Exploración «*In Silico*» del Proceso Inhibitorio de la β-Secretasa por Hidroxietilaminas: Una Aproximación Geométrica y Energética en el Tiempo

Carlos Alberto Gueto Tettay

Juan Carlos Drosos Ramírez, PhD
Grupo de Química Bioorgánica
Director

Tesis Doctoral

Universidad de Cartagena
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Doctorado en Ciencias
Cartagena de Indias, Bolívar, Colombia
2017

Copyright © 2017 por Carlos Alberto Gueto-Tettay & Grupo de Química Bioorgánica. Carlos Alberto Gueto-Tettay. Todos los derechos reservados.

Agradecimientos

Podría gastar mi vida y un manuscrito más extenso que el presente agradeciendo a todas aquellas personas que considero apoyaron mi proceso de crecimiento académico. Incluso de crecimiento personal.

Inicialmente reconozco a Dios como una fuerza superior, aquel que plantea preguntas interesantes. Esas que lleva toda la vida resolver.

De manera general agradezco a mi familia, el motor sobre el que gira mi vida, por su apoyo incondicional.

A mis amig@s por ser tolerantes conmigo y buscar espacios de esparcimiento.

A mi tutor y amigos del Grupo de Química Bioorgánica por los momentos vividos, académicos y sociales.

A todas las personas que se cruzaron en mi vida en estos cuatro años, compartieron sonrisas y un buen café en cualquier lugar del mundo.

A los que creyeron en que algún lograría tener mi título de doctorado.

A ti querido lector, por tomarte el tiempo de valorar este trabajo científico.

¡Gracias totales!

Resumen

BACE1 es un enzima de interés científico por su participación en la progresión en la enfermedad de Alzheimer. Esta aspartil proteasa presenta dos conformaciones distinguidas por la orientación del flap, el cual es una horquilla antiparalela que cubre su sitio activo y que modula su actividad enzimática. Cuando la proteína está en su forma apo o inactiva, el flap presenta una apertura y permite la entrada de especies al bolsillo catalítico de BACE1. La eventual formación de interacciones con el sustrato o inhibidor con el flap induce el cierre del mismo, conllevando a la forma cerrada o inhibida de la enzima. Adicionalmente, el estado de protonación de la diada aspártica, Asp93 y Asp289, depende de la naturaleza química del sustrato o inhibidor entrante. Por otro lado, las hidroxietilaminas (HEA) son una familia de compuestos que han demostrado exhibir actividad inhibitoria sobre BACE1 a nivel nanomolar, buenas propiedades farmacocinéticas y biodisponibilidad oral. Sin embargo, los detalles moleculares respecto a como ocurre la inhibición de BACE1 por parte de estos inhibidores no había sido reportado.

Para abordar este problema, en el presente trabajo doctoral se hizo la exploración «*In Silico*» del mecanismo inhibitorio de las HEAs sobre BACE1. Para ello, se emplearon nuevas perspectivas metodológicas, derivadas de las simulaciones de Dinámica Molecular, que permitieron resolver de fondo el asunto de los estados de protonación en la diada aspártica, el cual es determinante para cualquier simulación de este sistema. De igual manera, permitieron brindar una mirada geométrica y energética al sistema BACE1-HEA para explicar las diferencias en actividad biológica reportada de los ligandos. Los resultados, producto del análisis comparativo de una serie de parámetros cuidadosamente seleccionados (distancias, ángulos y

diedros) medidos sobre el sistema y usando una estructura cristalina BACE1-HEA de referencia, revelan que la inhibición está asociada a una reacción de transferencia protónica acompañada por cambios conformacionales en la enzima. Inicialmente, las HEAs entran al sitio activo de BACE1, quien está en su forma apo. Aquí, el sistema tiene la configuración de protonación LnAsp289, es decir, el ligando y la cadena lateral del residuo catalítico Asp289 se comportan como una amina y ácido carboxílico neutro, respectivamente. El proceso de inhibición finaliza con el cierre del flap y posterior transferencia protónica, de Asp289 al nitrógeno amínico de la HEA. Esta nueva configuración es conocida como LpAspUP (ligando protonado y diada Asp di-desprotonada). Por otro lado, la evaluación de 6.272 millones de cálculos de las energías de interacción residuo-ligando (ReLIE) dinámicas, usando el semiempírico PM7, permitió una mirada detallada y cuantitativa a las interacciones en el sitio activo de BACE1. La información reveló que el sistema BACE1-HEA presenta puntos de anclaje los cuales contribuyen en aproximadamente el 45% de la interacción proteína-ligando total. Estos puntos de anclaje involucran a los residuos Asp93, Asp289, Thr292, Thr293, Asn294 y Arg296. Adicionalmente, la comparación de la primera etapa del proceso inhibitorio, empleando HEAs de diferente poder inhibitorio (alto, moderado y bajo), reveló que la actividad biológica está relacionada con la capacidad de ligando para formar y mantener en el tiempo las interacciones con el bolsillo catalítico. Las fallas para establecer y/o conservar las interacciones de anclaje, debido a las modificaciones estructurales en las HEAs, conducen a impedir, dilatar el tiempo de cierre del flap o incluso conducir a una reapertura del mismo. Para las HEA de estudio con alto poder inhibitorio, el cierre del flap incrementó favorablemente las interacciones BACE1-HEA en alrededor del 25%.

En este trabajo se reporta una descripción detallada del proceso inhibitorio de BACE1 por HEAs que ofrece detalles no reportados previamente en la literatura y que, además de explicar los eventos que ocurren y las características que la determinan, ofrece una herramienta sólida de cribado para la evaluación «*In Silico»* de esta familia de inhibidores, es decir, para evaluar futuras modificaciones estructurales, que conlleven a incrementar la favorabilidad y estabilidad de las ReLIE en el sistema BACE1-HEA. Para finalizar, las metodologías aquí empleadas son extrapolables a otros sistemas BACE1-inhibidor, o proteínas en general, donde se aborde el problema de cambios conformacionales y/o estados de protonación.

Palabras Claves: Alzheimer, BACE1, Hidroxietilaminas, diada aspártica, estado de protonación, flap, energías de interacción residuo-ligando, inhibición, Dinámica Molecular, Densidad poblacional.

Tabla de Contenidos

1. Introducción 2

1.1. El mal de Alzheimer (AD) 5

1.2. Aspectos bioquímicos de la AD: hipótesis amiloidea 6

1.2.1. BACE1 es la secretasa de la AD 9

1.2.2. Mecanismo de hidrolisis de BACE1 12

1.3. Inhibición de BACE1 como estrategia para la AD 14

1.3.1. Peptidomiméticos 15

1.3.2. Pequeñas moléculas 17

1.3.3. Inhibidores en desarrollo clínico 20

1.4. HEAs como inhibidores de BACE1 21

1.5. Estudios computacionales sobre BACE1 26

1.6. Consideraciones del sistema BACE1-HEA 32

2. Objetivos 35

2.1. Objetivo General 35

2.2. Objetivos Específicos 35

3. Metodología 37

3.1. Protocolos Generales 38

3.1.1. Modelado Molecular 38

3.1.2. Acoplamiento molecular (docking) proteína-ligando 40

3.1.3. Simulaciones de Dinámica Molecular 40

3.2. Confirmación del estado de protonación final para los complejos BACE1-HEA 42

3.2.1. Calculo de docking y optimización del sistema 42

3.3. Determinación de la configuración inicial de estados de protonación BACE1-HEA. 43

3.3.1. Parámetros para el monitoreo del flap e interacciones BACE1-HEA 46

3.3.2. Cálculos de Densidad Poblacional 47

3.4. Análisis comparativo entre las HEAs de estudio 48

3.4.1. Energías de Interacción Residuo-Ligando Dinámicas 48

3.4.2. Parámetros proteína-proteína y proteína-ligando 51

RESULTADOS Y DISCUSIÓN 54

4. La Configuración De Estados De Protonación Final BACE1-HEA Es LpAspUP 55

4.1. Introducción al Capítulo 4 55

4.2. Análisis de los Parámetros Estáticos y Dinámicos 61

4.2.1. Configuraciones Monoprotonadas (Estados aniónicos) 65

4.2.2. Configuraciones Diprotonadas (Estados neutros) 69

4.2.3. Configuración Di-deprotonado (Estado dianiónico) 73

4.3. Consideraciones generales del análisis 74

4.4. Validación del estado AspUP 77

4.5. Conclusiones del Capítulo 4 79

5. LnAsn289 Es La Configuración Que Induce Un Cambio Conformacional En BACE1 de su forma apo a cerrada 80

5.1. Introducción al Capítulo 5 80

5.2. Análisis de las configuraciones de estados de protonación 83

5.2.1. Configuración LnAsp93 84

5.2.2. Configuración LnAsp289 86

5.2.3. Configuración LpAsp93 88

5.2.4. Configuración LpAsp289 90

5.2.5. Configuración LpAspUP 92

5.3. Análisis de la densidad poblacional 94

5.3.1. Densidad poblacional individual 94

5.3.2. Densidad población conjunta 96

5.4. El sistema BACE1-HEA sigue el modelo 2 inhibitorio 97

5.5. Conclusiones del Capítulo 5 99

6. Influencia de las modificaciones estructurales en las HEAs sobre el cierre del flap en BACE1 100

6.1. Introducción al Capítulo 6 100
6.2. Los valores de εT se relacionan con la actividad inhibitoria sobre BACE1 102
6.3. La Etapa I Está Gobernada Por El Cierre Del Flap 106
6.4. La movilidad de la HEAs influye en el cierre efectivo del flap 108
6.5. Las sustituciones en la cola de las HEAs afectan el cierre del flap en BACE1 110
6.6. La interacción con Asn294 mantiene las HEAs ancladas 111
6.7. Las PM7-ReLIE permiten la identificación de las interacciones más relevantes en el sistema BACE-HEA 112
6.8. El Sistema BACE1-HEA Presenta Interacciones De Anclaje 115
6.9. Conclusiones del Capítulo 6 118
7. Conclusiones Generales Y Recomendaciones 120
8. Bibliografías 124
9. Anexos 133
9.1. Anexos Capítulo 4 133
9.2. Anexos Capítulo 5 136
9.3. Anexos Capítulo 6 140
Anexo XIV. Publicación Científica #1 144
Anexo XV. Publicación Científica #2 145
Anexo XVI. Publicación Científica #3 146

Lista de Tablas

Tabla 3-1. Fragmentos de la cabeza y cola para las HEAs de estudio. 39
Tabla 4-1. Cuadro comparativo de las distancias de las principales interacciones BACE1-HEA para las estructuras cristalográficas y las empleadas para la validación del estado AspUP. 78
Tabla 6-1. Valores de acoplamiento inicial BACE1-HEA. 102

Lista de Figuras

Figura 1-1. Modelos posibles de Hipótesis de la cascada Amiloidea 8
Figura 1-2. Regiones del sitio activo de BACE1 y sus vecindades. 10
Figura 1-3. Modelos Mecanismos de acción de BACE1: I) catálisis ácido-base con intermedio neutro; II) catálisis ácido-base con intermedio zwiteriónico; III) ataque nucleófilo directo con intermedio covalente. 13
Figura 1-4. Algunos isósteros conocidos para el diseño de inhibidores de las aspartil proteasas. 15
Figura 1-5. Estructura de los peptidomiméticos CTS-21166 y GRL-8234. 16
Figura 1-6. Estructura química de algunos inhibidores no peptídicos de BACE1. 18
Figura 1-7. Algunos inhibidores de BACE1 que actualmente están en ensayos clínicos 20
Figura 1-8. (R)-Hidroxietlaminas de Elan/Pharmacia. 22
Figura 1-9. Inhibidores de BACE1 reportados por Elan, Pharmacia y Pfizer 23
Figura 1-10. Truncaciones hechas por Elan/Pfizer. 24
Figura 1-11. (R)-Hidroxietilaminas desarrolladas por GlaxoSmithKline (GSK). 25
Figura 1-12. Sulfonamidas cíclicas seleccionadas por GSK. 25
Figura 1-13. Regiones críticas de BACE1 participan en el reconocimiento del sustrato, y la orientación de la Tyr71 de la conformación abierta y cerrada de la hojilla. 26
Figura 1-14. Interacción del isostero HEA con las configuraciones posibles de estados de protonación para la diada de espartatos. 29
Figura 1-15. Análisis de energía potencial para el ángulo diedro del grupo OH del inhibidor 2VNM. 30
Figura 1-16. Modelos posibles de inhibición de BACE1 por las HEAs. El modelo 1 solo se considera un cambio conformacional de la proteína, conservando los estados de protonación inicial. En el modelo 2, BACE1 sufre un cambio geométrico acompañado por una transferencia protónica hacia el inhibidor. 33
Figura 3-1. Posibles configuraciones de estados de protonación para la díada asprtica Asp93 (D93) y Asp289 (D289). La protonación de la cadena lateral puede ocurrir en el átomo de oxígeno interno (i) o externo (o). 41
Figura 3-2. Esquema de protonación para el ligando (H2) y la diada aspártica (BACE1). El ligando puede ser una amina neutra (Ln) o protonada (Lp), mientras que la diada puede ser monoprotonada (Asp93 o Asp289) o di-desprotonada (AspUP). 44
Figura 3-3. Parámetros medidos para el complejo BACE1-H2 (PDB ID: 2VNM). Los parámetros ubicados en la parte superior describen el movimiento del flap, mientras los inferiores son

interacciones proteína-ligando sensibles al estado de protonación de ambas especies. Los valores experimentales de estos parámetros del complejo proteína-ligando fueron usados como referencias..... 45
Figura 3-4. Segmentación del sitio activo de BACE1 y sus vecindades. El código de colores se muestra en la parte inferior. 49
Figura 3-5. Esquema de fragmentación para la cadena principal de la proteína. Para cada residuo xij se completó la valencia añadiendo dos átomos de hidrogeno. La posición de los protones fue luego optimizada. El fragmento xij se compone de la cadena lateral de xij y el grupo carbonilo del residuo $xij - 1$. 50
Figura 3-6. Distancias proteína-proteína (d1, d2 y d3) y proteína-ligando (d4, d5, d6, d7, d8 y d9) para el sistema BACE1-HEA. Las medias experimentales de cada distancia se calcularon a partir de las estructuras de complejos cristalinos BACE1-HEA disponibles en el Protein Data Bank... 52
Figura 4-1. Medida del rmsd (Å) y ángulos diedros para la HEA H2 basado en la estructura más representativa de la trayectoria. Los valores experimentales para las torsiones se encuentran dentro de la figura de referencia. 58
Figura 4-2. Valores de rmsd de pares de Cα medidos para 84 residuos en el sitio active de BACE1 y sus vecindades..... 60
Figura 4-3. Orientación de la diada aspártica para las estructuras más representativas de la trayectoria MD. 62
Figura 4-4. Error absoluto de las distancias intermoleculares BACE1-H2 respecto a la estructura de rayos-X. Para cada configuración de estados de protonación se tomaron las estructuras más representativas de la simulación MD..... 64
Figura 4-5. Evaluación en el tiempo de $\delta\phi$ medidos sobre la diada catalítica 67
Figura 4-6. Error absoluto de las distancias intermolecular BACE1-H2 que involucran los residuos Asp93, Gly93 y Asp289. 70
Figura 4-7. Inhibidores HEA no co-cristalizados luego de los protocolos de docking y optimización SQM. A. Superposición de los modos de acoplamiento y, las HEAs B. V207 C. V317 y D. N323 dentro del sitio activo de BACE1. 76
Figura 5-1. Superposición de los diferentes segmentos del sitio activo de BACE1, y sus vecindades, para las estructuras más representativa de cada configuración. La estructura experimental (PDB ID 2VNM) se usó como referencia. 82
Figura 5-2. Error porcentual respecto a la estructura cristalina 2VNM de parámetros que describen el movimiento del flap: a) d1 b) d2 c) θ y d) ϕ. Los valores graficados muestran los

valores promedios cada 250ps de simulación. El Código de colores para las diferentes configuraciones se muestra en el fondo. 85
Figura 5-3. Error porcentual respecto a la estructura cristalina 2VNM de distancias proteína-ligando: a) d3, b) d4, c) d5 y d) d6. Los valores graficados muestran los valores promedios cada 250ps de simulación. El Código de colores para las diferentes configuraciones se muestra en el fondo. 87
Figura 5-4. Conformaciones del flap para cada configuración de estados de protonación, tomadas cada 10ns. El segmento de la estructura experimental se usó como referencia. El Código de colores para las diferentes configuraciones se muestra en el fondo. 89
Figura 5-5. Conformaciones del ligando respecto a la pose cristalina para cada modelo evaluado. Las instantáneas fueron tomadas cada 10ns. El Código de colores se muestra en el fondo..... 91
Figura 5-6. Densidad poblacional individual para cada parámetro vs el nivel de tolerancia. Las medidas fueron hechas para cada configuración: LnAsp93 (azul), LnAsp289 (rojo), LpAsp93 (verde), LpAsp289 (morado) y LpAspUP (naranja). 93
Figura 5-7. Densidad poblacional combinada ρ(d1,d2,θ,ϕ,d3, d4, d5 and d6) a diferentes niveles de tolerancia. El código de colores para configuración se halla en la parte inferior de la imagen. 95
Figura 5-8. Modelo propuesto de inhibición de BACE1 por HEAs. El sistema presenta un intercambio protónico y un cambio conformacional. 97
Figura 6-1. Distancias Variación de la energía proteína-ligando total (εT) en el tiempo para los sistemas compuestos por BACE1 en complejo con HEAs de alto (H1 y H2), moderado (M1 y M2) y bajo poder inhibitorio. Los valores graficados son la media calculada cada 250ps de la simulación. El código de colores empleado para diferenciar las HEAs se muestra en el fondo. 104
Figura 6-2. Parámetros para el monitoreo de la dinámica del flap. Variaciones para las distancias: A) d1, B) d2, C) d3 y D) d4 en el tiempo de simulación. Los valores graficados son la media calculada cada 250ps de la simulación. El código de colores empleado para diferenciar las HEAs se muestra en el fondo. 106
Figura 6-3. Parámetros para el monitoreo del ligando en el sitio activo de BACE1. Variaciones de A) rmsd y las distancias B) d5, C) d6, D) d7, E) d8 y F) d9 en el tiempo de simulación. Los valores graficados son la media calculada cada 250ps de la simulación. El código de colores empleado para diferenciar las HEAs se muestra en el fondo. 109
Figura 6-4. Mapa energético de las ReLIE para los primeros 10ns del sistema BACE1. La tabla resalta los residuos, por segmentos, que exhiben las ReLIE más favorables. 113

Figura 6-5. Diferencias energéticas en las interacciones de anclaje para los sistemas BACE1-HEA. Los residuos involucrados son: A. Asp93, B. Asp289, C. Thr292, D. Thr293, E. Asn294 y F. Arg296. Los valores graficados son la media calculada cada 250ps de la simulación. El código de colores empleado para diferenciar las HEAs se muestra en el fondo. 116

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

De acuerdo a Azheimer's Association (www.alz.org), el mal de Alzheimer (AD, por sus siglas en ingles *Alzheimer's Disease*) es la forma más común de demencia (60% a 80% de los casos), el cual afecta la memoria, el pensamiento y comportamiento. Aunque la edad avanzada es un factor de riesgo, padecer AD no es parte normal del envejecimiento. La AD es una enfermedad neurodegenerativa progresiva, donde los síntomas de la demencia empeoran gradualmente con los años; en sus etapas tempranas, la pérdida de memoria es sutil, pero en la última etapa, el individuo pierde la habilidad para llevar a cabo una conversación y responder a su ambiente(Reitz & Mayeux 2014; Crunkhorn 2016; Evin 2016). En la actualidad esta enfermedad no tiene cura. Se estima que para el año 2050 habrá más de cien millones de personas en el planeta con Alzheimer, por lo que existe un esfuerzo mundial para entender bien su mecanismo bioquímico para el diseño futuro de fármacos que puedan detener y revertir sus efectos. De momento solo se cuenta con tratamientos para tratar los síntomas y mejorar la calidad de vida de los pacientes (Evin 2016).

La marca característica de la AD son las placas amiloideas extracelulares(Serrano-Pozo, Frosch, Masliah & Hyman 2011; Evin 2016) que, junto con los ovillos neurofibrilares (NFT), causan la disfunción sináptica y muerte cerebral en los pacientes(Hersi et al. 2017). Las placas amiloideas se constituyen principalmente de fragmentos terminales proteicos, llamados péptidos-Aβ (Aβ), los cuales provienen de la escisión de la proteína precursora amiloidea (APP) por acción de un tándem de proteasas, identificadas como β- y γ-secretasa(Li et al. 2004). Se ha reportado que la primera enzima, también llamada BACE1 o Memapsina 2, participa en la etapa cinético-limitante del proceso proteolítico del APP (Vassar 2014; Yan, Fan, Zhou & Vassar 2016), lo que sugiere que la inhibición o modulación de esta aspartil proteasa en el cerebro disminuiría los niveles de Aβ. En la búsqueda por encontrar nuevos y mejores inhibidores de BACE1 peptídicos

y no-peptídicos se han cristalizado más de 180 estructuras co-cristalizadas, donde se revela y confirma que la diada aspártica catalítica (Asp93 y Asp289) se ubica en una hendija entre los lóbulos N- y C-terminal, cubierto por un bucle de horquilla flexible, conocido como "*flap*" (Hong et al. 2000; Hong & Tang 2004). Estudios de Dinámica Molecular mostraron que la dinámica de flap resulta primordial para el funcionamiento de la enzima ya que, su apertura permite la entrada de los sustratos e inhibidores al sitio activo de BACE1 (Hong & Tang 2004; Xu et al. 2012; Chakraborty & Basu 2015; Kumalo, Bhakat & Soliman 2016; Kumalo & Soliman 2016; Mahanti, Bhakat, Nilsson & Soderhjelm 2016). Además, su proceso de cierre ayuda a la estabilización del complejo macromolecular para que se lleve a cabo la hidrolisis de sus sustratos o inhibición de la β-secretasa (Gorfe & Caflisch 2005). Los datos experimentales y computacionales sugieren que la función proteolítica de la β-secretasa se lleva cabo a través de un mecanismo ácido-base(Barman, Schürer & Prabhakar 2011; Barman & Prabhakar 2014; Barman & Prabhakar 2014), similar a otras aspartil proteasas como la pepsina, renina(Bras, Fernandes & Ramos 2014) y la del VIH(Haass, Kaether, Thinakaran & Sisodia 2012; Arodola & Soliman 2016; Kumalo et al. 2016; Mahanti et al. 2016). Sin embargo, nueva evidencia sugiere que el mecanismo de acción dependerá fundamentalmente de la naturaleza química de la molécula entrante al sitio activo, la cual, a su vez, afecta el estado de protonación en la diada aspártica(Park & Lee 2003; Rajamani & Reynolds 2004; Yu et al. 2006; Polgar, Magyar, Simon & Keseru 2007; Domínguez et al. 2010; Barman & Prabhakar 2014; Ellis & Shen 2015; Kocak, Erol, Yildiz & Can 2016; Sabbah & Zhong 2016).

Las hidroxietilaminas (HEAs) son una familia de potentes inhibidores de BACE1 que se caracterizan por su alto poder inhibitorio a nivel nanomolar (nM), buenas propiedades farmacocinéticas y biodisponibilidad oral (Hussain et al. 2007; Kortum et al. 2007; Beswick et al. 2008; Clarke et al. 2008; Clarke et al. 2008; Clarke et al. 2008; Charrier et al. 2008; Charrier et al. 2009; Charrier et al. 2009; Charrier et al. 2009; Clarke et al. 2010; Truong et al. 2010). A la fecha, algunas compañías farmacéuticas como Elan(Ren et al. 2013), Pfizer(Kortum et al. 2007), Novartis(Rueeger et al. 2012), Merck(Mandal et al. 2012) y GlaxoSmithKline (GSK)(Hussain et al. 2007; Beswick et al. 2008; Clarke et al. 2008; Clarke et al. 2008; Clarke et al. 2008; Charrier et al. 2008; Charrier et al. 2009; Charrier et al. 2009; Charrier et al. 2009; Clarke et al. 2010) registran patentes de HEAs que han demostrado ser capaces de bloquear la β-secretasa. Es más, algunos reportan pruebas en animales y las primeras etapas de los ensayos clínicos (Ghosh & Osswald 2014; Vassar 2014; Yan et al. 2016). Paralelo a esto, se ha reportado una cantidad significativa de estudios computacionales, enfocados principalmente a la creación de modelos farmacofóricos (John, Thangapandian, Sakkiah & Lee 2011), relaciones cuantitativas actividad-

estructura (QSAR, 3D-QSAR)(Ambure & Roy 2016; Wu et al. 2016; Zhang et al. 2017) y al cribado virtual de grandes liberarías para la búsqueda nuevos inhibidores de BACE1 para el tratamiento de la AD (H. Al-Nadaf & Taha 2015; Zhang et al. 2017).

Como parte del trabajo en el grupo de Química Bioorgánica se ha reportado el estado de protonación más probable para el complejo BACE1-HEA a través de reacciones homodesmicas(Gueto-Tettay, Drosos & Vivas-Reyes 2011). Además, se calcularon las energías de interacción ligando-residuo (ReLIE) para una serie de HEAs con 25 residuos del sitio activo de la aspartil proteasa en cuestión. El conjunto de estudio consistió en estructuras cristalográficas de complejos BACE1-HEA reportados por la compañía farmacéutica GSK (Gueto-Tettay et al. 2011). El estudio permitió dar una mirada profunda a las interacciones residuo-ligando para determinar, cuantitativamente, como estas variaban de acuerdo las modificaciones hechas sobre la estructura central de las HEAs. Por otro lado, se ha explorado la influencia del grupo hidroxilo, característico de las HEAs, en el proceso de protonación de estas [Puello, 2013]. Sin embargo, los análisis a la fecha reportados son basados en complejos cristalinos de rayos-X, omitiendo la posible contribución de los eventos previos a la formación de los complejos BACE1-HEA; no existen modelos que describan la llegada del ligando al sitio activo de BACE1 en su forma apo o abierta, cierre del flap y estabilización del complejo proteína-inhibidor. Esta descripción estática limita el análisis necesario para la exploración de un mecanismo inhibitorio detallado.

En el presente trabajo de tesis doctoral se hizo la exploración *In Silico* del mecanismo inhibitorio de la β-secretasa por parte de las HEAs a través de herramientas computacionales, como la Dinámica Molecular, y Docking. Adicionalmente, se hizo una descripción del panorama energético del proceso por medio del mapeo de las ReLIE en el tiempo. Esta evaluación se hizo a través del método semiempírico PM7, el cual permitió identificar los aminoácidos claves para el anclaje de las HEAs en el sitio activo de BACE1. Más aún, brindó una explicación geométrica y energética de las diferencias en el poder inhibitorio de familia de HEAs. Los resultados obtenidos revelan que la actividad inhibitoria está relacionada con la capacidad de los ligandos con la afinidad inicial al sitio activo de BACE1, en su forma apo. Esta afinidad está conectada con la capacidad de formar, y mucho más importante la de mantener en el tiempo, la interacción con los residuos de anclaje (Asp93, Asp289, Thr292, Thr293, Asn294 y Arg296) cuya contribución a la energía de interacción BACE1-HEA es aproximadamente 45%. La información generada de esta investigación ayudará al diseño futuro de mejores HEAs como inhibidores de BACE1.

1.1. La enfermedad de Alzheimer (AD)

La AD en la causa principal de demencia en personas de edad avanzada. No es parte del envejecimiento normal, sino una enfermedad neurodegenerativa crónica y progresiva que involucra la pérdida progresiva de las células nerviosas en el cerebro(Crunkhorn 2016). Puesto que estas células son esenciales para el pensamiento memoria y otra función normal del cerebro, las personas con AD sufre una disminución en sus funciones mentales, los cuales eventualmente interfieren con las actividades diarias del paciente y eventualmente conlleva a la muerte (www.alz.org). Se cree que alrededor del mundo cerca de 36 millones de personas viven con la enfermedad de Alzheimer u otro tipo de demencias. Se estima que si no se hacen avances para el 2030, el número incrementará cerca de 66 millones, pudiendo exceder los 115 millones para el 2050 [Alzheimer's association, 2016]. Estas cifras son preocupantes y merecen la intervención de la comunidad científica para evitar un problema de salud pública (Adlard et al. 2014).

El primer caso clínico de esta enfermedad(Saito & Ihara 2014), fue una mujer de 51 años, Aguste D., fue presentado en un congreso Alemán de psiquiatría a finales de 1906, por el Doctor Alois Alzheimer. La paciente presentó en corto tiempo pérdida de memoria, desorientación, deterioro del lenguaje, percepción y habilidades motoras. Aguste murió a los 55 años y la autopsia cerebral reveló una atrofia general mientras que, el análisis neuropatológico mostró depósitos de sustancias extrañas (posteriormente llamadas *placas amiloides* o *neuríticas*), los cuales se asociaban a la perdida neuronal en la corteza cerebral. Años más tardes este aspecto se convertiría en una evidencia de la dolencia. Hacia 1910, esta enfermedad fue entendida como el resultado inevitable del envejecimiento, siendo reconocida como demencia presenil. No fue hasta los 60s que la comunidad científica mostró interés en los aspectos bioquímicos más allá del estudio del comportamiento de los enfermos.

Los estudios epidemiológicos muestran que factores como la edad, sexo, etnia, situación geográfica, historia familiar, factores genéticos, entre otros, aumentan el riesgo para desarrollar la enfermedad (Harrington, Lim, Gould & Maruff 2014; Reitz & Mayeux 2014; Hersi et al. 2017); Se sabe que la predisposición de padecer Alzheimer aumenta con la edad, doblándose cada 5 años superados los 70 años, y que existe mayor incidencia en mujeres que hombres, siendo esta de 2 a 3 veces mayor(Swaminathan & Jicha 2014). Los individuos de raza negra de ambos sexos son más propensos a padecerla y, que la AD es de mayor incidencia en lugares como Norteamérica, Europa Occidental, Rusia y Australia(Adlard et al. 2014). Por otro lado, esta enfermedad también genera un impacto económico negativo para las familias. De

acuerdo a cifras reportadas por la Alzheimer's association, se proyecta que los gastos por concepto de cuidados de pacientes a largo plazo incrementaran de 200 billones de dólares en el 2012 a 1.1 trillón de dólares en 2050 [www.alz.org].

Encontrar las soluciones para la AD, en términos de la terapia adecuada, ha sido un gran reto y a partir de las décadas pasadas muchos investigadores y compañías farmacéuticas se han mostrado optimistas en busca de este objetivo común. A pesar del esfuerzo, el número de opciones terapéuticas para la AD se mantiene severamente limitado. En la actualidad las drogas comerciales para el tratamiento de Alzheimer no previenen o revierten la enfermedad y han sido aprobadas sólo para el manejo de los síntomas. Las 5 drogas que en la actualidad se venden en mercado son: los inhibidores de la colinesterasa (ChEI) donepezil (Aricept; Esai/Pfizer), Rivastigmina (Exelon; Novaritis), galantamina (Razadyne; Johnson and Johson) Y tacrina (Cognex; first horizon pharameceuticals), y los receptores moduladores de la memantina N-metil-D-aspartate (Nameda; Forest/Lundbeck), todas ellas aprobadas por la FDA solo para el tratamiento sintomático de la AD(Vassar 2014; Evin 2016; Yan et al. 2016; Hersi et al. 2017). En la actualidad no hay drogas disponibles que actúen sobre el mecanismo patológico de este desorden y sean capaces de curar o prevenir la progresión de esta enfermedad. Aunque muchas moléculas potenciales han sido identificadas a través de un grandísimo esfuerzo en las últimas décadas, algunos han fallado en la prueba clínicas y algunos se mantiene en la fase de desarrollo(Evin 2016).

1.2. Aspectos bioquímicos de la AD: hipótesis amiloidea

La AD es una neuropatología caracterizada por la deposición extracelular de agregados β-amiloideas (Aβ), conocidas como placas seniles, ovillos neurofibrilares intra neuronales (proteína tau hiperfosforilada) y la pérdida de neuronas en el cerebro. De acuerdo a esta evidencia, existen varias hipótesis respecto a la causa de la AD, las tres principales son las: hipótesis tau u ovillo, colinérgica y amiloidea(Scheltens et al. 2016; Yan et al. 2016; Zeng & Wu 2016).

La hipótesis ovillo describe el involucramiento de otra proteína, tau, quien se tuerce para la formación de ovillos anormales. La deposición de los ovillos neurofibrilares es sugerida como la principal causa de la pérdida de memoria y cognitiva vista en la AD, puesto que está correlaciona estrechamente con el deterioro cognitivo(Scheltens et al. 2016). Sin embargo, la relación entre la tau hiperfosforilada y las placas seniles Aβ, o cómo estos causan la muerte neuronal,

permanece incierto(Small & Duff 2008; Reitz & Mayeux 2014; Edwards, Moreno-Gonzalez & Soto 2016; Iqbal, Liu & Gong 2016). Más aún, estos ovillos no son exclusivos de la AD, y se ha reportado su presencia en el mal de Parkinson, otra enfermedad neurodegenerativa. En contraste, de acuerdo a la hipótesis colinérgica, existe una deficiencia irreversible en las funciones colinérgicas en el cerebro que induce al deterioro de la memoria en los pacientes con AD(Scheltens et al. 2016).

Por último, la hipótesis amiloidea sugiere que los depósitos Aβ son la causa fundamental de esta enfermedad, siendo la más aceptada por la comunidad científica. Adicionalmente, argumenta que la acumulación de péptidos β-amiloideas (Aβ) acarrea su agregación y formación de las placas seniles, quienes activan los cambios patofisiológicos del cerebro y, en últimas, conducen a la disfunción cognitiva. Este fenómeno ocurre cuando el mecanismo protectivo y compensatorio de los cerebros envejecidos falla (Scheltens et al. 2016; Wilkins & Swerdlow 2016). El péptido Aβ, quién es insoluble, será acumulado en la región extracelular en placas seniles (**Figura 1-1**). Estos péptidos son producidos por una serie de enzimas conocidas como secretasas. Se piensa que el desarrollo de las placas seniles precede y precipita la formación de los ovillos neurofibrilares y formas oligoméricas de Aβ, que se reporta como la principal causa de la muerte neuronal (O'Brien & Wong 2011; Reitz & Mayeux 2014; Edwards et al. 2016).

Los péptidos Aβ consisten en 32 a 42 aminoácidos generados por la escisión de la proteína precursora amiloidea (APP), una proteína de transmembrana tipo 1. El procesamiento del APP por las β- y γ-secretasas forma un péptido Aβ insoluble y neurotóxico de 40-42 aminoácidos de longitud. La forma más larga (Aβ42) es más propensa para agregarse en fibrillas y constituyen el componente principal de las placas seniles (SP, por sus siglas en ingles *Senile Plaques*) [Ohyagi et al., 2004]. Los péptidos Aβ extracelulares se agrupan en estructuras de hojas-β para formar las SP. Las SP inician la cascada patogénica que conducen a la pérdida de las células neuronales.

En los humanos el APP se somete a la escisión por tres complejos enzimáticos: α-, β- y γ-secretasa. La forma tóxica del péptido Aβ, el cual consiste de 40-42 aminoácidos, se genera cuando las β- y γ-secretasas procesan el APP. El APP se procesado metabólicamente por dos rutas: la no-amiloidogénica y amiloidogénica(Hersi et al. 2017).

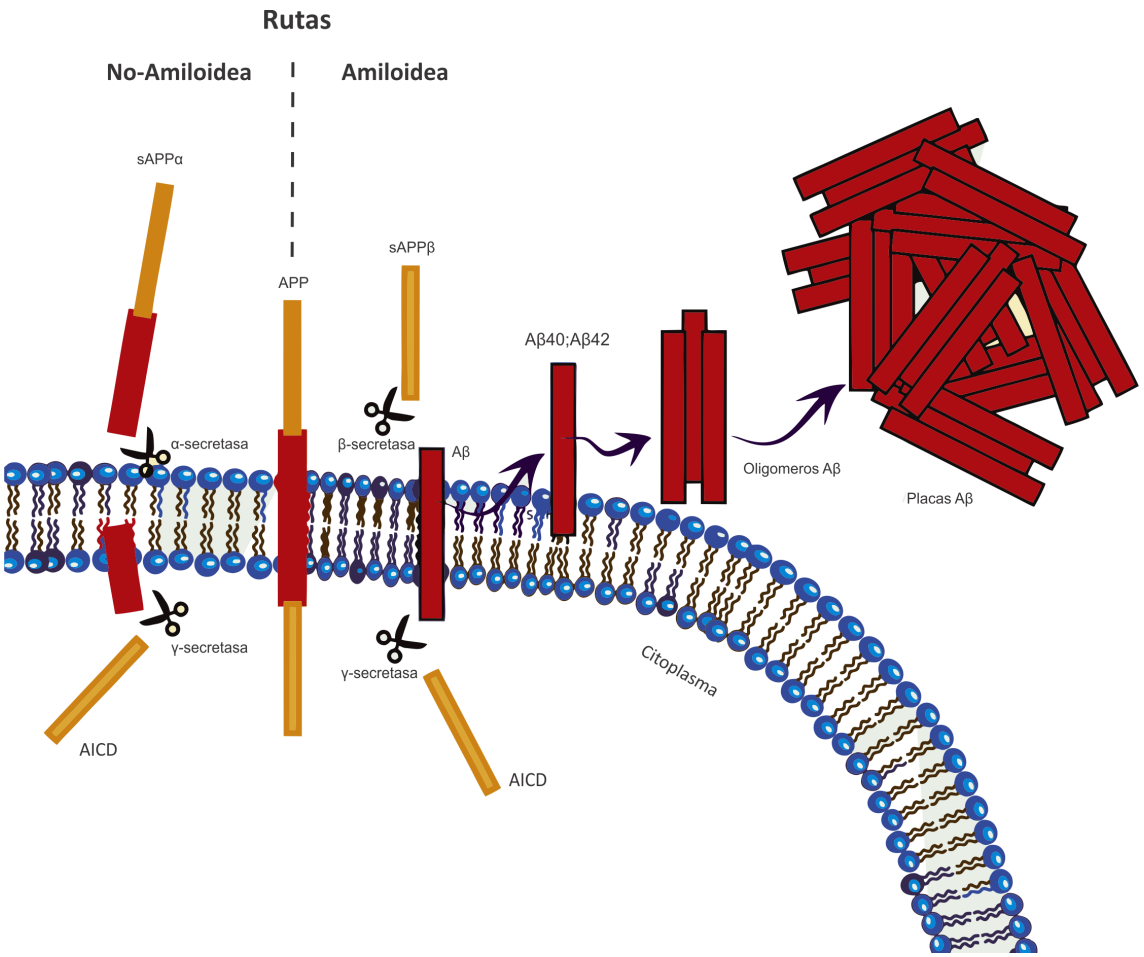


Figura 1-1. Modelos posibles de Hipótesis de la cascada Amiloidea

En la ruta no-amiloidogénica, la enzima α-secretasa escinde el APP, haciéndola un metabolito no tóxico. El proceso libera fracciones transmembranales solubles de la proteína precursora de amiloidea α-escindida (sAPPα) que parece ejercer actividad neuroprotectora. La ruptura secuencial del APP por la γ-secretasa conlleva a la producción de un péptido pequeño no tóxico, referido como p3. En contraste, en la ruta amiloidogénica, la β-secretasa escinde el APP en la Aβ-terminal, liberando la β-APP y un fragmento de proteína de 12-kDa constituido de 99 residuos, C99. El C99 será eventualmente cortado para liberar el fragmento insoluble Aβ que se deposita en placas.

En la AD, las SP son encontradas en las áreas del cerebro, como la corteza entorrinal, el hipocampo y neocortical. Estas placas también se observan en cerebros con envejecimiento normal y no correlaciona con la progresión de la demencia. De hecho, muchos estudios han mostrado una correlación débil entre los depósitos Aβ y el estado cognitivo(Evin 2016; Wilkins & Swerdlow 2016). Otros reportes mostraron que personas sanas de edad avanzada podrían

tener una carga sustancial de péptidos Aβ. Sin embargo, la acumulación de Aβ toxicas y agregadas parece ser crucial en la patogénesis de las formas familiar de la AD. En humanos, todos los individuos con AD clínico tienen depósitos anormales de Aβ (placas difusas o neuríticas). Por otro lado, las mutaciones que se llevan a cabo en el gen de la APP, se asocian con la manifestación temprana y hereditaria de la AD, mostrando, adicionalmente, que estas alteraciones se daban en regiones que intervienen en el proceso proteolítico de formación del péptido patogénico $A\beta_{42}$. Una de las más frecuentes y perjudicial es la "mutación Sueca", en la que se cambian los residuos de Lys^{670}y Met^{671}(K y M) de la proteína nativa por Asn y Leu (N y L) de la proteína de APP mutada(Jonsson et al. 2012; Tanzi 2012)

Diversos argumentos soportan la hipótesis de la cascada amiloidea como la predominante en la patogénesis de la AD. La generación anormal de Aβ conlleva a diversos eventos secundarios que incluyen la hiperfosforilación de la proteína *tau* y la generación de ovillos neurofibrilares, inflamación, oxidación y excitotoxicidad(O'Brien & Wong 2011; Reitz & Mayeux 2014; Edwards et al. 2016; Iqbal et al. 2016). Estos eventos conducen a la activación de la cascada apoptótica, muerte de células neuronales y déficit de neurotransmisores. La pérdida neuronal en las regiones afectadas causa déficit en la colina acetiltransferasa que conduce a la disminución en la producción de neurotransmisores de la acetilcolina, que a su vez conlleva la disfunción colinérgica cortical. El déficit de acetilcolina es responsable de la manifestación clínica de AD.

1.2.1. BACE1 es la secretasa de la AD

Como se mencionó previamente, la huella dactilar clásica de la AD es la presencia de los depósitos proteicos extracelulares, conocidos como placas amiloideas, compuestos principalmente de péptidos pequeños de 38-43 aminoácidos llamados péptidos Aβ. Se ha establecido, como una idea de aceptación general, a esta especie como la responsable por la neurodegeneración observada en los cerebros con AD, y por lo tanto, una gran cantidad de investigación está en curso encaminadas a reducir o eliminar la producción de Aβ como una estrategia terapéutica para el tratamiento de la AD (Evin 2016; S. Liu et al. 2016).

El Aβ es un pequeño péptido de 38-43 aminoácidos derivado de una proteína precursora mucho más grande, conocida como proteína precursora del amiloidea β (APP). La APP puede ser procesado proteolíticamente por el corte secuencial de una clase de proteasas llamadas

secretasas APP. La escisión secuencial del APP por la β-secretasa en el N-terminal del dominio Aβ seguido por la ruptura del APP en el C-terminal de la secuencia Aβ por la γ-secretasa libera el péptido Aβ (**Figura 1-1**). Puesto que la escisión del APP por la β-secretasa es la etapa cinéticamente limitante en la formación del Aβ, existe un interés considerable en focalizar esta proteasa como blanco farmacológico.

La identidad de la β-secretasa fue elucidada en 1999 cuando cinco grupos reportaron, casi simultáneamente, la secuencia de aminoácidos de la β-secretasa y la llamaron memapsina 2, asp2 o BACE1(S. Liu et al. 2016). El nombre de BACE1 (β-site APP Cleaving Enzyme 1 *por sus siglas en inglés*) es el nombre comúnmente aceptado para la β-secretasa (Vassar 2014; Yan et al. 2016). Existe una evidencia considerable que sugiere que BACE1 es la única β-secretasa responsable de la producción de Aβ a partir del APP; experimentos de supresión genética de BACE1 en ratones que producen APP humano conducen a la eliminación de la formación de Aβ y las placas seniles, lo que sugiere que BACE1 es la única enzima responsable por la producción de Aβ. Adicionalmente, la pérdida de la memoria y deterioro cognitivo son liberados de acuerdo a la supresión de BACE1 en ratones transgénicos (Hersi et al. 2017).

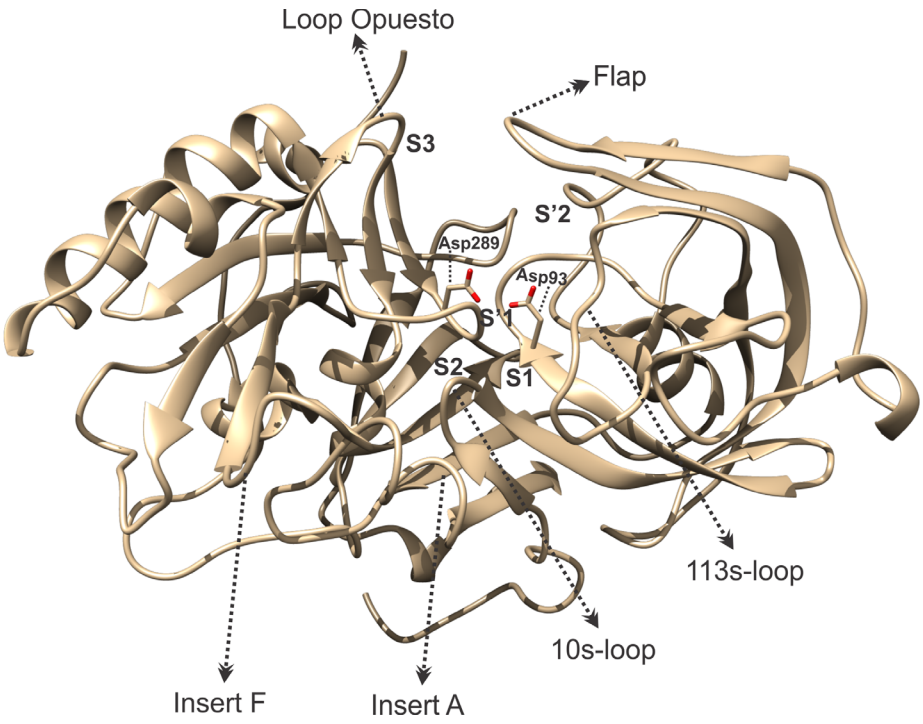


Figura 1-2. Regiones del sitio activo de BACE1 y sus vecindades.

BACE1 es una proteína de 501 aminoácidos, consiste de un péptido señal de 21 aminoácidos, un prodominio entre los residuos 22 y 45, y la proteína madura entre los residuos 46 y 501. BACE1 es aspartil proteasa de transmembrana tipo I que contiene dos residuos aspárticos catalíticos, Asp93 y Asp289. Ambos residuos son críticos para la actividad de BACE1, puesto que la mutación de cualquier de ellos suprime la actividad catalítica de BACE1 (Vassar 2014). Como en muchas otras proteasas, el prodominio de BACE1 es crítico para el plegamiento adecuado del dominio catalítico, y es vital para la autoinhibición de la actividad de BACE1. De hecho, el zimógeno tiene una actividad de proteasa considerablemente reducida comparada con su forma madura. Se ha mostrado a través de modelamiento teórico que el prodominio se sitúa adyacente al sitio activo, sin embargo, el bucle (loop) flexible entre los residuos 46-65 jugarían también un papel importante en la autoinhibición de proBACE1 por medio del bloqueo del acceso del sustrato al sitio activo. Adicionalmente, la prograstricisna y pepsinógeno, dos proteasas que comparten homología con BACE1, contienen un residuo de lisina en su prodominio quien interactúa directamente con los residuos catalíticos en sus respectivos sitios activos, creando un mecanismo de "*abrazadera"* el cual inhibe la actividad. BACE1 carece de este residuo crítico. La flexibilidad del loop, combinado con la ausencia de un residuo "*sujetador*", explicaría el mecanismo por el que la proBACE1 mantiene algo de actividad(Wilkins & Swerdlow 2016; Yan et al. 2016).

BACE1 es una proteasa única, en cuanto a que es está acoplada a la membrana. Esta puede ser S-palmitilada en un residuo de cisteína, el cual dirige a la enzima a agruparse en las regiones lipídicas ricas en esteroles de la membrana plasmática. Aunque hay evidencia que muestra la importancia de la localización de BACE1 en las balsas lípidas en la regulación de la actividad biológica, evidencia reciente sugiere que ni la palmitación o ubicación de BACE1 en las zonas lipídicas afectan la habilidad de BACE1 para actuar sobre la APP, en cultivos celulares y neuronales primarios. Adicionalmente, esta proteasa contiene un sitio de fosforilación, cerca al C-terminal en el Ser498. La fosforilación en este sitio no afecta la endocitosis pero regula el tráfico de BACE1 entre las rutas secretorias o endocíticas(Vassar 2014).

Estructuralmente hablando la proteína consta de una diada aspártica catalítica, Asp93 y Asp289. Se ha descrito que regiones del sitio activo como son el flap, 10s-loop, 113s-loop y opposite-loop juegan un papel importante en el reconocimiento de sustratos o inhibidores de esta proteasa(Hong & Tang 2004; Kumalo et al. 2016; Mahanti et al. 2016). Se sabe que la posición del flap está asociada con la forma inactiva (apo) e inhibida de BACE1 (cerrada)(Hong & Tang

2004; Spronk & Carlson 2011; Xu et al. 2012; Chakraborty & Basu 2015; Kumalo et al. 2016; Mahanti et al. 2016). Cuando el flap abre da paso a la entrada de los sustratos o inhibidores al sitio activo. Eventualmente las múltiples interacciones polares y apolares del ligando con el sitio activo dará lugar a la estabilización del complejo, ya se para que se dé la hidrolisis del sustrato o la inhibición de la enzima(Mahanti et al. 2016).

Puesto que BACE1 cataliza la etapa cinéticamente limitante en la producción de Aβ, se convierte naturalmente en un blanco de interés por los grupos de investigación en la búsqueda de nuevas y mejores formas de tratar la AD. Los estudios iniciales de manipulación genética de BACE1 en ratones sugirieron que la supresión de la producción de BACE1 daba fenotipos moderados, es decir que la inhibición farmacológica de BACE1 tendrá pocos, si alguno, potenciales efectos secundarios(Vassar 2014; Yan et al. 2016). La gran cantidad de investigaciones que se ha hecho a la fecha sobre los roles fisiológicos de BACE1 plantea la interrogante sobre la posibilidad de inhibir BACE1 sin producir efectos secundarios indeseables(Hersi et al. 2017). La respuesta podría estar en la modulación, en lugar de la inhibición completa de la actividad de BACE1. Estudios sobre ratones transgénicos muestran evidencia de que la reducción parcial de los niveles de BACE1 en el cerebro es suficiente para tener efectos notables sobre la AD. Esto sugiere que en lugar de la ablación completa de la actividad de BACE1, se puede modular para que disminuyan la producción de Aβ al tiempo que se disminuyen los riesgos de desencadenar posibles efectos secundarios.

1.2.2. Mecanismo de hidrolisis de BACE1

De acuerdo a la literatura, existen 3 mecanismos de acción para la hidrolisis de un péptido por parte de una aspartilproteasa (**Figura 1-3**), a saber: I) catálisis ácido-base con intermedio neutro; II) catálisis ácido-base con intermedio zwiteriónico; III) ataque nucleófilo directo con intermedio covalente(Barman & Prabhakar 2013; Stamford & Strickland 2013; Yan & Vassar 2014; Evin 2016). El primer mecanismo, tipo I, describe un proceso ácido-base donde el agua actúa como nucleófilo, atacando al carbonilo del enlace peptídico. El Asp desprotonado actúa como base, abstrayendo un protón a la molécula de agua mientras que el Asp protonado actúa como ácido, protonando el oxígeno carbonílico e incrementando la carga positiva sobre el carbono, que lo activa frente al ataque nucleofílico.

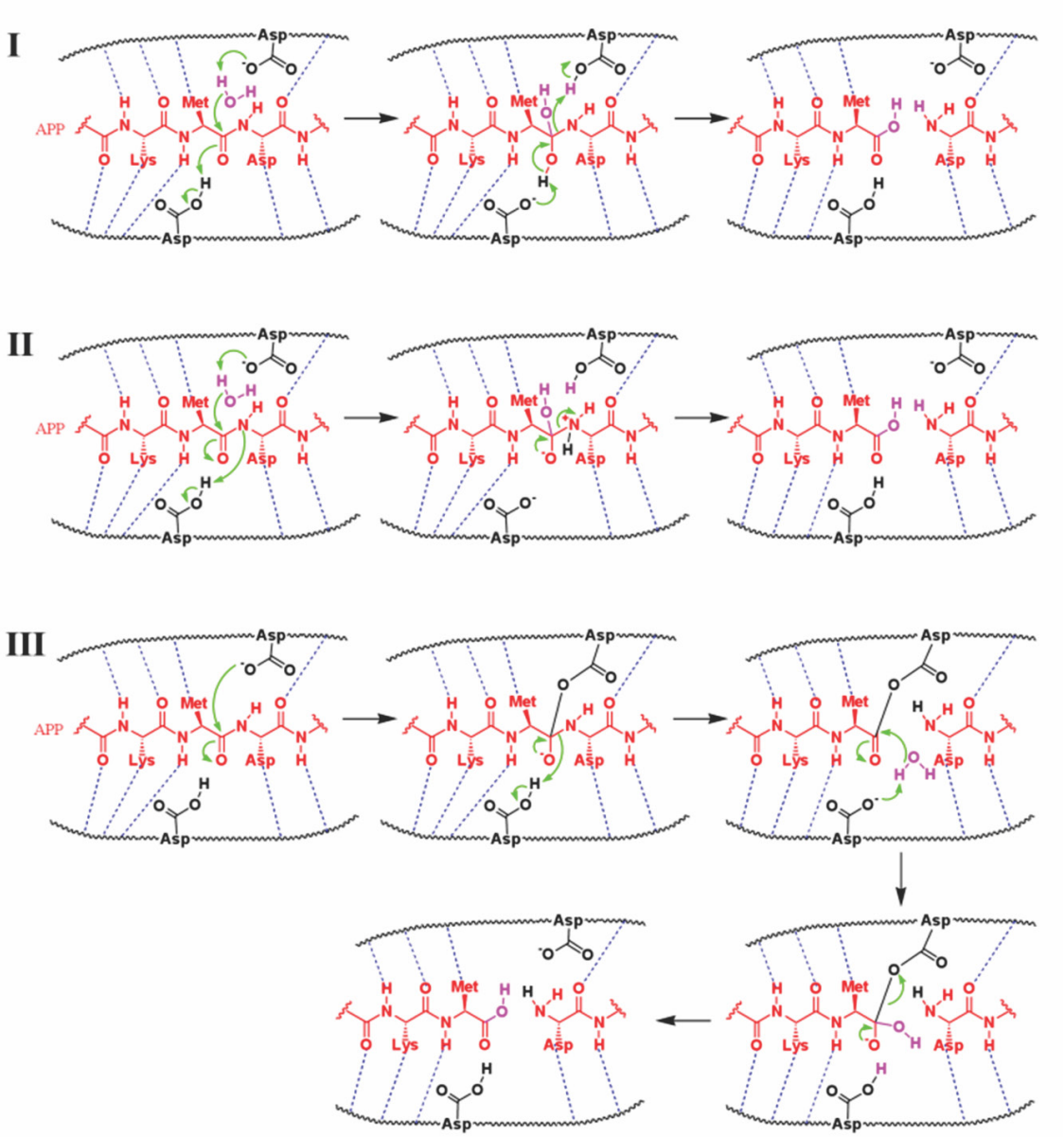


Figura 1-3. Modelos Mecanismos de acción de BACE1: I) catálisis ácido-base con intermedio neutro; II) catálisis ácido-base con intermedio zwiteriónico; III) ataque nucleófilo directo con intermedio covalente.

De esta manera da lugar a un estado de transición tetraédrico, el cual evoluciona produciendo la rotura del enlace peptídico y restableciendo los protones en ambos residuos de Asp para poder llevar a cabo la hidrolisis de un nuevo sustrato. El mecanismo tipo II es similar al tipo I, en el que la unidad de Asp protonada cede el protón al grupo amino del enlace a hidrolizar, en lugar de cedérselo al carbonilo. De esta manera se forma un intermediario zwiteriónico, que evoluciona hacia la ruptura del enlace peptídico. El mecanismo tipo III se basa en la formación de unión covalente entre el Asp desprotonado del sitio activo y el carbonilo del péptido,

obteniéndose un intermedio tetraédrico que evoluciona por rotura del enlace peptídico, liberando a continuación el fragmento unido a la enzima, por hidrólisis con la molécula de agua.

1.3. Inhibición de BACE1 como estrategia para la AD

La proteína BACE1 fue identificada hace más de 15 años como la responsable genética de la actividad de la β-secretasa(Vassar 2014). La ablación del gene BACE1 in los ratones no causó grandes defectos en el desarrollo embrionico o etapas tempranas, y los ratones alcanzaron la madurez sin anormalidades anatómicas o fenotípicas(Edwards et al. 2016; Evin 2016; Wilkins & Swerdlow 2016; Yan et al. 2016; Hersi et al. 2017). Esto motivó al desarrollo rápido de inhibidores de BACE1. Las publicaciones de que los niveles de BACE1 eran altos en los pacientes con AD alentaron aún más al desarrollo intensivo de inhibidores de BACE1 como aplicación terapéutica (Li et al. 2004). BACE1 es la fundadora de una subclase de proteasas aspártica atadas a la membrana, con homología en la secuencia a la renina y Catepsina D(Bras et al. 2014; Arodola & Soliman 2016; Hernandez-Rodriguez, Correa-Basurto, Gutierrez, Vitorica & Rosales-Hernandez 2016; Ellis, Tsai, Lin & Shen 2017). La determinación de la estructura tridimensional del dominio catalítico de BACE1 facilitó el diseño de inhibidores(Hong et al. 2000). El estudio reveló un sitio catalítico con desafíos para el diseño de inhibidores de alta afinidad ya que, las moléculas debían ser lo suficientemente pequeñas para penetrar a través de las membranas celulares y para cruzar la barrera hematoencefálica. Adicionalmente, la homología cercana entre BACE1 y BACE2 complica más el diseño específico de inhibidores de BACE1.

De hecho, BACE2 comparte 45% de identidad secuencial y 75% de homología con BACE1, incluyendo similaridad estructural en la región del sitio activo(Hernandez-Rodriguez et al. 2016; Kumalo & Soliman 2016). Sin embargo, las dos enzimas difieren por especificidad de su corte. BACE2 se descartó como candidato de β-secretasa ya que escinde en un sitio alternativo, cercano al sitio de la α-secretasa (Vassar 2014; Yan & Vassar 2014; Crunkhorn 2016; Evin 2016; S. Liu et al. 2016; Wilkins & Swerdlow 2016; Yan et al. 2016). Los patrones de la expresión de BACE1 y BACE2 también difieren considerablemente, siendo BACE1 expresada principalmente en el cerebro donde poco o nada de BACE2 es detectado. Los ratones con supresión genética de BACE2 muestran un incremento en la masa de las células pancreáticas-β y alteraciones en el color del pelaje que es consistente con hipo-pigmentación. Los exámenes fisiológicos y bioquímicos de estos ratones han revelado que BACE2 controla la proliferación y función de las células β en el páncreas a través de la escisión de la proteína de transmembrana TMEM27.

Adicionalmente estos ratones modificados mostraron un aumento en los niveles de insulina y un incremento en el metabolismo de glucosa, el cual apoyo investigaciones posteriores para determinar si la inhibición de BACE2 también podría jugar un papel en la regulación de melanosomas por la escisión de la proteína premetalosomica PMEL, por lo que la inhibición de BACE2 podría incrementar la fotosensibilidad en los pacientes tratados. Otros sustratos de BACE2 han sido descubiertos por análisis proteomico. La mayoría de los inhibidores desarrollados inhiben tanto a BACE1 como a BACE2, por lo que los efectos secundarios potenciales tendrán que ser tomados en cuenta. Cientos de compuestos que inhiben potentemente a BACE1 *in vitro* han sido descritos(Evin 2016), por lo que este texto se ocupará de abordar solo los últimos progresos en el desarrollo de inhibidores de BACE1.

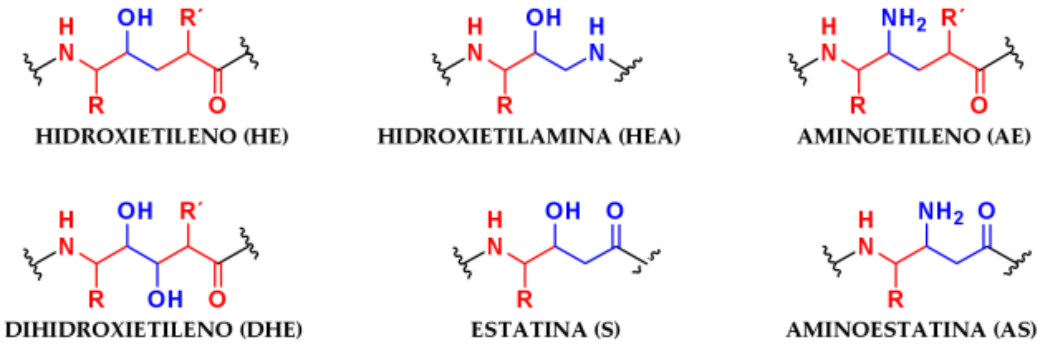


Figura 1-4. Algunos isósteros conocidos para el diseño de inhibidores de las aspartil proteasas.

1.3.1. Peptidomiméticos

La estrategia inicial para el diseño de inhibidores de BACE1 fue sintetizar análogos basados en el estado de transición de la secuencia de APP, donde el enlace peptídico en el sitio de escisión es reemplazado con un isóstero no-escindible tales como hidroxietileno, hidroxietliamina o grupos estatina/norestatina (**Figura 1-4**), y luego mejorar sus propiedades farmacológicas por sustitución química y refinamiento estructural, estrategia que ha sido exitosa en la producción eficaz de otras proteasas aspárticas(Ghosh & Osswald 2014). Esta estrategia produce moléculas grandes y polares, con afinidad de acople por BACE1, pero con propiedades farmacológicas desfavorables y penetración cerebral pobre. Otro obstáculo ha sido que algunos compuestos análogos y peptidomiméticos que puede pasar las membranas celulares y alcanzan su blanco se enfrentan con el problema del eflujo por las glicoproteínas-P (PgP) que controlan la barrera hematoencefálica. Estos compuestos tuvieron que ser administrados junto con inhibidores de las PgP para demostrar su eficacia en la reducción del Aβ y la deposición amiloidea en el cerebro

de los animales estudiados(Hong et al. 2000; Park & Lee 2003; Adlard et al. 2014; Evin 2016). Por lo tanto, era improbable que fueran aplicados en la clínica.

1.3.1.1. CTS-21166

El compuesto análogo portador de un isóstero hidroxietileno, CTS-21166 (**Figura 1-5**), el cual fue desarrollado por Ghosh y colaboradores, probó inhibir potentemente BACE1 en ensayos *in vitro* con una constante inhibitoria (Ki) de 1nM, y fue de los primeros inhibidores en ser probados exitosamente en ratones transgénicos(Ghosh & Osswald 2014). Las inyecciones intravenosas en los ratones Tg2576 disminuyeron hasta en un 70% los niveles de Aβ en plasma y 55% en el cerebro. Los ensayos preclínicos posteriores demostraron la penetración cerebral en animales no-transgénicos, incluyendo ratones, ratas, perros y monos, lo que mostró que dosis simples o múltiples del compuesto dado a ratas podían disminuir el Aβ en el cerebro y fluido cerebroespinal (CSF) hasta en un 50%. Un ensayo clínico de fase I, en la cual CTS-21166 fue administrado de manera intravenosa a voluntarios masculinos sanos, en dosis de hasta 225mg, probó que el fármaco podía disminuir los niveles de Aβ en plasma de manera dependiente a la dosis, con un efecto duradero de hasta 72h. En un segundo ensayo de Fase I, donde los participantes recibieron una solución líquida oral del compuesto, consolidó estos resultados. Estos ensayos probaron que CTS-21166 era bien tolerado y evidenciaba, por primera vez, la disminución de Aβ en humanos, aunque fue solo demostrado en plasma(Ghosh & Osswald 2014). No hay más pruebas registrada para este fármaco.

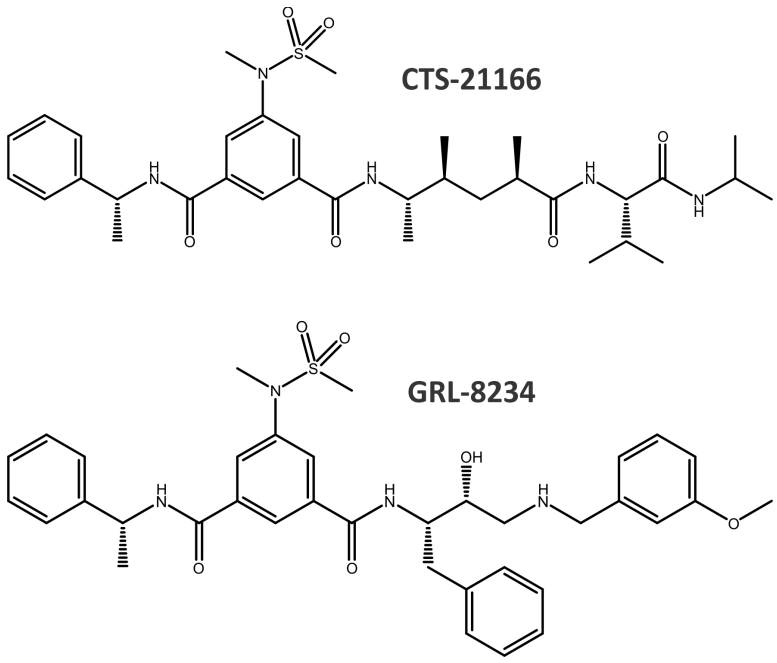


Figura 1-5. Estructura de los peptidomiméticos CTS-21166 y GRL-8234.

1.3.1.2. GRL-8234

El grupo de Ghosh produjo también el compuesto GRL-8234 (**Figura 1-5**), una hidroxietilamina peptidomimética con alta afinidad por BACE1, buena selectividad respecto a otras proteasas asparticas y permeabilidad a la barrera hematoencefálica, y mostró que podía bajar los niveles de Aβ en el cerebro de los ratones transgénicos con AD(Chang et al. 2010; Ghosh & Osswald 2014). La administración crónica de GRL-8234 por 6 meses produjo resultados prometedores ya que, podía disminuir la carga amiloidea cerebral en los animales tratados al tiempo que rescató el déficit cognitivo. Esto dio la primera prueba del concepto de que la inhibición de BACE1 podía aminorar el funcionamiento cognitivo en un modelo de AD, lo que ha fomentado el desarrollo posterior de inhibidores de BACE1.

1.3.2. Pequeñas moléculas

Como una estrategia alternativa a los sustratos análogos, algunas compañías farmacéuticas han cribado librerías de compuestos, ya sea por simulación virtual –donde las entidades químicas son probadas por acoplamiento molecular (docking) en un modelo del sitio catalítico de BACE1- o usando ensayos de alto rendimiento *in vitro* para identificar nuevas moléculas capaces de alterar la actividad enzimática de la proteasa aspártica. Los aciertos obtenidos de estos cribados proporcionaron compuestos líderes que fueron posteriormente refinados para mejorar la potencia y especificidad(Oehlrich, Prokopcova & Gijsen 2014). Esta estrategia tuvo la ventaja de que proveer pequeñas moléculas, con mejor biodisponibilidad que los peptidomiméticos pero con la desventaja de producir inhibidores que podrían bloquear parcialmente el sitio activo de BACE1 y, por lo tanto, falta de selectividad por BACE1 relativa a BACE2 o Catepsina D, una proteasa lisosomal ubicua. Estas desventajas fueron factores claves para discontinuar ensayos clínicos de algunos compuestos. La estructura química de algunos compuestos es mostrada en la **Figura 1-6**.

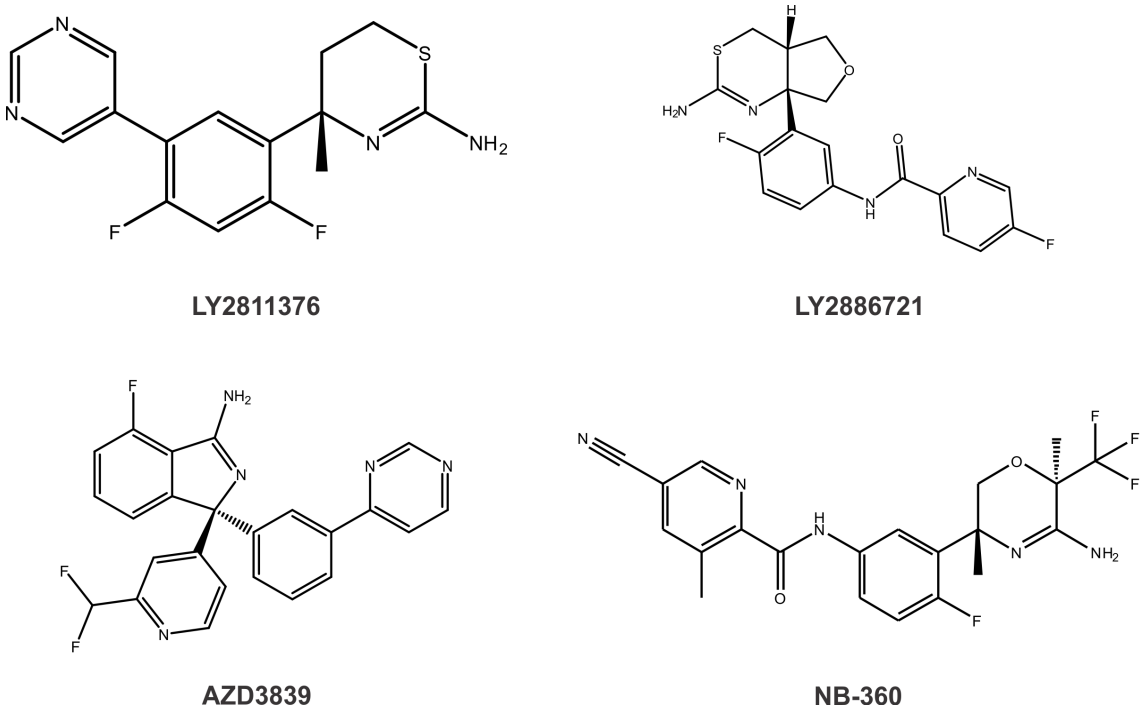


Figura 1-6. Estructura química de algunos inhibidores no peptídicos de BACE1.

1.3.2.1. LY2811376

Eli Lilly y Co. diseñaron el derivado cíclico de la isotiourea, LY2811376, el cual proporcionó resultados alentadores tras los ensayos en animales. La prueba en ratones con AD y perros Beagle mostró una respuesta dependiente de la dosis en la reducción en plasma y CSF de los péptidos Aβ y de los productos derivados de escisión del APP, C99 y sAPPβ (Oehlrich et al. 2014). Los resultados de la Fase I, un ensayo clínico en voluntarios sanos, indicaron que LY2811376 pudo bajar el Aβ CSF hasta en un 55%, un hallazgo que fue observado por primera vez en humanos y proporcionó la evidencia de que el fármaco había alcanzado su objetivo. Sin embargo, los ensayos clínicos con LY2811376 fueron terminados como una manera preventiva cuando se observó toxicidad retinar en estudios paralelos realizados en animales. Las ratas tratadas crónicamente por 3 meses con LY2811376 desarrollaron una acumulación de lipofuscina que conlleva a la degeneración celular en el epitelio retinar, y en menor medida, en las neuronas y células gliales. La lipofuscina está constituida de pigmentos granulosos autoflorecentes que se acumulan con el envejecimiento en los lisosomas. Puesto que un fenómeno similar se observó en los ratones trasgenicos, se concluyó que la toxicidad de LY2811376 era causada por la falta de selectividad, quien inhibía también a la Catepsina D(May et al. 2015).

1.3.2.2. LY2886721

La siguiente generación de un compuesto inhibidor de BACE1 en la compañía Lilly fue LY2886721, quien pareció ser más potente y selectivo que su antecesor de acuerdo a los ensayos preclínicos(May et al. 2015). Estudios en Fase I con voluntarios sanos y enfermos con AD se llevaron a cabo para probar la seguridad y eficacia del fármaco. Como resultado se obtuvo una disminución en los péptidos $A\beta_{40}$, $A\beta_{42}$ y sAPPβ en CSF hasta en un 74%. La Fase II del estudio, sin embargo, se debió discontinuar debido a toxicidad en el hígado atribuido a efectos secundarios del fármaco.

1.3.2.3. AZD3839

Astra-Zeneca reportó los datos preclínicos del rendimiento *in vivo* de un derivado del aminoisoindol, AZD3839 (Quartino et al. 2014). Los estudios *in vivo* establecieron que la selectividad del compuesto era de 3 órdenes de magnitud mayor por BACE1 comparado con Catepsina D, 14 veces contra BACE2. La dosis oral de AZD3839 en ratones, cerdos de guinea y monos transgénicos disminuía los niveles de Aβ en el cerebro, CSF y plasma dependiente de la dosis. La seguridad y propiedades farmacológicas del fármaco se probaron en un ensayo de Fase I con 54 voluntarios. Se observó una disminución de hasta el 55% de los niveles de $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$ a una dosis de 300mg. Estos datos son consistentes con los hallazgos en estudios animales. Sin embargo, se aumentó la preocupación en la seguridad del compuesto puesto que algunos pacientes experimentaron eventos adversos como cuadros presincopales (perdida súbita de la conciencia), dolores de cabeza, entre otros. Es más, la examinación electrofisiológica reveló que el fármaco causa arritmia, por lo que los ensayos clínicos se suspendieron(Quartino et al. 2014).

1.3.2.4. NB-360

La compañía Novartis tiene también ha propuesto varios inhibidores de BACE1. El sulfóxido cíclico derivado de la hidroxietilamina, NB-04 probó ser un potente inhibidor de BACE1 in vitro y capaz de reducir los niveles de Aβ en los cerebros de los ratones con AD y en el CSF de los perros Beagle [Rueeger et al., 2013]. No pudo avanzar en los ensayos clínicos por problemas con el eflujo PgP. Basado en estos resultados y en sus fallas de otros inhibidores de BACE1, Novartis produjo NB-360, una nueva generación de inhibidores de BACE1 con centro amino-1,4-oxazina que mejora sustancialmente las propiedades farmacológicas que, resultó en un incremento en la actividad inhibitoria, selectividad, y penetración cerebral [Neumann et al., 2015]. Las propiedades farmacocinéticas de NB-360 también son favorables, puesto que no se

acopla a proteínas plasmáticas y se libera poco a poco de la sangre, como los demostraron varios modelos animales. Los estudios preclínicos de seguridad y toxicidad están en curso.

1.3.3. Inhibidores en desarrollo clínico

En un esfuerzo conjunto, y con la experticia de químicos y biólogos, condujeron a Merck/Schering-Plough al descubrimiento de un potente inhibidor de BACE1 SCH-900931/MK-8931SC, renombrado recientemente Verubecestat. Los químicos usaron una estrategia con una mezcla de descubrimiento basado en los fragmentos y combinación de fragmentos para producir una serie de derivados del dióxido de iminotiadiazona capaces de acoplarse al sitio activo de BACE1. Verubecestat ha sido probada por 4 años (Evin 2016; Yan et al. 2016) y se considera en la actualidad el inhibidor de BACE1 más avanzado en ensayos clínicos. Su alta potencia y selectividad por BACE1 contra la Catepsina D limitan los efectos secundarios. Recientemente empezaron los ensayos de la Fase III.

Merck ha liderado el campo de los inhibidores de BACE1 en los últimos 5 años. Sin embargo, otras compañías empezaron el reclutamiento de participantes para las Fase II y III de sus compuestos, a saber: AZD3293 (**Figura 1-7**) y E2609 (Eisai Co. Ltd). El primero se encuentra ahora en ensayos con humanos en colaboración Lilly. AZD3293/LY-3314814 es un compuesto de doble espiro amino derivado del imidazol, el cual fue diseñado usando una estrategia basada en fragmentos. Posee biodisponibilidad oral y buena penetración al cerebro.

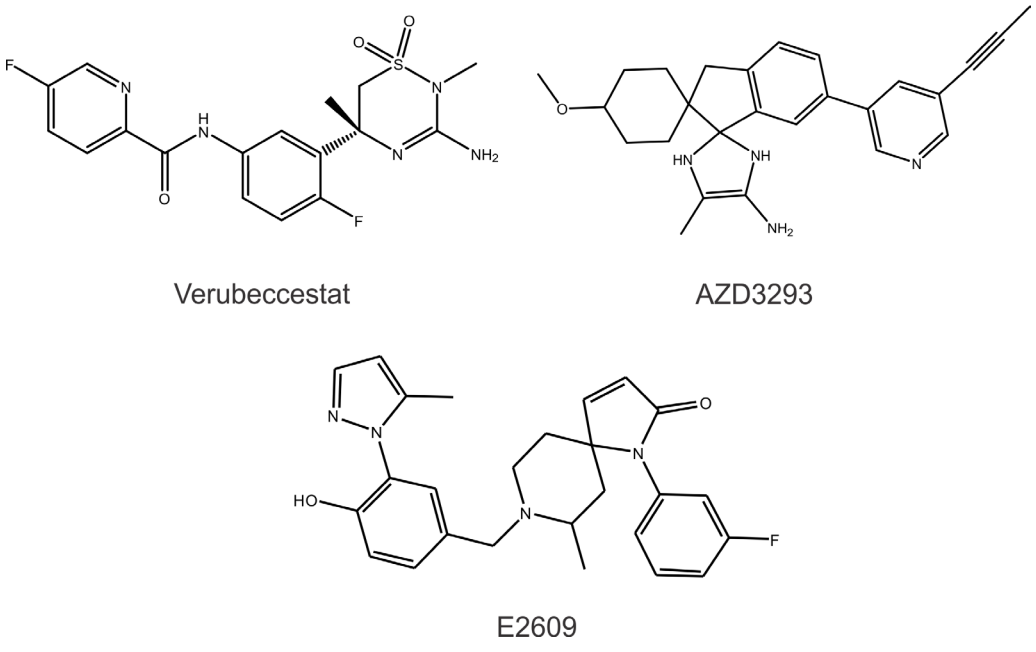


Figura 1-7. Algunos inhibidores de BACE1 que actualmente están en ensayos clínicos

Adicionalmente muestra una selectividad de 25000 veces por BACE1 comparado con la Catepsina D. Los experimentos en animales mostraron una disminución de Aβ40 y Aβ42 en el cerebro de los ratones con AD, así como en plasma y CSF de los cerdos de guinea y perros(Eketjäll et al. 2016). Por otro lado, Eisai Co. Ltd diseñó E2609 (**Figura 1-7**), un compuesto pequeño que ha probado disminuir los niveles de Aβ en los modelos animales, incluyendo ratas, cerdos de guinea y monos Rhesus (Morrone, Liu, Black & McLaurin 2015). En adición, diferentes ensayos clínicos de Fase I, realizados en Japón y USA, mostraron una disminución de Aβ de hasta 90% en plasma y 71% en CSF(Bernier et al. 2013).

1.4. HEAs como inhibidores de BACE1

Desde el 2002, más de 100 compuestos que llenaron aplicaciones para patente han revelado ser de inhibidores peptidomiméticos de BACE1 derivados de la hidroxietilamina (HEA). Los derivados de la HEA contienen un motivo conocido como inhibidor de las aspartil proteasas, siendo notable en trabajos previos su efecto como inhibidores de la proteasa del VIH y la renina. Elan y Pharmacia estuvieron entre los jugadores claves en este campo, enfocándose en inhibidores con estereoquímica (R)-hidroxi,l una variedad de grupos aril P1, en particular el fragmento 3,5-difluorofenil(Maillard et al. 2007; John et al. 2011). De manera notable, los diaesteroisomero que portaban un grupo (S)-hidroxil fueron 1000 veces menos activos que los isómeros-R. Los esfuerzos por mejorar las interacciones en los bolsillos S2 y S3 del sitio activo de la β-secretasa, siendo representativo el compuesto **1** (**Figura 1-8**), quien exhibe un IC_{50} = 20nM y una selectividad de 75 veces sobre la Captesina-D. Futuras exploraciones para mejorar las interacciones en los sitios S1-S3 condujeron a la adición de grupos más voluminosos como el benzil (compuesto **2**) y el 2-tionaftaleno.

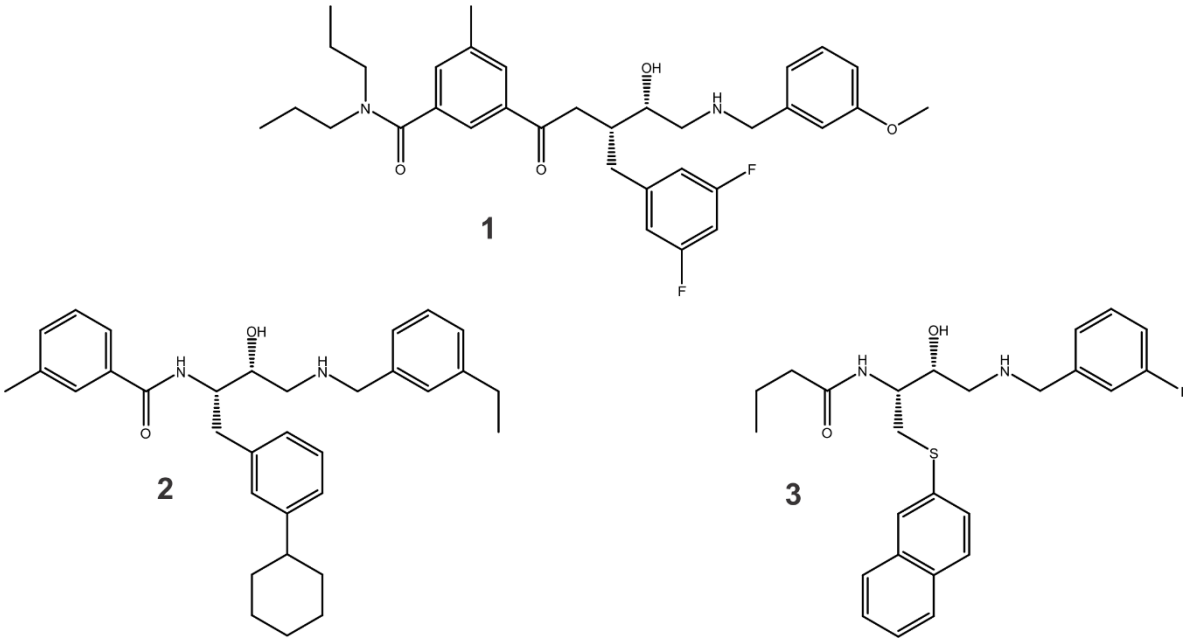


Figura 1-8. (R)-Hidroxietlaminas de Elan/Pharmacia.

Colaboraciones conjuntas se dieron entre las compañías Elan, Pharmacia y Pfizer(Vassar 2014) que llevaron a patentes donde se hicieron sustituciones a un grupo de benzil para mejorar las interacciones en S2 y S'2 del sitio activo de la β-secretasa, acompañado de grupos heterociclos en la cabeza conectados por espaciadores alquílicos. A partir del 2004, las compañías trataron de abarcar análogos truncados de sus HEA predecesoras, tapando el lado N-terminal con acetamidas (**Figura 1-9**). La intención era disminuir el peso molecular de los inhibidores con el fin de mejorar sus propiedades farmacocinéticas y permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica. Entre 2004 y 2006 Elan y Pharmacia patentaron 20 compuestos, los cuales cubrían sustituciones en R_1 tales como grupos aril, heteroaril, alquil, cicloalquil y heterocicloalquil. Por su lado Pfizer demostraba en los años 2006-2007 la progresión de los acetatos como grupos para tapar el lado N-terminal.

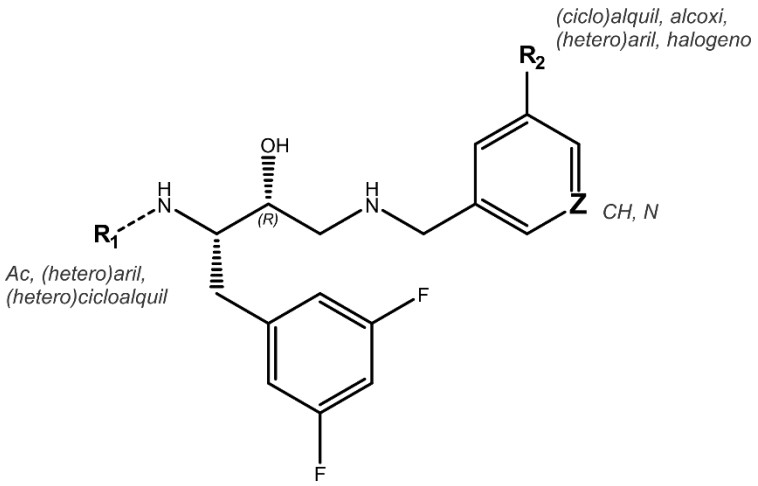


Figura 1-9. Inhibidores de BACE1 reportados por Elan, Pharmacia y Pfizer

En el año 2006, 4 aplicaciones de patente por parte de Elan y Pfizer revelaron cambios pronunciados en el grupo benzilamina (**Figura 1-10**). La supresión completa del grupo fenil conllevo a formación de compuestos como el 4 y 5, cuyos grupos N-metil conferían "*mejoramiento inesperado en la estabilidad de los microsomas del hígado*" [Kleinman & Murray, 2006a; 2006b]. Otras truncaciones en la misma zona parecen disminuir drásticamente la potencia inhibitoria de las HEA. Pfizer también preparó aminas cíclicas (Ghosh & Osswald 2014). La integración de dos grupos metilenos, adyacentes a la amina secundaria en la estructura del anillo piperidinil, mantenía el arreglo espacial de la amina secundaria, critica para el acoplamiento con los grupos aspartil en el sitio activo de BACE1. Como en patentes previas, Pfizer se enfocó eventualmente en grupos pequeños truncadores para el lado N-terminal (R_1= Ac) mientras abarcaba exploraciones con grupos heterocicloalquil y heteroaril. Es importante mencionar que otras compañías farmacéuticas han explorado modificaciones en diferentes lugares, manteniendo los grupos benzil o 3,5-difluorobezil en la estructura base de las HEA.

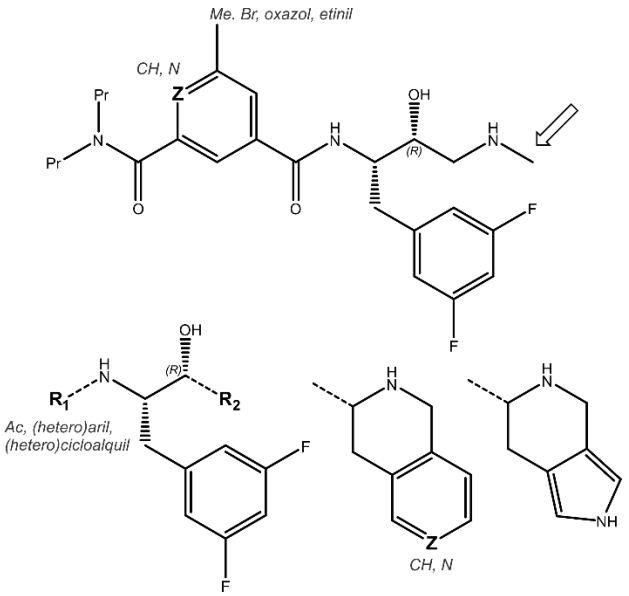


Figura 1-10. Truncaciones hechas por Elan/Pfizer.

La compañía farmacéutica GlaxoSmithKline (GSK) se centró en sustituciones secundarias de los motivos benzamida (R1 en **Figura 1-11**), al tiempo que incorporaba fragmentos principales preferidos como aril, heteroaril, cicloalquil y heterocicloalquil, reportados previamente por los trabajos de Elan y Pharmacia(Beswick et al. 2008; Charrier et al. 2008; Charrier et al. 2009; Charrier et al. 2009; Charrier et al. 2009). Aunque varios de los inhibidores reportados por GSK muestran grupos tiofenos, furanos, tiazoles, piridil y 3,5-difluorofenil en la región P1, la inmensa mayoría de los ejemplares posee un grupo fenil.

Luego de identificar la 3-(metilsulfonil)-benzamida como un buen punto de partida para los sitios S2 y S3, la mayoría de las HEAs incorporaron un motivo común sulfonamida, sultama o lactama en R2 (**Figura 1-11**). Este hecho se apoyó en las estructuras de difracción de rayos-X que revelaron un puente de hidrogeno entre un átomo de oxígeno en la sulfonamida o lactama con el fragmento NH de la cadena principal en Asn294. La importancia de esta interacción favorable fue corroborada eventualmente por la pérdida de 25 veces en potencia inhibitoria al reemplazar un grupo pirrolidinona con uno de pirrolidina(Charrier et al. 2008).

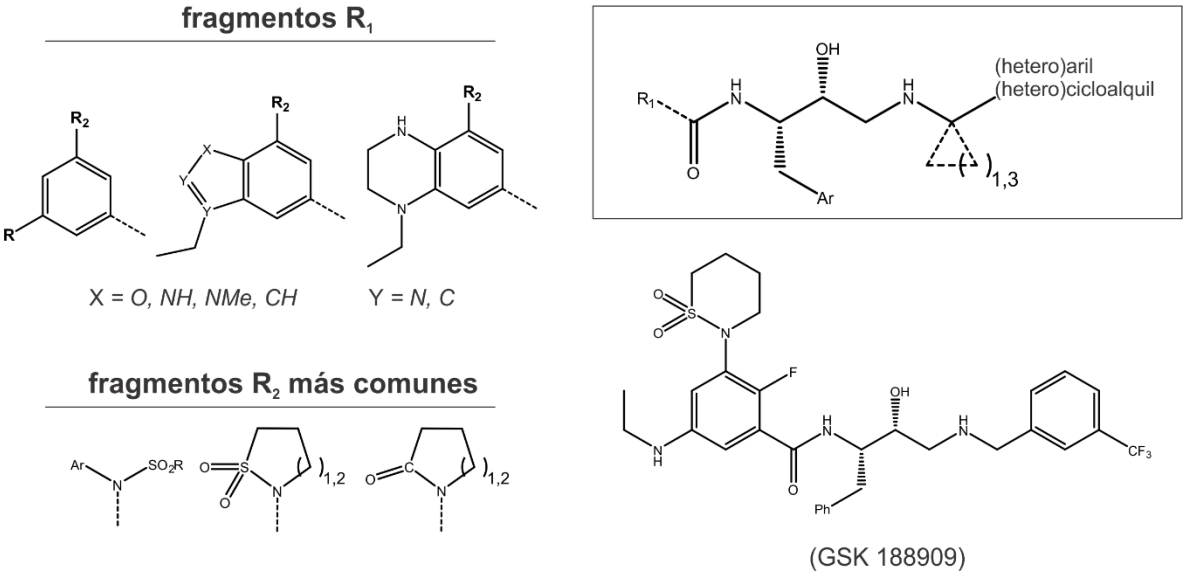


Figura 1-11. (R)-Hidroxietilaminas desarrolladas por GlaxoSmithKline (GSK).

Optimizaciones posteriores llevaron a la obtención del compuesto GSK1889909, quien exhibe buena potencia bioquímica y celular de 4nM y 21nM, respectivamente, así como 660 veces mayor selectividad sobre la catepsina D (Beswick et al. 2008; Clarke et al. 2008). Ensayos en ratones demostraron la capacidad de este compuesto para disminuir los niveles de Aβ40 y Aβ40 a través de dosis oral (Hussain et al. 2007). Futuras variaciones en las sultamas de seis y siete miembros, junto con pequeños fragmentos para capear el N-terminal (**Figura 1-12**), generaron patentes de compuestos con mejor permeabilidad de la membrana hematoencefálica y un incremento en la biodisponibilidad oral en ratas(Beswick et al. 2008; Charrier et al. 2008; Charrier et al. 2009; Charrier et al. 2009; Charrier et al. 2009).

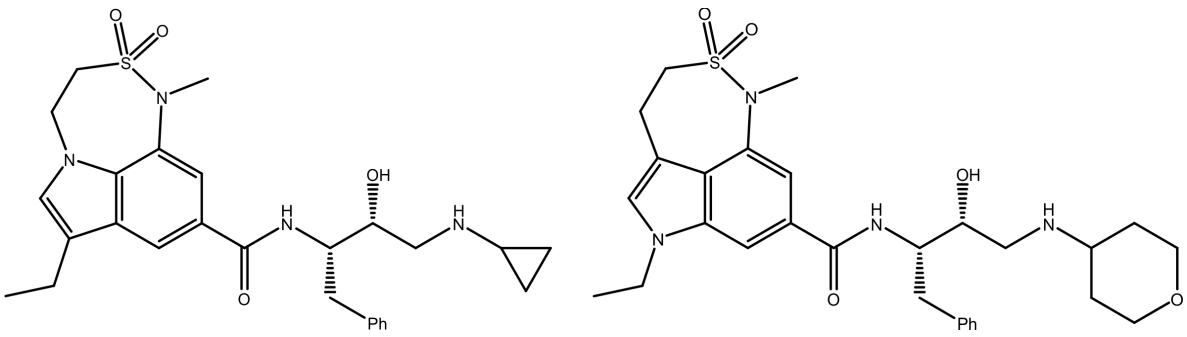


Figura 1-12. Sulfonamidas cíclicas seleccionadas por GSK.

1.5. Estudios computacionales sobre BACE1

La aplicación de las herramientas computacionales en el área de estudio de la enzima BACE1 es extensa. Los estudios sobre BACE1 se han enfocado en el entendimiento en que familias de pequeñas moléculas se acoplan al sitio activo de la aspartil proteasa, usando estructuras cristalinas de la proteína en su forma cerrada; Muchos reportes tienen como fin la creación de modelos farmacoforicos (Linning et al. 2012; Palakurti, Sriram, Yogeeswari & Vadrevu 2013; Kumar, Roy, Tripathi & Sharma 2015; Pradeep et al. 2015; Dhanabalan, Kesherwani, Velmurugan & Gunasekaran 2017), QSAR(Manoharan, Vijayan & Ghoshal 2010; Prado-Prado, Escobar-Cubiella & Garcia-Mera 2011; Chakraborty, Ramachandran & Basu 2014; Kumar et al. 2015; Zhang et al. 2017) y el cribado virtual en la búsqueda de nuevos líderes(Chakraborty et al. 2014; Kumar et al. 2015). De igual, la mejora en los sistemas de clasificación de ligandos (Polgar et al. 2007; Palakurti et al. 2013; Stamford & Strickland 2013; Chakraborty et al. 2014; Kumar et al. 2015; Crunkhorn 2016; Chéron & Shakhnovich 2017). Sin embargo, pocos estudios abordan el mecanismo de acción de BACE1 o su inhibición.

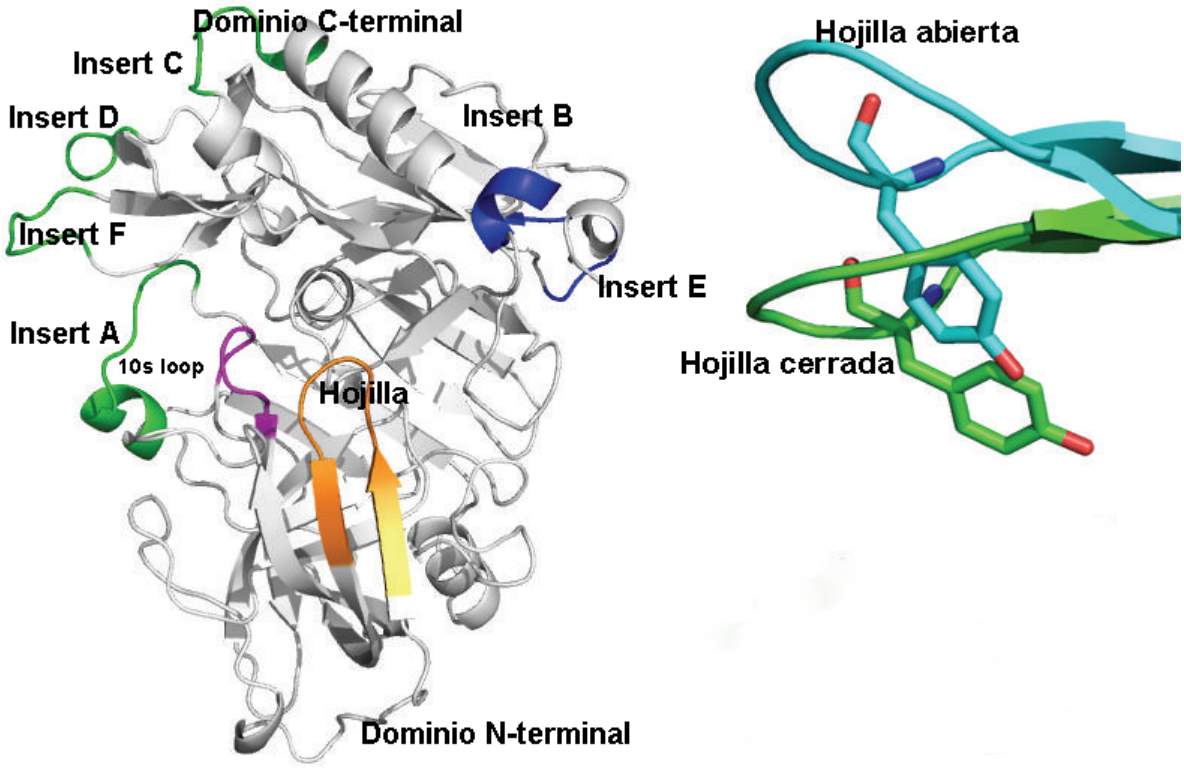


Figura 1-13. Regiones críticas de BACE1 participan en el reconocimiento del sustrato, y la orientación de la Tyr71 de la conformación abierta y cerrada de la hojilla.

Barman y Prabhakar(Barman & Prabhakar 2013), a través de estudios de dinámica molecular, sugieren que las diferencias estructurales en las regiones claves (Insert A, D, F y 10s loop) de la enzima son responsables de las diferencias observadas en la actividad de los sustratos WT- y SW (**Figura 1-13**). Las modificaciones en las regiones de hoja plegadiza, tercera hebra e Insert F, se encuentran involucradas en la alteración de la especificidad de la forma en BACE1 que acopla el glicosilafosfatidilinositol. Adicionalmente, los cálculos de QM/MM sugieren que la β-secretasa hidroliza el sustrato-SW más eficientemente que el sustrato-WT, a través del estudio del mecanismo de reacción(Barman & Prabhakar 2014), el cual sugiere que la actividad enzimática se da en dos etapas: 1) la formación de un intermediario gem-diol y 2) la ruptura del enlace peptídico. En el primer proceso ocurre con una barrera de 19.6 y 16.1 kcal/mol para los sustratos WT y SW, respectivamente.

Chakraborty y colaboradores (Chakraborty, Ramachandran & Basu 2014) reportaron el cribado virtual de liberarías de compuestos, considerando la flexibilidad en el sitio activo de BACE1, llegando a la creación de un nuevo sistema de categorización del acoplamiento molecular, basado en parámetros energéticos de interacción y flexibilidad conformacional del sitio activo de la aspartil proteasa. Polgár y Keserü (Polgar et al. 2007)reportaron la importancia de considerar los estados de protonación para los residuos de aspartatos en el cribado virtual. Años más tardes, publicaron el impacto positivo de considerar la protonación del ligando, en la eficacia del cribado (Polgar & Keseru 2011).

Una característica de esta enzima, y otras aspartil proteasas, es que el estado de protonación de la diada aspártica depende de la naturaleza química de la especie entrante al sitio activo de BACE1. La correcta modelación del sitio activo es vital para la descripción correcta del sistema. Por lo tanto, diferentes autores han reportado estudios donde se pretende determinar el estado de protonación para los sistemas BACE1-inhibidor, a través de estrategias como el acoplamiento molecular y dinámica molecular. El estado de protonación que adopta díada catalítica en la familia de las aspartil proteasas ha sido un tema de interés científico por décadas debido a la importancia de las mismas en el entendimiento del mecanismo de reacción (Hong et al. 2000; Barman et al. 2011) e inhibición (Yan et al. 2016), cribado virtual de librerías de compuestos (Polgar et al. 2007; Polgar & Keseru 2011) y diseño asistido por computadora de nuevos compuestos líderes (Vassar 2014; Evin 2016). Técnicas como Dinámica Molecular (MD) (Chakraborty & Basu 2015; Ellis & Shen 2015; Ellis et al. 2017), Docking(Sussman et al. 2011; Barman & Prabhakar 2012), cribado virtual, reacciones endodesmicas(Rajamani & Reynolds 2004; Gueto-Tettay et al. 2011) y cálculos QM/MM(Yu et al. 2006; Barman & Prabhakar 2013; Barman & Prabhakar 2014) muestran que los valores de pKa de los residuos titulables en el sitio

activo de BACE1 dependen de la naturaleza del ligando involucrado por lo que cabe la posibilidad de uno o más estados de protonación(Domínguez et al. 2010; Sussman et al. 2011), fenómeno extendido a otras familias de aspartil proteasas como la proteasa del VIH, endothiapepsina y renina (Ghosh & Osswald 2014; Vassar 2014; Evin 2016; Yan et al. 2016). Por otro lado, Kumalo (Kumalo et al. 2016; Kumalo & Soliman 2016) y otros investigadores (Mahanti et al. 2016) han enfocado sus esfuerzos en el entendimiento de los movimientos del flap y la creación de parámetros para monitorear su dinámica.

El grupo de Química Bioorgánica de la Universidad de Cartagena se suma estos esfuerzos, a través del reporte de las energías de interacción ligando-residuo para un conjunto de HEAs con 25 aminoácidos del sitio activo de BACE1 (Gueto-Tettay et al. 2011). Se empleó la teoría del funcional de la densidad (DFT) para estimar las energías de interacción para los complejos formados entre los inhibidores derivados de la hidroxietilamina y 24 residuos en el sitio activo de la enzima BACE1. Los datos recolectados ofrecieron una descripción general y particular que brinda una mirada exhaustiva, desde una perspectiva cuantitativa, a las interacciones formadas en el sitio activo de la proteína en cuestión, mostrando al mismo tiempo como son afectadas con las variaciones estructurales en el ligando. De acuerdo a los cálculos efectuados con el funcional DFT M062X y el conjunto de bases 6-311G(d,p), las interacciones polares son los mayores contribuidores a la estabilización del complejo; Se destacan aquellas interacciones formadas con los residuos cargados de aspartato, quienes a través de la formación de un contacto iónico residuo-ligando (-110.17 y -99.39 kcal/mol, en promedio, para la energía de interacción con ASP289 y ASP93, respectivamente), contribuyen 86.43% a la sumatoria de las energías de interacción promedio. Adicionalmente, la ubicación en el sitio activo de la enzima BACE1 de residuos polares como Asn294, Gln134, Thr133, Thr292, Thr293, Tyr132, conllevan a la formación de contactos polares y/o puentes de hidrógenos por su cadena principal/lateral con diversos fragmentos de los ligandos derivados de la hidroxietilamina, exhibiendo así, valores favorables de energía de interacción promedio (-5.58, -9.99, -5.09, -6.39, -8.47 y -4.89 kcal/mol, respectivamente), complementando la red de interacciones polares presentes en el sitio activo de la enzima BACE1. En contraste, la interacción con el residuo Arg296 resulta en una gran repulsión ión-ión (28.92 kcal/mol en promedio) producto de la naturaleza positiva de las especies interactúantes. Junto con el residuo Asn294, permite brindar una explicación cuantitativa del porque las sultamas son, en general, mejores inhibidores que las lactamas; La presencia de dos átomos de oxígeno convierte a las sultamas en mejores aceptores de puentes de hidrógeno, por lo que mejora la interacción con el residuo Asn294, al tiempo que compensa

mejor la deficiencia de densidad electrónica del residuo cargado positivamente Arg296. La disminución de la repulsión con Arg296 podría ser un aspecto clave en estrategias que apunten al diseño de mejores inhibidores de la enzima en cuestión. Adicionalmente, las interacciones hidrofóbicas juegan un papel crucial hacia la zona denominada S1 en el sitio activo, donde interactúan con un grupo fenil, fragmento común en todos los ligandos.

Por otra parte, la comparación de diferentes funcionales DFT (X3LYP y M062X), usando el nivel de teoría MP2 como estándar para fuerzas electrostáticas más dispersiones, muestra que los funcionales obtienen solo valores comparables para las interacciones con los residuos cargados (Asp289, Asp93 y Arg296), mientras exhiben discrepancias con residuos de otra naturaleza. Al contrastar con MP2 aquellos resultados que presentan grandes diferencias en las energías de interacción, se observa que el funcional M062X hace una buena descripción para las interacciones hidrofóbicas, obteniendo valores comparables a los arrojados con el MP2 a un bajo costo computacional.

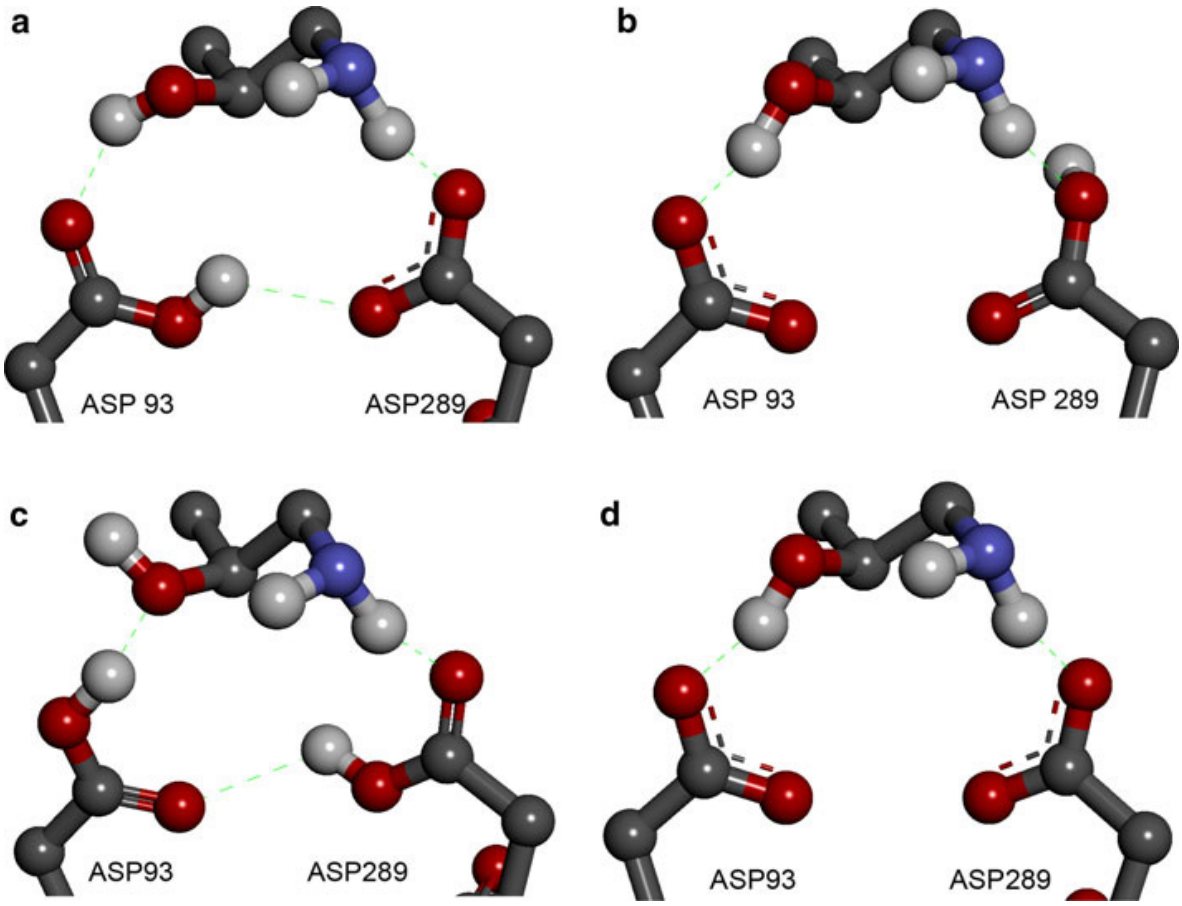


Figura 1-14. Interacción del isostero HEA con las configuraciones posibles de estados de protonación para la diada de espartatos.

Adicionalmente, se reportó, por medio de un conjunto de reacciones homodesmicas, el estado de protonación para los residuos y ligandos más probable a la hora de forma el complejo proteína-ligando (**Figura 1-14**). Más aún, haciendo uso de un ciclo termodinámico y un análisis de energía potencial para la rotación del ángulo diedro del grupo hidroxilo que portan los ligandos (**Figura 1-15**), se ha descrito que ocurre con el ligando una vez se protona dentro del sitio activo, donde la orientación del grupo hidroxilo del isóstero de las HEAs es fundamental para la interacción con Asp93, una de las principales interacción ligando-residuo, con un aporte de 45-50% de la interacción favorable total.

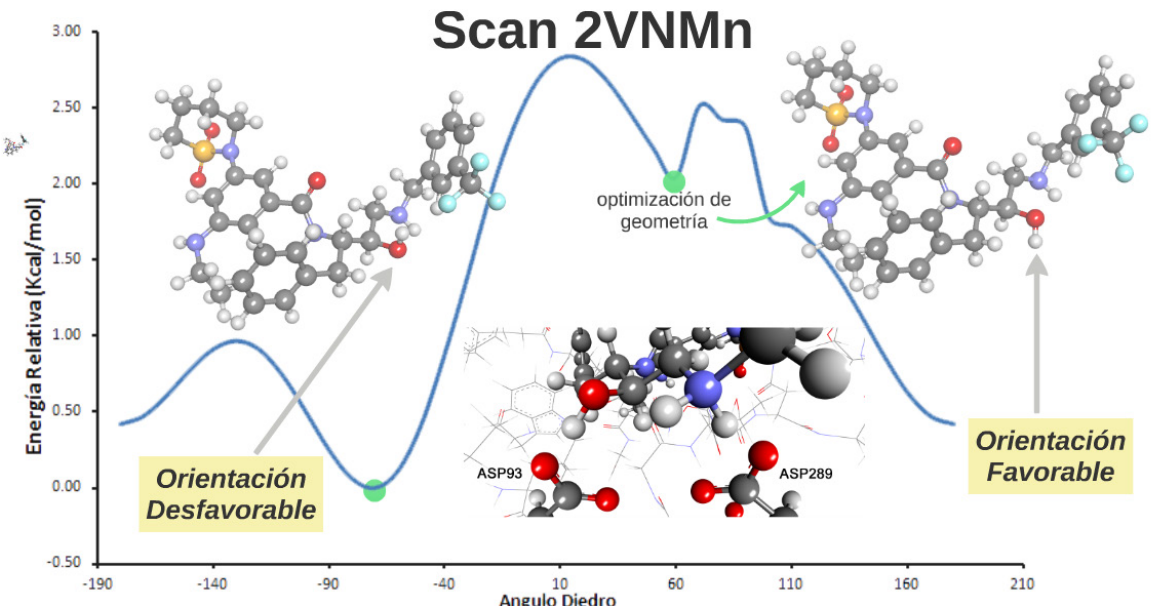


Figura 1-15. Análisis de energía potencial para el ángulo diedro del grupo OH del inhibidor 2VNM.

A pesar del gran esfuerzo en el diseño y síntesis de HEA inhibidoras de la β-secretasa, no se tiene una visión clara del mecanismo inhibitorio de esta familia importante de ligandos sobre esta enzima. Se han desconocido posibles factores como los estados de protonación en la diada y el inhibidor, así como los cambios conformacionales que sufre la proteína y como estos, se ven afectos por las modificaciones estructurales en las HEA influyen. Es decir, la mayoría de los estudios BACE1-ligando se basan en la forma cerrada de la enzima, desconociendo la influencia de los eventos previos, tales como la afinidad inicial de los inhibidores a BACE1 en su forma apo o la capacidad de los mismos para inducir el cierre del flap en la proteasa de estudio. Como

consecuencia, también se desconocen los cambios energéticos asociados a estos cambios geométricos. Es necesario entonces realizar experimentos que nos permitan resolver los aspectos químicos, geométricos y energéticos del sistema BACE1-HEA con el fin de explorar el camino inhibitorio de la β-secretasa. En este orden de ideas, los experimentos computacionales o *"in silico"* surgen como una estrategia tangible para el entendimiento de los eventos moleculares relacionados con la inhibición de BACE1 por parte de las HEAs. Las simulaciones de Dinámica Molecular (MD, por sus siglas en ingles *Molecular Dynamics*) servirán para estudiar los cambios conformacionales que puede sufrir la proteasa aspártica de estudio tras la llegada de las HEAs a su sitio activo. Una vez entendido el mecanismo, será posible entender su panorama energético basado en métodos semiempírico, quienes ha tenido un desarrollo y mejoras importantes en la descripción de interacciones no-enlazantes, las cuales dominan los sistemas proteína-ligando. Esta información permitirá asistir la creación de mejores reglas de diseño de inhibidores de BACE1.

1.6. Consideraciones del sistema BACE1-HEA

Para hacer la correcta exploración del camino inhibitorio de BACE1 es necesario considerar dos aspectos de sistema: 1) los estados de protonación de las especies y 2) cambios conformaciones de BACE1; Se ha reportado que el estado de protonación de la diada aspártica depende de la naturaleza química del sustrato o inhibidor, el cual permite la estabilidad proteína-ligando (Park & Lee 2003; Rajamani & Reynolds 2004; Yu et al. 2006; Polgar et al. 2007; Domínguez et al. 2010; Barman & Prabhakar 2012; Kocak et al. 2016; Sabbah & Zhong 2016). Sobre las HEAs, como inhibidores de la β-secretasa, se tiene certeza de que actúan como aminas protonadas dentro del sitio activo de la enzima. Por otro lado, la β-secretasa, como miembro de la familia de las aspartil proteasas(Hong & Tang 2004; Hornak, Okur, Rizzo & Simmerling 2006; Ishima & Louis 2008; Spronk & Carlson 2011; Cai, Kurt Yilmaz, Myint, Ishima & Schiffer 2012; Xu et al. 2012; Bras et al. 2014; Chakraborty & Basu 2015; Karubiu, Bhakat, McGillewie & Soliman 2015; Arodola & Soliman 2016; Kumalo et al. 2016; Kumalo & Soliman 2016; Mahanti et al. 2016), presenta dos conformaciones, una forma apo o inactiva y la cerrada(Hong & Tang 2004; Spronk & Carlson 2011; Xu et al. 2012; Chakraborty & Basu 2015; Kumalo et al. 2016; Mahanti et al. 2016). Estas formas se distinguen por la orientación del flap, una horquilla antiparalela que cubre su sitio activo, lugar donde se halla la diada Asp. En la forma apo de BACE1, el flap permite la entrada de especies al sitio activo. La formación de nuevas interacciones con el ligando entrante induce un cambio conformacional en la enzima hasta su forma cerrada. Este cierre del flap es necesario para la correcta función enzimática. Más aún, en la actualidad se cuenta con estructuras cristalinas de BACE1, en su forma cerrada, co-cristalizadas con HEAs.

Cuando analizamos y compilamos estos factores se generan dos tipos de modelos: El modelo 1, que solo considera un cambio conformacional en la proteína y donde no ocurre ningún tipo de transferencia protónica. Como consecuencia, el ligando debe ser protonado por el medio y no por la proteína. Por otro lado, para el modelo 2 deben ocurrir simultáneamente un cambio geométrico en BACE1 y una transferencia protónica, de uno de los residuos Asp catalíticos, a la HEA, quien inicialmente se hallaba como una amina neutra.

Sin importar el tipo de modelo inhibitorio, es importante añadir que las posibilidades se extienden al considerar que la protonación de la cadena lateral de Asp puede darse en ambos, uno o ningunos de los residuos catalíticos. Esto genera modelos neutros (diprotonados), aniónicos (monoprotonados) y dianiónico (di-desprotonado).

Se hace importante entonces trazar metodologías que permitan la extracción de información que conlleven a la elucidación de la dinámica del mecanismo inhibitorio de BACE1 por parte de las HEAs.

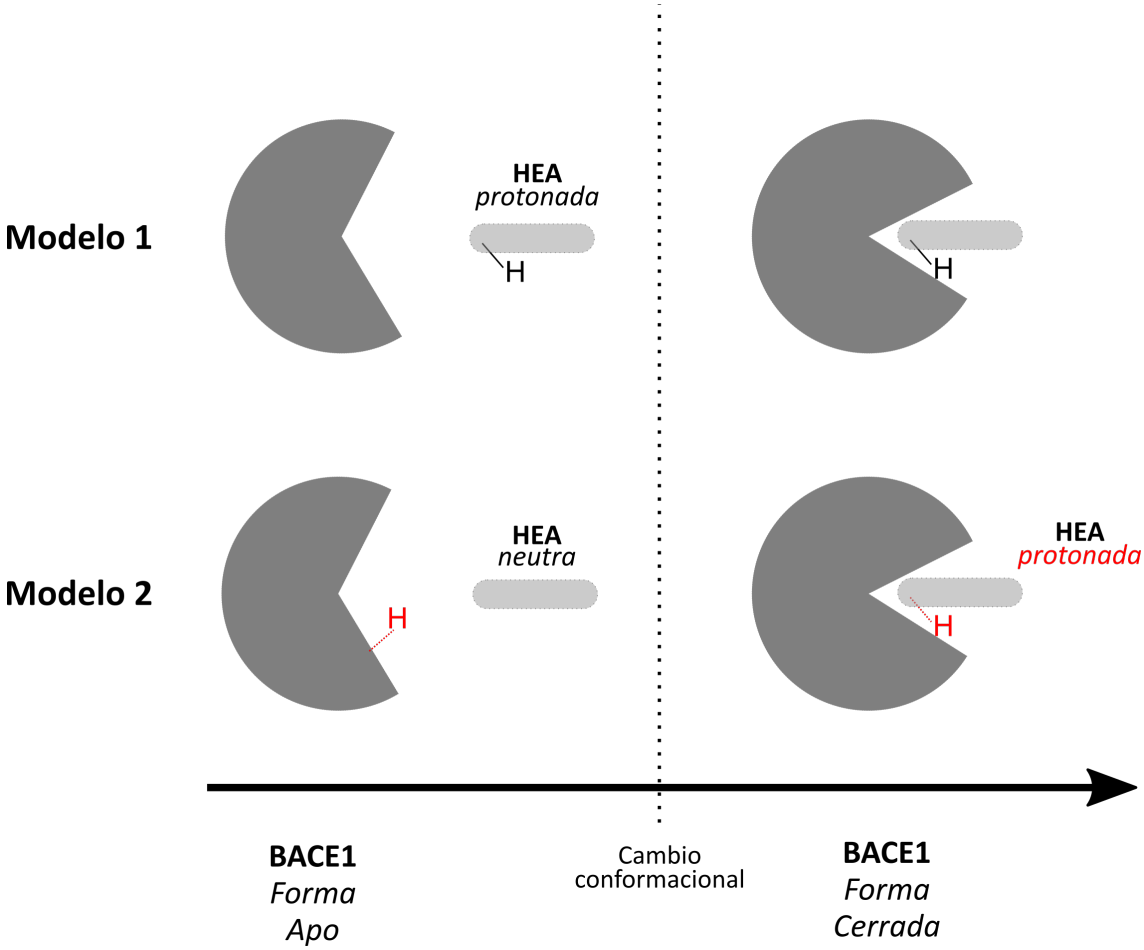


Figura 1-16. Modelos posibles de inhibición de BACE1 por las HEAs. El modelo 1 solo se considera un cambio conformacional de la proteína, conservando los estados de protonación inicial. En el modelo 2, BACE1 sufre un cambio geométrico acompañado por una transferencia protónica hacia el inhibidor.

OBJETIVOS DEL TRABAJO

---

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Explorar el mecanismo inhibitorio de la β-secretasa por parte de las Hidroxietilaminas empleando técnicas de modelado molecular asistido por computadoras.

2.2. Objetivos Específicos

- Validar que el estado de protonación final más probable para la diada catalítica en los complejos BACE1-HEA es di-deprotonado (AspUP) a través de estudios de Dinámica Molecular proteína-ligando.
- Determinar el sitio de protonación de las Hidroxietilaminas y su relación con el mecanismo inhibitorio de BACE1.
- Establecer una línea cronológica de eventos del mecanismo inhibitorio de BACE1 por parte de las Hidroxietilaminas.
- Explicar las diferencias de actividad inhibitoria en función de las energías de interacción residuo-ligando dinámicas.
- Crear herramientas computacionales de minería de datos que permitan mejorar la descripción geométrica y energética del sistema BACE1-HEA, con potencial aplicación en otros sistemas proteína-inhibidor.

METODOLOGÍA

_____

3. Metodología

Para la elucidación «*in silico*» del camino inhibitorio de la β-secretasa por parte de las HEAs se consideró los cambios conformacionales que presenta la enzima cuando está inactiva (forma Apo o abierta) e inhibida (cerrada), y los respectivos estados de protonación de la diada aspártica y el ligando en cada etapa. De tal manera que la asignación correcta de estados de protonación en las especies de interés permitió el cambio conformacional de BACE1, de su forma apo a cerrada, tras la llegada de las HEAs al sitio activo de la proteína. Más aún, estas configuraciones de estados de protonación fueron aquellas que presentaron menores desviaciones respecto a las estructuras cristalinas reportadas de BACE1(cerrada) en complejo con HEAs, quienes sirvieron como referencias. Una vez establecidas las cargas en la diada catalítica e inhibidor se procedió a brindar explicaciones de las diferencias en actividad biológica, haciendo uso de parámetros geométricos y energéticos.

Para lograr estos 3 objetivos se realizaron una serie de procesos generales, cuyos protocolos fueron transversales en la metodología presentada en el presente trabajo de investigación, a saber: la preparación de la proteína y ligando, acoplamiento molecular proteína-ligando (docking) y dinámica molecular. Estos se procesos se describen en la sección 3.1. Por otro lado, las metodologías específicas se describen en las secciones siguientes, tales como la confirmación de los estados de protonación final (sección 3.2), determinación de la configuración inicial diada aspártica-ligando (sección 3.3) y la comparación de diferentes HEAs para inducir el cierre del flap (sección 3.4).

3.1. Protocolos Generales

3.1.1. Modelado Molecular

3.1.1.1. Preparación de la proteína

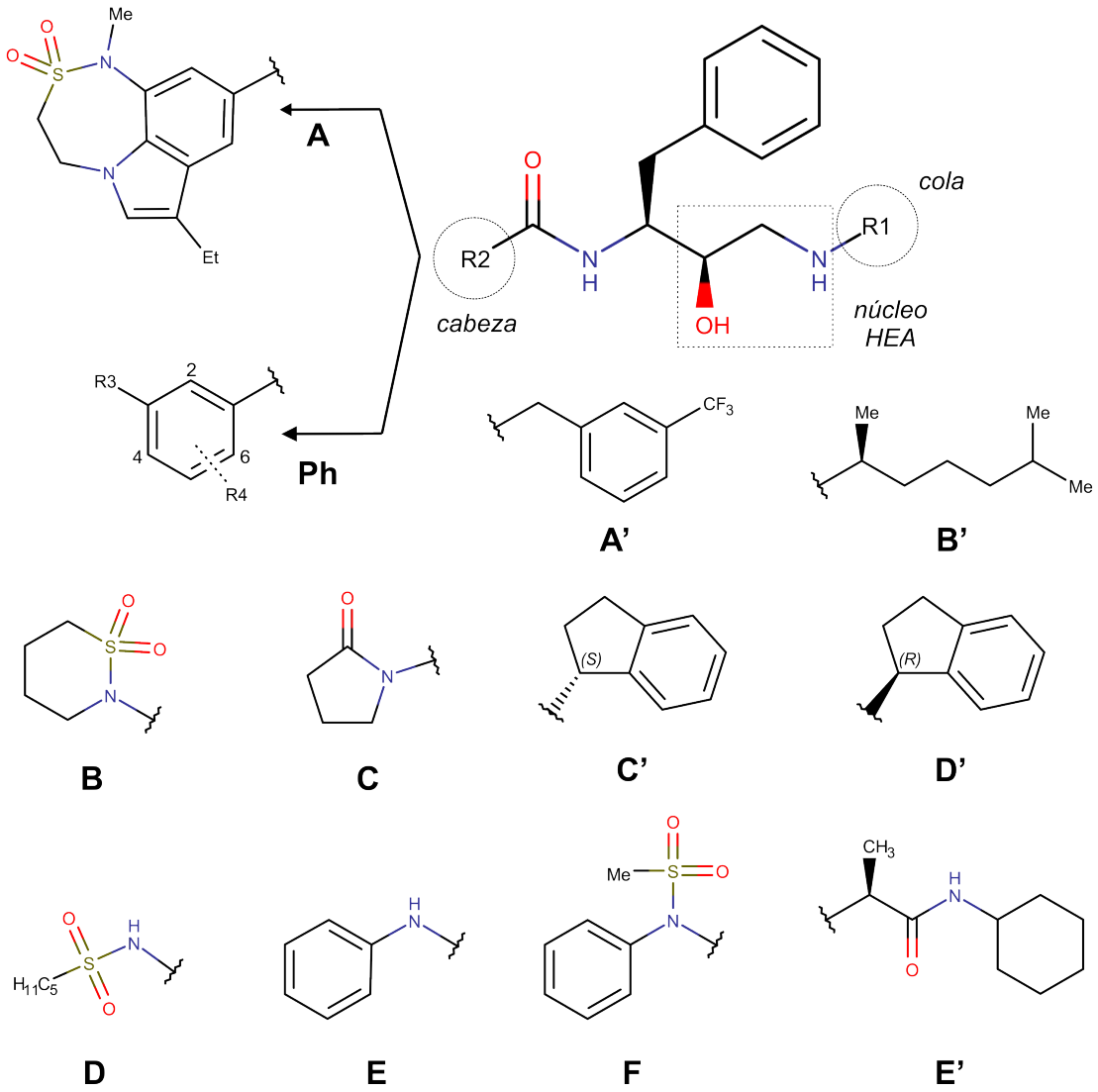
Las estructuras de la β-secretasa en sus formas apo (abierta) o cerrada se tomaron de la base de datos Protein Data Bank (PDB). El programa MODELLER(Webb & Sali 2014) se usó para insertar y optimizar segmentos faltantes en la cadena peptídica (Gly217-Ala229), tras alinear a la secuencia de la isoforma A (Uniprot ID: P56817-1) con las estructuras de BACE1 y el segmento de interés de otra estructura de rayos-X (PDB ID: 1FKN)(Hong et al. 2000), usando el software UCSF Chimera(Pettersen et al. 2004) como interfaz gráfico.. Las cadenas laterales de los residuos ionizables de Glu, Asp (diferentes a la díada catalítica, Asp93 y Asp289), Lys y Arg se modelaron como cargadas, mientras que las His se mantuvieron neutras.

Para el estado de protonación para la díada catalítica, Asp93 y Asp289, se consideraron los 9 estados de protonación posibles, esto es, 4 neutros (diprotonados), 4 aniónicos (monoprotonados) y 1 dianiónico (di-deprotonado), siguiendo la nomenclatura que se muestra en la **Figura 3-1**.

3.1.1.2. Preparación de las HEAs

Las estructuras de las HEAs de estudio se muestran en la ***Tabla 3-1***. La actividad biológica, medida como IC_{50}, fueron determinadas bajo las mismas condiciones experimentales por GlaxoSmithKline (GSK)(Hussain et al. 2007; Beswick et al. 2008; Clarke et al. 2008; Clarke et al. 2008; Clarke et al. 2008; Charrier et al. 2008; Charrier et al. 2009; Charrier et al. 2009; Charrier et al. 2009; Clarke et al. 2010). Adicionalmente, estas sirvieron como plantillas para el modelado de las restantes. A todas las estructuras se le añadieron átomos de hidrogeno a través del programa Discovery Studio Visualizer (http://accelrys.com). Seguido, se ejecutó una optimización general para la corrección de distancias, ángulos y diedros empleando el método semiempírico PM7 (SQM-PM7)(Stewart 2013; Martin, Brandon, Stewart & Braun-Sand 2015) empleando el programa MOPAC2016 (http://openmopac.net/). De acuerdo a Stewart, este método fue parametrizado empleado estructuras cristalinas, así como aquellas resultantes de cálculos *ab initio* de altos niveles de teoría(Stewart 2013; Martin et al. 2015; Stewart 2017).

Tabla 3-1. Fragmentos de la cabeza y cola para las HEAs de estudio.



ID	IC_{50} (nM)	R1	R2	R3	R4
H1	2	A'	A	-	-
H2	3	A'	Ph	B	5-NH(Et)
M1	33	B'	Ph	C	5-NH(Et)
M2	160	C'	Ph	C	5-NH(Et)
L1	1800	E'	Ph	D	-
L2	3470	A'	Ph	F	6-Me
L3	6300	E'	Ph	E	-
L4	34670	D'	Ph	C	5-NH(Et)

3.1.2. Acoplamiento molecular (docking) proteína-ligando

El acoplamiento molecular de las HEAs dentro del sitio activo de BACE1 se hizo a través del programa Autodock 4.2(Morris et al. 2009; El-Hachem, Haibe-Kains, Khalil, Kobeissy & Nemer 2017). El algoritmo Genético Lamarckiano (LGA) se empleó para efectuar la búsqueda conformacional del ligando dentro del bolsillo catalítico. Para garantizar que se hiciera una búsqueda exhaustiva, los parámetros para las evaluaciones y generaciones se ajustaron a 25 millones y 270 mil, respectivamente. El software Autodock Tools(Morris et al. 2009) fue utilizado como interfaz gráfico para la preparación del sitio de búsqueda, el cual fue una caja de 60Å x 80Å x 60Å que incluyó residuos que forman interacciones BACE1-HEA favorables, tales como Gly95, Asp93, Asp289, Gly291, Thr293, y Asn294(Gueto-Tettay et al. 2011). La afinidad de acoplamiento (*binding energy*) se usó como criterio de selección del mejor resultado luego de 200 corridas independientes de docking(Huey, Morris, Olson & Goodsell 2007; Morris et al. 2009; El-Hachem et al. 2017).

3.1.3. Simulaciones de Dinámica Molecular

Todas las simulaciones de dinámica molecular (MD) se llevaron a cabo usando el software GROMACS 5.1(Berendsen, van der Spoel & van Drunen 1995; Van Der Spoel et al. 2005; Pronk et al. 2013; Abraham et al. 2015), utilizando el campo de fuerza AMBER03(Cornell et al. 1995; Duan et al. 2003; Wang, Wolf, Caldwell, Kollman & Case 2004; Wang, Wang, Kollman & Case 2006). La topología de los inhibidores se construyó en un tándem de cálculos en los software Gaussian09 (http://gaussian.com) , Antechamber(Wang et al. 2004; Wang et al. 2006) y Acpype[Sousa da Silva & Vranken, 2012]. En todas las simulaciones, los hidrógenos faltantes se añadieron y la proteína se sumergió en una caja cúbica de 92Å de lado llena de aguas tipo TIP3P(Mahoney & Jorgensen 2000), lo cual aseguraron al menos 12Å entre las fronteras de la caja de agua y algún átomo-soluto. La carga total se neutralizó añadiendo contraiones de sodio o cloruro. Adicionalmente, el sistema tuvo una concentración salina fisiológica de 154mM. Las simulaciones del sistema (proteína, ligando, agua e iones) se llevaron a cabo de acuerdo al siguiente procedimiento. En el primer paso, se realizó una minimización (EM) por el método de steepest descent por 10000 pasos para corregir posibles clashes estéricos. El criterio de convergencia se ajustó para que la fuerza máxima fuera menor que 500 kJ/mol/nm. En el segundo paso, se equilibró la posición del solvente (agua) e iones alrededor del complejo proteína-ligando manteniendo la posición de los átomos pesados fija, permitiendo la entrada de las aguas a la proteína y ajustar su posición alrededor de ella. Esto se logró haciendo dos

simulaciones MD de 500ps consecutivas a condiciones canónica e isotérmica-isobárica, esto es, con el conjunto NVT (Número de partículas, Volumen y Temperatura constante) y NPT (Número de partículas, Presión y Temperatura constante) respectivamente. Por último, se liberaron las restricciones y la estructura resultante se usó como punto de partida para una simulación MD. Los algoritmos LINCS(Hess, Bekker, Berendsen & Fraaije 1997) y SETTLE(Miyamoto & Kollman 1992) se emplearon para aplicar constricciones a las distancias de enlace en los péptidos y moléculas de agua, respectivamente, mientras que las interacciones electrostáticas de largo rango se calcularon por el método particle-mesh Ewald (PME)(Darden, York & Pedersen 1993; York, Wlodawer, Pedersen & Darden 1994). Se aplicaron condiciones fronteras (PBC) y la ecuación de movimiento se integraron a un intervalo de tiempo de 2fs. Las herramientas disponibles en el programa GROMACS se usaron para el análisis de las diferentes trayectorias MD, mientras que los software UCSF Chimera, Visualizer Molecular Dynamics (VMD)(Humphrey, Dalke & Schulten 1996) y Discovery Studio Visualizer fueron usados extensamente para la visualización y preparación de los diagramas presentados en este estudio.

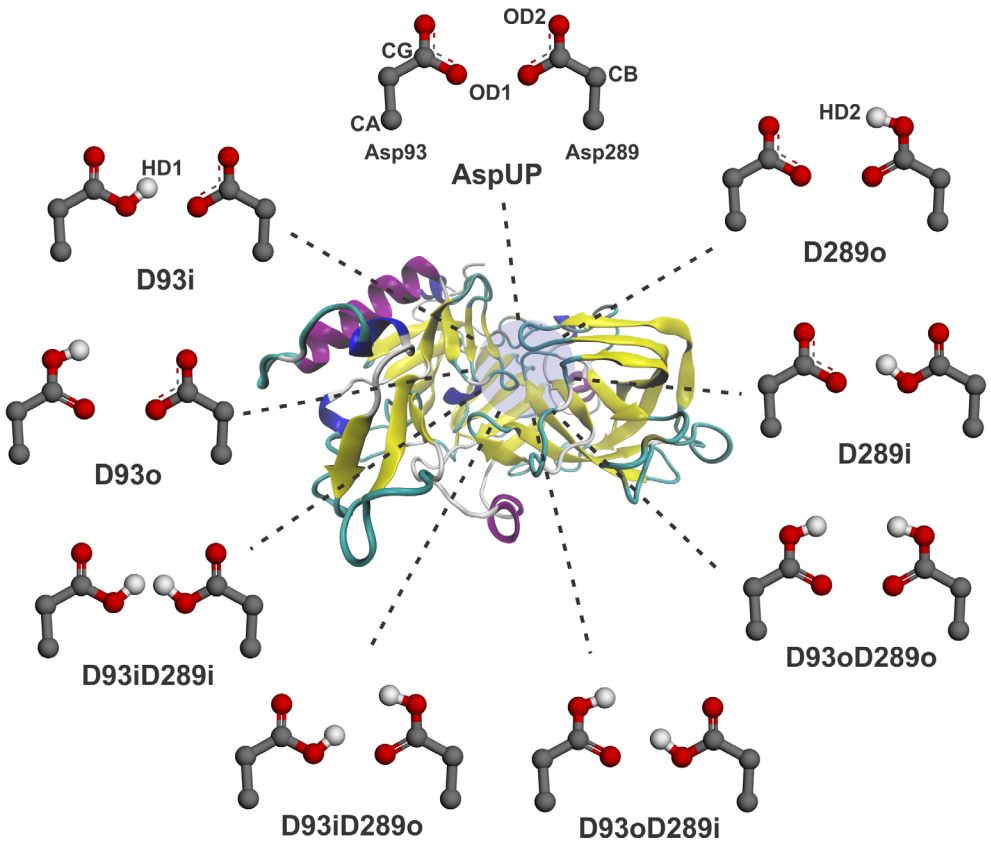


Figura 3-1. Posibles configuraciones de estados de protonación para la díada asprtica Asp93 (D93) y Asp289 (D289). La protonación de la cadena lateral puede ocurrir en el átomo de oxígeno interno (i) o externo (o).

3.2. Confirmación del estado de protonación final para los complejos BACE1-HEA

Actualmente se cuenta con una serie de estructuras co-cristalizadas entre la β-secratasa y las hidroxietilaminas. Se asume que previo al momento de la cristalización ocurrieron una serie de eventos que llevaron a que la enzima quedará bloqueada o inhibida, por lo que la determinación del estado de protonación para el par BACE1/HEA en este punto nos brindó información sobre el estado de los productos o final en su mecanismo inhibitorio. Para lograr esto, se tomó un complejo del sistema compuesto por la enzima BACE1, en su forma cerrada, en complejo con una HEA de alto poder inhibitorio del conjunto de estudio, H2 ($IC_{50} = 3nM$,***Tabla 3-1***). La estructura cristalina se descargó del Protein Data Bank bajo el código 2VNM(Charrier et al. 2008). Seguido, la proteína y el ligando se prepararon siguiendo la metodología descrita en las secciones 3.1.1.1 y 3.1.1.2, respectivamente. Para la exploración de los estados de protonación en la diada aspártica, se consideraron las 9 configuraciones posibles (**Figura 3-1**), esto es, neutras (D93oD289o, D93iD289i, D93iD289o y D93oD289i), monoprotonadas (D93i, D93o, D289i, D289o) y la di-deprotonada (AspUP). El ligando H2, una molécula representativa de las HEAs, se modeló como una amina protonada (Lp)(Beswick et al. 2008; Clarke et al. 2008; Clarke et al. 2008; Clarke et al. 2008; Charrier et al. 2008; Charrier et al. 2009; Charrier et al. 2009; Charrier et al. 2009; Clarke et al. 2010; Gueto-Tettay et al. 2011). Para lograr discernir cuál es el estado de protonación más probable entre las 9 configuraciones posibles, se exploraron una serie de parámetros estáticos y dinámicos sensibles al estado de protonación tales como distancias, ángulos diedros, desviación cuadrática media (rmsd por sus siglas en inglés *root-mean-square-deviation*)(Kabsch 1976; Coutsias, Seok & Dill 2004), entre otros. Los parámetros estáticos se basan o son medidos sobre la estructura más representativa de la simulación de MD, mientras que los dinámicos se miden a lo largo de la trayectoria. Ambos tipos pueden ser medidos sobre el ligando, la proteína o el complejo proteína-ligando. El estado de protonación más adecuado para los complejos BACE1/HEA fue aquel que presentó menores desviaciones respecto a la estructura cristalina 2VNM, este fue la configuración LpAspUP (HEA protonada y diada aspártica di-deprotonada).

3.2.1. Calculo de docking y optimización del sistema

Simulaciones de acoplamiento molecular seguido de optimización con el método de mecánica cuántica semiempírica (SQM) se emplearon para validar el estado de protonación de la diada aspártica obtenido del análisis MD; El docking de 3 estructuras de HEAs no cristalográficas en el sitio activo de la β-secretasa usando el estado AspUP se llevó a cabo para comprobar que los

modos de unión son similares a los reportados experimentalmente, mientras que la optimización, por el método SQM, del sitio activo se comprobar la estabilidad de los complejos BACE1-HEA. Los métodos SQM son capaces de maneras grandes sistemas y considerar los efectos de transferencia protónica y polarización durante sus cálculos(Stewart 2009; Stewart 2013; Yilmazer & Korth 2015; Stewart 2017). Las estructuras de las HEA 2VIE, 2VNM y 2WF1 se emplearon como plantillas el proceso de dibujo de los ligandos V207, V317 y N323 (**Anexo II**). El proceso acoplamiento molecular de los ligandos se hizo acorde al protocolo descrito en la sección 3.1.2. La mejor pose, de acuerdo a la energía de acople reportada por Autodock, se empleó como estructura de partida para el protocolo optimización de dos etapas, al nivel de cálculo SQM PM7 a través del programa MOPAC2016. El método PM7 incluye termino de corrección para dispersión y puentes de hidrogeno(Stewart 2013; Stewart 2017). El método de los Orbitales Moleculares Localizados (MOZYME) se empleó para el tratamiento de estos sistemas biomoleculares(Stewart 2009), mientras que el método COSMO se usó como modelo para simular el efecto del agua rodeando el sistema macromolecular(Klamt & Schüürmann 1993). En el primer paso del protocolo, solo se consideraron la posición de los protones con el fin de mejorar las interacciones no-enlazantes en el complejo proteína-ligando. En el paso final, el sitio activo de BACE1 se optimizó al considerar solo los residuos dentro de 7Å de la posición de las HEA como activas mientras que el resto del sistema se consideró fijo.

Los resultados de esta sección se describen en el Capítulo 4 (Pagina 55).

3.3. Determinación de la configuración inicial de estados de protonación BACE1-HEA.

El sitio activo de BACE1 se halla cubierto por una horquilla antiparalela conocida como flap. Este cumple una función importante en el reconocimiento de los ligados o sustratos. En general, cuando sitio activo está inactivo, el flap se mantiene en su conformación abierta. Sin embargo, tras la entrada de ligandos al sitio catalítico, el flap cierra y se estabiliza al formar nuevas interacciones proteína-ligando(Hong & Tang 2004; Spronk & Carlson 2011; Xu et al. 2012; Chakraborty & Basu 2015; Kumalo et al. 2016; Mahanti et al. 2016).

Para la determinación de la configuración de estados de protonación BACE1-HEA en esta etapa se hará la comparación de que tanto, una determinada configuración, induce el proceso del cierre del flap. Para ello se usaron dos estructuras de BACE1: una en su forma Apo y otra cerrada o inhibida. La primera sirvió como punto de partida para las simulaciones, mientras que la forma

inhibida se empleó como referencia sobre las condiciones, en términos de parámetros de distancias proteína-proteína y proteína-ligando, que debía alcanzar el sistema. Para este estudio, se consideraron 5 combinaciones, a saber: LnAsp93, LnAsp289, LpAsp93, LpAsp289 y LpAspUP (**Figura 3-2**). La estructura de la forma Apo y cerrada en complejo con la HEA H2 (***Tabla 3-1***) de la proteasa se descargaron del Protein Data Bank bajo los códigos 1W50(Patel, Vuillard, Cleasby, Murray & Yon 2004) y 2VNM(Charrier et al. 2008), respectivamente. La preparación de BACE1 se realizó acorde al protocolo descrito en la sección 3.1.1.1. La secuencia de la isoforma A de BACE1 (Uniprot ID: P56817-1) se usó como referencia para la numeración de la cadena principal. En esta, la diada aspártica está numerada como Asp93 y Asp289.

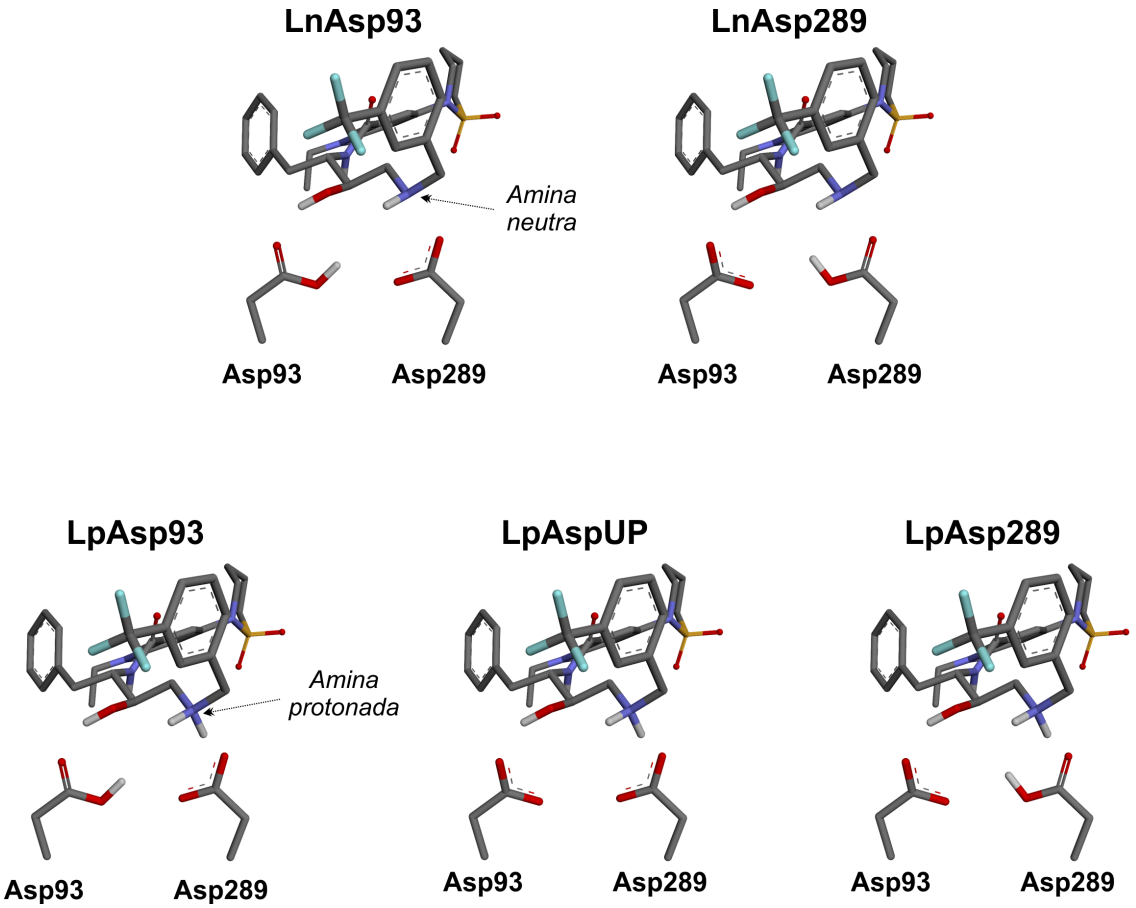
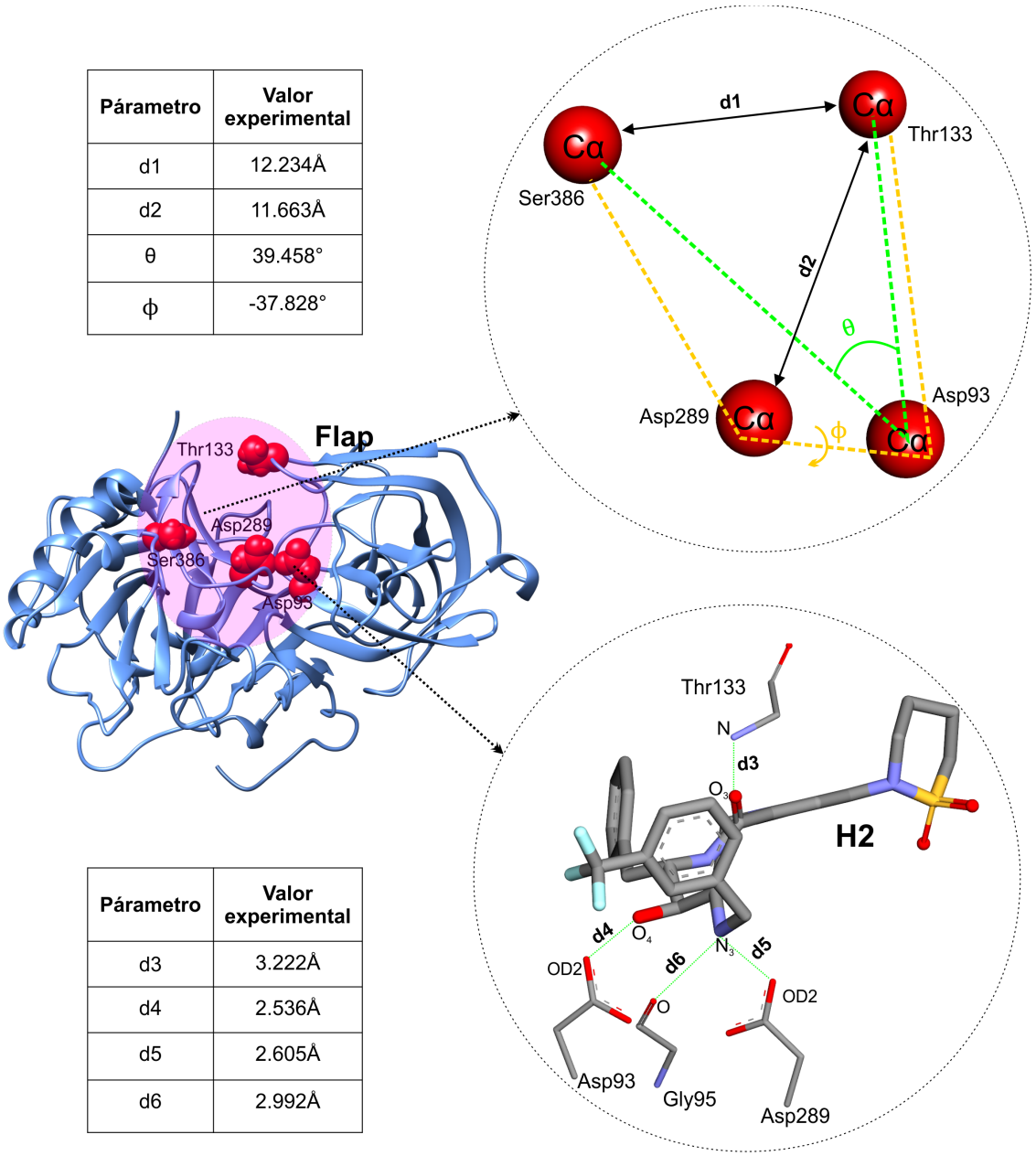


Figura 3-2. Esquema de protonación para el ligando (H2) y la diada aspártica (BACE1). El ligando puede ser una amina neutra (Ln) o protonada (Lp), mientras que la diada puede ser monoprotonada (Asp93 o Asp289) o di-desprotonada (AspUP).

Para cada una de las configuraciones de estados de protonación (**Figura 3-2**) se hizo el acoplamiento molecular del ligando dentro del sitio activo de BACE1, en su conformación abierta. La mejor pose se usó como punto de partida para las simulaciones de Dinámica

Molecular de 70ns. Los parámetros empleados para las simulaciones de docking y dinámica molecular se describen en las secciones 3.1.2 y 3.1.3, respectivamente.

Párametro	Valor experimental
d1	12.234Å
d2	11.663Å
θ	39.458°
ϕ	-37.828°



Párametro	Valor experimental
d3	3.222Å
d4	2.536Å
d5	2.605Å
d6	2.992Å

Figura 3-3. Parámetros medidos para el complejo BACE1-H2 (PDB ID: 2VNM). Los parámetros ubicados en la parte superior describen el movimiento del flap, mientras los inferiores son interacciones proteína-ligando sensibles al estado de protonación de ambas especies. Los valores experimentales de estos parámetros del complejo proteína-ligando fueron usados como referencias.

3.3.1. Parámetros para el monitoreo del flap e interacciones BACE1-HEA

Una vez terminadas las simulaciones MD para las 5 configuraciones (LnAsp93, LnAsp289, LpAsp93, LpAsp289 y LpAspUP) se calcularon 8 parámetros (**Figura 3-3**) para determinar qué modelo conlleva al cambio conformacional en BACE1, de Apo a cerrada, a saber: 4 parámetros proteína-proteína (d1, d2, θ y ϕ) y 4 proteína-ligando (d3, d4, d5 y d6). El primer conjunto de parámetros fue propuesto por Kumalo y colaboradores para comprender la dinámica de apertura y cierre del flap en la aspartil proteasa(Kumalo et al. 2016; Kumalo & Soliman 2016). El residuo Thr133 se halla en la punta del flap y la distancia con la Ser386 provee una mirada en extenso del movimiento del flap (d1). Adicionalmente, la posición de la diada aspártica, Asp93 y Asp289, está conservada en todas las estructuras cristalográficas reportadas, por lo que los cambios en la distancia entre estos residuos y la punta del flap debe ser consecuencia del movimiento del flap. Por lo tanto, los residuos catalíticos asisten en el entendimiento de la dinámica del flap durante la trayectoria MD, a través de los parámetros d2, θ y ϕ. Respecto a los parámetros proteína-ligando, la distancia d3, que corresponde a un puente de hidrogeno entre la punta del flap y el grupo carbonilo en el inhibidor H2, está presente en la estructura cristalina 2VNM y se ha reportado ser vital en el proceso de cierre del flap. Adicionalmente, las distancias restantes se hallan en la región distintiva de las HEAs, d4, d5 y d6, son sensibles a los estados de protonación de la diada.

Todos los parámetros fueron expresados como la desviación porcentual respecto a los valores de referencia encontrados en la estructura cristalina del complejo BACE1-H2, donde la proteína está en conformación cerrada (PDB ID: 2VNM, **Figura 3-3**). Para cada conformación C_i^m de la trayectoria MD de la configuración m de BACE1-HEA (LnAsp93, LnAsp289, LpAsp93, LpAsp289 o LpAspUP), la desviación porcentual $C_i^m P_j$ del parámetro j fue calculada de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$C_i^m P_j^m = \frac{(C_i^m \Omega_j) - \Omega_j^*}{\left|\Omega_j^*\right|} \times 100$$

Donde $C_i^m \Omega_j$ y Ω_j^* corresponden a los valores del parámetro j en la instantánea C_i^m y el valor de referencia experimental del complejo BACE1-H2, respectivamente. De acuerdo a la ecuación, valores positivos y negativos para $C_i^m P_j^m$ representan alargamientos o acortamientos respecto a lo encontrado en la estructura 2VNM. Más aún, valores cercanos a cero representan bajas desviaciones a lo experimental.

Puesto que el cambio conformacional en BACE1, de abierta a cerrada, debe reunir una serie de condiciones simultaneas en todos los parámetros medidos (**Figura 3-3**), en el presente trabajo

doctoral se creó un parámetro estadístico que tiene como fin cuantificar la cantidad de la población de instantáneas que cumplen, de manera individual y conjunta, dichas condiciones. A este parámetro se le llamó ***Densidad poblacional*** y describe en la siguiente sección (3.3.2).

3.3.2. Cálculos de Densidad Poblacional

Para cada configuración proteína-ligando m, hubo un número total N de instantáneas obtenidas de la simulación MD las cuales generó un numero de conformaciones proteína-ligando $C_1^m, C_2^m, \dots, C_N^m$. Para un conjunto de parámetros medidos $P_{j1}^m, P_{j2}^m, \dots, P_{jk}^m$, nosotros definimos:

$$\gamma_r^m\left(P_{j1}^m, P_{j2}^m, \dots, P_{jk}^m\right) = \#\left\{C_i: \left|C_i^m P_{js}^m\right| \leq r, \text{para cada valor de } s = 1, 2, \dots, k\right\}$$

$\gamma_r^m\left(P_{j1}^m, P_{j2}^m, \dots, P_{jk}^m\right)$ representa el número de instantáneas, para cierta configuración m, donde cada conjunto de parámetros $C_i^m P_{js}^m$ se hallan simultáneamente en un rango de tolerancia r, respecto a un valor de referencia experimental.

Entonces definimos la densidad poblacional $\rho_r^m\left(P_{j1}, P_{j2}, \dots, P_{jk}\right)$ como:

$$\rho_r^m\left(P_{j1}, P_{j2}, \dots, P_{jk}\right) = \frac{\gamma_r^m\left(P_{j1}^m, P_{j2}^m, \dots, P_{jk}^m\right)}{N} \times 100$$

Para un conjunto de parámetros medidos, evaluados para cada configuración de estados de protonación en BACE1-HEA (**Figura 3-2**), los valores de ρ representan el porcentaje de la población total que están dentro de una tolerancia r. En nuestro caso, estos parámetros representan el porcentaje de instantáneas que se muestran como la conformación experimental BACE1-H2 (PDB ID:2VNM), considerando simultáneamente una tolerancia r en todas las medidas seleccionadas. Estos parámetros se midieron individualmente, por ejemplo, $\rho(\phi)$ o $\rho(d3)$. Sin embargo, la densidad poblacional combinada brindó una mejor descripción del sistema al combinar parámetros proteína-proteína y proteína-ligando, así como una mejor herramienta de cribado, dado que las configuraciones deben cumplir varias condiciones, de manera simultánea, dentro de cierta tolerancia de desviación respecto a la estructura cristalina 2VNM.

Los resultados de aplicar estas metodologías se describen en extenso en el Capítulo 5 (Pagina 80).

3.4. Análisis comparativo entre las HEAs de estudio

El reconocimiento de las HEAs por BACE1 y posterior cierre del flap es un proceso complejo, puesto que demanda un cambio conformacional en la proteína para estabilizar el complejo BACE1-HEA. Dado esto, la capacidad de los inhibidores para inducir ese cambio podría ser un factor determinante en el poder inhibitorio contra la proteasa en cuestión. Para demostrar esta hipótesis, se evaluó el proceso de cierre del flap en BACE1 por 8 HEAs de diferente actividad biológica (alto, moderado y bajo). La actividad biológica de estos compuestos fue determinada bajo las mismas condiciones por GlaxoSmithKline (GSK)(Hussain et al. 2007; Beswick et al. 2008; Clarke et al. 2008; Clarke et al. 2008; Clarke et al. 2008; Charrier et al. 2008; Charrier et al. 2009; Charrier et al. 2009; Charrier et al. 2009; Clarke et al. 2010). La ***Tabla 3-1*** muestra la identidad de las HEAs y su actividad inhibitoria contra BACE1.

La primera etapa del proceso inhibitorio de BACE1 por las HEAs fue modelada bajo la configuración LnAsp289, esto es, los ligandos y la cadena lateral del residuo Asp289, de la diada catalítica, se consideraron como amina y ácido neutros, respectivamente. El otro residuo catalítico Asp93 fue considerada cargada. Para cada inhibidor, la preparación de las especies, simulaciones de acoplamiento y dinámica molecular se hicieron acorde a lo descrito a la sección 3.3. Finalizadas las simulaciones MD para los 8 sistemas BACE1-HEA, los componentes geométricos y energéticos fueron empleados para el análisis comparativo de las trayectorias. Para el análisis energético del proceso se estudió a través de las energías de interacción residuo-ligando (ReLIE), mientras que para el geométrico se usaron las herramientas disponibles en el software VMD y UCSF Chimera.

3.4.1. Energías de Interacción Residuo-Ligando Dinámicas

La trayectoria de Dinámica Molecular de un sistema macromolecular (S) está comprendida por un conjunto de instantáneas $\{f_d\}_{d\in\mathbb{N}}$ capturadas en el tiempo de simulación. El sistema S está constituido de una proteína (P), en complejo con un ligando (L). Adicionalmente, el sitio activo de P contiene un número de aminoácidos N y se encuentra dividido en segmentos α, los cuales, a su vez, están constituidos por un número finito de m_α aminoácidos interaccionando con L, representados por x_{ij}, donde i indica el segmento del sitio activo de P donde se ubica el residuo j. Tenemos que $N = \sum_{\substack{j=1 \\ i\in\alpha}}^{m_\alpha} x_{ij}$

Por otro lado, para una instantánea f_d, la energía de interacción residuo-ligando de un x_{ij} con L está definida como:

$$\{\Delta E(x_{ij}, L)\}_{f_d} = \{E(x_{ij}L)\}_{f_d} - \{E(x_{ij})\}_{f_d} - \{E(L)\}_{f_d}$$

$$\{\varepsilon_i\}_{f_d} = \sum_{j=1}^{m_\alpha} \{\Delta E(x_{ij}, L)\}_{f_d}$$

$$\{\varepsilon_T\}_{f_d} = \sum_{i \in \alpha} \{\varepsilon_i\}_{f_d} = \sum_{i \in \alpha} \sum_{j=1}^{m} \{\Delta E(x_{ij}, L)\}_{f_d}$$

donde $\Delta E(x_{ij}L)$ es la energía del complejo del residuo x_{ij} con L, la cual es calculada a partir de la diferencia energética entre el complejo del residuo x_{ij} con el ligando L, $E(x_{ij}L)$, y sus componentes individuales, $E(x_{ij})$ and $E(L)$, respectivamente. Adicionalmente, ε_i representa la sumatoria de las ReLIE para un segmento i, mientras que la energía de interacción total proteína-ligando está expresada como la sumatoria total de las ReLIE individuales de todos los x_{ij} con L (ε_T). A partir de estas definiciones tenemos que el número de cálculos ReLIE de L con los N aminoácidos del sitio activo de P, para una trayectoria de MD de S con un número total de f_T instantáneas, está dado por Nf_T. Más aún, la cantidad individual de cálculos singlet point (complejo, residuo y ligando) viene dada por $(2N + 1)f_T$.

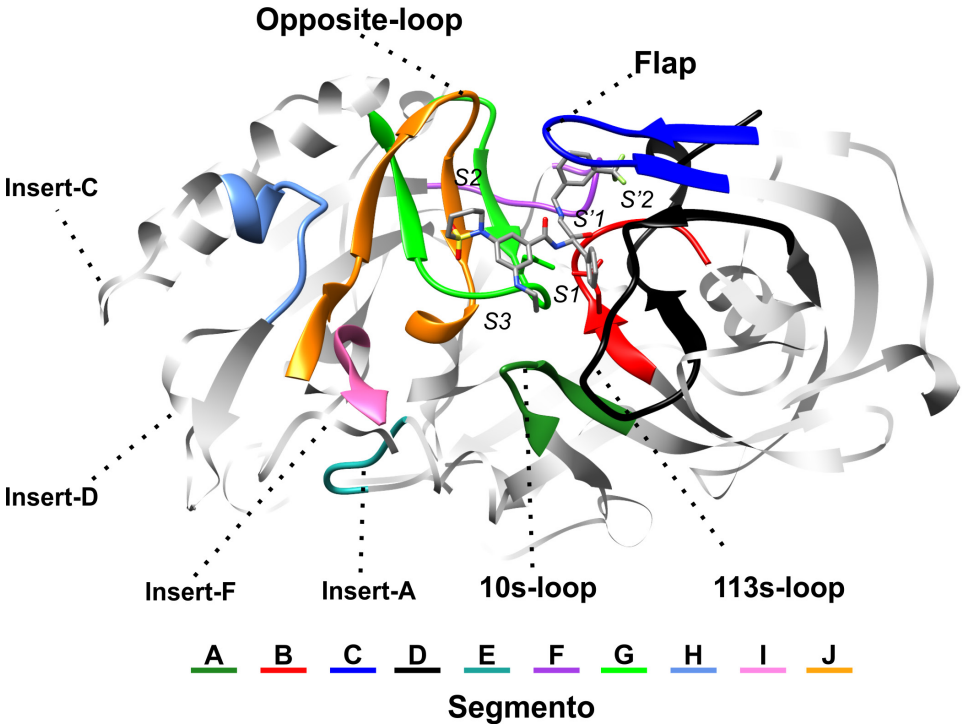


Figura 3-4. Segmentación del sitio activo de BACE1 y sus vecindades. El código de colores se muestra en la parte inferior.

En el presente trabajo de investigación, los cálculos de ReLIE se realizaron para las trayectorias MD del sistema en el que se induce el proceso el cambio conformacional de la BACE1, de su forma Apo a cerrada por 8 ligandos de la familia de las HEA. En cada caso, el tiempo de simulación fue de 70ns, el cual generó un total de 7000 frames. Se seleccionaron un total de 112 aminoácidos del sitio activo de la β-secretasa y sus vecindades, los cuales fueron agrupados en los segmentos **A** (Ser70 – Tyr76), **B**(Leu91 – Asn98), **C**(Tyr129 – Trp137), **D**(Thr164 – Asp191), **E**(Gly219 – Asn223), **F**(Arg256 – Ile263), **G**(Tyr283 – Pro298), **H**(Gly321 – Leu328), **I**(Tyr366 – Val370) y **J**(Tyr381 – Ile398), como se muestra en la **Figura 3-4**. Cada residuo fue extraído de acuerdo al esquema de fragmentación de la cadena principal que se muestra en la **Figura 3-5.** La valencia de cada residuo se completó añadiendo dos átomos de hidrógenos a través del programa Open Babel (http://openbabel.org) , seguido de la optimización de la posición de los mismos.

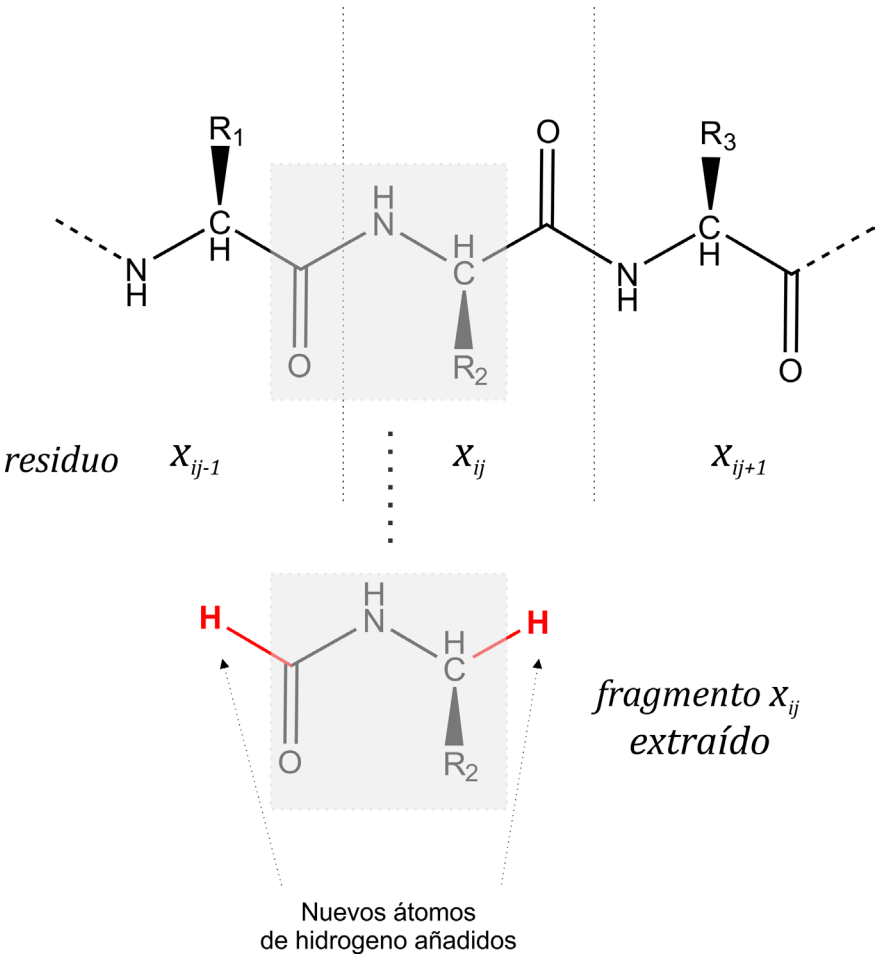


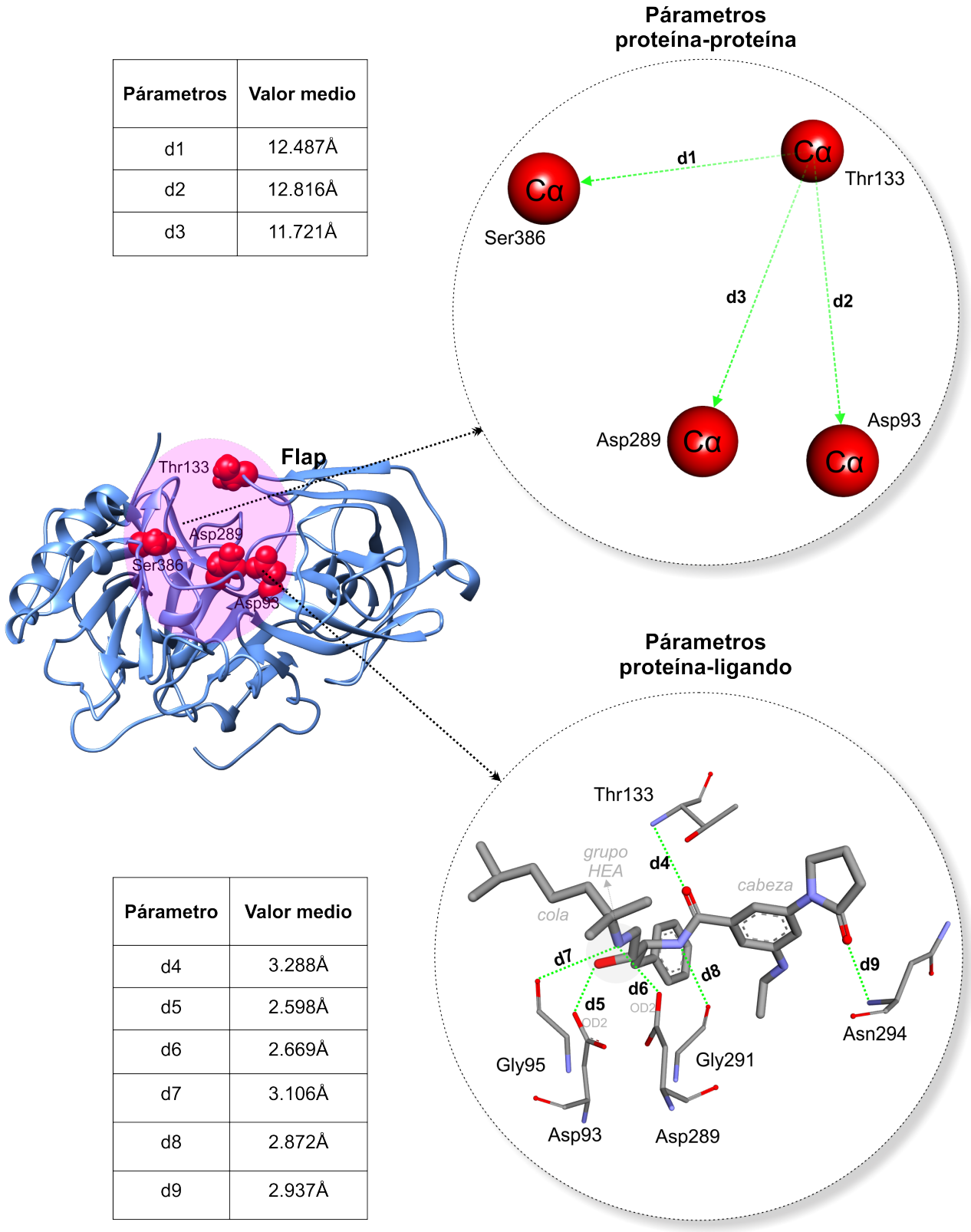
Figura 3-5. Esquema de fragmentación para la cadena principal de la proteína. Para cada residuo x_{ij} se completó la valencia añadiendo dos átomos de hidrogeno. La posición de los protones fue luego optimizada. El fragmento x_{ij} se compone de la cadena lateral de x_{ij} y el grupo carbonilo del residuo x_{ij-1}.

Todos los cálculos se realizaron a través del programa MOPAC2016 (http://OpenMOPAC.net), usando el método SQM-PM7(Stewart 2009; Stewart 2013; Brandon, Martin, McGee, Stewart & Braun-Sand 2015; Martin et al. 2015). De acuerdo a Stewart, este método fue parametrizado usando estructuras experimentales y cálculos ab initio de alto nivel como referencia. Más áun, SQM-PM7 emplea correcciones tipo "D2", lo que representa una mejora en la descripción de las interacciones no-covalentes(Stewart 2013; Martin et al. 2015; Stewart 2017). Para cada uno de los 8 sistemas BACE1-HEA se realizaron un total de 784000 cálculos de ReLIE, de los que fueron necesarios 1575000 cálculos individuales de singlet point (SP). Un total de 6.272 millones de cálculos ReLIE que se traduce en 12.600 millones de cálculos SP fueron realizados en el presente trabajo. Para el análisis comparativo de las diferentes HEAs se observó las variaciones ε_T en el tiempo. Los valores de afinidad BACE1-HEA inicial, $\overset{\circ}{\varepsilon_T}$, fueron calculados como un promedio de las ε_T en los primero 10ps de simulación MD. Adicionalmente, los mapas de colores ReLIE fueron empleados para la identificación de las principales interacciones en esta etapa del proceso inhibitorio de BACE1 por parte de las HEAs.

3.4.2. Parámetros proteína-proteína y proteína-ligando

El análisis geométrico comparativo de las trayectorias de MD se hizo a través de la medida de distancias en el sistema sobre el tiempo total de simulación. Para cada uno de los 8 sistema BACE1-HEA se midieron distancias proteína-proteína y proteína-ligando como parámetros para rastrear el movimiento del flap (d1, d2 y d3) y la posición relativa de las HEA dentro del sitio activo de BACE1 (d4, d5, d6, d7, d8 y d9), respectivamente (**Figura 3-6**). Los valores de las medias experimentales de todas las distancias, calculadas sobre 18 complejos cristalinos BACE1(cerrada)-HEA, fueron empleados como una herramienta para establecer las condiciones necesarias que el sistema debía adquirir de manera concertada en el primer paso del proceso inhibitorio de la aspartil proteasa, esto es, garantizar que las HEAs indujeran un cambio conformacional en BACE1, de su forma apo a cerrada. Los códigos PDB para las estructuras experimentales usadas y los valores experimentales para cada distancia se detallan en el ***Anexo VIII***.

Párametros	Valor medio
d1	12.487Å
d2	12.816Å
d3	11.721Å



Párametro	Valor medio
d4	3.288Å
d5	2.598Å
d6	2.669Å
d7	3.106Å
d8	2.872Å
d9	2.937Å

Figura 3-6. Distancias proteína-proteína (d1, d2 y d3) y proteína-ligando (d4, d5, d6, d7, d8 y d9) para el sistema BACE1-HEA. Las medias experimentales de cada distancia se calcularon a partir de las estructuras de complejos cristalinos BACE1-HEA disponibles en el Protein Data Bank.

Las distancias proteína-proteína usan las distancias de Cα entre la punta del flap (residuo Thr133) a diferentes zonas poco móviles de BACE1 durante el cierre del flap como Ser386 (d1), y la diada aspártica, Asp93 (d2) y Asp289 (d3). La posición relativa de los residuos Ser386, Asp93 y Asp289 no varía mucho durante el cierre del flap, por lo que las variaciones en estas distancias se atribuyen a la dinámica de la punta del flap (residuo Thr133). Además, la distancia d4, que consiste en el puente de hidrogeno formado por el grupo amida de la cadena principal de Thr133 y el oxígeno del grupo cabonilico de las HEA, es también un parámetro efectivo para el estudio del cierre del flap. Por otro lado, los parámetros proteína-ligando permiten perseguir posibles traslaciones y/o rotaciones de diferentes zonas del ligando (cabeza, núcleo y cola) dentro del sitio catalítico de la proteasa. La distancia d5, corresponde a la interacción BACE1-HEA que involucra el residuo catalítico Asp93, en S1', con el grupo hidroxilo, en el núcleo del ligando. Las distancias d6 y d7, que implican el motivo amínico de las HEAs, fueron medidas directas del movimiento de la cola e involucran los residuos Asp289 y Gly95 en S1' y S2', respectivamente. Finalmente, los puentes de hidrogeno con Gly291 (distancia d8) y Asn294 (distancia d9) evidenciaron los movimientos en la cabeza del ligando hacia las zonas S3 y S2, respectivamente. Adicionalmente, la variación de desviación cuadrática media (rmsd) del ligando, medida en el tiempo, se empleó como una medida general de los cambios conformacionales que sufrió el inhibidor durante la simulación, respecto a su pose inicial, cuando la proteína está en su forma apo o abierta.

Los resultados de aplicar estas metodologías se describen en extenso en el Capítulo 6 (Pagina 100).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

_____

4. La Configuración De Estados De Protonación Final BACE1-HEA Es LpAspUP

*Artículo publicado como resultado***:**

Gueto-Tettay, C. Pestana-Nobles, R., Drosos-Ramirez, J. C. **Determination of the protonation state for the catalytic dyad in beta-secretase when bound to hydroxyethylamine transition state analogue inhibitors: A molecular dynamics simulation study.** J. Mol Graph Mod 66 (**2016**) 155-167. DOI: *10.1016/j.jmgm.2016.04.003*

Documento adjunto en la sección: Anexo XIV. Publicación Científica #1.

4.1. Introducción al Capítulo 4

La presencia de placas amiloides extracelulares es una marca histopatológica distintiva asociada a la muerte cerebral en el mal de Alzheimer (AD)(Vassar 2014; Yan & Vassar 2014; Evin 2016; Yan et al. 2016), que es la causa más común de demencia en personas con más de 60 años y que perturba aquellas zonas del cerebro encargadas de controlar la memoria, el pensamiento y lenguaje(Hersi et al. 2017). Estos depósitos extracelulares se constituyen principalmente de péptidos que contienen entre 40-42 aminoácidos en extensión conocidos como péptidos Aβ, los cuales son el producto de la ruptura proteolítica de la proteína precursora amiloide (APP)(Fedele, Rivera, Marengo, Pronzato & Ricciarelli 2015), durante su transporte hacia la membrana celular, por un tándem de dos proteasas identificadas como β- y γ- secretasas(Evin 2016; Wilkins & Swerdlow 2016; Yan et al. 2016; Hersi et al. 2017). Es bien conocido que la

primera proteína, conocida como BACE1 y Memapsina 2, participa en la etapa cinético-limitante del proceso hidrolítico que conlleva a la fragmentación de la APP y esto la convierte en un blanco principal para diseño de fármacos contra AD(Hong et al. 2000; Vassar 2014; Yan & Vassar 2014; Yan et al. 2016). En la búsqueda de mejores inhibidores de BACE1 se han co-cristalizado (~180) una variedad de inhibidores peptídicos y no-peptídicos acoplados al ectodominio de BACE1, que sugieren que el sitio activo se halla localizado y embebido en la hendidura entre los lóbulos N- y C-terminal y es allí donde se encuentra inmerso, en una red de puentes de hidrógeno, la díada de aspartatos catalíticos (Asp93 y Asp289)(Hong et al. 2000). A pesar de que las estructuras cristalinas proveen una amplia información estructural, los estados de protonación o localización precisa de los protones de los grupos ionizables no puede ser determinada por cristalografía de rayos-X, al menos no a las resoluciones comúnmente empleadas(Rajamani & Reynolds 2004). El estado de protonación que adopta díada catalítica en la familia de las aspartil proteasas ha sido un tema de interés científico por décadas debido a la importancia de las mismas en el entendimiento del mecanismo de reacción(Hong et al. 2000; Barman et al. 2011; Barman & Prabhakar 2013; Barman & Prabhakar 2014) e inhibición (Chakraborty et al. 2014; Ghosh & Osswald 2014; Menting & Claassen 2014; Ellis & Shen 2015; Hernandez-Rodriguez et al. 2016; Yan et al. 2016), cribado virtual de librerías de compuestos (Polgar et al. 2007; Polgar & Keseru 2011; Chakraborty et al. 2014; H. Al-Nadaf & Taha 2015; Crunkhorn 2016) y diseño asistido por computadora de nuevos compuestos líderes(Polgar et al. 2007; Polgar & Keseru 2011; Huang et al. 2013; Palakurti et al. 2013; Chakraborty et al. 2014; H. Al-Nadaf & Taha 2015; Kumar et al. 2015; Crunkhorn 2016). Técnicas como Dinámica Molecular (MD)(Park & Lee 2003; Mishra & Caflisch 2011; Chakraborty et al. 2014; Chakraborty & Basu 2015; Ellis & Shen 2015), Docking (Sussman et al. 2011; Barman & Prabhakar 2012), cribado virtual, reacciones endodesmicas (Rajamani & Reynolds 2004; Gueto-Tettay et al. 2011) y cálculos QM/MM(Yu et al. 2006; Barman & Prabhakar 2013) muestran que los valores de pKa de los residuos titulables en el sitio activo de BACE1 dependen de la naturaleza del ligando involucrado por lo que cabe la posibilidad de uno o más estados de protonación(Domínguez et al. 2010), fenómeno extendido a otras familias de aspartil proteasas como la proteasa del VIH, endothiapepsina y renina(Czodrowski, Sotriffer & Klebe 2007; Ghosh & Osswald 2014; Vassar 2014; Soares, Torres, da Silva & Pascutti 2016). Si bien existen numerosos estudios sobre el tema no hay consenso ni evidencia cuantitativa suficiente sobre cuál es el estado de protonación preferido en presencia de inhibidores, esto es, neutro(diprotonado), aniónico (monoprotonado) o dianionico (di-deprotonado).

Dentro la familia de compuestos inhibidores de BACE1 se destacan las hidroxietilaminas (HEAs) quienes son conocidas por su gran poder inhibitorio a través de la estrategia del mimético del estado de transición(Hussain et al. 2007; Kortum et al. 2007; Beswick et al. 2008; Clarke et al. 2008; Clarke et al. 2008; Clarke et al. 2008; Charrier et al. 2008; Charrier et al. 2009; Charrier et al. 2009; Charrier et al. 2009; Clarke et al. 2010; Truong et al. 2010; Rueeger et al. 2012; Ambure & Roy 2016), además con la capacidad para penetrar la Barrera Hematoencefálica y disminuir Aβ en ratones transgénicos APP por administración oral[Troung et al., 2010a, 2010b; Weiss et al., 2012]. Un miembro representativo de esta familia (H2, ***Tabla 3-1***) se halla co-cristalizado con BACE1 (PDB ID: **2VNM**)(Charrier et al. 2008) y se caracteriza principalmente por una red de interacciones favorables electrostáticas, hidrofóbicas y puentes de hidrógeno clásico, π-donador y halógeno, presentes entre el inhibidor y el sitio activo de BACE1 (**Anexo I**). Los puentes de hidrógeno se dan entre las cadenas principales y/o laterales de BACE1 con zonas polares del ligando, esto es, hacia P'1 con Gly95 (d(N3.O)=2.99Å), Thr133 (d(O8.N)=3.22Å) y Gln134 (O8.N=3.03Å), en P2 con Asn294(d(O2.N)=2.96Å) y Ser386(d(O1-OG)=3.12Å) mientras que en P3 con Gly291(d(N2.O)=2.84Å) y Thr293(d(O2.N)=3.32Å y d(N1.OG1)=3.24Å con la cadena principal y lateral, respectivamente.

Hacia la zona P1 del ligando se encuentra un grupo bencilo que forma interacciones hidrofóbicas del tipo π-π T-shaped (en forma de T) con Phe169 y Tyr132 así como π-alquil con Leu91e Ile179. En P'1 se encuentran los contactos iónicos entre la diada aspártica y el isóstero hidroxietilamina, los cuales contribuyen en más del 90% a la interacción residuo-ligando del sitio activo. La cola de 2VNM, zona P'2, se caracteriza por la presencia de interacciones polares y apolares, esto es, puentes de hidrógeno clásico, π-donor y halógeno con los residuos de Gly95, Tyr259 y Arg189 respectivamente, mientras que la Tyr132 suma una nueva interacción π-π T-shaped con el anillo fenílico. Previamente reportamos el estado di-deprotonado como el preferido en la formación de los complejos BACE1-HEA a través de la comparación de la estabilidad relativa usando MOZYME PM6-DH+ y DFT (M062X) (Gueto-Tettay et al. 2011). Domínguez et al., usando la técnica Surface Plasmon Resonance reportó la preferencia del estado dianonico y aniónico en la diada de Asp, en presencia de las HEA a pH alto y bajo, respectivamente(Domínguez et al. 2010).

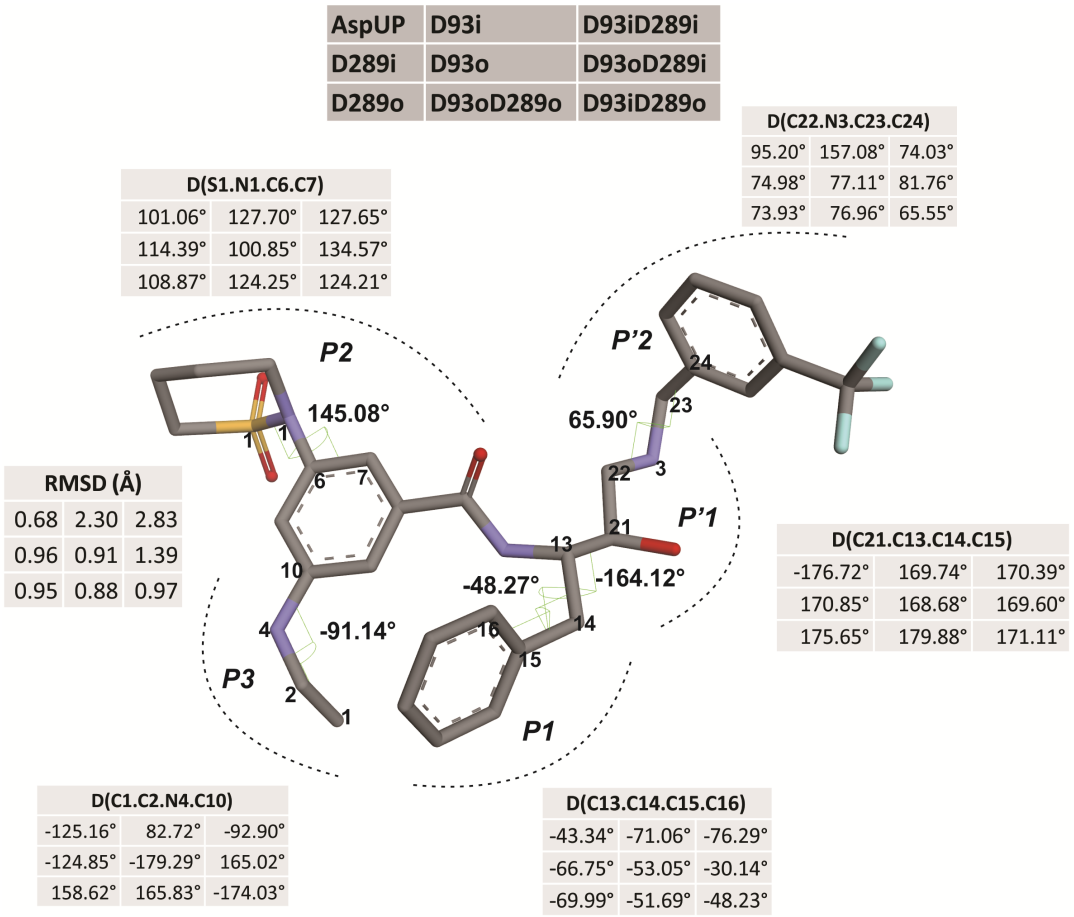


Figura 4-1. Medida del rmsd (Å) y ángulos diedros para la HEA H2 basado en la estructura más representativa de la trayectoria. Los valores experimentales para las torsiones se encuentran dentro de la figura de referencia.

Por otro lado, Barman & Prabhakar concluyeron que la díada Asp podía adoptar diferentes estados de protonación en presencia de otras familias de inhibidores de BACE1 que portan un grupo amino en la zona P'1(Barman & Prabhakar 2012). Este resultado lo alcanzaron comparando el rmsd del ligando y energías de acople de 8 estados de protonación diferentes, tales como inhibidores basados en el grupo aminoetil (AspUP, **Figura 3-1**), carbinaminas terciarias (Asp289i), aminas cíclicas (AspUP), amidas reducidas (Asp93o), α-amino cetos (AspUP) y aminobenzilpiperidinas (Asp289i). Sin embargo, estos trabajos presentan restricciones que van desde la reducción del tamaño del sistema (cantidad de átomos a considerar), rigidez de la proteína y sin considerar la estabilidad del complejo proteína-ligando en el tiempo. En el presente estudio se aborda este problema a través de la aplicación de simulaciones de MD para 9 los estados de protonación posibles (AspUP, D93i, D93o, D289i, D289o, D93iD289i, D93oD289o, D93iD289o y D93oD289i en la **Figura 3-1**) para una estructura representativa de las HEA (H2, ***Tabla 3-1***) co-cristalizado con BACE1 (PDB ID **2VNM**).

La comparación de las 9 trayectorias de la simulación por dinámica molecular para los distintos estados de protonación confirmó que el estado di-deprotonado es el estado más probable en los complejos BACE1/HEA a través de la medición de las diferencias respecto a la estructura experimental del complejo cristalino BACE1/H2, enfocadas en una serie de parámetros estáticos y dinámicos sensibles al estado de protonación. El estudio también reveló que un único parámetro como el RMSD de ligando no es criterio suficiente para discernir entre las diferentes configuraciones ya que, desconoce los cambios conformacionales que puede sufrir el sitio activo y la proteína en general en sistemas donde la enzima es rígida y/o el sistema de estudio se restringe a unos pocos átomos en el sitio activo de BACE1, por lo que la medida en el tiempo de distancias y ángulos diedros en la proteína, ligando y proteína-ligando de un sistema completo resultan ser más adecuados para modelar este fenómeno. Adicionalmente, las simulaciones de acoplamiento molecular proteína-ligando, entre estructuras de HEA no cristalográficas y BACE1 usando el estado AspUP (**Anexo II**), mostró modos similares de acople comparado con sus plantillas experimentales. La optimización del sistema resultante con el método SQM MOZYME/PM7 brindó evidencia adicional, confirmando la estabilidad del complejo BACE1-HEA, al observarse ningún tipo de transferencia protónica entre las especies involucradas. Los resultados reportados en este estudio ayudarán a una mejor comprensión de la influencia de los distintos ambientes químicos en la diada aspártica y su efecto en la estabilidad, a través del tiempo, de los complejos BACE1-HEA que conlleven al estudio de los mecanismos de inhibición, así como al cribado de bases de datos de esta familia de inhibidores.

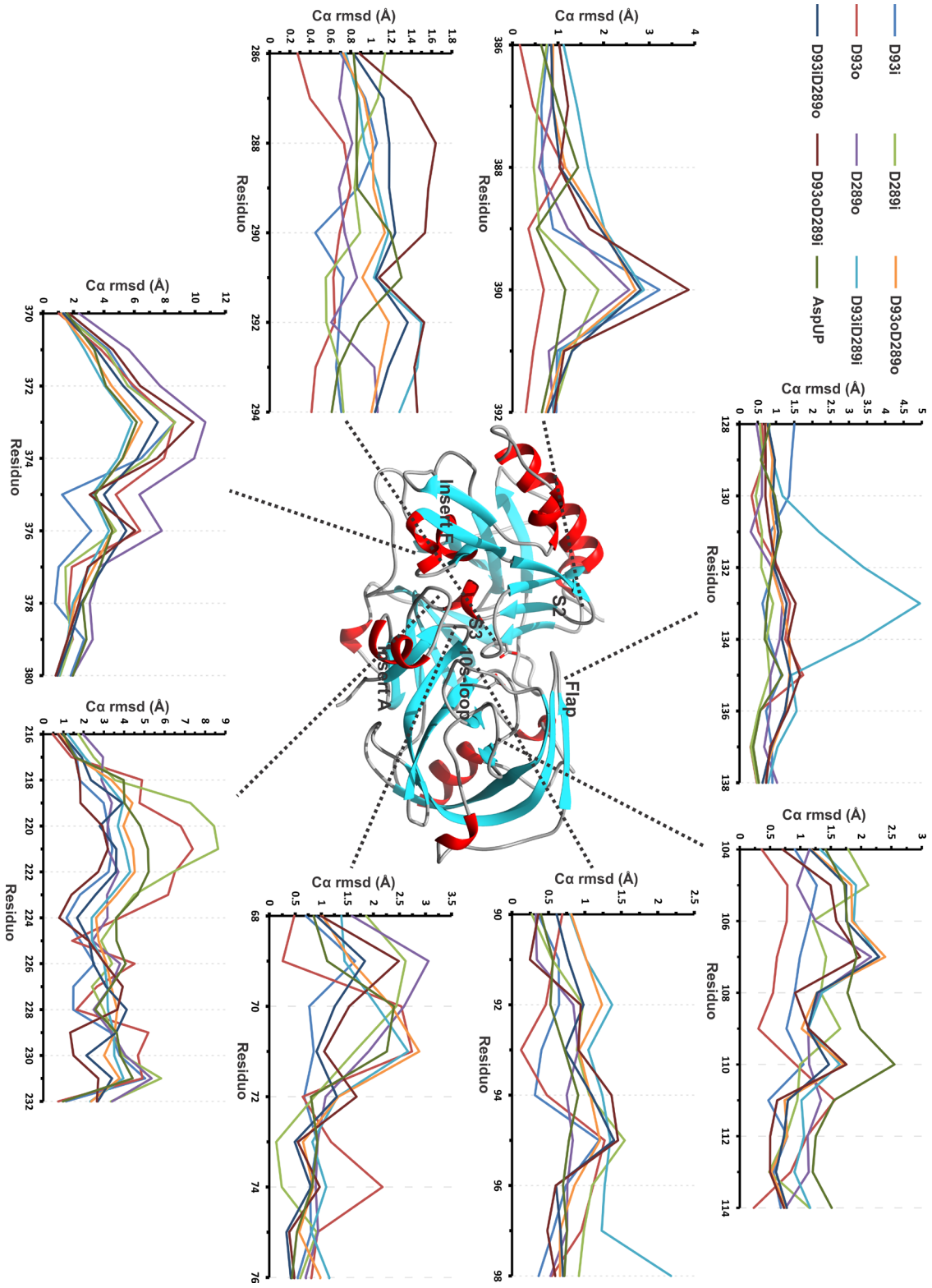


Figura 4-2. Valores de rmsd de pares de Cα medidos para 84 residuos en el sitio active de BACE1 y sus vecindades.

4.2. Análisis de los Parámetros Estáticos y Dinámicos

Una serie de simulaciones de dinámica molecular proteína-ligando se llevaron a cabo entre un ligando representativo de las HEAs (H2) y la β-secretasa. Para el análisis de las trayectorias de las 9 configuraciones de la diada-Asp, un conjunto de parámetros estáticos y dinámicos fueron medidos en el ligando, proteína y el complejo proteína-ligando, tales como las distancias y ángulos diedros, que permitieron la identificación del estado de protonación más probable para el sistema BACE1-HEA. Los parámetros estáticos, los cuales están basados en la estructura más representativa de la simulación MD. En este caso se calcularon ángulos diedros y rmsd del ligando (**Figura 4-1**), cambios conformacionales en la proteína (**Figura 4-2**), la orientación de las cadenas laterales para el inhibidor H2 y los residuos Asp93 y Asp289 (**Figura 4-3**), y la distancia intermolecular entre pares atómicos respecto a los valores experimentales (**Figura 4-4**). En adición, otra clase de parámetros fueron medidos, esta vez sobre toda la trayectoria MD, a los cuales llamamos parámetros dinámicos. Estos midieron la rotación de la cadena lateral en la diada aspártica (**Figura 4-5**) y el error absoluto de un conjunto de distancias intermoleculares, sensibles al estado de protonación en la diada aspártica (**Figura 4-6**).

Para el ligando tenemos el rmsd y ángulos diedros como medidas globales y locales estáticas de la posición del inhibidor respecto a la conformación activa en la estructura cristalina (**Figura 4-1**). Los valores de rmsd muestran que 7 de las 9 configuraciones tienen un valor por debajo de 2Å, tomado generalmente como una referencia en la validación de los programas de acoplamiento molecular proteína-ligando, dando configuración ApsUP como la más cercana a la pose experimental con un valor de 0.68Å. En contraste, los estados D93i y D93iD289i mostraron los valores más grandes del conjunto, con valores de 2.30Å y 2.83Å, respectivamente. Las grandes diferencias mostradas en las configuraciones D93i y D93iD289i se pudieron apreciar hacia las zonas P1, P'1 y P'2 dadas por los ángulos diedros D(C1.C2.N4.C10), D(C21.C13.C14.C15) y D(C22.N3.C23.C24) (**Figura 4-1**). Las 5 configuraciones restantes tuvieron valores de rmsd por debajo de 1Å, con ligeras diferencias entre los estados D93o (0.91Å), D289i (0.96Å), D289o (0.95Å) y D93iD289o (0.97Å), evidenciando la baja sensibilidad de este parámetro, extendiéndose este hecho a la medida de rmsd ligando a través del tiempo (**Anexo III**).

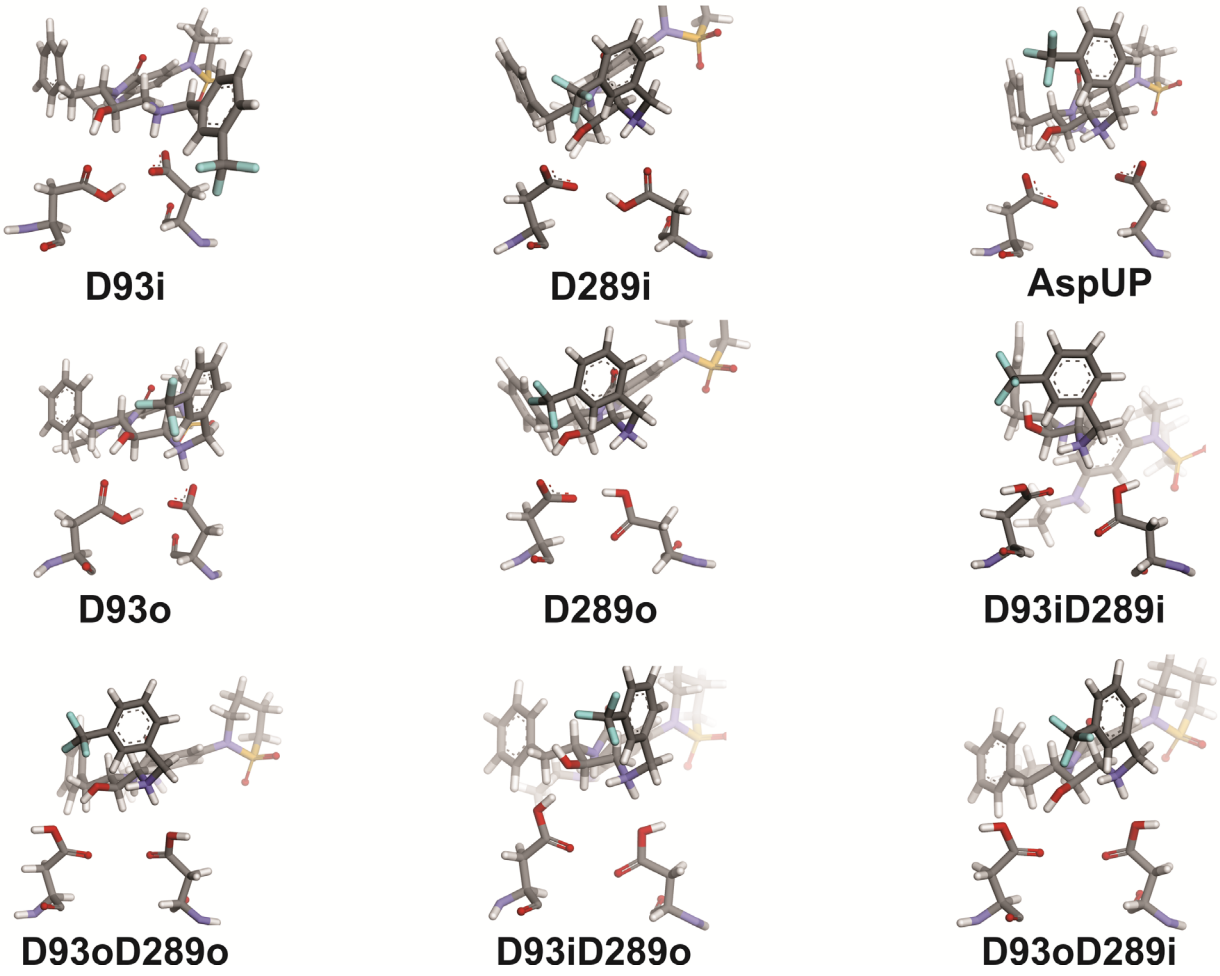


Figura 4-3. Orientación de la diada aspártica para las estructuras más representativas de la trayectoria MD.

El análisis de los cambios estructurales en la proteína se llevó a cabo comparando el rmsd de los Cα, respecto a la estructura cristalina experimental 2VNM, de 84 residuos en el sitio activo de BACE1 y sus vecindades. La **Figura 4-2** muestra que las regiones de la diada-Asp tuvieron bajo rmsd, contrario a las regiones flexibles Insert A e Insert F, quienes presentaron valores superiores a 4Å. Adicionalmente, con excepción de los estados AspUP, D93o y D289i, valores rmsd en Cα hacia la región S2 mostraron cambios conformacionales significativos para todas las configuraciones evaluadas, especialmente para las neutras. Las regiones S3, 10s-loop e Insert F presentaron desviaciones para las formas neutras y monoprotonadas. Más aún, la configuración D93iD289i tuvo el rmsd más alto hacia la zona del flap. Adicional a este parámetro estático, se consideraron parámetros dinámicos sobre la proteína, específicamente sobre la cadena lateral de los residuos de Asp, como son la medida del ángulo diedro $\phi = \mathrm{D(CA.CB.CG.OD2)}$ y las

distancias entre los oxígenos internos y externos, OD1 y OD2 respectivamente. Para el diedro ϕ se midió δ el cual se definió como el valor absoluto de la variación respecto al valor experimental, esto es, $\delta(\phi) = |\phi - \phi_{ref}|$. Los valores de δ en el tiempo permitieron evaluar específicamente el entorno estérico y electrónico de la diada aspártica en cuanto a la variación del diedro de referencia en el tiempo por la influencia del ligando y el sitio activo de BACE1. La **Figura 4-5** muestra que las configuraciones AspUP, D93i y D93oD289o son las que presentaron menores desviaciones del diedro ϕ en el tiempo. Adicionalmente, las configuraciones D93o, D93iD289i y D93oD289i presentaron valores de δ de al menos 140° en uno o ambos residuos aspárticos. Por otro lado, la evaluación en el tiempo de las distancias entre los pares de átomos de oxígenos internos y externos se hizo a través de la medida del error absoluto respecto a sus valores de referencia, encontrados en la estructura cristalina 2VNM, es decir, Δd(OD1.OD1) y Δd(OD2.OD2), respectivamente (**Figura 4-6**). Para este parámetro, los valores positivos y negativos representan alargamientos y acortamientos en las distancias de los pares atómicos, respectivamente. La mayoría de las configuraciones mostraron acortamientos en la distancia Δd(OD2.OD2), mientras que otras como los estados neutros D93iD289i, D93iD289o y D93oD289i tuvieron alargamientos significativos para Δd(OD1.OD1) después del 1er y/o 5to ns de trayectoria.

Medir individualmente parámetros para el ligando y la proteína brindó poca información sobre la correcta ubicación del inhibidor H2 dentro del sitio activo de BACE1, por lo que fue necesario un conjunto de parámetros que involucren ambas especies simultáneamente. Inicialmente se consideró la orientación de las cadenas lateral para Asp93 y Asp289 respecto al inhibidor H2, evaluado solo en la estructura más representativa de la simulación MD, la cual se aprecia en la **Figura 4-3**. De acuerdo a la información, una mala asignación en la posición del protón en el grupo ácido, del residuo Asp93 y/o Asp289, podría conducir a un cambio en la configuración, tal es el caso del estado D93i cuya torsión en el diedro ϕ condujo a una transformación en el estado homologo D93o, aparentemente más estable o representativo. Otros casos notables fueron las configuraciones neutras D93iD289i, D93iD289o y D93oD289i quienes convergen con el tiempo al estado con protonaciones en el oxígeno externo de ambos residuos catalíticos, D93oD289o. Adicionalmente, las configuraciones neutras adoptan valores atípicos en los diedros D(CA.CG.OD1.HD1) y/o D(CA.CG.OD2.HD2) debido al poco espacio en el sitio activo. Por otro lado, se midió también el error absoluto entre pares interatómicos BACE1/H2 tomando los residuos Asp93, Gly95, Thr133, Gln134, Asp289, Gly291, Thr293, Asn294 y Ser386 quienes interactúan con las diferentes zonas del ligando.

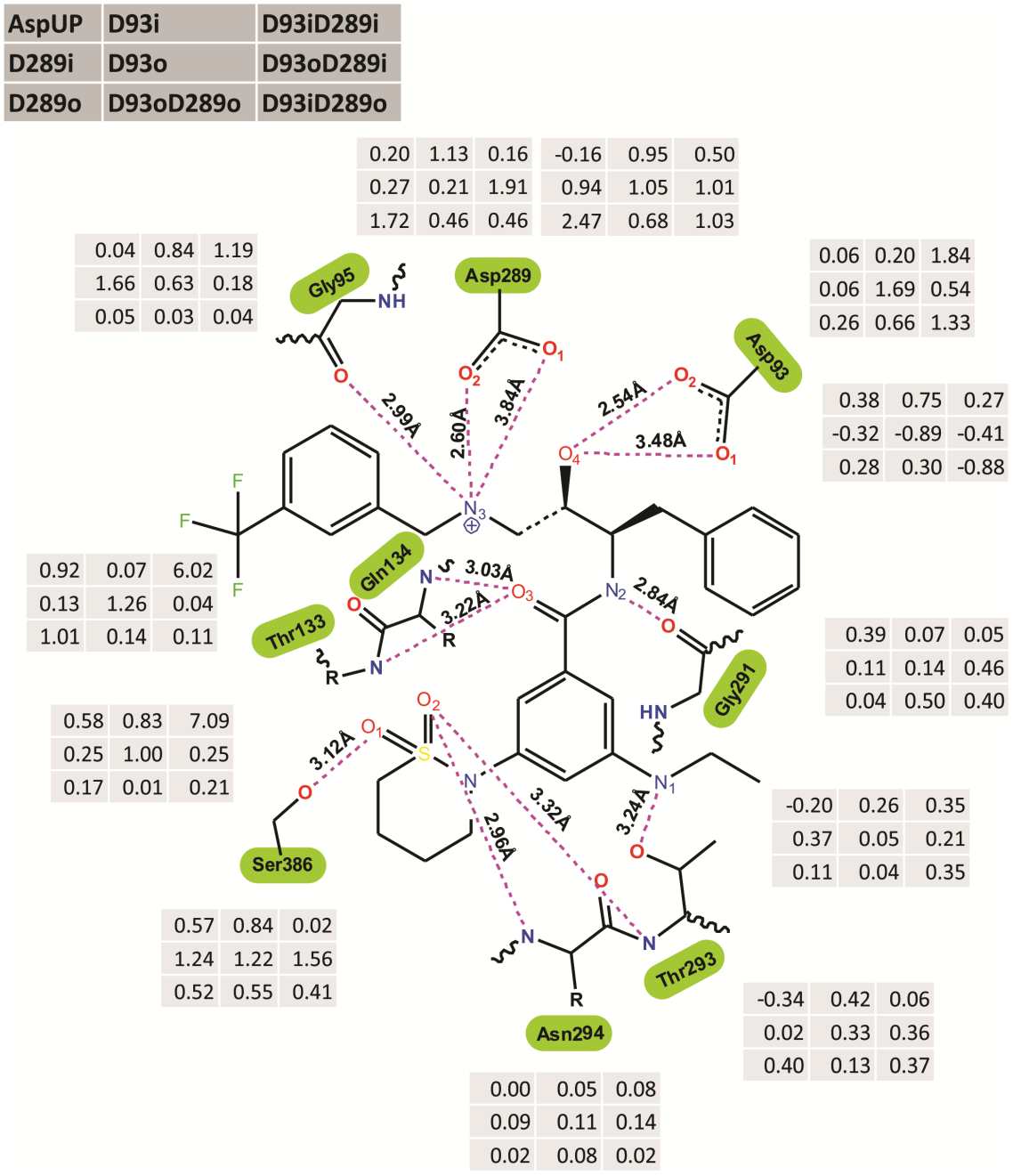


Figura 4-4. Error absoluto de las distancias intermoleculares BACE1-H2 respecto a la estructura de rayos-X. Para cada configuración de estados de protonación se tomaron las estructuras más representativas de la simulación MD.

La **Figura 4-6** muestra que hay interacciones poco sensibles a las diferentes configuraciones en la diada aspartica, tales como Δd(O_Gly291.N2), Δd(N_Thr293.O2), Δd(OG_Thr293.N1) y Δd(N_Asn294.O2) los cuales no ayudan a discernir cual es el estado de protonación más

probable. En contraste, las desviaciones medidas hacia la zona de Asp93, Gly95 y Asp289 resultan útiles como parámetros diferenciadores al ser el entorno químico más cambiante antes los cambios en los estados de protonación. Se decidió entonces medir estas variaciones a lo largo del tiempo (**Figura 4-6**), confirmando que las variaciones en los estados de protonación en la diada catalítica afectan directamente la interacción BACE1/H2, lo que se refleja en bajas o altas desviaciones de los parámetros seleccionados, respecto a lo encontrado en la estructura experimental de rayos-X.

4.2.1. Configuraciones Monoprotonadas (Estados aniónicos)

4.2.1.1. Estado D93i

En esta conformación el oxígeno interno en el Asp93 se encuentra protonado y el Asp289 desprotonado. Se encontró para ella el segundo rmsd más alto entre los nueve sistemas estudiados, siendo este de 2.30Å (**Figura 4-1**). En la estructura representativa se ve reflejado el cambio de diedro presentado por la zona P'2 y P3, reflejado en el cambio de los diedros D(C22.N3.C23.C24) y D(C1.C2.N4.C10) con desfases de 91.18° y 175.86° respectivamente. Más aún, estos cambios afectan las interacciones con los residuos Ser96, Pro131, Tyr132, Arg189 y Ile187 durante toda la trayectoria de MD. La β-secretasa presenta desviaciones marcadas hacia las zonas S2, Insert A e Insert F, de acuerdo a los valores de rmsd medidos sobre los CA de cada residuo (**Figura 4-2**). En la díada catalítica se da la formación de un puente de hidrógeno entre HD1(Asp93) y OD1 (Asp289) que se traduce en un desplazamiento del inhibidor H2 (**Figura 4-3**), que conlleva a un aumento en los valores de Δd(OD1_D93.O4)=0.75Å, Δd(O_G95.N3)=0.84Å, Δd(N_T133.O3)=0.83Å, Δd(OD2_D289.N3)=1.13Å y Δd(OG_S386.O1)=0.84Å (**Figura 4-4**). El análisis de las variaciones del diedro ϕ para los residuos aspárticos en el tiempo, dadas por los valores de δ, se ven en la **Figura 4-5.** En ella se aprecia que los valores medios para δ no exceden los 50°, siendo Asp289 el residuo con mayores variaciones en el diedro ϕ con valores de δ comprendidos entre 20° y 50°, siendo más sutiles para Asp93 que no superan los 30°. Las medidas de las desviaciones absolutas entre pares atómicos proteína-proteína y proteína-ligando mostraron acortamientos en las distancias entre los oxígenos OD1 y OD2 para la díada catalítica, esto es, valores negativos para Δd(OD1.OD1) y Δd(OD2.OD2). Estos acortamientos explican el alargamiento marcado en los valores de Δd(OD2_D93.O4) y Δd(O_G95.N3) a partir de los 8ns de trayectoria (**Figura 4-6**).

4.2.1.2. Estado D93o

La conformación aniónica D93o presenta protonado el oxígeno exterior (OD2) en el residuo Asp93. De los parámetros estáticos medidos, se encontró para el ligando un RMSD de 0.91Å, siendo el más bajo de los estados monoprotonados y el tercero a nivel global, detrás de las conformaciones AspUP y D93oD289o. En adición, la zona P3 del ligando es aquella con la desviación más marcada, mostrando un cambio neto en el diedro D(C1.C2.N4.C10) de 86.15°. Este cambio de diedro presentado por la zona P3 afecta las interacciones entre esta zona y los residuos pertenecientes al subpocket S3, tales como con el residuo Gly72, en el que el cambio de orientación del diedro en el ligando conduce la pérdida de la interacción, expuesto en los cambios conformaciones que sufre la proteína hacia las zonas S3, 10s-loop e insert A (**Figura 4-2**) y alteración en las desviaciones intermoleculares BACE1-H2 que involucran los residuos Asp93, Gly95, Thr133, Gln134 y Asp289, tales como Δd(OD1_D93.O4)=-0.89Å, Δd(OD2_D93.O4)=1.69Å, Δd(O_G95.N3)=0.63Å, Δd(N_T133.O3)=1.00Å, Δd(N_Q134.O3)=1.26Å y Δd(OD1_D289.N3)=-1.05Å (**Figura 4-4**). El análisis de los parámetros dinámicos mostró cambios en δ para Asp93 de aproximadamente 150° en promedio a partir del primer nanosegundo de simulación, manteniéndose durante el resto de la trayectoria. Además, los valores de δ para Asp289 mostraron un giro de 180° desde el inicio de la simulación, disminuyendo gradualmente hasta equilibrarse en 60° a partir de los 6ns. Es importante acotar que, puesto que Asp289 se encuentra desprotonado, sus oxígenos OD1 y OD2 son indistinguibles, por lo que los cambios de 150° durante los primeros 3ns, son equivalentes a 30° respecto al valor de ϕ reportado para este residuo en la estructura cristalina (**Figura 4-5**). Los cambios geométricos en Asp93 y Asp289 afectan directamente las distancias en la proteína y con el inhibidor, tal como se ve en la disminución en la desviación para la distancia entre los oxígenos externos, Δd(OD2.OD2), en 1.5Å durante los primeros 6ns, acortándose más aún a 3.5Å durante el resto de la simulación (**Figura 4-6**). Por otro lado, el incremento de Δd(OD2_D93.O4) en 1.5Å a partir del primer nanosegundo para minimizar las repulsiones por la falta de espacio en el sitio activo de la β-secretasa.

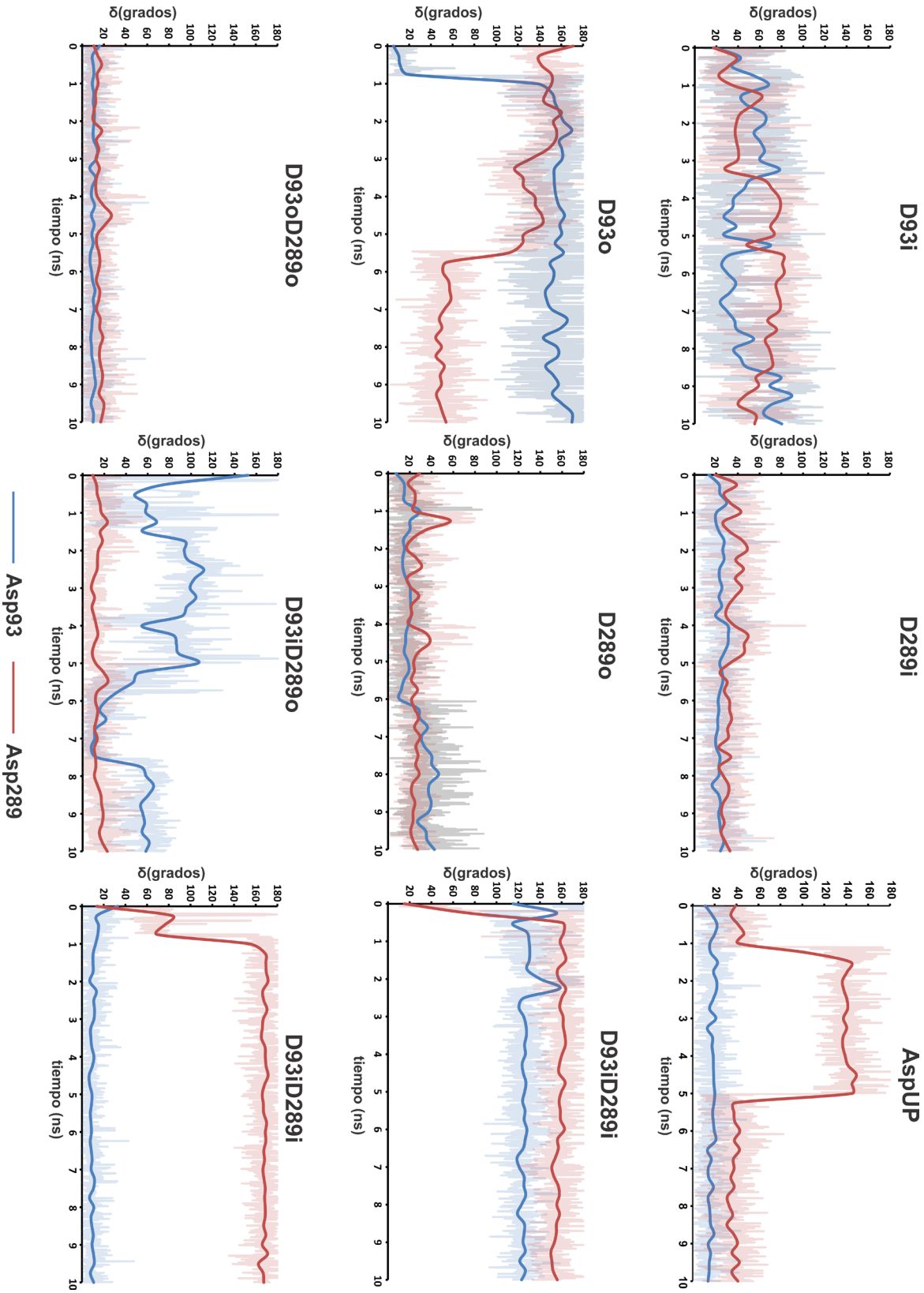


Figura 4-5. Evaluación en el tiempo de $\delta(\phi)$ medidos sobre la diada catalítica

4.2.1.3. Estado D289i

En esta configuración el Asp93 está desprotonado y el Asp289 protonado en el oxígeno interno(OD1), y mostró un rmsd de 0.96Å de acuerdo a la estructura más representativa de la simulación (**Figura 4-1**). Los diedros D(C1.C2.N4.C10), D(S1.N1.C6.C7) y D(C13.C14.C15.C16) los cuales fueron los más afectados presentaron cambios netos de 31.71°, 30.69° y 18.48° respectivamente. La proteína presenta variaciones en las zonas Insert A, Insert F y el subpocket S3 (**Figura 4-2**). Adicionalmente, la díada catalítica presentó un puente de hidrogeno formado por HD1(Asp289) y OD1(Asp93), una característica común a todas las conformaciones aniónicas en la β-secretasa (**Figura 4-3**). Dichos cambios afectan las interacciones formadas con residuos como Gly95, Asp289, Gly291, Ser386, Arg189 y Val130, pertenecientes a los subpockets S3, S2 y S1, destacando Δd(O_G95.N3)=1.66Å, Δd(OD1_D289.N3)=0.94Å y Δd(OG_S386.O1)=1.24Å (**Figura 4-4**). Por otro lado, los valores δ para los residuos aspárticos mostraron variaciones continuas de entre 20° y 82° en promedio para ambos aminoácidos. El residuo Asp93 mostró un incremento hasta los 80° en los primeros y últimos 3ns de simulación, mientras que los valores de δ para Asp289 mostraron un incremento hasta los 76° después de los primeros 4ns. Más aún, la **Figura 4-6** reveló que existen acortamientos en las desviaciones de las distancias entre los átomos de oxígenos OD1 y OD2 de la cadena lateral en la díada catalítica de BACE1 respecto a la estructura cristalina (PDB ID:2VNM), esto es, valores -0.5Å y -1.0Å en promedio para Δd(OD1.OD1) y Δd(OD2.OD2), respectivamente. Estas variaciones conducen al desplazamiento del inhibidor hacia la zona S2 y los cambios en BACE1 antes mencionados.

4.2.1.4. Estado D289o

La configuración aniónica D289o tiene el oxígeno exterior (OD2) de Asp289 protonado. De acuerdo a la estructura más representativa de la simulación de MD, se encontró que el ligando tiene un rmsd de 0.95Å siendo el cuarto mejor valor del conjunto de estudio, detrás de las conformaciones AspUP, D93oD289o y D93o. En la estructura representativa se observaron para el ligando desviaciones marcadas en las zonas P3, P2, P1 y un desplazamiento en la zona P'2 tal y como ocurre en la conformación D289i. Los cambios netos de diedros fueron de 251.76°, 36.21° y 21.72° para esos ángulos en D(C1.C2.N4.C10), D(S1.N1.C6.C7) y D(C13.C14.C15.C16), respectivamente (**Figura 4-1**). En adición, para la proteína se observan desviaciones notables hacia las zonas S2, S3, Insert A e Insert F y otras más sutiles hacia el Flap de la β-secretasa (**Figura 4-2**). La **Figura 4-3** muestra el acercamiento entre los residuos aspárticos a través de un puente de hidrógeno entre HD2(Asp289) y OD1(Asp93) de la díada catalítica, produciendo un desplazamiento del inhibidor H2 hacia la zona S2 e incrementado los valores para

Δd(OD1_D289.N3)=1.72Å, Δd(OD2_D289.N3)=2.47Å y Δd(N_Q134.O3)=1.01Å (**Figura 4-4**). El análisis de δ en el tiempo para Asp93 y Asp289 mostró que no superan en promedio los 60°, con un incremento en Asp93 de 20° a 40° después de los 6ns y pocas variaciones en Asp289 con un valor promedio δ de 25, salvo el pico de 58° hacia los 1.5ns de simulación (**Figura 4-5**). Adicionalmente, las desviaciones en las distancias en el complejo proteína-ligando para los residuos Asp93 y Gly95 con el grupo Core en H2 son bajas, esto es, los valores de Δd(OD2_D93.O4) y Δd(O_G95.N3) no superan los 0.5Å. En contraste, se observó después de los 6ns un acortamiento en la distancia entre los oxígenos OD2, Δd(OD2.OD2), y posterior formación del puente de hidrógeno entre los residuos Asp que afectan notoriamente los valores de Δd(OD2_D289.N3) (**Figura 4-6**).

4.2.2. Configuraciones Diprotonadas (Estados neutros)

4.2.2.1. Estado D93oD289o.

La configuración D93oD289o presenta ambos oxígenos externos (OD2) en la díada aspártica protonados (**Figura 3-1**). El análisis de los parámetros estáticos muestra para el ligando un rmsd de 0.88Å, siendo el mejor de todas las configuraciones neutras y la segunda a nivel global (**Figura 4-1**). Presenta motivos estructurales orientados de manera cercana al ligando de referencia, como se aprecia en el diedro D(C13.C14.C15.C16)=-51.69° hacia el núcleo de la HEA, en contraste al diedro D(C1.C2.N4.C10)=165.83°, cuya desviación del grupo etil permite ahora el contacto directo con Ile171. Por su lado, la proteína exhibe variaciones estructurales que se dan en las zonas cercanas al sitio activo, desde las más sutiles como aquellas que se dan en los segmentos Ser386-Met394 en S2 y Gly69-Gly74 en S3 hasta las más notables como en las zonas 10s-loop, Insert A e Insert F (**Figura 4-2**). La parte carboxílica de la diada catalítica adoptan diedros D(CB.CG.OD2.HD2) atípicos con valores de 14.31° y 10.76° en Asp93 y Asp289 respectivamente, alejados de su valor ideal 180°, así como una desviación de 0.85Å en la distancia entre los átomos OD2 de los aspartatos respecto a la encontrada en el complejo cristalino (**Figura 4-3**). Sobre las variaciones medidas sobre los pares atómicos en el complejo BACE1/H2 se encuentra que hay poca variación en las distancias con residuos como Gly95, Gly291, Thr293, Gln134 y Asn294, das por Δd(O_G95.N3)=-0.39Å, Δd(N_T133.O3)=0.01Å, Δd(N_Q134.O3)=-0.14Å y Δd(N_N294.O2)=-0.08Å, respectivamente. En contraste, es notable el alejamiento de estas en las medidas que involucran los residuos Asp93, Gly291 y Asp289, tales como Δd(OD2_D93.O4)=0.66Å, Δd(O_G291.N2)=0.50Å, respectivamente (**Figura 4-4**).

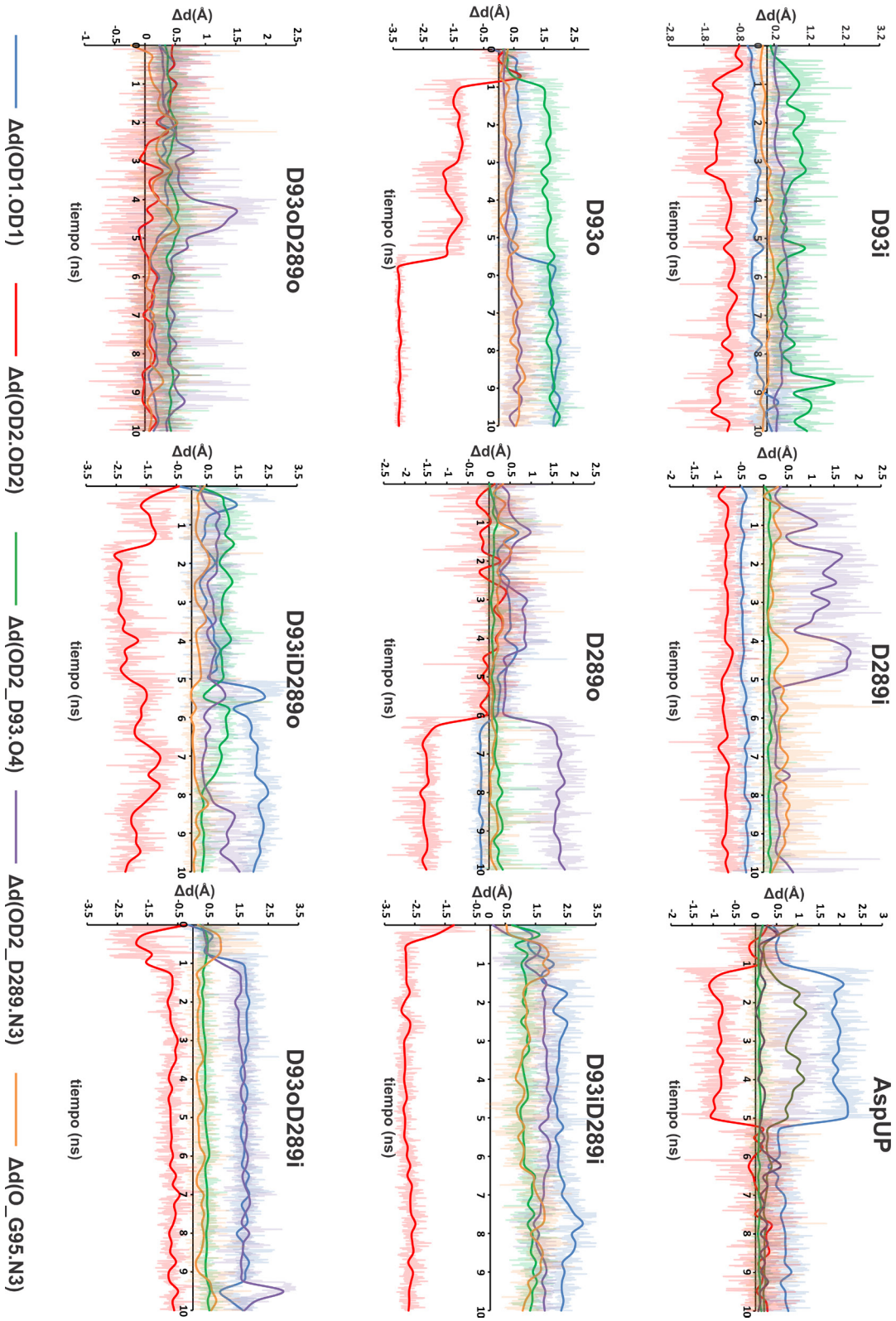


Figura 4-6. Error absoluto de las distancias intermolecular BACE1-H2 que involucran los residuos Asp93, Gly93 y Asp289.

La evaluación de los parámetros dinámicos confirmó que la configuración D93oD289o es la que presenta menor variación del rmsd entre los estados diprotonados de los átomos pesados que hacen parte de la díada aspártica y los que conforman el isóstero que caracteriza las HEA (Grupo Core) sobre los 10ns de simulación de MD (**Anexo III**). El grupo Core no sufre modificaciones pronunciadas salvo entre los 4-5ns de la simulación donde los oxígenos OD1 se acercan y el ligando es desplazado en dirección del flap. En este lapso se observa un incremento en las desviaciones proteína-ligando Δd(OD2_D289.N3) y Δd(O_G95.N3) (**Figura 4-4**). Pasado los 5ns el ligando vuelve a su posición original durante el resto de la simulación, acompañado de valores de δ para Asp93 y Asp289 que no superan los 30° pero exhibiendo siempre los diedros atípicos D(CB.CG.OD2.HD2) en ambos residuos aspárticos (**Figura 4-5**).

4.2.2.2. Estado D93iD289i

La configuración D93iD289i se distingue por ser la que presenta las mayores variaciones en todos los parámetros estáticos y dinámicos medidos sobre el ligando, la proteína y el complejo BACE1/H2. Se identifica como aquella configuración donde ambos oxígenos internos (OD1) están protonados. El ligando mostró un rmsd de 2.38Å basado en la estructura representativa del sistema, siendo el valor más elevado del conjunto de estudio, donde resaltan aquellas variaciones presentes hacia el núcleo de la HEA con valores de D(C21.C13.C14.C15)=-179.88° y D(C13.C14.C15.C16)=-76.29°, que afectan la orientación del grupo benzyl en el subpokect S1 del sitio activo (**Figura 4-1**). Adicionalmente, exhibe las mayores variaciones en los átomos pesados que conforman el Grupo Core (**Anexo III**). La apertura del flap es el cambio más sobresaliente en la proteína como lo reflejan los valores de RMSD de los CA en los residuos (**Figura 4-2**) y los valores en las desviaciones en las distancias proteína-ligando con Thr133 y Gln134, dadas por Δd(N_T133.O3)=7.09Å y Δd(N_Q134.O3)=6.02Å (**Figura 4-4**). Los grupos ácidos en la díada aspártica adoptan una geometría similar a la conformación D93oD289o, incluyendo los diedros atípicos D(CB.CG.OD2.HD1) de -14.67° y 6.54° para Asp93 y Asp289, respectivamente (**Figura 4-3**). El análisis de los parámetros dinámicos muestra que desde el primer nanosegundo de simulación que el sistema sufre variaciones por encima de los 100° para δ en ambos residuos catalíticos (**Figura 4-5**), acompañados de un acortamiento en Δd(OD2.OD2) alrededor de los 2.5Å y un alargamiento para Δd(OD2_D93.O4) y Δd(OD2_D289.N3) en más de 1.5Å durante el resto de la simulación (**Figura 4-6**).

4.2.2.3. Estado D93iD289o

La conformación neutra D93iD289o consta de la protonación en el oxígeno interno y externo para Asp93 y Asp289, respectivamente (**Figura 3-1**). Las mediciones hechas sobre la estructura más representativa sistema muestra que el inhibidor H2 tiene un rmsd de 0.97Å respecto a la estructura de referencia, siendo las zonas P1, P'1 y P'2 del ligando los motivos estructurales con menor desviación como lo muestran los diedros D(C21.C13.C14.C15), D(C13.C14.C15.C16) y D(C22.N3.C23.C24) con valores de -171.11°, -48.23° y 65.55°, respectivamente (**Figura 4-1**). En contraste, las mayores variaciones se dan hacia la zona P3 en más de 80° del diedro D(C1.C2.N4.C10). Respecto a los diedros en la cadena lateral de los residuos aspárticos, cabe mencionar que D(CB.CG.OD1.HD1)= -179.47° en Asp93, el cual sufrió un giro de casi 180°, un evento extendido para todas las conformaciones que involucran protonación en OD1 de Asp93 (**Figura 4-3**). Para el complejo proteína-ligando, se encontraron bajas desviaciones para los valores de distancia que involucran los residuos en las zonas S1 y S2 en el sitio activo de BACE1, esto es, Δd(O_G95.N3)=0.04Å, Δd(O_Q134.O3)=0.11Å, Δd(O_N294.O2)=0.02Å. Sin embargo, se encontraron desviaciones notorias hacia la zona S'1 en BACE1, específicamente en Δd(OD1_D93.O4)=-0.88Å, Δd(OD2_D93.O4)=1.33Å y Δd(OD1_D289.N3)=1.03Å (**Figura 4-4**). La evaluación de δ en el tiempo para el residuo Asp289 arroja una desviación en el rango de ±40° para el diedro ϕ y se caracteriza además por adoptar un diedro atípico D(CB.CG.OD2.HD2)=1.98°, con pocas variaciones a través de la simulación con el fin de evitar las repulsiones con el motivo amínico del ligando, explicando el incremento en Δd(OD2_D289.N3) y Δd(O_G5.N3), un aspecto común en todas las configuraciones donde se da la protonación del oxígeno externo en Asp289. En contraste, el residuo Asp93, protonado en su oxígeno interno (OD1), muestra un continuo cambio en los diedros ϕ y D(CB.CG.OD2.HD1) (**Figura 4-5**). Los desfases en δ van de 0-180° en los primeros 4ns. Entre 4-6ns se presenta un incremento en las distancias Δd(OD1.OD1) que afectan directamente las interacciones de esa región del ligando con los residuos Gly95 y Asp289 (**Figura 4-6**). En los últimos 4ns el complejo proteína-ligando se estabiliza, asumiendo una geometría similar a la D93oD289o, donde el valor para en el diedro ϕ oscila entre ±40-80°.

4.2.2.4. Estado D93oD289i

La configuración D93oD289i sigue la tendencia de las otras configuraciones diprotonadas, esto es, que la diada aspártica asuma al cabo de un tiempo la configuración D93oD289o, quien parece la más estable de las 4 evaluadas (**Figura 4-3**). Esta configuración neutra se caracteriza por la protonación en OD2 y OD1 en Asp93 y Asp289, respectivamente. Respecto a la estructura más

representativa de la simulación, el ligando reporta un rmsd de 1.39Å siendo la zona P1 la de menor variación, D(C21.C13.C14.C15), caso contrario a lo que aprecia en zonas como P2, P3 y P'1 (**Figura 4-1**). Por otro lado, la proteína sufre algunos cambios respecto a la estructura de referencia siendo evidente aquellos presentes en las zonas Flap, S2 y S3, hacia el sitio activo de la β-secretasa y, las regiones Insert A e Insert F en las vecindades del sitio activo (**Figura 4-2**). El aspecto geométrico notorio es la inversión del diedro D(CA.CB.CG.OD2) en Asp289, así como valores en los diedros D(CB.CG.OD2.HD2) y D(CB.CG.OD1.HD1) de 7.03° y 2.19° para Asp93 y Asp289, respectivamente (**Figura 4-3**), con el fin de minimizar las repulsiones con el isóstero hidroxietilamina del ligando, como se refleja en el incremento en las desviaciones de OD1 y OD2 en Asp289 con O4 y N3 de H2, esto es, Δd(OD1_D289.N3)=-1.01Å y Δd(OD2_D289.N3)=1.91Å (**Figura 4-4**). La trayectoria de la simulación para la configuración D93oD289i mostró que la inversión en el diedro D(CA.CB.CG.OD2) en Asp289 se hacia el primer nanosegundo quien cambia en más de 160° y quien se mantiene hasta los 10ns (**Figura 4-5**). Esta rotación afecta las distancias entre los diferentes átomos pesados de los oxígenos de Asp93 y Asp289 con el Core del ligando, destacando el incremento en Δd(OD2_D289.N3), esto es, la distancia entre el oxígeno externo del Asp289 y el nitrógeno amínico en H2 (**Figura 4-6**).

4.2.3. Configuración Di-deprotonado (Estado dianiónico)

4.2.3.1. Estado AspUP

La conformación AspUP es el estado en la que ambos residuos de aspartato se encuentran desprotonado (**Figura 3-1**). El estado dianionico de la β-secretasa se caracteriza por mostrar pocas variaciones estructurales en la proteína, ligando y en la diada aspártica. La estructura más representativa de la simulación MD muestra la conservación de las zonas Flap, S2, S3 y 10s-loop en el sitio activo de BACE1 respecto a la estructura de referencia (**Figura 4-2**). En contraste las zonas Insert A y F muestran desviaciones espaciales, una constante en los 9 estados de protonación evaluados (**Figura 4-2**). Por su lado, el inhibidor muestra el RMSD de los átomos pesados más bajo del conjunto con un valor de 0.600 Å (**Figura 4-1**), en las que, excluyendo las ligeras variaciones en la zona P3 donde se halla el motivo flexible etilamina, se encuentran conservadas las zonas P1, P2, P'1 y P'2. El análisis de las desviaciones en el complejo BACE1/H2 muestra pocas desviaciones en las distancias entre la proteína y el ligando en las diferentes zonas del sitio activo como S'1, S1 y S2, donde Δd(OD2_D93.O4)=0.06Å y Δd(OD1_D93.O4)=0.38Å en Asp93, Δd(OD2_D289.N3)=0.20Å y Δd(OD1_D289.N3)=-0.16Å en Asp289, Δd(O_G95.N3)=0.04Å en Gly95, Δd(O_G291.N2)=0.34Å en

Gly291, Δd(N_N294.O2)=0.00Å en Asn294, entre otros (**Figura 4-4**). Sobre los parámetros dinámicos se encontró que Entre 1-5ns el diedro ϕ presenta un desfase que oscila alrededor de los 140° (**Figura 4-5**) que afecta las distancias medidas que involucran el átomo OD2 en Asp289 (**Figura 4-6**). Sin embargo, puesto que ambos residuos de aspartato se encuentran desprotonado, no hay distinción entre los oxígenos OD1 y OD2, entonces si δ=180° haría que $\mathrm{D(CA.CB.CG.OD1)} = \mathrm{D(CA.CB.CG.OD2)}$ y por lo tanto, se conservará la variación en δ de aproximadamente 40° para el residuo Asp289 y desviaciones menores de 0.40Å en las desviacioens de Δd(OD2.OD2) y Δd(OD2_Asp189.N3) presentes al inicio y después de los 5ns de simulación MD. Sumado a esto, se presenta un desfase alrededor de 20° en el diedro ϕ en Asp93 por lo que las desviaciones Δd(OD2_D93.O4), al igual que Δd(O_G95.N3), se presentan cercanas a cero en la toda la trayectoria. Dicho lo anterior, existe una estabilización permanente y continua entre el Core del ligando y la diada aspártica en el sitio activo de BACE1.

4.3. Consideraciones generales del análisis

Luego de analizar las 9 trayectorias de los complejos BACE1/HEA en sus diferentes configuraciones monoprotonadas, diprotonadas y di-deprotonadas, se observan 2 aspectos transversales en las simulaciones como son: 1) Variaciones en las regiones Insert A e Insert F. La región modelada Insert A sufre desplazamientos que afectan espacialmente a su región vecina Insert F; y 2) Poca variabilidad en las distancias e interacciones hacia la zona P2 de H2, donde se halla el motivo sultamico del inhibidor, que se manifiesta en la poca variación en las distancias con los residuos Thr293 y Asn294, por lo que estos parámetros impasibles no pueden ser usados como determinantes en el estado de protonación. Es pertinente acotar que sólo el rmsd del ligando de la estructura más representativa respecto a la pose experimental no constituye un parámetro suficiente para discernir entre los diversos estados de protonación por desconocer este, los posibles cambios conformacionales que sufrió la enzima a través del tiempo de simulación, aspectos ignorados en simulaciones de acoplamiento molecular, donde la proteína es considerada rígida o la cantidad de movimiento se rige a unos pocos enlaces rotables, al igual que en estudios donde el sistema se restringe a unos pocos aminoácidos del sitio activo de BACE1, por lo que es necesario un estudio profundo del complejo BACE1/HEA en el tiempo que permitan explorar y discernir el estado de protonación más apropiado de la β-secretasa en presencia de esta familia de inhibidores.

El análisis de las trayectorias para los estados monoprotonados (D93i, D93o, D289i y D289o), considerado como el más adecuado en la presencia de varias familias de inhibidores del estado de protonación, deja ver que una protonación en cualquiera de los oxígenos de la cadena lateral de los residuos de aspartato no es factible ya que, conlleva a la formación de puentes de hidrógeno entre los residuos aspárticos, lo que se refleja en el acortamiento de las distancias Δd(OD1_OD1) y/o Δd(OD2_OD2), y una pérdida de la interacción con la región amínica de H2 con Asp289 y/o Gly95 (incremento en la distancia Δd(OD2_D289.N3) y/o Δd(O_G95.N3) (**Figura 4-6**). Este efecto es marcado en las configuraciones monoprotonadas donde el protón se halla en el oxígeno externo (OD2), D93o y D289o. Es esta última es la de mayor rmsd a través del tiempo del grupo Core con las diada aspártica y donde se da un desplazamiento de la cola del ligando en P'1 y P'2, mientras que en la configuración D93o se produce una inversión del diedro ϕ para evitar las repulsiones con el grupo hidroxilo en el ligando y una conversión a la conformación D93i, quien eventualmente producirá cambios marcados en el sitio activo de BACE1 (sección 4.2.1.1). En contraste, la configuración D289i presenta una atenuación de los efectos antes mencionados y convirtiéndose en el estado monoprotonado más factible, siendo el orden D289i > D289o > D93i > D93o. Por otro lado, los estados neutros (D93oD289o, D93iD289i, D93iD289o y D93oD289i) se caracterizaron por generar grandes cambios conformacionales en el sitio activo de la β-secretasa y sus vecindades, debido principalmente a los "clashes" estéricos proteína-proteína y proteína-ligando, siendo la configuración D93iD289i la que sufre mayores cambios en la proteína y H2 (sección 4.2.2). Además, a nivel de la diada Asp se presentaron diedros atípicos menores a 15° en D(CB.CG.OD2.HD2) y/o D(CB.CG.OD1.HD1) relacionados al poco espacio en el bolsillo catalítico y con el fin de disminuir las repulsiones proteína-ligando. Además, la conformación D93oD289o es, sin lugar a dudas, la mejor de este conjunto ya que las conformaciones convergen en ella, esto es, en las otras configuraciones los residuos de Asp sufren cambios en su diedro ϕ en más de 140° que resultan en una geometría en la diada aspártica similar a la D93oD289o. Por último, el estado Dianiónico (configuración AspUP) es el más factible en los complejos BACE1/HEA de acuerdo a los parámetros estáticos y dinámicos de rmsd y variaciones en las distancias y diedros medidos en el presente estudio sobre el ligando, la proteína y el complejo proteína-ligando, evidenciado en las pocas desviaciones en las mismas respecto a la estructura experimental cristalina y las demás configuraciones mono- y di-protonadas a través de toda la simulación de MD. Adicionalmente, es notable la conservación de las diferentes regiones como el flap, S1, S'1, S2 y 10s-loop en la proteína en toda su trayectoria.

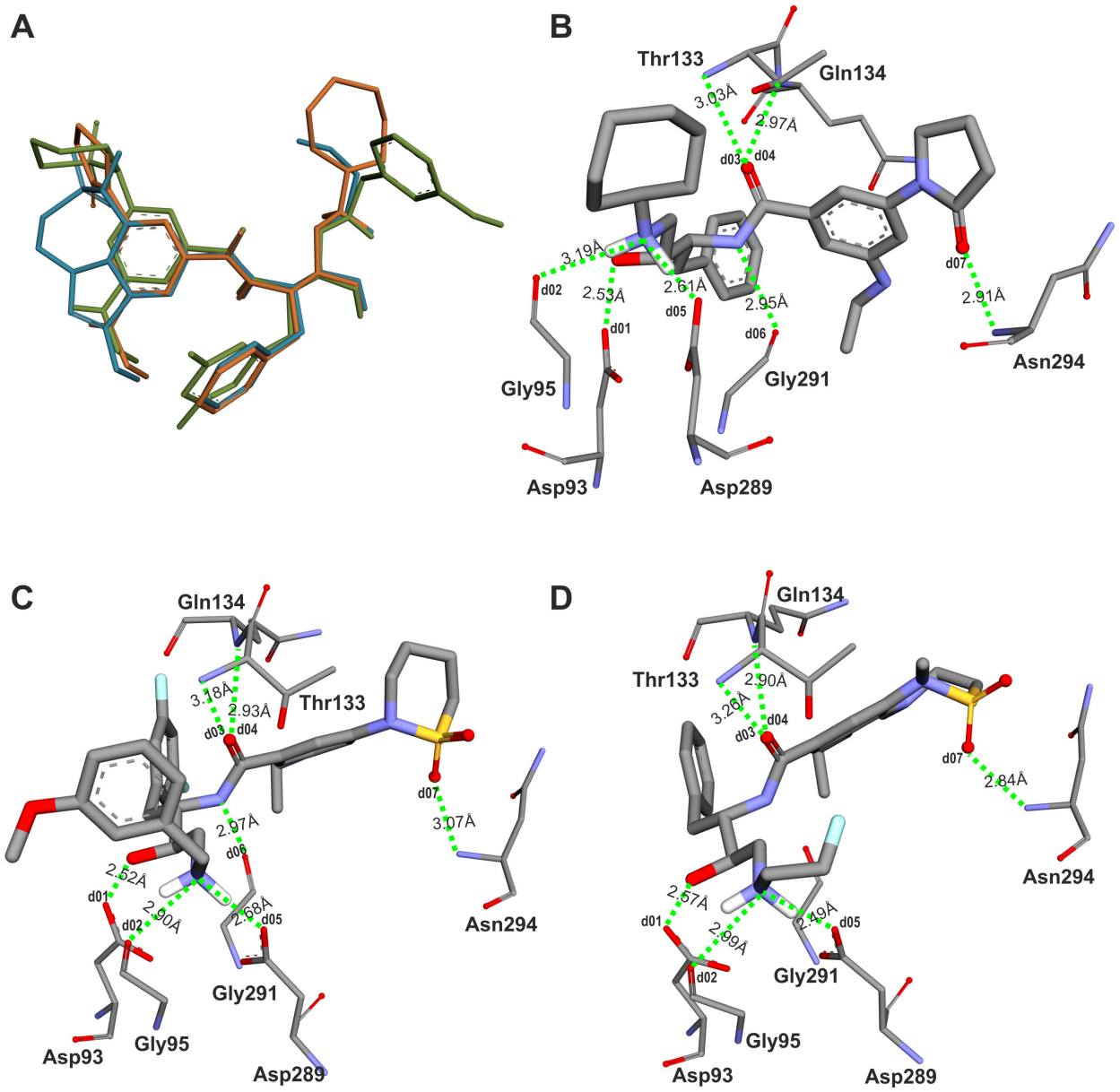


Figura 4-7. Inhibidores HEA no co-cristalizados luego de los protocolos de docking y optimización SQM. **A.** Superposición de los modos de acoplamiento y, las HEAs **B.** V207 **C.** V317 y **D.** N323 dentro del sitio activo de BACE1.

4.4. Validación del estado AspUP

Con el fin de probar la habilidad de diferentes HEAs para estar bien acomodadas dentro del sitio activo de BACE1, usando la configuración AspUP, se ejecutó el acoplamiento de 3 HEA no cristalográficas con β-secretasa, seguido de una optimización con MOZYME/PM7 (sección 3.2.1). Se consideró la diversidad molecular en diferentes regiones de la HEA, tales como, la cabeza polar en P2, donde se consideró grupos lactama (compuesto V207) y sultama (compuestos V317 y N323), mientras que en la cola hidrofóbica en P'2 se evaluaron grupos alifáticos (N323), cíclico (V207) y aromático (V317). Es más, se consideró la sustitución en el anillo fenilo (compuesto V317) hacia la zona P1. La **Tabla 4-1** muestra distancias intermoleculares que involucran los residuos Asp93, Gly95, Thr133, Gln134, Asp289, Gly291 y Asn294, 7 de las principales interacciones BACE1-HEA. Más aún, los valores se añadieron los valores proteína-ligando de sus plantillas para el análisis comparativo. Los resultados indicaron que, luego de la optimización SQM, no se observó ninguna transferencia entre la proteína y el ligando (**Figura 4-7**). Adicionalmente, el modo de acoplamiento de las 3 HEA evaluadas fueron similares a sus plantillas experimentales, conservando las principales interacciones (**Figura 4-7A**); los motivos amida, bencilo, hidroxilo y amina, hacia las zonas P1 y P'1, mostraron un alto grado de superposición. El motivo becilo (**Figura 4-7B** y **Figura 4-7D**), incluyendo aquel sustituido (dicloro-bencilo, **Figura 4-7C**), estuvo dentro del bolsillo hidrofóbico S1 interactuando con los residuos Tyr132, Phe169 y Trp176. La cabeza lactama (**Figura 4-7B**) y sultama (**Figura 4-7C** y **Figura 4-7D**) interactuaron con la cadena principal de Asn294, como lo reflejó la distancia d07 cuyos valores estuvieron en el rango 2.84-2.91Å. Por otro lado, se observaron ligeros acortamientos en las distancias hacia la zona del flap, donde los valores fueron de 3.03 – 3.26Å y 2.90 – 2.97Å para los residuos Thr133 y Gln134, respectivamente. También se hallaron otros acortamientos, relacionados a los puentes de hidrogeno que involucran los residuos Gly95 y Asp93 con los motivos hidroxilo y amínico en los ligandos. Por último, el contacto ionico entre el grupo amínico cargado en la HEA con el residuo catalítico Asp289 en el bolsillo S'1, una zona sensible a los estados de protonación de ambas especies, arrojó un rango de distancia de 2.49 – 2.65Å, el cual es cercano a los reportados experimentalmente (**Tabla 4-1**).

Se concluye que el estado di-deprotonado muestra ser la configuración, de las 9 evaluadas en el presente estudio, que mejor reproduce y mantiene menores desviaciones en el tiempo respecto a la estructura cristalina experimental, estando de acuerdo a lo previamente publicado por nuestro grupo de investigación, Grupo de Química Bioorgánica, en la que se implementó una serie de reacciones homodesmicas(Gueto-Tettay et al. 2011).

Tabla 4-1. Cuadro comparativo de las distancias de las principales interacciones BACE1-HEA para las estructuras cristalográficas y las empleadas para la validación del estado AspUP.

Nombre	BACE1		HEA		Experimental[a]			Docking-SQM[b]		
	Residuo	Átomo	Átomo	Zona	2VIE	2VNM	2WF1	V207	V317	N323
d01	Asp93	OD2	O4	P'1	2.60	2.54	2.59	2.53	2.52	2.57
d02	Gly95	O	N3	P'1	3.44	2.99	3.02	3.19	2.90	2.99
d03	Thr133	N	O2	P2	3.16	3.22	3.20	3.03	3.18	3.26
d04	Gln134	N	O2	P2	3.00	3.03	3.05	2.97	2.96	2.90
d05	Asp289	OD2	N3	P'1	2.66	2.61	2.68	2.56	2.65	2.49
d06	Gly291	O	N2	P1	2.92	2.84	2.97	2.95	2.86	2.91
d07	Asn294	N	O1	P2	2.84	2.96	3.08	2.91	2.85	2.84

[a] Complejos cristalograficos BACE1-HEA

[b] HEA usadas para la validación (**Anexo II**)

Los resultados producto del análisis de las simulaciones de MD, para los diferentes estados de protonación sobre la diada catalítica, permiten dar una luz sobre el mecanismo inhibitorio de esta familia de compuesto sobre BACE1; Por un lado tenemos que, de acuerdo al mecanismo ácido-base de las aspartil proteasas, uno de los residuos Asp hace la transferencia de su protón al sustrato (Barman & Prabhakar 2013). Ahora bien, dado que hemos demostrado que el estado protonación AspUP (di-desprotonado) es el más probable, una vez se forma el complejo BACE1(cerrada)/HEA, es factible que el proceso inhibitorio inicie con la llegada de la HEA neutra al bolsillo catalítico monoprotonado de la β-Secretasa en donde el residuo Asp289, eventualmente, le cederá el protón que llevaría a la formación y estabilización del complejo proteína-ligando con una diada aspártica dianionica y una HEA que actuaría como una amina cargada. Por otra parte, estos resultados resultan útil para mejorar las técnicas de cribado virtual de bases de datos constituidos de HEAs en la búsqueda de compuestos líderes que sirvan como inhibidores de BACE1, los cuales serán útiles para prevenir la acumulación del péptido Aβ, causante de las características neuropatológicas del Alzheimer.

4.5. Conclusiones del Capítulo 4

Un conjunto de simulaciones MD se llevaron a cabo en un complejo proteína-ligando, de código PDB 2VNM, que consiste en BACE1 acompañada con un ligando representativo de la familia de las HEAs (H2), con el objetivo de determinar el estado de protonación más probable de la aspartil proteasa en presencia de este tipo de inhibidores. El análisis de los 10ns de simulación para cada uno de los 9 estados de protonación en la diada aspártica confirman que el estado di-deprotonado es el más factible para los complejos BACE1/HEA. Esto, tras el análisis de un conjunto de parámetros estáticos y dinámicos medidos sobre el ligando, la proteína y el complejo proteína-ligando que miden las desviaciones respecto a la estructura experimental de rayos-X del complejo BACE1/H2. Más aún, la optimización con el método SQM PM7 demostró la estabilidad de la configuración de estados de protonación, al no mostrar ningún tipo de transferencia protónica entre las especies involucradas. El estudio mostró que las configuraciones monoprotonadas sufren de acortamientos en las distancias de los oxígenos externos e internos de los residuos aspárticos que promueven el desplazamiento del ligando en el sitio activo, siendo D289i aquel que sufre menores desviaciones. Adicionalmente, las configuraciones neutras conducen a cambios notables en el sitio activo y sus vecindades debido a las repulsiones proteína-ligando, donde la configuración D93oD289o es la más opcionada por ser la convergencia de las demás configuraciones neutras. Por último, el estudio deja claro que es necesario considerar siempre el sistema proteína-ligando para la discusión de resultados, puesto que el ambiente químico en cada configuración puede afectar la posición del inhibidor y algunos residuos en la proteína lo que conlleva a cambios conformacionales en ambas especies.

_____

5. LnAsn289 Es La Configuración Que Induce Un Cambio Conformacional En BACE1 de su forma apo a cerrada

Artículo publicado como resultado:

Gueto-Tettay, C., Zuchniarz, J. Fortich-Seca, Y. Gueto-Tettay, L. R. Drosos-Ramirez, J. C. **A molecular dynamics study of the BACE1 conformational change from Apo to closed form induced by hydroxyethylamine derived compounds.** J. Mol Graph Mod 70 (**2016**) 181-195. DOI: *10.1016/j.jmgm.2016.10.006*

Documento adjunto en la sección: Anexo XV. Publicación Científica #2.

5.1. Introducción al Capítulo 5

El mal de alzheimer (AD) es una enfermedad degenerativa del sistema nervioso central, la cual es responsable de la mayoría de los casos de demencias en la vejez, afectando más de 40 millones de personas a nivel global, de acuerdo al Alzheimer's Association (www.alz.org). La progresión de la enfermedad causa generalmente que las funciones del cerebro disminuyan, afectando inicialmente la habilidad cognitiva, memoria y resultando eventualmente en la incapacitación y muerte(Evin 2016; Hersi et al. 2017). La patogénesis de la AD está caracterizada por la deposición de placas extracelulares dentro del cerebro. Los componentes principales de estas placas son péptidos Aβ de 40 o 42 residuos de longitud. Estudios *in vivo* e *in vitro* han propuesto a BACE1 como un blanco prominente para el tratamiento de la AD por su papel en el

paso cinético-limitante en la producción de los péptidos Aβ(Edwards et al. 2016; Wilkins & Swerdlow 2016; Yan et al. 2016). La β-secretasa, o BACE1 (β-site of Amyloid precursor protein Cleaving Enzyme), es una proteasa aspártica (Hong et al. 2000). El sitio activo de BACE1 contiene por dos residuos aspárticos, Asp93 y Asp289, cubierto por un bucle de horquilla antiparalela conocido como flap(Hong & Tang 2004). Se ha reportado para las proteasas aspárticas que el cubrimiento del sitio activo por el flap juega un papel importante en el acoplamiento debido a los cambios conformacionales que regulan el acceso de los sustratos o ligando entrantes(Hong & Tang 2004; Xu et al. 2012; Chakraborty & Basu 2015; Kumalo et al. 2016; Mahanti et al. 2016). En general, cuando el sitio activo permanece inactivo, el flap se mantiene en su conformación abierta. Sin embargo, el flap se estabiliza mientras cierra encima de su sustrato o algún otro inhibidor. La flexibilidad y dinámica del flap se ha estudiado para algunos miembros de esta familia de proteínas, tales como la proteasa del HIV(Hornak et al. 2006; Ishima & Louis 2008; Cai et al. 2012), Catepsina D(Arodola & Soliman 2016), Plasmepsina II(Karubiu et al. 2015), Renina (Bras et al. 2014)y BACE2(Kumalo & Soliman 2016).

Las hidroxietilaminas (HEA) son una familia de compuesto que exhiben gran poder inhibitorio sobre BACE1 así como buenas propiedades farmacológicas y biodisponbilidad oral(Kortum et al. 2007; Charrier et al. 2008; Charrier et al. 2009; Charrier et al. 2009; Clarke et al. 2010; Truong et al. 2010; Rueeger et al. 2012; Ambure & Roy 2016). El estado de protonación que adopta la díada aspártica varía con las propiedades químicas que tenga el sustrato o inhibidor. Previamente reportamos el estado de protonación final más probable de la díada aspártica cuando se encuentra acoplado con las HEAs, a través de reacciones homodesmicas(Gueto-Tettay et al. 2011) y simulaciones de Dinámica Molecular (Capitulo 4). Adicionalmente, se reportó la influencia de las variaciones estructurales en el ligando en las energías de interacción residuo-ligando, revelando la importancia cuantitativa de los residuos Asp93, Gly95, Thr133, Gln134, Asp289, Gly291, Thr293 y Asn294, entre otros, en el acoplamiento BACE-HEA(Gueto-Tettay et al. 2011). Sin embargo, quedan preguntas por resolver referentes a los eventos iniciales en el proceso de inhibición de la β-secretasa por las HEAs, específicamente los estados de protonación de ambas especies (inhibidor y díada aspártica) a la llegada del ligando al sitio activo, así como el lugar y momento en que el ligando es protonado.

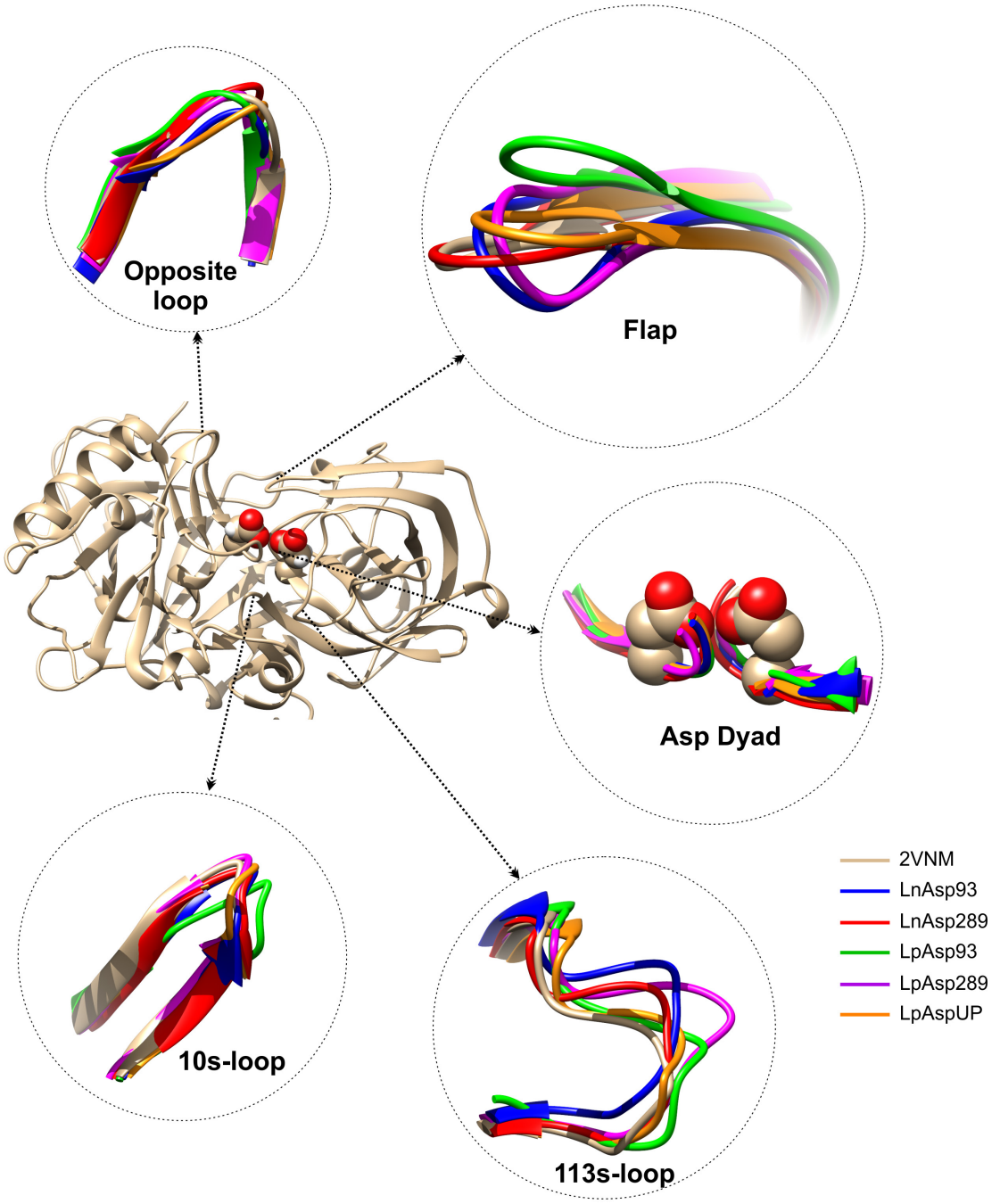


Figura 5-1. Superposición de los diferentes segmentos del sitio activo de BACE1, y sus vecindades, para las estructuras más representativa de cada configuración. La estructura experimental (PDB ID 2VNM) se usó como referencia.

Para abordar este tema se realizaron un conjunto de simulaciones de MD para un complejo BACE1-HEA con un inhibidor representativo (H2, ***Tabla 3-1***). Es importante mencionar que este sistema proteína-ligando ha sido eficaz como modelo de estudio en la determinación de los estados de protonación final de los complejos BACE1-HEA. Para la estructura inicial del complejo

proteína-ligando, el inhibidor fue acoplado en el sitio activo de BACE1 en su forma Apo usando diferentes configuraciones de estados de protonación aniónicas diada Asp-HEA, e.g., LnAsp93, LnAsp289, LpAsp93, LpAsp289 y LpAspUP (**Figura 3-2**). Para determinar la configuración que induce el cambio de BACE1 de la forma Apo a la cerrada, fueron usados las desviaciones porcentuales de un conjunto de parámetros que miden la dinámica del flap (d1, d2, θ y ϕ) y las interacciones proteína-ligando (d3, d4, d5 y d6, **Figura 3-3**). Los valores de referencia para las distancias y ángulos fueron tomados de la estructura co-cristalizada de H2 con BACE1 en la forma cerrada (PDB ID: 2VNM)(Charrier et al. 2008). Adicionalmente, se introdujo el concepto de densidad poblacional como una medida numérica para determinar qué porcentaje de la población (cantidad total de instantáneas), contiene simultáneamente una cantidad de parámetros dentro de un rango de tolerancia respecto a la estructura cristalina de referencia.

Los resultados por ambos métodos arrojaron que la configuración LnAsp289 es la única que induce un cambio de las formas Apo a cerrada del flap estable en el tiempo. Esto sugiere que la protonación del ligando se da dentro del sitio activo de BACE1. Además, el análisis de la configuración LpAspUP usando la forma Apo de BACE1 apunta a que la protonación del ligando se da posterior al cierre del flap. Entonces la ruta de inhibición de BACE1 por las HEA empieza con un inhibidor neutro y la díada aspártica protonada en Asp289. Eventualmente se dará una transferencia protónica de Asp289 al nitrógeno amínico en la zona P'1 que conllevará a la estabilización del complejo proteína-ligando.

5.2. Análisis de las configuraciones de estados de protonación

El primer paso para el estudio de los eventos iniciales en el proceso inhibitorio de BACE1 por parte de las HEA consiste en la determinación de los estados de protonación de ambas especies al momento del reconocimiento de los inhibidores HEA por parte de la proteína en su forma Apo. Para ello se consideraron un total de 5 modelos que abordan las posibles combinaciones de estados de protonación para el inhibidor H2 y los aspartatos catalíticos, e.g., LnAsp93, LnAsp289, LpAsp93, LpAsp289 y LpAspUP (**Figura 3-2**). La técnica de dinámica molecular se usó para estudiar el proceso de cierre del flap. Se calcularon las desviaciones porcentuales de 8 parámetros (**Figura 3-3**) que rastrean el movimiento del flap (d1, d2, θ y ϕ) y las interacciones BACE1-HEA (d3, d4, d5, d6) respecto a su complejo cristalino (PDB ID: 2VNM). Los primeros se han propuesto para describir la dinámica de apertura/cierre del flap de BACE1 y otras aspartil proteasas, como la renina(Bras et al. 2014), catepsina D(Arodola & Soliman 2016) y proteasa del HIV(Hornak et al. 2006). Por otro lado, previamente demostramos que los parámetros proteína-

ligando medidos en la zona del motivo distintivo de las HEA son sensible a los distintos estados de protonación en la díada (Capitulo 4). La **Figura 5-1** muestra las regiones del sitio activo de BACE1 y sus vecindades para las estructuras más representativas, después de los 70ns de simulación. La desviación porcentual de los parámetros proteína-proteína y proteína-ligando, medidos para cada configuración, se muestran en la **Figura 5-2** y **Figura 5-3**, respectivamente. Las conformaciones del flap y el ligando respecto a la estructura cristalina, tomadas cada 10ns, se muestran en la **Figura 5-4** y **Figura 5-5**, respectivamente. Figuras similares para las regiones opposite-, 10s- y 113s-loop se encuentra en la sección 9.2 (Anexos Capítulo 5)**.** A continuación, se presentará el análisis individual de cada configuración.

5.2.1. Configuración LnAsp93

La configuración LnAsp93i está identificada como el estado de protonación para el complejo BACE1/HEA donde el ligando se encuentra como una amina neutra y el Asp93 protonado en su oxígeno interno (**Figura 3-2**). De acuerdo a los parámetros que determinan la dinámica del flap (**Figura 5-2**), este presentó procesos continuos de cierre/reapertura, mostrando cierres en los primeros 15ns y después de los 45ns de trayectoria, como lo muestran los valores en las desviaciones porcentuales respecto a la estructura cristalina 2NVM en las distancias entre Ca Thr133-Ser386 (Ed1) y Thr133-Asp289 (Ed2) (**Figura 5-2A** y **B**), donde ambos exhiben valores alrededor del 12% en el primer intervalo. Después de los 45ns de simulación, los valores de Ed1 estuvieron por debajo del 5% de desviación y manteniéndose cercanos hasta el final de la trayectoria. Para el parámetro Ed2, los valores se hallan alrededor del 5% de 46 a 60ns para luego aumentar gradualmente hasta el 15%. Durante el tiempo de apertura el flap las desviaciones porcentuales en Ed1 y Ed2 están alrededor del 20%. Por otro lado, los valores para las desviaciones en el ángulo θ, Eθ, siguen la misma tendencia que los parámetros Ed1 y Ed2, donde desviaciones alrededor del 30% se hallan entre 20 y 40ns (**Figura 5-2C**).

El parámetro Eϕ, el cual mide el giro o "twisting" del flap, presenta desviaciones que oscilan alrededor del 20% y que cambia a -20% luego de los 60ns de trayectoria (**Figura 5-2D**). Las desviaciones en el diedro ϕ explican los cambios conformacionales en la zona del flap y el proceso de cierre del sitio activo tras la llegada del ligando a la hendidura. Este conjunto de desviaciones, en los diferentes parámetros, se traducen en diferentes movimientos que realizó el flap durante la simulación MD, los cuales lo alejan de la conformación adoptada por la estructura de referencia. Adicionalmente, otras regiones del sitio activo y sus vecindades sufrieron desviaciones significativas comparadas con 2VNM. Los segmentos que de mayor

variabilidad fueron Ser388-Gly391 (**Anexo IV**), Lys70-Gly72 (**Anexo V**) y Phe170-Trp176 (**Anexo VI**), en el opposite-, 10s- y 113s-loop, respectivamente. Respecto a los parámetros proteína-ligando (**Figura 5-3**) se encontró que la distancia entre el oxígeno carbonílico en la zona P3 de H2, con el N de la cadena principal en Thr133 en la punta del Flap exhibió desviaciones que oscilan entre 50-60% respecto a lo encontrado en la estructura cristalina (**Figura 5-3A**). La importancia de este puente de hidrógeno en el proceso de cierre del flap y estabilidad de los complejos BACE1-ligando ha sido reportado extensamente(Hong & Tang 2004; Spronk & Carlson 2011; Cai et al. 2012; Xu et al. 2012; Chakraborty & Basu 2015; Kumalo et al. 2016; Mahanti et al. 2016).

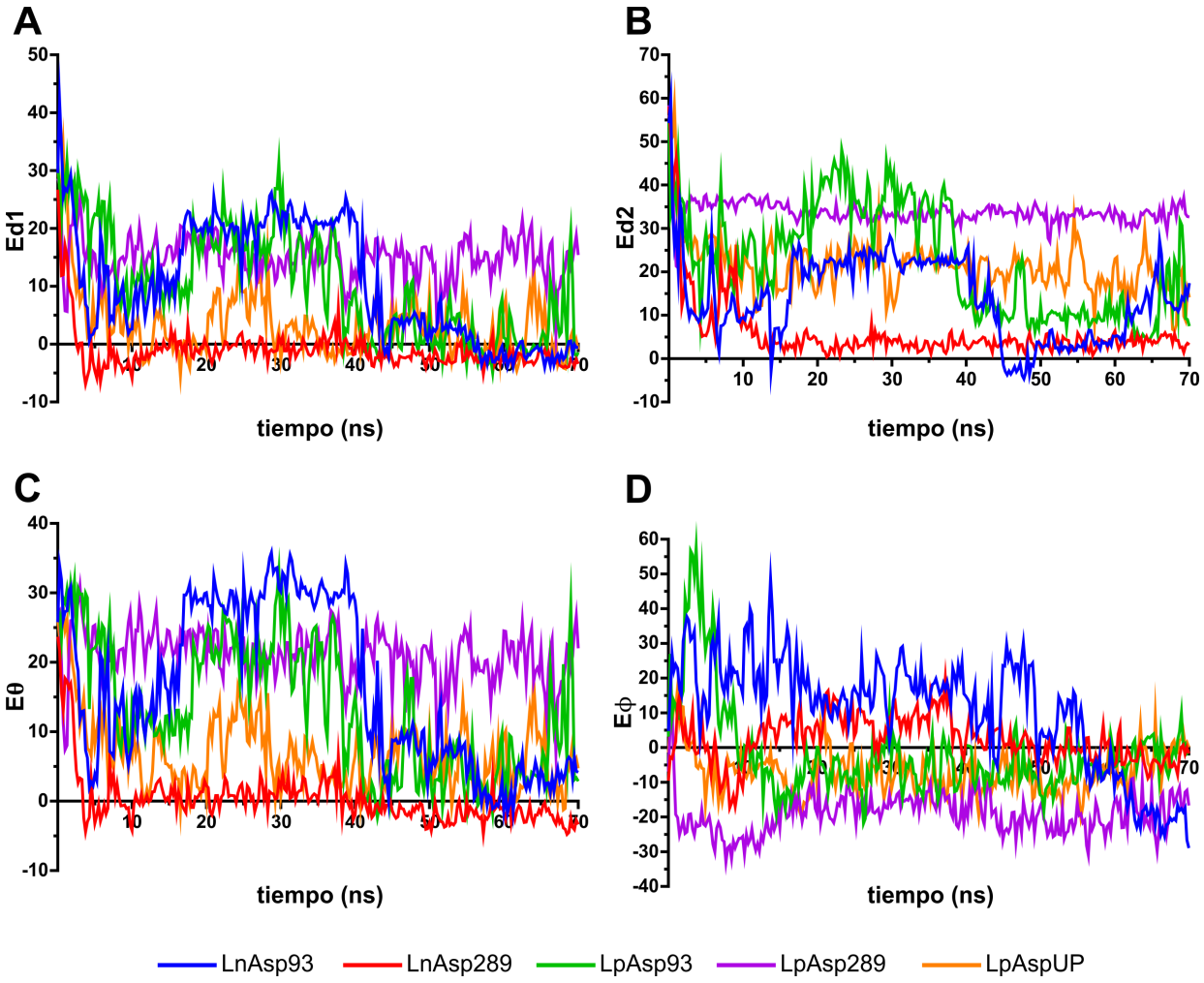


Figura 5-2. Error porcentual respecto a la estructura cristalina 2VNM de parámetros que describen el movimiento del flap: **a)** d1 **b)** d2 **c)** θ y **d)** ϕ. Los valores graficados muestran los valores promedios cada 250ps de simulación. El Código de colores para las diferentes configuraciones se muestra en el fondo.

Por otro lado, los parámetros Ed4, Ed5 y Ed6, los cuales son sensibles a los estados de protonación en BACE1 y H2, mostraron desviaciones en los primeros 50ns de alrededor del 27%, 23% y 50%, respectivamente. Además, se encontraron disminuciones hasta el 15% y 10% para Ed4 y Ed5 en el tiempo restante de simulación (**Figura 5-3B** y **C**). Estos alargamientos pueden explicarse por los constantes desplazamientos que sufrió el ligando en dirección del 10s-loop, siendo más notorios en los primeros 40ns de simulación en las zonas P'1, P2 y P3 (**Figura 5-5**). La traslación de H2 produce un acercamiento entre los residuos aspárticos y una torsión por parte del ligando que facilita la interacción de ambas especies con el residuo Asp289. Esta conformación conduce a un incremento en los valores para los parámetros Ed4, Ed5 y Ed6 (**Figura 5-3**). En el tiempo restante de simulación hay una estabilización del complejo a través de la formación de dos puentes de hidrógeno, el primero entre Asp93 protonado con el grupo hidroxilo, donde el residuo aspártico sirve como donador de puentes de hidrógeno y el fragmento hidroxilo del ligando es un receptor del mismo. El segundo puente se da entre el entre el grupo NH en el ligando con el residuo Asp289.

5.2.2. Configuración LnAsp289

La configuración LnAsp289 constituye la combinación de estados de protonación donde la HEA H2 y residuo catalítico Asp289 son modelados como una amina y ácidos neutros, respectivamente (**Figura 3-2**). Es importante resaltar que esta configuración es la que, partiendo de la conformación abierta de BACE1, presenta las desviaciones más bajas respecto a la estructura cristalina 2VNM (forma cerrada o inhibida), de las 5 combinaciones de estados de protonación para el par ligando-Asp estudiadas de acuerdo a los parámetros proteína-proteína y proteína-ligando aquí medidos; Como se observa en la **Figura 5-2** y **Figura 5-3**, la configuración LnAsp289 es la única que mostró simultáneamente desviaciones bajas. De acuerdo a los valores de Ed1 y Ed2, el cierre del flap se da dentro de los primeros 7ns, similar a los inhibidores SC6 y C222. Para la distancia Thr133-Ser386, parámetro d1, los valores no superan el 7% de desviación respecto al valor de referencia después de los 5ns de simulación. Más aún, las desviaciones en el ángulo θ exhiben la misma tendencia que Ed1 (**Figura 5-2**).

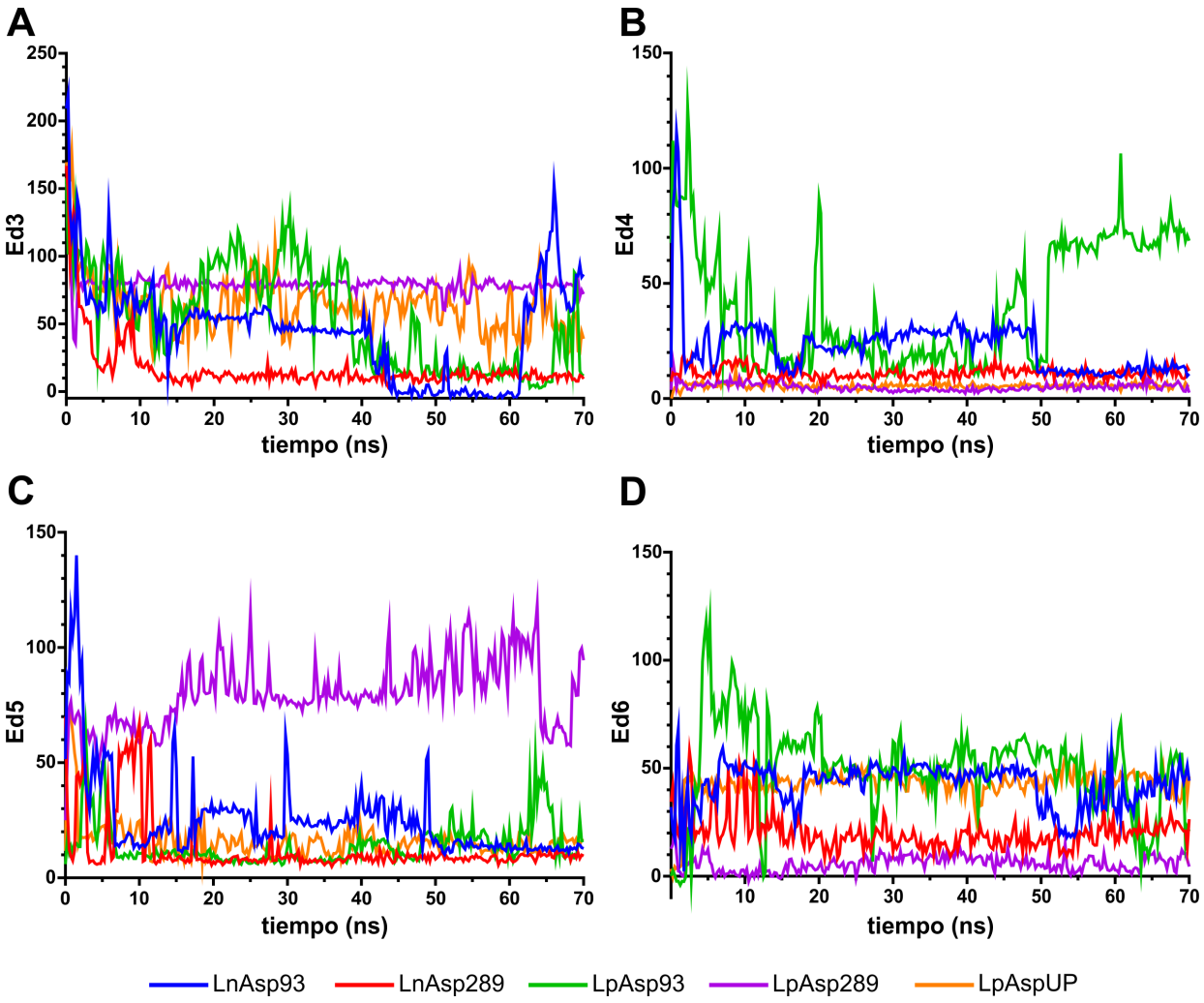


Figura 5-3. Error porcentual respecto a la estructura cristalina 2VNM de distancias proteína-ligando: **a)** d3, **b)** d4, **c)** d5 y **d)** d6. Los valores graficados muestran los valores promedios cada 250ps de simulación. El Código de colores para las diferentes configuraciones se muestra en el fondo.

Los valores de d2 fueron significativamente más cercanos al valor experimental respecto a las demás configuraciones, exhibiendo desviaciones solo alrededor del 5% después de los 15ns de simulación y manteniéndose sin mayores variaciones hasta el final de la trayectoria (**Figura 5-2B**). Además, el diedro D(Thr133.Asp93.Asp289.Ser386) muestra oscilaciones en las desviaciones entre los -10 y 15% en los primeros 40ns y manteniéndose cercanas a 0% hasta los 70ns (**Figura 5-2D**). La estabilización de la conformación cerrada de la β-secretasa se explica por la formación y prolongación de las interacciones BACE1-H2 en el tiempo; El cierre del flap permite la formación del puente de hidrógeno entre el grupo amino de la cadena principal en

Thr133 con el átomo de oxígeno del grupo carbonilo, O3, hacia la zona P3 de la HEA. Esta interacción perdura por el resto de la trayectoria, como lo reflejan los valores de Ed3, los cuales permanecen alrededor del 10% de desviación (**Figura 5-4**). Adicionalmente, la interacción entre el grupo hidroxilo y el oxígeno OD2 del Asp93 mostró valores monótonos, con desviaciones que no superan el 10% (**Figura 5-3B**). Esto refleja la importancia de esta interacción para el reconocimiento y anclamiento de las HEA al sitio de BACE1. Por otro lado, las interacciones que involucran el motivo amínico en H2 y los residuos Asp289 y Gly95, d5 y d6, respectivamente, exhibieron variaciones en los primeros 10ns de simulación, durante el proceso de cierre del flap. Mientras que las desviaciones en d5 se encuentran alrededor del 10% (**Figura 5-3C**), en d6 ascienden al 20% (**Figura 5-3D**). En general, la pose que adoptó el ligando en similar a la pose cristalina, con ligeras oscilaciones hacia la zona P'1 de H2 (**Figura 5-5**).

5.2.3. Configuración LpAsp93

En el modelo LpAsp93 tanto el ligando y residuo Asp93 se encuentran como especies protonadas, esto es, como una amina cargada y acido carboxílico neutro, respectivamente (**Figura 3-2**). La proteína presentó cambios conformacionales considerables en diferentes zonas del sitio activo y sus vecindades, por ejemplo, en las regiones del flap (**Figura 5-4**), opposite-, 10s- y 113s-loop (sección 9.2). En la región del opposite-loop antes de Ser386 y después de Thr392 se mostraron conformacionalmente similares a lo hallado en la estructura cristalina 2VNM, en contraste al segmento flexible Ser388-Gly391. Adicionalmente, LpAsp93 exhibió las desviaciones más marcadas en las regiones 10s-loop y 113s-loop, resaltando los segmentos Lys70-Gly74 y Phe170-Trp176, respectivamente. El flap mostró una dinámica de apertura-cierre-apertura; se mantuvo abierto en los primeros 40ns, mostrando las desviaciones más altas entre los 20 y 30ns, como se reflejó en los valores de Ed1, Ed2 y Eθ de aproximadamente el 20%, 40% y 20%, respectivamente (**Figura 5-2**). El proceso de cierre duró aproximadamente 20ns y se caracterizó porque este segmento adoptó una conformación similar a la experimental, como se muestra en las bajas desviaciones en los parámetros proteína-proteína (**Figura 5-2**) y soportado visualmente en la **Figura 5-4**. Es más, el parámetro proteína-ligando d3, que midió la interacción directa entre H2 con la punta del flap, mostró una baja considerable en el mismo tiempo (**Figura 5-3A**).

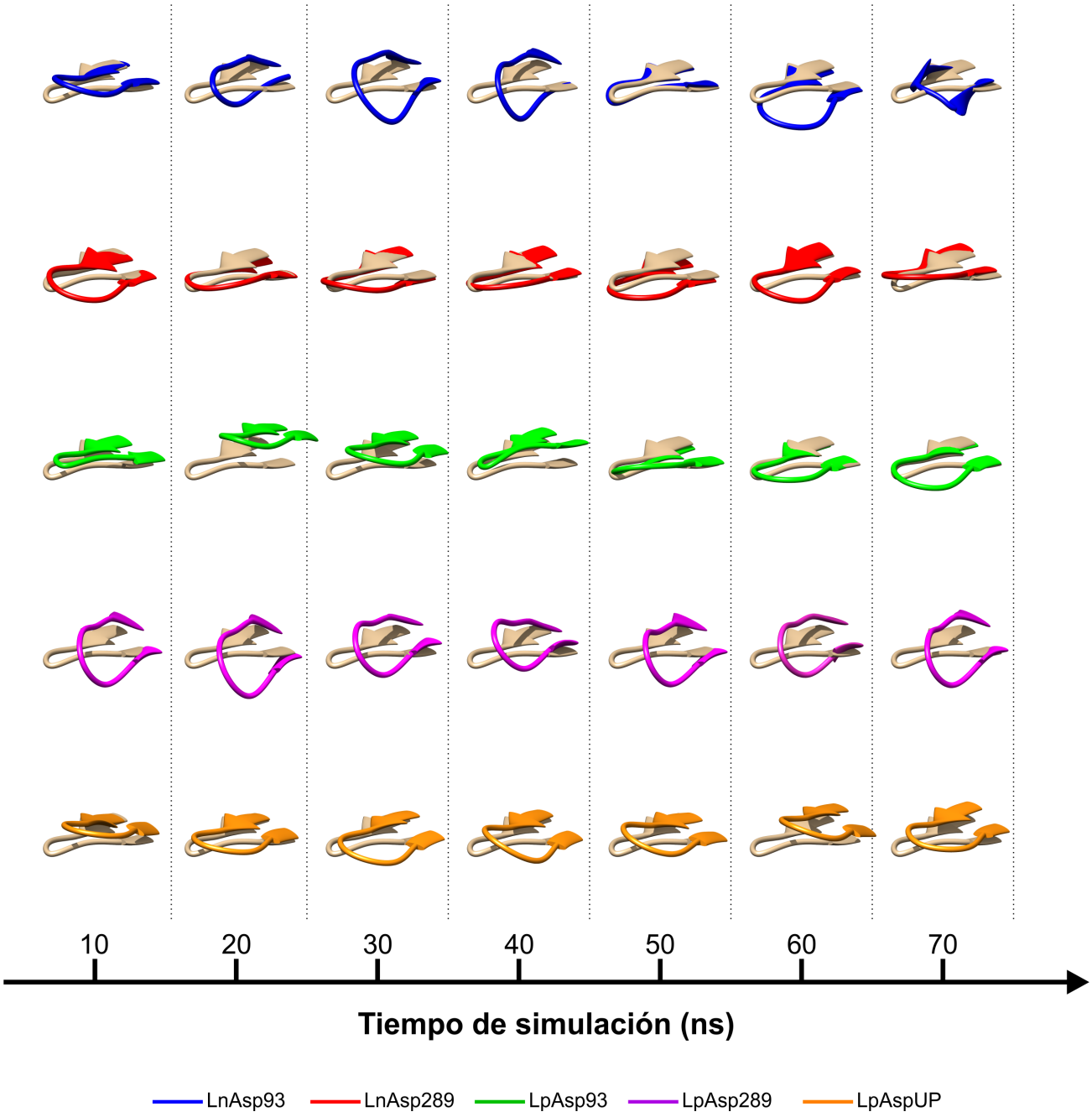


Figura 5-4. Conformaciones del flap para cada configuración de estados de protonación, tomadas cada 10ns. El segmento de la estructura experimental se usó como referencia. El Código de colores para las diferentes configuraciones se muestra en el fondo.

El ligando, sin embargo, presentó desviaciones significativas respecto a la pose cristalina, especialmente en las regiones P3, P'1 y P'2 en el transcurso de la simulación (**Figura 5-5**). Dichas desviaciones son producto de la repulsión asociada con la interacción del grupo hidroxilo del ligando (P'1) con la cadena lateral de Asp93, como se reflejó en las desviaciones en d5, las más altas de los modelos evaluados (**Figura 5-3B**). Como resultado, se presentó una rotación en el enlace C-N que conecta las regiones P'1 y P'2 de H2, causando el grupo fenil, en la cola del ligando, exhibiera una orientación diferente a aquella mostrada en la estructura cristalina (**Figura 5-5**). Más aún, mostrando un incremento en más del 50% en la distancia d6, la cual involucra el residuo Gly95 (**Figura 5-3D**). De hecho, el ligando se desplazó hacia la dirección del flap y opposite-loop, lo que explicaría los cambios conformacionales previamente mencionados.

5.2.4. Configuración LpAsp289

El modelo LpAsp289 describe el estado monoprotonado de la diada aspártica, donde el residuo Asp289 se encuentra protonado al igual que inhibidor H2 (**Figura 3-2**). Esta configuración se caracterizó por mantener el flap abierto en toda la simulación (**Figura 5-2** y **Figura 5-4**). LpAsp289 exhibió las desviaciones más notables en la región del flap, una desviación promedio de aproximadamente 13%, 35%, 20% y -20% en los parámetros d1, d2, θ y ϕ, respectivamente. Adicionalmente, se observó un incremento entre el grupo carbonilo del ligando y la punta del flap (Thr133), como se parecía en la Ed3, donde hay un incremento cercano al 80% (**Figura 5-3A**). Las secuencias Lys168-Asn175 y Ser388-Thr392, en 113s- (**Anexo VI**) y opposite-loop (**Anexo IV**), respectivamente, presentaron desviaciones considerables a través de toda la trayectoria. De manera similar a la configuración LpAsp289, se observó una repulsión en las cercanías de la región P'1 de H2 causando la expulsión del inhibidor del sitio activo, como lo reflejan los parámetros proteína-ligando, especialmente d5, quien midió la distancia entre Asp289 y el motivo amínico del ligando en la región P'1 (**Figura 5-3**).

Los resultados las configuraciones LpAsp93 y LpAsp289 dejan claro que, cuando el inhibidor se encuentra en cualquiera de los estados monoprotonados en la diada aspártica (protonación en Asp93 o Asp289), el complejo BACE1-HEA experimenta cambio conformacionales marcados que divergen de la estructura de referencia 2VNM. Más aún, las simulaciones MD de estas mismas configuraciones proteína-ligando, comenzando a partir de la estructura cerrada de BACE1, conllevan a cambios conformacionales en el sitio activo y regiones cercanas, así como a la reapertura del flap (Capitulo 4).

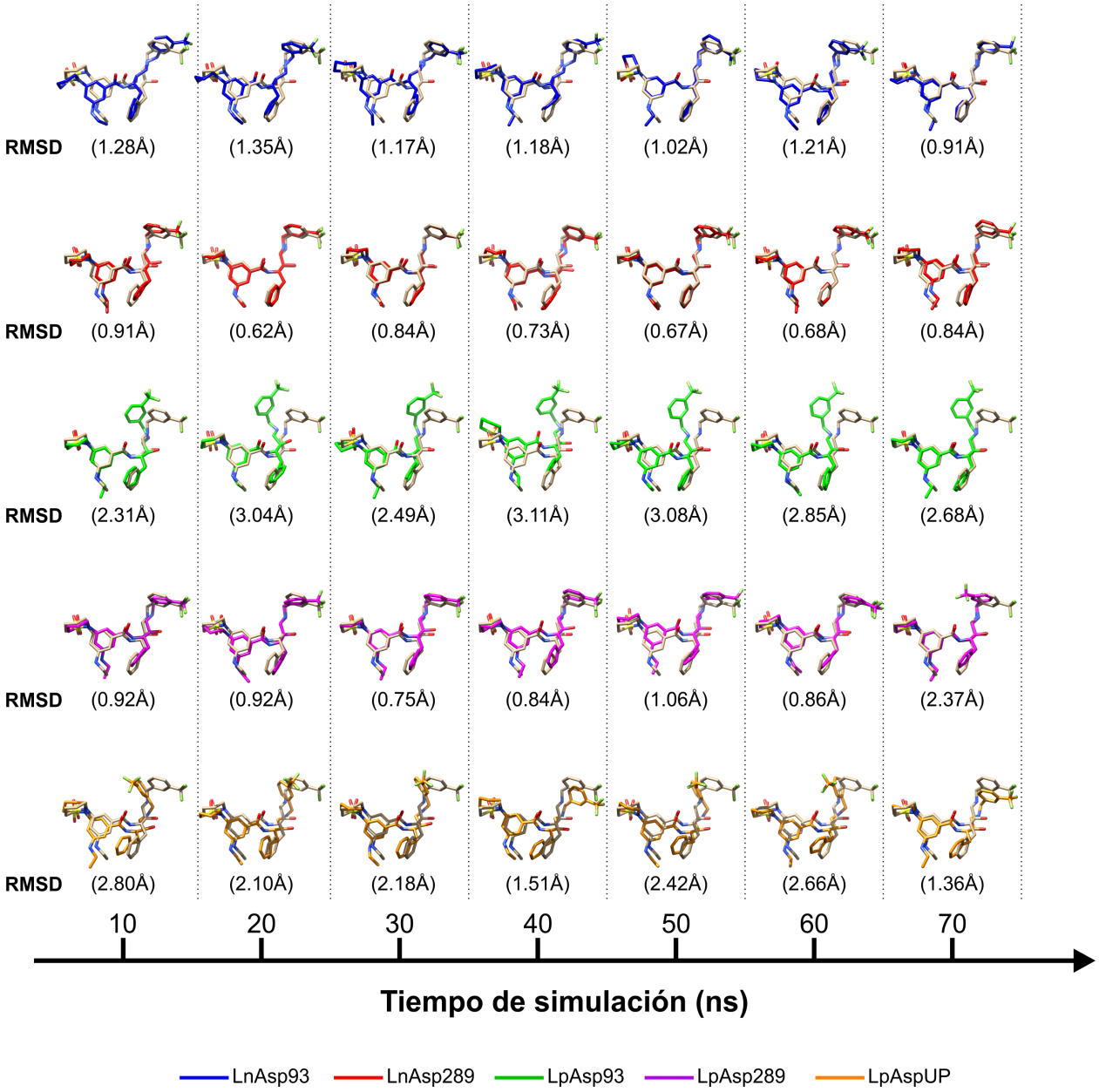


Figura 5-5. Conformaciones del ligando respecto a la pose cristalina para cada modelo evaluado. Las instantáneas fueron tomadas cada 10ns. El Código de colores se muestra en el fondo.

5.2.5. Configuración LpAspUP

La configuración LpAspUP consiste en modelar la HEA como una amina cargada y la díada en su estado di-desprotonado (**Figura 3-2**). Este modelo representa lo que ocurría si 1) el ligando es protonado por el medio acuoso y BACE1 se encuentra en el estado AspUP ; ó 2) si el proceso de protonación de la HEA occure dentro de BACE1, previo al cierre del flap (conformación abierta de BACE1). Esta configuración se caracteriza por desviaciones en diferentes del sitio activo de BACE1, tales como 10s-loop, 113s-loop y opposite loop (**Figura 5-1**). El 10s-loop adopta una conformación similar a la experimental después de los 40ns. Los mayores cambios se observaron en la secuencia Lys70-Gly72 entre los primeros 20ns y en Gly72-Tyr75, en los próximos 15ns de simulación. Por su lado, el 113s-loop se mostró bastante movible, destacando el segmento Ile171-Gln173 en toda la trayectoria. El segmento Asp167-Phe170 presenta pocas desviaciones respecto a lo experimental durante los primeros 50ns. Sin embargo, el 113s-loop sufre un desplazamiento general en los últimos 20ns de trayectoria (**Anexo VI**). Los cambios en el opposite loop se enfocan en la secuencia Ser388 - Gly391, destacando los sufridos en la cadena principal de Thr390. Adicionalmente, los segmentos a ambos lados de este (Ile385-Gln387 y Thr392-Val393) se encuentran bastante cercanos a los hallado en la estructura cristalina (**Anexo IV**). El flap sufre cambios conformacionales a través de toda la trayectoria, principalmente en el segmento Pro131 - Gly135 (**Figura 5-4**). En los primeros 30ns los movimientos se concentran en los residuos Gln134 - Gly135, extendiéndose a los demás residuos en el flap para asumir una conformación abierta. Numéricamente, los valores de Ed1 muestran una disminución en la desviación porcentual respecto al valor de distancia d1 en los primeros 10ns, el cual oscila entre 0 y 20% por el resto de la trayectoria (**Figura 5-2A**). Estas pequeñas variaciones inducen a pensar que esta combinación de estados de protonación conduce a un cierre del flap. Sin embargo, los valores de Ed2 muestran un alargamiento entre el 20-30% (**Figura 5-2B**), mientras que las Eθ y Eϕ, dejan ver un movimiento de "twisting", que se traduce en conjunto en la apertura del flap (**Figura 5-4**). En apoyo a esto, existe una pérdida de la interacción del flap con el ligando, como lo reflejan los valores para Ed3, la desviación para la distancia entre Thr133 y el grupo carbonilo en H2, ascienden al 50% (**Figura 5-3A**). El ligando presenta un desplazamiento general hacia la zona 10s-loop del sitio activo de BACE1, exceptuando la región sultamica hacia P2 quien permanece similar a la pose experimental de la HEA de estudio (**Figura 5-5**). Las desviaciones se hacen más notorias en el motivo hidroxietilamina en P'1 y en el grupo Ph-CF_3, en la cola P'2, el cual se refleja en alargamientos en las interacciones que involucran el motivo amínico del isóstero HEA, tales como en la distancia d6 donde la desviación es alrededor del 40% (**Figura 5-3**).

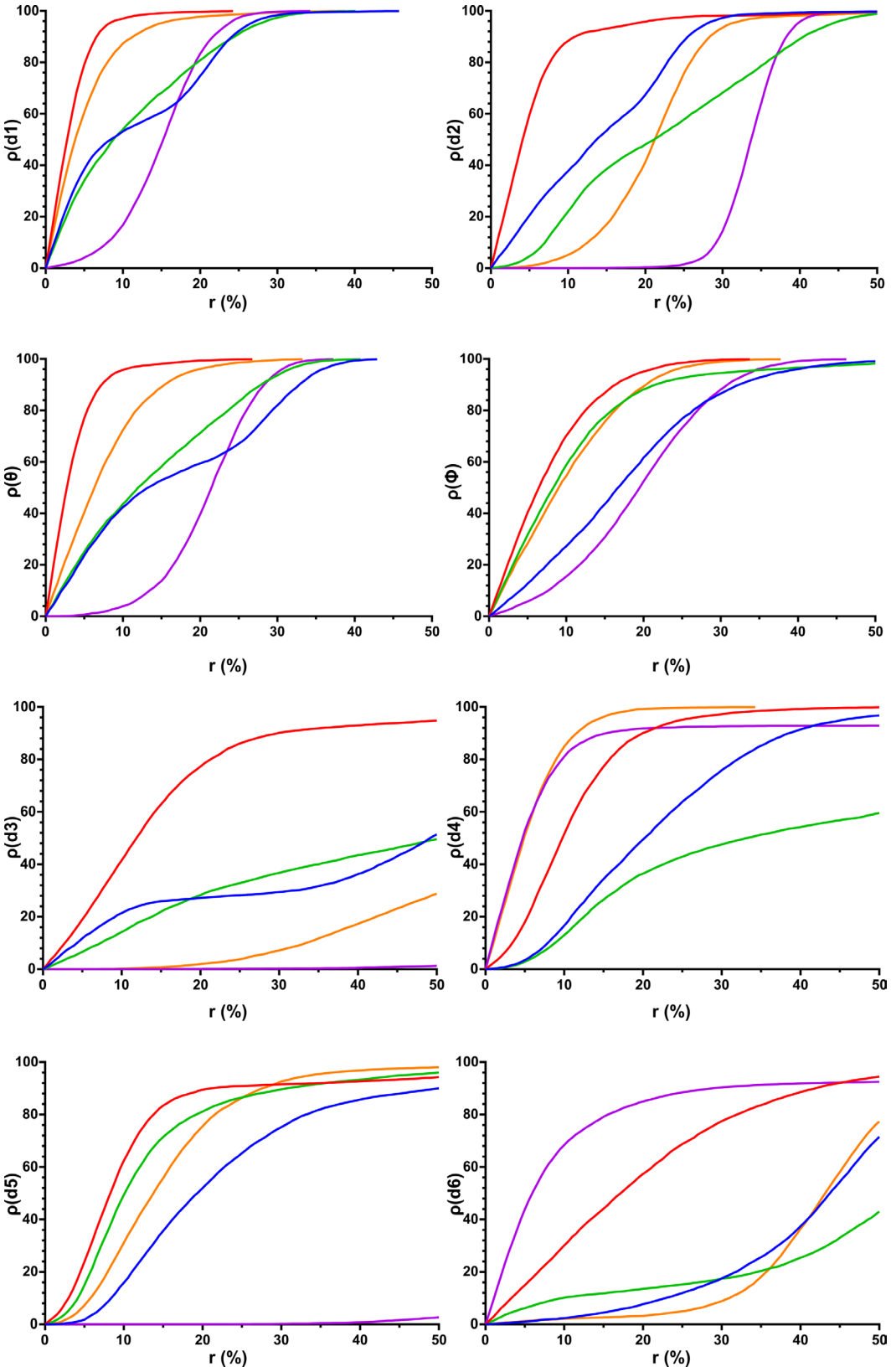


Figura 5-6. Densidad poblacional individual para cada parámetro vs el nivel de tolerancia. Las medidas fueron hechas para cada configuración: LnAsp93 (azul), LnAsp289 (rojo), LpAsp93 (verde), LpAsp289 (morado) y LpAspUP (naranja).

5.3. Análisis de la densidad poblacional

5.3.1. Densidad poblacional individual

Los valores individuales de la densidad poblacional individual (ρ) para las 5 configuraciones evaluadas con rango de tolerancia de 0 a 50%, usando las 7000 instantáneas de las simulaciones MD son mostrados en la **Figura 5-6**. De los 4 parámetros empleados para describir la dinámica del flap, se observó que la mayor parte de la población es hallada al considerar un 10% de tolerancia en las desviaciones respecto a la estructura experimental 2VNM, siendo el mejor la configuración LnAsp289 seguida de LpAspUP en los 4 parámetros (d1, d2, θ y ϕ), ya que alcanzan una gran población con bajos niveles de tolerancia. En contraste, la configuración LpAsp289 requiere niveles de tolerancia más alto (hasta el 40% en el caso de ρ para d2) para alcanzar una población por encima del 80% de las instantáneas de su trayectoria MD.

Este resultado es consistente con las grandes desviaciones encontradas en la configuración LpAsp289 relacionadas con la dinámica del flap (sección 5.2.4). De acuerdo a estos parámetros, el orden en las configuraciones que mejor adoptan la configuración experimental, partiendo de la conformación abierta de BACE1, es LnAsp289 > LpAspUP > LnAsp93 > LpAsp93 > LpAsp289. Adicionalmente, los parámetros ρ(d2) y ρ(θ) mostraron ser útiles para encontrar diferencias significativas en el cambio conformacional que sufre el sitio activo, no siendo igual con ρ(ϕ) donde tres configuraciones exhiben tendencias poblacionales similares.

La densidad poblacional de los parámetros BACE1-HEA (ρ(d3), ρ(d4), ρ(d5) y ρ(d6)) brindaron información interesante sobre la manera en que se acomoda el ligando H2 en el sitio activo de BACE1. La primera muestra la interacción entre el flap y grupo carbonilo del ligando (d3 en **Figura 3-3**) a través de un puente de hidrógeno que involucra la cadena principal de Thr133. De acuerdo a la gráfica de ρ(d3), la población para las configuraciones LnAsp93, LpAsp93, LpAsp289 y LpAspUP es baja ya que, no supera el 60% al incrementar la tolerancia en un 50%. Esto quiere decir que estas configuraciones pierden la capacidad para formar dicho puente de hidrógeno (LpAsp289) o mantenerlo en el tiempo (LnAsp93, LpAsp93 y LpAspUP). Además, la configuración LnAsp289 exhibe nuevamente los valores más cercanos a lo encontrado en la estructura cristalina al contener alrededor del 80% de la población con una tolerancia del 20%. En este punto es menester recordar que en los primeros 8ns la proteína cerró su flap por lo que es normal que una porción de la población no esté presente.

El análisis de ρ(d4), la densidad poblacional para el puente de hidrógeno formado entre el grupo hidroxilo de H2 y el residuo Asp93 (**Figura 3-3**), revela que una protonación en el residuo Asp93 conduce a desviaciones significativas respecto a la estructura de referencia como lo muestra la baja población de las configuraciones LnAsp93 y LpAsp93 comparado con las demás evaluadas (**Figura 5-6**). Por otro lado, las densidades poblacionales considerando la interacción entre el grupo amina del ligando con Asp289 en BACE1, ρ(d5), muestran que una protonación en Asp289 no es favorable cuando el ligando se encuentra protonado (forma Lp de H2, **Figura 3-2**) al no alcanzar un 5% de población con una tolerancia del 50% en la desviación experimental. Para ρ(d6), la densidad poblacional de la interacción entre el grupo amino de H2 con el grupo carbonilo de la cadena principal de Gly95, los porcentajes de las configuraciones que involucran una protonación en Asp93 (LnAsp93 y LpAsp93) y LpAspUP no superan el 20% de población con un 30% de tolerancia. Esto es consistente con los desplazamientos y cambios conformacionales sufridos por el ligando y el sitio activo en estas configuraciones (sección 5.2).

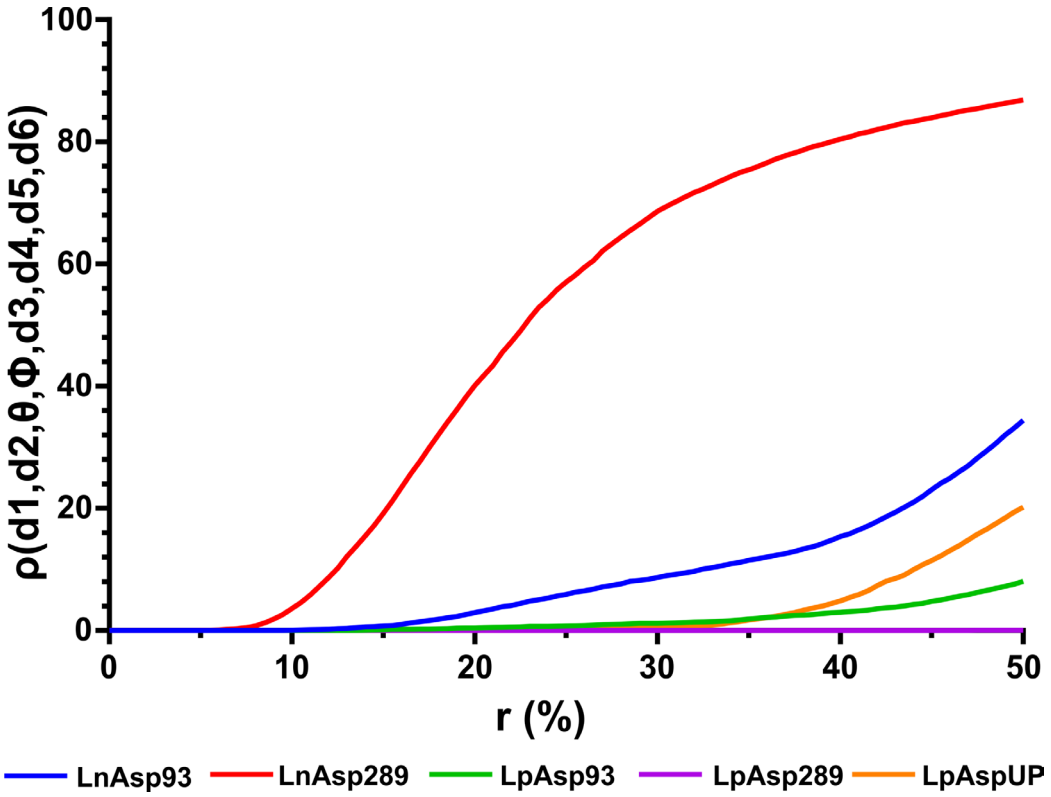


Figura 5-7. Densidad poblacional combinada ρ(d1,d2,θ,ϕ,d3, d4, d5 and d6) a diferentes niveles de tolerancia. El código de colores para configuración se halla en la parte inferior de la imagen.

5.3.2. Densidad población conjunta

La implementación de esta metodología en la determinación de los estados de protonación más probable para las HEA y la díada aspártica, tras la llegada del inhibidor al sitio activo de BACE1, que conducen a la conformación bioactiva reportada experimentalmente, requerirá la combinación de parámetros proteína-proteína y proteína-ligando, es decir, parámetros que expliquen el correcto cierre del flap así como las interacciones dentro del sitio activo de la β-secretasa. En este contexto, se determinó la densidad poblacional de las diferentes configuraciones en las que se deba cumplir simultáneamente varias condiciones, en términos de tolerancia de la desviación respecto a la pose cristalina. Inicialmente se hizo un modelo poblacional que considerara todos los parámetros estudiados, es decir, se calculó ρ(d1,d2,θ,ϕ,d3,d4,d5,d6) (**Figura 5-7**). La gráfica muestra de manera clara que la configuración LnAsp289 predomina sobre el resto de las evaluadas en este estudio. Con un 20% de tolerancia LnAsp289 muestra tener una población 13.70, 100.32, y 2809 veces mayor que las configuraciones LnAsp93, LpAsp93 y LpAspUP, respectivamente. Si bien algunas de ellas tienen densidades poblacionales individuales para determinados parámetros, solo LnAsp289 mostró un comportamiento consistente en todos los parámetros descritos. Adicionalmente, el crecimiento de la población se ve restringido principalmente por los parámetros d3 y d6 (**Figura 5-6**); Para la configuración LnAsp289, y a un 10% de tolerancia, solo el 50% y 38% de la población cumple con los requisitos en d3 y d6, respectivamente, por lo que estás actuarían como parámetros limitantes de la densidad poblacional total.

En un intento por disminuir la cantidad de parámetros, pero conservando las características antes descritas, se evaluaron densidades poblacionales grupales usando diferentes combinaciones de parámetros (**Anexo VII**). Se puede concluir que:

1. Se debe usar al menos un parámetro que explique el movimiento de cierre del flap, preferiblemente d1 o d2.
2. El uso de d3 es esencial dada la importancia que tiene esa interacción en el evento inhibitorio de la β-secretasa por las HEA.
3. Es vital el uso de al menos un parámetro sensible al estado de protonación en ambas especies, esto es, d4, d5 y/o d6.

5.4. El sistema BACE1-HEA sigue el modelo 2 inhibitorio

Luego de implementar las simulaciones de Dinámica Molecular proteína-ligando, y crear herramientas para facilitar el abordaje de los aspectos a considerar para la correcta exploración del mecanismo inhibitorio de BACE1 por la familia de HEA (sección 1.6), se concluye que el sistema BACE1-HEA sigue el modelo 2 de inhibición, esto es, que la enzima sufre un cambio conformacional acompañado de una transferencia hacia el inhibidor (**Figura 5-8**).

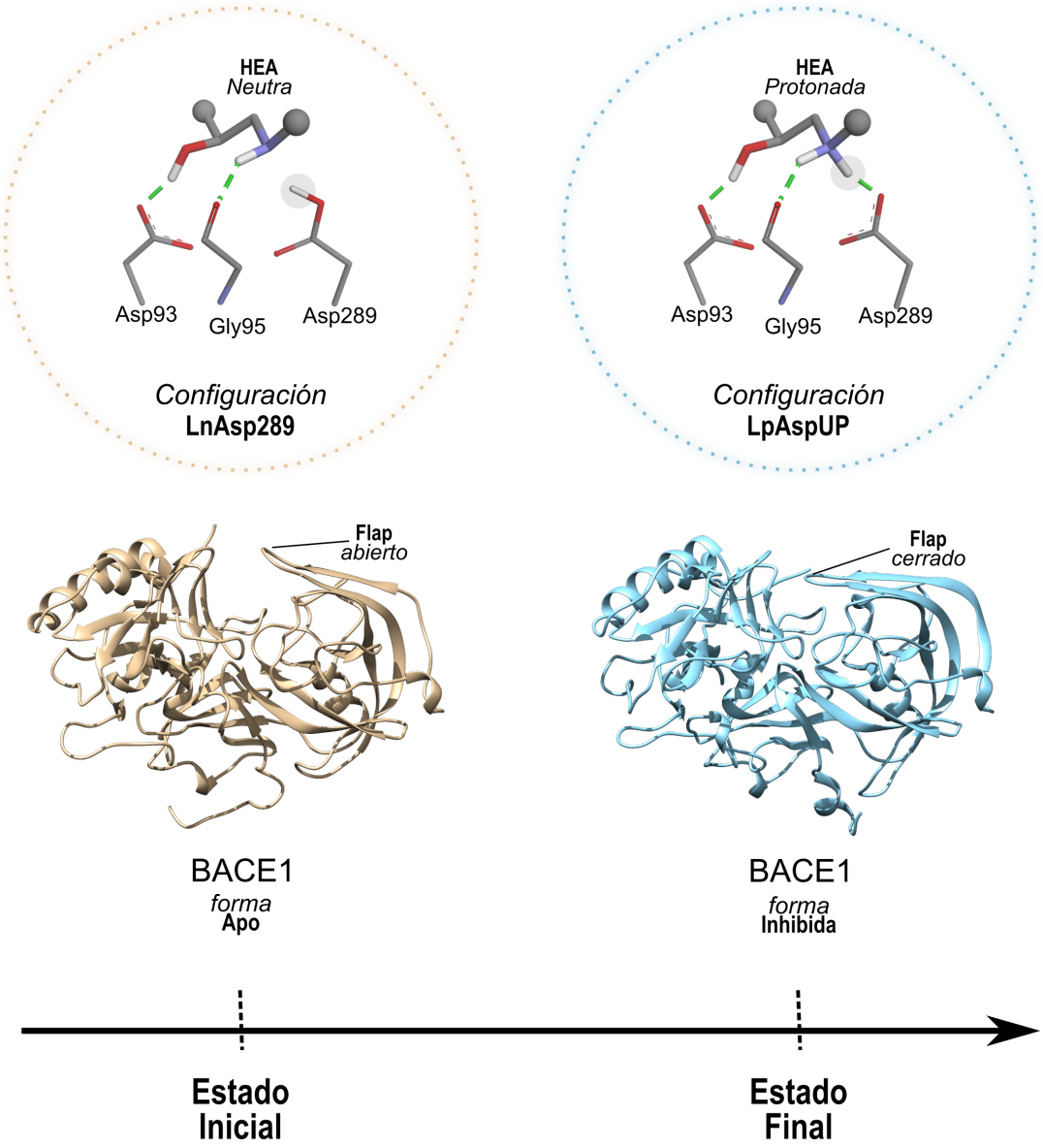


Figura 5-8. Modelo propuesto de inhibición de BACE1 por HEAs. El sistema presenta un intercambio protónico y un cambio conformacional.

La medición de parámetros estáticos y dinámicos sobre todas especies (ligando, proteína y sistema proteína-ligando,) confirmó que el estado de protonación final para el sistema BACE1-HEA es LpAspUP (Capítulo 4). En ella, la proteína, quien se encuentra en su forma cerrada o inhibida, exhibe un estado dianiónico en la diada catalítica de residuos Asp (**Figura 5-8**). El ligando, actúa como una amina protonada hacia la zona P'1 que forma contactos iónicos con los residuos aspárticos Asp93 y Asp289 (**Anexo I**).

Por otro lado, las simulaciones del estado inicial demostraron que solo la configuración LnAsp289 inducía el cambio conformacional en BACE1, de su forma apo a cerrada (sección 5.2). En esta configuración, la HEA y residuo Asp289 actúan como una amina y ácido carboxílico neutro, respectivamente (**Figura 5-8**). Este resultado apunta a que el sistema BACE1-HEA sigue el modelo 2 inhibitorio. Como consecuencia, se concluye que la protonación de las HEAs se hace al interior de la proteína, específicamente de la cadena lateral del residuo Asp289 hacia el nitrógeno amínico en la zona P'1 de las HEA. De hecho, las simulaciones en las que se empleó la configuración LpAspUP mostraron un desplazamiento del ligando respecto a la pose cristalina (sección 5.2.5), acompañado de una apertura del flap (**Figura 5-2**) y una baja densidad poblacional, al considerar simultáneamente los parámetros proteína-proteína y proteína-ligando (**Figura 5-7**). Esta información, además de brindar soporte al modelo 2, revela que la protonación de la HEA por la β-secretasa no puede darse, de manera inmediata, tras la llegada ligando al sitio activo de la proteína, quien está en su forma apo. Además de la relevancia en la descripción de la inhibición de BACE1 por las HEAs, el concepto de densidad poblacional, quien no había sido reportado previamente en la literatura, es aplicable a otros sistemas BACE1-inhibidor, aspartil proteasas-inhibidor e incluso a proteína-ligando en general, donde los cambios conformacionales en la enzima sean dependientes de los estados de protonación de la asignación de los residuos catalíticos. Por lo tanto, se espera que esta herramienta ayude a resolver problemas de la biología molecular de trascendía para el mundo científico.

En este punto del trabajo se han resulto la mayoría de los objetivos específicos propuestos (sección 2.2). Sin embargo, queda por explicar cómo las variaciones estructurales en las HEAs afectan la actividad inhibitoria sobre BACE1, así como el panorama energético (Capítulo 6).

5.5. Conclusiones del Capítulo 5

En este Capítulo se ha determinado la configuración de estados de protonación inicial más probable, para la diada Asp y HEA, que resulta en el cambio conformacional de la forma Apo a cerrada de la proteína. Se evaluaron simulaciones de Dinámica Molecular de 70ns para 5 diferentes modelos del complejo BACE1-HEA, empleando la estructura de BACE1 co-cristalizado con H2 como estructura de referencia (PDB ID:2VNM). Como resultado del análisis de las desviaciones porcentuales en diferentes parámetros proteína-proteína y proteína-ligando, con respecto a la estructura cristalina, se encontró que la configuración LnAsp289 (HEA neutra y Asp289 protonado) como la más probable. Más aún, la densidad poblacional usando diferentes combinaciones de estados de protonación arrojó el mismo resultado. Por último, es importante resaltar que la metodología empleada en este Capítulo provee una nueva perspectiva para el análisis de en otras aspartil proteasas, y otro tipo de proteínas en general, que enfrenten el desafío de establecer el estado de protonación más probable o incluso, de abordar cambios conformacionales en la proteína.

_____

6. Influencia de las modificaciones estructurales en las HEAs sobre el cierre del flap en BACE1

*Artículo en revisión como resultado***:**

Gueto-Tettay, C., Zuchniarz, J., Martinez A.. Gueto-Tettay, L. R. Drosos-Ramirez, J. C. **A Dyanmic PM7 Residue-Ligand Interaction Energy Landscape of the BACE1 Inhibitory Pathway by Hydroxyethylamine Compounds. Para I: the Flap Closure Process.** J. Mol Graph Mod. 76 (**2017**) 274–288. DOI: *10.1016/j.jmgm.2017.07.010.*

6.1. Introducción al Capítulo 6

El mal de Alzheimer (AD) es la principal causa de demencia en personas mayores a 60 años, caracterizándose por la pérdida progresiva de memoria y otras funciones cognitivas, que conllevan eventualmente a la muerte(Evin 2016). La presencia de placas amiloideas extracelulares es la marca distintiva patológica específica y principal en la AD, ya que otros aspectos como la acumulación de ovillos neurofibrales (NFT) están presentes en otras enfermedades neurodegenerativas(Reitz & Mayeux 2014; Edwards et al. 2016; Iqbal et al. 2016). Estas placas se constituyen principalmente de péptidos Aβ, de 40 – 43 aminoácidos de longitud, los cuales se agregan extracelularmente y producen los efectos citotóxicos asociados al AD. El péptido Aβ es el resultado del procesamiento proteolítico de la Proteína Precursora Amiloidea

(APP) por un tándem de proteasas, las β- y γ-secretasa, estando los esfuerzos enfocados en la modulación de la actividad primera proteína, también conocida como BACE1, por su participación en la etapa cinético-limitante del proceso(Yan et al. 2016). En el sitio activo de BACE1 se halla la diada catalítica, Asp93 y Asp289, la cual está cubierta por una horquilla antiparalela conocida como flap, quien regula la entrada de los sustratos o inhibidores a esta y otras aspartil proteasas, tales como plasmepsinas, cathepsina, pepsinas, BACE2 y la proteasa del HIV(Mahanti et al. 2016). Cuando la proteína se encuentra en su forma apo o inactiva, el flap se encuentra abierto permitiendo la entrada de moléculas a su sitio activo. El sistema macromolecular se estabiliza por el eventual cierre del flap que conduce a BACE1 a ejercer su función catalítica o inhibición de la misma(Cai et al. 2012; Xu et al. 2012; Bras et al. 2014; Chakraborty & Basu 2015; Karubiu et al. 2015; Arodola & Soliman 2016; Kumalo et al. 2016; Kumalo & Soliman 2016; Mahanti et al. 2016). Adicionalmente, se ha reportado que el estado de protonación de la diada aspártica en BACE1 dependen de la naturaleza química del sustrato o inhibidor entrante, dando lugar a posibles rutas en la actividad catalítica o inhibitoria sobre BACE1(Park & Lee 2003; Rajamani & Reynolds 2004; Yu et al. 2006; Domínguez et al. 2010; Barman & Prabhakar 2012; Kocak et al. 2016; Sabbah & Zhong 2016).

Previamente hemos reportado el camino inhibitorio de BACE1 por parte de las Hidroxietilaminas (HEAs), una familia de compuestos poderosos inhibidores de la β-secretasa que exhiben buenas propiedades farmacocinéticas y biodisponibilidad oral. La información producto de las simulaciones de Dinámica Molecular (MD) y el análisis de la densidad poblacional conjunta sugieren que las HEA entran al sitio activo de BACE1 (forma apo) comportándose como aminas neutras, mientras que la diada catalítica está en su estado anionico o monoprotonado (la cadena lateral de los residuos Asp93 y Asp289 está como un ácido carboxílico cargado y neutro, respectivamente). Esta combinación de estados de protonación BACE1-HEA, llamada LnAsp289, induce al cierre del flap y a adoptar una conformación estructural, tanto en la proteína como en el ligando, similar a la observada en las estructuras de rayos-X (Capitulo 5). El proceso finalizaría con una transferencia protónica, del residuo Asp289 al nitrógeno amínico, localizado en la región P'1 de las HEA. El nuevo estado de protonación del sistema es LpAspUP (HEA comportándose como amina protonada y ambos residuos aspárticos desprotonados) como lo sugirió el estudio de las reacciones homodesmicas(Gueto-Tettay et al. 2011) y confirmado por simulaciones MD, a través del uso de parámetros proteína-ligando estáticos y dinámicos (Capitulo 4). El proceso se resume en la **Figura 5-8**. Diferencias en la actividad inhibitoria de las HEAs sobre BACE1 podrían estar relacionadas con la afinidad inicial del inhibidor por el sitio activo de la proteína y, más aún, su capacidad para inducir el cierre el flap en la aspartil proteasa. Por lo que el estudio

de la influencia de las variaciones estructurales en las HEAs sobre el cierre del flap en BACE1 ofrecería más información para asistir al diseño de mejores fármacos inhibidores de la β-secretasa.

Para abordar este asunto, en este capítulo presenta el resultado de una serie de simulaciones MD de 70ns sobre el sistema BACE1(apo)-HEA que pretende determinar cómo las variaciones estructurales en la cabeza y cola del ligando afectan el proceso de cierre del flap, es decir, el cambio conformacional de BACE1 de su forma apo a cerrada. Un total de 8 inhibidores fueron probados (***Tabla 3-1***). Para el análisis de los resultados se emplearon parámetros energéticos y geométricos como la sumatoria total (ε_T, **Figura 6-1**) e individual de las ReLIE, y distancias proteína-proteína (**Figura 5**) y proteína-ligando (**Figura 6**), respectivamente. Estos parámetros permiten monitorear cambios conformacionales en la proteína, ligando y sistema proteína-ligando, así como los cambios energéticos globales y locales asociados. Adicionalmente, permitieron dar explicación a las diferencias en actividad inhibitoria mostrada por las HEAs estudiadas.

Tabla 6-1. Valores de acoplamiento inicial BACE1-HEA.

Poder Inhibitorio	ID	$\%\boldsymbol{\varepsilon_T}$[a]	IC_{50} (nM)
Alto	*H1*	0.00	2
	H2	-3.41	3
Moderado	*M1*	-5.76	33
	M2	-17.62	160
Bajo	*L1*	-9.04	1800
	L2	-19.00	3470
	L3	-10.52	6300
	L4	-14.79	34670

[a] desviación porcentual de ε_T° respecto a H1 (-158.52±3.98 kcal/mol)

6.2. Los valores de $\boldsymbol{\varepsilon_T}$ se relacionan con la actividad inhibitoria sobre BACE1

La energía de interacción total proteína-ligando, expresada como la sumatoria de las ReLIE total (ε_T), es una medida directa de la estabilidad del sistema BACE1-HEA por la presencia de los ligandos en el sitio activo de la aspartil proteasa (sección 3.4.1). En el presente trabajo se realizó

inicialmente el análisis comparativo de las ε_T para las HEAs en el tiempo (**Figura 6-1**). Más aún, la comparación de las energías de interacción total BACE1-HEA obtenidas de los valores ε_T y aquella considerando el sitio activo no-fragmentado mostraron como resultado que las tendencias en los valores energéticos se mantenían independiente de las metodologías empleadas (**Anexo IX**).

De acuerdo a los datos energéticos calculados sobre el proceso del cierre del flap de BACE1 inducidos por las 8 HEA, los valores de ε_T brindan las primeras pistas para explicar la actividad inhibitoria de los ligandos de estudio contra la proteasa del Alzheimer. Dos aspectos destacan: la afinidad de acoplamiento inicial (ε_T°) y el comportamiento de ε_T durante el tiempo. Para profundizar en estos se tomó H1, la HEA del conjunto de estudio de mayor actividad biológica contra BACE1 (IC_{50}=2nM, ***Tabla 3-1***), como referencia. El valor de ε_T° para el sistema BACE1-H1 fue de -158.52 ± 3.98 kcal/mol, el más favorable de todos los ligandos estudiados (**Tabla 6-1**). Se encontró que existen diferencias significativas de los valores de ε_T° entre los ligandos de alto poder inhibitorio (H1 y H2) respecto de aquellos con moderada (M1 y M2) y baja (L1, L2, L3 y L4) actividad inhibitoria contra BACE1. Mientras que H2 solo tuvo una desviación porcentual de –3.41% en el valor de ε_T°, el resto de las HEAs mostraron menor afinidad inicial por el sitio activo de la β-secratasa que van de –5.76 hasta –19.00% respecto a lo calculado por H1. Estos resultados se relacionan directamente con la capacidad de las HEAs de complementar estérica y electrónicamente el bolsillo catalítico de la enzima en cuestión, cuando se encuentra en su forma apo o abierta, por lo que, la naturaleza química de los sustituyentes en la cabeza y cola de las HEAs, tales como la flexibilidad (molécula M1), estereoquímica (moléculas M2 y L4) y el carácter polar e hidrofóbico de los fragmentos juegan un papel fundamental; Los sustituyentes con un carbono alifático metileno conectado al nitrógeno amínico, hacia la cola de las HEA, tales como A', B' y E' muestran mejores valores de ε_T°, por lo que la adición de enlaces rotables en esta zona permite una mejor orientación de R1 en la región hidrofóbica del sitio activo de BACE1. Adicionalmente, las moléculas M2 y L4 reflejan el efecto de la estereoquímica en los valores de ε_T°, al portar los grupos C' y D' que tienen un carbono quiral con estereoquímica (S) y (R), respectivamente. El primer ligando mostró ser 5kcal/mol más favorable, consistente con la diferencia en sus valores experimentales de IC_{50}, donde M2 es alrededor de 217 veces más activo que L4 **(Anexo X)**.

Por otro lado, las sustituciones hacia la cabeza de las mejores HEAs están gobernadas por la presencia de uno o dos átomos de oxígeno que caracteriza a las lactamas y sultamas, respectivamente. Esta especie electronegativa sirve como aceptor y permite la formación de un puente de hidrogeno con la cadena principal del residuo Asn294(Barman et al. 2011; Gueto-Tettay et al. 2011; Barman & Prabhakar 2013; Barman & Prabhakar 2014), una interacción de suma importancia para el cierre del flap y ampliamente descrita en la literatura(Hong & Tang 2004; Spronk & Carlson 2011; Xu et al. 2012; Chakraborty & Basu 2015; Kumalo et al. 2016; Mahanti et al. 2016). La supresión de esta interacción conlleva a una baja en la actividad inhibitoria, tal es el caso de L3 (IC_{50} = 6300nM, ***Tabla 3-1***) quien porta el segmento E en R3, el cual no posee átomos de oxígeno **(Anexo XI)**. Adicionalmente, la molécula L2 (IC_{50} = 3470nM) presentó una pérdida de la interacción con el residuo Asn294, al presentar un grupo 6-metil sustituido en el anillo fenilico (R2) que generó un clash estérico interno con el grupo benzil, obligando la reorientación de la cabeza de esta HEA **(Anexo XII)**.

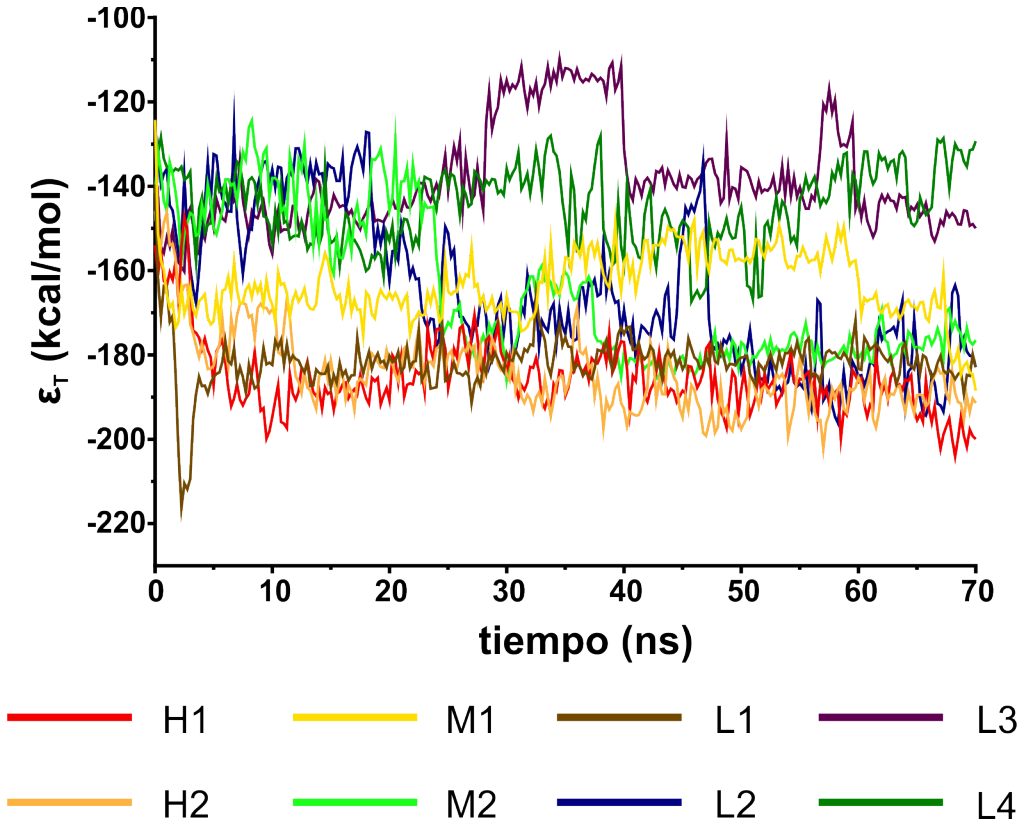


Figura 6-1. Distancias Variación de la energía proteína-ligando total (ε_T) en el tiempo para los sistemas compuestos por BACE1 en complejo con HEAs de alto (H1 y H2), moderado (M1 y M2) y bajo poder inhibitorio. Los valores graficados son la media calculada cada 250ps de la simulación. El código de colores empleado para diferenciar las HEAs se muestra en el fondo.

Respecto a la información de ε_T en el tiempo (**Figura 6-1**) y su posible relación con la actividad inhibitoria, se encontró que para H1 el mapa energético presentó tres etapas: la primera se caracteriza por una disminución notable en la energía y transcurre en los primeros 10ns. De acuerdo a los mínimos locales de ε_T, el incremento en la favorabilidad de las ReLIE total en esta etapa fue del 25.54% a los 5ns de trayectoria. Seguido, la etapa II consiste en un rebote ligero en las ReLIE total. Esta fase duró alrededor de 10ns y produce un alza en la energía que no supera las 10 kcal/mol. En la última etapa, la cual ocurre a partir de los 30ns, se presenta una estabilización energética del sistema BACE1-HEA ya que, se apreció una baja gradual en la energía hasta el final de la trayectoria, que se traduce en un incremento sustancial en las interacciones del ligando H1 con el sitio activo de BACE1 de 26.15%, respecto a su valor de $\overset{\circ}{\varepsilon_T}$, es decir, a la conformación inicial del sistema BACE1-HEA. El segundo ligando más activo del conjunto de estudio, H2 (IC_{50}=3nM), mostró un comportamiento similar al presentar un incremento en la favorabilidad del 18.25% y 25.39% en las etapas I y III de trayectoria MD. Para los inhibidores M2 y L2 se apreció una prolongación de la etapa I hasta 30ns y 35ns de la trayectoria, respectivamente. Esto quiere decir que hubo retraso de al menos 20ns antes de empezar la baja energética en la etapa I, al compararlos con la HEA H1. Para el ligando L4 la etapa I se extendió hasta los 20ns y presentó un descenso solo del 12.98%, sumado al hecho de que su valor de $\overset{\circ}{\varepsilon_T}$ es –135.08±9.03 kcal/mol, el cual es 14.79% menos favorable que el presentado por H1. Más aún, la etapa II se extendió hasta el final de la simulación, alcanzando valores cercanos a los reportados inicialmente, por lo que se concluye que este ligando no logró inducir un cambio conformacional en la proteína que derivara en la estabilización del complejo BACE1-HEA. Por otro lado, el comportamiento del parámetro ε_T en la segunda HEA de más baja actividad inhibitoria, L3 (IC_{50}= 6300nM), se caracterizó por la ausencia de las etapas I y III. El sistema BACE1-L3 arrojó un valor de $\overset{\circ}{\varepsilon_T}$ de -141.85±7.24 kcal/mol (desviación de -10.53% respecto a H1) y presentó un alza gradual en la energía hasta -129.62 ± 6.79 kcal/mol a los 40ns. Por último, la energía mostró una baja, alcanzando valores cercanos a los iniciales al final de la trayectoria.

Si bien los valores de ε_T describen de manera general el comportamiento energético de los sistemas BACE1-HEA inducidos por los diferentes inhibidores, además de relacionarlos con su actividad biológica contra la aspartil proteasa, no brindan información específica sobre los fenómenos geométricos y electrónicos ocurridos tanto en la proteína como en el ligando durante la simulación. Por otro tanto, la medida de distancias proteína-proteína y proteína-ligando, al igual que el análisis de las ReLIE individuales, permitirá monitorear eventos locales en las diferentes partes del sitio catalítico de BACE1.

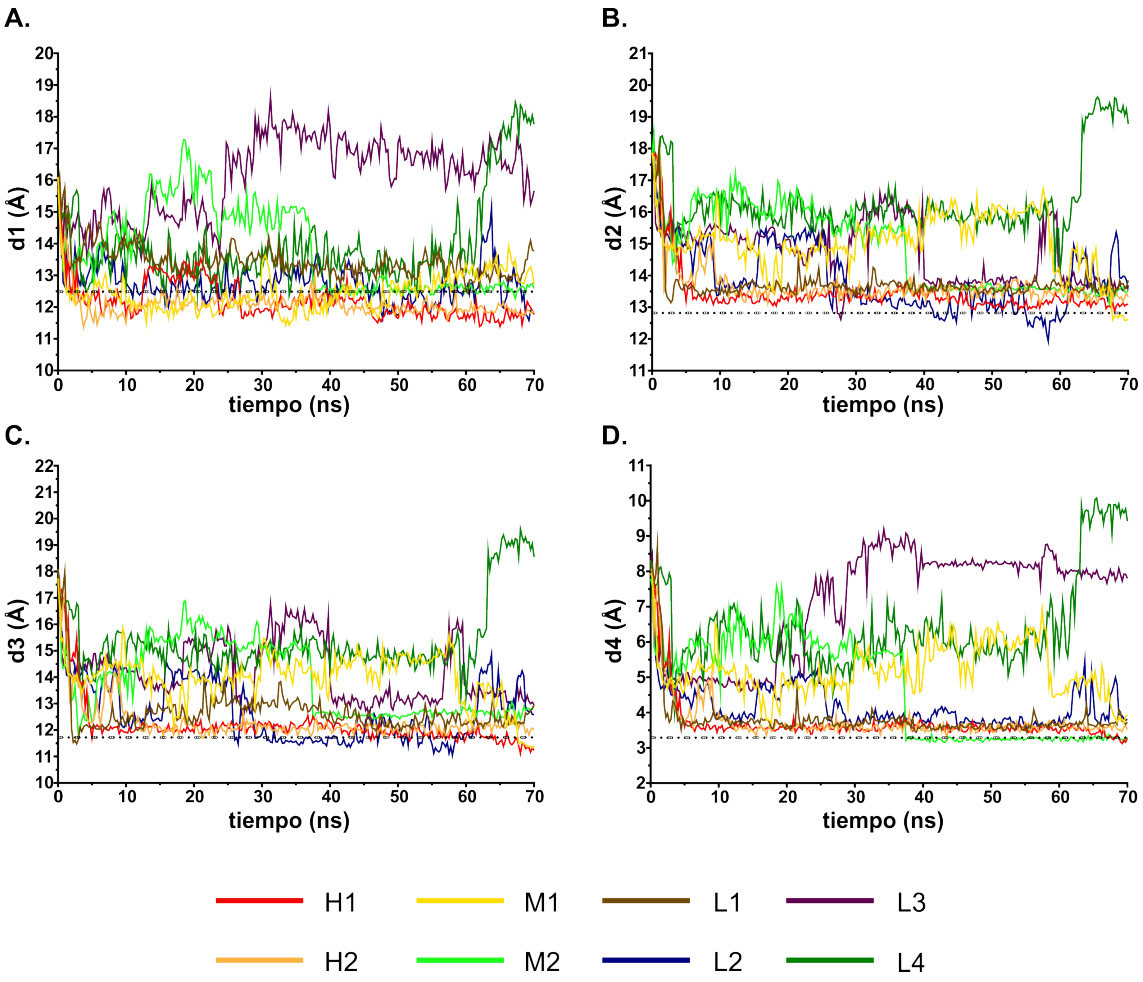


Figura 6-2. Parámetros para el monitoreo de la dinámica del flap. Variaciones para las distancias: **A)** d1, **B)** d2, **C)** d3 y **D)** d4 en el tiempo de simulación. Los valores graficados son la media calculada cada 250ps de la simulación. El código de colores empleado para diferenciar las HEAs se muestra en el fondo.

6.3. La Etapa I Está Gobernada Por El Cierre Del Flap

Con el fin de analizar los cambios geométricos y como se relacionan con los energéticos, medidos por ε_T, se procedió a medir una serie de distancias que monitorean la dinámica del flap. Esta hojilla antiparalela es el elemento característico entre las formas abierta (apo) y cerrada de la β-secretasa. La apertura del flap permite la entrada de los sustratos e inhibidores al sitio catalítico de BACE1 en su forma apo, mientras que su cierre es necesario para que lleve a cabo su actividad enzimática o la inhibición de la misma. Se midieron tres distancias Cα proteína-proteína (**Figura 3-6**), todas usando como referencia la punta del flap (Thr133), a saber: d1 (Thr133-Ser386), d2 (Thr133-Asp93) y d3 (Thr133-Asp289). Estos parámetros se fundamentan en la poca movilidad experimentada por estos residuos durante el cierre del flap, por lo que

cambios en las distancias se relacionan con desplazamientos en el flap. La media experimental de cada distancia, medida usando 18 complejos cristalinos BACE1-HEA (***Anexo VIII***), fue empleada como referencia para determinar que tanto se da el cierre del flap, es decir, una medida del cambio geométrico de la forma Apo a cerrada de BACE1. Un aspecto transversal a los tres parámetros es que para los sistemas BACE1-HEA con los inhibidores de mayor actividad biológica, H1 y H2, estas distancias se acercan a sus medias experimentales en los primeros 5ns de la simulación MD (**Figura 6-2**). Más aún, son los únicos sistemas en el que las distancias muestran valores monótonos o tienden a seguir disminuyendo durante el resto de la simulación, lo que se traduce en un cierre efectivo del flap, es decir, una vez que este cierra no hay reapertura del mismo durante el resto de la trayectoria. Para H1 y H2, las desviaciones oscilan son aproximadamente ±5% respecto a las medias experimentales. Otras HEAs, tales como M1, L1 y L2, presentaron valores cercanos en uno de los parámetros, pero un alejamiento para d2 (**Figura 6-2B**) y d3 (**Figura 6-2C**). En todos los casos, para d1 se observó una baja en los primeros 10ns y oscilaciones que no superan los 0.8Å. Sin embargo, en el caso de M1 y M2, las distancias d2 y d3 exhibieron desviaciones no menores a 2Å la mayor parte de la trayectoria. En el caso de L2 las desviaciones estuvieron alrededor de los 3Å en los primeros 26ns, para luego oscilar alrededor de la media experimental. Todos estos hechos coinciden con el comportamiento de ε_T previamente discutidos, por lo que se puede afirmar que los cambios favorables en ε_T observados en la etapa I **(sección 6.2)** están ligados al cierre del flap de la aspartil proteasa y que, la actividad inhibitoria se relaciona con la inducción, por parte de las HEAs, de un cierre efectivo del flap. Además, permiten explicar el cambio favorable adicional en ε_T que experimentan los sistemas BACE1-H1/H2 en la etapa III.

A pesar de que los parámetros proteína-proteína arrojan información sobre las conformaciones de BACE1 inducidas por las HEA, estos no dicen nada sobre el comportamiento de los ligandos dentro del sitio activo de la proteasa, por lo que un conjunto de parámetros enfocados en la movilidad y posición relativa de las HEAs durante el cierre del flap son necesarios.

6.4. La movilidad de la HEAs influye en el cierre efectivo del flap

Para tener una noción del comportamiento de las HEAs dentro del sitio activo de BACE1 durante el cierre del flap y su relación con los valores de ε_T observados para los 8 sistemas BACE1-HEA estudiados, se midieron parámetros como la desviación cuadrática media (rmsd) y distancias proteína-ligando (**Figura 6-3**). El rmsd mide los cambios en las coordenadas de la molécula en el tiempo respecto a su estructura inicial. Estos cambios de coordenadas en las coordenadas incluyen traslaciones y/o rotaciones de segmentos del ligando en el sitio activo de la β-secretasa. Adicionalmente, las distancias proteína-ligando involucran interacciones polares de gran importancia en el sistema BACE1(cerrada)-HEA previamente reportadas y también, son una referencia de que tanto los ligandos adoptan conformaciones cercanas a las registradas experimentalmente.

Los datos revelan nuevamente que las HEAs de mayor poder inhibitorio sobre BACE1, H1 y H2, son las únicas que poseen simultáneamente un bajo valor de rmsd y valores cercarnos a las medias experimentales en todas las distancias proteína-ligando, durante toda la simulación MD. Esto quiere decir que estas HEAs tuvieron poca movilidad durante y posterior al cierre del flap de proteasa. Para H1 y H2 los valores de rmsd estuvieron alrededor de 0.1Å durante toda la trayectoria, mientras que se observó un incremento fluctuante entre 2 y 4.5 veces en la mayoría de las HEAs de estudio (**Figura 6-3A**), lo que representa cambios conformacionales en el ligando, de manera simultánea, a los efectuados por la proteína.

Respecto a las mediciones de distancias BACE1-HEA, es importante mencionar que estas consideraron las interacciones diferentes secciones de las HEAs (cabeza, núcleo y cola) en el sitio catalítico de la aspartil proteasa. Inicialmente consideraremos la distancia d4, la cual describe el puente de hidrogeno formado entre la cadena principal del residuo Thr133 (punta del flap) y el grupo carbonilo en el núcleo de las HEA (**Figura 3-6**). Este parámetro es otra medida del cierre del flap tomando como referencia la posición del ligando dentro del sitio catalítico de BACE1. Además, se ha reportado previamente como una interacción necesaria para el cierre del flap, es decir, es esencial para el buen funcionamiento de su actividad catalítica(Hong & Tang 2004; Spronk & Carlson 2011; Xu et al. 2012; Chakraborty & Basu 2015; Kumalo et al. 2016; Mahanti et al. 2016).

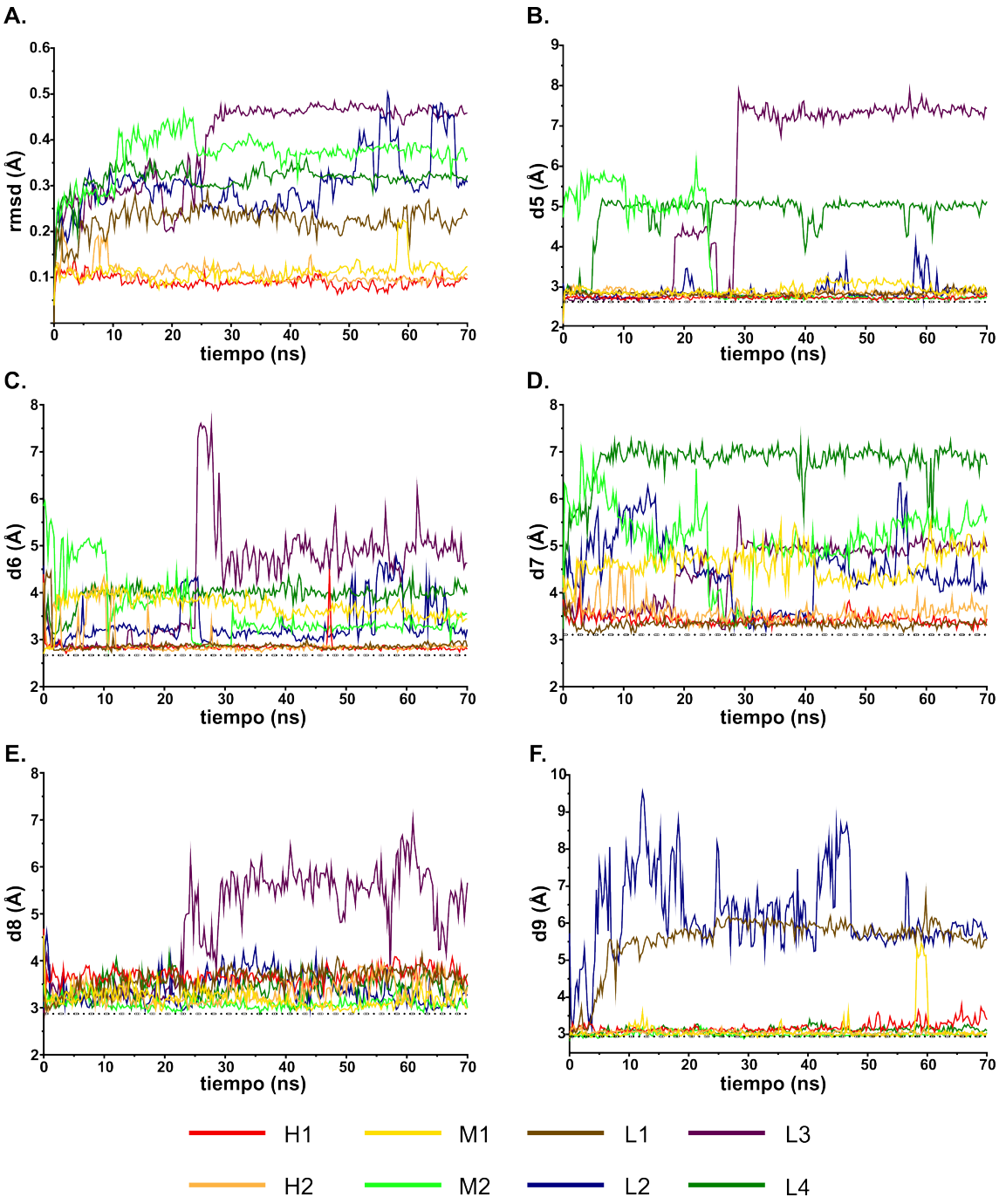


Figura 6-3. Parámetros para el monitoreo del ligando en el sitio activo de BACE1. Variaciones de **A)** rmsd y las distancias **B)** d5, **C)** d6, **D)** d7, **E)** d8 y **F)** d9 en el tiempo de simulación. Los valores graficados son la media calculada cada 250ps de la simulación. El código de colores empleado para diferenciar las HEAs se muestra en el fondo.

La **Figura 6-3**D muestra desviaciones significativas respecto a la media experimental en los sistemas con las HEAs de menor poder inhibitorio del conjunto de estudio, L3 y L4, siendo de al menos 5Å en los últimos 10ns de la trayectoria. Para M2 dicha desviación se encuentran alrededor de los 3Å en los primeros 36ns para luego adquirir valores por debajo de la media experimental. Adicionalmente, Para el sistema BACE1-M1 se presentaron oscilaciones en los valores de d4 que se traduce en un proceso continuo de cierre y reapertura del flap. Estos hallazgos son consistentes con los resultados extraídos de las distancias proteína-proteína **(sección 6.3)** y el análisis de las diferentes etapas, respecto al comportamiento de ε_T **(sección 6.2)**, ambos previamente discutidos.

6.5. Las sustituciones en la cola de las HEAs afectan el cierre del flap en BACE1

El análisis de las otras distancias proteína-ligando d5, d6 y d7 abordan el efecto de los sustituyentes en la cola sobre la inducción del cambio conformacional de BACE1, de su forma apo a cerrada (**Figura 6-3**). Estas distancias involucran la interacción con el grupo hidroxilo (d5) y amínico (d6), en el núcleo de las HEAs, con la diada aspártica, Asp93 y Asp289, respectivamente, hacia la zona S'1 de la β-secretasa (**Figura 3-6**). Adicionalmente, la distancia d7 monitorea el puente de hidrogeno entre el grupo amínico y el grupo carbonilo, en la cadena principal del residuo Gly95, localizada en el bolsillo S'2. Los datos sugieren que propiedades como la flexibilidad y estereoquímica del sustituyente en R1 afectan la capacidad para acomodar la cola de las HEAs en el pocket hidrofóbico S'2, lo que a su vez está relacionado con la facilidad para inducir el cierre del flap en la β-secretasa. Los inhibidores más potentes del conjunto de estudio comparten el fragmento **A'**, un grupo benzil sustituido (***Tabla 3-1***). El carbono alifático metilenico (-CH_2-) que conecta al grupo fenil ofrece dos enlaces rotables que permite la orientación adecuada del grupo rígido, voluminoso e hidrofóbico. Para estas HEAs las distancias en cuestión se mantuvieron monótonas y con pocas desviaciones respecto a las medias experimentales, desde el inicio y durante toda la simulación MD. Para M2, quien porta el fragmento **C'** (***Tabla 3-1***), donde se da la supresión del carbono alifático, el inhibidor ejecuta movimientos adicionales para acomodar el grupo rígido derivado del indeno, tal como lo sugieren los valores de d5, d6 y d7 para el sistema BACE1-M2 donde hay una reducción significativa en las desviaciones pasados los primeros 25ns (**Figura 6-3**). La HEA L4, quien lleva un estereoisómero (R) de **C'** en la cola, fragmento **D'** (***Tabla 3-1***), demuestra que la orientación espacial del sustituyente en el sitio activo de BACE1 juega también un papel influyente en el

proceso inhibitorio. El fragmento **D'** impide estéricamente el cierre del flap al orientarse hacia la zona del opposite-loop, y no la S'2, del sitio catalítico de la proteína **(Información Suplementaria B)**. Para el sistema BACE1-L4 las desviaciones fueron de al menos 2Å y se presentan a partir de los primeros 5ns de la trayectoria. De acuerdo a las distancias proteína-ligando calculadas para el sistema BACE1-M1, un sustituyente demasiado flexible, tal como el fragmento **B'**, tampoco induce a un cierre efectivo del flap. El exceso de enlaces rotables, producto de una cadena alifática y ramificada, no permite el acomodo en el pocket hidrofóbico, tal como lo muestran las distancias que involucran el nitrógeno amínico, d6 (**Figura 6-3C**) y d7 (**Figura 6-3D**), donde la desviación respecto a la media experimental se mantiene en al menos 1Å durante toda la trayectoria MD. Este hecho explica las oscilaciones constantes mostradas en las distancias d1, d2, d3 **(sección 6.3)** y d4 **(sección 6.4)**, discutidas previamente (**Figura 6-2**).

6.6. La interacción con Asn294 mantiene las HEAs ancladas

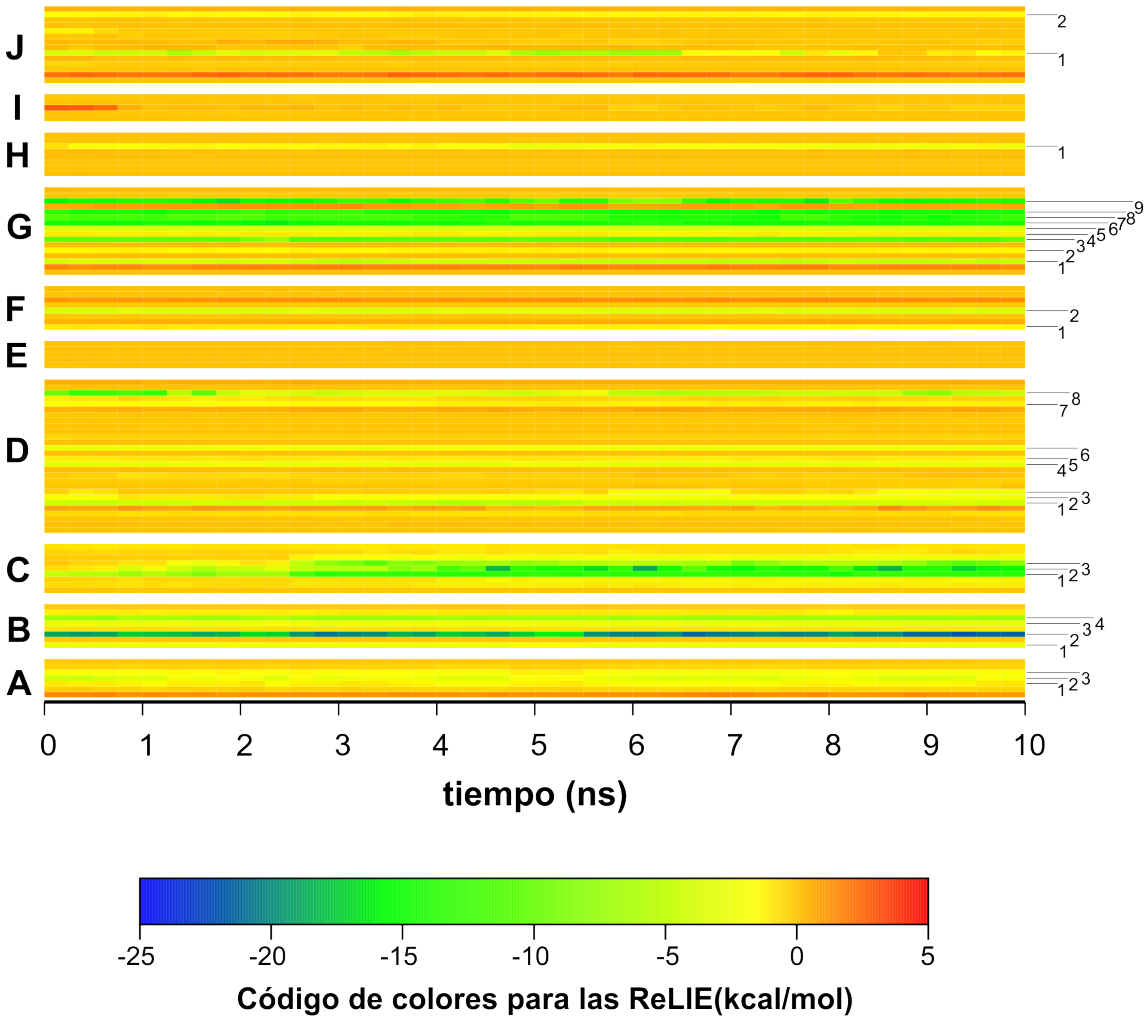
Respecto a la influencia de las sustituciones en la cabeza de las HEAs sobre el cierre del flap, las distancias d8 (**Figura 6-3E**)y d9 (**Figura 6-3F**) resultan útiles al monitorear dos puentes de hidrogeno proteína-ligando que involucran los residuos Gly291 y Asn294, respectivamente, en el segmento G de BACE1 **(Figura 3-4 y Figura 3-6)**. La distancia d8 es calculada considerando el nitrógeno amida en las HEAs, fragmento común a todas las moléculas de estudio, con el oxígeno del grupo carbonilo en la cadena principal de Gly291, quien actúa como aceptor de puentes de hidrogeno. La distancia d9 (**Figura 6-3F**) involucra el nitrógeno de la cadena principal del residuo Asn294, quien actúa como donador de puentes de hidrogeno (**Figura 3-6**), con un oxígeno que pertenece a un grupo carbonilo o sulfonilo que caracteriza a las lactamas (M1, M2 y L4) y sultamas (H1, H2, L1 y L2), respectivamente (***Tabla 3-1***). Para d9 se observa que los fragmentos cíclicos y rígidos muestran valores monótonos, alrededor de 3Å, desde el principio de la simulación MD, tales como los motivos A, B y C (***Tabla 3-1***), como lo demuestran las gráficas para los sistemas de H1, H2 y M1. Adicionalmente, las variaciones que muestra M2 y L4, quienes portan el fragmento C, son explicadas por la influencia de las características estéricas de sus sustituyentes hacia la cola de las HEAs, previamente discutidas (**sección 6.5**). La pérdida de la interacción con Asn294, traducida como el incremento en los valores de d8 y d9 se dió por alguna de 3 causas, a saber: 1) la presencia de un grupo flexible, 2) supresión del grupo aceptor o 3) rotación del enlace que conecta al grupo carbonilo con el grupo fenilo (Ph). Para ilustrar el primer caso consideremos el ligando L1, quien porta el fragmento **D** en la cabeza de la HEA, donde el grupo flexible -C_5H_{11} se halla unido al grupo sulfonilo (***Tabla 3-1***). La movilidad del motivo alifático impide la estabilización del puente de hidrogeno encuestion conllevando a la

perdida de la interacción con el residuo Asn294, tal y como lo reflejan los valores de d9, quien sufre un incremento dramático de al menos 2.5Å en la distancia a partir de los 3ns de trayectoria (**Figura 6-3F**). Por otra parte, la supresión de esta importante interacción proteína-ligando en el sistema BACE1-L3, por la ausencia de un átomo aceptor de puentes de hidrogeno en el motivo **E**, conlleva a un incremento marcado en la distancia d8 en más de 2Å a partir de los 23ns, explicando las variaciones en los valores de rmsd respecto al resto del conjunto de estudio **(Figura 6-3A)** y desviaciones en los parámetros proteína-proteína **(Figura 6-2)**, ambas previamente discutidas. Finalmente, la introducción de un grupo metilo en la posición 6 del anillo Ph en la molécula L2, produce un clash estérico con el grupo benzil que obliga a una rotación en el enlace C-C, entre el grupo carbonilo y Ph en R2. Esto se refleja en el incremento en los valores de d8 y d9. Más aún, explica la diferencia porcentual en el parámetro ε_T° respecto a H1, con valor de -19.00%, previamente discutida (**Tabla 6-1**).

De momento, el análisis de energías ε_T y distancias proteína-proteína ha revelado que la actividad inhibitoria se relaciona con la capacidad de las HEAs para acoplarse en el sitio activo de BACE1 e inducir un cambio conformacional, de su forma apo a cerrada. Más aún, las distancias proteína-ligando revelaron la influencia de los sustituyentes en las HEAs (cabeza y cola) en este proceso, específicamente en la capacidad para mantener las interacciones residuo-ligando. Sin embargo, el estudio de las ReLIE individuales permitirá cuantificar el impacto de la formación y perdida de las interacciones en el sistema BACE1-HEA.

6.7. Las PM7-ReLIE permiten la identificación de las interacciones más relevantes en el sistema BACE-HEA

El estudio de las ReLIE individuales en un sistema proteína-ligando permite la identificación de las interacciones más importantes durante una simulación MD. Más aún, permite identificar la formación o perdida de las mismas en determinado momento de la trayectoria. Esta información es útil para explicar los cambios en ε_T **(sección 6.2)**, distancias proteína-proteína **(sección 6.3)** y proteína-ligando **(sección 6.5** y **sección 6.6)** al cuantificar el efecto que tienen los cambios conformaciones tanto en la proteína como en el ligando sobre las interacciones proteína-ligando. La **Figura 6-4** muestra el panorama de las PM7-ReLIE para los primeros 10ns del proceso inhibitorio de la β-secretasa por parte de la HEA más potente del conjunto de estudio, H1 (IC_{50} = 2nM, ***Tabla 3-1***).



ReLIE más favorables

	A	B	C	D	F	G	H	J
1	Gly72	Leu91	Tyr132	Phe169	Arg256	Lys285	Glu326	Ser386
2	Gln73	Asp93	Thr133	Phe170	Tyr259	Ile287		Val397
3	Gly74	Gly95	Gln134	Ile171		Asp289		
4		Ser96		Trp176		Ser290		
5				Glu177		Gly291		
6				Ile179		Thr292		
7				Ile187		Thr293		
8				Arg189		Asn294		
9						Arg296		

Figura 6-4. Mapa energético de las ReLIE para los primeros 10ns del sistema BACE1. La tabla resalta los residuos, por segmentos, que exhiben las ReLIE más favorables.

De acuerdo a la información recolectada de las ReLIE con los 112 residuos en el sitio activo de BACE1 y sus vecindades durante los 70ns de trayectoria, el sistema BACE1-HEA presenta interacciones de naturaleza polar y apolar, destacando la red de puentes de hidrogeno formada en las diferentes secciones del ligando con la cadena principal y lateral de los residuos que constituyen el sitio activo de la aspartil proteasa. Hacia la zona S'1 se hallan se destacan los residuos Asp93, Gly95, Ser96 (segmento B, **Figura 3-4**) y Asp289 (segmento G) quienes interactúan con los motivos hidroxilo y amínico, fragmentos que identifican esta familia de inhibidores en P'1. Hacia la zona S2 del sitio catalítico se destacan las interacciones con la secuencia Thr292 -Arg296 (segmento G, **Figura 3-4**) quienes interactúan con una zona de alta densidad electrónica en la cabeza del ligando que está presente como lactama o sultama (sustituciones en R2, ***Tabla 3-1***). Dicha zona sirve como aceptor de puentes de hidrogeno y para compensar la carencia de densidad electrónica, lo que permite la formación de interacciones favorables con la cadena principal y lateral de los residuos Asn294 y Arg296, respectivamente. Adicionalmente, se encuentran aquellas interacciones formadas con la triada Tyr132-Thr133-Gln134, en la zona del flap (segmento C), los cuales interactúan con el grupo carbonilo de las HEA.

Es importante resaltar que la interacción inicial entre la punta del flap (residuo Thr133) con el motivo carbonilo en las HEAs, en la transición de las conformaciones abierta a cerrada de la proteína, esta mediada por un puente de hidrogeno formando, el cual involucra el grupo hidroxilo de la cadena lateral de la Thr133. La interacción residuo-ligando se fortalece cuando, al cerrar el flap, se da la formación de puente adicional con la cadena principal del residuo en cuestión **(Anexo XIII).** Adicionalmente, la **Figura 6-4** muestra que la interacción con la Tyr132 se ve favorecida desde el inicio de la trayectoria, a diferencia de Thr133 y Gln134, cuyas interacciones son notables a partir de los 3ns. Esta diferencia se debe principalmente a la capacidad de la cadena lateral de la Tyr132 de formar interacciones tipo π-π (stacking y T-shaped) con los anillos fenilicos ubicados en las zonas P1 y P'2 de H1, interacciones que se ven más favorecidas tras el cierre del flap.

Por otro lado, las ReLIE que involucran aminoácidos con cadenas laterales de naturaleza no-polar se concentran hacia la zona S1 y S'2 de BACE1 (segmento D, **Figura 3-4**). En la primera el grupo benzyl de las HEAs forma interacciones π-alquil con las cadenas laterales alquílicas de Leu91 y Ile171, y del tipo π-π con los residuos Ph169 y Trp176. La cola de las HEA interactúa con residuos del bolsillo hidrofóbico S'2, destacándose las interacciones con Ile179 y Try259.

Adicionalmente, la presencia de una especie electronegativa como un grupo -CF_3 (fragmento A, ***Tabla 3-1***) permite una interacción favorable con la cadena lateral de los residuos cargados Arg187 y Arg256. Otras interacciones hidrofóbicas favorables del tipo π-alquil o alquil-alquil se forman por sustituciones al en R4 alifáticas con el 10s-loop (segmento A), especialmente con los residuos Gly72 y Gly74.

6.8. El Sistema BACE1-HEA Presenta Interacciones De Anclaje

El análisis de los mapas ReLIE para los sistemas constituidos por BACE1 y las moléculas de mayor poder inhibitorio, H1 y H2, revela que existen interacciones de anclaje residuo-ligando tras la llegada de la HEA al sitio activo de BACE1 en su forma apo. Estas interacciones residuo-ligando se caracterizan porque aportan aproximadamente el 45% de la interacción total BACE1-HEA. Además, están presentes desde el inicio y se conservan durante el tiempo de simulación MD, fijando las diferentes secciones del ligando en el sitio catalítico. Como consecuencia, es posible explicar la baja movilidad de estas HEAs **(Figura 6A)** y su capacidad para inducir un cierre efectivo del flap, tal y como lo reflejan los parámetros proteína-proteína **(Figura 6-2)** y proteína-ligando **(Figura 6-3)**, los cuales presentan bajas desviaciones respecto a las medias experimentales. Más aún, este anclaje podría ser una condición necesaria para que se lleve a cabo la segunda etapa del proceso inhibitorio, esto es, la transferencia protónica Asp289 al grupo amina de las HEAs, en la sección P'1 del ligando o el cambio de configuración del sistema, de LnAsp289 a LpAspUP.

Las ReLIE de anclaje son del tipo polar y se destacan aquellas que involucran el motivo hidroxilo y amínico del ligando con la diada catalítica, Asp93 y Asp289, respectivamente, en la zona S'1 de BACE1. De acuerdo los datos, la interacción con Asp93 es la más favorable de todas las 113 estudiadas, en esta etapa del proceso inhibitorio, con un valor promedio de -20.72±2.75 kcal/mol, aportando el 11.17% de la interacción total, de acuerdo al valor promedio ε_T de la trayectoria. Además, es aproximadamente el doble de aquella formada con Asp289, cuyo valor de ReLIE promedio es -10.33±1.35 kcal/mol (5.57%). Adicionalmente, se encuentran aquellas interacciones formadas hacia la cabeza de las HEAs con el segmento G de la proteína, destacando aquellas con Thr292 (7.66%), Thr293 (6.94%), Asn294 (7.32%)y Arg296 (6.06%) con valores de ReLIE promedio de -14.22±1.54, -12.88±2.17, -13.57±1.93 y -11.25±5.33 kcal/mol, respectivamente. La **Figura 6-5** muestra los valores de ReLIE en el tiempo para las interacciones de anclaje para las 8 HEAs estudiadas.

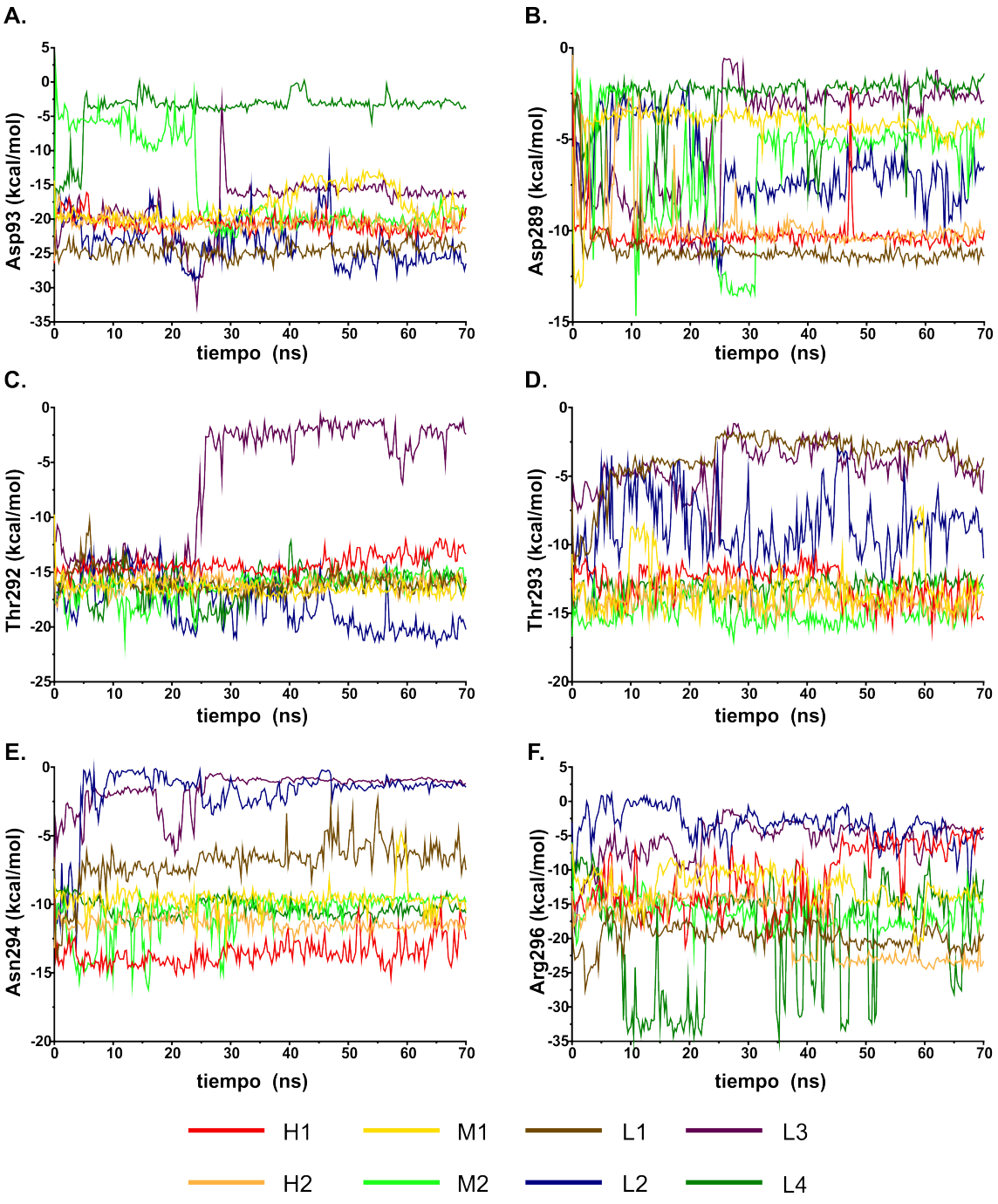


Figura 6-5. Diferencias energéticas en las interacciones de anclaje para los sistemas BACE1-HEA. Los residuos involucrados son: **A.** Asp93, **B.** Asp289, **C.** Thr292, **D.** Thr293, **E.** Asn294 y **F.** Arg296. Los valores graficados son la media calculada cada 250ps de la simulación. El código de colores empleado para diferenciar las HEAs se muestra en el fondo.

El análisis de las gráficas de los puntos de anclaje revela que los inhibidores de actividad moderada (M1 y M2) y baja (L1, L2, L3 y L4) contra BACE1 presentan fallas en diferentes puntos de anclaje a través de la trayectoria MD, esto es, alzas significativas respecto a las encontradas

para las HEAs H1 y H2. Para aquellas sustituciones en R1 que producen incrementos en las distancias proteína-proteína **(Figura 6-2**, **sección 6.3)** y proteína-ligando **(Figura 6-3, sección 6.5)** se observó una disminución en las ReLIE con la diada catalítica **(Figura 6-5A y Figura 6-5B)**. Para M1, quien porta un fragmento flexible B' en la cola, presentó perdidas en las interacciones con Asp93 y Asp289 en alrededor de 5 y 7 kcal/mol, respectivamente. Para M2, quien porta el fragmento C' en R1, las desviaciones en las ReLIE con Asp93 fueron de 20kcal/mol en los primeros 24ns, disminuyendo a 5kcal luego del cierre del flap. Además, mostró una perdida con Asp289 de aproximadamente 6 kcal/mol. La HEA L4, quien porta el estereoisómero (R) de C', mostró a partir de los primeros 5ns la perdida de la ReLIE con la diada aspártica, Asp93 y Asp289, de 17 y 8 kcal/mol, respectivamente. Por otro lado, las sustituciones en R2 que producen alargamientos en las distancias d8 y d9 **(Figura 6-3, sección 3.5)** mostraron disminuciones frecuentes en las ReLIE con Thr293 **(Figura 6-5D)** y Asn294 **(Figura 6-5E)**. Para L1, quien por un grupo n-C_5H_{11} flexible unido al grupo sulfonilo (fragmento D, ***Tabla 3-1***), se presentaron perdidas al menos 10 y 6 kcal/mol con Thr293 y Asn294 después de los primeros 5ns de trayectoria, respectivamente. La HEA L2, cuya sustitución en R4 con un grupo metil provoca rotaciones en la sección de la cabeza (***Tabla 3-1***), muestra una pérdida de interacción con Thr293 que fluctúa de 4 a 10 kcal/mol, mientras que su ReLIE Asn294 asciende a 12 kcal/mol, ambas desde el inicio de la simulación. Por último, el ligando L3, quien carece de un grupo aceptor en la cabeza de su estructura, mostró perdidas notables con los residuos Thr292 (**Figura 6-5C**), Thr293 (**Figura 6-5D**) y Asn294 (**Figura 6-5E**) de 14, 9 y 10 kcal/mol, respectivamente, las cuales conllevaron a una disminución simultánea con los residuos aspárticos en 5 y 8 kcal/mol para Asp93 y Asp289, respectivamente. Estos resultados permiten entender, desde un punto de vista energético, como se ven afectadas las interacciones por los cambios conformacionales locales en el ligando. De igual manera, ayudan a complementar la discusión basada meramente en parámetros geométricos.

Los hallazgos discutidos en este trabajo de investigación sugieren fuertemente que la actividad inhibitoria de las HEAs está asociada con la capacidad para formar y mantener en el tiempo las interacciones con el sitio catalítico de BACE1, especialmente aquellas consideradas como interacciones de anclaje, las cuales involucra los residuos Asp93, Asp289, Thr292, Thr293, Asn294 y Arg296. Más aún, permitirán asistir al diseño y cribado virtual de HEAs como inhibidores de BACE1

6.9. Conclusiones del Capítulo 6

En este capítulo se brindó el panorama energético, basado en las energías de interacción residuo-ligando dinámicas, del proceso de cierre del flap de la proteína BACE1 inducido por las hidroxietilaminas. Los cálculos basados en el método semiempírico PM7, permitieron dar una mirada profunda y cuantitativa al reconocimiento de 8 HEA de diferente actividad biológica por la β-secretasa. El análisis de las distancias proteína-proteína y proteína-ligando demostró que el proceso de cierre del flap se ve influenciado por las diferencias estructurales en la cabeza y cola de los ligandos. Por otro lado, el análisis energético, basado en las ReLIE, sugiere que el sistema BACE1-HEA tiene interacciones de anclaje, las cuales involucra los residuos Asp93, Asp289, Thr292, Thr293, Asn294 y Arg296. Estas contribuyen en aproximadamente 45% a la interacción proteína-ligando. Adicionalmente, el cierre del flap trae consigo un incremento de aproximadamente el 25% en la favorabilidad de las interacciones del sistema BACE1-HEA. La dificultad para formar o mantener en el tiempo las interacciones de anclaje conlleva a impedir o dilatar el proceso de cierre del flap, por lo que estaría relacionada con la perdida de actividad inhibitoria de las HEA sobre BACE1. La metodología empleada podría asistir al diseño de mejores HEAs como inhibidores de BACE1.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7. Conclusiones Generales Y Recomendaciones

Las peculiaridades geométricas y electrónicas de BACE1 obligaron, en este trabajo doctoral, al desarrollo de nuevas perspectivas para abordar el asunto de la inhibición de esta aspartil proteasa por HEAs. Debido a lo extenso del manuscrito y la variedad de experimentos computacionales efectuados en el presente trabajo doctoral, se ha decidido separar los hallazgos más relevantes producto de la exploración «*In Silico*» del camino inhibitorio de la β-secretasa por parte de las HEAs, de aquellos referentes a las metodologías empleadas.

Sobre el sistema BACE1-HEA

- En el camino de inhibición de BACE1 por las HEAs se da un cambio conformacional de la enzima, de su forma apo a cerrada, el cual además, viene acompañado de una transferencia protónica, por parte de la cadena lateral del residuo catalítico Asp289 hacia el grupo amínico de las HEAs, en la sección P'1.
- El estado de protonación final del sistema BACE1-HEA es LpAspUP
- El estado de protonación inicial del sistema BACE1-HEA es LnAsp289
- La protonación del ligando se da dentro del sitio activo de la aspartil proteasa. El protón proviene del residuo catalítico Asp289.
- Sobre el momento de la protonación de la HEA, se concluye que esta no ocurre mientras BACE1 esté en su forma apo

- La consideración de la cadena lateral Asp93 como un ácido neutro, en cualquiera de las conformaciones de BACE1, trae como consecuencia el desplazamiento, impedir el cierre del flap y/o reapertura del mismo.
- La actividad inhibitoria de las HEAs sobre BACE1 depende de la capacidad de los ligandos para formar y mantener en el tiempo las interacciones favorables con la proteína. Esto repercute directamente sobe la capacidad de inducir o mantener el cierre del flap.
- El cierre del flap es importante porque conlleva a un incremento favorable del 25% en las interacciones BACE1-HEA.
- El sistema BACE1-HEA presenta interacciones de anclaje que representan aproximadamente el 45% de la engería de interacción total proteína-ligando.
- Las fallas para formar o conservar los puntos de anclaje explicarían la perdida en el poder inhibitorio de algunas HEAs sobre BACE1.
- La naturaleza química (geométrica, estereoisometría y electrónica) de la cola de las HEA, hacia S'2, afecta el cierre el flap de la aspartil proteasa.
- La interacción con Asn294, hacia la cabeza de las HEAs, para es clave para el anclaje del ligando en el sitio activo de BACE1.

Sobre la metodología

- Las simulaciones de dinámica molecular son una buena aproximación para explorar los cambios conformacionales en la proteína. Sin embargo, solo el análisis de dichas simulaciones con parámetros adecuadas permite resolver problemas de interés bioquímico, tales como la asignación correcta de estados de protonación para un sistema proteína-ligando.
- El rmsd del ligando, medido para una instantánea o en el tiempo, no puede ser usado como criterio único para discernir entre diferentes estados de protonación. Tampoco el docking proteína-ligando, por no considerar los posibles cambios conformacionales en la macromolécula.
- Los parámetros dinámicos medidos sobre la proteína permiten monitorear sus cambios conformacionales, así como variaciones en ángulos diedros, sensibles a los factores estéricos y electrónicos del sistema.
- Los parámetros proteína-ligando dinámicos, brindaron información sobre la posición relativa de las HEAs dentro del sitio activo de BACE1. La medición hacia la zona P'1 del ligando, permitieron la exploración del efecto de la protonación en la diada aspártica.

Más aún, del efecto de las variaciones de la cola en el ligando sobre el cierre del flap. Adicionalmente, la medición en otras zonas permitió monitorear interacciones de importancia para el sistema BACE1-HEA.

- La aplicación del concepto de densidad poblacional individual y combinada, una herramienta comparada creada en este trabajo doctoral, permitió la identificación de la configuración inicial de estados de protonación. La densidad poblacional individual permitió identificar aquellas medidas redundantes o monótonas, así como aquellas que fueron sensibles a las diferentes configuraciones evaluadas. Por otro lado, la densidad poblacional conjunta o combinada es capaz de monitorear los eventos geométricos más relevantes del sistema de estudio, al reunir parámetros proteína-proteína y proteína-ligando en una única medida de puntuación porcentual (determinado a cierto nivel de tolerancia respecto a los valores de referencia).
- El cálculo de las energías de interacción residuo-ligando, total e individual, medidas en el tiempo de simulación, brindó un panorama energético del sistema BACE1-HEA. La ReLIE total brindó una descripción general de la estabilidad del sistema, mientras que el análisis de las ReLIE permitió monitorear interacciones importantes del sistema proteína-ligando.

Es importante mencionar que las metodologías empleadas en este proyecto de investigación son aplicables a otras familias de compuestos que actúen como inhibidores de BACE1, otras aspartil proteasas o proteínas en general. Además, confío en que estas herramientas afectaran positivamente las estrategias para el diseño de nuevas moléculas asistidos por computadoras. En este caso, en el diseño racional de nuevas HEAs inhibidoras de BACE1 en la lucha contra la progresión del mal de Alzheimer.

Como reflexión final, exhorto a la comunidad científica a abordar preguntas abiertas que podrían complementar el panorama del proceso inhibitorio de BACE1 por HEAs, tal es el caso del momento de la protonación del ligando en el sitio activo de la enzima, es decir, determinar si el proceso ocurre posterior al cierre del flap o de manera concertada. Por otro lado, y con fines de asistir al diseño de inhibidores de BACE1, sería beneficioso crear modelos computacionales que encuentren y expliquen como las variaciones estructurales en el ligando afectan la selectividad sobre BACE1 y otras aspartil proteasas con alto grado de homología, tales como BACE2 y Catepsina D.

BIBLIOGRAFÍAS

8. Bibliografías

Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B. & Lindahl, E. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX 1-2*: 19-25.

Adlard, P. A., Tran, B. A., Finkelstein, D. I., Desmond, P. M., Johnston, L. A., Bush, A. I. & Egan, G. F. (2014). A review of beta-amyloid neuroimaging in Alzheimer's disease. *Front Neurosci 8*: 327.

Ambure, P. & Roy, K. (2016). Understanding the structural requirements of cyclic sulfone hydroxyethylamines as hBACE1 inhibitors against Aβ plaques in Alzheimer's disease: a predictive QSAR approach. *RSC Adv. 6*: 28171-28186.

Arodola, O. A. & Soliman, M. E. (2016). Molecular Dynamics Simulations of Ligand-Induced Flap Conformational Changes in Cathepsin-D-A Comparative Study. *J Cell Biochem 117*: 2643-2657.

Barman, A. & Prabhakar, R. (2012). Protonation States of the Catalytic Dyad of β-Secretase (BACE1) in the Presence of Chemically Diverse Inhibitors: A Molecular Docking Study. *Journal of Chemical Information and Modeling 52*: 1275-1287.

Barman, A. & Prabhakar, R. (2013). Elucidating the catalytic mechanism of beta-secretase (BACE1): a quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) approach. *J Mol Graph Model 40*: 1-9.

Barman, A. & Prabhakar, R. (2014). Computational Insights into Substrate and Site Specificities, Catalytic Mechanism, and Protonation States of the Catalytic Asp Dyad of β-Secretase. *Scientifica 2014*: 11.

Barman, A. & Prabhakar, R. (2014). Computational Insights into Substrate and Site Specificities, Catalytic Mechanism, and Protonation States of the Catalytic Asp Dyad of beta -Secretase. *Scientifica (Cairo) 2014*: 598728.

Barman, A., Schürer, S. & Prabhakar, R. (2011). Computational Modeling of Substrate Specificity and Catalysis of the β-Secretase (BACE1) Enzyme. *Biochemistry 50*: 4337-4349.

Berendsen, H. J. C., van der Spoel, D. & van Drunen, R. (1995). GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer Physics Communications 91*: 43-56.

Bernier, F., Sato, Y., Matijevic, M., Desmond, H., McGrath, S., Burns, L., Kaplow, J. M. & Albala, B. (2013). Clinical study of E2609, a novel BACE1 inhibitor, demonstrates target engagement and inhibition of BACE1 activity in CSF. *Alzheimer's & Dementia 9*: P886.

Beswick, P., Charrier, N., Clarke, B., Demont, E., Dingwall, C., Dunsdon, R., Faller, A., Gleave, R., Hawkins, J., Hussain, I., Johnson, C. N., MacPherson, D., Maile, G., Matico, R., Milner, P., Mosley, J., Naylor, A., O'Brien, A., Redshaw, S., Riddell, D., Rowland, P., Skidmore, J., Soleil, V., Smith, K. J., Stanway, S., Stemp, G., Stuart, A., Sweitzer, S., Theobald, P., Vesey, D., Walter, D. S., Ward, J. & Wayne, G. (2008). BACE-1 inhibitors part 3: identification of hydroxy ethylamines (HEAs) with nanomolar potency in cells. *Bioorg Med Chem Lett 18*: 1022-1026.

Brandon, C. J., Martin, B. P., McGee, K. J., Stewart, J. J. P. & Braun-Sand, S. B. (2015). An approach to creating a more realistic working model from a protein data bank entry. *Journal of Molecular Modeling 21*.

Bras, N. F., Fernandes, P. A. & Ramos, M. J. (2014). Molecular dynamics studies on both bound and unbound renin protease. *J Biomol Struct Dyn 32*: 351-363.

Cai, Y., Kurt Yilmaz, N., Myint, W., Ishima, R. & Schiffer, C. A. (2012). Differential Flap Dynamics in Wild-Type and a Drug Resistant Variant of HIV-1 Protease Revealed by Molecular Dynamics and NMR Relaxation. *Journal of Chemical Theory and Computation 8*: 3452-3462.

Clarke, B., Cutler, L., Demont, E., Dingwall, C., Dunsdon, R., Hawkins, J., Howes, C., Hussain, I., Maile, G., Matico, R., Mosley, J., Naylor, A., O'Brien, A., Redshaw, S., Rowland, P., Soleil, V., Smith, K. J., Sweitzer, S., Theobald, P., Vesey, D., Walter, D. S. & Wayne, G. (2010). BACE-1 hydroxyethylamine inhibitors using novel edge-to-face interaction with Arg-296. *Bioorg Med Chem Lett 20*: 4639-4644.

Clarke, B., Demont, E., Dingwall, C., Dunsdon, R., Faller, A., Hawkins, J., Hussain, I., MacPherson, D., Maile, G., Matico, R., Milner, P., Mosley, J., Naylor, A., O'Brien, A., Redshaw, S., Riddell, D., Rowland, P., Soleil, V., Smith, K. J., Stanway, S., Stemp, G., Sweitzer, S., Theobald, P., Vesey, D., Walter, D. S., Ward, J. & Wayne, G. (2008). BACE-1 inhibitors part 1: identification of novel hydroxy ethylamines (HEAs). *Bioorg Med Chem Lett 18*: 1011-1016.

Clarke, B., Demont, E., Dingwall, C., Dunsdon, R., Faller, A., Hawkins, J., Hussain, I., MacPherson, D., Maile, G., Matico, R., Milner, P., Mosley, J., Naylor, A., O'Brien, A., Redshaw, S., Riddell, D., Rowland, P., Soleil, V., Smith, K. J., Stanway, S., Stemp, G., Sweitzer, S., Theobald, P., Vesey, D., Walter, D. S., Ward, J. & Wayne, G. (2008). BACE-1 inhibitors part 2: identification of hydroxy ethylamines (HEAs) with reduced peptidic character. *Bioorg Med Chem Lett 18*: 1017-1021.

Clarke, B., Demont, E., Dingwall, C., Dunsdon, R., Faller, A., Hawkins, J., Hussain, I., MacPherson, D., Maile, G., Matico, R., Milner, P., Mosley, J., Naylor, A., O'Brien, A., Redshaw, S., Riddell, D., Rowland, P., Soleil, V., Smith, K. J., Stanway, S., Stemp, G., Sweitzer, S., Theobald, P., Vesey, D., Walter, D. S., Ward, J. & Wayne, G. (2008). BACE-1 inhibitors part 2: identification of hydroxy ethylamines (HEAs) with reduced peptidic character. *Bioorganic & medicinal chemistry letters 18*: 1017-1021.

Cornell, W. D., Cieplak, P., Bayly, C. I., Gould, I. R., Merz, K. M., Ferguson, D. M., Spellmeyer, D. C., Fox, T., Caldwell, J. W. & Kollman, P. A. (1995). A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *Journal of the American Chemical Society 117*: 5179-5197.

Coutsias, E. A., Seok, C. & Dill, K. A. (2004). Using quaternions to calculate RMSD. *Journal of Computational Chemistry 25*: 1849-1857.

Crunkhorn, S. (2016). Alzheimer disease: BACE1 inhibitor reduces β-amyloid production in humans. *Nature Reviews Drug Discovery 16*: 18-18.

Crunkhorn, S. (2016). Computational chemistry: Novel virtual screening approach. *Nature Reviews Drug Discovery 16*: 18-18.

Czodrowski, P., Sotriffer, C. A. & Klebe, G. (2007). Atypical Protonation States in the Active Site of HIV-1 Protease: A Computational Study. *Journal of Chemical Information and Modeling 47*: 1590-1598.

Chakraborty, S. & Basu, S. (2015). Structural insight into the mechanism of amyloid precursor protein recognition by beta-secretase 1: A molecular dynamics study. *Biophys Chem 202*: 1-12.

Chakraborty, S., Ramachandran, B. & Basu, S. (2014). Encompassing receptor flexibility in virtual screening using ensemble docking-based hybrid QSAR: discovery of novel phytochemicals for BACE1 inhibition. *Molecular BioSystems 10*: 2684.

Chakraborty, S., Ramachandran, B. & Basu, S. (2014). Encompassing receptor flexibility in virtual screening using ensemble docking-based hybrid QSAR: discovery of novel phytochemicals for BACE1 inhibition. *Mol Biosyst 10*: 2684-2692.

Chang, W. P., Huang, X., Downs, D., Cirrito, J. R., Koelsch, G., Holtzman, D. M., Ghosh, A. K. & Tang, J. (2010). -Secretase inhibitor GRL-8234 rescues age-related cognitive decline in APP transgenic mice. *The FASEB Journal 25*: 775-784.

Charrier, N., Clarke, B., Cutler, L., Demont, E., Dingwall, C., Dunsdon, R., East, P., Hawkins, J., Howes, C., Hussain, I., Jeffrey, P., Maile, G., Matico, R., Mosley, J., Naylor, A., O'Brien, A., Redshaw, S., Rowland, P., Soleil, V., Smith, K. J., Sweitzer, S., Theobald, P., Vesey, D., Walter, D. S. & Wayne, G. (2008). Second Generation of Hydroxyethylamine BACE-1 Inhibitors: Optimizing Potency and Oral Bioavailability. *Journal of Medicinal Chemistry 51*: 3313-3317.

Charrier, N., Clarke, B., Cutler, L., Demont, E., Dingwall, C., Dunsdon, R., Hawkins, J., Howes, C., Hubbard, J., Hussain, I., Maile, G., Matico, R., Mosley, J., Naylor, A., O'Brien, A., Redshaw, S., Rowland, P., Soleil, V., Smith, K. J., Sweitzer, S., Theobald, P., Vesey, D., Walter, D. S. & Wayne, G. (2009). Second generation of BACE-1 inhibitors part 3: Towards non hydroxyethylamine transition state mimetics. *Bioorg Med Chem Lett 19*: 3674-3678.

Charrier, N., Clarke, B., Cutler, L., Demont, E., Dingwall, C., Dunsdon, R., Hawkins, J., Howes, C., Hubbard, J., Hussain, I., Maile, G., Matico, R., Mosley, J., Naylor, A., O'Brien, A., Redshaw, S., Rowland, P., Soleil, V., Smith, K. J., Sweitzer, S., Theobald, P., Vesey, D., Walter, D. S. & Wayne, G. (2009). Second generation of BACE-1 inhibitors. Part 1: The need for improved pharmacokinetics. *Bioorg Med Chem Lett 19*: 3664-3668.

Charrier, N., Clarke, B., Demont, E., Dingwall, C., Dunsdon, R., Hawkins, J., Hubbard, J., Hussain, I., Maile, G., Matico, R., Mosley, J., Naylor, A., O'Brien, A., Redshaw, S., Rowland, P., Soleil, V., Smith, K. J., Sweitzer, S., Theobald, P., Vesey, D., Walter, D. S. & Wayne, G. (2009). Second generation of BACE-1 inhibitors part 2: Optimisation of the non-prime side substituent. *Bioorg Med Chem Lett 19*: 3669-3673.

Chéron, N. & Shakhnovich, E. I. (2017). Effect of sampling on BACE-1 ligands binding free energy predictions via MM-PBSA calculations. *Journal of Computational Chemistry*.

Darden, T., York, D. & Pedersen, L. (1993). Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems. *The Journal of Chemical Physics 98*: 10089.

Dhanabalan, A. K., Kesherwani, M., Velmurugan, D. & Gunasekaran, K. (2017). Identification of new BACE1 inhibitors using Pharmacophore and Molecular dynamics simulations approach. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*.

Domínguez, J. L., Christopeit, T., Villaverde, M. C., Gossas, T., Otero, J. M., Nyström, S., Baraznenok, V., Lindström, E., Danielson, U. H. & Sussman, F. (2010). Effect of the Protonation State of the Titratable Residues on the Inhibitor Affinity to BACE-1. *Biochemistry 49*: 7255-7263.

Duan, Y., Wu, C., Chowdhury, S., Lee, M. C., Xiong, G., Zhang, W., Yang, R., Cieplak, P., Luo, R., Lee, T., Caldwell, J., Wang, J. & Kollman, P. (2003). A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *Journal of Computational Chemistry 24*: 1999-2012.

Edwards, G., 3rd, Moreno-Gonzalez, I. & Soto, C. (2016). Amyloid-beta and tau pathology following repetitive mild traumatic brain injury. *Biochem Biophys Res Commun*.

Eketjäll, S., Janson, J., Kaspersson, K., Bogstedt, A., Jeppsson, F., Fälting, J., Haeberlein, S. B., Kugler, A. R., Alexander, R. C., Cebers, G. & Ho, P. (2016). AZD3293: A Novel, Orally Active BACE1 Inhibitor with High Potency and Permeability and Markedly Slow Off-Rate Kinetics. *Journal of Alzheimer's Disease 50*: 1109-1123.

El-Hachem, N., Haibe-Kains, B., Khalil, A., Kobeissy, F. H. & Nemer, G. (2017). AutoDock and AutoDockTools for Protein-Ligand Docking: Beta-Site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1(BACE1) as a Case Study. *1598*: 391-403.

Ellis, C. R. & Shen, J. (2015). pH-Dependent Population Shift Regulates BACE1 Activity and Inhibition. *Journal of the American Chemical Society 137*: 9543-9546.

Ellis, C. R., Tsai, C.-C., Lin, F.-Y. & Shen, J. (2017). Conformational dynamics of cathepsin D and binding to a small-molecule BACE1 inhibitor. *Journal of Computational Chemistry 38*: 1260-1269.

Evin, G. (2016). Future Therapeutics in Alzheimer's Disease: Development Status of BACE Inhibitors. *BioDrugs 30*: 173-194.

Fedele, E., Rivera, D., Marengo, B., Pronzato, M. A. & Ricciarelli, R. (2015). Amyloid beta: Walking on the dark side of the moon. *Mech Ageing Dev 152*: 1-4.

Ghosh, A. K. & Osswald, H. L. (2014). BACE1 (β-secretase) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Chemical Society Reviews 43*: 6765-6813.

Gorfe, A. A. & Caflisch, A. (2005). Functional plasticity in the substrate binding site of beta-secretase. *Structure 13*: 1487-1498.

Gueto-Tettay, C., Drosos, J. C. & Vivas-Reyes, R. (2011). Quantum mechanics study of the hydroxyethylamines-BACE-1 active site interaction energies. *J Comput Aided Mol Des 25*: 583-597.

H. Al-Nadaf, A. & Taha, M. O. (2015). Identification of Small Molecule Memapsin Inhibitors via Computation-based Virtual Screening. *Advances in Pharmacology and Pharmacy 3*: 53-63.

Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G. & Sisodia, S. (2012). Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med 2*: a006270.

Harrington, K. D., Lim, Y. Y., Gould, E. & Maruff, P. (2014). Amyloid-beta and depression in healthy older adults: A systematic review. *Aust N Z J Psychiatry*.

Hernandez-Rodriguez, M., Correa-Basurto, J., Gutierrez, A., Vitorica, J. & Rosales-Hernandez, M. C. (2016). Asp32 and Asp228 determine the selective inhibition of BACE1 as shown by docking and molecular dynamics simulations. *Eur J Med Chem*: IN PRESS.

Hersi, M., Irvine, B., Gupta, P., Gomes, J., Birkett, N. & Krewski, D. (2017). Risk factors associated with the onset and progression of Alzheimer's disease: A systematic review of the evidence. *NeuroToxicology*.

Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C. & Fraaije, J. G. E. M. (1997). LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry 18*: 1463-1472.

Hong, L., Koelsch, G., Lin, X., Wu, S., Terzyan, S., Ghosh, A. K., Zhang, X. C. & Tang, J. (2000). Structure of the protease domain of memapsin 2 (beta-secretase) complexed with inhibitor. *Science 290*: 150-153.

Hong, L. & Tang, J. (2004). Flap Position of Free Memapsin 2 (β-Secretase), a Model for Flap Opening in Aspartic Protease Catalysis. *Biochemistry 43*: 4689-4695.

Hornak, V., Okur, A., Rizzo, R. C. & Simmerling, C. (2006). HIV-1 protease flaps spontaneously open and reclose in molecular dynamics simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences 103*: 915-920.

Huang, D., Liu, Y., Shi, B., Li, Y., Wang, G. & Liang, G. (2013). Comprehensive 3D-QSAR and binding mode of BACE-1 inhibitors using R-group search and molecular docking. *J Mol Graph Model 45*: 65-83.

Huey, R., Morris, G. M., Olson, A. J. & Goodsell, D. S. (2007). A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *Journal of Computational Chemistry 28*: 1145-1152.

Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph 14*: 33-38, 27-38.

Hussain, I., Hawkins, J., Harrison, D., Hille, C., Wayne, G., Cutler, L., Buck, T., Walter, D., Demont, E., Howes, C., Naylor, A., Jeffrey, P., Gonzalez, M. I., Dingwall, C., Michel, A., Redshaw, S. & Davis, J. B. (2007). Oral administration of a potent and selective non-peptidic BACE-1 inhibitor decreases ?-cleavage of amyloid precursor protein and amyloid-? production in vivo. *Journal of Neurochemistry 100*: 802-809.

Iqbal, K., Liu, F. & Gong, C. X. (2016). Tau and neurodegenerative disease: the story so far. *Nat Rev Neurol 12*: 15-27.

Ishima, R. & Louis, J. M. (2008). A diverse view of protein dynamics from NMR studies of HIV-1 protease flaps. *Proteins 70*: 1408-1415.

John, S., Thangapandian, S., Sakkiah, S. & Lee, K. (2011). Potent bace-1 inhibitor design using pharmacophore modeling, in silico screening and molecular docking studies. *BMC Bioinformatics 12*: S28.

Jonsson, T., Atwal, J. K., Steinberg, S., Snaedal, J., Jonsson, P. V., Bjornsson, S., Stefansson, H., Sulem, P., Gudbjartsson, D., Maloney, J., Hoyte, K., Gustafson, A., Liu, Y., Lu, Y., Bhangale, T., Graham, R. R., Huttenlocher, J., Bjornsdottir, G., Andreassen, O. A., Jonsson, E. G., Palotie, A., Behrens, T. W., Magnusson, O. T., Kong, A., Thorsteinsdottir, U., Watts, R. J. & Stefansson, K. (2012). A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature 488*: 96-99.

Kabsch, W. (1976). A solution for the best rotation to relate two sets of vectors. *Acta Crystallographica Section A 32*: 922-923.

Karubiu, W., Bhakat, S., McGillewie, L. & Soliman, M. E. S. (2015). Flap dynamics of plasmepsin proteases: insight into proposed parameters and molecular dynamics. *Molecular BioSystems 11*: 1061-1066.

Klamt, A. & Schüürmann, G. (1993). COSMO: a new approach to dielectric screening in solvents with explicit expressions for the screening energy and its gradient. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*: 799-805.

Kocak, A., Erol, I., Yildiz, M. & Can, H. (2016). Computational insights into the protonation states of catalytic dyad in BACE1-acyl guanidine based inhibitor complex. *J Mol Graph Model 70*: 226-235.

Kortum, S. W., Benson, T. E., Bienkowski, M. J., Emmons, T. L., Prince, D. B., Paddock, D. J., Tomasselli, A. G., Moon, J. B., LaBorde, A. & TenBrink, R. E. (2007). Potent and selective isophthalamide S2 hydroxyethylamine inhibitors of BACE1. *Bioorg Med Chem Lett 17*: 3378-3383.

Kumalo, H. M., Bhakat, S. & Soliman, M. E. (2016). Investigation of flap flexibility of beta-secretase using molecular dynamic simulations. *J Biomol Struct Dyn 34*: 1008-1019.

Kumalo, H. M. & Soliman, M. E. (2016). A comparative molecular dynamics study on BACE1 and BACE2 flap flexibility. *J Recept Signal Transduct Res 36*: 505-514.

Kumar, A., Roy, S., Tripathi, S. & Sharma, A. (2015). Molecular docking based virtual screening of natural compounds as potential BACE1 inhibitors: 3D QSAR pharmacophore mapping and molecular dynamics analysis. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics 34*: 239-249.

Li, R., Lindholm, K., Yang, L. B., Yue, X., Citron, M., Yan, R., Beach, T., Sue, L., Sabbagh, M., Cai, H., Wong, P., Price, D. & Shen, Y. (2004). Amyloid β peptide load is correlated with increased β-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101*: 3632-3637.

Linning, P., Haussmann, U., Beyer, I., Weidlich, S., Schieb, H., Wiltfang, J., Klafki, H.-W. & Knölker, H.-J. (2012). Optimisation of BACE1 inhibition of tripartite structures by modification of

membrane anchors, spacers and pharmacophores – development of potential agents for the treatment of Alzheimer's disease. *Organic & Biomolecular Chemistry 10*: 8216.

Mahanti, M., Bhakat, S., Nilsson, U. J. & Soderhjelm, P. (2016). Flap Dynamics in Aspartic Proteases: A Computational Perspective. *Chem Biol Drug Des 88*: 159-177.

Mahoney, M. W. & Jorgensen, W. L. (2000). A five-site model for liquid water and the reproduction of the density anomaly by rigid, nonpolarizable potential functions. *The Journal of Chemical Physics 112*: 8910-8922.

Maillard, M. C., Hom, R. K., Benson, T. E., Moon, J. B., Mamo, S., Bienkowski, M., Tomasselli, A. G., Woods, D. D., Prince, D. B., Paddock, D. J., Emmons, T. L., Tucker, J. A., Dappen, M. S., Brogley, L., Thorsett, E. D., Jewett, N., Sinha, S. & John, V. (2007). Design, Synthesis, and Crystal Structure of Hydroxyethyl Secondary Amine-Based Peptidomimetic Inhibitors of Human β-Secretase†. *Journal of Medicinal Chemistry 50*: 776-781.

Mandal, M., Zhu, Z., Cumming, J. N., Liu, X., Strickland, C., Mazzola, R. D., Caldwell, J. P., Leach, P., Grzelak, M., Hyde, L., Zhang, Q., Terracina, G., Zhang, L., Chen, X., Kuvelkar, R., Kennedy, M. E., Favreau, L., Cox, K., Orth, P., Buevich, A., Voigt, J., Wang, H., Kazakevich, I., McKittrick, B. A., Greenlee, W., Parker, E. M. & Stamford, A. W. (2012). Design and Validation of Bicyclic Iminopyrimidinones As Beta Amyloid Cleaving Enzyme-1 (BACE1) Inhibitors: Conformational Constraint to Favor a Bioactive Conformation. *Journal of Medicinal Chemistry 55*: 9331-9345.

Manoharan, P., Vijayan, R. S. K. & Ghoshal, N. (2010). Rationalizing fragment based drug discovery for BACE1: insights from FB-QSAR, FB-QSSR, multi objective (MO-QSPR) and MIF studies. *Journal of Computer-Aided Molecular Design 24*: 843-864.

Martin, B. P., Brandon, C. J., Stewart, J. J. P. & Braun-Sand, S. B. (2015). Accuracy issues involved in modelingin vivoprotein structures using PM7. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics 83*: 1427-1435.

May, P. C., Willis, B. A., Lowe, S. L., Dean, R. A., Monk, S. A., Cocke, P. J., Audia, J. E., Boggs, L. N., Borders, A. R., Brier, R. A., Calligaro, D. O., Day, T. A., Ereshefsky, L., Erickson, J. A., Gevorkyan, H., Gonzales, C. R., James, D. E., Jhee, S. S., Komjathy, S. F., Li, L., Lindstrom, T. D., Mathes, B. M., Martenyi, F., Sheehan, S. M., Stout, S. L., Timm, D. E., Vaught, G. M., Watson, B. M., Winneroski, L. L., Yang, Z. & Mergott, D. J. (2015). The Potent BACE1 Inhibitor LY2886721 Elicits Robust Central A Pharmacodynamic Responses in Mice, Dogs, and Humans. *Journal of Neuroscience 35*: 1199-1210.

Menting, K. W. & Claassen, J. A. (2014). beta-secretase inhibitor; a promising novel therapeutic drug in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci 6*: 165.

Mishra, S. & Caflisch, A. (2011). Dynamics in the Active Site of β-Secretase: A Network Analysis of Atomistic Simulations. *Biochemistry 50*: 9328-9339.

Miyamoto, S. & Kollman, P. A. (1992). Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *Journal of Computational Chemistry 13*: 952-962.

Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S. & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem 30*: 2785-2791.

Morrone, C. D., Liu, M., Black, S. E. & McLaurin, J. (2015). Interaction between therapeutic interventions for Alzheimer's disease and physiological Aβ clearance mechanisms. *Frontiers in Aging Neuroscience 7*.

O'Brien, R. J. & Wong, P. C. (2011). Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci 34*: 185-204.

Oehlrich, D., Prokopcova, H. & Gijsen, H. J. M. (2014). The evolution of amidine-based brain penetrant BACE1 inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters 24*: 2033-2045.

Palakurti, R., Sriram, D., Yogeeswari, P. & Vadrevu, R. (2013). Multiple e-Pharmacophore Modeling Combined with High-Throughput Virtual Screening and Docking to Identify Potential Inhibitors of β-Secretase(BACE1). *Molecular Informatics 32*: 385-398.

Park, H. & Lee, S. (2003). Determination of the Active Site Protonation State of β-Secretase from Molecular Dynamics Simulation and Docking Experiment: Implications for Structure-Based Inhibitor Design. *Journal of the American Chemical Society 125*: 16416-16422.

Patel, S., Vuillard, L., Cleasby, A., Murray, C. W. & Yon, J. (2004). Apo and inhibitor complex structures of BACE (beta-secretase). *Journal of molecular biology 343*: 407-416.

Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry 25*: 1605-1612.

Polgar, T. & Keseru, G. M. (2011). Integration of virtual and high throughput screening in lead discovery settings. *Comb Chem High Throughput Screen 14*: 889-897.

Polgar, T., Magyar, C., Simon, I. & Keseru, G. M. (2007). Impact of ligand protonation on virtual screening against beta-secretase (BACE1). *J Chem Inf Model 47*: 2366-2373.

Pradeep, N., Munikumar, M., Swargam, S., Hema, K., Sudheer Kumar, K. & Umamaheswari, A. (2015). 197 Combination of e-pharmacophore modeling, multiple docking strategies and molecular dynamic simulations to discover of novel antagonists of BACE1. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics 33*: 129-130.

Prado-Prado, F., Escobar-Cubiella, M. & Garcia-Mera, X. (2011). Review of Bioinformatics and QSAR Studies of β-Secretase Inhibitors. *Current Bioinformatics 6*: 3-15.

Pronk, S., Páll, S., Schulz, R., Larsson, P., Bjelkmar, P., Apostolov, R., Shirts, M. R., Smith, J. C., Kasson, P. M., van der Spoel, D., Hess, B. & Lindahl, E. (2013). GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics*.

Quartino, A., Huledal, G., Sparve, E., Lüttgen, M., Bueters, T., Karlsson, P., Olsson, T., Paraskos, J., Maltby, J., Claeson-Bohnstedt, K., Lee, C.-M., Alexander, R., Fälting, J. & Paulsson, B. (2014). Population pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of plasma Aβ40and Aβ42following single oral doses of the BACE1 inhibitor AZD3839 to healthy volunteers. *Clinical Pharmacology in Drug Development 3*: 396-405.

Rajamani, R. & Reynolds, C. H. (2004). Modeling the Protonation States of the Catalytic Aspartates in β-Secretase. *Journal of Medicinal Chemistry 47*: 5159-5166.

Reitz, C. & Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol 88*: 640-651.

Ren, Z., Tam, D., Xu, Y.-Z., Wone, D., Yuan, S., Sham, H. L., Cheung, H., Regnstrom, K., Chen, X., Rudolph, D., Jobling, M. F., Artis, D. R. & Bova, M. P. (2013). Development of a Novel β-Secretase Binding Assay Using the AlphaScreen Platform. *Journal of Biomolecular Screening 18*: 695-704.

Rueeger, H., Lueoend, R., Rogel, O., Rondeau, J.-M., Möbitz, H., Machauer, R., Jacobson, L., Staufenbiel, M., Desrayaud, S. & Neumann, U. (2012). Discovery of Cyclic Sulfone Hydroxyethylamines as Potent and Selective β-Site APP-Cleaving Enzyme 1 (BACE1) Inhibitors: Structure-Based Design and in Vivo Reduction of Amyloid β-Peptides. *Journal of Medicinal Chemistry 55*: 3364-3386.

S. Liu, C., Ruthirakuhan, M., A. Chau, S., Herrmann, N., F. Carvalho, A. & L. Lanctôt, K. (2016). Pharmacological Management of Agitation and Aggression in Alzheimer's Disease: A Review of Current and Novel Treatments. *Current Alzheimer Research 13*: 1134-1144.

Sabbah, D. A. & Zhong, H. A. (2016). Modeling the protonation states of β-secretase binding pocket by molecular dynamics simulations and docking studies. *Journal of Molecular Graphics and Modelling 68*: 206-215.

Saito, S. & Ihara, M. (2014). New therapeutic approaches for Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy. *Front Aging Neurosci 6*: 290.

Scheltens, P., Blennow, K., Breteler, M. M. B., de Strooper, B., Frisoni, G. B., Salloway, S. & Van der Flier, W. M. (2016). Alzheimer's disease. *The Lancet 388*: 505-517.

Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E. & Hyman, B. T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med. 1*: a006189.

Small, S. A. & Duff, K. (2008). Linking Aβ and Tau in Late-Onset Alzheimer's Disease: A Dual Pathway Hypothesis. *Neuron 60*: 534-542.

Soares, R. O., Torres, P. H. M., da Silva, M. L. & Pascutti, P. G. (2016). Dataset showing the impact of the protonation states on molecular dynamics of HIV protease. *Data in Brief 8*: 1144-1150.

Spronk, S. A. & Carlson, H. A. (2011). The role of tyrosine 71 in modulating the flap conformations of BACE1. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics 79*: 2247-2259.

Stamford, A. & Strickland, C. (2013). Inhibitors of BACE for treating Alzheimer's disease: a fragment-based drug discovery story. *Current Opinion in Chemical Biology 17*: 320-328.

Stewart, J. J. (2009). Application of the PM6 method to modeling proteins. *J Mol Model 15*: 765-805.

Stewart, J. J. (2013). Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. *J Mol Model 19*: 1-32.

Stewart, J. J. P. (2017). An investigation into the applicability of the semiempirical method PM7 for modeling the catalytic mechanism in the enzyme chymotrypsin. *J Mol Model 23*: 154.

Sussman, F., Otero, J. M., Villaverde, M. C., Castro, M., Domínguez, J. L., González-Louro, L., Estévez, R. J. & Estévez, J. C. (2011). On a Possible Neutral Charge State for the Catalytic Dyad in β-Secretase When Bound to Hydroxyethylene Transition State Analogue Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry 54*: 3081-3085.

Swaminathan, A. & Jicha, G. A. (2014). Nutrition and prevention of Alzheimer's dementia. *Front Aging Neurosci 6*: 282.

Tanzi, R. E. (2012). The genetics of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med 2*.

Truong, A. P., Tóth, G., Probst, G. D., Sealy, J. M., Bowers, S., Wone, D. W. G., Dressen, D., Hom, R. K., Konradi, A. W., Sham, H. L., Wu, J., Peterson, B. T., Ruslim, L., Bova, M. P., Kholodenko, D., Motter, R. N., Bard, F., Santiago, P., Ni, H., Chian, D., Soriano, F., Cole, T., Brigham, E. F., Wong, K., Zmolek, W., Goldbach, E., Samant, B., Chen, L., Zhang, H., Nakamura, D. F., Quinn, K. P., Yednock, T. A. & Sauer, J.-M. (2010). Design of an orally efficacious hydroxyethylamine (HEA) BACE-1 inhibitor in a preclinical animal model. *Bioorganic & medicinal chemistry letters 20*: 6231-6236.

Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E. & Berendsen, H. J. C. (2005). GROMACS: Fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry 26*: 1701-1718.

Vassar, R. (2014). BACE1 inhibitor drugs in clinical trials for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy 6*: 1-14.

Wang, J., Wang, W., Kollman, P. A. & Case, D. A. (2006). Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *J Mol Graph Model 25*: 247-260.

Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A. & Case, D. A. (2004). Development and testing of a general amber force field. *J Comput Chem 25*: 1157-1174.

Webb, B. & Sali, A. (2014). Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Curr Protoc Bioinformatics 47*: 1-32.

Wilkins, H. M. & Swerdlow, R. H. (2016). Amyloid precursor protein processing and bioenergetics. *Brain Res Bull*.

Wu, Q., Li, X., Gao, Q., Wang, J., Li, Y. & Yang, L. (2016). Interaction mechanism exploration of HEA derivatives as BACE1 inhibitors by in silico analysis. *Molecular BioSystems 12*: 1151-1165.

Xu, Y., Li, M. J., Greenblatt, H., Chen, W., Paz, A., Dym, O., Peleg, Y., Chen, T., Shen, X., He, J., Jiang, H., Silman, I. & Sussman, J. L. (2012). Flexibility of the flap in the active site of BACE1 as revealed by crystal structures and molecular dynamics simulations. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 68*: 13-25.

Yan, R., Fan, Q., Zhou, J. & Vassar, R. (2016). Inhibiting BACE1 to reverse synaptic dysfunctions in Alzheimer's disease. *Neurosci Biobehav Rev 65*: 326-340.

Yan, R. & Vassar, R. (2014). Targeting the β secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. *The Lancet Neurology 13*: 319-329.

Yilmazer, N. D. & Korth, M. (2015). Enhanced semiempirical QM methods for biomolecular interactions. *Computational and Structural Biotechnology Journal 13*: 169-175.

York, D. M., Wlodawer, A., Pedersen, L. G. & Darden, T. A. (1994). Atomic-level accuracy in simulations of large protein crystals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91*: 8715-8718.

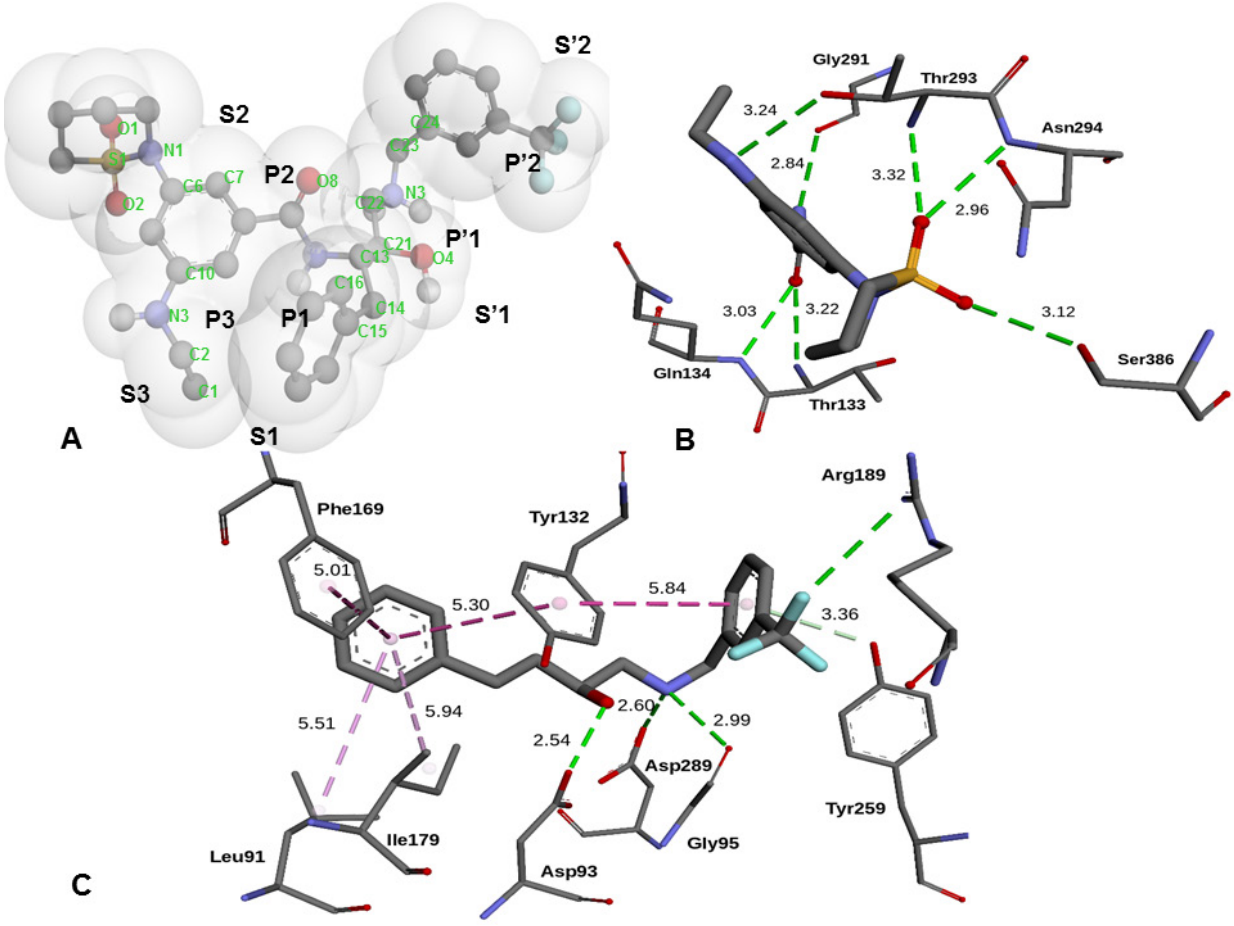
Yu, N., Hayik, S. A., Wang, B., Liao, N., Reynolds, C. H. & Merz, K. M. (2006). Assigning the protonation states of the key aspartates in β-Secretase using QM/MM X-ray structure refinement. *Journal of Chemical Theory and Computation 2*: 1057-1069.

Zeng, H. & Wu, X. (2016). Alzheimer's disease drug development based on Computer-Aided Drug Design. *European Journal of Medicinal Chemistry 121*: 851-863.

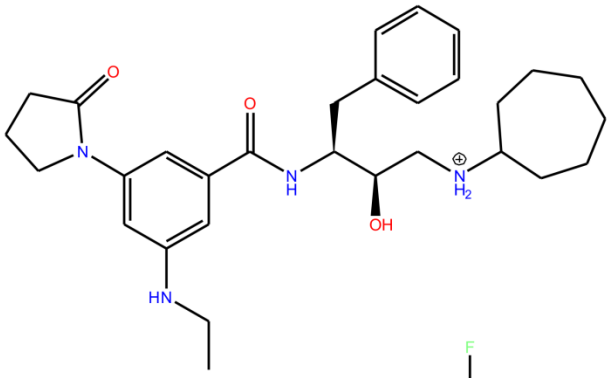
Zhang, S., Lin, Z., Pu, Y., Zhang, Y., Zhang, L. & Zuo, Z. (2017). Comparative QSAR studies using HQSAR, CoMFA, and CoMSIA methods on cyclic sulfone hydroxyethylamines as BACE1 inhibitors. *Computational Biology and Chemistry 67*: 38-47.

9. Anexos

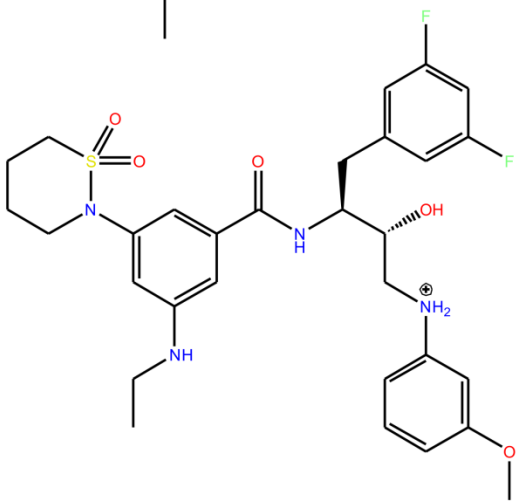
9.1. Anexos Capítulo 4



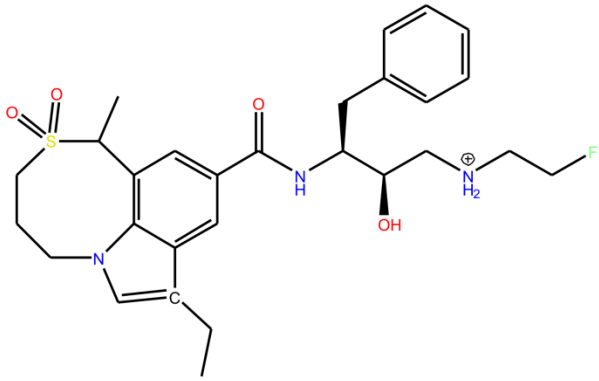
Anexo I. Interacción entre las diferentes zonas del sitio active de BACE1 y el inhibidor H2; **A.** Rotulación de las zonas de referencia; **B.** zonas de interacción S2/P2 y S3/P3 y ; **C.** S1/P1, S'1/P'1 y S'2/P'2. Las lineas punteadas verdes, purpura oscuro y claro representan interacciones tipo puentes de hidrogeno, π-π y π-alquil, respectivamente.



V207

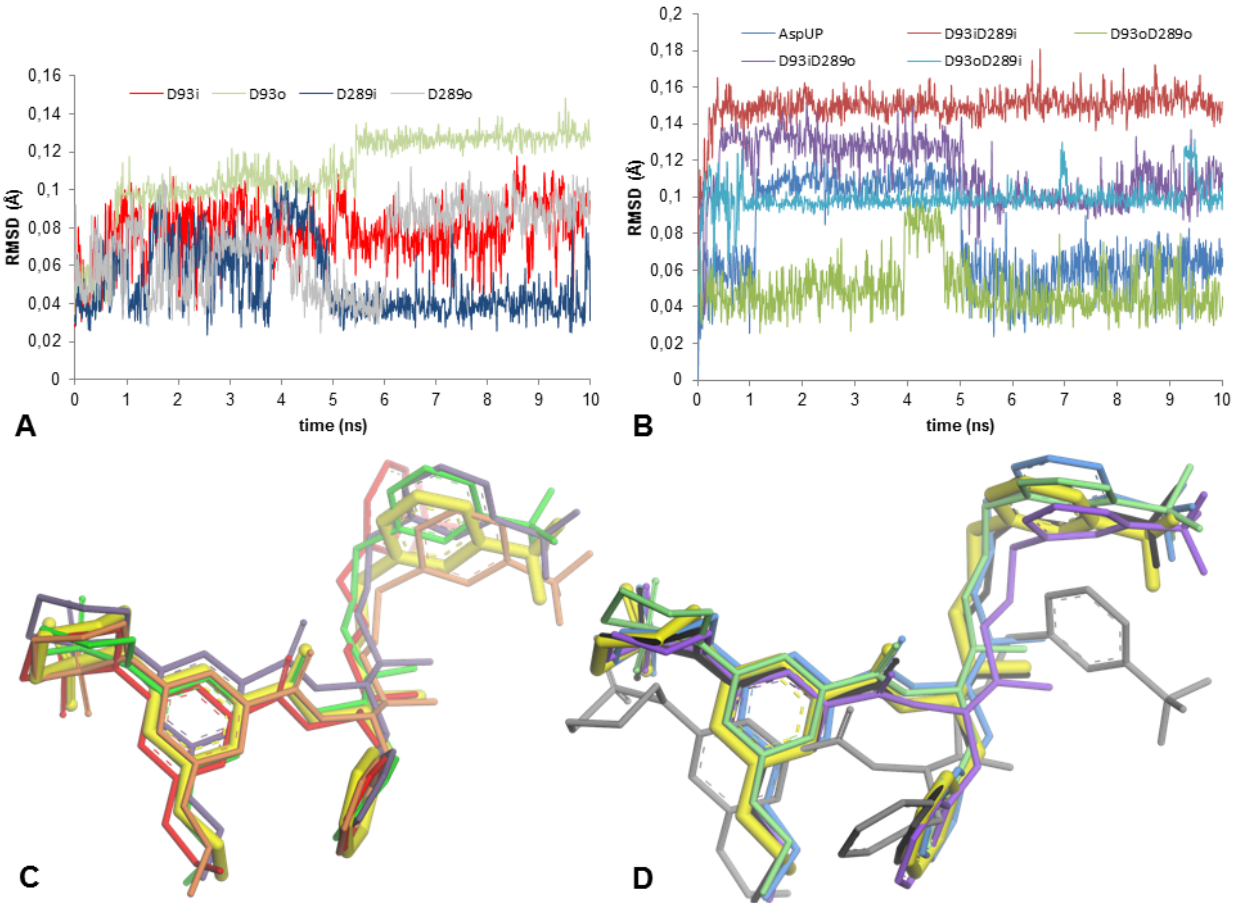


V317



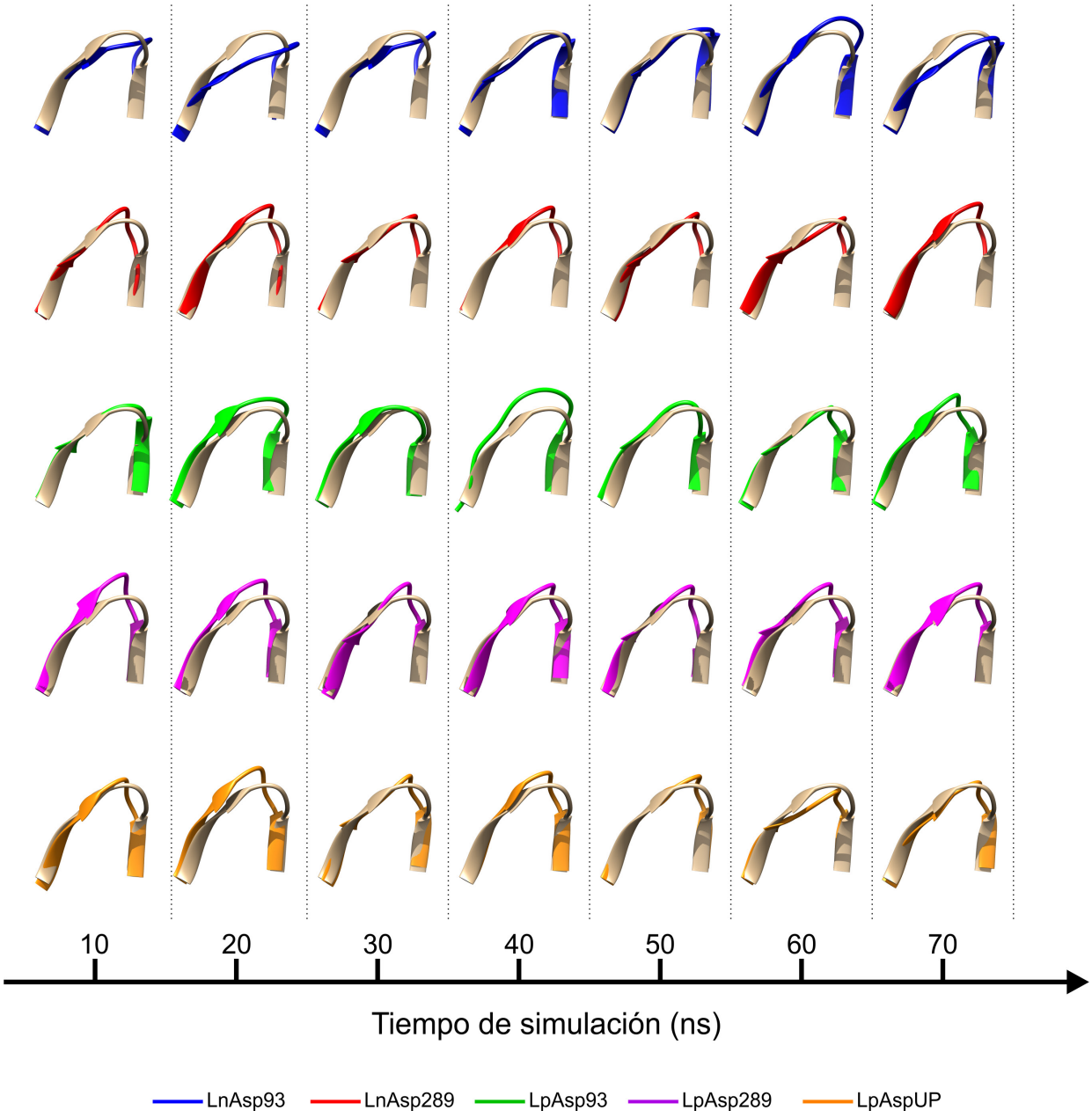
N323

Anexo II. Estructuras moleculares de 3 HEAs no co-cristalizadas con BACE1. Estas fueron usadas para las simulaciones de docking y posterior optimización del Sistema. Referencias:(Clarke et al. 2008; Charrier et al. 2008; Charrier et al. 2009)

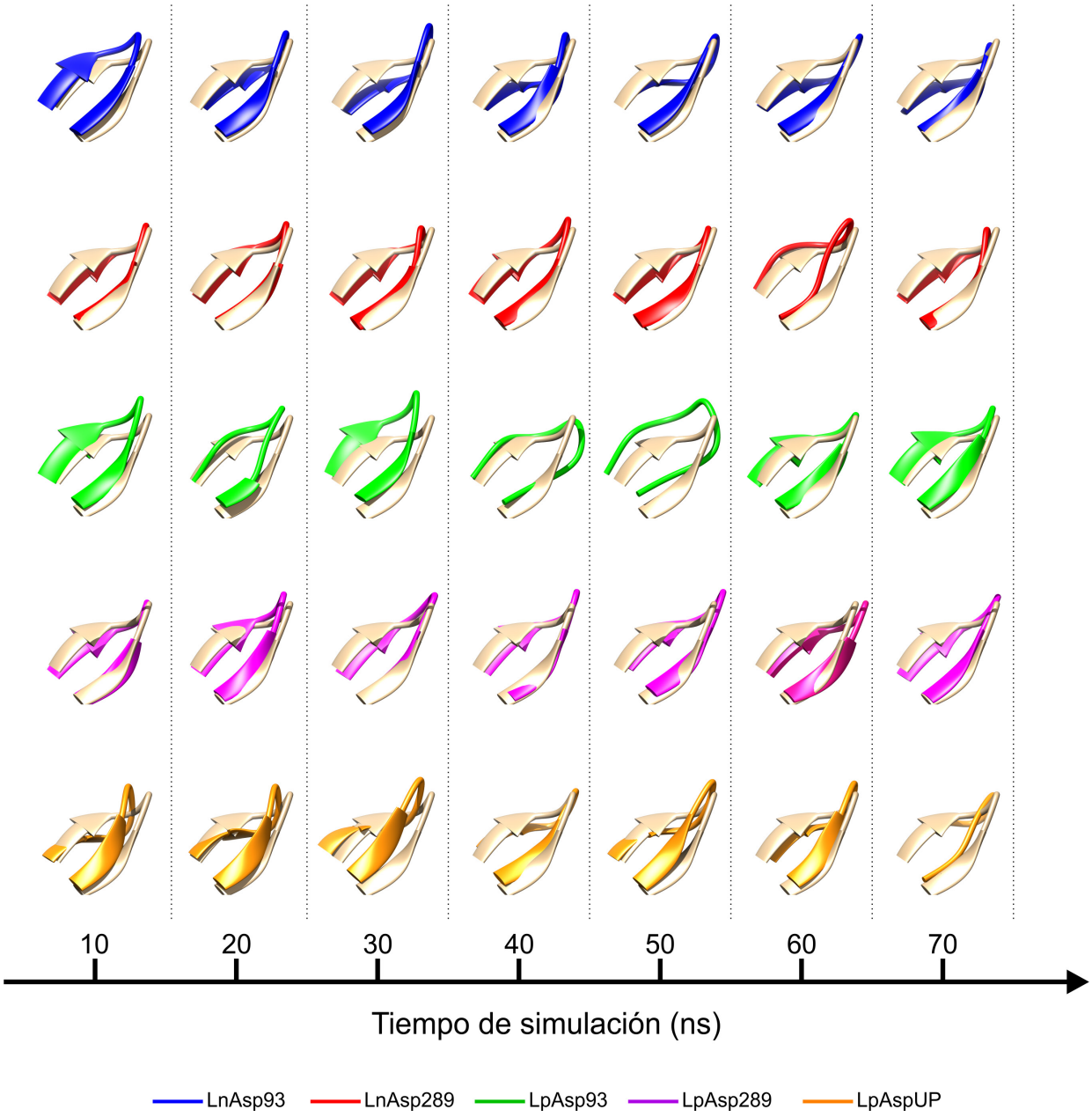


Anexo III. Desviación cuadratica media (rmsd), medida en Å, para los átomos pesados de la cadena lateral de la diada catalítica y los átomos C13, C21, C22, N3, C23, C24 en el inhibidor H2 de: **A.** las configuraciones aniónicas, D93i (rojo), D93o (verde claro), D289i (azul oscuro) y D289o (gris) y **B.** las configuraciones neutras y diaonica, D93iD289i (azul claro), D93oD289o (verde), D93iD289o (morado) y D93oD289i (azul claro), y AspUP (azul), respectivamente. Superposición de las poses para las estructuras más representivas de las configuraciones: **C.** monoprotonadas, D93i (rojo), D93o (naranja), D289i (verde) y D289o (morado); **D.** di-protonadas and di-desprotonada, D93iD289i (gris), D93oD289o (azul), D93iD289o (morado) y D93oD289i (verde claro), y AspUP (negro), respectivamente. La pose experimental (amarillo) se usó como referencia especial.

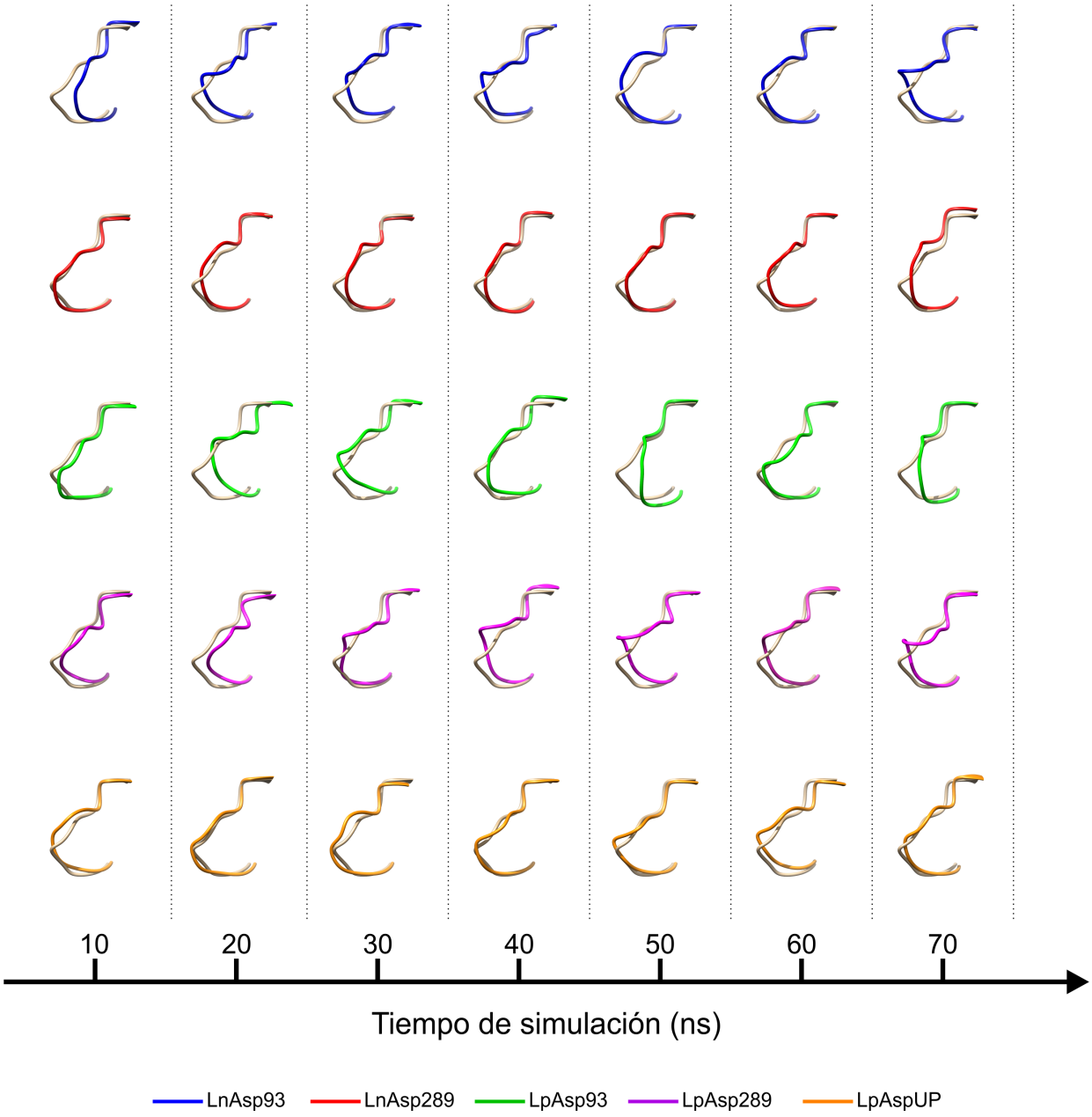
9.2. Anexos Capítulo 5



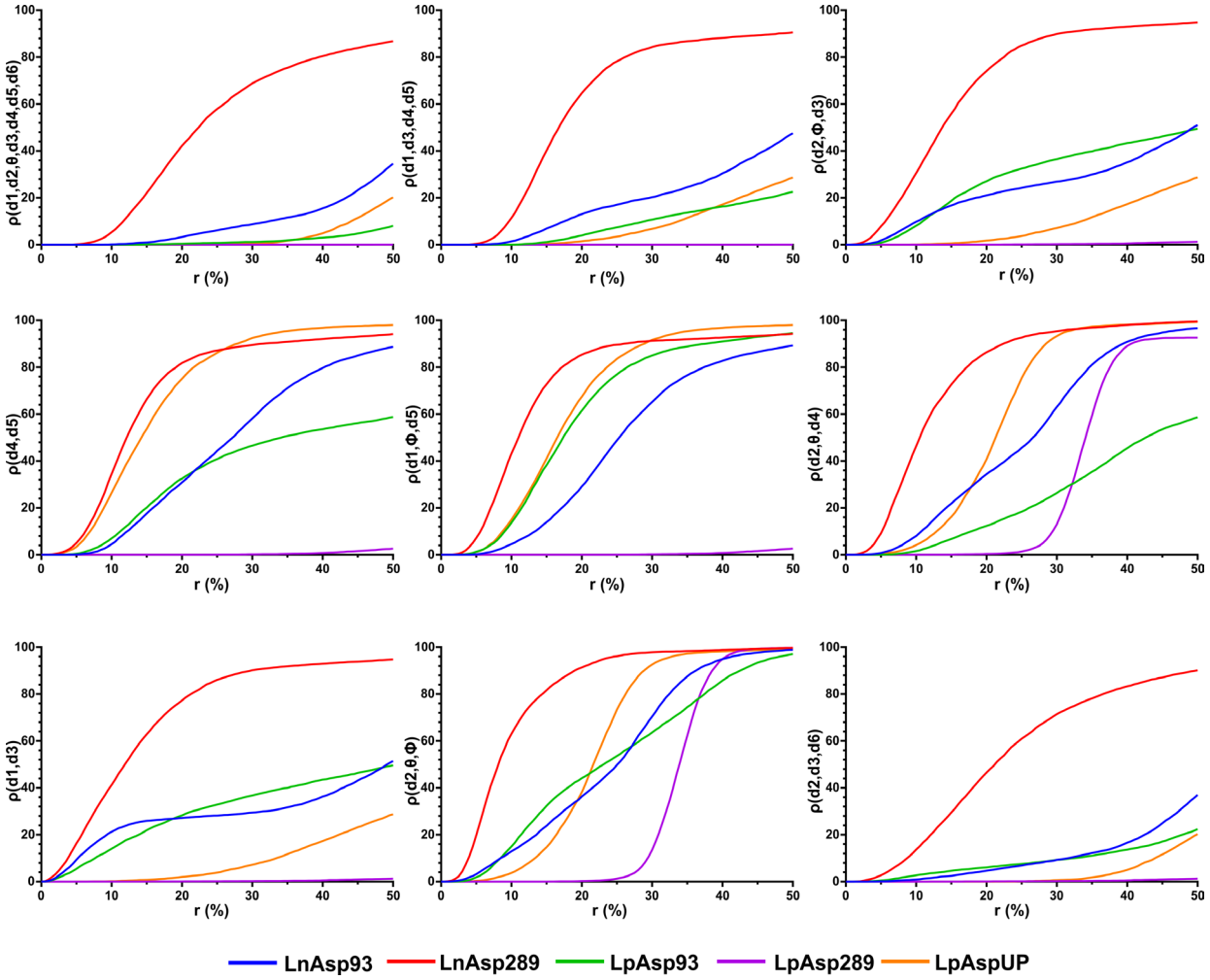
Anexo IV. Conformación del opposite-loop para cada configuración de estados de protonación respecto a 2VNM. El Código de colores se muestra en el fondo.



Anexo V. Conformación del 10s-loop para cada configuración de estados de protonación respecto a la estructura cristalina 2VNM. El Código de colores se muestra en el fondo.



Anexo VI. Conformación del 113s-loop para configuración de estados de protonación respecto a la estructura 2VNM. El Código de colores empleado se halla en el fondo.

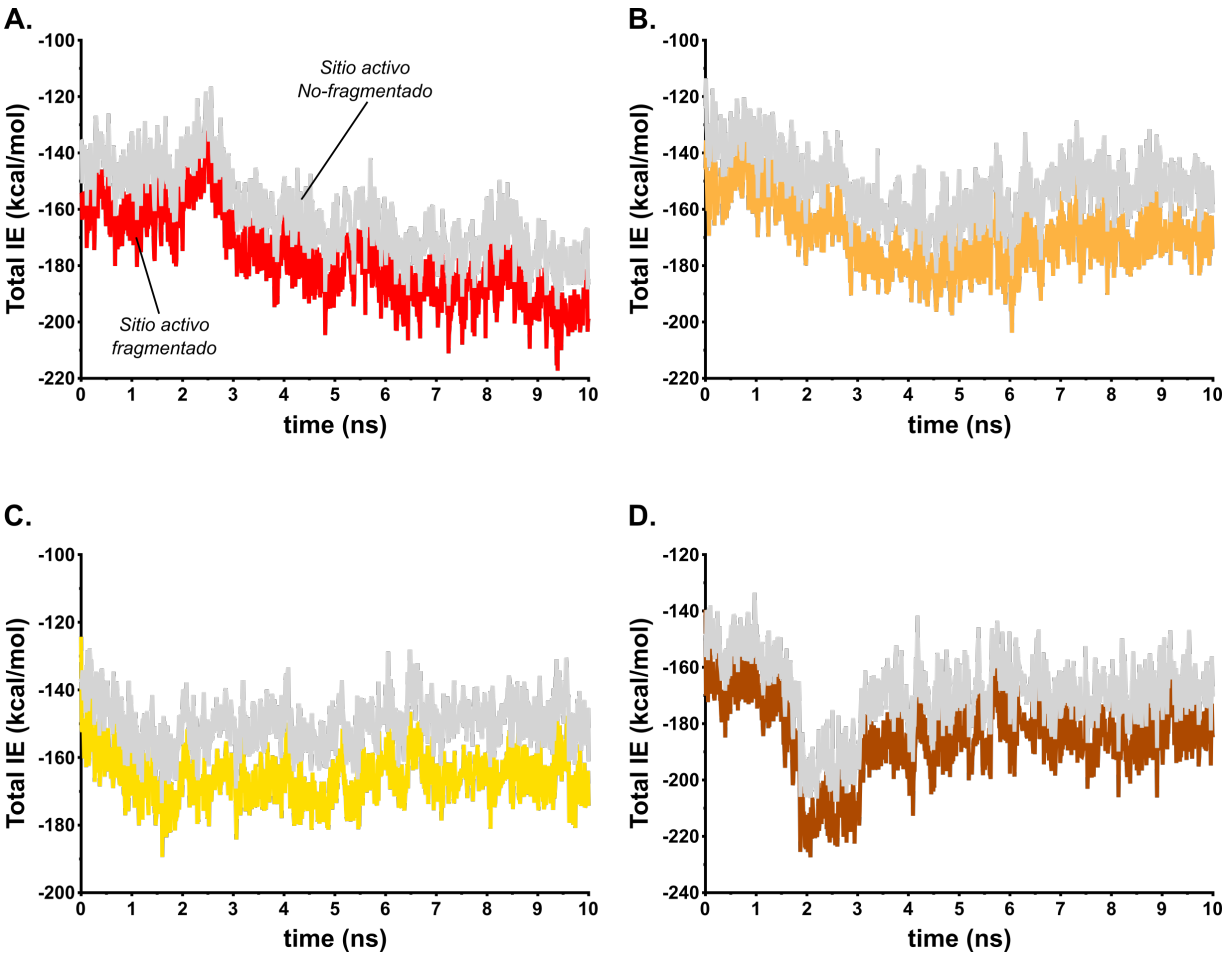


Anexo VII. Densidad poblacional calculada usando diferentes combinaciones de parámetros. Estas fueron evaluadas para las diferentes configuraciones de estados de protonación.

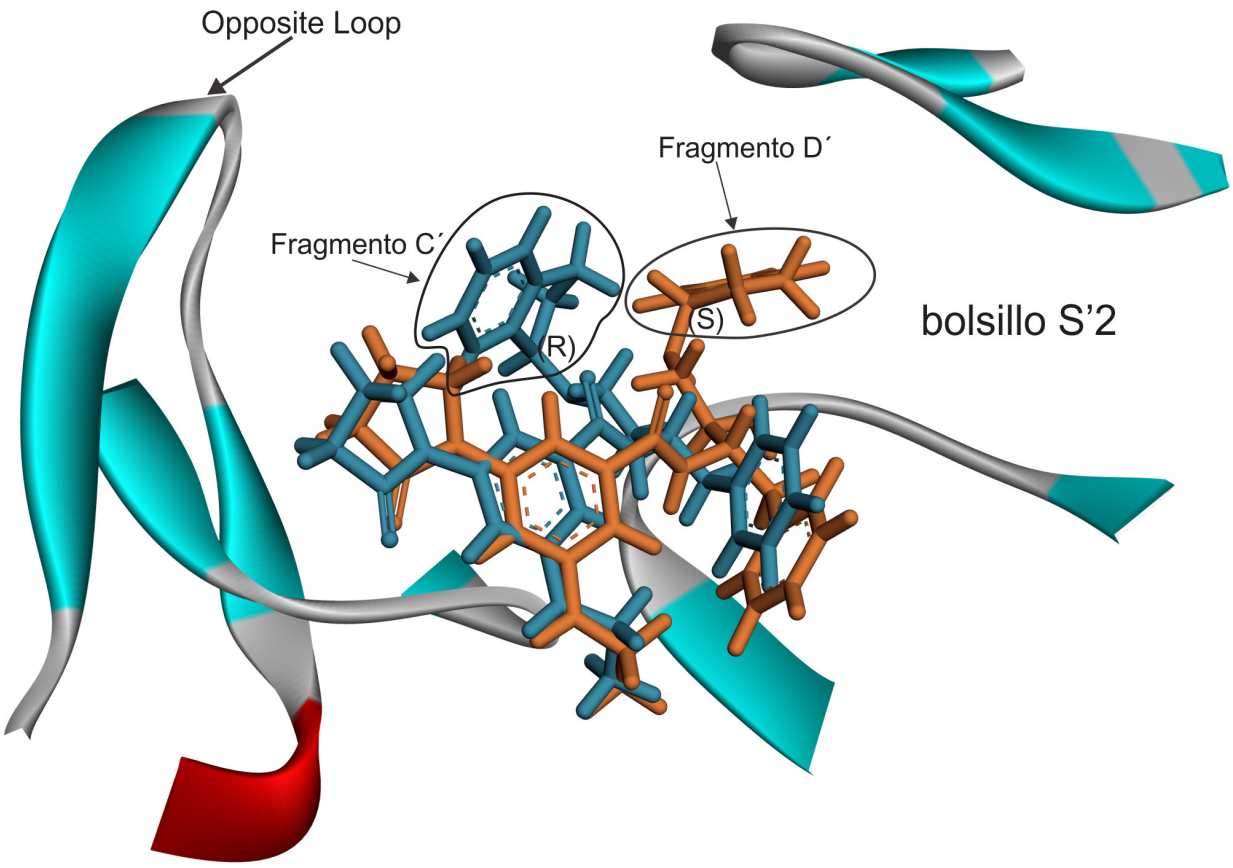
9.3. Anexos Capítulo 6

PDB	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9
2xfk	12.729	12.761	11.646	3.483	2.651	2.652	3.093	2.767	2.957
2xfj	12.500	12.815	11.704	3.259	2.526	2.647	3.143	2.800	2.906
2xfi	12.721	12.789	11.685	3.414	2.585	2.712	3.095	2.781	2.983
2wf4	12.459	12.802	11.754	3.074	2.465	2.821	3.089	2.952	2.933
2wf3	12.410	12.928	11.799	3.301	2.643	2.718	3.255	2.968	3.000
2wf2	12.419	12.949	11.817	3.273	2.532	2.692	3.038	2.782	2.990
2wf1	12.314	12.767	11.689	3.200	2.592	2.678	3.015	2.965	3.082
2wf0	12.424	12.837	11.672	3.787	2.693	2.686	3.034	2.847	2.905
2wez	12.372	12.812	11.672	3.252	2.552	2.643	3.161	2.853	2.918
2vnn	12.389	12.795	11.666	3.205	2.495	2.615	3.023	2.931	3.045
2vnm	12.234	12.855	11.663	3.222	2.536	2.605	2.992	2.838	2.956
2vj9	12.640	12.767	11.844	3.166	2.690	2.606	3.212	2.891	2.855
2vj7	12.680	12.877	11.729	3.299	2.591	2.576	3.037	3.000	2.850
2vj6	12.508	12.768	11.669	3.213	2.598	2.714	3.078	2.831	2.788
2viz	12.582	12.777	11.637	3.223	2.684	2.684	3.109	2.853	2.866
2viy	12.424	12.749	11.608	3.415	2.654	2.662	3.087	2.861	3.077
2vij	12.432	12.787	11.819	3.243	2.663	2.673	3.000	2.854	2.915
2vie	12.532	12.860	11.907	3.158	2.605	2.660	3.441	2.919	2.841
Mean	***12.487***	***12.816***	***11.721***	***3.288***	***2.598***	***2.669***	***3.106***	***2.872***	***2.937***
SD	***0.134***	***0.056***	***0.081***	***0.155***	***0.067***	***0.054***	***0.107***	***0.068***	***0.080***

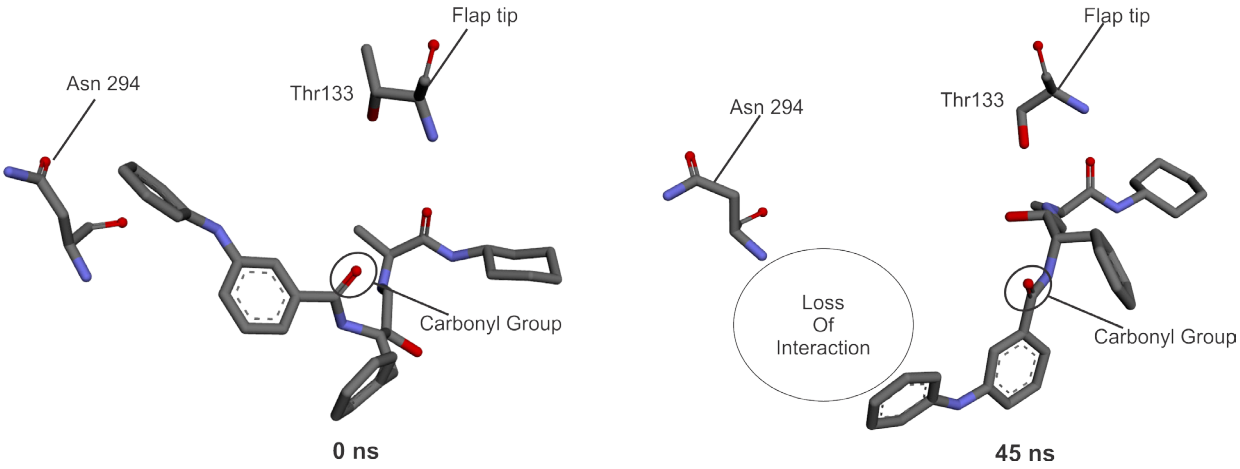
Anexo VIII. Medias experimentales calculadas para las distancias proteína-proteína (d1, d2 y d3) y proteína-ligando (d4, d5, d6, d7, d8 y d9) usando 18 complejos cristalinos BACE1-HEA reportados en el Protein Data Bank. Todas las distancias están dadas en Angstroms (Å).



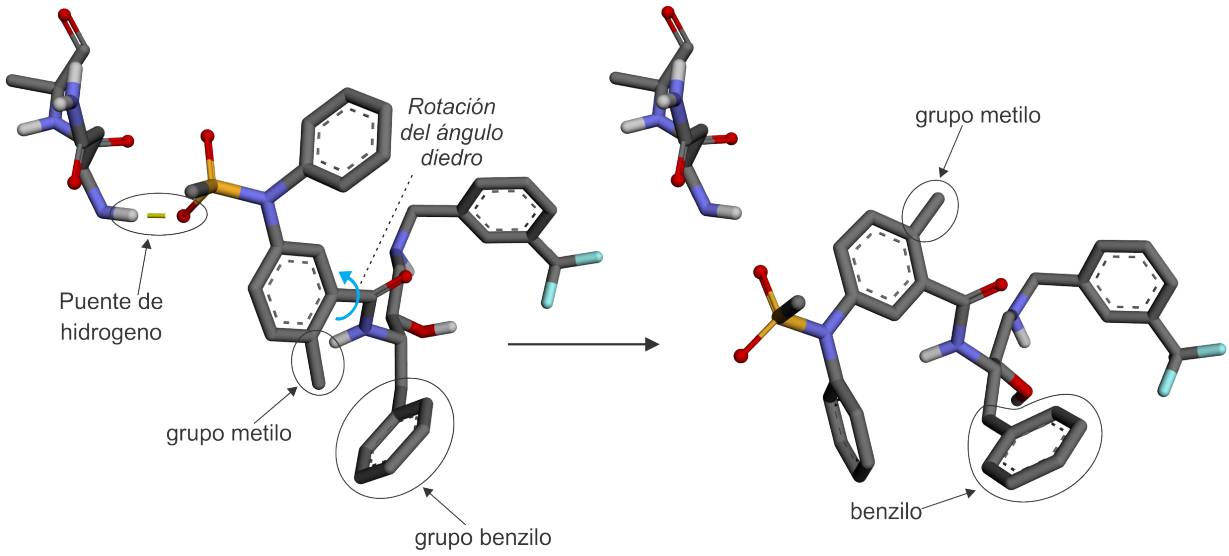
Anexo IX. Comparación en las tendencias para la energía de interacción total del complejo BACE1-HEA para los primeros 10ns de trayectoria, calculados considerando el sitio active de la proteína fragmentado (valores coloreados, ε_T) y no-fragmentado (valores en gris). Los sistemas incluyen las HEAs **A)** H1, **B)** H2, **C)** M1 y **D)** L1. Todas las gráficas muestran claramente seguir las mismas tendencias, independiente del método empleado para calcular la energía de interacción proteína-ligando, indicando que la metodología usada en el presente trabajo es válida para describir variaciones generales en las interacciones proteína-ligando, al tiempo que permite el análisis de las energías de interacción individuales, es decir, las ReLIE.



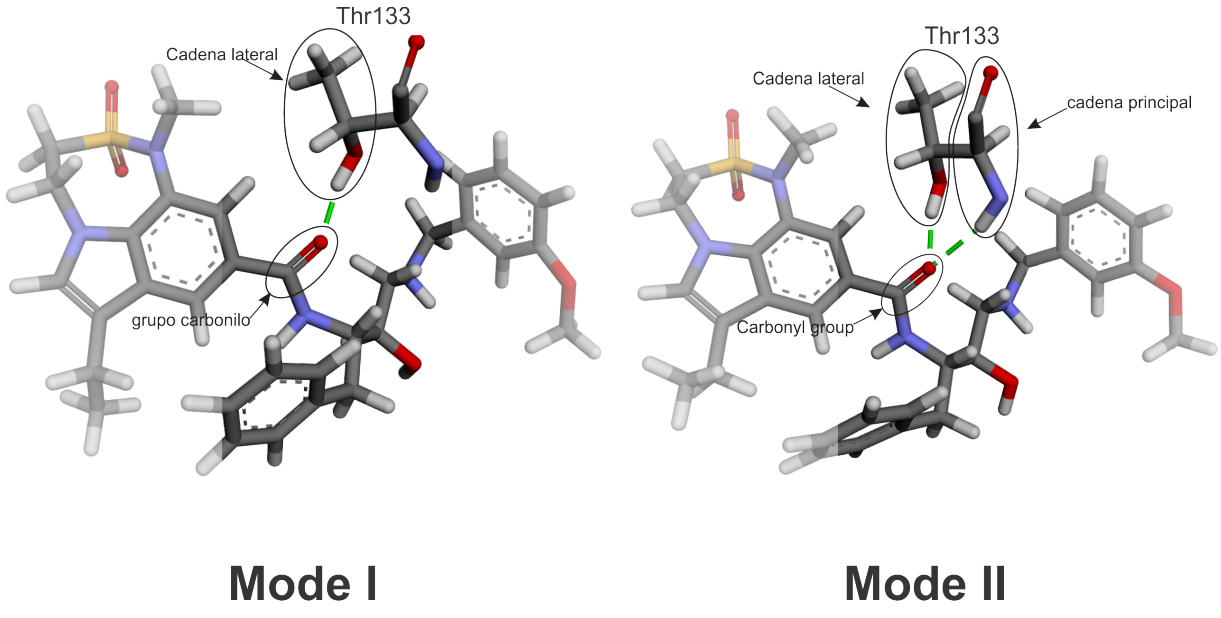
Anexo X. Influencia de la estereoisomería en la orientación de la cola de las HEAs en el sitio active de BACE1. La molécula M2 (IC_{50}=160nM, coloreada naranja contiene el fragmento **C'** el cual se orienta de manera favorable en el bolsillo hidrofóbico S'2, mientras que L4 (IC_{50}=34670nM, coloreada azul) orienta su cola en dirección del Opposite-loop, impidiendo estéricamente el cierre del flap.



Anexo XI. Consecuencias de la Perdida de la interacción de anclaje con Asn294. El ligando L3 tiene en su cabeza el fragmento **E**, el cual no es apto para la interacción con Asn294, conllevando a movimientos en el inhibidor que resultan no favorecen el cierre del flap. Esta observación explica la baja actividad de L3 sobre BACE1(IC_{50}=6300nM) comparado con H1(IC_{50}=2nM).



Anexo XII. Perdida de interacción entre la cabeza de la HEA L2 y Asn294 debido a la sustitución de un grupo 6-metil en el grupo fenilo. Esta sustitución crea un "clash" estérico que obliga a la reorientación de la cabeza del inhibidor y Perdida de la interacción en cuestión.



Anexo XIII. Modos de interacción de la punta del flap (Thr133) con el grupo carbonilo de las HEAs. El Modo I involucre solo la cadena lateral de Thr133, mientras que el Modo II incluye interacciones adicionales con la cadena principal del residuo.

Anexo XIV. Publicación Científica #1

Journal of Molecular Graphics and Modelling 66 (2016) 155–167

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular Graphics and Modelling

journal homepage: www.elsevier.com/locate/JMGM

Determination of the protonation state for the catalytic dyad in β-secretase when bound to hydroxyethylamine transition state analogue inhibitors: A molecular dynamics simulation study

Carlos Gueto-Tettay*, Roberto Pestana-Nobles, Juan Carlos Drosos-Ramirez*

Grupo de Química Bioorgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Cartagena, Colombia

ARTICLE INFO

Article history:
Received 24 February 2016
Received in revised form 9 April 2016
Accepted 12 April 2016
Available online 13 April 2016

Keywords:
Alzheimer's disease (AD)
Protonation state
Aspartatic dyad
BACE1
Hydroxyethylamine (HEA)
Gromacs

ABSTRACT

BACE1 is an aspartyl protease of pharmacological interest for its direct participation in Alzheimer's disease (AD) through β-amyloid peptide production. Two aspartic acid residues are present in the BACE1 catalytic region which can adopt multiple protonation states depending on the chemical nature of its inhibitors, i.e., monoprotonated, diprotonated and di-deprotonated states. In the present study a series of protein-ligand molecular dynamics (MD) simulations was carried out to identify the most feasible protonation state adopted by the catalytic dyad in the presence of hydroxyethylamine transition state analogue inhibitors. The MD trajectories revealed that the di-deprotonated state is most prefered in the presence of hydroxyethilamine (HEA) family inhibitors. This appears as a result after evaluating, for all 9 protonation state configurations during the simulation time, the deviations of a set of distances and dihedral angles measured on the ligand, protein and protein-ligand complex with reference to an X-ray experimental BACE1/HEA crystallographic structure. These results will help to clarify the phenomena related to the HEAs inhibitory pathway, and improve HEAs databases' virtual screening and ligand design processes targeting β-secretase protein.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The presence of extracellular amyloid plaques is a distinctive histopathological footprint related to brain death in Alzheimer's disease (AD) [1–4], which is the most common cause of dementia in persons over 60 years-old and affects those areas responsible for memory, thought and language functionality [5]. These extracellular deposits are mainly composed of 40–42 length peptides called Aβ-peptides, which come from the proteolytic cleavage of Amyloid Precursor Protein (APP), during its transportation to cell membrane [6,7], by a tandem of proteases identified as β- and γ-secretase [7–11], suggesting that inhibition or modulation of either or both of the proteases in the brain should decrease Aβ levels. It is a well-known fact that the first enzyme, called BACE1 or Memapsin 2, is involved in the rate-limiting step in the generation of Aβ peptides, making it the major target for drugs against AD [4,12]. In the quest to find better BACE1 inhibitors a variety of peptidic and non-peptidic transition state molecules inside BACE1 ectodomain have been co-crystallized (ca 180), revealing that the catalytic dyad (Asp93 and Asp289) is located in a cleft between the C- and N-terminal lobes and is capped with flexible hairpin loop, embedded in a hydrogen bond network [13]. At resolutions commonly employed, X-ray crystallographic techniques provide critical information about the structure of proteins, but the protonation state or precise position of the protons on the ionizable groups cannot be determined [14]. The protonation state of the catalytic dyad on aspartyl proteases has been a subject of scientific interest for decades because of the significance for the reaction mechanism [13,15], inhibition pathway [16], virtual screening of compound libraries [17,18] and drug design aided by computer [4,19]. Several computational techniques like molecular dynamics simulations [20–23], docking [24,25], endodesmic reactions [14,26], virtual screening [17,18] and QM/MM calculations [27–29] suggest that pKa values for titratable residues (Asp93 and Asp289) in the BACE1 active site depend on chemical characteristics of the bound ligand, so there is a possibility for one or more protonation states [30]; and this feature is common to other aspartyl protease families, such as HIV, endothiapepsin and renin [4,31]. Although there are numerous studies about the subject there is not consensus about the preferred protonation states for catalytic aspartic acids

* Corresponding authors at: Zaragocilla, Campus San Pablo, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Colombia.
E-mail addresses: jdrososr@unicartagena.edu.co, cguetot@unicartagena.edu.co (J.C. Drosos-Ramirez).

http://dx.doi.org/10.1016/j.jmgm.2016.04.003
1093-3263/© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

in the presence of inhibitors, i.e., neutral (diprotonated), anionic (monoprotonated) or dianionic (di-deprotonated).

Hydroxyethylamine-derived compounds are notable within the family of BACE1 transition state analogue inhibitors due to their great inhibitory power [32–36], blood brain barrier penetration capability and the decrease in the Aβ-peptide level of APP transgenic mice by oral administration [37–39]. CM8 compound, an outstanding member of this particular family of BACE1 inhibitors is co-crystallized (PDB ID: 2VNM) [32] with β-secretase and it is characterized mainly for its ability to create a network of favorable electrostatic, hydrophobic and hydrogen bond (classics and non-classics) interactions on the BACE1 active site. The hydrogen bonds involve the backbone and/or sidechain in BACE1 with polar zones on CM8 (Supplementary information), i.e., Gly95 (d(N3.O) = 2.99 Å), Thr133 (d(O8.N) = 3.22 Å) and Gln134 (O8.N = 3.03 Å) in the P'1 area, Asn294 (d(O2.N) = 2.96 Å) and Ser386 (d(O1-OG) = 3.12 Å) in the P2 region, while at the P3 region with Gly291 (d(N2.O) = 2.84 Å) and Thr293(d(O2.N) = 3.32 Å, and Ser386 $d(N_1 \cdot OG_1)$ = 3.24 Å with the Gly291 and Thr293 residues of the backbone and the Ser386 sidechain, respectively. A benzyl group, at P1 region, is responsible for π-π T-shaped interactions with the Phe169 and Tyr132 residues and π-alkyl interactions with Leu91 and Ile179 residues. Ionic contacts are found between the aspartic dyad and the hydroxyethylamine isostere at the P'1 region which contribute over 90% of the total favorable BACE1/CM8 interactions [26]. The inhibitor's tail at the P2 zone is characterized by both polar and apolar interactions, i.e., formation of classic, pi-donor and halogen-hydrogen bonds with Gly95, Tyr259 and Arg189 residues, respectively, whereas a π-π T-shaped interaction is present between the phenylic moiety and Tyr132. Previously we reported the di-deprotonated state for the catalytic dyad as the prefered state in the presence of HEA inhibitors through the relative stability comparison at MOZYME PM6-DH+ and DFT (M062X) calculation levels [26]. Domínguez et al. [30] reported, using the Surface Plasmon Resonance Technique, the preference for dianionic and anionic states on the Asp dyad in the presence of the HEA inhibitors at high and low pH values, respectively [30]. On the other hand, Barman and Prabhakar [25] concluded that several protonation states, of the aspartic dyad, are favored with other families of BACE1 inhibitors bearing a charged amine moiety. This result was reached comparing RMSD and docking binding energy values for 8 different protonation states, such as aminoethyl (AspUP, Fig. 1), tertiary carbinamine (Asp289i), cyclic amine (AspUP), reduced amide (Asp93o), α-amino keto (AspUP) and aminobenzylpiperidine (Asp289i) based inhibitors. Nevertheless, these studies have restrictions such as the system size description (amount of atoms to consider for simulation), protein rigidity and protein-ligand complex stability over time. In the present study this issue was addressed through MD simulations for all 9 possible protonation states (AspUP, D93i, D93o, D289i, D289o, D93iD289i, D93oD289o, D93iD289o and D93oD289i, Fig. 1) for a representative HEA co-crystallized with β-secretase (PDB ID *2VNM2VNM*).

The comparison of the trajectories for all 9 configurations confirmed that for the aspartic dyad, the di-deprotonated state is the most suitable on BACE1/HEA complexes through the absolute error measure for a series of static and dynamic parameters sensitive to Asp dyad protonation. Further, it also demonstrated that just the ligand RMSD value as parameter is not a sufficient criterion to discern among all 9 protonation state configurations given that this measure underestimates possible conformational changes in the active site and the protein in general in those modeled systems where the enzyme is rigid and/or is restricted to a few atoms in the catalytic site. Thus, the measure of distances and dihedral angles over time for pair of atoms inside the protein active site, ligand and/or protein-ligand complex are more appropriate parameters. Furthermore, protein-ligand docking simulations, between non-crystallographic HEA based inhibitors and BACE1 using AspUP state, showed similar binding modes compared to their corresponding experimental templates. Additional supporting evidence was obtained by MOZYME/PM7 system optimizations, which confirmed the BACE1-HEA complexes stability, as no proton transfer among the molecular species was observed. The results in this study will help to better understanding of the influence of different aspartic dyad chemical environments and their stability over time for BACE1/HEA complexes, leading to the inhibition pathway study and virtual screening process against β-secretase

2. Methodology

2.1. Molecular modeling

The co-crystallized X-ray structure of BACE1 with CM8, a representative HEA transition state analogue inhibitor, specifically those reported by Charrier et al. [32,33], was taken from the Protein Data Bank (PDB) with the PDB ID 2VNM [32]. The CM8 inhibitor was modeled as charged amine [25,26,32] and of the two available, only the ligand present in the active site was considered in the protein-ligand complex crystallographic file. The missing Insert A (Gly217-Ala229) was incorporated using another X-ray structure (PDB ID: 1FKN). The MODELLER software [40] was used to insert and optimize Insert A after aligning the isoform A (Uniprot ID: P56817-1) with 2VNM and the segment of interest from 1FKN. The position of the CM8 inhibitor was fixed inside BACE1 active site. UCSF Chimera software [41] was used as graphical interface. The ionizable side chains for Lys, Arg, Glu and Asp (other than catalytic Asp's, see below) were modeled as charged, whereas all His were kept neutral. For Asp93 and Asp289 all 9 configurations were considered, i.e., 4 neutrals (diprotonated), 4 anionics (monoprotonated) and 1 dianionic (di-deprotonated) according to Fig. 1.

2.2. Molecular dynamics simulations

All molecular dynamics simulations were performed using the GROMACS 5.1 program [42–45] utilizing the all-atom AMBER03 force field [46,47]. CM8 inhibitor topology files were built by a tandem of Gaussian09 [48], Antechamber [49–51] and Acpype [52] software calculations by the RESP method [46,47,52]. In all MD simulations, the missing hydrogens were added and the protein was immersed in a cubic box of size 92 Å, which ensured a distance of 12 Å between the boundary of the water box and any solute atom. The overall charge (−10) was neutralized by adding 10 sodium ions, and 154 mM salt concentration was achieved by adding 63 sodium and chloride ions. The box contained over 20,000 TIP3 P water molecules [53] and a total of about 76 000 atoms. The system (protein, ligand, waters and ions) simulations were carried out in a multistep procedure. In the first step, steric clashes were fixed using energy minimization with a steepest descent method for 10,000 steps. The convergence criterion was adjusted so that the force was below 500 kJ/mol/nm. In the second step, water and ion positions were equilibrated around the enzyme-ligand complex by keeping the heavy atoms coordinates frozen, allowing the entry of water molecules inside the protein and adjust their positions around it. This was made by two 500 ps consecutive restrained MD simulations with NVT and NPT ensembles, respectively. In the next step, all the restraints were removed and the structure was subsequently used as starting point for the 10 ns BACE1/HEA all-atom MD simulations in aqueous solution. The LINCS [54] and SETTLE [55] algorithms were employed to apply peptide and water molecule bond distance constraints, respectively, whereas long-range interactions were calculated using the particle-mesh Ewald (PME) method [56,57]. The periodic boundary condition (PBC) was

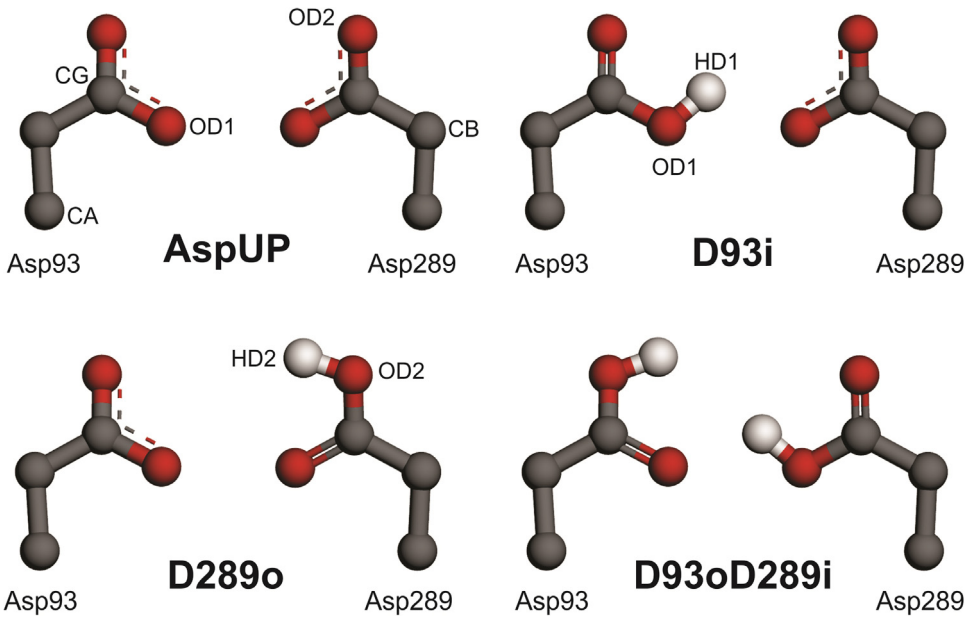


Fig. 1. Different protonation state configurations for the catalytic Asp dyad, Asp93 and Asp289 residues.

applied, and the equation of motion was integrated at time of 2 fs [56,57]. GROMACS and VMD [58] software package tools have been utilized to analyze the different MD trajectories and Discovery Studio Visualizer (DSV) [59] was also extensively used for visualizations and the preparation of structural diagrams presented in this study.

2.3. Molecular docking and semiempirical quantum mechanic (SQM) optimization

Molecular docking simulations followed by a SQM optimization were used to validate the BACE1 Aspartic dyad state obtained from the MD analysis; The docking of 3 non-crystallographic HEA containing group inhibitors on the β-secretase using AspUP state for the catalytic aspartic dyad were carried out, while the SQM active site optimization procedure was used to show the stability of the resulting BACE1/HEA complexes. The Semiempirical Quantum Mechanic Methods (SQM) can handle large systems and take charge transfer and polarization effects into account during calculation [61]. The HEA containing group inhibitor structures of the 2VIE [62], 2VNM [32] and 2WF1 [63] were used as template for the V207 [62], V317[32] and N323 [63] drawing process, respectively (Structures available as Supplementary Information). Docking simulations were performed using Autodock 4.2 and Autodock Tools [64] as graphical interface. A box size of $50 \times 78 \times 58$ Å^3 was defined around the active site of BACE1 in such a way that such that it included all the residues that are critical for the interaction with the HEA's inhibitors. For the docking calculation, two hundred runs of Lamarckian Genetic Algorithm (LGA) with 25,000,000 evaluations and 270,000 generations were performed. The best docked pose (according to the binding energy score [65]) was used as the initial structure for a two-step protein-ligand SQM optimization protocol, at PM7 semiempirical level [66] using MOPAC2016 [67]. The PM7 model includes dispersion and hydrogen-bond correction terms [66]. Localized Molecular Orbital Method (MOZYME) was also employed for the treatment of these large biomolecular complexes [68], while the COSMO method was used as solvation model to simulate the effect of the water surrounding the macromolecular system. In the first step of the protocol, just the proton position was considered to improve the non-bonded interactions in the protein-ligand complex [69]. In final step, the BACE1 active site was optimized so the coordinates of the residues within 7 Å of the HEA inhibitor were flagged active while the rest of the protein was frozen.

3. Results and discussion

A series of protein-ligand molecular dynamics simulations were carried out between the β-secretase enzyme and CM8, a representative HEA inhibitor. For the MD trajectory analysis of 9 aspartic dyad configurations, a set of static and dynamic parameters were measured on ligand, protein and protein-ligand molecular systems, such as distances and dihedral angles, that allowed the most probable protonation state of the two catalytic aspartyl side chains on the BACE1/HEA complex to be identified. The static parameters, which were based on the most representative system structure of the MD simulation, measured the dihedral angles and rmsd of ligand (Fig. 2), local conformational changes on protein (Fig. 3), the Asp93 and Asp289 residue side chains and CM8 inhibitor orientations (Fig. 4), and the deviation of the intermolecular atom-pair of distances respect to their experimental values (Fig. 5). In addition, other different kind of parameters that were measured over the MD trajectory, dynamic parameters, described the catalytic aspartic dyad sidechain rotation (Fig. 6) and the absolute error of a set of intermolecular atom-pair of distances, sensitives to the Asp dyad protonation state as well (Fig. 7).

Dihedral angles were calculated for the ligand as well as the root-mean-square-deviation (RMSD) between the inhibitor pose and its experimental reference pose (Fig. 2). The data showed that 7 of 9 configurations are good reproductions of the crystal pose as the rmsd values were below 2 Å [60]. Further, the lowest rmsd value was 0.68 Å corresponding to the inhibitor in the AspUP state. In contrast, the D93i and D93iD289i states exhibited the highest rmsd values of 2.30 Å and 2.83 Å, respectively. Significant structural differences from the rest of the group were found in both configurations at P1, P'1 and P'2 zones given by the dihedral angles $D(C_1{\cdot}C_2.N_4{\cdot}C_{10})$, $D(C_{21}{\cdot}C_{13}.C_{14}{\cdot}C_{15})$ and $D(C_{22}{\cdot}N_3.C_{23}{\cdot}C_{24})$ (Fig. 2). The 5 remaining configurations had rmsd values below 1 Å, with slight differences between D93o (0.91 Å), D289i (0.96 Å), D289o (0.95 Å) and D93iD289o (0.97 Å) states, evidencing the low sen-

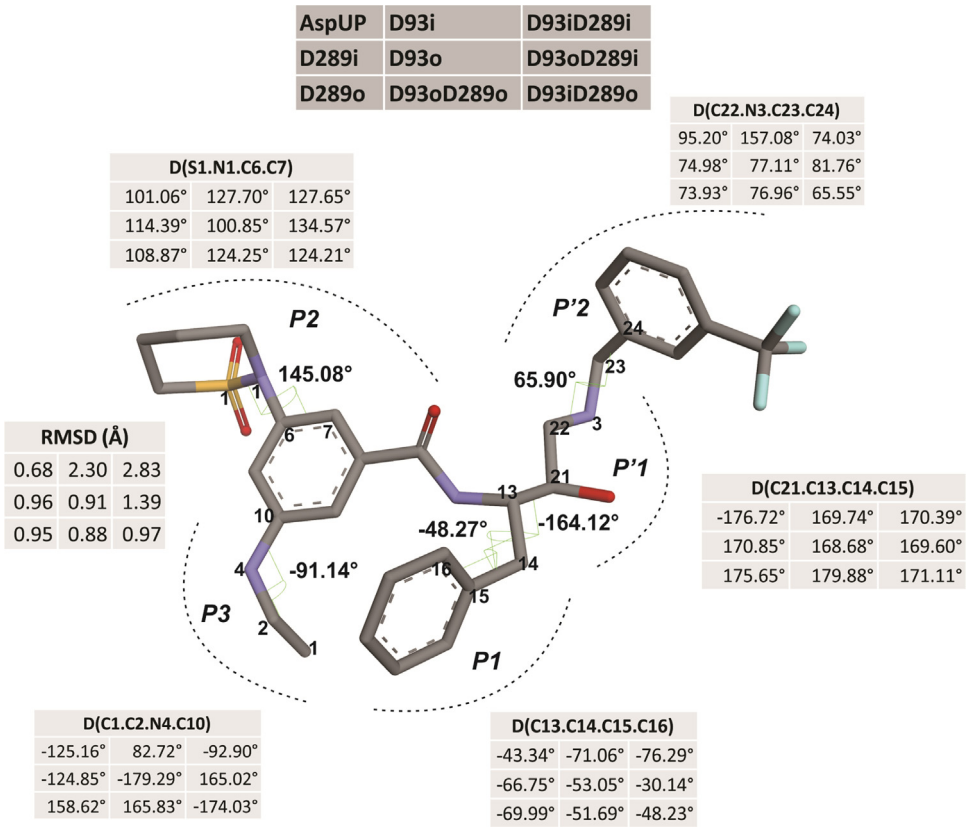


Fig. 2. Measurement of the root mean square deviation (Å) and dihedral angles (degrees) for the CM8 ligand based on the most representative structure. The experimental values for the torsional angles are shown inside figure for reference.

sitivity of this particular parameter and extending this fact to the rmsd values over time (Supplementary information).

Local analysis of protein structural changes was carried out by the pairwise Cα rmsd from the experimental structure for 84 residues in the BACE1 active site and its vicinity. Fig. 3 shows that aspartyl dyad regions had low pairwise rmsd, contrary to Insert A and Insert F flexible regions where values were beyond 4 Å. Further, with the exception of the AspUP, D93o and D289i states, Cα rmsd values at the S2 region showed significant conformational changes for all configurations, especially for the 4 neutral ones. The S3, 10s-loop, and insert F regions exhibited deviations for the neutral and monoprotonated forms, whereas the highest pairwise rmsd at the Flap zone were found for the D93iD289i neutral configuration. Besides this measure based on the most representative structure, two dynamics parameters were calculated on the catalytic aspartic dyad based on the dihedral angle $\varphi = D(CA{\cdot}CB.CG{\cdot}OD_2)$ and inner (OD1) and outer (OD2) oxygen intramolecular atom pair distances. In the first case, for both catalytic Asp residues the δ parameter was measured. It was defined as $\delta = |\Delta\varphi| = |\varphi - \varphi_{ref}|$, that is to say the absolute value of the difference between dihedral angle φ at a particular moment in time and its reference value from the x-ray crystallographic structure. The δ parameter values over time evaluated specifically the steric and electronic environment of both catalytic Asp residues as the phase shift from the reference dihedral angle φ over time was caused by the CM8 inhibitor and the BACE1 active site influence. Fig. 6 shows that the AspUP, D93i and D93oD289o states had the lowest δ values over time, namely, these Asp dyad configurations exhibited the smallest dihedral angle φ deviation from the experimental one over MD trajectories. Moreover, some configurations displayed δ values above 140° for either one or both Asp93 or Asp289 residues, such as the D93o, D93iD289i and D93oD289i states. Regarding the interatomic distances in the Asp dyad, the absolute errors from the crystallographic structure (PDB ID 2VNM) were calculated for both inner and outer oxygen atom distances, $\Delta d(OD_1{\cdot}OD_1)$ and $\Delta d(OD_2{\cdot}OD_2)$, respectively (Fig. 7). For this parameter, negative and positive values represent shortening and lengthening of the intramolecular pair of atoms distances from the experimental ones, respectively. Most of the configurations in the study showed shortened of $\Delta d(OD_2{\cdot}OD_2)$, whereas other like the D93iD289i, D93iD289o and D93oD289i neutral states had significant lengthening of the $\Delta d(OD_1{\cdot}OD_1)$ deviation after the first and/or fifth nanosecond of MD simulation.

The measurement of the parameters individually on the protein and inhibitor give us very little information about the right location of the CM8 inhibitor inside the BACE1 active site; therefore, new static and dynamic parameters that consider both molecular species were needed. Fig. 4 displays the catalytic Asp93 and Asp289 residue side chains and the CM8 inhibitor orientations for the most representative structures. Some configurations with the same protonation state were less stable over time, such as D93o and D93iD289i, D93iD289o and D93oD289i, which became the D93o and D93oD289o states, respectively. Furthermore, all neutral configurations (D93iD289i, D93oD289o, D93iD289o and D93oD289i) adopted outliers for $D(CA{\cdot}CG.OD_1{\cdot}HD_1)$ and/or $D(CA{\cdot}CG.OD_2{\cdot}HD_2)$ dihedral angles for one or both aspartyl residues due to limited space in the active site. On the other hand, the absolute error of the intermolecular BACE1-CM8 pair of atoms distances was also measured for Asp93, Gly95, Thr133, Gln134, Asp289, Gly291, Thr293, Asn294 and Ser386 residues which interact with different zones in the inhibitor (Fig. 5). Some distance deviations displayed monotonous values for all 9 evaluated protonation state configurations, includ-

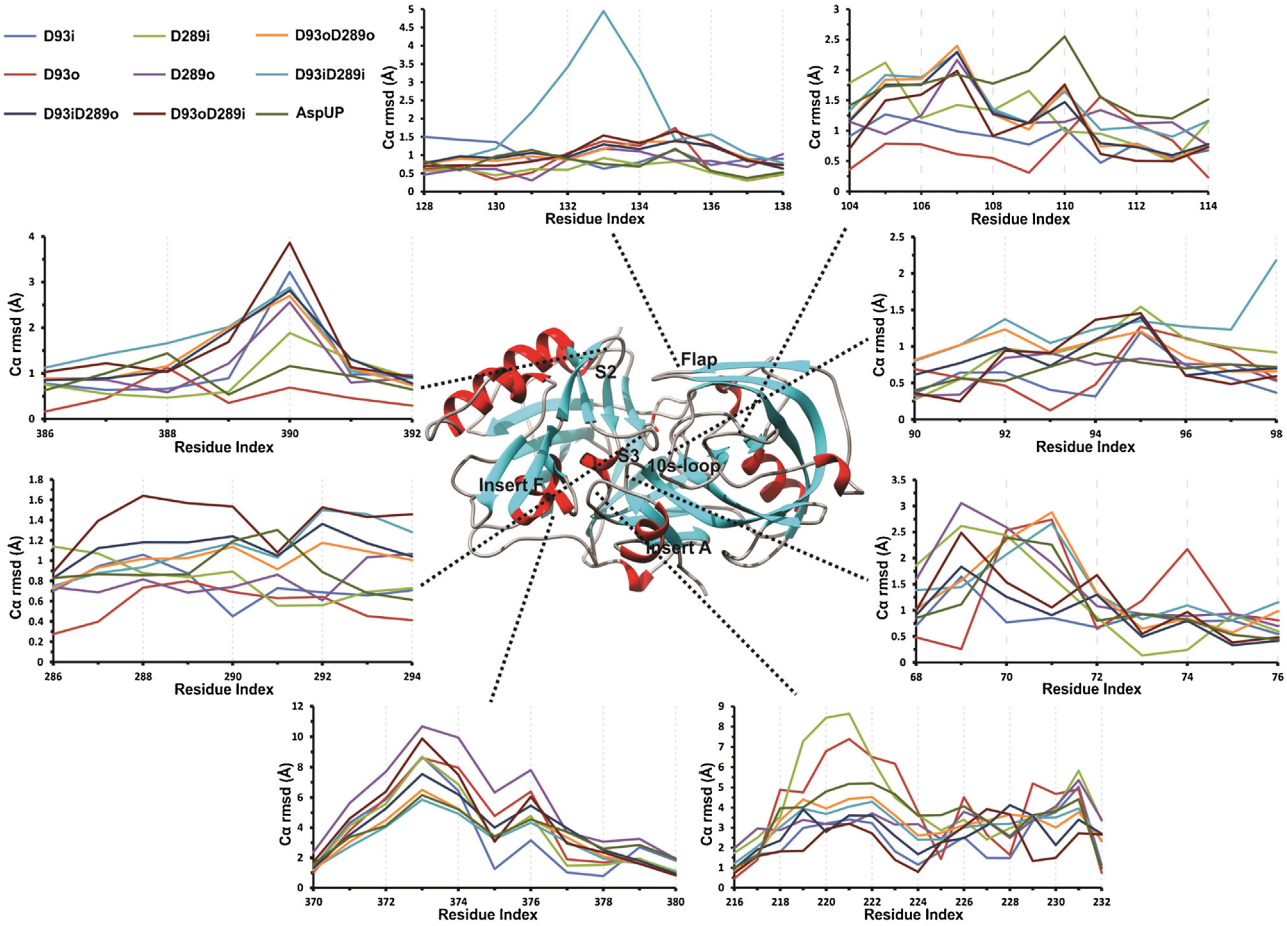


Fig. 3. Pairwise Cα rmsd measured for 84 residues in the BACE1 active site and its vicinity.

ing Δd(O_Gly291.N2), Δd(N_Thr293.O2), Δd(OG_Thr293.N1) and Δd(N_Asn294.O2), so they were not suitable for distinguishing between the 9 different Asp dyad states. In contrast, deviation distance measurements involving Asp93, Gly95 and Asp289 residues were found to be useful to the research purpose as the values change according to the aspartic dyad chemical environment, so they were selected to be measured over time (Fig. 7).

3.1. Monoprotonated configurations (anionic states)

3.1.1. D93i state

The D93i state is the monoprotonated state of the Asp dyad where the Asp93 residue is protonated on the inner oxygen (OD1). The ligand showed an rmsd value of 2.30 Å compared to the reference experimental pose, the second highest rmsd value among the nine states evaluated, just below the D93iD289i state (Fig. 2). The major structural changes were found at the P'2 and P3 zones, according to the torsion angles $D(C_{22}{\cdot}N_3.C_{23}{\cdot}C_{24})$ and $D(C_1{\cdot}C_2.N_4{\cdot}C_{10})$ that displayed a shift angle of 91.18° and 175.86°, respectively. Moreover, these changes affected the interactions with the Ser96, Pro131, Tyr132, Arg189 and Ile187 residues during the MD simulation. The β-secretase showed deviation at the S2, Insert A and Insert F zones, according to the pairwise Cα rmsd values for 84 residues at the BACE1 active site and its vicinity (Fig. 3). A hydrogen bond was found in the catalytic dyad between HD1 (Asp93) and OD1 (Asp289), which led to the CM8 inhibitor displacement to the S2 zone (Fig. 4) and a raise in the $\Delta d(OD_1_D_{93}{\cdot}O_4) = 0.75$ Å, $\Delta d(O_G_{95}{\cdot}N_3) = 0.84$ Å, $\Delta d(N_T_{133}{\cdot}O_3) = 0.83$ Å, $\Delta d(OD_2_D_{289}{\cdot}N_3) = 1.13$ Å and $\Delta d(OG_S_{386}{\cdot}O_1) = 0.84$ Å distance deviation values (Fig. 5). The analysis of the angle φ variation for the aspartic residues over time showed that δ values were below 50°, i.e., the Asp289 residue displayed values between 20° and 50°, while δ values below 30° were found for the other catalytic aspartyl residue (Fig. 6). Shortenings were found in the absolute protein–protein and protein-ligand pairs of atom distances deviation values involving the OD1 and OD2 oxygen atoms at the catalytic dyad side chains, which explained the major lengthenings in $\Delta d(OD_2_D_{93}{\cdot}O_4)$ and $\Delta d(O_G_{95}{\cdot}N_3)$ values after the 8 ns of MD trajectory (Fig. 7)

3.1.2. D93o state

The D93o anionic state displays the outer oxygen atom (OD2) of the Asp93 residue protonated. With regard to the static parameters, the ligand had a rmsd value of 0.91 Å, being the lowest rmsd value of all monoprotonated states and third globally behind the AspUP and D93oD289o configurations (Fig. 2). In addition, the P3 zone in the ligand displayed the most marked deviation, showing a net phase difference of 86.15° for the torsion angle $D(C_1{\cdot}C_2.N_4{\cdot}C_{10})$, affecting the interactions with several regions at the active site such as the Gly72 residue at the S3 zone, where the torsion shift leads to the loss of this particular interaction. These major conformational changes are displayed in Fig. 3, where high Cα rmsd values for S3, 10s-loop and Insert A regions were found as well as significant deviations in BACE1-CM8 pair of atoms distances involving Asp93, Gly95, Thr133, Gln134 and Asp289, namely., $\Delta d(OD_1_D_{93}{\cdot}O_4) = -0.89$ Å, $\Delta d(OD_2_D_{93}{\cdot}O_4) = 1.69$ Å, $\Delta d(O_G_{95}{\cdot}N_3) = 0.63$ Å, $\Delta d(N_T_{133}{\cdot}O_3) = 1.00$ Å, $\Delta d(N_Q_{134}{\cdot}O_3) = 1.26$ Å and

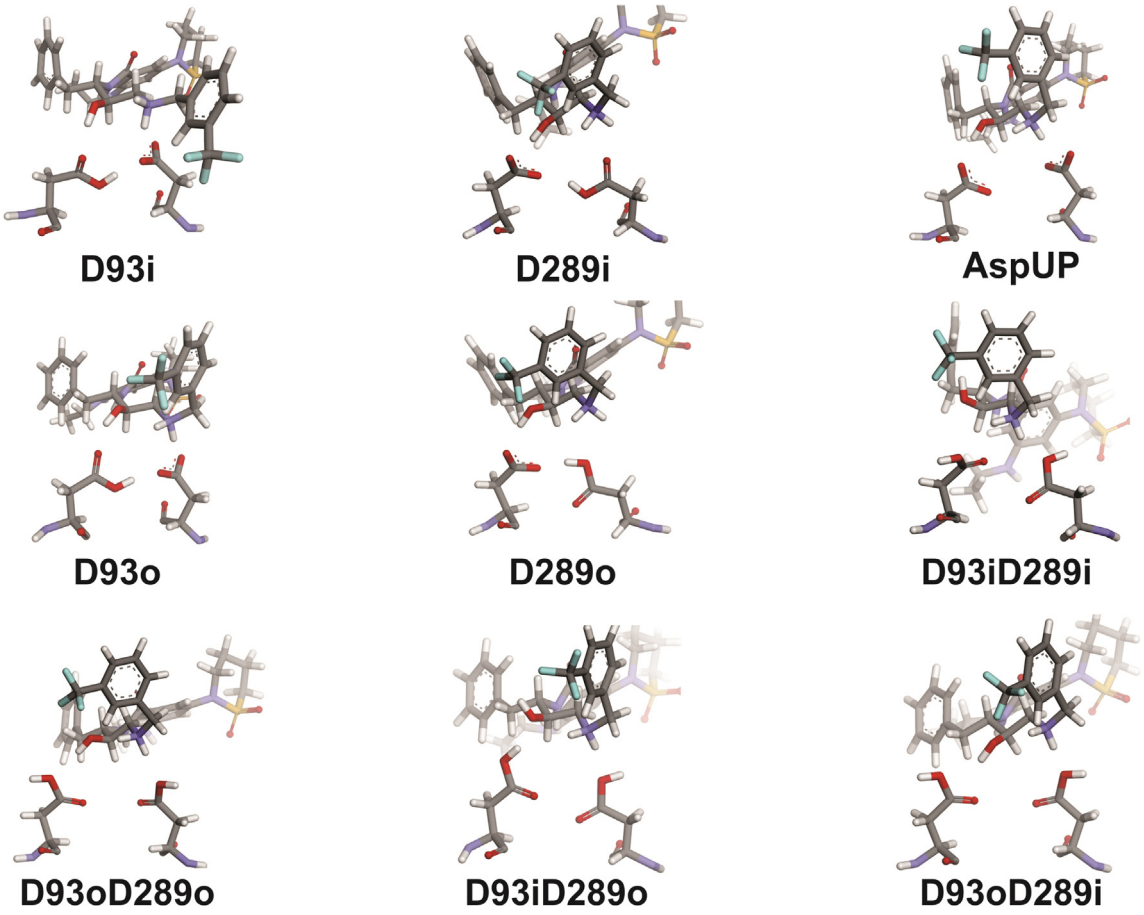


Fig. 4. Aspartic dyad residue orientations for the most representative structure of MD trajectory.

$\Delta d(OD_1_D_{289}\cdot N_3) = -1.05$ Å (Fig. 5). Moreover, the dihedral angle φ undergoes a considerable phase shift, turning this configuration into the D93i-like state (Fig. 4). The dynamic parameters analysis showed for Asp93 approximate δ values of 150° after the first nanosecond and remaining constant for the rest of the MD simulation (Fig. 6). Moreover, the δ values for Asp289 displayed a shift of 180° from the start, decreasing gradually and equilibrating within 60° after the 6 ns of MD trajectory. It is noteworthy that both deprotonated oxygen atoms in the Asp289 residue are indistinguishable so the phase difference of 150° in the first 3 ns are equivalent to 30° for the dihedral angle φ with respect to its experimental value. Geometric changes in the Asp dyad directly affect distances between atom pairs within the BACE1 enzyme and the CM8 inhibitor, as shown by $\Delta d(OD_2\cdot OD_2)$ negative values between −1.5 Å and −3.5 Å (Fig. 7). Furthermore, an increasing $\Delta d(OD_2_D_{93}\cdot O_4)$ value about 1.5 Å was also displayed in order to minimize the repulsions for the limited space in the β-secretase active site.

3.1.3. D289i state

The D289i state consists of the Asp93 residue protonated on the inner oxygen atom. The ligand displayed an rmsd value of 0.96 Å according to the most representative structure (Fig. 2). The most affected torsion angles $D(C_1\cdot C_2.N_4\cdot C_{10})$, $D(S_1\cdot N_1.C_6\cdot C_7)$ and $D(C_{13}\cdot C_{14}.C_{15}\cdot C_{16})$ had a phase difference of 31.71°, 30.69° and 18.48°, respectively. The protein had local structural variation at S3, Insert A and Insert F regions. Further, the catalytic Asp dyad formed a hydrogen bond between the HD1(Asp289) and OD1(Asp93) atoms, a common feature for all anionic states (Fig. 4). Those geometric changes directly affect protein-ligand interactions with Gly95, Asp289, Gly291, Ser386, among others as shown by $\Delta d(O_G_{95}\cdot N_3) = 1.66$ Å, $\Delta d(OD_1_D_{289}\cdot N_3) = 0.94$ Å and $\Delta d(OG_S_{386}\cdot O_1) = 1.24$ Å BACE1-CM8 intermolecular atom pair distance deviations (Fig. 5). On the other hand, calculated δ values showed oscillations between 20° and 82° for the Asp dyad. Increases in the δ values up to 80° and 76° in the first and last 3 ns, and after the first 4 ns of MD simulation were found for the Asp93 and Asp289 residues, respectively. Moreover, Fig. 7 displayed negative values of −0.5 Å and −1.0 Å for the $\Delta d(OD_1\cdot OD_1)$ and $\Delta d(OD_2\cdot OD_2)$ distance deviation parameters, respectively. These shortening in Asp dyad distances led to the CM8 inhibitor displacement to the S2 region and to the previously-mentioned conformational changes in BACE1 structure.

3.1.4. D289o state

This anionic state consists of the residue Asp289 side chain protonated on the outer oxygen (OD2). According to the most representative structure in the MD simulation, the ligand displayed an rmsd value of 0.95 Å which is the fourth lowest value for the nine different states studied, behind the AspUp, D93oD289o and D93o states. For the ligand, the most representative structure showed marked deviations at the P1, P2 and P3 zones and a displacement at the P'2 zone as, similar to the D289i state. The phase shifts for the angles $D(C_1\cdot C_2.N_4\cdot C_{10})$, $D(S_1\cdot N_1.C_6\cdot C_7)$ and $D(C_{13}\cdot C_{14}.C_{15}\cdot C_{16})$ were 251.76°, 36.21° and 21.72°, respectively. In addition, remarkables deviations were found at the S2, S3, Insert A and Insert F zones of the enzyme, whereas the Flap region had a subtler structural change (Fig. 3). Moreover, Fig. 4 shows how the Asp289 residue stayed in proximity to the other aspartic residue through a hydrogen bond formation between HD2(Asp289) and OD1(Asp93),

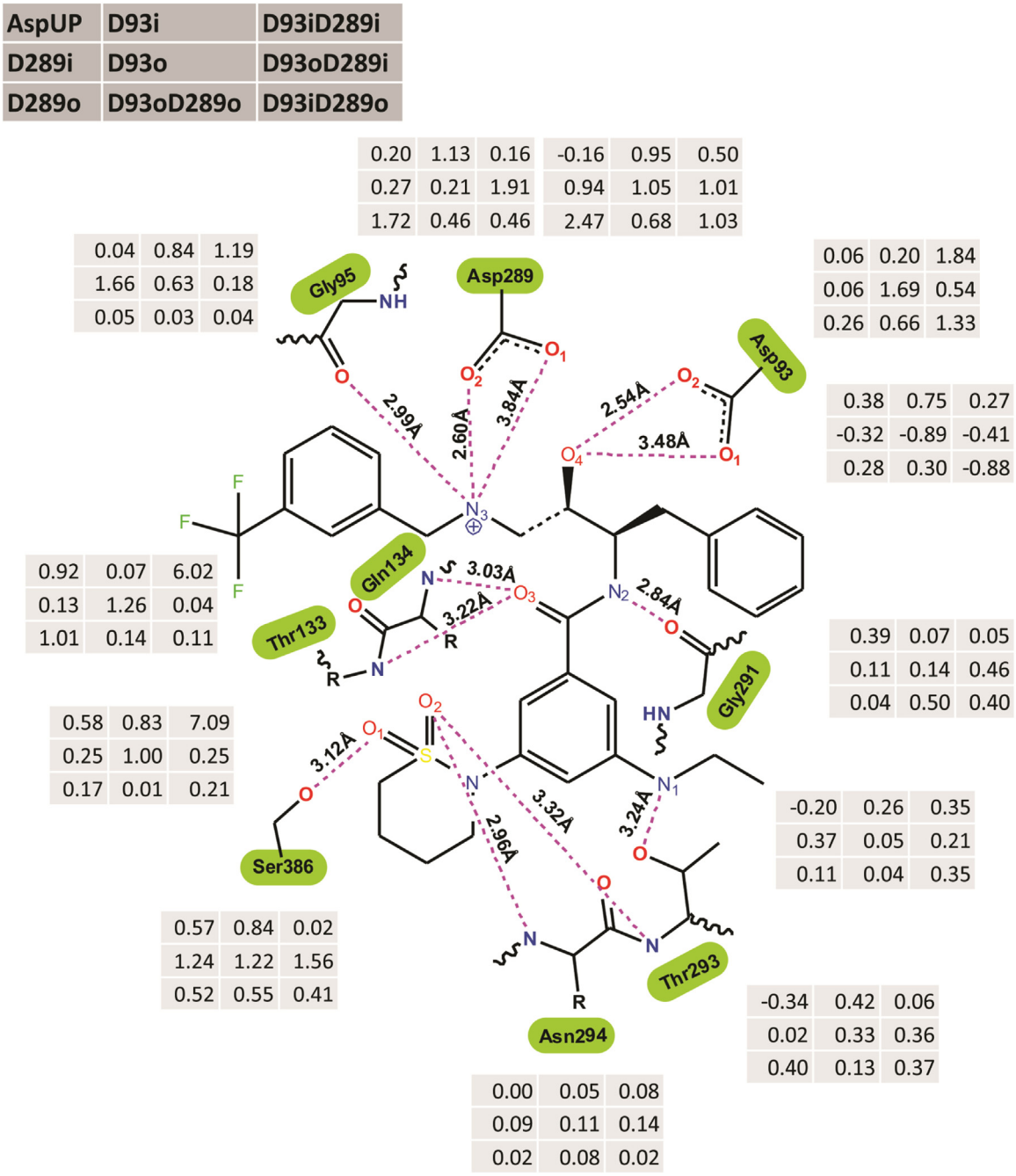


Fig. 5. Absolute error of the intermolecular BACE1-CM8 pair of atoms distances with respect to the experimental X-ray structure based on the most representative structure in the MD simulation.

leading to the CM8 inhibitor displacement to the S2 zone as shown by the $\Delta d(OD_1_D_{289}\cdot N_3) = 1.72$ Å $\Delta d(OD_2_D_{289}\cdot N_3) = 2.47$ Å and $\Delta d(N_Q_{134}\cdot O_3) = 1.01$ Å protein-ligand atom pair distance deviations (Fig. 5). On the other hand, mean δ values below 60° were found for the catalytic dyad with an increase in the phase shift from 20° to 40° after 6 ns of the MD simulation for the Asp93 residue, whereas the Asp289 residue displayed a mean δ value of 25°, except in the first 2 ns where the value for this parameter increased up to 58° (Fig. 6). Furthermore, protein-ligand atom pair distance deviations involving the Asp93 and Gly95 residues were below 0.5 Å. In contrast, a shortening in the $\Delta d(OD_2\cdot OD_2)$ distance deviations after 6 ns of MD trajectory was found, leading to the Asp93-Asp289 hydrogen bond formation and affecting the $\Delta d(OD_2_D_{289}\cdot N_3)$ values (Fig. 7).

3.2. Diprotonated configurations (neutral states)

3.2.1. D93oD289o state

The neutral D93oD289o state displays both outer oxygen atoms protonated in the Asp dyad. Static parameters analysis on the ligand gave an rmsd of 0.88 Å, which was the best of all neutral configurations and the second-best globally (Fig. 2). It presented structural motifs similar to the experimental pose as shown in the torsion angle $D(C_{13}\cdot C_{14}.C_{15}\cdot C_{16}) = -51.69°$ at the P'1 zone of the CM8 inhibitor, in contrast to the angle $D(C_1\cdot C_2.N_4\cdot C_{10}) = 165.83°$ whose deviation in the orientation of the ethyl group allowed direct contact with the Ile171 residue. Apart from the CM8 inhibitor, the protein also exhibited subtle and sharp structural changes at the S2 and S3 areas, and 10s-loop, Insert A and Insert F motifs, respec-

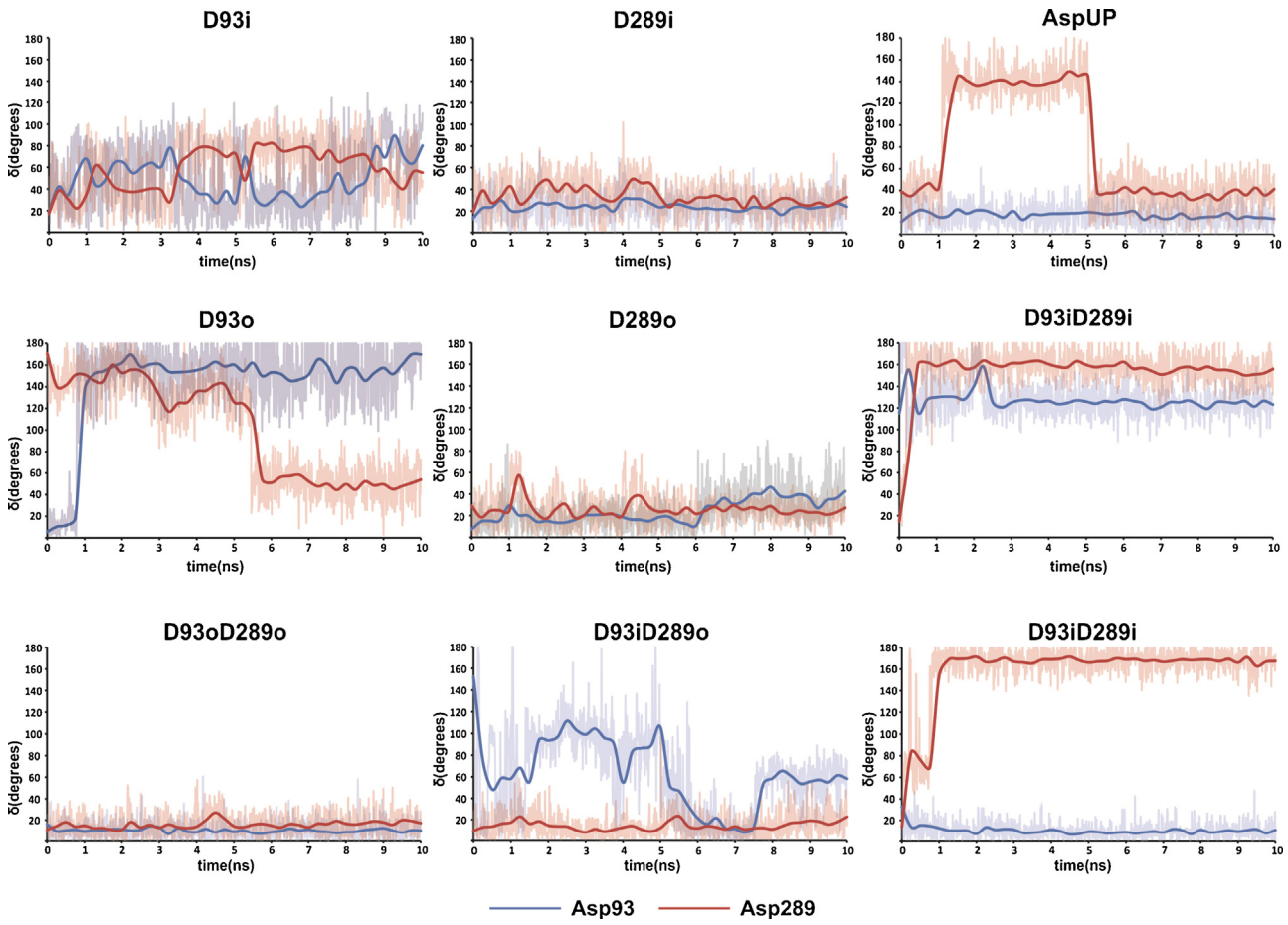


Fig. 6. The δ parameter values over time, i.e., the absolute value of the difference between dihedral angle φ at a particular moment in time and its reference value from the X-ray crystallographic structure.

tively (Fig. 3). Far from the ideal value of 180°, Asp93 and Asp289 showed outlier values for the dihedral angle D(CB·CG.OD$_2$·HD$_2$) of 14.31° and 10.76°, respectively, as well as a deviation of 0.85 Å for outer oxygen atom distance with respect to the experimentally-reported distance(Fig. 4). As a consequence of both protein and ligand conformational relaxation, BACE1-CM8 intermolecular atom pair distance elongations involving Asp93, Asp289 and Gly291 residues were found, such as Δd(OD$_2$_D$_{93}$·O$_4$) = 0.66 Å, Δd(OD$_1$_D$_{289}$·N$_3$) = 0.68 Å and Δd(O_G$_{291}$·N$_2$) = 0.50 Å, respectively (Fig. 5). Moreover, the dynamic parameter δ evaluation confirmed all the previously mentioned D93oD289o state steric behavior at the aspartic dyad (Fig. 6).

3.2.2. *D93iD289i state*

The D93iD289i neutral configuration is characterized by displaying the highest distance and torsion angle deviations measured on CM8, BACE1 and the BACE1-CM8 complex. It consists of both inner oxygen atoms protonated in the Asp dyad side chain. The inhibitor showed the highest rmsd value of 2.38 Å of the study set based on the most representative structure of the system, in which the dihedral angles D(C$_{21}$·C$_{13}$.C$_{14}$·C$_{15}$) and D(C$_{13}$·C$_{14}$.C$_{15}$·C$_{16}$) deviations directly affect the benzyl moiety orientation at the S1 sub pocket. Moreover, the D93iD289i state exhibits the highest deviations in the heavy atoms that constitute the Core group in all 9 evaluated configurations (Supplementary information). The Flap region opening was the most notable feature in BACE1 as shown by the local Cα rmsd values (Fig. 3), along with the outlier dihedral angles D(CB·CG.OD$_2$·HD$_1$) of −14.67° and 6.54° for the Asp93 and Asp289 residues(Fig. 4), respectively and the large Δd(N_T$_{133}$·O$_3$) = 7.09 Å and Δd(N_Q$_{134}$·O$_3$) = 6.02 Å deviation values with respect to the other studied configurations (Fig. 5). Dynamic parameter analysis revealed, after the first nanosecond of MD simulation, δ values above 100° for both catalytic residues (Fig. 6) and a shortening and elongation were found for the Δd(OD$_2$·OD$_2$) and Δd(OD$_2$_D$_{93}$·O$_4$) parameters around 2.5 Å and 1.5 Å, respectively (Fig. 7).

3.2.3. *D93iD289o state*

The D93iD289o neutral configuration consists of protonated inner and outer oxygen atoms in the Asp93 and Asp289 residues, respectively. Measurements made on the most representative structure displayed an rmsd value of 0.97 Å for the CM8 inhibitor pose where P1, P'1 and P'2 zones are conserved structural motifs according to the torsion angles D(C$_{21}$·C$_{13}$.C$_{14}$·C$_{15}$), D(C$_{13}$·C$_{14}$.C$_{15}$·C$_{16}$) and D(C$_{22}$·N$_3$.C$_{23}$·C$_{24}$), in contrast to the P3 zone where the angle D(C$_1$·C$_2$.N$_4$·C$_{10}$) showed a deviation above 80° (Fig. 2). Regarding the Asp dyad, it is worth mentioning that Asp93′s torsion angle D(CB·CG.OD$_1$·HD$_1$) experienced a shift difference in almost 180°, in order to minimize repulsions with the hydroxyl group of the CM8 inhibitor, an event extended to all neutral configurations involving the protonation of the inner oxygen atom in the Asp93 residue (Fig. 4). The highest protein-ligand atom pair distance deviations were found toward the S'1 zone involving both catalytic aspartyl side chains, such as Δd(OD$_1$_D$_{93}$·O$_4$) = −0.88 Å, Δd(OD$_2$_D$_{93}$·O$_4$) = 1.33 Å and Δd(OD$_1$_D$_{289}$·N$_3$) = 1.03 Å (Fig. 5). Evaluation of δ over time displayed for the Asp289 residue deviations around 40° for the angle φ, as well as an outlier value for the dihedral angle D(CB·CG.OD$_2$·HD$_2$) around 1.98° with the only

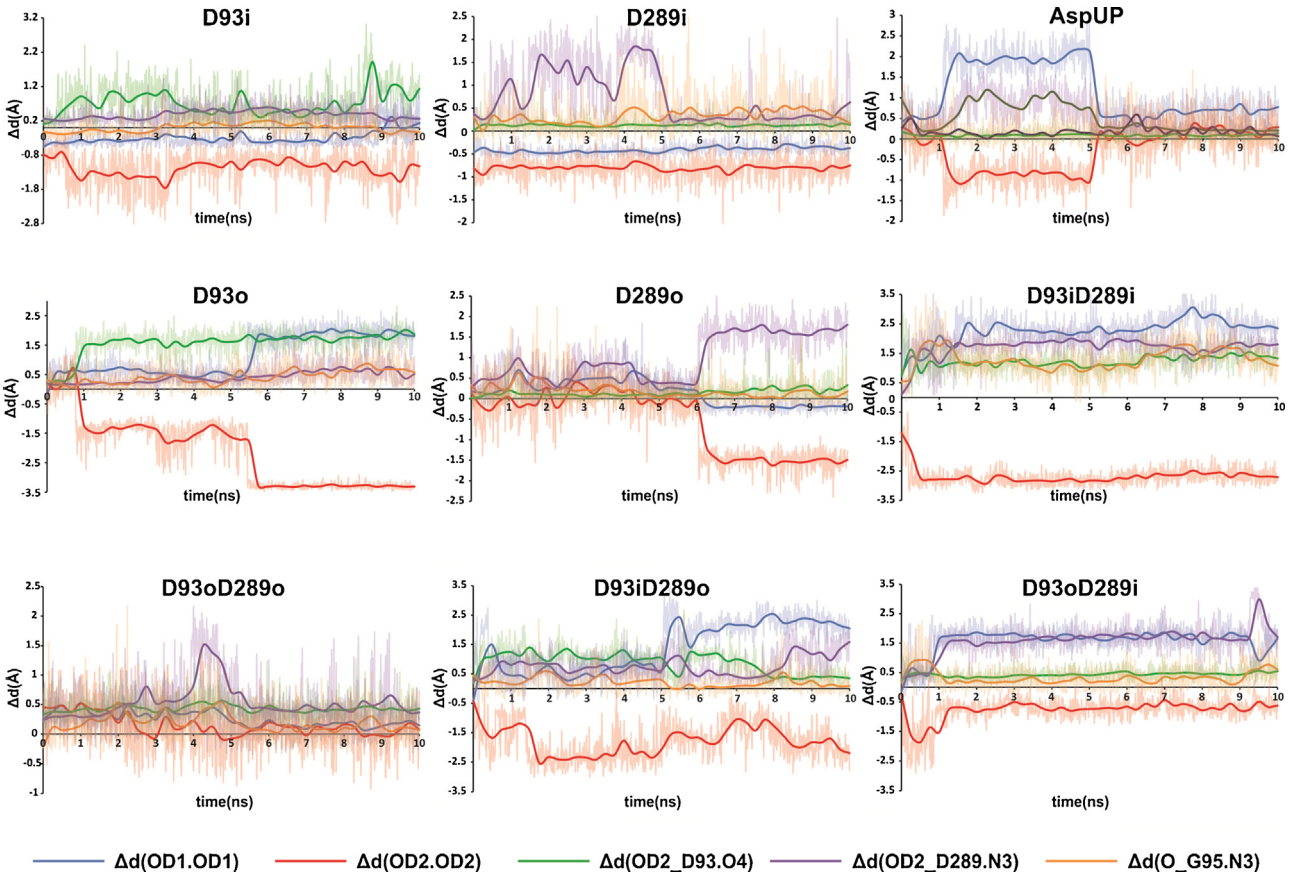


Fig. 7. Absolute error of the intermolecular BACE1-CM8 pair of atoms distances measured over time involving Asp93, Gly95 and Asp289 residues.

purpose being to avoid repulsions with the aminic moiety at the Core group in the ligand (Fig. 6), which explained the increases of the $\Delta d(OD_2_D_{289}\cdot N_3)$ and $\Delta d(O_G_5\cdot N_3)$ deviation values, a common feature for all configurations bearing the outer oxygen atom protonated at the Asp289 side chain (Fig. 7). In contrast, the Asp93 showed a continuous change in the dihedral angles ϕ and $D(CB\cdot CG.OD_2\cdot HD_1)$. The δ phase difference went from 0° to 180° in the first 4 ns. In the next 2 ns of MD simulation an increase in the $\Delta d(OD_1\cdot OD_1)$ was found (Fig. 6), directly affecting the interactions of the CM8 inhibitor with Gly95 and Asp289 residues (Fig. 7). For the last 4 ns of trajectory the protein-ligand complex was stabilized, assuming a D93oD289o-like state at the catalytic Asp dyad, where the δ values were around 40° and 80° (Fig. 6).

3.2.4. D93oD289i state

The D93oD289i state consists of both Asp93 and Asp289 side chains protonated on the outer and inner oxygen atom positions, respectively. This state follows the same behavior of the other neutral configurations, i.e., the catalytic dyad becomes D93oD289o-like in its configuration over time, the most stable of all 4 neutral configurations evaluated. This Asp dyad conformational change occurs markedly after the first nanosecond of simulation when the dihedral angle $D(CA\cdot CB.CG\cdot OD_2)$ in the Asp289 residue, which is protonated on the inner oxygen atom, turned over 160°, remaining in that conformation the rest of its MD trajectory (Fig. 6). This rotation affected protein-ligand distances involving Asp93 and Asp289 residues, highlighting the $\Delta d(OD_2_D_{289}\cdot N_3)$ distance deviation elongation (Fig. 7). Regarding the most representative structure, the CM8 ligand displayed an rmsd value of 1.39 Å, showing the lowest deviation at the P1 zone for the torsion angle $D(C_{21}\cdot C_{13}.C_{14}\cdot C_{15})$, in opposition to the high values reported for the P2, P3 and P'1 zones (Fig. 2). On the other hand, the protein experienced notable structural changes in the Flap, S2, S3, Insert A and F zones in BACE1. It is noteworthy that the most notable molecular geometric feature was the angle $D(CA\cdot CB.CG\cdot OD_2)$ inversion for the Asp289 residue. Further, outlier values were found for the dihedral angles $D(CB\cdot CG.OD_2\cdot HD_2) = 7.03°$ and $D(CB\cdot CG.OD_1\cdot HD_1) = 2.19°$ in the Asp93 and Asp289 side chains, respectively (Fig. 6). These dihedral angles changes were with the purpose of minimizing the repulsion with the CM8 inhibitor at the P'1 zone as displayed by the protein-ligand distance between atom pair deviation $\Delta d(OD_1_D_{289}\cdot N_3) = -1.01$ Å and $\Delta d(OD_2_D_{289}\cdot N_3) = 1.91$ Å (Fig. 5).

3.3. Di-deprotonated configuration (dianionic state)

3.3.1. AspUP state

The AspUP state is the protonation state in which both catalytic Asp residues are deprotonated. The β-secretase Asp dyad dianionic state was characterized by displaying few molecular conformational deviations in the protein, ligand and Asp dyad with respect to the experimental one. The most representative structure of the MD simulation displayed structurally conserved Flap, S2, S3 and 10s-loop regions in the protein with respect to the experimental X-ray structure, in contrast to the deviations at Insert A and Insert F regions, a universal issue for all 9 configurations studied (Fig. 3). Moreover, the ligand had the lowest rmsd value of 0.600 Å to its experimental reference pose (Fig. 2), displaying torsion angles near reference values at P1, P2, P'1 and P'2 zones, whereas slight deviations at the flexible ethylamine motif were found. Deviation distance analysis for the BACE1/CM8 complex displayed the lowest values in the study set, highlighting protein-ligand atom pair distance deviations found at S'1, S1 and S2 regions,

such as $\Delta d(OD_2_D_{93}\cdot O_4) = 0.06$ Å, $\Delta d(OD_1_D_{93}\cdot O_4) = 0.38$ Å, $\Delta d(OD_2_D_{289}\cdot N_3) = 0.20$ Å, $\Delta d(OD_1_D_{289}\cdot N_3) = -0.16$ Å, $\Delta d(O_G_{95}\cdot N_3) = 0.04$ Å, $\Delta d(O_G_{291}\cdot N_2) = 0.34$ Å and $\Delta d(N_N_{294}\cdot O_2) = 0.00$ Å (Fig. 5). Regarding the dynamic parameters, it was found for the Asp289 residue that the dihedral angle φ displayed a phase difference around 140° in the first 5 ns (Fig. 6), affecting the measures involving this residue (Fig. 7). However, the real phase angle was always about 40° as this case is similar to the D93o state, where both oxygen atoms were indistinguishable because of the Asp289 side chain was deprotonated. As a consequence, the $\Delta d(OD_2\cdot OD_2)$ and Δd(OD2_Asp189.N3) distance deviations were always below 0.40 Å. In addition, the Asp93 residue had a δ value of 20° throughout the trajectory (Fig. 6), so that $\Delta d(OD_2_D_{93}\cdot O_4)$ and $\Delta d(O_G_{95}\cdot N_3)$ distance deviations were close to zero (Fig. 7). To summarise, there was a constant and continued stabilization between the Core group in the ligand and the BACE1 active site.

After analyzing all nine BACE1/HEA trajectories in their differents monoprotonated, diprotonated and di-deprotonated configurations, two common issues in all MD simulations were noted: (1) notable structural changes at the Insert A and F regions, wherein the modeled Insert A region experienced displacement, spatially affecting the neighboring region, Insert F and (2) low distance and interaction variability at the sultamic moeity in CM8, which is reflected in low variations in distance with Thr293 and Asn294 residues, so that these impassive parameters cannot be used to determinate the Asp dyad protonation of state. On the other hand, after considering rmsd values in Fig. 2 and the discussions below about β-secretase active site changes associated with the different protonation state configurations, it is pertinent to bear in mind that just the ligand RMSD value for the most representative structure is not a sufficient parameter to distinguish between the different protonation of state configurations, as it does not take into account the possible structural changes that the enzyme suffers over time, which is an aspect ignored in protein-ligand docking calculations, where the protein is considered rigid or the motion is restricted to a few rotatable bonds in the BACE1 active site. That is why a deep study on BACE1/HEA complexes over time is necessary that allows the exploration and discernment of the protonation state most feasible to the Asp dyad.

The MD trajectory analyses for the monoprotonated states (D93i, D93o, D289i and D289o), which is considered the most accepted Asp dyad protonation state in the presence of several mimetic state inhibitor families, showed that a protonation of either of the oxygen atoms at the Asp's side chains were not possible as this lead to hydrogen bond formation within Asp catalytic residues and the loss of interactions between the CM8 aminic moiety and Asp289 and/or Gly95 residues, reflected in d(OD1_OD1) and/or d(OD2_OD2) distance shortening and $d(OD_2_D_{289}\cdot N_3)$ and/or $d(O_G_{95}\cdot N_3)$ distance elongating, respectively. This phenomenon is enhanced in those monoprotonated configurations with a protonated outer oxygen, such as D93o and D289o. The latter displayed the highest rmsd values for the Core group atoms over time and a displacement in the tail of the ligand at P'1 and P'2 regions, whereas the D93o configuration showed a $D(CA\cdot CB.CG\cdot OD_2)$ dihedral angle inversion to avoid repulsions with hydroxyl moiety in the ligand. This dihedral angle shift turns D93o into D93i, which eventually lead to remarkable structural changes in the β-secretase active site and its vicinity (Fig. 5). In contrast, there is an attenuation in the D289i configuration in the event described above, becoming then the monoprotonated protonation state with less deviation in comparison to the BACE1/CM8 X-ray structure. Moreover, the deviation order is D289i < D289o < D93i < D93o. On the other hand, the neutral states (D93oD289o, D93iD289i, D93iD289o and D93oD289i) are characterized by visible conformational changes in the protein due mainly to protein–protein and protein-ligand steric clashes, with D93iD289 being the state where the BACE1 and CM8 conformational changes are most noticeable. Further, the Asp dyad shows atipic $D(CB\cdot CG.OD_2\cdot HD_2)$ and/or $D(CB\cdot CG.OD_1\cdot HD_1)$ dihedral angle values, i.e., below 15°, which are adopted due to lack of space in the active site with the purpose of reducing protein-ligand repulsions. There is no doubt that the D93oD289o state is the most stable of all 4 neutral protonation states evaluated, as the other 3 show a $D(CA\cdot CB.CG\cdot OD_2)$ dihedral angle over 140°. Last, the diaonionic state (AspUP configuration) is the most feasible for BACE1/HEA complexes according to distances, dihedral angle and rmsd values measured in the present study, evidenced by the lowest deviations of the study with respect to the 2VNM X-ray crystallographic structure. In addition, the Flap, S1, S'1, S2 and 10s-loop regions had low pairwise Cα rmsd deviations after the 10 ns of MD simulation with respect to the experimental one.

Table 1
Major BACE1-HEA interaction distances for a set of crystallographic and docked ligands.

Name	BACE1		HEA		Experimental[a]			Docked-SQM[b]		
	Residue	Atom	Atom	Zone	2VIE	2VNM	2WF1	V207	V317	N323
d01	Asp93	OD2	O4	P'1	2.60	2.54	2.59	2.53	2.52	2.57
d02	Gly95	O	N3	P'1	3.44	2.99	3.02	3.19	2.90	2.99
d03	Thr133	N	O2	P2	3.16	3.22	3.20	3.03	3.18	3.26
d04	Gln134	N	O2	P2	3.00	3.03	3.05	2.97	2.96	2.90
d05	Asp289	OD2	N3	P'1	2.66	2.61	2.68	2.56	2.65	2.49
d06	Gly291	O	N2	P1	2.92	2.84	2.97	2.95	2.86	2.91
d07	Asn294	N	O1	P2	2.84	2.96	3.08	2.91	2.85	2.84

[a] Crystallographic BACE1-HEA complexes.
[b] BACE1 non-crystallographic HEA inhibitors used for validation (supplementary information).

In order to prove the ability of different HEA's inhibitors to be well-accommodated in the BACE1 active site, using the AspUP configuration, docking simulations between 3 non-crystallographic HEA based inhibitors and the β-secretase protein followed by a MOZYME/PM7 optimization were carried out. Molecular structural diversity in different regions of the HEA were considered, such as, in the polar head at P2 zone, the lactam (compound V207) and sultams (compounds V317 and N323) groups while in the hydrophobic tail at P2 zone, the aliphatic (N323), cyclic (V207) and aromatic (V317) moieties were evaluated. Moreover, the effect of the substituted phenyl ring at P1 zone was also taken into account (V317). Table 1 shows a set of atom-pair distances involving the Asp93, Gly95, Thr133, Gln134, Asp289, Gly291 and Asn294 residues, 7 major BACE1/HEA interactions according to the residue-ligand interaction energy, previously reported [26]. Moreover, experimental protein-ligand atom-pair of distance values of the V207, V317 and N323 templates were also added. After the SQM optimization, no proton transfer from the protonated amine ligands to any residue was observed (Fig. 8). Furthermore, the binding mode of all 3HEA based inhibitors were similar to the experimental ones, conserving the main protein-ligand interactions (Fig. 8A); the amide, benzyl, hydroxyl and amine moieties, at P1 and P'1 regions, displayed a high degree of superposition. The benzyl moiety (Fig. 8B and D), including the difluoro-benzyl substituted one (Fig. 8C), was inside S1 hydrophobic subpocket interacting with the Tyr132, Phe169 and Thrp176 residues. The polar head of the lactam (Fig. 8B) and sultam (Fig. 8C and Fig. 8D) HEA based inhibitors interacts with the amide nitrogen atom of the Asn294 residue at S2 subpocket, as it shown by the d07 distance with the range of 2.84–2.91 Å. Slight shortenings in the protein-ligand distances were displayed at the flap zone for the β-secretase active site, where the range values were 3.03–3.26 Å and 2.90–2.97 Å for the Thr133 and Gln134 residues, respectively. Other shortenings, corresponding to

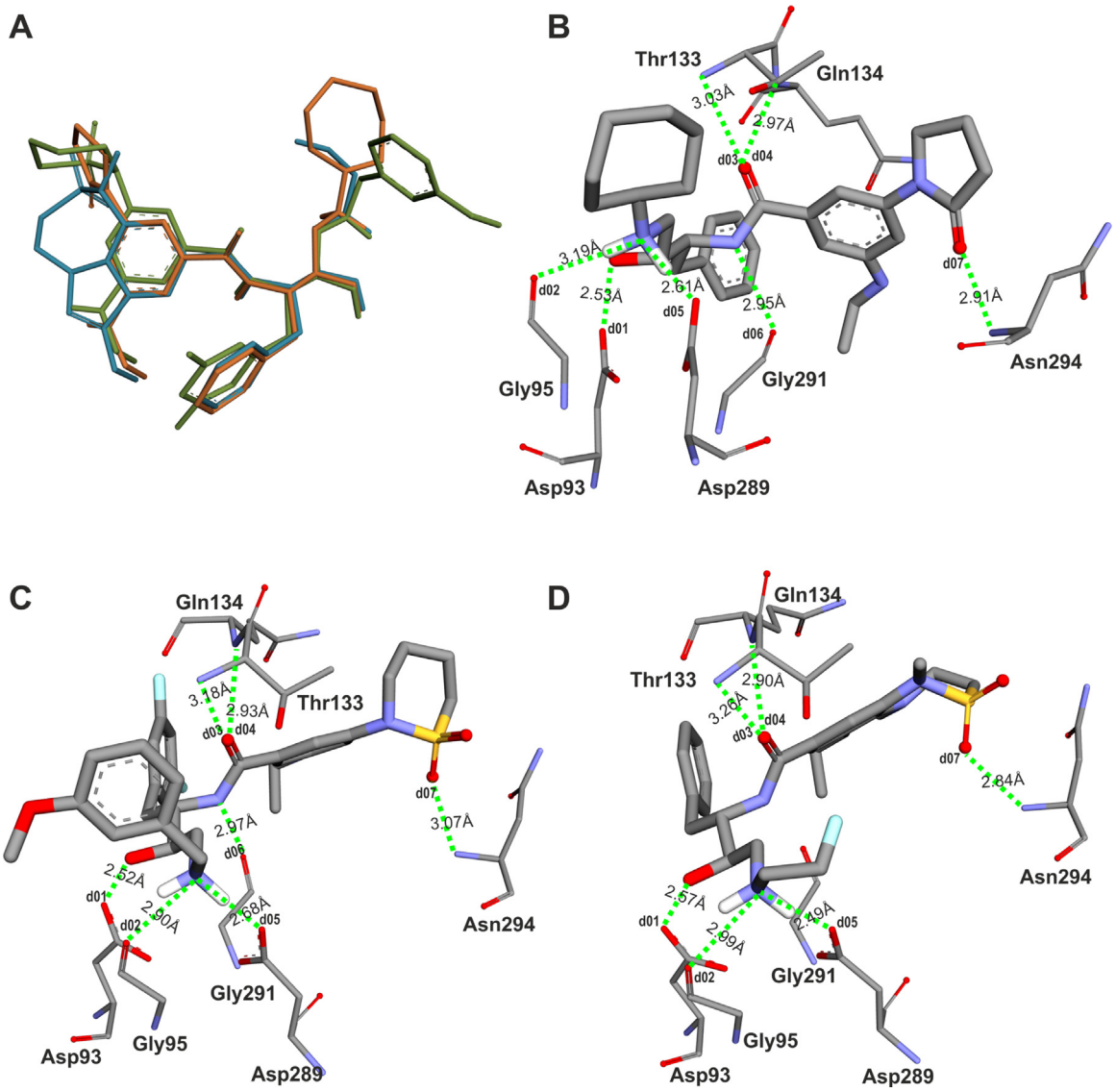


Fig. 8. Not co-crystallized HEA type inhibitors after docking and SQM optimization procedure. (A) Superposition of binding modes and, (B) V207 (C) V317 and (D) N323 ligand inside the BACE1 active site.

the hydrogen bonds between the backbone and sidechain of the Gly95 and Asp93 residues and, the hydroxyl and charged amine moieties respectively, were also found. Furthermore, the ionic contact between the charged nitrogen atom in the HEA and the catalytic Asp289 residue at S'1 subpocket, a sensitive zone to the protonation of state for both protein and ligand, displayed a distance range of 2.49–2.65 Å, showing a good agreement to the experimental ones (Table 1).

It is concluded in the present study that di-deprotonated state is the configuration of all 9 possible states that best reproduces protein-ligand conformation and maintains the lowest deviations over time about the X-ray crystallographic structure, which it is in agreement with the previously published study where a series of homodesmic reactions were employed [26].

The MD results shed light on BACE1 inhibitory mechanism by HEAs. According to the acid-base β-secretase enzymatic mechanism, one of two Asp residues transfers a proton to the ligand [28] and, given that the di-deprotonated state is the most probable when BACE1 is bound with HEAs, it is likely that process starts with a monoprotonated Asp state and the HEA inhibitor as a neutral amine, then a proton is transferred from Asp289 to the nitrogen atom at the Core group in the ligand, leading to protein-ligand complex stabilization with a di-deprotonated Asp dyad and CM8HEA inhibitor acting as a charged amine. On the other hand, these results are useful to improve virtual screening technique of HEA derived compound databases in order to find new leader compounds as BACE1 inhibitors.

4. Conclusions

A set of molecular dynamics simulations were carried out on a protein-ligand complex between the BACE1 enzyme along with CM8, a representative compound of HEA inhibitors family, in order to determine the most feasible protonation state of the Asp catalytic dyad in the presence of HEAs. The analysis of 10 ns MD for all 9 configurations of the aspartic dyad confirmed that the di-deprotonated state is the most probable for BACE1/HEA complexes, after comparing over time distance and angles absolute deviations about X-ray 2VNM crystallographic structure. Monoprotonated configurations showed outer and inner oxygens distance shortening that lead to a ligand displacement on the active site, the D289i configuration being the least affected of all 4 anionic states. On the other hand,

neutral protonation state configurations experienced remarkable structural changes on the β-secretase active site and its vicinity. The D93oD289o configuration was the most stable of 4 evaluated as the other 3 neutral configurations (D93iD289i, D93iD289o and D93oD289i) became therein over time. In addition, docking of 3 non-crystallographic HEA containing inhibitors inside the β-secretase active site followed by a PM7 SQM optimization showed the stability of BACE1-HEA complexes using the AspUP configuration, as the ligands were well-accommodate in the catalytic pocket and no proton transfer was observed. Finally, the study demonstrated that it is always necessary to consider the protein-ligand system for this particular discussion of results, since the chemical environment in each Asp dyad configuration may affects the position of the inhibitor and some residues in the protein, which leads to conformational changes on both species.

Acknowledgements

This research was supported by the 2015 initiative of the Vice-Rector of Universidad de Cartagena for strengthening research groups. We are very grateful to our university for funding and supporting science activities internally.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.jmgm.2016.04.003.

References

[1] D.J. Selkoe, The molecular pathology of Alzheimer's disease, Neuron 6 (1991) 487–498.
[2] D.J. Selkoe, Cell biology of the amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease, Annu. Rev. Cell Biol. 10 (1994) 373–403.
[3] D.M. Walsh, D.J. Selkoe, Aβ oligomers—a decade of discovery, J. Neurochem. 101 (2007) 1172–1184.
[4] R. Vassar, BACE1 inhibitor drugs in clinical trials for Alzheimer's disease, Alzheimer's Res. Ther. 6 (2014) 89.
[5] J. Hardy, D.J. Selkoe, The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics, Science 297 (2002) 353–356.
[6] S. Sinha, J.P. Anderson, R. Barbour, G.S. Basi, R. Caccavello, D. Davis, M. Doan, et al., Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain, Nature 402 (1999) 537–540.
[7] G. Thinakaran, E.H. Koo, Amyloid precursor protein trafficking processing, and function, J. Biol. Chem. 283 (2008) 29615–29619.
[8] D.J. Selkoe, Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease, Nature 399 (1999) A23–31.
[9] X. Lin, G. Koelsch, S. Wu, D. Downs, A. Dashti, J. Tang, Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the β-secretase site of β-amyloid precursor protein, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97 (2000) 1456–1460.
[10] J. Lundkvist, J. Näslund, γ-Secretase: a complex target for Alzheimer's disease, Curr. Opin. Pharmacol. 7 (2007) 112–118.
[11] K.S. Vetrivel, A. Barman, Y. Chen, P.D. Nguyen, S.L. Wagner, R. Prabhakar, G. Thinakaran, Loss of cleavage at β'-site contributes to apparent increase in β-amyloid peptide (Aβ) secretion by β-secretase (BACE1)-glycosylphosphatidylinositol (GPI) processing of amyloid precursor protein, J. Biol. Chem. 286 (2011) 26166–26177.
[12] I. Hussain, D. Powell, D.R. Howlett, D.G. Tew, T.D. Meek, C. Chapman, I.S. Gloger, et al., Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase, Mol. Cell. Neurosci. 14 (1999) 419–427.
[13] L. Hong, G. Koelsch, X. Lin, S. Wu, S. Terzyan, A.K. Ghosh, X.C. Zhang, J. Tang, Structure of the protease domain of memapsin 2 (beta-secretase) complexed with inhibitor, Science 290 (2000) 150–153.
[14] R. Ramkumar, C.H. Reynolds, Modeling the protonation states of the catalytic aspartates in beta-secretase, J. Med. Chem. 47 (2004) 5159–5166.
[15] A. Barman, S. Schürer, R. Prabhakar, Computational modeling of substrate specificity and catalysis of the β-secretase (BACE1) enzyme, Biochemistry 50 (2011) 4337–4349.
[16] J. Varghese, Human beta-secretase (BACE) and BACE inhibitors: progress report, Curr. Top. Med. Chem. 6 (2006) 569–578.
[17] T. Polgár, G.M. Keserü, Virtual screening for beta-secretase (BACE1) inhibitors reveals the importance of protonation states at Asp32 and Asp228, J. Med. Chem. 48 (2005) 3749–3755.
[18] T. Polgar, M. Csaba, S. Istvan, G.M. Keserü, Impact of ligand protonation on virtual screening against beta-secretase (BACE1), J. Chem. Inf. Model. 47 (2007) 2366–2373.
[19] J.T. Nguyen, Y. Hamada, T. Kimura, Y. Kiso, Design of potent aspartic protease inhibitors to treat various diseases, Arch. Pharm. Chem. Life Sci. 341 (2008) 523–535.
[20] H. Park, S. Lee, Determination of the active site protonation state of beta-secretase from molecular dynamics simulation and docking experiment: implications for structure-based inhibitor design, J. Am. Chem. Soc. 125 (2003) 16416–16422.
[21] S. Mishra, A. Caflisch, Dynamics in the active site of β-secretase: a network analysis of atomistic simulations, Biochemistry 50 (2011) 9328–9339.
[22] S. Chakraborty, S. Basu, Structural insight into the mechanism of amyloid precursor protein recognition by β-secretase 1: a molecular dynamics study, Biophys. Chem. 202 (2015) 1–12.
[23] C.R. Ellis, J. Shen, pH-Dependent population shift regulates BACE1 activity and inhibition, J. Am. Chem. Soc. 137 (2015) 9543–9546.
[24] F. Sussman, J.M. Otero, M.C. Villaverde, M. Castro, J.L. Domínguez, L. González-Louro, R.J. Estévez, J.C. Estévez, On a possible neutral charge state for the catalytic dyad in β-secretase when bound to hydroxyethylene transition state analogue inhibitors, J. Med. Chem. 54 (2011) 3081–3085.
[25] A. Barman, R. Prabhakar, Protonation states of the catalytic dyad of β-secretase (BACE1) in the presence of chemically diverse inhibitors: a molecular docking study, J. Chem. Inf. Model. 52 (2012) 1275–1287.
[26] C. Gueto-Tettay, J.C. Drosos, R. Vivas-Reyes, Quantum mechanics study of the hydroxyethylamines-BACE-1 active site interaction energies, J. Comput. Aided Mol. Des. 25 (2011) 583–597.
[27] N. Yu, S.A. Hayik, B. Wang, L. Ning, C.H. Reynolds, K.M. Merz, Assigning the protonation states of the key aspartates in β-secretase using QM/MM X-Ray structure refinement, J. Chem. Theory Comput. 2 (2006) 1057–1069.
[28] A. Barman, R. Prabhakar, Elucidating the catalytic mechanism of β-secretase (BACE1): a quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) approach, J. Mol. Graph. Model. 40 (2013) 1–9.
[29] A. Barman, R. Prabhakar, Computational insights into substrate and site specificities, catalytic mechanism, and protonation states of the catalytic Asp dyad of β -secretase, Scientifica (2014) 598728.
[30] J.L. Domínguez, T. Christopeit, M.C. Villaverde, T. Gossas, J.M. Otero, S. Nyström, V. Baraznenok, E. Lindström, U.H. Danielson, F. Sussman, Effect of the protonation state of the titratable residues on the inhibitor affinity to BACE-1, Biochemistry 49 (2010) 7255–7263.
[31] A.K. Ghosh, S. Gemma, J. Tang, Beta-secretase as a therapeutic target for Alzheimer's disease, Neurotherapeutics 5 (2008) 399–408.
[32] N. Charrier, B. Clarke, L. Cutler, E. Demont, C. Dingwall, R. Dunsdon, R. East, et al., Second generation of hydroxyethylamine BACE-1 inhibitors: optimizing potency and oral bioavailability, J. Med. Chem. 51 (2008) 3313–3317.
[33] N. Charrier, B. Clarke, L. Cutler, E. Demont, C. Dingwall, R. Dunsdon, L. Hawkins, et al., Second generation of BACE-1 inhibitors. Part 1: the need for improved pharmacokinetics, Bioorg. Med. Chem. Lett. 19 (2009) 3664–3668.
[34] M.R. Kaller, S.S. Harried, B. Albrecht, P. Amarante, S. Babu-Khan, M.D. Bartberger, J. Brown, et al., A potent and orally efficacious: hydroxyethylamine-based inhibitor of β-secretase, ACS Med. Chem. Lett. 3 (2012) 886–891.
[35] K. Mondal, K. Regnstrom, W. Morishige, R. Barbour, G. Probst, Y.Z. Xu, D.R. Artis, N. Yao, P. Beroza, M.P. Bova, Thermodynamic and kinetic characterization of hydroxyethylamine β-secretase-1 inhibitors, Biochem. Biophys. Res. Commun. 441 (2013) 291–296.
[36] P. Nordeman, S. Estrada, L.R. Odell, M. Larhed, G. Antoni, (11)C-Labeling of a potent hydroxyethylamine BACE-1 inhibitor and evaluation in vitro and in vivo, Nucl. Med. Biol. 41 (2014) 536–543.
[37] A.P. Truong, G.D. Probst, J. Aquino, L. Fang, L. Brogley, J.M. Sealy, R.K. Hom, et al., Improving the permeability of the hydroxyethylamine BACE-1 inhibitors: structure-activity relationship of P2′ substituents, Bioorg. Med. Chem. Lett. 20 (2010) 4789–4794.
[38] A.P. Truong, G. Tóth, G.D. Probst, J.M. Sealy, S. Bowers, D.W.G. Wone, D. Dressen, et al., Design of an orally efficacious hydroxyethylamine (HEA) BACE-1 inhibitor in a preclinical animal model, Bioorg. Med. Chem. Lett. 20 (2010) 6231–6236.
[39] M.M. Weiss, T. Williamson, S. Babu-Khan, M.D. Bartberger, J. Brown, K. Chen, Y. Cheng, et al., Design and preparation of a potent series of hydroxyethylamine containing β-secretase inhibitors that demonstrate robust reduction of central β-amyloid, J. Med. Chem. 55 (2012) 9009–9024.
[40] N. Eswar, B. Webb, M.A. Marti-Renom, M.S. Madhusudhan, D. Eramian, M. Shen, U. Pieper, A. Sali, Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2002.
[41] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, UCSF chimera—a visualization system for exploratory research and analysis, J. Comput. Chem. 25 (2004) 1605–1612.
[42] D. Van Der Spoel, H.J.C. Berendsen, R. Van Drunen, GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation, Comput. Phys. Commun. 91 (1995) 43–56.
[43] D. Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A.E. Mark, H.J.C. Berendsen, GROMACS: fast flexible, and free, J. Comput. Chem. 26 (2005) 1701–1718.
[44] S. Pronk, S. Páll, R. Schulz, P. Larsson, P. Bjelkmar, R. Apostolov, M.R. Shirts, et al., GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit, Bioinformatics 29 (2013) 845–854.

[45] S. Pall, M. Abraham, C. Kutzner, B. Hess, E. Lindahl, Tackling exascale software challenges in molecular dynamics simulations with GROMACS, in: S. Markidis, E. Laure (Eds.), Solving Software Challenges for Exascale, vol. 8759, Springer International Publishing, Switzerland, 2015, pp. 3–27.
[46] W.D. Cornell, P. Cieplak, C.I. Bayly, I.R. Gould, K.M. Merz, D.M. Ferguson, D.C. Spellmeyer, T. Fox, J.W. Caldwell, P.A. Kollman, A second generation force field for the simulation of proteins nucleic acids, and organic molecules, J. Am. Chem. Soc. 117 (1995) 5179–5197.
[47] Y. Duan, C. Wu, S. Chowdhury, M.C. Lee, G. Xiong, W. Zhang, R. Yang, et al., A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations, J. Comput. Chem. 24 (2003) 1999–2012.
[48] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, et al., s. f. Gaussian~09 Revision D.01.
[49] J. Wang, R.M. Wolf, J.W. Caldwell, P.A. Kollman, D.A. Case, Development and testing of a general amber force field, J. Comput. Chem. 25 (2004) 1157–1174.
[50] J. Wang, W. Wang, P.A. Kollman, D.A. Case, Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations, J. Mol. Graph. Model. 25 (2006) 247–260.
[51] D.A. Case, J.T. Berryman, R.M. Betz, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, T.A. Darden, R.E. Duke, T.J. Giese, H. Gohlke, A.W. Goetz, N. Homeyer, S. Izadi, P. Janowski, J. Kaus, A. Kovalenko, T.S. Lee, S. LeGrand, P. Li, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, K.M. Merz, G. Monard, P. Needham, H. Nguyen, H.T. Nguyen, I. Omelyan, A. Onufriev, D.R. Roe, A. Roitberg, R. Salomon-Ferrer, C.L. Simmerling, W. Smith, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, R.M. Wolf, X. Wu, D.M. York, P.A. Kollman, AMBER 2015, University of California, San Francisco, 2015.
[52] A.W. Sousa da Silva, W.F. Vranken, ACPYPE—AnteChamber PYthon parser interfacE, BMC Res. Notes 5 (2012) 367.
[53] M.W. Mahoney, W.L. Jorgensen, A five-site model for liquid water and the reproduction of the density anomaly by rigid: nonpolarizable potential functions, J. Chem. Phys. 112 (2000) 8910–8922.
[54] B. Hess, H. Bekker, H.J.C. Berendsen, J.G.E.M. Fraaije, LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations, J. Comput. Chem. 18 (1997) 1463–1472.
[55] S. Miyamoto, P.A. Kollman, Settle an analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models, J. Comput. Chem. 13 (1992) 952–962.
[56] T. Darden, D. York, L. Pedersen, Particle mesh Ewald: an N log(N) method for Ewald sums in large systems, J. Chem. Phys. 98 (1993) 10089–10092.
[57] D.M. York, A. Wlodawer, L.G. Pedersen, T.A. Darden, Atomic-level accuracy in simulations of large protein crystals, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91 (1994) 8715–8718.
[58] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: visual molecular dynamics, J. Mol. Graph. 14 (1996) 33–38 (27–28).
[59] Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, Release 4.5, San Diego: Dassault Systèmes, 2015. s. f.
[60] B. Waszkowycz, D.E. Clark, E. Gancia, Outstanding challenges in protein-ligand docking and structure-based virtual screening, Comput. Mol. Sci. 1 (2011) 229–259.
[61] N.D. Yilmazer, M. Korth, Enhanced semiempirical QM methods for biomolecular interactions, Comput. Struct. Biotechnol. J. 13 (2015) 169–175.
[62] B. Clarke, E. Demont, C. Dingwall, R. Dunsdon, A. Faller, J. Hawkins, I. Hussain, D. MacPherson, G. Maile, R. Matico, P. Milner, J. Mosley, A. Naylor, A. O'Brien, S. Redshaw, D. Riddell, P. Rowland, V. Soleil, K.J. Smith, S. Stanway, G. Stemp, S. Sweitzer, P. Theobald, D. Vesey, D.S. Walter, J. Ward, G. Wayne, BACE-1 inhibitors part 2: Identification of hydroxy ethylamines (HEAs) with reduced peptidic character, Bioorg. Med. Chem. Lett. 18 (2008) 1017–1021.
[63] N. Charrier, B. Clarke, E. Demont, C. Dingwall, R. Dunsdon, J. Hawkins, J. Hubbard, I. Hussain, G. Maile, R. Matico, J. Mosley, A. Naylor, A. O'Brien, S. Redshaw, P. Rowland, V. Soleil, K.J. Smith, S. Sweitzer, P. Theobald, D. Vesey, D.S. Walter, G. Wayne, Second generation of BACE-1 inhibitors part 2: optimisation of the non-prime side substituent, Bioorg. Med. Chem. Lett. 19 (2009) 3669–3673.
[64] G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson, AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexiblity, J. Comput. Chem. 16 (2009) 2785–2791.
[65] R. Huey, G.M. Morris, A.J. Olson, D.S. Goodsell, A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation, J. Comput. Chem. 28 (2007) 1145–1152.
[66] J.J.P. Stewart, Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters, J. Mol. Model. 19 (2013) 1–32.
[67] J.J.P. Stewart, MOPAC2016, Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA, http://OpenMOPAC.net.
[68] J.J.P. Stewart, Application of the PM6 method to modeling proteins, J. Mol. Model. 15 (2009) 765–805.
[69] A. Klamt, G. Schüümann, COSMO: a new approach to dielectric screening in solvents with explicit expressions for the screening energy and its gradient, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2 (1993) 799–805.

Anexo XV. Publicación Científica #2

Journal of Molecular Graphics and Modelling 70 (2016) 181–195

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular Graphics and Modelling

journal homepage: www.elsevier.com/locate/JMGM

A molecular dynamics study of the BACE1 conformational change from Apo to closed form induced by hydroxyethylamine derived compounds

Carlos Gueto-Tettay*, Joshua Zuchniarz, Yeyson Fortich-Seca, Luis Roberto Gueto-Tettay, Juan Carlos Drosos-Ramirez*

Grupo de Química Bioorgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Cartagena, Colombia

ARTICLE INFO

Article history:
Received 22 July 2016
Received in revised form 5 October 2016
Accepted 6 October 2016
Available online 7 October 2016

Keywords:
Alzheimer's disease
Hydroxyethylamines
GROMACS
BACE1
Flap
Population density

ABSTRACT

BACE1 is an aspartyl protease which is a therapeutic target for Alzheimer's disease (AD) because of its participation in the rate-limiting step in the production of Aβ-peptide, the accumulation of which produces senile plaques and, in turn, the neurodegenerative effects associated with AD. The active site of this protease is composed in part by two aspartic residues (Asp93 and Asp289). Additionally, the catalytic site has been found to be covered by an antiparallel hairpin loop called the flap. The dynamics of this flap are fundamental to the catalytic function of the enzyme. When BACE1 is inactive (Apo), the flap adopts an open conformation, allowing a substrate or inhibitor to access the active site. Subsequent interaction with the ligand induces flap closure and the stabilization of the macromolecular complex. Further, the protonation state of the aspartic dyad is affected by the chemical nature of the species entering the active site, so that appropriate selection of protonation states for the ligand and the catalytic residues will permit the elucidation of the inhibitory pathway for BACE1. In the present study, comparative analysis of different combinations of protonation states for the BACE1-hydroxyethylamine (HEA) system is reported. HEAs are potent inhibitors of BACE1 with favorable pharmacological and kinetic properties, as well as oral bioavailability. The results of Molecular Dynamics (MD) simulations and population density calculations using 8 different parameters demonstrate that the LnAsp289 configuration (HEA with a neutral amine and the Asp289 residue protonated) is the only one which permits the expected conformational change in BACE1, from apo to closed form, after flap closure. Additionally, differences in their capacities to establish and maintain interactions with residues such as Asp93, Gly95, Thr133, Asp289, Gly291, and Asn294 during this step allow differentiation among the inhibitory activities of the HEAs. The results and methodology here reported will serve to elucidate the inhibitory pathway of other families of compounds that act as BACE1 inhibitors, as well as the design of better leader compounds for the treatment of AD.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a degenerative illness of the central nervous system which is responsible for the majority of dementia cases in the elderly [1], affecting more than 40 million people worldwide, according to the Alzheimer's Association (http://www.alz.org/). The progression of the illness results in diminished cerebral function, initially affecting cognitive ability and memory, eventually resulting in incapacitation and, finally, death [2]. The pathogenesis of AD is characterized by extracellular plaque deposits inside the brain. The principle components of these plaques are Aβ-peptides of 40 or 42 amino acid residues in length [3]. Studies *in vivo* and *in vitro* have proposed BACE1 as a prominent target for the treatment of AD because of its role in the rate-limiting step of the production of Aβ-peptides [1,4,5]. β-secretase, or BACE1 (β-site of Amyloid precursor protein Cleaving Enzyme), is an integral membrane aspartic protease [6]. The active site of BACE1 is composed of two aspartic residues, Asp93 and Asp289, covered by an antiparallel hairpin loop known as the flap [7,8]. It has been reported regarding aspartic proteases that the covering of the active site by the flap plays an important role in the ligand or substrate recognition process [9–13]. In general, when the active site is inactive, the flap remains in the open conformation. However, the flap is stabilized while it closes around a substrate or inhibitor. The flexibility and dynamics of the flap have been studied in several members of this family of proteins [13],

* Corresponding author. Zaragocilla, Campus San Pablo, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Colombia.
E-mail address: jdrososr@unicartagena.edu.co (J.C. Drosos-Ramirez).

http://dx.doi.org/10.1016/j.jmgm.2016.10.006
1093-3263/© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

such as HIV protease [14–16], Plasmepsin II [17], BACE1 [11,18], and BACE2 [19].

Hydroxyethylamines (HEA) are a family of compounds that exhibit high inhibitory activity on BACE1 as well as desirable pharmacological properties [20,21] and oral bioavailability [1,22]. It is further important to consider the protonation state adopted by the aspartic dyad, which is affected by the chemical properties of the substrate or inhibitor [23–31]. We previously reported the most probable final protonation state of the aspartic dyad when docked with HEAs, through homodesmic reactions [32] and molecular dynamics (MD) simulations [28]. Additionally, the influence of structural variations of the ligand on the residue-ligand interaction energies was reported, revealing the quantitative importance of the residues Asp93, Gly95, Thr133, Gln134, Asp289, Gly291, Thr293, and Asn294, among others, in BACE1-HEA docking [32]. Questions remained, however, about the initial events in the inhibition of β-secretase by HEAs, specifically regarding the protonation states of both species (the inhibitor and aspartic dyad) upon the arrival of the ligand at the active site, as well as the location and time at which the ligand is protonated, and also the possible influence of the particular details of these events on the inhibitory activity of HEAs on β-secretase.

In order to address these questions a series of MD simulations on a BACE1-HEA complex with a representative inhibitor (CM8) were performed. It is important to mention that this protein-ligand system has been an effective model for study in the determination of the final protonation states of BACE1-HEA complexes. For the initial structure of the protein-ligand complex, the inhibitor was docked to the active site of BACE1 in the Apo form using different protonation state configurations of the Asp dyad-HEA system, i.e. LnAsp93, LnAsp389, LpAsp93, LpAsp289, and LpAspUP (Fig. 1). To determine the configuration that leads to the change from the Apo to the closed form in BACE1, the percent deviations of a set of parameters that measure the flap dynamics (d1, d2, θ and ϕ;) and the protein-ligand interactions (d3, d4, d5, and d6, Fig. 2) were used. The reference values for these distances and angles were taken from the co-crystallized structure of CM8 with BACE1 in the closed form (PDB ID: 2VNM [20]). Additionally, the concept of population density as a quantitative measure to determine the percentage of the population (the total number of frames) that simultaneously satisfy a number of parameters within a given tolerance, defined with respect to the crystal structure, has been introduced in this study. The results for both methods revealed that the LnAsp289 configuration is the only one which induces a change in the flap conformation from Apo to closed which is stable over time. This suggests that the protonation of the ligand happens within the active site of BACE1. In addition, the analysis of the LpAspUP configuration using the Apo form of BACE1 also indicates that ligand protonation occurs after flap closure. Therefore, the inhibition pathway of BACE1 by HEAs begins with a neutral inhibitor and a protonated aspartic dyad in Asp289. Eventually there must be a proton transfer from Asp289 to the amine nitrogen of the ligand in the P'1 zone resulting in the stabilization of the protein-ligand complex. Furthermore, the differences in the formation and stability over time of the principal protein-ligand interactions, in the first step of the inhibition process, could explain the differences in biological activity of HEAs on BACE1.

2. Methodology

2.1. Preparation of the system

The crystal structures of the Apo BACE1 conformation (PDB ID: 1W50 [33]) and closed BACE1 form in complex with the representative, low IC_{50} inhibitor CM8 (PDB ID: 2VNM [20]) were taken from the RSCB Protein Data Bank. The MODELLER program [34], using the USCF Chimera program as a graphical interface [35], was used to incorporate and optimize the missing fragment, Insert A, in the peptide chain using other X-ray structures (PDB ID: 1FKN [6]) as a template for the region [11,28]. The BACE1 isoform A sequence (Uniprot ID: P56817-1) was used as reference for the main chain numbering, so the residue numbers assigned to the catalytic aspartic dyad were Asp93 and Asp289, respectively. Furthermore, the residues with ionizable side chains were modelled as charged species, i.e. Lys, Arg, Glu, and Asp (except for the catalytic dyad). Five models of the protonation states of the CM8 inhibitor and the pair of catalytic aspartates, namely LnAsp93, LnAsp289, LpAsp93, LpAsp289, and LpAspUP (Fig. 1) were devised.

2.2. Apo BACE1-HEA molecular docking

For each combination of BACE1-HEA protonation states, the Autodock 4.2 program [36,37] was used to find the binding mode of the CM8 inhibitor in the active site of the protease under study in its Apo form. 200 runs were performed implementing the Lamarckian Genetic algorithm (LGA) with 25 million evaluations and 270 million generations. The investigation site was defined by a box of dimensions $60 \times 80 \times 60$ Å^3 that included important active site residues of BACE1, such as Gly95, Asp93, Thr133, Asp289, Gly291, Thr293, and Asn294, among others. To accomplish this, the Autodock Tools software was used as a graphical interface [36]. Finally, the best pose, (according to the final binding energy [36]) was chosen as the starting point for the Molecular Dynamics simulations.

2.3. Molecular dynamics simulations

All of the molecular dynamics were performed employing the AMBER03 force field [38] in GROMACS 5.1 [39–41]. For all the HEA compounds studied, the topology files for the neutral and/or protonated inhibitor forms were obtained by the RESP method [38,42–44]. The pre-dynamics preparation of the system was done using typical parameters as described in our prior report [28], i.e., in all MD simulations, the missing hydrogens were added and the protein was immersed in a cubic box with a side length of 92 Å, which ensured a distance of 12 Å between the boundary of the water box and any solute atom. The overall charge was neutralized by adding counterions, and 154 mM salt concentration was achieved by adding sodium and chloride ions. The box contained over 20,000 TIP3P water molecules [45] and a total of about 76,000 atoms. The system (protein, ligand, waters and ions) simulations were carried out in a multistep procedure. In the first step, steric clashes were fixed through energy minimization by a steepest descent method for 10,000 steps. The convergence criterion was adjusted so that the force was below 500 kJ/mol/nm. In the second step, water and ion positions were equilibrated around the enzyme-ligand complex by keeping the heavy atoms coordinates frozen, allowing the entry of water molecules inside the protein and adjustment of their positions around it. This was done by two consecutive 500 ps restrained MD simulations with NVT and NPT ensembles, respectively. In the next step, all the restraints were removed and the structure was subsequently used as starting point for the 10 ns BACE1/HEA all-atom MD simulations in aqueous solution. The LINCS [46] and SETTLE [47] algorithms were employed to apply peptide and water molecule bond distance constraints, respectively, whereas long-range interactions were calculated using the particle-mesh Ewald (PME) method [48,49]. The periodic boundary condition (PBC) was applied. Finally, the 5 models were submitted to 70 ns molecular dynamics simulations with no restraints. The equation of motion was integrated at intervals of 2 fs and the trajectories were captured every 1 ps. Visualization and analysis of the systems were

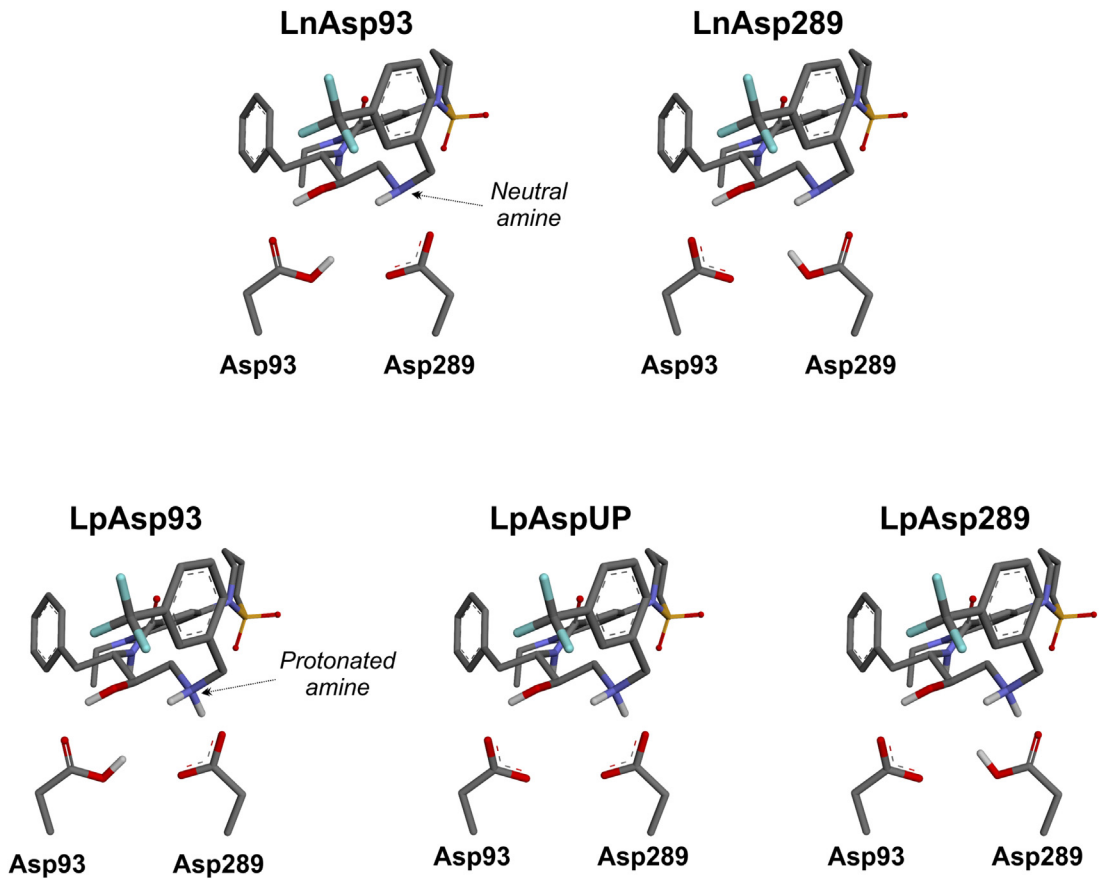


Fig. 1. Protonation scheme for the ligand (CM8) and aspartic dyad (BACE1). The ligand can be a neutral (Ln) or protonated (Lp) amine, while the dyad can be monoprotonated (Asp93 or Asp289) or doubly deprotonated (AspUP).

done through tools in the VMD [50] and USCF Chimera software packages [35].

2.4. Flap dynamics and BACE1-HEA interactions tracking parameters

After all the MD simulations of the 5 configurations (LnAsp93, LnAsp289, LpAsp93, LpAsp289 and LpAspUP) were done, a total of 8 parameters (Fig. 2) were calculated to determine the model that leads to the change from the Apo to the closed form in BACE1, namely: 4 protein-protein parameters (d1, d2, θ and ϕ;) and 4 protein-ligand (d3, d4, d5, and d6). The first set of parameters has been proposed by Kumalo and coworkers to understand the extent of flap motion as well as the opening and closing phenomena in the case of BACE1 enzyme [18,19]. Th133 is often described as the flap tip residue, and the distance with the Ser386 residue provides insight into the extent of the flap movement (distance d1). It is noteworthy that the positions of the aspartic dyad, Asp93 and Asp289, are quite fixed in all of the reported crystal structures, therefore changes in distance between these residues and the tip of the flap must be a consequence of the flap motion [18]. So the aspartic residues, Asp93 and Asp289, assist in understanding the position of Thr133 and Ser386 relative to catalytic dyad and provide an estimation of flap opening/closing during MD trajectory, though the parameters d2, θ and ϕ;. Regarding the protein-ligand parameters, the distance d3, which corresponds to a hydrogen bond between the tip of the flap and the carbonyl group of the CM8 inhibitor, is present in the crystal structure 2VNM [20] and it has been reported to be vital for the BACE1 flap closing process [11,12,18,28]. In addition, the other parameters in the distinctive motif region of HEAs, distances d4, d5 and d6, are sensitive to distinct protonation states of the dyad, as we showed in a previous report [28].

All the parameters were expressed as the percent deviations with respect to their references values found in the crystal BACE1-CM8 complex, where the BACE1 protein is in its closed form (PDB ID: 2VNM). For each conformation C_i^m of the MD trajectory of the BACE1-HEA configuration m, the percent deviation ($C_i^m P_j$) of the parameter j was calculated according to the following equation:

$$C_i^m P_j^m = \frac{(C_i^m \Omega_j) - \Omega_j^*}{|\Omega_j^*|} \times 100$$

where $C_i^m \Omega_j$ and Ω_j^* correspond to the value of the parameter j in the conformation C_i^m and the reference crystal structure of the BACE-HEA complex, respectively. According to the equation, positive and negative values for $C_i^m P_j^m$ represent lengthening and shortening with respect to the 2VNM X-ray structure. Furthermore, values closer to zero represent lower deviations to the reference BACE1-CM8 complex.

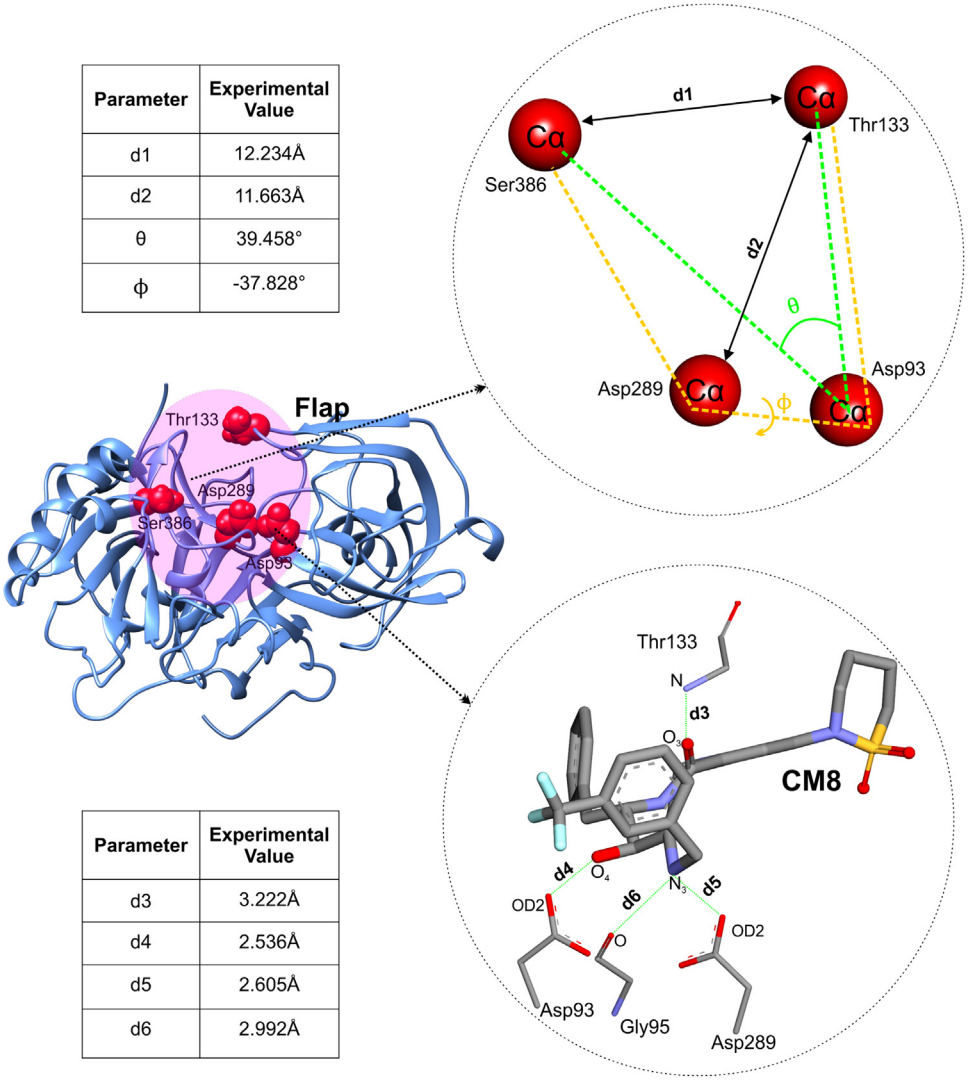
2.5. Population density calculation

For each protein-ligand configuration m, e.g. LpAsp93, there was a number N of total frames $C_1^m, C_2^m, \ldots, C_N^m$ obtained through the MD simulation which provided a number of BACE1-HEA conformations

For a set of parameters $P_{j1}^m, P_{j2}^m, \ldots, P_{jk}^m$, we define

$$\gamma_r^m \left(P_{j1}^m, P_{j2}^m, \ldots, P_{jk}^m\right) = \#\left\{C_i : |C_i^m P_{js}^m| \leq r, \text{ for each value of } s = 1, 2, \ldots, k\right\}$$

Parameter	Experimental Value
d1	12.234Å
d2	11.663Å
θ	39.458°
ϕ	-37.828°



Parameter	Experimental Value
d3	3.222Å
d4	2.536Å
d5	2.605Å
d6	2.992Å

Fig. 2. Measured parameters for the BACE1-CM8 complex (PDB ID: 2VNM). The upper parameters show the movement of the flap, while the lower ones are protein-ligand interactions sensitive to the protonation states of both species. The experimental values of these parameters in the closed protein-ligand complex are used as a reference.

$\gamma_r^m\left(P_{j1}^m, P_{j2}^m, \ldots, P_{jk}^m\right)$ represents the number of frames, of a configuration m, where each set of parameters $C_i^m P_{js}^m$ are in a range of the percent error tolerance r simultaneously, with respect to the values found in the crystal structure 2VNM.

Thus we have defined the population density $\rho_r^m\left(P_{j1}, P_{j2}, \ldots, P_{jk}\right)$ as:

$$\rho_r^m\left(P_{j1}, P_{j2}, \ldots, P_{jk}\right) = \frac{\gamma_r^m\left(P_{j1}^m, P_{j2}^m, \ldots, P_{jk}^m\right)}{N} \times 100$$

For a set of measured parameters, the values of ρ, evaluated for each configuration of BACE1-HEA protonation states, represent the percentage of the total population that is within a tolerance r. In our case these parameters represent the percentage of frames which display the experimental configuration of BACE1-CM8 (PDB ID:2VNM), within a percentage tolerance r, with respect to all selected measures simultaneously. This parameter can be calculated individually, e.g., ρ(ϕ;) or ρ(d3). However, the combined population density provides a better description of the system by the combination of protein-protein and protein-ligand parameters, as well as, a better tool for screening, given that the configurations should simultaneously fulfill several conditions, within a certain tolerance of deviation with respect to the crystal structure.

2.6. Influence of the initial events on the inhibitory activity

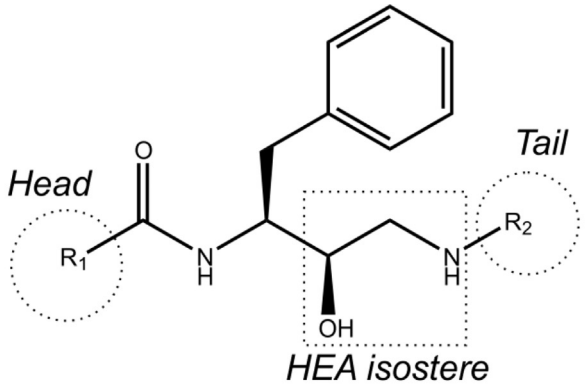
After the selection of the initial protonation state configurations for the Asp dyad-HEA pair (the LnAsp289 configuration), the behavior during the initial events was compared with that of two other inhibitors of different activities. These HEAs of low, moderate, and high inhibitory activity are identified by the PDB codes 2VIY [51], 2VIE [52], and 2VNM (CM8) [20], respectively (Table 1). The new compounds were submitted to docking and molecular dynamics simulations by the same methods previously described (sections 2.2 and 2.3). The distances between the heavy atoms of these inhibitors and the residues Asp93, Gly95, Thr133, Asp289, Gly291, and Asn294 were employed for the analysis of the capacity of the ligand to form and maintain these interactions in time and their possible relation with inhibitory activity.

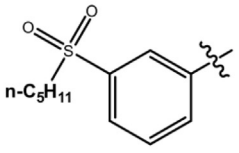
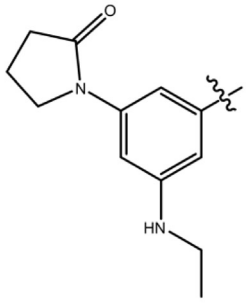
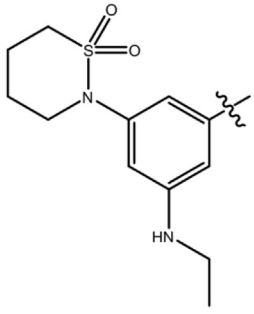
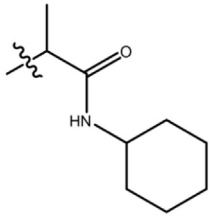
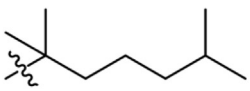
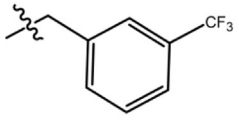
3. Discussion of results

3.1. Determination of the protonation state

The first step in the study of the initial events of the inhibition of BACE1 by HEAs consists of the determination of the protonation states of both species at the moment of HEA inhibitor recognition on the part of the protein in the Apo form. In order to make such

Table 1
Head and tail fragments for the 2VIY, 2VIE and 2VNM HEA derived compounds.



	2VIY	2VIE	2VNM
R_1			
R_2			

a determination, a total of 5 models that encompass the possible combinations of protonation states for the CM8 inhibitor and the catalytic aspartates, i.e. LnAsp93, LnAsp289, LpAsp93, LpAsp289, and LpAspUP, were considered (Fig. 1). Molecular dynamics techniques were used to study the flap closure process. The percent deviations of 8 parameters (Fig. 2) which track the movement of the flap (d1, d2, θ, and ϕ;) and the BACE1-HEA interactions (d3, d4, d5, d6) with respect to the crystal complex (PDB ID: 2VNM) were calculated. The first set of parameters has been proposed to describe the dynamics of the opening/closure of the flap of BACE1 [11,18,19] and other aspartyl proteases, such as renin [53], cathepsin D [54], and HIV protease [14–16]. Furthermore, we have previously shown that the second set, the measured protein-ligand parameters in the distinctive motif region of HEAs, are sensitive to distinct protonation states of the dyad [28]. Fig. 3 shows the regions of the BACE1 active site and its neighboring residues for the most representative structures after 70 ns simulations. The percent deviation over time for each configuration in the protein-protein and protein-ligand parameters are shown in Fig. 4 and Fig. 5, respectively. The conformations of the flap and the ligand with respect to the crystal structure, taken every 10 ns, are shown for each configuration in Fig. 6 and Fig. 7, respectively. Similar figures for the opposite-, 10s-, and 113s-loop are provided in **Supporting information**. The following sections present an individual analysis of each configuration.

3.1.1. *LnAsp93 configuration*

The LnAsp93 configuration is defined as the protonation state for the BACE1/HEA complex where the ligand has a neutral amine group and the Asp93 residue is protonated on its internal oxygen (Fig. 1). Based on the flap dynamics parameters, the flap closes in the first 15 ns and again after a trajectory of 45 ns; the percent deviation values with respect to the 2VNM crystal structure show that the distances between Thr133-Ser386 (Ed1) and Thr133-Asp289 (Ed2) (Figs. 4A and B) both exhibit values near 12% in the first interval. After 45 ns of simulation, the values of Ed1 were below 5% deviation and remained near that level until the end of the trajectory. For the Ed2 parameter, the values remained around 5% from 46 to 60 ns, but later gradually grew to 15%. While the flap was open the percent deviations of Ed1 and Ed2 were around 20%. In addition, the values for the deviations in the angle θ, Eθ, followed the same pattern as Ed1 and Ed2, with deviations near 30% between 20 and 40 ns (Fig. 4C). The parameter Eϕ;, which measures flap twisting, presented deviations oscillating around 20% and which changed

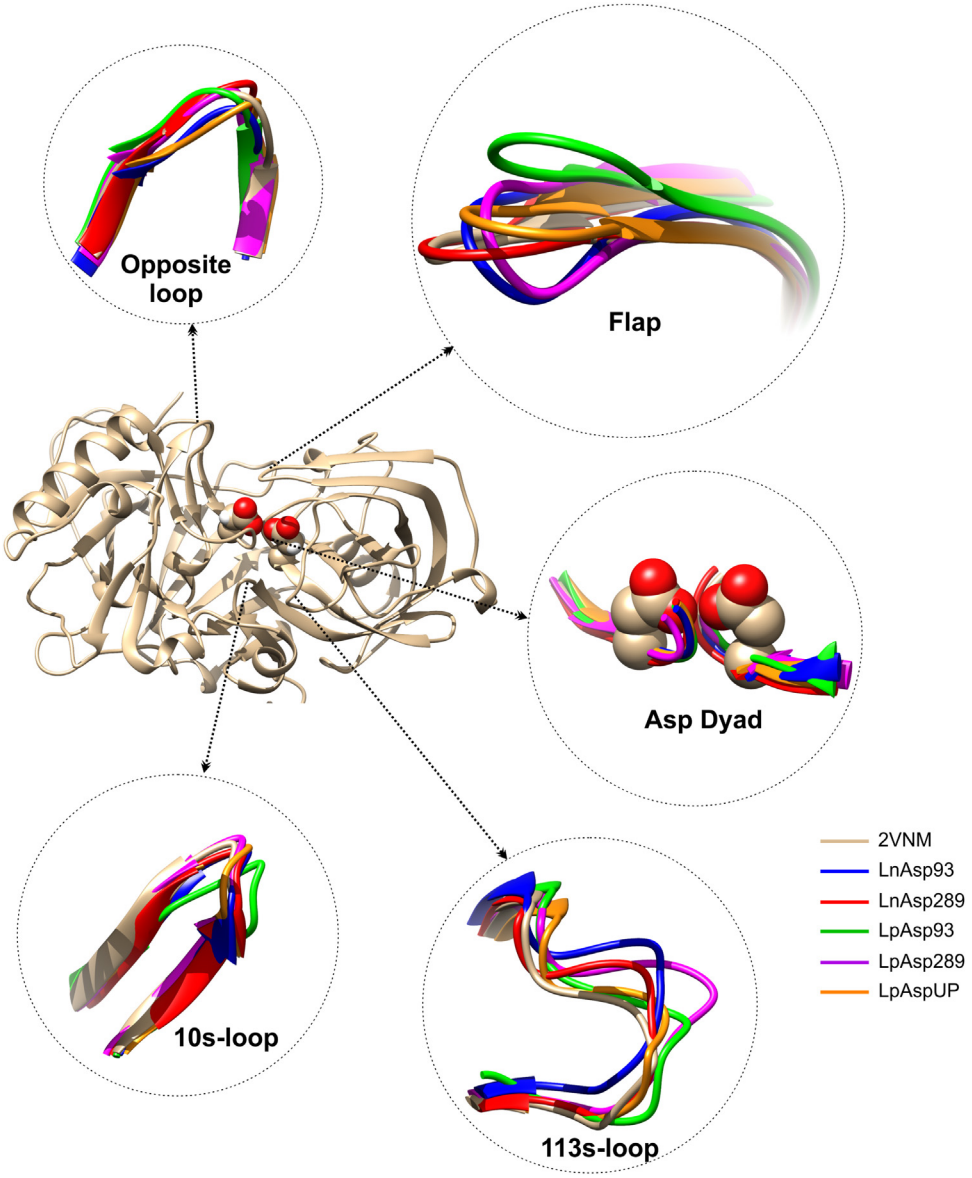


Fig. 3. The most representative structures for each configuration superimposed on each other, with distinct segments of the β-secretase active site shown in detail. The experimental structure with PDB ID 2VNM is used as a reference.

to −20% after 60 ns of trajectory (Fig. 4D). These deviations in the dihedral ϕ; explain the conformational changes in the flap region and the closure process of the active site after the arrival of the ligand at the cleft. This set of deviations in the different parameters corresponds to different movements of the flap during the MD simulation, which diverged from the reference structure (Fig. 6). Additionally, other regions of the active site and its neighbors experienced significant deviations compared with 2VNM. The segments with the greatest variability were Ser388-Gly391, Lys70-Gly72, and Phe170-Trp176, in the opposite-loop, 10s-loop and 113s-loop, respectively (Supporting information). With respect to the protein-ligand parameters (Fig. 2), it was found that the distance between the carbonyl oxygen in the P3 region of CM8 and the nitrogen of the Thr133 main chain at the tip of the flap exhibited deviations between 50 and 60% compared to those found in the crystal structure (Fig. 5**A**). The importance of this hydrogen bond in the flap closure process has been extensively reported. Furthermore, the Ed4, Ed5, and Ed6 parameters, which are sensitive to the protonation states of BACE1 and CM8, display deviations in the first 50 ns around 27%, 23%, and 50%, respectively. Additionally, decreases up to 15% and 10% for Ed4 and Ed5 were observed in the remainder of the simulation (Fig. 5B and 5C). The lengthening of these interactions could explain the constant displacement experience by the ligand in the direction of the 10s-loop, most obvious in the first 40 ns of simulation in the regions P'1, P2, and P3 (Fig. 7). The displacement of CM8 caused the aspartic residues to approach each other and a torsion through part of the ligand which facilitated the increase in the Ed4, Ed5, and Ed6 parameters. In the remaining simulation time the complex was stabilized through the formation of two hydrogen bonds, the first between the protonated Asp93 and a hydroxyl group, where the aspartic residue served as a hydrogen bond donor and the hydroxyl fragment of the ligand served as a receptor. The second hydrogen bond was between the NH group of CM8 and the Asp289 residue.

3.1.2. LnAsp289 configuration

The LnAsp289 configuration is the combination of protonation states where the HEA CM8 and the catalytic residue Asp289 are both modelled as neutral (Fig. 1). It is important that this configuration stands out from the others as the one, beginning from the open

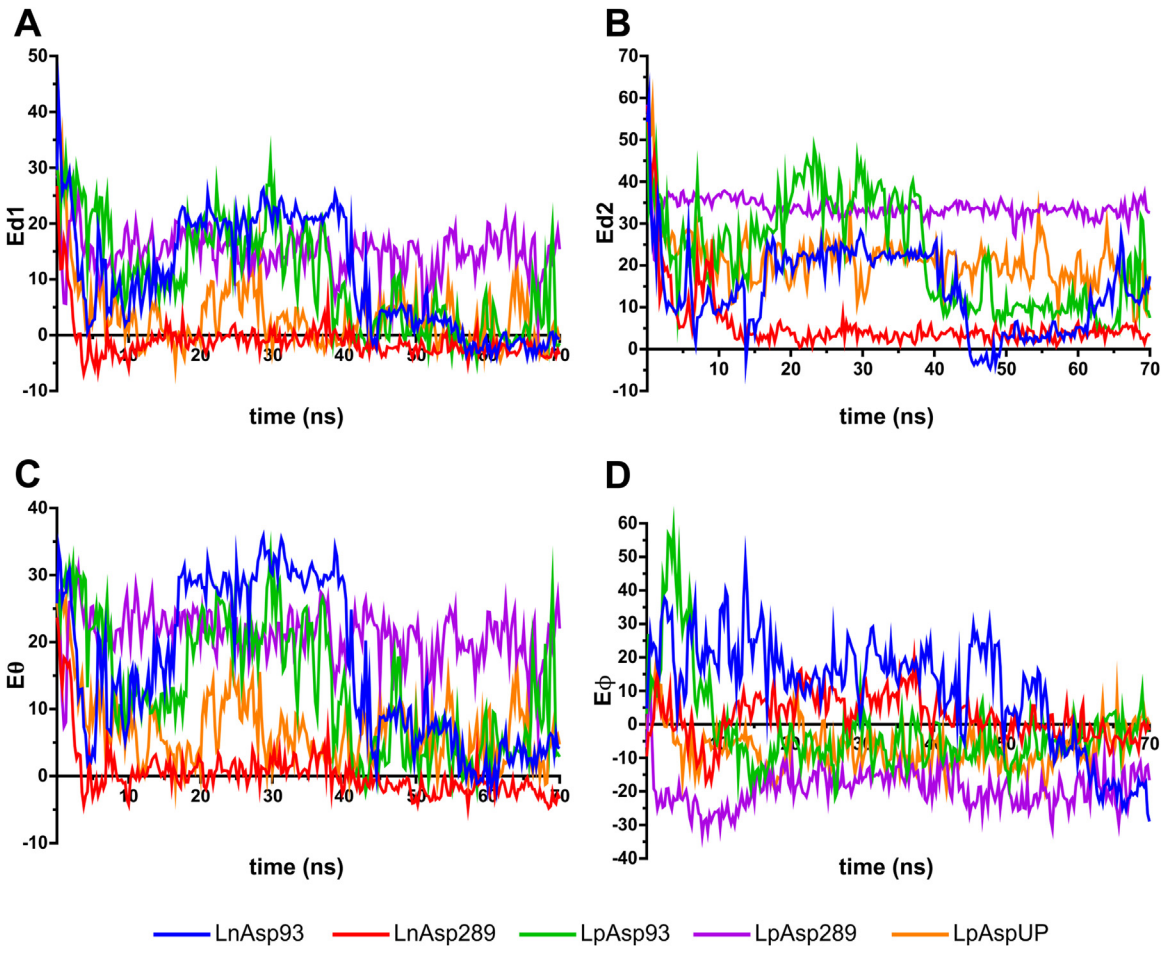


Fig. 4. Percent error over time with respect to the 2VNM crystal structure for the parameters which describe flap movement: **a)** d1 and **b)** d2 **c)** θ and **d)** ϕ. The plotted values are the mean values of each parameter for each 250 ps of simulation. The color code for the different configurations is shown at the bottom.

BACE1 conformation, which presents the lowest deviations with respect to the 2VNM crystal structure (the closed or inhibited form) of the five combinations of protonation states for the CM8-Asp pair studied, according to the protein-protein and protein-ligand parameters measured here (Fig. 2). As observed in Fig. 4 and Fig. 5, the LnAsp289 configuration is the only one which shows simultaneously low deviations. According to the values of Ed1 and Ed2, flap closure occurs within the first 7 ns, in the same time window as other inhibitors of BACE1, such as SC6 [11] and C222 [18]. For the Thr133-Ser386 distance, parameter d1, the values did not exceed 7% deviation after the first 5 ns with respect to the reference values (Fig. 4**A**). The values of d2 were significantly closer to the experimental value than the other configurations, exhibiting deviations around 5% after 15 ns of simulation and remaining at that level without large variation until the end of the trajectory (Fig. 5**B**). In addition, the dihedral D(Thr133.Asp93.Asp289.Ser386) displayed oscillations in deviation between −10% and 15% during the first 40 ns and afterward remaining near 0% until 70 ns (Fig. 4**D**). The stabilization of the closed conformation of β-secretase is explained by the formation and maintenance of BACE1-CM8 interactions over time. The flap closure permits the formation of a hydrogen bond between the amine group of the main chain of Thr133 with the oxygen atom of the carbonyl group, O3, in the P3 region of the HEA (Fig. 6). This interaction endures across the rest of the trajectory, as reflected by the values of Ed3, which maintained a deviation of around 10% (Fig. 5**A**). Additionally, the interaction between the hydroxyl group and the OD2 oxygen of Asp93 displayed constant values, with deviations not exceeding 10% (Fig. 5**B**). This reflects the importance of this interaction for the recognition and docking of HEAs to the active site of BACE1. Furthermore, the interactions that involve the amine motif of CM8 and the residues Asp289 and Gly95, d5 and d6, respectively, exhibited variations in the first 10 ns of the simulation, during the flap closure process. While the d5 deviations stayed around 10% (Fig. 5**C**), d6 climbed to 20% (Fig. 5**D**). In general, the pose adopted by the ligand was similar to the crystal structure pose, with small fluctuations toward the P'1 region of CM8 (Fig. 7).

3.1.3. *LpAsp93 configuration*

The LpAsp93 configuration models both the ligand and catalytic residue Asp93 as protonated species, that is, with a charged amine group and neutral carboxylic acid, respectively (Fig. 1). The protein displayed considerable deviations in different regions of the active site and the nearby residues, e.g. in the opposite-loop, 10s-loop, 113s-loop, and flap regions (**Supporting information**). In the opposite-loop region the segments before Ser386 and after Thr392 were conformationally similar to the crystal structure, in contrast with the more flexible Ser388-Gly391 segment. Furthermore, LpAsp93 resulted in the most marked conformational deviations in the 10s-loop and 133s-loop regions, with the particular developments in the Lys70-Gly74 and Phe170-Trp176 segments, respectively, standing out most. The flap displayed open-closed-open dynamics; it remained open for the first 40 ns, resulting in the highest distance values between 20 and 30 ns, as reflected in the values of Ed1, Ed2, and Edθ of approximately 20%, 40%, and 20%, respectively (Fig. 4). The closure process lasted about 20 ns, where the flap adopted a conformation similar to that

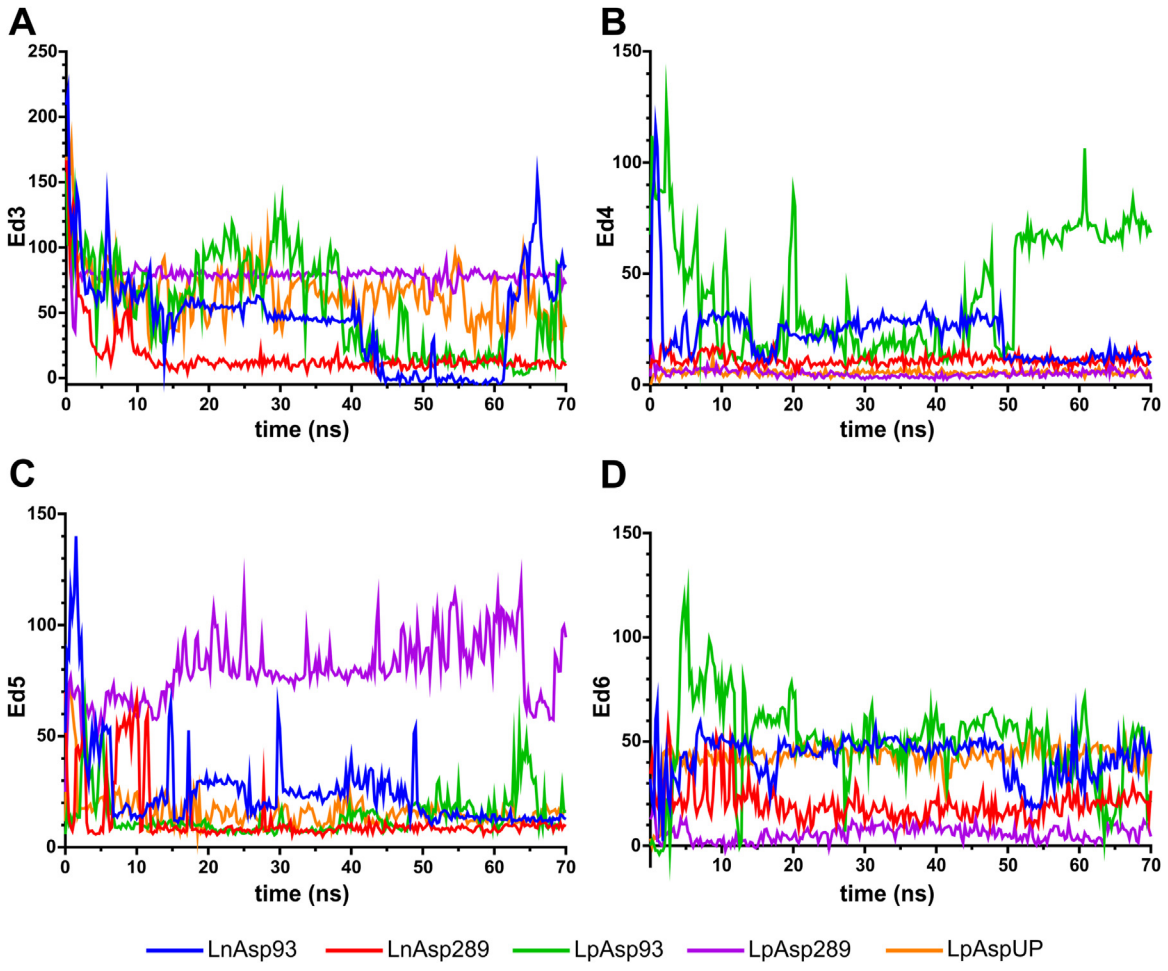


Fig. 5. Percent error over time with respect to the 2VNM crystal structure for the protein-ligand distances: **a)** d3, **b)** d4, **c)** d5 and **d)** d6. The plotted values are the mean values of each parameter for each 250 ps of simulation. The color code for the different configurations is shown at the bottom.

experimentally reported, as shown by the low deviations in the protein-protein parameters and supported visually by Fig. 6. In addition, the protein-ligand parameter d3, intended to measure the direct interaction of CM8 with the tip of the flap, displayed a significant decrease at the same time (Fig. 5**A**). The ligand, however, presented significant deviations from the experimental pose, especially in the P3, P'1, and P'2 regions throughout the simulation (Fig. 7), a product of the repulsion associated with the interaction of the hydroxyl fragment of the ligand (P'1) and the side chain of Asp93, reflected by the d5 protein-ligand distance deviation values, which were the highest of all the configurations simulated in this study (Fig. 5**B**). As a result, a rotation occurred in the N—C bond connecting the P'1 and P'2 regions of the ligand, causing the whole phenyl fragment, in the tail of CM8, to diverge considerably from the reference structures and increase the values for the distance involving the Gly95 residue, d6, to more than 50% (Fig. 5**D**). Additionally, it appeared that the inhibitor was displaced in the direction of the flap and the opposite-loop, explaining the conformational changes mentioned previously.

3.1.4. *LpAsp289 configuration*

The LpAsp289 model describes the monoprotonated state of the aspartic dyad, where the Asp289 residue is found protonated as well as the HEA inhibitor (Fig. 1). This configuration was characterized by the flap remaining open for the entire simulation (Fig. 4 and Fig. 6). LpAsp289 displayed the most noticeable deviations in the flap region, with average deviations of approximately 13%, 35%, 20%, and −20% in the parameters d1, d2, θ, and ϕ;, respectively. In addition, an increase in the interaction between the carbonyl group and the tip of the flap (Thr133) was observed, as seen in the increases in Ed3 to near 80% (Fig. 5**A**). The Lys168-Asn175 and Ser388-Thr392 sequences, in the 113s-loop and opposite-loop, respectively, presented considerable deviations throughout the trajectory (**Supporting information**). Similar to the LpAsp93 configuration, repulsive effects were observed near the P'1 region of CM8 which caused the inhibitor to be dislodged from the active site and the protein-ligand parameter deviations to increase, especially d5, which measures the distance from Asp289 to the amine motif of the ligand's P'1 region (Fig. 5**C**).

The results in the LpAsp93 and LpAsp289 configuration make clear that, when the HEA inhibitor is encountered as a charged amine species, in conjunction with whichever monoprotonated state of the aspartic dyad (protonation of either Asp93 or Asp289), the BACE1-HEA complex experiences marked conformational changes which diverge from the inhibited reference structure (the closed form of BACE1). Moreover, the simulations of these same protein-ligand configurations, starting from the closed structure of BACE1, lead to conformational changes in the active site and the neighboring regions, as well as the opening of the flap [28].

3.1.5. *LpAspUP configuration*

The LpAspUP configuration consists of the HEA with a charged amine group and the aspartic dyad in the doubly deprotonated state (Fig. 1). This model represents what would occur if 1) the

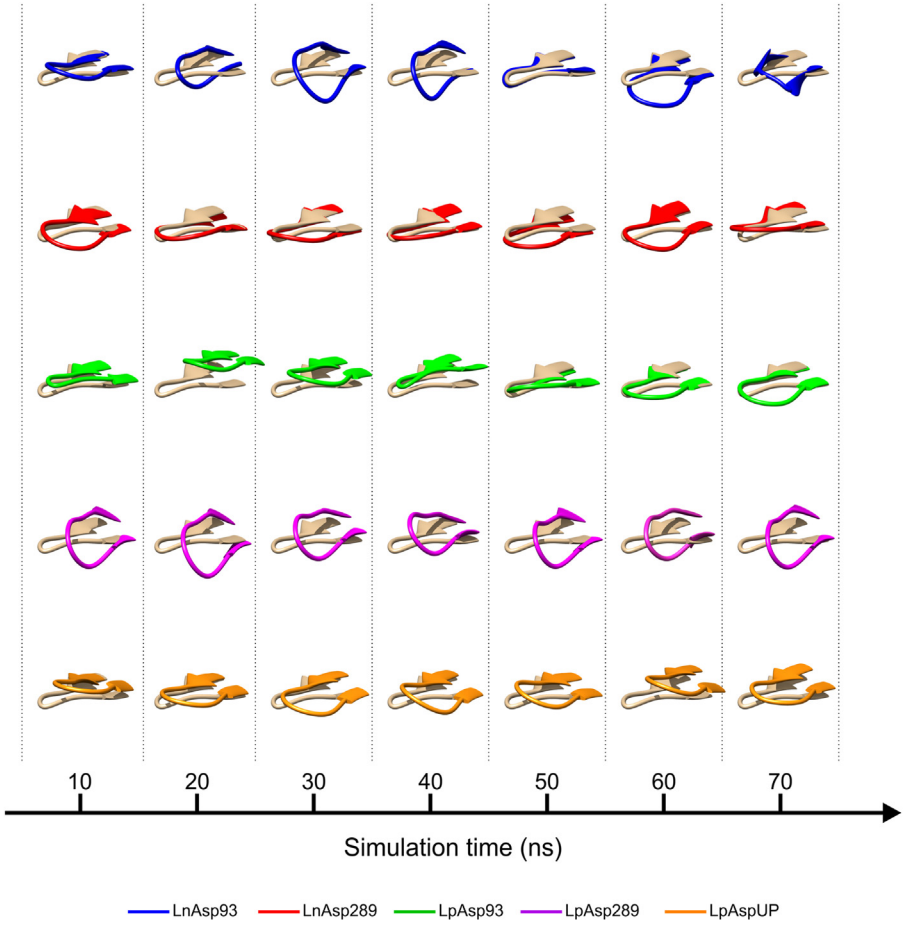


Fig. 6. Representative conformations of the flap for each protonation state configuration taken every 10 ns, superimposed on the 2VNM reference structure. The color code for the different configurations is shown at the bottom.

ligand is protonated in the aqueous medium and is encountered in this form by BACE1 in the AspUP state or 2) if the HEA protonation event occurs within BACE1, but before flap closure (i.e., open BACE1 conformation). This configuration is characterized by deviations in various areas of the active site of BACE1, such as the 10s-loop, 113s-loop, and opposite loop (Fig. 3). The 10s-loop adopted a conformation similar to the experimental one after 40 ns. The largest changes were seen in Lys70-Gly72 in the first 20 ns and in Gly72-Tyr75 in the next 15 ns of the simulation. The 113s-loop was quite flexible, especially the Ile171-Gln173 segment, during the whole trajectory. The Asp167-Phe170 segment showed small deviations with respect to the experimental structure in the first 50 ns. However, the 113s-loop experienced a general displacement in the last 20 ns of the trajectory. In the opposite loop, the changes were most prominent in the sequence Ser388-Gly391, especially the main chain of Thr390. Additionally, segments on either side (Ile385-Gln387 and Thr392-Val393) were found to be somewhat near those found in the crystal structure (**Supporting information**). The flap experienced conformational changes throughout the trajectory, principally in the segment Pro131-Gly135 (Fig. 6). In the first 30 ns, the movement was most pronounced in the residues Gln134-Gly135, but eventually the surrounding residues also began to move, and the flap remained open. Numerically, the values of Ed1 displayed a decrease in the percent deviation in the first 10 ns, fluctuating between 0 and 20% for the rest of the trajectory (Fig. 4**A**). These small deviations might seem to indicate that these conditions are conducive to flap closure. However, the values of Ed2 increased 20–30% (Fig. 4**B**), similar to those of Eθ(Fig. 4**C**) and Eϕ;(Fig. 4**D**), which represent a "twisting" motion which occurs in conjunction with the opening of the flap (Fig. 6). In support of this indication, there was a loss of interaction between the flap and the ligand, reflected by the values of Ed3, the deviation of the distance between Thr133 and the carbonyl group of CM8, rising to 50% (Fig. 5**A**). The ligand experienced a general displacement toward the 10s-loop region of the BACE1 active site, save the sultam region which remained oriented toward P2 as in the CM8 experimental pose (Fig. 7). The deviations were most obvious in the hydroxyethyl amine motif in P'1 and the Ph-CF3 group, in the P'2 tail, and were reflected in the increases in the interactions between the amine motif of the HEA isostere, such as the d6 distance, where the deviation is around 40% (Fig. 5**D**).

3.2. Population density analysis

3.2.1. Individual population density

The individual values of the population density (ρ) for the 5 configurations were evaluated within a tolerance range of 0 to 50%, using all of the 7000 MD simulation frames, as shown in Fig. 8. For the 4 deviation parameters employed to describe the flap dynamics, the majority of the population was found to be within a tolerance of 10% with respect to the experimental structure, the best configuration being LnAsp289 followed by LpAspUP in the d1, d2, θ, and ϕ; parameters, both of which structures have large populations within low levels of tolerance. In contrast, the LpAsp289 configuration required higher levels of tolerance (up to 40% in the case of ρ for d2) to reach a population of at least 80% of the MD trajectory frames. This result is consistent with the large deviations found for the LpAsp289 configuration with respect

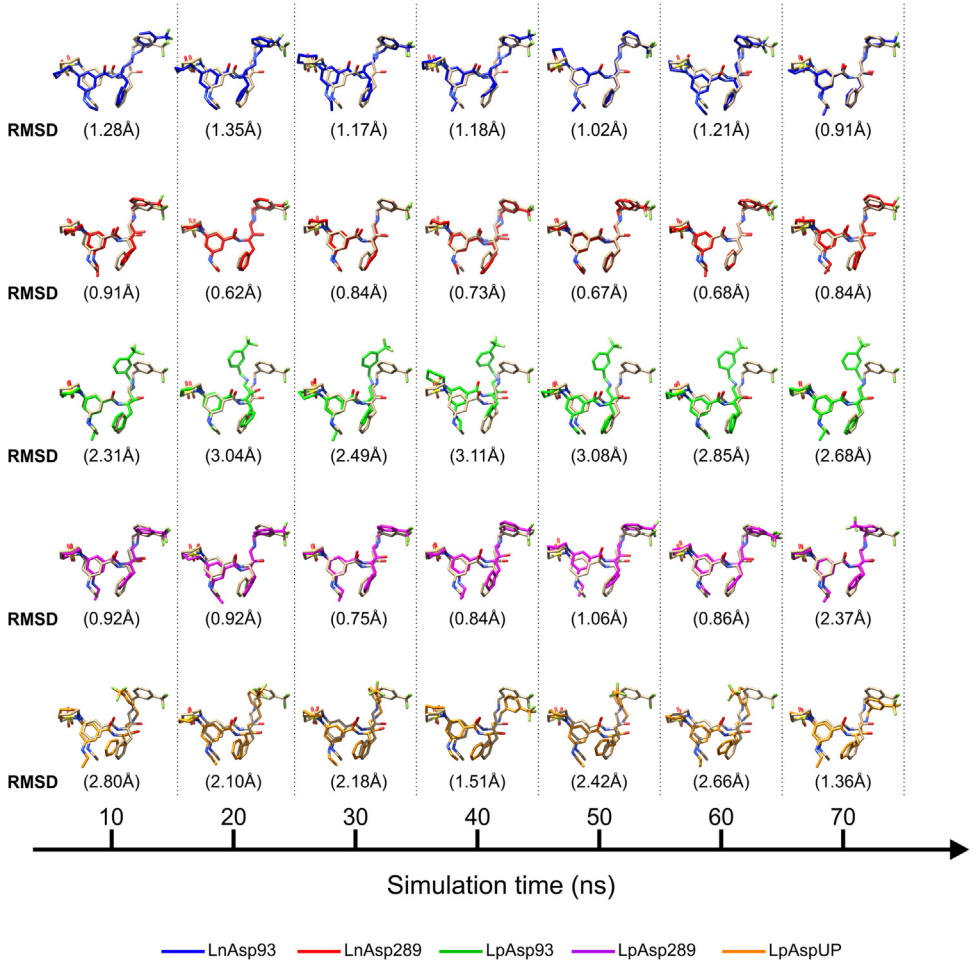


Fig. 7. Representative conformations of the ligand for each protonation state configuration taken every 10 ns, superimposed on the 2VNM reference structure. The color code for the different configurations is shown at the bottom.

to the flap dynamics parameters. According to these parameters, the order of configurations which best mimic the experimental configuration, after starting from the open BACE1 conformation, is LnAsp289 > LpAspUP > LnAsp93 > LpAsp93 > LpAsp289. Additionally, the parameters ρ(d2) and ρ(θ) proved themselves to be useful in finding significant differences in the conformational change experience by the active site, unlike ρ(ϕ;) which showed very similar population density tendencies for three configurations.

The population densities calculated using the BACE1-HEA parameters (ρ(d3), ρ(d4), ρ(d5), and ρ(d6)) provide interesting information about the manner in which the CM8 ligand is accommodated in the BACE1 active site. The first corresponds to the interaction between the flap and the carbonyl group of the ligand (d3 in Fig. 2) through a hydrogen bond which involves the main chain of Thr133. As seen in the figure for ρ(d3), the populations for the LnAsp93, LpAsp93, Lpasp289, and LpAspUP configurations are low, not exceeding 60% within a tolerance of 50%. This calls into question whether these configurations lose the capacity to form the aforementioned hydrogen bond (LpAsp289) or perhaps to maintain it over time (LnAsp93, LpAsp93, and LpAspUP). In addition, the LnAsp289 configuration again exhibited the most similar values to those of the experimental crystal structure, with a population near 80% at a tolerance of 20%. At this point is of prime importance to recall that in the first 8 ns the flap of the protein is closing and so it is expected that a portion of the population would not meet the criteria presented, even at high levels of tolerance. The analysis of ρ(d4), the population density for the hydrogen bond between the hydroxyl group of CM8 and the Asp93 residue, reveals that protonation of Asp93 leads to significant deviations from the reference structure values, as shown by the low populations of LnAsp93 and LpAsp93 compared with the other configurations evaluated. Furthermore, the population densities concerning the interaction between the amine group of CM8 and Asp289 in BACE1, namely ρ(5), indicate that protonation of Asp289 is not favorable when the ligand is also protonated (the Lp form of CM8), so much so that the population does not reach 5% within a tolerance of 50% deviation from the experimental values. For ρ(6), the population density of the interaction between the amine group of CM8 with the carbonyl of the main chain of Gly95, the configurations that involve a protonation of Asp93 (LnAsp93 and LpAsp93) and LpAspUP did not have populations of more than 20% within a tolerance of 30%. These data are consistent with the displacement and conformational changes experienced by the ligand in the active site in these conformations.

3.2.2. *Combined population density*

The implementation of this methodology in the determination of the most probable protonation states for HEAs and the aspartic dyad, after the arrival of the inhibitor at the active site of BACE1, which induces the change in conformation from Apo to closed form, requires the combination of protein-protein and protein-ligand parameters (Fig. 2); that is to say, parameters which correspond to flap closure as well as the interactions within the β-secretase active site. In this context, it was determined that the population density of the various configurations should simultaneously fulfill several

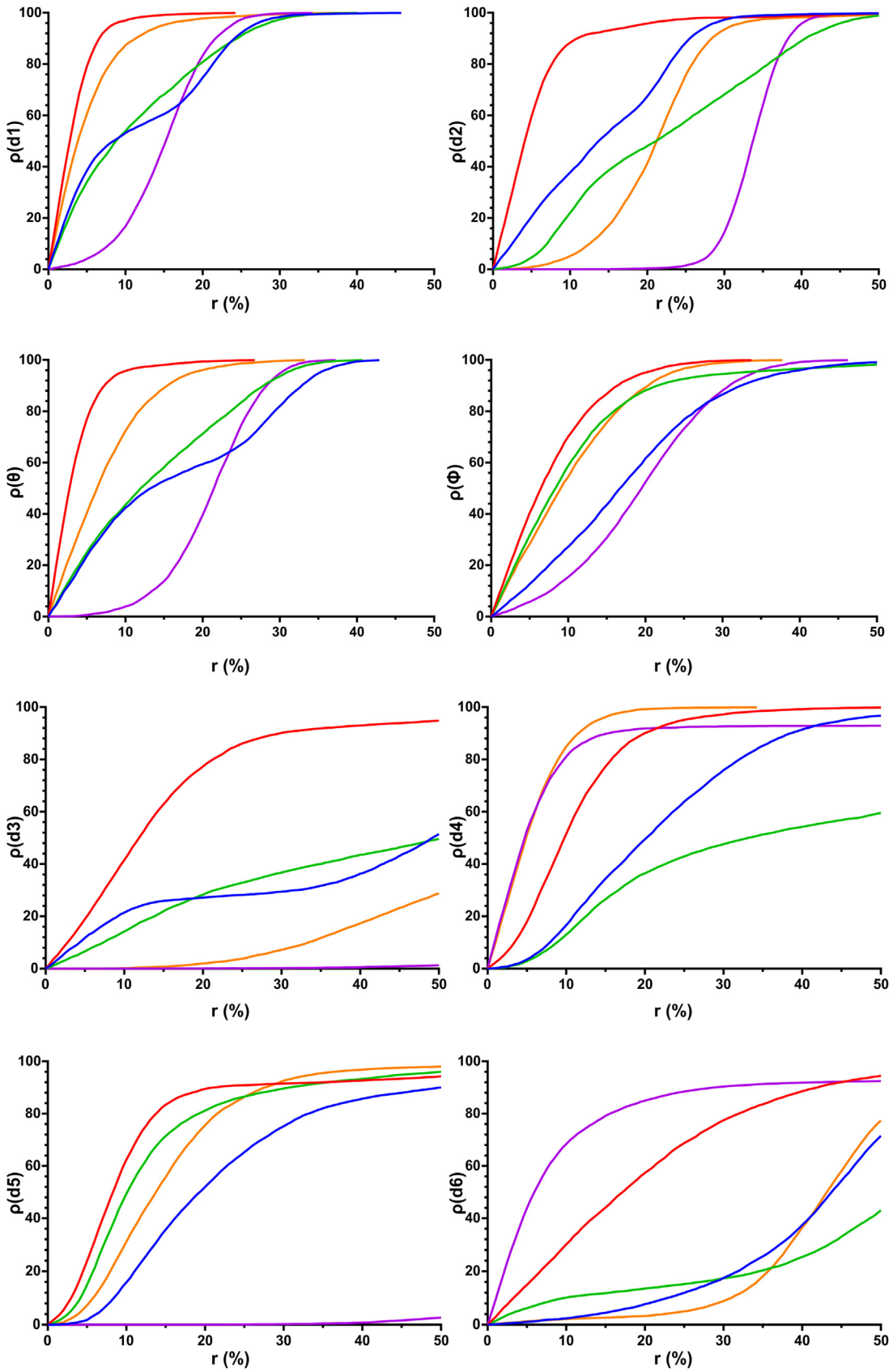


Fig. 8. Individual population densities for each parameter (d1,d2,θ,ϕ;,d3, d4, d5 and d6) vs the tolerance range. The measurements were made for each different configuration: LnAsp93 (blue), LnAsp289 (red), LpAsp93 (green), LpAsp289 (purple) and LpAspUP (orange).

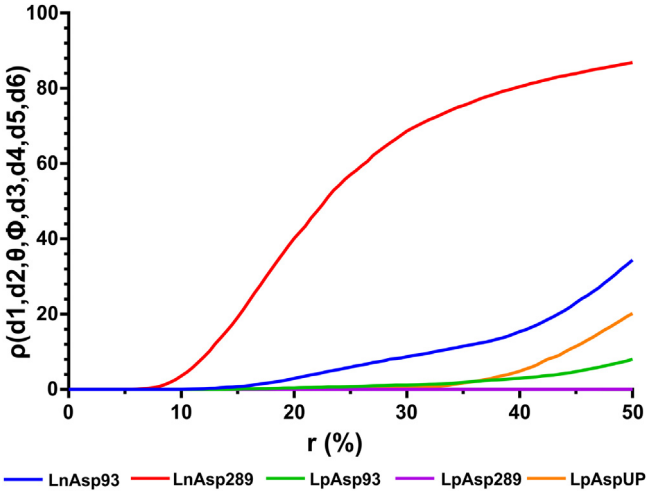


Fig. 9. Combined population density ρ(d1,d2, θ,ϕ;,d3, d4, d5 and d6) at different levels of tolerance: LnAsp93 (blue), LnAsp289 (red), LpAsp93 (green), LpAsp289 (purple) and LpAspUP (orange).

conditions, within a certain tolerance of deviation with respect to the crystal structure. Initially a mixture of all the parameters was used, i.e., the value of ρ(d1,d2,θ, ϕ;,d3,d4,d5,d6) was calculated (Fig. 9). The figure clearly shows that the LnAsp289 configuration stands out from the rest in this study. Within a tolerance of 20%, LnAsp289 was shown to have a population 13.70, 100.32, and 2809 times greater than the LnAsp93, LpAsp93, and LpAspUP configurations, respectively. Though some of these have good population densities for individual parameters, only LnAsp289 displayed consistent behavior in all the parameters described. Additionally, the population growth was restricted in large part by parameters d3 and d6 (Fig. 8). For the LnAsp289 configuration, at a tolerance of 10%, only 50% and 38% of the population fulfilled the requirements for d3 and d6, respectively, such that these act as limiting parameters on the total population density.

In an attempt to reduce the number of parameters but retain the characteristics previously described, group population densities were evaluated using different combinations of parameters (**Supporting information D**). It can be concluded that:

1. At least one parameter to describe the movement of the flap should be used, preferably d1 or d2
2. The use of d3 is essential because of the importance this interaction has in the inhibitory event of BACE1 by HEAs.
3. The use of at least one parameter sensitive to the protonation state of both species, i.e. d4, d5, and/or d6, is vital.

4.1. Initial events in HEA inhibition of BACE1

The analysis of the percent deviations and population density for the BACE1-HEA system independently confirm that the most probable protonation states for the ligand and aspartic dyad are neutral and protonated, respectively. This conclusion is based on the ability of the said configuration to adopt the closed, inhibited BACE1 active site conformation as well as the bioactive pose of CM8 found in the crystal structure with PDB ID 2VNM. It was also deduced that there must be ligand protonation event, as we have already reported previously using two different computational methods that the final protonation state of the closed form of BACE1 and CM8 is LpAspUP. Moreover, HEA protonation must occur within the active site of the β-secretase, since the configurations which model the ligand with a protonated amine group produce large conformational changes in the flap (Fig. 4 and Fig. 6), the active site, and the neighboring regions that do not allow the adoption of the closed, inhibited form of the BACE1-CM8 complex, experimentally reported, discrediting the possibility that the process might be external. Finally, the inability of the LpAspUP configuration to form and/or maintain the d3 interaction (Fig. 5**A**), vital in the inhibitory process of the β-secretase, starting from the open form of BACE1 suggests that the protonation process should be after flap closure. It can also be concluded that the inhibitory process begins when the neutral HEA enters the active site of the protease, which is found in the open form with the aspartic dyad protonated at Asp289. The formation of this complex leads to the closure of the flap in the first 8 ns and increased BACE1-HEA interaction. Some time later, the proton transfer from the Asp289 residue to the amine nitrogen atom in the HEA isostere will occur, reinforcing the stabilization of said complex. Furthermore, the comparison of the initial events of the inhibitory process among HEAs with different biological activities on BACE1 shows that inhibitory power can be initially be related with the ability of the inhibitor to dock and maintain interactions during the flap closure process (Table 1). Several vital distances in the BACE1-HEA interaction were measured using ligands of high (CM8, PDB ID: 2VNM, IC_{50}=2 nM [20]), moderate (PDB ID: 2VIE, IC_{50}=33 nM [52]) and low (PDB ID: 2VIY, IC_{50}=5400 nM [51]) inhibitory power, i.e. polar interactions with the residues Asp93, Gly95, Thr133, Asp289, Gly291, and Asn294. A graphical representation of these interactions for the 2VIE inhibitor can be found in **Supporting information E**. The polar heads of the ligands interacted with residue Asn294 in S2 (distance d7), the amide substituents of the ligands with Gly291 in S1 (distance d8), and the hydroxyethylamine motifs of the S'1 region with the aspartic dyad (distances d4 and d5 involving the Asp93 and Asp289 residues, respectively) and Gly95 (distance d6). The selected ligands had different heads (lactam or sultam, and aliphatic or cyclic, Table 1) as well as tails (aliphatic, phenyl-substituted, and polar). According to the measured parameters, the inclusion of a highly flexible aliphatic fragment (2VIY and 2VIE) prevents stabilization of the BACE1-HEA complex. The d7 distance measurements with the Asn294 residue returned values of 3 Å for the high- and moderate-activity ligands, while those of the low-activity 2VIY ligand fluctuated between 5.5 and 6.1 Å after 25 ns (Fig. 10**E**). Similarly, higher values of d8 (around 3.7 Å after 20 ns) were also found for 2VIY (Fig. 10**F**). The presence of an aliphatic tail in the S'2 region of the active site furthermore seems to affect the formation of important interactions which involve the amine nitrogen in the isostere region of hydroxyethylamines, such as those with Asp289 (Fig. 10**C**) and Gly95 (Fig. 10**D**), where a difference of at least 1 Å compared with the other ligands of the study is seen. Additionally, the measurement of the interaction with the tip of the flap (distance d3, Fig. 10**A**) showed that only 2VNM and 2VIY form a stable interaction. In the case of 2VIE, this interaction varies between 5 and 6 Å, on account of which the flap repeatedly opens and closes over the course of the MD simulation. On the other hand, all of the ligands displayed favorable interactions with the catalytic residue Asp93 (Fig. 10**B**), which could demonstrate their importance in the initial docking of the HEAs in the active site of the β-secretase. It is important to mention that only the ligand with high inhibitory power, CM8, showed low and constant values in the 6 measured interactions jointly, which might therefore constitute a necessary condition to be a good inhibitor of the protease BACE1.

The findings in this scientific work demonstrate the importance of the arrival of the ligand at the BACE1 active site and, in addition, the use of appropriate parameters for the determination of the protonation states of other families of inhibitors in complex with BACE1, other aspartyl proteases, or proteins in general. The MD simulations of HEAs docked to BACE1 in the Apo form could be used in virtual screening and the design of new leader compounds. Future exploration of residue-ligand interaction energies

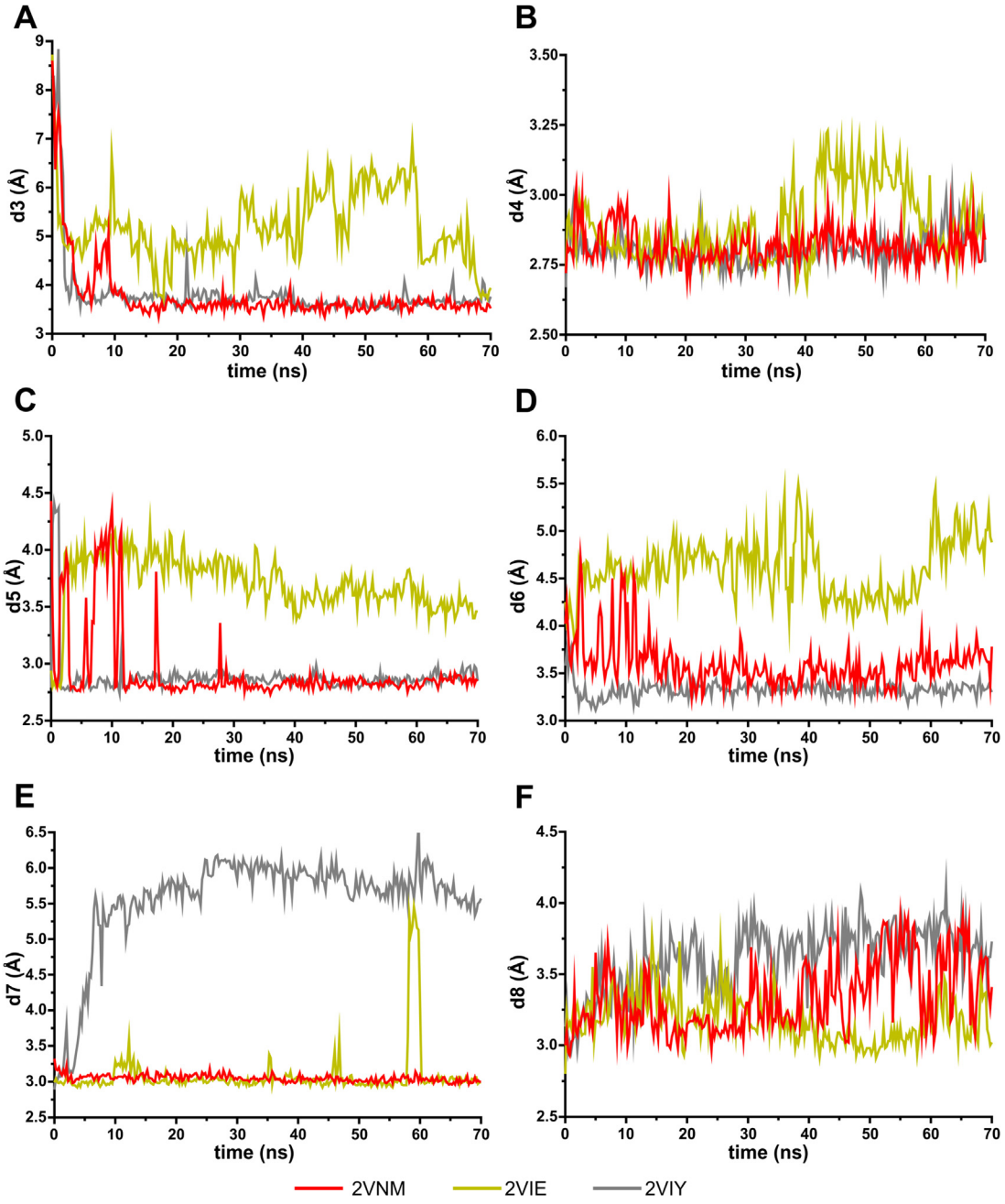


Fig. 10. Measured values for the d3, d4, d5, d6, d7 and d8 distance parameters for the 2VNM, 2VIE, and 2VIY ligands of high, moderate, and low inhibitory activity, respectively, in complex with BACE1. The plotted values are the mean values of each parameter for each 250 ps of simulation. The color code is shown at the bottom.

during the docking process will provide more clues to the inhibitory process of BACE1 by hydroxyethylamines.

5. Conclusions

The present study has determined the most probable initial configuration of protonation states of BACE1 and HEA, which results in the conformational change from the Apo to the closed form of the protein. Molecular dynamics simulations of 70 ns for 5 combinations of the BACE1-HEA complex were evaluated. The co-crystalized BACE1 complex in the closed form together with a high-inhibitory activity ligand (CM8) was employed as a reference system (PDB ID: 2VNM). As a result of the analysis of the percent deviation of different protein-protein and protein-ligand parameters, with respect to the crystal structure, it was found that the LnAsp289 configuration (HEA neutral and Asp289 protonated) is most probable. Moreover, population density using different combinations of parameters gave the same result. Additionally, molecular dynamics simulations of other HEAs with different structures and biological activities suggest that ligand inhibitory power could be associated with its capacity to establish and maintain protein-ligand interactions with important residues in the active site of the β-secretase, such as Asp93, Gly95, Thr133, Gly291, and Asn294.

It is also worth mentioning that the methodology used for this study provides a new perspective for the analysis and virtual screening of potential candidates to be BACE1 inhibitors. What is more, its use can be extended for the analysis of similar processes in other types of aspartases and other types of proteins in gen-

eral which develop conformational changes due to their interaction with ligands to finally form biologically active complexes.

Acknowledgments

This research was supported by the 2014 initiative of the Vice-Rector of Universidad de Cartagena for funding research projects through the 7th annual convocation #02200. We are very grateful to our university for funding and supporting science activities internally. Additionally we want to thank Professor Julio Cesar Hernández Arzusa for his assistance as mathematics advisor for the population density concept.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.jmgm.2016.10.006.

References

[1] G. Evin, Future therapeutics in alzheimer's disease: development status of BACE inhibitors, BioDrugs 30 (2016) 173–194.
[2] C. Reitz, R. Mayeux, Alzheimer disease: epidemiology diagnostic criteria, risk factors and biomarkers, Biochem. Pharmacol. 88 (2014) 640–651.
[3] R. Vassar, BACE1 inhibitor drugs in clinical trials for Alzheimer's disease, Alzheimer's Res. Ther. 6 (2014) 1–14.
[4] R. Li, K. Lindholm, L.B. Yang, X. Yue, M. Citron, R. Yan, T. Beach, L. Sue, M. Sabbagh, H. Cai, P. Wong, D. Price, Y. Shen, Amyloid β peptide load is correlated with increased β-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101 (2004) 3632–3637.
[5] A. Serrano-Pozo, M.P. Frosch, E. Masliah, B.T. Hyman, Neuropathological alterations in Alzheimer disease, Cold Spring Harb. Perspect. Med. 1 (2011) a006189.
[6] L. Hong, G. Koelsch, X. Lin, S. Wu, S. Terzyan, A.K. Ghosh, X.C. Zhang, J. Tang, Structure of the protease domain of memapsin 2 (beta-secretase) complexed with inhibitor, Science 290 (2000) 150–153.
[7] A.A. Gorfe, A. Caflisch, Functional plasticity in the substrate binding site of beta-secretase, Structure 13 (2005) 1487–1498.
[8] S. Mishra, A. Caflisch, Dynamics in the active site of β-secretase: a network analysis of atomistic simulations, Biochemistry 50 (2011) 9328–9339.
[9] L. Hong, J. Tang, Flap position of free memapsin 2 β(-Secretase), a model for flap opening in aspartic protease catalysis, Biochemistry 43 (2004) 4689–4695.
[10] Y. Xu, M.J. Li, H. Greenblatt, W. Chen, A. Paz, O. Dym, Y. Peleg, T. Chen, X. Shen, J. He, H. Jiang, I. Silman, J.L. Sussman, Flexibility of the flap in the active site of BACE1 as revealed by crystal structures and molecular dynamics simulations, Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 68 (2012) 13–25.
[11] A. Barman, S. Schürer, R. Prabhakar, Computational modeling of substrate specificity and catalysis of the β-secretase (BACE1) enzyme, Biochemistry 50 (2011) 4337–4349.
[12] S. Chakraborty, S. Basu, Structural insight into the mechanism of amyloid precursor protein recognition by beta-secretase 1: a molecular dynamics study, Biophys. Chem. 202 (2015) 1–12.
[13] M. Mahanti, S. Bhakat, U.J. Nilsson, P. Soderhjelm, Flap dynamics in aspartic proteases: a computational perspective, Chem. Biol. Drug. Des. 88 (2016) 159–177.
[14] R. Ishima, J.M. Louis, A diverse view of protein dynamics from NMR studies of HIV-1 protease flaps, Proteins 70 (2008) 1408–1415.
[15] Y. Cai, N. Kurt Yilmaz, W. Myint, R. Ishima, C.A. Schiffer, Differential flap dynamics in wild-Type and a drug resistant variant of HIV-1 protease revealed by molecular dynamics and NMR relaxation, J. Chem. Theor. Comput. 8 (2012) 3452–3462.
[16] V. Hornak, A. Okur, R.C. Rizzo, C. Simmerling, HIV-1 protease flaps spontaneously open and reclose in molecular dynamics simulations, Proc. Natl. Acad. Sci. 103 (2006) 915–920.
[17] W. Karubiu, S. Bhakat, L. McGillewie, M.E.S. Soliman, Flap dynamics of plasmepsin proteases: insight into proposed parameters and molecular dynamics, Mol. Biosyst. 11 (2015) 1061–1066.
[18] H.M. Kumalo, S. Bhakat, M.E. Soliman, Investigation of flap flexibility of beta-secretase using molecular dynamic simulations, J. Biomol. Struct. Dyn. 34 (2016) 1008–1019.
[19] H.M. Kumalo, M.E. Soliman, A comparative molecular dynamics study on BACE1 and BACE2 flap flexibility, J. Recept. Signal Transduct. Res. 36 (2016) 505–514.
[20] N. Charrier, B. Clarke, L. Cutler, E. Demont, C. Dingwall, R. Dunsdon, P. East, J. Hawkins, C. Howes, I. Hussain, P. Jeffrey, G. Maile, R. Matico, J. Mosley, A. Naylor, A. O'Brien, S. Redshaw, P. Rowland, V. Soleil, K.J. Smith, S. Sweitzer, P. Theobald, D. Vesey, D.S. Walter, G. Wayne, Second generation of hydroxyethylamine BACE-1 inhibitors: optimizing potency and oral bioavailability, J. Med. Chem. 51 (2008) 3313–3317.
[21] A.P. Truong, G. Tóth, G.D. Probst, J.M. Sealy, S. Bowers, D.W.G. Wone, D. Dressen, R.K. Hom, A.W. Konradi, H.L. Sham, J. Wu, B.T. Peterson, L. Ruslim, M.P. Bova, D. Kholodenko, R.N. Motter, F. Bard, P. Santiago, H. Ni, D. Chian, F. Soriano, T. Cole, E.F. Brigham, K. Wong, W. Zmolek, E. Goldbach, B. Samant, L. Chen, H. Zhang, D.F. Nakamura, K.P. Quinn, T.A. Yednock, J.-M. Sauer, Design of an orally efficacious hydroxyethylamine (HEA) BACE-1 inhibitor in a preclinical animal model, Bioorg. Med. Chem. Lett. 20 (2010) 6231–6236.
[22] A.K. Ghosh, H.L. Osswald, BACE1 β(-secretase) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease, Chem. Soc. Rev. 43 (2014) 6765–6813.
[23] H. Park, S. Lee, Determination of the active site protonation state of β-Secretase from molecular dynamics simulation and docking experiment: implications for structure-based inhibitor design, J. Am. Chem. Soc. 125 (2003) 16416–16422.
[24] R. Rajamani, C.H. Reynolds, Modeling the protonation states of the catalytic aspartates in β-Secretase, J. Med. Chem. 47 (2004) 5159–5166.
[25] N. Yu, S.A. Hayik, B. Wang, N. Liao, C.H. Reynolds, K.M. Merz, Assigning the protonation states of the key aspartates in β-secretase using QM/MM X-ray structure refinement, J. Chem. Theor. Comput. 2 (2006) 1057–1069.
[26] F. Sussman, J.M. Otero, M.C. Villaverde, M. Castro, J.L. Domínguez, L. González-Louro, R.J. Estévez, J.C. Estévez, On a possible neutral charge state for the catalytic dyad in β-secretase when bound to hydroxyethylene transition state analogue inhibitors, J. Med. Chem. 54 (2011) 3081–3085.
[27] C.R. Ellis, J. Shen, pH-Dependent population shift regulates BACE1 activity and inhibition, J. Am. Chem. Soc. 137 (2015) 9543–9546.
[28] C. Gueto-Tettay, R. Pestana-Nobles, J.C. Drosos-Ramirez, Determination of the protonation state for the catalytic dyad in beta-secretase when bound to hydroxyethylamine transition state analogue inhibitors: a molecular dynamics simulation study, J. Mol. Graph. Model. 66 (2016) 155–167.
[29] D.A. Sabbah, H.A. Zhong, Modeling the protonation states of β-secretase binding pocket by molecular dynamics simulations and docking studies, J. Mol. Graph. Model. 68 (2016) 206–215.
[30] A. Barman, R. Prabhakar, Protonation states of the catalytic dyad of β-Secretase (BACE1) in the presence of chemically diverse inhibitors: a molecular docking study, J. Chem. Inf. Model. 52 (2012) 1275–1287.
[31] M. Hernandez-Rodriguez, J. Correa-Basurto, A. Gutierrez, J. Vitorica, M.C. Rosales-Hernandez, Asp32 and Asp 228 determine the selective inhibition of BACE1 as shown by docking and molecular dynamics simulations, Eur. J. Med. Chem. (2016), http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.08.028.
[32] C. Gueto-Tettay, J.C. Drosos, R. Vivas-Reyes, Quantum mechanics study of the hydroxyethylamines-BACE-1 active site interaction energies, J. Comput. Aided Mol. Des. 25 (2011) 583–597.
[33] S. Patel, L. Vuillard, A. Cleasby, C.W. Murray, J. Yon, Apo and inhibitor complex structures of BACE (beta-secretase), J. Mol. Biol. 343 (2004) 407–416.
[34] B. Webb, A. Sali, Comparative protein structure modeling using MODELLER, Curr. Protoc. Bioinformatics 47 (2014) 1–32.
[35] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis, J. Comput. Chem. 25 (2004) 1605–1612.
[36] R. Huey, G.M. Morris, A.J. Olson, D.S. Goodsell, A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation, J. Comput. Chem. 28 (2007) 1145–1152.
[37] G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson, AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility, J. Comput. Chem. 30 (2009) 2785–2791.
[38] W.D. Cornell, P. Cieplak, C.I. Bayly, I.R. Gould, K.M. Merz, D.M. Ferguson, D.C. Spellmeyer, T. Fox, J.W. Caldwell, P.A. Kollman, A second generation force field for the simulation of proteins nucleic acids, and organic molecules, J. Am. Chem. Soc. 117 (1995) 5179–5197.
[39] H.J.C. Berendsen, D. van der Spoel, R. van Drunen, GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation, Comput. Phys. Commun. 91 (1995) 43–56.
[40] D. Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A.E. Mark, H.J.C. Berendsen, GROMACS: Fast flexible, and free, J. Comput. Chem. 26 (2005) 1701–1718.
[41] S. Pronk, S. Páll, R. Schulz, P. Larsson, P. Bjelkmar, R. Apostolov, M.R. Shirts, J.C. Smith, P.M. Kasson, D. van der Spoel, B. Hess, E. Lindahl, GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit, Bioinformatics (2013).
[42] J. Wang, R.M. Wolf, J.W. Caldwell, P.A. Kollman, D.A. Case, Development and testing of a general amber force field, J. Comput. Chem. 25 (2004) 1157–1174.
[43] J. Wang, W. Wang, P.A. Kollman, D.A. Case, Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations, J. Mol. Graph. Model. 25 (2006) 247–260.
[44] A.W. Sousa da Silva, W.F. Vranken, ACPYPE – AnteChamber PYthon parser interfacE, BMC Res. Notes 5 (2012) 1–8.
[45] M.W. Mahoney, W.L. Jorgensen, A five-site model for liquid water and the reproduction of the density anomaly by rigid: nonpolarizable potential functions, J. Chem. Phys. 112 (2000) 8910–8922.
[46] B. Hess, H. Bekker, H.J.C. Berendsen, J.G.E.M. Fraaije, LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations, J. Comput. Chem. 18 (1997) 1463–1472.
[47] S. Miyamoto, P.A. Kollman, Settle: an analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models, J. Comput. Chem. 13 (1992) 952–962.
[48] T. Darden, D. York, L. Pedersen, Particle mesh Ewald: an N·log(N) method for Ewald sums in large systems, J. Chem. Phys. 98 (1993) 10089.

[49] D.M. York, A. Wlodawer, L.G. Pedersen, T.A. Darden, Atomic-level accuracy in simulations of large protein crystals, P. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994) 8715–8718.
[50] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: visual molecular dynamics, J. Mol. Graph. 14 (1996) 33–38 (27-38).
[51] B. Clarke, E. Demont, C. Dingwall, R. Dunsdon, A. Faller, J. Hawkins, I. Hussain, D. MacPherson, G. Maile, R. Matico, P. Milner, J. Mosley, A. Naylor, A. O'Brien, S. Redshaw, D. Riddell, P. Rowland, V. Soleil, K.J. Smith, S. Stanway, G. Stemp, S. Sweitzer, P. Theobald, D. Vesey, D.S. Walter, J. Ward, G. Wayne, BACE-1 inhibitors part 1: identification of novel hydroxy ethylamines (HEAs), Bioorg. Med. Chem. Lett. 18 (2008) 1011–1016.
[52] B. Clarke, E. Demont, C. Dingwall, R. Dunsdon, A. Faller, J. Hawkins, I. Hussain, D. MacPherson, G. Maile, R. Matico, P. Milner, J. Mosley, A. Naylor, A. O'Brien, S. Redshaw, D. Riddell, P. Rowland, V. Soleil, K.J. Smith, S. Stanway, G. Stemp, S. Sweitzer, P. Theobald, D. Vesey, D.S. Walter, J. Ward, G. Wayne, BACE-1 inhibitors part 2: identification of hydroxy ethylamines (HEAs) with reduced peptidic character, Bioorg. Med. Chem. Lett. 18 (2008) 1017–1021.
[53] N.F. Bras, P.A. Fernandes, M.J. Ramos, Molecular dynamics studies on both bound and unbound renin protease, J. Biomol. Struct. Dyn. 32 (2014) 351–363.
[54] O.A. Arodola, M.E. Soliman, Molecular dynamics simulations of ligand-Induced flap conformational changes in cathepsin-D-A comparative study, J. Cell. Biochem. 117 (2016) 2643–2657.

Anexo XVI. Publicación Científica #3

Journal of Molecular Graphics and Modelling 76 (2017) 274–288

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular Graphics and Modelling

journal homepage: www.elsevier.com/locate/JMGM

A PM7 dynamic residue-ligand interactions energy landscape of the BACE1 inhibitory pathway by hydroxyethylamine compounds. Part I: The flap closure process

Carlos Gueto-Tettay*, Alejandro Martinez-Consuegra, Joshua Zuchniarz, Luis Roberto Gueto-Tettay, Juan Carlos Drosos-Ramírez*

Grupo de Química Bioorgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia

ARTICLE INFO

Article history:
Received 18 October 2016
Received in revised form 10 July 2017
Accepted 11 July 2017
Available online 14 July 2017

Keywords:
BACE1
Hydroxyethylamine
Flap
PM7
MOPAC
Interaction energy
GROMACS
Molecular dynamics

ABSTRACT

BACE1 is an enzyme of scientific interest because it participates in the progression of Alzheimer's disease. Hydroxyethylamines (HEAs) are a family of compounds which exhibit inhibitory activity toward BACE1 at a nanomolar level, favorable pharmacokinetic properties and oral bioavailability. The first step in the inhibition of BACE1 by HEAs consists of their entrance into the protease active site and the resultant conformational change in the protein, from Apo to closed form. These two conformations differ in the position of an antiparallel loop (called the flap) which covers the entrance to the catalytic site. For BACE1, closure of this flap is vital to its catalytic activity and to inhibition of the enzyme due to the new interactions thereby formed with the ligand. In the present study a dynamic energy landscape of residue-ligand interaction energies (ReLIE) measured for 112 amino acids in the BACE1 active site and its immediate vicinity during the closure of the flap induced by 8 HEAs of different inhibitory power is presented. A total of 6.272 million ReLIE calculations, based on the PM7 semiempirical method, provided a deep and quantitative view of the first step in the inhibition of the aspartyl protease. The information suggests that residues Asp93, Asp289, Thr292, Thr293, Asn294 and Arg296 are anchor points for the ligand, accounting for approximately 45% of the total protein-ligand interaction. Additionally, flap closure improved the BACE1-HEA interaction by around 25%. Furthermore, the inhibitory activity of HEAs could be related to the capacity of these ligands to form said anchor point interactions and maintain them over time: the lack of some of these anchor interactions delayed flap closure or impeded it completely, or even caused the flap to reopen. The methodology employed here could be used as a tool to evaluate future structural modifications which lead to improvements in the favorability and stability of BACE1-HEA ReLIEs, aiding in the design of better inhibitors.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the primary cause of dementia in persons over 60 years of age, characterized by the progressive loss of memory and other cognitive functions and resulting eventually in death [1–3]. The specific, principal pathological marker of AD is the presence of extracellular amyloid plaques [4,5], which accompany other features common to many neurodegenerative diseases, such as the accumulation of neurofibrillary tangles (NFTs) [1,6,7]. These plaques are composed primarily of Amyloid beta (Aβ) peptides 40–43 amino acids long [8], which aggregate extracellularly and produce the cytotoxic effects associated with AD [1,3,9,10]. Aβ peptide is produced by proteolytic processing of Amyloid Precursor Protein (APP) by a pair of proteases, β- and γ-secretase [11,12]; current efforts are focused on modulating the activity of the first, also known as Memapsin 2 or BACE1 [13], because of its role in the rate-limiting step of the process [1,4,10,14–18]. A catalytic dyad of Asp93 and Asp289 is present in the active site of BACE1 [13] and is covered by a hairpin loop known as the flap, which regulates the entrance of substrates or inhibitors to this and other aspartyl proteases [19–23], such as Renin [24], Plasmepsin II [25], Cathepsin D [26,27], BACE2 [28], and HIV protease [29–31]. When the protein is found in its inactive (Apo) form, the flap is open, allowing molecules to enter the active site. The resultant macromolecular system is stabilized by the eventual closure of the flap which leads to BACE1's

* Corresponding authors.
E-mail addresses: carlosgueto@gmail.com (C. Gueto-Tettay), jdrososr@unicartagena.edu.co (J.C. Drosos-Ramírez).

http://dx.doi.org/10.1016/j.jmgm.2017.07.010
1093-3263/© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

catalytic activity or else its inhibition [19–22,32–35]. Additionally, it has been reported that the protonation state of the aspartic dyad depends on the chemical nature of the different families of entering substrates or inhibitors, indicating different possible avenues for the catalytic activity or inhibition of BACE1 [34,36–44].

We previously reported the inhibitory pathway of BACE1 by hydroxyethylamines (HEAs) [45–47], a family of powerful inhibitors of β-secretase which exhibit desirable pharmacokinetic properties and oral bioavailability [16,48–58]. The Molecular Dynamics (MD) simulation results and population density analysis together suggested that HEAs enter the BACE1 active site (Apo form) as neutral amines, while the catalytic dyad is in an anionic, or monoprotonated, state (the side chains of Asp93 and Asp289 are a charged and neutral carboxylic acid, respectively) [46]. This combination of BACE1-HEA protonation states, called LnAsp289, induces flap closure and the adoption of structural conformations similar to those observed in closed-form X-ray structures in both the protein and the ligand. The process could terminate with a proton transfer from Asp289 to the amine nitrogen, located in the core of the HEA (Table 1). The new protonation state of the system is LpAspUP (HEA as a protonated amine and both aspartic residues deprotonated), as suggested by study of homodesmic reactions [47] and confirmed by MD simulations through the use of static and dynamic protein-ligand parameters [45]. Differences among the HEAs in their inhibitory activity toward BACE1 could be related to their initial affinity for the active site of the protein and, furthermore, their capacity to induce flap closure [46]. As a result, a study of the influence of HEA structural variations on flap closure in BACE1 could offer more information to aid the design of better pharmaceutic inhibitors of β-secretase.

To address this question, in the present investigation MD simulations of the BACE1 flap closure process induced by 8 HEAs of different inhibitory power (Table 1) were performed [49–52,54]. The results of this study do not intend to establish a quantitative mathematical relationship between different values of biological activity of BACE1 inhibitors and the electronic or geometric parameters measured, but instead to depict extensively, with physical chemistry support, the peculiarities that chemically determine the variation of these levels of activity. With this in mind it is worth noting that the capacity of the HEAs to induce an effective closing of the flap is related to its inhibitory power toward BACE1. The analysis of the energetic and structural data obtained suggest that inhibitory activity is related to the ability to form and maintain protein-ligand interactions, especially those considered to be anchor point interactions, which involve residues Asp93, Asp289, Thr292, Thr293, Asn294 and Arg296. Per the residue-ligand interaction energies (ReLIE) calculated by the semiempirical PM7 method (SQM-PM7) [59–61], anchor interactions account for approximately 45% of the sum of the ReLIEs (ε_T). Flaws in these interactions, due to the steric and electronic properties of the substituents at the head and tail of the HEAs, lead to the destabilization of the BACE1-HEA system, which is primarily reflected by delay or impediment of flap closure and/or reopening of the same. The values of ε_T for the systems involving the HEAs with greatest inhibitory activity of the study set, H1 and H2, demonstrated that the conformational change of BACE1 from Apo to closed form leads to an improvement of approximately 25% in the total protein-ligand interaction. Furthermore, these ligands were the only ones which produced an effective flap closure, that is to say that these ligands simultaneously displayed small deviations in protein–protein and protein-ligand parameters with respect to the experimental means calculated from 18 BACE1-HEA crystal complexes [49–56]. To our knowledge this is the first time that the estimation of the energy contribution of the flap closure, on a BACE1-HEA system, in terms of interaction energies and using a method based on quantum mechanics (PM7), has been reported. The findings of this study could lead to the development of virtual screening tools to assist in the design of better HEA inhibitors of BACE1.

2. Methodology

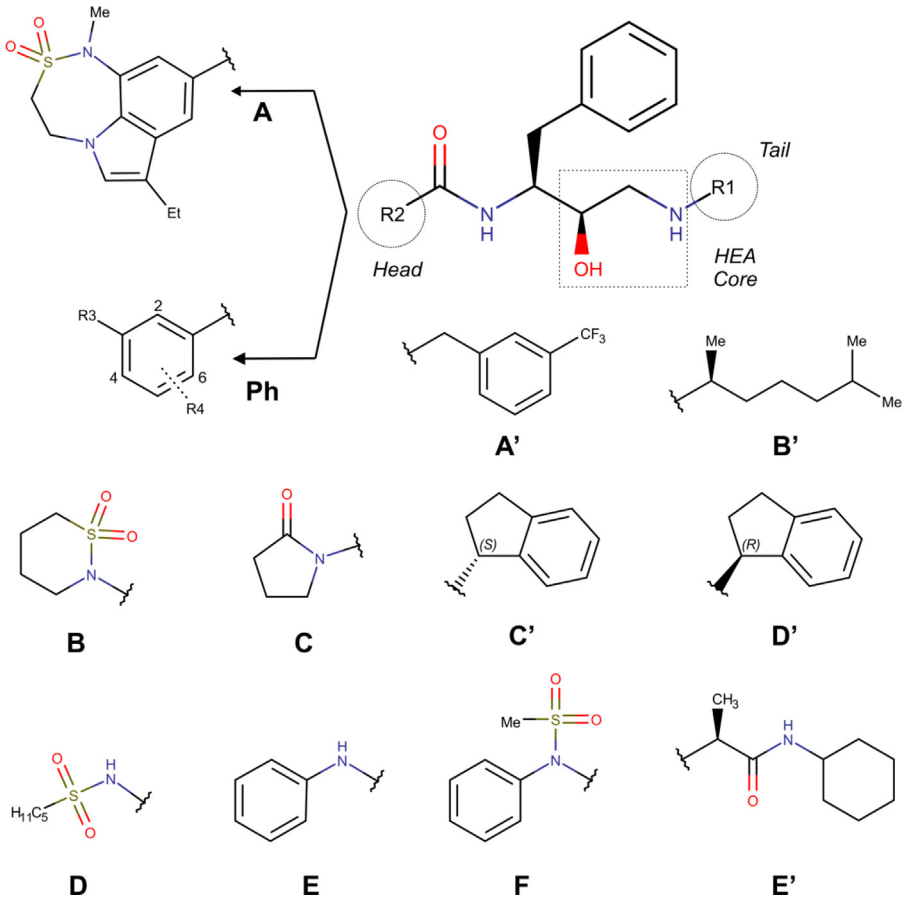
2.1. Molecular dynamics simulations

The structure for BACE1 in Apo form was downloaded from the Protein Data Bank (www.rcsb.org) [62] under the code 1W50 [63]. The MODELLER program [64] was used to add and optimize the missing segment *Insert A* (Gly217-Ala229), after aligning the isoform A sequence of BACE1 (Uniprot ID: P56817-1) with 1W50 and the segment of interest of another X-ray structure (PDB ID: 1FKN) [13], using UCSF Chimera as a graphical interface [65]. Furthermore, the BACE1 canonical sequence was used as reference for the main chain numbering, so the residue numbers assigned to the catalytic aspartic dyad were Asp93 and Asp289, respectively [46]. The side chains of the ionizable residues Glu, Asp (except Asp289), Lys and Arg were modelled charged, while those of His were kept neutral. This approach is identical to that used in our prior reports [45,46]. Additionally, the starting structures of the 8 HEAs of the study of low (L1 [51], L2 [52], L3 [54] and L4 [52]), moderate (M1[52] and M2 [54]) and high (H1 [50] and H2 [49]) inhibitory power toward BACE1 were created using structures of HEAs co-crystallized with BACE1 as templates, such as 2VIY [51], 2VIE [52], 2VNM [49] and 2WF1 [50]. The biological activity of these compounds was determined under identical conditions by GlaxoSmithKline (GSK) [49–52,54]. Table 1 shows the identities of the HEAs and their inhibitory activities against BACE1.

The first step in the inhibition of BACE1 by HEAs was modelled in the LnAsp289 configuration, such that the ligands and side chain of Asp289, one member of the catalytic dyad, were treated as amines and a neutral acid, respectively [46]. The other catalytic residue, Asp93, was treated as charged. Molecular docking results of the HEAs inside the protease active site in the Apo form obtained by the Autodock 4.2 program [66–68] were used as starting points for the MD simulations. In order to do so, the best result, as determined by the binding energy score [68,69], was selected after 200 docking runs, implementing the Lamarckian Genetic Algorithm (LGA) [68] with 25 million evaluations and 270 million generations. Autodock Tools [66] was used as a graphical interface for the preparation of the investigation site, which was a box of 60Åx80Åx60 Å (the spacing parameter was set using the default value of 0.375 Å) encompassing the important active site residues of BACE1, such as Gly95, Asp93, Asp289, Gly291, Thr293 and Asn294 [45–47,49,50,52].

MD simulations were performed using GROMACS 5.1 [70–72] utilizing the AMBER03 force field [73,74]. The topology of the inhibitors as neutral amines was constructed through the RESP methodology [73,75–77]. For all simulations, missing hydrogens were added and the protein was immersed in a cubic box 92 Å to a side filled with TIP3P water [78], which ensured at least 12 Å between the boundaries of the box of water and any solute atom. Chlorine and sodium ions were also added until the salt concentration was 154 mM. The simulated systems contained around 20000 water molecules and a total of approximately 76000 atoms. The simulations of the system (protein, ligand, water and ions) were carried out according to the following procedure. In the first step, a steepest-descent energy minimization (EM) was performed for 10000 steps to correct possible steric clashes. The convergence criteria were adjusted in order that the maximum force was less than 500 kJ/mol/nm. In the second step, the positions of the solvent (water) and ions near the protein-ligand complex were equilibrated, keeping the position of heavy atoms fixed, while allowing water molecules to enter the protein and adjust their position

Table 1
Head and tail substituents for the HEAs studied.



ID	IC_{50} (nM)	R1	R2	R3	R4	$\%\varepsilon_T^{\circ}$ [a]
H1	2	A'	A	–	–	0.0
H2	3	A'	Ph	B	5-NH(Et)	−3.4
M1	33	B'	Ph	C	5-NH(Et)	−5.8
M2	160	C'	Ph	C	5-NH(Et)	−17.7
L1	1800	E'	Ph	D	–	−9.0
L2	3470	A'	Ph	F	6-Me	−19.0
L3	6300	E'	Ph	E	–	−10.5
L4	34670	D'	Ph	C	5-NH(Et)	−14.8

[a] Percent deviation of ε_T° with respect to H1 (-158.5 ± 4.0 kcal/mol).

around it. This was accomplished by two consecutive MD simulations of 500 ps under canonical, isobaric-thermobaric conditions, that is to say by using the NVT (Number of particles, Volume and Temperature constant) and NPT (Number of particles, Pressure and Temperature constant) ensembles, respectively. Finally, the restrictions were lifted and the resulting structure was used as a starting point for an MD simulation of 70 ns. The LINCS [79] and SETTLE [80] algorithms were employed to restrict bond distances in the peptide and water molecules, respectively, while long range electrostatic interactions were calculated by the particle-mesh Ewald (PME) method [81,82]. Periodic boundary conditions (PBC) were applied and the equations of movement were integrated at a time-step of 2 fs. Having finished the MD simulations for the 8 BACE1-HEA systems, the energetic and geometric components were employed for comparative analysis of the trajectories. For the energetic analysis, the inhibitory process was studied through the residue-ligand interaction energies. The residue-ligand maps were created using the program Gnuplot [http://www.gnuplot.info]. For the geometric analysis, tools available in the Visualizer Molecular Dynamics (VMD) program [83] and UCSF Chimera [65] were used.

2.2. PM7 residue-Ligand energy (ReLIE) calculation

The MD trajectory for a macromolecular system (S) is composed of a set of frames $\{f_d\}_{d\in\mathbb{N}}$ captured over the simulation time. The system S comprises a protein (P) in complex with a ligand (L). Additionally, the active site of P contains a number of amino acids N which are divided among segments α, each of which is composed of a finite number of amino acids m_α interacting with L, represented by x_{ij}, where i y j indicate the segment and the position of the active site of P wherever the residue x is located, respectively. Thus we have that

$$N = \sum_{\substack{j=1 \\ i\in\alpha}}^{m_i} x_{ij}. \tag{1}$$

Furthermore, for a given frame f_d, the ReLIE of some x_{ij} with L is defined as:

$$\{\Delta E(x_{ij}, L)\}_{f_d} = \{E(x_{ij}L)\}_{f_d} - \{E(x_{ij})\}_{f_d} - \{E(L)\}_{f_d} \tag{2}$$

$$\left\{\varepsilon_i\right\}_{f_d} = \sum_{j=1}^{m_i}\left\{\Delta E\left(x_{ij}, L\right)\right\}_{f_d} \quad (3)$$

$$\{\varepsilon_T\}_{f_d} = \sum_{i\in\alpha}\left\{\varepsilon_i\right\}_{f_d} = \sum_{i\in\alpha}\sum_{j=1}^{m_i}\left\{\Delta E\left(x_{ij}, L\right)\right\}_{f_d} \quad (4)$$

where $\Delta E\left(x_{ij}L\right)$ is the interaction energy of the complex from the interaction of residue x_{ij} with L, which is calculated from the energetic difference between the complex of residue x_{ij} with the ligand L, $E\left(x_{ij}L\right)$, and its individual components, $E\left(x_{ij}\right)$ and $E(L)$, respectively. Additionally, ε_i represents the sum of the ReLIEs for a segment i. The total interaction protein-ligand interaction energy is expressed as a sum of the individual ReLIE of all x_{ij} with L (ε_T). ε_T provides general information about the favorability of the ligand's interaction with the active site, while $\Delta E\left(x_{ij}L\right)$ gives more detailed information about particular interactions over time. From these definitions we have that the number of ReLIE calculations for L with the N amino acids in the active site P, for an MD trajectory of S with a total number of frames f_T, is given by Nf_T. Further, the quantity of individual single point (SP) calculations (complex, residue and ligand) is $(2N+1)f_T$.

In the present investigation, ReLIE calculations were performed for the MD trajectories in which the BACE1 complex undergoes a conformational change from Apo to closed form at the instigation of 8 HEA ligands. In each case, the simulation time was 70 ns, which generated a total of 7000 frames. 112 amino acids from the β-secretase active site and its immediate vicinity were selected and grouped into segments: **A** (Ser70–Tyr76), **B**(Leu91–Asn98), **C**(Tyr129–Trp137), **D**(Thr164–Asp191), **E**(Gly219–Asn223), **F**(Arg256–Ile263), **G**(Tyr283–Pro298), **H**(Gly321–Leu328), **I**(Tyr366–Val370) and **J**(Tyr381–Ile398), as shown in Fig. 1. Each residue was extracted according to the fragmentation scheme shown in Fig. 2. The valence of each residue was completed through the program Open Babel by adding two hydrogen atoms, followed by the optimization of their positions. All calculations were carried out through the program MOPAC2016 (http://OpenMOPAC.net), using the SQM-PM7 method [59]. Per Stewart, this method was parametrized using experimental structures and high-level «*ab initio*» calculations as references. Further, SQM-PM7 includes D2-type corrections, which better describe non-covalent interactions [59–61,84]. For each of the 8 BACE1-HEA systems a total of 784000 ReLIE calculations were performed, requiring 1575000 individual single point calculations. Thus, 6.272 million ReLIE calculations involving 12.600 million SP calculations were performed for the present study, which is the first instance, to our knowledge, that such a comprehensive quantitative description of residue-ligand interaction in the BACE1 flap closure process has been attempted. Variations in ε_T over time were observed for the comparative analysis of the different HEAs (Fig. 3). The initial BACE1-HEA affinities, ε_T°, were calculated as the average of the ε_T during the first 10 ps of simulation time. Table 1 displays the percent deviations of the values of ε_T° with respect to the value measured for the BACE1-H1 system. Additionally, colored ReLIE maps were used to identify the principal interactions in this step of the inhibitory process of BACE1 by HEAs.

2.3. Protein-protein and protein-ligand parameters

The comparative geometric analysis of the MD trajectories relied on the measurement of particular inter-atomic distances in the system across the total simulation time. For each of the 8 BACE1-HEA systems, protein–protein and protein-ligand distances were measured as parameters to track the movement of the flap (d1, d2 and d3) and the relative position of the HEAs within the active site (d4, d5, d6, d7, d8 and d9), respectively (Fig. 3). The mean experimental values for all of these distances, calculated from 18 BACE1(closed)-HEA crystal complexes, which represent a large portion of publicly-available closed BACE1 systems, were taken to represent the necessary conditions which the system should approach simultaneously in the first step of the inhibitory process; that is, achievement of these values is supposed to guarantee that the HEA has induced the desired conformational change, from Apo to closed, in BACE1. The PDB codes for the experimental structures used and the experimental values for each distance are detailed in Supporting Information A.

The protein–protein parameters are the distances between the Cα of the tip of the flap (Thr133) and three residues of BACE1 which are almost fixed during flap closure: Ser386 (d1), Asp93 (d2) and Asp289 (d3), the latter two composing the aspartic dyad. The relative positions of Ser386, Asp93 and Asp289 do not vary significantly during flap closure; therefore changes in the distances between these residues and the tip of the flap (Thr133) must be a consequence of the motion of the flap [28,33,46]. Distance d4, which is the length of the hydrogen bond between the amide group of the Thr133 backbone and the carbonyl oxygen of the HEA, is also an effective parameter to study the closure of the flap for similar reasons [33,46].

On the other hand, the protein-ligand parameters are useful for monitoring possible translations and/or rotations of different regions of the ligand (head, core and tail) within the catalytic site of the protease [45,46]. Distance d5 corresponds to the BACE1-HEA interaction involving the catalytic residue Asp93, in S'1, with the hydroxyl group of the ligand core. Distances d6 and d7, which indicate movement of the amine group of the HEAs, were measured directly from the movement of the tail and involve Asp289 and Gly95 in S'1 and S'2, respectively. The hydrogen bonds with Gly291 (distance d8) and Asn294 (distance d9) showed the movements of the head of the ligand with respect to regions S3 and S2, respectively. Finally, the variation in the root mean square deviation (rmsd) of each ligand's position with respect to its initial pose in the Apo BACE1 conformation, measured over time, was employed as a general measure of the conformational changes experience by the inhibitor during the simulation.

3. Results and discussion

A series of 70 ns MD simulations of the BACE1(Apo)-HEA system were carried out to determine how structural variations in the head and tail of the ligand affect flap closure, i.e. the conformational change of BACE1 from Apo to closed. A total of 8 inhibitors were tested. Energetic and geometric parameters such as the total (ε_T, Fig. 4) and individual ReLIE sums, and protein–protein (Fig. 5) and protein-ligand (Fig. 6) distances, respectively, were calculated. The analysis of the geometric and energetic data obtained in this work is essentially comparative and relative and used, as has been mentioned, for the purpose of reference to the behavior of the high-power BACE1 inhibitors H1 and H2, which have been inferred to have, as the best inhibitors of the set, the most optimal values for the measured parameters. This was fully in evidence for all of the geometric parameters in that H1 and H2 demonstrated small deviations with respect to the average values calculated from 18 experimental structures (methodology Section 2.3). With regard to the energetic part, the analysis of the **initial** total interaction energy (ε_T°) is done first, specifically as it was seen to be affected by the structure of the HEAs and the possible relation of its magnitude and favorability with inhibitory activity toward BACE1. Next, the variation of ε_T over time is described in detail, and it was demonstrated that there exist clear differences between the HEAs H1 and H2 and the rest of the study set. Later, study of the protein–protein param-

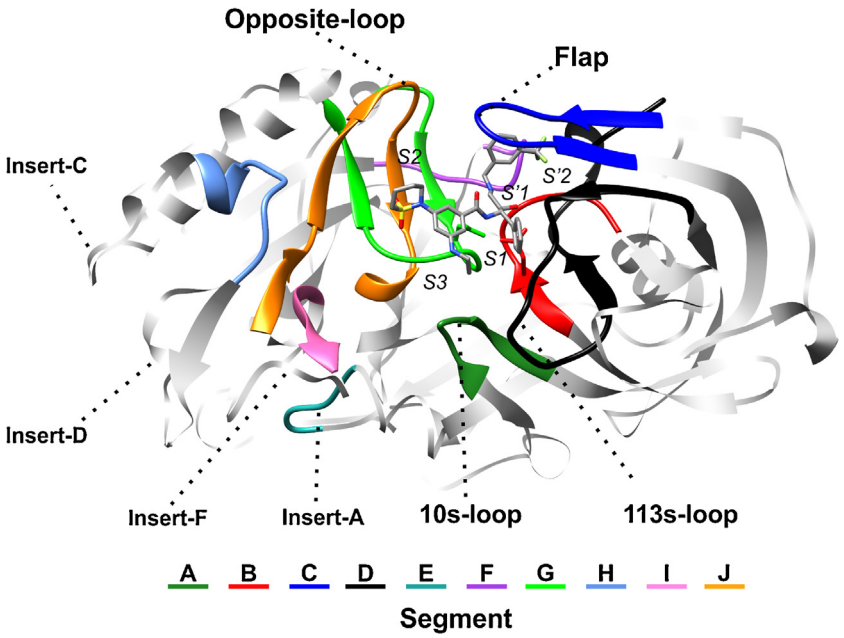


Fig. 1. Segmentation of the BACE1 active site and its vicinity. The color code is shown at the bottom.

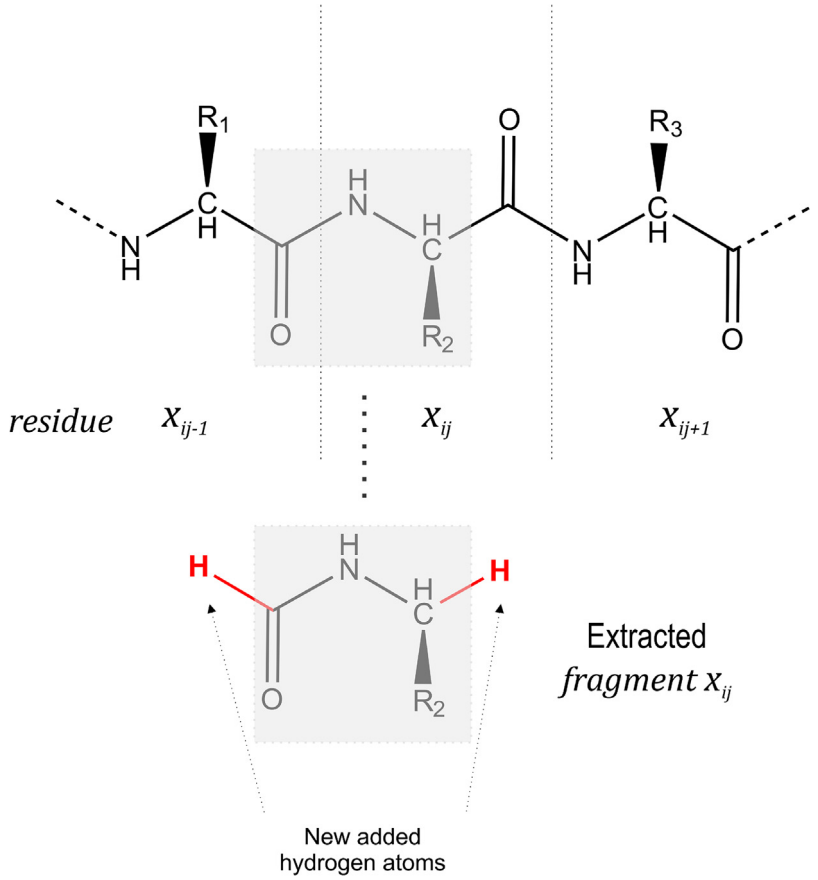
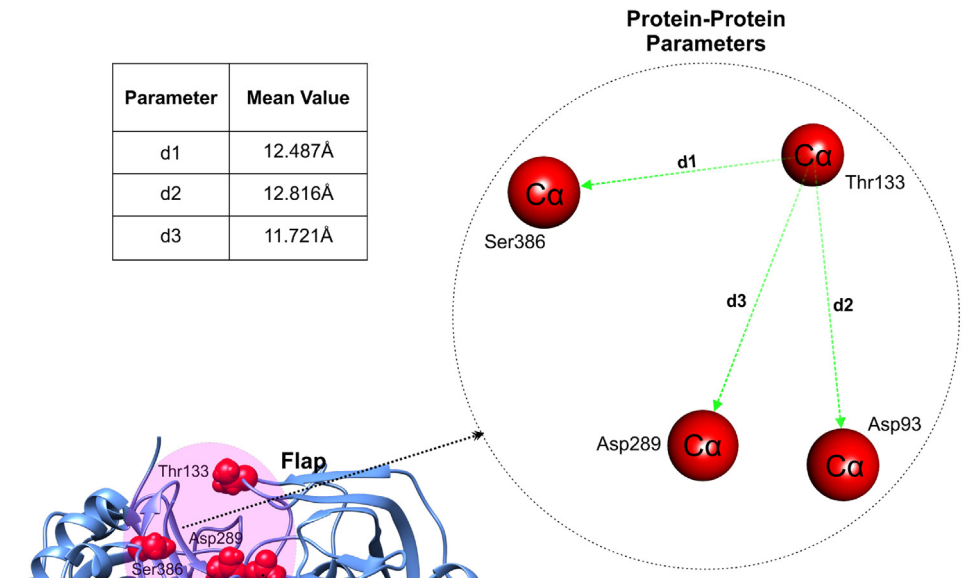


Fig. 2. Fragmentation scheme for the protein backbone. For each residue x_{ij}, the valence was filled by adding two hydrogen atoms. The positions of the protons were then optimized. Each fragment x_{ij} contains the carbonyl group of fragment x_{ij-1} and amine, $C\alpha$ and side chain of x_{ij} to minimize movement of the newly-added hydrogen atoms.

eters allowed the monitoring of the conformational changes in the protein, linking the process of flap closure/opening with the variations in ε_T. Furthermore, this phenomenon was examined from the point of view of the ligand and how the structural variations in the head and tail of the HEAs facilitate or affect flap closure, as well as the capacity to maintain that conformation. Finally, the dissection of the ReLIEs in the study set established that the differences in the inhibitory activity of the HEAs toward β-secretase possess some degree of relation with the capacity of the same to form and maintain key interactions in the enzyme active site, specifically

Parameter	Mean Value
d1	12.487Å
d2	12.816Å
d3	11.721Å



Parameter	Mean Value
d4	3.288Å
d5	2.598Å
d6	2.669Å
d7	3.106Å
d8	2.872Å
d9	2.937Å

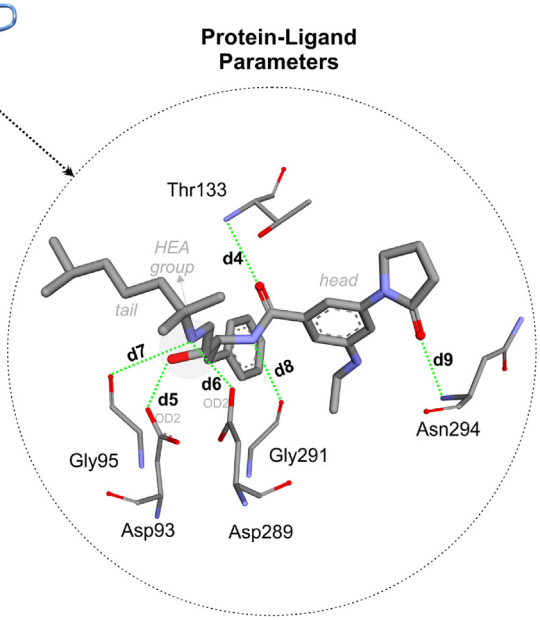


Fig. 3. Protein-protein (d1, d2 and d3) and protein-ligand (d4, d5, d6, d7, d8 and d9) distances for the BACE1-HEA system. The mean experimental values for each distance were calculated from the BACE1-HEA crystal complex structures available in the Protein Data Bank (Supporting Information A).

those involving residues Asp93, Asp289, Thr292, Thr293, Asn294 and Arg296.

3.1. The values of ε_T are related to inhibitory activity toward BACE1

Total protein-ligand interaction energy, expressed as the sum of all the ReLIEs (ε_T, eq.(1)), is a direct measure of the BACE1-HEA system stability due to the presence of the ligands in the active site of the aspartyl protease. In the present work, the comparative analysis of the ε_T values for the HEAs over time was performed initially (Fig. 4). Moreover, comparison of the total BACE1-HEA interaction energies obtained by the method previously described for ε_T and the interaction energies for the unfragmented active site demonstrated that the trends in the total energy values were independent of the methodology used (Supporting Information B).

According to the energetic data calculated for BACE1 flap closure induced by the 8 HEA ligands, the ε_T values offer the first indications of an explanation for the differential inhibitory activity of the studied ligands toward the Alzheimer-associated protease. Two aspects stand out: the initial docking affinity (ε_T°) and the behavior of ε_T over time. To further elucidate these results, H1, the HEA of the study set with the highest biological activity against BACE1 (IC_{50} =2 nM, Table 1), was taken as a reference. The value of ε_T° for BACE1-H1 was -158.5 ± 4.0 kcal/mol, the most favorable of all ligands studied. Significant differences in the values of ε_T° were found between the ligands of high inhibitory power (H1 and H2) and those of moderate (M1 and M2) and low (L1, L2, L3 and L4) inhibitory activity. While H2 only deviated by −3.4% in its value of ε_T°, the rest of the HEAs showed smaller initial affinities for the active site of the β-secretase, with values from −5.8 to −19.0% with respect to those for H1. These results are directly related to the ability of the HEAs to complement the catalytic pocket of the enzyme sterically and electronically when they encounter it in its Apo form, such that the chemical properties of the head and tail substituents on the HEAs, like flexibility (M1), stereochemistry (M2 and L4) and

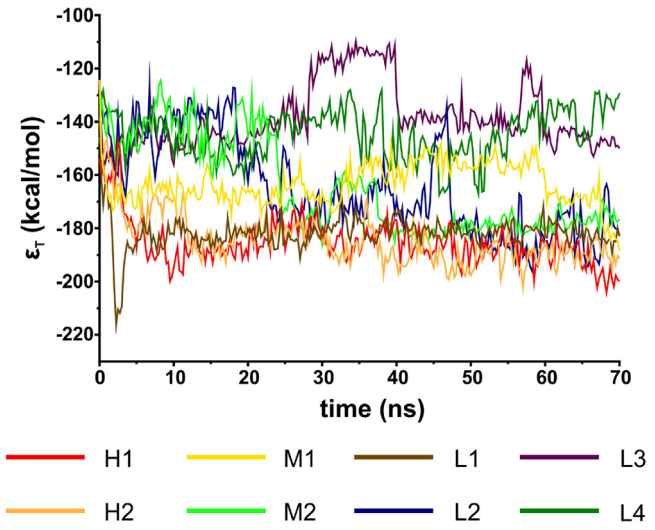


Fig. 4. Variation of the total protein-ligand energy (ε_T) over time for the systems comprised of BACE1 in complex with HEAs of high (H1 and H2), moderate (M1 and M2) and low (L1, L2, L3 and L4) inhibitory power. The values shown are the mean values calculated for each 250 ps of the simulation. The color code to differentiate among the HEAs is shown at the bottom.

the polar or hydrophobic character of the fragments play a fundamental role; the substituents with an aliphatic carbon (-CH- or $-CH_2-$) connected to the amine nitrogen, near the tail of the HEA, such as A', B' and E' displayed better values of ε_T° because the presence of rotatable bonds in this area permits a better orientation of R1 in the hydrophobic region of the BACE1 active site. Additionally, molecules M2 and L4 reflect the effect of stereochemistry on ε_T° because they contain the groups C' and D' with a chiral carbon in the (S) and (R) configuration, respectively. The first ligand proved to be 5 kcal/mol more favorable, consistent with the difference in their experimental IC_{50} values, which indicate that M2 is about 217 times more active than L4 (Supporting Information C). On the other hand, substitutions at the head of the best HEAs were either lactams or sultams, containing one or two oxygen atoms, respectively. These electronegative species serve as acceptors and promote the formation of a hydrogen bond with the backbone of Asn294, which interaction is of great importance for flap closure, as amply described in the literature [45–47,50,51,54,56–58,85]. Suppression of this interaction led to a decrease in inhibitory activity, as is the case with L3 (IC_{50}=6300 nM, Table 1) which has group E, with no oxygens, at position R3 (Supporting Information D). Additionally, L2 (IC_{50}=3470 nM) displayed a loss of interaction with Asn294, due to the presence of a 6-methyl group substituted on the phenyl ring (R2) which creates an internal steric clash with the benzyl group, requiring that the head of the HEA reorient itself (Supporting Information E).

Considering the information for ε_T over time (Fig. 4) and its possible relation with inhibitory activity, it was found for H1 that the

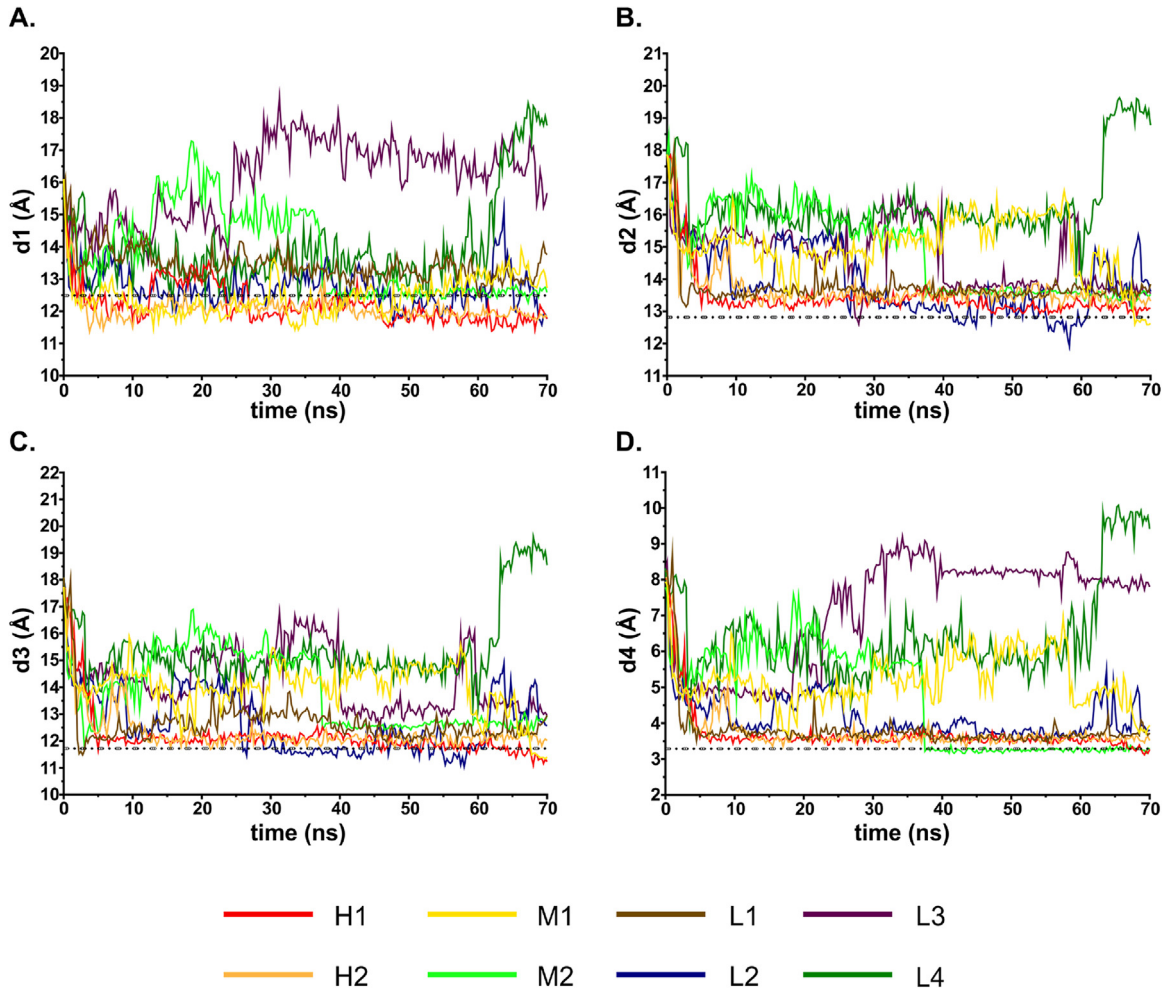


Fig. 5. Parameters to monitor the flap dynamics. Variations of distances **A)** d1, **B)** d2, **C)** d3 and **D)** d4 over time. The values shown are the mean values calculated for each 250 ps of the simulation. The dashed lines represent the experimental means for each distance. The color code to differentiate among the HEAs is shown at the bottom.

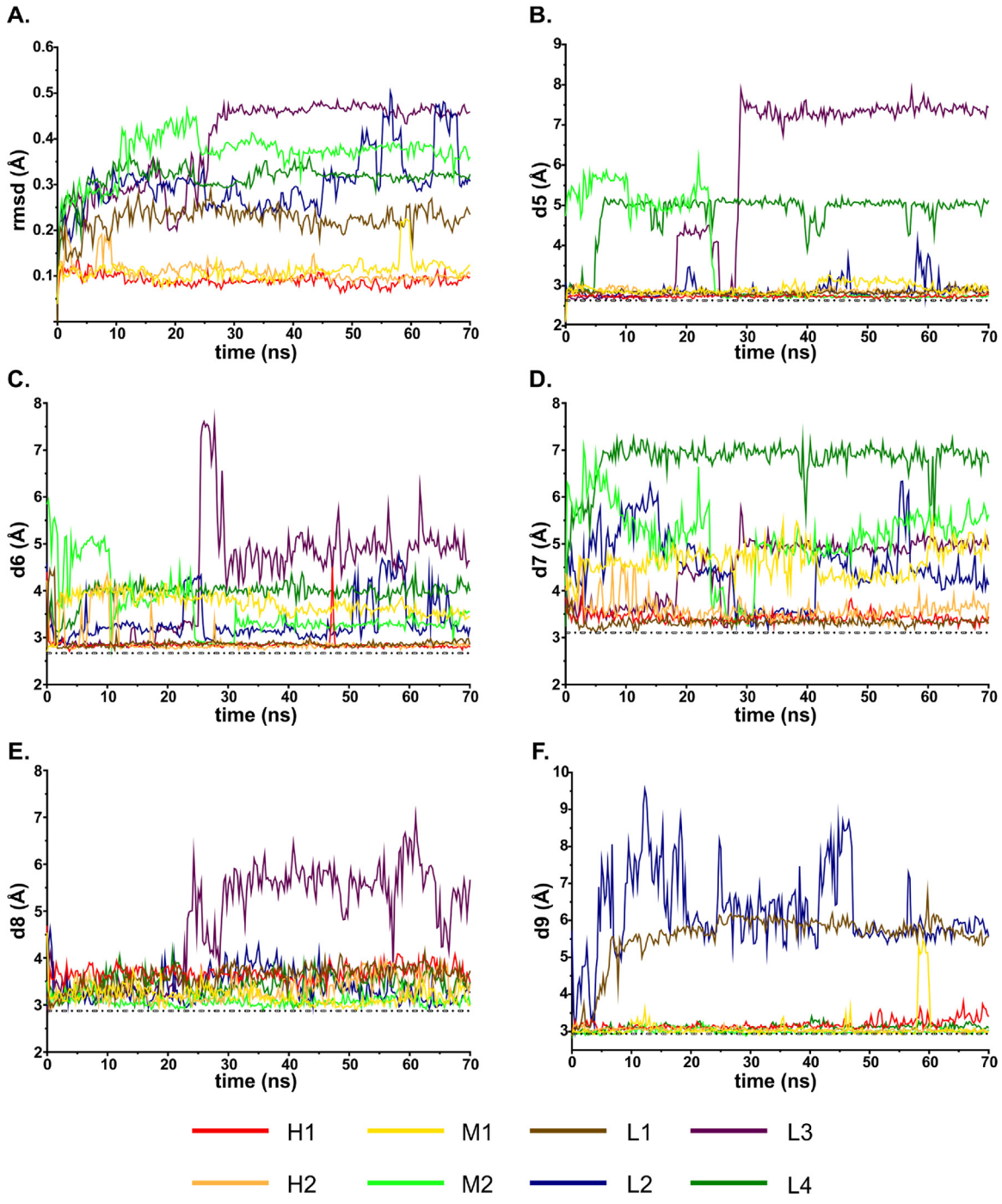


Fig. 6. Parameters to monitor the ligand in the BACE1 active site. Variations of **A)** rmsd and distances **B)** d5, **C)** d6, **D)** d7, **E)** d8 and **F)** d9 over time. The values shown are the mean values calculated for each 250 ps of the simulation. The dashed lines represent the experimental means for each distance. The color code to differentiate among the HEAs is shown at the bottom. Note that L3 is not shown in **F)** because it does not contain a carbonyl or sulfonyl oxygen atom by which to measure distance d9.

energy map represents three steps: the first is characterized by a notable decrease in energy and occurs over the first 10 ns. Measured from the local minima of ε_T, the total increase in favorability of the ReLIE in this step was 25.5% after 5 ns of the trajectory. Next, step II consists of a slight rebound in the total ReLIE. This phase lasted around 20 ns and produced an increase in energy not larger than 10 kcal/mol. In the final step, after the first 30 ns, an energetic stabilization of the BACE1-HEA system was observed, in the form of a gradual decrease in energy until the end of the trajectory, which translated to a substantial increase in the interactions of H1 with the active site of BACE1 of 26.2% compared to its value of ε_T°, the value for the initial conformation. The second-most active ligand of this study, H2 (IC_{50}=3 nM), behaved similarly, with an increase in favorability of 18.3% and 25.4% in steps I and III of the trajectory. For inhibitors M2 and L2, step I lasted until 30 ns and 35 ns, respectively. This signifies a delay of at least 20 ns before the beginning of the energetic improvement in step I, compared with ligand H1. For ligand L4, step I lasted until 20 ns and only resulted in a decrease of 13.0%, in addition to the fact that its ε_T° value is -135.0 ± 9.0 kcal/mol, which is already 14.8% less favorable than that for H1. Furthermore, step II extended until the end of the simulation, approaching values near those initially recorded,

which leads to the conclusion that this ligand did not induce a conformational change in the protein that would result in stabilization of the BACE1-HEA complex. For the HEA with the second-lowest inhibitory activity, L3 (IC_{50}=6300 nM), steps I and III were absent from ε_T. BACE1-L3 produced an ε_T° value of -141.9 ± 7.2 kcal/mol (a deviation of −10.53% with respect to H1) and displayed a gradual increase in energy to -129.6 ± 6.8 kcal/mol at 40 ns. Finally, the energy began to decrease, approaching values close to the initial energy by the end of the trajectory.

If the ε_T values generally describe the energetic behavior of the BACE1-HEA systems well, as well as the relationship with the ligands' biological activity against the aspartyl protease, they do not provide specific information about the electronic and geometric phenomena which occur in the protein or ligand during the simulation. Measurement of certain protein–protein and protein-ligand distances, as well as analysis of individual ReLIEs, will allow the observation of local events in different parts of the BACE1 catalytic site.

3.2. Step I is governed by flap closure

With the goal of analyzing the geometric changes and how they are related with energetics, as measured by ε_T, a series of distances which track the movement of the flap were measured. This antiparallel hairpin loop is the characteristic element which differs in the Apo and closed forms of β-secretase. Opening of the flap permits the entrance of substrates and inhibitors to the Apo BACE1 active site, while its closure is necessary for enzymatic activity or inhibition to take place. Three protein–protein distances (Fig. 3), measured from Cα, were used as a reference to the tip of the flap (Thr133): d1 (Thr133-Ser386), d2 (Thr133-Asp93) and d3 (Thr133-Asp289). These parameters are based on the relative immobility, according to experiment, of these residues during flap closure, ensuring that changes in these distances correspond to displacement of the flap. The experimental mean of each distance, measured using 18 BACE1-HEA crystal complexes (Supporting Information A), was used as a reference to determine how much the flap had closed, i.e. as a measure of geometric progress from Apo to closed BACE1. All three parameters for the highest-activity BACE1 inhibitors, H1 and H2, closely approach their experimental averages within the first 5 ns of MD simulation (Fig. 5). Furthermore, these are the only systems in which these distances are approximately constant or tend to decrease across the entirety of the rest of the simulation, resulting in effective flap closure (which is to say that once the flap closes, it does not reopen for the rest of the trajectory). For H1 and H2, the deviations oscillate approximately ±5% with respect to the experimental averages. Other HEAs, such as M1, L1 and L2, presented values near experiment in the first of these parameters, but relatively longer distances for d2 (Fig. 5**B**) and d3 (Fig. 5**c**). In every case, a shortening was observed for d1 in the first 10 ns, followed by oscillations which did not exceed 0.8 Å. However, in the cases of M1 and M2, d2 and d3 deviated from experiment by at least 2 Å for most of the trajectory. For L2, similar deviations of around 3 Å occurred during the first 26 ns, but afterwards the values fluctuated around the experimental average. All of these facts agree with the behavior of ε_T, previously discussed, implying that the favorable changes in ε_T observed in step I (Section 3.1) can be attributed to the flap of the aspartyl protease closing and that inhibitory activity is related to the inducement of effective flap closure by HEAs. Additionally, they provide an explanation for the additional favorable change in ε_T experienced by BACE1-H1/H2 in step III. Although the protein–protein parameters deliver information about the BACE1 conformations induced by HEAs, they do not address the behavior of the ligands within the active site of the protease, which instead requires a set of parameters focused on the mobility and relative positions of the HEAs during flap closure.

3.3. Low mobility of HEAs is a key element for effective flap closure in BACE1

To get an idea of the behavior of the HEAs within the BACE1 active site during flap closure and its relation with the observed ε_T values for the 8 BACE1-HEA systems studied, protein-ligand distances and the root mean square deviation (rmsd) of the ligands' positions were measured. rmsd measures the changes in the coordinates of the molecule over time with respect to its initial structure. These changes of coordinates include translations and/or rotations of segments of the ligand in the active site. Additionally, the protein-ligand distances involve polar interactions which previous reports have indicated are of great importance to the BACE1(closed)-HEA system, and which also serve as a reference for how closely the ligands adopt conformations similar to experiment.

The data once again reveal that the high-inhibitory power HEAs, H1 and H2, are the only ones which simultaneously have a low rmsd value and values near the experimental averages for all of the protein-ligand distances during the entire MD simulation. This means that these HEAs were largely immobile during and after flap closure. For H1 and H2 the rmsd values were near 0.1 Å for the entire trajectory, while measurements of 2–4.5 times this value were recorded for the majority of the HEAs of the study (Fig. 6**A**), representing simultaneous conformational changes within each ligand due to interaction with the protein.

Regarding the BACE1-HEA distance measurements, it is important to mention that these represent interactions of different sections of the HEAs (head, core and tail) in the catalytic site of the aspartyl protease. Consider distance d4, which describes the hydrogen bond formed between the backbone of Thr133 (tip of the flap) and the carbonyl in the HEA core (Fig. 3). This parameter is another measure of flap closure and ligand mobility taking as a reference the position of the ligand within the active site of BACE1. It has been previously reported that this interaction is also necessary for flap closure, i.e. that it is essential to proper catalytic function [20,28,33,35]. Fig. 5**D** shows significant deviations in this parameter with respect to the experimental average in the systems with the lowest-power inhibitors, L3 and L4, being at least 5 Å in the last 10 ns of the trajectory. For M2 said deviation was measured at around 3 Å in the first 36 ns, later dropping to less than the experimental average. Additionally, BACE1-M1 presented fluctuations in the value of d4 which indicate a continual process of closure and reopening of the flap. These findings are consistent with the results of the protein–protein distance analysis (Section 3.2) and the analysis of the different steps in the behavior of ε_T (Section 3.1), both previously discussed.

3.4. Substitutions in the HEA tail affect flap closure in BACE1

Three other protein ligand distances, d5, d6 and d7, deal with the effect of substituents in the HEA tail on the conformational change of BACE1 from Apo to closed form (Fig. 6). These distances involve the interaction of the hydroxyl (d5) and amine (d6) groups in the HEA core with the aspartic dyad, Asp93 and Asp289, respectively, in the S'1 region of β-seretase (Fig. 3). Additionally, distance d7 monitors the hydrogen bond between the amine group and the carbonyl group of the Gly95 backbone, located in the S'2 pocket. The data suggest that properties like the flexibility and stereochemistry of the substituent at R1 affect the ability of the hydrophobic pocket, S'2, to accommodate the HEAs, which is in turn related to the capacity to induce flap closure in BACE1. The most powerful inhibitors of the study set shared the fragment **A'**, a substituted benzyl group (Table 1). The methylene carbon —CH_2– connected to the phenyl

group provides two rotatable bonds which allow favorable orientation of the rigid, bulky, hydrophobic group. For these HEAs the distances in question remained constant and deviated little with respect to the experimental averages, from the beginning to the end of the MD simulation. For M2, which contains the C' fragment (Table 1), which lacks an aliphatic carbon, additional movements are necessary to accommodate the rigid, indene-derived group, as suggested by the values of d5, d6 and d7 for BACE1-M2, all of which display a significant reduction in deviation after the first 25 ns (Fig. 6). The HEA L4, which has a stereoisomer (R) of **C'** in its tail, **D'** (Table 1), demonstrates that the spatial orientation of the substituent in the BACE1 active site also plays an influential role in inhibition. Flap closure is sterically impeded by **D'** orienting itself toward the opposite-loop region, rather than S'2, of the protein catalytic site (Supporting Information B). For the BACE1-L4 system, the deviations were at least 2 Å and started after 5 ns of the trajectory. According to the protein-ligand distances calculated for the BACE1-M1 system, a substituent which is too flexible, such as **B'**, similarly impinges on effective flap closure. The excess of rotatable bonds, as a result of a branched aliphatic chain, cannot be accommodated in the hydrophobic pocket, as shown by the distances that involve the amine nitrogen, d6 (Fig. 5**C**) and d7 (Fig. 6**D**), where the deviation with respect to the experimental average remains at least 1 Å during the entire MD trajectory. This fact explains the constant fluctuations seen in distances d1, d2, d3 (Section 3.2) and d4 (Section 3.3), previously discussed (Fig. 5).

3.5. Effective interaction with Asn294 guarantees that the HEA head will remain stationary

Distances d8 (Fig. 6**E**) and d9 (Fig. 6**F**) are useful to monitor two protein-ligand hydrogen bonds which involve Gly291 and Asn294, respectively, in segment G of BACE1 (Figs. 1 and 3), providing insight into the effect of substitutions at the HEA head on flap closure. Distance d8 is calculated between the amide nitrogen of the HEAs, a group common to all the molecules of the study, and the carbonyl oxygen of the Gly291 backbone, which acts as a hydrogen bond acceptor. Distance d9 (Fig. 6**F**) involves the nitrogen of the Asn294 backbone, which acts as a hydrogen bond donor (Fig. 3), and an oxygen atom which belongs either to a carbonyl or sulfonyl characteristic of lactams (M1, M2 and L4) and sultams (H1, H2, L1 and L2), respectively (Table 1). It was observed that cyclic and rigid groups such as A, B, and C (Table 1) produced constant values of d9, around 3 Å, from the beginning of the simulation, as demonstrated by the figures for the H1, H2 and M1 systems. Additionally, the variations seen in M2 and L4, which contain fragment C, are explained by the influence of the steric characteristics of their tail substituents, already discussed (Section 3.4). Loss of interaction with Asn294, indicated by increases in the values of d8 and d9, is explained by 3 causes: 1) the presence of a flexible group, 2) suppression of the acceptor group or 3) rotation of the bond connecting the carbonyl group to the phenyl (Ph) group. To illustrate the first case we consider ligand L1, which has a **D** fragment in the HEA head, in which a flexible $-C_5H_{11}$ group is bound to the sulfonyl group (Table 1). The mobility of the aliphatic motif impedes stabilization of the hydrogen bond in question, leading to a loss of interaction with Asn294, reflected by a dramatic increase in the values of d9 to at least 2.5 Å after 3 ns (Fig. 6**F**). On the second count, the suppression of this important protein-ligand interaction in BACE1-L3, due to the absence of an atomic hydrogen bond acceptor in the **E** substituent, results in a marked increase in distance d8 of more than 2 Å after 23 ns, explaining the relatively large variations in the rmsd values compared with the rest of the study set (Fig. 6**A**) and the deviations in the protein–protein parameters (Fig. 5), both previously discussed. Finally, the introduction of a methyl group at the 6 position of the Ph ring in L2 produces a steric clash with the benzyl group which requires a rotation about the C—C bond, between the carbonyl group and the Ph group of R2. This movement is reflected by an increase in both d8 and d9. Further, the percent difference of ε_T° with respect to H1 of −19.0%, previously mentioned, is well-explained by this behavior.

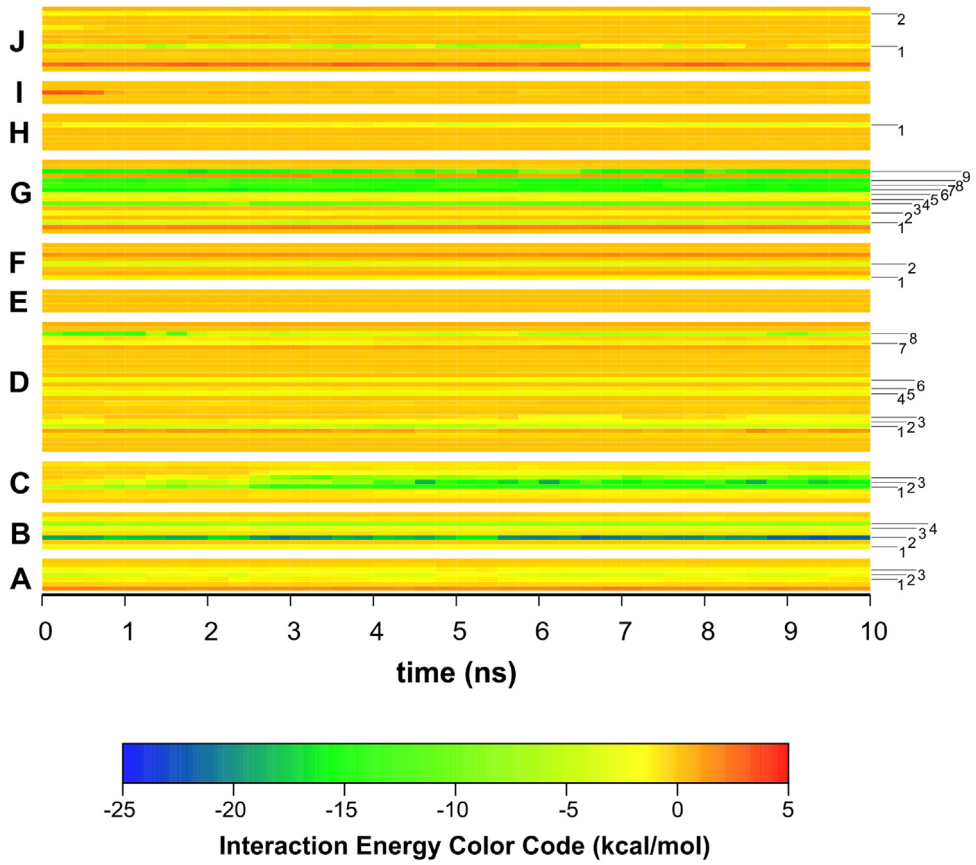
At this point, the analysis of the ε_T energies and protein–protein distances have revealed that inhibitory activity is related to the ability of the HEAs to dock to the active site of BACE1 and induce a conformational change, from Apo to closed form. Furthermore, the protein-ligand distances reveal the influence of the HEA substituents (both head and tail) on this process, specifically on the capacity to maintain residue-ligand interactions. However, study of the individual ReLIEs will allow quantification of the impact of the formation and loss of specific interactions in the BACE1-HEA system.

3.6. The PM7-ReLIEs permit identification of the most relevant interactions in the BACE1-HEA system

Study of the individual ReLIEs in a protein-ligand system permits identification of the most important interactions during the MD simulation. Furthermore, these energies indicate the formation or loss of such interactions at a given time during the trajectory. This information is useful for explaining the changes in ε_T (Section 3.1), protein–protein distances (Section 3.2) and protein-ligand distances (Sections 3.4 and 3.5) by quantifying the effect that those conformational changes have on the protein as well as the ligand through the protein-ligand interactions. Fig. 7 shows the landscape of PM7-ReLIEs for the first 10 ns of the inhibitory process of β-secretase by the most powerful inhibitor of the study set, H1 (IC_{50} =2 nM). According to ReLIE information collected for 112 residues in and around the BACE1 active site over the 70 ns trajectory, there are polar and apolar interactions present in the BACE1-HEA system, in particular a network of hydrogen bonds formed between different sections of the ligand and the side chains and backbones of residues in the active site of the aspartyl protease. In the S'1 region, Asp93, Gly95, Ser96 (segment B, Fig. 1) and Asp289 (segment G) stand out, interacting with the hydroxyl and amine groups of P'1 which characterize the HEA family of inhibitors. The notable interactions in the S2 region of the catalytic site are those involving residues Thr292-Arg296 (segment G, Fig. 1) which interact with an area of high electron density in the head of the ligand, present as either a lactam or sultam (depending on the substitution at R2, Table 1). Said area serves as a hydrogen bond acceptor and compensates for the lack of electron density, allowing the formation of favorable interactions with the backbone and side chain of Asn294 and Arg296, respectively. Additionally, interactions between the triad Tyr132-Thr133-Gln134, at the tip of the flap (segment C), and the carbonyl group of the HEAs were found.

It should be emphasized that the initial interaction of the tip of the flap (Thr133) with the carbonyl group of the HEAs, during the protein's conformational transition from open to closed form, is mediated by the formation of a hydrogen bond involving the hydroxyl group of the Thr133 side chain. This residue-ligand interaction is strengthened when, upon flap closure, formation of an additional hydrogen bond to the backbone of the residue in question occurs (Supporting Information F). Additionally, Fig. 7 shows that the interaction with Tyr132 is favorable from the beginning of the trajectory, unlike Thr133 and Gln134, whose interactions are only remarkable after 3 ns. This difference is principally due to the ability of the side chain of Tyr132 to form $\pi-\pi$ interactions (stacking and T-shaped) with the phenyl rings located in regions P1 and P'2 of H1, which become more favorable after flap closure.

Furthermore, the ReLIEs which involve amino acids with apolar side chains are concentrated near the S1 and S'2 regions of BACE1 (segment D, Fig. 1). The benzyl group of the HEAs forms π-alkyl



Strongest ReLIE

	A	B	C	D	F	G	H	J
1	Gly72	Leu91	Tyr132	Phe169	Arg256	Lys285	Glu326	Ser386
2	Gln73	Asp93	Thr133	Phe170	Tyr259	Ile287		Val397
3	Gly74	Gly95	Gln134	Ile171		Asp289		
4		Ser96		Trp176		Ser290		
5				Glu177		Gly291		
6				Ile179		Thr292		
7				Ile187		Thr293		
8				Arg189		Asn294		
9						Arg296		

Fig. 7. Energetic map of the ReLIEs for the first 10 ns of simulation (from the total 70 ns) of the BACE1 system. The table identifies the residues, by segment, which displayed the best ReLIE values.

interactions with the alkyl side chains of Leu91 and Ile71, and $\pi - \pi$ interactions with Ph169 and Trp176. The HEA tail interacts with residues in the hydrophobic pocket S'2, in particular Ile179 and Tyr259. Additionally, the presence of an electronegative species like a $-CF_3$ group (as in fragment A) permits a favorable interaction with the side chain of the charged residues Arg187 and Arg256. Other favorable hydrophobic π–alkyl or alkyl–alkyl interactions are formed by aliphatic interactions at R4 near the 10s-loop (segment A, Fig. 1), especially with Gly72 and Gly74.

3.7. *The BACE1-HEA system displays anchor interactions*

Analysis of the ReLIE maps for systems of BACE1 and the high-power inhibitors H1 and H2 reveals that anchor point residue-ligand interactions exist after the arrival of the HEA at the BACE1(Apo) active site. These residue-ligand interactions are characterized by their contribution of approximately 45.0% of the total BACE1-HEA interaction. They are also present from the beginning and remain throughout the MD simulation, fixing the various sections of the ligand in place in the catalytic site. Consequentially, the low mobility of these HEAs (Fig. 6**A**) and their capacity to induce effective flap closure, as is also reflected in the small deviations with respect to experiment in the protein–protein (Fig. 5) and protein-ligand (Fig. 6) parameters, can be explained by these anchor point interactions. Moreover, these anchor points could be a necessary condition for the second step of the inhibition process, the proton transfer from Asp289 to the core amine of the HEAs (the change in system configuration from LnAsp289 to LpAspUP, Table 1), to take place.

The anchor ReLIEs are due to polar interactions, and among them those involving interactions between the hydroxyl and amine groups of the ligand and the catalytic dyad, Asp93 and

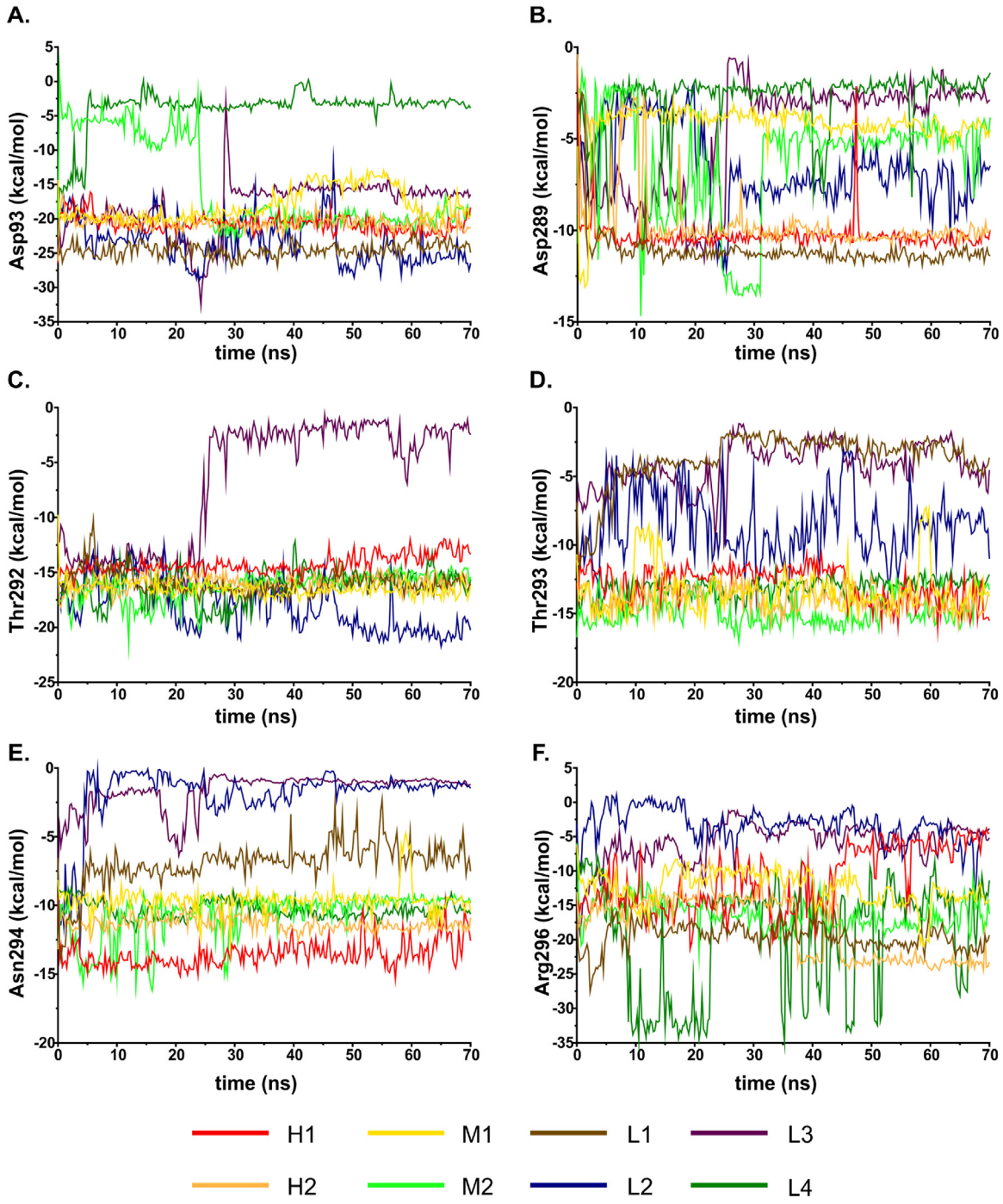


Fig. 8. Energetic differences in the anchor point interactions for the BACE1-HEA systems. The residues involved are: **A)** Asp93, **B)** Asp289, **C)** Thr292, **D)** Thr293, **E)** Asn294 and **F)** Arg296. The values shown are the mean values calculated for each 250 ps of the simulation. The color code to differentiate among the HEAs is shown at the bottom.

Asp289, respectively, in the S'1 region of BACE1 stand out as being particularly strong. According to the data, the Asp93 interaction is the most favorable of all 112 residues studied, during this step of the inhibitory process, with an average value of -20.7 ± 2.8 kcal/mol, accounting for 11.2% of the total interaction as measured by the average ε_T value. This contribution is approximately double that of Asp289, whose average ReLIE value is -10.3 ± 1.4 kcal/mol (5.6%). Additionally, several strong interactions were found between segment G of the protein and the head of the ligand: Thr292 (7.7%), Thr293 (6.9%), Asn294 (7.3%)y Arg296 (6.1%) with average ReLIE values of -14.2 ± 1.5, -12.9 ± 2.2, -13.6 ± 1.9 y -11.3 ± 5.3 kcal/mol, respectively. Fig. 8 shows the ReLIE values over time of the anchor point interactions for the 8 HEAs studied.

Analysis of the anchor point figures reveals that the inhibitors with moderate (M1 and M2) and low (L1, L2, L3 and L4) activity toward BACE1 display flaws in various anchor points throughout the MD trajectory, that is significant increases with respect to the values for H1 and H2. Substitutions at R1 that produce increases in the protein–protein (Fig. 5, Section 3.2) and protein-ligand (Fig. 6, section 3.4) distances were found to correspond to weakening of the ReLIEs with the catalytic dyad (Fig. 8A and B). For M1, which has a flexible B' group in its tail, loss of interaction with Asp93 and Asp289 of 5.0 and 7.0 kcal/mol, respectively, was observed. For M2,

which contains a C' fragment at R1, the deviations in the ReLIE with Asp93 were 20.0 kcal/mol in the first 24 ns, falling to 5.0 kcal/mol after flap closure. The same ligand also showed a loss of interaction with Asp289 of approximately 6.0 kcal/mol.

On the other hand, substitutions at R2 which resulted in increases in d8 and d9 (Fig. 6**,** Section 3.5) showed frequent weakening in the ReLIEs with Thr293 (Fig. 8**D**) and Asn294 (Fig. 8**E**). For L1, which has a flexible C_5H_{11} group bound to sulfonyl (fragment D, Table 1), losses of at least 10 and 6.0 kcal/mol with Thr293 and Asn294, respectively, were observed during the first 5 ns of the trajectory. The HEA L2, whose substituent methyl at R4 provokes rotations in the ligand head (Table 1), displays an immediate loss of interaction with Thr293 that fluctuates between 4.0 and 10.0 kcal/mol and a weakening of its ReLIE with Asn294 of 12.0 kcal/mol. Finally, L3, which lacks an acceptor group at its head, demonstrated remarkable losses with residues Thr292 (Fig. 8**C**), Thr293 (Fig. 8**D**) y Asn294 (Fig. 8**E**) of 14.0, 9.0 and 10.0 kcal/mol, respectively, which lead to a simultaneous decrease in interaction with Asp93 and Asp289 of 5.0 and 8.0 kcal/mol, respectively. Based on these results, the effect on interactions by conformational changes in the ligand can be understood. Similarly, they supplement a discussion otherwise based merely on geometric parameters.

The findings discussed in this investigative work strongly suggest that the inhibitory activity of HEAs is associated with their ability to form and maintain interactions within the active site of BACE1, especially those considered anchor point interactions, which involve the residues Asp93, Asp289, Thr292, Thr293, Asn294 and Arg296. Furthermore, they could assist in the design and virtual screening of HEAs to be used as BACE1 inhibitors.

4. Conclusions

In the present work an energetic landscape of the flap closure process in the BACE1 enzyme induced by hydroxyethylamines based on dynamic residue-ligand interaction energies was presented. Calculations based on the semiempirical PM7 method provided deep and quantitative insights into the recognition of 8 HEAs with different biological activity by β-secretase. The analysis of protein–protein and protein-ligand distances demonstrated that flap closure is influenced by structural differences in the head and tail of the ligands. Furthermore, the energetic analysis, based on the ReLIEs, suggests that the BACE1-HEA systems have anchor point interactions, which involve the residues Asp93, Asp289, Thr292, Thr293, Asn294 and Arg 296. These contribute approximately 45% of the total protein-ligand interaction. Additionally, there is a concomitant increase in favorability of about 25% associated with the flap closure process. Difficulty in forming or maintaining anchor point interactions leads to delay or complete impediment of flap closure, which could be related with lower HEA activity toward BACE1. The methodology here employed could be used to assist in the design of better HEA BACE1 inhibitors that might contribute to Alzheimerís disease treatment research efforts.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.jmgm.2017.07.010.

References

[1] G. Evin, Future therapeutics in alzheimer's disease: development status of BACE inhibitors, BioDrugs 30 (2016) 173–194.
[2] C. Reitz, R. Mayeux, Alzheimer disease: epidemiology diagnostic criteria, risk factors and biomarkers, Biochem. Pharmacol. 88 (2014) 640–651.
[3] P. Scheltens, K. Blennow, M.M.B. Breteler, B. de Strooper, G.B. Frisoni, S. Salloway, W.M. Van der Flier, Alzheimer's disease, Lancet 388 (2016) 505–517.
[4] H.M. Wilkins, R.H. Swerdlow, Amyloid precursor protein processing and bioenergetics, Brain Res. Bull. (2016).
[5] R. Li, K. Lindholm, L.B. Yang, X. Yue, M. Citron, R. Yan, T. Beach, L. Sue, M. Sabbagh, H. Cai, P. Wong, D. Price, Y. Shen, Amyloid β peptide load is correlated with increased β-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101 (2004) 3632–3637.
[6] K. Iqbal, F. Liu, C.X. Gong, Tau and neurodegenerative disease: the story so far, Nat. Rev. Neurol. 12 (2016) 15–27.
[7] G. Edwards 3rd, I. Moreno-Gonzalez, C. Soto, Amyloid-beta and tau pathology following repetitive mild traumatic brain injury, Biochem. Biophys. Res. Commun. (2016).
[8] C.L. Masters, G. Simms, N.A. Weinman, G. Multhaup, B.L. McDonald, K. Beyreuther, Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82 (1985) 4245–4249.
[9] E. Fedele, D. Rivera, B. Marengo, M.A. Pronzato, R. Ricciarelli, Amyloid beta: walking on the dark side of the moon, Mech. Ageing Dev. 152 (2015) 1–4.
[10] R. Vassar, BACE1 inhibitor drugs in clinical trials for Alzheimer's disease, Alzheimer's Res. Ther. 6 (2014) 1–14.
[11] R.J. O'Brien, P.C. Wong, Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease, Annu. Rev. Neurosci. 34 (2011) 185–204.
[12] C. Haass, C. Kaether, G. Thinakaran, S. Sisodia, Trafficking and proteolytic processing of APP, Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2 (2012) a006270.
[13] L. Hong, G. Koelsch, X. Lin, S. Wu, S. Terzyan, A.K. Ghosh, X.C. Zhang, J. Tang, Structure of the protease domain of memapsin 2 (beta-secretase) complexed with inhibitor, Science 290 (2000) 150–153.
[14] K.W. Menting, J.A. Claassen, beta-secretase inhibitor; a promising novel therapeutic drug in Alzheimer's disease, Front. Aging Neurosci. 6 (2014) 165.
[15] R. Yan, Q. Fan, J. Zhou, R. Vassar, Inhibiting BACE1 to reverse synaptic dysfunctions in Alzheimer's disease, Neurosci. Biobehav. Rev. 65 (2016) 326–340.
[16] A.K. Ghosh, H.L. Osswald, BACE1 (β-secretase) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease, Chem. Soc. Rev. 43 (2014) 6765–6813.
[17] H. Zeng, X. Wu, Alzheimer's disease drug development based on Computer-Aided Drug Design, Eur. J. Med. Chem. 121 (2016) 851–863.
[18] M. Hernandez-Rodriguez, J. Correa-Basurto, A. Gutierrez, J. Vitorica, M.C. Rosales-Hernandez, Asp32 and Asp228 determine the selective inhibition of BACE1 as shown by docking and molecular dynamics simulations, Eur. J. Med. Chem. 124 (2016) 1142–1154.
[19] M. Mahanti, S. Bhakat, U.J. Nilsson, P. Soderhjelm, Flap dynamics in aspartic proteases: a computational perspective, Chem. Biol. Drug Des. 88 (2016) 159–177.
[20] L. Hong, J. Tang, Flap position of free memapsin 2 (β-secretase), a model for flap opening in aspartic protease catalysis, Biochemistry 43 (2004) 4689–4695.
[21] A.A. Gorfe, A. Caflisch, Functional plasticity in the substrate binding site of beta-secretase, Structure 13 (2005) 1487–1498.
[22] S. Mishra, A. Caflisch, Dynamics in the active site of β-secretase: a network analysis of atomistic simulations, Biochemistry 50 (2011) 9328–9339.
[23] Y. Xu, M.J. Li, H. Greenblatt, W. Chen, A. Paz, O. Dym, Y. Peleg, T. Chen, X. Shen, J. He, H. Jiang, I. Silman, J.L. Sussman, Flexibility of the flap in the active site of BACE1 as revealed by crystal structures and molecular dynamics simulations, Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 68 (2012) 13–25.
[24] N.F. Bras, P.A. Fernandes, M.J. Ramos, Molecular dynamics studies on both bound and unbound renin protease, J. Biomol. Struct. Dyn. 32 (2014) 351–363.
[25] W. Karubiu, S. Bhakat, L. McGillewie, M.E.S. Soliman, Flap dynamics of plasmepsin proteases: insight into proposed parameters and molecular dynamics, Mol. Biosyst. 11 (2015) 1061–1066.
[26] O.A. Arodola, M.E. Soliman, Molecular dynamics simulations of ligand-Induced flap conformational changes in cathepsin-D-A comparative study, J. Cell. Biochem. 117 (2016) 2643–2657.
[27] C.R. Ellis, C.-C. Tsai, F.-Y. Lin, J. Shen, Conformational dynamics of cathepsin D and binding to a small-molecule BACE1 inhibitor, J. Comput. Chem. 38 (2017) 1260–1269.
[28] H.M. Kumalo, M.E. Soliman, A comparative molecular dynamics study on BACE1 and BACE2 flap flexibility, J. Recept. Signal Transduct. Res. 36 (2016) 505–514.
[29] R. Ishima, J.M. Louis, A diverse view of protein dynamics from NMR studies of HIV-1 protease flaps, Proteins 70 (2008) 1408–1415.
[30] Y. Cai, N. Kurt Yilmaz, W. Myint, R. Ishima, C.A. Schiffer, Differential flap dynamics in wild-type and a drug resistant variant of HIV-1 protease revealed by molecular dynamics and NMR relaxation, J. Chem. Theor. Comput. 8 (2012) 3452–3462.
[31] V. Hornak, A. Okur, R.C. Rizzo, C. Simmerling, HIV-1 protease flaps spontaneously open and reclose in molecular dynamics simulations, Proc. Natl. Acad. Sci. 103 (2006) 915–920.
[32] A. Barman, S. Schürer, R. Prabhakar, Computational modeling of substrate specificity and catalysis of the β-secretase (BACE1) enzyme, Biochemistry 50 (2011) 4337–4349.
[33] H.M. Kumalo, S. Bhakat, M.E. Soliman, Investigation of flap flexibility of beta-secretase using molecular dynamic simulations, J. Biomol. Struct. Dyn. 34 (2016) 1008–1019.
[34] A. Barman, R. Prabhakar, Elucidating the catalytic mechanism of beta-secretase (BACE1): a quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) approach, J. Mol. Graph. Model. 40 (2013) 1–9.

[35] A. Barman, R. Prabhakar, Computational insights into substrate and site specificities catalytic mechanism, and protonation states of the catalytic Asp dyad of β-secretase, Scientifica 2014 (2014) 11.
[36] A. Barman, R. Prabhakar, Protonation states of the catalytic dyad of β-secretase (BACE1) in the presence of chemically diverse inhibitors: a molecular docking study, J. Chem. Inf. Model. 52 (2012) 1275–1287.
[37] H. Park, S. Lee, Determination of the active site protonation state of β-secretase from molecular dynamics simulation and docking experiment: implications for structure-based inhibitor design, J. Am. Chem. Soc. 125 (2003) 16416–16422.
[38] R. Rajamani, C.H. Reynolds, Modeling the protonation states of the catalytic aspartates in β-secretase, J. Med. Chem. 47 (2004) 5159–5166.
[39] N. Yu, S.A. Hayik, B. Wang, N. Liao, C.H. Reynolds, K.M. Merz, Assigning the protonation states of the key aspartates in β-secretase using QM/MM X-ray structure refinement, J. Chem. Theor. Comput. 2 (2006) 1057–1069.
[40] D.A. Sabbah, H.A. Zhong, Modeling the protonation states of β-secretase binding pocket by molecular dynamics simulations and docking studies, J. Mol. Graph. Model. 68 (2016) 206–215.
[41] C.R. Ellis, J. Shen, pH-dependent population shift regulates BACE1 activity and inhibition, J. Am. Chem. Soc. 137 (2015) 9543–9546.
[42] D. Huang, Y. Liu, B. Shi, Y. Li, G. Wang, G. Liang, Comprehensive 3D-QSAR and binding mode of BACE-1 inhibitors using R-group search and molecular docking, J. Mol. Graph. Model. 45 (2013) 65–83.
[43] F. Sussman, J.M. Otero, M.C. Villaverde, M. Castro, J.L. Domínguez, L. González-Louro, R.J. Estévez, J.C. Estévez, On a possible neutral charge state for the catalytic dyad in β-secretase when bound to hydroxyethylene transition state analogue inhibitors, J. Med. Chem. 54 (2011) 3081–3085.
[44] A. Kocak, I. Erol, M. Yildiz, H. Can, Computational insights into the protonation states of catalytic dyad in BACE1-acyl guanidine based inhibitor complex, J. Mol. Graph. Model. 70 (2016) 226–235.
[45] C. Gueto-Tettay, R. Pestana-Nobles, J.C. Drosos-Ramirez, Determination of the protonation state for the catalytic dyad in beta-secretase when bound to hydroxyethylamine transition state analogue inhibitors: a molecular dynamics simulation study, J. Mol. Graph. Model. 66 (2016) 155–167.
[46] C. Gueto-Tettay, J. Zuchniarz, Y. Fortich-Seca, L.R. Gueto-Tettay, J.C. Drosos-Ramirez, A molecular dynamics study of the BACE1 conformational change from Apo to closed form induced by hydroxyethylamine derived compounds, J. Mol. Graph. Model. 70 (2016) 181–195.
[47] C. Gueto-Tettay, J.C. Drosos, R. Vivas-Reyes, Quantum mechanics study of the hydroxyethylamines-BACE-1 active site interaction energies, J. Comput. Aided Mol. Des. 25 (2011) 583–597.
[48] A.P. Truong, G. Tóth, G.D. Probst, J.M. Sealy, S. Bowers, D.W.G. Wone, D. Dressen, R.K. Hom, A.W. Konradi, H.L. Sham, J. Wu, B.T. Peterson, L. Ruslim, M.P. Bova, D. Kholodenko, R.N. Motter, F. Bard, P. Santiago, H. Ni, D. Chian, F. Soriano, T. Cole, E.F. Brigham, K. Wong, W. Zmolek, E. Goldbach, B. Samant, L. Chen, H. Zhang, D.F. Nakamura, K.P. Quinn, T.A. Yednock, J.-M. Sauer, Design of an orally efficacious hydroxyethylamine (HEA) BACE-1 inhibitor in a preclinical animal model, Bioorg. Med. Chem. Lett. 20 (2010) 6231–6236.
[49] N. Charrier, B. Clarke, L. Cutler, E. Demont, C. Dingwall, R. Dunsdon, P. East, J. Hawkins, C. Howes, I. Hussain, P. Jeffrey, G. Maile, R. Matico, J. Mosley, A. Naylor, A. O'Brien, S. Redshaw, P. Rowland, V. Soleil, K.J. Smith, S. Sweitzer, P. Theobald, D. Vesey, D.S. Walter, G. Wayne, Second generation of hydroxyethylamine BACE-1 inhibitors: optimizing potency and oral bioavailability, J. Med. Chem. 51 (2008) 3313–3317.
[50] N. Charrier, B. Clarke, E. Demont, C. Dingwall, R. Dunsdon, J. Hawkins, J. Hubbard, I. Hussain, G. Maile, R. Matico, J. Mosley, A. Naylor, A. O'Brien, S. Redshaw, P. Rowland, V. Soleil, K.J. Smith, S. Sweitzer, P. Theobald, D. Vesey, D.S. Walter, G. Wayne, Second generation of BACE-1 inhibitors part 2: Optimisation of the non-prime side substituent, Bioorg. Med. Chem. Lett. 19 (2009) 3669–3673.
[51] B. Clarke, E. Demont, C. Dingwall, R. Dunsdon, A. Faller, J. Hawkins, I. Hussain, D. MacPherson, G. Maile, R. Matico, P. Milner, J. Mosley, A. Naylor, A. O'Brien, S. Redshaw, D. Riddell, P. Rowland, V. Soleil, K.J. Smith, S. Stanway, G. Stemp, S. Sweitzer, P. Theobald, D. Vesey, D.S. Walter, J. Ward, G. Wayne, BACE-1 inhibitors part 1: identification of novel hydroxy ethylamines (HEAs), Bioorg. Med. Chem. Lett. 18 (2008) 1011–1016.
[52] B. Clarke, E. Demont, C. Dingwall, R. Dunsdon, A. Faller, J. Hawkins, I. Hussain, D. MacPherson, G. Maile, R. Matico, P. Milner, J. Mosley, A. Naylor, A. O'Brien, S. Redshaw, D. Riddell, P. Rowland, V. Soleil, K.J. Smith, S. Stanway, G. Stemp, S. Sweitzer, P. Theobald, D. Vesey, D.S. Walter, J. Ward, G. Wayne, BACE-1 inhibitors part 2: identification of hydroxy ethylamines (HEAs) with reduced peptidic character, Bioorg. Med. Chem. Lett. 18 (2008) 1017–1021.
[53] N. Charrier, B. Clarke, L. Cutler, E. Demont, C. Dingwall, R. Dunsdon, J. Hawkins, C. Howes, J. Hubbard, I. Hussain, G. Maile, R. Matico, J. Mosley, A. Naylor, A. O'Brien, S. Redshaw, P. Rowland, V. Soleil, K.J. Smith, S. Sweitzer, P. Theobald, D. Vesey, D.S. Walter, G. Wayne, Second generation of BACE-1 inhibitors part 3: Towards non hydroxyethylamine transition state mimetics, Bioorg. Med. Chem. Lett. 19 (2009) 3674–3678.
[54] B. Clarke, L. Cutler, E. Demont, C. Dingwall, R. Dunsdon, J. Hawkins, C. Howes, I. Hussain, G. Maile, R. Matico, J. Mosley, A. Naylor, A. O'Brien, S. Redshaw, P. Rowland, V. Soleil, K.J. Smith, S. Sweitzer, P. Theobald, D. Vesey, D.S. Walter, G. Wayne, BACE-1 hydroxyethylamine inhibitors using novel edge-to-face interaction with Arg-296, Bioorg. Med. Chem. Lett. 20 (2010) 4639–4644.
[55] N. Charrier, B. Clarke, L. Cutler, E. Demont, C. Dingwall, R. Dunsdon, J. Hawkins, C. Howes, J. Hubbard, I. Hussain, G. Maile, R. Matico, J. Mosley, A. Naylor, A. O'Brien, S. Redshaw, P. Rowland, V. Soleil, K.J. Smith, S. Sweitzer, P. Theobald, D. Vesey, D.S. Walter, G. Wayne, Second generation of BACE-1 inhibitors. Part 1: The need for improved pharmacokinetics, Bioorg. Med. Chem. Lett. 19 (2009) 3664–3668.
[56] P. Beswick, N. Charrier, B. Clarke, E. Demont, C. Dingwall, R. Dunsdon, A. Faller, R. Gleave, J. Hawkins, I. Hussain, C.N. Johnson, D. MacPherson, G. Maile, R. Matico, P. Milner, J. Mosley, A. Naylor, A. O'Brien, S. Redshaw, D. Riddell, P. Rowland, J. Skidmore, V. Soleil, K.J. Smith, S. Stanway, G. Stemp, A. Stuart, S. Sweitzer, P. Theobald, D. Vesey, D.S. Walter, J. Ward, G. Wayne, BACE-1 inhibitors part 3: identification of hydroxy ethylamines (HEAs) with nanomolar potency in cells, Bioorg. Med. Chem. Lett. 18 (2008) 1022–1026.
[57] A.K. Ghosh, M. Brindisi, Y.C. Yen, E.L. Cardenas, J.R. Ella-Menye, N. Kumaragurubaran, X. Huang, J. Tang, A.D. Mesecar, Design synthesis, and X-ray structural studies of BACE-1 inhibitors containing substituted 2-oxopiperazines as P1'-P2' ligands, Bioorg. Med. Chem. Lett. 27 (2017) 2432–2438.
[58] S.W. Kortum, T.E. Benson, M.J. Bienkowski, T.L. Emmons, D.B. Prince, D.J. Paddock, A.G. Tomasselli, J.B. Moon, A. LaBorde, R.E. TenBrink, Potent and selective isophthalamide S2 hydroxyethylamine inhibitors of BACE1, Bioorg. Med. Chem. Lett. 17 (2007) 3378–3383.
[59] J.J. Stewart, Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters, J. Mol. Model. 19 (2013) 1–32.
[60] J.J.P. Stewart, An investigation into the applicability of the semiempirical method PM7 for modeling the catalytic mechanism in the enzyme chymotrypsin, J. Mol. Model. 23 (2017) 154.
[61] B.P. Martin, C.J. Brandon, J.J.P. Stewart, S.B. Braun-Sand, Accuracy issues involved in modelingin vivoprotein structures using PM7, Proteins: Struct. Funct. Bioinf. 83 (2015) 1427–1435.
[62] H.M. Berman, The protein data bank, Nucleic Acids Res. 28 (2000) 235–242.
[63] S. Patel, L. Vuillard, A. Cleasby, C.W. Murray, J. Yon, Apo and inhibitor complex structures of BACE (beta-secretase), J. Mol. Biol. 343 (2004) 407–416.
[64] B. Webb, A. Sali, Comparative protein structure modeling using MODELLER, Curr. Protoc. Bioinf. 47 (2014) 1–32.
[65] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis, J. Comput. Chem. 25 (2004) 1605–1612.
[66] G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson, AutoDock4 and AutoDockTools4. Automated docking with selective receptor flexibility, J. Comput. Chem. 30 (2009) 2785–2791.
[67] R. Huey, G.M. Morris, A.J. Olson, D.S. Goodsell, A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation, J. Comput. Chem. 28 (2007) 1145–1152.
[68] G.M. Morris, D.S. Goodsell, R.S. Halliday, R. Huey, W.E. Hart, R.K. Belew, A.J. Olson, Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function, J. Comput. Chem. 19 (1998) 1639–1662.
[69] N. El-Hachem, B. Haibe-Kains, A. Khalil, F.H. Kobeissy, G. Nemer, AutoDock and AutoDockTools for protein-ligand docking: beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1(BACE1) as a case study, Methods Mol. Biol. 1598 (2017) 391–403.
[70] S. Pronk, S. Páll, R. Schulz, P. Larsson, P. Bjelkmar, R. Apostolov, M.R. Shirts, J.C. Smith, P.M. Kasson, D. van der Spoel, B. Hess, E. Lindahl, GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit, Bioinformatics (2013).
[71] D. Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A.E. Mark, H.J.C. Berendsen, GROMACS, Fast, flexible, and free, J. Comput. Chem. 26 (2005) 1701–1718.
[72] H.J.C. Berendsen, D. van der Spoel, R. van Drunen, GROMACS, A message-passing parallel molecular dynamics implementation, Comput. Phys. Commun. 91 (1995) 43–56.
[73] W.D. Cornell, P. Cieplak, C.I. Bayly, I.R. Gould, K.M. Merz, D.M. Ferguson, D.C. Spellmeyer, T. Fox, J.W. Caldwell, P.A. Kollman, A second generation force field for the simulation of proteins nucleic acids, and organic molecules, J. Am. Chem. Soc. 117 (1995) 5179–5197.
[74] Y. Duan, C. Wu, S. Chowdhury, M.C. Lee, G. Xiong, W. Zhang, R. Yang, P. Cieplak, R. Luo, T. Lee, J. Caldwell, J. Wang, P. Kollman, A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations, J. Comput. Chem. 24 (2003) 1999–2012.
[75] A.W. Sousa da Silva, W.F. Vranken, ACPYPE – AnteChamber PYthon parser interface, BMC Res. Notes 5 (2012) 1–8.
[76] J. Wang, R.M. Wolf, J.W. Caldwell, P.A. Kollman, D.A. Case, Development and testing of a general amber force field, J. Comput. Chem. 25 (2004) 1157–1174.
[77] J. Wang, W. Wang, P.A. Kollman, D.A. Case, Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations, J. Mol. Graph. Model. 25 (2006) 247–260.
[78] M.W. Mahoney, W.L. Jorgensen, A five-site model for liquid water and the reproduction of the density anomaly by rigid: nonpolarizable potential functions, J. Chem. Phys. 112 (2000) 8910–8922.
[79] B. Hess, H. Bekker, H.J.C. Berendsen, J.G.E.M. Fraaije, LINCS, A linear constraint solver for molecular simulations, J. Comput. Chem. 18 (1997) 1463–1472.
[80] S. Miyamoto, P.A. Kollman, Settle An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models, J. Comput. Chem. 13 (1992) 952–962.
[81] T. Darden, D. York, L. Pedersen, Particle mesh Ewald: an N·log(N) method for Ewald sums in large systems, J. Chem. Phys. 98 (1993) 10089.

[82] D.M. York, A. Wlodawer, L.G. Pedersen, T.A. Darden, Atomic-level accuracy in simulations of large protein crystals, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91 (1994) 8715–8718.
[83] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: visual molecular dynamics, J. Mol. Graph. 14 (33–38) (1996) 27–38.
[84] C.J. Brandon, B.P. Martin, K.J. McGee, J.J.P. Stewart, S.B. Braun-Sand, An approach to creating a more realistic working model from a protein data bank entry, J. Mol. Model. 21 (2015).
[85] B. Clarke, E. Demont, C. Dingwall, R. Dunsdon, A. Faller, J. Hawkins, I. Hussain, D. MacPherson, G. Maile, R. Matico, P. Milner, J. Mosley, A. Naylor, A. O'Brien, S. Redshaw, D. Riddell, P. Rowland, V. Soleil, K.J. Smith, S. Stanway, G. Stemp, S. Sweitzer, P. Theobald, D. Vesey, D.S. Walter, J. Ward, G. Wayne, BACE-1 inhibitors part 2: identification of hydroxy ethylamines (HEAs) with reduced peptidic character, Bioorg. Med. Chem. Lett. 18 (2008) 1017–1021.

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
Fundada en 1827

Fecha		
DD	MM	AAAA
19	**10**	**2017**

1. Presentación del trabajo (trabajo de grado, investigación o tesis).

Código	Documento de Identidad		Apellidos	Nombres	Correo electrónico
	Tipo	número			
6861310001	**Cedula**	**1047386601**	**Gueto Tettay**	**Carlos Alberto**	carlosgueto@gmail.com

Programa	**Doctorado en Ciencias**
Facultad	**Ciencias Exactas y Naturales**
Título al que opta	**Doctor en Ciencias**
Asesor	**Juan Carlos Drosos Ramirez**

Título de la obra: **Exploración «*In Silico*» del Proceso Inhibitorio de la β-Secretasa por Hidroxietilaminas: Una Aproximación Geométrica y Energética en el Tiempo**

Palabras claves (materias): **Alzheimer, BACE1, Hidroxietilaminas, diada aspártica, estado de protonación, flap, energías de interacción residuo-ligando, inhibición, Dinámica Molecular, Densidad poblacional.**

2. Autorización de publicación de versión electronica del trabajo (trabajo de grado, investigación o tesis).

Con esta autorización hago entrega del trabajo de grado (investigación o tesis) y de sus anexos (si existen), de forma gratuita en forma digital o electrónica (CD-ROM, DVD) y doy plena autorización a la Universidad de Cartagena, de forma indefinida, para que en los terminos establecidos en la ley 23 de 1982, la Ley 44 de 1993, leyes y jurisprudencia vigente al respecto, haga la publicación de éste, con fines educativos. Esta autorización, es válida sobre la obra en formato o soporte material, digital, electrónico o virtual, para usos en red, internet, intranet, biblioteca digital o cualquier formato conocido o por conocer.

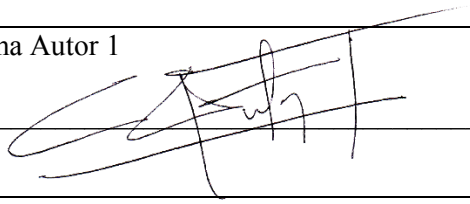
EL AUTOR, expresa que el trabajo de grado (investigación o tesis) objeto de la presente autorización, es original y la elaboró sin quebrantar ni suplantar los derechos de autor de terceros, de tal forma que el Trabajo es de su exclusiva autoría y tiene la titularidad sobre éste. En caso de queja o acción por parte de un tercero referente a los derechos de autor sobre el trabajo de grado en cuestión EL AUTOR, asumirá la responsabilidad total, y saldrá en defensa de los derechos aquí autorizados; para todos los efectos, la Universidad de Cartagena actúa como un tercero de buena fe.

Toda persona que consulte ya sea la biblioteca o en medio electrónico podrá copiar apartes del texto **citando** siempre la fuentes, es decir el título del trabajo, autor y año.

Esta autorización no implica renunciar a la facultad que tengo de publicar total o parcialmente la obra. La autorización debe estar respaldada por las firmas de todos los autores del trabajo de grado.

Si autorizo

3. Firma

Firma Autor 1 	Firma Autor 2
Firma Autor 3	Firma Autor 4