

ESTUDIO COMPUTACIONAL DE LA INTERACCIÓN LIGANDO- RECEPTOR EN LA CYP450-ESTEROL 14-DESMETILASA DE *Mycobacterium tuberculosis*

Christian Solís C.

Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos

RESUMEN

La Cyp450-Esterol 14-Desmetilasa es una enzima del *Mycobacterium tuberculosis* (MT) que, por la redundancia del gen que la codifica en el genoma del MT, debe cumplir roles preponderantes para la supervivencia del patógeno. Usando los modelos publicados de la estructura 3D de esta enzima se evaluó computacionalmente por el método de Docking la interacción de esta proteína a ligandos del tipo azol, los que fueron modelados por optimización geométrica y presentan valores de LogP superiores a 4.9, lo que indica su extrema lipoficidad, observándose con el clotrimazol los mejores valores para su «docking» con la proteína.

Palabras clave: Cyp450-Esterol 14-Desmetilasa, *Mycobacterium tuberculosis*, Docking, bioinformática.

ABSTRACT

The cytochrome P450 14alpha-sterol demethylase is an enzyme of the *Mycobacterium tuberculosis* (MT) that by redundancy of its gene that codifies it in the genome of MT should have preponderant rolls for the survival of the pathogen. Using the published models of the structure 3D of this enzyme, we evaluated by «docking» computational method interaction of this protein to ligands of azole type, those that were modeled by geometric optimization and present values of LogP up to 4,9, which indicates their extreme lipophilicity, being observed with clotrimazole the best values for its docking with the protein.

Keywords: Cyp450-Esterol 14-Desmetilasa, *Mycobacterium tuberculosis*, docking, bioinformática.

INTRODUCCIÓN

A pesar de ser la infección por el *Mycobacterium tuberculosis* (MT) una infección persistente en su forma latente en casi un tercio de la población mundial, de su multirresistencia a la terapia farmacológica y su sinergia con la epidemia del SIDA, pocos fármacos con nuevos mecanismos de acción se han desarrollado en los últimos 30 años. No obstante, la obtención de la secuencia del genoma del MT H37Rv está permitiendo la elucidación de la constitución genética del patógeno, revelándonos nuevos productos génicos que luego de sus caracterizaciones

estructural y funcional pueden constituirse en blancos farmacológicos potenciales⁽¹⁾. Las 14 a-esterol desmetilasas (CYP51s) son citocromos P450 que catalizan la remoción del grupo 14 a-metil del lanosterol, 24-metileno dihidrolanosterol y obtusifoliol en la síntesis del colesterol, ergosterol y fitoesteroles en animales, hongos y plantas, respectivamente⁽²⁾. Su presencia en el MT (codificada por el gen Rv0764c) ha sido inesperada. Basado en los datos genómicos, así como la disponibilidad de modelos estructurales⁽³⁾, realizamos un estudio computacional de la interacción de esta proteína a sus potenciales ligandos⁽⁴⁾; estudio que será el sustento

para el diseño racional de nuevos fármacos que tengan como blanco a esta Cyp450-Esterol 14-Desmetilasa.

METODOLOGÍA

- 1. Análisis bioinformático de la Cyp450-Esterol 14-Desmetilasa.** Se obtuvo la secuencia de aminoácidos de la enzima en la base de datos NR del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se comparó la secuencia con el genoma y proteoma del MT H37Rv usando los programas TBLASTN y BLASTP, respectivamente, determinando su localización y redundancia en el genoma. También se obtuvieron modelos de las estructuras 3D de la enzima en formato PDB, a partir de base de datos públicas (<http://www.rcsb.org/>). La calidad de los modelos fue evaluada en el servidor Verify3D Structure Evaluation (<http://www.doe-mbi.ucla.edu/Services/>).
- 2. Modelaje molecular de los ligandos.** Ligandos candidatos pertenecientes al grupo químico Azol fueron esquematizados usando el programa ISIS DRAWN 2.4 distribuido por MDL Information Systems, Inc. Posteriormente fue exportado al programa de modelaje molecular HyperChem 6.03 distribuido por Hypercube, Inc ⁽⁵⁾. La optimización geométrica la realizamos usando el método numérico de gradiente de Polak-Ribiere, teniéndose como parámetros un número máximo de ciclos de 540 y un gradiente atómico RMS de 0.1 kcal/(A° mol).
- 3. Docking.** Los ensayos computacionales de Docking entre los ligandos modelados y la estructura de la enzima en estudio se realizaron usando el programa Hex 3.0, distribuido por la Universidad de Aberdeen ⁽⁶⁾. El modo de búsqueda fue de rotación total y en base a la forma y volumen de las moléculas. Los modelos del acoplamiento ligando-receptor se guardaron en formato PDB, registrándose los parámetros del docking. La selección de los modelos se basó en sus valores de

energía total y la orientación de los ligandos en el receptor. En base a estos resultados se diseñaron, computacionalmente, nuevos ligandos a fin de optimizar el docking y mejorar los parámetros QSAR como el LogP.

4. Validación del Docking

Se realizó un control usando los modelos de las estructuras obtenidas experimental y computacionalmente en el docking. Comparándose la posición y orientación de los ligandos (fenilimidazol y fluconazol) en ambos casos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla N.º 1 se observa gráficamente en el genoma circular del MT la redundancia de la esterol-14-desmetilasa, se observan también 25 regiones en el genoma con similitud a la secuencia del gen que codifica esta proteína, pero sólo 6 de ellas son de alta similitud y una idéntica, que es la que corresponde a la localización del gen en el genoma. Esta redundancia nos puede indicar que para la actividad de esta proteína existen isoformas codificadas por distintos genes bastante similares pero no iguales, lo que nos indica que esta enzima debe ser esencial para la integridad del microorganismo ya que se presenta codificada repetidamente en el genoma ⁽²⁾; no obstante esto dificulta el hallar un inhibidor para su actividad, ya que los sitios de unión al ligando no son exactamente los mismos en estas isoformas, presentándose diferentes valores de afinidad y de actividad intrínseca.



Figura N.º 1. Estructura 3D de la Cyp450-Esterol 14-Desmetilasa con el fenilimidazol.

Tabla N.º 1. Análisis bioinformático del la Cyp450-Esterol 14-Desmetilasa del *Mycobacterium tuberculosis*.

REDUNDANCIA EN EL GENOMA DEL MT	DESCRIPCIÓN DE LOS MODELOS 3D DISPONIBLES		
		MODELO 1	MODELO 2
	Código PDB	<u>1E9X</u>	<u>1EA1</u>
	Ligando	Fenilimidazol	Fluconazol
	Distancia Fe-N (Ao)	2.4	2.34
	R-Value	0.185	0.204
	Resolution [Å]	2.10	2.21
	Método de determinación	Difracción de rayos X	Difracción de rayos X
	Valor máximo de calidad	0.83	0.87

En la Tabla N.º 1 también se presentan datos de los modelos publicados para la estructura tridimensional de la P450 desmetilasa utilizados en el presente trabajo⁽⁷⁾, ambos fueron obtenidos por difracción de rayos X y presentan valores R (medida del refinamiento de la estructura) inferiores a 0.20 y sus valores de resolución están cerca al valor óptimo de 2.0 Å. Ambos parámetros son indicadores de que no se necesitó un mayor refinamiento a partir de los resultados experimentales para obtener la estructura final publicada, por lo que estas estructuras son una base confiable para estudios computacionales como el nuestro.

El método utilizado para el modelaje molecular de los ligandos fue el de la optimización geométrica (método para hallar la estructura que reduce al mínimo la energía de la molécula, es decir, aquella que la hace más estable desde el punto de vista energético), usando el método numérico de gradiente de Polak-Ribiere Este método localiza el mí-

nimo energético introduciendo pequeños en los valores de grados de libertad (coordenadas internas), analizando las variaciones que ocasionan en la energía. La Tabla N.º 2 presenta los descriptores de los modelos obtenidos. El principal parámetro analizado fue el de LogP (logaritmo del coeficiente de partición), un parámetro QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationships*) que es una medida de la lipofilia de la molécula y que, en el caso de microorganismos como el MT, se ha observado que deben presentar valores entre 1.3 y 4.1⁽⁸⁾. Los resultados muestran que la mayoría de los ligandos tipo azol presentan valores superiores a este rango, esta alta lipofilia (valores de LogP altos) haría efectiva su absorción por los microorganismos libres que presentan una alta lipofilia en su pared celular. No obstante, estos valores no serían óptimos cuando el microorganismo se encuentra secuestrado en el interior de las células fagocíticas, ya que tendría que superar varias barreras hidrofílicas presentes en la célula del hospedero.

	Fórmula	LogP	Energía total (kcal/mol)	Gradiente RMS kcal/(Å.mol)	Flexibilidad (phi)	Área superficial (aproximada) (Å ²)
Clotrimazol	C ₂₂ H ₁₇ N ₂ Cl	4.93	48.62744	0.08820	4.224	372.09
Itraconazol	C ₃₅ H ₃₉ O ₄ Cl ₂ N ₈	8.23	71.79142	0.09874	10.29	899.29
Fluconazol	C ₁₃ H ₁₂ F ₂ N ₆ O	0.27	41.99165	0.09668	3.838	322.03
Ketoconazol	C ₂₅ H ₂₆ O ₄ Cl ₂ N ₄	4.73	51.20660	0.08839	7.336	668.66
Econazol	C ₁₈ H ₁₅ Cl ₃ N ₂ O	5.48	40.52781	0.09041	6.060	495.97
Tram-03	C ₁₉ H ₁₄ Cl ₂ O	5.91	15.61985	0.08645	4.213	387.91
Tram-34	C ₂₂ H ₁₇ N ₂ Cl	6.27	47.61015	0.08756	4.224	374.69
Tram-39	C ₂₀ H ₁₄ NCl	6.19	32.27390	0.09642	3.956	392.29
Fenilimidazol	C ₉ H ₈ N ₂	1.67	22.41712	0.09644	1.537	252.23

Tabla N.º 2. Parámetros de modelaje molecular de los ligandos en estudio.

Tabla N.º 3. Resultados del análisis de Docking para los ligandos en estudio

	No de modelos	Modelo elegido	Soluciones del modelo	$E_{total} = E_{forma} + E_{fuerza}$	Distancia Fe-N (Å)
Clotrimazol	38	1	498	-216.6	2.54
Itraconazol	58	2	502	-322.1	3.78
Fluconazol	51	2	495	-232	2.30
Ketoconazol	45	2	502	-276.6	2.73
Econazol	46	2	508	-219.0	3.51
Tram-03	45	1	506	-203.1	6.75
Tram-34	47	2	512	-205.1	4.42
Tram-39	43	2	510	-197.7	7.53
Fenilimidazol	27	5	510	-127.0	3.00

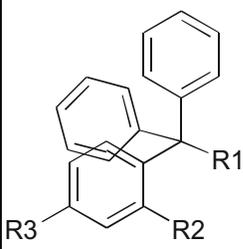
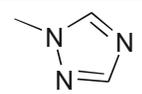
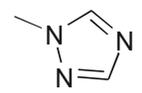
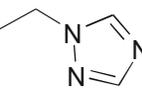
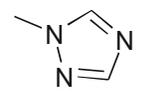
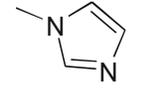
Para los ensayos computacionales de reconocimiento molecular o Docking (técnica a través de la cual se pueda obtener información sobre la interacción de los ligandos a la estructura del receptor), utilizamos el programa Hex 3.0 que usa las correlaciones esférico polares de Fourier para acelerar el Docking y los cálculos de superposición, ya que permiten la translación y rotación de los modelos moleculares a fin de evaluar las orientaciones de Docking obtenidas. Con algunas restricciones, el docking score obtenido puede ser interpretado como una energía de interacción (E_{total}) que idealmente debe ser disminuida⁽⁶⁾. Nuestros resultados se muestran en la Tabla N.º 3 y se observa que el valor máximo de E_{total} se presentó cuando el

ligando era el Itraconazole, lo que se explica debido a su gran volumen y alta lipofiliidad (LogP igual a 8.23), las cuales presentan orientaciones en el interior de la estructura de la desmetilasa bastante favorables energéticamente.

La mejor orientación la presentó el clotrimazol (Figura N.º 2) con una distancia del N imidazólico al Fe del Hem cercano a los observados experimentalmente para otros ligandos tipo azol como el fenilimidazol y el fluconazol (Tabla N.º 1).

En base a los resultados anteriores, diseñamos computacionalmente cuatro nuevos ligandos, cuya descripción se presenta en la Tabla N.º 4.

Tabla N.º 4. Parámetros para los ligandos computacionalmente diseñados

	Modelos	R1	R2	R3	Masa	LogP	E_{total}
	Modelo 1		-Cl	-H	345.83	5.45	-210.9
	Modelo 2		-Cl	-Cl	380.28	5.97	-232.0
	Modelo 3		-Cl	-H	359.86	5.69	-214.3
	Modelo 4		-F	-F	394.3	6.68	-203.0
	Clotrimazol		-Cl	-H	344.84	4.93	-216.6

