



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y CENTRO DE
QUÍMICA-INSTITUTO DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

TESIS

INVESTIGACIÓN DE RECEPTORES NEURONALES
ASOCIADOS A LAS ENFERMEDADES
DE ALZHEIMER Y DE PARKINSON
UTILIZANDO MÉTODOS COMPUTACIONALES

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS EN EL ÁREA
DE FISICOQUÍMICA

PRESENTA:
M.C. ELIUD MORALES DÁVILA

DIRECTOR DE TESIS
DR. FRANCISCO JAVIER MELÉNDEZ BUSTAMANTE

CODIRECTOR DE TESIS:
DR. JOSÉ MANUEL PÉREZ AGUILAR



BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por la Dra. María Eugenia Castro Sánchez, Dra. Brenda Leonor Sánchez Gaytán, Dr. Ilhuicamina Daniel Limón Pérez de León, Dr. Ramón Garduño Juárez y el Dr. Víctor Manuel Baizabal Aguirre, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **“INVESTIGACIÓN DE RECEPTORES NEURONALES ASOCIADOS A LAS ENFERMEDADES DE ALZHEIMER Y DE PARKINSON UTILIZANDO MÉTODOS COMPUTACIONALES”**, que presenta el alumno **M.C. Eliud Morales Dávila** para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los cuatro días del mes de junio del año dos mil veinticuatro.

ATENTAMENTE

Dra. María Eugenia Castro Sánchez

Dra. Brenda Leonor Sánchez Gaytán

Dr. Ilhuicamina Daniel Limón Pérez de León

Dr. Ramón Garduño Juárez

Dr. Víctor Manuel Baizabal Aguirre

“Las computadoras hacen los cálculos para permitir que las personas transformen el mundo”

Conrad Wolfram

Dedicatoria

A mi familia

Agradecimientos

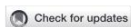
Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología la beca otorgada para realizar el doctorado (No. 758730).

Agradezco a mis asesores el Dr. Francisco Javier Meléndez Bustamante y al Dr. José Manuel Pérez Aguilar por el apoyo y guía durante la realización del doctorado.

Agradezco al Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México (LNS) y al Laboratorio Nacional de Cómputo de Alto Rendimiento (LANCAD) por el tiempo de cómputo asignado.

Agradezco a mis sinodales la dedicación que prestaron al revisar el presente trabajo.

Interacting binding insights and conformational consequences of the differential activity of cannabidiol with two endocannabinoid-activated G-protein-coupled receptors.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Gustavo Gonzalez-Cuevas,
Idaho State University, United States

REVIEWED BY
Sun Choi,
Ewha Womans University, South Korea
Jahan Marcu,
University of the Sciences, United States
Franziska Marie Heydenreich,
MRC Laboratory of Molecular Biology,
United Kingdom

*CORRESPONDENCE
Jose Manuel Perez-Aguilar,
jmanuel.perez@correo.buap.mx
Brenda L. Sanchez-Gaytan,
brendale.sanchez@correo.buap.mx

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Neuropharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

RECEIVED 17 May 2022
ACCEPTED 12 July 2022
PUBLISHED 09 August 2022

CITATION
Dávila EM, Patricio F,
Rebolledo-Bustillo M, Garcia-Gomez D,
Hernandez JCG, Sanchez-Gaytan BL,
Limón ID and Perez-Aguilar JM (2022),
Interacting binding insights and
conformational consequences of the
differential activity of cannabidiol with
two endocannabinoid-activated G-
protein-coupled receptors.
Front. Pharmacol. 13:945935.
doi: 10.3389/fphar.2022.945935

COPYRIGHT
© 2022 Dávila, Patricio, Rebolledo-
Bustillo, Garcia-Gomez, Hernandez,
Sanchez-Gaytan, Limón and Perez-
Aguilar. This is an open-access article
distributed under the terms of the
Creative Commons Attribution License
(CC BY). The use, distribution or
reproduction in other forums is
permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s) are
credited and that the original
publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic
practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does
not comply with these terms.

Interacting binding insights and conformational consequences of the differential activity of cannabidiol with two endocannabinoid-activated G-protein-coupled receptors

Eliud Morales Dávila¹, Felipe Patricio²,
Mariana Rebolledo-Bustillo¹, David Garcia-Gomez¹,
Juan Carlos Garcia Hernandez¹, Brenda L. Sanchez-Gaytan^{3*},
Ilhuicamina Daniel Limón² and Jose Manuel Perez-Aguilar^{1*}

¹School of Chemical Sciences, Meritorious Autonomous University of Puebla (BUAP), University City, Puebla, Mexico, ²Neuropharmacology Laboratory, School of Chemical Sciences, Meritorious Autonomous University of Puebla (BUAP), University City, Puebla, Mexico, ³Chemistry Center, Science Institute, Meritorious Autonomous University of Puebla (BUAP), University City, Puebla, Mexico

Cannabidiol (CBD), the major non-psychoactive phytocannabinoid present in the plant *Cannabis sativa*, has displayed beneficial pharmacological effects in the treatment of several neurological disorders including, epilepsy, Parkinson's disease, and Alzheimer's disease. In particular, CBD is able to modulate different receptors in the endocannabinoid system, some of which belong to the family of G-protein-coupled receptors (GPCRs). Notably, while CBD is able to antagonize some GPCRs in the endocannabinoid system, it also seems to activate others. The details of this dual contrasting functional feature of CBD, that is, displaying antagonistic and (possible) agonistic ligand properties in related receptors, remain unknown. Here, using computational methods, we investigate the interacting determinants of CBD in two closely related endocannabinoid-activated GPCRs, the G-protein-coupled receptor 55 (GPR55) and the cannabinoid type 1 receptor (CB₁). While in the former, CBD has been demonstrated to function as an antagonist, the way by which CBD modulates the CB₁ receptor remains unclear. Namely, CBD has been suggested to directly trigger receptor's activation, stabilize CB₁ inactive conformations or function as an allosteric modulator. From microsecond-length unbiased molecular dynamics simulations, we found that the presence of the CBD ligand in the GPR55 receptor elicit conformational changes associated with antagonist-bound GPCRs. In contrast, when the GPR55 receptor is simulated in complex with the selective agonist ML186, agonist-like conformations are sampled. These results are in agreement with the proposed modulatory function of each ligand, showing that the computational techniques utilized to characterize the GPR55 complexes correctly differentiate the agonist-bound and antagonist-bound systems. Prompted by these results, we investigated the role of the CBD compound

Structural Basis of the Binding Mode of the Antineoplastic Compound Motixafortide (BL-8040) in the CXCR4 Chemokine Receptor.



International Journal of
Molecular Sciences



Article

Structural Basis of the Binding Mode of the Antineoplastic Compound Motixafortide (BL-8040) in the CXCR4 Chemokine Receptor

Mariana Rebolledo-Bustillo ^{1,†}, David Garcia-Gomez ^{1,†}, Eliud Morales Dávila ¹, María Eugenia Castro ², Norma A. Caballero ³, Francisco J. Melendez ¹, Víctor M. Baizabal-Aguirre ⁴, Brenda L. Sanchez-Gaytan ² and Jose Manuel Perez-Aguilar ^{1,*}

- ¹ School of Chemical Sciences, Meritorious Autonomous University of Puebla (BUAP), University City, Puebla 72570, Mexico
 - ² Chemistry Center, Science Institute, Meritorious Autonomous University of Puebla (BUAP), University City, Puebla 72570, Mexico
 - ³ School of Biological Sciences, Meritorious Autonomous University of Puebla (BUAP), University City, Puebla 72570, Mexico
 - ⁴ Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km. 9.5 s/n Carretera Morelia-Zinapécuaro, La Palma, Tarimbaro, Morelia 58893, MICH, Mexico
- * Correspondence: jmanuel.perez@correo.buap.mx; Tel.: +52-(222)-2295500 (ext. 4089)
† These authors contribute equally to this work.



Citation: Rebolledo-Bustillo, M.; Garcia-Gomez, D.; Dávila, E.M.; Castro, M.E.; Caballero, N.A.; Melendez, F.J.; Baizabal-Aguirre, V.M.; Sanchez-Gaytan, B.L.; Perez-Aguilar, J.M. Structural Basis of the Binding Mode of the Antineoplastic Compound Motixafortide (BL-8040) in the CXCR4 Chemokine Receptor. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 4393. <https://doi.org/10.3390/ijms24054393>

Academic Editors: Ignacio Camacho-Arroyo, Jorge Melendez-Zajgla, Mahara A. Valverde Ramirez and Mauricio Rodriguez-Dorantes

Received: 30 December 2022
Revised: 24 January 2023
Accepted: 29 January 2023
Published: 23 February 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Modulation of the CXCL12–CXCR4 signaling axis is of the utmost importance due to its central involvement in several pathological disorders, including inflammatory diseases and cancer. Among the different currently available drugs that inhibit CXCR4 activation, motixafortide—a best-in-class antagonist of this GPCR receptor—has exhibited promising results in preclinical studies of pancreatic, breast, and lung cancers. However, detailed information on the interaction mechanism of motixafortide is still lacking. Here, we characterize the motixafortide/CXCR4 and CXCL12/CXCR4 protein complexes by using computational techniques including unbiased all-atom molecular dynamics simulations. Our microsecond-long simulations of the protein systems indicate that the agonist triggers changes associated with active-like GPCR conformations, while the antagonist favors inactive conformations of CXCR4. Detailed ligand–protein analysis indicates the importance of motixafortide’s six cationic residues, all of which established charge–charge interactions with acidic CXCR4 residues. Furthermore, two synthetic bulky chemical moieties of motixafortide work in tandem to restrict the conformations of important residues associated with CXCR4 activation. Our results not only elucidate the molecular mechanism by which motixafortide interacts with the CXCR4 receptor and stabilizes its inactive states, but also provide essential information to rationally design CXCR4 inhibitors that preserve the outstanding pharmacological features of motixafortide.

Keywords: cancer; computational methods; MD simulations; motixafortide; antineoplastic drugs; CXCR4

1. Introduction

Cancer is a collection of diseases that has become a central problem and a priority in public health, since it represents the leading cause of mortality and morbidity worldwide [1]. Described as a pathogenic process of uncontrolled growth and dissemination of cells, resulting in a disease with the ability to infiltrate, destroy normal body tissue, and spread throughout the body, cancer caused approximately 10 million deaths and 19.3 million new cases in 2020 [2].

Due to the complexity of cancer, several approaches are needed to either prevent or reduce its progression. In this regard, the incorporation of different techniques to tackle most of cancer’s deleterious features—including those that can provide information

Theoretical NMR and IR spectroscopic analyses of the preferred conformers of the neurotransmitter anandamide.

Received: 3 August 2022 | Revised: 6 December 2022 | Accepted: 31 January 2023
DOI: 10.1002/qua.27098

RESEARCH ARTICLE

QUANTUM CHEMISTRY WILEY

Theoretical NMR and IR spectroscopic analyses of the preferred conformers of the neurotransmitter anandamide

María Eugenia Castro¹ | Maricruz Rangel-Galván² | Eliud Morales Dávila² |
Norma A. Caballero³ | Francisco J. Melendez² 

¹Centro de Química, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Complejo de Ciencias, ICUAP, Edif. IC8, 22 Sur y San Claudio, Ciudad Universitaria, Puebla, Mexico

²Lab. de Química Teórica, Centro de Investigación, Depto. de Físicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Edif. FCQ10, 22 Sur y San Claudio, Ciudad Universitaria, Puebla, Mexico

³Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Edif. B101, 22 Sur y San Claudio, Ciudad Universitaria, Puebla, Mexico

Correspondence

María Eugenia Castro, Centro de Química, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Complejo de Ciencias, ICUAP, Edif. IC8, 22 Sur y San Claudio, Ciudad Universitaria, Col. San Manuel, C.P. 72570, Puebla, Puebla, México.
Email: mareug.castro@correo.buap.mx

Francisco J. Melendez, Lab. de Química Teórica, Centro de Investigación, Depto. de Físicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Edif. FCQ10, 22 Sur y San Claudio, Ciudad Universitaria, Col. San Manuel, C.P. 72570, Puebla, Puebla, México.
Email: francisco.melendez@correo.buap.mx

Funding information

PRODEP Academic Group BUAP-CA-263 (SEP, Mexico); Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP-BUAP, Mexico), Grant/Award Number: 100256733-VIEP2022

Abstract

Anandamide, an endogenous fatty acid, displays a wide conformational space due to the nature of its chemical structure, particularly its polyunsaturated aliphatic chain component (omega-6 fatty acid). Six main minima are considered after a conformational search based on the MM+ method, namely, extended shape, U-shape, and hairpin shape with either an open or a closed conformation of the ethanolamide (EA) ring. For these six conformers, DFT calculations were performed to theoretically characterize their structural stability, NMR and IR spectroscopic, and electronic properties using the BP86/cc-pVTZ level of theory with the solute-implicit solvent model PCM. DLPNO-CCSD(T) level of theory was used for comparison with DFT results. Our results indicate that the conformers with closed EA ring are more stable than their corresponding open ring counterparts. With the NMR and IR spectroscopies was characterized the formation of the intramolecular hydrogen bond in the closed conformers of the EA ring. The electronic properties investigated include the calculation of the frontier molecular orbitals (FMO), the molecular electrostatic potential (MEP), and the natural bond orbitals (NBO). Additionally, the multiscale ONIOM QM1/QM2 model was used to simulate a solute-explicit solvent system and molecular dynamics simulations were used to simulate the anandamide systems embedded in a hydrated symmetric POPC membrane and in aqueous solution. The results suggest that alkyl-middle and EA groups in anandamide may play an important role in the ligand-receptor interaction.

KEYWORDS

anandamide, DFT calculations, MD simulations, NMR and IR spectra, ONIOM-DFT

1 | INTRODUCTION

Anandamide is part of the endocannabinoid system which comprise endogenous cannabinoids (2-arachidonoylglycerol (2-AG), N-arachidonoyldopamine (NADA)), cannabinoid receptors (CB1, CB2), transport proteins (Fatty acid binding protein 5 (FABP5)) and enzymes responsible for the synthesis (N-acyl-phosphatidylethanolamine-specific phospholipase D (NAPE-PLD)) and degradation of the endocannabinoids (Fatty acid amide hydrolase (FAAH)) [1]. Anandamide molecule interacts with multiple receptors that includes, the cannabinoids CB1 (located in the central nervous system) and CB2 (located in the peripheral nervous system) receptors, the transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) channels [2].

Int J Quantum Chem. 2023;e27098.
<https://doi.org/10.1002/qua.27098>

<http://q-chem.org>




© 2023 Wiley Periodicals LLC | 1 of 20

Factor de impacto: 2.2

Identification of Molecular Determinants in iRhoms1 and 2 That Contribute to the Substrate Selectivity of Stimulated ADAM17.

Article

Identification of Molecular Determinants in iRhoms1 and 2 That Contribute to the Substrate Selectivity of Stimulated ADAM17

Yi Zhao ¹, Eliud Morales Dávila ² , Xue Li ¹, Beiyu Tang ³, Ariana I. Rabinowitsch ^{1,4}, Jose Manuel Perez-Aguilar ^{2,*}  and Carl P. Blobel ^{5,6,*} 

¹ Department of Biochemistry, Cellular and Molecular Biology, Weill Cornell Medicine, New York, NY 10021, USA

² School of Chemical Sciences, Meritorious Autonomous University of Puebla (BUAP), University City, Puebla 72570, Mexico

³ Department of Pharmacology, Weill Cornell Medicine, New York, NY 10021, USA

⁴ Weill Cornell/Rockefeller/Sloan-Kettering Tri-Institutional MD-PhD Program, New York, NY 10021, USA

⁵ Department of Physiology, Biophysics and Systems Biology, Weill Cornell Medicine, New York, NY 10021, USA

⁶ Arthritis and Tissue Degeneration Program, Hospital for Special Surgery, New York, NY 10021, USA

* Correspondence: jmanuel.perez@correo.buap.mx (J.M.P.-A.); blobelc@hss.edu (C.P.B.)



Citation: Zhao, Y.; Dávila, E.M.; Li, X.; Tang, B.; Rabinowitsch, A.I.; Perez-Aguilar, J.M.; Blobel, C.P. Identification of Molecular Determinants in iRhoms1 and 2 That Contribute to the Substrate Selectivity of Stimulated ADAM17. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 12796. <https://doi.org/10.3390/ijms232112796>

Academic Editors: Claudiu T. Supuran and Clemente Capasso

Received: 7 September 2022

Accepted: 19 October 2022

Published: 24 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The metalloprotease ADAM17 is a key regulator of the TNF α , IL-6R and EGFR signaling pathways. The maturation and function of ADAM17 is controlled by the seven-membrane-spanning proteins iRhoms1 and 2. The functional properties of the ADAM17/iRhom1 and ADAM17/iRhom2 complexes differ, in that stimulated shedding of most ADAM17 substrates tested to date can be supported by iRhom2, whereas iRhom1 can only support stimulated shedding of very few ADAM17 substrates, such as TGF α . The first transmembrane domain (TMD1) of iRhom2 and the sole TMD of ADAM17 are important for the stimulated shedding of ADAM17 substrates by iRhom2. However, little is currently known about how the iRhoms interact with different substrates to control their stimulated shedding by ADAM17. To provide new insights into this topic, we tested how various chimeras between iRhom1 and iRhom2 affect the stimulated processing of the EGFR-ligands TGF α (iRhom1- or 2-dependent) and EREG (iRhom2-selective) by ADAM17. This uncovered an important role for the TMD7 of the iRhoms in determining their substrate selectivity. Computational methods utilized to characterize the iRhom1/2/substrate interactions suggest that the substrate selectivity is determined, at least in part, by a distinct accessibility of the substrate cleavage site to stimulated ADAM17. These studies not only provide new insights into why the substrate selectivity of stimulated iRhom2/ADAM17 differs from that of iRhom1/ADAM17, but also suggest new approaches for targeting the release of specific ADAM17 substrates.

Keywords: ADAM17 (a disintegrin and metalloprotease 17); iRhom1 and 2 (inactive rhomboid like protein 1 and 2); EGFR-ligand (epidermal growth factor receptor ligand); protein ectodomain shedding

1. Introduction

ADAM17 is a membrane-anchored metalloprotease that plays important roles in the regulation of the EGFR, TNF α , IL-6R, and other signaling pathways [1–3]. ADAM17 was initially discovered as the TNF α convertase, which is required for the release of the pro-inflammatory cytokine TNF α from the cell membranes [4,5]. Subsequent studies showed that the release of soluble TNF α from myeloid cells in vivo in the context of endotoxin shock and inflammatory arthritis depends primarily on ADAM17 [6,7]. ADAM17 is also essential for EGFR signaling since several EGFR-ligands, all of which are membrane anchored, must be released from the membrane by ADAM17 to become functionally active [8,9]. Mice lacking ADAM17 die shortly after birth with open eyes and defects in their heart valves

Intrapallidal injection of cannabidiol or a selective GPR55 antagonist decreases motor asymmetry and improves fine motor skills in hemiparkinsonian rats.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Gustavo Gonzalez-Cuevas,
Idaho State University, United States

REVIEWED BY
Andreas Wree,
University of Rostock, Germany
Catalina Requejo,
Spanish National Research Council
(CSIC), Spain

*CORRESPONDENCE
Ilhucamina Daniel Limón,
ilhimon@yahoo.com.mx,
daniel.limon@correo.buap.mx

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Neuropharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

RECEIVED 17 May 2022
ACCEPTED 09 August 2022
PUBLISHED 02 September 2022

CITATION
Patricio F, Morales Dávila E,
Patricio-Martínez A,
Arana Del Carmen N, Martínez J,
Aguilera J, Perez-Aguilar JM and
Limón ID (2022), Intrapallidal injection
of cannabidiol or a selective
GPR55 antagonist decreases motor
asymmetry and improves fine motor
skills in hemiparkinsonian rats.
Front. Pharmacol. 13:945836.
doi: 10.3389/fphar.2022.945836

COPYRIGHT
© 2022 Patricio, Morales Dávila,
Patricio-Martínez, Arana Del Carmen,
Martínez, Aguilera, Perez-Aguilar and
Limón. This is an open-access article
distributed under the terms of the
Creative Commons Attribution License
(CC BY). The use, distribution or
reproduction in other forums is
permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s) are
credited and that the original
publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic
practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does
not comply with these terms.

Intrapallidal injection of cannabidiol or a selective GPR55 antagonist decreases motor asymmetry and improves fine motor skills in hemiparkinsonian rats

Felipe Patricio¹, Eliud Morales Dávila²,
Aleidy Patricio-Martínez^{1,3}, Nayeli Arana Del Carmen¹,
Isabel Martínez⁴, José Aguilera^{5,6}, Jose Manuel Perez-Aguilar²
and Ilhucamina Daniel Limón^{1*}

¹Laboratorio de Neurofarmacología, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico, ²Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico, ³Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico, ⁴Laboratorio de Neuroquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico, ⁵Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular, Facultat de Medicina, Institut de Neurociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, ⁶Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Barcelona, Spain

Cannabidiol (CBD) presents antiparkinsonian properties and neuromodulatory effects, possibly due to the pleiotropic activity caused at multiple molecular targets. Recently, the GPR55 receptor has emerged as a molecular target of CBD. Interestingly, GPR55 mRNA is expressed in the *external globus pallidus* (GPe) and striatum, hence, it has been suggested that its activity is linked to motor dysfunction in Parkinson's disease (PD). The present study aimed to evaluate the effect of the intrapallidal injection of both CBD and a selective GPR55 antagonist (CID16020046) on motor asymmetry, fine motor skills, and GAD-67 expression in hemiparkinsonian rats. The hemiparkinsonian animal model applied involved the induction of a lesion in male Wistar rats via the infusion of the neurotoxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA) into the medial forebrain bundle via stereotaxic surgery. After a period of twenty days, a second surgical procedure was performed to implant a guide cannula into the GPe. Seven days later, lysophosphatidylinositol (LPI), CBD, or

Abbreviations: AMPH, Amphetamine; BG, Basal ganglia; CB₁, Cannabinoid receptor type 1; CBD, Cannabidiol; CNS, Central nervous system; DMSO, Dimethyl sulfoxide; ER, Endoplasmic reticulum; FAAH, Fatty acid amide hydrolase; GAD-67, Glutamic acid decarboxylase 67; GPe, external globus pallidus; GPR55, G-protein coupled receptor 55; H₂O₂, Hydrogen peroxide; 6-OHDA, 6-hydroxydopamine; LPI, Lysophosphatidylinositol; MPP⁺, 1-methyl-4-phenylpyridinium; MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; PD, Parkinson's disease; PLC, Phospholipase C; ROCK, Rho-associated protein kinase; SNpc, substantia nigra pars compacta; SNpr, substantia nigra pars reticulata; STN, Subthalamic nucleus; TH, Tyrosine hydroxylase; THC, Δ^9 -tetrahydrocannabinol.

Inhibitory Mechanism of the Isoflavone Derivative Genistein in the Human Ca_v3.3 Channel

ACS Chemical
Neuroscience

pubs.acs.org/chemneuro

Research Article

Inhibitory Mechanism of the Isoflavone Derivative Genistein in the Human Ca_v3.3 Channel

Maricruz Rangel-Galván, Azahel Rangel, Catalina Romero-Méndez, Eliud Morales Dávila, María Eugenia Castro, Norma A. Caballero, Francisco J. Meléndez Bustamante, Brenda L. Sanchez-Gaytan, Ulises Meza,* and Jose Manuel Perez-Aguilar*

Cite This: *ACS Chem. Neurosci.* 2021, 12, 651–659

Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Regulation of cellular excitability and oscillatory behavior of resting membrane potential in nerve cells are largely mediated by the low-voltage activated T-type calcium channels. This calcium channel family is constituted by three isoforms, namely, Ca_v3.1, Ca_v3.2, and Ca_v3.3, that are largely distributed in the nervous system and other parts of the body. Dysfunction of T-type calcium channels is associated with a wide range of pathophysiological conditions including epilepsy, neuropathic pain, cardiac problems, and major depressive disorders. Due to their pharmacological relevance, finding molecular agents able to modulate the channel's function may provide therapeutic means to ameliorate their related disorders. Here we used electrophysiological experiments to show that genistein, a canonical tyrosine kinase inhibitor, reduces the activity of the human Ca_v3.3 channel in a concentration-dependent manner. The inhibitory effect of genistein is independent of tyrosine kinase modulation and does not affect the voltage-dependent gating of the channel. Subsequently, we used computational methods to identify plausible molecular poses for the interaction of genistein and the Ca_v3.3 channel. Starting from different molecular poses, we carried out all-atom molecular dynamics (MD) simulations to identify the interacting determinants for the Ca_v3.3/genistein complex formation. Our extensive (microsecond-length) simulations suggest specific binding interactions that seem to stabilize the protein/inhibitor complex. Furthermore, our results from the unbiased MD simulations are in good agreement with the recently solved cryoelectron microscopy structure of the Ca_v3.1/Z944 complex in terms of both the location of the ligand binding site and the role of several equivalent amino acid residues. Proposed interacting complex loci were subsequently tested and corroborated by electrophysiological experiments using another naturally occurring isoflavone derivative, daidzein. Thus, by using a combination of *in vitro* and *in silico* techniques, we have identified interacting determinants relevant to the Ca_v3.3/genistein complex formation and propose that genistein directly blocks the function of the human Ca_v3.3 channel as a result of such interaction. Specifically, we proposed that a combination of polar interactions involving the three hydroxyl groups of genistein and an aromatic interaction with the fused rings are the main binding interactions in the complex formation. Our results pave the way for the rational development of improved and novel low-voltage activated T-type calcium channel inhibitors.



KEYWORDS: T-type calcium channels, MD simulations, isoflavone derivative, channel blockers, LVA channels, channel inhibition

INTRODUCTION

Neuronal calcium-dependent cellular processes occurring at or near resting membrane potential are largely modulated by the T-type calcium channels.^{1,2} The low-voltage activated calcium channel family includes three isoforms, namely, Ca_v3.1, Ca_v3.2, and Ca_v3.3, which together regulate the cellular excitability and oscillatory behavior of the resting membrane potential in nerve cells.^{3–5}

Dysregulation of T-type channel function is related to different pathophysiological conditions, including thalamocortical dysrhythmias associated with disorders such as epilepsy, neurological problems, and neurogenic pain.⁶ Moreover, the low-voltage activated calcium channels are implicated in neuropathic pain and heart problems,^{6,7} and their participation in major

depressive disorder (depression) was recently reported.⁸ In particular, Ca_v3.1 is involved in spinocerebellar ataxia, cerebellar atrophy, and epilepsy; Ca_v3.2 is linked to autism, epilepsy, heart failure, and neuropathic pain, and Ca_v3.3 is implicated in epilepsy and schizophrenia.^{5–7,9}

Received: October 22, 2020

Accepted: January 19, 2021

Published: January 28, 2021



ACS Publications

© 2021 American Chemical Society

651

<https://dx.doi.org/10.1021/acschemneuro.0c09084>
ACS Chem. Neurosci. 2021, 12, 651–659

Factor de impacto: 4.8

Resumen

En el presente trabajo se estudian mecanismos moleculares asociados a dos de las enfermedades neurodegenerativas más comunes; la enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Parkinson (EP), debido a que la etiología completa de dichas enfermedades permanece aún desconocida.

En primer lugar, se exploran las primeras etapas de la enfermedad de Alzheimer, donde los oligómeros del péptido β amiloide de 42 aminoácidos (A β O1-42) aún exhiben solubilidad en medio acuoso. La relevancia de investigar a estas entidades biomoleculares radica en que ellas presentan una alta afinidad por receptores sinápticos, lo que conlleva a una desregulación de la función de estos últimos. En particular se explora la interacción del tetrámero de A β O1-42 con el receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR) y el receptor adrenérgico $\alpha 2A$ ($\alpha 2A$ AR) mediante la técnica de simulaciones atomísticas de dinámica molecular. Esto con el fin de conocer más sobre las interacciones moleculares que presentan los receptores sinápticos en presencia de los A β O1-42. Nuestros hallazgos muestran que el tetrámero del péptido β amiloide de 42 aminoácidos adopta una conformación que asemeja a la estructura de un dominio barril β en medio acuoso, lo que le confiere de una estabilidad importante para interactuar con receptores sinápticos, así como servir de plantilla para la formación de agregados más grandes. Por otro lado, en el caso del receptor $\alpha 7$ nAChR, se observan interacciones en la cercanía del bolsillo de unión al ligante (sitio ortostérico) lo que sugiere una perturbación a la estructura de dicho sitio que impediría la activación del receptor mediada por un ligante agonista, es decir, un efecto antagónico del oligómero. Por otra parte, la formación del complejo $\alpha 2A$ AR/A β O1-42 nos sugiere los modos de interacción entre las dos entidades, así como el desplazamiento de las conformaciones del receptor a conformaciones asociadas a la activación del receptor; de esta forma el tetrámero de A β O1-42 parece activar al receptor $\alpha 2A$ AR en ausencia de un ligante agonista como la noradrenalina.

En segunda instancia, se exploran las perspectivas de interacción y consecuencias conformacionales de la interacción del fitocannabinoide cannabidiol (CBD), el cual ha mostrado una actividad benéfica como posible terapia para la enfermedad de Parkinson, con dos receptores del sistema endocannabinoide, el receptor acoplado a proteína G 55 (GPR55) y el receptor cannabinoide de tipo 1 (CB1). Los sistemas se caracterizaron mediante la técnica de simulaciones atomísticas de dinámica molecular. Los resultados sugieren que la técnica computacional empleada captura y diferencia los distintos modos de interacción en los que diferentes ligantes forman complejos con los receptores. En particular, el CBD al interactuar con el receptor GPR55 (un reciente receptor clasificado como parte del sistema endocannabinoide) modula su función comportándose como un ligante antagonista del receptor. Por otro lado, CBD funciona como un ligante agonista, al favorecer conformaciones del receptor CB1 observadas en sistemas enlazados a compuestos agonistas. Finalmente, contribuimos con el hallazgo de un sitio de unión a sodio no reportado anteriormente para el receptor CB1.

Abstract

This thesis examines the molecular mechanisms associated with two of the most common neurodegenerative diseases: Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD). The full etiology of these diseases remains poorly understood.

First, we explore the early stages of Alzheimer's disease, where oligomers of the 42-amino acid β -amyloid peptide (A β O1-42) still exhibit solubility in aqueous media. The investigation of these biomolecular entities is of significant relevance, as they exhibit high affinity for synaptic receptors, leading to a dysregulation of their function. In particular, the interaction of the A β O1-42 tetramer with the α 7 nicotinic acetylcholine receptor (α 7 nAChR) and the α 2A adrenergic receptor (α 2AAR) is explored using atomistic molecular dynamics simulations. This is to gain further insights into the molecular interactions between synaptic receptors in the presence of A β O1-42. Our findings indicate that the 42-amino acid β -amyloid peptide tetramer assumes a conformation that resembles the structure of a β -barrel domain in aqueous media. This confers significant stability for interacting with synaptic receptors and serves as a template for the formation of larger aggregates. In the case of the α 7 nAChR receptor, interactions are observed in the vicinity of the ligand binding pocket (orthosteric site) suggesting a perturbation to the structure of this site that would prevent receptor activation mediated by an agonist ligand, i.e. an antagonistic effect of the oligomer. On the other hand, the formation of the α 2AAR/A β O1-42 complex suggests modes of interaction between the two entities, as well as a shift from receptor conformations associated with the active-like state of the receptor. Consequently, the A β O1-42 tetramer appears to activate the α 2AAR receptor in the absence of an agonist ligand, such as noradrenaline.

Secondly, the interaction prospects and conformational consequences of the interaction of the phytocannabinoid, cannabidiol (CBD), which has shown beneficial activity as a potential therapy for Parkinson's disease, with two receptors of the endocannabinoid system, the G protein-coupled receptor 55 (GPR55) and the cannabinoid receptor type 1 (CB1), are explored. The systems were characterized using the technique of atomistic molecular dynamics simulations. The results suggest that the computational technique employed is capable of capturing and differentiating the different modes of interaction in which different ligands interact with the receptors. In particular, CBD interacting with the GPR55 receptor (a recent receptor classified as part of the endocannabinoid system) modulates its function by behaving as a ligand antagonist of the receptor. Conversely, CBD functions as an agonist ligand, promoting the formation of CB1 receptor conformations observed in systems bound to agonist compounds. Finally, we have identified a previously unreported sodium binding site for the CB1 receptor.

Contenido

Resumen	x
Abstract	xi
Lista de figuras	xiv
Lista de abreviaturas	xxii
1. Enfermedades neurodegenerativas	1
1.1 Hipótesis	3
1.2 Objetivos generales	3
1.2.1 Objetivos particulares	3
2. La enfermedad de Alzheimer	4
2.1 El péptido β amiloide ($A\beta$) en la enfermedad de Alzheimer	6
2.2 Métodos	8
2.2.1 Estructuras del $A\beta$, $\alpha 7$ nAChR y $\alpha 2_A$ AR	8
2.2.2 Formación del complejo receptor/ligante	9
2.2.3 Simulaciones atomística de dinámica molecular	10
2.3 Resultados y discusión	11
2.4 Conclusión	29
3. La enfermedad de Parkinson	31
3.1 El cannabidiol (CBD) en la enfermedad de Parkinson	32
3.2 Métodos	33
3.2.1 Estructuras de CB1 y GPR55 para <i>Rattus norvegicus</i>	33
3.2.2 Formación del complejo receptor/ligante	34
3.2.3 Simulaciones atomísticas de dinámica molecular	35
3.3 Resultados y discusión	36
3.4 Conclusión	49
4. Comentarios finales	51
4.1 Perspectivas	52
A. Receptores	54
A.1 Receptores acoplados a proteína G (GPCRs)	54
A.2 Receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs)	56
B. Técnicas utilizadas en biofísica computacional de macromoléculas	59

B.1 Fundamentos de las simulaciones de dinámica molecular	60
B.1.1 Metodología general	63
B.1.2 Simulaciones de dinámica molecular para sistemas en medio acuoso	65
B.1.3 Simulaciones de dinámica molecular para sistemas embebidos en membranas.	66
B.2 Modelado por homología	67
B.3 Acoplamiento molecular	68
C. Estructuras macromoleculares	70
D. Secuencias lineales y ligantes	74
Bibliografía	77

Lista de figuras

- 1.1 Estructura fisiológica neuronal A) normal y B) afectada por enfermedades neurodegenerativas (p.ej. la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson)1
- 2.1 Esquema de las etapas de la agregación del péptido β amiloide ($A\beta$) en la enfermedad de Alzheimer, imagen realizada en el programa Inkscape. 7
- 2.2 Estructura del tetrámero del péptido β amiloide de 42 aminoácidos, $A\beta_{1-42}$. Se representa cada cadena en un color diferente, la cadena A en color cian, la cadena B en color verde, la cadena C en color amarillo y la cadena D en color naranja (PDB: 6RHY).7
- 2.3 Estructura tetramérica del $A\beta$ O. A) Representación de la estructura del $A\beta$ O tetramérico donde las seis β plegadas que forman el *core* de hebras β , son mostradas y nombradas como $\beta 1^{cadenaA}$, $\beta 2^{cadenaA}$, $\beta 3^{cadenaB}$, $\beta 1^{cadenaC}$, $\beta 2^{cadenaC}$, and $\beta 3^{cadenaD}$, nomenclatura utilizada en Ciudad *et al.*, 2020. B) Representación de la estructura y la composición de los 42 residuos de las cuatro cadenas del $A\beta$ O tetramérico. Cadena A es coloreada cian, cadena B es coloreada verde, cadena C es coloreada amarillo and cadena D es colorada naranja; las hebras plegadas β son indicadas como flechas. 11
- 2.4 Estructura del $A\beta$ O tetramérico en medio acuoso. Vista de la estructura final del $A\beta$ O tetramérico después de 1.0 μ s de simulación. 12
- 2.5 Evolución temporal del contenido de la estructura secundaria $A\beta$ O tetramérico. La evolución temporal del contenido de los 42 residuos de las cuatro cadenas en el $A\beta$ O tetramérico a lo largo de 1.0 μ s de simulación, calculado con VMD usando el programa STRIDE.^{50, 51} El código de color para las diferentes estructuras secundarias son las siguientes: hebra β en rojo, hélice (α , 310 , o π) en negro, configuración extendida o puente aislado en caqui, y aleatoria en blanco. Las hebras β son nombradas como en (Ciudad *et al.*, 2020). 13
- 2.6 Representación del RMSD del núcleo formado por 6 hebras β de la estructura tetramérica del $A\beta_{1-42}$ 13
- 2.7 Estructura representativa del receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ al final de la simulación de 1.0 μ s. Nomenclatura habitual para la descripción de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) colocando un (+) a la subunidad izquierda y un (-) a la subunidad derecha, además de letras de la A'-E' describiendo la posición de las cadenas del pentámero y el identificador de la subunidad. 14
- 2.8 Evolución temporal de la distancia de los centros de masas del receptor $\alpha 7$ nAChR y el núcleo formado de 6 hebras β del $A\beta_{1-42}$ 15
- 2.9 Evolución temporal del contenido de la estructura secundaria $A\beta$ O tetramérico. La evolución temporal del contenido de los 42 residuos de las cuatro cadenas en el $A\beta$ O

tetramérico a lo largo de 1.0 μ s de simulación en presencia del receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$, calculado con VMD usando el programa STRIDE.^{50, 51} El código de color para las diferentes estructuras secundarias son las siguientes: hebras β en rojo, hélice (α , 310, o π) en negro, configuración extendida o puente aislado en caqui, y aleatoria en blanco. Las hebras β son nombradas como en (Ciudad *et al.*, 2020). 16

- 2.10 Pose representativa del complejo $\alpha 7$ nAChR/A β t1-42. A) Interacciones formadas en la interfase del complejo $\alpha 7$ nAChR/A β t1-42. Los residuos involucrados se representan en esferas mientras que las distancias exploradas en color azul cielo y líneas discontinuas, además de representar el W171⁺ como referencia del residuo conservado en el bolsillo de unión. Evolución temporal de la distancia formada por el residuo D23 de la cadena B del tetrámero y B) K165⁺ de la cadena A'(+) del receptor, donde se observa que la interacción inicia aproximadamente a los 60 ns y se mantiene a lo largo de la simulación. Por otro lado, C) y D) muestran la evolución temporal de la distancia formada por el residuo D23 de la cadena B del tetrámero y dos residuos de la cadena A'(+) del receptor donde se observa que dichas interacciones son complementarias a la del panel B). 17
- 2.11 Pose representativa del complejo $\alpha 7$ nAChR/A β t1-42. A) Interacciones formadas en la interfase del complejo $\alpha 7$ nAChR/A β t1-42. Se representan los residuos involucrados en esferas y las distancias exploradas en color azul cielo y líneas discontinuas, además de representar el W171⁺ como referencia del residuo conservado en el bolsillo de unión. La evolución temporal de la distancia formada por el residuo K28 de la cadena B del tetrámero y B) E211⁺ de la cadena A'(+) del receptor, donde se observa que la interacción inicia aproximadamente a los 100 ns y se mantiene a lo largo de la simulación. Por otro lado, C) y D) muestran la evolución temporal de la distancia formada por el residuo D23 de la cadena B del tetrámero y dos residuos de la cadena B'(-) del receptor donde se observa que dichas interacciones son complementarias a la del panel B). 18
- 2.12 Pose representativa del complejo $\alpha 7$ nAChR/A β t1-42. A) Interacciones formadas en la interfase del complejo $\alpha 7$ nAChR/A β t1-42. Se representan los residuos involucrados en esferas y las distancias exploradas en color azul cielo y líneas discontinuas, además de representar el W171⁺ como referencia del residuo conservado en el bolsillo de unión. La evolución temporal de las distancias formadas por los residuos S26 y N27 de la cadena C del tetrámero y B) S81⁻ de la cadena B'(-) del receptor, donde se observa que la interacción inicia aproximadamente a los 100 ns y la tendencia a lo largo de la simulación es dinámica, sin embargo, se puede observar la formación de interacciones intermitentes. Por otro lado, D) muestran la evolución temporal de la distancia formada por el residuo N27 de la cadena C del tetrámero y un residuo de la cadena A'(+) , donde se observa que dicha interacción es complementaria a la del panel A) y B), además en el panel D) se observa una mayor preponderancia en la interacción. 19
- 2.13 Distribución de la cantidad de moléculas de agua que penetran la cavidad del bolsillo de unión. La cantidad de moléculas de agua se calcula respecto a los residuos W171⁺ y W77⁻ a 4 y 5 Å. A) Muestra la cantidad de moléculas de agua en la cavidad del bolsillo de unión cuando el A β t1-42 no interactúa con el receptor $\alpha 7$ nAChR, el panel

superior muestra las moléculas de agua a 4 Å de los residuos W171⁺ y W77⁻ y el panel inferior muestra las moléculas de agua a 5 Å de los residuos W171⁺ y W77⁻. B) Muestra la cantidad de moléculas de agua en la cavidad del bolsillo de unión cuando el Aβ1-42 interactúa con el receptor α7 nAChR, el panel superior muestra las moléculas de agua a 4 Å de los residuos W171⁺ y W77⁻ y el panel inferior muestra las moléculas de agua a 5 Å de los residuos W171⁺ y W77⁻. 20

2.14 Evolución temporal del RMSD calculado mediante la diferencia de las posiciones del esqueleto del modelo del receptor α7 nAChR. 22

2.15 Aliniamiento estructural de los complejos formados por α7 nAChR (color gris y azul en representación de listón) con α-bungarotoxina (representada en esferas en color rosado claro)⁵² y α7 nAChR (modelo, color gris y violeta representación de listón y dibujo) con el Aβ1-42 (representado en dibujo y color cian cadena A, color verde cadena B, color amarillo cadena C y color naranja cadena D). 22

2.16 Evolución temporal de la distancia de los centros de masas del receptor α_{2A}AR y el núcleo formado de 6 hebras β del Aβ1-42. 24

2.17 Evolución temporal del contenido de la estructura secundaria AβO tetramérico. La evolución temporal del contenido de los 42 residuos de las cuatro cadenas en el AβO tetramérico a lo largo de 2.0 μs de simulación en presencia del receptor adrenérgico α_{2A}, calculado con VMD usando el programa STRIDE.^{50, 51} El código de color para las diferentes estructuras secundarias son las siguientes: hebras β en rojo, hélice (α, 310, o π) en negro, configuración extendida o puente aislado en caqui, y aleatoria en blanco. Las hebras β son nombradas como en (Ciudad *et al.*, 2020). 25

2.18 Poses representativas a diferentes tiempos de simulación. Se observa la formación del complejo α_{2A}AR/Aβ1-42, donde se pueden apreciar las distintas poses que el tetrámero adopta. El receptor está representado en dibujo de color violeta y el Aβ1-42 se representa en dibujo en color cian la cadena A, en verde la cadena B, en amarillo la cadena C y en anaranjado la cadena D. 26

2.19 Pose representativa de la simulación del receptor apo. A) vista lateral del receptor α_{2A}AR con proyecciones en la región extracelular (EC) e intracelular (IC), donde se muestran las distancias entre aminoácidos que forman un doble puente salino (EC) y un puente iónico (IC), las distancias son representadas en líneas discontinuas en color azul cielo. B) La evolución temporal de la distancia formada por el residuo K424^{7.36} y el residuo E109^{2.65} y la distribución de las distancias. C) La evolución temporal de la distancia formada por el residuo E204^{ECL2} y el residuo R420^{7.32} y la distribución de las distancias. D) La evolución temporal de la distancia formada por el residuo R146^{3.50} y el residuo E384^{6.30} y la distribución de las distancias, dicha interacción está asociada a la actividad del receptor. 27

2.20 Pose representativa de la simulación del complejo α_{2A}AR/Aβ1-42. A) vista lateral del receptor α_{2A}AR con proyecciones en la región extracelular (EC) e intracelular (IC), donde se muestran las distancias entre aminoácidos que forman un doble puente salino (EC) y un puente iónico (IC), las distancias son representadas en líneas discontinuas en color azul cielo. B) La evolución temporal de la distancia formada por el residuo K424^{7.36} y el residuo E109^{2.65} y la distribución de las distancias. C) La

- evolución temporal de la distancia formada por el residuo E204^{ECL2} y el residuo R420^{7.32} y la distribución de las distancias. D) La evolución temporal de la distancia formada por el residuo R146^{3.50} y el residuo E384^{6.30} y la distribución de las distancias, dicha interacción está asociada a la actividad del receptor. 28
- 3.1 Pose representativa de las simulaciones MD del complejo CBD/GPR55. A) Vista lateral del complejo CBD /GPR55. Posición del CBD en la cavidad del sitio unión al ligante. B) Vista extracelular del complejo CBD/GPR55, donde se observa que la fracción de dos anillos del CBD se inserta entre las hélices TM2 y TM3, donde también se encuentra rodeado por los residuos cargados, K79^{2.60} y E98^{3.29}. Mientras que el primer residuo interactúa a través de su región alifática de su cadena lateral, el segundo forma interacciones con un grupo hidroxilo (OH) del CBD (línea discontinua color cian). Se indican los residuos que forman el sitio de unión al CBD en el GPR55. C) Gráfico de la evolución temporal de la distancia entre el residuo ácido E98^{3.29} y uno de los grupos hidroxilo (OH) del CBD. 37
- 3.2 Pose representativa de las simulaciones MD del complejo ML186/GPR55. A) Vista lateral del complejo ML186/GPR55. Posición del ML186 en la cavidad del sitio unión al ligante. B) Vista extracelular del complejo ML186/GPR55, donde se observa que la interacción del ligante con las hélices TM3, TM6 y TM7. Tres residuos aromáticos rodean al ligante ML186. F102^{3.33} se sitúa a lo largo del eje principal de los ligantes donde establece interacciones de carácter aromático con la región altamente deslocalizada del ligante. En cuanto a los residuos F239^{6.48} y Y106^{3.37}, formaron la parte inferior del sitio de unión al agonista. Obsérvese que la posición 6.48 ("*toggle switch*") está implicada en la activación de los GPCRs de clase A. Por último, el grupo SO del ligante establece interacciones polares alrededor del residuo Q249. 38
- 3.3 Cambios conformacionales en el "*toggle switch*" diferenciando el complejo de GPR55 unido a un ligante agonista o antagonista. A) Distribuciones del ángulo diedro N-CA-CB-CG del residuo F239^{6.48} en los complejos del CBD/GPR55 y ML186/GPR55. La posición 6.48 se conoce como el "*toggle switch*" y se ha implicado en la activación de los GPCRs. En el caso del GPR55, la posición 6.48 contiene un residuo de fenilalanina. B) Estructuras finales superpuestas de las simulaciones del CBD/GPR55 y ML186/GPR55. Se ilustra la diferente posición del residuo F239^{6.48} en los dos sistemas (flecha color azul). La posición molecular más profunda del agonista selectivo ML186 (verde) puede ser responsable de la diferente posición de la cadena lateral F239^{6.48}. C) Otro residuo que parece desempeñar un papel en los cambios rotaméricos del F239^{6.48} es el F239^{6.48} que también muestra una distribución de ángulos diedros distintiva. 40
- 3.4 Distribución de los estados rotaméricos de F235^{6.44} en ambos complejos GPR55. Distribuciones del ángulo diedro N-CA-CB-CD del residuo F235^{6.44} en los complejos CBD/GPR55 y ML186/GPR55..... 41
- 3.5 Los cambios de conformación alrededor del residuo intracelular conservado R3.50 distinguen los complejos GPR55 unidos a antagonistas de los unidos al agonistas. Esta interacción electrostática se mantiene en el primero, mientras que en el segundo se interrumpe con frecuencia. Se muestran estructuras representativas de los

- complejos A) CBD/GPR55 y B) ML186/GPR55, donde las dos distancias se ilustran como líneas cian.42
- 3.6 Poses representativas de las simulaciones MD de los complejos CB1. A) Vista lateral de las estructuras superpuestas de los complejos CBD/CB1 y AM251/CB1. B) Vista extracelular del complejo CBD/CB1, donde se aprecia la interacción de los anillos aromáticos del CBD y la cadena lateral del residuo F269^{ECL2}. Se forma una interacción polar mediada por agua de uno de los grupos hidroxilo (OH) del CBD con la cadena lateral del residuo S384^{7.39}. El recuadro de la izquierda muestra la interacción aromática con la cadena lateral del residuo F269^{ECL2} y con la cadena lateral de F380^{7.35}. El recuadro de la derecha muestra con más detalle la molécula de agua que media en la interacción del CBD con el residuo S384^{7.39}. Se ha demostrado que la mutación de estos dos residuos en TM7 reduce la potencia agonista de los ligantes cannabinoides. C) Vista extracelular del complejo AM251/CB1. D) Gráficos de evolución temporal de la distancia entre uno de los grupos hidroxilo (OH) del CBD y el grupo hidroxilo de S384^{7.39} y la distancia anillo-anillo entre el anillo aromático del CBD y la cadena lateral del residuo F269^{ECL2}. 44
- 3.7 Cambios de conformación en los residuos F201^{3.36} y W357^{6.48} muestran diferentes distribuciones en los complejos CBD/CB1 y AM251/CB1. A) Distribuciones del ángulo diedro N-CA-CB-CD del residuo F201^{3.36} en los complejos CBD/CB1 y AM231/CB1. Los valores indicados en magenta corresponden a la estructura CB1 unida al antagonista (5TGZ.pdb) mientras que los coloreados en azul corresponden a la estructura CB1 unida al agonista CB1 (5XRA.pdb). Como se observa, sólo el complejo con CBD explora las conformaciones del “*twin toggle switch*” asociado con la estructura CB1 unida al agonista. B) Estructuras finales superpuestas de los complejos CBD/CB1 y AM251/CB1. Los diferentes estados rotaméricos de los residuos F239^{3.36}, W357^{6.48} y W280^{5.43} en los dos complejos CB1. Como se indica en el texto principal y en la figura 3.6, la cola alquílica del CBD contacta directamente con la cadena lateral voluminosa del residuo W280^{5.43}. C) Distribuciones del ángulo diedro N-CA-CB-CD del residuo W357^{6.48} en los complejos CBD/CB1 y AM251/CB1. F201^{3.36} y W357^{6.48} se conocen como el “*twin toggle switch*”. 46
- 3.8 Estructuras representativas de los complejos A) CBD/CB1 y B) AM251/CB1, donde se representa el candado iónico con líneas discontinuas color cian. C) Evolución temporal de la distancia entre R119^{3.5}(CZ)-D339^{6.30}(CG) para los sistemas CB1 con CBD (izquierda) y con un antagonista (derecha). La línea discontinua a 4.7 (magenta) y 8.8 Å (azul) indican la distancia correspondiente a las estructuras CB1 unida a un antagonista (5TGZ.pdb) y al agonista (5XRA.pdb), respectivamente. D) Evolución temporal de la distancia entre R119^{3.5}(CA)-D339^{6.30}(CA) para los sistemas CB1 con CBD (izquierda) y con un antagonista (derecha). La interacción electrostática se ve interrumpida en el primero mientras que en el segundo se forma con más frecuencia.47
- 3.9 Sitio de unión a sodio extracelular observado en las ambas simulaciones de dinámica molecular. Vista extracelular del sitio de unión a sodio identificado por medio de las simulaciones de dinámica molecular imparciales del complejo CBD/CB1 y B) AM251/CB1. C) Mapa de contacto del sodio a lo largo del tiempo de simulación, donde se muestra en color negro se indica el contacto con un ion de sodio (definido

por una distancia a 4 Å o menos de cualquier átomo pesado al átomo de sodio), mientras que el blanco indica la ausencia de tal contacto. Como se muestra, el residuo D367^{6.58} es el principal responsable de establecer interacciones electrostáticas con un catión sodio y, para ello, suele utilizar tanto el grupo carboxilato de su cadena lateral como el grupo carbonilo del esqueleto. La naturaleza ácida de los residuos en estas posiciones está conservada en el receptor CB1 humano (D367^{6.58}, E274^{5.37}, y D267^{ECL2}; residuos de rata con las correspondientes posiciones humanas, D366^{6.58}, E273^{5.37}, y D266^{ECL2}). 49

A.1 Estructura característica de los receptores acoplados a proteína G (GPCRs). Figura realizada en el programa Pymol¹²⁰ e Inkscape¹²¹, estructura proteica tomada del modelo GPR55. 55

A.2 Ejemplo de la farmacocinética de los ligantes unidos a los receptores acoplados a proteína G (GPCRs). 56

A.3 Estructura característica de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs). Figura realizada en el programa Pymol¹²⁰ e Inkscape¹²¹, estructura proteica tomada del PDB:5KXI. 57

A.4 Esquemas de los estados conformacionales que los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) exploran en su activación y desactivación. Figura realizada en el programa Inkscape¹²¹. 58

B.1 Esquemas de los descriptores estructurales presentes en el sistema. A) Interacciones enlazantes y no enlazantes descritas en las ecuaciones del campo de fuerzas CHARMM. B) Esquema del ángulo de diedro o de torsión. Figura realizada en el programa Inkscape¹²¹. 61

B.2 Diagrama de flujo general para realizar simulaciones de dinámica molecular de macromoléculas. 64

B.3 Representación gráfica del modelado por homología 68

B.4 Representación gráfica del acoplamiento molecular. 69

C.1 Ejemplo de un sistema macromolecular en un medio acuoso (moléculas de agua de tipo TIP3P) con una concentración salina de NaCl a 0.15 M. Figura realizada en el programa Pymol¹²⁰ e Inkscape¹²¹. 70

C.2 Ejemplo de un sistema macromolecular embebido en una membrana bilipídica (POPC), rodeado por un medio acuoso con una concentración salina de NaCl a 0.15 M. Figura realizada en el programa Pymol¹²⁰ e Inkscape¹²¹. 70

C.3 Estructura inicial del receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR) en presencia del tetrámero del péptido β amiloide. Figura realizada en el programa Pymol¹²⁰ e Inkscape¹²¹. 71

C.4 Estructuras iniciales del receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR) en presencia del tetrámero del péptido β amiloide en diferentes posiciones, se representan los tetrámeros en diferentes colores y en listones a excepción del tetrámero que presenta interacción con el receptor, este se representa en color cian

- (cadena A), color verde (cadena B), color amarillo (cadena C), color naranja (cadena D) y en dibujo. Figura realizada en el programa Pymol¹²⁰ e Inkscape¹²¹. 71
- C.5 Estructura inicial del receptor adrenérgico α_{2A} (α_{2A} AR) en presencia del tetrámero del péptido β amiloide. Figura realizada en el programa Pymol¹²⁰ e Inkscape¹²¹. 72
- C.6 Estructuras iniciales del receptor adrenérgico α_{2A} (α_{2A} AR) en presencia del tetrámero del péptido β amiloide en diferentes posiciones, se representan los tetrámeros en diferentes colores y en listones a excepción del tetrámero que presenta interacción con el receptor, este se representa en color cian (cadena A), color verde (cadena B), color amarillo (cadena C), color naranja (cadena D) y en dibujo. Figura realizada en el programa Pymol¹²⁰ e Inkscape¹²¹. 72
- C.7 Estructuras de los complejos iniciales del CB1/CBD y CB1/AM251. A) Vista lateral del complejo CB1/CBD y CB1/AM251. Sitios de unión al ligante del B) compuesto CBD y C) del antagonista AM251 seleccionados de cálculos de acoplamiento molecular. Figura realizada en el programa Pymol¹²⁰ e Inkscape¹²¹. 73
- C.8 Estructuras de los complejos iniciales del GPR55/CBD y GPR55/ML186. A) Vista lateral del complejo GPR55/CBD y GPR55/ML186. Sitios de unión al ligante del B) compuesto CBD y C) del agonista M186 seleccionados de cálculos de acoplamiento molecular. Figura realizada en el programa Pymol¹²⁰ e Inkscape¹²¹. 73
- D.1 Secuencia del péptido β amiloide de 42 aminoácidos. Figura realizada en el programa Inkscape¹²¹. 74
- D.2 Alineamiento de las secuencias para generar el receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ ($\alpha 7nAChR$) para la especie *Homo sapiens*. Secuencia de la plantilla de la subunidad $\alpha 4$ (PDB: 5KXI) usado para generar la estructura terciaria del receptor $\alpha 7nAChR$. Las hebras beta de la subunidad $\alpha 4$ son indicadas en rectángulos color lila, y la hélice $\alpha 1$ en color violeta. El residuo triptófano (W) del bolsillo de unión al ligante están coloreados en azul y las cisteínas que forman los puentes de disulfuro están coloreadas en rojo. Figura realizada en el programa Inkscape¹²¹. 74
- D.3 Secuencias de aminoácidos de los receptores CB1 y GPR55 estudiados en este trabajo. A) Secuencia de aminoácidos del receptor cannabinoide de tipo 1 (CB1) de *Rattus norvegicus* (UNIPROT: P20272). Los segmentos excluidos del CB1 están coloreado en gris. Las hélices transmembranales (TM) están indicadas con rectángulos verde mientras que los residuos más conservados en cada TM están de color azul. Las cisteínas de los puentes de disulfuro son rojos. B) Secuencia de aminoácidos del receptor acoplado a proteínas G 5 (GPR55) de *Rattus norvegicus* (UNIPROT: F1MAK4). Los segmentos excluidos del modelo estructural del GPR55 están coloreado en gris. Las hélices transmembranales (TM) están indicadas con rectángulos naranjas mientras que los residuos más conservados en cada TM están de color azul. Las cisteínas de los puentes de disulfuro son rojos. Figura realizada en el programa Inkscape¹²¹. 75
- D.4 Alineamiento de las secuencias para generar el receptor GPR55 para la especie *Rattus norvegicus*. Secuencia de la plantilla del receptor LPA6 (PDB: 5XSZ) usado para generar la estructura terciaria del receptor GPR55. Las siete hélices

transmembranales (TM) del receptor LPA6 son indicadas en rectángulos color cian. Los residuos más conservados en cada TM están coloreados en azul. Figura realizada en el programa Inkscape¹²¹. 75

D.5 Ligantes utilizados en la interacción con receptores del sistema endocannabinoide. A) Dos ligantes utilizados en la formación de complejos con el receptor CB1. AM251 es un antagonista de CB1 mientras que el CBD permanece incierta. B) Dos ligantes utilizados en la formación de complejos con el receptor GPR55. CDB es un antagonista mientras que el ML186 actúa como un agonista selectivo. Figura realizada en el programa MarvinSketch e Inkscape¹²¹. 76

Lista de abreviaturas

AAP	Proteína precursora amiloidea.
AM251	<i>1-(2,4-dichlorophenyl)-5-(4-iodophenyl)-4-methyl-N-piperidin-1-ylpyrazole-3-carboxamide.</i>
AMBER	<i>Assisted Model Building and Energy Refinement.</i>
Apo	En ausencia de ligante.
ApoE	Apolipoproteína.
atm	Atmósfera.
A β	Péptido β amiloide.
A β 1-40	Péptido β amiloide de 40 aminoácidos.
A β 1-42	Péptido β amiloide de 42 aminoácidos.
A β Os	Oligómeros del péptido β amiloide.
A β t	Tetrámero del péptido β amiloide.
A β t1-42	Tetrámero del péptido β amiloide de 42 aminoácidos.
B-W	Ballesteros-Weinstein.
CB1	Receptor cannabinoide tipo 1.
CB2	Receptor cannabinoide tipo 2.
CBD	Cannabidiol: <i>2-[(1R,6R)-3-methyl-6-prop-1-en-2-ylcyclohex-2-en-1-yl]-5-pentylbenzene-1,3-diol.</i>
CHARMM	<i>Chemistry at Harvard Molecular Mechanics.</i>
Cter	C terminal.
DM	Dinámica molecular.
EA	Enfermedad de Alzheimer.
EC	Extracelular.
ECL	Bucle extracelular.
EP	Enfermedad de Parkinson.
GPCR	Receptor acoplado a proteína G.

GPR55	Receptor acoplado a proteína G 55.
GROMOS	<i>Groningen Molecular Simulation.</i>
IC	Intracelular.
ICL	Bucle intracelular.
L-DOPA	Levodopa: <i>(2S)-2-amino-3-(3,4-dihydroxyphenyl)propanoic acid.</i>
LPA6	Ácido lisofosfatídico 6.
ML186	<i>N-[2-methoxy-5-(4-morpholynylsulfonyl)phenyl]-4,5,6,7-tetrahydro-1-benzothiophene-2-carboxamide.</i>
NAMD	<i>Not (just) another molecular dynamics program.</i>
ns	Nanosegundos.
Nter	N terminal.
PDB	<i>Protein Data Bank.</i>
PET	Tomografía de emisiones de positrones.
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina.
CB1	Receptor cannabinoide tipo 1.
GPR55	Receptor acoplado a proteína G 55.
RMN	Resonancia magnética nuclear.
RMSD	Desviación de la raíz cuadrada media.
RN	<i>Rattus norvegicus.</i>
SEC	Sistema endocannabinoide.
TCL	<i>Tool Command Language.</i>
TM	Hélice transmembranal.
VMD	<i>Visual Molecular Dynamics.</i>
α_{2A} AR	Receptor adrenérgico α_{2A} .
α_7 nAChR	Receptor nicotínico de acetilcolina α_7 .
μ s	Microsegundos.

Capítulo 1

1. Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas son trastornos caracterizados por la degeneración progresiva de las células nerviosas del sistema nervioso central (Figura 1.1), lo que provoca alteraciones en sus funciones intrínsecas y, en última instancia, conduce a la muerte celular.¹⁻³ Existen diversas enfermedades neurodegenerativas, sin embargo, las dos principales en términos de personas afectadas son la enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Parkinson (EP).^{4, 5}

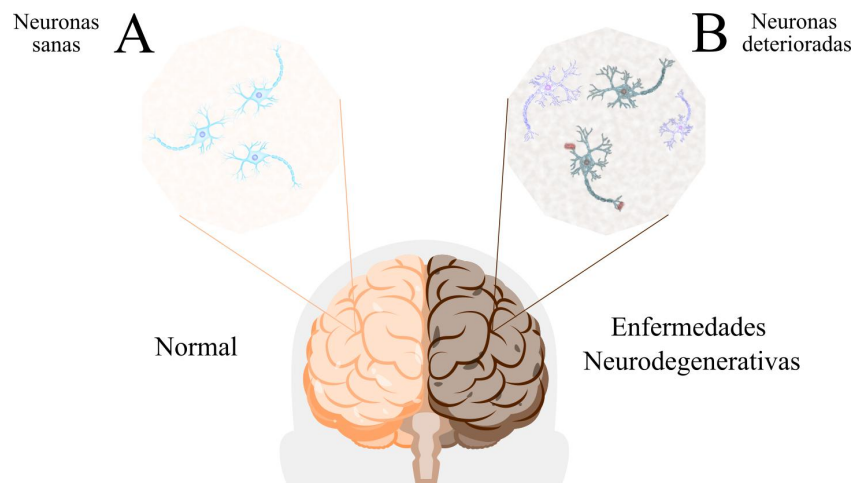


Figura 1.1 Estructura fisiológica neuronal A) normal y B) afectada por enfermedades neurodegenerativas (p.ej. la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson)

Las enfermedades neurodegenerativas afectan a millones de personas mundialmente. Para dimensionar el problema, se estima que en el año 2030 solamente la enfermedad de Alzheimer afectará a 78 millones de personas.⁴

Además, por la naturaleza multifactorial de estos trastornos, sigue siendo difícil alcanzar un consenso sobre un enfoque terapéutico para detener su progresión o revertir el daño infligido.⁶

⁷ Por ello, actualmente no se conoce cura para estas enfermedades.

Particularmente, en este trabajo nos centraremos en las enfermedades de Alzheimer y Parkinson. Aunque comparten algunas similitudes como su clasificación, el impacto en las funciones cognitivas y la afección de la calidad de vida, cada una presenta características únicas que distingue tanto su origen como su prognosis.¹⁻⁵

Las dos enfermedades se clasifican como trastornos neurodegenerativos que afectan principalmente a personas mayores degradando las capacidades inherentes de las células nerviosas que repercuten en las funciones cognitivas como atención, lenguaje y las capacidades para realizar actividades cotidianas. De este modo, las personas que padecen cualquiera de estas enfermedades se ven afectadas en su calidad de vida.

En cuanto a síntomas, patología y tratamiento, cada enfermedad tiene sus características predominantes. La EA se caracteriza por la pérdida de memoria mientras que la EP por la disminución de las capacidades motoras.

De la misma forma pasa con la patología subyacente de cada enfermedad, ya que en el caso de la EA la contribución del deterioro neuronal es causado por la acumulación del péptido β amiloide (formación de placas seniles) y los ovillos neurofibrilares de la proteína tau. Por su parte, en la EP la acumulación de la proteína α -sinucleína y el deterioro de las células nerviosas dopaminérgicas de la sustancia negra (*substantia nigra*) del cerebro son las principales causas.⁸⁻¹⁰

Aunque en el caso del EA se han propuesto diversos tratamientos, ninguno ha sido muy efectivo. Sin embargo, para la EP es más común tener un tratamiento que ayude al aumento en la presencia de la dopamina y así mejorar considerablemente las capacidades motoras.

A pesar de los esfuerzos y avances neuromédicos la EA y la EP no tienen una cura conocida. Es por esto que se abre la posibilidad de explorar los detalles de cada enfermedad para propiciar la generación de alguna terapia efectiva.

El trabajo de tesis se centra en un enfoque computacional que pretende entender a nivel atómico-molecular, interacciones proteína ligante relacionadas con el Alzheimer y el Parkinson.

1.1 Hipótesis

La caracterización de entidades biomoleculares incluyendo receptores neuronales, mediante el uso de métodos computacionales es capaz de proveer información a nivel atómico-molecular sobre las interacciones con ligantes y los cambios conformacionales en las entidades proteicas asociados a dichas interacciones.

1.2 Objetivos generales

1. Estudiar la posible interacción de oligómeros del péptido β amiloide ($A\beta O$) y receptores neuronales en el contexto de una posible alteración en la función de estos últimos.
2. Caracterizar los mecanismos de interacción a nivel molecular entre cannabinoides y receptores del sistema endocannabinoide.

1.2.1 Objetivos particulares

- a. Analizar la estructura del tetrámero del péptido β amiloide utilizando técnicas computacionales.
- b. Obtener la estructura molecular de receptores neuronales (el receptor $\alpha 7$ nAChR y el receptor adrenérgico $\alpha 2A$) que se sabe que muestran gran afinidad por $A\beta O$.
- c. Identificar los modos de interacción a nivel molecular entre receptores neuronales seleccionados y los $A\beta O$ para discernir las interacciones relevantes entre estas dos especies.
- d. Obtener la estructura molecular del receptor cannabinoide tipo 1 (CB1) y el receptor acoplado a proteína G 55 (GPR55) para la especie *Rattus norvegicus*.
- e. Identificar los modos de interacción a nivel molecular entre los receptores cannabinoides CB1 y GPR55 con cannabinoides de interés farmacológico.

Capítulo 2

2. La enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más prevalente de demencia y una de las principales enfermedades neurodegenerativas. El deterioro cognitivo asociado a la EA incluye dificultades con la memoria, el lenguaje, el pensamiento y un estado de deterioro celular y físico que finalmente imposibilitan o incapacitan a la persona afectada.^{4, 6, 7, 10}

El primer registro que se tiene de la enfermedad fue en 1906 cuándo el científico alemán Alois Alzheimer publicó los resultados de sus estudios sobre la paciente Auguste Deter.¹¹

Con el pasar de los años aumentó el interés por la etiología de la EA, lo que dio lugar a más estudios e hipótesis sobre el desarrollo de la patología. En un inicio la identificación de genes relacionados con la proteína precursora amiloidea (APP) y la apolipoproteína E (ApoE) se relacionaron con el desarrollo de la enfermedad como una causa genética. Sin embargo, las mismas investigaciones señalaron que no es el único factor que la desarrolla, además de que, notaron que los síntomas iniciales aparecen cuando el daño en el sistema nervioso central ya es avanzado. Las posibles causas involucran a la acumulación de oligómeros del péptido β amiloide y la formación de ovillos constituidos por la proteína tau.¹²

Con el desarrollo de las nuevas técnicas de imagenología y con la revolución tecnológica del siglo XXI, se estandarizó el uso de resonancias magnéticas para el diagnóstico de la EA y en 2004 se realiza el primer radiotrazador para visualizar las placas de amiloide mediante la tomografía de emisión de positrones (PET).¹³

Más tarde se introduce el concepto de biomarcador para la enfermedad de Alzheimer que se utilizan para realizar la medición de la acumulación del péptido β amiloide ($A\beta$) y la proteína tau, es decir, dos de las alteraciones más notables que se observan en el cerebro afectado por esta enfermedad.¹⁴

A partir de los avances neuromédicos y tecnológicos antes mencionados surgen diversos estudios para encontrar terapias para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, no obstante, hasta la actualidad la EA no tiene cura y se estima para el año 2030 cerca de 78 millones de personas en el mundo desarrollen dicho padecimiento.⁴

Es necesario recalcar que la EA es una enfermedad crónica neurodegenerativa de carácter multifactorial, lo que ha generado que existan diversas hipótesis para explicar tanto su origen como su progresión.

Los factores de riesgo incluyen la edad, la heredabilidad, traumatismo, género, estilo de vida, entre otros. De esta manera, se sugieren diversas explicaciones y conexiones con el inicio de la EA, las cuales incluyen la formación de placas extracelulares, la formación de ovillos intracelulares, la proinflamación asociada a la activación de la microglía debida a la unión de agregados del péptido A β . Dichos ejemplos sugieren diversas áreas de investigación y de oportunidad para estudiar la enfermedad de Alzheimer.¹⁵⁻¹⁷

En particular, la evidencia médica ha demostrado la formación de agregados del péptido β amiloide en estudios de autopsia de pacientes con EA, lo que sugiere un papel central y neurotóxico del péptido A β que se ha asociado directamente a los orígenes de la enfermedad. Asimismo, se han demostrado que algunos receptores neuronales muestran gran afinidad por los oligómeros del péptido β amiloide (A β O), los cuales son elementos intermediarios en el mecanismo de formación de las placas seniles que aún son solubles en agua.^{7, 16-22}

A pesar del desarrollo antes mencionado, no existe aún información detallada a nivel molecular sobre el modo de interacción de los A β O ni las consecuencias funcionales en los receptores causadas por la interacción debido principalmente a la complejidad de estudiar a estos sistemas experimentalmente.²³⁻³² Por ello en este trabajo se exploró una estrategia computacional capaz de proveer información detallada de dichos sistemas biomoleculares. En particular, se investigaron las interacciones moleculares entre oligómeros del péptido β amiloide y neuroreceptores, en particular, el receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR) y el receptor adrenérgico α_{2A} (α_{2A} AR).

2.1 El péptido β amiloide ($A\beta$) en la enfermedad de Alzheimer

Para encontrar un tratamiento eficaz para la enfermedad de Alzheimer se han propuesto hipótesis que sugieren el inicio de la patología.^{6, 33}

En particular, la hipótesis más aceptada está relacionada con la formación de agregados del péptido β amiloide.³³ Esto se debe a que los agregados del péptido β amiloide son los causantes de la mayor toxicidad en el cerebro. Además, el péptido β amiloide es utilizado como un biomarcador para monitorear información importante sobre la posible aparición de la enfermedad.^{14, 34}

Para ser más específico, la sobreproducción del β amiloide se encuentra en casi todas las formas de Alzheimer, la sobreexpresión del β amiloide y sus mutaciones de la proteína precursora amiloidea (APP) en modelos animales dirige al desarrollo de fenotipos relacionados con el Alzheimer y las formas oligoméricas de β amiloide es altamente tóxica para las neuronas.¹⁶⁻³²

Dicho lo anterior, conocer las interacciones y el mecanismo con el que se relacionan los oligómeros del péptido β amiloide y los receptores neuronales será la clave a la resolución de una posible cura y prevención a la enfermedad del Alzheimer.

Por lo cual, es preciso mostrar información más concreta del péptido β amiloide para un mayor entendimiento. En concreto el péptido está compuesto de 36 a 43 aminoácidos que se sintetizan a partir de la proteína precursora amiloidea (APP) y se ha demostrado que los $A\beta$ formados por 40 y 42 aminoácidos ($A\beta$ 1-40 y $A\beta$ 1-42 respectivamente) ocurren con mayor frecuencia de forma natural en el cerebro.^{33, 34} No obstante, existen otros segmentos que se sugieren causan neurotoxicidad, por ejemplo, el segmento 25-35 o el segmento 12-28.^{29, 35} Sin embargo, el segmento $A\beta$ 1-42 tiene un papel más relevante en la patología de la EA, ya que dichos péptidos muestran mayor tendencia a formar un grupo diverso de oligómeros (agregados formados por varias unidades estructurales) en condiciones *in vitro* incluyendo dímeros, trímeros, tetrámeros, y más.¹⁷⁻³²

El mecanismo evolutivo sugiere que los péptidos β amiloides y los respectivos oligómeros, aún tienen la capacidad de ser solubles en medio acuoso. Posteriormente forman protofibrillas y placas extracelulares formadas por una gran cantidad de agregados del $A\beta$ (Figura 2.1), las

que, en contraste, son entidades moleculares insolubles (las placas extracelulares formada por agregados de $A\beta$ son un fenotipo conocido de la enfermedad de Alzheimer en una etapa avanzada).

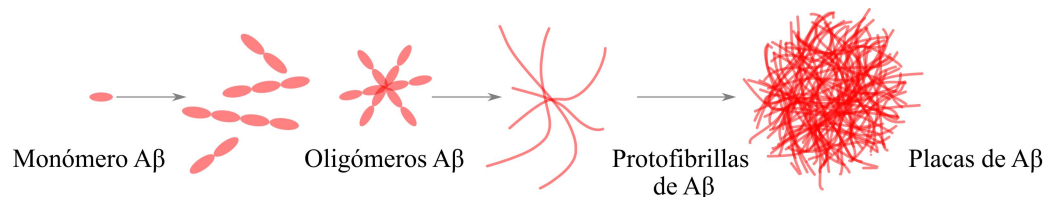


Figura 2.1 Esquema de las etapas de la agregación del péptido β amiloide ($A\beta$) en la enfermedad de Alzheimer, imagen realizada en el programa Inkscape.

Por otra parte, es de suma importancia tener información estructural del péptido β amiloide, así como de los distintos oligómeros que son el inicio de la formación de los agregados de $A\beta$. En la base de datos de proteínas (PDB: *Protein Data Bank*) se encuentra un gran número de estructuras del péptido β amiloide, sin embargo, las estructuras han sido resueltas en ambientes donde la agregación del péptido ya está formando protofibrillas o placas.

En este contexto, en el 2019, se obtuvieron estructuras de un tetrámero del péptido β amiloide de 42 aminoácidos, $A\beta_{1-42}$, (Figura 2.2) mediante la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), dicha información se encuentra contenida en el PDB: 6RHY.²⁶

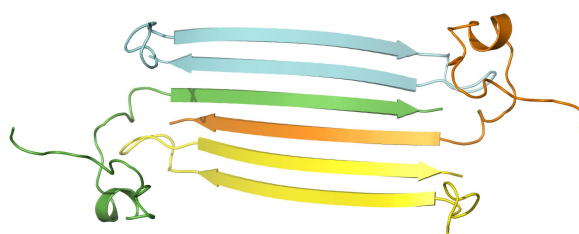


Figura 2.2 Estructura del tetrámero del péptido β amiloide de 42 aminoácidos, $A\beta_{1-42}$. Se representa cada cadena en un color diferente, la cadena A en color cian, la cadena B en color verde, la cadena C en color amarillo y la cadena D en color naranja (PDB: 6RHY).

Estas estructuras fueron obtenidas en un medio similar al membranal y es de suma importancia para el presente trabajo, ya que una de ellas fue seleccionada como la estructura inicial para investigar la posible estructura del estado tetramérico del péptido β amiloide en un medio acuoso. Dicha estructura soluble en agua del tetrámero del péptido β amiloide será utilizada a su vez para explorar los modos de interacción entre los oligómeros del péptido β amiloide y receptores neuronales.

2.2 Métodos

En esta sección se describen los detalles relacionados con la generación de los complejos formados por el A β O y dos receptores neuronales, el receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR) y el receptor adrenérgico α_{2A} (α_{2A} AR). Debido a que los dichos receptores muestran gran afinidad por los A β O y están asociados a la enfermedad de Alzheimer.

2.2.1 Estructuras del A β O, $\alpha 7$ nAChR y α_{2A} AR

Como se mencionó anteriormente para investigar los cambios conformacionales del tetramero del péptido β amiloide (Figura 2.2), se utilizó la estructura tetramérica del péptido β amiloide depositada en el PDB: 6RHY y donde cada monómero está constituido por 42 aminoácidos (Figura D.1).

Se seleccionó la estructura basada en distintas consideraciones; la composición de los monómeros, 1-42 aminoácidos (longitud de los péptidos con más predisposición a formar agregados), la estructura constituía un oligómero de 4 monómeros (tetramero), aunque existe diversa información del péptido β amiloide, dicha información está en diversos ambientes fisiológicos de la patología, por lo cual se considera que la elección de la información del PDB 6RHY es buena aproximación inicial para la presente investigación.²⁶

No obstante, ya que el ambiente en el que se resolvió la estructura fue tal que se imitó el ambiente de la membrana celular, se realizó una investigación para determinar las conformaciones adoptadas por el oligómero en condiciones acuosas. Con esto en mente se realizó una simulación atomística de dinámica molecular de 1.0 μ s en un ambiente acuoso (a 1 atm de presión, 37 °C y una concentración salina de 0.15 M) para observar su comportamiento en un ambiente fisiológico, así como determinar las características estructurales en la fase inicial de la patología cuando los A β O aún son solubles.^{33, 36}

Por otro lado, en el momento que se inició el proyecto la estructura del receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR) no estaba dilucidada, por lo cual se utilizó la técnica de modelado por homología para obtener la estructura tridimensional pentamérica del receptor.³⁷⁻³⁹

Para obtener una plantilla apropiada para generar la estructura terciaria del $\alpha 7$ nAChR, se comparó la homología de las subunidades alfa existentes en el banco de datos de proteínas (PDB), posteriormente, se seleccionó la estructura de la subunidad $\alpha 4$ basado en las similitudes tanto de expresión neuronal que comparte con la subunidad $\alpha 7$ como la identidad de secuencia que presenta, la cual es de aproximadamente de 38% (PDB: 5KXI), las secuencias de aminoácidos de las subunidades alfa 4 y alfa 7 de *Homo sapiens* se obtuvieron de UNIPROT con los códigos P43681 y P36544, respectivamente (Figura D.2).⁴⁰ Dichas secuencias se alinearon mediante el programa BLASTp.⁴¹ Los modelos tridimensionales de la subunidad $\alpha 7$ se realizaron con los protocolos establecidos del programa Modeller 9.23, donde se generaron 100 modelos y se seleccionó una estructura representativa basándonos en la función de puntuación de Modeller.³⁹

La estructura representativa de la subunidad $\alpha 7$ seleccionada se replicó y alineó estructuralmente con las diferentes subunidades del pentámero del receptor que se encuentra en el código de PDB 5KXI, formando así el receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ (homopentámero). Cabe mencionar que para los posteriores estudios solo se utiliza la región extracelular del receptor dada la naturaleza de las posibles interacciones con los A β O.

Para el caso del receptor adrenérgico α_{2A} (α_{2A} AR) se utilizó la información estructural depositada en la base de datos PDB con el código 6KUX. Sin embargo, dicha estructura tiene un segmento intracelular faltante, así, la estructura del receptor se completó mediante el protocolo del programa Modeller 9.23,³⁹ donde se generaron 100 modelos y se seleccionó una estructura representativa basada en la formación del bucle faltante de la información estructural contenida en el PDB 6KUX,⁴² así como la función de puntuación del programa.

2.2.2 Formación del complejo receptor/ligante

Para formar los complejos receptores/ligante se consideró realizar una construcción del sistema donde el A β O estuviera localizado a una distancia no menor de 17 Å del receptor (p. ej. Figura C.3 y C.5) garantizando así la ausencia de cualquier interacción entre el A β O y el receptor en la configuración inicial del complejo. Con esto en mente se generaron 10 réplicas del sistema variando la posición inicial del A β O tanto con el receptor $\alpha 7$ nAChR como con el receptor α_{2A} AR (Figuras C.4 y C.6).

2.2.3 Simulaciones atomística de dinámica molecular

Se realizaron simulaciones atomísticas de dinámica molecular para cada complejo. Los pasos para generar al sistema son relativamente similares a la descrita en el Apéndice B y con más detalle en la sección B.1. En resumen, utilizando la información estructural de los sistemas conformados por los receptores $\alpha 7$ nAChR, $\alpha 2A$ AR y el A β O (Figuras C.3 y C.5), se incluyen los átomos de hidrógeno que representan los estados de protonación más probables en cada aminoácido a pH neutro.⁴³

Para el caso donde el sistema está conformado por el receptor $\alpha 7$ nAChR tiene la característica de ser un sistema en un medio acuoso (sección B.1.2), ya que únicamente se incluyó el dominio extracelular del receptor, por lo que el sistema se hidrató con una caja de moléculas de agua, donde se incluyen iones sodio y cloro a una concentración salina fisiológica de 0.15 M. Para este tipo de simulaciones se realizaron pasos de preparación del sistema donde se imponen fuerzas externas de tipo armónicas en diversos tipos de átomos con la finalidad de minimizar (utilizando el algoritmo de gradiente conjugado) y equilibrar el sistema dinámico de una manera más óptima. Posterior a los pasos de preparación se realizó la simulación de dinámica molecular imparcial durante 1000 ns (1.0 μ s) a temperatura y presión constante, 37 °C y 1 atmósfera respectivamente.³⁶

Por otra parte, el sistema asociado con el receptor $\alpha 2A$ AR, se embebió en una membrana de POPC (véase sección B.1.3) que posteriormente se hidrató con moléculas de agua por ambos lados de la bicapa lipídica, donde se incluyeron iones sodio y cloro para obtener una concentración salina fisiológica (0.15 M).⁴⁴⁻⁴⁶ Se realizaron pasos de preparación que incluyeron la imposición de restricciones de fuerza estructural para evitar una conformación no realista del sistema. Posteriormente, se realizaron simulaciones de dinámica molecular sin sesgos durante un microsegundo (1000 ns) a una temperatura de 37 °C y 1 atmósfera de presión. Además, se utiliza la numeración de Ballesteros-Weinstein como superíndice para describir la posición de los aminoácidos como es común en receptores de la familia A de los GPCRs (véase Apéndice A).⁴⁷

2.3 Resultados y discusión

Los resultados de las simulaciones de dinámica molecular proporcionan información valiosa y detallada de la formación de complejos proteínicos de distintos receptores neuronales y una especie neurotóxica (como son los oligómeros del péptido β amiloide), de igual manera proveen parámetros estructurales, de interacción y conformacionales que se asocian al comportamiento de cada especie química.

Como se mencionó anteriormente en la sección de métodos, para explorar el comportamiento de los oligómeros del péptido β amiloide inicialmente se eligió la información del PDB 6RHY que contiene la estructura de un tetramero del péptido β amiloide de 42 aminoácidos (Figura 2.3), el cual se sometió a una simulación atómica de dinámica molecular con una duración de 1.0 μ s en un ambiente fisiológico para observar la estabilidad de las interacciones del oligómero y el comportamiento dinámico de su estructura en medio acuoso.

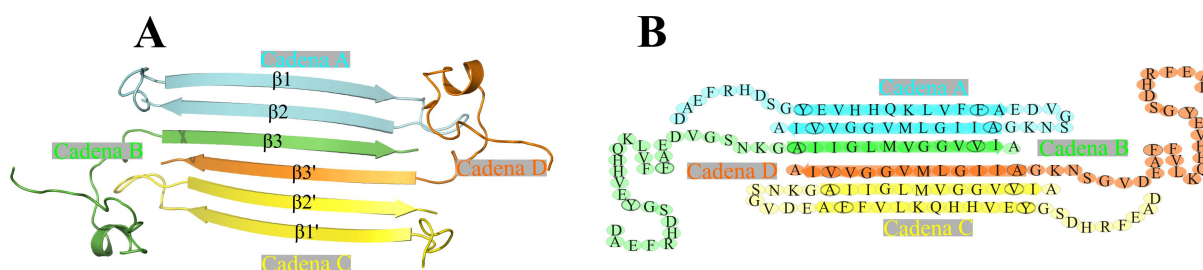


Figura 2.3 Estructura tetramérica del A β O. A) Representación de la estructura del A β O tetramérico donde las seis β plegadas que forman el *core* de hebras β , son mostradas y nombradas como $\beta 1^{cadenaA}$, $\beta 2^{cadenaA}$, $\beta 3^{cadenaB}$, $\beta 1^{cadenaC}$, $\beta 2^{cadenaC}$, and $\beta 3^{cadenaD}$, nomenclatura utilizada en Ciudad *et al.*, 2020. B) Representación de la estructura y la composición de los 42 residuos de las cuatro cadenas del A β O tetramérico. Cadena A es coloreada cian, cadena B es coloreada verde, cadena C es coloreada amarillo and cadena D es colorada naranja; las hebras plegadas β son indicadas como flechas.

A partir de las trayectorias de las simulaciones del tetramero se observó que durante el tiempo de simulación la estructura terciaria se modificó, originalmente la estructura tridimensional era planar conformada por un núcleo de seis hebras β , donde los dos péptidos A β (1-42) externos contribuyen con dos hebras β ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 1'$ y $\beta 2'$) mientras que los dos péptidos A β (1-42) internos contribuyen cada uno con una hebra β ($\beta 3$ y $\beta 3'$)²⁶ (Figura 2.3), posteriormente, la estructura terciaria llegó a ser de tipo toroide (Figura 2.4)

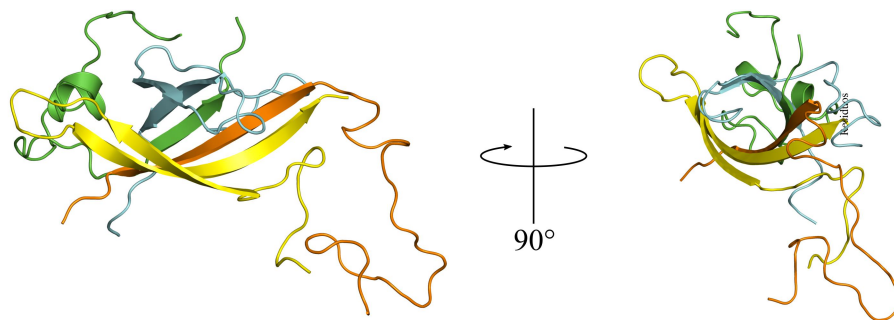


Figura 2.4 Estructura del A β O tetramérico en medio acuoso. Vista de la estructura final del A β O tetramérico después de 1.0 μ s de simulación.

Debido al cambio observado en la estructura terciaria, se procedió a explorar las interacciones que estabilizan dicha conformación, donde la estructura se asemeja a un dominio barril β de 6 hebras β con un núcleo hidrofóbico formado por los residuos que incluyen L17^{cadenaA}, F19^{cadenaA}, I32^{cadenaA}, L34^{cadenaA}, M35^{cadenaB}, L17^{cadenaC}, F19^{cadenaC}, I32^{cadenaC}, L34^{cadenaC} y M35^{cadenaD}, además una vez colocada en un medio acuoso se observan interacciones previamente ausentes entre residuos de las cadenas A y C; particularmente relevante es la interacción aromática entre las cadenas laterales de la F19 (F19^{cadenaA}-F19^{cadenaC}) y la G33^{cadenaA} establece estrechas interacciones esqueleto-esqueleto con G37^{cadenaB} y G38^{cadenaB}, mientras que G33^{cadenaC} forma interacciones equivalentes con G37^{cadenaD} y G38^{cadenaD}. Estas interacciones permiten los contactos entre las hebras β de la estructura.^{25, 48}

Se debe agregar que se exploró la evolución temporal de la estructura secundaria que indica en forma general, que la estructura tetramérica A β 1-42 conserva su núcleo original de 6 hebras β (Figura 2.5). Además, dichos parámetros estructurales indican que aproximadamente a los 100 ns la estructura terciaria global se mantiene relativamente estable. Por otro lado, se complementa la información con el estudio de la desviación de la raíz cuadrática media, RMSD, que ayuda a cuantificar la similitud estructural del sistema, utilizando la distancia entre los átomos de moléculas superpuestas,⁴⁹ y observar su variación con respecto al tiempo. De dicho análisis se observó que las hebras β del núcleo de la estructura, en general, se mantienen relativamente estables (Figura 2.6) a lo largo del tiempo de simulación, dicha observación es consistente con la evolución temporal de la estructura secundaria de las hebras β .

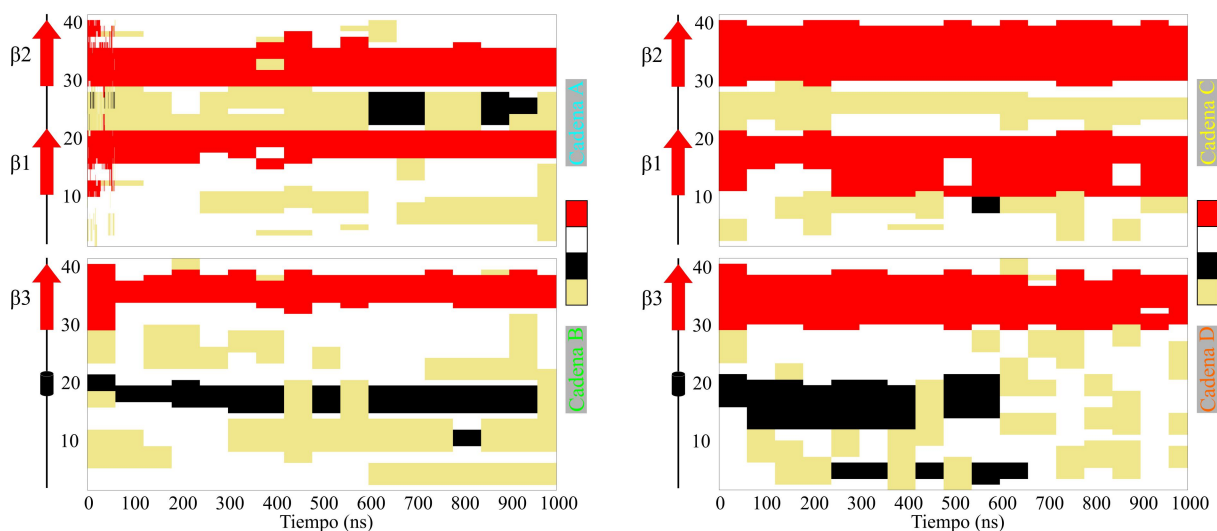


Figura 2.5 Evolución temporal del contenido de la estructura secundaria A β O tetamérico. La evolución temporal del contenido de los 42 residuos de las cuatro cadenas en el A β O tetamérico a lo largo de 1.0 μ s de simulación, calculado con VMD usando el programa STRIDE.^{50, 51} El código de color para las diferentes estructuras secundarias son las siguientes: hebra β en rojo, hélice (α , 310 , o π) en negro, configuración extendida o puente aislado en caqui, y aleatoria en blanco. Las hebras β son nombradas como en (Ciudad *et al.*, 2020).

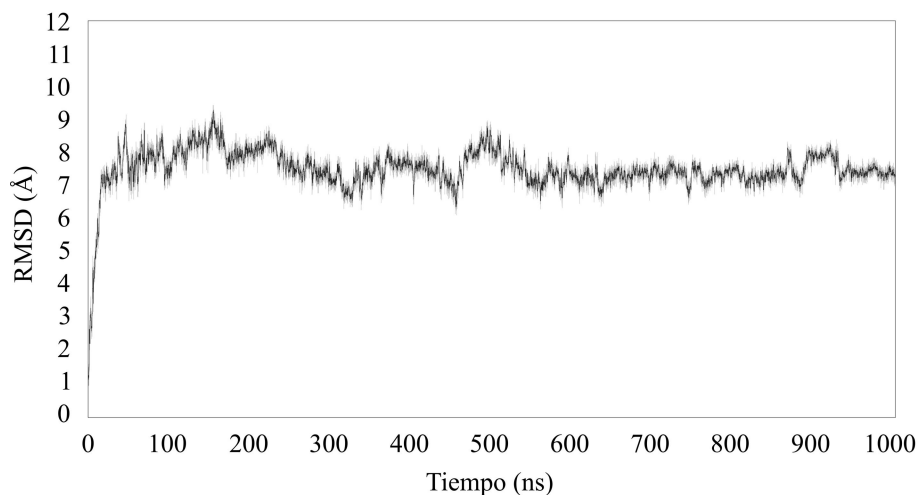


Figura 2.6 Representación del RMSD del núcleo formado por 6 hebras β de la estructura tetamérica del A β 1-42.

Al final de las simulaciones se seleccionó una estructura representativa (Figura 2.4) que se utilizó en los estudios posteriores.

Por otra parte, para continuar con la exploración y el estudio de las interacciones de los A β O es necesario obtener las estructuras de los receptores que se emplean en el trabajo de investigación, es decir, el receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ y el receptor adrenérgico $\alpha 2A$.

Caso I, el receptor $\alpha 7$ nAChR.

Dicho lo anterior, y como se discutió en la sección de métodos, se construyó un modelo del

$\alpha 7$ nAChR mediante modelado por homología con la estructura de la subunidad $\alpha 4$, tomando en cuenta la identidad de sus secuencias (aprox. 38%) y la similitud en la expresión neuronal.³⁸ La estructura del homopentámero se construyó tomando como referencia la información del PDB 5KXI. Cabe mencionar que en este trabajo se utilizó solo la región extracelular. Para explorar el comportamiento del modelo bajo las condiciones fisiológicas del sistema (concentración salina 0.15 M, 1 atmósfera de presión y 37 °C de temperatura) se realizó una simulación de 100 ns con el receptor en estado apo, es decir, en ausencia de ligantes. Una vez concluido el tiempo de simulación de 100 ns del sistema apo, se eligió una estructura representativa para ser utilizada en el estudio subsecuente. Con el fin de identificar de mejor manera las posiciones de los residuos, así como a la subunidad a la que se refiera en la discusión, se adoptó una nomenclatura habitual para la descripción de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) colocando un (+) a la subunidad izquierda y un (-) a la subunidad derecha, además de letras de la A'-E' describiendo la posición de las cadenas del pentámero y el identificador de la subunidad (Figura 2.7).⁵²

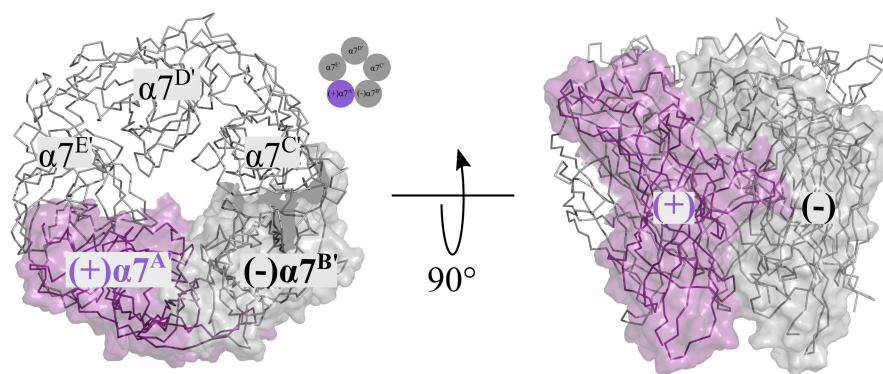


Figura 2.7 Estructura representativa del receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ al final de la simulación de 1.0 μ s. Nomenclatura habitual para la descripción de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) colocando un (+) a la subunidad izquierda y un (-) a la subunidad derecha, además de letras de la A'-E' describiendo la posición de las cadenas del pentámero y el identificador de la subunidad.

Con las estructuras del receptor $\alpha 7$ nAChR y del tetrámero del péptido β amiloide ($A\beta 1-42$) se forman sistemas donde coexisten las dos estructuras solvatadas en una caja de agua, incluidos iones de cloro y sodio a una concentración de 0.15 M, a una presión (1 atm) y temperatura (37 °C) constante. Se consideró posicionar la estructura del $A\beta 1-42$ a una distancia de al menos 17 Å con respecto al receptor (p. ej. Figura C.3). Ese procedimiento se replicó modificando la posición inicial del $A\beta 1-42$ relativa al $\alpha 7$ nAChR de forma aleatoria

(Figura C.4). Un total de diez diferentes sistemas fueron generados y sometidos a simulaciones atómicas de dinámica molecular por un tiempo de 100 ns. Para las simulaciones que mostraron una interacción entre el $\alpha 7$ nAChR y el A β t1-42, se extendió la simulación hasta alcanzar 1.0 μ s.

En la figura 2.8 se graficó la distancia entre los centros de masas del receptor $\alpha 7$ nAChR y el núcleo formado por las 6 hebras β del A β t1-42 para una de las diez simulaciones donde se observó una interacción durante 100 ns de simulación. En este caso, se observa que la distancia inicial es mayor a los 75 Å y recordando que la distancia aproximada entre el receptor y el A β t1-42 era de 17 Å se infiere que alrededor de los 60 ns el tetrámero empieza a interactuar con el receptor. De manera interesante, dicha interacción se mantiene a lo largo del tiempo de simulación (1.0 μ s) llegando a una distancia mínima de proximidad entre los centros de masas antes mencionados que ronda entre los 55 a 57 Å.

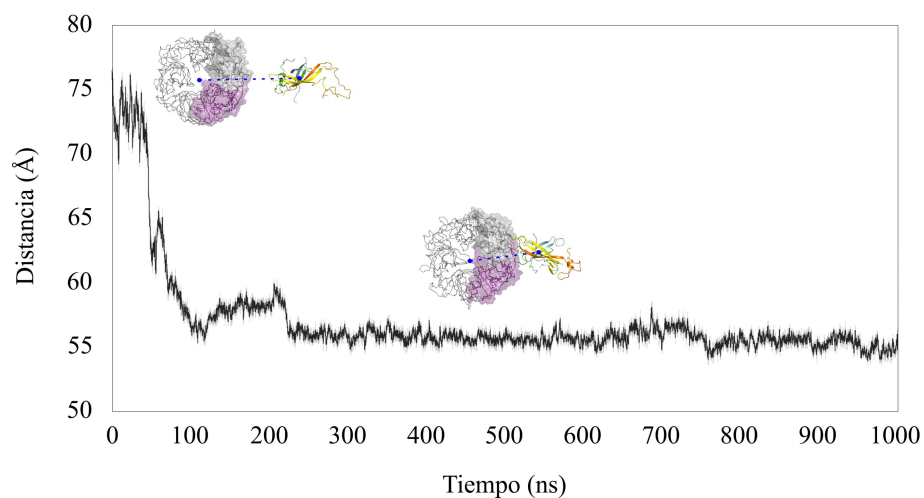


Figura 2.8 Evolución temporal de la distancia de los centros de masas del receptor $\alpha 7$ nAChR y el núcleo formado de 6 hebras β del A β t1-42.

Una vez que se corroboró que existe la formación del complejo $\alpha 7$ nAChR/A β t1-42 se analizaron los posibles cambios que existen en la estructura secundaria del núcleo del tetrámero enlazado al receptor (Figura 2.9).

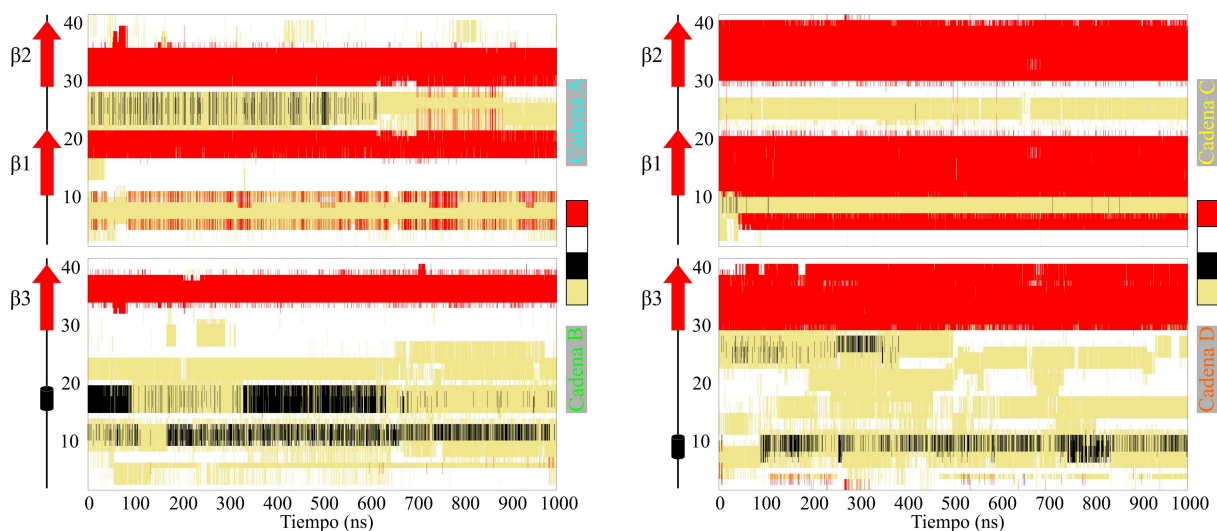


Figura 2.9 Evolución temporal del contenido de la estructura secundaria A β O tetramérico. La evolución temporal del contenido de los 42 residuos de las cuatro cadenas en el A β O tetramérico a lo largo de 1.0 μ s de simulación en presencia del receptor nicotínico de acetilcolina α 7, calculado con VMD usando el programa STRIDE.^{50, 51} El código de color para las diferentes estructuras secundarias son las siguientes: hebras β en rojo, hélice (α , 310, o π) en negro, configuración extendida o puente aislado en caqui, y aleatoria en blanco. Las hebras β son nombradas como en (Ciudad *et al.*, 2020).

Igual que en el caso donde el tetramero se encuentra disuelto en un medio acuoso sin la presencia del receptor, la estructura secundaria del tetramero se mantiene estable durante la simulación y el tamaño de las hebras β siguen una tendencia similar, donde la cadena A y B son un poco más cortas que C y D. Sin embargo, también existen diferencias entre los dos casos (Figuras 2.5 y 2.9), ya que cuando se forma el complejo, una de las hebras β , β 1, de la cadena C muestra una discontinuidad lo que se atribuye a la forma en la que debe rotar la estructura completa para mantener las interacciones que estabilizan a la conformación toroidal. Por otro lado, basado en las observaciones anteriores se exploraron las interacciones que forma el complejo α 7 nAChR/A β t1-42.

En la figura 2.10 se muestra la interfase que forma el receptor y el tetramero, donde se observa que los residuos involucrados forman parte de la cadena B y C del A β t1-42 y de la cadena A'(+) y B'(-) del α 7 nAChR. Asimismo, los residuos que forman las interacciones preponderantes tienen un carácter polar.

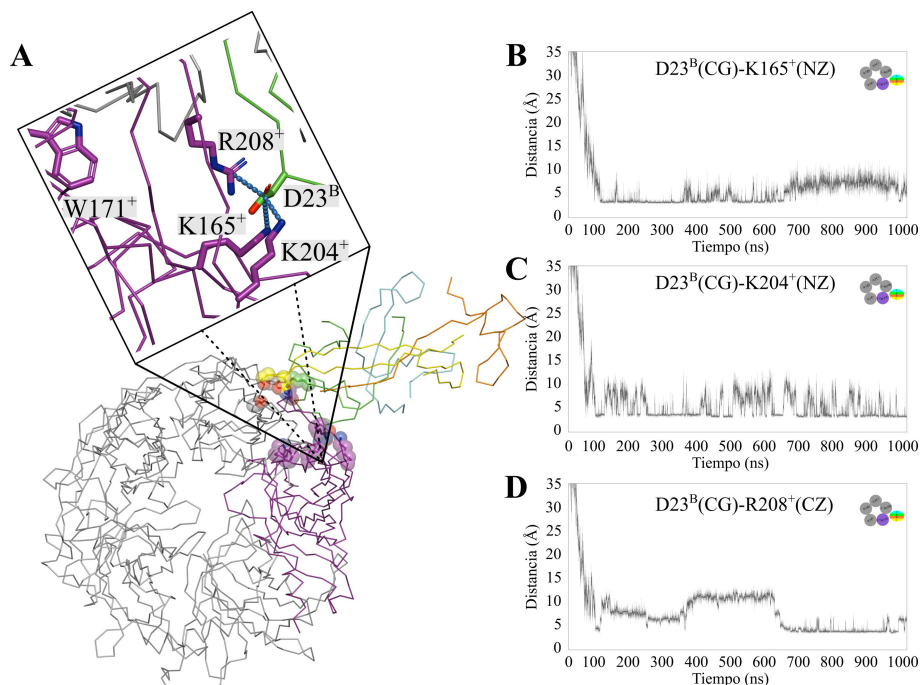


Figura 2.10 Pose representativa del complejo $\alpha 7$ nAChR/A β t1-42. A) Interacciones formadas en la interfase del complejo $\alpha 7$ nAChR/A β t1-42. Los residuos involucrados se representan en esferas mientras que las distancias exploradas en color azul cielo y líneas discontinuas, además de representar el W171⁺ como referencia del residuo conservado en el bolsillo de unión. Evolución temporal de la distancia formada por el residuo D23 de la cadena B del tetrámero y B) K165⁺ de la cadena A'(+) del receptor, donde se observa que la interacción inicia aproximadamente a los 60 ns y se mantiene a lo largo de la simulación. Por otro lado, C) y D) muestran la evolución temporal de la distancia formada por el residuo D23 de la cadena B del tetrámero y dos residuos de la cadena A'(+) del receptor donde se observa que dichas interacciones son complementarias a la del panel B).

En particular, se observa que el residuo cargado negativamente D23 de la cadena B del tetrámero inicia la interacción carga-carga con el receptor alrededor de los 60 ns, de esta manera anclando la estructura y propiciando nuevas interacciones con otros residuos de la cadena + del receptor. Dichas interacciones formadas por los residuos K204⁺ y R208⁺ complementan la interacción con K165⁺, así el residuo D23^B siempre se mantiene unido al receptor a través de interacciones de puente salino.

De la misma forma pasa con el residuo K28 de la cadena B del tetrámero. Dicha interacción ocurre subsecuentemente a la interacción inicial con el receptor mediada por el residuo D23^B. El residuo cargado positivamente K28^B muestra una interacción muy estable con los tres residuos que lo rodean (E211⁺, S188⁻ y D186⁻) como se muestra en las gráficas de la evolución temporal de las distancias de la figura 2.11.

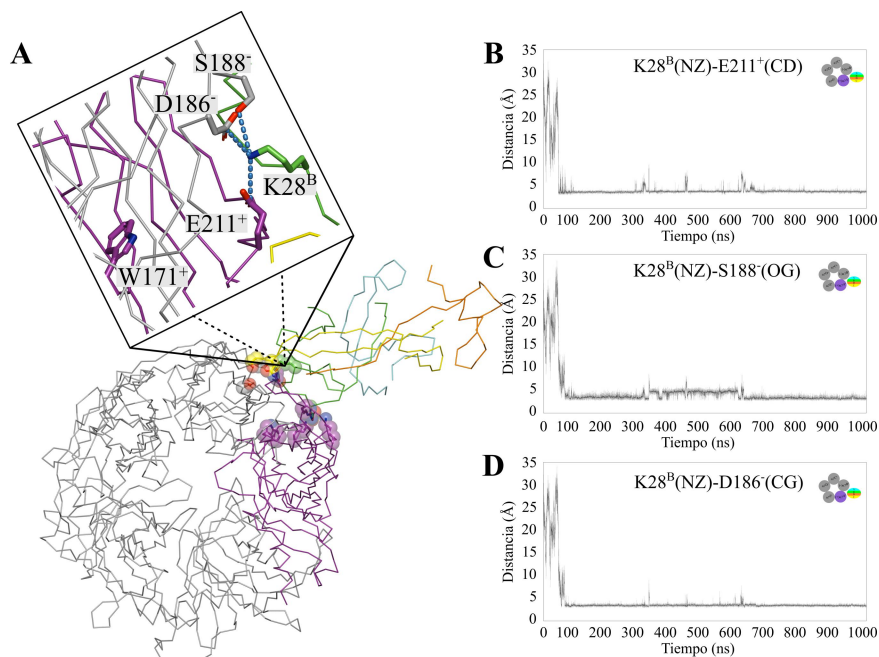


Figura 2.11 Pose representativa del complejo $\alpha 7$ nAChR/A β t1-42. A) Interacciones formadas en la interfase del complejo $\alpha 7$ nAChR/A β t1-42. Se representan los residuos involucrados en esferas y las distancias exploradas en color azul cielo y líneas discontinuas, además de representar el W171⁺ como referencia del residuo conservado en el bolsillo de unión. La evolución temporal de la distancia formada por el residuo K28 de la cadena B del tetrámero y B) E211⁺ de la cadena A'(+) del receptor, donde se observa que la interacción inicia aproximadamente a los 100 ns y se mantiene a lo largo de la simulación. Por otro lado, C) y D) muestran la evolución temporal de la distancia formada por el residuo D23 de la cadena B del tetrámero y dos residuos de la cadena B'(-) del receptor donde se observa que dichas interacciones son complementarias a la del panel B).

Por otro lado, una vez anclado el tetrámero por las interacciones carga-carga mencionadas, surgen nuevas interacciones, solo que ahora con residuos de la cadena C del tetrámero (Figura 2.12). Sin embargo, dichas interacciones son más dinámicas (menos estables) que las anteriormente mencionadas. Esto se debe a las características de las interacciones y el tipo de residuos involucrados. Donde la principal interacción sucede con el residuo N27 de la cadena C del tetrámero y el carbonilo del esqueleto del residuo E211 de la cadena A'(+).

El residuo S81 de la cadena B'(-) del receptor forma interacciones con los residuos N27 y S26 de la cadena C del tetrámero, cuya interacción es de tipo puente de hidrógeno, por lo que esa distancia es relativamente más larga y fluctúa más que observadas con los residuos de la cadena B del tetrámero.

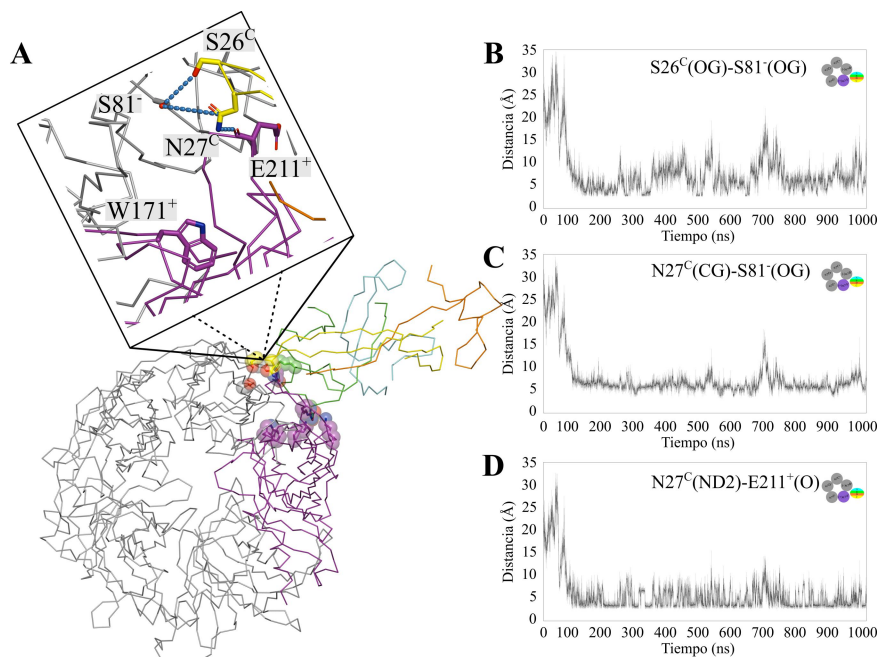


Figura 2.12 Pose representativa del complejo $\alpha 7$ nAChR/A β t1-42. A) Interacciones formadas en la interfase del complejo $\alpha 7$ nAChR/A β t1-42. Se representan los residuos involucrados en esferas y las distancias exploradas en color azul cielo y líneas discontinuas, además de representar el W171⁺ como referencia del residuo conservado en el bolsillo de unión. La evolución temporal de las distancias formadas por los residuos S26 y N27 de la cadena C del tetrámero y B) S81⁻ de la cadena B'(-) del receptor, donde se observa que la interacción inicia aproximadamente a los 100 ns y la tendencia a lo largo de la simulación es dinámica, sin embargo, se puede observar la formación de interacciones intermitentes. Por otro lado, D) muestran la evolución temporal de la distancia formada por el residuo N27 de la cadena C del tetrámero y un residuo de la cadena A'(+) , donde se observa que dicha interacción es complementaria a la del panel A) y B), además en el panel D) se observa una mayor preponderancia en la interacción.

De forma interesante, la formación del complejo $\alpha 7$ nAChR/A β t1-42 sucede en la proximidad del bolsillo de unión al ligante (bolsillo ortostérico), lo que genera cambios estructurales en la cavidad del mismo y que se indica en las figuras 2.10-2.12 por la presencia del residuo más conservado (W171), dicha observación ha sido reportada de forma experimental.^{28-30, 53, 54} Más aún, nuestros resultados indican que las principales interacciones formadas por el A β t1-42 suceden con residuos situados en el segmento 23-28 del péptido. Dicha información es relevante ya que mediante estudios inmunohistoquímicos de cerebros humanos con enfermedad de Alzheimer no solamente muestran la estrecha relación entre el receptor $\alpha 7$ nAChR y el A β t1-42 sino que además indican la relevancia del segmento 12-28 como el principal motivo del A β 1-42 que interactúa con el receptor $\alpha 7$ nAChR y que ejerce la

inhibición de la función del receptor. Dicha observación concuerda con nuestros resultados computacionales y el mecanismo de inhibición del A β 1-42 en el receptor α 7 nAChR, sugerido experimentalmente, muestran la complementariedad entre ambas técnicas, computacional y experimental.³⁰

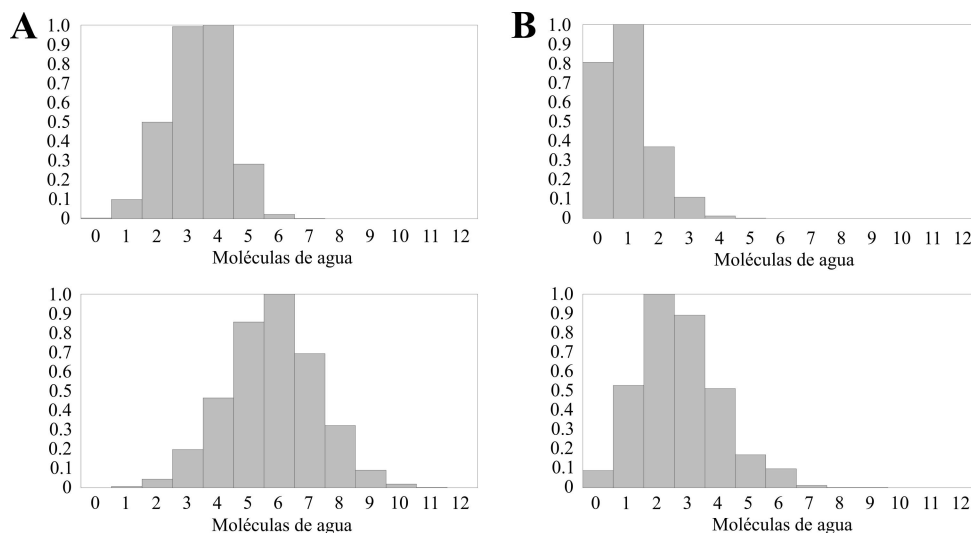


Figura 2.13 Distribución de la cantidad de moléculas de agua que penetran la cavidad del bolsillo de unión. La cantidad de moléculas de agua se calcula respecto a los residuos W171⁺ y W77⁻ a 4 y 5 Å. A) Muestra la cantidad de moléculas de agua en la cavidad del bolsillo de unión cuando el A β 1-42 no interactúa con el receptor α 7 nAChR, el panel superior muestra las moléculas de agua a 4 Å de los residuos W171⁺ y W77⁻ y el panel inferior muestra las moléculas de agua a 5 Å de los residuos W171⁺ y W77⁻. B) Muestra la cantidad de moléculas de agua en la cavidad del bolsillo de unión cuando el A β 1-42 interactúa con el receptor α 7 nAChR, el panel superior muestra las moléculas de agua a 4 Å de los residuos W171⁺ y W77⁻ y el panel inferior muestra las moléculas de agua a 5 Å de los residuos W171⁺ y W77⁻.

Para observar los cambios que se generan en dicho bolsillo de unión se calculó el volumen de la cavidad utilizando como estimación la cantidad de moléculas de agua que ocupan la cavidad a lo largo de la simulación. Para contrastar los resultados se exploraron dos casos, el primero, se registra la frecuencia de las moléculas de agua que penetran la cavidad. La cantidad de agua se calcula a 4 y 5 Å de distancia con respecto a dos residuos que forman parte del bolsillo de unión al ligante (W171⁺ y W77⁻) a lo largo del tiempo de la simulación cuando el tetrámero está interactuando con el receptor y el segundo, cuando no existe la presencia del A β 1-42 con las subunidades α 7 del receptor.

En la figura 2.13 se muestra la distribución de la frecuencia relativa de la cantidad de agua durante el tiempo de simulación para los dos casos antes mencionados. En el caso en donde no existe interacción del A β 1-42 con el receptor (Figura 2.13 A) la cantidad de moléculas de

agua en la cavidad es mayor que en el caso donde sí se observa interacción con la subunidad $\alpha 7$ del receptor. Estos resultados indican que la cavidad del bolsillo de unión se reduce en tamaño cuando el tetrámero interactúa con el receptor (colapso parcial de cavidad), es decir, se produce una reducción del volumen que ocuparían los ligantes agonistas del receptor (Figura 2.13.B).

Con lo antes mencionado, se puede inferir que el acceso al bolsillo de unión al ligante del receptor se ve impedido debido a la interacción del receptor con el A β 1-42, lo que hace que el ligante nativo del receptor $\alpha 7$ nAChR tenga dificultades por ingresar al sitio de unión al ligante. Más aún, aunque el ligante logre ingresar, la deformación de la estructura de la cavidad ocasionada por la interacción directa con el A β 1-42 evita que se lleven a cabo los rearrreglos estructurales en el bolsillo de unión debidos a la presencia del agonista con la concomitante repercusión en los cambios conformacionales necesarios para la activación del receptor. Es decir, la interacción del A β 1-42 modifica la función normal del receptor $\alpha 7$ nAChR vía la perturbación de la estructura del sitio de unión al ligante.

Por otro lado, recordemos que al inicio del trabajo no existía una estructura tridimensional del receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$, por lo que se utilizó la técnica de modelado por homología para crear un modelo inicial necesario para realizar los estudios descritos anteriormente. En consecuencia, se evaluó la estabilidad estructural del modelo mediante un análisis de su evolución a lo largo de la trayectoria de las simulaciones de dinámica molecular. En particular, se analizó el RMSD del esqueleto de la región extracelular del modelo a lo largo de la simulación, donde observamos que, en general, con la formación del complejo $\alpha 7$ nAChR/A β 1-42 el receptor explora cambios en su estructura que se mantienen a lo largo de la simulación, además se observa que la tendencia de la figura 2.14, inicia aproximadamente en 60 ns cuando se crean las primeras interacciones con el A β 1-42. Además, el modelo se mantiene estable y la región extracelular no difiere significativamente de las recientes estructuras resueltas y almacenadas en la base de datos de proteínas (PDB).^{54, 55}

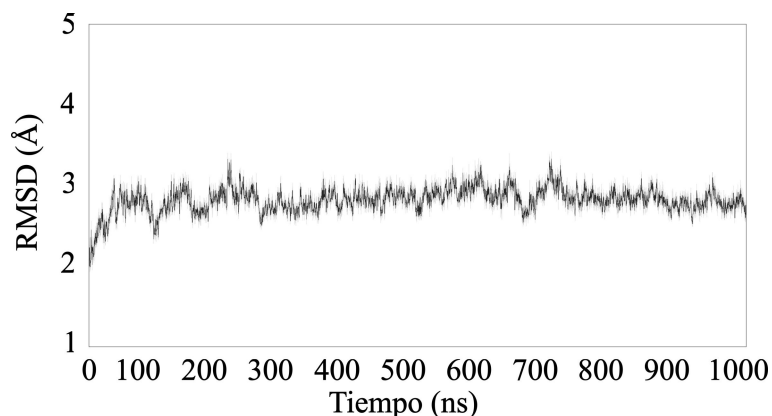


Figura 2.14 Evolución temporal del RMSD calculado mediante la diferencia de las posiciones del esqueleto del modelo del receptor $\alpha 7$ nAChR.

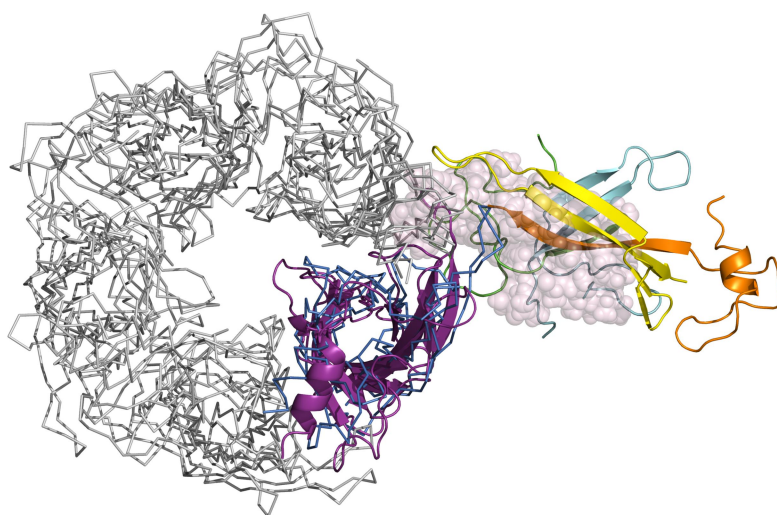


Figura 2.15 Aliniamiento estructural de los complejos formados por $\alpha 7$ nAChR (color gris y azul en representación de listón) con α -bungarotoxina (representada en esferas en color rosado claro)⁵² y $\alpha 7$ nAChR (modelo, color gris y violeta representación de listón y dibujo) con el A β 1-42 (representado en dibujo y color cian cadena A, color verde cadena B, color amarillo cadena C y color naranja cadena D).

De forma interesante, la posición observada del A β 1-42 en nuestras simulaciones es semejante a la estructura del receptor $\alpha 7$ nAChR en complejo con la α -bungarotoxina contenida en la base de datos de proteínas (resuelta por microscopía electrónica).^{53, 54}

Por otra parte, la posición que explora el A β 1-42 en la cercanía del bolsillo de unión al ligante, comprimiendo el bucle C (región cercana al bolsillo de unión), es observada en estudios experimentales que sugieren un posible bloqueo de la función basal del receptor $\alpha 7$ nAChR (Figura 2.15).²⁸⁻³²

Caso II, el receptor adrenérgico α_{2A} .

Por otro lado, se realizaron estudios del A β t1-42 con otro receptor transmembranal sináptico, el receptor adrenérgico α_{2A} (α_{2A} AR muestra afinidad por los oligómeros del péptido β amiloide)^{16, 19-22}, el cual pertenece a la familia A de los GPCRs (receptores acoplados a proteína G, v. apéndice A).

Para explorar el comportamiento del receptor α_{2A} AR bajo las condiciones fisiológicas del sistema (concentración salina 0.15 M, 1 atmósfera de presión y 37 °C de temperatura) se realizó una simulación de 1.0 μ s con el receptor en estado apo.

Una vez concluido el tiempo de simulación, se eligió una estructura representativa de la parte final de la trayectoria y de igual modo que con el receptor nicotínico de acetilcolina α_7 , el A β t1-42 fue colocado a una distancia de 17 Å aproximadamente del α_{2A} AR (Figura C.5). Con la idea de maximizar las posibilidades de observar un evento de interacción entre ambas entidades biomoleculares se replicó diez veces el estado inicial variando la posición del A β t1-42 (Figura C.6).

Para cada caso se realizaron simulaciones de 100 ns. En un sistema en particular, se observó una interacción relativamente estable por lo que se decidió extender ese sistema hasta los 2000 ns (2.0 μ s). Los resultados de dicha trayectoria sugieren que el A β t1-42 tiene un comportamiento muy dinámico, es decir, aun cuando forma interacciones con el receptor y la interacción A β t1-42- α_{2A} AR se mantiene a lo largo de toda la simulación, estas son reemplazadas por otras nuevas por lo que los contactos entre ambos no permanecen estables por mucho tiempo (Figura 2.16). En otras palabras, las interacciones que se establecen son generalmente reemplazadas por otras interacciones que involucran a diferentes residuos lo que hace que la posición del tetrámero en relación con el receptor se modifique constantemente en comparación con el caso del α_7 nAChR.

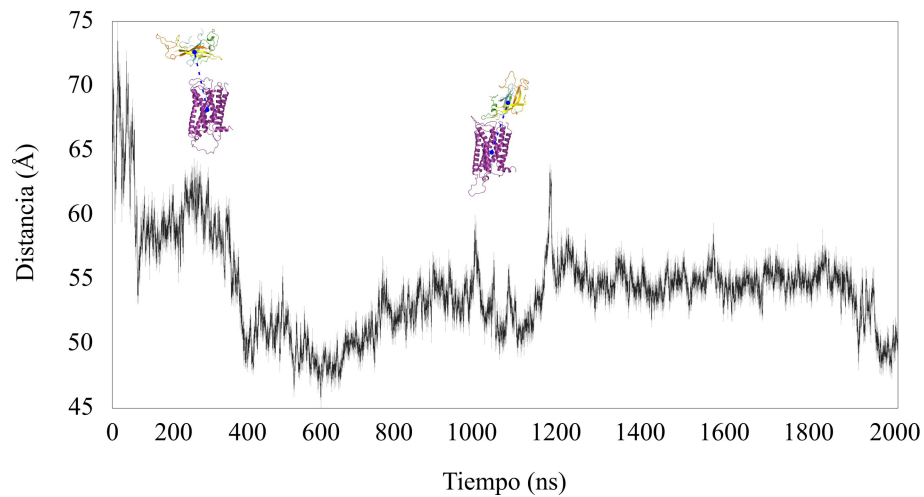


Figura 2.16 Evolución temporal de la distancia de los centros de masas del receptor $\alpha_{2A}AR$ y el núcleo formado de 6 hebras β del $A\beta_{1-42}$.

El lugar en donde pueden interactuar el receptor adrenérgico y el tetrámero es una región limitada (región extracelular) ya que la membrana lipídica que rodea al $\alpha_{2A}AR$ limita la interacción del $A\beta_{1-42}$ con otros segmentos del receptor dada la solubilidad acuosa que presenta el tetrámero. Más aún, la presencia de bucles extracelulares disminuye, aunque no imposibilita, la capacidad del tetrámero para penetrar significativamente e interactuar con residuos que forman parte del sitio de unión a las catecolaminas, adrenalina y noradrenalina, sus ligantes endógenos.

Sin embargo, las simulaciones son capaces de capturar información de la formación del complejo $\alpha_{2A}AR/A\beta_{1-42}$. Una vez que se corroboró que existe la formación del complejo $\alpha_{2A}AR/A\beta_{1-42}$ se exploraron las variaciones que existen en la estructura secundaria del núcleo del tetrámero enlazado al receptor $\alpha_{2A}AR$ (Figura 2.17).

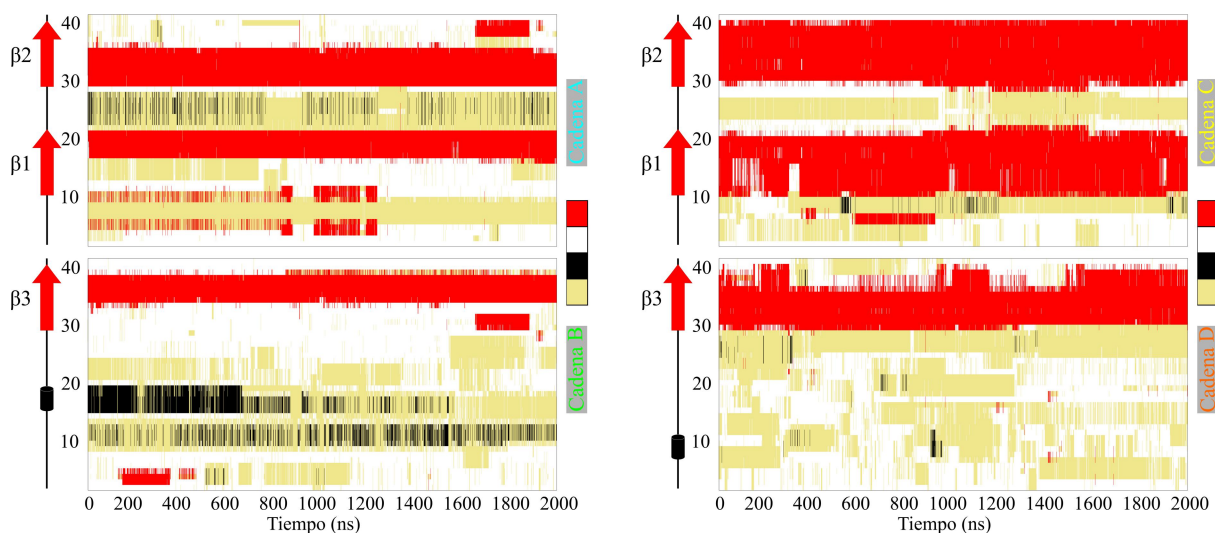


Figura 2.17 Evolución temporal del contenido de la estructura secundaria A β O tetramérico. La evolución temporal del contenido de los 42 residuos de las cuatro cadenas en el A β O tetramérico a lo largo de 2.0 μ s de simulación en presencia del receptor adrenérgico α_{2A} , calculado con VMD usando el programa STRIDE.^{50, 51} El código de color para las diferentes estructuras secundarias son las siguientes: hebras β en rojo, hélice (α , 310, o π) en negro, configuración extendida o puente aislado en caqui, y aleatoria en blanco. Las hebras β son nombradas como en (Ciudad *et al.*, 2020).

De forma general, la tendencia en las 6 hebras β del núcleo del tetramero se mantiene, asimismo la longitud en las hebras β son similares al comportamiento observado anteriormente con el receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$.

Basado en las observaciones de la formación del complejo $\alpha_{2A}AR/A\beta t1-42$, se exploraron las interacciones existentes en la interfase del receptor y el tetramero. En particular, se observa que el tetramero inicia la interacción con residuos localizados en la cadena B y residuos del bucle extracelular 2 (ECL2) del receptor, específicamente con los residuos E3^{cadenaB} y K189^{ECL2}, respectivamente, sin embargo, dicha interacción se ve rápidamente interrumpida. Cabe recalcar que esta interacción no ancla la posición del tetramero, pero sí hace que las dos estructuras empiecen a “sentir” las interacciones y contactos que ocurren entre ellas.

Por otra parte, debido al comportamiento dinámico tanto del tetramero como del ECL2, las interacciones de residuos en la cadena B se ven interrumpidas, las interacciones con residuos de la cadena C del tetramero continúan siendo relativamente estables. De esta manera la cadena B y C del tetramero continuaron interactuando por varios lapsos de tiempo con diversos residuos del receptor, particularmente con residuos situados en los bucles extracelulares ECL1 (Y113), ECL2 (K189, K190, G193, G194, P196, Q197 y A199) y ECL3 (S417 y R420) (Figura 2.18).

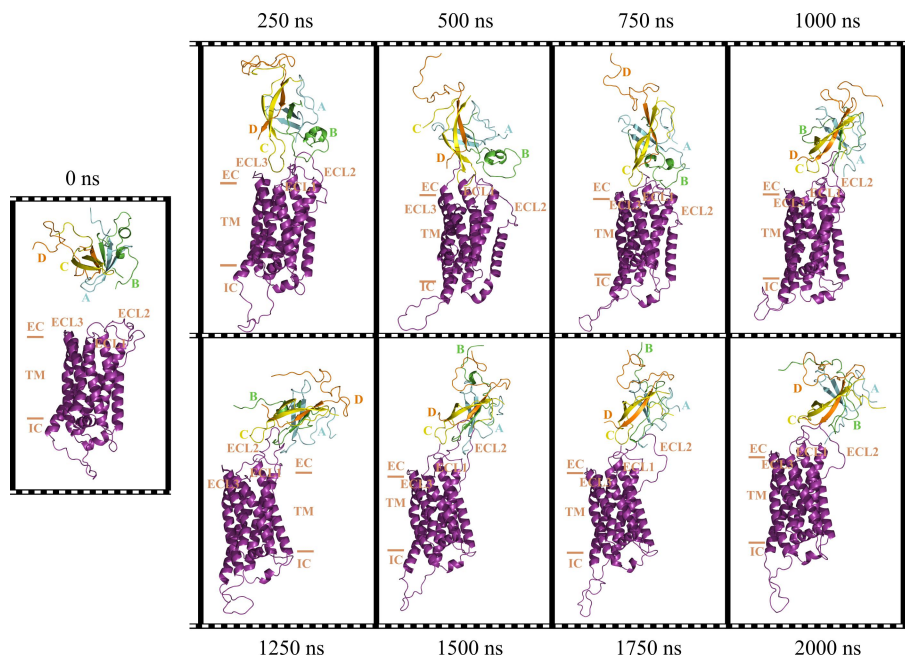


Figura 2.18 Poses representativas a diferentes tiempos de simulación. Se observa la formación del complejo $\alpha_2AAR/A\beta t1-42$, donde se pueden apreciar las distintas poses que el tetrámero adopta. El receptor está representado en dibujo de color violeta y el $A\beta t1-42$ se representa en dibujo en color cian la cadena A, en verde la cadena B, en amarillo la cadena C y en anaranjado la cadena D.

Adicionalmente, exploramos los cambios conformacionales asociados a la actividad del receptor α_2AAR , dicho de otra manera, los receptores acoplados a proteína G poseen conformaciones particulares en motivos estructurales distintivos asociados a un estado activo o inactivo del receptor. Por lo cual, se estudió el comportamiento de dos puentes salinos observados en la región extracelular, EC, y un puente iónico en la región intracelular, IC (el cual está formado por los residuos 3.50 y 6.30, la ruptura de este puente iónico se asocia directamente a la activación del receptor).

Primero exploramos el comportamiento del receptor apo (Figura 2.19) para contrastar los resultados cuando se forma el complejo $\alpha_2AAR/A\beta t1-42$. Observamos que los puentes salinos de la región extracelular se mantienen a lo largo de la simulación, aunque por algunos lapsos de tiempo cortos se ven temporalmente interrumpidos para luego volver a formarse. Lo que indica que la hélice transmembranal 7 (TM7) en su segmento extracelular mantiene su interacción a lo largo de la simulación con la TM2 haciendo que TM7 no se desplace. Por otra parte, la interacción entre los residuos $E204^{ECL2}$ y $R420^{7.32}$ estabiliza conformaciones que posicionan esta región de tal forma que parecen cubrir parcialmente la entrada al bolsillo de

unión, lo que coadyuva a mantener la posición de la hélice TM7 restringida; dicho desplazamiento de la TM7 juega una función importante en la activación del receptor.⁵⁶ De igual modo, se exploró el puente iónico en la región intracelular (distintivo en los receptores GPCRs).⁵⁶ Se observó que el puente iónico (formado por los residuos R146^{3.50} y E384^{6.30}) se mantiene cerrado a lo largo de la simulación, lo que indica un estado inactivo del receptor, ya que es fundamental que dicho puente se rompa para que el empaquetamiento entre la TM3 y TM6 se desplacen hacia afuera permitiendo así conformaciones activas del receptor, que propicien la interacción con la proteína G (estado activo).

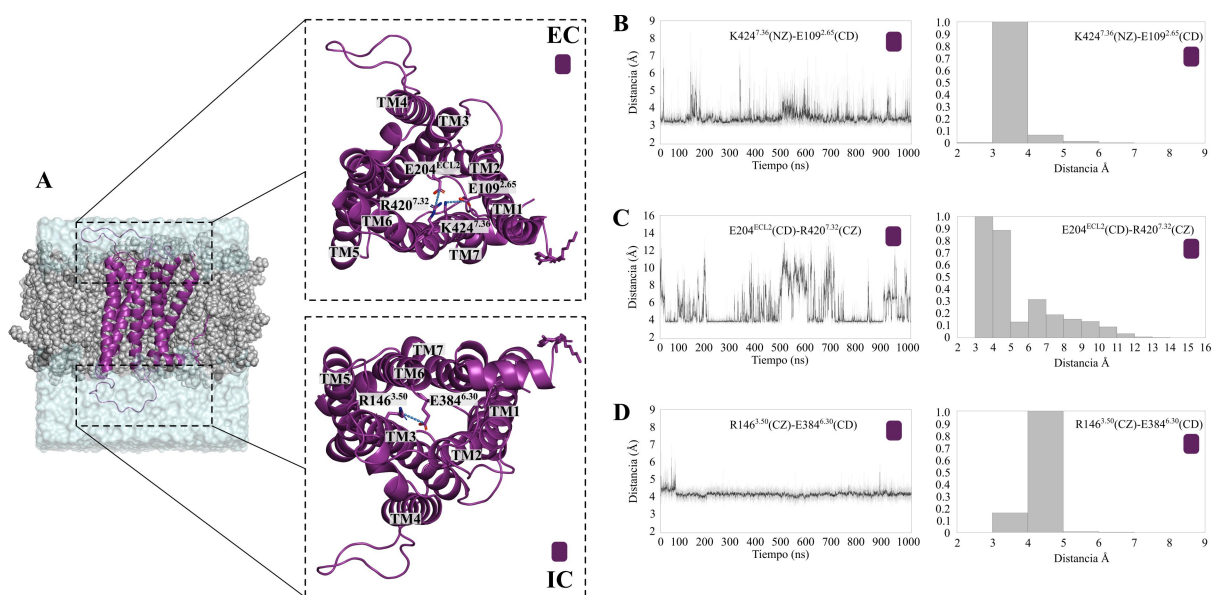


Figura 2.19 Pose representativa de la simulación del receptor apo. A) vista lateral del receptor α_2AAR con proyecciones en la región extracelular (EC) e intracelular (IC), donde se muestran las distancias entre aminoácidos que forman un doble puente salino (EC) y un puente iónico (IC), las distancias son representadas en líneas discontinuas en color azul cielo. B) La evolución temporal de la distancia formada por el residuo K424^{7.36} y el residuo E109^{2.65} y la distribución de las distancias. C) La evolución temporal de la distancia formada por el residuo E204^{ECL2} y el residuo R420^{7.32} y la distribución de las distancias. D) La evolución temporal de la distancia formada por el residuo R146^{3.50} y el residuo E384^{6.30} y la distribución de las distancias, dicha interacción está asociada a la actividad del receptor.

Igualmente se realizó el estudio de las mismas interacciones en la EC e IC del receptor cuando forma el complejo con el A β 1-42 (Figura 2.20).

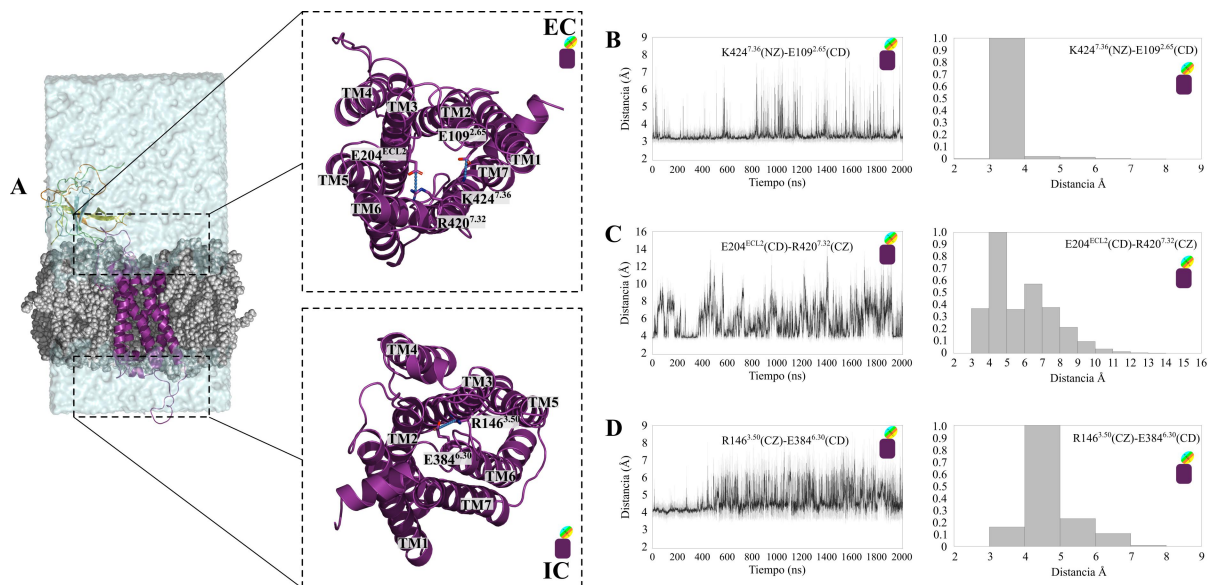


Figura 2.20 Pose representativa de la simulación del complejo $\alpha_2AAR/A\beta 1-42$. A) vista lateral del receptor α_2AAR con proyecciones en la región extracelular (EC) e intracelular (IC), donde se muestran las distancias entre aminoácidos que forman un doble puente salino (EC) y un puente iónico (IC), las distancias son representadas en líneas discontinuas en color azul cielo. B) La evolución temporal de la distancia formada por el residuo K424^{7.36} y el residuo E109^{2.65} y la distribución de las distancias. C) La evolución temporal de la distancia formada por el residuo E204^{ECL2} y el residuo R420^{7.32} y la distribución de las distancias. D) La evolución temporal de la distancia formada por el residuo R146^{3.50} y el residuo E384^{6.30} y la distribución de las distancias, dicha interacción está asociada a la actividad del receptor.

En la figura 2.20 se puede observar que las distancias representadas en el panel C y D mantienen valores mayores a los observados cuando el receptor está en ausencia de ligantes. La presencia del tetrámero induce cambios conformacionales en el receptor, específicamente provocando la ruptura de uno de los puentes salinos localizados en la región extracelular. Esta ruptura se debe a las interacciones observadas entre el tetrámero y las regiones ECL2 y ECL3, cercanas a los residuos responsables de la formación del puente salino. Tal como se ilustra en el panel C de la figura 2.20, los valores de distancia exhiben una distribución más amplia. En otras palabras, durante la simulación, los residuos E204 en ECL2 y R420 en la posición 7.32 exploran diversas conformaciones, resultando en la ruptura intermitente del puente salino en lapsos cortos de tiempo.

De igual modo, el puente iónico de la región intracelular se rompe, como se ilustra en el panel D de la figura 2.20, las observaciones anteriores sugieren que el receptor explora conformaciones asociadas a estados activos de los GPCRs.

De manera interesante, reportes experimentales han mostrado que el bucle extracelular 3 (ECL3) juega un papel importante en la interacción del receptor α_{2A} AR con oligómeros del péptido β amiloide. Aún más, el mismo reporte indica que los oligómeros del péptido β amiloide activan al receptor α_{2A} AR en ausencia de ligantes agonistas, que ocasionaría una desregulación de la vía de señalización asociada a este receptor.²¹ Dicha observación experimental sustenta la información capturada mediante simulaciones de dinámica molecular utilizada en el presente.

2.4 Conclusión

Conocer las interacciones a nivel molecular de los oligómeros del péptido β amiloide con receptores sinápticos, establecerán las bases para eventualmente prevenir los efectos neurotóxicos de los A β O.

Las simulaciones atomísticas de dinámica molecular nos proporcionaron información relevante del tetrámero del péptido β amiloide, donde se observó que la estructura terciaria sufre cambios significativos relativos a la estructura inicial, pero se estabiliza en condiciones fisiológicas. En contraste, la caracterización de estas entidades utilizando métodos experimentales sigue siendo sumamente complicada.

Por otro lado, pudimos capturar información significativa del modo de interacción del A β t1-42 y el receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$, que sugiere una posible competencia por el bolsillo de unión al ligante impidiendo el acceso a ligantes nativos del $\alpha 7$ nAChR. Además, pudimos comparar la información estructural del $\alpha 7$ nAChR recientemente descubierta con el modelo utilizado en el presente trabajo. Observamos que el A β t1-42 explora una posición semejante a la reportada en un complejo con α -bungarotoxina, además que el tetrámero interacciona con residuos situados en el segmento 12-28 que resalta con reportes experimentales asociados a la toxicidad del A β t1-42.

De manera similar, la información que se obtuvo en la formación del complejo del receptor adrenérgico α_{2A} con el A β t1-42 sugiere que el tetrámero ocasiona que el receptor explore conformaciones activas, lo que puede desencadenar alteraciones asociadas a la enfermedad de Alzheimer debidas a una desregulación de la vía de señalización del receptor adrenérgico α_{2A} .

Los resultados obtenidos pueden ser fundamentales para avanzar en la comprensión de la enfermedad de Alzheimer. A pesar de que aún queda un largo camino por recorrer, se espera que estos hallazgos contribuyan significativamente al desarrollo de posibles terapias.

Capítulo 3

3. La enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) al igual que otras enfermedades neurodegenerativas se caracteriza por el deterioro de las células nerviosas y por la progresión de sus síntomas con el paso del tiempo.¹⁻³

Dicha enfermedad es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común y sus síntomas causan tanto alteraciones en las capacidades motoras como alteraciones mentales que se reflejan en trastornos de movimiento, de sueño, dolor y otros padecimientos; dichos padecimientos son causados por una desregulación en las vías de dopamina.^{5, 8}

En México no existen cifras exactas de la cantidad de personas que padecen la enfermedad de Parkinson, sin embargo, se estima que a nivel mundial más de 10 millones de personas la padecen.⁵

Por otro lado, la enfermedad de Parkinson actualmente no tiene cura, esto se debe a que la causa de la EP sigue siendo desconocida, no obstante, a diferencia de otras enfermedades neurodegenerativas, la EP tiene tratamientos que ayudan a reducir algunos síntomas.

El tratamiento habitual se basa en la administración del fármaco levodopa (L-DOPA), un compuesto que es precursor del neurotransmisor dopamina, sin embargo, el tratamiento a largo plazo tiene efectos secundarios, así como una disminución de su eficiencia.^{57, 58} Una terapia alternativa reciente consiste en la implantación de un dispositivo de estimulación profunda que se ha probado en el núcleo subtalámico (NST) y el globo pálido interno (GPi) con excelentes resultados. No obstante, los beneficios duran un corto periodo de tiempo (aprox. 5 años) y no todas las personas que padecen EP son candidatas para recibir la terapia.⁵

Por lo cual, se necesita de tratamientos más eficaces que reduzcan los riesgos y los efectos secundarios. Una propuesta prometedora es el uso de neuromoduladores del sistema

endocannabinoide (SEC), ya que participan en la neuroregulación fisiológica de los ganglios, ayudando a controlar el movimiento.⁵⁹⁻⁶³

Considerando la diversidad de funciones celulares asociadas al SEC, las biomoléculas que forman este sistema se convierten en dianas farmacológicas atractivas. El sistema endocannabinoide comprende varias entidades celulares, incluidos los endocannabinoides (compuestos endógenos que modulan el sistema de señalización) así como varias biomacromoléculas, es decir, receptores y enzimas. Además de las enzimas que sintetizan y descomponen a los endocannabinoides, varios receptores constituyen el sistema endocannabinoide, incluidos dos receptores acoplados a proteínas G, los receptores cannabinoides de tipo 1 (CB1) y de tipo 2 (CB2).⁵⁹⁻⁶³ Además de CB1 y CB2, se ha propuesto que otros receptores participan como mediadores de los efectos de los ligantes cannabinoides, incluido el receptor acoplado a proteína G 55 (GPR55).⁶⁴⁻⁶⁷ Entre los ligantes capaces de modular a los receptores cannabinoides, los presentes en la planta *Cannabis sativa* interesan no solo por su papel como agentes terapéuticos y por su creciente uso recreativo, sino que su sobreuso puede plantear un problema de salud pública.^{68, 69}

3.1 El cannabidiol (CBD) en la enfermedad de Parkinson

El cannabidiol (CBD) es el principal fitocannabinoide no psicoactivo presente en la planta *Cannabis sativa*. En particular, CBD ha mostrado tener diversos efectos farmacológicos benéficos en el tratamiento de varios trastornos neurológicos, como la epilepsia, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer.⁷⁰⁻⁷⁵

El CBD modula diferentes receptores del sistema endocannabinoide, algunos de los cuales pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Aunque el CBD puede antagonizar algunos GPCR del sistema endocannabinoide, también parece activar otros.⁷⁶

Sin embargo, aún se desconocen los detalles de esta doble característica funcional contrastada por parte del CBD, es decir, que dicho compuesto presenta propiedades de ligante antagonista (posiblemente) agonista en receptores relacionados.⁷⁷⁻⁸²

Algunas investigaciones han tenido resultados prometedores en el uso de CBD como tratamiento de los síntomas de la enfermedad de Parkinson,^{72, 83-87} por ejemplo, en 2008 Zuardi,

A. *et al.* investigaron los efectos del CBD en un grupo de pacientes con la enfermedad de Parkinson y se observó que existía una mejora significativa en la calidad de vida y en la reducción de los síntomas de los pacientes que consumieron CBD.⁸³ En el 2014 Chagas, M.H. *et al.* y en el 2020 dos Santos, R.G. *et al.* realizaron estudios en ensayos clínicos y de metaanálisis respectivamente, donde concluyeron que el uso de CBD tiene efectos positivos en los síntomas motores y en la calidad de sueño asociados a la EP.^{84, 85}

Por otra parte, en el 2022 Patricio F. *et al.* realizaron estudios en modelos animales, particularmente para estudiar los efectos que tiene el compuesto CBD sobre el receptor GPR55, observando que la administración de cannabinoides disminuye la asimetría motora y mejora la motricidad fina en ratas hemiparkinsonianas.⁸⁸

Motivados por el creciente estudio del fitocannabinoide CBD, en este trabajo se presentan detalles del análisis computacional de las consecuencias de la actividad diferencial del cannabidiol con dos receptores acoplados a proteínas G activados por compuestos endocannabinoides.⁴⁶

3.2 Métodos

En esta sección se tratan los detalles de los complejos CB1/CBD, CB1/AM251, GPR55/CBD y GPR55/ML186.

3.2.1 Estructuras de CB1 y GPR55 para *Rattus norvegicus*

No solo se eligió utilizar los modelos de las estructuras de los receptores de *Rattus norvegicus* para correlacionar de mejor forma nuestros hallazgos con los resultados experimentales de modelos animales sino también por la alta similitud que tienen las secuencias con *Homo sapiens*, la cual es de aproximadamente del 97% para CB1 y de alrededor del 74% de identidad para el GPR55 (Figura D.3).

Como en este caso no existe ninguna información estructural experimental disponible de los receptores de interés para la especie *Rattus norvegicus* (RN) se tuvo que recurrir a la técnica de modelado por homología para tener una estructura terciaria tanto de CB1 como de GPR55.³⁸

En primer lugar, se realizó el modelo del CB1, donde se emplearon diferentes plantillas para cada estado funcional del receptor. En el caso del CB1 que forma el complejo con CBD (tentativo agonista) se usó la información contenida en el PDB con el código 5XRA (un receptor CB1 humano unido a un ligante agonista). Por otro lado, el CB1 que forma el complejo con AM251 (antagonista) se utilizaron dos plantillas del receptor CB1 humano unido a un antagonista (códigos de PDB: 5U09 y 5TGZ).

En ambos casos se obtuvieron 100 modelos de CB1 de R. N., las estructuras fueron diseñadas a través de modelado por homología con el protocolo de Modeller 9.23.^{38, 39}

Se utilizaron las secuencias del receptor CB1 de humano y de rata que se obtuvieron de UNIPROT con los códigos P21554 y P20272, respectivamente. Basados en consideraciones energéticas de la función de puntuación de Modeller, se seleccionó una estructura del CB1 representativa en cada caso para posteriores análisis.⁴⁰

Por otra parte, para realizar el modelo de GPR55 de rata se hizo una búsqueda en el servidor de Swiss-model para identificar posibles plantillas, debido a que experimentalmente no se ha determinado información estructural del GPR55 de ninguna especie.⁸⁹

La plantilla que se seleccionó fue del receptor del ácido lisofosfatídico 6 (LPA6) el cual tiene una identidad aproximadamente del 30% con el GPR55, la información estructural se encuentra en el PDB 5XSZ. Las secuencias que se utilizaron para la plantilla y el GPR55 están contenidas en la base de datos de UNIPROT con los códigos Q08BG4 y F1MAK4, respectivamente (Figura D.4).⁴⁰ El protocolo utilizado para generar los modelos tridimensionales del GPR55 de rata fue basado en Modeller 9.23, donde se generaron 100 modelos de GPR55 y se seleccionó una estructura representativa basada en la función de puntuación del programa.^{38, 39}

3.2.2 Formación del complejo receptor/ligante

En esta parte del trabajo se explica cómo se formaron los complejos del CB1 y GPR55 con sus ligantes respectivos (Figura D.5).

Para predecir una posible pose del ligante CBD con la estructura del CB1, se realizaron estudios de acoplamiento molecular utilizando el protocolo de Autodock Vina.⁹⁰ Adicionalmente de las consideraciones energéticas de la función de puntuación del programa,

se usó como guía la estructura del complejo AM11542/CB1 (PDB: 5XRA). La estructura del complejo AM11542/CB1 se seleccionó por la similitud estructural del ligante AM11547 con CBD. Finalmente, se seleccionó una pose del complejo CBD/CB1.

Por otra parte, de forma similar a lo mencionado anteriormente se seleccionó la mejor pose para la formación del complejo AM251/CB1 basada en el protocolo de Autodock Vina y la comparación con la estructura del complejo AM6538/CB1 (PDB: 5TGZ).⁹⁰

Para el receptor GPR55 se realizaron cálculos de acoplamiento molecular utilizando el protocolo de Autodock Vina, con el fin de explorar las mejores poses, tanto para el CBD como para el ML186. Finalmente se seleccionó una pose para los complejos CBD/CB1 y ML186/CB1.

3.2.3 Simulaciones atomísticas de dinámica molecular

Se realizaron simulaciones atomísticas de dinámica molecular donde todos los átomos están presentes para cada complejo. La preparación general es similar a la descrita en el Apéndice B y con más detalle en la sección B.1. En resumen, utilizando la información estructural de los cálculos de acoplamiento molecular como la estructura inicial del complejo (Figuras C.7 y C.8), se incluyen los átomos de hidrógeno que representan los estados de protonación más probables en cada aminoácido a un pH neutro. Los complejos proteicos fueron embebidos en una membrana de POPC e hidratados con moléculas de agua, donde se incluyeron iones sodio y cloro para obtener una concentración salina fisiológica (0.15 M).⁴⁴⁻⁴⁶ Se realizaron pasos de preparación que incluyeron la imposición de restricciones de fuerza estructural para evitar una conformación no realista del sistema al inicio de la simulación. Posteriormente, se realizaron las simulaciones de dinámica molecular sin sesgo/imparciales durante un microsegundo (1000 ns) a una temperatura de 37 °C y 1 atmósfera de presión.⁴⁴⁻⁴⁶
91, 92

Además, para identificar la posición de cada residuo en la estructura del receptor, se utilizó la numeración de Ballesteros-Weinstein como superíndice.⁴⁷

3.3 Resultados y discusión

Los resultados provenientes de las simulaciones atomísticas de dinámica molecular proporcionaron elementos detallados de la unión al ligante en los sistemas proteicos (CBD/CB1, ML186/GPR55, CBD/GPR55 y AM251/CB1). Asimismo, los resultados proporcionaron información sobre las consecuencias conformacionales correspondientes.

Como se describió en la sección de métodos, el modelo inicial del CBD/GPR55 se obtuvo a partir del cálculo de acoplamiento molecular y el modelo estructural del GPR55 fue resuelto por medio de modelado por homología, el método es descrito en la sección B.2.

La estructura inicial se puede observar en la figura C.7. Dicha estructura se utilizó como punto de partida para investigar el complejo CBD/GPR55 mediante simulaciones atomísticas de dinámica molecular en un ambiente fisiológico que incluye a la bicapa lipídica.

En la figura 3.1 se muestra la estructura representativa del final de la simulación del complejo después de 1.0 μ s, donde las interacciones que estabilizan la pose molecular del CBD son ilustradas.

La pose molecular del CBD en el sitio de unión al ligante del GPR55 es localizada en la vecindad de las hélices transmembranales TM2 y la TM3 cerca del puente de disulfuro altamente conservado y que en este sistema está formado por C94^{3.25} y C168^{ECL2}. En particular, la región del anillo terpenoide del CBD se inserta entre la TM2 y la TM3 como se observa en la figura 3.1.B. En dicha posición el ligante CBD está rodeado por dos residuos cargados, la K79^{2.60} y el E98^{3.29}. En particular, el CBD forma interacciones de carácter polar con la cadena lateral del E98^{3.29} por medio de un grupo hidroxilo (OH) de su estructura química.

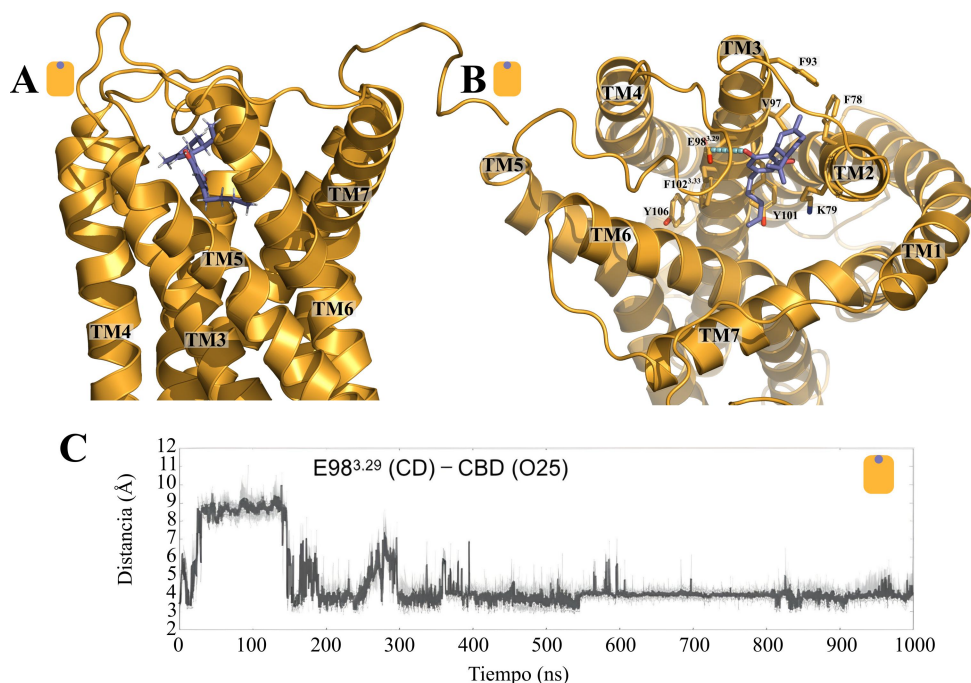


Figura 3.1 Pose representativa de las simulaciones MD del complejo CBD/GPR55. A) Vista lateral del complejo CBD /GPR55. Posición del CBD en la cavidad del sitio unión al ligante. B) Vista extracelular del complejo CBD/GPR55, donde se observa que la fracción de dos anillos del CBD se inserta entre las hélices TM2 y TM3, donde también se encuentra rodeado por los residuos cargados, K79^{2.60} y E98^{3.29}. Mientras que el primer residuo interactúa a través de su región alifática de su cadena lateral, el segundo forma interacciones con un grupo hidroxilo (OH) del CBD (línea discontinua color cian). Se indican los residuos que forman el sitio de unión al CBD en el GPR55. C) Gráfico de la evolución temporal de la distancia entre el residuo ácido E98^{3.29} y uno de los grupos hidroxilo (OH) del CBD.

La evolución temporal de la distancia entre el E98^{3.29} y el hidroxilo del CBD se muestra en la figura 3.1.C. Además, se observó que el residuo K79^{2.60} interactúa con el CBD por medio de la parte alifática de su cadena lateral. Los residuos que delimitan el sitio de unión al ligante del CBD son indicados en la figura 3.1.B.

Por otra parte, para contrastar las observaciones anteriores, se exploró la interacción del GPR55 con el agonista selectivo conocido como ML186. De la misma manera que el caso anterior, se ilustra una estructura representativa del complejo (ML186/GPR55) al final de la simulación de dinámica molecular después de realizar una trayectoria de 1.0 μ s de tiempo (Figura 3.2).

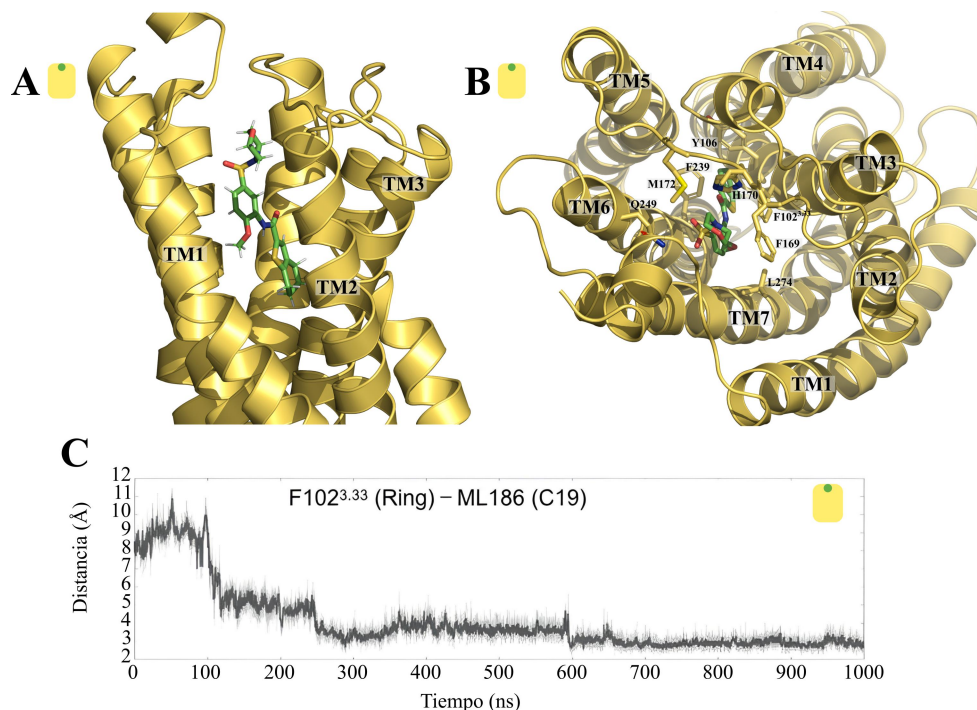


Figura 3.2 Pose representativa de las simulaciones MD del complejo ML186/GPR55. A) Vista lateral del complejo ML186/GPR55. Posición del ML186 en la cavidad del sitio unión al ligante. B) Vista extracelular del complejo ML186/GPR55, donde se observa que la interacción del ligante con las hélices TM3, TM6 y TM7. Tres residuos aromáticos rodean al ligante ML186. F102^{3.33} se sitúa a lo largo del eje principal de los ligantes donde establece interacciones de carácter aromático con la región altamente deslocalizada del ligante. En cuanto a los residuos F239^{6.48} y Y106^{3.37}, formaron la parte inferior del sitio de unión al agonista. Obsérvese que la posición 6.48 ("toggle switch") está implicada en la activación de los GPCRs de clase A. Por último, el grupo SO del ligante establece interacciones polares alrededor del residuo Q249.

En contraste con la posición del ligante CBD en el sitio de unión del GPR55, el ML186 se posiciona en la proximidad de las hélices transmembranales TM3, TM6 y TM7. Además, el ligante ML186 se sitúa en una posición más profunda en la región TM del bolsillo de unión.

El sitio de unión del agonista selectivo está parcialmente formado por tres residuos aromáticos voluminosos, el F102^{3.33}, Y106^{3.37} y F239^{6.48}.

La interacción del residuo F102^{3.33} con el ligante ocurre en la región electrónica altamente deslocalizada (aromática) de la molécula del ML186, la cual establece la estabilización del eje principal del ligante (Figura 3.2.C). Asimismo, los residuos Y106^{3.37} y F239^{6.48} forman la región de interacción más baja del sitio de unión al ligante. En particular la posición 6.48 conocida como "toggle switch" está asociada a la activación de los GPCRs de la clase A (los detalles están más adelante).

Adicionalmente, el grupo sulfonilo ($>SO_2$) del ligante forma interacciones polares con el residuo Q249^{6,58} en la parte extracelular de la hélice transmembranal TM6.

En los GPCRs, particularmente en la clase A, se han identificado motivos estructurales concretos asociados con la activación del receptor. Así, para comprender mejor las consecuencias estructurales del CBD en las conformaciones del receptor se exploró el comportamiento conformacional de dichos motivos estructurales.

Para el caso del “*toggle switch*”, normalmente situado en la posición 6.48, suele presentar el residuo aromático triptófano W^{6,48}. Durante la activación del receptor se produce una reorganización de la cadena lateral del residuo en esta posición, que al parecer propaga cambios conformacionales hacia la región intracelular.⁵⁶ Particularmente, en la posición 6.48 el receptor GPR55 contiene otro residuo aromático, F239^{6,48}.

En consecuencia, se analizaron las conformaciones de este residuo en el receptor GPR55 en la unión con los ligantes CBD y ML186. Se exploran los estados rotaméricos del residuo F239^{6,48} (Figura 3.3), donde se observa que los valores del ángulo diedro definido por los átomos N-CA-CB-CG, en el caso del complejo CBD/GPR55, muestran una distribución unimodal, es decir, que la distribución de los valores explorados por el receptor a lo largo de la trayectoria simulada principalmente se localiza alrededor de 280° a 320°. Contrario al caso del complejo ML186/GPR55 (GPR55 unido a un agonista), donde la presencia del ligante provoca un cambio en la posición del residuo F239^{6,48} explorando una distribución bimodal del mismo ángulo diedro N-CA-CB-CG. Este comportamiento en la distribución de los valores del ángulo N-CA-CB-CG puede atribuirse a la fracción de anillos fusionados que contiene el grupo tiofeno del agonista ML186, la cual contacta directamente con la cadena lateral del residuo F239^{6,48}.

La evidencia experimental sugiere que el comportamiento conformacional más dinámico y heterogéneo se atribuye a la unión de un ligante agonista.^{93, 94} Dichos resultados concuerdan con el consenso actual de que el compuesto CBD es un antagonista de receptor GPR55, mientras que el ML186 presenta una función agonista en el receptor GPR55.^{64, 65, 95}

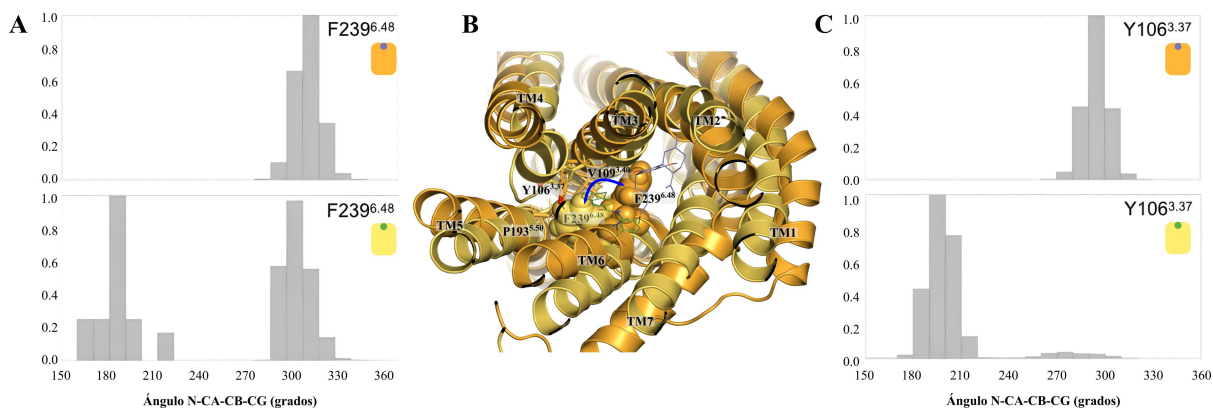


Figura 3.3 Cambios conformacionales en el “toggle switch” diferenciando el complejo de GPR55 unido a un ligante agonista o antagonista. A) Distribuciones del ángulo diedro N-CA-CB-CG del residuo F239^{6.48} en los complejos del CBD/GPR55 y ML186/GPR55. La posición 6.48 se conoce como el “toggle switch” y se ha implicado en la activación de los GPCRs. En el caso del GPR55, la posición 6.48 contiene un residuo de fenilalanina. B) Estructuras finales superpuestas de las simulaciones del CBD/GPR55 y ML186/GPR55. Se ilustra la diferente posición del residuo F239^{6.48} en los dos sistemas (flecha color azul). La posición molecular más profunda del agonista selectivo ML186 (verde) puede ser responsable de la diferente posición de la cadena lateral F239^{6.48}. C) Otro residuo que parece desempeñar un papel en los cambios rotaméricos del F239^{6.48} es el F239^{6.48} que también muestra una distribución de ángulos diedros distintiva.

Además, los cambios en la posición 6.48 con residuos localizados en las hélices TM3 y TM6 se han sugerido que ocurren en la activación de los GPCRs.^{56, 96} Las simulaciones realizadas sugieren que los cambios del residuo F239^{6.48} están asociados estrechamente con dos residuos aromáticos, Y106^{3.37} y F235^{6.44}.

El análisis equivalente del ángulo diedro (N-CA-CB-CG) de Y106^{3.37} indica un cambio en el estado rotamérico explorado por dicho residuo. Mientras que en el sistema CBD/GPR55, que muestra la distribución unimodal del F239^{6.48}, el ángulo diedro (N-CA-CB-CD) de Y106^{3.37} también indica una distribución con un solo pico (Figura 3.3.A). El comportamiento más dinámico de F239^{6.48}, observado en la presencia del ligante agonista ML186, provoca cambios significativos en la distribución de los estados rotaméricos que explora el residuo Y106^{3.37} en la TM3 (Figura 3.3.B). Por último, los cambios en el “toggle switch” de GPR55 hacen que F235^{6.44} siga una tendencia similar, es decir, el CBD/GPR55 muestra una distribución unimodal del ángulo diedro definido por los átomos N-CA-CB-CG mientras que el complejo ML186/GPR55 muestra una distribución más heterogénea (Figura 3.4).

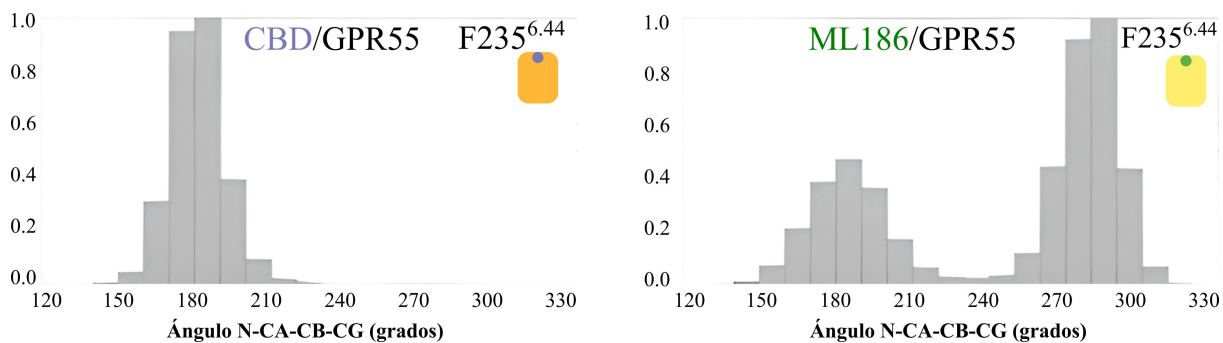


Figura 3.4 Distribución de los estados rotaméricos de F235^{6.44} en ambos complejos GPR55. Distribuciones del ángulo diedro N-CA-CB-CD del residuo F235^{6.44} en los complejos CBD/GPR55 y ML186/GPR55.

La respuesta conformacional significativa del receptor GPR55 a la presencia del antagonista CBD y del agonista ML186 en motivos estructurales conocidos por desempeñar un papel en la activación del receptor, parece estar en buen acuerdo con la evidencia experimental vinculada a estos dos ligantes.^{64, 65, 95, 97-101}

Adicionalmente, a los residuos que forman el "toggle switch" antes mencionado, otra característica estructural distintiva de la activación de los GPCRs de clase A es la presencia de una interacción intracelular carga-carga, llamado candado iónico, formado por los residuos R^{3.50} y D/E^{6.30}.⁵⁶ Durante la activación, este bloqueo iónico debe romperse para que sea posible un desplazamiento de TM6 hacia el exterior, el cual es necesario para la interacción con la respectiva proteína G. En el caso de GPR55 hay un residuo de arginina en la posición 3.50 (R119^{3.50}), pero no hay ningún residuo ácido en la posición 6.30.⁵⁶ Sin embargo, para tener una idea del desplazamiento relativo del segmento intracelular del TM6 desde el TM3, se calculó la distancia entre los átomos CA de R119^{3.50} y I228^{6.37}. Se eligió la posición 6.37 ya que su átomo CA está en el mismo plano que el átomo CA de la posición 3.50. Como se observa en la figura 3.5 la distancia entre R119^{3.50} y I228^{6.37} en el receptor unido al antagonista apenas se muestran valores superiores de 9 Å. En cambio, el receptor unido al agonista, la mayor parte del tiempo supera los valores de 9 Å, incluso alcanzando valores de 11 Å de distancia.

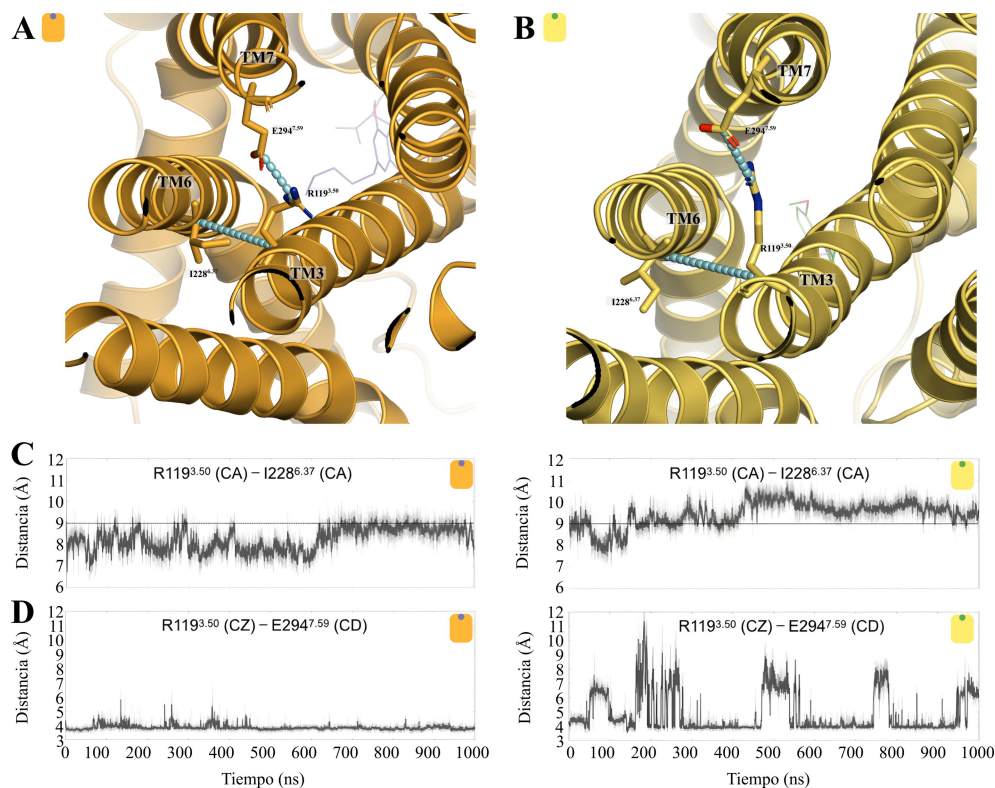


Figura 3.5 Los cambios de conformación alrededor del residuo intracelular conservado R3.50 distinguen los complejos GPR55 unidos a antagonistas de los unidos al agonistas. Esta interacción electrostática se mantiene en el primero, mientras que en el segundo se interrumpe con frecuencia. Se muestran estructuras representativas de los complejos A) CBD/GPR55 y B) ML186/GPR55, donde las dos distancias se ilustran como líneas cian. C) Evolución temporal de la distancia R119^{3.50} (CA)-I228^{6.37} (CA) para los sistemas GPR55 unido a antagonista (izquierda) y unido al agonista (derecha). La línea continua a 9 Å se traza como guía. D) Evolución temporal de la distancia R119^{3.50} (CZ)-E294^{7.59} (CD) para los complejos GPR55 unido a antagonista (izquierda) y unido al agonista (derecha).

Los cálculos revelan que R119^{3.50} forma una interacción de puente salino con el residuo E297^{7.59}, localizado en la hélice TM7. Como muestra de esta interacción, en la figura 3.5 se muestra la evolución temporal de la distancia R119^{3.50} (CZ)-E294^{7.59} (CD). En el complejo CBD/GPR55, la interacción de puente-salino permanece estable durante toda la simulación; pero, en el caso del sistema ML186/GPR55, se suele romper esta interacción muy frecuentemente. Una vez más, los resultados computacionales capturaron conformaciones distintivas adoptadas por el receptor en presencia de diferentes ligantes, ya sean antagonistas o agonistas (Figura 3.5).

Por lo tanto, en el caso del GPR55, las consecuencias estructurales de la presencia de CBD sugieren que el ligante estabiliza las conformaciones inactivas del receptor, lo que concuerda con la actividad antagonista sugerida del CBD sobre el GPR55.^{64, 65, 95} Por otra parte, la

presencia del agonista selectivo ML186 favorece los cambios estructurales relacionados con las conformaciones enlazadas a un agonista del GPCR, de nuevo, en buena concordancia con las propiedades funcionales del ligante.⁹⁷⁻¹⁰¹

Como los enfoques computacionales pudieron distinguir las consecuencias conformacionales de cada ligante, ya sea agonista o antagonista, para el receptor GPR55, se decidió aplicar un enfoque similar para dilucidar la actividad funcional aún no esclarecida del CBD sobre el arquetípico receptor a cannabinoides CB1.

Basado en la similitud estructural del CBD con otros ligantes cannabinoides,¹⁰² incluida la estructura del fitocannabinoide delta-9-tetrahidrocannabinol, Δ 9-THC, que presenta un agonismo parcial en el receptor CB1, se decidió seleccionar poses moleculares a partir de cálculos de acoplamiento molecular que sitúan al CBD en el sitio de unión ortostérico del CB1.^{103, 105}

Como se describió en la sección de métodos, el modelo inicial del CBD/CB1 se obtuvo a partir de aproximaciones de acoplamiento molecular (Figura C.8). Además, se utilizó como referencia la información de la estructura cristalizada del receptor CB1 en complejo con un ligante agonista (PDB: 5XRA).

El sistema CBD/CB1 se estudió mediante simulaciones de dinámica molecular sin sesgo/imparciales utilizando protocolos descritos previamente para proteínas de transmembrana (véase sección de métodos y para más detalle en Apéndice B). La figura 3.6 muestra la estructura final representativa de ambos complejos CBD en las etapas finales de la simulación de 1.0 μ s. También se indican los residuos que delimitan el sitio de unión al CBD.

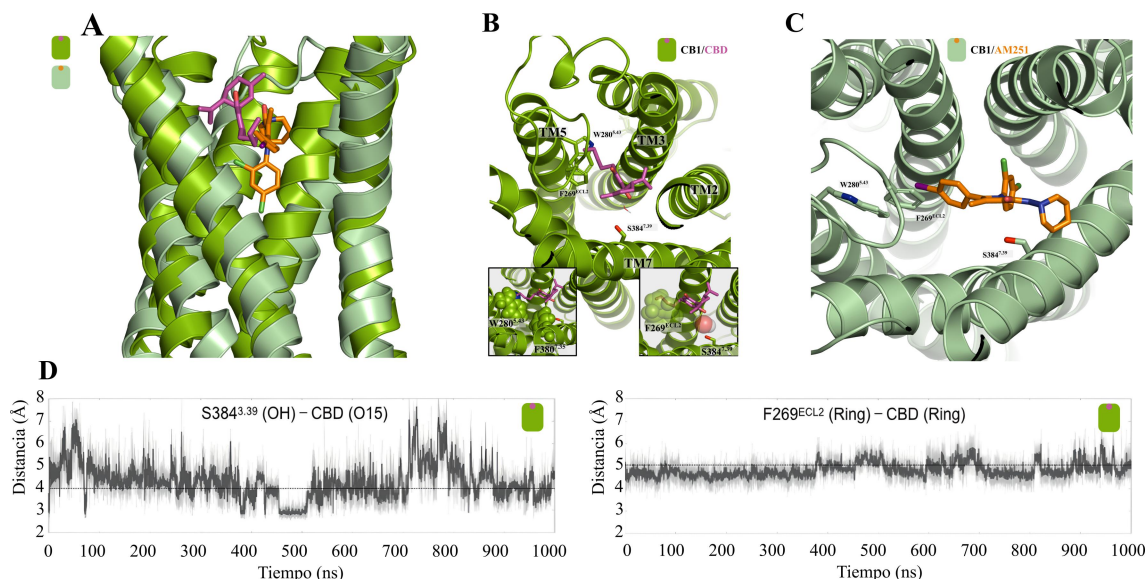


Figura 3.6 Poses representativas de las simulaciones MD de los complejos CB1. A) Vista lateral de las estructuras superpuestas de los complejos CBD/CB1 y AM251/CB1. B) Vista extracelular del complejo CBD/CB1, donde se aprecia la interacción de los anillos aromáticos del CBD y la cadena lateral del residuo F269^{ECL2}. Se forma una interacción polar mediada por agua de uno de los grupos hidroxilo (OH) del CBD con la cadena lateral del residuo S384^{7.39}. El recuadro de la izquierda muestra la interacción aromática con la cadena lateral del residuo F269^{ECL2} y con la cadena lateral de F380^{7.35}. El recuadro de la derecha muestra con más detalle la molécula de agua que media en la interacción del CBD con el residuo S384^{7.39}. Se ha demostrado que la mutación de estos dos residuos en TM7 reduce la potencia agonista de los ligandos cannabinoides. C) Vista extracelular del complejo AM251/CB1. D) Gráficos de evolución temporal de la distancia entre uno de los grupos hidroxilo (OH) del CBD y el grupo hidroxilo de S384^{7.39} y la distancia anillo-anillo entre el anillo aromático del CBD y la cadena lateral del residuo F269^{ECL2}.

En el caso del CBD/CB1, se indican las principales interacciones que estabilizan el ligante en el sitio de unión ortostérico de CB1. En la figura 3.6 se indica la evolución temporal de la distancia que representa dos de las principales interacciones. Como se ha observado, la mayor parte de las interacciones son de carácter alifático, destacando interacciones aromáticas entre el anillo aromático del CBD y la cadena lateral del residuo F269^{ECL2} situado en el bucle extracelular 2 (recuadro derecho de la figura 3.6 B) y la cadena lateral del residuo F380^{7.35} en TM7 (recuadro izquierdo de la figura 3.6 B). La importancia de esta última interacción se ha documentado para agonistas de CB1, donde se ha demostrado que la mutación por alanina reduce la potencia del ligante agonista.¹⁰²

Curiosamente, la cola alquílica del CBD contacta directamente con la cadena lateral voluminosa del residuo W280^{5.43} en TM5. Por último, uno de los grupos OH del CBD forma una interacción polar, a veces mediada por una molécula de agua, con el residuo S384^{7.39} (recuadros de la figura 3.6 B). Cabe destacar que la presencia de este residuo polar, S384^{7.39},

es relevante en la interacción de CB1 con agonistas de tipo cannabinoide, ya que la eliminación del grupo hidroxilo (mutación por alanina) redujo la potencia de estos ligantes. Para observar las consecuencias del ligante CBD en receptor CB1, primero se analizó la conformación de dos residuos hidrofóbicos voluminosos que se han relacionado con la actividad del CB1 (F201^{3.36} y W357^{6.48}). Estos residuos se les denominan “*twin toggle switch*”, ya que el cambio conformacional en su estado rotamérico se ha propuesto como esencial para la activación del receptor CB1.¹⁰² La distribución de los valores de los ángulos diedros formados por los átomos (N-CA-CB-CG) de cada residuo se presentan en la figura 3.7, donde se puede observar que en presencia de CBD, el residuo F201^{3.36} explora dos valores distintivos (distribución bimodal). El primer pico de la distribución se superpone con el valor observado en la estructura de CB1 enlazada a un ligante antagonista [5TGZ.pdb; F3.36 (N-CA-CB-CG) ángulo diedro de 182.18°,¹⁰⁵ etiqueta magenta en la figura 3.7 A], mientras que el segundo pico de distribución se superpone con el valor observado en el receptor CB1 unido a un ligante agonista [5XRA.pdb; F3.36 (N-CA-CB-CG) ángulo diedro de 280.59°,¹⁰² etiqueta azul en la figura 3.7 A]. Es decir, en presencia del ligante CBD, el estado rotamérico del F201^{3.36} muestra un comportamiento dinámico y explora valores que se observan no solamente en estados inactivos del receptor, sino también en estados del sistema enlazados a un agonista. Para poner los resultados en contexto, se estudió un complejo de CB1 con un conocido antagonista de CB1, el ligante AM251, mediante simulaciones atomísticas de dinámica molecular. Para el caso del antagonista AM251 se observó únicamente una conformación (distribución unimodal) que se superpone con el receptor CB1 unido al antagonista. Esta conformación particular del F3.36 se ha asociado con el estado inactivo del receptor. Además, en presencia del CBD, el residuo W357^{6.48} también explora dos conformaciones distintas (distribución bimodal) aunque el primer pico apenas es explorado por el sistema. Una vez más, en presencia del antagonista AM251, solo se observó una conformación.

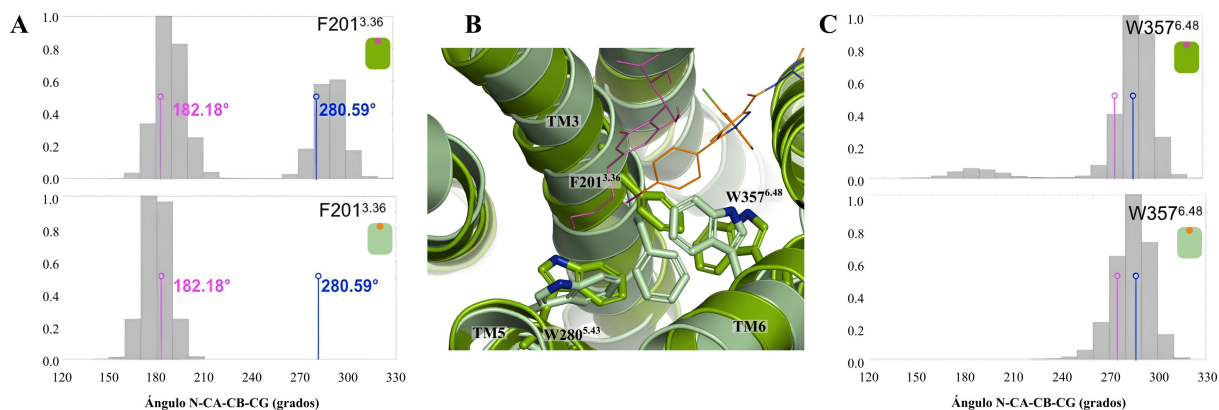


Figura 3.7 Cambios de conformación en los residuos F201^{3.36} y W357^{6.48} muestran diferentes distribuciones en los complejos CBD/CB1 y AM251/CB1. A) Distribuciones del ángulo diedro N-CA-CB-CD del residuo F201^{3.36} en los complejos CBD/CB1 y AM251/CB1. Los valores indicados en magenta corresponden a la estructura CB1 unida al antagonista (5TGZ.pdb) mientras que los coloreados en azul corresponden a la estructura CB1 unida al agonista CB1 (5XRA.pdb). Como se observa, sólo el complejo con CBD explora las conformaciones del “*twin toggle switch*” asociado con la estructura CB1 unida al agonista. B) Estructuras finales superpuestas de los complejos CBD/CB1 y AM251/CB1. Los diferentes estados rotaméricos de los residuos F201^{3.36}, W357^{6.48} y W280^{5.43} en los dos complejos CB1. Como se indica en el texto principal y en la figura 3.6, la cola alquílica del CBD contacta directamente con la cadena lateral voluminosa del residuo W280^{5.43}. C) Distribuciones del ángulo diedro N-CA-CB-CD del residuo W357^{6.48} en los complejos CBD/CB1 y AM251/CB1. F201^{3.36} y W357^{6.48} se conocen como el “*twin toggle switch*”.

Por último, esta diferencia conformacional en los residuos que constituyen el “*twin toggle switch*” está relacionada con los estados rotaméricos explorados por el residuo voluminoso W280^{5.35}. Como se observa en la figura 3.6B, la cola alquílica del CBD entra en contacto con la cadena lateral de W280^{5.35}, lo que podría facilitar los cambios identificados en el interruptor de doble palanca. Por lo tanto, la presencia de CBD hace que el receptor adopte conformaciones similares a las activas (“*twin toggle switch*”) que se asocian con sistemas unidos al agonistas. En contraste los resultados de las simulaciones para el complejo AM251/CB1 indican que las conformaciones adoptadas por el receptor en presencia del ligante antagonista son asociadas al estado inactivo del receptor CB1.

De esta manera, los métodos computacionales utilizados en este estudio son capaces de diferenciar correctamente los cambios estructurales en CB1 modulados por diferentes ligantes, es decir, CBD y AM251 (un antagonista de CB1). Además, los resultados mostrados aquí sugieren que el ligante CBD puede actuar como un agonista del receptor CB1.

Como se mencionó anteriormente, en el caso de GPR55, una característica de la activación de los GPCRs es la interacción polar formada comúnmente por dos residuos cargados localizados

en el la TM3 y la TM6. En el caso de CB1 el llamado candado iónico está formado por los residuos R215^{3.50} y D339^{6.30} (Figura 3.8)

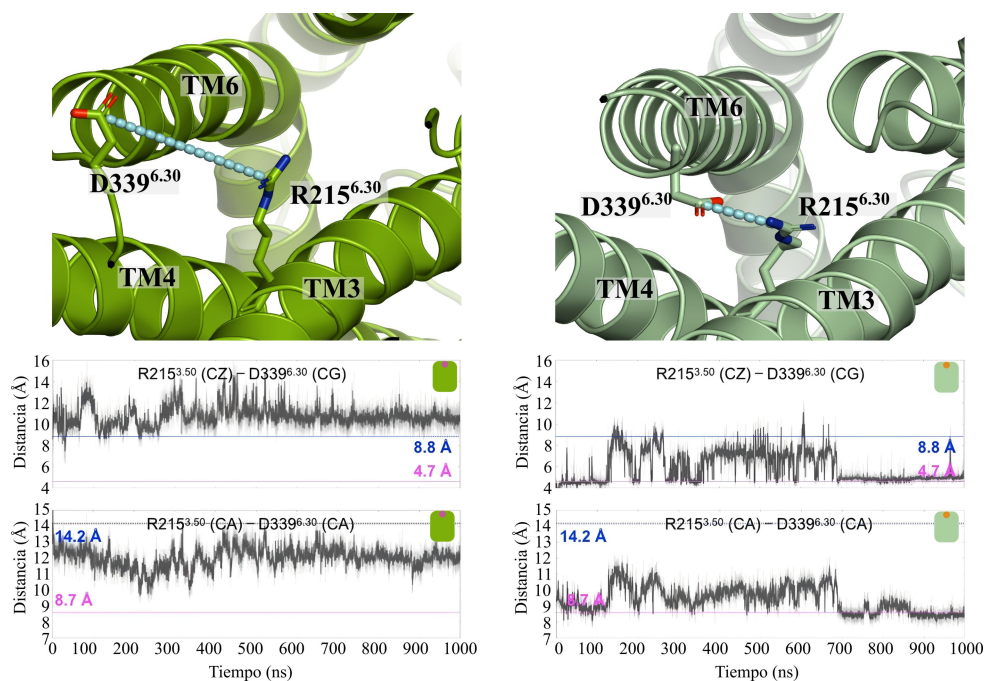


Figura 3.8 Estructuras representativas de los complejos A) CBD/CB1 y B) AM251/CB1, donde se representa el candado iónico con líneas discontinuas color cian. C) Evolución temporal de la distancia entre R119^{3.5}(CZ)-D339^{6.30}(CG) para los sistemas CB1 con CBD (izquierda) y con un antagonista (derecha). La línea discontinua a 4.7 (magenta) y 8.8 Å (azul) indican la distancia correspondiente a las estructuras CB1 unida a un antagonista (5TGZ.pdb) y al agonista (5XRA.pdb), respectivamente. D) Evolución temporal de la distancia entre R119^{3.5}(CA)-D339^{6.30}(CA) para los sistemas CB1 con CBD (izquierda) y con un antagonista (derecha). La interacción electrostática se ve interrumpida en el primero mientras que en el segundo se forma con más frecuencia.

Como se indica en la figura 3.8, a lo largo de la simulación, se observó la ruptura del candado iónico, el cual se ha establecido como un prerequisite para la interacción de los GPCRs con su respectiva proteína G.

La distancia entre R215^{3.50}(CZ)-D339^{6.30}(CG) muestra valores mayores de 8.8 Å, que es la distancia observada en el complejo de CB1 unido a un agonista (AM11542/CB1; PDB: 5XRA). Este resultado indica que en presencia de CBD, el candado iónico muestra conformaciones asociadas a los estados unidos a ligantes agonistas. De forma similar, se analizó la misma distancia en el complejo de AM251/CB1 (sistema enlazado a un antagonista). Como se observa en la figura 3.8 C, el candado iónico permanece cerrado, alrededor de 4.5/4.7 Å (distancia observada en la estructura de cristalografía de complejos unidos a un antagonista;

5TGZ/5U09.pdb) y casi nunca explora distancias mayores a los 8.8 Å (distancia observada en la estructura de cristalografía de complejos unidos a un agonista; 5XRA). Lo mismo pasa cuando se analiza la distancia R215^{3.50}(CA)-D339^{6.30}(CA), el comportamiento del complejo AM251/CB1 muestra el candado iónico cerrado, al contrario que el complejo CBD/CB1 (Figura 3.8 D).

Por otra parte, analizando los detalles de las simulaciones para describir el enlace a ligante y las consecuencias estructurales del receptor CB1 se identificó un sitio de unión a sodio localizado en la región extracelular (anteriormente se había reportado un sitio de unión en el dominio transmembranal del receptor).^{106, 107}

En ambos complejos de CB1, se observa la formación de dicho sitio formado por residuos situados en el segmento de TM5, TM6 y el bucle extracelular 2 (D267^{ECL2}, E274^{5.37}, y D367^{6.58}). Como se muestra en la figura 3.9, a lo largo del tiempo de simulación los residuos D267^{ECL2}, E274^{5.37}, and D367^{6.58} forman un contacto directo con un ion de sodio formando un sitio de unión a sodio en la región extracelular sin importar la característica del ligante. Las consecuencias funcionales de este sitio deben evaluarse más a fondo para una posible explotación de este sitio alostérico tentativo. Curiosamente, no se observó ningún sitio de unión de sodio en el lado extracelular en el caso del GPR55.

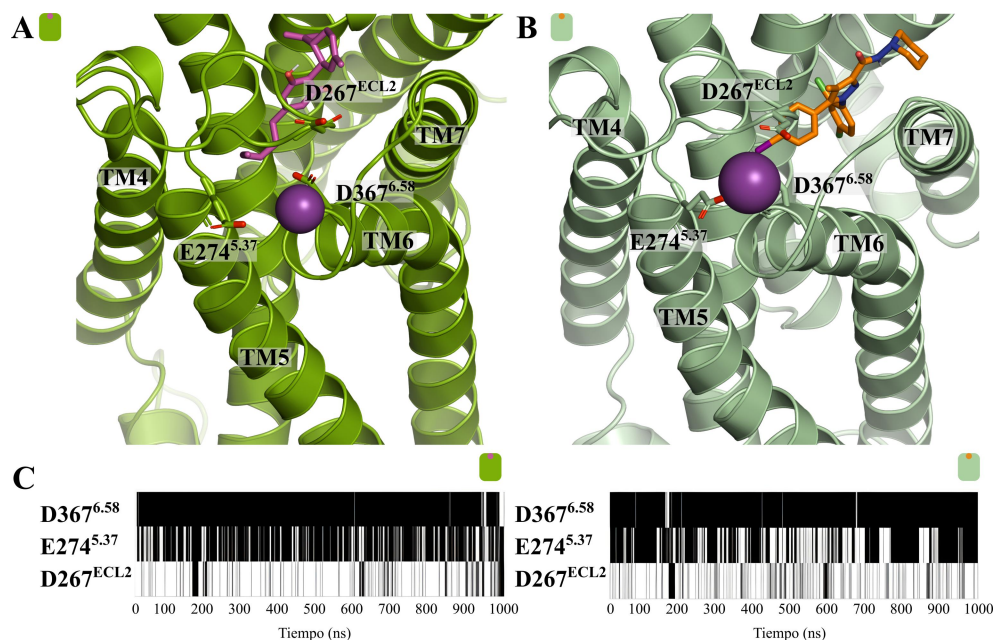


Figura 3.9 Sitio de unión a sodio extracelular observado en las ambas simulaciones de dinámica molecular. Vista extracelular del sitio de unión a sodio identificado por medio de las simulaciones de dinámica molecular imparciales del complejo CBD/CB1 y B) AM251/CB1. C) Mapa de contacto del sodio a lo largo del tiempo de simulación, donde se muestra en color negro se indica el contacto con un ion de sodio (definido por una distancia a 4 Å o menos de cualquier átomo pesado al átomo de sodio), mientras que el blanco indica la ausencia de tal contacto. Como se muestra, el residuo D367^{6.58} es el principal responsable de establecer interacciones electrostáticas con un catión sodio y, para ello, suele utilizar tanto el grupo carboxilato de su cadena lateral como el grupo carbonilo del esqueleto. La naturaleza ácida de los residuos en estas posiciones está conservada en el receptor CB1 humano (D367^{6.58}, E274^{5.37}, y D267^{ECL2}; residuos de rata con las correspondientes posiciones humanas, D366^{6.58}, E273^{5.37}, y D266^{ECL2}).

3.4 Conclusión

Una descripción integral de la función de la proteína es fundamental para comprender la implicación de estas biomacromoléculas en diferentes actividades celulares. Además, discernir cómo diferentes entidades bioquímicas, incluidos ligantes exógenos, iones, péptidos y lípidos, por mencionar algunos, regulan la función de la proteína para modular con precisión la respuesta celular de las proteínas.^{43, 108-112}

En este contexto, los métodos computacionales ofrecen herramientas para investigar detalles a nivel molecular que pueden adaptarse a las necesidades farmacológicas actuales.

Como anteriormente se discutió las técnicas computacionales fueron capaces de capturar la información necesaria para discernir los efectos de la interacción del cannabidiol (CBD) en dos receptores distintos que son activados por endocannabinoides.

Del estudio realizado se provee una fuerte evidencia de que el CBD es capaz de desencadenar cambios en el receptor CB1 asociados a GPCRs unidos a un agonista. Los detalles del trabajo sugieren un sitio de unión a sodio desconocido en la región extracelular formado por residuos de la ECL2, TM5 y TM6.

Nuestros resultados nos dan información importante de la forma en la que interactúa el ligante CBD en presencia de los receptores cannabinoides (de importancia farmacológica en la implementación de un medicamento paliativo para la enfermedad de Parkinson).

Por otra parte, los estudios computacionales nos ayudan a allanar el camino hacia el entendimiento a nivel molecular de las interacciones del CBD en complejos con los receptores CB1 y GPR55. De los resultados se sugiere que el CBD causa conformaciones en CB1 enlazado a receptores GPCR de la clase A unidos a un agonista.

Actualmente, el rol del CBD en el receptor CB1 se mantiene en debate. Se ha sugerido que el CBD puede activar el receptor o favorecer las conformaciones inactivas del CB1 o incluso funcionar como modulador alostérico.

Por otro lado, el CBD modula la función antagonista en GPR55 que se ha demostrado que, en modelos animales, es capaz de mejorar las habilidades motoras finas y gruesas en modelos animales de Parkinson.

Capítulo 4

4. Comentarios finales

Se cumplió el propósito original del trabajo que fue evidenciar que los métodos computacionales, particularmente las simulaciones atomísticas de dinámica molecular son capaces de capturar información relevante a nivel atómico-molecular en el estudio de sistemas biomacromoleculares relevantes para enfermedades neurodegenerativas.

Más aún, la información detallada obtenida a partir del uso de diversas técnicas computacionales es capaz, no solamente de sustentar información obtenida mediante técnicas experimentales, sino que además complementa dicha caracterización que es fundamental para tener una información integral de sistemas tan complejos como los investigados en este trabajo. De los diversos sistemas que se estudiaron mediante simulaciones atomísticas de dinámica molecular, se incluyeron los dos tipos de proteínas más comunes, proteínas globulares (medio acuoso) y proteínas transmembranales (embebidas en una membrana lipídica hidratada). La técnica computacional fue capaz de diferenciar conformaciones asociadas a la actividad o inactividad de los receptores, independientemente del ligante estudiado. La estrategia computacional utilizada en este proyecto nos ayudó a explorar problemas particulares en cada enfermedad. Para el caso de la enfermedad de Alzheimer (EA) se pudo observar el comportamiento de un oligómero del péptido β amiloide (A β O), donde se exploró su estabilidad estructural en medio acuoso, la cual es particularmente difícil de investigar por medios experimentales. Además, los datos obtenidos en la formación del complejo con distintos receptores neuronales nos dan indicios de los modos de interacción que poseen los A β O y establece las bases para desarrollar una posible terapia que inhiba dicha interacción.

Por otra parte, para la enfermedad de Parkinson (EP) se pudo estudiar el sistema endocannabinoide como un blanco terapéutico en el uso de tratamientos alternativos para la disminución de síntomas asociados a la enfermedad, en particular, las posibles características

farmacológicas del cannabidiol (CBD). Asimismo, se propuso un sitio de unión a sodio antes no mencionado para el receptor cannabinoide tipo 1 (CB1), que juega un papel importante en la actividad del receptor y puede ser utilizado como con fines terapéuticos como un sitio de modulación alostérica.

Con todo lo antes mencionado, creemos que el trabajo es enriquecedor y provee información interesante para contribuir al desarrollo de terapias contra las enfermedades neurodegenerativas.

4.1 Perspectivas

Comprendemos la complejidad de las enfermedades neurodegenerativas, no obstante, los resultados del presente trabajo nos ayudan a pensar en posibles perspectivas a futuro.

De los resultados de la primera parte del proyecto y con la idea de evaluar los mecanismos de interacción aquí propuestos, se podría plantear mutaciones sitio-dirigidas de algunos aminoácidos del A β O que forman algunas de las interacciones más importantes tanto con el receptor α 7 nAChR como con el receptor adrenérgico α _{2A}. De esta manera se intentaría disminuir su capacidad de interacción con dichos receptores neuronales. Por otro lado, en el contexto de la generación de una posible terapia molecular que elimine la toxicidad de los A β O_s generada por la desregulación de la función de los receptores neuronales antes mencionados, nuestros resultados sugerirían la identificación de un segmento peptídico obtenido a partir de las interacciones principales del A β O con los receptores α 7 nAChR y α _{2A}AR. Es decir, sabiendo las interacciones del sistema A β O- α 7 nAChR, sería posible en principio generar un péptido que contenga a los residuos importantes del receptor que participan en la interacción con A β O y así establecer un sistema que competiría por A β O impidiendo su interacción con el receptor α 7 nAChR; una aproximación similar ocurriría en el caso del receptor α _{2A}AR.

Para la segunda parte del proyecto se podría estudiar computacionalmente al receptor CB2, perteneciente al sistema endocannabinoide, y explorar los modos de interacción del CBD con

dicho receptor. Por otro lado, se podrían probar más agonistas/antagonistas de los receptores CB1, GPR55 y CB2, incluidos aquellos que lo hacen de manera alostérica.

Apéndice A

A. Receptores

Los receptores son proteínas especializadas que pueden interaccionar con moléculas de señalización conocidas como ligantes (péptidos, toxinas, moléculas pequeñas, hormonas y más) o por medio de estímulos externos (luz, sonido, voltaje).^{113, 114}

Dicha interacción puede desencadenar respuestas en las células, además, transmitir información mediante la transducción de señales intracelulares y de estímulos externos lo que se relaciona con procesos fisiológicos benéficos y perjudiciales para la salud.

Los receptores modulados por ligantes son muy importantes, ya que suelen estudiarse como dianas farmacológicas.¹¹⁵⁻¹¹⁷

En particular, son de nuestro interés los situados en las células nerviosas, ya que son de importancia para comprender mejor los procesos neurológicos y para el desarrollo de terapias farmacológicas asociadas a enfermedades neurodegenerativas.^{1-3, 9}

En general, los receptores se dividen en diversas familias que comparten características entre sí y que a su vez pueden subdividirse.

Para el presente trabajo se estudiaron dos familias de receptores: los receptores acoplados a proteína G (GPCRs)^{56, 118, 119} y los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs).¹²²

A.1 Receptores acoplados a proteína G (GPCRs)

Los receptores acoplados a proteína G (GPCRs) integran una gran familia de receptores de membrana que responden a diversos estímulos, se estima que hay más de 800 GPCRs, lo que constituye la familia más extensa de receptores en el genoma humano.^{116, 117}

Dichos receptores desencadenan diferentes funciones fisiológicas y se dividen en cinco subfamilias dependiendo de su similitud de secuencia, sus procesos de transducción similares y su estructura respecto al representante de cada subfamilia. De esta manera, la familia A corresponde a los receptores similares a la rodopsina, los B a la secretina, los C a glutamato, los D a adhesión y los E a frizzled/taste2.

Los GPCRs se caracterizan por poseer una estructura formada por siete dominios transmembranales (TM1-7) altamente conservados unidos por tres bucles intracelulares (IC1-3) y tres bucles extracelulares (EC1-3), además de poseer su N terminal (Nter) en el dominio extracelular y su C terminal (Cter) en el dominio intracelular (Figura A.1).^{118, 119}

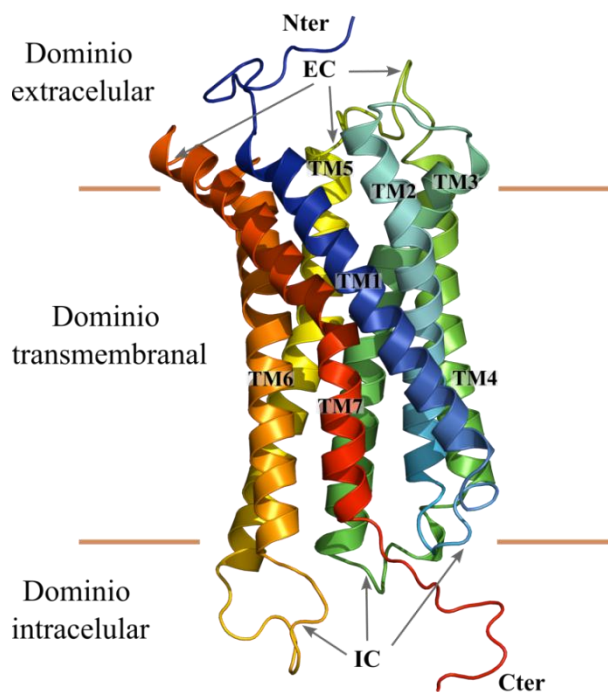


Figura A.1 Estructura característica de los receptores acoplados a proteína G (GPCRs). Figura realizada en el programa Pymol¹²⁰ e Inkscape¹²¹, estructura proteica tomada del modelo GPR55.

Otra interesante característica es la forma en la que se pueden enumerar los residuos que componen a los GPCRs, conocida como numeración de Ballesteros-Weinstein (B-W).

Debido a su estructura conservada se pueden identificar residuos que se asignan con un número genérico de residuo. Esta numeración permite identificar de manera más precisa y sencilla residuos conservados de interés. La numeración consiste en dos números, el primero indica la hélice (1-7) y el segundo la posición relativa al residuo más conservado, definido

como el residuo 50. Por ejemplo, el residuo 3.50 (numeración de B-W) indica la posición del residuo en la transmembrana 3 (TM3) y el residuo más conservado (en el caso de los GPCRs clase A es una arginina).

Por otro lado, los GPCRs tienen funciones basales que se ven moduladas por ligantes, estos ligantes pueden ser agonistas (ligantes que incrementan la función basal), antagonistas (ligantes que no modifican la función basal o impiden los cambios conformacionales asociados al agonismo) y agonistas inversos (ligantes que disminuyen la función basal) (véase Figura A.2).^{118, 119}

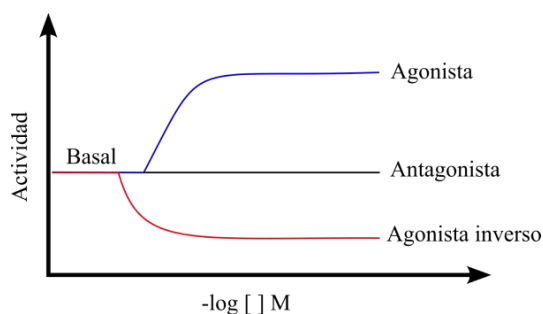


Figura A.2 Ejemplo de la farmacocinética de los ligantes unidos a los receptores acoplados a proteína G (GPCRs).

Para este trabajo se estudiaron los GPCRs de la clase A, particularmente el receptor cannabinoide de tipo 1 (CB1) y el receptor acoplado a proteína G 55 (GPR55) propuestos como dianas farmacológicas por la interacción de cannabinoides que se implican en la mejoría de algunos de los síntomas de la enfermedad de Parkinson.

De la misma manera, se estudió el receptor adrenérgico α_{2A} ($\alpha_{2A}AR$) que muestra afinidad por oligómeros del péptido β amiloide asociados a la neurotoxicidad en la enfermedad de Alzheimer.

A.2 Receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs)

Los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) son otra gran familia de receptores presentes en la membrana.

Los nAChRs, también conocidos como receptores “*cys-loop*”, son canales iónicos que tiene la función de modular el paso de iones a través de la membrana lipídica y se asocian diversas actividades según su composición.¹²²

Su estructura se compone de cinco subunidades con tres dominios (extracelular, transmembranal e intracelular) (Figura A.3). Además, se pueden identificar dos tipos de receptores dependiendo de sus subunidades, los primeros cuando las cinco subunidades son iguales (homopentámero) y segundo cuando las subunidades son distintas (heteropentámero). Cada tipo de receptor modulará funciones fisiológicas distintas y se expresará de forma única.

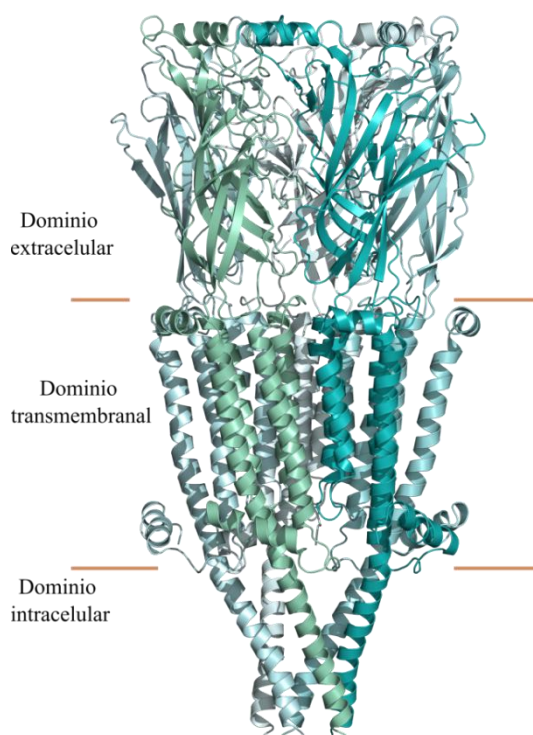


Figura A.3 Estructura característica de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs). Figura realizada en el programa Pymol¹²⁰ e Inkscape¹²¹, estructura proteica tomada del PDB:5KXI.

De los nAChRs se pueden identificar tres estados conformacionales (abierto, cerrado y desensibilizado) que explora el receptor dependiendo de la naturaleza del ligante que interactúe con él (Figura A.4).

El estado conformacional abierto permite el flujo de iones a través del canal mediante la compuerta de activación. Por el contrario, el estado cerrado bloquea el flujo de iones manteniendo cerrada la compuerta de activación del receptor.

Por otro lado, el estado desensibilizado es una conformación más compleja donde el receptor permanece cerrado por la compuerta de desensibilización (diferente a la activación).¹²²

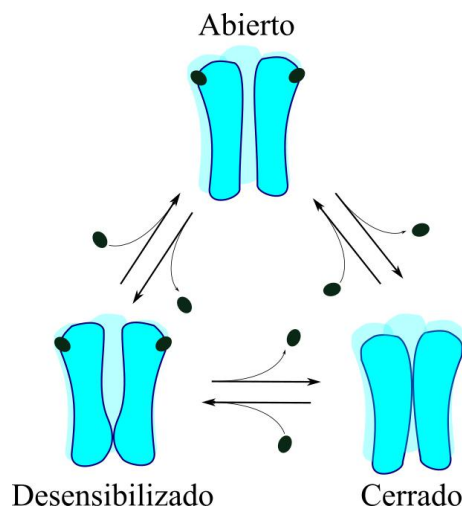


Figura A.4 Esquemas de los estados conformacionales que los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) exploran en su activación y desactivación. Figura realizada en el programa Inkscape¹²¹.

Para este trabajo se estudió el receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$, un homopentámero formado por la subunidad $\alpha 7$ que se expresa en las células nerviosas y que tiene afinidad por los oligómeros del péptido β amiloide asociados a la neurotoxicidad en la enfermedad de Alzheimer.

Apéndice B

B. Técnicas utilizadas en biofísica computacional de macromoléculas

Existen diversas técnicas computacionales utilizadas en distintos campos de estudio. En el caso de la biofísica computacional de macromoléculas se conocen técnicas y métodos que ayudan a solucionar problemas asociados a sistemas de interés biológico.

Principalmente, se utilizan simulaciones computacionales que permiten estudiar la evolución temporal de un conjunto de cuerpos (átomos, moléculas y partículas macroscópicas) que interactúan entre sí, que es conocida como dinámica molecular (DM).

La DM fue empleada por primera vez para estudiar macromoléculas en la década de los 70's (McCammon, J.A, 1977).¹²³ Sin embargo, la complejidad del sistema y el escaso poder de cómputo de esos años limitaban mucho el uso de las simulaciones de dinámica molecular.

Actualmente, el poder de cómputo se ha incrementado exponencialmente lo que ha impulsado las simulaciones por computadoras.¹²⁴

Las simulaciones computacionales complementan los métodos experimentales, sin embargo, existen ventajas en contraste con la experimental, destacando el entendimiento a nivel molecular, la reducción de costos al no usar modelos animales o cultivos celulares y el análisis predictivo con posibles aplicaciones en el estudio de blancos terapéuticos.¹²⁴

Por otro lado, alrededor de las simulaciones de dinámica molecular también existen otras técnicas computacionales complementarias para resolver problemas previos a su realización.

Entre las que se encuentran el modelado por homología que ayuda a realizar modelos tridimensionales a partir de una secuencia primaria y una plantilla con información estructural.^{38, 39} Por otro lado, el acoplamiento molecular ayuda a predecir las poses preferentes de un ligante en la formación de un complejo ligante/proteína.^{90, 125, 126}

B.1 Fundamentos de las simulaciones de dinámica molecular

De forma general, las simulaciones de dinámica molecular tienen un protocolo muy conocido. Las variantes dependen del sistema a estudiar y del software que se utilice para realizarlas.

En el caso del presente trabajo se utilizan simulaciones atomísticas de dinámica molecular para sistemas macromoleculares imitando condiciones fisiológicas, es decir, a una atmósfera de presión, a una temperatura de 37 °C y una concentración salina de 0.15 M utilizando el programa NAMD.¹²⁷

Normalmente, para realizar simulaciones de dinámica molecular se requiere conocer las fuerzas del sistema y usar un algoritmo numérico para determinar la evolución de los átomos que interactúan entre sí con respecto al tiempo, es decir, se resuelven las ecuaciones que describen el movimiento de cada átomo del sistema.¹²⁸

Cada programa tendrá implementados distintos conjuntos de funciones matemáticas y parámetros usados para evaluar las fuerzas y el comportamiento de los átomos que interactúan entre sí, independientemente del programa el campo de fuerzas es fundamental para la técnica.¹²⁹ Algunos de los campos de fuerza son: GROMOS (*Groningen Molecular Simulation*),¹³⁰ AMBER (*Assisted Model Building and Energy Refinement*),¹³¹ CHARMM (*Chemistry at Harvard Molecular Mechanics*),^{132, 133} entre otros.

Para ser más específico, se utilizó el campo de fuerzas de CHARMM en el programa NAMD (*not (just) another molecular dynamics program*) paralelizado en gpus (*graphics processing unit*) sobre supercomputadoras.^{127, 132, 133}

Fundamentalmente, en las simulaciones de dinámica molecular se resuelven las ecuaciones de movimiento de Newton (ec. 1), al aceptar una aproximación clásica del sistema.¹³⁰

$$\vec{F}_i(t_n) = m_i \ddot{\vec{r}}_i(t_n), \quad n = 0, 1, 2, \dots \quad (1)$$

Donde \vec{F}_i es la fuerza total que actúa sobre el i -ésimo átomo, m_i su masa, $\ddot{\vec{r}}_i$ la segunda derivada temporal del vector de posición y t_n el valor del tiempo en el que se encuentra el sistema.

Debido a que la fuerza es conservativa, se puede reescribir la ecuación 1 como:

$$F_i = -\nabla_i U(\vec{R}) \quad \vec{R} = r_1, r_2, \dots, r_N \quad (2)$$

Donde ∇_i es el gradiente perteneciente al componente espacial i-ésimo y $U(\vec{R})$ es el potencial, que en el caso de CHARMM el potencial se escribe como en la ecuación 3.

$$U(\vec{R}) = \sum_{enlaces} k_i^{enlaces} (r_i - r_0)^2 + \sum_{angulos} k_i^{angulos} (\theta_i - \theta_0)^2 + \sum_{diedral} k_i^{diedral} [1 + \cos(n_i)] (r_i - r_0)^2 + \sum_{impropio} k_w^{impropio} (w_i - w_0)^2 + \sum_{U-B} k_i^{U-B} (u_i - u_0)^2 + \sum_i \sum_{i \neq j} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum \sum \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} \quad (3)$$

Donde las expresiones matemáticas de la ecuación 3 representan los descriptores estructurales de la interacción de los átomos en nuestro sistema (Figura B.1).

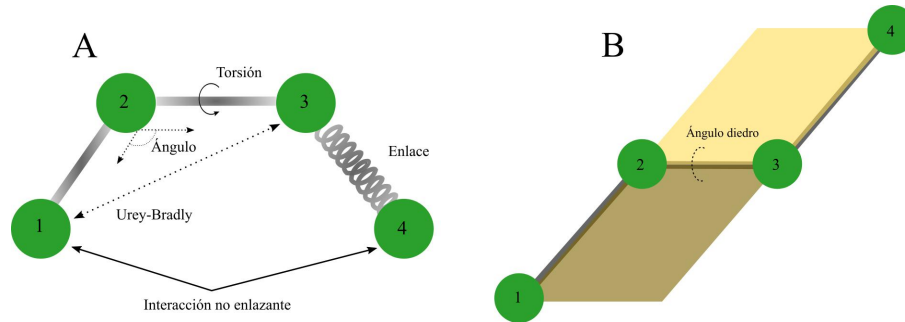


Figura B.1 Esquemas de los descriptores estructurales presentes en el sistema. A) Interacciones enlazantes y no enlazantes descritas en las ecuaciones del campo de fuerzas CHARMM. B) Esquema del ángulo de diedro o de torsión. Figura realizada en el programa Inkscape¹²¹.

De la ecuación 3 y la figura 8 se pueden diferenciar dos tipos de descriptores estructurales, la primera que corresponde a la interacción enlazante de nuestro sistema y la segunda la que corresponde a la no enlazante.

Los primeros cuatro términos de la ecuación 3 representan las expresiones matemáticas que describen la interacción enlazante del sistema. De los cuales se observa el primer término que corresponde al enlace entre dos átomos contiguos y su movimiento es descrito con la ecuación de Hook que representa el movimiento de un resorte. El segundo y tercer término

corresponden a ángulos formados por tres y cuatro átomos respectivamente, estos dos términos ayudan a describir la orientación y restricciones atómicas. El cuarto término ayuda a mantener la quiralidad y para mantener la planaridad sobre ciertos átomos planos.

Por otro lado, los últimos tres términos de la ecuación 3 corresponden a las interacciones no enlazantes, el potencial de CHARMM introduce un término llamado Urey-Bradly que corresponde a la interacción no covalente entre dos átomos en la posición 1-3, de esta manera aproxima los modos vibracionales para las simulaciones. El penúltimo término corresponde a la interacción de Van der Waals descrita por la ecuación de Lennard-Jones que corresponde a la interacción de dos átomos no unidos a una determinada distancia y describe las fuerzas atractivas y repulsivas de dichos átomos. El último término describe las interacciones electrostáticas calculadas entre pares de átomos existentes, sin tomar los pares más próximos, debido a la mínima contribución que aportan.^{132, 133}

Para realizar simulaciones de dinámica molecular es necesario realizar tres puntos importantes donde se integra la información antes mencionada.¹³⁴

1. **El diseño de un estado inicial:** Es una parte crucial de la simulación debido a que la captura de información subsecuente depende en gran medida del punto inicial de los átomos que componen al sistema. Se crean las condiciones necesarias para nuestro experimento, es decir, se construyen las configuraciones espaciales y los parámetros topológicos de los componentes de nuestro sistema. De igual modo, se realizan pre-fases con restricciones que ayudan a minimizar y equilibrar el sistema completo.
2. **Las simulaciones de dinámica molecular:** Una vez realizado el paso anterior, se calculan las fuerzas de cada átomo mediante un algoritmo para resolver numéricamente las ecuaciones del campo de fuerzas que rigen el sistema. Los cambios asociados a la evolución temporal de los átomos (trayectoria) se registran a lo largo del tiempo de simulación.
3. **El análisis de datos:** En este punto, se realizan diversos análisis para explorar y analizar la información almacenada en las trayectorias.

B.1.1 Metodología general

En esta sección se muestra la metodología llevada a cabo en el presente trabajo de investigación.

Las simulaciones de dinámica molecular de macromoléculas se puede diferenciar en dos casos generales que dependen del ambiente en el que se encuentra el sistema biológico.

El primer caso es un sistema acuoso, la macromolécula solo está rodeada de iones y agua (p. ej. Figura C.1). Para este caso se estudian los comportamientos del tetrámero del péptido β amiloide y el sistema constituido por el receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ de la especie *Homo sapiens* ($\alpha 7$ nAChR).

Por otra parte, el segundo caso es para un sistema embebido en una membrana bilipídica, además de estar rodeado de iones y moléculas de agua (Figura C.2).

En particular, este caso se utiliza en dos situaciones. La primera para estudiar el sistema endocannabinoide, donde se construyen complejos del receptor cannabinoide tipo 1 de la especie *Rattus norvegicus* (CB1) con cannabidiol (CBD), CB1 con un antagonista bien establecido conocido como AM251, además de explorar el novedoso receptor acoplado a proteína G 55 de la especie *Rattus norvegicus* (GPR55) con CBD y GPR55 con un agonista conocido como ML186.

La segunda situación fue para estudiar el sistema constituido por el receptor adrenérgico α_{2A} de la especie *Homo sapiens* (α_{2A} AR) con un tetrámero del péptido β amiloide (Figura C.5).

Los pasos para realizar las simulaciones de dinámica molecular en cualquiera de los dos casos se observan en la figura B.2.

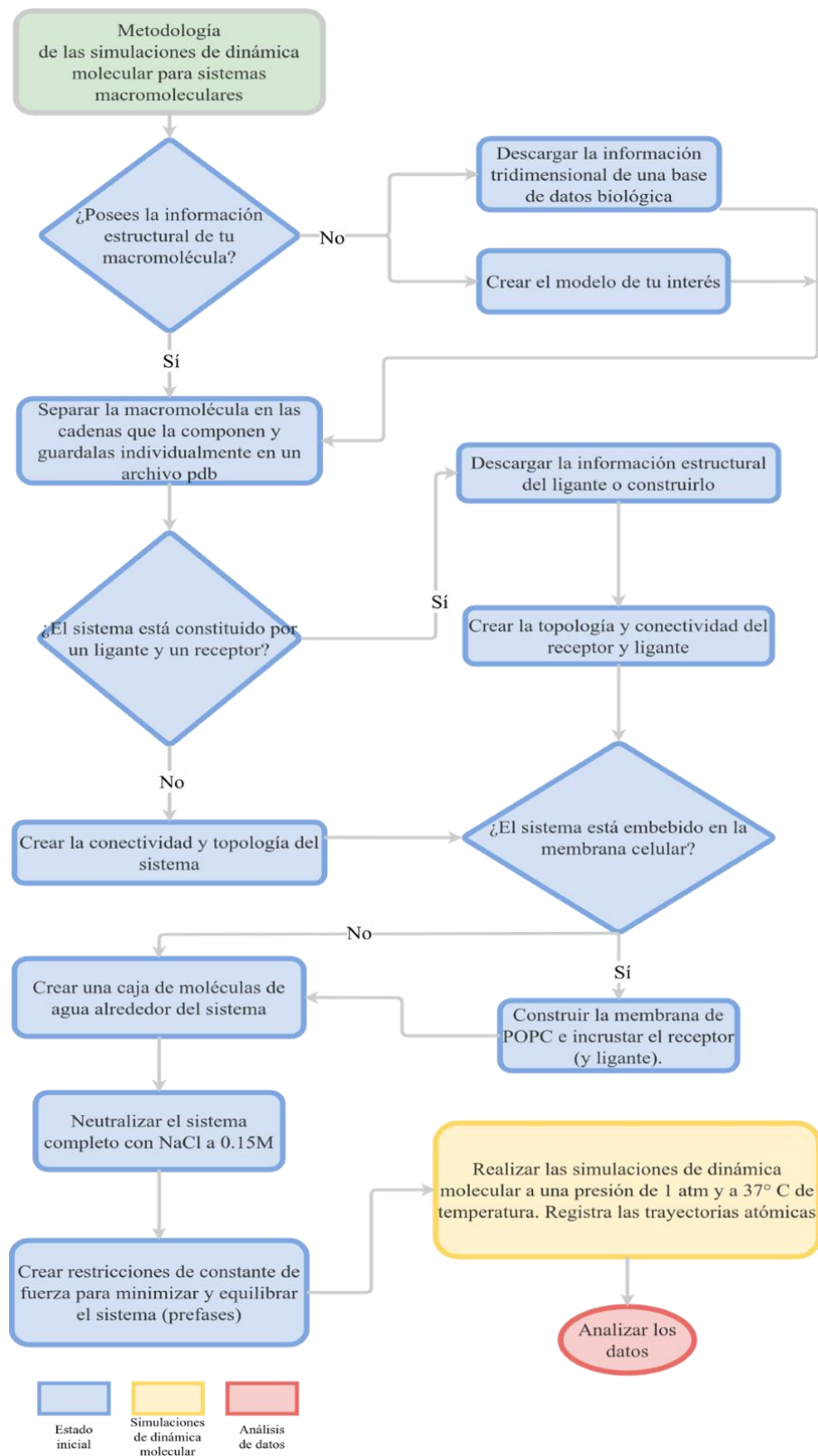


Figura B.2 Diagrama de flujo general para realizar simulaciones de dinámica molecular de macromoléculas.

B.1.2 Simulaciones de dinámica molecular para sistemas en medio acuoso

Las simulaciones atomísticas de dinámica molecular se realizaron con el programa NAMD y con un campo de fuerzas de tipo CHARMM.^{127, 131, 133}

Por otro lado, el otro tipo de sistema tiene la característica de estar solo rodeado de un medio acuoso (p. ej. Figura C.1), para el caso del estudio del tetrámero del péptido β amiloide y para el complejo A β O/ α 7 nAChR el protocolo utilizado es el siguiente:

El primer paso es obtener las estructuras que componen al sistema.

Una vez que se tengan las estructuras se procede a realizar *scripts* en el lenguaje *Tool Command Language* (TCL)¹³⁵ para utilizar el programa *Visual Molecular Dynamics* (VMD)⁵⁰ y crear la topología de la proteína para cada cadena que compone el sistema. Para ello se separan en archivos distintos para cada cadena respectivamente y se reconstruyen las coordenadas y conectividades de cada residuo.

Posteriormente, se hidrata el sistema formando una caja de moléculas de agua (TIP3P) alrededor de la macromolécula y se ioniza el sistema con iones de cloruro (Cl⁻) y de sodio (Na⁺) a una concentración de 0.15 M, de esta manera se puede neutralizar el sistema completo. A continuación, se realiza una pre dinámica (para minimizar y equilibrar el sistema) se crean tres fases preliminares que incluyen la presencia de un potencial armónico en los átomos distintos al hidrógeno.³⁶

En la primera fase, las restricciones fuertes fueron impuestas utilizando una constante de fuerza de 1.0 kcal/mol A² en 300,000 pasos con un tamaño de paso de 2.0 fs.

En las siguientes dos fases, la magnitud de la constante armónica se reduce, primero a 0.5 kcal/mol A² y finalmente a 0.1 kcal/mol A², donde se realizan 300,000 pasos con un tamaño de paso de 2.0 fs para cada fase.

Por último, se realiza la simulación de dinámica molecular extensa a lo largo de 1000 ns de tiempo que equivale a realizar 500,000,000 pasos con un tamaño de paso de 2.0 fs. Posteriormente, se analizan los datos.

B.1.3 Simulaciones de dinámica molecular para sistemas embebidos en membranas.

Las simulaciones atomísticas de dinámica molecular se realizaron con el programa NAMD y con un campo de fuerzas de tipo CHARMM.^{127, 132, 133}

Como los sistemas están compuestos por receptores GPCRs, estos se encuentran embebidos en la membrana (p. ej. Figura C.2), por lo que es necesario seguir un protocolo particular para este tipo de sistemas. Como primer paso, es importante tener las estructuras que componen nuestro sistema, principalmente el receptor y ligante.

Posteriormente, se realiza una serie de *scripts* en lenguaje *Tool Command Language* (TCL)¹³⁵ para utilizar el programa *Visual Molecular Dynamics* (VMD)⁴⁸ y crear la topología de la proteína.

Donde se reconstruyen las coordenadas y conectividades de cada residuo para el receptor, además de agregar los átomos de hidrógeno representando el estado más probable de protonación a un pH neutro.

Como el complejo está embebido en una membrana de fosfolípidos. Se crea una membrana simétrica de POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina) mediante el programa VMD, en particular el subprograma denominado “membrane builder”, después, se traslapa la membrana con el receptor utilizando *scripts* en VMD para fusionar estructuras.^{44-46, 91, 92}

Por otro lado, se eliminan los lípidos que tengan contacto con los residuos aminoacídicos y a una distancia aproximada de 0.4 Å de la cadena principal del receptor.

A continuación, se hidratar el sistema con moléculas de agua (TIP3P) y se ioniza el sistema con iones cloruro (Cl⁻) y sodio (Na⁺) a una concentración salina fisiológica de 0.15 M, de esta manera se neutraliza el sistema completo.

En una pre dinámica (para minimizar y equilibrar el sistema completo) se crean seis fases preliminares.

En la primera fase, se fija todo el sistema excepto las colas de los lípidos y se realizan 500,000 pasos con un tamaño de paso de 2.0 fs.

En la segunda fase, se fijan los átomos del receptor, se crean restricciones fuertes (de 1.0 kcal/mol Å²) para los átomos del lípido que se fijaron en el cálculo anterior. Además, que se restringe que las moléculas de agua penetren la membrana y se realizan otros 500,000 pasos.

En la tercera y cuarta fase, se crean restricciones fuertes para el receptor (de 1.0 kcal/mol Å^2). El resto de los átomos son libres de moverse, no obstante, se mantiene la limitación para las moléculas de agua sólo hasta la tercera fase.

En las dos últimas fases, la magnitud de la constante armónica es disminuida, primero a 0.5 kcal/mol Å^2 y por último a 0.1 kcal/mol Å^2 , en cada caso, se realizan 500,000 pasos a 2.0 fs.

Por último, se realizan simulaciones de dinámica molecular extensas a lo largo de 1000 ns de tiempo que equivale a realizar 500,000,000 pasos con un tamaño de paso de 2.0 fs a una temperatura y presión constante (37 °C y 1 atm, respectivamente).

Posteriormente, se analizan los datos.

B.2 Modelado por homología

Otra técnica que se utilizó en el presente trabajo fue modelado por homología. La técnica es esencial en la investigación estructural de proteínas, debido a que se basa en la predicción de la estructura tridimensional a partir de una proteína homóloga (plantilla) y la secuencia lineal objetivo. Considerando que proteínas relacionadas evolutivamente conservan estructuras semejantes.

Para utilizar la técnica es necesario buscar una plantilla (estructura tridimensional determinada experimentalmente) adecuada, para posteriormente alinear las secuencias de la proteína objetivo y la secuencia de la plantilla. Cuando se tenga la plantilla tridimensional y la alineación de secuencias se usa un programa que ayude a transformar dicha información en la estructura tridimensional deseada (Figura B.3).

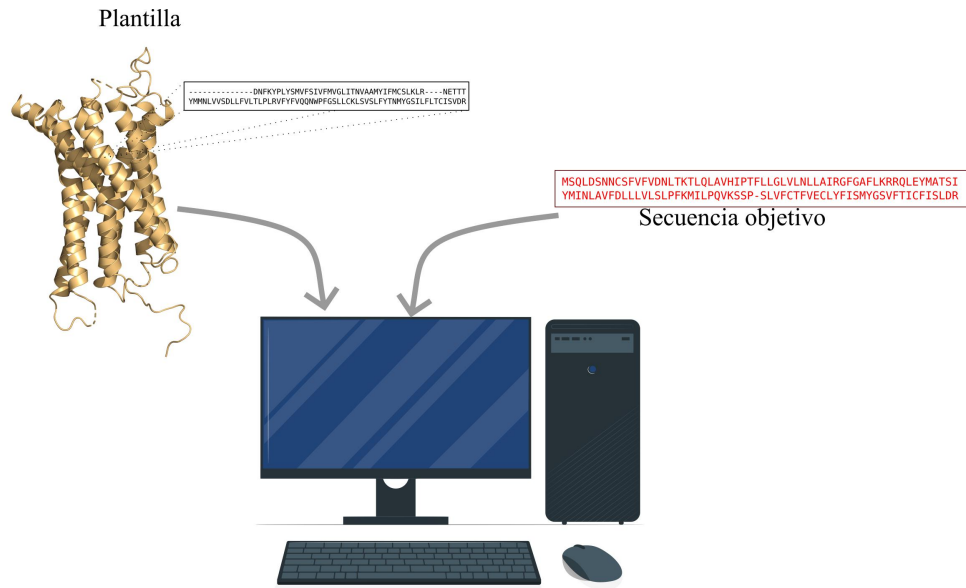


Figura B.3 Representación gráfica del modelado por homología

Existen diversos programas y servidores *online* para realizar el modelado, en particular se utilizó el protocolo del programa MODELLER para realizar dicha técnica.^{38, 39, 108}

B.3 Acoplamiento molecular

Es una técnica que ayuda a predecir la conformación espacial y energética más favorable en la interacción entre una molécula (ligante) y una diana biológica (receptor) mediante métodos computacionales. El proceso se basa en algoritmos y funciones de energía que evalúan la complementariedad entre las superficies de la proteína y el ligante, así como las interacciones no covalentes que contribuyen significativamente a la estabilidad de la unión.

De igual modo que en diversas técnicas computacionales el acoplamiento molecular se puede realizar con diferentes programas o servidores *online*. En cada programa se tienen implementaciones diferentes de los algoritmos y funciones de puntuación que ayudan a evaluar las poses que explora el ligante a las inmediaciones del receptor en búsqueda del mejor modo de enlace (Figura B.4).

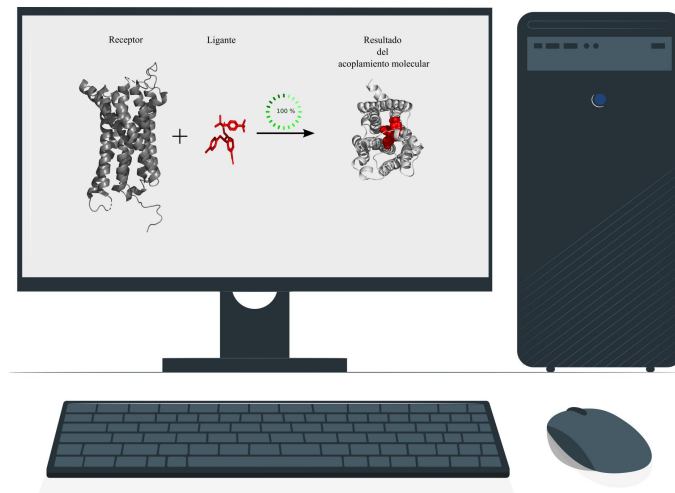


Figura B.4 Representación gráfica del acoplamiento molecular.

Para nuestro trabajo se utilizaron protocolos de programas como Autodock Vina y servidores como Rosie que es un servidor en línea basado en el protocolo de Rosetta (programa de acoplamiento molecular).^{90, 112, 125, 126}

Apéndice C

C. Estructuras macromoleculares

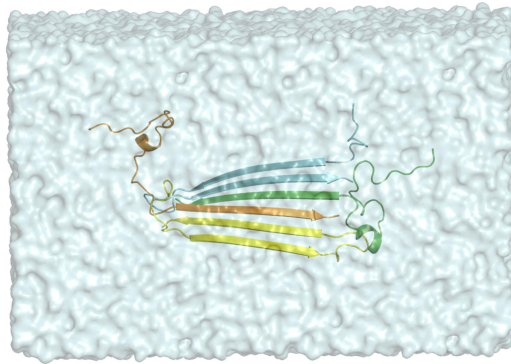


Figura C.1 Ejemplo de un sistema macromolecular en un medio acuoso (moléculas de agua de tipo TIP3P) con una concentración salina de NaCl a 0.15 M. Figura realizada en el programa Pymol¹²⁰ e Inkscape¹²¹.

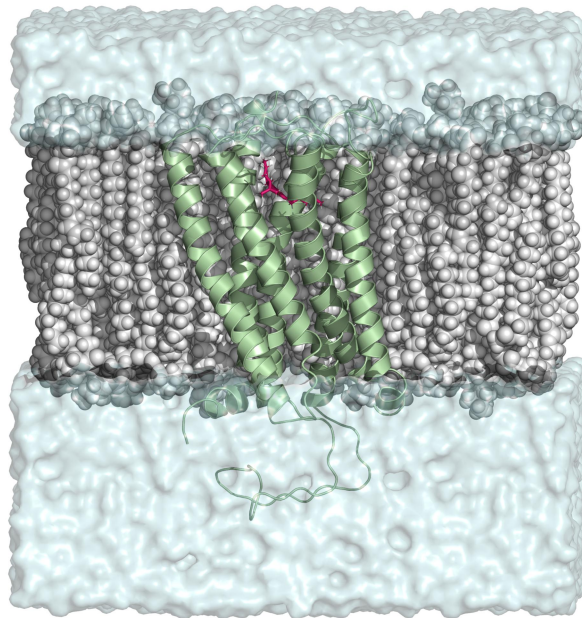


Figura C.2 Ejemplo de un sistema macromolecular embebido en una membrana bilipídica (POPC), rodeado por un medio acuoso con una concentración salina de NaCl a 0.15 M. Figura realizada en el programa Pymol¹²⁰ e Inkscape¹²¹.

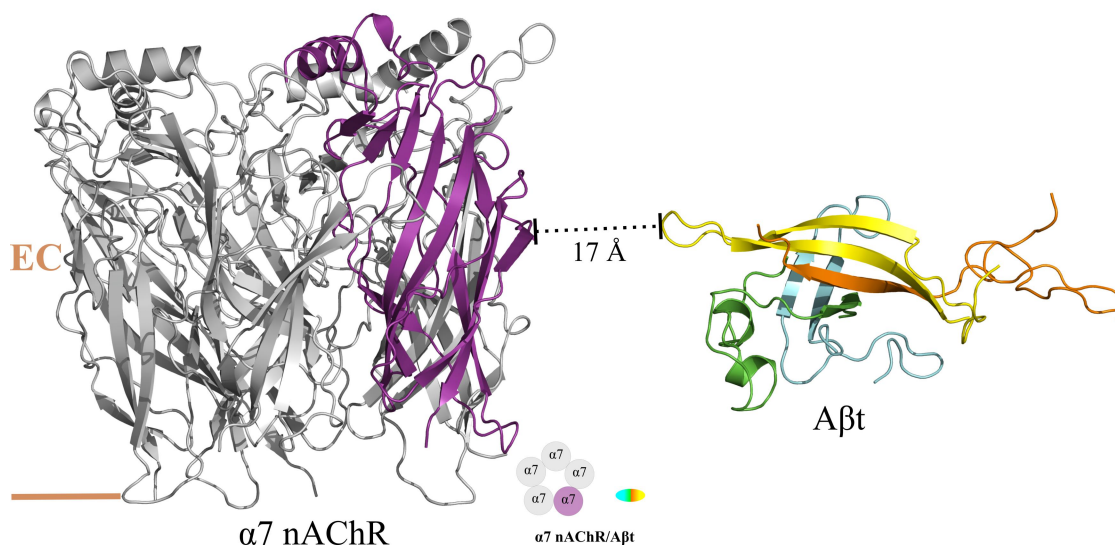


Figura C.3 Estructura inicial del receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR) en presencia del tetrámero del péptido β amiloide. Figura realizada en el programa Pymol¹²⁰ e Inkscape¹²¹.

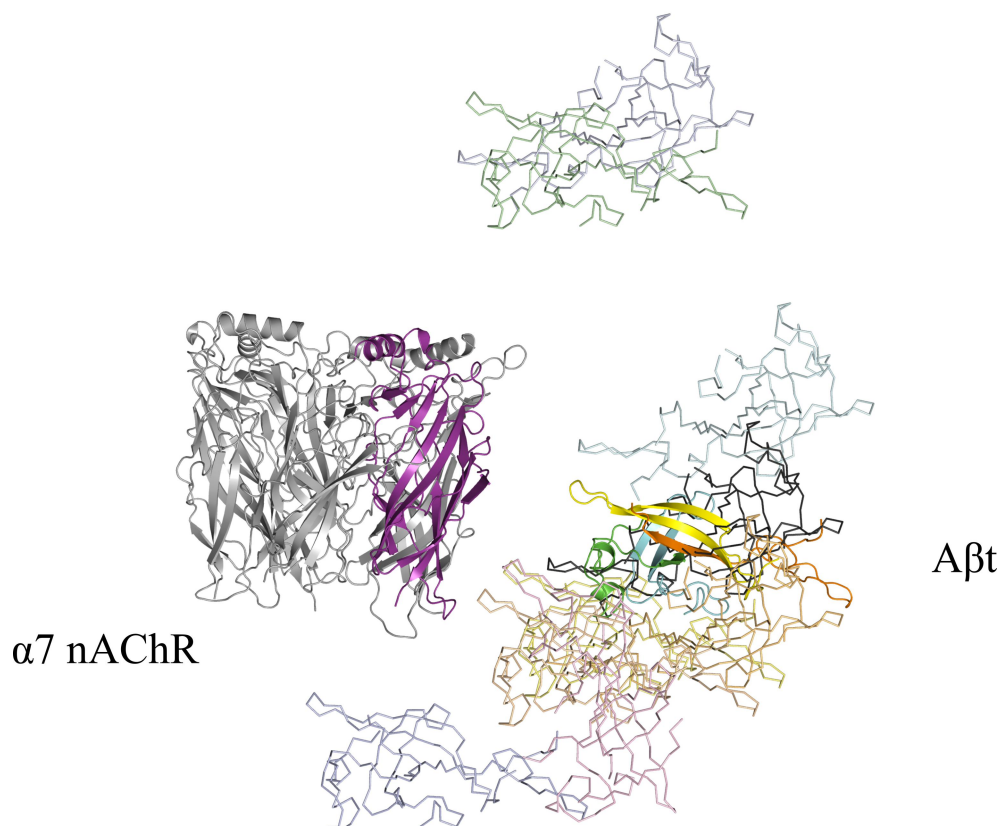


Figura C.4 Estructuras iniciales del receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR) en presencia del tetrámero del péptido β amiloide en diferentes posiciones, se representan los tetrámeros en diferentes colores y en listones a excepción del tetrámero que presenta interacción con el receptor, este se representa en color cian (cadena A), color verde (cadena B), color amarillo (cadena C), color naranja (cadena D) y en dibujo. Figura realizada en el programa Pymol¹²⁰ e Inkscape¹²¹.

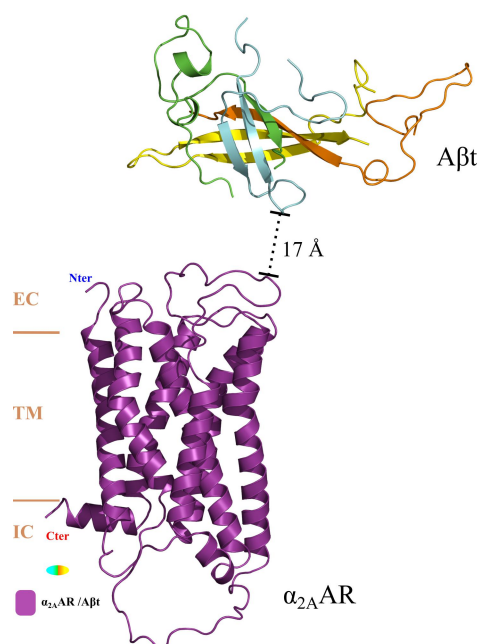


Figura C.5 Estructura inicial del receptor adrenérgico α_{2A} ($\alpha_{2A}AR$) en presencia del tetrámero del péptido β amiloide. Figura realizada en el programa Pymol¹²⁰ e Inkscape¹²¹.

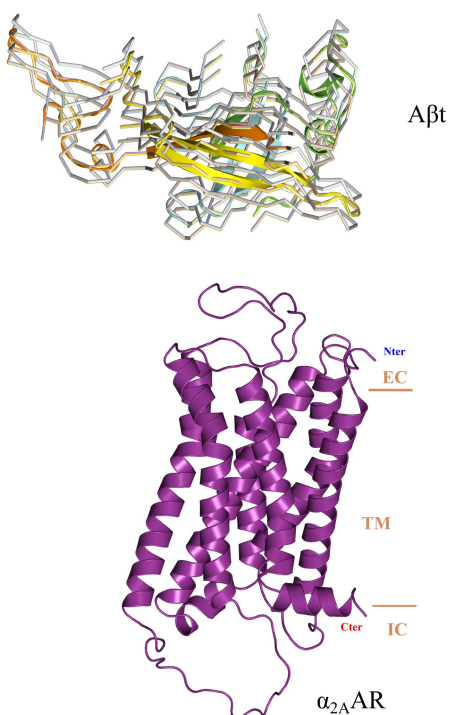


Figura C.6 Estructuras iniciales del receptor adrenérgico α_{2A} ($\alpha_{2A}AR$) en presencia del tetrámero del péptido β amiloide en diferentes posiciones, se representan los tetrámeros en diferentes colores y en listones a excepción del tetrámero que presenta interacción con el receptor, este se representa en color cian (cadena A), color verde (cadena B), color amarillo (cadena C), color naranja (cadena D) y en dibujo. Figura realizada en el programa Pymol¹²⁰ e Inkscape¹²¹.

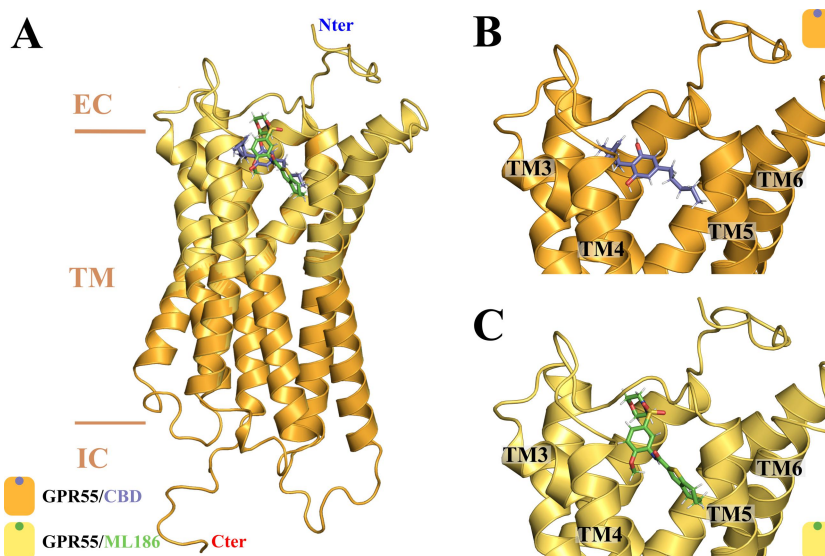


Figura C.7 Estructuras de los complejos iniciales del CB1/CBD y CB1/AM251. A) Vista lateral del complejo CB1/CBD y CB1/AM251. Sitios de unión al ligante del B) compuesto CBD y C) del antagonista AM251 seleccionados de cálculos de acoplamiento molecular. Figura realizada en el programa Pymol¹²⁰ e Inkscape¹²¹.

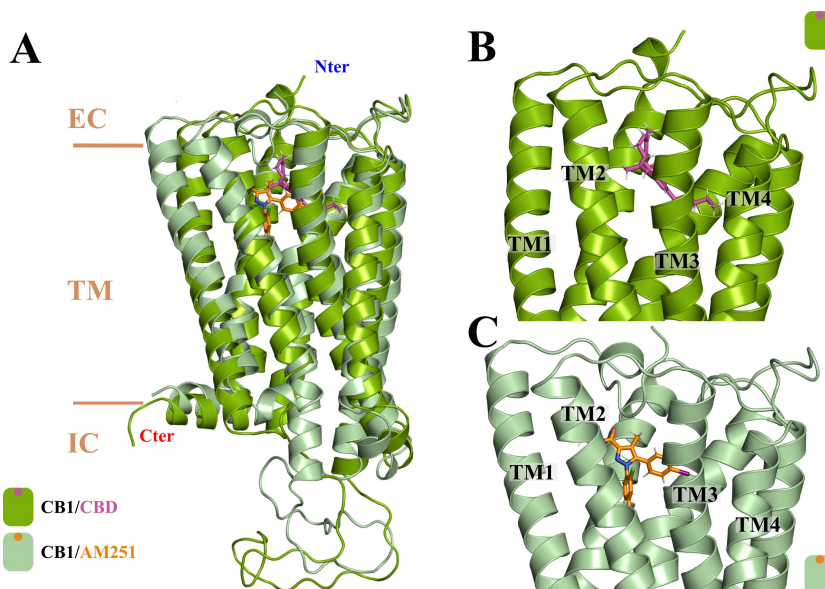


Figura C.8 Estructuras de los complejos iniciales del GPR55/CBD y GPR55/ML186. A) Vista lateral del complejo GPR55/CBD y GPR55/ML186. Sitios de unión al ligante del B) compuesto CBD y C) del agonista M186 seleccionados de cálculos de acoplamiento molecular. Figura realizada en el programa Pymol¹²⁰ e Inkscape¹²¹.

Apéndice D

D. Secuencias lineales y ligantes

En este apéndice se encontrarán las secuencias utilizadas a lo largo del trabajo. Así como las alineaciones de secuencia utilizadas para realizar el modelado por homología y detalles con respecto a la información lineal de las proteínas empleadas.

10
20
30
40

|
|
|
|

Aβ DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA

Figura D.1 Secuencia del péptido β amiloide de 42 aminoácidos. Figura realizada en el programa Inkscape¹²¹.

	α1	β1	β2
α4	AHAEERLLKQLF	SGYNKWSRPVANISDVVLRVFGLSIAQLIDVDEKNQMMTTNVVKQEW	
α7	GEFQRKLYKELVKNYNPLERPVANDSQPLTVYFSLSLQIMDVDEKNQVLTNNIWLQMSW		
	β3	β4	β5 β6
α4	HDYKLRWDPADYENVTSIRI	PSELIWRPDI	VLYNNADGDFAVTHLTKAHLFHDGRVQWTP
α7	TDHYLQWNVSEYPGVKTVRFPDQGIWKPDIILYNSADERFDATFHTNVLVNSSGHCQYLP		
	β6'	β7	β8 β9
α4	PAIYKSSC	SIDVTFFPF	DQNC
α7	TMKFGSW	TYDKAKIDLVN	MHSRVDQLDFWESGEWVIVD
	PGIFKSSCYIDVRWFPFDVQHCKLKF		
	SGYGGWSDL - - QMQEADISGYIPNGEWDLVG		
	β10		
α4	AVGTYNTRKYECCAEIYPDITYAFVIRRLP*		
α7	IPGKRSERFYECCKEPYPDVTFVTMRRRT*		

Figura D.2 Alineamiento de las secuencias para generar el receptor nicotínico de acetilcolina α7 (α7nAChR) para la especie *Homo sapiens*. Secuencia de la plantilla de la subunidad α4 (PDB: 5KXI) usado para generar la estructura terciaria del receptor α7nAChR. Las hebras beta de la subunidad α4 son indicadas en rectángulos color lila, y la hélice α1 en color violeta. El residuo triptófano (W) del bolsillo de unión al ligante están coloreados en azul y las cisteínas que forman los puentes de disulfuro están coloreadas en rojo. Figura realizada en el programa Inkscape¹²¹.

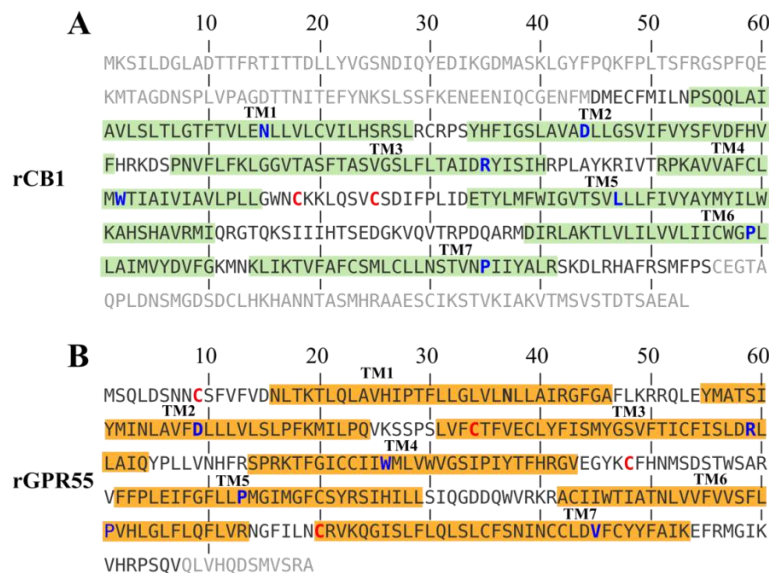


Figura D.3 Secuencias de aminoácidos de los receptores CB1 y GPR55 estudiados en este trabajo. A) Secuencia de aminoácidos del receptor cannabinoide de tipo 1 (CB1) de *Rattus norvegicus* (UNIPROT: P20272). Los segmentos excluidos del CB1 están coloreado en gris. Las hélices transmembranales (TM) están indicadas con rectángulos verde mientras que los residuos más conservados en cada TM están de color azul. Las cisteínas de los puentes de disulfuro son rojos. B) Secuencia de aminoácidos del receptor acoplado a proteínas G 5 (GPR55) de *Rattus norvegicus* (UNIPROT: F1MAK4). Los segmentos excluidos del modelo estructural del GPR55 están coloreado en gris. Las hélices transmembranales (TM) están indicadas con rectángulos naranjas mientras que los residuos más conservados en cada TM están de color azul. Las cisteínas de los puentes de disulfuro son rojos. Figura realizada en el programa Inkscape¹²¹.

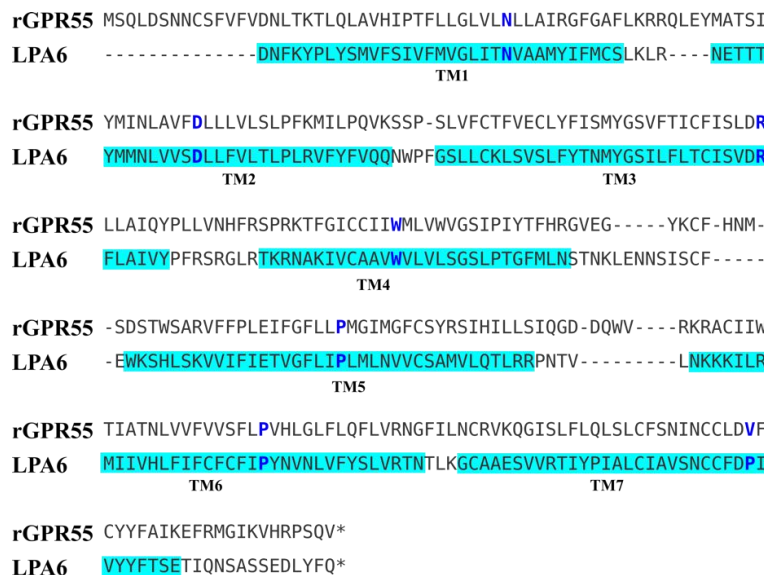


Figura D.4 Alineamiento de las secuencias para generar el receptor GPR55 para la especie *Rattus norvegicus*. Secuencia de la plantilla del receptor LPA6 (PDB: 5XSZ) usado para generar la estructura terciaria del receptor GPR55. Las siete hélices transmembranales (TM) del receptor LPA6 son indicadas en rectángulos color cian. Los residuos más conservados en cada TM están coloreados en azul. Figura realizada en el programa Inkscape¹²¹.

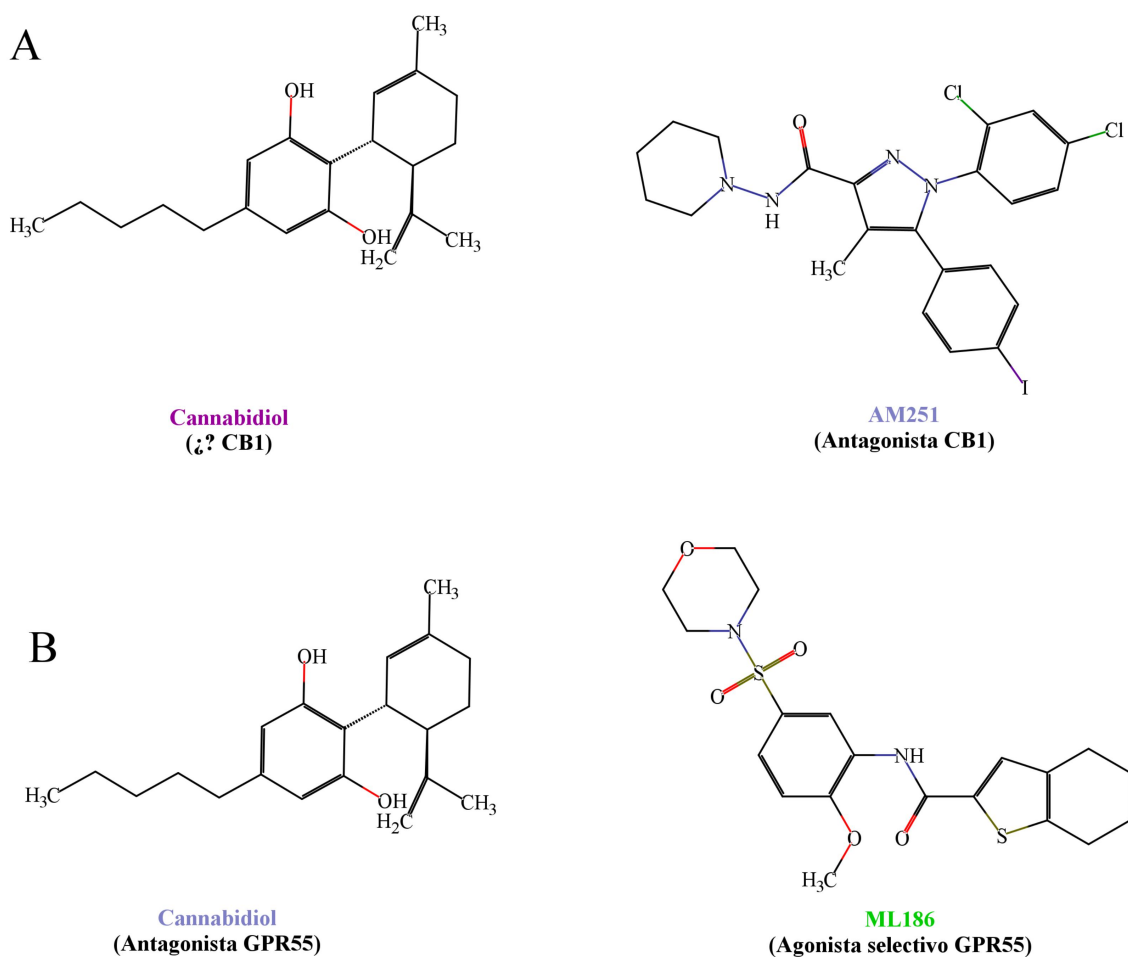


Figura D.5 Ligantes utilizados en la interacción con receptores del sistema endocannabinoide. A) Dos ligantes utilizados en la formación de complejos con el receptor CB1. AM251 es un antagonista de CB1 mientras que el CBD permanece incierta. B) Dos ligantes utilizados en la formación de complejos con el receptor GPR55. CDB es un antagonista mientras que el ML186 actúa como un agonista selectivo. Figura realizada en el programa MarvinSketch e Inkscape¹²¹.

Bibliografía

- [1] Dugger, B. N.; Dickson, D. W. Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2017**, *9* (7), a028035. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028035>.
- [2] Forman, M. S.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M-Y. Neurodegenerative Diseases: A Decade of Discoveries Paves the Way for Therapeutic Breakthroughs. *Nature Medicine* **2004**, *10* (10), 1055–1063. <https://doi.org/10.1038/nm1113>.
- [3] Gitler, A. D.; Dhillon, P.; Shorter, J. Neurodegenerative Disease: Models, Mechanisms, and a New Hope. *Disease Models & Mechanisms* **2017**, *10* (5), 499–502. <https://doi.org/10.1242/dmm.030205>.
- [4] *Home*. Alzheimer's Disease and Dementia. <https://www.alz.org>.
- [5] *Parkinson's Foundation*. Parkinson's Foundation. <https://www.parkinson.org>.
- [6] Liu, P.-P.; Xie, Y.; Meng, X.-Y.; Kang, J.-S. History and Progress of Hypotheses and Clinical Trials for Alzheimer's Disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2019**, *4* (1). <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0063-8>.
- [7] Braak, H.; Braak, E. Neuropathological Staging of Alzheimer-Related Changes. *Acta Neuropathologica* **1991**, *82* (4), 239–259. <https://doi.org/10.1007/bf00308809>.
- [8] Wood, A. J. J.; Calne, D. B. Treatment of Parkinson's Disease. *New England Journal of Medicine* **1993**, *329* (14), 1021–1027. <https://doi.org/10.1056/nejm199309303291408>.
- [9] Jellinger, K. A. Basic Mechanisms of Neurodegeneration: A Critical Update. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **2010**, *14* (3). <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01010.x>.
- [10] Crews, L.; Masliah, E. Molecular Mechanisms of Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *Human Molecular Genetics* **2010**, *19* (R1), R12–R20. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq160>.
- [11] Alzheimer, A. Über Eigenartige Erkrankung Der Hirnrinde. *All Z Psychiatr* **1907**, *64*, 146–148.
- [12] Bertram, L.; Tanzi, R. E. The Genetics of Alzheimer's Disease. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* **2012**, *107* (9780123858832), 79–100. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-385883-2.00008-4>.
- [13] Johnson, K. A.; Fox, N. C.; Sperling, R. A.; Klunk, W. E. Brain Imaging in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2012**, *2* (4), a006213–a006213. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006213>.
- [14] Hansson, O. Biomarkers for Neurodegenerative Diseases. *Nature Medicine* **2021**, *27* (6), 954–963. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01382-x>.
- [15] Heneka, M. T.; Carson, M. J.; El Khoury, J.; Landreth, G. E.; Brosseron, F.; Feinstein, D. L.; Jacobs, A. H.; Wyss-Coray, T.; Vitorica, J.; Ransohoff, R. M.; Herrup, K.; Frautschy, S. A.; Finsen, B.; Brown, G. C.; Verkhratsky, A.; Yamanaka, K.; Koistinaho, J.; Latz, E.; Halle, A.; Petzold, G. C. Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *The Lancet. Neurology* **2015**, *14* (4), 388–405. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5).
- [16] Benilova, I.; Karran, E.; De Strooper, B. The Toxic A β Oligomer and Alzheimer's Disease: An Emperor in Need of Clothes. *Nature neuroscience* **2012**, *15* (3), 349–357. <https://doi.org/10.1038/nn.3028>.

- [17] Shin, W. S.; Di, J.; Cao, Q.; Li, B.; Seidler, P. M.; Murray, K. A.; Bitan, G.; Jiang, L. Amyloid β -Protein Oligomers Promote the Uptake of Tau Fibril Seeds Potentiating Intracellular Tau Aggregation. *Alzheimer's Research & Therapy* **2019**, *11* (1). <https://doi.org/10.1186/s13195-019-0541-9>.
- [18] Cao, Q.; Shin, W. S.; Chan, H.; Vuong, C. K.; Dubois, B.; Li, B.; Murray, K. A.; Sawaya, M. R.; Feigon, J.; Black, D. L.; Eisenberg, D. S.; Jiang, L. Inhibiting Amyloid- β Cytotoxicity through Its Interaction with the Cell Surface Receptor LILRB2 by Structure-Based Design. *Nature Chemistry* **2018**, *10* (12), 1213–1221. <https://doi.org/10.1038/s41557-018-0147-z>.
- [19] Mroczko, B.; Groblewska, M.; Litman-Zawadzka, A.; Kornhuber, J.; Lewczuk, P. Amyloid β Oligomers (A β Os) in Alzheimer's Disease. *Journal of Neural Transmission* **2017**, *125* (2), 177–191. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1820-x>.
- [20] Jarosz-Griffiths, H. H.; Noble, E.; Rushworth, J.; Hooper, N. Amyloid- β Receptors: The Good, the Bad, and the Prion Protein. *Journal of Biological Chemistry* **2016**, *291* (7), 3174–3183. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.702704>.
- [21] Smith, L. M.; Mikhail Kostylev; Lee, S.; Strittmatter, S. M. Systematic and Standardized Comparison of Reported Amyloid- β Receptors for Sufficiency, Affinity, and Alzheimer's Disease Relevance. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294* (15), 6042–6053. <https://doi.org/10.1074/jbc.ra118.006252>.
- [22] Zhang, F.; Gannon, M.; Chen, Y.; Yan, S.; Zhang, S.; Feng, W.; Tao, J.; Sha, B.; Liu, Z.; Saito, T.; Saido, T.; Keene, C. D.; Jiao, K.; Roberson, E. D.; Xu, H.; Wang, Q. β -Amyloid Redirects Norepinephrine Signaling to Activate the Pathogenic GSK3 β /Tau Cascade. *Science Translational Medicine* **2020**, *12* (526), eaay6931. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aay6931>.
- [23] Li, S.; Selkoe, D. J. A Mechanistic Hypothesis for the Impairment of Synaptic Plasticity by Soluble A β Oligomers from Alzheimer's Brain. *Journal of Neurochemistry* **2020**, *154* (6), 583–597. <https://doi.org/10.1111/jnc.15007>.
- [24] Whitfield, J. F.; Rennie, K.; Chakravarthy, B. Alzheimer's Disease and Its Possible Evolutionary Origin: Hypothesis. *Cells* **2023**, *12* (12), 1618–1618. <https://doi.org/10.3390/cells12121618>.
- [25] Samdin, T. D.; Jones, C. R.; Guaglianone, G.; Kreutzer, A. G.; J. Alfredo Freites; Wierzbicki, M.; Nowick, J. S. A β -Barrel-like Tetramer Formed by a β -Hairpin Derived from A β . *Chemical Science* **2024**, *15* (1), 285–297. <https://doi.org/10.1039/d3sc05185d>.
- [26] Ciudad, S.; Puig, E.; Botzanowski, T.; Meigooni, M.; Arango, A. S.; Do, J.; Mayzel, M.; Bayoumi, M.; Chaignepain, S.; Maglia, G.; Cianferani, S.; Orekhov, V.; Tajkhorshid, E.; Bardiaux, B.; Carulla, N. A β (1-42) Tetramer and Octamer Structures Reveal Edge Conductivity Pores as a Mechanism for Membrane Damage. *Nature Communications* **2020**, *11* (1), 3014. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16566-1>.
- [27] Puig, E.; Tolchard, J.; Riera, A.; Natàlia Carulla. Somatostatin, an *in Vivo* Binder to A β Oligomers, Binds to BPF_{A β (1-42)} Tetramer. *bioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)* **2020**. <https://doi.org/10.1101/2020.05.11.088153>.
- [28] Liu, Q.; Kawai, H.; Berg, D. K. β -Amyloid Peptide Blocks the Response of α 7-Containing Nicotinic Receptors on Hippocampal Neurons. *PNAS* **2001**, *98* (8), 4734–4739. <https://doi.org/10.1073/pnas.081553598>.
- [29] Wang, H.-Y.; Lee, D. H. S.; Davis, C. B.; Shank, R. P. Amyloid Peptide A β 1-42 Binds Selectively and with Picomolar Affinity to α 7 Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Journal of Neurochemistry* **2002**, *75* (3), 1155–1161. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0751155.x>.
- [30] Wang, H.-Y.; Lee, D. H. S.; D'Andrea, M. R.; Peterson, P. A.; Shank, R. P.; Reitz, A. B. β -Amyloid1-42 Binds to α 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor with High Affinity. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275* (8), 5626–5632. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5626>.
- [31] Tong, M.; Arora, K.; White, M.; Nichols, R. L. Role of Key Aromatic Residues in the Ligand-Binding Domain of α 7 Nicotinic Receptors in the Agonist Action of β -Amyloid. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286* (39), 34373–34381. <https://doi.org/10.1074/jbc.m111.241299>.

- [32] Lasala, M.; Fabiani, C.; Corradi, J.; Antollini, S.; Bouzat, C. Molecular Modulation of Human $\alpha 7$ Nicotinic Receptor by Amyloid- β Peptides. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **2019**, *13*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00037>.
- [33] Selkoe, D. J.; Hardy, J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease at 25 Years. *EMBO molecular medicine* **2016**, *8* (6), 595–608. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606210>.
- [34] Hayden, E. Y.; Teplow, D. B. Amyloid β -Protein Oligomers and Alzheimer's Disease. *Alzheimer's Research & Therapy* **2013**, *5* (6), 60. <https://doi.org/10.1186/alzrt226>.
- [35] Tang, Z.; Kaisei Motoyoshi; Honda, T.; Nakamura, H.; Murayama, T. Amyloid Beta-Peptide 25–35 (A β_{25-35}) Induces Cytotoxicity *Via* Multiple Mechanisms: Roles of the Inhibition of Glucosylceramide Synthase by A β_{25-35} and Its Protection by D609. *Biological & pharmaceutical bulletin* **2021**, *44* (10), 1419–1426. <https://doi.org/10.1248/bpb.b21-00204>.
- [36] Rita, A.; Cannistraro, S. Molecular Dynamics of Water at the Protein–Solvent Interface. *Journal of Physical Chemistry B* **2002**, *106* (26), 6617–6633. <https://doi.org/10.1021/jp020100m>.
- [37] Krieger, E.; Nabuurs, S. B.; Vriend, G. *Structural Bioinformatics*; Bourne, P. E., Weissig, H., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2003. <https://doi.org/10.1002/0471721204>.
- [38] Bitencourt-Ferreira, G.; de Azevedo, W. F. Homology Modeling of Protein Targets with MODELLER. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* **2019**, *2053*, 231–249. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9752-7_15.
- [39] Webb, B.; Sali, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Current Protocols in Bioinformatics* **2016**, *54* (1). <https://doi.org/10.1002/cpbi.3>.
- [40] Bateman, A.; Martin, M.-J.; Orchard, S.; Magrane, M.; Ahmad, S.; Alpi, E.; Bowler-Barnett, E. H.; Britto, R.; Bye-A-Jee, H.; Cukura, A.; Denny, P.; Dogan, T.; Ebenezer, T.; Fan, J.; Garmiri, P.; da Costa Gonzales, L. J.; Hatton-Ellis, E.; Hussein, A.; Ignatchenko, A.; Insana, G. UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research* **2022**, *51* (D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>.
- [41] Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* **1990**, *215* (3), 403–410.
- [42] Qu, L.; Zhou, Q. T.; Wu, D.; Zhao, S. W. Crystal Structures of the Alpha2A Adrenergic Receptor in Complex with an Antagonist RSC. **2019**. <https://doi.org/10.2210/pdb6kux/pdb>.
- [43] Hollingsworth, S. A.; Dror, R. O. Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron* **2018**, *99* (6), 1129–1143. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.011>.
- [44] Rebolledo-Bustillo, M.; Garcia-Gomez, D.; Morales Dávila, E.; Castro, M. E.; Caballero, N. A.; Melendez, F. J.; Baizabal-Aguirre, V. M.; Sanchez-Gaytan, B. L.; Perez-Aguilar, J. M. Structural Basis of the Binding Mode of the Antineoplastic Compound Motixafortide (BL-8040) in the CXCR4 Chemokine Receptor. *International journal of molecular sciences* **2023**, *24* (5), 4393–4393. <https://doi.org/10.3390/ijms24054393>.
- [45] Rangel-Galván, M.; Rangel, A.; Romero-Méndez, C.; Morales Dávila, E.; Castro, M. E.; Caballero, N. A.; Meléndez, F. J.; Sanchez-Gaytan, B. L.; Meza, U.; Perez-Aguilar, J. M. Inhibitory Mechanism of the Isoflavone Derivative Genistein in the Human $ca_v3.3$ Channel. *ACS chemical neuroscience* **2021**, *12* (4), 651–659. <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.0c00684>.
- [46] Morales Dávila, E.; Patricio, F.; Rebolledo-Bustillo, M.; Garcia-Gomez, D.; Carlos, J.; Sánchez-Gaytán, B. L.; Limón, I. D.; Perez-Aguilar, J. M. Interacting Binding Insights and Conformational Consequences of the Differential Activity of Cannabidiol with Two Endocannabinoid-Activated G-Protein-Coupled Receptors. *Frontiers in Pharmacology* **2022**, *13*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.945935>.
- [47] Ballesteros, J. A.; Weinstein, H. Integrated Methods for the Construction of Three-Dimensional Models and Computational Probing of Structure-Function Relations in G Protein-Coupled Receptors. *Methods in Neurosciences* **1995**, 366–428. [https://doi.org/10.1016/s1043-9471\(05\)80049-7](https://doi.org/10.1016/s1043-9471(05)80049-7).

- [48] Kim, D. E.; Jensen, D. R.; Feldman, D.; Tischer, D.; Saleem, A.; Chow, C. M.; Li, X.; Carter, L.; Milles, L.; Nguyen, H.; Kang, A.; Bera, A. K.; Peterson, F. C.; Volkman, B. F.; Ovchinnikov, S.; Baker, D. De Novo Design of Small Beta Barrel Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2023**, *120* (11). <https://doi.org/10.1073/pnas.2207974120>.
- [49] Carugo, O.; Pongor, S. A Normalized Root-Mean-Square Distance for Comparing Protein Three-Dimensional Structures. *Protein Science* **2008**, *10* (7), 1470–1473. <https://doi.org/10.1110/ps.690101>.
- [50] Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics* **1996**, *14* (1), 33–38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
- [51] Heinig, M.; Frishman, D. STRIDE: A Web Server for Secondary Structure Assignment from Known Atomic Coordinates of Proteins. *Nucleic Acids Research* **2004**, *32* (Web Server), W500–W502. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh429>.
- [52] Ho, T. N. T.; Abraham, N.; Lewis, R. J. Structure-Function of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Inhibitors Derived from Natural Toxins. *Frontiers in Neuroscience* **2020**, *14* (1). <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.609005>.
- [53] Cecon, E.; Dam, J.; Luka, M.; Gautier, C.; Chollet, A.-M.; Delagrangé, P.; Danober, L.; Jockers, R. Quantitative Assessment of Oligomeric Amyloid β Peptide Binding to $\alpha 7$ Nicotinic Receptor. *British journal of pharmacology* **2019**, *176* (18), 3475–3488. <https://doi.org/10.1111/bph.14688>.
- [54] Noviello, C. M.; Gharpure, A.; Mukhtasimova, N.; Cabuco, R.; Baxter, L.; Borek, D.; Sine, S. M.; Hibbs, R. E. Structure and Gating Mechanism of the $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Cell* **2021**, *184* (8), 2121–2134.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.049>.
- [55] Zhao, Y.; Liu, S.; Zhou, Y.; Zhang, M.; Chen, H.; Eric Xu, H.; Sun, D.; Liu, L.; Tian, C. Structural Basis of Human $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Activation. *Cell Research* **2021**, *31* (6), 713–716. <https://doi.org/10.1038/s41422-021-00509-6>.
- [56] Zhou, Q.; Yang, D.; Wu, M.; Guo, Y.; Guo, W.; Zhong, L.; Cai, X.; Dai, A.; Jang, W.; Shakhnovich, E. I.; Liu, Z.-J.; Stevens, R. C.; Lambert, N. A.; Babu, M. M.; Wang, M.-W.; Zhao, S. Common Activation Mechanism of Class a GPCRs. *eLife* **2019**, *8*, e50279. <https://doi.org/10.7554/eLife.50279>.
- [57] Chou, K. L. Adverse Events from the Treatment of Parkinson’s Disease. *Neurologic Clinics* **2008**, *26* (3), 65–83. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2008.05.003>.
- [58] Singer, C. Adverse Effects in the Treatment of Parkinson’s Disease. *Expert Review of Neurotherapeutics* **2002**, *2* (1), 105–118. <https://doi.org/10.1586/14737175.2.1.105>.
- [59] Andrzejewski, K.; Barbano, R.; Mink, J. Cannabinoids in the Treatment of Movement Disorders: A Systematic Review of Case Series and Clinical Trials. *Basal Ganglia* **2016**, *6* (3), 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.baga.2016.06.001>.
- [60] Buhmann, C.; Mainka, T.; Ebersbach, G.; Gandor, F. Evidence for the Use of Cannabinoids in Parkinson’s Disease. *Journal of Neural Transmission* **2019**, *126* (7), 913–924. <https://doi.org/10.1007/s00702-019-02018-8>.
- [61] Garcia-Arencibia, M.; Garcia, C.; Fernandez-Ruiz, J. Cannabinoids and Parkinson’s Disease. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets- CNS & Neurological Disorders* **2009**, *8* (6), 432–439. <https://doi.org/10.2174/187152709789824642>.
- [62] Stampanoni Bassi, M.; Sancesario, A.; Morace, R.; Centonze, D.; Iezzi, E. Cannabinoids in Parkinson’s Disease. *Cannabis and Cannabinoid Research* **2017**, *2* (1), 21–29. <https://doi.org/10.1089/can.2017.0002>.
- [63] Lastres-Becker, I.; Fernandez-Ruiz, J. An Overview of Parkinsons Disease and the Cannabinoid System and Possible Benefits of Cannabinoid-Based Treatments. *Current Medicinal Chemistry* **2006**, *13* (30), 3705–3718. <https://doi.org/10.2174/092986706779026156>.

- [64] Ryberg, E.; Larsson, N.; Sjögren, S.; Hjorth, S.; Hermansson, N-O.; Leonova, J.; Elebring, T.; Nilsson, K.; Drmota, T.; Greasley, P. J. The Orphan Receptor GPR55 Is a Novel Cannabinoid Receptor. *British Journal of Pharmacology* **2009**, *152* (7), 1092–1101. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707460>.
- [65] Sharir, H.; Abood, M. E. Pharmacological Characterization of GPR55, a Putative Cannabinoid Receptor. *Pharmacology & Therapeutics* **2010**, *126* (3), 301–313. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.02.004>.
- [66] Pertwee, R. G. GPR55: A New Member of the Cannabinoid Receptor Clan? *British Journal of Pharmacology* **2009**, *152* (7), 984–986. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707464>.
- [67] Kapur, A.; Zhao, P.; Sharir, H.; Bai, Y.; Caron, M. G.; Barak, L. S.; Abood, M. E. Atypical Responsiveness of the Orphan Receptor GPR55 to Cannabinoid Ligands. *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284* (43), 29817–29827. <https://doi.org/10.1074/jbc.m109.050187>.
- [68] Hall, W.; Lynskey, M. Evaluating the Public Health Impacts of Legalizing Recreational Cannabis Use in the United States. *Addiction* **2016**, *111* (10), 1764–1773. <https://doi.org/10.1111/add.13428>.
- [69] Wilkinson, S. T.; Yarnell, S.; Radhakrishnan, R.; Ball, S. A.; D'Souza, D. C. Marijuana Legalization: Impact on Physicians and Public Health. *Annual Review of Medicine* **2016**, *67* (1), 453–466. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-050214-013454>.
- [70] Crippa, J. A. S.; Hallak, J. E. C.; Zuardi, A. W.; Guimarães, F. S.; Tumas, V.; dos Santos, R. G. Is Cannabidiol the Ideal Drug to Treat Non-Motor Parkinson's Disease Symptoms? *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* **2019**, *269* (1), 121–133. <https://doi.org/10.1007/s00406-019-00982-6>.
- [71] Patricio, F.; Morales-Andrade, A. A.; Patricio-Martínez, A.; Limón, I. D. Cannabidiol as a Therapeutic Target: Evidence of Its Neuroprotective and Neuromodulatory Function in Parkinson's Disease. *Frontiers in Pharmacology* **2020**, *11*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.595635>.
- [72] Chagas, M. H. N.; Zuardi, A. W.; Tumas, V.; Pena-Pereira, M. A.; Sobreira, E. T.; Bergamaschi, M. M.; dos Santos, A. C.; Teixeira, A. L.; Hallak, J. E.; Crippa, J. A. S. Effects of Cannabidiol in the Treatment of Patients with Parkinson's Disease: An Exploratory Double-Blind Trial. *Journal of Psychopharmacology* **2014**, *28* (11), 1088–1098. <https://doi.org/10.1177/0269881114550355>.
- [73] Viana, M. de B.; Aquino, P. E. A. de; Estadella, D.; Ribeiro, D. A.; Viana, G. S. de B. *Cannabis Sativa* and Cannabidiol: A Therapeutic Strategy for the Treatment of Neurodegenerative Diseases?. *Medical Cannabis and Cannabinoids* **2022**, *5* (1), 207–219. <https://doi.org/10.1159/000527335>.
- [74] Scotter, E. L.; Abood, M. E.; Glass, M. The Endocannabinoid System as a Target for the Treatment of Neurodegenerative Disease. *British Journal of Pharmacology* **2010**, *160* (3), 480–498. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00735.x>.
- [75] Cassano, T.; Villani, R.; Pace, L.; Carbone, A.; Bukke, V. N.; Orkisz, S.; Avolio, C.; Serviddio, G. From Cannabis Sativa to Cannabidiol: Promising Therapeutic Candidate for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Pharmacology* **2020**, *11*, 124. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00124>.
- [76] Almeida, D. L.; Devi, L. A. Diversity of Molecular Targets and Signaling Pathways for CBD. *Pharmacology Research & Perspectives* **2020**, *8* (6). <https://doi.org/10.1002/prp2.682>.
- [77] Navarro, G.; Varani, K.; Lillo, A.; Vincenzi, F.; Rivas-Santisteban, R.; Raich, I.; Reyes-Resina, I.; Ferreiro-Vera, C.; Borea, P. A.; Sánchez de Medina, V.; Nadal, X.; Franco, R. Pharmacological Data of Cannabidiol- and Cannabigerol-Type Phytocannabinoids Acting on Cannabinoid CB1, CB2 and CB1/CB2 Heteromer Receptors. *Pharmacological Research* **2020**, *159*, 104940. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104940>.
- [78] Grotenhermen F. Pharmacology of Cannabinoids. *Neuro endocrinology letters* **2021**, *25* (1-2).
- [79] Batalla, A.; Bos, J.; Postma, A.; Bossong, M. G. The Impact of Cannabidiol on Human Brain Function: A Systematic Review. *Frontiers in Pharmacology* **2021**, *11*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.618184>.

- [80] Śmiarowska, M.; Białecka, M.; Machoy-Mokrzyńska, A. Cannabis and Cannabinoids: Pharmacology and Therapeutic Potential. *Neurologia i Neurochirurgia Polska* **2022**, *56* (1), 4–13. <https://doi.org/10.5603/PJNNS.a2022.0015>.
- [81] Shao, Z.; Yan, W.; Chapman, K.; Ramesh, K.; Ferrell, A. J.; Yin, J.; Wang, X.; Xu, Q.; Rosenbaum, D. M. Structure of an Allosteric Modulator Bound to the CB1 Cannabinoid Receptor. *Nature Chemical Biology* **2019**, *15* (12), 1199–1205. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0387-2>.
- [82] Austrich-Olivares, A.; García-Gutiérrez, M. S.; Illescas, L.; Gasparyan, A.; Manzanares, J. Cannabinoid CB1 Receptor Involvement in the Actions of CBD on Anxiety and Coping Behaviors in Mice. *Pharmaceuticals* **2022**, *15* (4), 473. <https://doi.org/10.3390/ph15040473>.
- [83] Zuardi, A.; Crippa, J.; Hallak, J.; Pinto, J.; Chagas, M.; Rodrigues, G.; Dursun, S.; Tumas, V. Cannabidiol for the Treatment of Psychosis in Parkinson's Disease. *Journal of Psychopharmacology* **2008**, *23* (8), 979–983. <https://doi.org/10.1177/0269881108096519>.
- [84] Chagas, M. H. N.; Eckeli, A. L.; Zuardi, A. W.; Pena-Pereira, M. A.; Sobreira-Neto, M. A.; Sobreira, E. T.; Camilo, M. R.; Bergamaschi, M. M.; Schenck, C. H.; Hallak, J. E. C.; Tumas, V.; Crippa, J. A. S. Cannabidiol Can Improve Complex Sleep-Related Behaviours Associated with Rapid Eye Movement Sleep Behaviour Disorder in Parkinson's Disease Patients: A Case Series. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics* **2014**, *39* (5), 564–566. <https://doi.org/10.1111/jcpt.12179>.
- [85] dos Santos, R. G.; Hallak, J. E. C.; Crippa, J. A. S. Neuropharmacological Effects of the Main Phytocannabinoids: A Narrative Review. *Cannabinoids and Neuropsychiatric Disorders* **2020**, 29–45. https://doi.org/10.1007/978-3-030-57369-0_3.
- [86] de Faria, S. M.; de Morais Fabrício, D.; Tumas, V.; Castro, P. C.; Ponti, M. A.; Hallak, J. E.; Zuardi, A. W.; Crippa, J. A. S.; Chagas, M. H. N. Effects of Acute Cannabidiol Administration on Anxiety and Tremors Induced by a Simulated Public Speaking Test in Patients with Parkinson's Disease. *Journal of Psychopharmacology* **2020**, *34* (2), 189–196. <https://doi.org/10.1177/0269881119895536>.
- [87] Genaro, K.; Fabris, D.; Arantes, A. L. F.; Zuardi, A. W.; Crippa, J. A. S.; Prado, W. A. Cannabidiol Is a Potential Therapeutic for the Affective-Motivational Dimension of Incision Pain in Rats. *Frontiers in Pharmacology* **2017**, *8*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00391>.
- [88] Patricio, F.; Morales Dávila, E.; Patricio-Martínez, A.; Carmen, D.; Martínez, I.; Aguilera, J.; Perez-Aguilar, J. M.; Limón, I. D. Intrapallidal Injection of Cannabidiol or a Selective GPR55 Antagonist Decreases Motor Asymmetry and Improves Fine Motor Skills in Hemiparkinsonian Rats. *Frontiers in Pharmacology* **2022**, *13*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.945836>.
- [89] Waterhouse, A.; Bertoni, M.; Bienert, S.; Studer, G.; Tauriello, G.; Gumienny, R.; Heer, F. T.; de Beer, T. A.; Rempfer, C.; Bordoli, L.; Lepore, R.; Schwede, T. SWISS-MODEL: Homology Modelling of Protein Structures and Complexes. *Nucleic Acids Research* **2018**, *46* (W1), W296–W303.
- [90] Trott, O.; Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *Journal of Computational Chemistry* **2009**, *31* (2), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
- [91] Perez-Aguilar, J. M.; Shan, J.; LeVine, M. V.; Khelashvili, G.; Weinstein, H. A Functional Selectivity Mechanism at the Serotonin-2A GPCR Involves Ligand-Dependent Conformations of Intracellular Loop 2. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136* (45), 16044–16054. <https://doi.org/10.1021/ja508394x>.
- [92] Perez-Aguilar, J. M.; Kang, S.-G.; Zhang, L.; Zhou, R. Modeling and Structural Characterization of the Sweet Taste Receptor Heterodimer. *ACS chemical neuroscience* **2019**, *10* (11), 4579–4592. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.9b00438>.
- [93] Latorraca, N. R.; Venkatakrisnan, A. J.; Dror, R. O. GPCR Dynamics: Structures in Motion. *Chemical Reviews* **2016**, *117* (1), 139–155. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00177>.
- [94] Manglik, A.; Kim, T.; Masureel, M.; Altenbach, C.; Yang, Z.; Hilger, D.; Lerch, Michael T.; Kobilka, T.; Thian, F.; Hubbell, Wayne L.; Prosser, R. Scott; Kobilka, Brian K. Structural Insights into the Dynamic

- Process of β 2 -Adrenergic Receptor Signaling. *Cell* **2015**, *161* (5), 1101–1111. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.043>.
- [95] Ross, R. A. The Enigmatic Pharmacology of GPR55. *Trends in Pharmacological Sciences* **2009**, *30* (3), 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.12.004>.
- [96] Hilger, D. The Role of Structural Dynamics in GPCR-Mediated Signaling. *The FEBS Journal* **2021**, *288* (8), 2461–2489. <https://doi.org/10.1111/febs.15841>.
- [97] Sharir, H.; Console-Bram, L.; Mundy, C.; Popoff, S. N.; Kapur, A.; Abood, M. E. The Endocannabinoids Anandamide and Virodhamine Modulate the Activity of the Candidate Cannabinoid Receptor GPR55. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* **2012**, *7* (4), 856–865. <https://doi.org/10.1007/s11481-012-9351-6>.
- [98] Kotsikorou, E.; Sharir, H.; Shore, D. M.; Hurst, D. P.; Lynch, D. L.; Madrigal, K. E.; Heynen-Genel, S.; Milan, L. B.; Chung, T. D. Y.; Seltzman, H. H.; Bai, Y.; Caron, M. G.; Barak, L. S.; Croatt, M. P.; Abood, M. E.; Reggio, P. H. Identification of the GPR55 Antagonist Binding Site Using a Novel Set of High-Potency GPR55 Selective Ligands. *Biochemistry* **2013**, *52* (52), 9456–9469. <https://doi.org/10.1021/bi4008885>.
- [99] Anderson, L. L.; Heblinski, M.; Absalom, N. L.; Hawkins, N. A.; Bowen, M.; Benson, M. J.; Zhang, F.; Bahceci, D.; Doohan, P. T.; Chebib, M.; McGregor, I. S.; Kearney, J. A.; Arnold, J. C. Cannabigerolic Acid, a Major Biosynthetic Precursor Molecule in Cannabis, Exhibits Divergent Effects on Seizures in Mouse Models of Epilepsy. *British Journal of Pharmacology* **2021**. <https://doi.org/10.1111/bph.15661>.
- [100] Heynen-Genel, S.; Dahl, R.; Shi, S.; Milan, L.; Hariharan, S.; Bravo, Y.; Sergienko, E.; Hedrick, M.; Dad, S.; Stonich, D.; Su, Y.; Vicchiarelli, M.; Mangravita-Novo, A.; Smith, L. H.; Chung, T. D.; Sharir, H.; Barak, L. S.; Abood, M. E. *Screening for Selective Ligands for GPR55 - Agonists*. PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22091480/> (accessed 2024-04-16).
- [101] Kotsikorou, E.; Madrigal, K. E.; Hurst, D. P.; Sharir, H.; Lynch, D. L.; Heynen-Genel, S.; Milan, L. B.; Chung, T. D. Y.; Seltzman, H. H.; Bai, Y.; Caron, M. G.; Barak, L.; Abood, M. E.; Reggio, P. H. Identification of the GPR55 Agonist Binding Site Using a Novel Set of High-Potency GPR55 Selective Ligands. *Biochemistry* **2011**, *50* (25), 5633–5647. <https://doi.org/10.1021/bi200010k>.
- [102] Hua, T.; Vemuri, K.; Nikas, S. P.; Laprairie, R. B.; Wu, Y.; Qu, L.; Pu, M.; Korde, A.; Jiang, S.; Ho, J.-H.; Han, G. W.; Ding, K.; Li, X.; Liu, H.; Hanson, M. A.; Zhao, S.; Bohn, L. M.; Makriyannis, A.; Stevens, R. C.; Liu, Z.-J. Crystal Structures of Agonist-Bound Human Cannabinoid Receptor CB 1. *Nature* **2017**, *547* (7664), 468–471. <https://doi.org/10.1038/nature23272>.
- [103] Pertwee, R. G. The Diverse CB1 and CB2 Receptor Pharmacology of Three Plant Cannabinoids: Δ 9-Tetrahydrocannabinol, Cannabidiol and Δ 9-Tetrahydrocannabivarin. *British Journal of Pharmacology* **2008**, *153* (2), 199–215. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707442>.
- [104] Dutta, S.; Selvam, B.; Das, A.; Shukla, D. Mechanistic Origin of Partial Agonism of Tetrahydrocannabinol for Cannabinoid Receptors. *Journal of Biological Chemistry* **2022**, *298* (4). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101764>.
- [105] Hua, T.; Vemuri, K.; Pu, M.; Qu, L.; Han, G. W.; Wu, Y.; Zhao, S.; Shui, W.; Li, S.; Korde, A.; Laprairie, R. B.; Stahl, E. L.; Ho, J.-H.; Zvonok, N.; Zhou, H.; Kufareva, I.; Wu, B.; Zhao, Q.; Hanson, M. A.; Bohn, L. M. Crystal Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB1. *Cell* **2016**, *167* (3), 750–762.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.004>.
- [106] Dutta, S.; Selvam, B.; Shukla, D. Distinct Binding Mechanisms for Allosteric Sodium Ion in Cannabinoid Receptors. *ACS Chemical Neuroscience* **2022**. <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.1c00760>.
- [107] Katritch, V.; Fenalti, G.; Abola, E. E.; Roth, B. L.; Cherezov, V.; Stevens, R. C. Allosteric Sodium in Class a GPCR Signaling. *Trends in Biochemical Sciences* **2014**, *39* (5), 233–244. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.03.002>.

- [108] Almeida, J. G.; Preto, A. J.; Koukos, P. I.; Bonvin, A. M. J. J.; Moreira, I. S. Membrane Proteins Structures: A Review on Computational Modeling Tools. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2017**, *1859* (10), 2021–2039. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.07.008>.
- [109] Klepeis, J. L.; Lindorff-Larsen, K.; Dror, R. O.; Shaw, D. E. Long-Timescale Molecular Dynamics Simulations of Protein Structure and Function. *Current Opinion in Structural Biology* **2009**, *19* (2), 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2009.03.004>.
- [110] Arinaminpathy, Y.; Khurana, E.; Engelman, D. M.; Gerstein, M. B. Computational Analysis of Membrane Proteins: The Largest Class of Drug Targets. *Drug Discovery Today* **2009**, *14* (23-24), 1130–1135. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.08.006>.
- [111] Samish, I.; MacDermaid, C. M.; Perez-Aguilar, J. M.; Saven, J. G. Theoretical and Computational Protein Design. *Annual Review of Physical Chemistry* **2011**, *62* (1), 129–149. <https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-032210-103509>.
- [112] Pagadala, N. S.; Syed, K.; Tuszynski, J. Software for Molecular Docking: A Review. *Biophysical Reviews* **2017**, *9* (2), 91–102. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0247-1>.
- [113] Heldin, C.-H.; Lu, B.; Evans, R.; Gutkind, J. S. Signals and Receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2016**, *8* (4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005900>.
- [114] Nestler, E. J.; Hyman, S. E.; Malenka, R. C. *Molecular Neuropharmacology*; McGraw Hill Professional, 2008.
- [115] Beaulieu, J.-M. ; Gainetdinov, R. R. The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *Pharmacological Reviews* **2011**, *63* (1), 182–217. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002642>.
- [116] Jonge, W. J.; Ulloa, L. The Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor as a Pharmacological Target for Inflammation. *British Journal of Pharmacology* **2009**, *151* (7), 915–929. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707264>.
- [117] Lynch, J. J.; Van Vleet, T. R.; Mittelstadt, S. W.; Blomme, E. A. G. Potential Functional and Pathological Side Effects Related to Off-Target Pharmacological Activity. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **2017**, *87*, 108–126. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2017.02.020>.
- [118] Strader, C. D.; Fong, T. M.; Grazlano, M. P.; Tota, M. R. The Family of G-Protein-Coupled Receptors. *The FASEB Journal* **1995**, *9* (9), 745–754. <https://doi.org/10.1096/fasebj.9.9.7601339>.
- [119] Latek, D.; Modzelewska, A.; Trzaskowski, B.; Palczewski, K.; Filipek, S. G Protein-Coupled Receptors--Recent Advances. *Acta biochimica Polonica* **2012**, *59* (4), 515–529.
- [120] Schrödinger, L., & DeLano, W. (2020). PyMOL. Retrieved from <http://www.pymol.org/pymol>
- [121] Inkscape Project. (2020). Inkscape. Retrieved from <https://inkscape.org>
- [122] Wonnacott, S.; Bermudez, I.; Millar, N. S.; Tzartos, S. J. Nicotinic Acetylcholine Receptors. *British Journal of Pharmacology* **2018**, *175* (11), 1785–1788. <https://doi.org/10.1111/bph.14209>.
- [123] McCammon, J. A.; Gelin, B. R.; Karplus, M. Dynamics of Folded Proteins. *Nature* **1977**, *267* (5612), 585–590. <https://doi.org/10.1038/267585a0>.
- [124] Tuckerman, M. E.; Martyna, G. J. Understanding Modern Molecular Dynamics: Techniques and Applications. *The Journal of Physical Chemistry B* **1999**, *104* (2), 159–178. <https://doi.org/10.1021/jp992433y>.
- [125] Stanzone, F.; Giangreco, I.; Cole, J. C. Use of Molecular Docking Computational Tools in Drug Discovery. *Progress in Medicinal Chemistry* **2021**, *60*, 273–343. <https://doi.org/10.1016/bs.pmch.2021.01.004>.
- [126] Agarwal, S.; Mehrotra, R. J. J. C. An Overview of Molecular Docking. *JSM chem* **2016**, *4* (2), 1024–1208.
- [127] Phillips, J. C.; Hardy, D. J.; Maia, J. D. C.; Stone, J. E.; Ribeiro, J. V.; Bernardi, R. C.; Buch, R.; Fiorin, G.; Hénin, J.; Jiang, W.; McGreevy, R.; Melo, M. C. R.; Radak, B. K.; Skeel, R. D.; Singharoy, A.; Wang,

- Y.; Roux, B.; Aksimentiev, A.; Luthey-Schulten, Z.; Kalé, L. V. Scalable Molecular Dynamics on CPU and GPU Architectures with NAMD. *The Journal of Chemical Physics* **2020**, *153* (4), 044130. <https://doi.org/10.1063/5.0014475>.
- [128] Brooks, C. L.; Case, D. A.; Plimpton, S. J.; Roux, B.; David; Emad Tajkhorshid. Classical Molecular Dynamics. *Journal of Chemical Physics* **2021**, *154* (10), 100401–100401. <https://doi.org/10.1063/5.0045455>.
- [129] González, M. A. Force Fields and Molecular Dynamics Simulations. *École thématique de la Société Française de la Neutronique* **2011**, *12*, 169–200. <https://doi.org/10.1051/sfn/201112009>.
- [130] Wilfred; Daura, X.; Mark, A. E. GROMOS Force Field. *Encyclopedia of Computational Chemistry* **1998**. <https://doi.org/10.1002/0470845015.cga011>.
- [131] Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Development and Testing of a General Amber Force Field. *Journal of Computational Chemistry* **2004**, *25* (9), 1157–1174. <https://doi.org/10.1002/jcc.20035>.
- [132] Brooks, B. R.; Brooks, C. L.; Mackerell, A. D.; Nilsson, L.; Petrella, R. J.; Roux, B.; Won, Y.; Archontis, G.; Bartels, C.; Boresch, S.; Caflisch, A.; Caves, L.; Cui, Q.; Dinner, A. R.; Feig, M.; Fischer, S.; Gao, J.; Hodoscek, M.; Im, W.; Kuczera, K. CHARMM: The Biomolecular Simulation Program. *Journal of Computational Chemistry* **2009**, *30* (10), 1545–1614. <https://doi.org/10.1002/jcc.21287>.
- [133] Mackerell, A. D. Empirical Force Fields for Biological Macromolecules: Overview and Issues. *Journal of Computational Chemistry* **2004**, *25* (13), 1584–1604. <https://doi.org/10.1002/jcc.20082>.
- [134] *NAMD 2.12 User's Guide*. www.ks.uiuc.edu. <https://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/2.12/ug/> (accessed 2024-04-16).
- [135] Nadkarni, A. P. *The Tcl Programming Language*; Createspace Independent Publishing Platform, 2017.