

Esperdimina como agente inhibidor de la proteína de la distrofia muscular miotónica tipo 1 (MBNL-1) empleando química computacional

Spermidine as an inhibiting agent of the protein of myotonic dystrophy type 1 (MBNL-1) using computational chemistry

Carlos Daniel Chuquimango Terrones¹

¹Centro de Investigación en Ingeniería Molecular, Vicerectorado de Investigación, Universidad Católica de Santa María. Arequipa, Perú

RESUMEN

La Espermidina es un poliamina que podemos encontrar en frutas, verduras, productos cárnicos y lácteos; además de ser conocida por su papel modulador de funciones del ADN, ARN, nucleótidos trifosfatos y proteínas. Según, estudios experimentales recientes demostraron que cumple una función inhibitoria sobre la proteína relacionada con la patogénesis de la distrofia miotónica tipo 1 (MBNL-1) dando luces a esta enfermedad aun sin cura; sin embargo, estos estudios no han proporcionado suficientes datos para aclarar su capacidad inhibitoria. En este trabajo se comprobó la interacción existente entre la espermidina y la proteína MBNL-1 mediante química computacional. El análisis mediante el uso de mecánica cuántica (QM) se llevó a cabo con la funcional CAM-B3LYP usando un set de base TZVP. En relación a la mecánica molecular (MM) se utilizó un campo de fuerza OPLS-aa, seguidamente se realizó una solvatación de la proteína MBNL-1 estabilizándose en menos de 0.3nm. Se empleó un ensamble canónico NVT donde la temperatura, número de moles y volumen permanecieron constantes asemejando así la simulación a una temperatura fisiológica a la del ser humano. Adicionalmente, el análisis de Ramachandran permitió validar la estructura la cual se conservó a través del tiempo (100ns) obteniendo un 98.4% de certeza. Finalmente quedó demostrado que la interacción *in silico* de la espermidina-MBNL-1 fue tan semejante como la interacción reportada *in vivo* e *in vitro*.

Palabras Clave: Agente inhibidor, distrofia miotónica tipo 1, espermidina, mecánica cuántica, mecánica molecular, química computacional.

ABSTRACT

Spermidine is a polyamine compound found in fruits, vegetables, meats and milk products. It is also known for its role as a modulator of functions for DNA, RNA, nucleotide triphosphates and proteins. Some recent experimental studies have shown that it has an inhibitory function on the protein related to the pathogenesis of myotonic dystrophy type 1 (MBNL-1), providing some hope in relation to this disease presently without cure. However these studies have not provided sufficient information to explain its inhibitory role. In the present work, the existing interaction between spermidine and the MBNL-1 protein has been confirmed by computational chemistry. The quantum mechanics analysis was carried out with the CAM-B3LYP density functional, using a TZVP basis set. For the molecular mechanics, the OPLS-AA force field was used, followed immediately by the solvation of the MBNL-1 protein, which stabilized at less than 0.3 nm. As an NVT canonical ensemble (constant volume, temperature and number of moles) was used, the process can simulate what is happening at the physiological temperature of a human body. Furthermore, a Ramachandran analysis allowed the validation of the structure, which was preserved through time (100 ns), at a 98.4 % confidence level. It was therefore demonstrated that the *in silico* interaction between spermidine and the MBNL-1 protein was similar to the reported interactions *in vivo* and *in vitro*.

Keywords: *inhibiting agent, myotonic dystrophy type 1, spermidine, quantum mechanics, molecular mechanics, computational chemistry.*

INTRODUCCIÓN

La neurogenética estudia el sistema nervioso desde su genética, explorando su función y desarrollo para un mejor entendimiento de los trastornos neurológicos [1], dentro de las enfermedades

neurodegenerativas más conocidas se encuentran la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, el Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), ataxias, distrofias musculares, miopatías, mioclonías, distonías, degeneración corticobasal, esclerosis múltiple, etcétera [2].

Correspondencia:
charlie.ibcds@gmail.com

La investigación de la neurogenética en el Perú lleva un desarrollo fructífero de aproximadamente 20 años, sin embargo, aún presenta muchos desafíos por cumplir; siendo el centro de Investigación Básica en Neurogenética (CIBN) perteneciente al Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN) el único centro de investigación que se dedica a la neurogenética en el Perú [3]. Según el informe del INCN en el periodo del 2010 al 2014 existió un incremento en el número de citas por trastornos en neurogenética, estando entre ellas los pacientes con distrofia miotónica (DM) también conocida como distrofia miotónica tipo 1 (DM1) [4]. La DM1 es una de las formas más comunes de distrofia muscular con una incidencia estimada de 1 en 8000 [5]. Comienza en la adolescencia o en la edad adulta joven y afecta a varios músculos, entre ellos: músculos de la cara, el cuello, los dedos, los tobillos y músculos involuntarios como los del tracto gastrointestinal. En el caso de las mujeres los músculos del útero pueden comprometerse lo que provoca complicaciones durante el embarazo [6]. El defecto genético en la DM1 es el resultado de una expansión progresiva del triplete CTG (citosina - timina - guanina) en la región 3'-no traducida dentro del gen proteína quinasa de la distrofia miotónica (DMPK) [7]. El gen DMPK expandido produce un transcrito de ARN tóxico (CUG exp) que no sale del núcleo, sino que se asocian con proteínas como con la Muscleblind-like 1 (MBNL-1) [8]. Las proteínas de la familia MBNL actúan como reguladores de empalme en diferentes transcripciones y promueven la selección del sitio de empalme para los tejidos musculares. Existen tres tipos de proteínas MBNL sin embargo la MBNL-1 es la única que tiene un papel fundamental en la patogénesis de la enfermedad muscular conocida como distrofia miotónica [9].

Actualmente no hay cura para la DM1. Existen una gran variedad de opciones farmacológicas para atenuar los síntomas y encontrar una posible cura. Una de ellas es la mixiletina, un medicamento antiarrítmico clase Ib que actúa como bloqueador de los canales de sodio, la cual se ha surgido como terapia de primera línea para el alivio de la miotonía sintomática incapacitante en los trastornos miotónicos distróficos y no distróficos [10-11]. También hay estudios sobre el desarrollo artificial de sitios específicos de ARN endonucleasas (ASRE) que se unen a las repeticiones del ARN en pacientes con DM1 y degradan específicamente los ARN mensajeros patógenos del gen DMPK [12]; algunos trabajos sugieren la inhibición de la interacción tóxica del MBNL-1 (CUG exp) utilizando un inhibidor de unión de ranura de ARN conocido como ligando 3 [13]. Sin embargo, investigaciones recientes indican que los mecanismos patógenos de DM1 implican muchos otros factores incluyendo la repetición de la traducción asociada, la activación de la vía de

señalización dependiente de PKC, la desregulación de microARN y la poliadenilación anormal [14].

Las poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) son moléculas alifáticas nitrogenadas que podemos encontrar en frutas, verduras, productos cárnicos y lácteos; son objetos interesantes de estudio por su capacidad de modulación en las funciones del ADN, ARN, nucleótidos trifosfatos, proteínas y otras sustancias ácidas. Las poliaminas modulan la síntesis de proteínas a diferentes niveles, incluyendo la estimulación de tipos especiales de síntesis de proteínas, la estimulación del ensamblaje de subunidades ribosómicas 30S y la estimulación de la formación de Ile-ARNt [15-16]. Uno de los estudios más recientes sobre las poliaminas nos indica haber formado una estructura cristalina de espermidina/espermina humana N-1 acetiltransferasa (hSSAT) la cual es la primera estructura de diamina N Acetiltransferasas y nos da luces para futuros estudios in silico [17]; Los métodos de modelado molecular realizados por plataformas computacionales han permitido estudios de gran éxito en los últimos años [18].

El objetivo de este trabajo fue evaluar la interacción inhibitoria entre laespermidina y la proteína relacionada con la patogénesis de la distrofia miotónica (MBNL-1) empleando química computacional.

II DETALLES COMPUTACIONALES

Para el Hardware se utilizó Workstation con procesador E7 de 3.1GH, memoria RAM de 64GB, 02 discos duros de 04 y 06TB, Acelerador de Video GTX 980 con 4GB de memoria dedicada, Acelerador de Video Tesla K80 con 24Gb de memoria dedicada.

A. Recopilación y Preparación de las Estructuras

Se realizó la búsqueda de las estructuras de la *Muscleblindlike protein 1* (MBNL1) en la base de datos del Protein Data Bank [24], el cual contiene estructuras tridimensionales de moléculas biológicas en su mayoría identificadas por cristalografía de rayos X. Una vez obtenida la estructura MBNL-1 del PDB, se procedió a realizar la preparación de la estructura agregándole aminoácidos y átomos de hidrógenos faltantes, eliminando cabeceras y modelos repetidos existentes en el archivo. Así mismo, se diseñó la estructura de la espermidina en Gauss View 5.0 [25].

B. Optimización de las Estructuras mediante Mecánica

Molecular y Mecánica Cuántica

Empleando el programa Gromacs 2016.3 [26] se realizó una minimización de energías para la estructura MBNL-1, usando el método de “steepest descent”, seguidamente se tomó la estructura minimizada de la MBNL-1 y se procedió a realizar la Dinámica Molecular, agregándole condiciones periódicas de contorno (PBC), con un tamaño de caja cúbica de 6nm, un ensamble canónico NVT (número de moléculas, volumen y temperatura constante) en un periodo de tiempo de 100 ns (nanosegundos) e integrándole solvente explícito (spc216) en el medio, con un campo de fuerza Opls-aa (Optimized Potentials for Liquid Simulations – All Atoms) y un termostato de v-rescale a una temperatura de 309.65 K para simular las condiciones fisiológicas del cuerpo humano. Por otro lado, se optimizó la espermidina en Gaussian09 [27] usando la funcional CAMB3LYP [28], la cuál es una funcional híbrida de intercambio correlación que combina las cualidades híbridas del B3LYP y una corrección de largo alcance. Además de la funcional CAMB3LYP, se utilizó el set de base TZVP para obtener una convergencia más rápida y mejor de las energías y geometrías a nivel de DFT (Density Theory Function) [29] y así evitar las frecuencias negativas al momento de la optimización.

C. Acoplamiento Molecular y Validación de los resultados

Las regiones hidrofóbicas presentes en el receptor MBNL-1 fueron identificadas empleando el software VMD [30], posteriormente con las regiones hidrofóbicas identificadas, se realizó la interacción entre el receptor (MBNL-1) y el ligando (espermidina) haciendo uso del software de acoplamiento HEX 8.0 [31] obteniendo la conformación de mayor score; con los parámetros de clustering y docking correspondientes para la obtención de las conformaciones y la minimización con OPLS-aa para un post-procesamiento.

Finalmente, la validación de los resultados de mecánica molecular, se realizó con un análisis de trayectoria del cálculo (RMSD), un análisis de la trayectoria de la energía total y un análisis de la transformación de la estructura en un tiempo determinado (Ramachandran) [32]. Así mismo, se realizó el análisis de las frecuencias positivas en la optimización de la espermidina en mecánica cuántica.

III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Estructura de la proteína Muscibind-like protein 1 (MBNL-1)

Se encontró la proteína MBNL-1 en la base datos PDB perteneciente a la especie Homo sapiens con código de acceso 3D2Q reportada en el año 2008 (Figura 1).

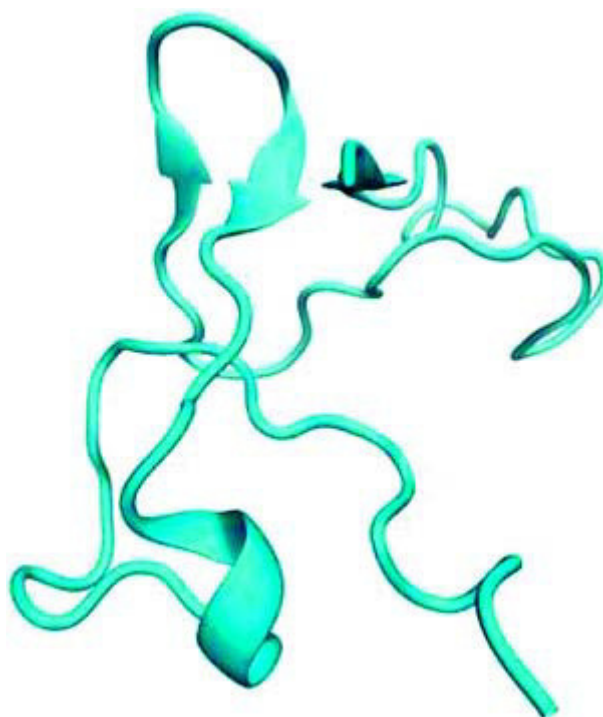


Figura 1. Estructura de la proteína MBNL-1 reportada en la base de datos PDB.

B. Optimización y Validación Molecular de la Estructura Proteica causante de la DM1 (MBNL-1)

Se encontró el mínimo local al realizar la energía de minimización. La dinámica molecular mostró una estructura estable a través del tiempo, donde gracias al análisis de la desviación media cuadrática (RMSD) (Fig. 2.a) se pudo visualizar la estabilización del MBNL-1 a los 15 ns, luego de alcanzar la zona de pre-equilibrio con una fluctuación no mayor de 0.5 nm; así mismo, en el análisis de Ramachandran se obtuvo un 98.4% en la gran parte de aminoácidos de la proteína MBNL-1, dichos aminoácidos se encontraron en las regiones permitidas y favorecidas lo cual indica que la estructura no sufre cambios conformacionales en la trayectoria de 100ns (Fig. 2.b). Además, en el análisis de la energía total se obtuvo una energía estable a lo largo de la simulación (Fig. 2.c).

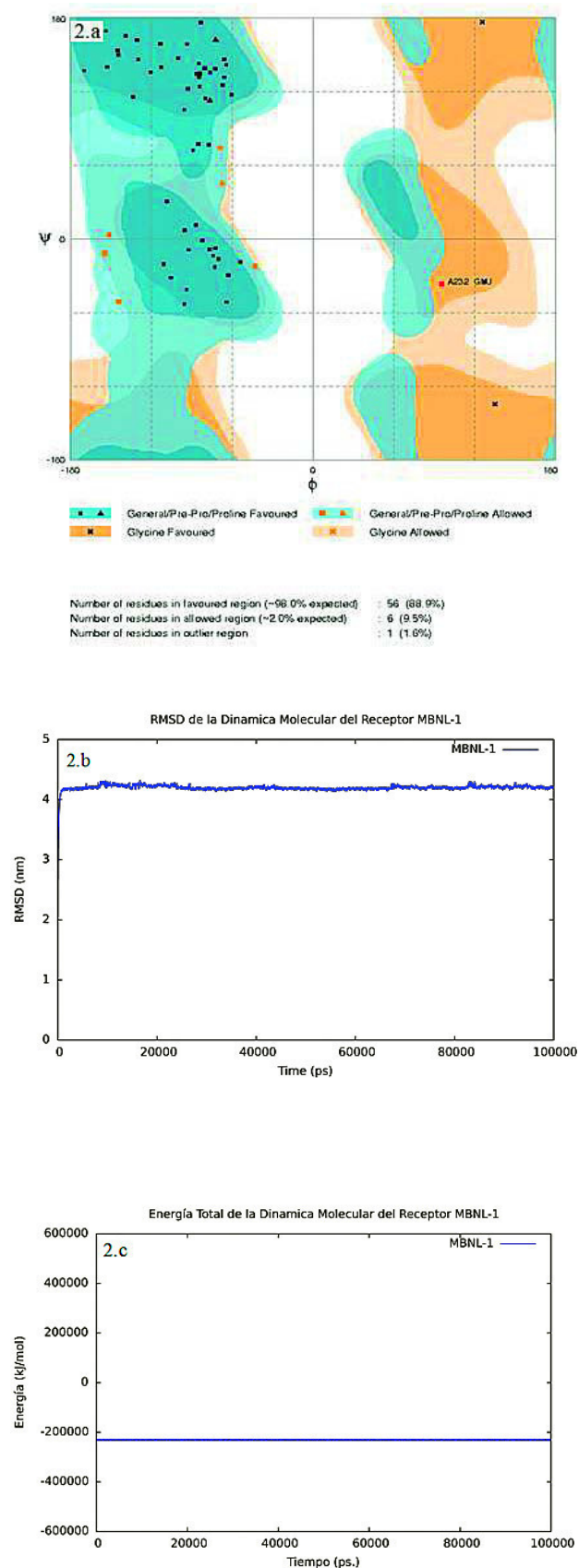


Figura 2. Validación de resultados de la dinámica molecular del MBNL-1. (a) RMSD de la trayectoria de 100 ns del MBNL-1, (b) Análisis de la transformación de la estructura en 100 ns (Ramachandran) y (c) Energía Total del MBNL-1.

B. Optimización y Validación Cuántica de la Poliamina (Espermidina).

Se determinó la mínima energía de la poliamina en fase gas visualizando que todas sus frecuencias no fuesen imaginarias, obteniendo varias geometrías calculadas empleando la funcional híbrida CAM-B3LYP y el set de base TZVP, donde la geometría en equilibrio fue la que se escogió para realizar el respectivo acoplamiento molecular (Fig. 3).

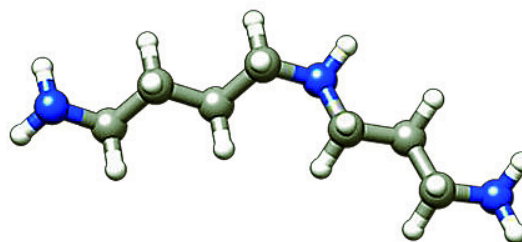


Figura 3. Optimización de la poliamina espermidina en Gaussian09.

C. Acoplamiento Molecular entre el MBNL-1 y la Espermidina.

Los lugares de hidrofobicidad obtenidos en la proteína MBNL-1 fueron: un anillo hidrofóbico y zonas cercanas a la región N-terminal de la proteína, como se puede visualizar en la Fig. 4.

Con el empleo del software HEX 8.0 [26], se observó la aproximación del ligando hacia la zona hidrofóbica N-terminal del receptor, visualizando una interacción. Se obtuvo la conformación con el mayor score donde los aminoácidos que interaccionaron con el ligando fueron: histidina 242 (HYS 242), prolina 240 (PRO 240), fenilalanina (PHE 237), histidina (HYS 238), tirosina 224 (TYR 224) y alanina 241 (241) como se muestra en la Fig. 5. Dichos aminoácidos logran interactuar con los nitrógenos presentes en la espermidina logrando obtener sitios favorables de interacción con la estructura del fosfodiéster cargada negativamente en el ligando [28].

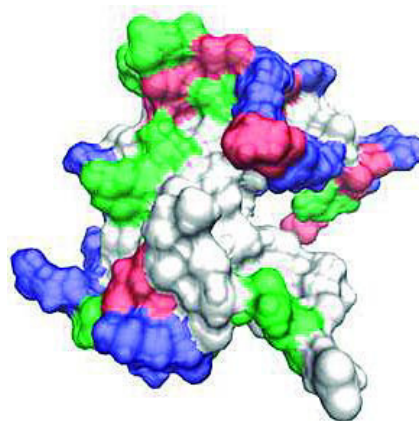


Figura 4. Identificación de las regiones hidrofóbicas del receptor MBNL1. Las regiones se muestran en color blanco grisáceo.

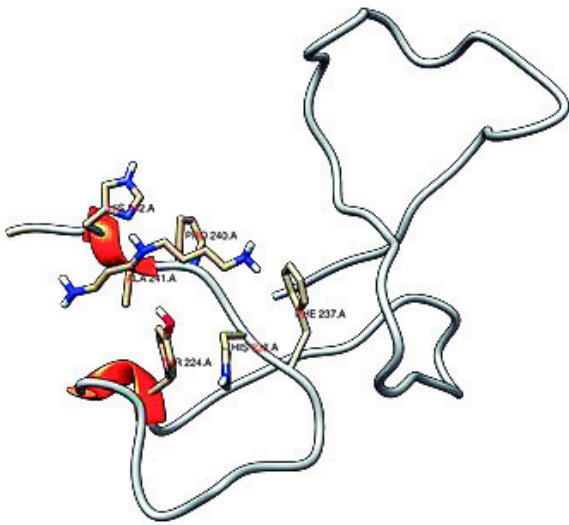


Figura 5. Aminoácidos que interactúan en el receptor MBNL1 al realizar la interacción MBNL1-Espermidina.

Tabla 1. Tabla de scoring de la interacción MBNL-1 con espermidina. Se muestra los mejores 20 scores de 50 000 conformaciones

Soln ¹	Ettotal ²	Eshape ³	Eforce ⁴	RMS ⁵
1	-269.1	-190.3	-78.7	-1.00
2	-269.0	-201.3	-67.7	-1.00
3	-266.9	-196.9	-70.0	-1.00
4	-266.8	-199.1	-67.7	-1.00
5	-266.3	-194.0	-72.2	-1.00
6	-266.2	-200.9	-65.3	-1.00
7	-266.2	-195.8	-70.3	-1.00
8	-266.0	-200.6	-65.4	-1.00
9	-265.7	-192.7	-73.1	-1.00
10	-265.4	-207.4	-58.0	-1.00
11	-263.6	-202.2	-61.4	-1.00
12	-263.5	-197.0	-66.5	-1.00
13	-263.4	-191.9	-71.5	-1.00
14	-262.2	-216.7	-45.6	-1.00
15	-262.2	-190.1	-72.1	-1.00
16	-260.7	-189.5	-71.2	-1.00
17	-260.5	-185.9	-74.6	-1.00
18	-260.0	-186.2	-73.8	-1.00
19	-259.3	-208.8	-50.5	-1.00
20	-259.3	-215.5	-43.8	-1.00

- ¹ Scores del acoplamiento molecular
² Energía total correspondiente al score
³ Energía de la conformación
⁴ Energía de la fuerza de interacción
⁵ Desviación media cuadrática

IV CONCLUSIONES

Se determinó que la espermidina presenta una interacción tipo inhibitoria con la proteína MBNL-1 impidiendo su interacción con las repeticiones CUG expandidas del ARN, evitando un posible desarrollo de la patología de la Distrofia Muscular Miotónica tipo 1.

El empleo de la Mecánica Molecular permitió realizar una simulación de la interacción espermidina-MBNL-1, en condiciones fisiológicas humanas, reconociendo de tal manera la eficiencia inhibitoria de la espermidina, sin presentar complicaciones. Según el estudio de la interacción entre la poliamina y la proteína causante de la distrofia miotónica, se reconoce a la espermidina como una agente natural, que podría ser utilizada como posible tratamiento alternativo, para pacientes que sufren de distrofia miotónica, frente a los tratamientos existentes muchos de los cuales requieren de una demanda elevada de dinero.

V AGRADECIMIENTOS

C. D. Ch. T agradece el apoyo de A. Calderón, P. Catacora, C. Paredes y D. Morales, compañeros del Centro de Investigación en Ingeniería Molecular, de la Universidad Católica de Santa María, y en especial al Dr. Badhin Gómez, nuestro mentor.

VI REFERENCIAS

- [1] L. Trelles Montero, G. Quesada and M. de los Angeles. "La neurogenética: pasado, presente y futuro." *Rev. Neuropsiquiatr*, vol. 52, pp. 168-88. 1989.
- [2] (2013) Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas Website [Online] Available: <http://www.incn.gov.pe/index.php/component/content/article/11-neurologia/68-neurodegenerativas>
- [3] P. Mazzetti., M. Inca-Martínez, I. Tirado-Hurtado, k. Milla-Neyra, G. Silva-Paredes, A. Vishnevetsky, and M. Cornejo-Olivas. "Neurogenética en el Perú, ejemplo de investigación traslacional." *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, vol. 32, pp. 787-793. 2015.
- [4] M. Cornejo-Olivas, K. Espinoza-Huertas, M. R. Veliz-Salazar, D. Veliz-Otani, I. Tirado-Hurtado, M. Inca-Martínez, and P. Mazzetti. "Neurogenetics in Peru: clinical, scientific and ethical perspectives." *Journal of community genetics*, vol. 6, pp. 251-257. 2015.
- [5] L. Witherspoon, S. O'Reilly, J. Hadwen, N. Tasnim, A. MacKenzie, and F. Farooq. "Sodium Channel Inhibitors Reduce DMPK mRNA and Protein." *Clinical and translational science*, vol 8, pp. 298-304. 2015.
- [6] (2017) The Muscular Dystrophy Association (MDA) website [Online] Available: <https://www.mda.org/disease/myotonic-muscular-dystrophy>
- [7] T. M. Wheeler, K. Sobczak, J. D. Lueck, R. J. Osborne, x. Lin, R. T. Dirksen and C. A. Thornton. "Reversal of RNA dominance by displacement of protein sequestered on triplet repeat RNA." *Science*, vol. 325, pp. 336-339. 2009.
- [8] A. Haghighat Jahromi, M. Honda, S. C. Zimmerman and M. Spies. "Single-molecule study of the CUG repeat-MBNL1 interaction and its inhibition by small molecules." *Nucleic acids research*, vol. 41, pp. 6687-6697. 2013.
- [9] M. Teplova and D. J. Patel. "Structural insights into RNA recognition by the alternative-splicing regulator muscleblind-like MBNL1." *Nature structural & molecular biology*, vol. 15, pp. 1343-1351. 2008.

- [10] C. R. Heatwole, J. M. Statland and E. L. Logigjan. *The diagnosis and treatment of myotonic disorders.* *Muscle & nerve*, vol. 47, pp. 632-648. 2013.
- [11] J. M. Statland, B. N. Bundy, Y. Wang, D. R. Rayan, J. R. Trivedi, V. A. Sansone and G. Meola. *Mexiletine for symptoms and signs of myotonia in nondystrophic myotonia: a randomized controlled trial.* *Jama*, vol. 308, pp. 1357-1365. 2012.
- [12] W. Zhang, Y. Wang, S. Dong, R. Choudhury, Y. Jin and Z. Wang. *Treatment of type 1 myotonic dystrophy by engineering site-specific RNA endonucleases that target (CUG) n repeats.* *Molecular Therapy*, vol. 22, pp. 312-320. 2014.
- [13] C. H. Wong, L. Nguyen, J. Peh, L. M. Luu, J. S. Sanchez, S. L. Richardson, and A. M. Baranger. *Targeting toxic RNAs that cause myotonic dystrophy type 1 (DM1) with a bisamidinium inhibitor.* *Journal of the American Chemical Society*, vol. 136, pp. 6355-6361. 2014.
- [14] A. Chau, and A. Kalsotra. *Developmental insights into the pathology of and therapeutic strategies for DM1: back to the basics.* *Developmental Dynamics*, vol. 244, pp. 377-390. 2015.
- [15] K. Igarashi, and K. Kashiwagi. *Polyamines: mysterious modulators of cellular functions.* *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 271, pp. 559-564. 2000.
- [16] M. Atiya Ali, E. Poortvliet, R. Stromberg, A. Yngve. *Polyamines in foods: development of a food database.* *Food & nutrition research*, vol. 55, pp. 5572. 2011.
- [17] Y. Q. Zhu, D. Y. Zhu, L. Yin, Y. Zhang, C. Vonrhein and D. C. Wang. *Crystal structure of human spermidine/spermine N1-acetyltransferase (hSSAT): The first structure of a new sequence family of transferase homologous superfamily.* *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 63, pp. 1127-1131. 2006.
- [18] J. de Ruyck, G. Brysbaert, R. Blossey and M.F. Lensink. *Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel.* *AABC*, vol. 9, p. 1.2016.
- [19] M. Teplova and D. J. Patel. *Structural insights into RNA recognition by the alternative-splicing regulator muscleblind-like MBNL1.* *Nature structural & molecular biology*, vol. 15, pp. 1343-1351.2008.
- [20] GaussView, Version 5, R. Dennington, T. Keith, and J. Millam, Semichem Inc., Shawnee Mission, KS, 2009.
- [21] M.J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Pall, J. C. Smith, B. Hess, and E. Lindahl. *GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers.* *SoftwareX*, vol 1, pp. 19-25. 2015.
- [22] MJ Frisch et al., Gaussian. Inc., Wallingford CT. *Gaussian09, Revision (2009).* 02.
- [23] T. Yanai, D. P. Tew and N.C. Handy. *A new hybrid exchange-correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP).* *Chemical Physics Letters*, vol 393, pp. 51-57. 2004.
- [24] S. Hammes-Schiffer. *A conundrum for density functional theory.* *Science*, vol 355, pp. 28-29. 2017.
- [25] W. Humphrey, A. Dalke and K. Schulten. *gVMD: visual molecular dynamics.* *Journal of molecular graphics*, vol 14, pp 33-38. 1996.
- [26] Hex 8.0.0 User Manual. D Ritchie and T. Orpailleur. 1996.
- [27] SC. Lovell, I. W. Davis, W. B. Arendall, P. I. de Bakker, J.M. Word, M. G. Prisant, J. S. Richardso and D. C. Richardson. *Structure validation by C geometry: , and C deviation.* *Proteins*, vol 50, pp. 437-450. 2002.
- [28] S. G Rzuczek, Y. Gao, Z. Z. Tang, C. A. Thornton, T. Kodadek, and M. D. Disney. *Features of modularly assembled compounds that impart bioactivity against an RNA target.* *ACS chemical biology*, vol 8 , pp. 2312-2321. 2013.