

**Diseño *in silico* de aptámeros de DNA dirigidos contra el péptido  $\beta$ -  
amiloide**

Fabio Alejandro González Arias

Universidad Icesi

Facultad de Ciencias Naturales, Departamento de Ciencias Químicas y  
Departamento de Ciencias Farmacéuticas

Programa de Química y Química Farmacéutica

Santiago de Cali

2018

1

**Diseño *in silico* de aptámeros de DNA dirigidos contra el péptido  $\beta$ -  
amiloide**

Fabio Alejandro González Arias

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TITULO DE PREGRADO EN  
QUÍMICA Y QUÍMICA FARMACÉUTICA

Tutores: Carlos Alberto Arango, PhD y Álvaro Barrera-Ocampo, PhD

Universidad Icesi

Facultad de Ciencias Naturales, Departamento de Ciencias Químicas y  
Departamento de Ciencias Farmacéuticas

Programa de Química y Química Farmacéutica

Santiago de Cali

2018

Aprobado por:



Evaluador.



Director del Proyecto 1



Director del Proyecto 2

Santiago de Cali, noviembre 9 del 2018

## **Agradecimientos**

Quiero expresar mis agradecimientos a mi familia por su apoyo y compromiso con mi educación por tantos años, por creer en mí y en mis sueños de convertirme en un profesional integral. A mis compañeros y amigos de la universidad, por todos los momentos buenos y malos que pasamos juntos, por las enseñanzas y por su apoyo. A Carlos Arango por ser mi tutor durante estos 3 años, por guiarme en esta línea de investigación en la que encontré una pasión y por todas las enseñanzas durante sus cursos. A Álvaro Barrera, por confiar en este proyecto y por el apoyo y enseñanzas brindadas durante no solo este proyecto, sino todo mi proceso de formación. Agradecimientos especiales al grupo Tandem Max Plank, de la Universidad de los Andes, especialmente al profesor Camilo Aponte y Angélica Sandoval por su acompañamiento y capacitación en herramientas computacionales. Finalmente, a la Universidad Icesi por brindarme una educación en alta calidad y haber infundado en mi tanto valores, que se me harán marcar la diferencia como profesional en mi futuro.

## TABLA DE CONTENIDO

ii. RESUMEN.....	8
ii. ABSTRACT .....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....	12
2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN Y JUSTIFICACIÓN .....	12
2.2 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.....	13
2.2.1 Enfermedad de Alzheimer.....	13
2.2.2 Aptámeros.....	15
2.2.3 Modelamiento computacional.....	16
2.2.4 Dinámica molecular.....	19
2.2.5 Dinámica Browniana en la simulación de movimiento difusional ..	20
2.3 OBJETIVOS.....	21
2.3.2 Objetivo general .....	21
2.3.3 Objetivos específicos .....	21
2.4 METODOLOGÍA PROPUESTA .....	21
2.4.2 Preparación del sitio de estudio .....	22
2.4.3 Validación del software Autodock4.....	22
2.4.4 <i>Screening</i> dirigido hacia la proteína A $\beta$ 40.....	24
2.4.5 Selección de aptámeros con mejores afinidades e identificación de interacciones intermoleculares. ....	25
2.4.6 Diseño racional del aptámero de DNA .....	25
2.4.7 Inducción de mutaciones al aptámero de DNA desde el complejo molecular .....	27
2.4.8 Refinamiento del complejo aptámero-proteína por dinámica molecular .....	27
2.5 Resultados y discusión .....	29
2.5.1 Validación del procedimiento de docking por el software Autodock4...29	
2.5.2 <i>Screening</i> de aptámeros de DNA dirigido hacia la proteína A $\beta$ 40.....	32
2.5.3 Diseño del aptámero de DNA.....	36
2.5.4 Formación del complejo aptámero de DNA-proteína A $\beta$ 40 .....	38
2.5.5 Mutaciones y Simulación del complejo por dinámica molecular .....	39

2.6	Conclusiones .....	44
2.7	Recomendaciones .....	45
3.	Referencias .....	45
	Matriz de marco lógico .....	61

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Esquema representativo del proceso de agregación amiloide en enfermedad de Alzheimer.....	14
<b>Fig. 2</b>	Esquema del cálculo de energía de unión por Autodock4.....	18
<b>Figura 3.</b>	Validación del procedimiento por Autodock4 .....	29
<b>Figura 4.</b>	Predicción del sitio de unión del proceso de validación por selección de pose. A) Aptámero de 7nt unido al receptor kinasa 2 acoplado a proteína G (código PDB 3UZT). B) Proteína alfa-trombina unida a aptámero de 15nt (código PDN 1HUT). C) Proteína alfa-trombina humana unida a aptámero de 31nt (código PDB 5CMX). D) Complejo entre el dominio A1 del factor de von Willebrand 1 y aptámero de 42nt (código PDB 3HXO). E) Lisozima-E unida a una secuencia de aptámero de 59nt (código PDB 4M4O). Resultado experimental (verde) y resultado del cálculo teórico (rojo). Visualizado utilizando AutodockTools.....	31
<b>Figura 5.</b>	Resultados de energía de unión de aptámeros de DNA a proteína A $\beta$ 40 .....	35
<b>Figura 6.</b>	Resultados del RMSD para el <i>cluster</i> con mejor energía del cálculo de docking .....	35
<b>Figura 7.</b>	Modo de unión de aptámero de DNA (código PDB 1P0U) y proteína A $\beta$ 40 (código PDB 1BA4) predicho por el software Autodock4. Las esferas solidas indicas interacciones de van der Waals y los puntos verdes interacciones tipo enlace de hidrogeno.....	35
<b>Figura 8.</b>	Formación del complejo entre el aptámero de DNA 1C32 y la proteína A $\beta$ 40. El aminoácido marcado corresponde a la lisina 28 .....	38
<b>Figura 9.</b>	Valores de RMSD para los complejos proteína-DNA durante la simulación de 200 ns. <b>A)</b> Valores para mutante 1. <b>B)</b> Valores para mutante 2 .....	39
<b>Figura 10.</b>	Mapa de contacto promedio de la proteína A $\beta$ 40 y los aptámeros de DNA diseñados. <b>A)</b> mutante 1. <b>B)</b> mutante 2. Los valores de índice de 1-40 corresponden a la proteína A $\beta$ 40 y los valores de 41-55 al aptámero de DNA... ..	41
<b>Figura 11.</b>	Mapa de formación de puentes de hidrogeno de la proteína A $\beta$ 40 y los aptámeros de DNA diseñados. <b>A)</b> mutante 1. <b>B)</b> mutante 2. Los índices de puentes de hidrogeno se muestran en la tabla 7.....	42

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Resultados del procedimiento de validación vía Autodock4 .....	29
.....	31
<b>Tabla 2.</b> Resultados de screening dirigidos a la proteína A $\beta$ 40.....	32
<b>Tabla 3.</b> Probabilidad de interacción de cada nucleótido de los aptámeros de DNA con los aminoácidos de la proteína A $\beta$ 40.....	36
<b>Tabla 4.</b> Diseño de aptámeros de DNA acorde a la probabilidad de interacción.....	36
<b>Tabla 5.</b> Resultados de dinámica browniana de aptámeros de DNA unidos a la proteína A $\beta$ 40.....	37
<b>Tabla 6.</b> Mutantes obtenidos para la simulación del complejo por dinámica molecular. El color verde indica mutación por transición (mismo tipo de nucleótido), y el color rojo indica mutación por transversión (diferente tipo de nucleótido). La primera secuencia indica el mutante y la segunda el nucleótido 1C32.....	39
<b>Tabla 7.</b> Índice de formación de enlaces de hidrogeno correspondiente a la figura 11. Los resultados fueron ordenados en orden ascendente de la figura. Los nombres de los átomos son dados por la topología del software Gromacs.....	43

## ii. RESUMEN

Esta investigación obtuvo el diseño y estudios de dos estructuras de aptámero de DNA afines a la proteína A $\beta$ 40, a partir de un modelamiento computacional. En primer lugar, para el estudio de las interacciones intermoleculares se utilizó el software Autodock4 el cual fue validado de acuerdo a la metodología por selección de pose, en donde se obtuvieron buenas predicciones para aptámeros hasta de 42 nucleótidos con valores de RMSD menores a 5 Å. No obstante, el cálculo de energías solo fue acertado para estructuras simples y flexibles como tallos y bucles.

Se encontró durante el análisis de interacciones DNA-proteína que la guanina tenía gran versatilidad de unión por muchos aminoácidos, de esta información se seleccionaron las secuencias por unión más probable y se dividieron de acuerdo al lugar de unión de la secuencia proteica en las regiones: 1-15 nucleótidos, 16-24 nucleótidos y 25-40 nucleótidos.

Estas secuencias se llevaron a un alineamiento múltiple con estructuras conocidas de las bases de datos del Protein Data Bank (PDB), donde se encontraron que un total de 8 secuencias se alineaban correctamente con el total de las evaluadas, los códigos PDB de las estructuras cristalinas fueron: 2AVH, 1PQT, 1KR8, 1BJH, 1AC7, 1C32.

Para disminuir tiempo de simulación de todas las secuencias, cada estructura cristalográfica se simuló por dinámica browniana con SDA 7.2 para visualizar cuál se acompleja de mejor manera a la proteína A $\beta$ 40. De esta simulación, la estructura 1C32 obtuvo el mejor resultado de energía para el primer clúster con 8.616 kJ/mol y un total de 344 trayectorias para éste. De manera que este fue el cristal seleccionado para la simulación por dinámica molecular. La lisina 28 muestra una fuerte interacción electrostática por los grupos fosfato del aptámero.

Antes de la simulación, con el software en línea PMX se llevaron a cabo las mutaciones con un total de 4 mutantes en total. Se evaluaron 2 de los 4 mutantes, en un total de 200 ns cada uno. Para ambos, se pudo estudiar que preferían unión con la región media y terminal de la proteína y se identificó una fuerte interacción por enlace de hidrogeno entre las adeninas inducidas por mutación con la asparagina 27, al igual que otros aminoácidos con carga como aspartato 23 y lisina 28; involucrados en la fibrilogenesis. Tanto las interacciones electrostáticas, como de formación de enlaces de hidrogeno son fundamentales en la formación de estos complejos macromoleculares.

## ii. ABSTRACT

This research obtained as a result the design and study of two structures of DNA aptamers targeted to the A $\beta$ 40 protein, from a computational modelling. First, in order to study the intermolecular interactions, the software Autodock4 was used and validated according to the pose selection method, where good computational predictions were performed for aptamers up to 42 nucleotides and with RMSD values fewer than 5 Å. Nevertheless, the energies calculation was only correct for simple and flexible secondary structures, such as hairpins and loops.

It was found during the analysis of interactions DNA.protein that the nucleotide guanine, has great versatility in terms of union with different aminoacids. From this information, the sequences were selected according to the most probable interaction and were divided in accordance at the site of union of the protein in the following regions: 1-15nucleotides, 16-24 nucleotides and 25-40 nucleotides.

These sequences were used in a multiple alignment study with known crystal structures from the Protein Data Bank (PDB) data base. It was found that a total of 8 crystal structures were correctly aligned with the total of proposed sequences aligned. The PDB code of the structures were: 2AVH, 1PQT, 1KR8, 1BJH, 1AC7, 1C32.

In order to decrease the simulation time of the sequences, each crystal structure was simulated via Brownian dynamics with SDA 7.2 to visualize which one binds better to the protein A $\beta$ 40. From these simulation, the structure 1C32 obtain the best energy result for the first cluster with a result of 8.616 kJ/mol and a total of 344 trajectories for this one. Thus, this was the crystal structure selected for the simulation via molecular dynamics. The lysine 28 shows a strong electrostatic interaction with the phosphate groups of the aptamer.

Before the simulation, the software PMX was used in order to perform the mutations with a total of 4 mutants. Only 2 out of 4 mutants were evaluated, simulated for 200 ns each one. For both mutants, it was found that they preferred to bind with the medium and terminal region of the protein, and also the adenines induced by mutation interacted by hydrogen bond with the asparagine 27, and other charged aminoacids such as aspartate 23 and lysine 28; involved in the amyloid fibrillogenesis. Both electrostatic interactions and hydrogen bond interactions, are fundamental in the formation of these molecular complexes.

## 1. INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) se conoce como la forma más común de demencia (60% al 80% de los casos) y actualmente representa un problema de salud mundial debido a los problemas a la salud relacionados con los trastornos neurodegenerativos que ocasiona. Esta enfermedad fue descubierta en 1906, y solo 70 años después fue reconocida de esta manera (Alzheimer's association, 2018). Asimismo, dentro de los trastornos neurodegenerativos de esta enfermedad se encuentran el deterioro progresivo de memoria y demás aptitudes intelectuales, que conllevan en últimas instancias a un declive cognitivo y problemas psiquiátricos y fisiológicos los cuales llevan a la muerte de los pacientes. Cabe resaltar estos síntomas aparecen muchos años después de los primeros indicios moleculares de la EA.

Las investigaciones en EA han permitido clasificar esta enfermedad, de acuerdo a la edad de aparición, en tardía y precoz. En estado tardío se caracteriza por la aparición entre los 50 y 60 años y se le asocian como factores de riesgo comorbilidades cardiacas, estilo de vida sedentario, entre otros; mientras que en estado precoz se presenta a una edad mucho más temprana y se asocia más a factores genéticos (de Jesus de Paula, Meira Guimarães, Satler Diniz, & Vicente Forlenza, 2009). No obstante, para ambos la neuropatología es similar y aunque se han encontrado múltiples biomarcadores de la enfermedad, se ha asociado la aparición de esta enfermedad con la generación de placas amiloides y ovillos neurofibrilares. Enfocándose en la formación de placas, éstas se dan por la formación de oligómeros A $\beta$ , los cuales se liberan por secretasas al medio extracelular y forman agregados no covalentes, que se depositan e insolubilizan siendo potencialmente neurotóxicos (Jedari, Palomino, & Drumm, 2018).

A pesar de estos hallazgos, existen muchos otros factores y otros procesos moleculares simultáneos en la EA que han dificultado entender el origen fisiopatológico de ésta y por esta razón en la actualidad no existe un tratamiento efectivo para detener su progresión (Padayachee, Ngqwala, & Whiteley, 2012). Hoy en día existen dos tipos de fármacos disponibles para el tratamiento paliativo de la EA, en primer lugar, se encuentran los inhibidores de colinesterasa (donezepil, rivastigmina, galantamina) que aumentan la vida media de este neurotransmisor y ayuda al mantenimiento de la señalización celular y funciones cognitivas. Por otro lado, se encuentran los inhibidores del receptor NMDA (memantina), que bloquean el efecto del neurotransmisor glutamato, el cual causa daño celular en neuronas durante la EA (Alzheimer's Disease International, 2018). Estos medicamentos tratan los síntomas de la enfermedad, pero no su origen. De esta manera, en los últimos años se han buscado alternativas dirigidas a nuevas formas de abordar la EA.

Una de las alternativas más viables ha consistido en la búsqueda de agentes con la capacidad de bloquear, disminuir o inhibir la agregación amiloide. Dentro de los agentes potenciales se encuentran los anticuerpos monoclonales (mAb), los cuales han demostrado presentan una gran especificidad y capacidad de desagregación de placas amiloides (Hardy & Selkoe, 2002). No obstante,

cuentan con desventajas como la probabilidad de generar respuestas inmunogénicas, procesos complejos de elaboración, elevados costos de síntesis y detección limitada de compuestos (Shui et al., 2018).

Por estas razones, se ha optado por el uso de aptámeros (ácidos nucleicos de cadena simple) como biosensores, marcadores moleculares e inhibidores de la agregación, ya sea de péptidos amiloides, oligómeros o en última instancia de las fibrillas amiloides, las cuales son las más neurotóxicas. Estos aptámeros de DNA o RNA, cuentan con secuencias de nucleótidos y estructuras tridimensionales que les confieren una elevada afinidad y especificidad hacia blancos moleculares (Shui et al., 2018). Es así como la búsqueda de aptámeros de unión a proteínas amiloides se ha convertido en un reto, de modo que puedan prevenir fenómenos de oligomerización de éstas y así mitigar o prevenir la ocurrencia de EA en estadios tempranos. La ventaja del uso de estos aptámeros en este tipo de terapias, a comparación con el uso de mAbs, radica en su menor costo de producción, complejidad de síntesis y un menor número de riesgo de desencadenar respuestas inmunogénicas. Adicionalmente, los aptámeros pueden dirigirse hacia cualquier tipo de blanco molecular (Mascini, Palchetti, & Tombelli, 2012).

Estos aptámeros se sintetizan por medio de enzimas y sus librerías hacia blancos moleculares se generan a partir de una técnica llamada SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment), que consiste en realizar procesos de screening y amplificación iterativos, en grandes librerías de ligandos (Tuerk & Gold, 1990). A pesar de ser una técnica muy eficiente, resulta engorrosa y muy costosa, además de que los resultados que se obtienen no brindan información acerca del tipo de interacción intermolecular o la naturaleza de esta interacción.

Debido a las limitaciones de esta técnica, en últimos años y gracias al desarrollo de software ha incrementado el uso de herramientas computacionales, basadas en la química teórica, para el estudio de sistemas químicos, bioquímicos y biológicos. Mediante simulaciones computacionales basadas en dinámica molecular, es posible estudiar complejos DNA/RNA-proteína y medir las interacciones intermoleculares y su naturaleza (Meli, Gasset, & Colombo, 2018). Las simulaciones por dinámica molecular, basadas en las leyes de Newton, permiten el estudio de sistemas en movimiento y resultan una herramienta muy útil y precisa para apoyar estudios experimentales o predecir propiedades y comportamientos, que no se pueden observar ni medir a nivel experimental.

Estas herramientas computacionales se utilizan en este estudio, en conjunto con docking molecular y dinámica browniana para el diseño y simulación de un aptámero de DNA, de afinidad teórica relevante por la proteína A $\beta$ 40. Se busca poder caracterizar el tipo de interacción intermolecular durante el tiempo de simulación, y así proveer información que sirva de guía a futuras investigaciones enfocadas al uso de aptámeros, como nuevas terapias y/o métodos de detección temprana de la EA.

## 2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

### 2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN Y JUSTIFICACIÓN

En el marco del tratamiento terapéutico y la detección temprana de la EA, se busca proponer alternativas novedosas que permitan detener o retrasar el inicio de la enfermedad con el fin de mejorar la calidad de vida y disminuir la carga sobre los sistemas de salud en el mundo. Debido a esto, y con evidencia previa acerca del potencial terapéutico de aptámeros de DNA (oligonucleótidos de DNA de cadena sencilla) por su capacidad de reconocer dianas moleculares (Hays, Duan, & Shigdar, 2017), se lleva a cabo el diseño *in silico* de oligonucleótidos de DNA afines a la proteína  $\beta$ -amiloide 40 ( $A\beta$ 1-40) (implicada en el proceso de agregación amiloide) haciendo uso de las herramientas computacionales docking molecular, dinámica molecular y dinámica browniana con el fin de contribuir al entendimiento de los procesos de agregación amiloide y de las interacciones intermoleculares proteína-DNA. De esta manera, se espera proveer información que sirva de guía en futuros estudios experimentales en el uso de estos aptámeros, como terapias y/o métodos de detección temprana de la EA.

La EA es la forma más común de demencia y se encarga de generar un deterioro progresivo en las funciones y habilidades cognitivas de las personas, en su mayoría, de la tercera edad. Actualmente, esta enfermedad representa un problema global de salud pública debido al incremento en su incidencia y prevalencia, estimándose que el número de personas con demencia alcance la cifra de 115.4 millones a nivel mundial para el año 2050 (Duthey, 2013). Por estos motivos, y adicionando el hecho que en la actualidad no existe una cura para detener o revertir la progresión de la enfermedad, el tratamiento de la EA representa un alto costo anual que muchos países no pueden subsidiar.

La EA se caracteriza por la formación de agregados insolubles de péptidos  $A\beta$  a nivel extracelular, los cuales forman fibrillas que son altamente neurotóxicas (Rijal Upadhaya et al., 2014). Con los avances en la elucidación de la fisiopatología de la enfermedad, se han abordado tratamientos terapéuticos direccionados a la reducción de la agregación de proteínas  $A\beta$  con el fin de reducir el proceso neurodegenerativo.

Las características estructurales y químicas de los oligonucleótidos de DNA, les confiere la capacidad de reconocer blancos moleculares y celulares con gran selectividad y afinidad. Esta evidencia, en conjunto con nuevas técnicas sintéticas para la generación de librerías de oligonucleótidos, ha potenciado el uso de aptámeros con fines terapéuticos (Ylera et al., 2002).

No obstante, el uso de metodologías como SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) para la obtención de librerías, no resulta viable económicamente para muchas instituciones de investigación en Colombia

y otros países de economía emergente. Por lo expuesto anteriormente, el presente proyecto busca emplear herramientas computacionales como docking molecular, dinámica molecular y dinámica browniana a través de los programas AutodockTools, Gromacs y SDA para proponer una metodología de diseño racional de aptámeros de DNA dirigidos contra el péptido A $\beta$ . Este tipo de estudios sirve de base para futuras investigaciones experimentales, ya que permiten ahorrar costos y tiempo, dando resultados iniciales veraces para el diseño de moléculas y el entendimiento de los procesos de interacción intermolecular proteína-DNA. Por otro lado, a partir de los estudios teóricos se pueden validar los procedimientos realizados, y generar protocolos que sean útiles para futuras investigaciones dirigidas al diseño y descubrimiento de fármacos en enfermedades caracterizadas por agregación proteica.

## **2.2 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE**

### **2.2.1 Enfermedad de Alzheimer**

La EA es una de las enfermedades neurodegenerativas más predominantes a nivel mundial, y la causa más común de demencia senil. La EA puede desarrollarse de forma tardía alrededor de los 60 años o de forma precoz, alrededor de los 40 años (Gois, 2017). Se desconocen las causas de la forma tardía, pero se ha establecido que la forma precoz es originada por factores genéticos.

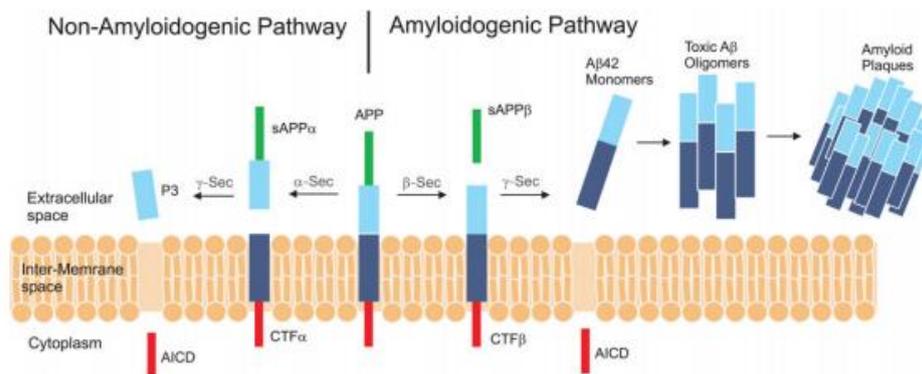
Esta enfermedad afecta en gran medida la señalización sináptica, genera muerte neuronal y altera procesos de regulación a nivel del sistema nervioso central, que finalmente se desencadenan en un deterioro progresivo de los procesos cognitivos de los pacientes (Duthey, 2013). No obstante, los síntomas de ésta aparecen años después de la aparición de los primeros procesos moleculares de la enfermedad. La fase preclínica se caracteriza por ser asintomática y se estima empieza a desarrollarse entre 10 a 15 años antes de la aparición de los primeros síntomas, en ésta el individuo permanece autónomo y con capacidad cognitiva total, ya en la fase clínica en etapa temprana empiezan a aparecer los primeros síntomas como síndrome amnésico y falta de motivación acompañada de duelo emocional. Finalmente, en la etapa terminal aparece la amnesia y un deterioro cognitivo marcado, que termina privando de total autonomía al paciente hasta el punto de perder el control de sus funciones fisiológicas, que conducen finalmente a la muerte (Torreilles & Touchon, 2002).

#### **2.2.1.1 Fisiopatología de la EA**

La EA esporádica afecta al 99% de los pacientes. Por esta razón, el diagnóstico clínico requiere una serie de múltiples exámenes y el diagnóstico final solo se da hasta la fase *postmortem* donde se encuentran placas y ovillos neurofibrilares en el tejido neuronal que se utilizan como marcadores histopatológicos para la detección de EA (Giraldo, García-Arteaga, Cárdenas-Robledo, & Romero, 2018). Estudios previos han comprobado la correlación entre el aumento de estas placas y ovillos y la progresión de la enfermedad (Rijal Upadhaya et al., 2014).

Actualmente, una de las hipótesis más aceptadas que intenta explicar la relación entre los síntomas de la enfermedad, con sus procesos fisiológicos y moleculares, corresponde a la hiperproducción de péptidos A $\beta$  que conduce a formación de las placas seniles (Torreilles & Touchon, 2002).

Los péptidos A $\beta$  se producen a partir de la proteína precursora de amiloide (APP), que se localiza en la membrana celular de neuronas o en vesículas intracelulares con función netamente estructural. En la figura 1 se esquematiza el proceso de formación de placa  $\beta$ -amiloide en la EA. En la vía amiloidogénica se lleva a cabo el primer corte por la acción de la enzima  $\beta$ -secretasa (BACE1) (residuos 671-672) que libera los péptidos sAPP $\beta$  y el fragmento intermembranoso remanente se escinde por el complejo  $\gamma$ -secretasa que genera los monómeros de A $\beta$  desde 38 hasta 42 aminoácidos (Bachurin, Bovina, & Ustyugov, 2017).



**Figura 1.** Esquema representativo del proceso de agregación amiloide en enfermedad de Alzheimer (Murphy, LeVine, & III, 2010).

Los péptidos A $\beta$  de 40 (corte en isoleucina 713) y 42 (treonina 715) aminoácidos son los más abundantes en el cerebro y líquido cefalorraquídeo. El péptido A $\beta$ 1-40 se encuentra entre el 80 al 90%, seguido del fragmento A $\beta$ 1-42 que se encuentra entre el 5-10%. Este último, al ser más hidrofóbico es el responsable de la mayoría de los procesos de formación de fibrillas neurotóxicas (Murphy et al., 2010). La formación de fibrillas se da por la naturaleza de agregación de estos péptidos en dímeros, trímeros y oligómeros, para formar finalmente las fibrillas que forman las placas seniles, placas difusas o depósitos vasculares. Estas fibrillas generan neurotoxicidad mediada por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), procesos inflamatorios, degeneración cerebrovascular y pérdida de homeostasis iónica (Dumery et al., 2001).

#### 2.2.2.2 Estrategias para el tratamiento de la EA

Con el descubrimiento de la vía amiloidogénica para la formación de placa  $\beta$ -amiloide se han podido proponer diferentes mecanismos para el tratamiento

paliativo de la EA. Todos estos tienen en común que buscan la reducción en la formación de agregados amiloide.

Una de las primeras estrategias consistió en reducir la expresión de las enzimas  $\beta$ -secretasa y la  $\gamma$ -secretasa, no obstante, se generan efectos secundarios nocivos como toxicidad gastrointestinal y exantemas debido a las funciones regulatorias de estas proteasas sobre otras macromoléculas a nivel fisiológico. Debido a esto, los nuevos tratamientos se han encaminado a generar mecanismos que impidan la agregación de péptidos  $A\beta$  y con ello la formación de las fibrillas  $\beta$ -amiloide. El avance en inmunoterapia ha permitido el desarrollo de anticuerpos monoclonales que se unen a péptidos  $\beta$ -amiloide, y favorecen su solubilización y eliminación del organismo (Seeman & Seeman, 2011). Del mismo modo, se ha descubierto el posible potencial terapéutico de agentes colorantes y  $\beta$ -ciclodextrinas en la disminución de la agregación de péptidos  $\beta$ -amiloide (Dumery et al., 2001).

### 2.2.2 Aptámeros

El término aptámero hace referencia a secuencias de oligonucleótidos entre 20 y 200 bases, que pueden ser de RNA o DNA. Este concepto nace de los procesos observados a nivel biológico de interacción RNA/DNA-proteína para procesos celulares regulatorios, de empaquetamiento, replicación, reparación, entre otros. Entre los ejemplos más comunes se encuentran los dedos de zinc con el DNA celular, material genético viral con factores celulares, formación de nucleosomas por interacción histonas-DNA, etc (Schlick, 2002).

#### 2.2.2.1 Aplicaciones terapéuticas

El alcance de los aptámeros se estima puede llegar a ser tan amplio en terapias, como lo es para los anticuerpos monoclonales hoy en día. Como ventaja, se encuentra que su producción no requiere de metodologías *in vivo* que implican el uso de animales y pueden sintetizarse amplia y versátilmente a través de diferentes tecnologías *in vitro* (Bruno, 2015).

De este modo, se ha planteado sus usos como agentes de detección y/o terapéuticos para enfermedades que se caractericen por la aparición de interacciones intermoleculares proteína-proteína en el medio extracelular. Se espera, éstos inhiban las interacciones proteína-proteína, con un mecanismo de acción análogo a un antagonismo farmacoterapéutico. Para lograr esto, el desafío en el estudio de aptámeros ha correspondido en lograr un diseño que permita obtener una interacción intermolecular aptámero-proteína tan favorable, que inhiba los procesos fisiopatológicos de enfermedades. Al año 2010, ya existía un aptámero con efectos terapéuticos en el mercado y ocho más en ensayos clínicos (Keefe, Pai, & Ellington, 2010).

#### 2.2.2.2 Aptámeros y enfermedades neurodegenerativas

El uso de aptámeros y sus nuevas perspectivas dirigidas hacia el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas ha crecido en los últimos años, gracias al desarrollo de metodologías experimentales para su diseño, como la metodología

SELEX. Desde el año 2002, se viene empleando el diseño de aptámeros para evitar y reconocer proteínas amiloide (Bouvier-Müller & Ducongé, 2018). Incluso, se han reportado aptámeros de DNA y RNA con potencial de unión a la proteína Aβ40 (Zhou et al., 2016). Sin embargo, debido al elevado costo y complejidad de la metodología SELEX, el uso de herramientas computacionales dirigidas al desarrollo y diseño de estos oligonucleótidos es una necesidad evidente que puede afectar positivamente el desarrollo e implementación de la tecnología de los aptámeros.

La metodología SELEX es una técnica *in vitro* que consiste en la generación de librerías de oligonucleótidos, las cuales se exponen ante una molécula blanco y se van eliminando aquellas librerías con poca afinidad, a través de técnicas como cromatografía. Aquellas que muestran afinidad en la unión se someten a rondas de PCR, para su amplificación, se someten de nuevo a la molécula blanco para su selección. Este proceso se realiza iterativamente (Manley, 2013).

### 2.2.3 Modelamiento computacional

La química teórica y computacional ha desarrollado un incremento considerable en los últimos años, gracias al avance tecnológico de dispositivos de cómputo y software; que en conjunto con métodos de cálculo y algoritmos nuevos permite el estudio de sistemas poliatómicos a nivel cuántico y clásico. Entre las aplicaciones de esta rama de la química es la descripción *in silico* de sistemas biológicos, descubrimiento de fármacos, procesos de excitación electrónica, estudio de polímeros, entre otros (Chávez et al., 2012).

#### 2.2.3.1 Mecánica molecular

La mecánica molecular surge de las limitaciones de los cálculos *ab initio* para la descripción de sistemas químicos de tamaño relativamente grande. Este método se basa en las leyes de la mecánica clásica para el cálculo de energías conformacionales y geometrías de equilibrio de moléculas, de acuerdo a las diferencias en energías de potencial para cada una de éstas (Cuevas, 2003).

Para el cálculo de la energía potencial, se tiene en cuenta un campo de fuerza, con términos que describan clásicamente las interacciones enlazantes y no enlazantes de átomos en el sistema de estudio.

$$\begin{aligned}
 U = & \frac{1}{2} \sum_{bonds} k_b (b - b_0)^2 + \frac{1}{2} \sum_{angles} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \frac{1}{2} \sum_{impropers} k_\varphi (\varphi - \varphi_0)^2 \\
 & + \frac{1}{2} \sum_{torsions} k_\omega [1 + \cos(n\omega + \delta)] + \sum_{atom\ pairs\ i,j} \left[ \frac{q_i q_j}{R_{ij}} + \left( \frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} \right) \right]
 \end{aligned}
 \tag{1}$$

La ecuación (1), describe la función tradicional de energía potencial la cuál es a su vez una función de las posiciones ( $r$ ) en dos o tres dimensiones, para la cantidad total  $N$  de átomos que comprende la molécula. El primer término muestra la contribución de la longitud de enlace por potencial armónico y como se incrementa la energía al desviarse de sus valores de referencia. El segundo y tercer término representan la contribución energética de las variaciones angulares de la molécula, también por potenciales armónicos. El tercer término indica los cambios en energía debido a la rotación angular. Por último, se describen las contribuciones energéticas de interacciones no enlazantes tipo Coulomb y van der Waals, por medio del potencial Lennard-Jones (Leach, 2001). El objetivo es utilizar algoritmos que permitan la minimización de la energía potencial.

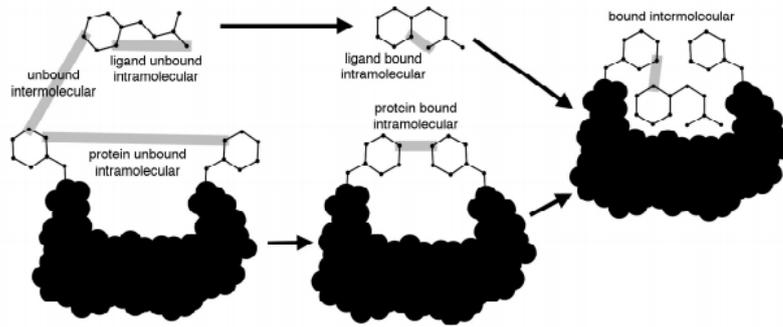
Los valores de las constantes de la energía potencial se obtienen a través de parametrizaciones por mecánica cuántica, o a través del uso de constantes provenientes de campos de fuerza. Estos campos de fuerza, se han desarrollado para describir los parámetros de diferentes tipos de átomos e incluso grupos funcionales específicos. La validez de los cálculos de mecánica molecular, se basan entonces, en la capacidad de transferencia de estos parámetros a diferentes sistemas de estudio. Los campos de fuerza más utilizados para el modelamiento computacional de moléculas de DNA son OPLS-AA, AMBER y CHARMM (Young, 2001).

Actualmente, existen algoritmos termodinámicos que se basan en métodos termodinámicos y el fenómeno de apareamiento de bases por puentes de hidrogeno, para el modelamiento de estructuras secundarias de oligonucleótidos (Zuker, 2003).

#### 2.2.3.2 Docking molecular

Los métodos de docking molecular permiten evaluar por métodos computacionales, la interacción entre dos moléculas, un ligando y una macromolécula, y sus energías de interacción cuando se varían las diferentes posiciones que pueden adoptar. De este modo, para obtener las interacciones más favorables los campos de fuerza se modelan a partir de energías potenciales que representen la interacción intermolecular (Cramer, 2013).

El campo de fuerza de Autodock4 evalúa la energía de unión en dos pasos. En primer lugar, para la macromolécula y el ligando en conformaciones separadas, se calcula su energía interna. En segundo lugar, se calcula el cambio en la energía para llegar a la conformación de interacción. En la conformación de interacción, la energía se calcula a partir de las interacciones intermoleculares macromolécula-ligando (Forli, Halliday, Belew, & Olson, 2012).



**Figura. 2** Esquema del cálculo de energía de unión por Autodock4 (Forli et al., 2012).

De esta manera, el campo de fuerza se modela a partir del cambio en energía potencial del estado de no interacción y del estado de interacción para el ligando y la macromolécula (2), a nivel intermolecular e intramolecular. Igualmente, se calcula la pérdida de entropía configuracional por la interacción, y finalmente se obtiene el cambio en la energía libre de Gibbs.

$$\Delta G = (U_{bound}^{L-L} - U_{unbound}^{L-L}) + (U_{bound}^{P-P} - U_{unbound}^{P-P}) + (U_{bound}^{P-L} - U_{unbound}^{P-L} + \Delta S_{conf}) \quad (2)$$

Cada término energético de la ecuación (2) se evalúa a partir del potencial de Lennard-Jones, enlace de hidrogeno, interacción electrostática y la desolvatación, que es crítica para estos cálculos y mide la contribución de la reorganización del solvente en la superficie tanto del ligando y la macromolécula al momento de la unión (Forli et al., 2012).

$$U = W_{vdw} \sum_{atom\ pairs\ i,j} \left[ \left( \frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} \right) \right] + W_{hbound} \sum_{atom\ pairs\ i,j} E(t) \left[ \left( \frac{C_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{R_{ij}^{10}} \right) \right] + W_{elec} \sum_{atom\ pairs\ i,j} \left[ \frac{q_i q_j}{er_{ij}} \right] + W_{sol} \sum_{atom\ pairs\ i,j} (S_i V_j + S_j V_i) e^{(-r_{ij}^2/2\sigma^2)} \quad (3)$$

Los factores de peso (W) y las constantes del potencial de la ecuación (3) se basan en los campos de fuerza de Amber. Autodock4 calcula la diferencia en la entropía configuracional a través del cálculo de una función de partición configuracional (Z), que se basa en los grados de libertad del ligando ( $X_L$ ), del solvente ( $r_s$ ) y la energía potencial de unión, calculada a partir de la ecuación (2) (Gallicchio & Levy, 2011). Adicionalmente, se mejora la veracidad del cálculo al introducir el cambio de energía por las torsiones del ligando para el cálculo de las energías potenciales.

$$Z_{N,L} = \int dx_L dr_s e^{-\beta U}$$

(4)

Con esta función de partición configuracional, es posible estimar la energía libre de Helmholtz (5), para finalmente obtener la entropía configuracional para cálculos de docking molecular a través de Autodock4 (6). De esta manera, se realiza el cálculo de la energía libre de unión.

$$A = k_B \ln Z$$

(5)

$$S_{conf} = - \frac{\partial A}{\partial T}$$

(6)

La eficiencia en el cálculo de estas ecuaciones se basa en los algoritmos genéticos que utiliza Autodock4. Estos algoritmos se basan en las ideas de la genética y la biología evolutiva, y realizan cálculos iterativos de las diferentes conformaciones de unión macromolécula-ligando hasta alcanzar una energía de unión mínima. El algoritmo Lamarckiano (LA) es ampliamente utilizado para docking molecular y calcula la energía de unión a partir de las coordenadas del ligando y las perturbaciones que sufren para poder optimizar la función de potencial en un mínimo, para un espacio de coordenadas determinado (Morris et al., 1998).

#### 2.2.4 Dinámica molecular

La dinámica molecular es una herramienta computacional muy útil y práctica para el estudio de configuraciones en el equilibrio de macromoléculas como DNA, simulando condiciones experimentales. Con ésta, se busca aplicar las ecuaciones de Newton sobre un sistema de muchas partículas y hallar la solución del sistema resultante de ecuaciones (Chávez et al., 2012).

$$\frac{d^2 x_i}{dt^2} = \frac{F_i}{m_i}$$

(7)

Las configuraciones conformacionales de los sistemas se obtienen a partir de un campo de fuerza aplicado, que minimiza la energía potencial. A partir de estos cálculos, se computan las fuerzas para cada átomo a la geometría dada y se integran las leyes de Newton para obtener las trayectorias del movimiento (Leach, 2001).

Los procesos de simulación por dinámica molecular de sistemas en equilibrio, son dependientes del tiempo y requiere conocer las condiciones iniciales de posición de los modelos de estudio. Posteriormente, las velocidades iniciales se estiman y se normalizan en un equilibrio NVT según la distribución gaussiana de Boltzman. A través de campos de fuerza, se obtienen las fuerzas para cada átomo según su energía inicial y se resuelven las ecuaciones de Newton para cada uno, dando como resultado las aceleraciones y sus velocidades. Este proceso se repite hasta llegar al equilibrio, donde se almacenan las coordenadas de cada paso (*time step*), como archivos de trayectoria (Young, 2001).

Los campos de fuerza más empleados para modelamiento por dinámica molecular de sistemas biológicos, corresponden a OPLS y GROMOS.

La eficiencia del cálculo de dinámica molecular, se basa en la selección de algoritmos para la obtención de las soluciones a las ecuaciones de Newton. Para sistemas de estudio con gran número de partículas, como proteínas, material genético y polímeros se utiliza el algoritmo de Verlet debido a la optimización del espacio de los archivos y la disminución del tiempo de cálculo, para sistemas con equilibrio térmico. Este algoritmo utiliza las posiciones y aceleraciones del paso actual, en conjunto con las posiciones del paso anterior para el cálculo de las coordenadas del paso siguiente (Young, 2001).

### **2.2.5 Dinámica Browniana en la simulación de movimiento difusional**

El planteamiento teórico detrás del movimiento browniano permite la descripción del comportamiento dinámico de partículas inmersas en un solvente. El fenómeno de difusión, se plantea por dinámica browniana, a través del sometimiento de las partículas de estudio a colisiones estocásticas con moléculas del solvente, lo que conlleva a su movimiento aleatorio (Gabdoulline & Wade, 1998).

Este movimiento se comporta a través de la ecuación (8), donde el desplazamiento  $\Delta r$  de una partícula es un tiempo  $\Delta t$  es proporcional al coeficiente de distribución translacional D.

$$\langle \Delta r^2 \rangle = 6D\Delta t$$

**(8)**

El movimiento translacional de cada partícula durante cada escala de tiempo (*time step*) se expresa por

$$\Delta r = (k_b T)^{-1} DF\Delta t + R$$

**(9)**

Donde  $k_b$  corresponde a la constante de Boltzmann, T es la temperatura del solvente, F corresponde a la fuerza sistemática sobre la partícula antes del paso y R es un vector aleatorizado.

Para simular interacciones entre macromoléculas, ambos se tratan como modelos rígidos y se resuelve la ecuación (9) solo para una de las moléculas relativa a la posición de la otra (Gabdoulline & Wade, 1998). La peculiaridad de las simulaciones por dinámica browniana radica en su capacidad de separación de la escala de tiempo (*time step*), lo cual en ocasiones representa una problemática en simulaciones por dinámica molecular, ya que ralentiza el modelamiento (Chen & Kim, 2004). De esta manera, la dinámica browniana es una herramienta computacional de soporte a la dinámica molecular, debido a que a través del cálculo de trayectorias entre dos macromoléculas en solvente, permite tener un avistamiento cercano de los primeros indicios de interacción intermolecular los cuales después de corregir y estudiar más a fondo por dinámica molecular. De esta manera, se ahorra tiempo y recurso computacional.

## **2.3 OBJETIVOS**

### **2.3.2 Objetivo general**

Diseñar *in silico* un aptámero de DNA con elevada afinidad por la proteína  $\beta$ -amiloides 40, a través de las herramientas computacionales.

### **2.3.3 Objetivos específicos**

Validar el procedimiento de docking molecular del software Autodock4, para aptámeros de DNA.

Obtener aptámeros de DNA afines a la proteína  $\beta$ -amiloides 40 a partir de un proceso de *screening*.

Identificar y reportar los tipos de interacción intermolecular predominantes de los aptámeros de DNA identificados, para la obtención de nuevas moléculas afines a la proteína  $\beta$ -amiloides 40.

Proponer racionalmente una molécula de aptámero de DNA, y evaluar la afinidad del aptámero diseñado racionalmente hacia la proteína  $\beta$ -amiloides 40.

## **2.4 METODOLOGÍA PROPUESTA**

El proyecto de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de cómputo científico (LCC), de la Facultad de Ciencias Naturales. Los recursos utilizados para el diseño computacional del aptámero se especifican a continuación:

- 2x Desktop:
  - Memoria RAM 8GB (4GB de intercambio)
  - Procesador Intel® Core™ i-5
  - 500 GB HDD
  - Sistema operativo Ubuntu 15.10
  
- 1x Dell PowerEdge R810 GEN II 40-core SFF Server:
  - Memoria RAM 512GB
  - Procesador Intel® E7-4870 4x2.4GHz 10-Core CPU

- 6x1TB 7.2K SAS HDD
- Sistema operativo Scientific Linux 7.2

Debido a la complejidad del modelamiento de complejos macromoleculares tan grandes, durante el desarrollo metodológico se realizaron aproximaciones que facilitarían el cálculo y el estudio de acuerdo a la capacidad de cómputo. En primer lugar, se eligió el software Autodock4 por facilidad del cálculo y de manejo, por limitación se restringieron las rotaciones de los ligandos (aptámeros de DNA) a 32 lo cual solo afectaría en mayor medida a aquellos de mayor tamaño. En el análisis de estos resultados, solo se tuvieron en cuenta energías de unión menores a 30kcal/mol, para corregir las limitaciones del software. Finalmente, en el diseño del software debido a la gran cantidad de interacciones aminoácido-nucleótido, para efectos de depuración de datos solo se tuvieron en cuenta aquellas con mayor frecuencia. Finalmente, durante la simulación por dinámica molecular, la proteína A $\beta$ 40 se mantuvo rígida para alcanzar tiempos razonables de simulación, de acuerdo a la capacidad computacional contada.

#### **2.4.2 Preparación del sitio de estudio**

Para llevar a cabo el desarrollo del sistema a estudiar, se desarrolló la capacidad de cómputo y manejo de los programas Autodock4 (Huey, Morris, and Forli, 2012) y Gromacs (Lemkul, 2008), a través de tutoriales e información teórica sobre los parámetros a usar acorde a la naturaleza del sistema a estudiar. Adicionalmente, se realizó la capacitación en los sistemas gráficos de análisis de datos como AutodockTools (Huey et al., 2012), Visual Molecular Dynamics (VMD) (Stone et al., 2017) y Grace (Vigmond, 2015).

#### **2.4.3 Validación del software Autodock4**

La validación del programa Autodock4 a través de AutodockTools, se llevó a cabo teniendo en cuenta la metodología propuesta por Rabal et al. (2016). Se seleccionaron los complejos proteína-aptámero con códigos PDB: 3UZT correspondiente a un aptámero de 7nt unido al receptor kinasa 2 acoplado a proteína G, 1HUT que corresponde a la proteína alfa-trombina unida a aptámero de 15nt, 5CMX que es la proteína alfa-trombina humana unida a aptámero de 31nt, 3HXO como la estructura cristalina correspondiente al complejo entre el dominio A1 del factor de von Willebrand 1 aptámero de 42nt; y 4M4O que representa la estructura cristalina de la lisozima-E unida a una secuencia de aptámero de 59nt. En este caso, se obvió el tamaño de la proteína y solo se tuvo en cuenta el tamaño del aptámero, ya que será el ligando flexible a manejar durante el diseño.

El objetivo de la validación fue corroborar que el programa Autodock4 era capaz de predecir acertadamente sitios de unión de aptámeros en sistemas proteicos, abarcando aptámeros con número de nucleótidos en un rango que se encuentre dentro de las secuencias de nucleótidos de los aptámeros de estudio. De este modo, se realizó el cálculo teórico de docking molecular, y se hizo una comparación de la desviación en la posición del centro geométrico del ligando del cálculo teórico con la posición obtenida en el cristal de manera experimental.

Esta desviación se midió en términos del valor de Desviación Media Cuadrática (RMSD) el cual se reportó en Angstroms (Å). Generalmente, valores de RMSD de 1 a 2 Å permiten asegurar una buena precisión del cálculo. No obstante, algunos autores proponen que para este tipo de cálculos con ligandos con mayor tamaño, como los aptámeros de DNA, y más propensos a la variación son aceptados valores de RMSD de hasta 10 Å (Rabal et al., 2016).

Para ejecutar el docking molecular con Autodock4, se puede utilizar tanto la interfaz gráfica de AutodockTools vía PyMOL, o se puede realizar directamente desde la terminal de comandos.

#### 2.4.3.2 Preparación de archivos de ligando y proteína: generación de archivos .PDBQT

Se realizó para cada cristal la separación del complejo proteína-aptámero, conservando sus coordenadas originales. Posteriormente, se ajustaron los sistemas agregando hidrógenos faltantes y realizando la eliminación de moléculas de agua y demás que no fueran objeto de estudio, tanto en la proteína como el aptámero. Simultáneamente se hizo la adición de cargas parciales y tipo de átomos de acuerdo a los parámetros de Autodock4.

La creación de los archivos de coordenadas .PDBQT se realizó por separado para el aptámero y la proteína, y los archivos finales contaron con la información de hidrógenos polares y no polares, tipos de átomos, ángulos de rotación y el mapa torsional del ligando. De esta manera, el cálculo se realizó seleccionando todas las torsiones disponibles para el ligando con el fin de obtener resultados más veraces, Autodock4 trabaja con un máximo de 32 torsiones. Adicionalmente, por simplicidad del cálculo, se modelaron las proteínas como estructuras rígidas, aunque se podían elegir regiones flexibles. La información de estos archivos es importante y corresponde al paso más crítico en simulaciones de docking molecular (Forli et al., 2012).

#### 2.4.3.3 Cálculo de AutoGrid: Generación de mapas *grid* para el cálculo de docking molecular.

El programa AutoGrid es una extensión de Autodock4 y se encarga de realizar los cálculos previos de afinidad aptámero-proteína. Esta es la razón de la alta eficiencia de los cálculos de docking molecular. El AutoGrid se encarga de realizar un cálculo previo de los mapas de potencial para los diferentes tipos de átomos del ligando y la macromolécula. Estos mapas son usados posteriormente, con el fin de facilitar y realizar un cálculo más rápido de la energía de unión (Huey et al., 2012).

Se realizó el cálculo previo de los mapas de potencial para cada tipo de átomo presente en el ligando. Esto ocurrió seleccionando un espacio tridimensional de muestreo que rodea la proteína y su ubicación concordó con el sitio de unión experimental del cristal. El tamaño y coordenadas del espacio tridimensional se seleccionó automáticamente de acuerdo a la posición inicial del ligando (aptámero). De esta manera, para cada punto de la caja tridimensional se calculó la energía de interacción intermolecular de cada tipo átomo del ligando con la

proteína. Se seleccionó el espacio de muestreo por default que es 0.375 Å, lo que significa que cada átomo se evaluó dentro de la caja tridimensional en un punto diferente a esa distancia del punto de muestreo anterior (Forli et al., 2012).

Esta información se recopiló en un archivo *grid parameter file* (.gpf) y se obtuvo un archivo de salida (.log) con las energías calculadas para cada mapa, un archivo con las energías de todos los mapas (.fld) y otro con la representación cartesiana de los potenciales (.xyz). Para cada sistema de estudio, se generaron igualmente los mapas de potencial para átomos de carbonos aromáticos (C), carbonos alifáticos (A), nitrógenos (N), oxígenos (O) e hidrógenos polares (HD); además de los mapas de desolvatación (d) e interacción electrostática (e).

#### 2.4.3.4 Cálculos de docking molecular con Autodock4

Los archivos generados en el paso anterior se utilizaron para la búsqueda de las conformaciones más favorables energéticamente del ligando flexible, en el espacio tridimensional seleccionado. Así, se generó el archivo de entrada docking parameter file (.dpf) y se obtuvo el archivo de salida *docking log file* (.dlg) con las coordenadas de unión, el tipo de interacción y la energía de unión para cada conformación.

Para la búsqueda conformación de unión del aptámero se podía utilizar una amplia variedad de algoritmos. El de elección para este estudio fue el Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA), ya que se ha demostrado su alta eficiencia en sistemas con elevada flexibilidad de ligandos, como es el caso de las moléculas de aptámeros (Fuhrmann et al., 2010). Para asegurar una buena precisión del cálculo de docking, se emplea un número máximo de 25'000.000 evaluaciones. Adicionalmente, se emplea una tolerancia al RMSD de 10 Å y se evalúan solo las 10 mejores conformaciones, según su clasificación por *Ranking* y formación de clusters.

#### 2.4.3.5 Análisis de resultados

Se ejecutó el análisis de los valores RMSD de las mejores conformaciones para cada sistema de estudio. Por último, se determinó que el procedimiento realizado y el software son óptimos para la naturaleza de los sistemas de estudio.

### 2.4.4 **Screening** dirigido hacia la proteína Aβ40

#### 2.4.4.2 Selección de estructura cristalográfica de la proteína Aβ40

Se realizó la búsqueda y obtención de la estructura en formato .PDB de la proteína Aβ40 expresadas en *Homo sapiens*. El código correspondiente de la proteína es 1BA4. Esta estructura fue elucidada por espectroscopia RMN, con un total de 10 estructuras y se eligió el modelo 1.

#### 2.4.4.3 Obtención de estructuras cristalográficas de aptámeros de DNA.

Se llevó a cabo la búsqueda de librerías disponibles de aptámeros de DNA con diferentes características (secuencia de nucleótidos, largo de la cadena, estructura secundaria) en formato .PDB y se clasificaron según el número de

nucleótidos, estructura secundaria y código PDB. Estos aptámeros han sido caracterizados y diseñados para otro tipo de blancos moleculares, no obstante se utilizan en el estudio para caracterizar el comportamiento promedio de este tipo de moléculas hacia la proteína A $\beta$ 40.

#### 2.4.4.4 Cálculos de docking molecular

Se ejecutó el cálculo de docking molecular de cada aptámero identificado para la proteína A $\beta$ 40 (código PDB 1BA4), de acuerdo al procedimiento validado vía Autodock4. El tamaño de la caja tridimensional fue de 126x78x64 y las coordenadas de elección fueron 4.33, -5.58, -7.36 (en coordenadas x, y, z respectivamente). De esta manera, se aseguró la cobertura de todo el espacio de la proteína A $\beta$ 40. Se analizaron los aptámeros utilizados de acuerdo con la energía de unión y el número de clusters en cada cálculo de docking.

#### 2.4.5 Selección de aptámeros con mejores afinidades e identificación de interacciones intermoleculares.

Se seleccionaron los aptámeros con energía de unión más favorable y se identificaron en su secuencia de nucleótidos, los tipos de interacción intermolecular más predominantes vía AutodockTools. Para esto, se eligió la estructura de energía más favorable y se visualizó la interacción tipo enlace de hidrogeno e interacción tipo van der Waals, entre los nucleótidos del aptámero y los aminoácidos de la proteína A $\beta$ 40.

#### 2.4.5.2 Obtención de secuencia FASTA de proteína A $\beta$ 40

Una vez identificadas las interacciones más favorables nucleótido-aminoácido, se llevó a cabo la obtención de la secuencia primaria FASTA para A $\beta$ 40, disponible en la página del Protein Data Bank (PDB). Finalmente se realizó una correlación entre los aminoácidos de la secuencia primaria FASTA, y los nucleótidos de los aptámeros con interacción más relevante.

#### 2.4.6 Diseño racional del aptámero de DNA

El diseño racional del aptámero para la proteína A $\beta$ 40 se realizó teniendo en cuenta la frecuencia de interacción entre el nucleótido y tipo de aminoácido. Esta inspección se hizo visualmente, a través de la interfaz gráfica, caracterizando las interacciones y ordenándolas según su frecuencia. De este modo, se seleccionó el nucleótido de unión más favorable a cada uno de los aminoácidos, de acuerdo con la interacción de mayor probabilidad. Para efectos del diseño, se tuvieron en cuenta interacciones tipo enlace de hidrogeno e interacciones tipo van der Waals.

#### 2.4.6.2 Obtención de la secuencia primaria del aptámero

Las secuencias del aptámero de DNA se obtuvieron y de acuerdo con su ubicación de organizaron en tres grandes grupos. Se obtuvieron grupos de secuencias para las regiones de la proteína de aminoácido 1 al 15, del 16 al 25, y del aminoácido 26 al 40. Debido a la elevada flexibilidad de las moléculas de DNA, el diseño de metodologías de plegamiento de este tipo de macromoléculas

desde su secuencia primaria requiere de mucho tiempo de cálculo, de manera que el campo de fuerza puede explorar todas las posibles conformaciones y alcanzar un estado mínimo de energía. Debido a esto se optó por la realización de estudios de alineamiento, con el fin de encontrar secuencias plegadas tridimensionalmente similares a las propuestas.

#### 2.4.6.3 Estudio de alineamiento de aptámeros de DNA

Las secuencias de aptámeros obtenidas fueron sometidas a un alineamiento múltiple a través del software Tcoffee. Con este alineamiento se buscaron estructuras cristalográficas con similitud en su secuencia de nucleótidos, en comparación con las secuencias propuestas anteriormente. Se alinearon un total de 34 secuencias de nucleótidos, que dieron un total de 7 análogos cristalográficos. El alineamiento realizado fue un alineamiento múltiple de secuencia, con todos los parámetros en default, la determinación del análogo más cercano se realizó por árbol filogenético.

#### 2.4.6.4 Obtención de las estructuras cristalográficas de los análogos de DNA

Se llevó a cabo la búsqueda de las estructuras cristalográficas de los análogos de DNA (en formato .pdb). Se encontraron los siguientes aptámeros identificados con código PDB: 2AVH, 1PQT, 1KR8, 1BJH, 1AC7, 1C32 y 1LA8. La búsqueda de análogos cristalográficos se realizó, ya que el diseño y plegamiento de este tipo de moléculas tan flexibles, requiere un tiempo elevado de cálculo de manera que se exploren todas sus conformaciones y se llegue a aquella que sea más estable.

#### 2.4.6.5 Formación del complejo aptámero-DNA vía dinámica browniana

El programa SDA 7.2 (Simulation of Diffusional Association) funciona a través de un servidor web, y por cálculos de dinámica browniana utiliza métodos de docking para simular interacciones intermoleculares y procesos de formación de complejos, como en este caso la formación del complejo DNA-proteína.

En el servidor webSDA, se selecciona la opción SDA docking y se realiza la preparación de los archivos para la ejecución del cálculo. Tanto para la proteína, como para cada uno de los ligandos (aptámeros de DNA) se trabajó con estados de ionización a pH 7 y una fuerza iónica del medio como 0.1M que corresponde a una aproximación de la fuerza iónica correspondiente al medio neurobasal utilizado experimentalmente para este tipo de estudios.

En la simulación por dinámica browniana se asumió tanto los aptámeros como las proteínas como cuerpos rígidos, ya que es la naturaleza de este cálculo ignorar rotaciones. En primer lugar, se subieron los archivos en formato .PDB y se indicó al software cuál era la proteína estática y cuál sería el ligando (aptámero de DNA), para los cuales se iba a modelar el movimiento difusional. El criterio de reacción, el cual corresponde a las posiciones de cada una de las moléculas se dejó por defecto en el centro de geometría de cada una. El

rearrreglo de carga y radio de van der Waals a átomos no estándar no aplica para los efectos de este estudio.

Después de este paso, se realizó el cómputo de las constantes de difusión translacionales, rotacionales y los potenciales electrostáticos del aptámero y la proteína A $\beta$ 40 (a través del programa ABPS el cual modela campos de potencial electrostático a través de la ecuación de Poisson-Boltzmann).

Por último, antes de realizar el cálculo de trayectorias por dinámica browniana, se ajustó el número de evaluaciones a 20.000 y un total de 500 trayectorias agrupadas en clusters. Las trayectorias finales y complejos formados se visualizaron vía PyMOL.

#### 2.4.6.6 Análisis de resultados

El análisis de cada uno de los siete complejos se condujo teniendo en cuenta el número de trayectorias en cada cluster y las energías de interacción en cada uno de éstos. De acuerdo con esto, se seleccionó el mejor complejo DNA-proteína para realizar las mutaciones pertinentes.

#### **2.4.7 Inducción de mutaciones al aptámero de DNA desde el complejo molecular**

El aptámero de DNA elegido por sus mejores características de unión correspondió a 1C32 (código PDB), el cual es un aptámero de ssDNA con una conformación tridimensional tipo cuádruplex, formado por 15 nucleótidos y con guanina y timina como bases nitrogenadas. De este modo, se escoge un complejo por su interacción, el cual tiene un aptámero con una secuencia característica que después se muta.

Para llevar a cabo las mutaciones, se realizaron en el servidor web pmx perteneciente al Grupo de Dinámica Computacional y Molecular, perteneciente al Instituto Max Planck de Química Biofísica (Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, 2018). Los mutantes correspondientes a esta estructura inicial correspondieron a 4, acorde a los estudios previos de alineamiento.

Para el proceso de mutación, se eligió el campo de fuerza Amber99SB\*ILDN-BSC1, sin la opción de agregar hidrógenos. El número total de mutaciones varía según los cambios que requiera cada mutante con su secuencia inicial. Las variaciones en el largo de la cadena se preservaron por defecto.

#### **2.4.8 Refinamiento del complejo aptámero-proteína por dinámica molecular**

El modelamiento del complejo final compuesto por el aptámero mutado y la proteína A $\beta$ 40 se ejecutó a través de GROMACS 5.0, con el objetivo de tener un acercamiento más veraz de la estructura molecular del aptámero en solvente acuoso y a condiciones experimentales y fisiológicas.

La simulación por dinámica molecular se llevó a cabo con el campo de fuerza Amber99BSC1 ya que se utiliza ampliamente para la simulación de secuencias de nucleótidos, además que se conocen por completo sus parámetros de simulación según el sistema de estudio (Siu, Pluhackova, and Böckmann, 2012).

En primer lugar, se establecieron las condiciones periódicas de simulación de acuerdo al tamaño del aptámero, el tamaño del espacio de simulación es de 1.5 nm desde el centro geométrico del complejo molecular. Este espacio cumple con la condición de evaluación de límites periódicos, donde su valor es mayor a 3 nm. Posteriormente, se generó el medio con solvente en un sistema cubico por simplicidad del cálculo, y con moléculas de agua tipo TIP3P las cuales ya se encontraban parametrizadas para el campo de fuerza elegido y son ampliamente utilizadas en modelos de dinámica molecular (Pekka & Nilsson, 2001).

Una vez se encontró el aptámero embebido dentro de la caja de solvente acuoso, se neutralizó el sistema con una concentración de sal de 0.1 M y con la condición de mantener el sistema final neutro. La selección del tipo de sal no interfiere en los resultados de dinámica molecular, a razón de que el modelamiento se realiza según modelos de mecánica clásica y no mecánica cuántica, por ende, los iones solo representan puntos en el espacio acuoso con carga neta. De este modo, se eligió como sal cloruro de sodio (NaCl).

Luego se ejecutaron los cálculos de la energía de minimización, y de equilibrio; consecutivamente. Para efectos de este estudio, todas las simulaciones se llevaron a cabo con solvente acuoso a temperatura de 300K y presión de 1 bar. Los parámetros para los cálculos de equilibrios se obtuvieron de modelamientos previos de macromoléculas con este campo de fuerza (Lemkul, 2008).

El cálculo de minimización se llevó a cabo por un mínimo de 50 ns, para ambas simulaciones y se observó la energía potencial final concordara con el mínimo de energía. El cálculo de equilibrio se realizó para 1 ns y se ejecutó con el modelo de termostato de Nose-Hoover y una presión de acoplamiento según el modelo Berendsen. Tanto la proteína como el DNA se mantuvieron con restricciones de posición.

Finalmente, se ejecutó el cálculo de dinámica molecular a partir del punto de partida del equilibrio. El tiempo de corrida total fue de 200 ns, verificando a través del RMSD y demás herramientas complementarias la formación y estabilidad del complejo molecular. Finalmente, se obtuvieron simulaciones de solo 2 de los 4 mutantes seleccionados para la estructura cristalográfica 1C32 (código PDB), debido al recurso computacional y tiempo de cálculo.

#### 2.4.8.1 Análisis de resultados

Herramientas complementarias como el software VMD y Xmgrace fueron utilizadas para la visualización de las trayectorias y posteriores análisis de mapas de contacto y formación de enlaces de hidrogeno.

## 2.5 Resultados y discusión

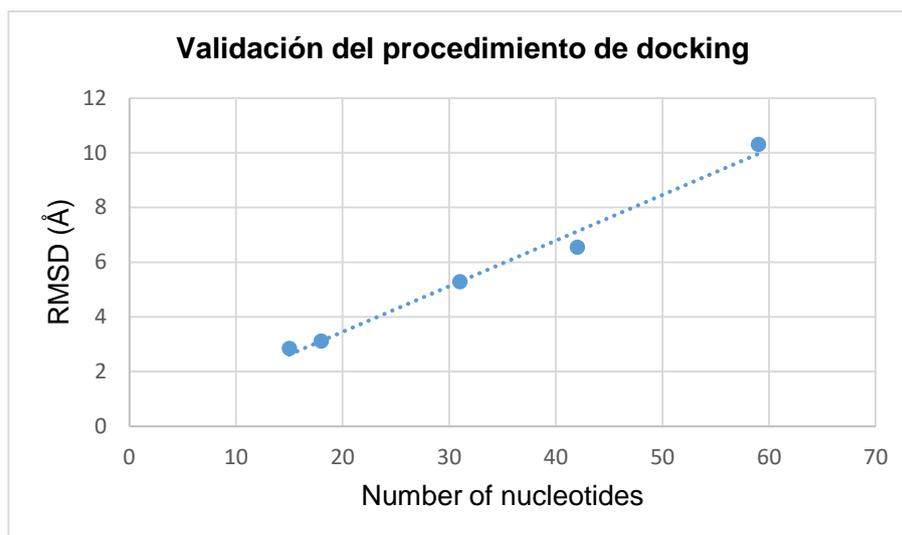
### 2.5.1 Validación del procedimiento de docking por el software Autodock4

Para el proceso de validación del software Autodock4, utilizado para el análisis inicial del estudio de docking molecular, se eligieron complejos moleculares entre aptámeros de DNA y proteínas dentro de un rango de longitud de la cadena de DNA de 5 a 59 nucleótidos, y con diferentes conformaciones estructurales. Esto con el fin de asegurar abarcar un rango diverso de aptámeros de DNA en el estudio de diseño, y de conocer los límites en el cálculo del software. Se puede apreciar en la figura 3, que existe un aumento en el RMSD (*Root Median Square Deviation*) a medida que existe un incremento en la longitud de la cadena de nucleótidos de los aptámeros de DNA. Lo anterior indica que existe un mayor sesgo en el procedimiento del cálculo por Autodock 4 y en la predicción de sitios de unión, para aptámeros de DNA a medida que se incrementa el tamaño de su cadena, es decir, existe una relación lineal.

Este tipo de validaciones se realiza ampliamente en estudios de docking y asegura el ajuste de parámetros del cálculo y de este modo, minimizar la aparición de resultados que sean falsos positivos y falsos negativos.

Existen diferentes maneras de realizar la validación de un proceso de docking molecular, no obstante, todas tienen el mismo fin. Este tipo de validación recibe el nombre de selección de pose (*pose selection*) y resulta uno de los procesos de validación más utilizados y prácticos (Hevener et al., 2009). Acorde a los valores de RMSD obtenidos, se puede observar que el procedimiento y el software utilizado, funciona de manera óptima en la predicción de sitios de unión de aptámeros de DNA con longitud de cadenas de tamaño menor a 59 nucleótidos. Esto, debido a que se ha sugerido en estudios previos que por el tamaño de los aptámeros como ligandos moleculares, es posible aceptar tolerancias de hasta 10 Å como RMSD (Rabal et al., 2016). Lo que esto traduce, consiste en que una buena predicción de sitios de unión de aptámeros de DNA en blancos moleculares es aquella en donde la desviación del centro geométrico del ligando, comparado con su posición original del cristal, se encuentra en un rango entre 0 Å hasta 10 Å.

Los parámetros del docking se dejaron por defecto, a excepción del Algoritmo Genético Lamarckiano elegido para la ejecución del cálculo y la elección de un número de evaluaciones máximo de 25'000.000.



**Figura 3.** Validación del procedimiento por Autodock4

Al visualizar los datos de energía de unión presentados en la tabla 1, se puede apreciar que para el complejo con código PDB 4M4O además de presentar un valor elevado del RMSD, presenta una energía de unión elevada que no correspondería a un proceso espontáneo de unión. Esto se puede explicar a partir del cálculo que realiza el software Autodock4 para calcular las energías de unión (ver Anexo 1), donde se aprecia para este ejemplo se tiene un valor muy elevado de energía torsional.

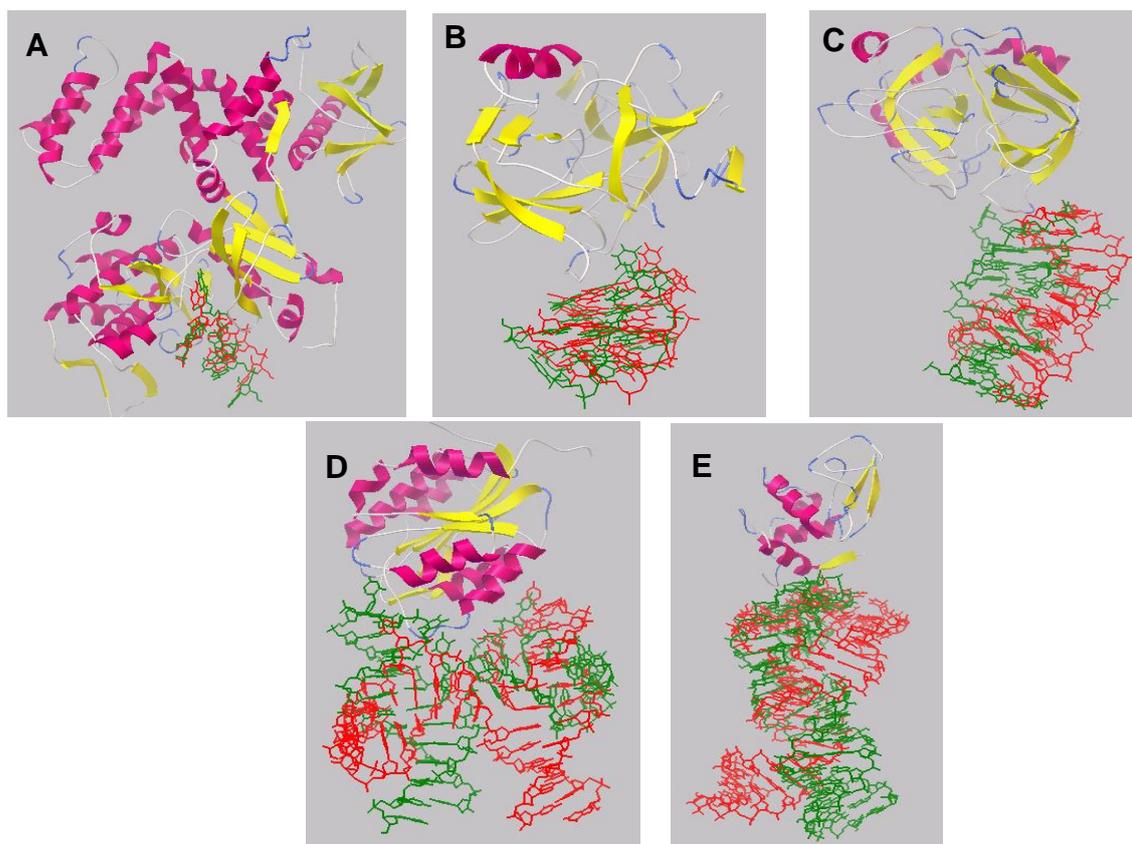
Este fenómeno se puede explicar de dos maneras: En primer lugar, debido a la complejidad en la estructura secundaria del DNA y su estabilidad por la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares, representa un proceso energético desfavorable al perder esta conformación para tener un tipo de interacción con la proteína blanco. En segundo lugar, se ha encontrado que el programa Autodock4 falla en el cálculo de docking para moléculas muy complejas que cuenten con más de 32 grados libres de torsión (Morris et al., 2009). No obstante, a pesar del sesgo que existe en el cálculo, para los complejos con aptámeros de menor cadena se obtiene una predicción en el cálculo aceptable.

**Tabla 1.** Resultados del procedimiento de validación vía Autodock4

Código PDB	Numero de nucleótidos del aptámero	RMSD (Å)	Energía de unión (Kcal/mol)
3UZT	7	2.84	4.70±0.0126
1HUT	15	3.11	24.00±0.0251

5CMX	31	5.29	48.41±0.00562
3HXO	42	6.55	54.75±0.0134
4M4O	59	10.31	128.18±0.187

A continuación, se esquematiza la visualización de manera gráfica del proceso de validación por selección de pose.



**Figura 4.** Proceso de validación por el método de selección de pose. **A)** Aptámero de 7nt unido al receptor kinasa 2 acoplado a proteína G (código PDB 3UZT). **B)** Proteína alfa-trombina unida a aptámero de 15nt (código PDN 1HUT). **C)** Proteína alfa-trombina humana unida a aptámero de 31nt (código PDB 5CMX). **D)** Complejo entre el dominio A1 del factor de von Willebrand 1 y aptámero de 42nt (código PDB 3HXO). **E)** Lisozima-E unida a una secuencia de aptámero de 59nt (código PDB 4M4O). Resultado experimental (verde) y resultado del cálculo teórico (rojo). Visualizado utilizando AutodockTools.

Se aprecia como a medida que crece la longitud de la cadena del aptámero de DNA, existe una mayor desviación en el cálculo en comparación a la posición inicial del cristal.

## 2.5.2 Screening de aptámero de DNA dirigido hacia la proteína A $\beta$ 40

Posterior al proceso de validación y ajuste de parámetros, se realizó la búsqueda de estructuras de aptámeros en el rango estipulado por el proceso de validación (longitudes menores a 59nt).

Cada uno de los aptámeros fue utilizado y modelado por docking hacia la estructura de la proteína A $\beta$ 40. Se realizó el cálculo de docking para un total de 30 aptámeros de DNA.

La clasificación del cálculo se realizó por un sistema de ranking por clusters, que es un método de análisis del Algoritmo Lamarckiano y permite visualizar qué ligandos se unieron en conformaciones similares a un blanco molecular en la misma región (Forli et al., 2012). De esta manera, aquellos cálculos con menor número de clusters contienen más estructuras unidas en conformaciones similares a una misma región de la proteína A $\beta$ 40, estos resultados también fueron reportados en conjunto con aquellos cálculos de energía menor a 30 Kcal/mol. Esto debido a que valores de energía mayores a 30 Kcal/mol con Autodock4, indican sesgos en el componente de energía torsional (Anexo 1) a causa de las limitaciones del software.

**Tabla 2.** Resultados de screening dirigidos a la proteína A $\beta$ 40.

Aptámero (código PDB)	Estructura	Largo de la cadena (nt)	Energía de unión (Kcal/mol)	Cluster RMSD	Clusters	Conformaciones en el cluster
134D	Triplex	31	36,41	0	10	1
184D	Cuádruplex	14	33,48	0	9	1
1A8N	Cuádruplex	24	38,18	1,5	8	3
1AC7	Hairpin	16	24,95	0,48	2	5
1BJH	Hairpin	11	15,80	0,07	2	8
1C11	Cuádruplex	11	35,01	0,07	1	10
1D16	Z-DNA	16	60,60	0,09	1	10
1FV8	Hairpin	11	15,02	1,2	2	5

1KR8	Hairpin	7	5,55	0	10	1
1LA8	Hairpin	13	20,08	0	7	1
1LAI	B-DNA	13	43,01	0	9	1
1P0U	Loop	13	14,89	0	10	1
1PQT	Hairpin	7	14,60	0	10	1
1XUE	Hairpin	17	22,63	0	10	1
1ZHU	Hairpin	10	9,49	0	10	1
2AVH	Hairpin	11	10,71	0	10	1
2K71	Hairpin	8	6,84	0	10	1
2K8Z	Dímero	16	21,81	0	10	1
2KAZ	cuádruplex	26	44,73	0	10	1
2L5K	Z-DNA	23	47,93	0	10	1
2LO5	Hairpin	12	11,14	0	10	1
2LO8	Hairpin	10	9,87	0	10	1
2M8Y	Hairpin	15	18,96	0	10	1
3T86	Hairpin	7	2,93	0	10	1
148D	G-cuádruplex	15	21,04	0	10	1
1C32	G-cuádruplex	20	19,63	0	10	1
1Y8D	Cuádruplex	42	57,71	0	10	1
2IDN	G-cuádruplex	15	23,34	0	10	1

2M53	G-cuádruplex	25	105,12	0	10	1
------	--------------	----	--------	---	----	---

A continuación, en la figura 4 se graficaron los resultados obtenidos de la energía unión de cada aptámero de DNA hacia la proteína A $\beta$ 40. Se observa, igual al proceso de validación, existe un comportamiento de aumento de la energía a medida que incrementa la longitud de la cadena de DNA, debido a las limitaciones del software en el cálculo de energía rotacional para sistemas grandes. Por esta razón, se decidió realizar el análisis de interacciones en la región de 0 a 20 nucleótidos en donde la mayoría de los resultados alcanzó energías menores a 30 Kcal/mol. Sin embargo, en esta región se encontraron 4 nucleótidos con energías mayores a 30 Kcal/mol.

Al observar las características de estos nucleótidos, se encontró que sus estructuras secundarias eran cuádruplex (código PDB 184D y 1C11), B-DNA (código PDB 1LAI) y Z-DNA (código PDB 1D16). Este tipo de estructuras secundarias se ha podido identificar y estudiar más a fondo gracias a los avances experimentales de metodologías SELEX. Se ha encontrado que al igual que las proteínas, los aptámeros de DNA con este tipo de estructuras secundarias forman *clusters* hidrófobos favorecidos por interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre anillos aromáticos y la complementariedad de bases nitrogenadas. No obstante, y a diferencia de las proteínas, éstos cuentan con cierta flexibilidad en su estructura brindada por el enlace fosfodiéster y el enlace glucosídico lo que le permite igualmente explorar muchas conformaciones (Gelinás, Davies, & Janjic, 2016).

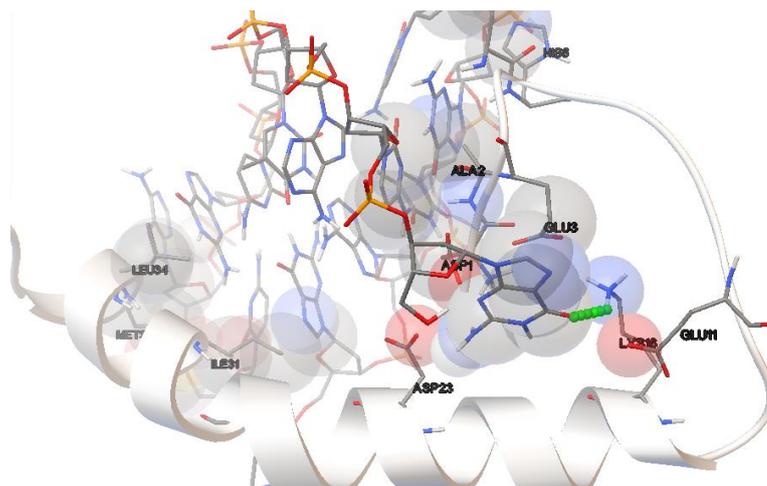
De acuerdo con los resultados obtenidos en la figura 4, las estructuras secundarias más complejas presentaron una energía de unión menos favorable ya que su rigidez hace que requieran de un aporte para realizar las torsiones, además que al ser más enlaces realizando esa torsión mayor será su energía requerida. Por el contrario, estructuras secundarias como tallos y bucles presentaron una energía de unión más favorable ya que tienen una mayor flexibilidad que le permite explorar diferentes conformaciones para un blanco molecular.

Estos resultados concuerdan con datos experimentales previos, que indican que el diseño de un aptámero de DNA contiene diferentes dominios rígidos que sirven como andamiaje, unidos por regios flexibles (tallos y bucles) los cuales le brindan la capacidad de reconocimiento ya que les permiten adoptar sus diferentes conformaciones (Gelinás et al., 2016). Acorde a esta evidencia, en el diseño del aptámero de DNA hacia la proteína A $\beta$ 40 se tuvo en cuenta que la región de reconocimiento de la proteína debía ser de baja complejidad estructural y flexible.



### 2.5.3 Diseño del aptámero de DNA

Con la información obtenida del proceso de docking molecular, se eligió el grupo de aptámeros correspondiente a energías de unión menores a 30 Kcal/mol, y se visualizaron para cada uno de los cálculos ejecutados las interacciones intermoleculares proteína-DNA más relevantes. Los tipos de interacciones reportados corresponden a interacciones tipo van der Waals con un factor de escala por defecto de 1.0 y enlaces de hidrogeno. A continuación, se presenta la visualización de las interacciones por el programa AutodockTools.



**Figura 7.** Modo de unión de aptámero de DNA (código PDB 1P0U) y proteína A $\beta$ 40 (código PDB 1BA4) predicho por el software Autodock4. Las esferas solidas indican interacciones de van der Waals y los puntos verdes interacciones tipo enlace de hidrogeno.

De esta manera, se reportaron cada una de las interacciones entre el tipo de nucleótido y aminoácido de la proteína. Los resultados se reportaron en términos de frecuencia y se tradujeron a términos porcentuales, como se muestra en la tabla a continuación. Como existía más una posibilidad de unión entre un nucleótido y un aminoácido, solo aquellas interacciones con más de una frecuencia se reportaron, y se tomó en cuenta para el diseño aquella interacción con mayor probabilidad de ocurrencia.

**Tabla 3.** Probabilidad de interacción de cada nucleótido de los aptámeros de DNA con los aminoácidos de la proteína Aβ40

	1	5	10	15	20	25	30	35	40																						
<b>DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVV</b>																															
Adenine	10	8	10		100	10	50	38	16	33	16	33	33	12	25	18	16	29	100												
Timine	5	25	50	20	33	100	30	5	50					25	50	17	18	16	33												
Guanine	65	25	92	20	100	50	100	100	100	100	100	100	100	100	33	33	20	50	38	16	33	44	66	66	38	25	50	36	34	33	42
Cytosine	20	50	50	50	33	40	19	16	33	39	25	34	100	28	34	33	29														

De acuerdo a este resultado obtenido, se puede apreciar que existe un predominio de unión de la guanina sobre diferentes tipos de aminoácidos, independientemente de su naturaleza. Este fenómeno es igualmente observado a nivel biológico, donde se ha demostrado que la guanina por su composición química, naturaleza y tamaño tiene mucha versatilidad en la formación de múltiples interacciones extra-helocoidales, es decir, fuera de la hélice de DNA (Subirana & Abrescia, 2000).

Cabe resaltar que uno de los mayores retos en el diseño de un aptámero afín a esta proteína radica en que al ser macromoléculas estructurales y no enzimáticas, no cuentan con un centro activo o alostérico hacia dónde dirigir el péptido. Es por esto, que el análisis se realiza sobre toda la secuencia de la proteína.

Con base en los resultados anteriores, se diseñó un aptámero de DNA que fuera flexible en cuanto a su estructura por lo que debía ser de un tamaño pequeño y estructura secundaria no compleja. Por esto, se fraccionó la proteína en tres fragmentos y con los datos de la tabla 3 se construyeron los posibles aptámeros (ver tabla 4).

Los nucleótidos en paréntesis indican que de acuerdo con los resultados de docking molecular, existe igual probabilidad de unión de un nucleótido sobre otro. De esto sale un número muy elevado de posibles aptámeros de unión a la proteína Aβ40. Aunque hoy en día existen metodologías de simulación validadas para el plegamiento de nucleótidos (Jeddi & Saiz, 2017), el tiempo de simulación total se sale de la capacidad de computo con que se contaba para este estudio.

**Tabla 4.** Diseño de aptámeros de DNA acorde a la probabilidad de interacción

Secuencia proteica de aminoácidos		
1-15	16-24	25-40

Secuencia de  
nucleótidos 5'-  
3'

GCG(T,C)CG(G,C)GGG G(T,G,C)TAC(A,G)(A,G)T (A,G,C)GGGGTGCG(G,C)(T,G,C)G

Por esta razón, se optó por realizar un estudio de homología e identificar qué secuencias cristalográficas reportadas tenían similitud con todas las posibles combinaciones de aptámeros de DNA propuesto (ver Anexo 2). De esta manera, posteriormente se podían inducir mutaciones y correr el cálculo de dinámica molecular a un menor tiempo. De todas las posibles combinaciones de secuencias de nucleótidos, se encontraron las siguientes estructuras que compartían homología con (código PDB): 2AVH, 1PQT, 1KR8, 1BJH, 1AC7, 1C32.

#### 2.5.4 Formación del complejo aptámero de DNA-proteína A $\beta$ 40

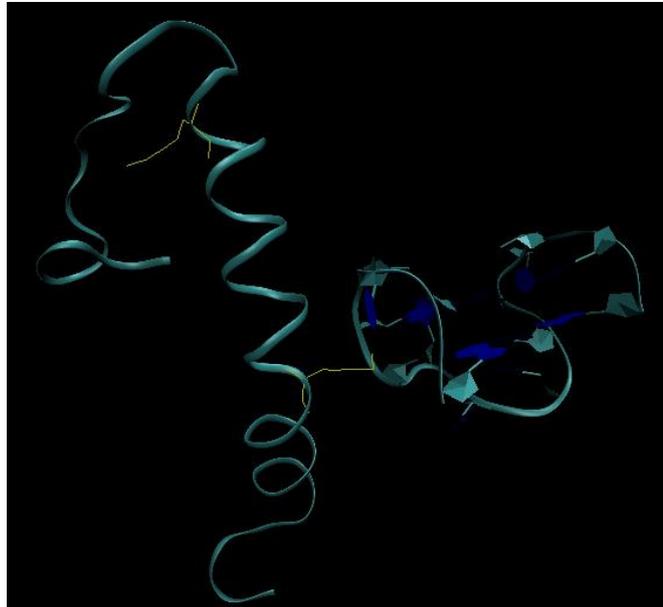
A través del cálculo de dinámica browniana se obtuvieron los complejos entre los aptámeros descritos anteriormente y la proteína A $\beta$ 40. El análisis se llevó a cabo de acuerdo al tamaño del primer cluster y la energía de interacción más favorable.

**Tabla 5.** Resultados de dinámica browniana de aptámeros de DNA unidos a la proteína A $\beta$ 40

Aptámero de DNA (código PDB)	Tamaño de <i>cluster 1</i>	Tamaño de <i>cluster 2</i>	Energía de <i>cluster 1</i> (kJ/mol)	Energía de <i>cluster 2</i> (kJ/mol)
2AVH	294	194	-4.332	-4.066
1PQT	230	155	-3.648	-3.210
1KR8	289	173	-3.961	-3.527
1BJH	244	202	-3.681	-3.526
1AC7	287	98	-4.076	-4.068
1LA8	344	90	-4.181	-4.362
1C32	344	96	-8.616	-7.234

Los resultados obtenidos arrojaron que el aptámero con código PDB 1C32, es aquel que tiene una mejor afinidad, en términos de energía de unión, a la

proteína por el cálculo de dinámica browniana. Todos los cálculos mostraron que la afinidad mayor se da en la porción media y terminal de la proteína A $\beta$ 40.



**Figura 8.** Formación del complejo entre el aptámero de DNA 1C32 y la proteína A $\beta$ 40. El aminoácido marcado corresponde a la lisina 28

La estructura visualizada corresponde a una representación del posicionamiento promedio de todas las trayectorias pertenecientes al primer *cluster*, para el aptámero de DNA. Se aprecia con la imagen del complejo existe una atracción electrostática visible entre el aminoácido marcado en amarillo (lisina 28) y los grupos fosfato del nucleótido. Esto indica que, al momento de interactuar el DNA con la proteína, en un inicio, las interacciones más relevantes en este proceso son las de tipo electrostático y que permiten exista un primer contacto entre ambas moléculas. Este indicio podría significar una etapa relevante en la interrupción de la agregación amiloide, debido a que se ha descubierto por medio de estudios computacionales en dinámica molecular, que este proceso es dependiente de las interacciones electrostáticas entre los diferentes monómeros (Yun et al., 2007).

### 2.5.5 Mutaciones y Simulación del complejo por dinámica molecular

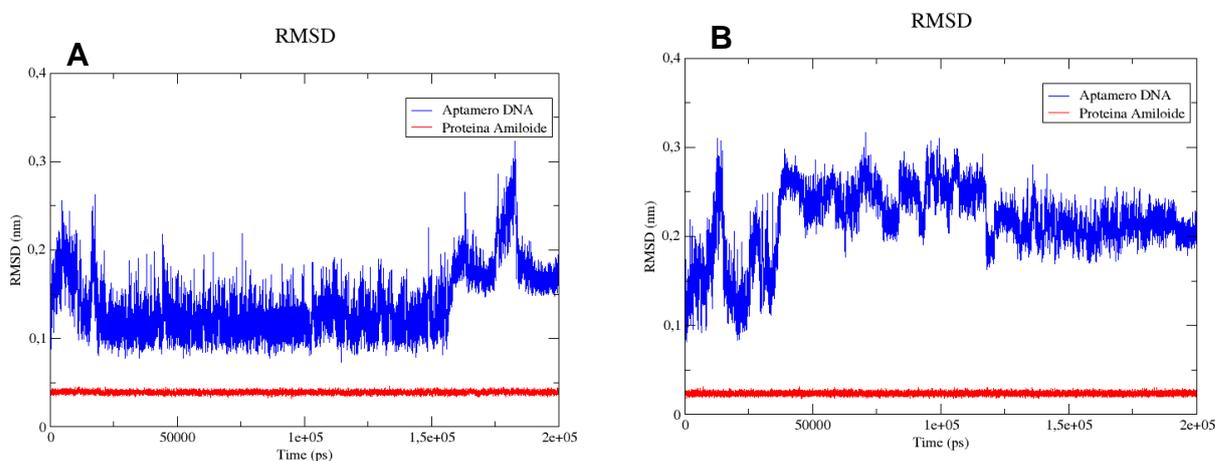
De acuerdo con los resultados de dinámica browniana, se realizaron las mutaciones pertinentes sobre el aptámero con código PDB 1C32, al cual le correspondieron 4 secuencias de los resultados previos de alineamiento. éstas se pueden visualizar en la tabla 6.

**Tabla 6.** Mutantes obtenidos para la simulación del complejo por dinámica molecular. El color verde indica mutación por transición (mismo tipo de nucleótido), y el color rojo indica mutación por transversión (diferente tipo de nucleótido). La primera secuencia indica el mutante y la segunda el nucleótido 1C32.

Secuencia FASTA aptámero 1C32		
	Alineamiento	Mutación
<b>Mutante 1</b>	-----GTTACGGT----- --GGTTGGTGGTGGTTGG--	GGTTACGGTGGTTGG
<b>Mutante 2</b>	-----GGTACGGT----- --GGTTGGTGGTGGT--TGG-	GGTTGGTACGGTTGG
<b>Mutante 3</b>	----GGGGGTGCGGTGG---- ---GGTTGGTGGTGGTTGG---	GGGGGGTGC GGTTGGG
<b>Mutante 4</b>	—GGGGGTGCGCGG---- -GGTTGGTGGTGGTTGG--	GGGGGGTGC GGCGCGG

Con las mutaciones obtenidas, se observó para el primer mutante de estudio, que se conserva una gran parte de la secuencia, pero se indujeron dos mutaciones de transversión que podrían alterar la estructura del aptámero y una sola mutación de transición, que podría no tener relevancia en la modificación de la estructura. Del otro lado, las mutaciones para el mutante 2 correspondían ambas a transiciones y se esperaba que éstas no alteraran su estructura durante la simulación del complejo.

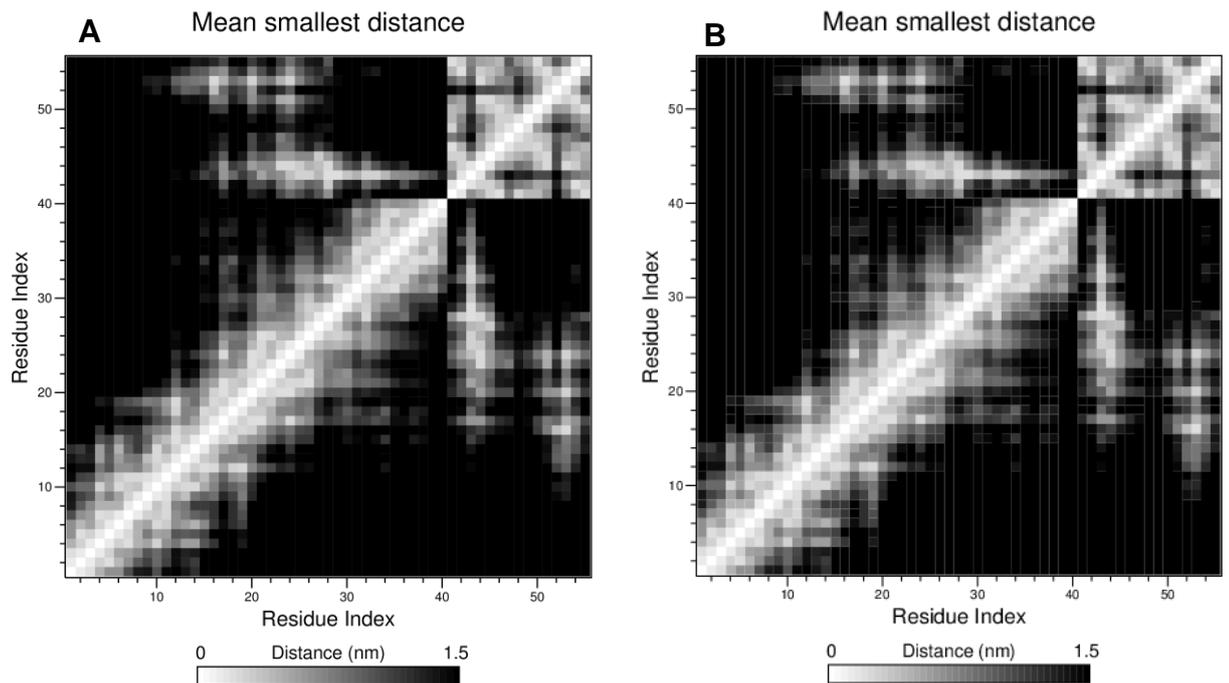
Debido a la capacidad de computo, se lograron simular 2 del total de 4 mutantes propuesto para la estructura 1C32 por un tiempo total de 200 ns cada una. Se calculó igualmente la minimización de las energías para verificar que se encontraran en una estructura que correspondiera al mínimo de energía (ver Anexo 3), los parámetros de minimización y equilibrio se reportan igualmente (ver Anexo 4 y Anexo 5, respectivamente).



**Figura 9.** Valores de RMSD para los complejos proteína-DNA durante la simulación de 200 ns. **A)** Valores para mutante 1. **B)** Valores para mutante 2

De acuerdo con los resultados finales de la simulación, la estructura correspondiente al mutante 1 alcanza una estructura más estable y con menor variación en las posiciones de sus átomos, que la estructura correspondiente al mutante 2. Aunque durante los 200 ns de simulación no se alcanzó una estabilidad completa, los valores de RMSD son a escala menor a 1 nm, por lo que el tiempo de simulación fue suficiente para observar los comportamientos de la interacción entre la proteína A $\beta$ 40 y cada uno de los aptámeros. Cabe resaltar, que para el mutante 1 aunque existe un aumento abrupto del RMSD al final de la simulación, éste se alcanzó a estabilizar. Para el mutante 2 se aprecia una estabilización desde los 5 ns. Cabe resaltar que los resultados bajos de RMSD para la proteína se dan porque su modelamiento durante la dinámica de ejecutó con restricción de posiciones.

A continuación, se analizaron los contactos entre los aptámeros de DNA y la proteína de estudio, durante la simulación. En la figura 10, se observan las regiones donde hacen contacto en promedio el aptámero de DNA con la proteína en los 200 ns. En ambas simulaciones se encuentran resultados similares, donde el aptámero de DNA tiene preferencia de interacción en la región media y terminal proteica. En estas regiones se encuentran los aminoácidos lisina 16 y lisina 29, cuya interacción electrostática reportada anteriormente indica es un primer indicio en el acoplamiento e interacción intermolecular electrostática. Igualmente, existen aminoácidos positivos como la arginina 5 e histidina 6 pero no se reportó interacción electrostática. La importancia de unión en esta región terminal, radica en que corresponde a la porción hidrófoba de la proteína (aminoácidos 17-21), la cual es fundamental en el proceso de fibrilogenesis y formación de placas, por lo que se podría asumir que estos aptámeros tendrían la capacidad de irrumpir estas interacciones y así evitar la formación de fibrillas neurotóxicas (Sinha, Lopes, & Bitan, 2012).



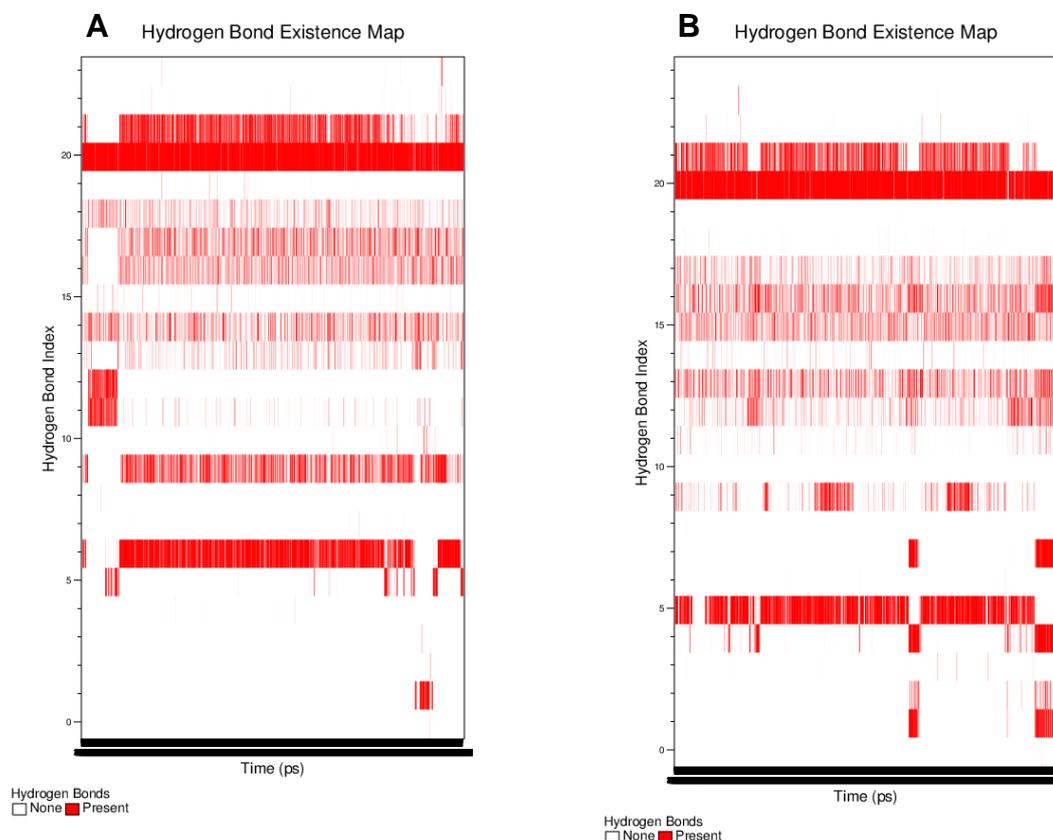
**Figura 10.** Mapa de contacto promedio de la proteína A $\beta$ 40 y los aptámeros de DNA diseñados. **A)** mutante 1. **B)** mutante 2. Los valores de índice de 1-40 corresponden a la proteína A $\beta$ 40 y los valores de 41-55 al aptámero de DNA.

En un análisis más a fondo, se evaluaron los mapas de formación de puentes de hidrogeno en la simulación para ambos aptámeros de DNA. En la figura 11 se ven los resultados para el tiempo de simulación, en donde para ambos aptámeros, existen puentes de hidrogeno que predominan desde el inicio de la simulación, asimismo se vio que existió una mayor formación de puentes de hidrogeno del mutante 2. Por efectos de la dinámica de la simulación, cada aminoácido o nucleótido interactúa con más de un átomo en el tiempo. No obstante, solo se toman en cuenta para el análisis aquellas interacciones más predominantes.

Al analizar uno por uno los tipos de puentes de hidrogeno formados (tabla 7), para el mutante 1 los enlaces más predominantes fueron entre la lisina 16 y timina 13, asparagina 27 y adenina 5, timina 3 y glicina 29. De estas interacciones, cabe resaltar que el mutante adenina 5 genera una interacción favorable con la asparagina 27 la cual se ha caracterizado por ser un agente formador de puentes salinos en la fibrilogenesis, además de la lisina 16 y otras interacciones no tan relevantes pero que caben resaltar como la lisina 28 y aspartato 23 (Sinha et al., 2012).

Por otro lado, para el mutante 2 se identificaron las interacciones lisina 16 y timina 13, timina 3 y glicina 29, timina 4 y aspartato 23, además de asparagina 27 y adenina 8 la cual corresponde a una de las mutaciones. Igual que la simulación con el mutante 1, la asparagina 27 hace interacción con una adenina

mutada e intervienen otro tipo de aminoácidos involucrados en la fibrilogenesis que fueron mencionados anteriormente.



**Figura 11.** Mapa de formación de puentes de hidrogeno de la proteína A $\beta$ 40 y los aptámeros de DNA diseñados. **A)** mutante 1. **B)** mutante 2. Los índices de puentes de hidrogeno se muestran en la tabla 7.

**Tabla 7.** Índice de formación de enlaces de hidrogeno correspondiente a la figura 11. Los resultados fueron ordenados en orden ascendente de la figura. Los nombres de los átomos son dados por la topología del software Gromacs.

Mutante 1			Mutante 2		
Donor	Hidrogeno	Aceptor	Donor	Hidrogeno	Aceptor
LYS16NZ	LYS16HZ1	DG11O3'	LYS16N	LYS16H	DT13O2P
LYS16NZ	LYS16HZ1	DT12O1P	LYS16NZ	LYS16HZ1	DT12O1P
LYS16NZ	LYS16HZ1	DT12O2P	LYS16NZ	LYS16HZ1	DT12O5'
LYS16NZ	LYS16HZ1	DT12O5'	LYS16NZ	LYS16HZ1	DT12O3'
LYS16NZ	LYS16HZ1	DT12O3'	LYS16NZ	LYS16HZ1	DT13O1P
LYS16NZ	LYS16HZ1	DT13O1P	LYS16NZ	LYS16HZ1	DT13O2P
LYS16NZ	LYS16HZ1	DT13O2P	LYS16NZ	LYS16HZ1	DT13O5'
LYS16NZ	LYS16HZ1	DT13O5'			
ASN27ND2	ASN27HD21	DT4O2P	LEU17N	LEU17H	DT13O2P

ASN27ND2 ASN27ND2	ASN27HD21 ASN27HD21	DA5O1P DA5O2P			
LYS28N LYS28NZ LYS28NZ LYS28NZ LYS28NZ LYS28NZ LYS28NZ	LYS28H LYS28HZ1 LYS28HZ1 LYS28HZ1 LYS28HZ1 LYS28HZ1 LYS28HZ1	DT3O2 DT3O1P DT3O2P DT3O5' DT3O4' DT3O3' DT4O2P	ASN27ND2 ASN27ND2 ASN27ND2	ASN27HD21 ASN27HD21 ASN27HD21	DT7O1P DA8O1P DA8O2P
GLY29N	GLY29H	DT3O2	LYS28N LYS28NZ LYS28NZ LYS28NZ LYS28NZ LYS28NZ	LYS28H LYS28HZ1 LYS28HZ1 LYS28HZ1 LYS28HZ1 LYS28HZ1	DT3O2 DT3O2P DT3O5' DT3O4' DT3O3' DT4O2P
GLY33N	GLY33H	DT3O4	GLY29N	GLY29H	DT3O2
DT3N3 DT4N3 DT4N3	DT3H3 DT4H3 DT4H3	GLY29O ASP23OD1 ASP23OD2	GLY33N	GLY33H	DT3O4
DG11N2	DG11H21	ASP23OD1	DT3N3 DT3N3	DT3H3 DT3H3	GLY25O GLY29O
			DT4N3 DT4N3	DT4H3 DT4H3	ASP23OD1 ASP23OD2
			DG11N2	DG11H21	ASP23OD1
			DT12N3	DT12H3	HID13O

## 2.6 Conclusiones

Del proceso de validación del software Autodock4, se evidenció limitaciones existentes en el cálculo para estructuras complejas que intervengan con más de 32 grados de libertad para torsión de enlaces. Esto debe ser tenido en cuenta a la hora de realizar estudios de docking molecular con estos sistemas, usando Autodock4.

El *screening* realizado con Autodock4, indicó que existen en los aptámeros regiones flexibles y regiones rígidas de acuerdo con la estructura secundaria que estos adoptan. Estructuras muy rígidas como G-quadruplex o Z-DNA, cuentan con clústeres hidrofóbicos que le confieren la suficiente rigidez como para hacer su rotación y pérdida de estructura un fenómeno energéticamente muy desfavorable. Por otro lado, estructuras más flexibles y menos complejas como *hairpins* y *loops*, muestran energías de unión mucho más favorables debido a la facilidad de obtención de diferentes poses estructurales para reconocer una macromolécula.

Sim embargo, con las interacciones obtenidas se pudo llegar al diseño de aptámeros de DNA que compartieron similitud de secuencia con estructuras cristalográficas ya reportadas. Aunque en el resultado de *screening* se obtuvieron interacciones alrededor de toda la estructura de la proteína A $\beta$ 40, los resultados obtenidos por dinámica browniana indican que la interacción

electrostática de residuos cargados positivamente, ubica los aptámeros de DNA sobre la región media y terminal de la proteína.

Este resultado se corroboró después de realizar las simulaciones de los mutantes, a través del mapa de contacto. Al analizar la formación de puentes de hidrogeno, se observó la adenina mutada en ambos nucleótidos hace interacción con la asparagina 27, involucrada en el proceso de fibrilogenesis; además de otras interacciones relevantes con otros residuos de la región media y terminal involucrados en este proceso. Con estos resultados, se han caracterizado para los aptámeros de DNA diseñados una serie de interacciones con aminoácidos clave en el proceso de agregación amiloide de A $\beta$ 40, mediante un análisis computacional. No obstante, se deben validar estos resultados con trabajos experimentales.

## 2.7 Recomendaciones

Se recomienda utilizar softwares de docking molecular, como Maestro®, con mayor capacidad de cálculo, para obtener resultados más veraces y explorar nuevas interacciones intermoleculares.

Correr las simulaciones a tiempos más largos e identificar nuevos comportamientos e interacciones con la proteína A $\beta$ 40. Igualmente, realizar los mismos estudios con los dos mutantes restantes y comparar los resultados obtenidos o reportar nuevas interacciones.

Por último, es importante validar estos resultados con trabajo experimental *in vitro* para fortalecer las observaciones del estudio computacional.

## 3. Referencias

- Alzheimer's association. (2018). *2018 Alzheimer's Disease Facts and Figures*. Retrieved from [https://www.alz.org/media/HomeOffice/Facts and Figures/facts-and-figures.pdf](https://www.alz.org/media/HomeOffice/Facts_and_Figures/facts-and-figures.pdf)
- Alzheimer's Disease International. (2018). World Alzheimer Report 2018 - The state of the art of dementia research: New frontiers, 1–48. <https://doi.org/10.3354/meps143077>
- Bachurin, S. O., Bovina, E. V., & Ustyugov, A. A. (2017). Drugs in Clinical Trials for Alzheimer's Disease: The Major Trends. *Medicinal Research Reviews*, 37(5), 1186–1225. <https://doi.org/10.1002/med.21434>
- Bouvier-Müller, A., & Ducongé, F. (2018). Nucleic acid aptamers for neurodegenerative diseases. *Biochimie*, 145, 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.10.026>
- Bruno, J. G. (2015). Predicting the uncertain future of aptamer-based diagnostics and therapeutics. *Molecules*, 20(4), 6866–6887. <https://doi.org/10.3390/molecules20046866>

- Chávez, M., Fuentes, M., Rodrigue, L., Montero, A., Carreno, I., Chávez, G., & Andrade, S. (2012). *Introducción a la Química Computacional: Notas de Clase*. Lexington: Universidad Autónoma de Chihuahua. Retrieved from <https://books.google.com.co/books?id=ivWAMAEACAAJ&dq=introduccion+a+la+quimica+computacional+apuntes+de+clase&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwimz8iH3vfaAhXOtVvKHRRDAasQ6AEIKDAA>
- Chen, J. C., & Kim, A. S. (2004). Brownian dynamics, molecular dynamics, and monte carlo modeling of colloidal systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 112(1–3), 159–173. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2004.10.001>
- Cramer, C. J. (2013). *Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models*. (Second edi). Minnesota: Wiley.
- Cuevas, G. (2003). *Introducción a la química computacional*. México D.F: Fondo de Cultura Económica. Retrieved from <https://www.elfondoenlinea.com/Detalle.aspx?ctit=008184R>
- de Jesus de Paula, V. R., Meira Guimarães, F., Satler Diniz, B., & Vicente Forlenza, O. (2009). *Amyloid-beta, TAU protein or both? Dementia & Neuropsychologia* (Vol. 3). Retrieved from <http://www.scielo.br/pdf/dn/v3n3/1980-5764-dn-3-03-00188.pdf>
- Dumery, L., Bourdel, F., Soussan, Y., Fialkowsky, A., Viale, S., & Nicolas, P. (2001). Revue générale  $\beta$  -Amyloid protein aggregation : its implication in the physiopathology of Alzheimer ' s disease. *Pathologie-Biologie*, 8114(00), 72–85.
- Duthey, B. (2013). Background Paper 6.11 Alzheimer Disease and other Dementias. *World Health Organization*, (February), 1–77. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.155>
- Forli, W., Halliday, S., Belew, R., & Olson, A. (2012). AutoDock Version 4.2. *Citeseer*. La Jolla, CA: The Scipps Institute of Technology. Retrieved from <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.363.3063&rep=rep1&type=pdf>
- Fuhrmann, J., Rurainski, A., Lenhof, H.-P., & Neumann, D. (2010). A new Lamarckian genetic algorithm for flexible ligand-receptor docking. *Journal of Computational Chemistry*, 31(9), NA-NA. <https://doi.org/10.1002/jcc.21478>
- Gabdoulline, R. R., & Wade, R. C. (1998). *Brownian Dynamics Simulation of Protein-Protein Diffusional Encounter. METHODS: A Companion to Methods in Enzymology* (Vol. 14). Retrieved from <https://dasher.wustl.edu/chem478/labs/lab-11/methods-14-329-98.pdf>
- Gallicchio, E., & Levy, R. M. (2011). *Recent theoretical and computational advances for modeling protein-ligand binding affinities. Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (1st ed., Vol. 85). Elsevier Inc.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386485-7.00002-8>

- Gelinas, A. D., Davies, D. R., & Janjic, N. (2016). Embracing proteins: Structural themes in aptamer-protein complexes. *Current Opinion in Structural Biology*, 36, 122–132. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.01.009>
- Giraldo, D. L., García-Arteaga, J. D., Cárdenas-Robledo, S., & Romero, E. (2018). Characterization of brain anatomical patterns by comparing region intensity distributions: Applications to the description of Alzheimer's disease. *Brain and Behavior*, 8(4), 1–12. <https://doi.org/10.1002/brb3.942>
- Gois, S. (2017). Biomarcadores y Marcadores de Imagen de la Enfermedad de Alzheimer, 35(3), 864–869. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022017000300011>
- Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5580), 353–356. <https://doi.org/10.1126/science.1072994>
- Hays, E. M., Duan, W., & Shigdar, S. (2017). Aptamers and glioblastoma: Their potential use for imaging and therapeutic applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12). <https://doi.org/10.3390/ijms18122576>
- Hevener, K. E., Zhao, W., Ball, D. M., Babaoglu, K., Qi, J., White, S. W., & Lee, R. E. (2009). Validation of molecular docking programs for virtual screening against dihydropteroate synthase. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 49(2), 444–460. <https://doi.org/10.1021/ci800293n>
- Huey, R., Morris, G. M., & Forli, S. (2012). Using AutoDock 4 and AutoDock Vina with AutoDockTools: A Tutorial. La Jolla, CA: The Scripps Institute of Technology. Retrieved from [http://autodock.scripps.edu/faqs-help/tutorial/using-autodock-4-with-autodocktools/2012\\_ADTtut.pdf](http://autodock.scripps.edu/faqs-help/tutorial/using-autodock-4-with-autodocktools/2012_ADTtut.pdf)
- Jedari, C., Palomino, A. M., & Drumm, E. C. (2018). Physiopathological modulators of amyloid aggregation and novel pharmacological approaches in Alzheimer's disease. *Geotechnical Special Publication, 2018–March*(GSP 296), 265–284. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652002000200006>
- Jeddi, I., & Saiz, L. (2017). Three-dimensional modeling of single stranded DNA hairpins for aptamer-based biosensors. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01348-5>
- Keefe, A. D., Pai, S., & Ellington, A. (2010). Aptamers as therapeutics. *Nature Reviews*, 9(july). <https://doi.org/10.1038/nrd3141>
- Leach, A. R. (2001). *Molecular modelling : principles and applications* (Pearson Ed). Harlow: Prentice Hall. Retrieved from <https://books.google.com.co/books?id=kB7jsbV-uhkC&dq=molecular+modeling+principles+and+applications&hl=en&sa=X&>

ved=0ahUKEwiewa-p7PfaAhVkoFkKHU3VAsUQ6AEIKDAA

- Lemkul, J. (2008). GROMACS Tutorials. Baltimore: University of Maryland. Retrieved from <http://www.bevanlab.biochem.vt.edu/Pages/Personal/justin/gmx-tutorials/>
- Manley, J. L. (2013). SELEX to Identify Protein-Binding Sites on RNA. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2013(2), pdb.prot072934-pdb.prot072934. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot072934>
- Mascini, M., Palchetti, I., & Tombelli, S. (2012). Nucleic acid and peptide aptamers: Fundamentals and bioanalytical aspects. *Angewandte Chemie - International Edition*, 51(6), 1316–1332. <https://doi.org/10.1002/anie.201006630>
- Max Planck Institute for Biophysical Chemistry. (2018). Computational biomolecular dynamics group. Retrieved November 2, 2018, from [http://www3.mpibpc.mpg.de/groups/de\\_groot/contact.html](http://www3.mpibpc.mpg.de/groups/de_groot/contact.html)
- Meli, M., Gasset, M., & Colombo, G. (2018). Are Amyloid Fibrils RNA-Traps? A Molecular Dynamics Perspective, 5(June), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00053>
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., & Olson, A. J. (1998). AutoDock-related material Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. *Comput. Chem. J. Comput. Chem*, 19(28), 1639–1662. <https://doi.org/10.1002/jcc.20634>
- 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. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Murphy, M. P., LeVine, H., & III. (2010). Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 19(1), 311–323. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1221>
- Padayachee, E., Ngqwala, N., & Whiteley, C. G. (2012). Association of  $\beta$ -amyloid peptide fragments with neuronal nitric oxide synthase: Implications in the etiology of Alzheimers disease. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 27(3), 356–364. <https://doi.org/10.3109/14756366.2011.590805>
- Pekka, M., & Nilsson, L. (2001). Structure and Dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E Water Models at 298 K. *Journal of Physical Chemistry A*, 105(43), 9954–9960. <https://doi.org/10.1021/JP003020W>
- Rabal, O., Pastor, F., Villanueva, H., Soldevilla, M. M., Hervas-Stubbs, S., & Oyarzabal, J. (2016). In Silico Aptamer Docking Studies: From a

Retrospective Validation to a Prospective Case Study' TIM3 Aptamers Binding. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 5(October), e376. <https://doi.org/10.1038/mtna.2016.84>

Rijal Upadhaya, A., Kosterin, I., Kumar, S., Von Arnim, C. A. F., Yamaguchi, H., Fändrich, M., ... Thal, D. R. (2014). Biochemical stages of amyloid- $\beta$  peptide aggregation and accumulation in the human brain and their association with symptomatic and pathologically preclinical Alzheimer's disease. *Brain: A Journal of Neurology*, 137(3), 887–903. <https://doi.org/10.1093/brain/awt362>

Schlick, T. (2002). *Molecular modeling and simulation : an interdisciplinary guide*. New York: Springer.

Seeman, P., & Seeman, N. (2011). Alzheimer's disease:  $\beta$ -amyloid plaque formation in human brain. *Synapse*, 65(12), 1289–1297. <https://doi.org/10.1002/syn.20957>

Shui, B., Tao, D., Florea, A., Cheng, J., Zhao, Q., Gu, Y., ... Guo, Z. (2018). Biosensors for Alzheimer's disease biomarker detection: A review. *Biochimie*, 147, 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.12.015>

Sinha, S., Lopes, D. H. J., & Bitan, G. (2012). A key role for lysine residues in amyloid  $\beta$ -protein folding, assembly, and toxicity. *ACS Chemical Neuroscience*, 3(6), 473–481. <https://doi.org/10.1021/cn3000247>

Siu, S. W. I., Pluhackova, K., & Böckmann, R. A. (2012). Optimization of the OPLS-AA Force Field for Long Hydrocarbons. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 8(4), 1459–1470. <https://doi.org/10.1021/ct200908r>

Stone, J. E., Aksimentiev, A., Arkhipov, A., Birnbaum, R., Brunner, R., Cohen, J., ... Yin, Y. (2017). Using VMD. Urbana-Campaign: University of Illinois at Urbana-Campaign. Retrieved from <http://www.ks.uiuc.edu/Training/TutorialsOverview/vmd/tutorial-html/>

Subirana, J. A., & Abrescia, N. G. (2000). Extra-helical guanine interactions in DNA. *Biophysical Chemistry*, 86(2–3), 179–189. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11026683>

Torreilles, F., & Touchon, J. (2002). Pathogenic theories and intrathecal analysis of the sporadic form of Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*, 66, 191–203. Retrieved from [https://nebulosa.icesi.edu.co:2148/S0301008201000302/1-s2.0-S0301008201000302-main.pdf?\\_tid=c5130e87-d1ec-4236-94ee-d145840005a7&acdnat=1525654608\\_04475674deef02b7a3cb634abdc17f87](https://nebulosa.icesi.edu.co:2148/S0301008201000302/1-s2.0-S0301008201000302-main.pdf?_tid=c5130e87-d1ec-4236-94ee-d145840005a7&acdnat=1525654608_04475674deef02b7a3cb634abdc17f87)

Tuerk, C., & Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, 249(4968), 505–510. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2200121>

- Vigmond, E. (2015). Grace Tutorials. Tulane: University of Tulane. Retrieved from <http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/doc/Tutorial.html>
- Ylera, F., Lurz, R., Erdmann, V. A., & Fürste, J. P. (2002). Selection of RNA aptamers to the alzheimer's disease amyloid peptide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290(5), 1583–1588. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6354>
- Young, D. C. (2001). *Computational chemistry: a practical guide for applying techniques to real world problems*. Wiley.
- Yun, S., Urbanc, B., Cruz, L., Bitan, G., Teplow, D. B., & Stanley, H. E. (2007). Role of electrostatic interactions in amyloid  $\beta$ -protein ( $A\beta$ ) oligomer formation: A discrete molecular dynamics study. *Biophysical Journal*, 92(11), 4064–4077. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.097766>
- Zhou, Y., Zhang, H., Liu, L., Li, C., Chang, Z., Zhu, X., ... Xu, M. (2016). Fabrication of an antibody-aptamer sandwich assay for electrochemical evaluation of levels of  $\beta$ -amyloid oligomers. *Scientific Reports*, 6(July), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep35186>
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3406–3415. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12824337>

## Anexos

**Anexo 1.** Calculo de energías de unión por Autodock 4. Ejemplo de cálculo para el aptámero 1BJH (código PDB)

Estimated Free Energy of Binding = +15.79 kcal/mol  
 [= (1)+(2)+(3)-(4)]

- (1) Final Intermolecular Energy = -5.99 kcal/mol  
 vdW + Hbond + desolv Energy = -6.25 kcal/mol  
 Electrostatic Energy = +0.26 kcal/mol
- (2) Final Total Internal Energy = -7.85 kcal/mol
- (3) Torsional Free Energy = +21.78 kcal/mol
- (4) Unbound System's Energy [= (2)] = -7.85 kcal/mol

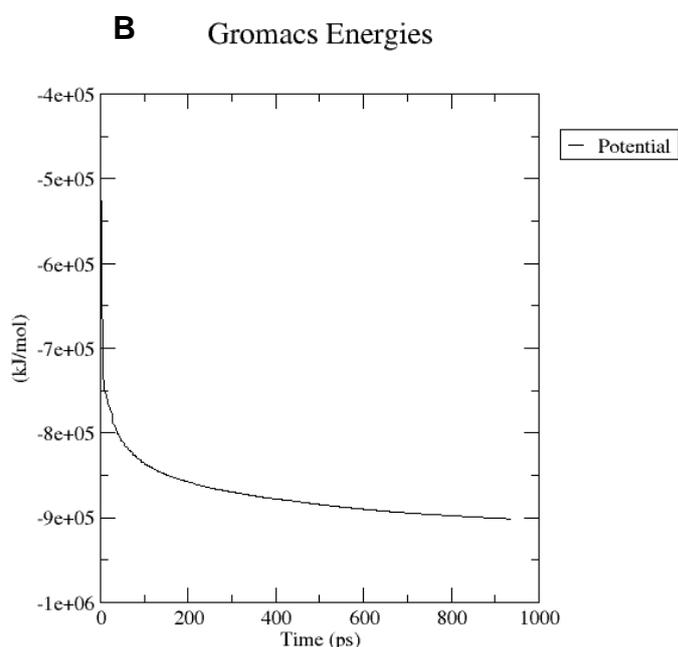
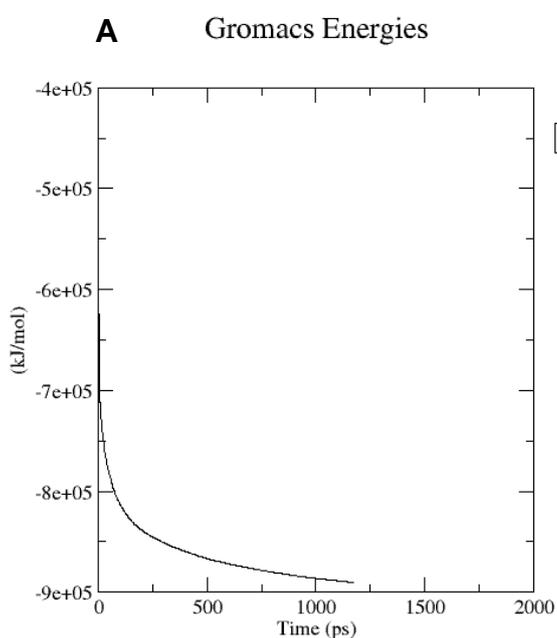
**Anexo 2.** Resultados del análisis de secuencias de DNA propuestas por alineamiento con estructuras conocidas de la base de datos del Protein Data Bank. Cada sección indica la región de la proteína Aβ40 para la que fueron diseñadas.

Alineamiento		
1-15nt	16-24nt	25-40nt
>Apt1_1:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-10 >2AVH:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-11 -----GCGTCGGGGG--- ----GGGGTTTGGGG---  >Apt1_2:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-10 >1PQT:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-7 --GCGTCGCGGG----- --GCGAAGC-----  >Apt1_3:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-10 >1KR8:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-7 --GCGCCGGGG----G--- --GCGAAGC-----  >Apt1_4:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-10 >1KR8:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-7 --GCGCCGCGGG----- --GCGAAGC-----	>Apt2_1:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-8 >1BJH:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-11 GTTACAAT----- --GTACAAAGTAC-----  >Apt2_2:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-8 >1AC7:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-16 -----GTTACGAT--- -ATCCTAGTTATAGGAT---  >Apt2_3:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-8 >1C32:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-15 ----GTTACGGT----- --GGTTGGTGTGGTTGG---  >Apt2_4:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-8 >1AC7:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-16 -----GTTACAGT--- --ATCCTAGTTATAGGAT--  >Apt2_5:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-8 >1BJH:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-11 GGTACAAT----- --GTACAAAGTAC-----	>Apt3_1:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-13 >2AVH:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-11 ---AGGGGTGCGGTGG---- ----GGGGTTTGGGG----  >Apt3_2:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-13 >2AVH:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-11 ---AGGGGTGCGGGGG---- ----GGGGTTTGGGG----  >Apt3_3:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-13 >2AVH:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-11 ---AGGGGTGCGGCGG---- ----GGGGTTTGGGG----  >Apt3_5:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-13

	<p>&gt;Apt2_7:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-8  &gt;1C32:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-15  -----GGTACGGT-----  --GGTTGGTGTGGT--TGG-</p> <p>&gt;Apt2_8:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-8  &gt;1BJH:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-11  --GGTACAGT-----  ---GTACAAAGTAC-----</p> <p>&gt;Apt2_9:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-8  &gt;1BJH:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-11  GCTACAAT-----  --GTACAAAGTAC-----</p> <p>&gt;Apt2_12:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-8  &gt;2LO8:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-10  -GCTACAGT-----  -GCCGCAGTGC-----</p>	<p>&gt;2AVH:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-11  -----AGGGGTGCGCGGG--  -----GGGGTTTGGGG---</p> <p>&gt;Apt3_7:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-13  &gt;1C32:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-15  ---GGGGGTGCGGTGG----  --GGTTGGTGTGGTTGG---</p> <p>&gt;Apt3_8:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-13  &gt;2AVH:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-11  ---GGGGGTGCGGGGG----  ----GGGGTTTGGGG-----</p> <p>&gt;Apt3_9:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-13  &gt;1C32:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-15  ---GGGGGTGCGGCGG----  - GGTTGGTGTGGTTGG---</p> <p>&gt;Apt3_11:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-13  &gt;2AVH:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-11  -----GGGGGTGCGCGGG--  -----GGGGTTTGGGG---</p> <p>&gt;Apt3_13:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-13  &gt;2AVH:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-11  ---CGGGGTGCGGTGG----  ----GGGGTTTGGGG-----</p> <p>&gt;Apt3_14:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-13  &gt;2AVH:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-11  ---CGGGGTGCGGGGG----  -----GGGGTTTGGGG-----</p> <p>&gt;Apt3_15:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-13  &gt;2AVH:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-11  ---CGGGGTGCGGCGG----  ----GGGGTTTGGGG-----</p> <p>&gt;Apt3_17:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-13  &gt;1LA8:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-13  ---CGGGGTGCGCGGG--  ---CGCGGTGTCCGCG---</p>
--	---	--

		<pre> &gt;Apt3_18:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-13 &gt;2LO8:A PDBID CHAIN SEQUENCE/1-10 ----CGGGGTGCGCCGG---- -GCCGCAGTGC----- </pre>
--	--	--

**Anexo 3. Resultados de minimización de energía. A) Mutante 1. B) Mutante 2**



**Anexo 4. Parámetros del cálculo de energía de minimización para ambos mutantes.**

```

min
define          =
integrator      = steep
emtol          = 1000.0
nsteps         = 50000
nstlist        = 10
cutoff-scheme  = Verlet
rlist          = 1.2
vdwtype        = Cut-off
rvdw           = 1.0
coulombtype    = pme
rcoulomb       = 1.0

```

```
;
constraints          = h-bonds
constraint_algorithm = LINCS
```

## **Anexo 5.** Parámetros del cálculo de equilibrio para ambos mutantes

```
equilib.
include              =
; e.g.: -DPOSRES -DFLEXIBLE (note these variable names are case sensitive)
define               = -DPOSRES_Protein

; RUN CONTROL PARAMETERS
integrator           = md
; Start time and timestep in ps
tinit                = 0
dt                   = 0.002 ; dickson2014
nsteps               = 5000000 ; 10ns
; For exact run continuation or redoing part of a run
init_step            = 0
; Part index is updated automatically on checkpointing (keeps files separate)
simulation-part      = 1
; mode for center of mass motion removal
comm-mode            = Linear
; number of steps for center of mass motion removal
nstcomm              = 100 ; mustn't be smaller than nstcalcenergy
; group(s) for center of mass motion removal
comm-grps            = System

; LANGEVIN DYNAMICS OPTIONS
; Friction coefficient (amu/ps) and random seed
bd-fric              = 0
ld-seed              = 1983

; ENERGY MINIMIZATION OPTIONS
; Force tolerance and initial step-size
emtol                = 10
emstep               = 0.01
; Max number of iterations in relax-shells
niter                = 20
; Step size (ps^2) for minimization of flexible constraints
fcstep               = 0
; Frequency of steepest descents steps when doing CG
nstcgsteep           = 1000
nbfgrscorr           = 10

; TEST PARTICLE INSERTION OPTIONS
rtpi                 = 0.05
```

```

; OUTPUT CONTROL OPTIONS
; Output frequency for coords (x), velocities (v) and forces (f)
nstxout          = 500000 ; 1ns
nstvout          = 500000 ; 1ns
nstfout          = 500000
; Output frequency for energies to log file and energy file
nstlog           = 500000 ; 10ps
nstcalcenergy    = 500000
nstenergy        = 500000 ; 10ps
; Output frequency and precision for .xtc file
nstxout-compressed = 500000 ; 10ps
compressed-x-precision = 100000
; This selects the subset of atoms for the compressed
; trajectory file. You can select multiple groups. By
; default, all atoms will be written.
compressed-x-grps =
; Selection of energy groups
energygrps       = Protein_DNA Water_and_ions

; NEIGHBORSEARCHING PARAMETERS
; cut-off scheme (Verlet: particle based cut-offs, group: using charge groups)
cutoff-scheme    = Verlet
; nlist update frequency
nstlist          = 10 ; Dickson2014 uses 5, with cutoff-Scheme=Verlet
nstlist>=10
; ns algorithm (simple or grid)
ns_type          = grid
; Periodic boundary conditions: xyz, no, xy
pbc              = xyz
periodic-molecules = no
; Allowed energy error due to the Verlet buffer in kJ/mol/ps per atom,
; a value of -1 means: use rlist
verlet-buffer-tolerance = 0.005
; nlist cut-off
rlist            = 1.2 ; irrelevant if using cutoff-scheme=Verlet
; long-range cut-off for switched potentials
rlistlong        = -1
nstcalclr        = -1

; OPTIONS FOR ELECTROSTATICS AND VDW
; Method for doing electrostatics
coulombtype      = PME
coulomb-modifier = Potential-shift-Verlet
rcoulomb-switch  = 0
rcoulomb         = 1.0 ; dickson2014
; Relative dielectric constant for the medium and the reaction field
epsilon-r        = 1

```

```

epsilon_rf          = 1
; Method for doing Van der Waals
vdw-type           = cut-off           ; with cutoff-scheme=Verlet equivalent
to old vdw=type=switch
vdw-modifier       =
; cut-off lengths
rvdw-switch        =
rvdw               = 1.0           ; Amber14 manual
; Apply long range dispersion corrections for Energy and Pressure
DispCorr           = EnerPres      ; dickson2014
; Extension of the potential lookup tables beyond the cut-off
table-extension    = 1
; Separate tables between energy group pairs
energygrp-table    =
; Spacing for the PME/PPPM FFT grid
fourierspacing     = 0.12
; FFT grid size, when a value is 0 fourierspacing will be used
fourier_nx         = 0
fourier_ny         = 0
fourier_nz         = 0
; EWALD/PME/PPPM parameters
pme_order          = 4
ewald_rtol         = 1e-5
ewald-rtol-lj      = 0.001
lj-pme-comb-rule   = Geometric
ewald_geometry     = 3d
epsilon_surface    = 0

; IMPLICIT SOLVENT ALGORITHM
implicit_solvent   = No

; GENERALIZED BORN ELECTROSTATICS
; Algorithm for calculating Born radii
gb_algorithm       = Still
; Frequency of calculating the Born radii inside rlist
nstgbradii        = 1
; Cutoff for Born radii calculation; the contribution from atoms
; between rlist and rgbradii is updated every nstlist steps
rgbradii          = 2
; Dielectric coefficient of the implicit solvent
gb-epsilon-solvent = 80
; Salt concentration in M for Generalized Born models
gb_saltconc       = 0
; Scaling factors used in the OBC GB model. Default values are OBC(II)
gb-obc-alpha      = 1
gb-obc-beta       = 0.8
gb-obc-gamma      = 4.85
gb-dielectric-offset = 0.009

```

```

sa-algorithm          = Ace-approximation
; Surface tension (kJ/mol/nm^2) for the SA (nonpolar surface) part of GBSA
; The value -1 will set default value for Still/HCT/OBC GB-models.
sa-surface-tension   = -1

; OPTIONS FOR WEAK COUPLING ALGORITHMS
; Temperature coupling
tcoupl               = Nose-Hoover ; Dickson2014 uses Langevin ; use v-rescale
in case of mixed membranes or protein-membrane systems
nsttcouple           = -1
nh-chain-length      = 1
print-nose-hoover-chain-variables = no
; Groups to couple separately
tc-grps              = Protein_DNA Water_and_ions
; Time constant (ps) and reference temperature (K)
tau-t                = 0.5 0.5
ref-t                = 310 310
; pressure coupling
Pcoupl              = Berendsen ; dickson2014
Pcoupltype          = isotropic
nstpcouple          = -1
; Time constant (ps), compressibility (1/bar) and reference P (bar)
tau-p               = 1.0 ; dickson2014
compressibility     = 4.5e-5
ref-p               = 1.0
; Scaling of reference coordinates, No, All or COM
refcoord-scaling    = No

; OPTIONS FOR QMMM calculations
QMMM                = no
; Groups treated Quantum Mechanically
QMMM-grps           =
; QM method
QMmethod            =
; QMMM scheme
QMMMscheme          = normal
; QM basisset
QMbasis             =
; QM charge
QMcharge            =
; QM multiplicity
QMmult              =
; Surface Hopping
SH                  =
; CAS space options
CASorbitals         =
CASelectrons         =
SAon                 =

```

```

SAoff          =
SAsteps        =
; Scale factor for MM charges
MMChargeScaleFactor = 1
; Optimization of QM subsystem
bOPT           =
bTS            =

; SIMULATED ANNEALING
; Type of annealing for each temperature group (no/single/periodic)
annealing      = no
; Number of time points to use for specifying annealing in each group
annealing-npoints =
; List of times at the annealing points for each group
annealing-time =
; Temp. at each annealing point, for each group.
annealing-temp =

; GENERATE VELOCITIES FOR STARTUP RUN
gen-vel        = yes
gen-temp       = 310
gen-seed       = -1

; OPTIONS FOR BONDS
constraints    = h-bonds ; dickson2014
; Type of constraint algorithm
constraint-algorithm = LINCS ; dickson2014 used SHAKE
; Do not constrain the start configuration
continuation   = no
; Use successive overrelaxation to reduce the number of shake iterations
Shake-SOR     = no
; Relative tolerance of shake
shake-tol     = 1e-04
; Highest order in the expansion of the constraint coupling matrix
lincs-order   = 4
; Number of iterations in the final step of LINCS. 1 is fine for
; normal simulations, but use 2 to conserve energy in NVE runs.
; For energy minimization with constraints it should be 4 to 8.
lincs-iter    = 1
; Lincs will write a warning to the stderr if in one step a bond
; rotates over more degrees than
lincs-warnangle = 30
; Convert harmonic bonds to morse potentials
morse        = no

; ENERGY GROUP EXCLUSIONS
; Pairs of energy groups for which all non-bonded interactions are excluded
energygrp-excl =

```

```

; WALLS
; Number of walls, type, atom types, densities and box-z scale factor for Ewald
nwall          = 0
wall-type      = 9-3
wall-r-linpot  = -1
wall-atomtype  =
wall-density   =
wall-ewald-zfac = 3

; COM PULLING
; Pull type: no, umbrella, constraint or constant-force
pull           = no

; ENFORCED ROTATION
; Enforced rotation: No or Yes
rotation       = no

; Group to display and/or manipulate in interactive MD session
IMD-group      =

; NMR refinement stuff
; Distance restraints type: No, Simple or Ensemble
disre          = No
; Force weighting of pairs in one distance restraint: Conservative or Equal
disre-weighting = Conservative
; Use sqrt of the time averaged times the instantaneous violation
disre-mixed    = no
disre-fc       = 1000
disre-tau      = 0
; Output frequency for pair distances to energy file
nstdisreout    = 100
; Orientation restraints: No or Yes
orire          = no
; Orientation restraints force constant and tau for time averaging
orire-fc       = 0
orire-tau      = 0
orire-fitgrp    =
; Output frequency for trace(SD) and S to energy file
nstorireout    = 100

; Free energy variables
free-energy     = no
couple-moltype =
couple-lambda0 = vdw-q
couple-lambda1 = vdw-q
couple-intramol = no
init-lambda    = 0

```

```

init-lambda-state      = -1
delta-lambda           = 0
nstdhdl                = 50
fep-lambdas            =
mass-lambdas           =
coul-lambdas           =
vdw-lambdas            =
bonded-lambdas         =
restraint-lambdas      =
temperature-lambdas    =
calc-lambda-neighbors = 1
init-lambda-weights    =
dhdl-print-energy       = no
sc-alpha               = 0
sc-power               = 1
sc-r-power              = 6
sc-sigma               = 0.3
sc-coul                = no
separate-dhdl-file     = yes
dhdl-derivatives       = yes
dh_hist_size           = 0
dh_hist_spacing        = 0.1

```

; Non-equilibrium MD stuff

```

acc-grps               =
accelerate              =
freezegrps             =
freezedim              =
cos-acceleration        = 0
deform                  =

```

; simulated tempering variables

```

simulated-tempering    = no
simulated-tempering-scaling = geometric
sim-temp-low           = 300
sim-temp-high          = 300

```

; Electric fields

; Format is number of terms (int) and for all terms an amplitude (real)  
; and a phase angle (real)

```

E-x                    =
E-xt                   =
E-y                    =
E-yt                   =
E-z                    =
E-zt                   =

```

; Ion/water position swapping for computational electrophysiology setups

; Swap positions along direction: no, X, Y, Z  
 swapcoords = no

; AdResS parameters  
 adress = no

; User defined thingies  
 user1-grps =  
 user2-grps =  
 userint1 = 0  
 userint2 = 0  
 userint3 = 0  
 userint4 = 0  
 userreal1 = 0  
 userreal2 = 0  
 userreal3 = 0  
 userreal4 = 0

#### Anexo 5. Matriz de marco lógico

Objetivos	Actividades	Supuestos	Indicadores
Validar el procedimiento de docking molecular del software Autodock4, para aptámeros de DNA.	<p>Búsqueda de estructuras cristalográficas experimentales aptámero-proteína.</p> <p>Ejecución de cálculo de docking molecular.</p> <p>Determinación de la precisión del software para predecir afinidades con aptámeros de DNA.</p>	<p>Disponibilidad óptima de estructuras cristalográficas experimentales aptámero-proteína.</p> <p>Capacidad de cómputo adecuada para la robustez de los cálculos.</p> <p>Procedimiento utilizado por el software adecuado para predecir con precisión afinidades con aptámeros de DNA como ligandos.</p>	<p>Afinidad de los aptámeros hacia las proteínas de referencia por medio de energía de unión calculada.</p> <p>Precisión del cálculo de afinidades por medio del RMSD (root medium square deviation) de referencia calculado.</p>
Obtener aptámeros de DNA afines a partir de un proceso de <i>screening</i>	Búsqueda bibliográfica de aptámeros de DNA en bases	Disponibilidad de estructuras cristalográficas en formato .pdb, para	Afinidad de los aptámeros hacia las proteínas por

<p>dirigido hacia la proteína <math>\beta</math>-amiloide 40.</p>	<p>de datos disponibles. Obtención de proteína <math>\beta</math>-amiloide 40 y aptámeros encontrados en bases de datos en formato .pdb Clasificación de aptámeros en: número de nucleótidos, código pdb, estructura secundaria. Ejecución de docking molecular de cada aptámero para proteína <math>\beta</math>-amiloide 40. Clasificación de aptámeros con mejor afinidad.</p>	<p>la proteína <math>\beta</math>-amiloide 40 (de <i>homo sapiens</i>) y aptámeros encontrados en bases de datos. Obtención de estructuras cristalográficas de óptima calidad. Información veraz de características de aptámeros disponibles. Número de aptámeros disponibles adecuados para el estudio. Capacidad de cómputo adecuada para la robustez y precisión de los cálculos.</p>	<p>medio de energía de unión calculada. Precisión del cálculo de afinidades por medio del RMSD calculado. Lista de aptámeros de DNA con mejores afinidades, identificados y clasificados.</p>
<p>Identificar y reportar los tipos de interacción intermolecular predominantes de los aptámeros de DNA identificados, para la obtención de nuevas moléculas afines a la proteína <math>\beta</math>-amiloide 40.</p>	<p>Obtención y clasificación de los tipos de interacción intermolecular, de acuerdo a los resultados obtenidos durante el <i>screening</i></p>	<p>Información fácil de interpretar. Capacidad de ejecución del programa apta para los sistemas en estudio. Resultados coherentes con los fenómenos observados experimentalmente y en la naturaleza.</p>	<p>Tipos de interacción intermolecular aptámero-proteína identificados y clasificados.</p>
<p>Proponer racionalmente una molécula de aptámero de DNA, y evaluar la</p>	<p>Obtención de la secuencia lineal de nucleótidos de DNA.</p>	<p>Bibliografía disponible. Coherencia de los resultados</p>	<p>Modelamiento computacional de la secuencia de DNA realizado.</p>

<p>diferencia en la afinidad del aptámero modificado racionalmente hacia las proteínas <math>\beta</math>-amiloide 40.</p>	<p>Realización de alineamientos para encontrar análogos a las secuencias propuestas.</p> <p>Obtención de estructuras cristalográficas de aptámeros análogos (formato .pdb)</p> <p>Obtención de complejos molecular a través del cálculo por dinámica browniana.</p> <p>Ejecución del cálculo de dinámica molecular para el aptámero diseñado.</p> <p>Evaluación y análisis de los resultados obtenidos.</p>	<p>obtenidos con los observados a nivel biológico.</p> <p>Entendimiento de la naturaleza de interacción aptámero-DNA.</p> <p>Capacidad de cómputo adecuada para la robustez de los cálculos.</p>	<p>Precisión del modelamiento por medio del radio de giro y RMSD calculado.</p> <p>Afinidad del aptámero modificado racionalmente hacia la proteína por medio de energía de unión calculada.</p> <p>Precisión del cálculo por medio del RMSD calculado.</p>
--	---	--	---