

Estudio *in silico* de nanopartículas de plata contra la enfermedad de Parkinson mediante acoplamiento molecular

In silico study of silver nanoparticles against Parkinson's disease through molecular docking

Geyse Santos
Rachel N. Huber
Geovani F. M. Duarte

Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Central del Paraguay,
Pedro Juan Caballero, Amambay, Paraguay

Fecha de recepción: 28 de mayo de 2022

Fecha de aceptación: 29 de junio de 2022

Resumen

La enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa del mundo, y la nanotecnología tiene un gran potencial para mejorar los tratamientos actuales. En este contexto, el presente trabajo tiene como objetivo estudiar la interacción de la nanopartícula de plata (AgNP) con la E3 UBIQUITIN-PROTEIN LIGASE PARKIN (PARK2 o Parkina), una proteína importante relacionada con la enfermedad de Parkinson. La proteína objetivo PARK2 (Parkina) fue seleccionada de la plataforma del Banco de Datos de Proteínas (PDB) con el ID PDB: 4BM9. El AgNP se obtuvo con un archivo CIF (Crystallographic Information File) de Ag cúbico cargado en la plataforma Nanocrystal para generar las coordenadas cristalográficas del archivo modelo 3D (archivo AgNP.pdb) con un total de 1865 átomos en su estructura. El acoplamiento molecular se realizó con la ayuda del servidor HDock, se configuró una caja de rejilla cúbica para abarcar toda la enzima, ajustada a 1,0 angstrom. HDock es un servidor utilizado para predecir los complejos de unión entre dos moléculas, como proteínas y ligandos, utilizando una estrategia de acoplamiento híbrido. El modelo de acoplamiento aplicado fue el algoritmo basado en un modelo geométrico. Para la evaluación de los resultados, se aplicó una distancia de 2,5 angstroms como zona de contacto entre la AgNP y los residuos de aminoácidos. Los resultados muestran que se observaron interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas con valores de Potencial de Lipofilia Molecular de una media de -4,218 MLP. Las regiones cercanas al N-terminal de la enzima muestran un área mayor de interacción con el AgNP. Los residuos de aminoácidos cisteína, glutamina y glutamato presentan la mayor afinidad con la superficie de la AgNP evaluada en este estudio. Concluimos que los resultados del docking molecular de la interacción receptor-ligando del PARK2 (Parkina) pueden contribuir a la búsqueda de nuevos fármacos y terapias para inhibir la enfermedad de Parkinson.

Palabras clave: Docking molecular; Nanomedicina; Enfermedad de Parkinson; In silico.

Abstract

Parkinson's disease is the second-largest neurodegenerative disease in the world, and nanotechnology has great potential to improve current treatments. Thus, this work aimed to study the interaction of silver nanoparticle (AgNP) with E3 UBIQUITIN-PROTEIN LIGASE PARKIN PARK2 (Parkina) an important protein for Parkinson's disease. The target protein PARK2 (Parkina) was chosen from Protein Data Bank (PDB) platform with PDB ID: 4BM9. The AgNP was obtained with a



CIF file of cubic Ag uploaded in Nanocrystal platform to generate coordinates of AgNP.pdb file with 1865 atoms. Molecular docking was performed with HDOCK server, a cubic grid box was configured to encompass the entire enzyme, adjusted to 1.0 angstrom. The HDOCK server is used to predict the binding complexes between two molecules like proteins and ligands by using a hybrid docking strategy. The docking model applied was the algorithm based on a geometric model. For the result evaluation, 2.5 angstroms were applied as a contact zone between the AgNP and amino acid residues. Our results show that hydrophilic and hydrophobic interactions were observed with Molecular Lipophilicity Potential values with an average of -4,218 MLP. The regions next to N-terminus of the enzyme present a greater area of interaction with AgNPs. The cysteine, glutamine, and glutamate amino acid residues present the highest affinity with the surface of the AgNP evaluated in this study. We conclude that molecular docking results of receptor-ligand interaction of PARK2 (Parkina) can contribute to the search for new drugs and therapies to inhibit Parkinson's disease.

Keywords: Molecular docking; Nanomedicine; Parkinson Disease; In silico.

Introducción

Con los primeros registros fechados en 1817, la enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo del movimiento que deprime el sistema nervioso central, con un desarrollo progresivo y sin cura (1). Diagnosticado sobre todo clínicamente, el cuadro incluye síntomas psicósomáticos, como dificultades motoras cardinales, marcha lenta y temblores, y síntomas no motores, como trastornos del sueño, cambios cognitivos, depresión, apatía y, en los casos más avanzados, demencia de Parkinson (2).

Con una estimación de 10 millones de individuos actualmente portadores (3), la enfermedad de Parkinson puede tener su inicio atribuido a varios factores concomitantes, como polimorfismos genéticos, factores ambientales y alteraciones epigenéticas, que corresponden del 5 al 10% (1,2). Tiene como principal característica patológica la degeneración de las neuronas dopaminérgicas localizadas en la sustancia negra pars compacta (SNpc), la α -sinucleína

en los cuerpos de Lewy (1), y la distrofia de las fibras de proyección asociadas al cuerpo estriado, provocando cambios considerables en la homeostasis del tejido nervioso, daños inmunológicos, generando daños en el sistema motor, lo que conlleva síntomas no motores (3). Esta variabilidad de factores que conducen al desarrollo del Parkinson genera, en última instancia, perspectivas ilimitadas para el desarrollo de intervenciones farmacéuticas que interrumpan el curso de la enfermedad.

El tratamiento de la patología es meramente paliativo y demanda altos costos. La terapia utilizada actualmente se basa en el uso de inhibidores de la dopamina descarboxilasa y precursores de la dopamina, como la Carbidopa-Levodopa (3), el seguimiento fisioterapéutico y la estimulación cerebral profunda en los casos más avanzados (1). Una de las grandes limitaciones de la terapéutica en el Parkinson es la dificultad que tienen las biomoléculas de los fármacos para atravesar la barrera



hematoencefálica, haciendo que la concentración del fármaco sea siempre baja en el sistema nervioso central (3). En este contexto, con el actual desarrollo de la nanotecnología, especialmente en el área de la farmacología y la medicina, se espera que en las próximas décadas los nuevos sistemas de administración de fármacos nanoestructurados tengan un mejor rendimiento en el tratamiento de diversas enfermedades, incluida la enfermedad de Parkinson.

En la actualidad, la nanotecnología se ha empleado en diversas áreas del conocimiento, como la agricultura (4), los nanosensores (5) y los sistemas de liberación controlada de activos químicos (6). Las nanopartículas (NPs) metálicas y los óxidos metálicos, como los óxidos de plata (Ag), de oro (Au), de cobre (CuO) y de zinc (ZnO), ya están surgiendo como relevantes en biomedicina debido a sus propiedades antimicrobianas (7,8). Sin embargo, se sabe poco sobre la interacción de estos nanomateriales con proteínas clave para enfermedades importantes.

El gen E3 UBIQUITIN-PROTEIN LIGASE PARKIN (PARK2) es una de las principales causas de mutaciones en la enfermedad de Parkinson (9-11). En este contexto, la búsqueda tradicional de modelos in vitro e in vivo de nuevos fármacos para controlar estas mutaciones es extremadamente difícil debido a su estructura funcional, por lo que los ensayos in silico se

presentan como una alternativa para el desarrollo de nuevos fármacos.

El docking molecular llega como un proceso computacional para el desarrollo de nuevos fármacos, con el fin de flexibilizar la incorporación de estudios con proteínas de interés, ponderando la interacción de receptores y ligandos a través de la geometría, energía y enlaces químicos potenciales involucrados en los procesos de interacción molecular (12). El uso del método in silico surge como una alternativa racional y complementaria a las técnicas habituales para los sistemas biológicos in vitro e in vivo (13). Proporciona una mayor variación de la información y un mayor margen de error, lo que disminuye los costos y brinda informaciones que los métodos biológicos tradicionales tardarían décadas en ajustar. El presente tiene como propósito realizar ensayos de acoplamiento molecular in silico para dilucidar las interacciones de las nanopartículas de plata con la proteína Parkina (gen PARK2) para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

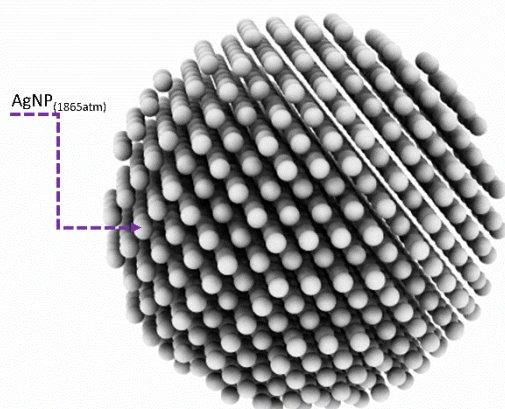
Materiales y Métodos

Diseñador 3D y preparación de la nanopartícula de plata (AgNP_{1865 atm}) como el ligando

La nanopartícula de plata se preparó utilizando la herramienta Nanocrystal (14), utilizando un archivo cristalográfico CIF (Customer Information File) de moléculas de Ag con estructura cristalina cúbica. El archivo CIF se descargó de la base de datos de

materialsprojectc (materialsproject.org/). La Figura 1 representa la nanopartícula de plata (1865 átomos) utilizada en este estudio.

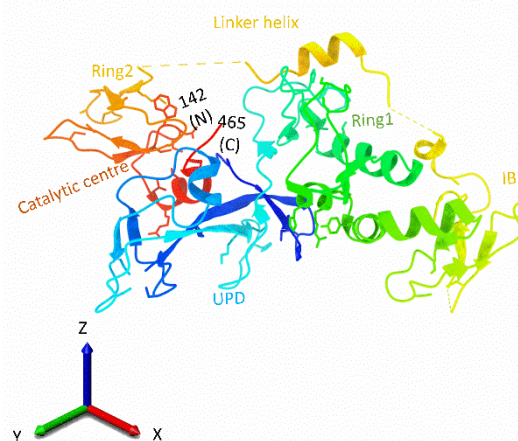
Figura 1. La nanopartícula de plata (AgNP) utilizada en este estudio de acoplamiento, generada con el auxilio del servidor Nanocrystal (Imagen del autor).



Proteína receptora

Como receptor utilizamos la proteína Parkin, una diana molecular del gen Park2 E3 UBIQUITIN-PROTEIN LIGASE de la enfermedad de Parkinson (15) que está depositada en la base de datos de proteínas PDB (Protein Data Bank; <https://www.rcsb.org>) bajo el código 4BM9 (Figura 2). La estructura cristalográfica se descargó en formato PDB. La preparación de la macromolécula para la interacción se realizó con la ayuda del software Chimera X. v.1.2 (16).

Figura 2. La enzima PARK2 Parkina (pdb ID = 4BM9) y sus dominios, archivo cristalográfico disponible en: <https://www.rcsb.org>. (Imagen del autor)



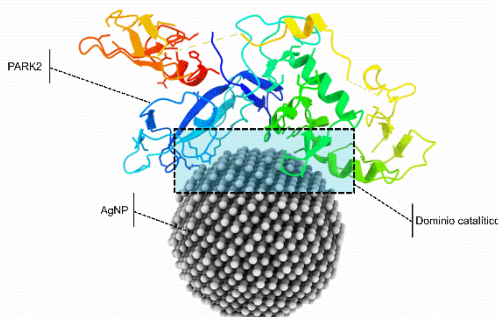
Acoplamiento molecular

El docking molecular se realizó con la ayuda del servidor HDOCK (17), preparando el ligando y la macromolécula para la interacción, la rejilla de caja cúbica se configuró para abarcar toda la enzima, fijada en 1 angstrom. El modelo de acoplamiento aplicado fue el algoritmo de modelado híbrido basado en el modelo de acoplamiento geométrico y el acoplamiento libre ab initio (17). Para el análisis de los resultados, se aplicó una distancia de 2,5 angstromes como zona de contacto entre los residuos de aminoácidos, además, todas las figuras fueron generadas y analizadas mediante el software Chimera X. v.1.2.

Resultados y Discusión

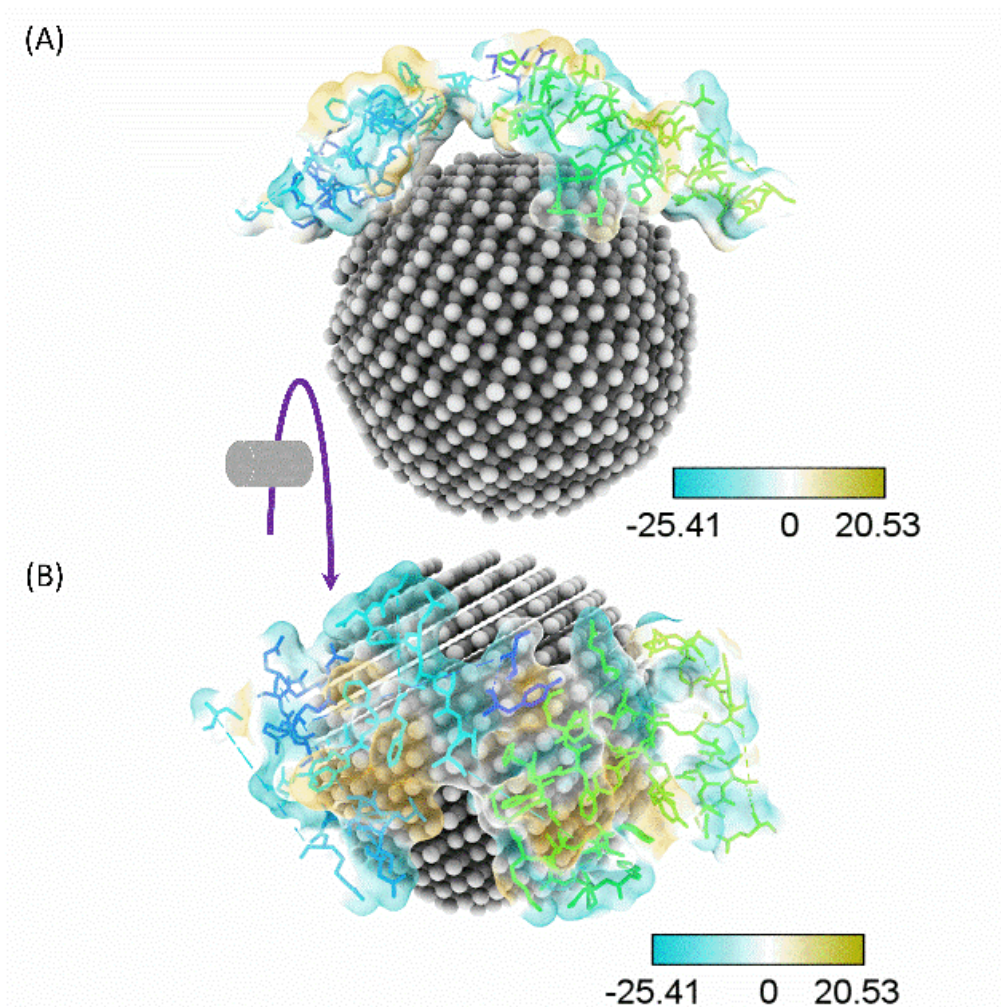
El modo de unión de la nanopartícula de Ag junto al dominio UPD evaluado por el método de acoplamiento mostró la disposición de la nanopartícula en la enzima Parkina (Figura 3). En el extremo N la enzima PARK2 (Parkina) es un bucle de unión de iones Zn llamado dominio parkin único (UPD) o Ring0 (18). Este resultado sugiere que los iones Ag liberados de la nanopartícula pueden competir por el sitio con los iones Zn. Se sabe que las mutaciones en la UPD para afectar la interfaz hidrofóbica hacen que Parkin sea significativamente menos soluble (15). La identificación de la unión de AgNP junto al dominio UPD en parkin proporciona una nueva estructura de dominio general para la proteína que será importante para evaluar los roles de su interacción y diseñar experimentos en nanomedicina y administración de fármacos destinados a comprender y/o controlar la enfermedad.

Figura 3. Posición del AgNP en los cálculos de acoplamiento molecular de la posición intermedia asumida por la AgNP al lado de la región UPD(Ring0) y Ring1. (Imagen del autor)



Los valores medios de hidrofobicidad de los residuos de aminoácidos observados para la enzima Parkin, que interactúa con el AgNP, se calcularon según el método MPL (Molecular Lipophilicity Potential) con una media de -4,218 MLP y un rango de -25,41 a 20,53 MLP (Figura 4). La tinción azul se utilizó para los residuos de aminoácidos más hidrofílicos, mientras que la tinción dorada oscura se aplicó a los residuos más hidrofóbicos. Los residuos Tyr149, Cys201, Phe208, Phe210, His279, Ile298, Phe304 y Tyr315 mostraron una mayor hidrofobicidad. Los residuos Cys166, Ser167, Thr168, Cys169, Arg170 y Gln171 cerca de la región catalítica de la enzima también mostraron hidrofobicidad. En los residuos Cys323, Val324 y Gln325 del dominio Ring1 también se observa hidrofobicidad debido a la presencia de aminoácidos apolares, formados en su mayoría por hidrocarburos. Los aminoácidos hidrofóbicos o hidrofílicos son importantes para determinar la región en la que la proteína se estabilizará en la célula tras su síntesis. En general, los aminoácidos apolares o hidrofóbicos tienden a asentarse en regiones de membrana (19), como en el caso de la parkina (PARK2).

Figura 4. El mapa de superficie para la hidrofobicidad de los residuos de aminoácidos observados para la enzima Parkin que interactúa con la AgNP que se calculó según el método MPL (Molecular Lipophilicity Potential). (Imagen del autor)



La figura 5 muestra los residuos de aminoácidos que interactúan con la proteína PARK2. Los residuos Tyr149, Lys151, Gln165, Cys 166, Ser167, Cys169, Arg170, Gln171, Asp184, Val186, Leu187, Ile188, Pro189, Asn190, Arg191, Cys201, Ser205, Ala206, Glu207, Phe208, En la Figura 5A se pueden observar Phe209, Phe210, Ser218, Asp219, Lys220, Glu221, Thr222 y Ser223 del centro catalítico (Anillo2) y del UPD (Anillo0) que interactúan con el AgNP. Los residuos de aminoácidos de los dominios Ring1 e IBR que interactuaron con la nanopartícula de plata fueron: His279, Asp280, Pro281, Gln282, Leu283, Gly284, Tyr285, Ser286, Ile298, Lys299, Glu300, Leu301, His302, His303, Phe304, Arg305, Glu309, Tyr312, Asn313, Arg314, Tyr315, Gln316, Gln317, Tyr318, Gly319, Ala320, Glu321, Glu322, Cys323, Val324, Gln326, Leu331, Cys332, Arg334, Pro335, Gly336, Cys337, Gly338, Ala339 y Gly340. Los aminoácidos que mostraron una mayor interacción con la nanopartícula de plata fueron la cisteína, la glutamina y el glutamato, donde estos son aminoácidos no esenciales, con características hidrofílicas polares, capaces de formar

Referencias

- (1) Balestrino R, Schapira AHV. Parkinson disease. *European Journal of Neurology*. 2020 Jan 27;27(1):27–42.
- (2) Sezgin M, Bilgic B, Tinaz S, Emre M. Parkinson's Disease Dementia and Lewy Body Disease. *Seminars in Neurology*. 2019 Apr 29;39(02):274–82.
- (3) Jagaran K, Singh M. Nanomedicine for Neurodegenerative Disorders: Focus on Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021 Aug 23;22(16):9082.
- (4) Lima PHC de, Antunes DR, Forini MM de L, Pontes M da S, Mattos BD, Grillo R. Recent Advances on Lignocellulosic-Based Nanopesticides for Agricultural Applications. *Frontiers in Nanotechnology*. 2021 Dec 17;3.
- (5) Souza MB, Santos JS, Pontes MS, Nunes LR, Oliveira IP, Lopez Ayme AJ, et al. CeO₂ nanostructured electrochemical sensor for the simultaneous recognition of diethylstilbestrol and 17 β -estradiol hormones. *Science of The Total Environment*. 2022 Jan;805:150348.
- (6) Pontes MS, Antunes DR, Oliveira IP, Forini MML, Santos JS, Arruda GJ, et al. Chitosan/tripolyphosphate nanoformulation carrying paraquat: insights on its enhanced herbicidal activity. *Environmental Science: Nano*. 2021;8(5):1336–51.
- (7) Pontes MS, Graciano DE, Antunes DR, Santos JS, Arruda GJ, Botero ER, et al. In vitro and in vivo impact assessment of eco-designed CuO nanoparticles on non-target aquatic photoautotrophic organisms. *Journal of Hazardous Materials*. 2020 Sep;396:122484.
- (8) Mezacasa AV, Queiroz AM, Graciano DE, Pontes MS, Santiago EF, Oliveira IP, et al. Effects of gold nanoparticles on photophysical behaviour of chlorophyll and pheophytin. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2020 Feb;389:112252.
- (9) Bhat ZI, Kumar B, Bansal S, Naseem A, Tiwari RR, Wahabi K, et al. Association of PARK2 promoter polymorphisms and methylation with colorectal cancer in North Indian population. *Gene*. 2019 Jan;682:25–32.
- (10) Novosadova E, Anufrieva K, Kazantseva E, Arsenyeva E, Fedoseyeva V, Stepanenko E, et al. Transcriptome datasets of neural progenitors and neurons differentiated from induced pluripotent stem cells of healthy donors and Parkinson's disease patients with mutations in the PARK2 gene. *Data in Brief*. 2022 Apr;41:107958.
- (11) Shukuya T, Takahashi K. Germline mutations in lung cancer. *Respiratory Investigation*. 2019 May;57(3):201–6.
- (12) Machado K dos S. Seleção eficiente de conformações de receptor flexível em simulações de docagem molecular [Internet]. [Porto Alegre, RS - Brazil]: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2011 [cited 2022 May 14]. Disponible en: <https://tede2.pucrs.br/tede2/handle/tede/5134>
- (13) Macalino SJY, Basith S, Clavio NAB, Chang H, Kang S, Choi S. Evolution of In Silico Strategies for Protein-Protein Interaction Drug Discovery. *Molecules*. 2018 Aug 6;23(8):1963.
- (14) Chatzigoulas A, Karathanou K, Dellis D, Cournia Z. NanoCrystal: A Web-Based Crystallographic Tool for the Construction of Nanoparticles Based on Their Crystal Habit. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2018 Dec 24;58(12):2380–6.
- (15) Wauer T, Komander D. Structure of the human Parkin ligase domain in an autoinhibited state. *EMBO Journal*. 2013 Jul 31;32(15):2099–112.
- (16) Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Couch GS, Croll TI, et al. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Science*. 2021 Jan 1;30(1):70–82.
- (17) Yan Y, Tao H, He J, Huang SY. The HDock server for integrated protein–protein docking. *Nature Protocols*. 2020 May 1;15(5):1829–52.
- (18) Hristova VA, Beasley SA, Rylett RJ, Shaw GS. Identification of a novel Zn²⁺-binding domain in the autosomal recessive juvenile Parkinson-related E3 ligase parkin. *Journal of*

Biological Chemistry. 2009 May
29;284(22):14978–86.

(19) Nelson DL, Cox MM. Principios de
Bioquímica de Lehninger. 4º. 2002.

- ⊙ El trabajo no recibió financiamiento.
- ⊙ Los autores declaran no tener conflictos de interés.
- ⊙ Correspondencias pueden encaminarse al correo electrónico del autor o del equipo editorial.