenidas de la dinámica molecular del primer exón de la Huntingtina nativa. (a) Energía Potencial (b) Energía Cinética (c) Energía Total (d) Energía potencial (color negro), Energía Cinética (color rojo) y Energía Total (color verde)

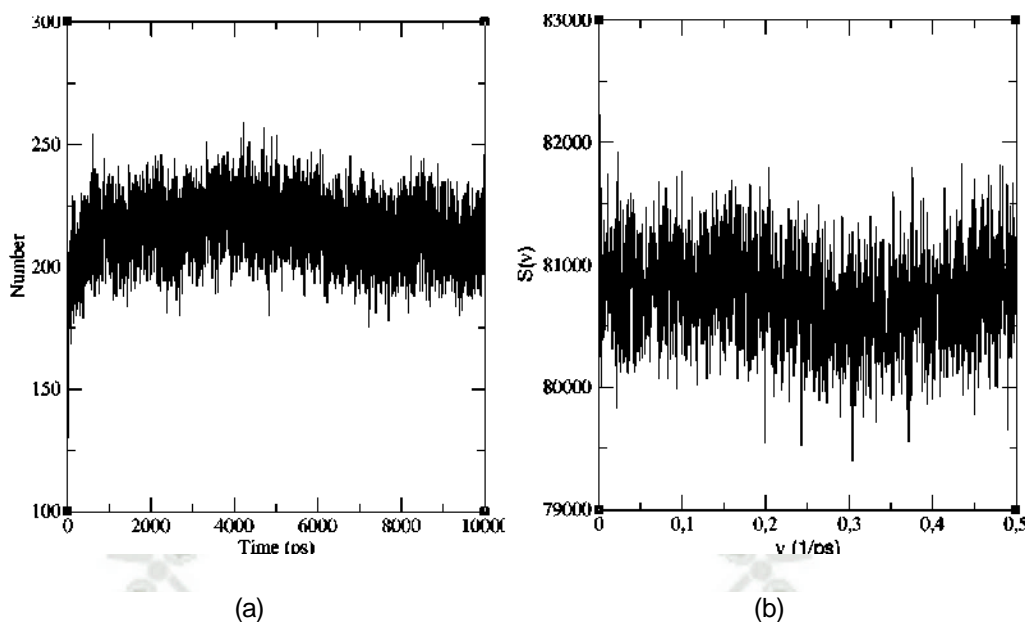


Figura 4.7: Parámetros de estabilidad de la estructura Huntingtina nativa. (a) Permanencia de puentes de hidrógeno (b) Densidad de estados

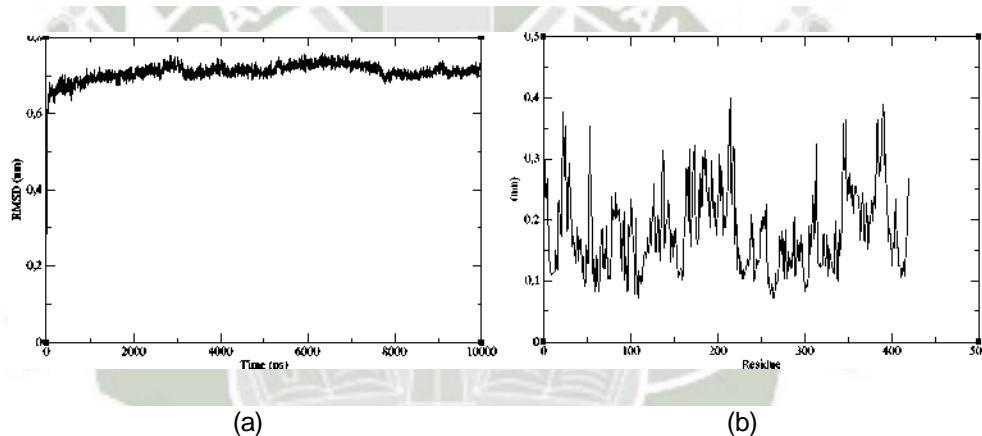


Figura 4.8: Desviación media cuadrática del primer exón de la Huntingtina nativa. (a) RMSD (b) RMSF

Por último, mediante el uso de los programas `g_rmsd`, y `g_rmsf`, se calculó la desviación media cuadrática con respecto a la distancia, los datos obtenidos se utilizaron para la generación del gráfico `rmsd`, este nos indica que el tiempo de estabilidad es alcanzado a partir de los 2.5ns, este dato es importante ya que es el tiempo tomado para la generación de la estructura promedio, la cual será utilizada en el docking, el cálculo de fluctuación de la desviación media

cuadrática por residuos, rmsf, para así poder obtener información de que zonas de la estructura han variado en su posición, se nota, que la mayor fluctuación se presentó entre los aminoácidos del 20 al 30, del 51 al 57, del 210 al 225 y del 380 al 395, con un movimiento de 0,4nm en su pico máximo, como se aprecia en la figura 4.8(b).

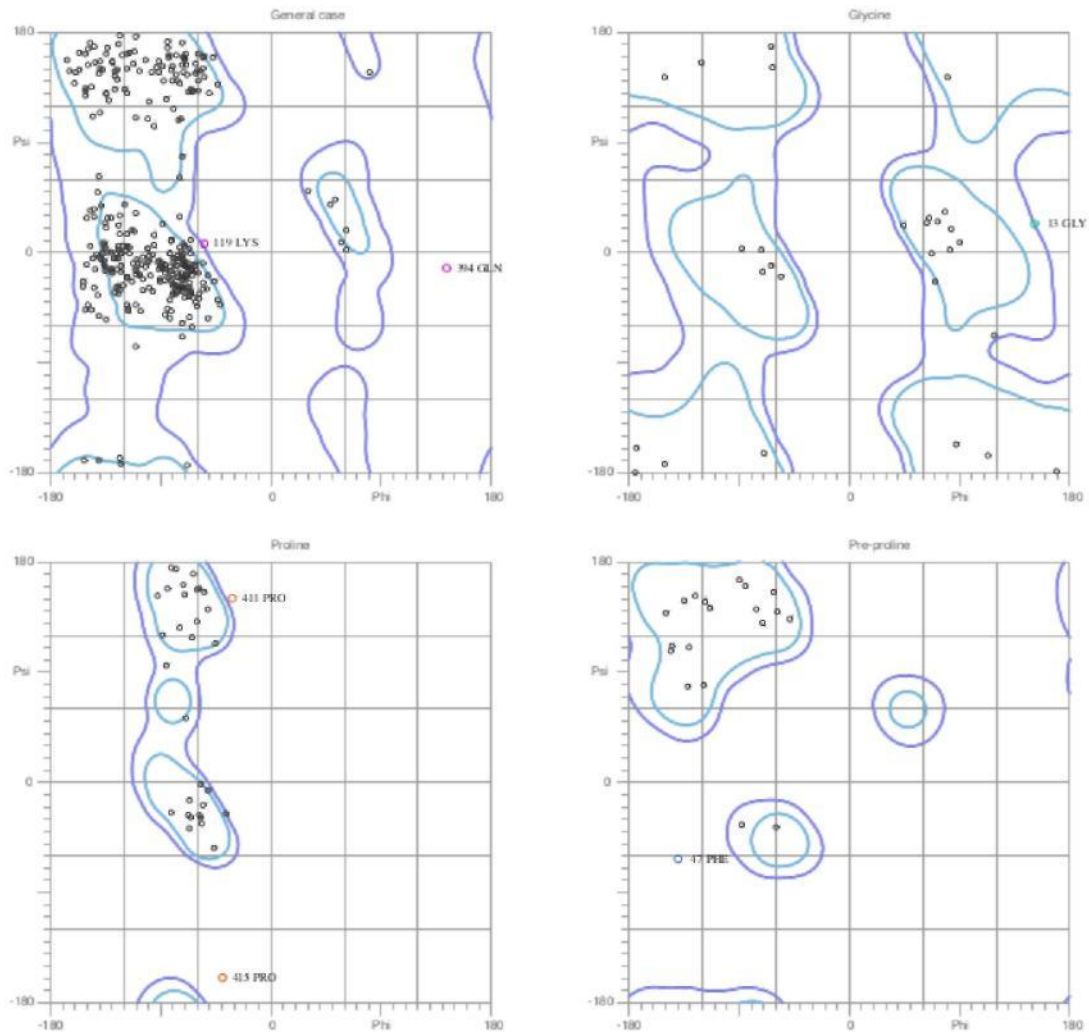


Figura 4.9: Diagrama de Ramachandran de la Huntingtina nativa

Usando el diagrama de Ramachandran se obtuvo la figura 4.9, en la cual observamos que para la estructura del primer exón de la Huntingtina, se obtuvo un 87.3 % de residuos en zonas permitidas y 98.6 % en zonas favorecidas de un total de 411 residuos de 417.

El diagrama nos muestra que hay aminoácidos que se hallan fuera de la zona per-

mitida, las cuales son la PHE47, LYS119, GLN394, PRO411 y PRO415.

4.3. Construcción de la proteína mutada

Usando el programa de MOLDEN se obtuvo la secuencia mutada, incorporando a la secuencia del primer exón de la huntingtina nativa, 133 glutaminas a la cola de glutaminas que presentaba la proteína nativa, dando un total de 150 repeticiones de glutaminas, en la figura 4.10, se observa proteína nativa modificada, donde la secuencia de 133 glutaminas incorporadas se muestra de color rojo.

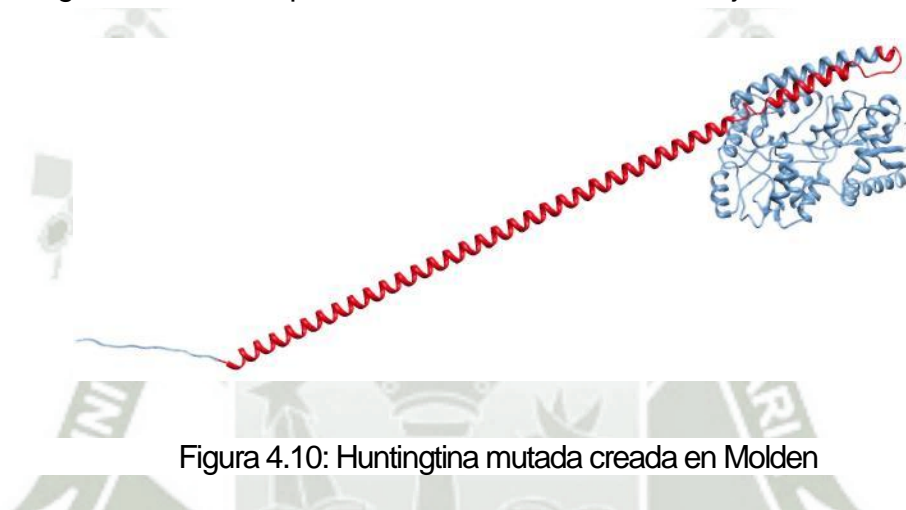


Figura 4.10: Huntingtina mutada creada en Molden

Terminada de modificar la proteína nativa, se procedió a realizar la minimización de energías, mediante una leve minimización en solvente implícito GB/SA, usando dos métodos, el primero fue usando el integrador steep, que fue dos minimizadas y el integrador I-bfgs, que se realizaron cinco minimizaciones, ambos métodos a 20000ps.

Culminada la minimización se obtuvo una estructura con un mínimo de energía global, en la figura 4.11 se observa como queda la estructura luego de culminar la minimización.

Posteriormente se realizó la simulación de dinámica molecular en un ensamble canónico NVT, a una temperatura de 309,65°K, usando una caja cúbica con volumen constante, cada lado de la caja midió 50nm. Las simulaciones se realizaron con condiciones periódicas de contorno. Las ecuaciones de movimiento fueron integradas

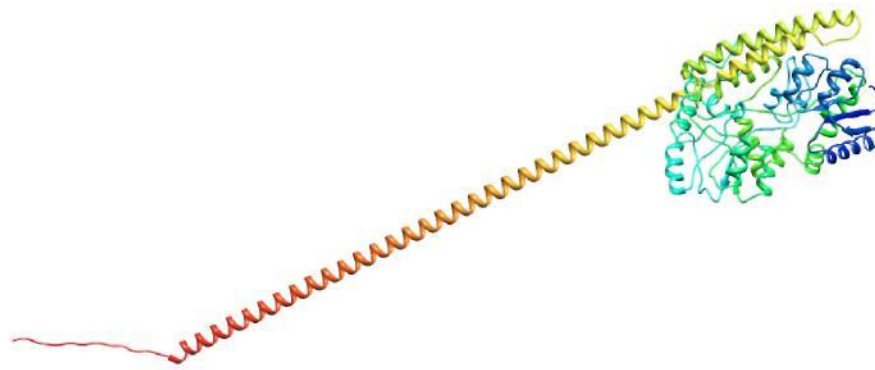


Figura 4.11: Estructura final de la Huntingtina mutada finalizada la minimización usando el algoritmo de leapfrog, en pasos de tiempo de $0,001\text{ps} = 1\text{fs}$ (10^{-15}s) por 10000000 pasos de integración, la temperatura fue regulada con el termostato de Nosé-Hoover. En la figura 4.12, se observa que terminada la dinámica molecular, el primer exón de la huntingtina mutada tienden a formar una esfera. Lo cual es debido a la cantidad de glutaminas que presenta la proteína mutada.



Figura 4.12: Estructura final de la Huntingtina mutada finalizada la simulación de dinámica molecular.

Terminada la simulación de dinámica molecular, se obtienen varios archivos finales, que presentan todos los cálculos realizados. Uno de esos archivos nos ayudará a conocer los datos de energía, este archivo se encuentra con la extensión .edr. Para obtener información de la variación energética, se procedió a analizar este archivo usando el comando `g_energy` obteniendo de esta forma un archivo con el resultado final de en-

energía potencial, cinética y total. En la figura 4.13, se observan que las energías se mantienen estables a lo largo del tiempo, cuando se revisa la gráfica de energía total se observa que se estabiliza a partir de 1750ps, manteniéndose la energía estable durante el tiempo de dinámica molecular.

Posteriormente haciendo uso del programa `g_dos`, se calcularon los datos de la densidad de estados, donde se observa la prevalencia de la estructura que más veces se repite con respecto al tiempo (ver figura 4.14(b)). Para poder revisar la permanencia de puentes de hidrógeno se hizo uso del programa `g_hbond` (ver figura 4.14(a)), donde se generó la gráfica de los puentes de hidrógeno que nos indica la permanencia de los mismos dentro de la estructura, lo que habla de la estabilidad de la estructura terciaria, ya que a medida que los puentes de hidrógeno permanentes se mantengan constantes, nos hallamos en una fase estable de la estructura.

Mediante el uso de los programas `g_rms`, y `g_rmsf`, se calculó la desviación media cuadrática con respecto a la distancia, los datos obtenidos se utilizaron para la generación del gráfico `rmsd`, este nos indica que el tiempo de estabilidad es alcanzado a partir de los 0,8ns, este dato es importante ya que es el tiempo tomado para la generación de la estructura promedio, la cual será utilizada en el docking, (ver figura 4.15(a)).

Con el comando de `g_rmsf` se calculó la fluctuación de la desviación media cuadrática por residuos, para así obtener información de que zonas de la estructura han variado en su posición, se nota, que la mayor fluctuación se presentó entre los aminoácidos del 270 al 275, del 386 al 396, del 475 al 481, del 518 al 524 y del 549 al 552 con un movimiento de 1,3nm en su pico máximo, como se aprecia en la figura 4.15(b).

Finalmente para verificar la estructura, se hizo uso del diagrama de Ramachandran, para ello se usó el archivo final de extensión `.gro`, el cual fue convertido a un archivo de extensión `.pdb` y este archivo fue alzado en el servidor de Molprobit.

Molprobit nos proporcionó el diagrama, analizando la estructura de la proteína mutada (ver figura 4.16) se observa que un 86.4 % de residuos se encuentran en zonas

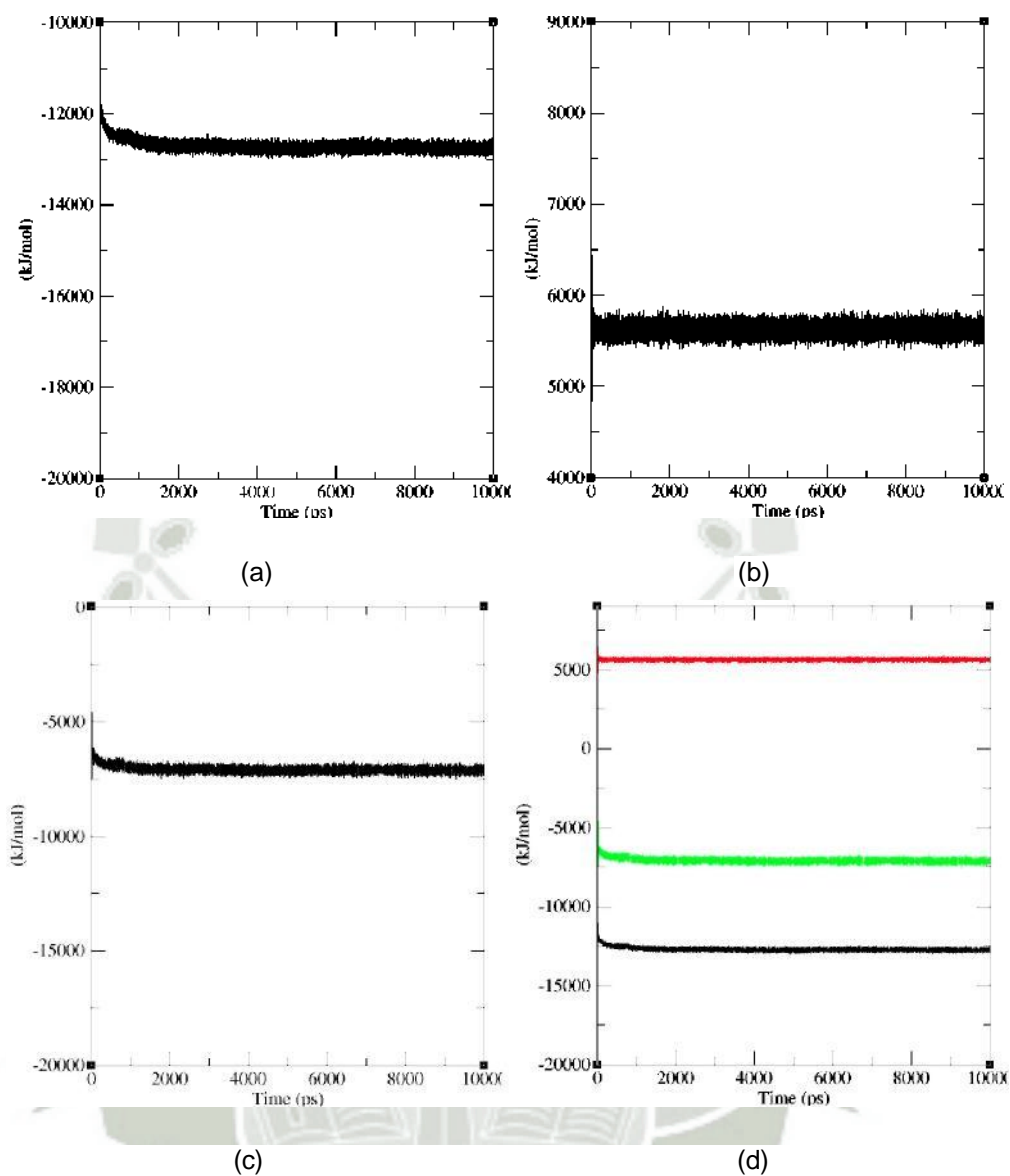


Figura 4.13: Energías obtenidas de la dinámica molecular del primer exón de la Huntingtina mutada. (a) Energía Potencial (b) Energía Cinética (c) Energía Total (d) Energía potencial (color negro), Energía Cinética (color rojo) y Energía Total (color verde)

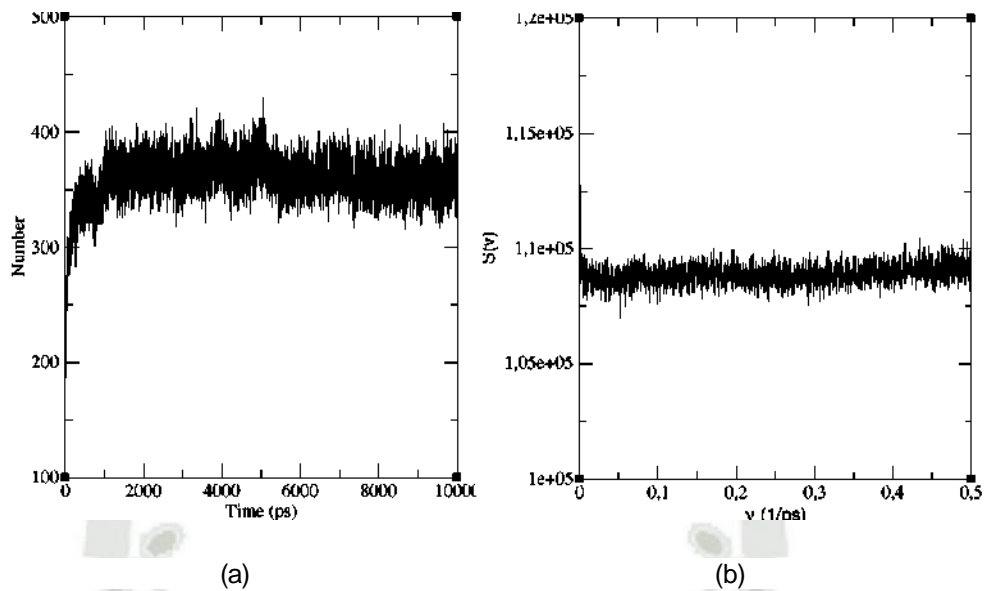


Figura 4.14: Parámetros de estabilidad de la estructura Huntingtina mutada. (a) Permanencia de puentes de hidrógeno (b) Densidad de estados

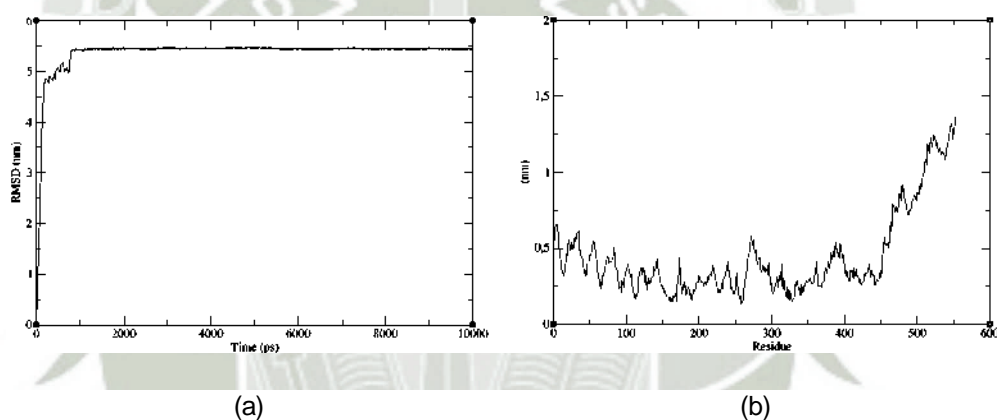


Figura 4.15: Desviación media cuadrática del primer exón de la Huntingtina mutada. (a) RMSD (b) RMSF

permitidas y 99.5 % en zonas favorecidas. En la figura se muestran los aminoácidos que se encuentran fuera de la zona permitida siendo la SER114, GLU172 y GLN414.

En el primer diagrama (superior izquierdo) se observa la distribución de las alfa hélices y hebras beta, el lugar de las alfa hélices (inferior izquierda del primer diagrama) se encuentra con varias alfa hélices, en la figura 4.12 se presenta la proteína con muchas alfa hélices y pocas láminas beta, es por ello que los ángulos phi y psi permitidos definen regiones del diagrama de Ramachandran que corresponden a elementos

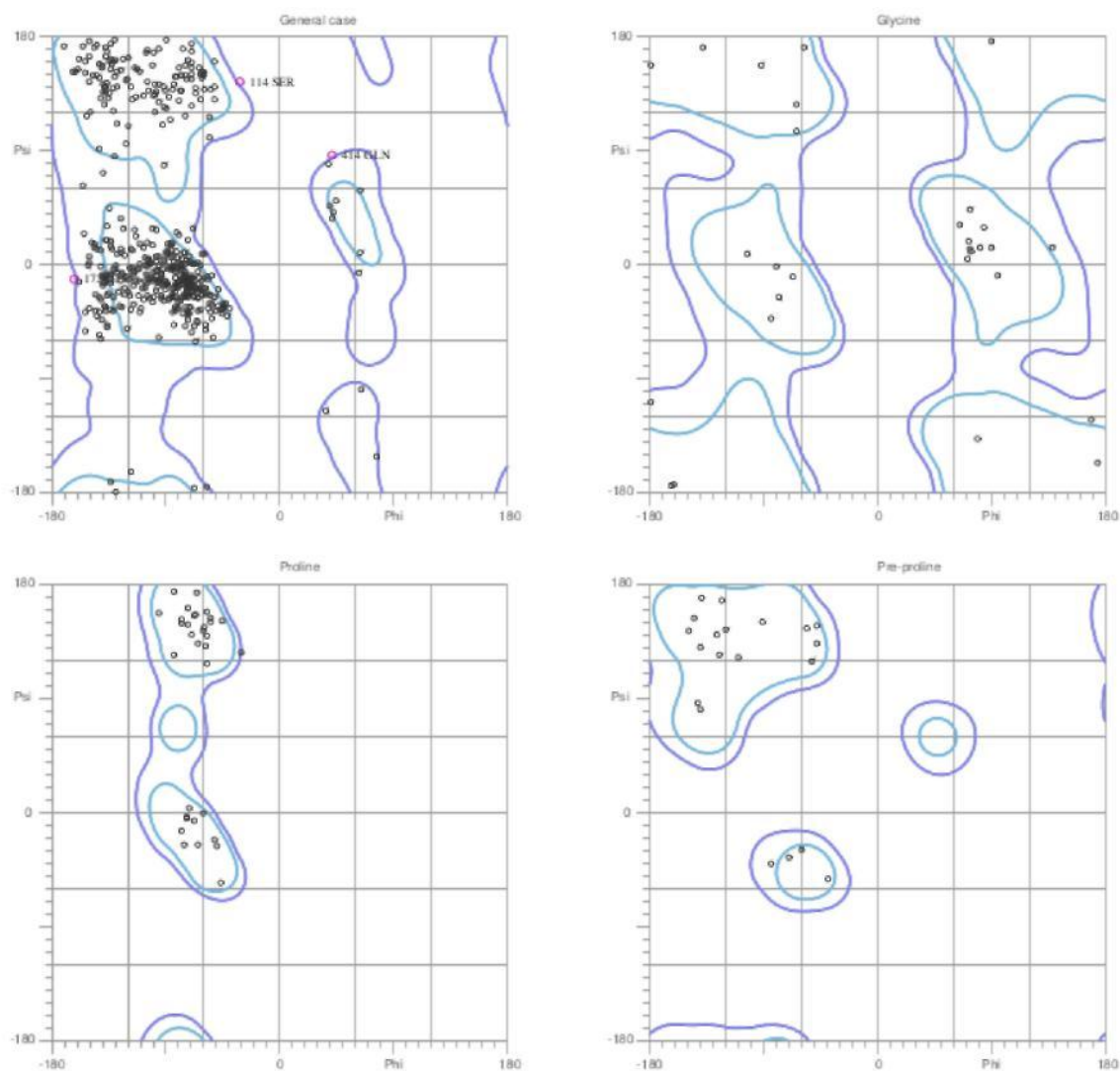


Figura 4.16: Diagrama de Ramachandran de la Huntingtina mutada

de estructura secundaria (hélices alfa y láminas beta).

4.4. Construcción de los diferentes osmolitos

En el programa de MOLDEN, se construyeron los diferentes osmolitos, obteniendo los constructos, los cuales fueron guardados en formato .xyz, posteriormente se usó Gaussian, lo cual ayudó a evaluar la posición final de los átomos de cada constructo (ver figura 4.17).

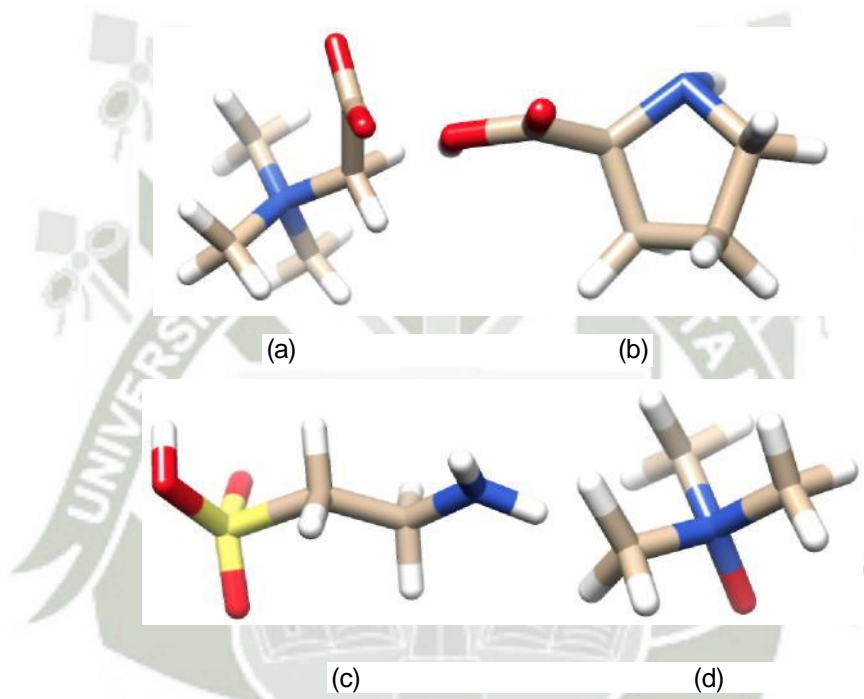


Figura 4.17: Optimización de la estructura tridimensional con Gaussian de los diferentes osmolitos. (a) Betaína (b) Prolina (c) Taurina (d) TMAO

Luego de validar la estructura molecular de los diferentes osmolitos, se procedió a diseñar los nuevos archivos de campos de fuerza para los diferentes osmolitos, para ello se usó el cálculo final que proporcionó Gaussian de la posición de los átomos de cada osmolito, seguidamente se usó Gausview, el cual nombró los átomos de cada osmolito con una denominación que es leída en Amber. Luego en el terminal ingresamos como super usuario al archivo de campo de fuerza de Amber (`cd /usr/local/gromacs/share/gromacs/top/Amber99sb - ildn.ff`), y ahí ingresamos al archivo `aminoacids.rtp`

con el Editor de textos para lo cual se digitó en el terminal gedit aminoacids.rtp y se agregó los datos de cada osmolito recién creado (ver Anexo A.5, A.7, A.8, A.9). También se incorporaron nuevos datos al archivo forcefield.itp (ver Anexo A.10), debido a que no existen datos referidos a ángulos, diedros y distancias de algunos átomos con respecto a otros átomos con los que se unen, para formar las nuevas moléculas.

Obtenido el campo de fuerza de Amber modificado, se procedió a realizar la minimización de energías, para lo cual se usó el integrador I_bfgs, con 20000ps, terminada la minimización se realizó la dinámica molecular en ensamble canónico NVT, dentro de una caja cúbica de 5nm por cada lado, una temperatura de 309,65°K, la dinámica se corrió en 10000000ps. Terminada la dinámica se procedió a ver las moléculas en el software de Chimera6.1 y se observó los diagramas de densidad de estados, rmsd, rmsf y las energías de cada molécula en el software de XMGRACE.

4.4.1. Betaína

El osmolito Betaína se muestra en la figura 4.18, se presentan dos tipos de modelos moleculares, el de bolas y varillas (balls and sticks) donde no se refleja ni el tamaño ni la forma real de la molécula, pero si se distingue claramente los diferentes átomos y enlaces. El otro modelo molecular es el de superficies hidrofóbicas e hidrofílicas.

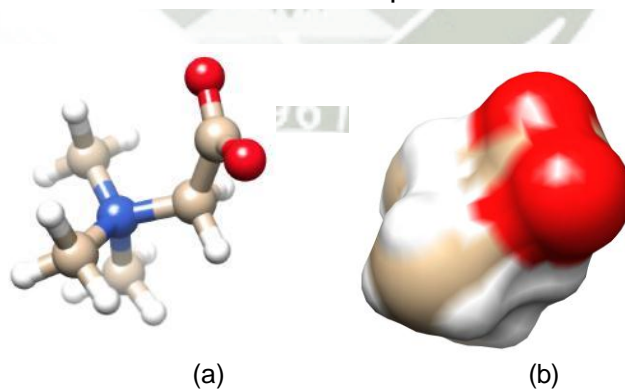


Figura 4.18: Representación molecular del osmolito Betaína. (a)Bolas y Varillas (b) Superficie hidrofóbica e hidrofílica

Se usó el comando g_dos, para determinar la densidad de estado, el diagrama

obtenido se muestra en la figura 4.19, donde podemos afirmar que la prevalencia de la estructura del osmolito se mantiene a lo largo del tiempo.

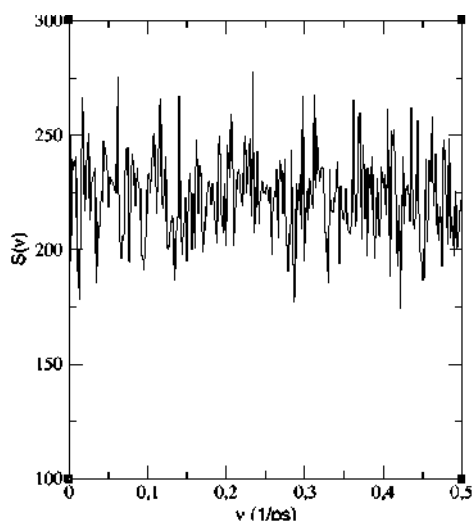


Figura 4.19: Densidad de Estados del osmolito Betaína

Se usó el comando de `g_rmsd` para determinar la desviación media cuadrática, donde el tiempo de estabilidad está dado por 0, 15ns este dato se aprecia en la figura 4.20(a), la fluctuación de la desviación media cuadrática por átomos, se muestra en la figura 4.20(b), se realizó usando el comando `g_rmsf` donde se observa que la mayor fluctuación se presentó en los átomos del 6 al 9, del 15 al 16 y del átomo 19, con un movimiento de 0,17nm en su pico máximo.

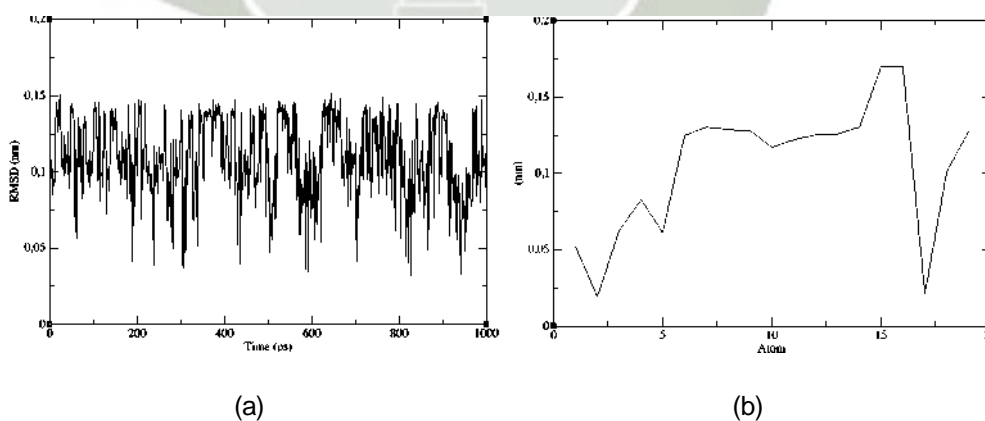


Figura 4.20: Desviación media cuadrática del osmolito Betaína. (a) RMSD (b) RMSF

Para determinar las energías, se usó el comando `g_energy`, donde se obtuvo la energía cinética, potencial y total en la figura 4.21 se observa los diagramas, donde puede-

mos ver que la energía total comienza a estabilizarse a partir de 5ps manteniendo la estabilidad a lo largo del tiempo.

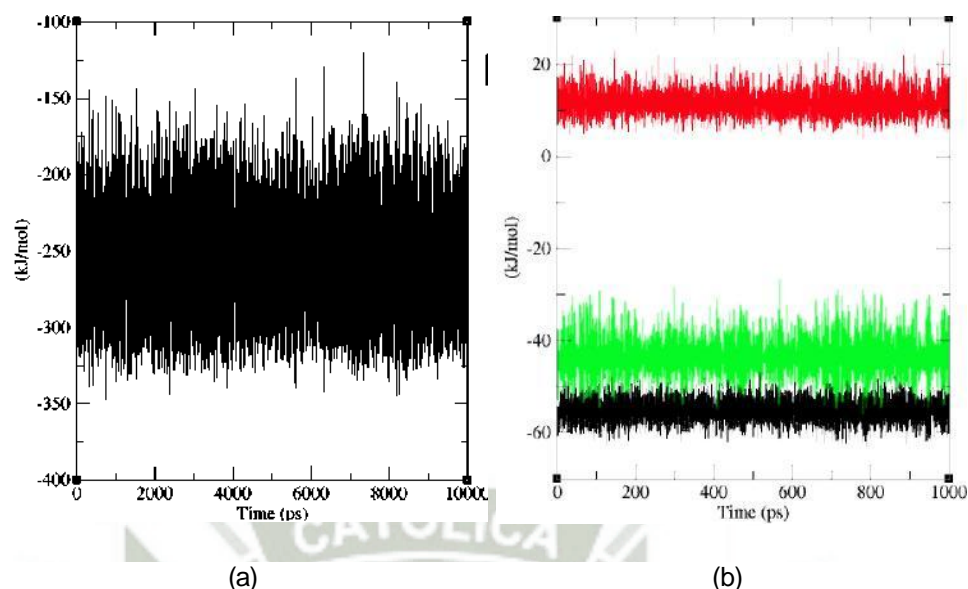


Figura 4.21: Diagramas de la energía del osmolito Betaína. (a) Energía total (b) Energía potencial (color negro), Energía Cinética (color rojo) y Energía Total (color verde)

4.4.2. Prolina

La estructura del osmolito prolina, luego de realizada la dinámica molecular, se aprecia en la figura 4.22, donde se visualiza la molécula en su forma tridimensional, usando el modelo de bolas y varillas, y también se observa el modelo molecular de superficies hidrofóbicas e hidrofílicas.

Para determinar la densidad de estados se usó el comando de `g_dos`, donde se obtuvo el diagrama que se muestra en la figura 4.23, se observa que el estado estructural en que nos encontramos perdura a lo largo del tiempo.

La desviación media cuadrática se determinó usando el comando `g_rmsd`, donde se observa que la estabilidad del osmolito prolina se da a partir de 200ps, también se determinó la fluctuación media cuadrática usando el comando `g_rmsf`, donde se observa en la figura 4.24(b) que existe una mayor fluctuación en los átomos 17, del 11

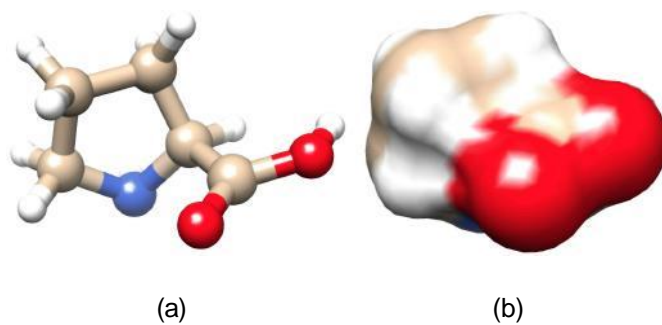


Figura 4.22: Representación molecular del osmolito Prolina. (a)Bolas y Varillas (b) Superficie hidrofóbica e hidrofílica

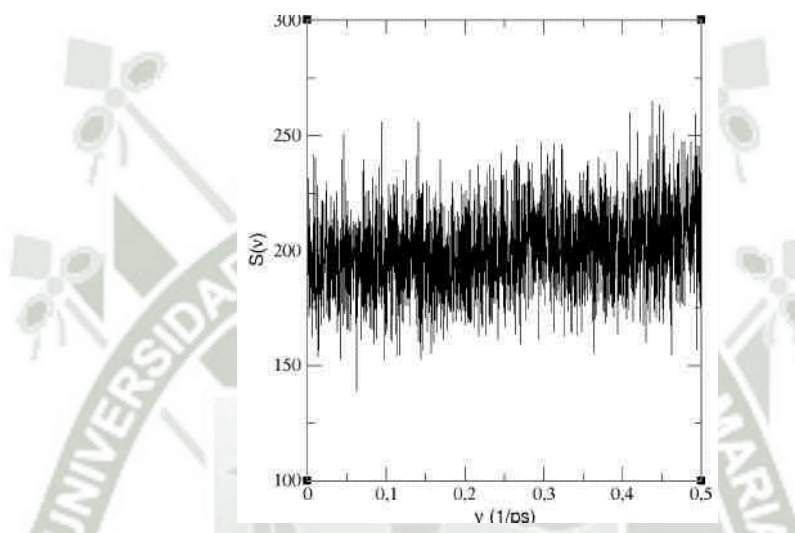


Figura 4.23: Densidad de Estados del osmolito Prolina. al

12 y átomos del 16 al 17 se observa un pico máximo a 0,1225nm.

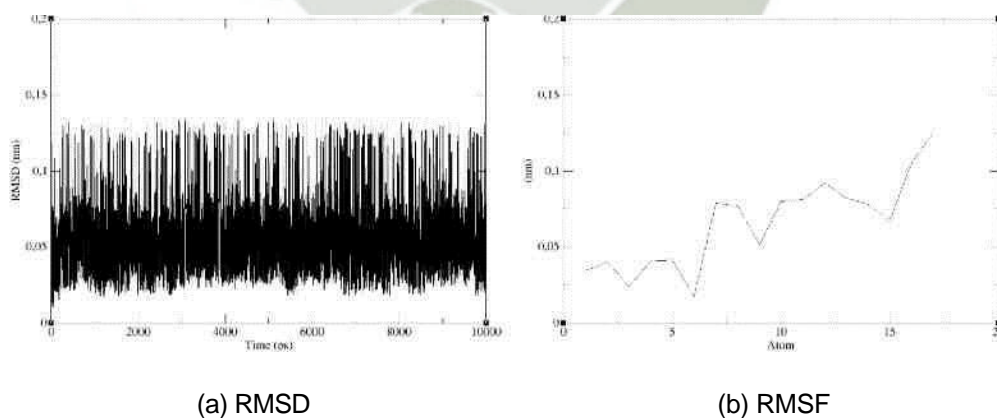


Figura 4.24: Desviación media cuadrática del osmolito Prolina. (a) RMSD (b) RMSF

Se usó el comando `g_energy` para determinar las energías del osmolito, en la figu-

ra 4.25 se observa que comienza a estabilizarse a partir de 500.ps, manteniéndose a lo largo del tiempo.

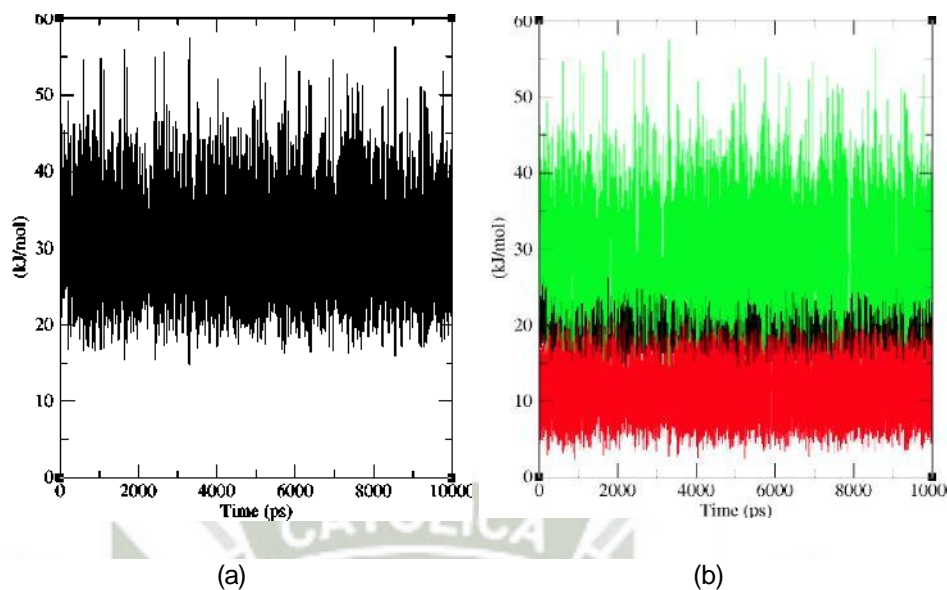


Figura 4.25: Diagramas de la energía del osmolito Prolina. (a) Energía total (b) Energía potencial (color negro), Energía Cinética (color rojo) y Energía Total (color verde)

4.4.3. Taurina

En la figura 4.26, se observa la estructura del osmolito Taurina, en dos tipos de representación de formas moleculares, una de bolas y varillas, y otra de superficie hidrofóbica e hidrofílica. En la figura 4.18(b), se distinguen la zonas hidrofílicas de color azul y la región hidrofóbica de color rojo, la taurina presenta las dos zonas.

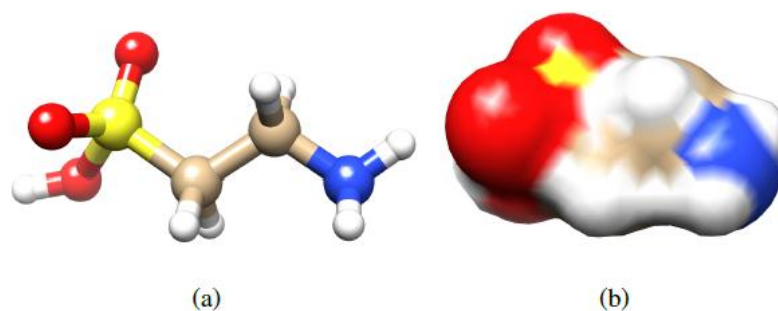


Figura 4.26: Representación molecular del osmolito Taurina. (a)Bolas y Varillas (b) Superficie hidrofóbica e hidrofílica

Para ver la densidad de estado de la taurina, se usó el comando `g_dos` en la figura 4.27, se observa que la prevalencia de la estructura del osmolito se mantiene a lo largo del tiempo.

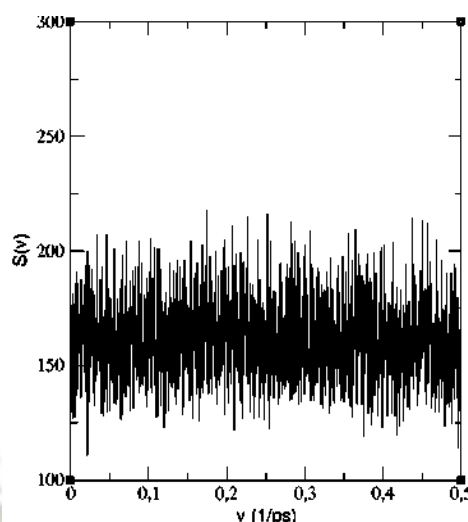


Figura 4.27: Densidad de Estados del osmolito Taurina.

Para validar la estructura del osmolito taurina, se realizó la desviación media cuadrática, para ello se usó `g_rmsd` el diagrama se observa en la figura 4.28(a), donde la estabilidad del osmolito se da a partir de 100ps, para determinar la fluctuación se usó `g_rmsf`, los valores obtenidos se observan en la figura 4.28(b), la mayor fluctuación se da en los átomos 2, del 7 al 8 y los átomos del 11 al 12, se muestra el pico máximo a 0,1536nm.

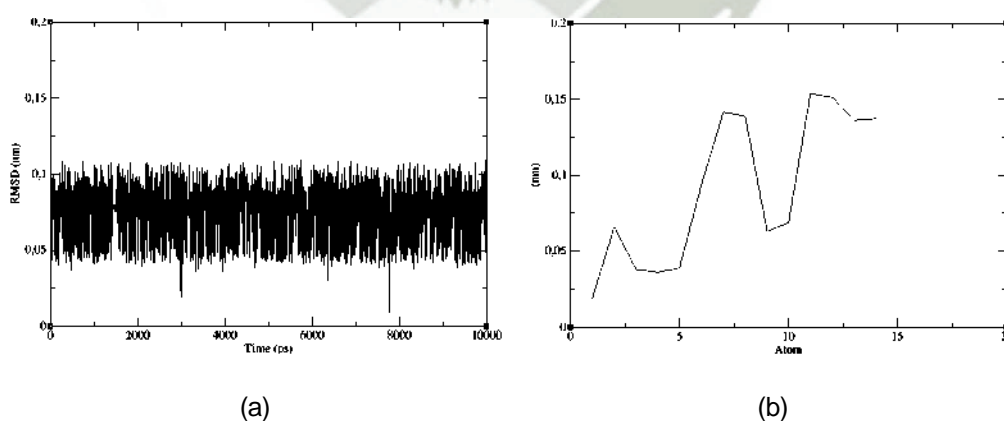


Figura 4.28: Desviación media cuadrática del osmolito Taurina. (a) RMSD (b) RMSF

Para obtener los datos de energía cinética, potencial y total se usó el comando

`g_energy`, donde se obtuvo las imágenes que se observan en la figura 4.29, la energía total del osmolito se establece a partir de 250 ps, manteniéndose a lo largo del tiempo.

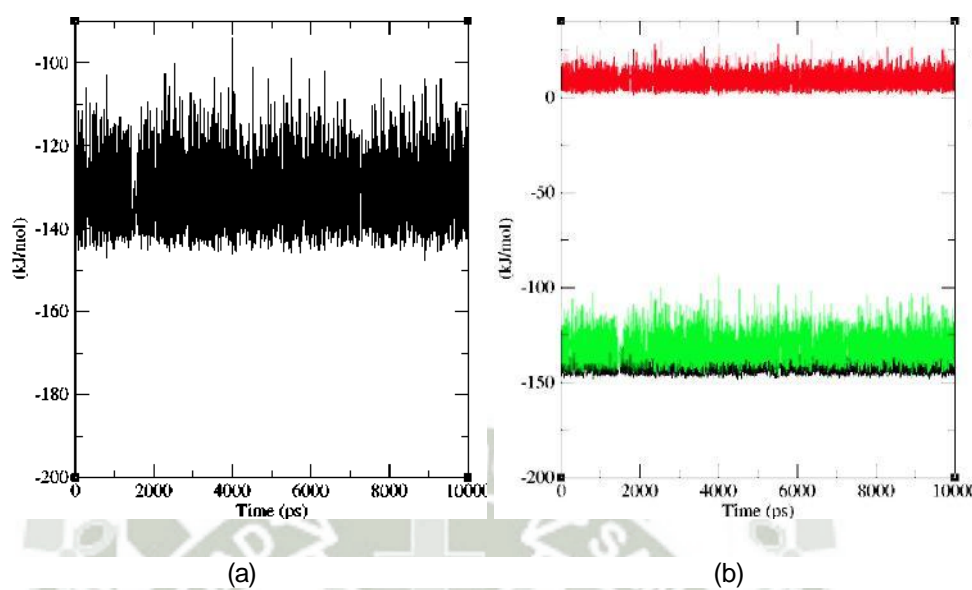


Figura 4.29: Diagramas de la energía del osmolito Taurina. (a) Energía total (b) Energía potencial (color negro), Energía Cinética (color rojo) y Energía Total (color verde)

4.4.4. TMAO

Se obtuvo dos representaciones de formas moleculares las cuales se presentan en la figura 4.30, aquí se aprecia la forma de bolas y varillas, donde se observan los átomos que conforman el osmolito, el segundo modelo molecular muestra la superficie hidrofóbica e hidrofílica, que para el osmolito muestra ambas superficies. La superficie de color rojo indica la región hidrofóbica de la molécula y el color azul indica la región hidrofílica.

Para obtener el diagrama de densidad de estado, se usó el comando `g_dos` el cual se muestra en la figura 4.31, donde se observa que la estructura del osmolito perdura a lo largo del tiempo.

Se usó el comando de `g_rmsd` para determinar el diagrama de la desviación media

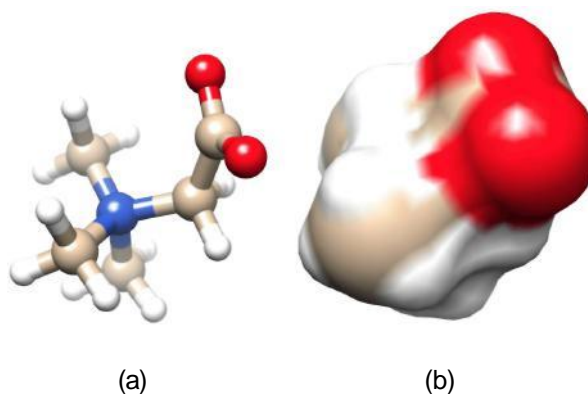


Figura 4.30: Representación molecular del osmolito TMAO. (a)Bolas y Varillas (b) Superficie hidrofóbica e hidrofílica

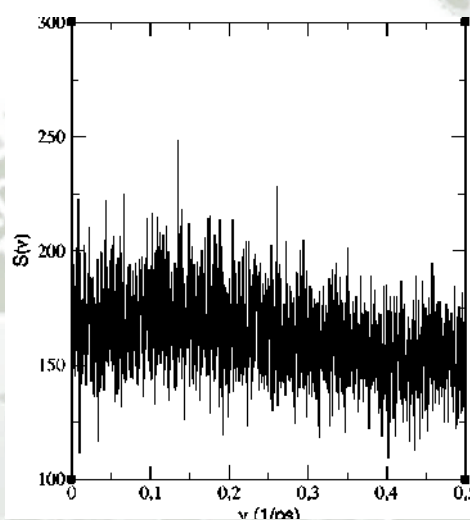


Figura 4.31: Densidad de Estados del osmolito TMAO.

cuadrática del osmolito, en la figura 4.32(a) se observa que la estabilidad de la estructura se da a partir de 70ps y para ver la fluctuación se usó el comando `g_rmsf`, en la figura 4.32(b) se observa que la mayor fluctuación se da en el átomo 6 con un pico máximo de 0,1028nm.

Las energías obtenidas del osmolito TMAO, fueron obtenidas usando el comando `g_energy`, en la figura 4.33 se observa que la energía total comienza a estabilizarse a partir de 100ps, manteniéndose constante hasta culminar la dinámica molecular.

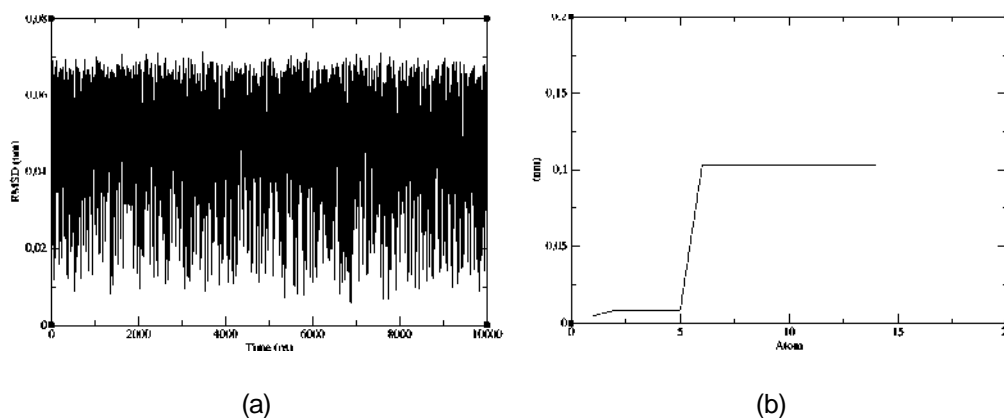


Figura 4.32: Desviación media cuadrática del osmolito TMAO. (a) RMSD (b) RMSF

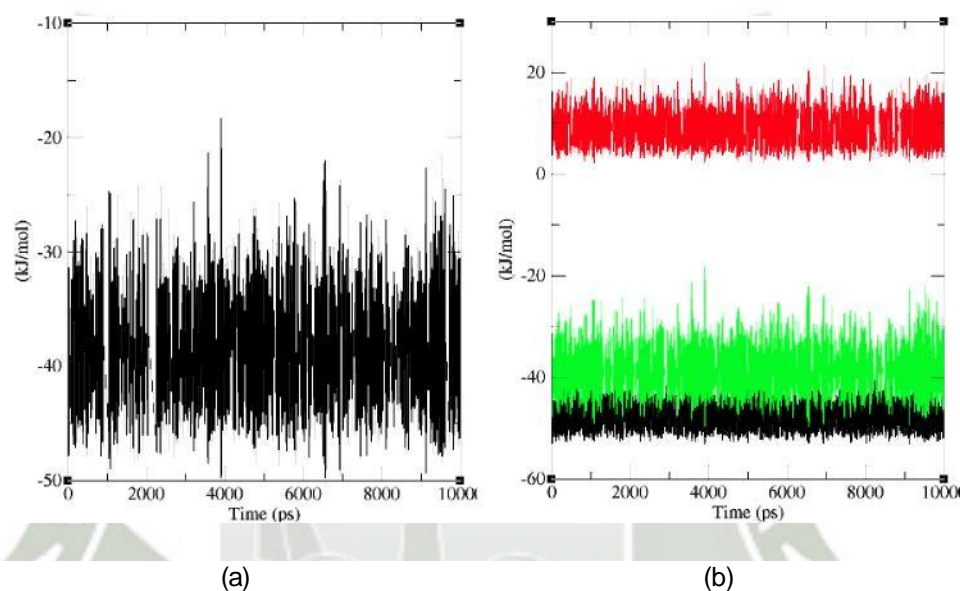


Figura 4.33: Diagramas de la energía del osmolito TMAO. (a) Energía total (b) Energía potencial (color negro), Energía Cinética (color rojo) y Energía Total (color verde)

4.5. Interacción Proteína mutada con osmolito

Culminada la dinámica molecular de todas las moléculas, se obtuvo los archivos finales de dinámica molecular, siendo .gro uno de ellos, este archivo se procedió a convertir a un formato de extensión .pdb, los archivos con la extensión .pdb fueron ingresados al servidor de HEX, realizándose el docking del primer exón de la huntingtina mutada con los diferentes osmolitos, obteniendo de esta forma una estructura cuaternaria.

4.5.1. Interacción Httm-Betaína

En la figura 4.34(a) se observa que para encontrar una interacción óptima, el servidor de Hex tuvo que predecir varios sitios de interacción.

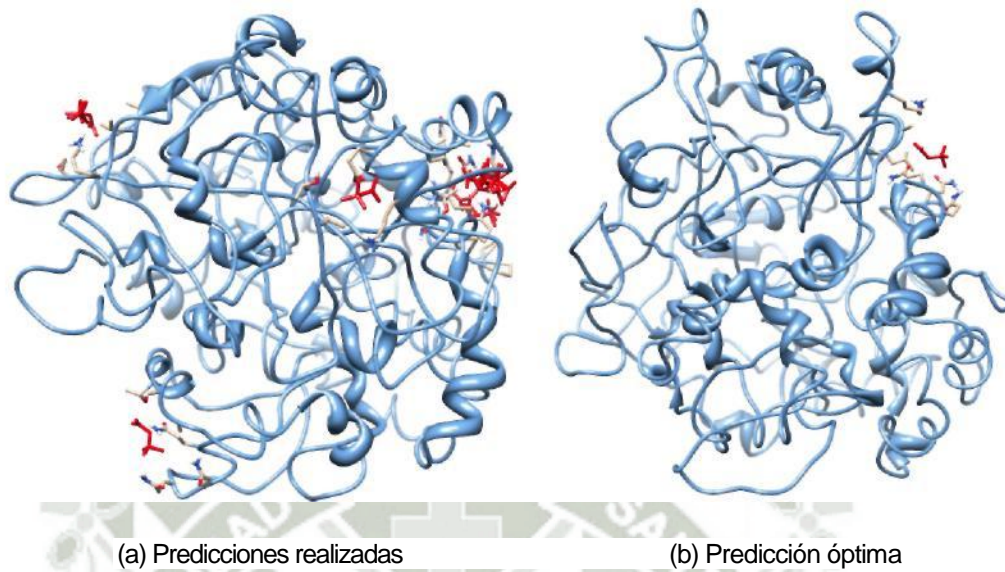


Figura 4.34: Predicción realizada en el servidor de HEX, para la interacción Httm-Betaína

Terminada la predicción el servidor de HEX, selecciona la predicción óptima, dicho archivo se encuentra bajo una extensión .pdb, este archivo es abierto en el visualizador de Quimera6.1, en la figura 4.34(b) se ve el sitio de unión óptimo del osmolito con la Huntingtina mutada.

Para poder ubicar la secuencia de glutaminas repetidas, se coloreo la proteína diferenciando la secuencia repetida de la proteína total, del mismo modo se coloreo el osmolito. En la figura 4.35, se muestra de color rojo la secuencia glutaminas repetidas y de color verde el osmolito Betaína.

En la Figura4.36 se observa los aminoácidos de la proteína Huntingtina mutada que interacciona con el osmolito Betaína, lo aminoácidos son: ALA21, LYS34, LEU20, THR36, GLN462, GLN465 y GLN466.

Prontamente se realizó la minimización de la energía del sistema interactuante, usando el integrador I - bfgs con 20000ps, terminada la minimización se continuó

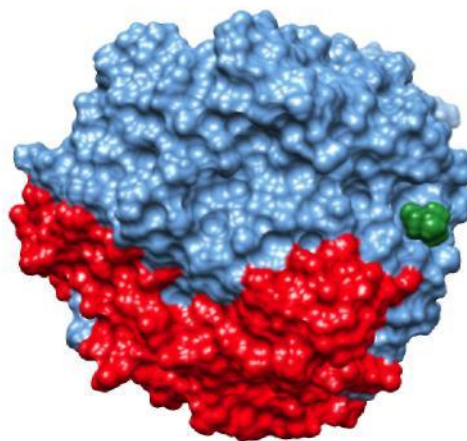


Figura 4.35: Estructura tridimensional de la interacción Httm-Betaína.

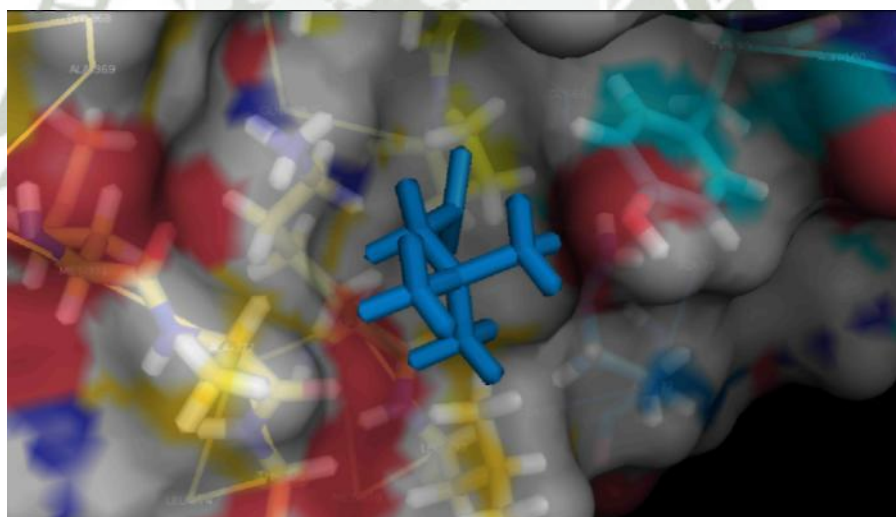


Figura 4.36: Sitio de unión de la Huntingtina mutada con el osmolito Betaína.

con la dinámica del sistema interactuante en un ensamble canónico NVT, el archivo de .mdp usado fue el que se encuentra en el anexo A.4, debido a que el sistema tiene dos moléculas que interactúan. Esta dinámica se realizó a una temperatura de 309,65°K, usando una caja cúbica con volumen constante, cada lado de la caja mide 20nm. Las simulaciones se realizaron con condiciones periódicas de contorno. Las ecuaciones de movimiento fueron integradas usando el algoritmo de leapfrog, en pasos de tiempo de 0,001ps = 1fs (10^{-15} s) por 30000000 pasos de integración, la temperatura fue regulada con el termostato de Nosé-Hoover.

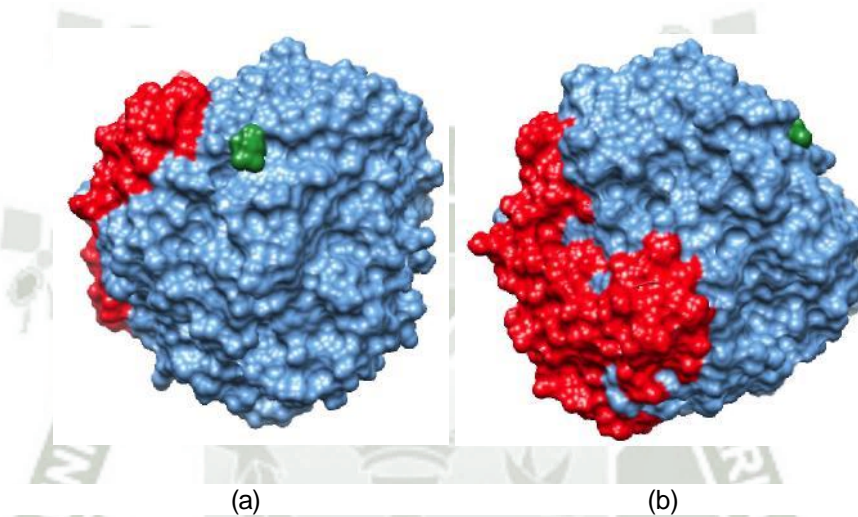


Figura 4.37: Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) 0.5ns (b) 1ns

En el programa de Chimera 6.1, se observó la película de dinámica molecular, para ello se usó los archivos finales de dinámica molecular, los cuales fueron: .tpr y .trr, durante el evento se tomaron las siguientes fotografías a diferentes tiempos, en la figura 4.37 se observan los tiempos de 0.5ns y 1ns, aquí se observa que el osmolito no se mantiene fijo en un solo sitio, por ello se observa que va moviéndose alrededor de la proteína mutada.

En la figura 4.38, se observa que llegando a 1.5ns, la betaína está alejada de la proteína mutada, esto es debido a que no encontró un sitio de unión, lo mismo ocurre en 2ns. Terminado el tiempo de dinámica no se observa algún cambio con respecto a la unión del osmolito con la proteína.

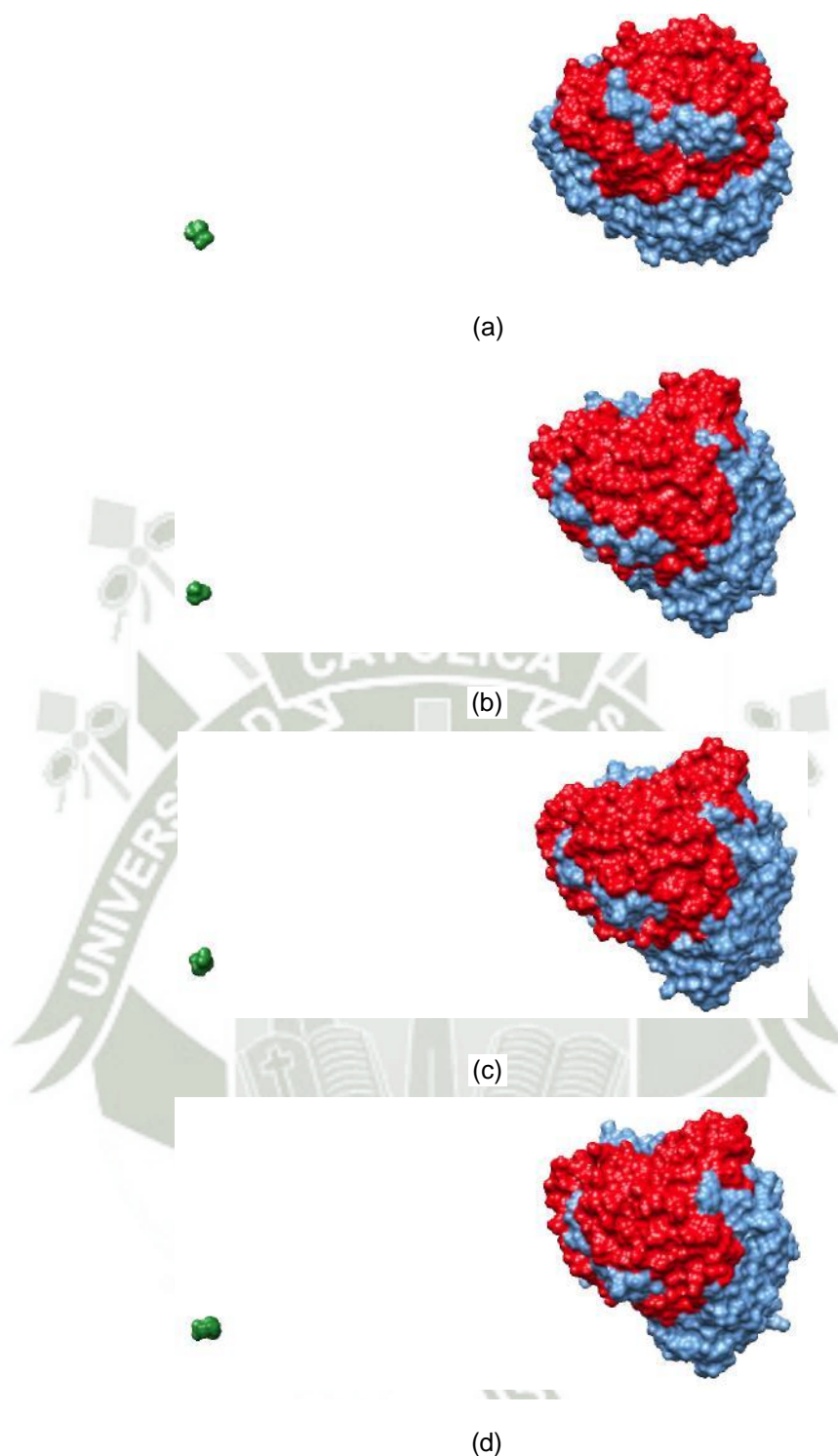


Figura 4.38: Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) 1.5ns (b) 2ns c) 2.5ns (d) 3ns

Los resultados obtenidos nos muestran que el osmolito Betaína no tiene algún efecto para contrarrestar el efecto de mutación.

Para verificar la estabilidad de la estructura se realizó el cálculo de desviación media cuadrática usando el comando `g_rmsd`, en la figura 4.39(b), se observa que a partir de 0ps la estabilidad de la estructura se mantiene constante, cuando comienza 5050ps se va perdiendo la estabilidad y en 11270ps se observa un pico máximo de 0,9394nm, en este tiempo ocurre un cambio brusco lo cual es debido a que el osmolito Betaína se aleja de la proteína Huntingtina mutada, es por ello que pasado ese tiempo, vuelve a estabilizarse el sistema interactuante manteniéndose estable hasta que finalice la simulación de dinámica molecular.

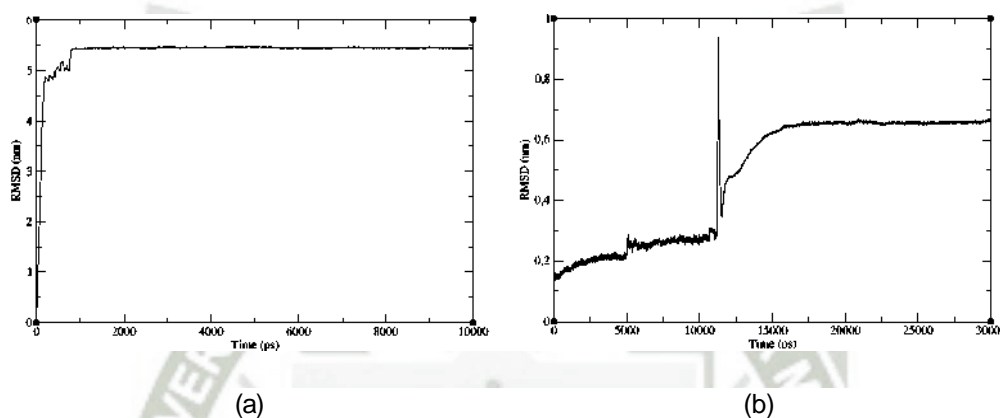


Figura 4.39: Desviación media cuadrática de la interacción Httm-Betaína. (a) RMSD de Httm (b) RMSD del sistema interactuante

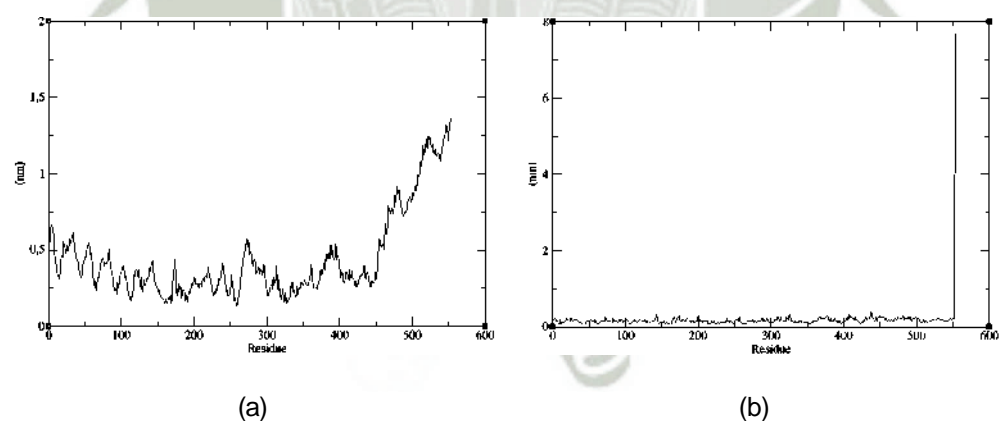


Figura 4.40: Fluctuación de la interacción Httm-Betaína. (a) RMSF de Httm (b) RMSF del sistema interactuante

Finalizado el análisis de la desviación media cuadrática se procedió a verificar la fluctuación del sistema, para ello se usó el comando `g_rmsf`, de donde se obtuvo un

archivo final el cual fue lanzado en el software de Xmgrace, en la figura 4.40(b), se observa que la mayor fluctuación se ve en el residuo que pertenece a la Betaína, con un pico máximo de 7,68nm, existiendo una gran diferencia en la fluctuación con respecto a la proteína sin osmolito, ya que los que ocasionan mayor fluctuación en la proteína sin ligando son los residuos de glutaminas, en la figura 4.39(a) se observa la fluctuación de la proteína mutada sin osmolito.

Se determinó la energía del sistema interactuante, para esto se usó el comando `g_energy`, donde se obtuvo un archivo final de extensión `.xvg` el cual fue abierto en el programa de Xmgrace, este programa nos permitió ver las gráficas de energía potencial, energía cinética y energía total. En la figura 4.41 se observa que la estabilidad de la energía comienza desde que se inició la dinámica, lo que indica que todo el sistema esta con la energía constante.

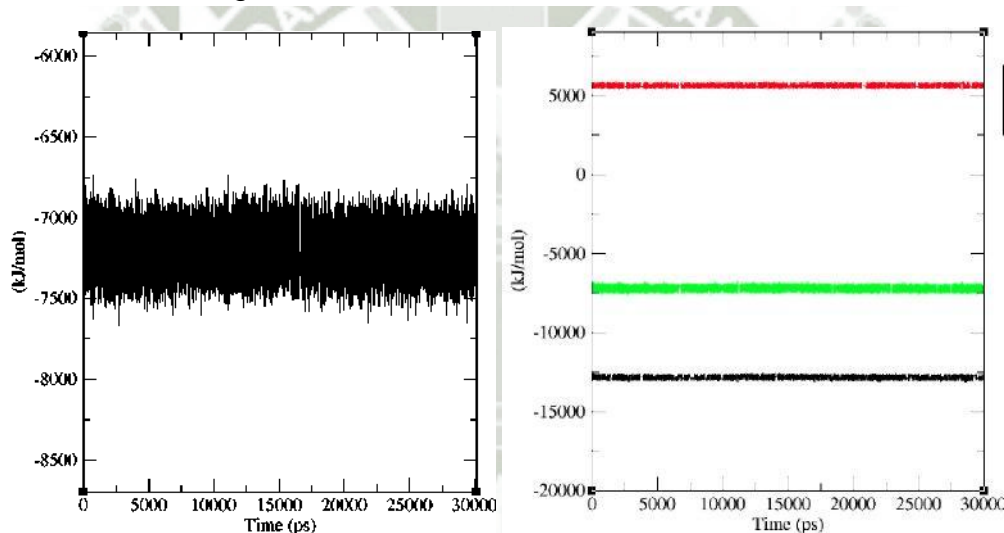


Figura 4.41: Energías obtenidas luego de concluida la dinámica molecular de Httm-Betaína. (a) Energía Total (b) Energía potencial (color negro), Energía Cinética (color rojo) y Energía Total (color verde)

Finalmente para validar la estructura del sistema interactuante se procedió el análisis del diagrama de Ramachandran, para lo cual se usó el servidor Molprobit, al cual se introdujo el archivo final de dinámica molecular `.gro`, que para realizar el análisis tuvo que ser convertido a un archivo de extensión `.pdb`. Culinado el cálculo se obtuvo un

archivo final, en la figura 4.42 se observa que un 87.6 % de residuos se encuentran en zonas permitidas y 99.1 % en zonas favorecidas.

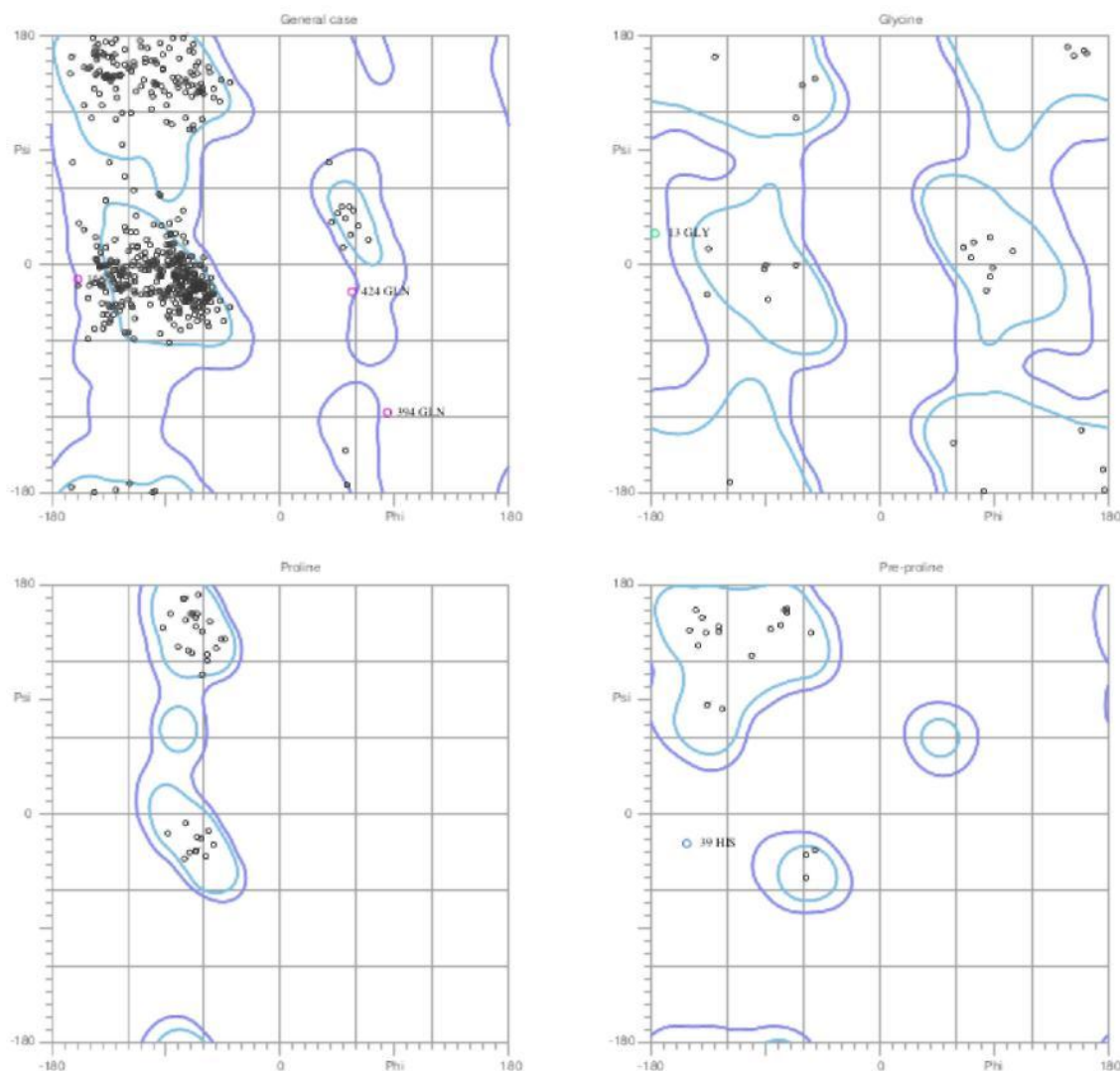


Figura 4.42: Diagrama de Ramachandran del sistema Httm-Betaína.

En el diagrama se muestran los aminoácidos que se encuentran fuera de la zona permitida siendo GLY13, HIS39, ALA168, GLN394 y GLN424. En el caso de las glicinas es probable que nos indique un incremento de reactividad por metilación en esa posición, para el caso del análisis de las pre-prolinas, podemos observar que la Histidina-39, se halla en la región que no corresponde a zonas favorecidas ni permitidas, en este caso, observamos un leve movimiento en la reactividad de las zonas correspondientes a las preprolinas y cuando realizamos el análisis de las prolinas, podemos observar

que ninguna sale de las regiones favorecidas o permitidas, lo que indica claramente que nuestra estructura, es estable a mutaciones por efecto de rompimiento de anillos prolínicos y para sustituciones de tipo nucleofílica, pero inestable para la generación de anillos prolínicos sustituidos.

4.5.2. Interacción Httm-Taurina

En el servidor de Hex, se predijo el docking de la Huntingtina mutada con el osmolito Taurina, de donde se obtuvo las imágenes que se muestran en la figura 4.43, la primera imagen muestra las zonas de la proteína a la que posiblemente se une la taurina, de donde el servidor elige el óptimo, el cual se aprecia en la figura 4.43(b).

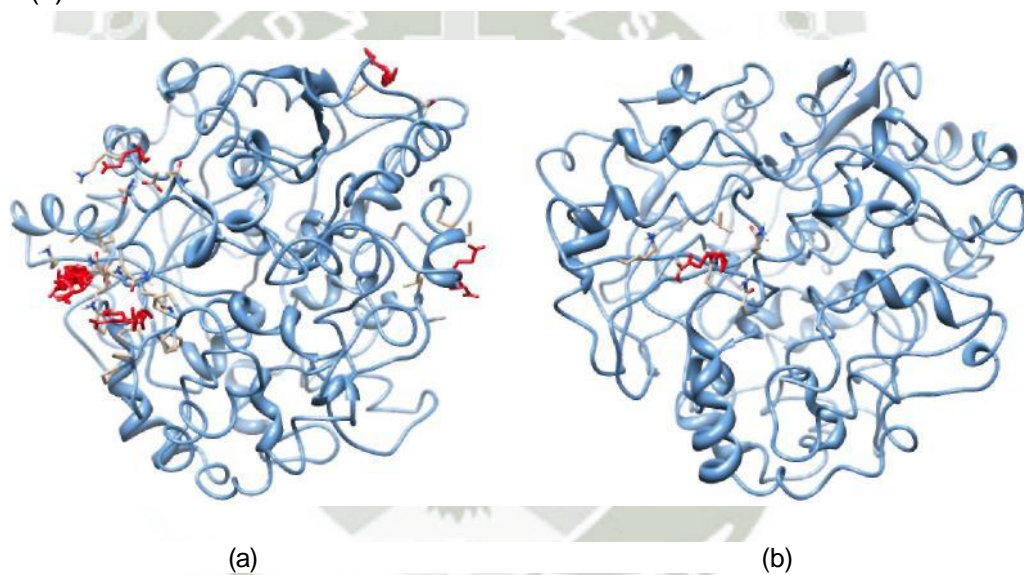


Figura 4.43: Predicción realizada en el servidor de HEX para el osmolito Taurina con la Huntingtina mutada. (a) Predicciones realizadas (b) Predicción óptima

Con el visualizador de Quimera 6.1, se observó la estructura en la forma molecular de superficie, la figura 4.44 muestra la estructura inicial de como queda el docking, para poder diferenciar la región donde se repiten las glutaminas se coloreo de color rojo, y el osmolito se presenta de color verde. El análisis refleja que el osmolito taurina se ubica en una parte de la región de la secuencia repetida, formando una cavidad en la cual se aloja.

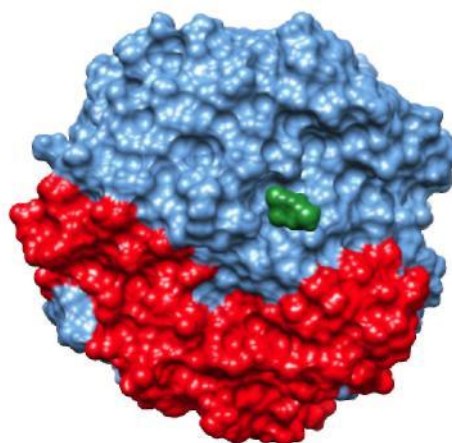


Figura 4.44: Estructura tridimensional de la interacción Httm-Taurina.

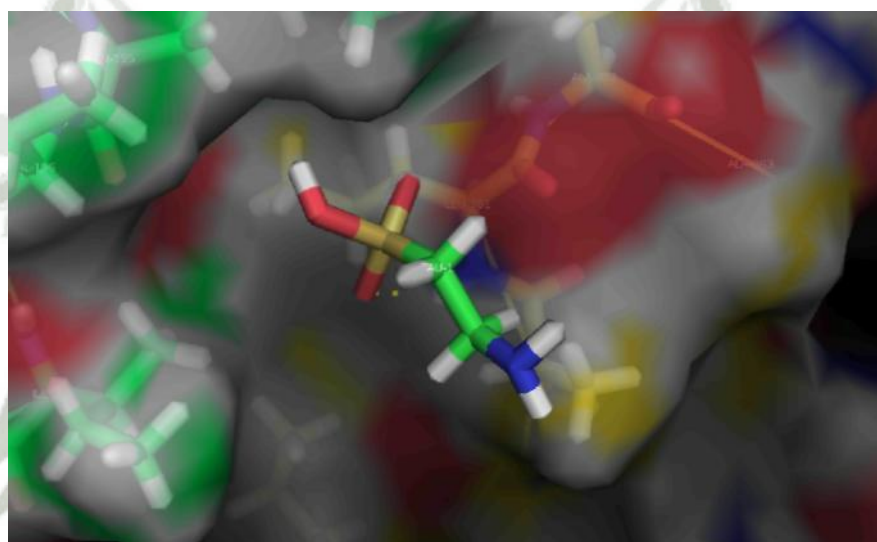


Figura 4.45: Sitio de unión de la Huntingtina mutada con el osmolito Taurina.

Con el visualizador de Pymol, se observa que los aminoácidos que interactúan con el osmolito taurina son: LEU20, ALA21, THR36, GLN462, GLN465 Y GLN466. En la figura 4.45, muestra el lugar donde se une el osmolito taurina.

Finalizado el análisis con el visualizador, se procedió con la minimización de los sistemas interactuantes, para ello se usó el archivo que nos ofrece el servidor Hex, el cual se presenta en un formato .pdb, para la minimización de las energías del sistema interactuante, se usó el integrador I - bfgs con 20000ps.

Terminada la minimización se continuó con la simulación de dinámica del sistema

interactuante en un ensamble canónico NVT, el archivo de .mdp usado fue el que se encuentra en el anexo A.4. La dinámica se realizó a una temperatura de 309,65°K, usando una caja cúbica con volumen constante, cada lado de la caja midió 20nm. Las simulaciones se realizaron con condiciones periódicas de contorno. Las ecuaciones de movimiento fueron integradas usando el algoritmo de leapfrog, en pasos de tiempo de 0,001ps = 1fs (10^{-15} s) por 30000000 pasos de integración, la temperatura fue regulada con el termostato de Nosé-Hoover.

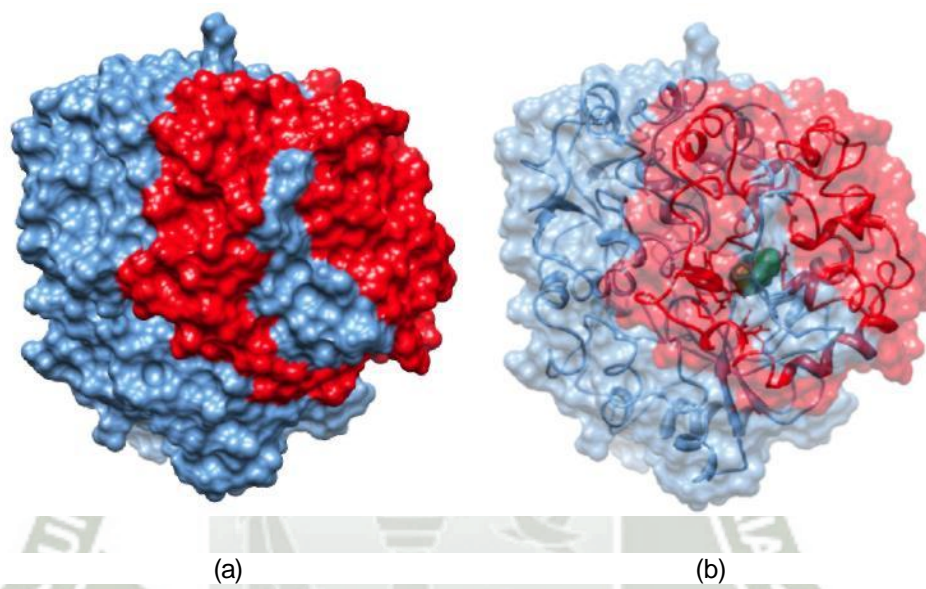


Figura 4.46: Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) Superficie sólida a 0.5ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 0.5ns

Culminada la dinámica molecular, se dio inicio a la película de dinámica molecular, para ello se usó el programa de Quimera 6.1, del cual se obtuvieron imágenes de la simulación a diferentes tiempos (0.5ns, 1ns, 1.5ns, 2ns, 2.5ns y 3ns).

En la figura 4.46 se observa que a 0,5ns, el osmolito taurina se ubica en la parte interna de la proteína, interactuando con la región repetida, del mismo modo en la figura 4.47 se muestra que a 1ns, la proteína gira y el osmolito taurina se mantiene interactuando con la región repetida.

Cuando el sistema se corta en 1,5ns y a 2ns, el osmolito se mantiene en la zona repetida, en la figura 4.48 y 4.49 se observa el sistema interactuante en la forma molec-

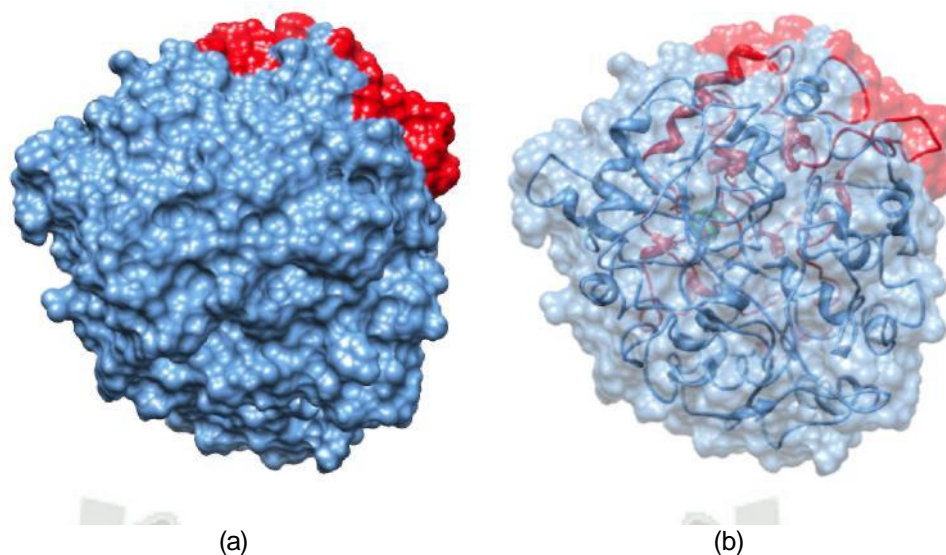


Figura 4.47: Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) Superficie sólida a 1ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 1ns

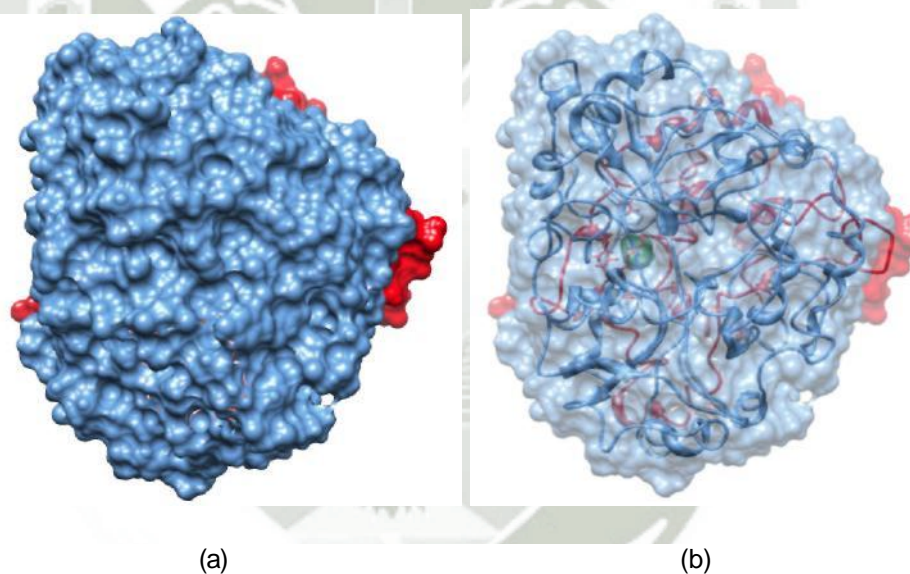


Figura 4.48: Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) Superficie sólida a 1.5ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 1.5ns

ular de superficie. La región de color rojo es la que representa a la secuencia de glutaminas repetidas y el osmolito se muestra de color rojo.

En la figura 4.50, en 2,5ns el osmolito taurina se sigue manteniendo ligado al sitio de unión en la zona repetida.

En la figura 4.51 a un tiempo de 3ns, la proteína se muestra rotada y el osmolito

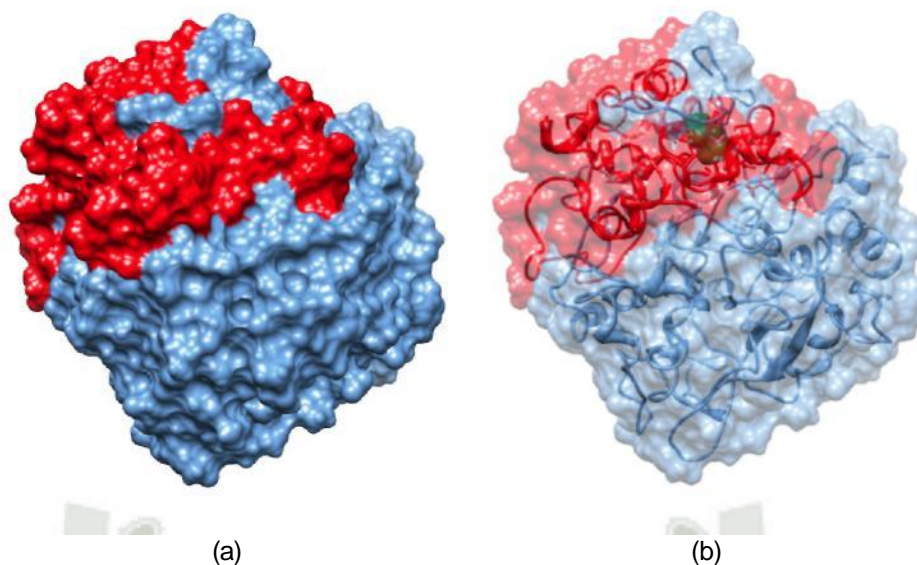


Figura 4.49: Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) Superficie sólida a 2ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 2ns

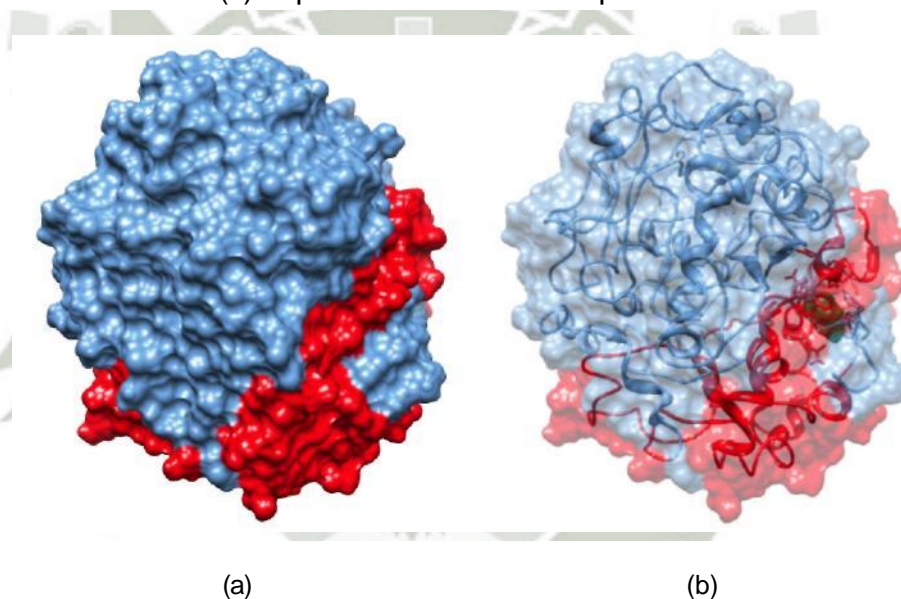


Figura 4.50: Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) Superficie sólida a 2.5ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 2.5ns

taurina continúa en la zona de repetición de glutaminas, manteniendo la preferencia de unión a esa zona. Este resultado nos da a entender que la secuencia de glutaminas son altamente atractivos.

La desviación media cuadrática fue determinada usando el comando `g_rmsd`, en la figura 4.52(b) se muestra que la la estabilidad de la estructura comienza en 10000ps

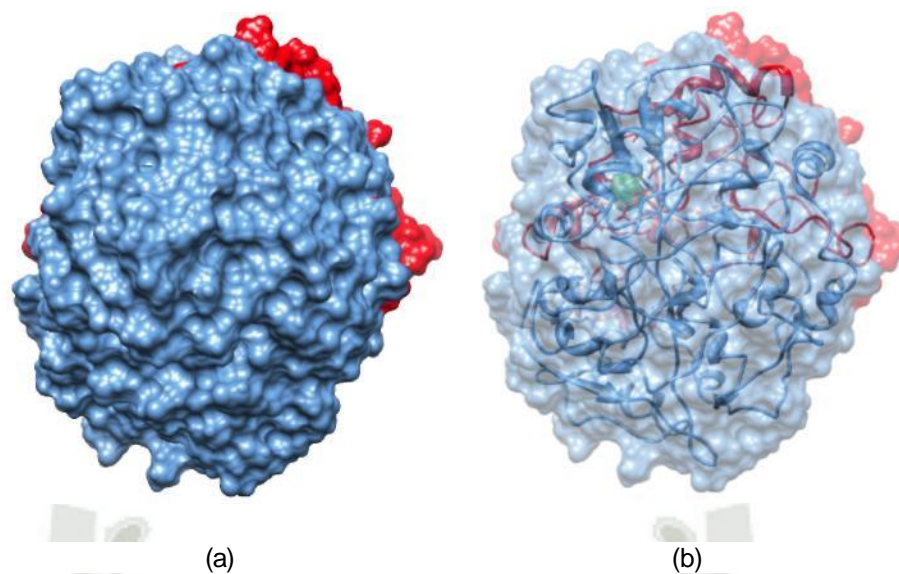


Figura 4.51: Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) Superficie sólida a 3ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 3ns

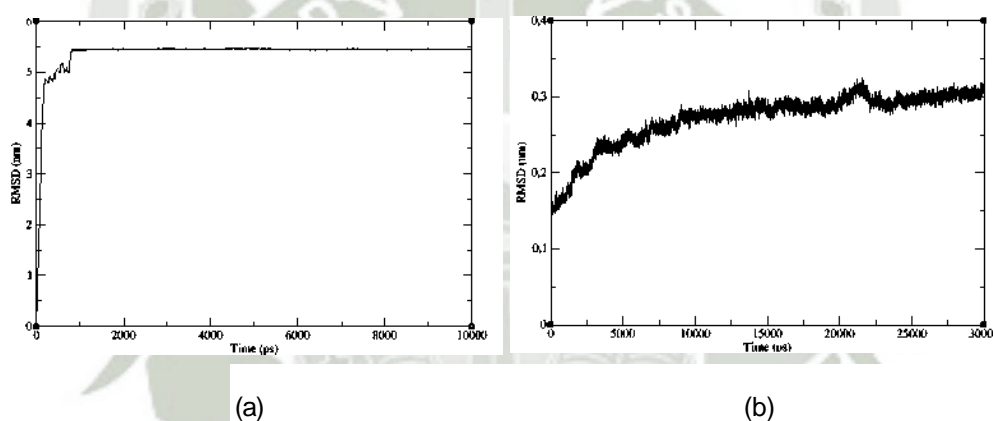


Figura 4.52: Desviación media cuadrática de la interacción Httm-Taurina. (a) RMSD de la Httm (b) RMSD del sistema interactuante

y que luego de 20000ps se observa una variación en la estabilidad estructural, y luego comienza a estabilizarse nuevamente todo el sistema interactuante hasta que culmine el proceso de simulación de dinámica molecular.

Para analizar la fluctuación se usó el comando `g_rmsf`, del cual se obtuvo el diagrama que se muestra en la figura 4.53(b), donde se observa que la mayor fluctuación se da en los aminoácidos del 24 al 28, del 180 al 190, del 306 al 308, del 370 al 380 y del 435 al 440. Con un pico máximo de fluctuación de 0,39nm.

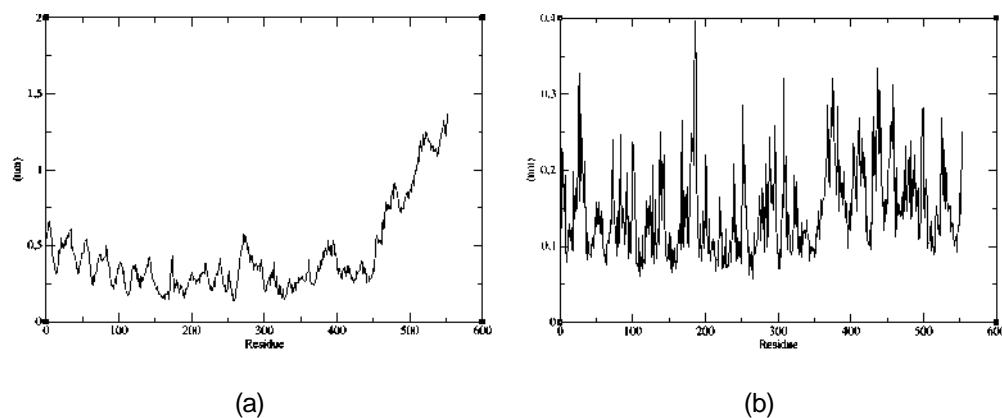


Figura 4.53: Fluctuación de la interacción Httm-Taurina. (a) RMSF de la Httm (b) RMSF del sistema interactuante

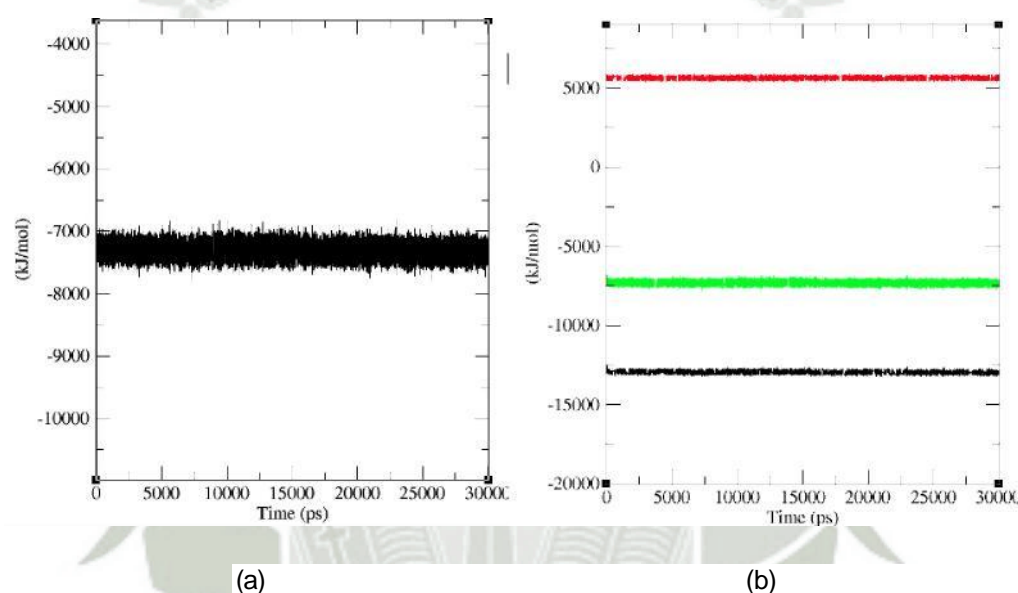


Figura 4.54: Energías obtenidas luego de concluida la dinámica molecular de Httm-Taurina. (a) Energía Total (b) Energía potencial (color negro), Energía Cinética (color rojo) y Energía Total (color verde)

Los diagramas de la energías del sistema interactuante fueron obtenidos luego de hacer el cálculo con el comando `g_energy`, del cual se obtuvo el archivo final de extensión `.xvg` este archivo nos proporcionó los cálculos de energía, los cuales fueron visualizados y analizados en el programa de `Xmgrace`, en la figura 4.54 se muestra que la energía perdura durante la simulación de dinámica molecular.

En la figura 4.54(b) se muestra una imagen con la energía potencial, cinética y total,

observándose que las energías se mantienen constantes durante la simulación hasta que finalice la dinámica.

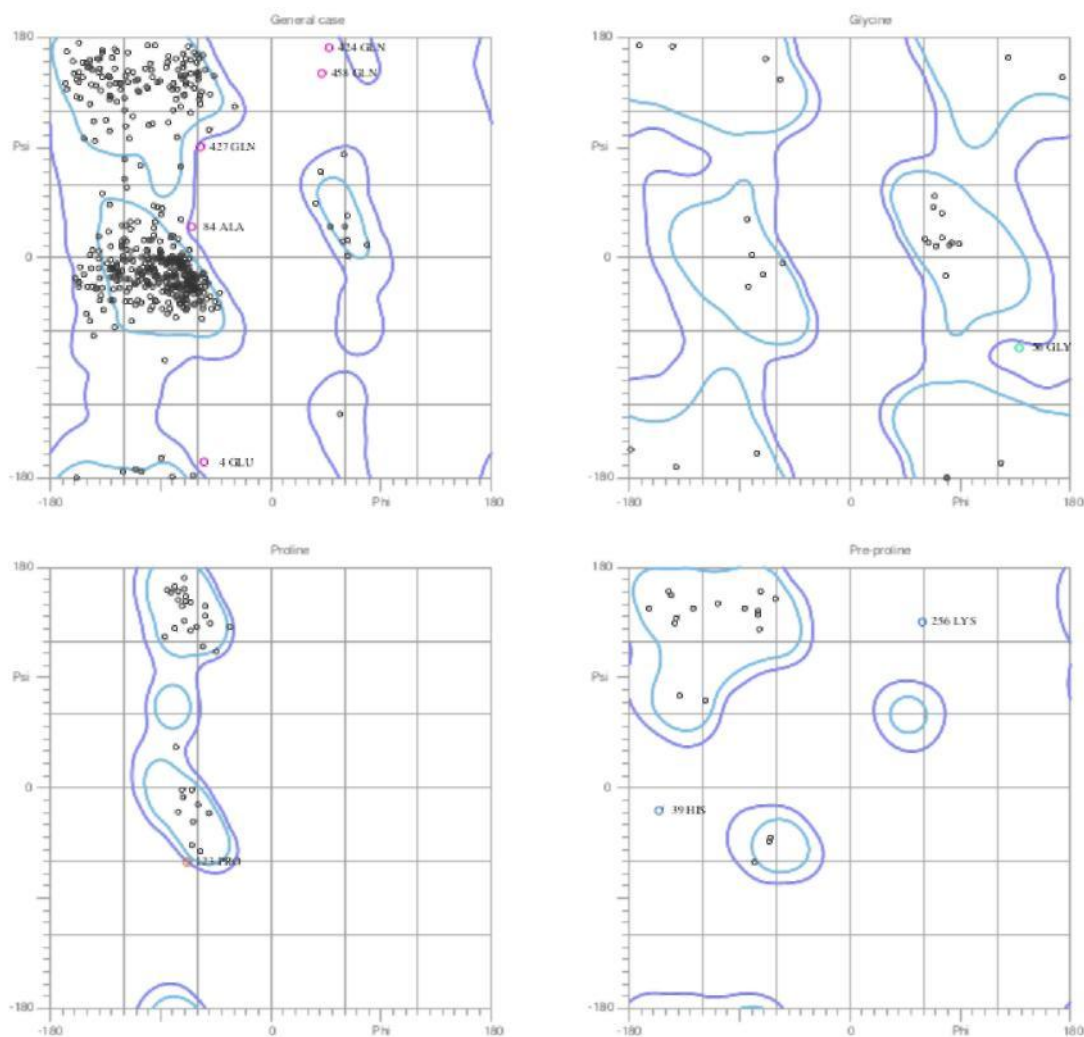


Figura 4.55: Diagrama de Ramachandran del sistema Httm-Taurina.

Usando el diagrama de Ramachandran, se analizó la estructura del primer exón de la huntingtina mutada, donde podemos observar en la figura 4.55, un 87.6% de residuos en zonas permitidas y 98.4 % en zonas favorecidas de un total de 541 residuos de 550, en el diagrama se muestran los aminoácidos que se encuentran fuera de la zona permitida siendo la GLU4, HIS39, GLY56, ALA84, PRO123, LYS256, GLN424, GLN427 Y GLN458.

La glicina-56 se muestra fuera de la zona permitida de la gráfica de las glicinas, es

probable que nos indique un incremento de reactividad por metilación en esa posición, para el caso del análisis de las pre-prolinas, podemos observar que la Histidina-39 y Lisina-256, se hallan en la región que no corresponde a zonas favorecidas ni permitidas, en este caso, observamos un leve movimiento en la reactividad de las zonas correspondientes a las preprolinas y cuando realizamos el análisis de las prolinas, podemos observar que la Prolina-123 se encuentra saliendo de la región permitida, lo que indica claramente que nuestra estructura, es inestable a mutaciones por efecto de rompimiento de anillos prolínicos.

4.5.3. Interacción Httm-TMAO

El servidor de Hex nos sirvió para predecir el docking de la proteína mutada con el osmolito TMAO, para ello se introdujo en el servidor los archivos finales producto de la dinámica de cada sistema con la extensión .pdb, luego de un pequeño tiempo, se obtuvo los archivos finales de predicción.

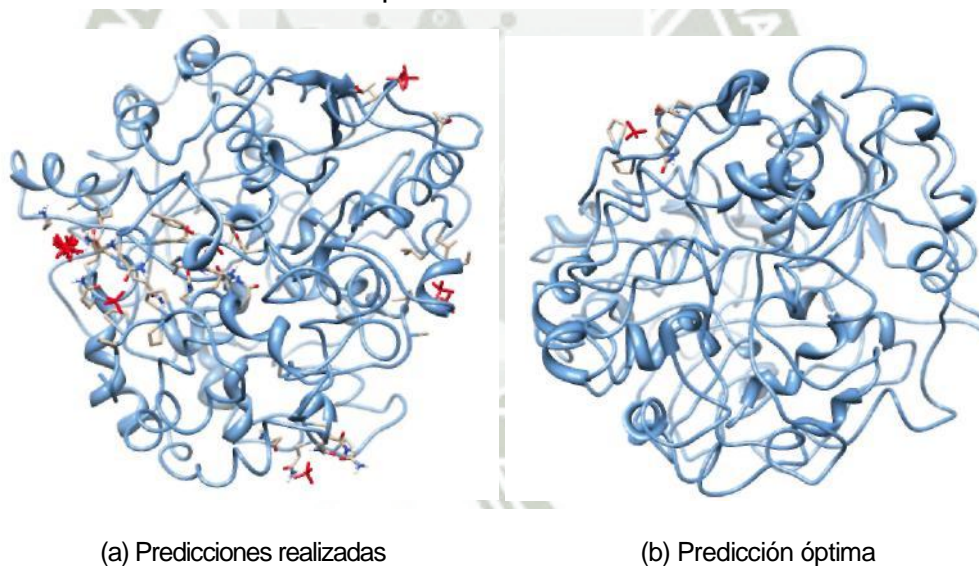


Figura 4.56: Predicción realizada en el servidor de HEX para el osmolito TMAO con la Huntingtina mutada

En la figura 4.56(a) se observa varios sitios de unión del osmolito TMAO, esto es debido a que en Hex, realiza varios supuestas interacciones, del cual elige un óptimo, en la figura 4.56(b) se observa la predicción óptima.

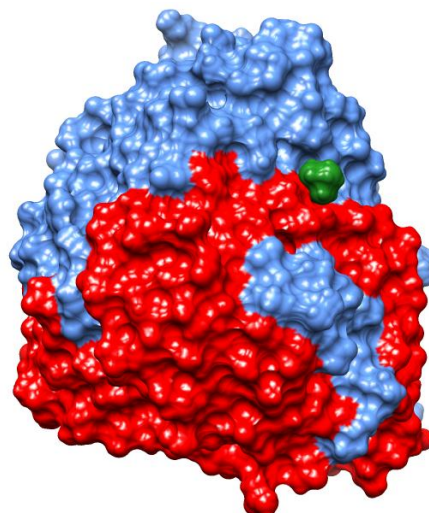


Figura 4.57: Sitio de unión de la Huntingtina mutada con el osmolito TMAO.

En Quimera6.1 se visualizó la estructura de los sistemas interactuantes, obteniendo de esta forma la figura 4.57 en la cual se observa la forma molecular de superficie, la región de color rojo muestra la secuencia repetida del aminoácido glutamina y de color verde el osmolito TMAO.

En Pymol se visualizó los aminoácidos que interaccionan con el osmolito TMAO, los cuales fueron los aminoácidos LEU20, ALA21, THR36, GLN459, GLN462, GLN463, GLN465 y GLN466, en la figura 4.58 se observa una cavidad que forma la proteína cuando se une al osmolito.

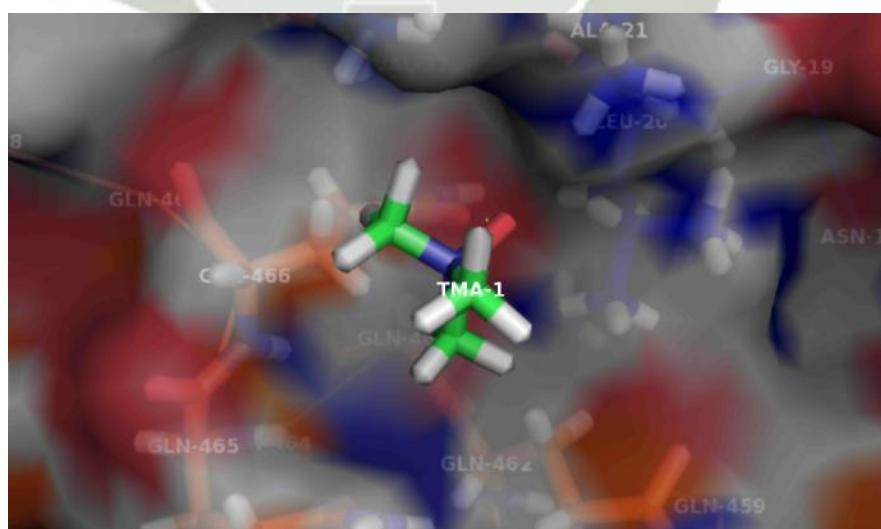


Figura 4.58: Sitio de unión de la Huntingtina mutada con el osmolito TMAO.

Luego se procedió a realizar la minimización de los sistemas, usando el integrador I - bfgs, con 20000ps usando el solvente implícito GB/SA, para esta minimización se usó el archivo .mdp (anexo A.1). Terminada la minimización se dio inicio a la simulación de dinámica molecular en un ensamble canónico NVT, con un caja cúbica de 20nm de lado, con 30ns de tiempo, la simulación se dio en condiciones periódicas de contorno, a una temperatura de 309,65°K regulada en un termostato de Nosé-Hoover, para la dinámica se usó el archivo .mdp que se encuentra en el anexo A.4.

Culminada la simulación de dinámica molecular del sistema interactuante se procedió a analizar la película de dinámica molecular en el programa de Quimera6.1, donde se obtuvo imágenes a diferentes tiempos (0.5ns, 1ns, 1.5ns, 2ns, 2.5ns y 3ns).

En la figura 4.59 se observa que el osmolito TMAO a 0,5ns se encuentra en la zona de las glutaminas.

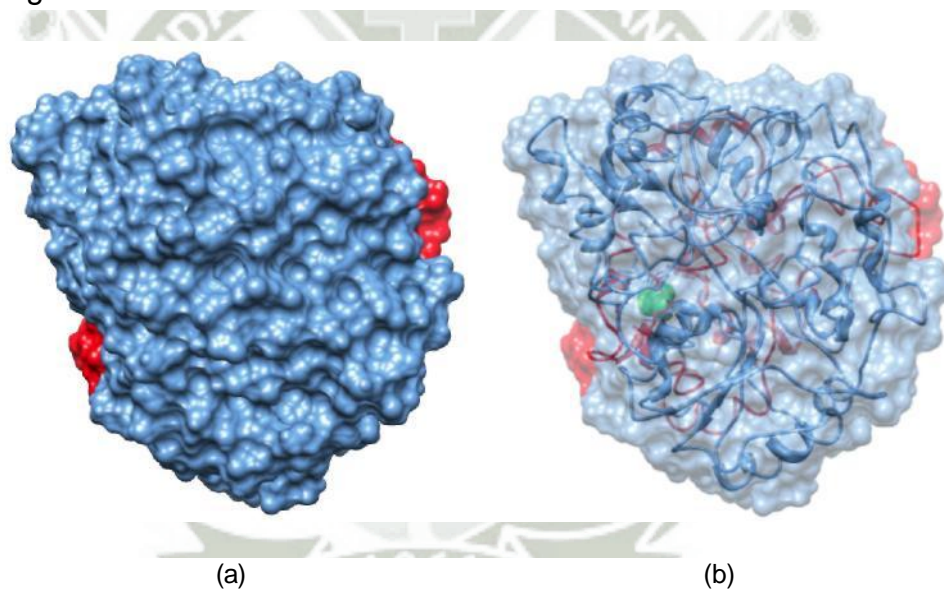


Figura 4.59: Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) Superficie sólida a 0.5ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 0.5ns

En la figura 4.60 se muestra que a 1ns, el sistema interactuante se encuentra rotado y el osmolito TMAO se sigue manteniendo en la zona de las glutaminas.

Cuando se corta la película a un tiempo de 1,5ns la imagen que se toma muestra que el sistema interactuante se mantiene rotando y que el osmolito TMAO continúa

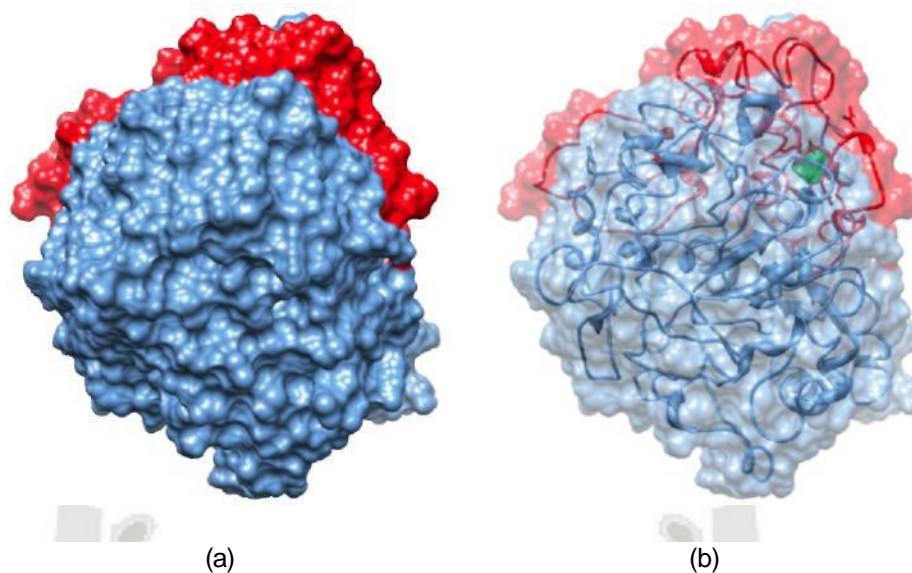


Figura 4.60: Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) Superficie sólida a 1ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 1ns

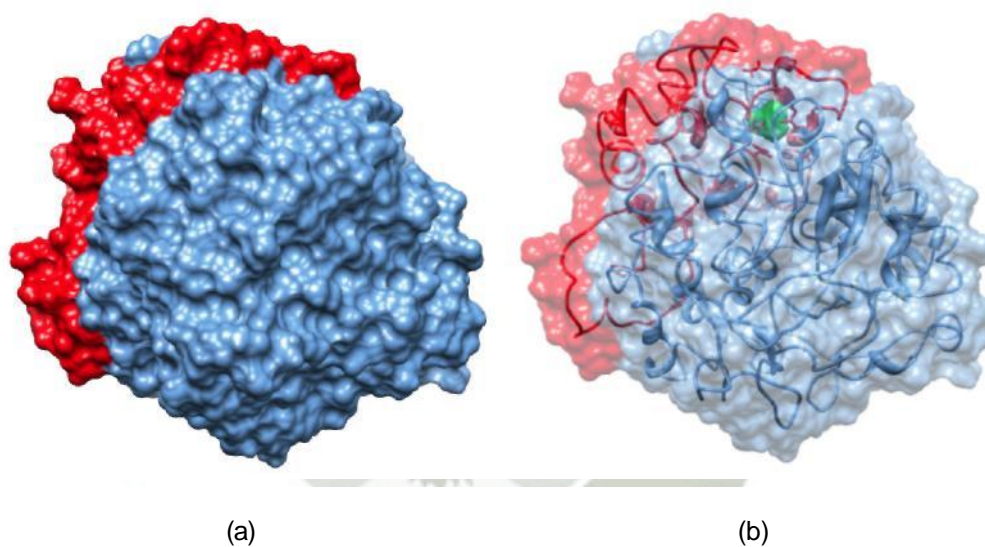


Figura 4.61: Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) Superficie sólida a 1.5ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 1.5ns

interactuando en la región de las glutaminas, en la figura 4.61 se muestran dos representaciones moleculares, la primera imagen nos muestra la superficie y la otra de superficie con una transparencia del 50 %, pudiendo observar la ubicación del osmolito.

En la figura 4.62 a un tiempo de 2ns, la imagen tomada muestra que el osmolito

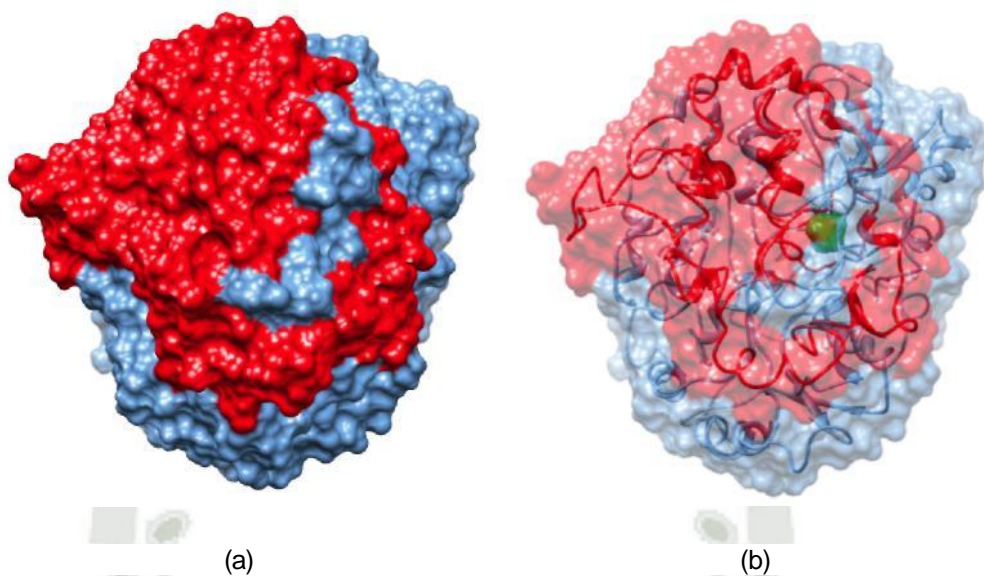


Figura 4.62: Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) Superficie sólida a 2ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 2ns

TMAO continúa ligado a la región repetida de glutaminas de la proteína Huntingtina mutada.

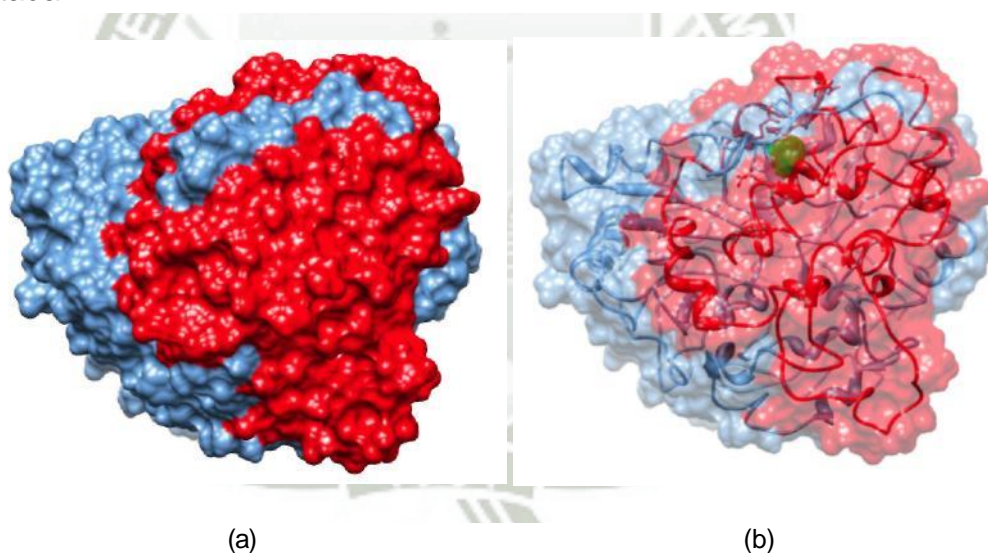


Figura 4.63: Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) Superficie sólida a 2.5ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 2.5ns

Cuando la simulación se para en 2,5ns las imágenes tomadas se muestran en la figura 4.63, aquí observamos dos representaciones moleculares la primera nos muestra el sistema en su forma de superficie y la segunda imagen nos muestra al osmolito (de

color verde) que se mantiene interactuando con la secuencia repetida de glutaminas, siendo esto posible a la alta atracción que tienen las glutaminas hacia otros residuos.

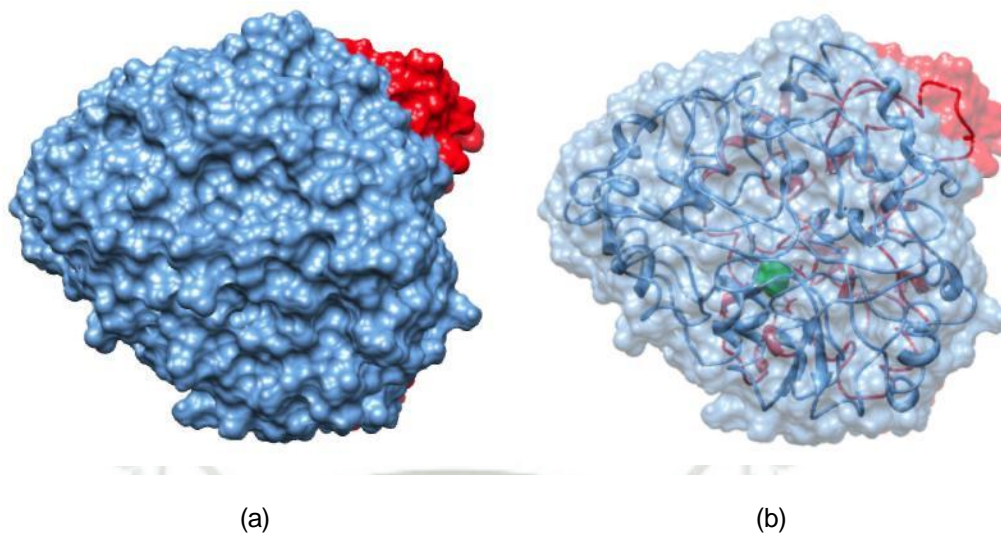


Figura 4.64: Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) Superficie sólida a 3ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 3ns

En la figura 4.64 se observa que cuando culmina la dinámica molecular de los sistemas interactuantes, el osmolito se mantiene interactuando con la proteína Huntingtina mutada, con una preferencia por la zona de glutaminas.

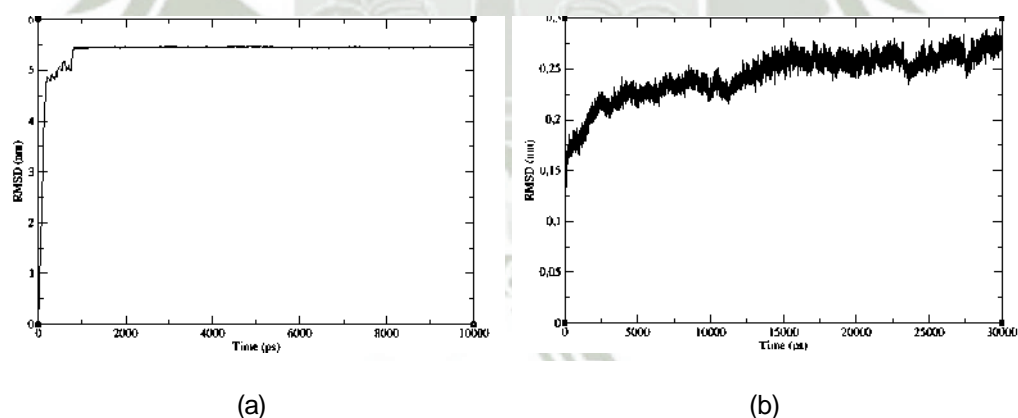


Figura 4.65: Desviación media cuadrática de la interacción Httm-TMAO. (a) RMSD de Httm (b) RMSD del sistema interactuante

Para determinar la desviación media cuadrática, se usó el comando `g_rms` el cual nos proporcionó las imágenes con el diagrama que se muestra en la figura 4.65(b) aquí vemos que el tiempo en el que comienza a perdurar la estructura es en 15000ps, lo cual

indica que la estructura al inicio de la simulación de dinámica molecular cambia de forma cuando comienza a interactuar con el osmolito TMAO, luego de un tiempo la estructura se hace estable manteniendo de esta forma su estructura, hasta que finalice la simulación de dinámica molecular.

La fluctuación fue hallada con el comando `g_rmsf`, del cual se obtuvo el diagrama que se muestra en la figura 4.66(b), ahí se observa que la mayor fluctuación se dio en los residuos 83, 173, 377, 378, 437, 498 y 553, siendo el residuo 553 con un pico máximo de 0,3148nm. Cuando observamos las dos imágenes una correspondiente a la proteína sin ligando y la otra con ligando, presenciamos que existe mayor fluctuación en un sistema interactuante.

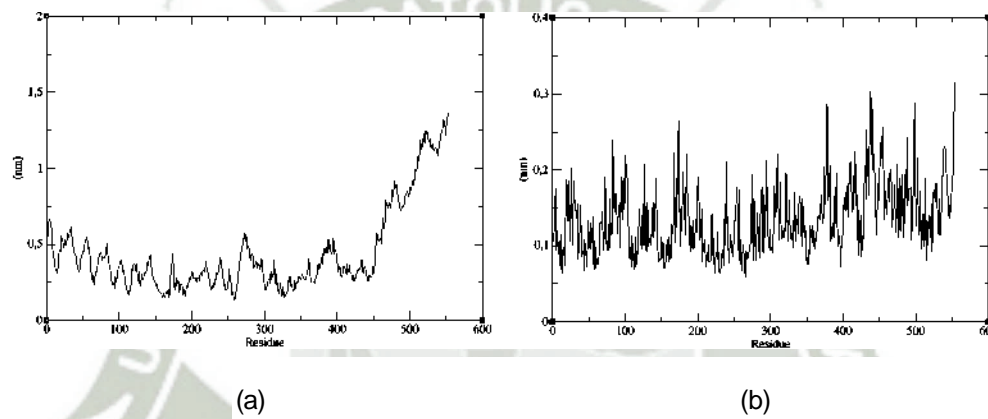


Figura 4.66: Fluctuación de la interacción Httm-TMAO. (a) RMSF de Httm (b) RMSF del sistema interactuante

Las energías del sistema interactuante, fueron determinados usando el comando `g_energy`, del cual se obtuvo la energía cinética, energía potencial y energía total. En la figura 4.67 se aprecian los diagramas correspondientes a energía total y todas las energías en una misma imagen, de donde se observa que la estabilidad de la energía comienza en 100ps, manteniéndose a lo largo de la simulación de dinámica molecular.

Para validar la estructura del sistema interactuante se usó el diagrama de Ramachandran, se analizó la estructura del primer exón de la huntingtina mutada, donde podemos observar en la figura 4.68, un 88.4 % de residuos en zonas permitidas y 99.1 % en zonas favorecidas de un total de 545 residuos de 550, en el diagrama se muestran los

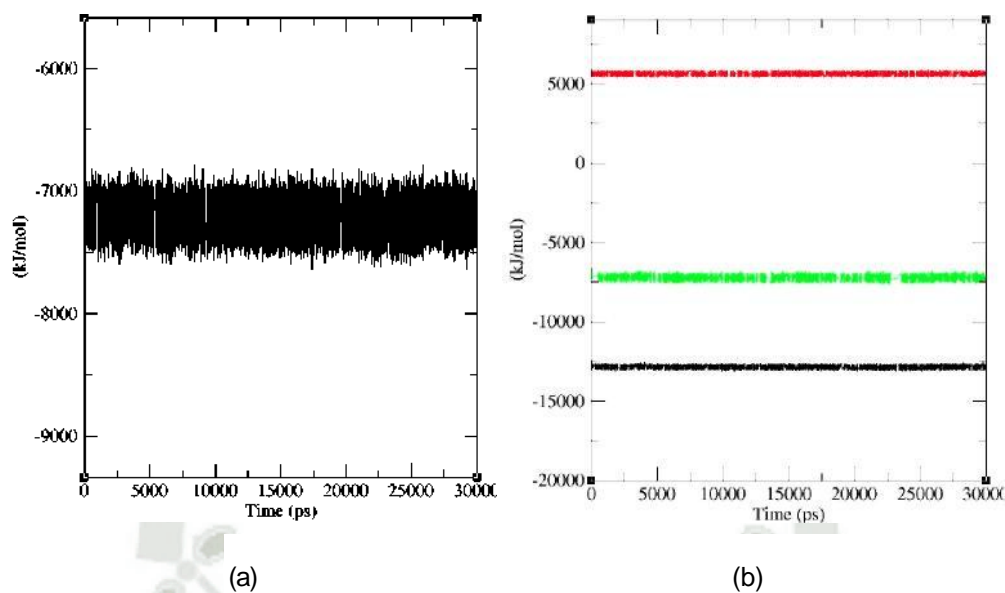


Figura 4.67: Energías obtenidas luego de concluida la dinámica molecular de Httm-TMAO. (a) Energía Total (b) Energía potencial (color negro), Energía Cinética (color rojo) y Energía Total (color verde)

aminoácidos que se encuentran fuera de la zona permitida siendo la PRO40, ASN150, ALA206, GLY289 Y GLN394.

En la zona de las glicinas, la Glicina-289 se encuentra en la zona no permitida ya que es probable a un aumento de la reactividad por metilación, para el caso de la zona de las pre-prolinas no se observa ninguna aminoácido fuera de las zonas permitidas y favorecidas, finalmente cuando observamos la zona de la prolinas, la Prolina-40 se encuentra saliendo de la región permitida, lo que indica claramente que nuestra estructura, es un tanto inestable a mutaciones por efecto de rompimiento de anillos prolínicos.

Por lo tanto cuando hacemos el análisis del gráfico de la parte superior izquierda, observamos que en la zona de las alfa hélices se ubican varios aminoácidos, por esta razón haciendo la revisión de la estructura tridimensional de la proteína nos damos cuenta que existe mayor cantidad de alfa hélices que láminas beta, comprobando la existencia de dichos enlaces en la estructura tridimensional de la proteína.

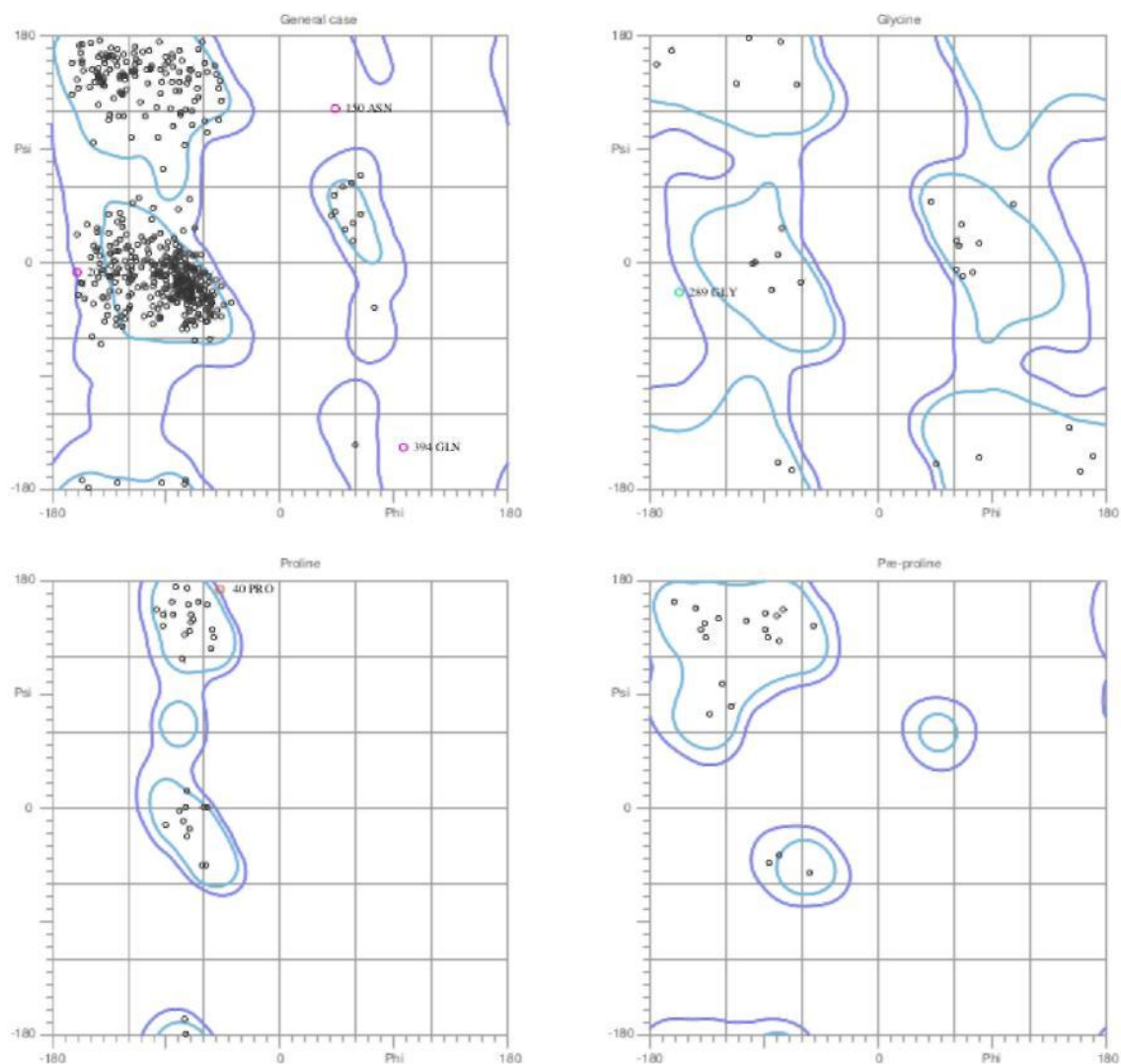


Figura 4.68: Diagrama de Ramachandran del sistema Httm-TMAO.

4.5.4. Interacción Httm-Prolina

Para predecir el posible lugar de unión del osmolito se usó el servidor de Hex, en el cual se introdujo los archivos con extensión .pdb de ambas moléculas y prontamente se dio inicio al cálculo de predicción, uno de los archivos finales del cálculo nos proporciona los posibles sitios de unión de la proteína mutada con el osmolito prolina, esto se observa en la figura 4.69. El otro archivo nos muestra la predicción óptima, la cual se observa en la figura 4.69(b), esta predicción se usó para los posteriores análisis como la de dinámica molecular del sistema interactuante.

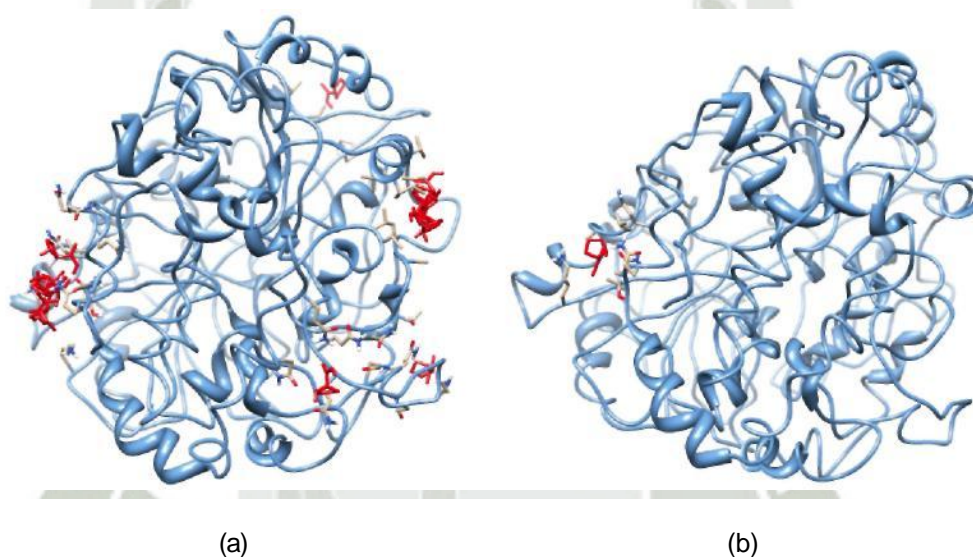


Figura 4.69: Predicción realizada en el servidor de HEX para el osmolito Prolina con la Huntingtina mutada. (a) Predicciones realizadas (b) Predicción óptima

En el software de Quimera6.1 se visualizó la superficie de la proteína unida al osmolito, en la figura4.70 se muestra la secuencia repetida de glutaminas en color rojo y de color verde el osmolito prolina. En esta imagen se observa que el osmolito prolina se mantiene alojado en una cavidad que forma la proteína cuando se realiza el docking.

Para ver los aminoácidos que interactúan con el osmolito prolina, se usó el software de Pymol. En la figura4.71 se muestra una cavidad que se forma cuando el osmolito prolina interactúa con la proteína mutada, los aminoácidos que interactúan son: LEU20, ALA21, VAL35, THR36, GLN462, GLN463, GLN465 Y GLN466. 18, 138,

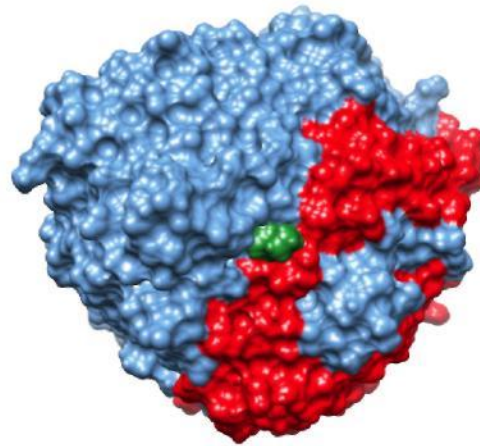


Figura 4.70: Sitio de unión de la Huntingtina mutada con el osmolito Prolina. 173, 432 y 449,

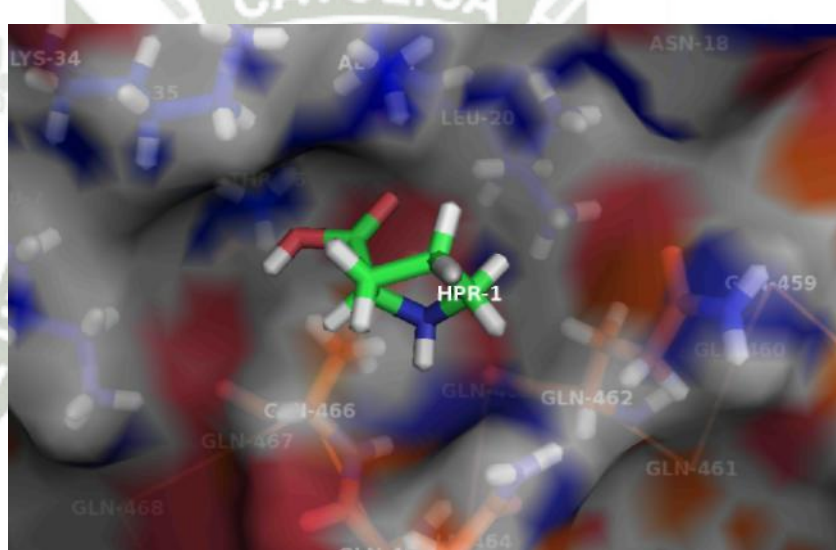


Figura 4.71: Sitio de unión de la Huntingtina mutada con el osmolito Prolina.

Los archivos finales de la simulación de dinámica molecular nos muestra como el osmolito prolina interactúa con la proteína mutada, se realizó el análisis de las interacciones cada 0.5ns, en la figura4.72 se muestra la interacción a 0.5ns, el osmolito prolina se mantuvo en la parte externa de la proteína, interactuando con la secuencia repetida de glutaminas.

En un tiempo de 1ns, el sistema interactuante se muestra rotado donde la secuencia de glutaminas apenas se nota, el osmolito prolina aun se mantiene en la secuencia

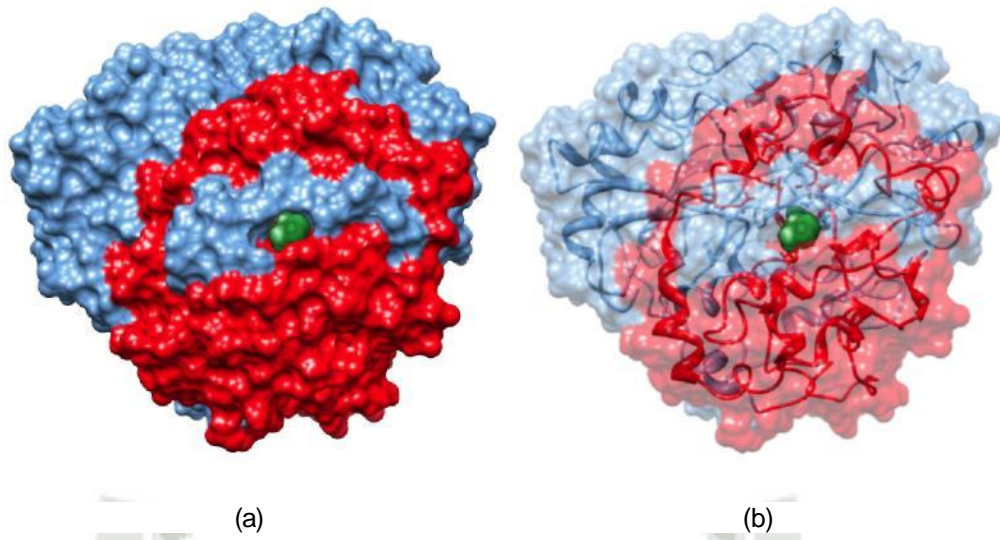


Figura 4.72: Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) Superficie sólida a 0.5ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 0.5ns

repetida, en la figura4.73 se observa la interacción.

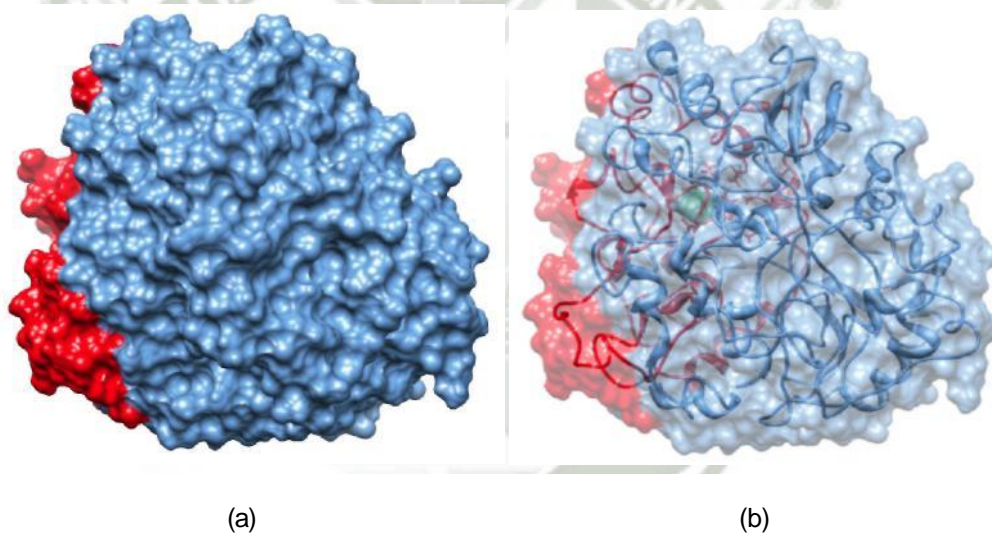


Figura 4.73: Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) Superficie sólida a 1ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 1ns

En 1.5ns el sistema interactuante se mantiene rotando y el osmolito prolina al parecer muestra gran atracción con la secuencia de glutaminas, en la figura4.74 se muestran las imágenes de como esta el sistema interactuante en un tiempo de 1.5ns.

En la figura4.75 a un tiempo de 2ns, la imagen tomada muestra que el osmolito prolina se encuentra atrapado en la zona de las glutaminas, del mismo modo cuando el

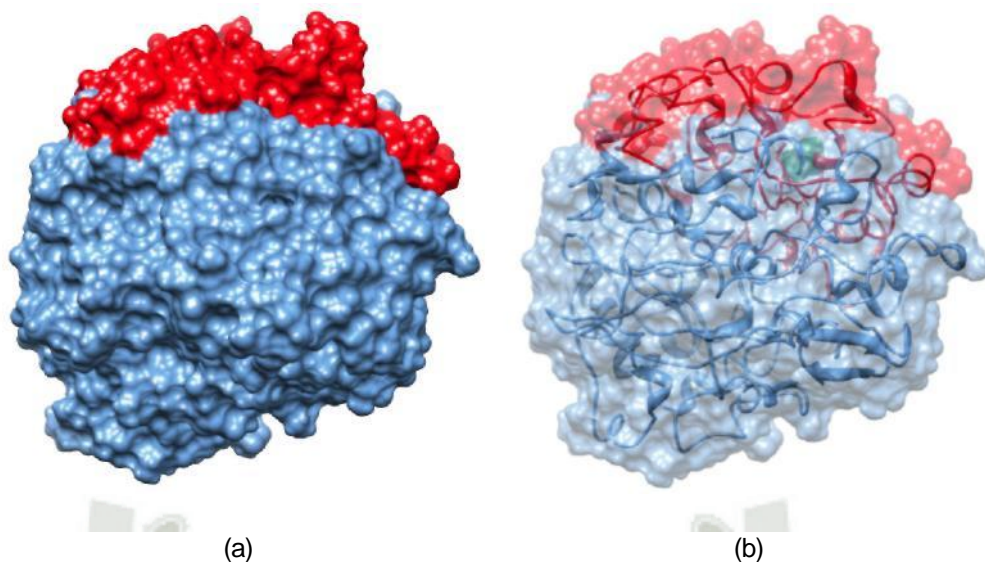


Figura 4.74: Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) Superficie sólida a 1.5ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 1.5ns

sistema interactuante se encuentra en un tiempo de 2,5ns la unión del osmolito prolina con la zona de las glutaminas se mantiene, esta fase se puede observar en la figura4.76.

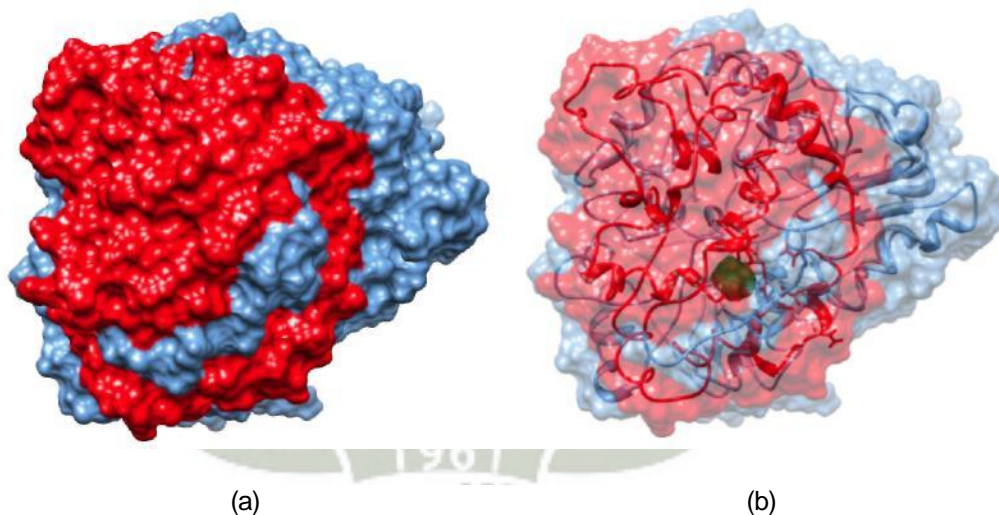


Figura 4.75: Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) Superficie sólida a 2ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 2ns

Finalizada la simulación de dinámica molecular del sistema interactuante la cual culminó en 3ns, muestra que el osmolito prolina se mantuvo interactuando con la secuencia de glutaminas repetidas de la proteína mutada, esto es debido a la gran atracción que tienen las glutaminas con otras moléculas, en la figura4.77 se muestra el

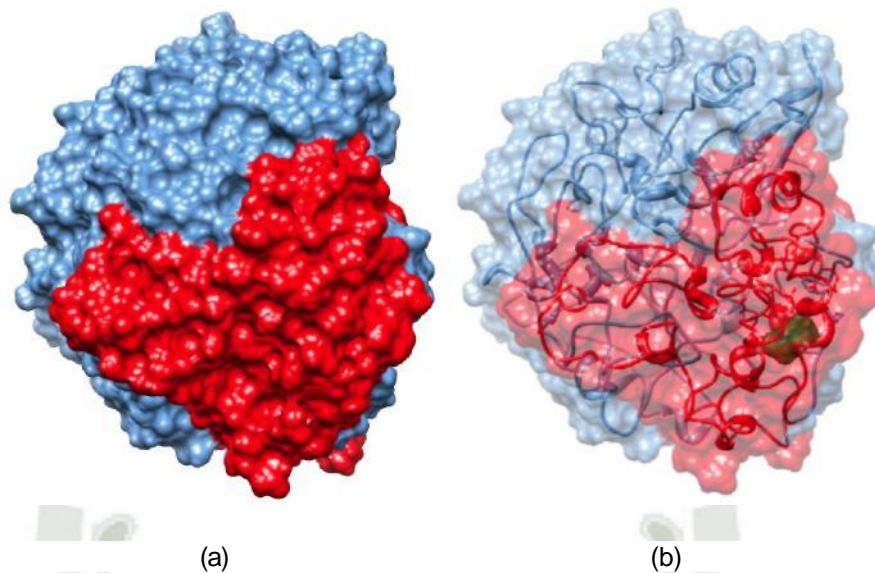


Figura 4.76: Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) Superficie sólida a 2.5ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 2.5ns sistema interactuante final.

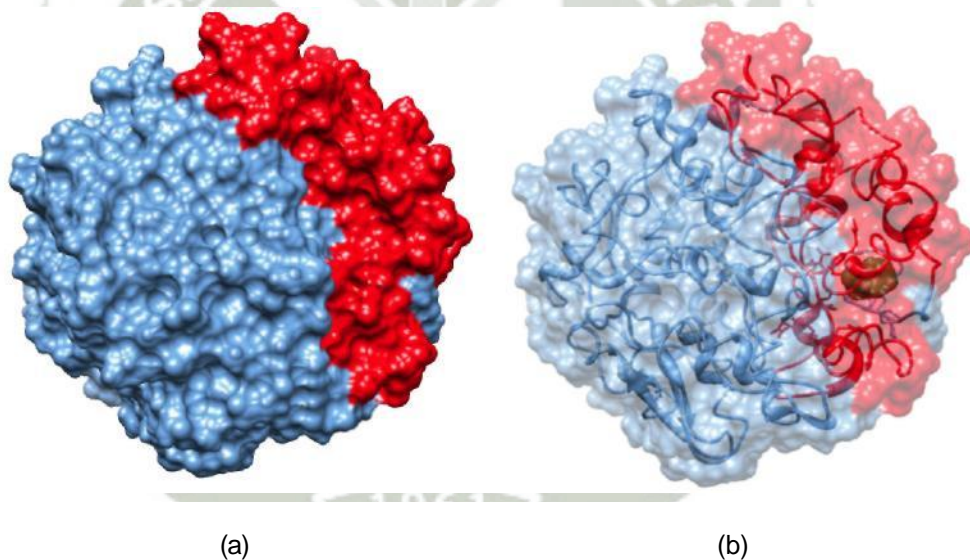


Figura 4.77: Estructura final de la dinámica molecular del sistema interactuante. (a) Superficie sólida a 3ns (b) Superficie al 50 % de transparencia a 3ns

Para validar la estructura del sistema interactuante, se recurrió al análisis de la estructura, la cual se determinó hallando la desviación media cuadrática, para ello se usó el comando `g_rms` que viene incorporado en el Gromacs, de donde se obtuvo el diagrama que se muestra en la figura 4.78(b), ahí se muestra que la estructura perdura

a partir de 16000ps manteniéndose estable durante el tiempo de dinámica molecular, esto es debido a que el osmolito prolina se mantiene en un solo sitio de la estructura.

La fluctuación fue hallada con el comando `g_rmsf`, del cual se obtuvo el diagrama que se muestra en la figura 4.79(b), ahí se observa que la mayor fluctuación se dio en los residuos 18, 138, 173, 432 y 449, siendo el residuo 18 con un pico máximo de 0,3617nm.

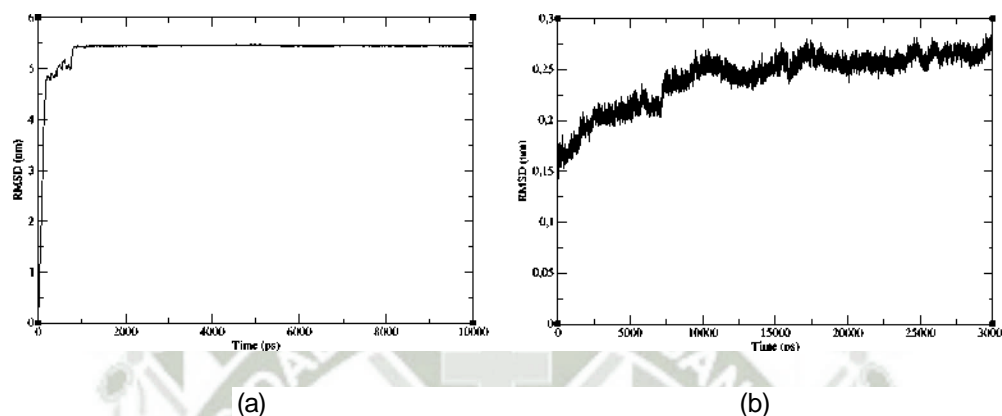


Figura 4.78: Desviación media cuadrática de la interacción Httm-Prolina. (a) RMSD de Httm (b) RMSD del sistema interactuante

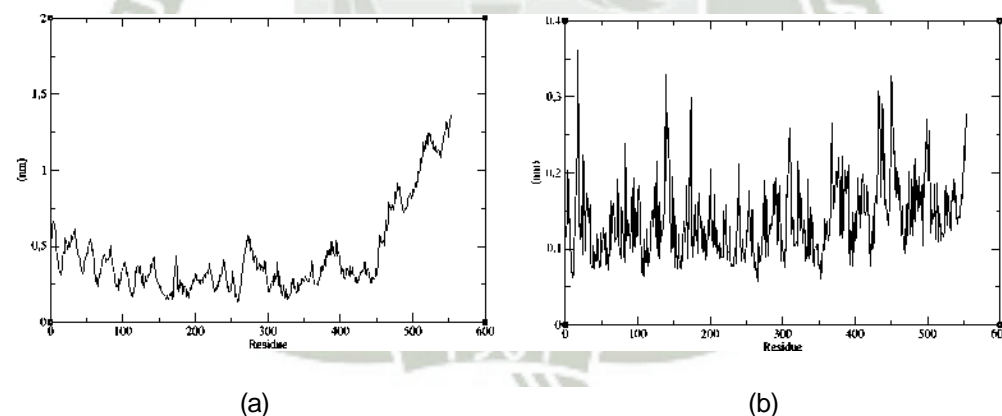


Figura 4.79: Fluctuación de la interacción Httm-Prolina. (a) RMSF de Httm (b) RMSF del sistema interactuante

Las energías del sistema interactuante, fueron determinadas usando el comando `g_energy`, donde se obtuvo un archivo final `.xvg` el cual fue levantado en el programa de `Xmgrace`, en este programa se observó los diagramas de las energías (energía cinética, energía potencial y energía total). En la figura 4.80 se aprecian los diagramas

correspondientes a energía total y todas las energías en una misma imagen, de donde se observa que la estabilidad de la energía total comienza en 500ps, manteniéndose a lo largo de la simulación de dinámica molecular.

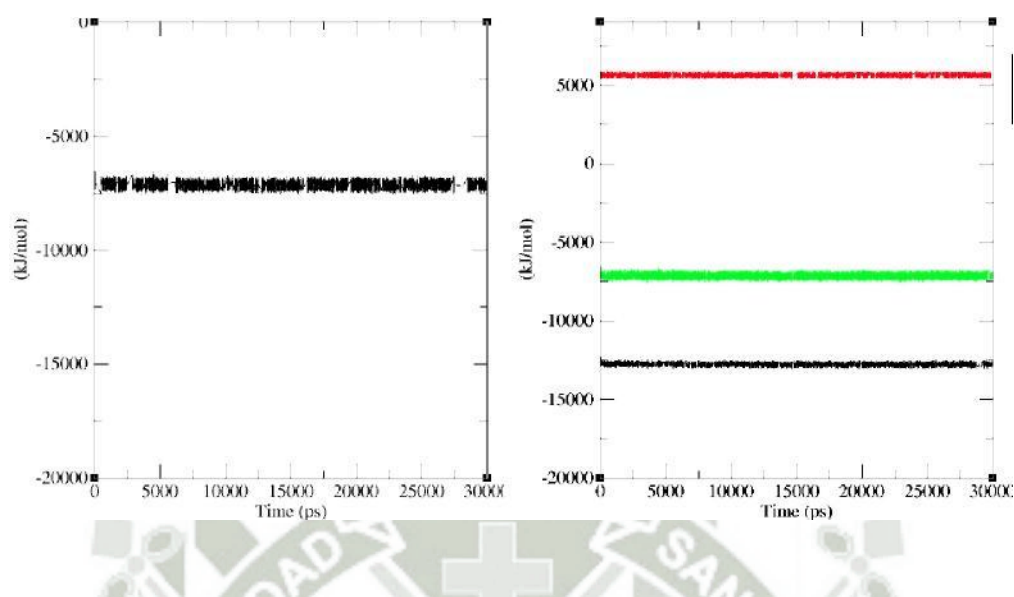


Figura 4.80: Energías obtenidas luego de concluida la dinámica molecular de Httm-Prolina. (a) Energía Total (b) Energía potencial (color negro), Energía Cinética (color rojo) y Energía Total (color verde)

Para validar la estructura del sistema interactuante se usó el programa de Molprobit, en el cual se obtuvo el diagrama de Ramachandran, analizando la estructura del primer exón de la huntingtina mutada, en la figura 4.55 se observa que un 87.6 % de residuos se encuentran en zonas permitidas y 98.4 % en zonas favorecidas de un total de 543 residuos de 550, en el diagrama se muestran los aminoácidos que se encuentran fuera de la zona permitida siendo la GLY16, HIS39, TYR99, PRO123, GLN394, GLN413 y GLN487.

En la zona de las glicinas, la Glicina-16 se encuentra en la zona no permitida ya que es probable a un aumento de la reactividad por metilación, para el caso de la zona de las pre-prolinas la Histidina-39 se observa fuera de las zonas permitidas y favorecidas, finalmente cuando observamos la zona de la prolinas, la Prolina-123 se encuentra saliendo de la región permitida, lo que indica claramente que nuestra estructura, es un tanto inestable a mutaciones por efecto de rompimiento de anillos prolínicos.

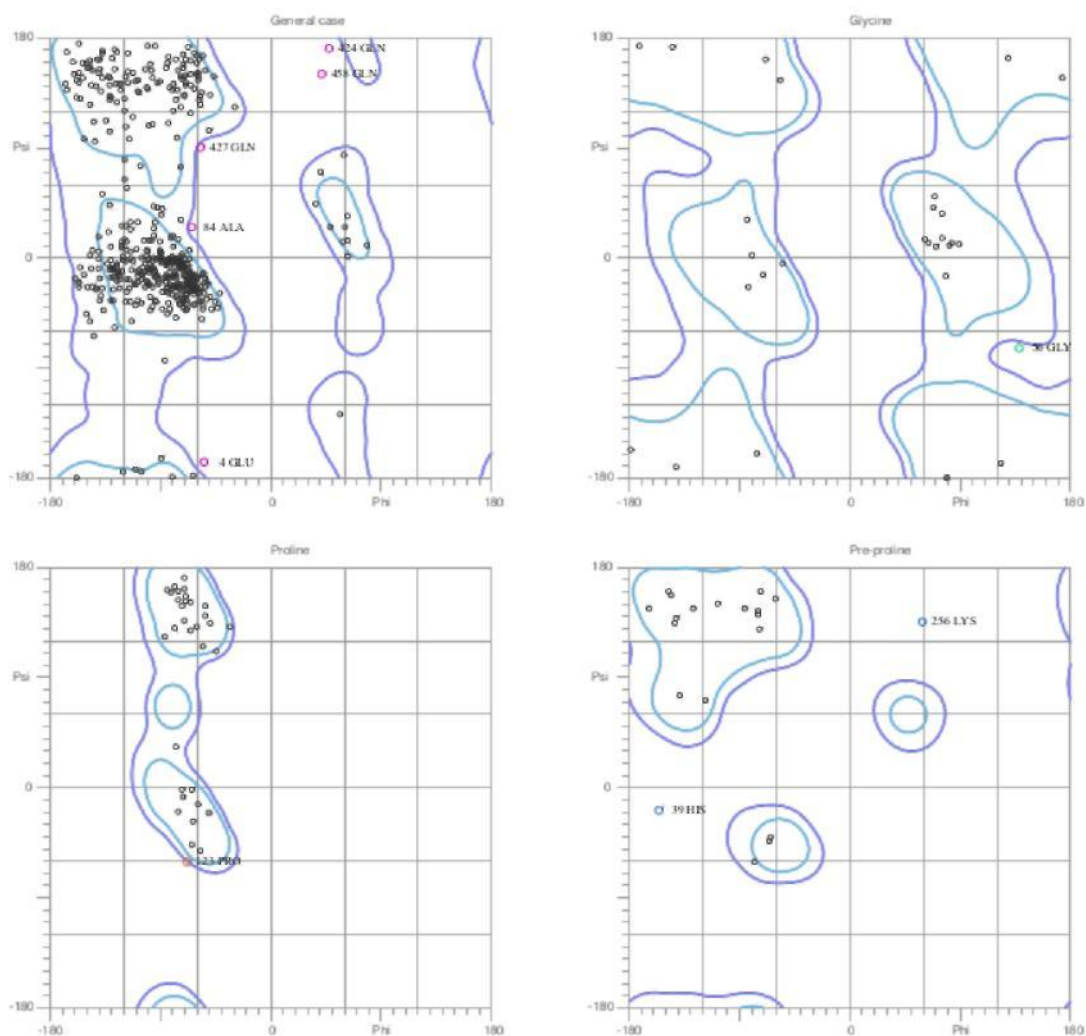


Figura 4.81: Diagrama de Ramachandran del sistema Httm-Prolina.

4.6. Potencial Electrostático

El análisis de los potenciales fue a través de la obtención de datos de la proteína Huntingtina mutada y los diferentes sistemas interactuantes. Para ello se usó el archivo final de la simulación de dinámica molecular .gro, el cual prontamente fue convertido a un archivo de extensión .pdb, este último archivo fue ingresado en el servidor online PDB2PQR (<http://nbcrc-222.ucsd.edu/pdb2pqr1,8/>), el cual es un paquete de software del Python que automatiza muchas de las tareas comunes de preparar las estructuras para los cálculos que realiza APBS, proporcionando una utilidad de plataforma-independiente para los archivos de la proteína que convierten desde el formato .pdb al formato .pqr. También a través de este servidor se puede obtener un archivo de extensión .in, el cual es utilizado como archivo de entrada para APBS, el que contiene las condiciones en que se realizarán los cálculos y que cálculos se realizaron, en este caso APBS genera un archivo de salida de extensión .dx con la información de su potencial electrostático en la superficie de la molécula, el cual fue revisado y visualizado en el programa de Quimera6.1.

4.6.1. Potencial electrostático de Huntingtina mutada

Los cálculos realizados en el programa APBS, nos proporcionó los resultados de como se encontró la proteína Huntingtina mutada antes de realiza el docking con los diferentes osmolitos. En al figura 4.82 se observan dos imágenes, una correspondiente a la forma molecular de superficie, de donde se observa que la zona de color rojo nos indica la secuencia repetida de glutaminas y en la figura 4.82(b) observamos la superficie de potencial electrostático donde la zona de las glutaminas, presenta una región negativa (roja) en la parte inferior de la proteína y la región positiva (azúl), presentando regiones de acoplamiento que siguen la ley de Coulomb, al igual que el principio HSAB (Duro – Blando, Acido – Base). También se observan cargas puntuales sobre la superficie (regiones rojo y azul intenso) que son proporcionalmente menores

a las zonas o regiones de potencial suave (regiones rojo y azul suave).

Finalmente se hizo el análisis de la proteína mutada cuando esta se encuentra rotada 180° , mostrado en la figura 4.88. En esta imagen se muestra la cara de la proteína donde no está presente la secuencia de glutaminas repetida y cuando se muestra la superficie de potencial electrostático se presenta regiones de acoplamiento, presentando en esta cara de la proteína regiones positiva (azul) y negativa (rojo).

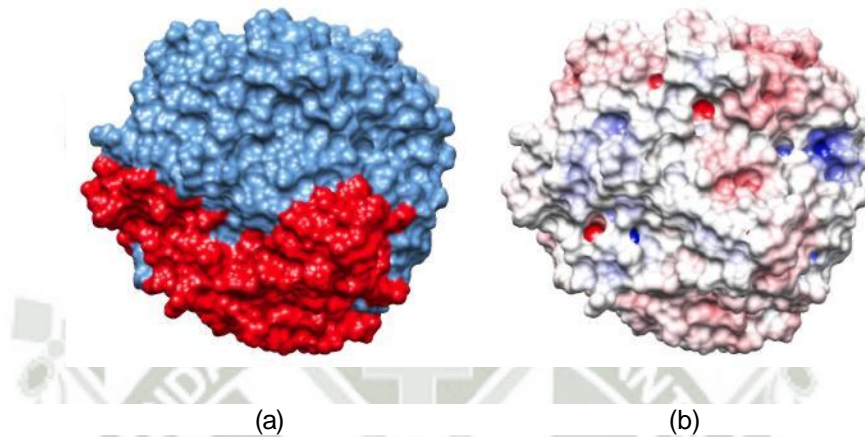


Figura 4.82: Proteína Huntingtina mutada pre-interacción. (a) Httm Modelo de Superficie (b) Httm con superficie de potencial electrostático

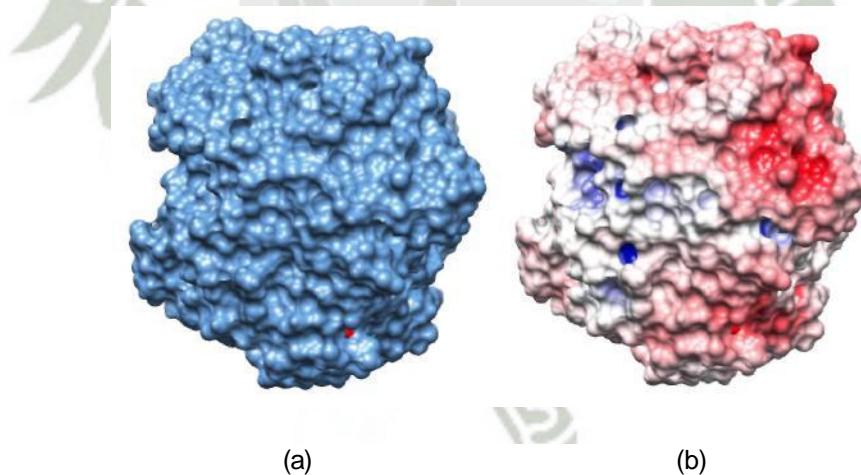


Figura 4.83: Proteína Huntingtina mutada pre-interacción con 180° de rotación . (a) Httm Modelo de Superficie (b) Httm con potencial electrostático

4.6.2. Potencial electrostático de Httm-Betaína

Se determinó el potencial electrostático del osmolito Betaína, del cual se obtuvo la figura 4.84, como observamos el osmolito Betaína presenta una región negativa (rojo intenso) la cual está conformada por los dos átomos de oxígeno, mientras tanto la región positiva (azúl intenso) la conforman los átomos de hidrógeno, claro está que los átomos de oxígeno presentan carga negativa y los hidrógenos carga positiva. Este análisis se realizó en el programa de Aspartan, el cual nos provee los datos necesarios para observar la coloración de la superficie de potencial electrostático.

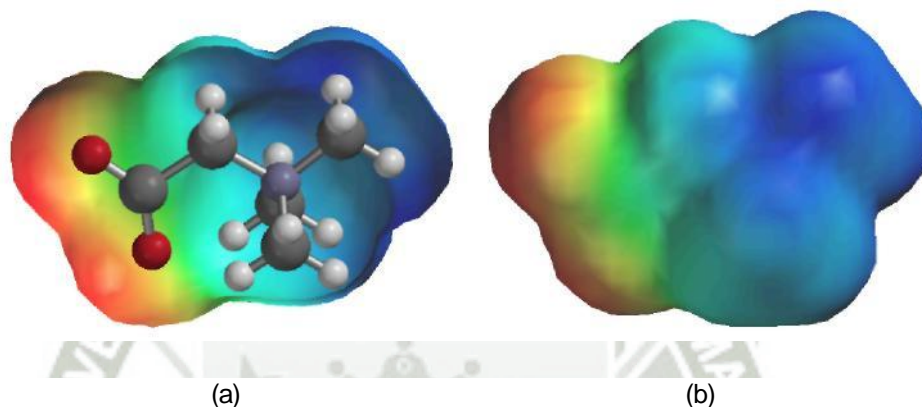


Figura 4.84: Pre-interacción del osmolito Betaína.

Prontamente se realizó el análisis al sistema interactuante, para ello se usó el archivo final de la dinámica molecular .gro, el cual fue sometido al cálculo con el programa APBS, culminado el cálculo se continuó con la revisión gráfica en el visualizador de Quimera 6.1, en el cual no se pudo observar nada debido a que el programa no concluyó en traducir los cálculos realizados en APBS, esto fue debido a que durante la dinámica molecular del sistema interactuante, el osmolito Betaína trata de interactuar con algún sitio de la proteína mutada, pero está parece repeler la unión. El análisis nos indica que como el osmolito se aleja de la proteína mutada, significa que es repulsivo con respecto a ella, por lo tanto probablemente en ese caso no sea la primera aproximación electrostática la que gobierne y sea de otro tipo el proceso de interacción en esa proteína, la reacción no esta gobernada por la interacción Coulómbica y que probablemente se de la interacción en medio orgánico, es decir en un medio hidrófobo por ser un caso

especial.

Para obtener las imágenes correspondientes, se tuvo que separar el ligando del receptor, y de esta manera estudiar el nuevo estado que generó la dinámica molecular, en la figura 4.85 la molécula betaína se muestra completamente diferente a como se encontraba antes de interactuar con la proteína mutada, los átomos de oxígeno siguen manteniéndose negativos (rojo intenso) la posición de estos con respecto a los átomos que se muestran en la figura 4.84 cambia, de igual modo los átomos de hidrógeno cambian de posición.

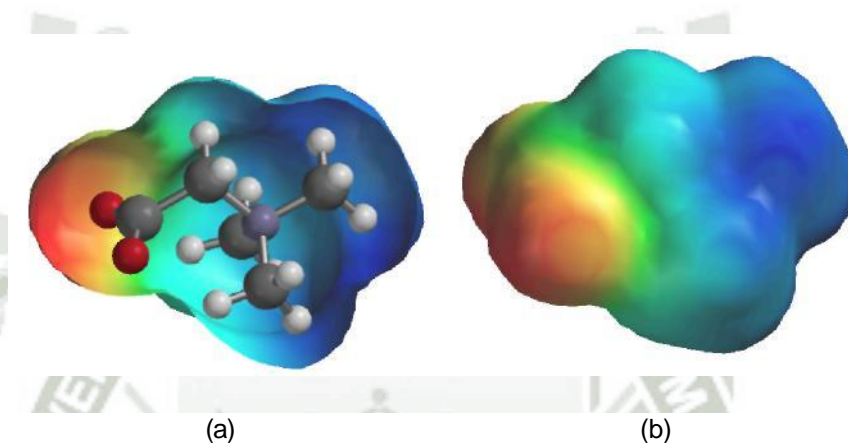


Figura 4.85: Post-interacción del osmolito Betaína.

4.6.3. Potencial electrostático de Httm-Taurina

El potencial electrostático del osmolito taurina fue obtenido en el programa de Spartan, en la figura 4.86 se muestra al osmolito en el modelo de superficie donde se aprecia la zona negativa (rojo intenso) esto es debido a los átomos de oxígeno que presenta la molécula en tanto la zona positiva (azúl intenso) se genera por un átomo de hidrógeno, las otras regiones nos indican que cuando está coloreado de color celeste aún se mantiene en un región positiva, el color verde nos indica una región negativa débil, del mismo modo el color naranja nos indica una región negativa débil.

Finalmente cuando separamos el osmolito taurina de la proteína, se observan algunas características de como queda el osmolito cuando finaliza la dinámica molecular

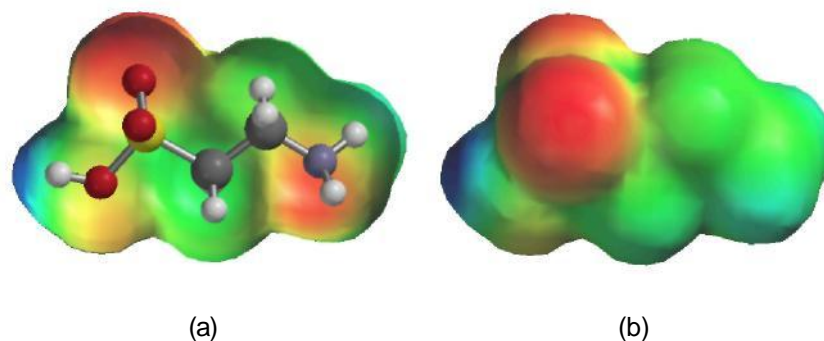


Figura 4.86: Pre-interacción del osmolito Taurina.

del sistema interactuante, en la figura 4.87 se observa la posición final de los átomos del osmolito post-interacción, donde los átomos de oxígeno se observan con un carga negativa disminuida (amarillo-naranja) mientras la parte central del osmolito tiene una tendencia a formar una zona con carga positiva débil (celestes), debido a los átomos de hidrógeno y cuando observamos el átomo de nitrógeno se observa una pequeña zona con carga negativa (rojo intenso).

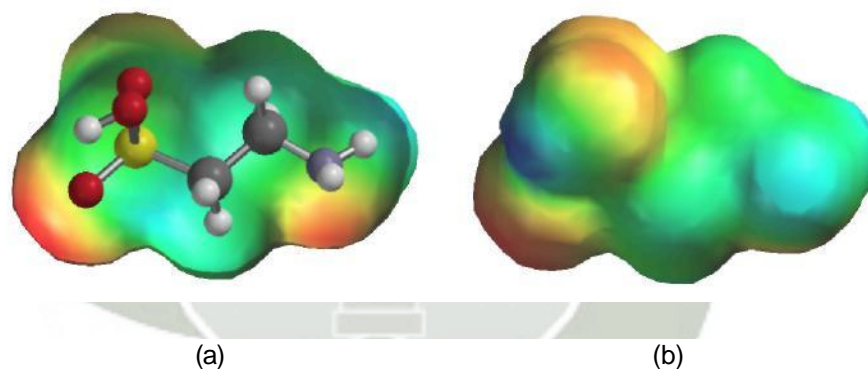


Figura 4.87: Post-interacción del osmolito Taurina.

Luego de hacer el análisis del osmolito, se realizó el análisis de la superficie de potencial electrostático de la Huntingtina mutada sin el ligando (osmolito) y con ligando (osmolito) para ello se usó el programa del APBS, donde se obtuvo archivos finales los cuales fueron alzados en el programa de Quimera6.1, donde se visualizó la superficie de potencial electrostático de las proteínas. Prontamente se tomaron varias imágenes de diferentes lados de la proteína.

En las figuras 4.88(a), 4.88(c) y 4.88(e) se observan imágenes de la estructura de la

proteína huntingtina mutada sin el osmolito, en tres representaciones moleculares, la primera representación molecular muestra la secuencia repetida de glutaminas (de color rojo), la segunda representación molecular muestra la proteína en forma de ribbon o cintas y la tercera muestra la superficie de potencial electrostático.

En las figuras 4.88(b), 4.88(d) y 4.88(f) se muestra el sistema interactuante en la etapa final de la dinámica molecular, presentándose en tres representaciones moleculares para poder localizar y realizar un estudio más detallado del lugar donde se encuentra interactuando el osmolito, en la figura 4.88(d) se muestra al osmolito taurina en el modelo de superficie mostrado de color verde. En la figura 4.88(f), se observa que existe una variación en la forma de la proteína cuando interacciona con el osmolito taurina, reduciéndose las cavidades que normalmente se presentan cuando la proteína mutada no interacciona con otra molécula. El lugar donde se encuentra interactuando el osmolito, presenta una disminución en la zona negativa, mostrando un color rojo suave. También se observan notorias diferencias en la estructura proteica, lo cual fue debido a que el osmolito antes de mantenerse en el lugar en el que se muestra, este interactuó con varios sitios de la proteína.

Luego de rotarlas 180° en el eje de coordenadas X, se tomaron imágenes, donde se muestran en la figura 4.89, aquí observamos que existe un cambio en la forma de la proteína cuando esta se encuentra interactuando con el osmolito taurina. En la figura 4.89(f) se observan pequeñas cavidades que muestran una zona negativa (rojo) cuando la proteína no se encuentra ligada al osmolito mientras que cuando se toma imagen del sistema interactuante con la superficie de potencial electrostático esas cavidades cambian a un estado positivo débil (azul suave). En esta cara las proteínas muestran diferencias en las cargas, en la figura 4.89(e) existen más cargas positivas (azul) en la parte central, mientras que en la figura 4.89(f) la cual corresponde al sistema interactuante, las cargas son negativas (rojo suave).

En la figura 4.90 se observan imágenes de la parte superior de la proteína, aquí observamos tres diferentes representaciones moleculares, en las figuras 4.90(e) y 4.90(f)

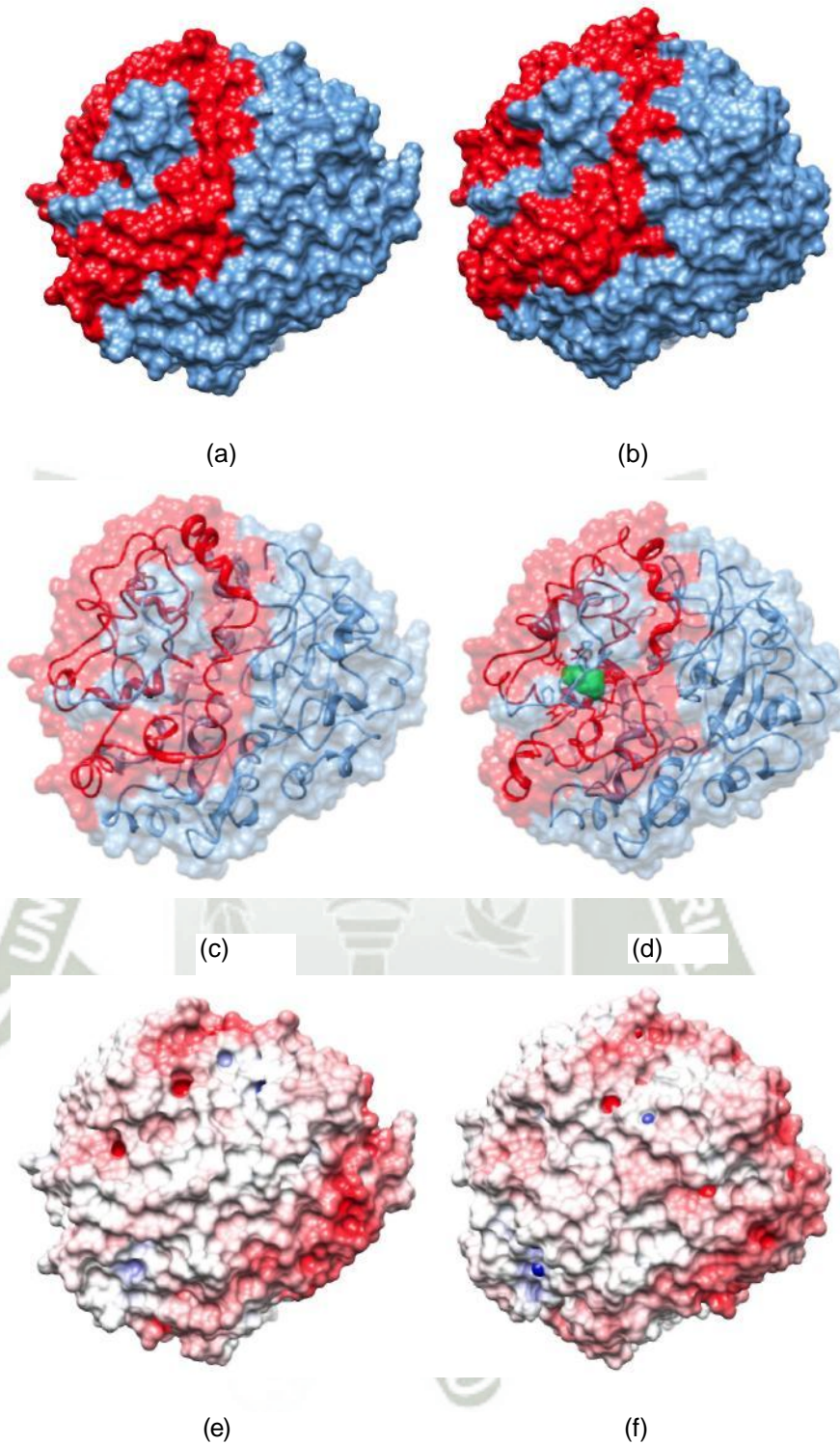


Figura 4.88: Proteína Huntingtina normal y mutada post-interacción. (a) Httm modelo de superficie (b) Httm-Taurina modelo de superficie (c) Httm modelo de superficie y cintas (d) Httm-Taurina modelo de superficie y cintas (e) Httm con superficie de potencia | electrostático (f) Httm-Taurina con superficie de potencial electrostático

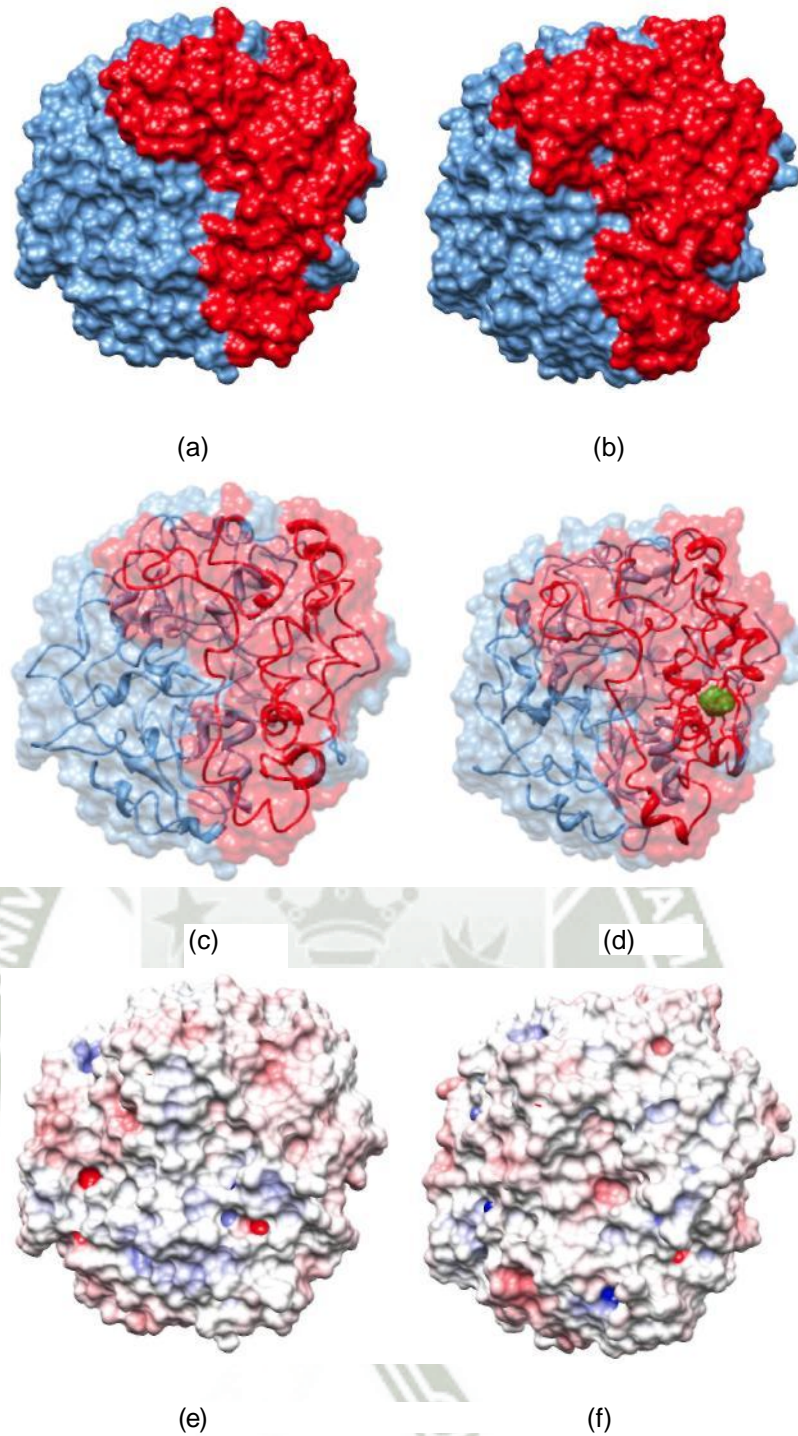


Figura 4.89: Proteína Huntingtina normal y mutada post-interacción con 180° de rotación . (a) Httm modelo de superficie (b) Httm-Taurina modelo de superficie (c) Httm modelo de superficie y cintas (d) Httm-Taurina modelo de superficie y cintas (e) Httm con superficie de potencial electrostático (f) Httm-Taurina con superficie de potencial electrostático

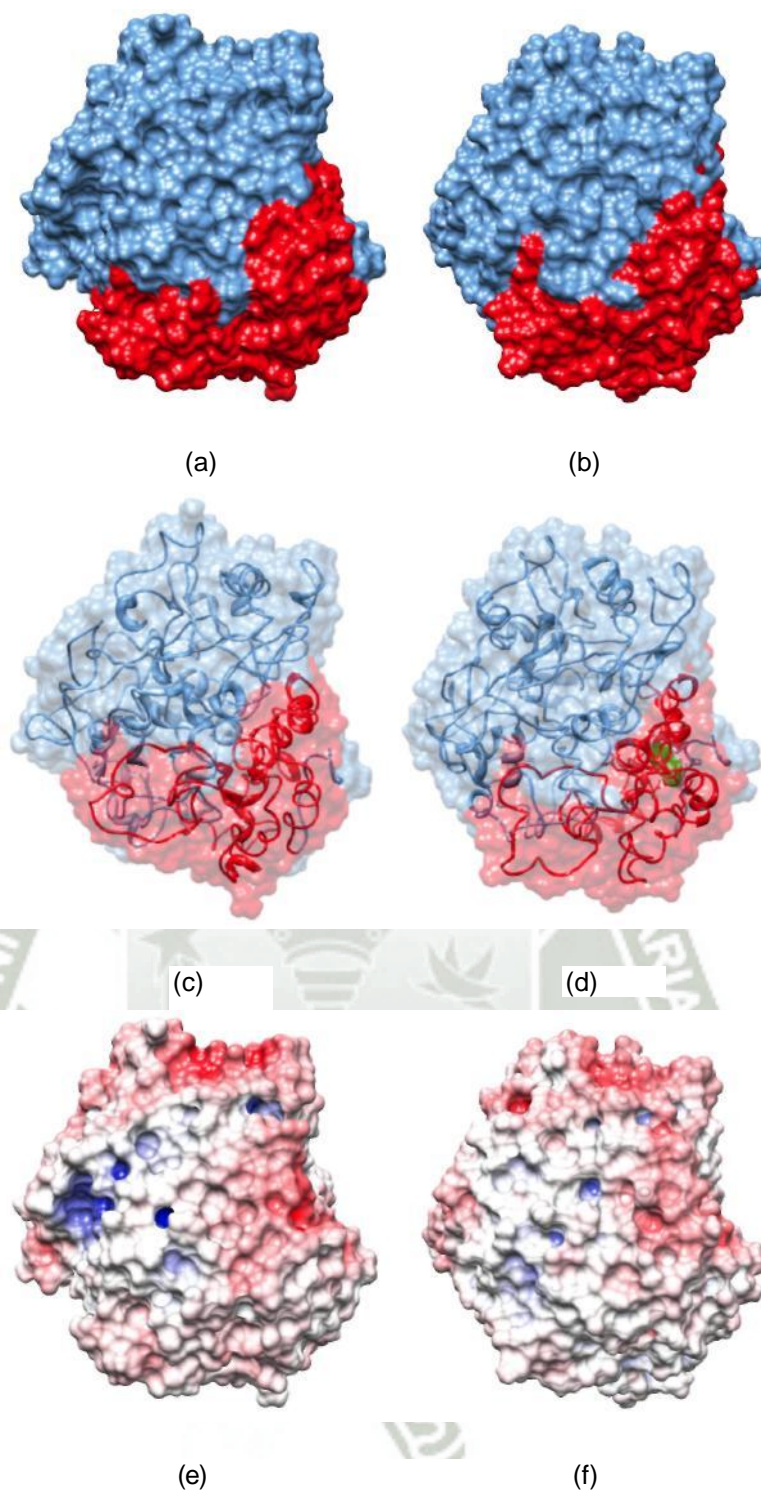


Figura 4.90: Proteína Huntingtina normal y mutada post-interacción vista de arriba.
 (a) Httm modelo de superficie (b) Httm-Taurina modelo de superficie (c) Httm modelo de superficie y cintas (d) Httm-Taurina modelo de superficie y cintas (e) Httm con superficie de potencial electrostático (f) Httm-Taurina con superficie de potencial electrostático

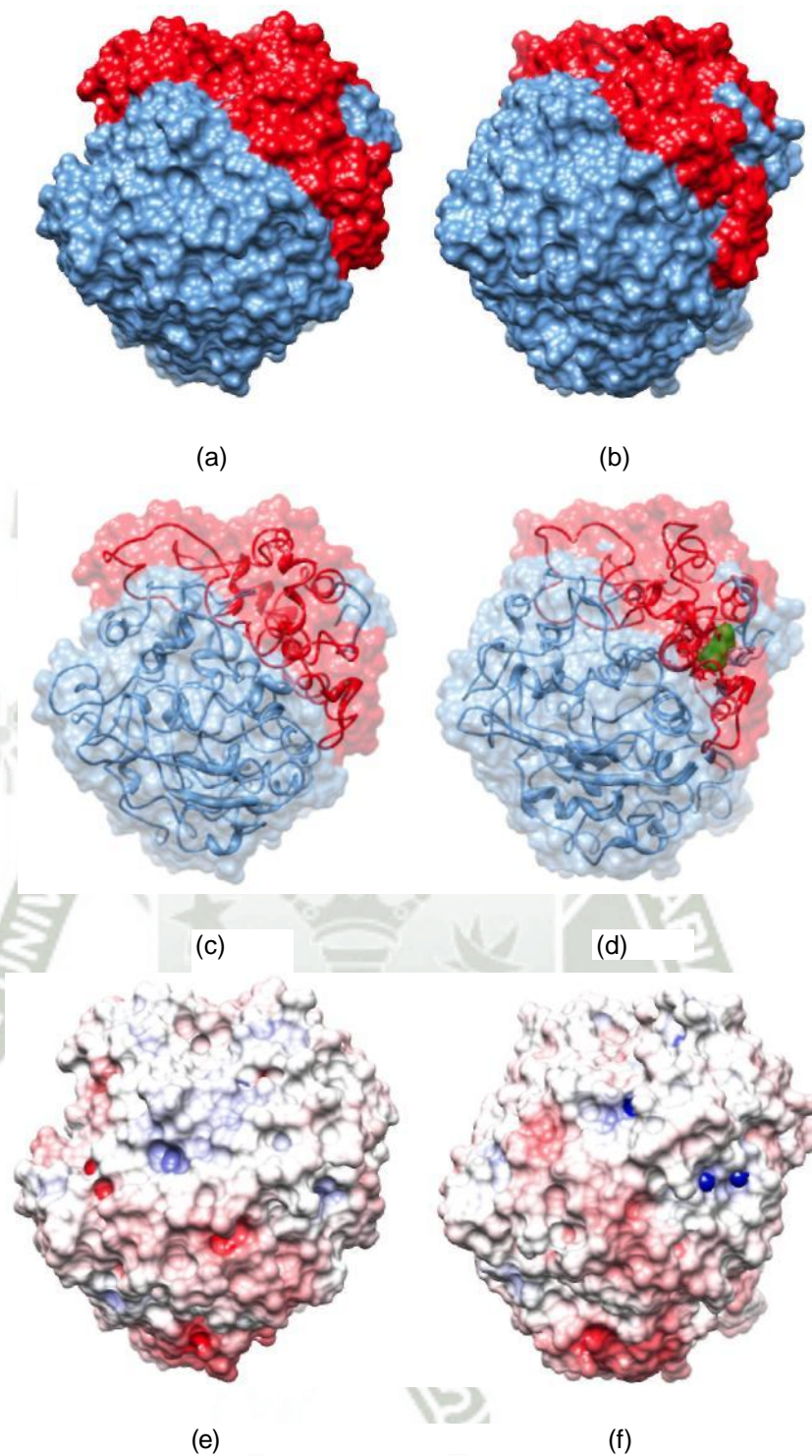


Figura 4.91: Proteína Huntingtina normal y mutada post-interacción vista de abajo. (a) Httm modelo de superficie (b) Httm-Taurina modelo de superficie (c) Httm modelo de superficie y cintas (d) Httm-Taurina modelo de superficie y cintas (e) Httm con superficie de potencial electrostático (f) Httm-Taurina con superficie de potencial electrostático

se presentan las imágenes de superficie de potencial electrostático donde existe una reducción de cavidades, la proteína sin ligando presenta una cavidad bastante notoria cargada positivamente (azúl intenso), mientras que en la proteína con ligando esta cavidad es reducida y cambiando a una zona menos positiva (azúl debil). En la región donde suele encontrarse el osmolito, se observan pequeños cambios en la superficie manteniéndose una carga negativa debil (rojo suave).

Revisando la superficie de potencial electrostático de otra cara de la proteína, en la figura 4.91 se observan las imágenes correspondientes a una misma posición de la proteína sin ligando y la proteína con ligando, cuando observamos la imagen de superficie de potencial electrostático del sistema interactuante se ven variaciones en la proteína cuando interactúa con el osmolito, en la figura 4.91(f) se encuentra la zona de interacción cargada positivamente (azúl intenso).

4.6.4. Potencial electrostático de Httm-TMAO

Se determinó el potencial electrostático del osmolito TMAO antes de que se inicie la interacción con la proteína, los resultados obtenidos del programa Spartan se muestran en la figura 4.92, donde el átomo de oxígeno mantiene una carga negativa (rojo intenso), todos los átomos de hidrógeno mantienen una zona con carga positiva (azúl intenso).

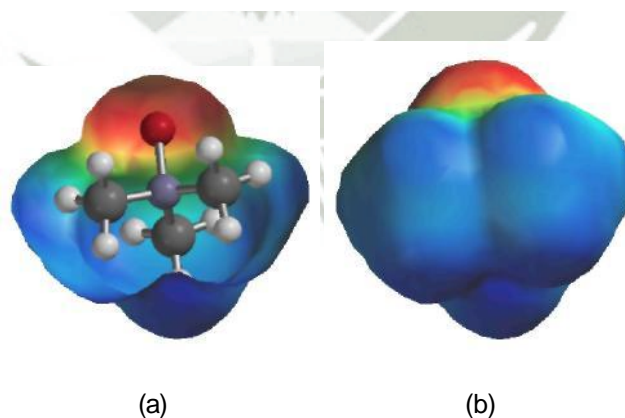


Figura 4.92: Pre-interacción del osmolito TMAO.

Culminada la dinámica del sistema interactuante, se procedió a separar el ligan-

do del receptor y de esta forma se estudió la superficie de potencial electrostático post-interacción, en la figura 4.93 se observa como quedó el osmolito, en esta imagen la posición de los diferentes átomos que conforman la estructura del osmolito se encuentran un poco diferentes, pues aún se mantiene cargado negativamente (rojo intenso) donde se encuentre el átomo oxígeno y de igual modo los átomos de hidrógeno mantienen una carga positiva (azul intenso).

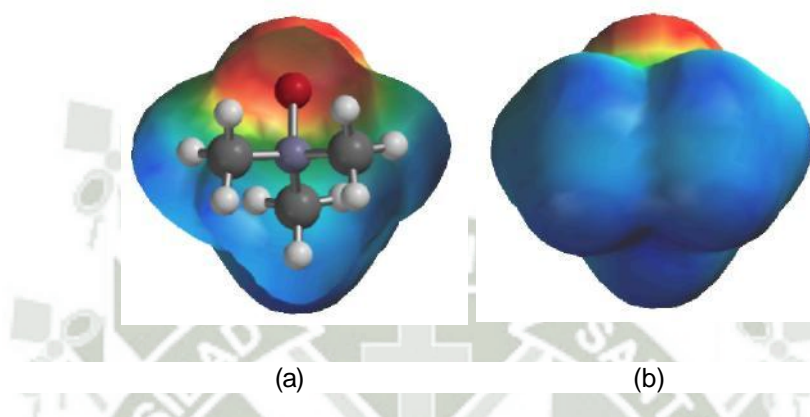


Figura 4.93: Post-interacción del osmolito TMAO.

Para poder tener una visión más clara de la superficie de potencial electrostático de las proteínas, se realizó el análisis de tres tipos de representaciones moleculares, la primera representación corresponde la de superficie hidrofóbica, donde se muestra de color rojo el lugar donde se encuentra la región de la secuencia de glutaminas repetidas, la segunda representación muestra la posición del osmolito en la proteína mutada y finalmente la tercera representación presenta la superficie de potencial electrostático de las proteínas.

En la figura 4.94 se muestra una posición estándar inicial, aquí observamos que las estructuras en su forma de superficie no muestran diferencias, el osmolito TMAO se encuentra dentro de la superficie de la proteína. En cuanto a la superficie de potencial, se muestran variaciones de carga, pues en la proteína sin ligando (osmolito) la parte central muestra una zona bastante clara, mientras que en la proteína con ligando (osmolito) esta zona se encuentra dominada por cargas negativas (rojo suave), también es importante mencionar que se observan zonas positivas bien diferenciadas.

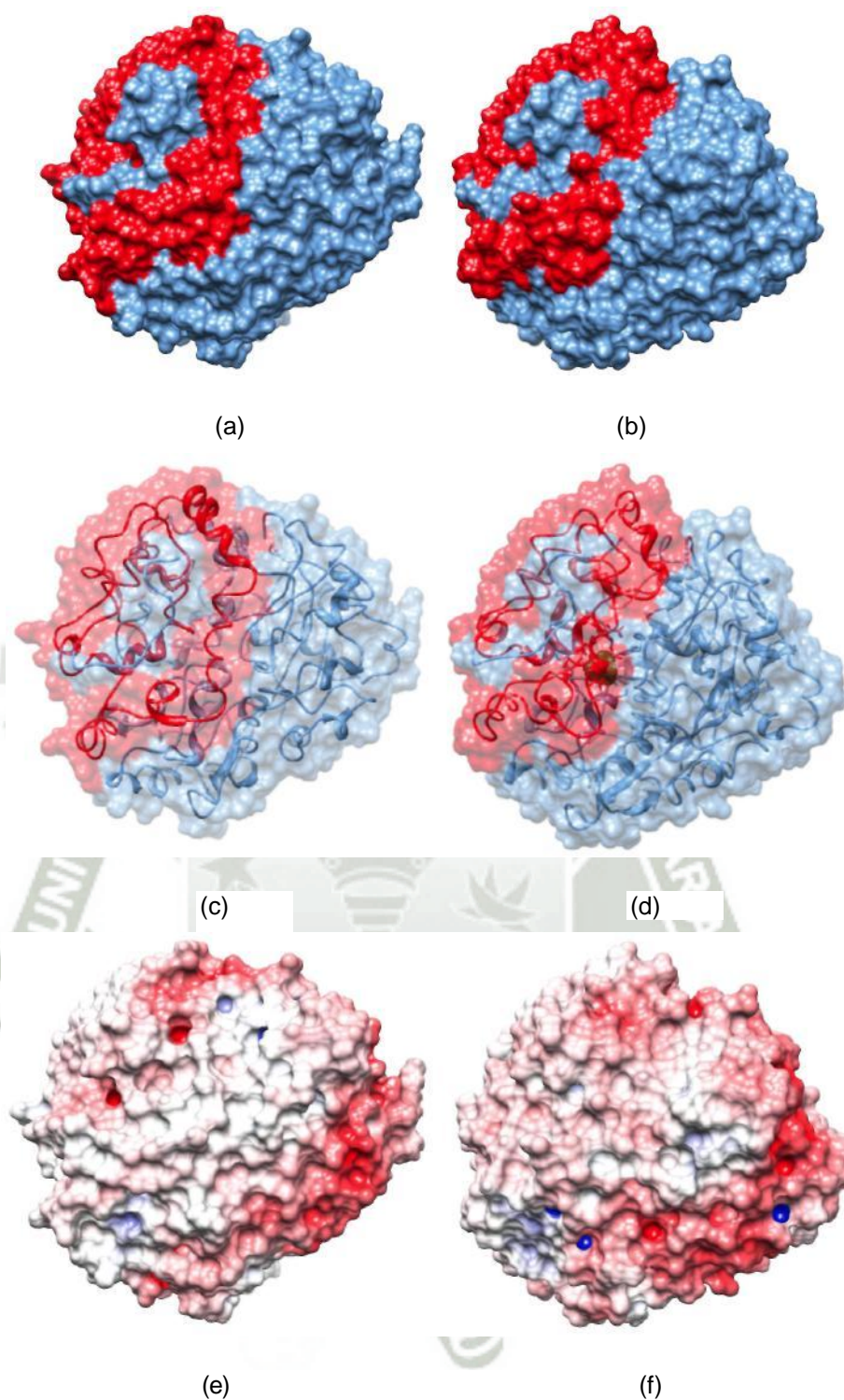


Figura 4.94: Proteína Huntingtina normal y mutada post-interacción. (a) Httm modelo de superficie (b) Httm-TMAO modelo de superficie (c) Httm modelo de superficie y cintas (d) Httm-TMAO modelo de superficie y cintas (e) Httm con superficie de potencial electrostático (f) Httm-TMAO con superficie de potencial electrostático

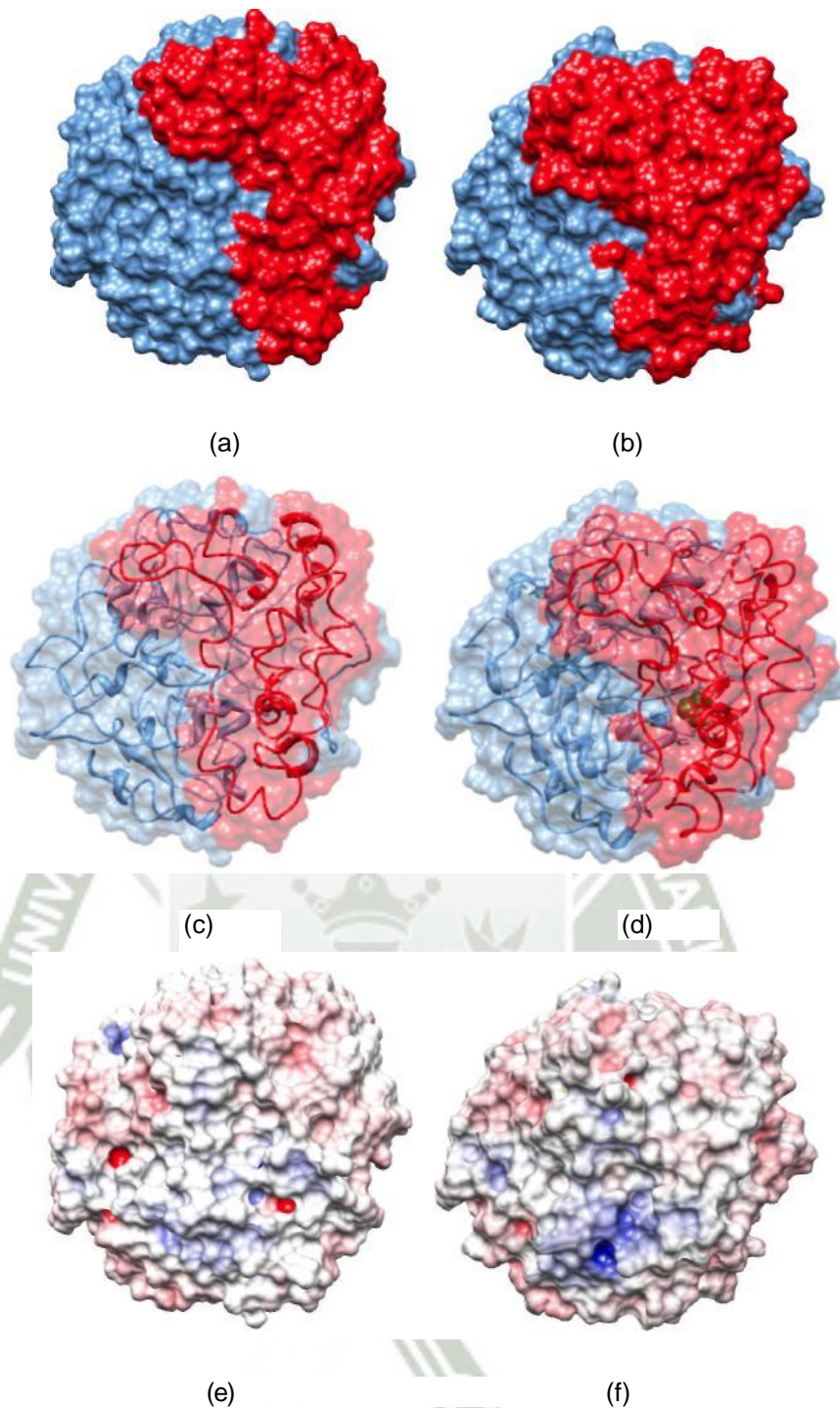


Figura 4.95: Proteína Huntingtina normal y mutada post-interacción con 180° de rotación . (a) Httm modelo de superficie (b) Httm-TMAO modelo de superficie (c) Httm modelo de superficie y cintas (d) Httm-TMAO modelo de superficie y cintas (e) Httm con superficie de potencial electrostático (f) Httm-TMAO con superficie de potencial electrostático

En la figura 4.95 se presenta a las proteína con una rotación antihoraria de 180° en su eje X, mostrando que no hay mucha variación en la forma de la proteína con ligando (osmolito) que la que no la presenta. Con respecto a la ubicación del osmolito, este se encuentra interactuando con la secuencia repetida de glutaminas, en la figura 4.95(d) se observa que el osmolito (color verde) se encuentra en la parte interna de la proteína.

Cuando revisamos la superficie de potencial electrostático de la proteína con ligando (ver figura 4.95(f)) el lugar donde se encuentra alojado el osmolito se muestra con una cavidad y con una carga positiva (azúl), mientras que en la proteína sin ligando (ver figura 4.95(e)) la carga positiva se muestra con un color azúl suave y no se muestra una cavidad bien marcada como la que muestra el sistema interactuante.

En la figura 4.96 se muestra otra cara de las proteína, donde se muestran notables variaciones en la estructura mutada, pues cuando observamos la figura 4.96(e) presenta una cavidad bien clara de color azúl intenso lo cual indica una zona de carga positiva y cuando revisamos la figura 4.96(f) la cavidad mostrada en la proteína sin ligando se muestra de color rosado indicando una zona de carga negativa débil.

Cuando revisamos ambas proteínas, nos damos cuenta que varias zonas con carga positiva mostradas en la estructura de la proteína sin ligando cambian a zonas con carga negativa cuando esta proteína se encuentra interactuando con el osmolito.

Finalmente se realizó el estudio de otro lado de las proteínas, donde se pudo comprobar que la forma de la estructura de las proteínas muestran una notable diferencia (ver figura 4.97(a) y figura 4.97(b)).

En las figuras 4.97(e) y 4.97(f) se muestra el modelo de superficie de potencial electrostático, cuando se observa la imagen de la proteína con el ligando (osmolito) se muestran varias cavidades con carga positiva (azúl intenso), mientras que en la proteína sin ligando (osmolito) esas cavidades presentan una carga negativa (rojo débil).

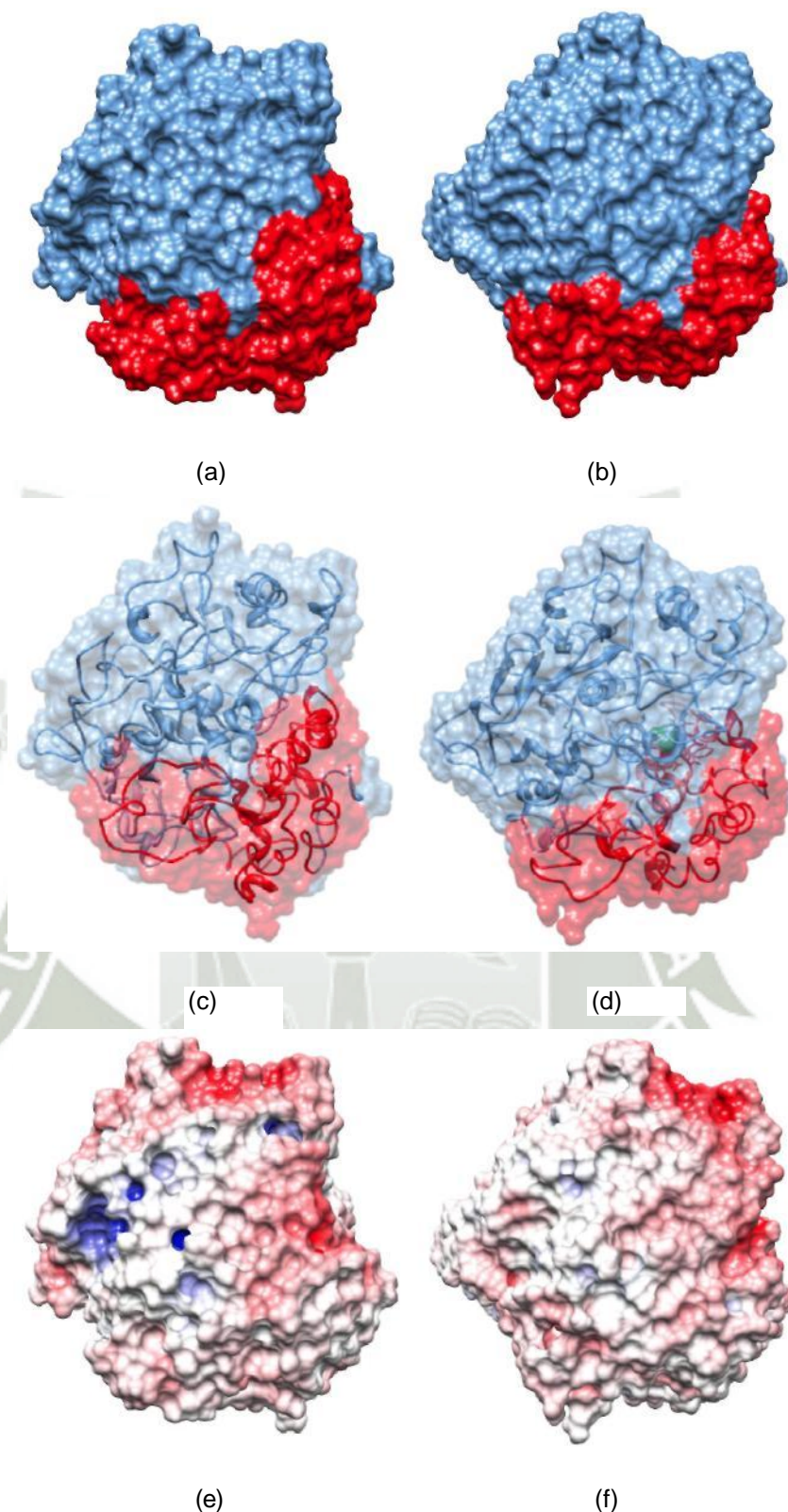


Figura 4.96: Proteína Huntingtina normal y mutada post-interacción vista de arriba. (a) Httm modelo de superficie (b) Httm-TMAO modelo de superficie (c) Httm modelo de superficie y cintas (d) Httm-TMAO modelo de superficie y cintas (e) Httm con superficie de potencial electrostático (f) Httm-TMAO con superficie de potencial electrostático

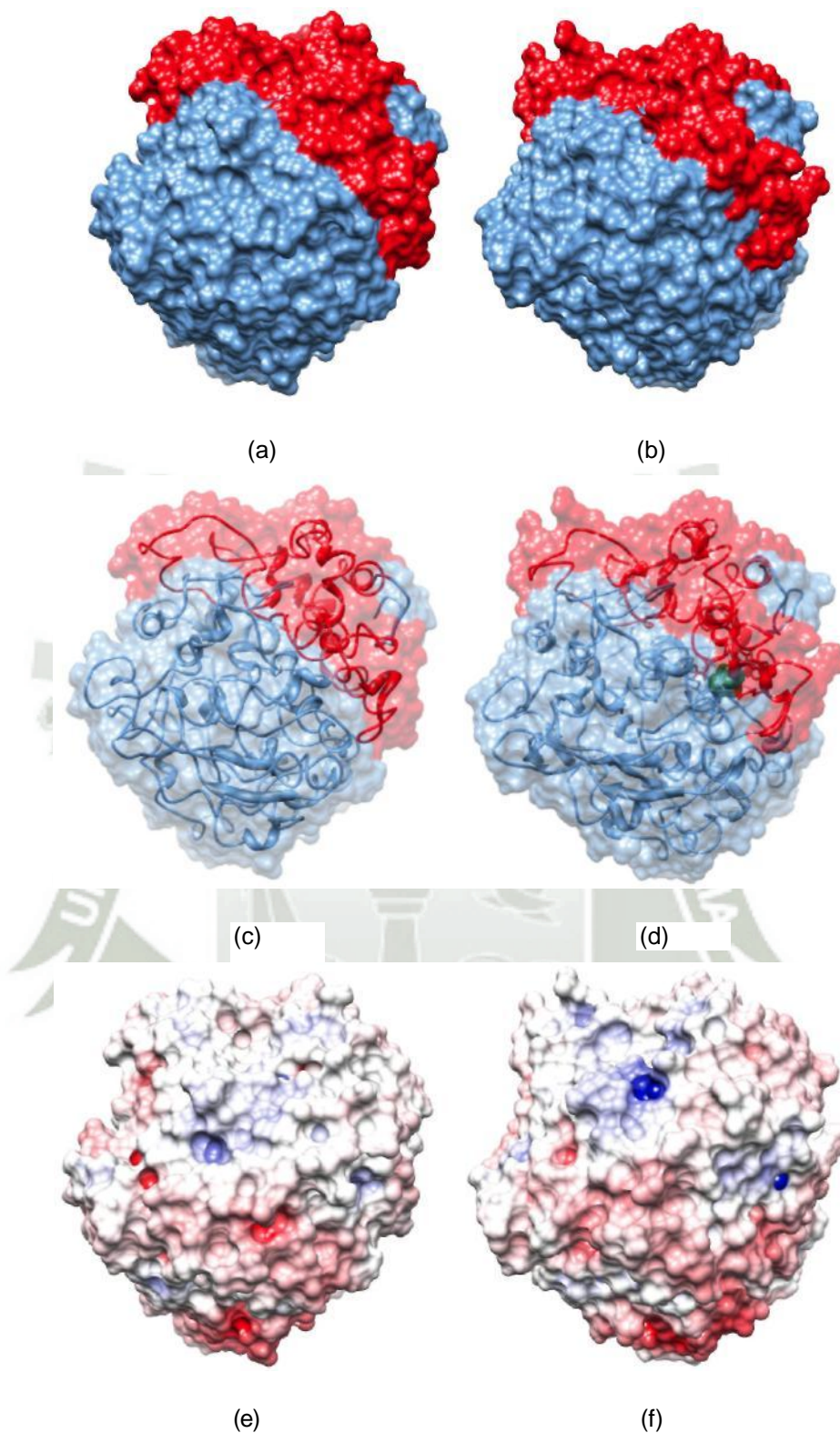


Figura 4.97: Proteína Huntingtina normal y mutada post-interacción vista de abajo. (a) Httm modelo de superficie (b) Httm-TMAO modelo de superficie (c) Httm modelo de superficie y cintas (d) Httm-TMAO modelo de superficie y cintas (e) Httm con superficie de potencial electrostático (f) Httm-TMAO con superficie de potencial electrostático

4.6.5. Potencial electrostático de Httm-Prolina

Para terminar con la evaluación de los potenciales electrostáticos, se determinó el potencial electrostático del osmolito prolina antes de la interacción con la proteína mutada, para determinar el potencial de la prolina se usó el programa de Spartan y prontamente se obtuvo las imágenes de la superficie de potencial electrostático. En la figura 4.98, los átomos de oxígeno mantienen una carga negativa (rojo intenso) y los átomos de hidrógeno mantienen una carga positiva débil (celeste).

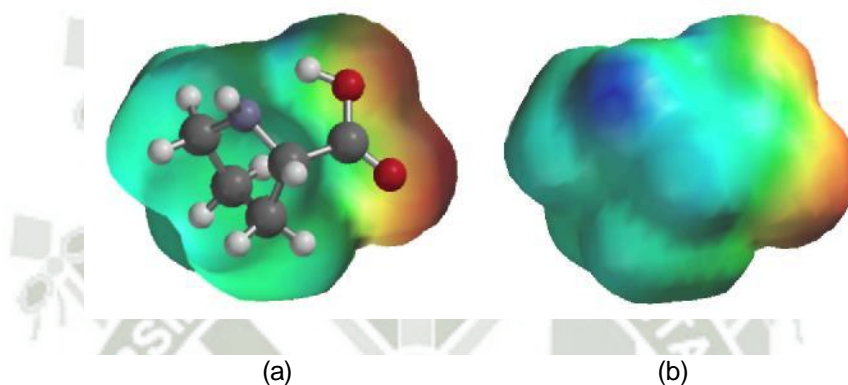


Figura 4.98: Pre-interacción del osmolito Prolina.

En la figura 4.99 se observa al osmolito post-interacción, donde el átomo de nitrógeno (representado por una bola de color morado) muestra una pequeña zona de carga negativa (rojo intenso), los átomos de hidrógeno tienen una tendencia a una carga positiva muy débil (verde-celeste).

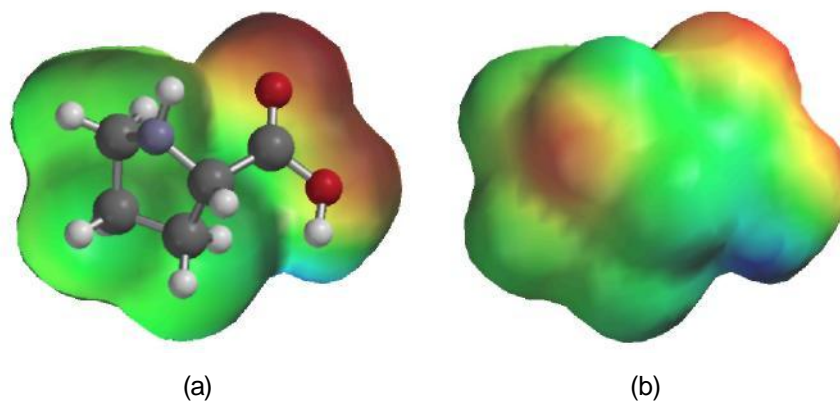


Figura 4.99: Post-interacción del osmolito Prolina.

La superficie de potencial electrostático del sistema interactuante fue determinado usando el servidor PDB2PQR y el programa de APBS, prontamente los archivos finales fueron decodificados en el programa de Quimera6.1 para la visualización de la superficie de potencial, en la figura 4.100 se observan los tres tipos de representaciones moleculares de la proteína sin ligando y la proteína con ligando, en las figuras 4.100(a) y 4.100(b), se muestra que la forma de las estructuras de las proteínas varían una respecto a la otra.

En la figura 4.100(d) se muestra la localización del osmolito en la proteína, aquí se ve que el osmolito mantiene la preferencia por la secuencia repetida de glutaminas, finalmente se realiza el análisis de las estructuras con la superficie de potencial electrostático en las figuras 4.100(e) y 4.100(f) se muestra que existe un notorio cambio en la carga negativa débil (rojo suave) que presenta la proteína sin ligando, tomándose a una región de carga positiva (azúl).

Se tomaron imágenes de otro lado de la proteína mutada con ligando y sin ligando, en la figura 4.101 se muestran tres formas de representación molecular, donde la primera representación nos muestra de color rojo la región de glutaminas, en la figura 4.101(a) se muestra una ligera variación en la posición de las glutaminas, la localización del osmolito se encuentra en la parte lateral derecha de la proteína, seguido de estas imágenes en la figura 4.101(d) podemos distinguir donde se encuentra ubicado el osmolito (color verde), el cual se muestra interactuando con la secuencia repetida de glutaminas.

El potencial electrostático se muestra en las figuras 4.101(e) y 4.101(f), en estas imágenes se aprecia una notable disminución de las cargas negativas (rojo) a cargas positivas (azúl), cuando observamos la imagen de la superficie de potencial de la proteína sin ligando nos damos cuenta que presenta algunos lugares con carga negativa (rojo intenso) y cuando comparamos con la proteína que tiene el ligando, estas zonas desaparecen.

En la figura 4.102 se muestra la cara anterior de las proteínas con respecto a la

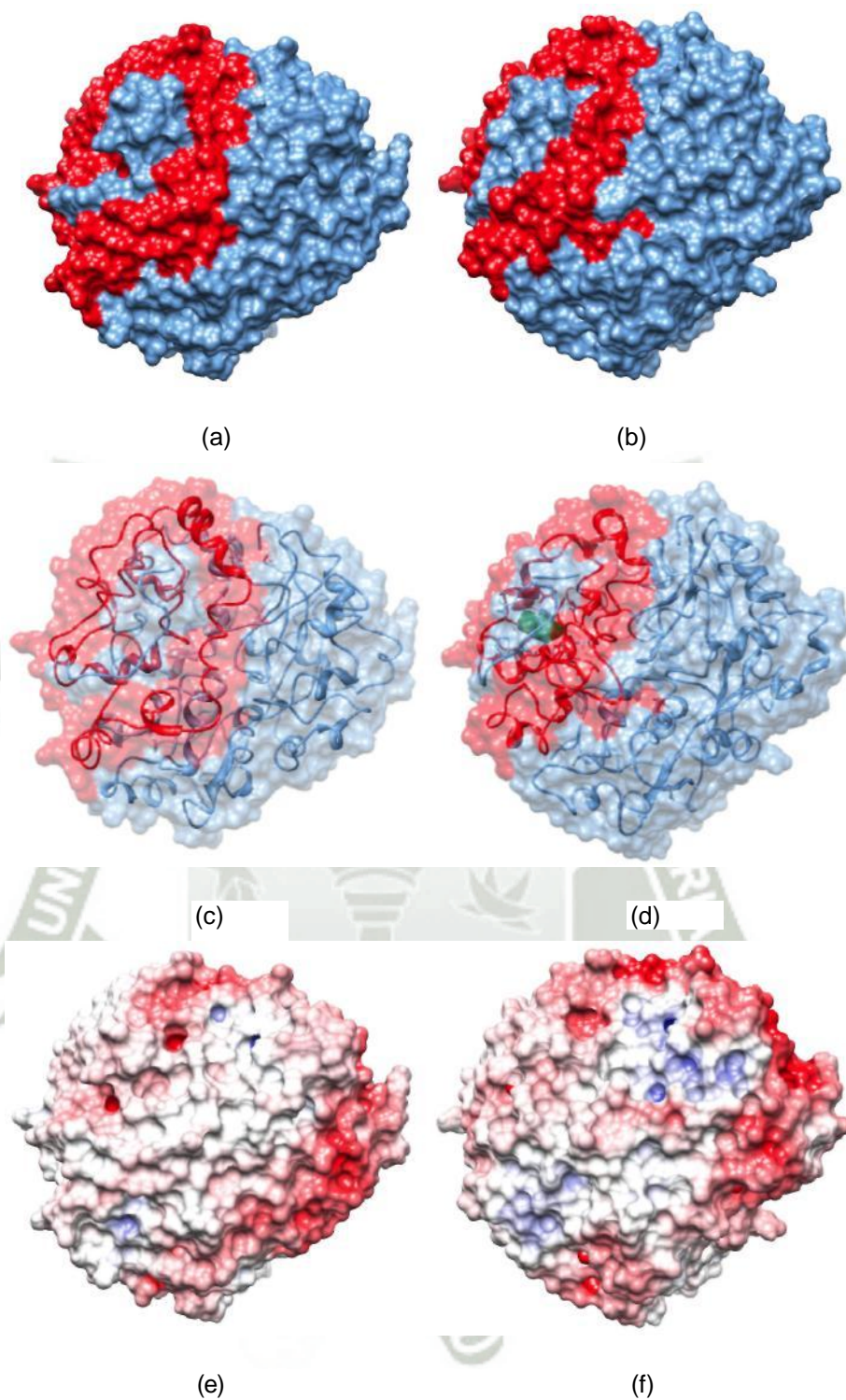


Figura 4.100: Proteína Huntingtina normal y mutada post-interacción. (a) Httm modelo de superficie (b) Httm-Prolina modelo de superficie (c) Httm modelo de superficie y cintas (d) Httm-Prolina modelo de superficie y cintas (e) Httm con superficie de potencial electrostático (f) Httm-Prolina con superficie de potencial electrostático

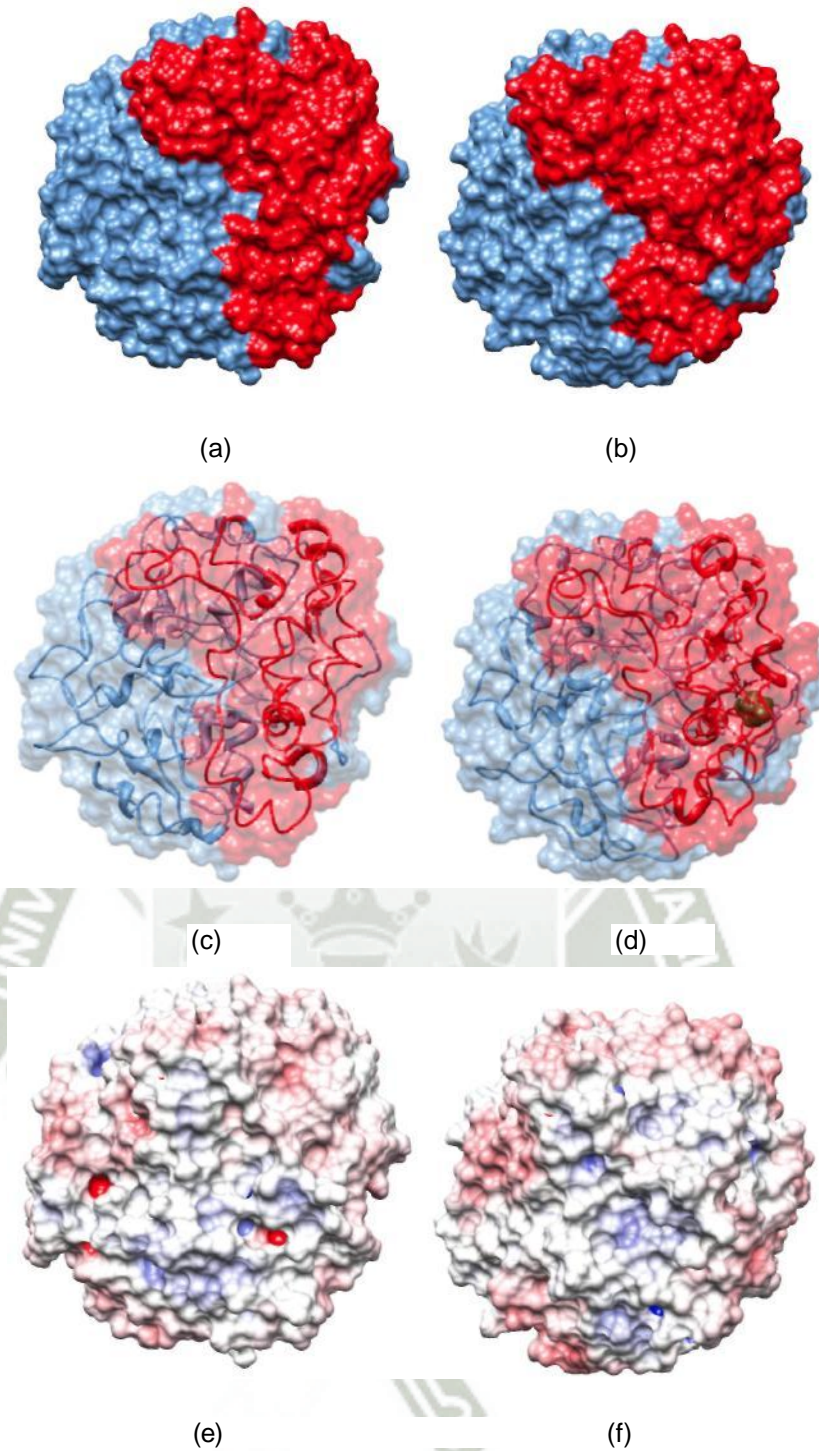


Figura 4.101: Proteína Huntingtina normal y mutada post-interacción con 180° de rotación . (a) Httm modelo de superficie (b) Httm-Prolina modelo de superficie (c) Httm modelo de superficie y cintas (d) Httm-Prolina modelo de superficie y cintas (e) Httm con superficie de potencial electrostático (f) Httm-Prolina con superficie de potencial electrostático

mostrada en la figura 4.100, la representación de la estructura molecular de superficie presenta que las proteínas no muestran diferencias significativas (ver figuras 4.102(a) y 4.102(b)), en tanto la posición del osmolito se muestra en la zona lateral derecha inferior en este lugar se observa como los enlaces de tipo alfa de la secuencia repetida de glutaminas son los que interaccionan con el osmolito (ver figura 4.102(d)).

La superficie de potencial electrostático mostrado en las figuras 4.102(e) y 4.102(f) nos indican que la variación de potencial es notorio, pues gran parte de este lado de la proteína con ligando se encuentra gobernado por cargas negativas (rojo), la cavidad con carga positiva (azúl) que presenta la proteína sin ligando cambia cuando la proteína interactúa con el osmolito.

Finalmente se tomaron imágenes de la cara inferior de las proteínas con respecto a las proteínas mostradas en la figura 4.103 se presentan los tres tipos de representaciones moleculares indicando que las primeras imágenes nos muestran la forma de las proteínas y la posición de la secuencia repetida de glutaminas, en la figura 4.103(b) se muestra que las glutaminas cambian de posición mostrando que estas son las que mayor excitabilidad tienen en la proteína, la localización del osmolito (color verde) muestra la preferencia por interaccionar con la secuencia repetida de glutaminas (figura 4.103(d)).

Cuando se revisa la superficie de potencial electrostático de la proteína sin ligando (figura 4.99(b)), esta nos muestra regiones variadas de cargas positivas (azúl) y negativas (rojo), el lugar donde se ubican las glutaminas se muestran con una carga positiva débil (celestes) y algunas zonas con carga negativa débil (rosado), cuando se revisa la superficie de potencial electrostático de la proteína con ligando esta nos muestra la formación de cavidades con carga positiva (azúl) en lugar que ocupan las glutaminas, esto se puede apreciar en la figura 4.103(f), de igual modo en la zona donde se encuentra el osmolito la carga de esta zona es positiva (azúl intenso).

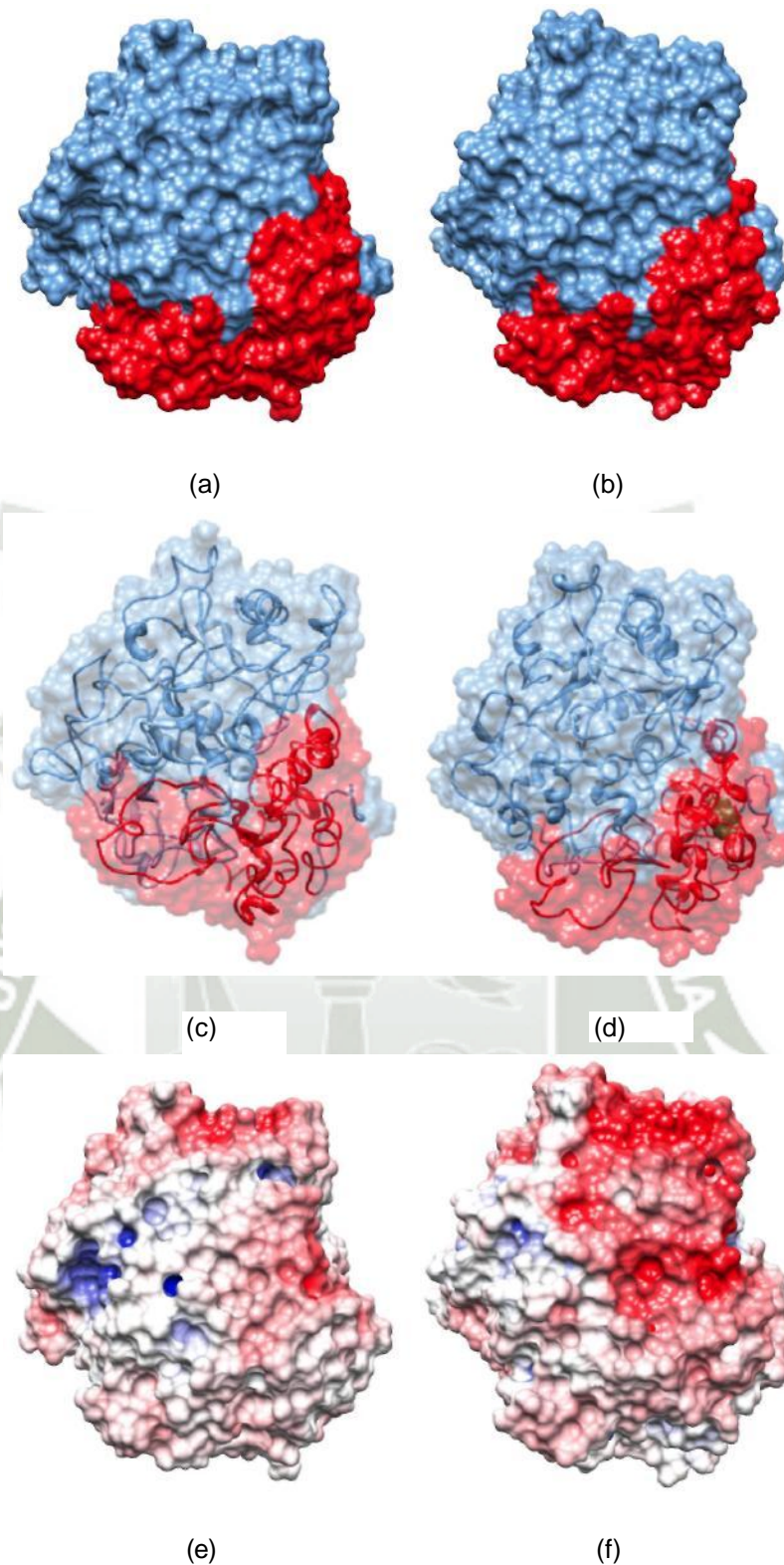


Figura 4.102: Proteína Huntingtina normal y mutada post-interacción vista de arriba. (a) Httm modelo de superficie (b) Httm-Prolina modelo de superficie (c) Httm modelo de superficie y cintas (d) Httm-Prolina modelo de superficie y cintas (e) Httm con superficie de potencial electrostático (f) Httm-Prolina con superficie de potencial electrostático

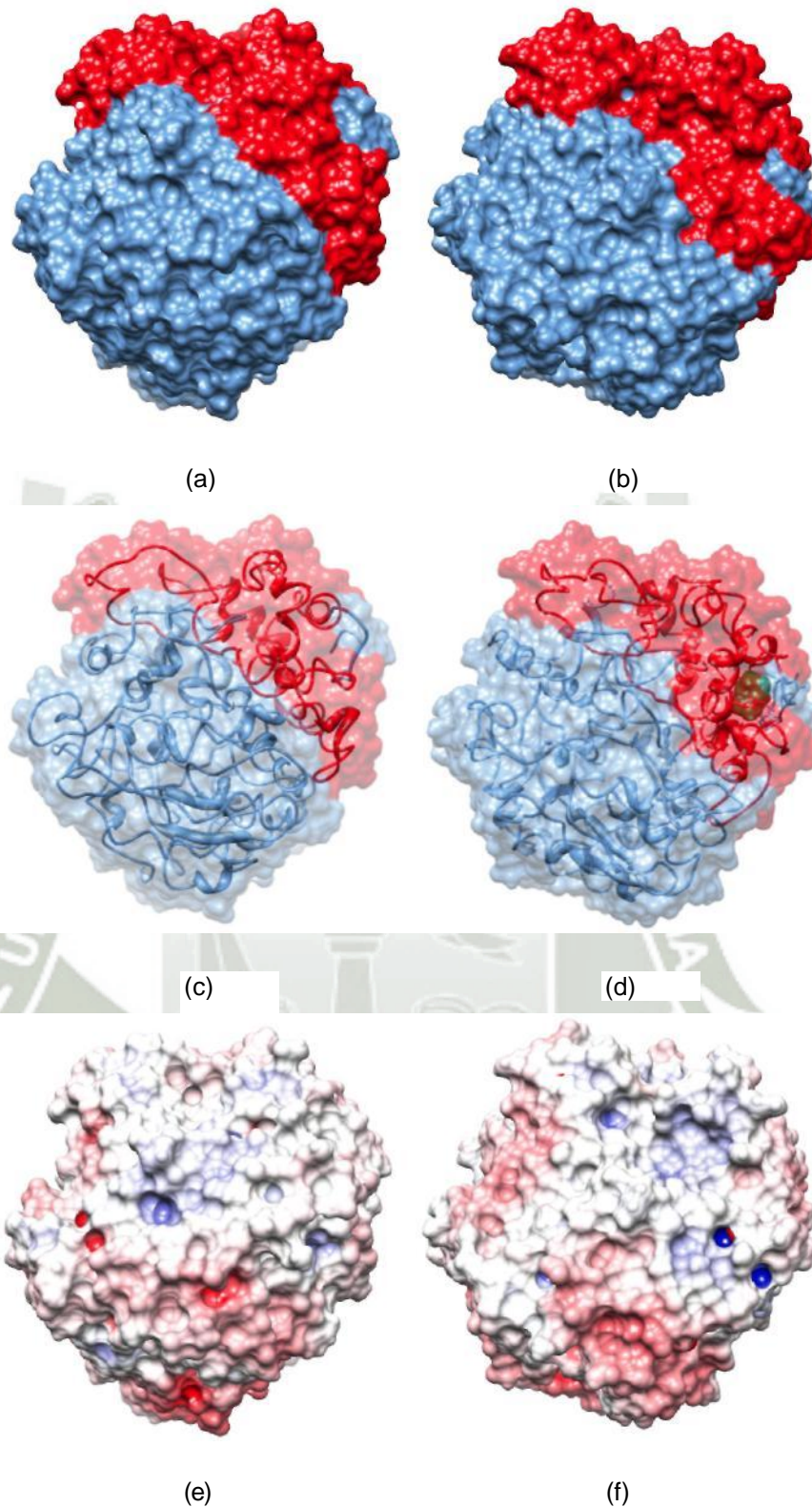


Figura 4.103: Proteína Huntingtina normal y mutada post-interacción vista de abajo. (a) Httm modelo de superficie (b) Httm-Prolina modelo de superficie (c) Httm modelo de superficie y cintas (d) Httm-Prolina modelo de superficie y cintas (e) Httm con superficie de potencial electrostático (f) Httm-Prolina con superficie de potencial electrostático.

4.7. Estudio de los parámetros termodinámicos

El análisis de los parámetros termodinámicos de las estructuras terciarias así como de las estructuras cuaternarias le brindan a la investigación un mayor realce de veracidad con respecto a la revisión gráfica. Los datos termodinámicos de acuerdo a las aproximaciones de termodinámica estadística fueron obtenidos luego de culminar la simulación de dinámica molecular de los sistemas.

Para determinar las propiedades termodinámicas de los sistemas aislados y de los sistemas interactuantes, se tomó en cuenta la función de partición que describen las propiedades de un sistema termodinámicamente en equilibrio, como el promedio de las Energías Totales de los microestado de cada sistema, considerado como la Energía Total del Sistema.

Tabla 4.1: Valores de variación de energía

	E_k (KJ/mol)	E_p (KJ/mol)	E_t (KJ/mol)
Huntingtina mutada	-12704,2	5624,82	-7079,38
Betaína	-55,203	11,5881	-43,6149
Taurina	-140,936	8,36503	-132,57097
TMAO	-47,4939	8,36665	-39,12725
Prolina	19,3661	10,3003	29,6664

Se obtuvo un total de 10 millones de datos para la proteína mutada y los diferentes osmolitos, en la tabla 4.1 se observan los datos correspondientes al promedio de energías cinética, potencial y total de las moléculas sin interactuar, en esta tabla los datos de energía total se muestra con un valor negativo indicando que el sistema esta caminando a una forma más estable excepto el osmolito prolina ya que presenta una energía total positiva esto es debido a que al ser un aminoácido apolar o hidrófobo.

Para realizar los cálculos de los sistemas interactuantes se obtuvo un total de 30 millones de datos, estos son mostrados en la tabla 4.2, donde se muestran los valores de

energía cinética, potencial y total, los resultados mostrados son negativos indicándonos que el sistema esta caminando a una forma mas estable por lo tanto mas favorable.

Tabla 4.2: Valores de variación energía de los sistemas interactuantes

	$E_k(\text{KJ/mol})$	$E_p(\text{KJ/mol})$	$E_t(\text{KJ/mol})$
Httm-Betaína	-12837,6	5637,05	-7200,55
Httm-Taurina	-12943,9	5633,84	-7310,06
Httm-TMAO	-12849	5633,82	-7215,18
Httm-Prolina	-12772,9	5635,76	-7137,14

En ausencia de datos cristalográficos sobre el modo preciso de unión del ligando a la macromolécula, es preciso explorar las diversas posibilidades de interacción entre ambas moléculas. Para que se forme un complejo, la energía de interacción (ΔE_i), ha de ser negativa:

$$\Delta E_i = \Delta E_t(\text{Httm} - \text{osmolito}) - (\Delta E_t(\text{Httm}) + \Delta E_t(\text{osmolito})) \quad (4.1)$$

La computación del ΔE_i implica conocer tanto las conformaciones óptimas de ligando y receptor por separado como la conformación más estable del complejo. La búsqueda del complejo óptimo no es trivial en la mayoría de las ocasiones, y su modelado implica tener en consideración un buen número de factores. En la tabla 4.3 se muestran los resultados de energía de interacción, del mismo modo en la figura 4.104 se muestran los resultados representados en una gráfica de barras.

De todos los resultados obtenidos se logró comprobar que mientras mas negativo sea la energía de interacción, se da una mayor interacción, quedando los resultados de la siguiente manera: Taurina >TMAO >Prolina >Betaína, teniendo la taurina mayor energía de interacción y la betaína la menor energía de interacción, esto puede ser visto claramente en las imágenes ya mostradas anteriormente.

Tabla 4.3: Valores de energía de interacción.

	E_i (KJ/mol)
Httm-Betaína	-77,5551
Httm-Taurina	-98,10903
Httm-TMAO	-96,67275
Httm-Prolina	-87,4264

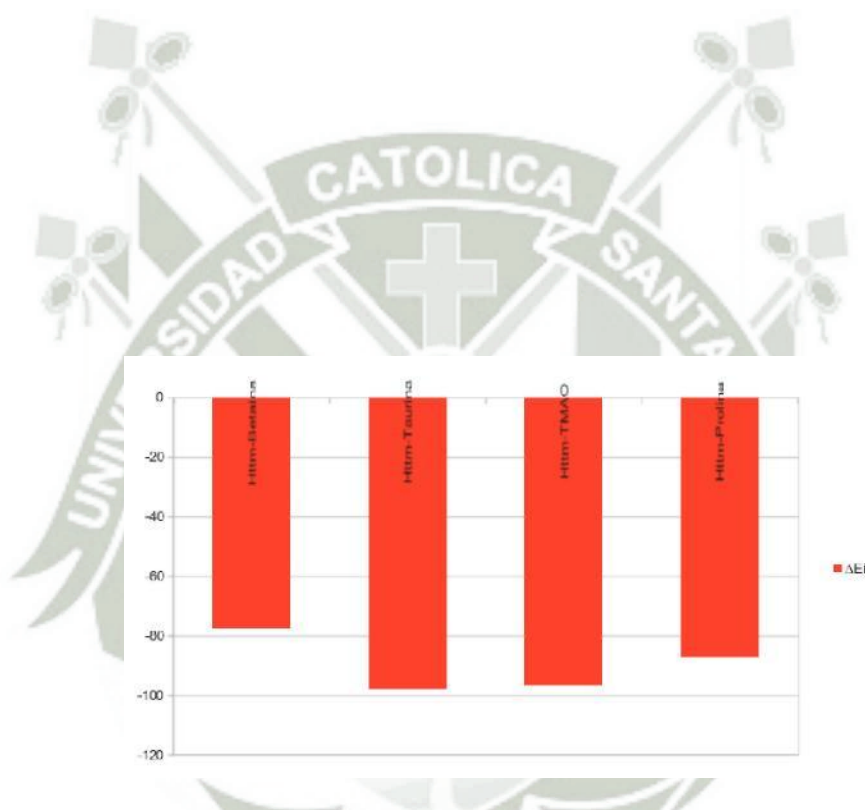


Figura 4.104: Representación en barras de la energía de interacción de los sistemas interactuantes.

Conclusiones

1. La estructura del primer exón de la proteína Huntingtina nativa se obtuvo a partir de una estructura terciaria encontrada en el Protein Data Bank bajo la denominación 3IOW.pdb, para el caso de la estructura del primer exón de la proteína Huntingtina mutada se agregó 133 glutaminas a la estructura normal, de esta forma se obtuvo un constructo con 150 repeticiones de glutaminas.
2. Se diseñaron cuatro osmolitos orgánicos (betaína, taurina, TMAO y prolina) en el programa de Molden de acuerdo a su estructura química.
3. La minimización de la estructuras proteicas se realizó en el software de GRO-MACS, usando un archivo que contiene todos los parámetros necesarios de minimización como son la temperatura, el método de minimización que fue de Steep descent y el tiempo de 10000ps o 10ns.
4. La minimización de las estructuras de los diferentes osmolitos se realizó a nivel mecánica cuántica, obteniendo la posición real en el espacio de los átomos que conforman los osmolitos.
5. Se elaboraron los cuatro campos de fuerzas de manera manual, para realizar las simulaciones de minimización y dinámica molecular de los diferentes osmolitos.
6. Se realizó la minimización y simulación de dinámica molecular de los osmolitos a nivel mecánica molecular, el osmolito betaína alcanzó la estabilidad a partir de 5 ps, el osmolito taurina se estabilizó a partir de 250 ps, el osmolito TMAO empezó en 100 ps y finalmente la estabilidad energética del osmolito prolina comenzó en 500 ps, dicha estabilidad perduró hasta finalizar la simulación.

7. La simulación de dinámica molecular de la Huntingtina mutada inició la estabilidad energética a partir de 1750 ps hasta culminar la simulación, para lo cual se usó un ensamble canónico NVT, a una temperatura de 306.09 K con solvente implícito.
8. Se obtuvo el sitio de unión óptimo de la Huntingtina mutada con los diferentes osmolitos, generando cuatro estructuras cuaternarias como Httm–Betaína, Httm–Taurina, Httm–TMAO y Httm–Prolina.
9. Para el caso de la interacción Httm–Betaína la estabilidad energética se dio inicio desde que se lanzó la simulación de dinámica, para Httm–Taurina la estabilidad energética comienza desde el inicio de la simulación, para el caso de la interacción Httm–TMAO la estabilidad comienza a partir de 100 ps y finalmente para la interacción Httm–Prolina la estabilidad comienza a partir de 500 ps, todos estos sistemas se mantuvieron estables hasta finalizar la simulación de dinámica molecular.
10. Se obtuvo la variación de Energía interna de interacción (ΔU) de todos los sistemas sin interactuar y los sistemas interactuantes, determinando que la mejor energía de interacción se da en el sistema interactuante Httm-aurina, seguidamente el sistema Httm-TMAO, posteriormente Httm-prolina y finalmente el sistema Httm-betaína.

Sugerencias

De lo estudiado en la presente tesis, surgen algunas sugerencias para posteriores estudios.

Es de suma importancia en estudios bioinformáticos, trabajar con estructuras optimizadas. Esto evita que se extienda el tiempo de cálculo y memoria de disco.

Es importante elegir las secuencias y estructuras de las proteínas de una base de datos confiable. De la misma manera se debe tener en cuenta las referencias bibliográficas de las secuencias y estructuras.

Para obtener mejores resultados se debería de trabajar con la proteína completa, para establecer una terapia más efectiva.

Para comprender mejor como estos osmolitos interactúan con la proteína mutada sería necesario trabajar en un solvente explícito.

Sería interesante incorporar prolinas a la proteína mutada de manera proporcional al número que existe en una proteína nativa, para poder realizar otros estudios en cuanto a la estabilidad de la proteína.



Referencias

- [1] Teresa Vasquez Corona. Su dimensión y repercusión social . Gaceta Médica de México, 138(6):533–536, August 2001.
- [2] Carolyn L. Crankshaw and Eliezer Kopf. Neurodegenerative Diseases .
- [3] Fabio Gómez Salamanca. Avances en el estudio de las enfermedades neurodegenerativas. Gaceta Médica de México, 137(5), 2001.
- [4] Luis B. Tovar y Romo, Luz De Santa Cruz, and Ricardo Tapia. Experimental models for the study of neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. Molecular Neurodegeneration, 4:31, 2009.
- [5] Ying-Hui Fu, Derek P.A. Kuhl, Antonio Pizzuti, Maura Pieretti, James S. Sutcliffe, Stephen Richards, Annemieke J.M.H Verkert, Jeanette J.A. Holden, Raymond G. Fenwick, Stephen T. Warren, Ben A. Oostra, David L. Nelson, and Thomas C. Caskey. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: Resolution of the Sherman paradox. Cell, 67(6):1047–1058, December 1991.
- [6] V. Morell. The puzzle of the triple repeats. Science, 260:1422–1423, June 1993.
- [7] Christina L. Liquori, Kenneth Ricker, Melinda L. Moseley, Jennifer F. Jacobsen, Wolfram Kress, Susan L. Naylor, John W. Day, and Laura P. W. Ranum. Myotonic Dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. Science, 252:1711–1714, 2001.

- [8] Raji P. Grewal, Madhureeta Achari, Tohru Matsuura, Alberto Durazo, Emilio Tayag, Lan Zu, Stefan M. Pulst, and Tetsuo Ashizawa. Clinical Features and ATTCT Repeat Expansion in Spinocerebellar Ataxia Type 10. *Archives of Neurology*, 59(8):1285–1290, 2002.
- [9] Vladimir N. Potaman, John J. Bissler, Vera I. Hashem, Elena A. Ous-satcheva, Lu Lu, Luda S. Shlyakhtenko, Tohru Matsuura, Tetsuo Ashizawa, Michael Leffak, Craig J. Benham, and Richard R. Sinden. Unpaired Structures in SCA10(ATTCT) n -(AGAAT) n Repeats. *Journal of molecular Biology*, 326:1095–1111, 2003.
- [10] Patricia Cuenca Berger and Fernando Morales Montero. Mutaciones inestables: causa de algunas enfermedades neurológicas hereditarias. *Acta médica costarricense*, 41(2):7–15, June 1999.
- [11] S. E. Purdon, E. Mohr, V. Ilivitsky, and B. D. Jones. Huntington's disease: pathogenesis, diagnosis and treatment. *J Psychiatry Neurosci*, 19(5):359–367, November 1994.
- [12] Peter S. Harper. The epidemiology of Huntington's disease. *Human Genetics*, 89:365–376, December 1992.
- [13] Marcy E. MacDonald, Christine M. Ambrose, Mabel P. Duyao, Richard H. Myers, Carol Lin, Lakshmi Srinidhi, Glenn Barnes, Sherryl A. Taylor, Marianne James, Nicolet Groot, Heather MacFarlane, Barbara Jenkins, Mary Anne Anderson, Nancy S. Wexler, and James F. Gusella. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, 72(6):971–983, March 1993.
- [14] F. Persichetti, C. M. Ambrose, P. Ge, S. M. McNeil, J. Srinidhi, M. A. Anderson, B. Jenkins, G. T. Barnes, M. P. Duyao, and L. Kanaley. Normal and expanded Huntington's disease gene alleles produce distinguishable proteins due to translation across the CAG repeat. *Molecular Medicine*, 137(4):374–383, May 1995.

- [15] R. H. Myers, K. S. Marans, and M. E. MacDonald. Huntington's disease. California: Academic., 1999.
- [16] D. C. Rubinsztein, J. Leggo, R. Coles, E. Almqvist, V. Biancalana, J. J. Cassiman, K. Chotai, M. Connarty, D. Crauford, A. Curtis, D. Curtis, M. J. Davidson, A. M. Differ, C. Dode, A. Dodge, M. Frontali, N. G. Ranen, O.C. Stine, M. Sherr, M. H. Abbott, M.L. Franz, C. A. Graham, P. S. Harper, J. C. Hedreen, and M. R. Hayden. Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats. *Am J Hum Genet*, 59(1):16–22, July 1996.
- [17] McMurray. Huntington's disease: new hope for therapeutics. *Trends Neuro-science*, 24(11):S32–S38, November 2001.
- [18] H. W. Walling, J. J. Baldassare, and T. C. Westfall. Molecular aspects of Huntington's disease. *J Neurosci Res*, 54(3):301–8, November 1998.
- [19] M. F. Perutz, T. Johnson, M. Suzuki, and J. T. Finch. Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 91:5355–5358,, 1994.
- [20] P. Harjes and E. E. Wanker. The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. *Trends Biochem. Sci.*, 28:425–433, 2003.
- [21] H. Goehler, M. Lalowski, U. Stelzl, S. Waelter, M. Stroedicke, U. Worm, A. Droege, K. S. Lindenberg, M. Knoblich, C. Haenig, M. Herbst, J. Suopanki, E. Scherzinger, C. Abraham, B. Bauer, R. Hasenbank, A. Fritzsche, A. H. Ludewig, K. Büssow, S. H. Coleman, C. A. Gutekunst, B. G. Landwehrmeyer, H. Lehrach, and E. E. Wanker. A protein interaction network links GIT1, an enhancer of huntingtin aggregation, to Huntington's disease. *Mol Cell.*, 15(6):853–65, September 2004.

- [22] J.S. Steffan, N. Agrawal, J. Pallos, E. Rockabrand, L. C. Trotman, N. Slepko, K. Illes, T. Lukacsovich, Y. Z. Zhu, E. Cattaneo, P. P. Pandolfi, L. M. Thompson, and J. L. Marsh. SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. . *Science*, 304(5667):100–4, April 2004.
- [23] M. A. Andrade and P. Bork. HEAT repeats in the Huntington's disease protein. . *Nat Genet.*, 11(2):115–6, October 1995.
- [24] A. F. Neuwald and T. Hirano. HEAT repeats associated with condensins, co-hesins, and other complexes involved in chromosome-related functions. . *Genome Res.*, 10(10):1445–52, October 2000.
- [25] Jianrun Xia, Denise H. Lee, Jillian Taylor, Mark Vandelft, and Ray Truant. Huntingtin contains a highly conserved nuclear export signal. . *Human Molecular Genetics*, 12(12):1393–1403, 2003.
- [26] Yvon Trottier, Yves Lutz, Giovanni Stevanin, Georges Imbert, Didier Devys, Géraldine Cancel, Frédéric Saudou, Chantal Weber, Gilles David, Laszlo Tora, Yves Agid, Alexis Brice, and Jean-Louis Mandel. Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias. . *Nature*, 378:403–406, November 1995.
- [27] M. DiFiglia, E. Sapp, K. Chase, C. Schwarz, A. Meloni, C. Young, E. Martin, J. P. Vonsattel, R. Carraway, and S. A. Reeves. Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. . *Neuron.*, 14(5):1075–81, May 1995.
- [28] C. A. Gutekunst, A. I. Levey, C. J. Heilman, W. L. Whaley, H. Yi, N. R. Nash, H. D. Rees, J. J. Madden, and V. Hersch. Identification and localization of huntingtin in brain and human lymphoblastoid cell lines with anti-fusion protein antibodies. . *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 92(19):8710–8714, September 1995.
- [29] K. B. Kegel, A. R. Meloni, Y. Yi, Y. J. Kim, E. Doyle, B. G. Cuiffo, E. Sapp, Y. Wang, Z. H. Qin, J. D. Chen, J. R. Nevins, N. Aronin, and M. DiFiglia.

- Huntingtin is present in the nucleus, interacts with the transcriptional corepressor C-terminal binding protein, and represses transcription. . *J Biol Chem.*, 277(9):7466–76, March 2002.
- [30] M. P. Duyao, A. B. Auerbach, A. Ryan, F. Persichetti, G. T. Barnes, S. M. Mc-Neil, P. Ge, V. Vonsattel, J. F. Gusella, and A. L. Joyner. Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. . *Science.*, 269(5222):407–10, July 1995.
- [31] J. Nasir, S. B. Floresco, J. R. O'Kusky, V. M. Diewert, J. M. Richman, J. Zeisler, A. Borowski, J. D. Marth, A. G. Phillips, and M. R. Hayden. Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. . *Cell*, 81(5):811–23, June 1995.
- [32] S. Zeitlin, J. P. Liu, D. L. Chapman, V. E. Papaioannou, and A. Efstratiadis. Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. . *Nat Genetic.*, 11(2):155–63, October 1995.
- [33] D. Rigamonti, J. H. Bauer, C. De-Fraja, L. Conti, S. Sipione, C. Sciorati, E. Clementi, A. Hackam, M. R. Hayden, Y. Li, J. K. Cooper, C. A. Ross, S. Govoni, Vincenz C., and E. Cattaneo. Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3. . *J Neurosci.*, 20(10):3705–13, May 2000.
- [34] A. S. Hackam, A. S. Yassa, R. Singaraja, M. Metzler, C. A. Gutekunst, L. Gan, S. Warby, C. L. Wellington, J. Vaillancourt, N. Chen, F. G. Gervais, L. Raymond, D. W. Nicholson, and M. R. Hayden. Huntingtin interacting protein 1 induces apoptosis via a novel caspase-dependent death effector domain. . *J Biol Chem.*, 275(52):41299–308, December 2000.
- [35] I. Dragatsis, M. S. Levine, and S. Zeitlin. Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. . *Nat Genet.*, 26(3):300–6, November 2000.

- [36] Y. Zhang, M. Li, M. Drozda, M. Chen, S. Ren, R. O. Mejia Sanchez, B. R. Leav-itt, E. Cattaneo, R. J. Ferrante, M. R. Hayden, and R. M. Friedlander. Depletion of wild-type huntingtin in mouse models of neurologic diseases. . *J Neurochem.*, 87(1):101–6, October 2003.
- [37] R. Smith, P. Brundin, and J. Y. Li. Synaptic dysfunction in Huntington’s disease: a new perspective. . *Cell Mol Life Sci.*, 62(17):1901–12, September 2005.
- [38] C. Landles and G. Bates. Huntingtin and the molecular pathogenesis of Hunt-ington disease. *EMBO Journal*, 5(10):958–963, October 2004.
- [39] M. R. Hayden and B. Fremer. The metabolic & molecular bases of inherited disease. McGraw-Hill Professional, 8 edition, 2000.
- [40] P. Kahlem, C. Terre, H Green, and P. Djian. Peptides contain- ing glutamine repeats as sub- strates for transglutaminase- catalyzed cross-linking: Rele- vance to diseases of the nerv- ous system. . *Proc Nat Acad Sci .*, 93:14580–14585, 1996.
- [41] J.R. Burke, J. Enghild, M.E. Martin, Y.S. Jou, R.M. Myers, A.D. Roses, J.M. Vance, and W.J. Strittmatter. Huntingtin and DRPLA proteins selectively inter-act with the enzyme GADPH. . *Nat Med*, 2:347–350, 1996.
- [42] S. Engelender, A.H. Sharp, V. Colomer, M.K. Tokito, A. Lanahan, P. Worley, E.L.F. Holzbauer, and C.A. Ross. Huntingtin associated protein 1 (HAP1) in-teracts with the p150 (Glued) subunit of dynactin. . *Hum Molec Genet*, 6:2205– 2212, 1997.
- [43] M.F. Perutz. Glutamine repeats and inherited neurode- generative diseases: Molecular aspects. . *Curr Opin Struct Biol*, 6:848–858, 1996.
- [44] G. Schilling, M. F. Peters, W. J. Herring, A. H. Sharp, Z. Kaminsky, E. J. Mason, F. A. Khan, M. Delanoy, J. K. Cooper, D. R. Borchelt, C. A. Ross, and V. L. Dawson. Truncated N-terminal fragments of huntingtin with expanded

- glutamine repeats form nuclear and cytoplasmic aggregates in cell culture. .
Hum Molec Genet, 7:783–790, 1998.
- [45] E. Scherzinger, R. Lurz, M. Turmaine, L. Mangiarini, Hollenbach B., R. Hasenbank, G. P. Bates, S. W. Davies, H. Lehrach, and E. E. Wanker. Huntingtin encoded polyglutamine expansions form amyloid like protein aggregates in vit-ro and in vivo. . Cell, 90:549–558, 1997.
- [46] N. Aronin, K. Chase, C. Young, E. Sapp, C. Schwarz, N. Hatta, R. Kornreich, B. Landwehrmeyer, E. Bird, and M. F. Beal. CAG expansion affects the ex-pression of mu- tant huntingtin in the Huntington´s disease brain. . Neuron., 15:1193–1201, 1995.
- [47] S. Kuemmerle, C. A. Gutekunst, A. M. Kleim, X. J. Li, S. H. Li, M. F. Beal, S. M. Hersch, and R. J. Ferrante. Huntingtin aggregates may not predict neu-ronal death in Huntington´s disease. . Ann Neurol, 46:842–849, 1999.
- [48] N. Aronin, M. Kim, G. Laforet, and M. Di Figlia. Are there multiple pathways in the pathogenesis of Huntington´s disease? . Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 354:995–1003, 1999.
- [49] P. Kahlem, H. Green, and P. Djian. Transglutaminase action imitates Hunt-ington´s disease: Selective polymerization of huntingtin containing expanded polyglutamine. . Mol Cell., 1:595–601, 1998.
- [50] M. Lesort, W. Chun, G. V. Johnson, and R. J. Ferrante. Tissue transglutaminase is increased in Huntington´s disease brain. J. Neurochem, 73:2018–2027, 1999.
- [51] M. A. Kalchman, H. B. Koide, K. Mccutcheon, R. K. Graham, K. Nichol, K. Nishiyama, P. Kazemi-Esfarjani, F. C. Lynn, C. Wellington, M. Metzler, Y. P. Goldber, I. Kanazawa, R. D. Gietz, and M. R. Hayden. HIP1, a human homo-logue of *S. cerevisiae* S1a2p, interacts with membrane-associated huntingtin in the brain. . Nat Genetic., 16:44–53, 1997.

- [52] E. E. Wanker, C. Rovira, E. Scherzinger, R. Hasen-Bank, S. Walter, D. Tait, J. Colicelli, and H. Lehrach. HIP1: A huntingtin interacting protein isolated by the yeast two-hybrid system. . *Hum Mol Genet*, 6:487–495, 1997.
- [53] J. Bao, A. H. Sharp, M. V. Wagster, M. Becher, G. Schilling, C. A. Ross, V. L. Dawson, and T. M. Dawson. Expansion of polyglutamine repeat in huntingtin leads to abnormal protein interactions involving calmodulin. . *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:5037–5042, 1996.
- [54] Tukamoto, N. Nukina, K. Ide, and I. Kanazawa. Huntington's disease gene product, huntingtin, associates with microtubules in vitro. . *Brain Res. Mol.*, 51:8–14, 1997.
- [55] J. M. Boutell, J. D. Wood, P. S. Harper, and A. L. Jones. Huntingtin interacts with cystathionine B-synthase. . *Hum Molec Genet*, 7:371–378, 1998.
- [56] M. A. Kalchman, R. K. Graham, G. Xia, H. B. Koide, J. G. Hodgson, K. C. Gra-ham, Y. G. Goldbere, R. D. Gietz, C. M. Pickart, and M. R. Hayden. Huntingtin is ubiquitinated and interacts with a specific ubiquitin conjugating enzyme. *J Biol Chem.*, 271:19385–19394, 1996.
- [57] S. Jentsch and S. Schlenker. Selective protein degradation: a journey's end with-in the proteasome. . *Cell*, 82:881–884, 1995.
- [58] S. W. Davies, M. Turmaine, B. A. Cozens, M. Difulgia, A. H. Sharp, C.A. Ross, E. Scherzinger, E. E. Wanker, L. Mangiarini, and G. P. Bates. Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. . *Cell*, 90:537–548, 1997.
- [59] M. Difulgia, E. Sapp, K. O. Chase, S. W. Davies, G. P. Bates, J. P. Vonsattel, and N. Aronin. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. . *Science*, 277:1990–1993, 1997.

- [60] M. E. Goldberg, R. Rudolph, and R. Jaencke. A Kinetic Study of the Competition Between Renaturation and Aggregation During the Refolding of Denatured-Reduced Egg White Lysozyme. *Biochemistry*, 30:2790–2797, 1991.
- [61] T. Sivaraman, T. K. S. Kumar, C. C. Huang, and C. Yu. The Role of Acetic Acid in the prevention of Salt-induced Aggregation of Snake Venom Cardiotoxin. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 44:29–39, 1998.
- [62] Y. Hirakura, R. Azimov, R. Azimova, and B. Kagan. Polyglutamine induced ion channels: a possible mechanism for the neurotoxicity of Huntington and other CAG repeat diseases. *Journal of Neuroscience Research*, 60:490–494, 2000.
- [63] Y. Hirakura, R. Azimov, R. Azimova, and B. Kagan. The channel hypothesis of Huntington's disease. . *Brain Research Bulletin*, 56:281–284, 2001.
- [64] L. Masino and A. Pastore. A structural approach to trinucleotide expansion diseases. *Brain Research Bulletin*, 56(3-4):183–189, October 2001.
- [65] H. Green and P. Djian. Amino acid repeats in proteins and the neurological diseases produced by polyglutamine. En: Wells R. y Warren S. (Eds). *Genetic instabilities and hereditary neurological disease*. . Academic Press U.S.A, pages 739–760, 1998.
- [66] S. Li and X. Li. Aggregation of N-terminal huntingtin is dependent on the length of its glutamine repeats. . *Human Molecular Genetics*, 7(5):777–782, 1998.
- [67] J. Cooper, G. Schilling, M. Peters, W. Herring, A. Sharp, Z. Kaminsky, J. Ma-sone, F. Khan, M. Delanoy, D. Borchelt, V. Dawson, T. Dawson, and C. Ross. Truncated N- terminal fragments of huntingtin with expanded glutamine repeats form nuclear and cytoplasmic aggregates in cell culture. . *Human Molecular Genetics*, 7(5):783–790, 1998.
- [68] M. Goedert, M. Spillantini, and S. Davies. Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases. . *Curr Opin Neurobiol*, 8(5):619–632, 1998.

- [69] K. Fischbeck. Polyglutamine expansion neurodegenerative disease. . Brain Research Bulletin. 56: 3/4. ., 56(3-4):161–163, 2001.
- [70] T. Klockgether and B. Evert. Genes involved in hereditary ataxias. . Trends Neuroscience, 216:413–418, 1998.
- [71] C. Wójcik. Ubiquitin more than just a signal for protein degradation. . Trends in Cell Biology, 11(10):397–399, 2001.
- [72] K. Moulder, O. Onodera, J. Burke, W. Strittmatter, and E. Johnson. Generación de neuronal intranuclear inclusions by polyglutamine-GFP: analysis of inclusion clearance y toxicity as a function of polyglutamine length. . J. Neurosci., 15(2):705–715, 1999.
- [73] I. Sanchez, C-J. Xu, P. Juo, A. Kakizaka, J. Blenis, and J. Yuan. Caspase-8 is required for cell death by expanded polyglutamine repeats. . Neuron., 22:623–633, 1999.
- [74] Encinosa and Guianeya. Corea de Huntington. Revista Cubana de Genética Humana, 3(11), 2001.
- [75] Adel Afifi and Ronald Bergman. Neuroanatomía Funcional. McGrawHill, 2 edition, 2006.
- [76] Gerald Tortora and Derrickson Bryan. Principios de Anatomía y Fisiología. Editorial Médica Panamericana, 11 edition, 2006.
- [77] Paul Young. Neuroanatomía Clínica Funcional. Masson, 1 edition, 2001.
- [78] Marlén Gadea, Raúl Espert, and Javier Chirivella. Detección Presintomática del déficit neuropsicológico en la Corea de Huntington: controversias. . Psicología Conductual, 4(3):363–375, 1996.
- [79] A. Royuela Rico, J. A. Macías Fernández, and J. A. Gil-Verona. A case of obsessive symptoms in Huntington’s disease. Actas Españolas de Psiquiatría, 31(6):367–370, 2003.

- [80] Ramiro Coello, Angel García, and Maria Isabel Núñez. Un Caso de Demencia Subcortical Funcional. *Revista Médica*, 48, 1980.
- [81] R. Bonelli, G. Wenníng, and H. Kapfhammer. Huntington's disease: present treatments and future therapeutic modalities. *Int ClinPsychopharmacol*, 19(2):51–62, 2004.
- [82] D. Paleacu, N. Giladi, O. Moore, A. Stern, S. Honigman, and S. Badany. Tetra-benazine treatment in movement disorders . *Clin Neuropharmacol*, 27(5):230– 233, 2004.
- [83] E. Moro, A. Lang, A. Strafella, Y. Poon, P. Arango, and A. Dagher. Bilateral globus pallidus stimulation for Huntington's disease. *Ann Neurol*, 56(2):290– 294, 2004.
- [84] P. Harper. *Huntington's Disease*. Londres: Saunders, 2 edition, 1991.
- [85] A. Negrette. Corea de Huntington (Estudio de una sola familia investigada a través de varias generaciones). Technical report, Universidad de Zulia, 1963.
- [86] A. Young, I. Shoulson, and J. Penney. Huntington's disease in Venezuela: neu-rogenic features and functional decline. *Neurology*, 36:244–249, 1986.
- [87] J. M. Cuba. A focus of Huntington's chorea in Perú. *Revista Neurologica (Paris)*, 142:151–153, 1986.
- [88] F. J. Revilla. Enfermedad de Huntington: Estudio Epidemiológico en un grupo familiar. Tesis de Bachiller en Medicina. Master's thesis, UPCH, 1993.
- [89] D. W Bolen and Ilia V Baskakov. The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *Journal of Molecular Biology*, 310(5):955–963, July 2001.
- [90] M. B. Burg. Molecular basis of osmotic regulation. *Am Journal Physiol Renal Physiol*, 268(6):F983–F996, June 1995.

- [91] P. H. Yancey. Compatible and counteracting solutes. . Boca Raton, 1994.
- [92] P. H. Yancey, M. E. Clark, S. C. Hand, R. D. Bowlus, and G. N. Somero. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, 217:1214–1222, 1982.
- [93] Cecilia C. Mello and Doug Barrick. An experimentally determined protein folding energy landscape. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(39):14102–14107, September 2004.
- [94] CR Brown, LQ Hong-Brown, J. Biwersi, AS Verkman, and Welch WJ. Chaperonas químicas corregir el fenotipo mutante de la F508 transmembrana de fibrosis quística regulador de la conductancia proteína . *Chaper estrés celular*, 1(117–125), 1996.
- [95] J. Tatzelt, S. B. Prusiner, and W. J. Welch. Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein. *EMBO Journal*, 15(23):6363–6373, December 1996.
- [96] P. C. Maloney and S. V. Ambudkar. Functional reconstitution of prokaryote and eukaryote membrane proteins. . *Arch. Biochem. Biophys.*, 269(1):1–10, 1989.
- [97] D. Jeruzalmi and T. A. Steitz. Use of organic osmolytic solutes to crystallize flexible proteins: Application to T7 RNA polymerase and its complex with the inhibitor T7 lysozyme. *J. Mol. Biol.*, 274(5):748–756, 1997.
- [98] M. F. Roberts. Osmoadaptation and osmoregulation in archaea. *Front Biosci*, 5:796–812, 2000.
- [99] R. D. Sleator and C. Hill. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol Rev*, 260:49–71, 2001.
- [100] D. R. Wilken, M. L. McMacken, and A. Rodriguez. Choline and betaine aldehyde oxidation by rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 216:305–3177, 1970.

- [101] J. Zhang, J. K. Blusztajn, and S. H. Zeisel. Measurement of the formation of betaine aldehyde and betaine in rat liver mitochondria by high pressure liquid chromatography-radioenzymatic assay. *Biochim Biophys Acta*, 1117:333–339, 1992.
- [102] T. Wallimann, M. Wyss, D. Brdiczka, K. Nicolay, and H. M. Eppenberger. Intra-cellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the ‘phosphocreatine circuit’ for cellular energy homeostasis. *Biochem J*, 281(1):21–40, 1992.
- [103] M. Wyss and R. Kaddurah-Daouk. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev*, 80:1107–1213, 2000.
- [104] J. T. Brosnan and M. E. Brosnan. Creatine: endogenous metabolite, dietary, and therapeutic supplement. *Annu Rev Nutr*, 27:241–261, 2007.
- [105] R. H. Andres, A. D. Ducray, U. Schlattner, T. Wallimann, and H. R. Widmer. Functions and effects of creatine in the central nervous system. *Brain Res Bull*, 76:329–343, 2008.
- [106] J. H. Bothwell, P. Styles, and K. K. Bhakoo. Swelling-activated taurine and creatine effluxes from rat cortical astrocytes are pharmacologically distinct. *J Membr Biol*, 185:157–164, 2002.
- [107] L. S. Almeida, G. S. Salomons, F. Hogenboom, C. Jakobs, and A. N. Schoffeleers. Exocytotic release of creatine in rat brain. *Synapse*, 60:118–123, 2006.
- [108] J. M. Lawler, W. S. Barnes, G. Wu, W. Song, and S. Demaree. Direct antioxidant properties of creatine. *Biochem Biophys Res Commun*, 290:47–52, 2002.
- [109] V. Srinivas and D. Balasubramanian. Proline is a protein compatible hydrotrope. *Langmuir*, 11:2830–2833, 1995.

- [110] R. J. Huxtable. Physiological actions of taurine. . *Physiol Rev*, 72(1):101–163, 1992.
- [111] R. J. Huxtable. Physiological actions of taurine. . *Physiol. Rev.*, 72:101–163, 1992.
- [112] R. P. Forster and L. Goldstein. Intracellular osmoregulatory role of amino acids and urea in marine elasmobranchs. *Am. J. Physiol.*, 230(4):925–931, April 1976.
- [113] G. S. Ratnaparkhi and R. Varadarajan. Ratnaparkhi, G. S., and Varadarajan, R. . *J. Biol. Chem.*, 276:28789 –28798, 2001.
- [114] T. Y. Lin and S. N. Timasheff. Why do some organisms use a urea-methylamine mixture as osmolyte? Thermodynamic compensation of urea and trimethylamine N-oxide interactions with protein. *Biochemistry*, 33(42):12695–12701, October 1994.
- [115] P. H. Yancey and G. N. Somero. Counteraction of urea destabilization of protein structure by methylamine osmoregulatory compounds of elasmobranch fishes. *Biochem. J.*, 183:317–323, 1979.
- [116] I. Baskakov and D. W. Bolen. Forcing thermodynamically unfolded proteins to fold. *J. Biol. Chem.*, 273(9):4831– 4834, February 1998.
- [117] I. Baskakov and D. W. Bolen. Time-dependent effects of trimethylamine-N-oxide/urea on lactate dehydrogenase activity: an unexplored dimension of the adaptation paradigm. *Biophys. J.*, 74(5):2658 –2665, May 1998.
- [118] Y. Qu, C. L. Bolen, and D. W. Bolen. Osmolyte-driven contraction of a random coil protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95(16):9268 –9273, August 1998.
- [119] R. Kumar, J. C. Lee, D. W. Bolen, and E. B. Thompson. The conformation of the glucocorticoid receptor af1/tau1 domain induced by osmolyte binds co-regulatory proteins. *J. Biol. Chem.*, 276(21):18146 –18152, May 2001.

- [120] A. C. Natalia, E. H. Stephen, and J. W. Donald. Ultracentrifugal studies of the effect of molecular crowding by trimethylamine N-oxide on the self-association of muscle glycogen phosphorylase b. *Eur. J. Biochem.*, 268:506-513, February 2001.
- [121] G. L. Devlin, H. Parfrey, J. T. Deborah, A. L. David, and S. P. Bottomley. Prevention of polymerization of M and Z alpha1-Antitrypsin (alpha1-AT) with trimethylamine N-oxide. Implications for the treatment of alpha1-at deficiency. *Am. J. Respir. CellMol. Biol*, 24(6):727-732, June 2001.
- [122] C. R. Brown, L. Q. Hongbrown, J. Biwersi, A. S. Verkman, and W. J. Welch. Chemical chaperones correct the mutant phenotype of the delta F508 cystic fi-brosis transmembrane conductance regulator protein. *Cell Stress Chaperones*, 1(2):117-125, June 1996.
- [123] J. Tatzelt, S. B. Prusiner, and W. J. Welch. Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein. *EMBO Journal*, 15:6363-6373, 1996.
- [124] William J. Kaufmann and Larry L. Smarr. *Supercomputing and the Transformation of Science*. Scientific American Library, 1993.
- [125] J. Hermans, H. J. Berendsen, W. F. Van Gunsteren, and J. P. Postma. A Consistent Empirical Potential for Water-Protein Interactions. *Biopolymers*, 23:1513-1518, 1984.
- [126] E. J. Beck, K. D. Drysdale, L. K. Thompson, L. Li, C. A. Murphy, and M. A. S. Aquino. Weak intermolecular antiferromagnetic exchange in $[\text{Ru}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4(\text{L})]_n$ polymers (L = 4,4'-dipyridine and 1,4-diazabicyclooctane, X = PF_6^- or BPh_4^-). *Inorganica Chimica Acta*, 279(1):121, September 1998.
- [127] D. Yoshioka, M. Mikuriya, and M. Handa. Synthesis and Characterization of Polynuclear Chain and Tetranuclear Adducts of Mixed-Valent Ruthenium

- (II,III) Pivalate with N,N-Didentate Ligands. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 77:2205, 2004.
- [128] C. B. Anfinsen. The formation and stabilization of protein structure. . *Biochem J.*, 128(4):737–749, July 1972.
- [129] P. Y. Chou and G. D. Fasman. Prediction of protein conformation. *Biochemistry*, 13(2):222–245, January 1974.
- [130] P. Y. Chou and G. D. Fasman. Conformational parameters for amino acids in helical, beta-sheet, and random coil regions calculated from proteins. *Biochemistry*, 13(2):211–222, January 1974.
- [131] J. Garnier, D. J. Osguthorpe, and B. Robson. Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.*, 120(1):97–120, March 1978.
- [132] Mao Chen and Wen Qi Huang. A branch and bound algorithm for the protein folding problem in the hp lattice model. . *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 3(4):225–230, November 2005.
- [133] Gualberto Asencio Cortés. Minería de datos aplicada a la predicción de estructuras de proteínas mediante vecinos más cercanos . Master's thesis, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Informática, 2009.
- [134] B. Rost and C. Sander. Prediction of protein secondary structure at better than 70 % accuracy. *J. Mol. Biol.*, 232:584–599, 1993.
- [135] B. Rost and C. Sander. Combining evolutionary information and neural networks to predict protein secondary structure. *Proteins*, 19:55–72, 1994.
- [136] B. Rost. Protein secondary structure prediction continues to rise. . *J. Struct. Biol.*, 134:204–218, 2001.

- [137] T. K. Attwood and Parry-Smith. D. J. Introducción a la Bioinformática. . Pear-son Education, 2002.
- [138] N. L. Allinger. Conformational Analysis. 130. MM2. A Hydrocarbon Force Field Utilizing V1 and V2 Torsional Terms. J. Am. Chem. Soc., 99:8127, 1977.
- [139] Ronald M.A. Knegtel and Peter D.J. Grootenhuis. Binding affinities and non-bonded interaction energies. . Perspectives in Drug Discovery and Design, 90:99–114, January 1998.
- [140] J. E. Lennard-Jones. On the forces between atoms and ions. . Proc. Roy. Soc. London Ser. A - Math. and Phys. Sc., 109:584–597, 1925.
- [141] N. L. Allinger, Y. H. Yuh, and J. H. Lii. Molecular Mechanics. The MM3 Force Field for Hydrocarbons. J. Am. Chem. Soc., 111:8551, 1989.
- [142] S. J. Weiner, P. A. Kollman, and D. A. Case. An All-Atom Force Field for Simulations of Proteins and Nucleic Acids. J. Comput. Chem., 7:230, 1986.
- [143] B. R. Brooks, R. E. Bruccoleri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan, and M. Karplus. CHARMM: a Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. M.J. Comput. Chem., 1234, 1983.
- [144] W. L. Jorgensen and J. Tirado-Rives. The OPLS Potential Functions for Pep-tides. Energy Minimizations for Crystals of Cyclic Peptides and Crambin. J. Am. Chem. Soc., 110:1657, 1988.
- [145] D. A. Case, T. A. Darden, T. E. Cheatham III, C. L. Simmerling, J. Wang, R. E. Duke, R. Luo, M. Crowley, R. C. Walker, W. Zhang, K. M. Merz, B. Wang, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, I. Kolossvary, K. F. Wong, F. Paesani, J. Van-icek, X. Wu, S. R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, L. Yang, C. Tan, J. Mon-gan, V. Hornak, G. Cui, D. H. Mathews, M. G. Seetin, C. Sagui, V. Babin, and P. A. Kollman. AMBER 10, 2008.
- [146] J. Meller. Molecular dynamics. Encyclopedia of life sciences, 2001.

- [147] A. R. Leach. Molecular modelling: principles and applications. Prentice Hall, 2 edition, 2001.
- [148] Y. M. Rhee, E. J. Sorin, G. Jayachandran, E. Lindahl, and V. S. Pande. Simulations of the role of water in the protein-folding mechanism. . Proc Natl Acad Sci U S A., 101(17):6456–61, 2004.
- [149] David. W. Ritchie. Evaluation of Protein Docking Predictions using Hex 3.1 in CAPRI rounds 1-2. PROTEINS: Structure, Function and Genetics, 52:98–106, 2003.
- [150] D. W. Ritchie and G. J. L. Kemp. Protein Docking Using Spherical Polar Fourier Correlations . PROTEINS: Structure, Function and Genetics, 39:178–194, 2000.
- [151] G. N. Ramachandran, C. Ramakrishnan, and V. Sasisekharan. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. J. Mol. Biol., 7:95–9, July 1963.

APÉNDICES



Apéndice A

Archivos utilizados



```

title          = Minimizacion
cpp            = /lib/cpp
include        = -I../top
define         =
integrator     = steep
nsteps        = 200000
nstcomm       = 1
emtol         = 1.0
emstep        = 0.1
nstcgsteep    = 1000
nstxout       = 10
nstvout       = 10
nstfout       = 0
nstlog        = 100
nstenergy     = 1
nstxtcout     = 1
xtc_precision = 1000
xtc_grps      =
energygrps    =
nstlist       = 5
ns_type       = grid
pbc           = xyz
optimize_fft  = yes
fourierspacing = 0.3
DispCorr      = Ener
constraints    = none
implicit_solvent=GBSA
coulombtype   = Cut-off
rlist         = 1.0
rcoulomb      = 1.0
rgbradii      = 1.0
vdwtype       = Cut-off
rvdw          = 1.0
gb_algorithm  = HCT
nstgbradii    = 1

gb_epsilon_solvent = 80
gb_dielectric_offset = 0.09
sa_surface_tension = 2.05016
    
```



Figura A.1: Archivo para la minimización, con integrador steep

```
title           = Minimizacion
cpp             = /lib/cpp
include        = -I../top
define         =
integrator     = l-bfgs
nsteps        = 200000
nstcomm       = 1
emtol         = 1.0
emstep        = 0.1
nstcgsteep    = 1000
nstxout       = 10
nstvout       = 10
nstfout       = 0
nstlog        = 100
nstenergy     = 1
nstxtcout     = 1
xtc_precision = 1000
xtc_grps      =
energygrps    =
nstlist       = 5
ns_type       = grid
pbc           = xyz
optimize_fft  = yes
fourierspacing = 0.3
DispCorr      = Ener
constraints    = none
implicit_solvent=GBSA
coulombtype   = Cut-off
rlist         = 1.0
rcoulomb      = 1.0
rgbradii     = 1.0
vdwtype       = Cut-off
rvdw         = 1.0
gb_algorithm  = HCT
nstgbradii   = 1
gb_epsilon_solvent = 80
gb_dielectric_offset = 0.09
sa_surface_tension = 2.05016
```



Figura A.2: Archivo para la minimización, con integrador l-bfgs

```
title           = Dinamica Molecular NVT
cpp             = /lib/cpp
include        = -I../top
integrator      = md
dt             = 0.001
nsteps         = 10000000
nstxout        = 1000
nstvout        = 1000
nstlog         = 1000
nstenergy      = 200
nstxtcout      = 1000
xtc_grps       =
energygrps     =
nstlist        = 10
ns_type        = grid
fourierspacing = 0.30
pme_order      = 4
ewald_rtol     = 1e-5
pbc            = xyz
tcoupl         = nose-hoover
tc-grps        = protein
tau_t          = 0.5
ref_t          = 309.65
gen_vel        = yes
gen_seed       = 173529
constraints    = none
;
implicit_solvent=GBSA
coulombtype    = Cut-off
rlist          = 1.0
rcoulomb       = 1.0
rgbradii       = 1.0
vdwtype        = Cut-off
rvdw           = 1.0
gb_algorithm   = HCT
nstgbradii     = 1
gb_epsilon_solvent = 78
gb_dielectric_offset = 0.09
sa_surface_tension = 2.05016
```



Figura A.3: Archivo de dinámica molecular, para todos los sistemas

```
title           = Dinamica Molecular NVT
cpp             = /lib/cpp
include        = -I../top
integrator     = md
dt             = 0.001
nsteps        = 30000000
nstxout       = 1000
nstvout       = 1000
nstlog        = 1000
nstenergy     = 200
nstxtcout    = 1000
xtc_grps      =
energygrps    =
nstlist       = 10
ns_type       = grid
fourierspacing = 0.30
pme_order     = 4
ewald_rtol    = 1e-5
pbc           = xyz
tcoupl        = nose-hoover
tc-grps       = protein other
tau_t         = 0.5 0.5
ref_t         = 309.65 309.65
gen_vel       = yes
gen_seed      = 173529
constraints    = none
;
implicit_solvent=GBSA
coulombtype   = Cut-off
rlist         = 1.0
rcoulomb      = 1.0
rgbradii     = 1.0
vdwtype       = Cut-off
rvdw          = 1.0
gb_algorithm  = HCT
nstgbradii   = 1
gb_epsilon_solvent = 78
gb_dielectric_offset = 0.09
sa_surface_tension = 2.05016
```



Figura A.4: Archivo de dinámica molecular para la interacción proteína-osmolito

```

[ BET ]
[ atoms ]
  C1  CT      -0.193651  1
  N1  N3       0.064484  2
  C2  CT      -0.189354  3
  C3  CT      -0.246640  4
  C4  CT      -0.189294  5
  HA1 HP       0.098526  6
  HA2 HP       0.198765  7
  HA3 HP       0.114089  8
  HB1 HP       0.112095  9
  HB2 HP       0.122734 10
  HB3 HP       0.122720 11
  HC1 HP       0.098558 12
  HC2 HP       0.114033 13
  HC3 HP       0.198708 14
  HD1 HP       0.116896 15
  HD2 HP       0.116894 16
  C5  C        0.353777 17
  O1  O2      -0.464848 18
  O2  O2      -0.548490 19
[ bonds ]
  C1  N1
  C1  HB1
  C1  HB2
  C1  HB3
  N1  C2
  N1  C3
  N1  C4
  C2  HA1
  C2  HA2
  C2  HA3
  C3  C5
  C3  HD1
  C3  HD2
  C4  HC1
  C4  HC2
  C4  HC3
  C5  O1
  C5  O2
[ impropers ]

```

Figura A.5: Datos para el osmolito Betaína

```

[ CRE ]
[ atoms ]
C1 CT 0.157024 1
N1 N* -0.439388 2
C2 C 0.295246 3
C3 CT -0.120973 4
N2 N3 -0.243104 5
O1 O -0.337135 6
C4 CT -0.120348 7
N3 N3 -0.362707 8
HA1 H1 0.106620 9
HA2 H1 0.133401 10
HB1 H 0.155925 11
HB2 H 0.164477 12
HC1 H 0.241093 13
HD1 H1 0.108065 14
HD2 H1 0.088293 15
HD3 H1 0.050312 16
HE1 H3 0.123198 17
[ bonds ]
C1 N1
C1 N2
C1 N3
C1 HE1
N1 C2
N1 HC1
C2 O1
C2 C3
C3 N2
C3 HA1
C3 HA2
N3 HB1
N3 HB2
C4 N2
C4 HD1
C4 HD2
C4 HD3
[ impropers ]
N1 C3 C2 O1
    
```



Figura A.6: Datos para el osmolito Creatina

```
[ HPRO ]
[ atoms ]
  C1  CT      -0.085547   1
  N1  N3      -0.278339   2
  C2  CT      -0.020426   3
  C3  CT      -0.174473   4
  C4  CT      -0.177997   5
  C5  C        0.318548   6
  O1  OH      -0.313864   7
  O2  O       -0.359548   8
  HA1 H1       0.107898   9
  HB1 HC       0.121675  10
  HB2 HC       0.091356  11
  HC1 HC       0.099921  12
  HC2 HC       0.084033  13
  HD1 H1       0.103932  14
  HD2 H1       0.077669  15
  HE1 H        0.164150  16
  HF1 HO       0.241011  17
[ bonds ]
  C1  N1
  C1  C4
  C1  HD1
  C1  HD2
  N1  C2
  N1  HE1
  C2  C3
  C2  C5
  C2  HA1
  C3  C4
  C3  HB1
  C3  HB2
  C4  HC1
  C4  HC2
  C5  O1
  C5  O2
  O1  HF1
[ impropers ]
```



Figura A.7: Datos para el osmolito Prolina

```
[ TAU ]
[ atoms ]
  S      S      2.841210   1
  C1     CT     -0.908789   2
  O1     O      -0.925716   3
  O2     OH     -0.771103   4
  O3     O      -0.964301   5
  HA1    H      0.282742   6
  HB1    H1     0.164798   7
  HB2    H1     0.194189   8
  C2     CT     -0.035343   9
  N      N2     -0.347420  10
  HC1    H1     0.117448  11
  HC2    H1     0.043735  12
  HD1    H      0.160172  13
  HD2    H      0.148378  14
[ bonds ]
  S      O1
  S      O2
  S      O3
  S      C1
  C1     C2
  C1     HB1
  C1     HB2
  C2     HC1
  C2     HC2
  C2     N
  N      HD1
  N      HD2
  O2     HA1
[ impropers ]
```

Figura A.8: Datos para el osmolito Taurina

```
[ TMA ] [ atoms ]

N1  N*      0.329893   1
O1  O2     -0.646400   2
C1  CT     -0.204797   3
C2  CT     -0.204819   4
C3  CT     -0.204819   5
HA1 HP      0.079700   6
HA2 HP      0.115296   7
HA3 HP      0.115284   8
HB1 HP      0.079746   9
HB2 HP      0.115318  10
HB3 HP      0.115318  11
HC1 HP      0.079700  12
HC2 HP      0.115284  13
HC3 HP      0.115296  14

[ bonds ]
N1  O1
N1  C1
N1  C2
N1  C3
C1  HB1
C1  HB2
C1  HB3
C2  HC1
C2  HC2
C2  HC3
C3  HA1
C3  HA2
C3  HA3

[ impropers ]
```

Figura A.9: Datos para el osmolito TMAO

[bondtypes]

O2 N*	1	0.13830	354803.2 ; Haru (TMAO)
SO	1	0.12290	476976.0 ; haru (S=O) taurina
OH S	1	0.16100	192464.0 ; haru (S-O) taurina
H OH	1	0.09572	462750.4 ; haru (O-H) taurina

[angletypes]

N* CT N3	1	106.200	585.760 ; Haru
N* CT H3	1	109.500	418.400 ; Haru
N3 CT N3	1	115.400	585.760 ; Haru
N3 CT H3	1	109.500	418.400 ; Haru
CT N* H	1	121.200	585.760 ; Haru
N* C CT	1	110.000	669.440 ; Haru
N3 CT H1	1	109.500	418.400 ; Haru
CT S O	1	103.700	569.024 ; Haru (taurina)
CT S OH	1	98.900	518.816 ; Haru (taurina)
OS OH	1	108.230	376.560 ; Haru (taurina)
OS O	1	126.000	669.440 ; Haru (taurina)
S OH H	1	113.000	418.400 ; Haru (taurina)
O2 N* CT	1	117.600	585.760 ; Haru (TMAO)
CT N* CT	1	109.500	334.720 ; Haru (TMAO)
HP CT N*	1	109.500	418.400 ; Haru (TMAO)

[dihedraltypes] 1

O S OH H	4	180.00	4.60240	2	; Haru (taurina)
----------	---	--------	---------	---	------------------

[dihedraltypes] 2

O S OHH	9	180.0	8.36800	1	; Haru (taurina)
CT S OHH	9	0.0	14.64400	2	; Haru (taurina)

Figura A.10: Datos de distancias, ángulos y diedros que forman los átomos