



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Departamento de Química

Tesis de Doctor en Química

"Determinación de nuevos principios y elementos de diseño biomoleculares y su aplicación en sistemas de interés terapéutico"

Lic. Cintia Anabella Menéndez

Bahía Blanca, Argentina

- 2018 -

- PREFACIO -

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Química, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el área IV (Fisicoquímica) y II (Química Orgánica), Departamento de Química, dependiente de la Universidad Nacional del Sur (UNS) y en el Instituto de Química del Sur (INQUISUR), dependiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), durante el período comprendido entre el 1 de abril de 2014 y el 30 de julio de 2018, bajo la dirección de los Doctores, Dario C. Gerbino, Profesor Adjunto del Dpto. de Química de la UNS e investigador Adjunto del CONICET y Gustavo A. Appignanesi, Profesor Titular del Dpto. de Química de la UNS e investigador principal del CONICET.

[Firma del Alumno]



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría general de posgrado y educación continua

La presente tesis ha sido aprobada el / /, mereciendo una calificación de, (.....).

A todos mis maestros...

Y si de los de 'la vida' hablamos,

Entonces muy especialmente a mi abuelo Pacho.

*"...Porque fue mi maestro quien me enseñó no solamente cuan poco sabía,
sino también que cualquiera que fuese el tipo de sabiduría a la que yo pudiese aspirar jamás,
no podría consistir en otra cosa que en percatarme más plenamente de la **infinitud** de mi ignorancia."*

-Karl Popper.

- RESUMEN -

El trabajo realizado en esta tesis surge del reconocimiento explícito de que la comprensión detallada de la modulación local que sufren distintas interacciones no covalentes en ambientes de dimensiones nanométricas resulta fundamental en diversos contextos biológicos. En este sentido, uno de los principales determinantes estructurales en proteínas son los puentes de hidrógeno del 'backbone' o por sus siglas en inglés BHBs (*backbone hydrogen bonds*). Dichas interacciones no covalentes son estables cuando el agua es significativamente excluida de su entorno local por los grupos hidrofóbicos de las cadenas laterales de los aminoácidos. Sin embargo, este requerimiento no necesariamente se cumple a lo largo de toda la proteína, y particularmente en sitios de binding, los cuáles pueden presentar propiedades de hidratación marcadamente diferentes de otras regiones de la superficie proteica. Precisamente, ha sido sugerido que las propiedades de hidratación que presentan los sitios de binding juegan un papel central en los procesos de asociación ligando-proteína, así como también proteína-proteína, ya que se espera que las moléculas de agua de hidratación resulten lábiles y sean desplazadas del sitio de binding al formarse un complejo determinado. De hecho, el remplazo de moléculas de agua 'desfavorables' por grupos del ligando complementarios a la superficie de la proteína ha sido establecido como una de las fuerzas impulsoras principales para el binding y, como tal, se ha incorporado en estrategias computacionales basadas en la estructura (esta aproximación será aplicada a uno de los sistemas estudiados en el transcurso de esta tesis). Además, estudios de unión de pequeñas moléculas de prueba, han sido combinados con mapas de exclusión dictados por el patrón de moléculas de agua fuertemente unidas, con el objetivo de detectar sitios de binding. De acuerdo con este escenario heterogéneo para la hidratación de proteínas, una serie de investigaciones lideradas por el profesor Ariel Fernandez, identificaron puentes de Hidrógeno incompletamente protegidos (parcialmente expuestos al solvente) los cuáles permitieron codificar el proceso de unión en términos de dichos "defectos de empaquetamiento" que resultarían "pegajosos" debido a la necesidad de protección *intermolecular* adicional. Dichas ideas del Prof. Ariel Fernandez han sido precisamente la principal inspiración de este trabajo de tesis. Sin embargo, salvo en ciertos contextos específicos, dicho enfoque se ha centrado mayormente en el análisis de estructuras tridimensionales "estáticas" para una serie de proteínas. Resulta entonces muy importante destacar en este punto que por ser justamente las proteínas moléculas flexibles, su estructura obtenida experimentalmente (en particular por cristalografía de rayos X) captura meramente a aquella conformación más probable dentro de su dinámica estructural. Es decir que hablar de estructura es, más bien, hablar de una dinámica estructural. Existe todo un paisaje conformacional para una misma proteína, con mayor o menor población (probabilidad) de estructuras preferidas, de acuerdo con su estabilidad relativa en ese ensamble. Adicionalmente, tal vez, sean aquellas conformaciones estructuralmente más defectuosas, las que poseen mayores potencialidades adhesivas. Así, esta última insinuación resume sucintamente una de las hipótesis de partida para el trabajo desarrollado en esta tesis.

En resumen, la columna vertebral de esta tesis será el estudio de interacciones moleculares no covalentes relevantes en medios biológicos, con el fin último de entender mecanismos subyacentes en el reconocimiento molecular, ya sea de complejos proteína-proteína como proteína-ligando, y sus proyecciones en el desarrollo de nuevas herramientas aplicables, por ejemplo, en el diseño racional de fármacos. Más específicamente, centramos nuestra atención en el estudio de BHBs,

en un esfuerzo por esclarecer la dependencia contextual de dichas interacciones. Para esto, estudiamos mediante simulaciones por dinámica molecular las propiedades de hidratación de una serie de proteínas con demostrada relevancia terapéutica. Además realizamos matrices de contacto, dónde estudiamos el tiempo promedio de vida de un determinado BHBs, con el objetivo final de establecer relaciones entre su comportamiento/estabilidad con la exposición local al agua (solvente). De este modo, se demostrará que algunas de las particularidades de las conformaciones menos estables, pueden cumplir un rol fundamental en la fisicoquímica de interacción y, por otra parte, como esta 'perdida de estabilidad' puede estar justificada por sus características locales de hidratación. Posteriormente, utilizamos este conocimiento de manera predictiva en la evaluación de nuevos compuestos (los mismos pertenecientes a familias de moléculas de origen natural, caracterizadas por poseer un abanico de actividades biológicas ampliamente reportadas), así como también, en la propuesta de modificaciones racionales sobre pequeños ligandos con un interés biológico ya revelado. Finalmente algunos de dichos compuestos fueron sintetizados y evaluados biológicamente como inhibidores de la enzima Acetilcolinesterasa.

- ABSTRACT -

The present thesis work arises from the explicit recognition of the fact that understanding local modulation of different non-covalent interactions in nanometric environments is cornerstone in diverse biological contexts. In this sense, backbone hydrogen bonds (BHBs) have been shown to constitute major determinants of protein structure. In soluble proteins, such non-covalent interactions are stable provided water is significantly excluded from their local environment by hydrophobic aminoacid side-chains. However, this requirement is not necessarily met all along the protein chain, particularly at protein binding sites. Precisely, while not focusing explicitly on BHBs, the hydration properties of binding sites have been suggested to play a main role in ligand-binding or in protein-protein association since labile hydration-water molecules are expected to be displaced from the protein binding site. Indeed, the replacement of so-called "unfavorable" water molecules by groups of the ligand complementary to the protein surface has been established as a principal driving force for binding and, as such, has been incorporated in computational structure-based strategies. Also, fragment clustering approaches (binding of small molecular probes) have been combined with exclusion maps dictated by the pattern of tightly bound water molecules in order to detect protein binding sites.

In accord with this heterogeneous scenario for protein hydration, the existence of BHBs partially exposed to the solvent (incompletely wrapped BHBs or 'dehydrons') has been established by Professor Ariel Fernández. The relevance of the dehydron for protein binding (their inherently sticky nature provided their requirement of additional intermolecular wrapping) led him to also implement them within the successful 'wrapping technique'. Such motif, which exhibits an enhanced dehydration propensity, represents a structural packing defect that is readily determined from PDB coordinates (from X-ray experiments, for example). These ideas have been the main source of inspiration for the present thesis work. However, beyond certain specific contexts, the wrapping approach has mostly relied on 'static' structural information of proteins. Then, it is very important to note that, since proteins are inherently dynamical objects, the merely binary (formed/not formed) classification of non-covalent interactions provided by PDB structures might be veiling some valuable information regarding protein interactions and function. Hence, the experimentally determined protein structure (especially that conformation obtained from X-ray experiments) represents in fact the most probable conformation from all the ones visited during the protein structural dynamics. This means that there exists an incredibly complex protein conformational landscape with a huge amount of structures, each with high or low population (probability) according to its relative stability in that ensemble. Additionally, and provided the above-described hydration properties of protein binding sites, certain less stable conformations could be central for the binding process. This constitutes one of the main hypothesis of this thesis work.

In summary, the central objective of this work will be the study of non-covalent interactions relevant in biological systems, with the aim of understanding the underlying mechanisms of molecular recognition and their implications in bioengineering, as in the development of new tools for rational drug design. More specifically, we have centered our attention on the study of BHBs, in order to clarify the way in which this kind of interaction is modulated by the local context in proteins. To this end, we have characterized the hydration properties of a series of therapeutic relevant proteins by means of molecular dynamics simulations. Additionally, we have performed a contact matrix analysis, where the overage lifetime of each

interaction (BHBs) was recorded to relate their stability with solvent exposure. In this way, it will be shown that some characteristics of the less stable conformations might play a fundamental role in binding processes, while this 'loss of stability' will be rationalized in terms of hydration properties. In turn, this knowledge will be exploited in the theoretical evaluation of several new compounds for different biological targets. Finally, some of such compounds will be synthesized and biologically tested as anti-Acetylcholinesterase agents.

- PUBLICACIONES SURGIDAS A PARTIR DE ESTA TESIS -

[1] Joan Manuel Montes de Oca, Cintia A. Menéndez, Sebastián R. Accordino, David C. Malaspina, and Gustavo A. Appignanesi, "Studies on electrostatic interactions within model nano-confined aqueous environments of different chemical nature", **The European Physical Journal E**, 2017, 40: 78. Doi: 10.1140/epje/i2017-11568-6.

[2] Cintia A. Menéndez, Brunella Biscussi, Sebastián Accordino, A. Paula Murray, Darío C. Gerbino, and Gustavo A. Appignanesi, "Design, synthesis and biological evaluation of 1,3-dihydroxyxanthone derivatives: Effective agents against acetylcholinesterase", **Bioorganic Chemistry**, 2017, 75: 201–209. Doi: 10.1016/j.bioorg.2017.09.012

[3] Cintia A. Menéndez, Sebastián R. Accordino, Darío C. Gerbino, Gustavo A. Appignanesi, "Hydrogen bond dynamic propensity studies for protein binding and drug design", **PLOS ONE**, 2016, 11(10): e0165767. doi: 10.1371/journal.pone.0165767. ISSN: 1932-6203.

[4] Cintia A. Menéndez, Sebastián R. Accordino, Darío C. Gerbino, Gustavo A. Appignanesi, "Chameleonic" backbone hydrogen bonds in protein binding and as drug targets, **The European Physical Journal E.**, 2015, 38 (107), 1-6. Springer. ISSN: 1292-8941.

Capítulos de libro:

[1] Biopolymers for Medical Applications. Chapter 13: Dynamic Analysis of Backbone-Hydrogen-Bond Propensity for Protein Binding and Drug Design. C. A. Menéndez, S. R. Accordino, J. A. Rodríguez Fris, D. C. Gerbino, G. A. Appignanesi. Editorial: CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida, 2016, p 317-338. ISBN: 978-1-4987-4496-6.

- ÍNDICE DE CONTENIDOS -

Prefacio	2
Resumen	4
Abstract	6
Producción	8
Índice de contenidos	9
Capítulo 1	11
Introducción y antecedentes	11
Antecedentes contexto de aplicación	12
Antecedentes fundantes del marco conceptual	27
Referencias Capítulo 1	34
Capítulo 2	37
Descripción general y objetivos	37
Métodos	40
Estudios de interacciones no covalentes en sistemas modelo	45
Otras consideraciones	54
Estudios de la dinámica de BHBs en complejos proteína- proteína	57
Conclusiones del capítulo 2	74
Referencias capítulo 2	75
Capítulo 3	77
Descripción general y objetivos	77
Convergencia y reproducibilidad de las medidas de propensiones dinámicas de BHBs	78
Propiedades adherentes de los CHBs	100
Otras consideraciones	108
Conclusiones del capítulo	113
Referencias capítulo 3	115
Capítulo 4	116
Descripción general y objetivos	116
Estudios de Docking y Dinámica Molecular	116
Síntesis orgánica	126
Conclusiones del capítulo	128
Referencias capítulo 4	129
Capítulo 5	130

Descripción general y objetivos	130
Aplicabilidad de los estudios de propensiones dinámicas de BHBs	132
Estudios de Docking Molecular	136
Estudios de Dinámica Molecular	137
Análisis de las propiedades termodinámicas del agua de hidratación: GIST	138
Modificaciones racionales	142
Síntesis de nuevas xantonas anfifílicas	145
Ensayos de inhibición sobre Acetilcolinesterasa	145
Propuesta de futuras modificaciones	146
Conclusiones del capítulo	148
Referencias capítulo 5	149
Capítulo 6	150
Conclusiones generales	150
Anexo I	153
Detalles experimentales generales	153
Procedimientos experimentales obtención de los compuestos CH-6* y CH-7*	153
Procedimientos experimentales obtención nuevos derivados xantónicos	155
Espectros de RMN (resonancia magnética nuclear)	158
Agradecimientos	172

CAPITULO 1

"Si hay magia en este planeta, está contenida en el agua."

Loran Eisely.

INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES

1.0 Motivación y fundamento conceptual:

Una plena comprensión del comportamiento del agua, la matriz de la vida, en la nano-escala resulta esencial para entender la biología a nivel molecular. En los procesos de organización biológica, como ser el plegamiento de biopolímeros, la interacción entre proteínas y el reconocimiento molecular, el agua oficia de mediador entre complejas superficies que se relacionan generalmente por interacciones de tipo no-covalente (1-7). Un ejemplo típico es la interacción entre dos superficies hidrofóbicas donde el nanoconfinamiento afecta a las propiedades termodinámicas del agua de modo de producir el "secado" promotor del colapso hidrofóbico. Por su parte, en la unión de un ligando (como ser una droga) a una proteína, se espera que éste desplace agua de hidratación fácilmente removible (2,3,7). De hecho, recientemente se han desarrollado métodos para predecir e identificar sitios de unión basados en la determinación de regiones con propensión a la remoción local del agua (2,3). En tal sentido, dichos procesos generan ambientes de nanoconfinamiento para los cuales nuestro conocimiento del comportamiento del agua masiva suele tener valor escaso o, incluso, resultar engañoso. El conocimiento del modo en que distintas condiciones de nanoconfinamiento afectan a la hidrofobicidad/hidrofilicidad, no sólo desde lo geométrico sino que también a partir de la especificidad química, es por ende de enorme relevancia tanto para comprender y predecir el comportamiento de estos sistemas, como para emularlos en esfuerzos de bioingeniería.

Es evidente que hoy no sólo no existe una teoría de la hidrofobicidad e hidrofilicidad a nivel de la nanoescala (1,2), sino que es necesario el desarrollo de una nueva intuición al respecto. Tampoco es comprendido a nivel racional (e incluso muchas veces no es suficientemente reconocido) el modo en que las interacciones no covalentes (como las interacciones hidrofóbicas o las interacciones electrostáticas, como los puentes de Hidrógeno), dependen de su entorno local. Usualmente en diseño de drogas, bioingeniería, química supramolecular y ciencia de materiales se utilizan conceptos derivados de comportamientos típicos en solvente masivo o de comportamientos "in vacuo" que no resultan aplicables en ambientes de nanoconfinamiento. Por lo tanto, no asombra la escasez de elementos de diseño racional y el abrumador dominio de los intentos tipo "prueba y error" (extremadamente costosos y sub-óptimos). A lo sumo, se utilizan estrategias como el así

llamado "principio de Gulliver" (utilizado en química supramolecular y diseño de materiales, el cuál consiste en "atar al gigante" utilizando numerosas "sogas" diminutas). En tal sentido, parece evidente que para que este enfoque deje de ser conceptualmente "Liliputiense" se debe considerar el hecho de que no es cuestión de sumar interacciones no covalentes como si fueran aditivas, sino de combinarlas en una topología adecuada pues, como dicho, ciertas interacciones pueden ser significativamente moduladas por su entorno.

Sustraídas del efecto disruptivo del solvente masivo, las interacciones no covalentes de naturaleza electrostática suelen ser determinantes en ambientes de nanoconfinamiento. Esta dependencia del contexto y, por ende, no aditividad de las distintas interacciones no covalentes se manifiesta, por ejemplo, en el modo en que la presencia de hidrófobos vecinos afecta a la intensidad y la estabilidad de las interacciones electrostáticas (al ordenar localmente al agua, promover la desolvatación y modular el dieléctrico local) (7,8). De hecho, el efecto protector o "arropador" de las interacciones hidrofóbicas ha sido introducido exitosamente en bioingeniería por el Prof. Ariel Fernandez (7). Dicha cuestión también ha sido cualitativamente reconocida en las teorías tipo O-Ring del "protein binding" (9) que postulan que es necesario que un grupo central de residuos o "hot spot" se vea protegido por un anillo de residuos energéticamente menos relevantes pero que promuevan la desolvatación local de los anteriores.

En definitiva, la columna vertebral del trabajo realizado en esta tesis surge del reconocimiento explícito de que la comprensión detallada tanto de la naturaleza de la hidrofobicidad e hidrofiliidad a nivel de la nanoescala como de la modulación local que sufren las distintas interacciones no-covalentes en ambientes de dimensiones nanométricas resulta fundamental en diversos contextos biológicos. De este modo, uno de los objetivos fundamentales de esta tesis es el estudio de interacciones moleculares no covalentes relevantes en medios biológicos con el fin último de entender mecanismos subyacentes en el reconocimiento molecular, ya sea de complejos proteína-proteína como proteína-ligando, y sus proyecciones en el desarrollo de nuevas herramientas aplicables, por ejemplo, en el diseño racional de fármacos. Posteriormente, utilizamos este conocimiento en moléculas de origen natural de gran interés terapéutico, como son las xantonas y derivados que han demostrado poseer una gran diversidad de actividades farmacológicas tales como anti-tumorales, anti-inflamatorias, anti-virales etc. De este modo, se estudió en detalle algunas de estas moléculas y su interacción con distintas proteínas, se propusieron modificaciones racionales de las mismas, y finalmente algunos de dichos compuestos fueron sintetizados y evaluados biológicamente.

1.1- Antecedentes del contexto de aplicación:

1.1.1- Descubrimiento/desarrollo de nuevos fármacos: perspectivas generales de un proceso costoso y complejo.

El desarrollo de fármacos es un proceso costoso y complejo, el cual implica atravesar una serie de etapas consecutivas, las cuales se muestran esquemáticamente en la **Figura 1.1** (10). Este proceso inicia con la identificación de compuestos que se unen a un blanco terapéutico o que muestran actividad biológica en un ensayo de tamizaje. Aquellas moléculas que muestran actividad biológica son llamadas *hits*. El siguiente paso es encontrar compuestos que tengan propiedades farmacéuticas atractivas, incluyendo por ejemplo baja toxicidad, solubilidad adecuada, entre otras propiedades farmacocinéticas. Tales compuestos son llamados «líderes o cabezas de serie». Típicamente los *hits* son encontrados por

tamizaje de un número vasto de moléculas, mientras que los compuestos «cabezas de serie» son desarrollados a partir de los *hits* a través de modificaciones químicas.

En cuanto a los tiempos y costos del proceso de desarrollo y descubrimiento de fármacos, se estima que el desarrollo de un fármaco tarda aproximadamente entre 10 y 15 años y se invierten en promedio más de **900 millones de dólares** (figura 1.1). El tiempo y costos tan elevados están asociados en gran medida a la gran cantidad de moléculas que fallan una o varias etapas del desarrollo de fármacos (se estima que de cada 9000 moléculas biológicamente activas sólo una tiene uso clínico). Por otra parte, considerando que el número de moléculas orgánicas que son sintéticamente factibles se estima entre 10^{20} y 10^{24} (11), es evidente que su análisis sería muy complejo sin el uso de técnicas computacionales. De este modo, el diseño de fármacos asistido por computadora (DFAC) o '*computer- aided drug design*' (CADD) surge como una herramienta esencial en este proceso; el DFAC tiene como principio entender relaciones estructura-actividad biológica o farmacológica de compuestos y está integrado por diversas áreas de la investigación que incluyen a la quimiinformática, bioinformática, modelado molecular, química teórica y visualización de datos. Como se mencionó previamente, el desarrollo de fármacos involucra varias etapas que abarcan desde la identificación de dianas moleculares hasta las fases clínicas. La mayoría de las técnicas clásicas del DFAC están centradas en las primeras etapas, denominadas en conjunto como preclínicas. De este modo, los métodos computacionales han tenido un rol esencial en el descubrimiento de fármacos en los últimos años (12). Algunos ejemplos de drogas recientemente aprobadas y cuyo desarrollo estuvo asistido por el uso de técnicas computacionales son: captopril (13), saquinavir, ritonavir, indinavir (14) y tirofiban (15).

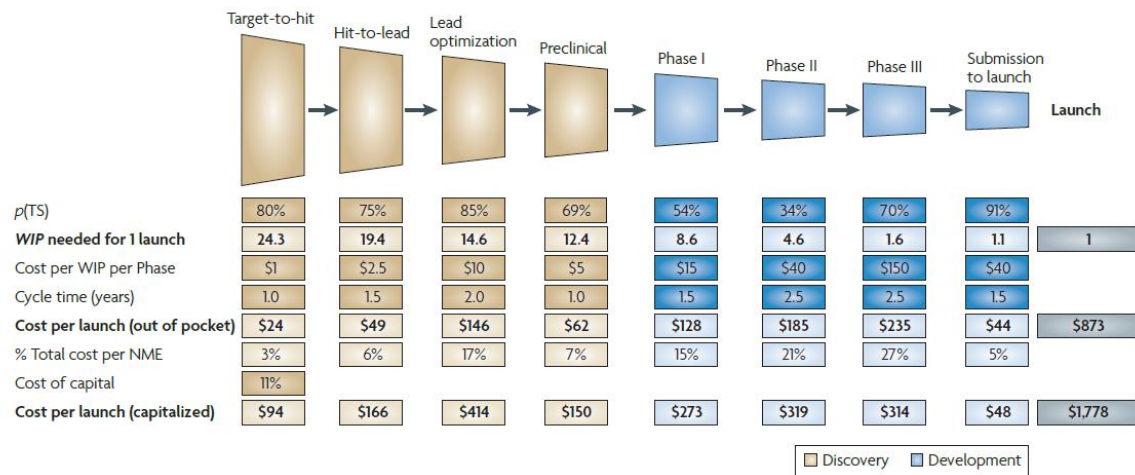


Figura 1.1. Modelo estándar actual del proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos. Se muestra en orden decreciente para cada etapa del proceso desde la identificación de un compuesto hit hasta su lanzamiento en el mercado: p (TS) probabilidad de éxito de la transición de una etapa a la siguiente; el costo de cada etapa por proyecto, expresado en millones de dólares; el tiempo requerido en cada etapa del proceso en años, y el costo capitalizado que insumen cada una de las etapas para lograr la obtención de sólo un nuevo fármaco (1.778 millones de dólares). (Imagen tomada del trabajo titulado: *How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge*).

Los métodos aplicados en el DFAC se pueden clasificar de modo general como aquellos basados en el ligando (2D, dos dimensiones) o basadas en la estructura de la proteína o receptor (3D). Particularmente en esta tesis se hará uso de este

último tipo de herramientas, por lo cual a continuación se explican brevemente sus principales características y fundamentos.

1.1.2- Métodos basados en la estructura del blanco:

1.1.2.1- Docking Molecular:

Los métodos de *docking* molecular permiten predecir la estructura de complejos proteína-ligando y estimar su afinidad de manera rápida. Usualmente, la proteína se mantiene en una dada conformación (rígida) y se identifican diferentes poses para el ligando (flexible), de las cuales se selecciona aquella que presente mayor afinidad. Se requiere conocer la estructura tridimensional del blanco, o al menos del sitio de unión, a nivel atómico. Ésta puede provenir de experimentos de difracción de rayos X con resolución por debajo de 2,5 Å, de experimentos RMN o de modelos por homología de alta identidad. La estructura tridimensional de las moléculas pequeñas puede obtenerse también a partir de datos experimentales (estructuras cristalinas o RMN) o se pueden modelar las conformaciones *de novo*. En general, el *docking* proteína-ligando no se aplica a toda la superficie proteica sino que se restringe a un sitio de interés obtenido de información previa proveniente de co-cristales o de programas de detección de bolsillos drogables, entre otros.

Para lograr sus objetivos, los programas de *docking* necesitan básicamente dos componentes: (i) un algoritmo de búsqueda eficiente que halle diferentes poses del ligando en relación a la estructura del blanco y (ii) una función de puntaje para estimar la afinidad de cada pose e ir seleccionando las poses energéticamente más favorables.

1.1.2.1.1- Algoritmo de búsqueda.

El algoritmo de búsqueda es el encargado de explorar de manera efectiva el espacio conformacional disponible para el ligando en el sitio de interés. Dada la enorme cantidad de posibilidades, se usan técnicas heurísticas que permiten hallar poses aceptables en tiempos de simulación acotados. En la gran mayoría de los casos los programas tienen implementados métodos estocásticos como *simulated annealing* (Monte Carlo) (16,17) o algoritmos genéticos (18-20) que operan haciendo cambios aleatorios sobre los grados de libertad conformacionales del ligando. Las poses del ligando que se van obteniendo se evalúan mediante una función de probabilidad predefinida que determina si se mantienen como opción o se eliminan. Los grados de libertad evaluados suelen restringirse a la traslación, rotación y las torsiones de enlaces. Las distancias y ángulos de enlace permanecen fijas, incluso en anillos alifáticos, de modo de simplificar la búsqueda.

1.1.2.1.2- Funciones de puntaje (*Scoring Functions*).

La evaluación precisa, con un costo computacional razonable, de la afinidad de interacción entre los ligandos y sus receptores es de enorme beneficio para el diseño racional. Este hecho posibilita la predicción de la afinidad de un gran número de compuestos antes de ser sintetizados, agilizando el proceso del desarrollo farmacológico como un todo. Sin embargo, obtener una estimación adecuada de la energía libre de unión de un complejo ligando-proteína es una tarea bastante costosa computacionalmente. De este modo, la necesidad de funciones de evaluación más rápidas, que puedan ser utilizadas por los programas de *docking*, ha llevado al desarrollo de un gran número de funciones que hacen uso de aproximaciones para la valoración del complejo ligando-proteína. Fundamentalmente, las funciones de puntaje están

preparadas para predecir modos de unión y para discriminar entre compuestos que se unen al blanco y aquellos que no, más que para brindar un valor preciso de energía libre de unión. Las funciones de scoring se pueden clasificar principalmente en tres grandes grupos (21): 1) funciones basadas en campos de fuerzas, 2) funciones empíricas y 3) funciones basadas en conocimiento (*knowledge-based*). Las funciones basadas en los campos de fuerzas diseñados para dinámica molecular como AMBER21 y CHARMM22 calculan las interacciones intermoleculares de van der Waals y electrostáticas de a pares entre los átomos del ligando y la proteína y, en algunos casos, agregan términos de enlaces de hidrógeno, energía intramolecular del ligando y desolvatación (22). Por su parte, las funciones de puntaje empíricas consisten en la suma de términos de interacción considerados importantes para la unión, cada uno de ellos multiplicado por un coeficiente cuyo valor se obtiene de un ajuste por regresión lineal múltiple a energías de unión experimentales para un conjunto de ligandos conocidos (23). Finalmente, los potenciales estadísticos (funciones *knowledge-based*) son el resultado de observaciones estadísticas de contactos cercanos intermoleculares entre proteínas y ligandos en bases de datos estructurales como *Protein Data Bank* (PDB) (24) o *Cambridge Structural Database* (CSD) (25), los cuales son utilizados para derivar un potencial de fuerza media (26).

En el trabajo realizado en esta tesis se utilizó el programa de *Docking Autodock4* (27), el cual utiliza un algoritmo genético más minimizaciones locales; en cuanto a la función de puntaje pertenece al primer grupo de la clasificación dada previamente, y además realiza ajustes por afinidad de complejos conocidos.

1.1.2.2 - Dinámica molecular (DM):

La aplicación de DM permite generar configuraciones sucesivas del sistema integrando las leyes del movimiento de Newton. El resultado es una trayectoria que especifica cómo las posiciones y las velocidades de las partículas varían con el tiempo. Se trata de un método determinista, es decir, las posiciones de los átomos se suceden en la escala temporal y las interacciones entre las partículas son descritas generalmente por un campo de fuerza.

Existen distintos campos de fuerzas aplicados a la DM; entre los más importantes podemos encontrar AMBER, GROMOS y CHARMM, los cuales presentan distintas versiones de acuerdo a las modificaciones que se le fueron realizando a lo largo del tiempo. Estos campos de fuerza han sido diseñados especialmente para el estudio de sistemas bioorgánicos. Cada campo de fuerza, por lo general, se combina junto a un paquete de programas que incluyen un integrador de las ecuaciones de movimiento, y herramientas de análisis.

En esta tesis se utilizó el paquete de simulación de AMBER, en todos los casos el campo de fuerza utilizado fue ff99SB (o versiones más recientes del mismo como protein.ff14SB).

1.1.3- Importancia de los productos naturales en el desarrollo de fármacos:

En un estudio reciente se ha analizado el origen los nuevos fármacos aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration* de los Estados Unidos) entre 1981 y 2014. De este estudio se desprende que aproximadamente un **58%** se corresponden con Productos Naturales, entendiendo como tal a los propiamente llamados así, a sus derivados y miméticos de los mismos (**figura 1.2**) (28).

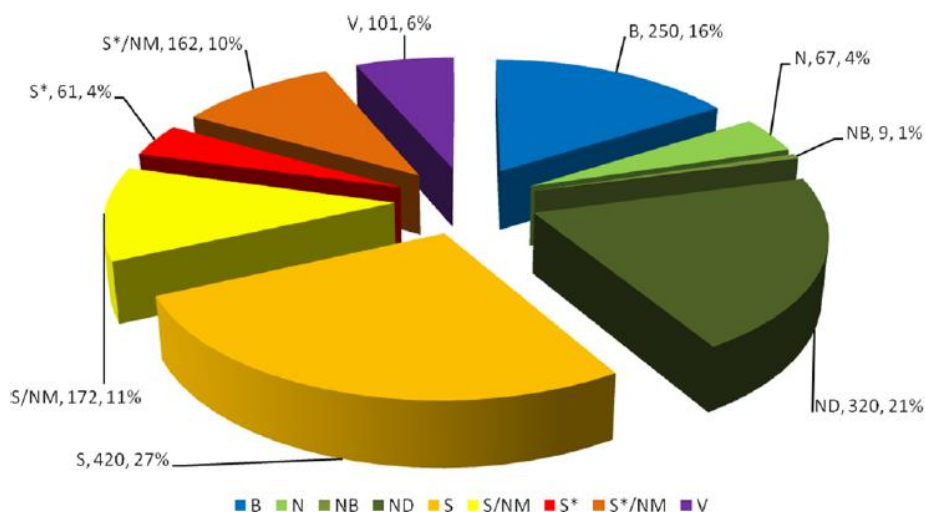


Figura 1.2. Todas las nuevas drogas aprobadas en el período 1981-2014, n: 1562 compuestos. Clasificados según su origen como: **B** (macromoléculas biológicas), **N** (productos naturales inalterados), **NB** (drogas botánicas), **ND** (derivados de productos naturales), **S** (drogas sintéticas), **S*** (drogas sintéticas, con un farmacóforo correspondiente a los productos naturales), **V** (vacunas), **NM** (miméticos de productos naturales). (Imagen tomada del trabajo titulado: *Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014*).

En sentido amplio definimos un producto natural como cualquiera de los compuestos de la Naturaleza (metabolitos primarios y secundarios); en sentido más restrictivo un producto natural sólo es un **metabolito secundario** (Figura 1.3). Se denomina metabolismo secundario al conjunto de procesos en el que participan compuestos con una distribución mucho más limitada y específica según el ser vivo. Los compuestos que participan en este metabolismo se denominan metabolitos secundarios, son específicos de las especies y pueden ser considerados como productos para la adaptación de un organismo a sobrevivir en un ecosistema particular.

Resulta inquietante el hecho de que se conocen varios millones de compuestos sintéticos, el 99% de los productos químicos conocidos son sintéticos y sólo un número indeterminado entre 200-300.000 de Productos Naturales. En este panorama ¿cómo es posible el hecho de que casi un 60% de los fármacos sea de origen natural? Una de las razones del éxito de los productos naturales radica en que son compuestos que ya han sido validados por la evolución, han sido biosintetizados, degradados, y transformados por sistemas enzimáticos. Por tanto a la hora de interactuar con las moléculas dianas lo realizarán de una manera privilegiada.

En un trabajo reciente (29) se manifiesta la necesidad de restringir/delimitar la búsqueda de compuestos biológicamente relevantes dentro del espacio químico de pequeñas moléculas, CSSM (chemical space of small molecules), el cual se estima tiene un tamaño de 10^{60} compuestos diferentes (sin considerar su factibilidad sintética) a la regiones dónde los primeros estarían concentrados; en otras palabras, esto es 'ubicar' la parte del espacio químico donde residen los compuestos biológicamente activos y acotar la búsqueda de compuestos novedosos sólo a estas regiones. Un resultado interesante de este trabajo es que al comparar la ubicación en el espacio químico de productos naturales (126.140 compuestos naturales) y compuestos bioactivos (178.210), se encuentran regiones donde ambos grupos se superponen, pero el resultado más

interesante son las evidentes diferencias en la cobertura del espacio químico biológicamente relevante por parte de estos dos grupos (**figura 1.4**). De este modo, una de las conclusiones de este trabajo es que existen regiones del espacio químico, donde residen productos naturales, que carecen de representación por parte de compuestos bioactivos; es decir, regiones que aún no se han investigado en el descubrimiento de fármacos y por lo tanto su exploración es de evidente relevancia. En dicho estudio (29), para clasificar y ubicar los diferentes compuestos estudiados en el CSSM, utilizaron la herramienta de exploración ChemGPSNP (30-32), la cual utiliza análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés); en este caso contó de 8 dimensiones (8 componentes) que describen propiedades fisicoquímicas como tamaño, polarizabilidad, lipofilia, flexibilidad, rigidez, polaridad, forma, y la capacidad de formar puentes de hidrógeno. Dichos parámetros se calculan para un set de referencia, y luego los nuevos compuestos son incorporados en el mapa por interpolación según su puntuación en el análisis de componentes principales antes mencionados (33).

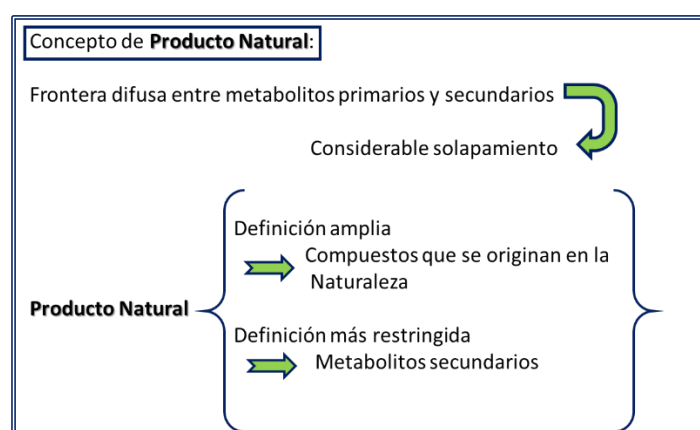


Figura 1.3. Definición de producto natural.

En definitiva, el trabajo anterior sustenta/valida la búsqueda de nuevas entidades químicas con potencial aplicación farmacéutica dentro de los productos naturales y sus derivados. Particularmente en esta tesis, se indagará en la aplicabilidad de ciertos derivados de *xantonas*, *chalconas* y *quinolonas*, en la modulación de blancos moleculares específicos de relevancia terapéutica definida.

1.1.4- Estructuras Privilegiadas: Xantonas, Chalconas y Quinolonas

De un modo general podemos definir '**estructuras privilegiadas**' como peldaños o bloques moleculares los cuales, mediante modificaciones estructurales, son capaces de proveer ligandos activos en más de un contexto biológico; es decir, capaces de interactuar con más de un tipo de receptor o enzima.

El término '**estructuras privilegiadas**' fue acuñado por Ben Evans (34) quién reconoció el potencial de ciertos motivos estructurales para el desarrollo de ligandos novedosos, obteniéndolos por derivatización de estas unidades estructurales. Más recientemente Klaus Muller ha tratado de definir el término '**estructuras privilegiadas**' más específicamente como: "Pequeñas estructuras, no planares, con conformaciones robustas que proveen posibilidades interesantes para sustitución, con propiedades tipo droga e idealmente sintéticamente accesibles".

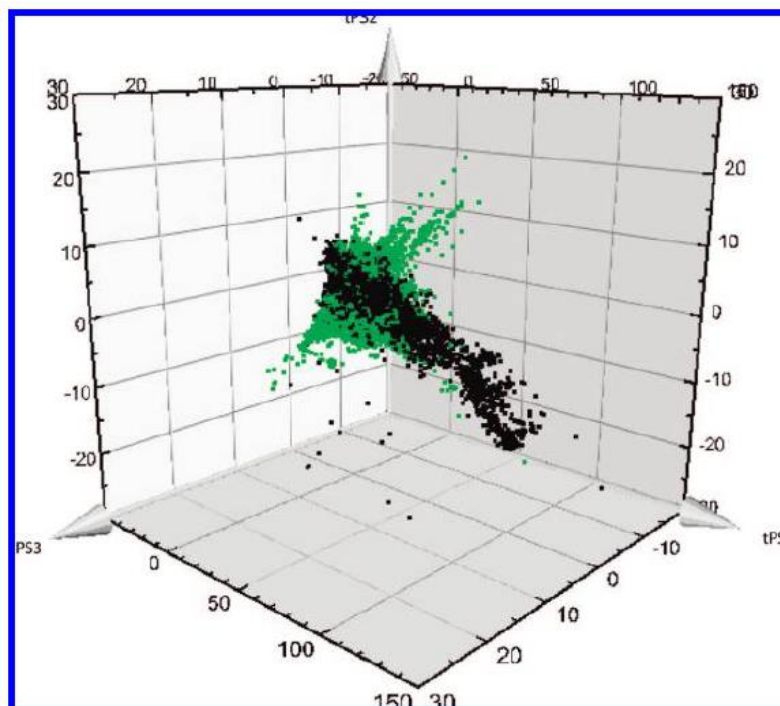


Figura 1.4. Funciones de puntuación ilustrando las diferencias en cobertura del espacio químico biológicamente relevante por productos naturales (en verde), y compuestos bioactivos tomados de la base de datos WOMBAT (en negro) en los tres primeros componentes principales. Se puede ver que los productos naturales cubren partes del espacio químico que no tienen representación por parte de compuestos bioactivos.

Dentro de la amplia variedad de estructuras privilegiadas de origen natural, y como se mencionó previamente, en esta tesis centraremos la atención principalmente en tres familias de compuestos: *Xantonas*, *Quinolonas* y *Chalconas*. Por un lado, estudiaremos la potencialidad del empleo de algunos de estos compuestos en contextos biológicos específicos; por otra parte, se propondrán modificaciones racionales con el objetivo de potenciar su actividad en blancos donde su acción ya ha sido probada.

1.1.4.1- XANTONAS:

Las xantonas son componentes del metabolismo secundario de las plantas de la familia de las Bonnetiaceae, de las Clusiaceae y también de algunas especies de la familia de las Podostemaceae, que incluyen hongos, líquenes y plantas superiores. Estructuralmente, son tipificadas por la presencia de un sistema de anillo 9-xanten-9-ona o dibenzo-gama-pirona (**Figura 1.5**).

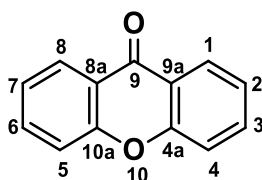


Figura 1.5. Núcleo xantónico básico

Los núcleos de xantonas comprenden una clase destacada de heterociclos oxigenados. El gran interés por estos compuestos está asociado a la diversidad de propiedades farmacológicas, las cuales están relacionadas en función de la naturaleza y

posición de los sustituyentes en los anillos aromáticos. Entre las propiedades terapéuticas más destacadas podemos mencionar la actividad anti-bacteriana, anti-viral, anti-tumoral, anti-inflamatoria y anti-malaria (35).

A continuación se dan ejemplos representativos de algunas xantonas bioactivas en algunos de los contextos antes mencionados:

1.1.4.1.1- Xantonas con actividad anti-HIV

Estudios recientes han demostrado actividad por parte de algunas xantonas naturales frente al virus de inmunodeficiencia humana. Además de su actividad anti-viral, muchas xantonas tienen propiedades terapéuticas secundarias contra infecciones fúngicas en pacientes inmunosuprimidos debido al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (36).

1.1.4.1.1.1- Swertifranchesida:

Es una xantona compleja, aislada a partir de *Swertia franchetiana* (Figura 1.6). Esta molécula presenta una moderada actividad como inhibidora de la enzima HIV transcriptasa inversa (enzima codificada y utilizada por los virus en la transcripción inversa, es decir, el pasaje de ARN a ADN, el cual luego se integra en el genoma del huésped).

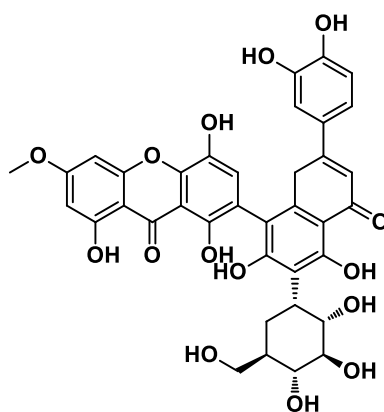


Figura 1.6. Estructura de swertifranchesida

1.1.4.1.2- Xantonas con actividad anti-malaria

El gran anhelo en el tratamiento de la malaria es el desarrollo de una vacuna de larga duración. Ciertas xantonas presentan potente actividad contra los parásitos de la malaria *P. falciparum* y en particular contra cepas resistentes a la cloroquina (fármaco de la familia de las 4-aminoquinolinas, usado para el tratamiento y prevención de la malaria).

1.1.4.1.2.1- F2C5:

La malaria es causada por parásitos protozoarios, del género *Plasmodium*, los cuales específicamente atacan los eritrocitos. El *Plasmodium falciparum* es responsable de más del 80% de los casos de malaria en todo el mundo, causando la forma más grave de la enfermedad (37).

La vacuola digestiva es un compartimiento proteolítico central para el metabolismo del parásito *Plasmodium* y puede ser considerado como el talón de Aquiles del parásito. En esta vacuola la hemoglobina es degradada en un proceso conocido como hemoglobinólisis, proporcionando aminoácidos para el crecimiento del parásito.

Este tipo de xantonas (**Figura 1.7**) es capaz de coordinarse por medio del grupo carbonilo al átomo de Fe del grupo hemo. Por otra parte, los anillos aromáticos a ambos lados del grupo carbonilo se someten a interacciones de tipo π -stacking con los anillos aromáticos coplanares presentes en el grupo hemo. Adicionalmente, las cadenas de cinco átomos de carbono con grupos amino pueden interaccionar fuertemente (interacciones iónicas) con los propionatos de dicho grupo prostético. De esta manera, y debido a la capacidad de interacción del compuesto **F2C5** (**Figura 1.7**) con el grupo prostético hemo, la hemoglobínolisis se ve impedida.

La adición de halógenos, como fluoruros a la estructura del **F2C5** incrementa su actividad, ya que los mismos son isósteros de los grupos fenólicos en sistemas biológicos.

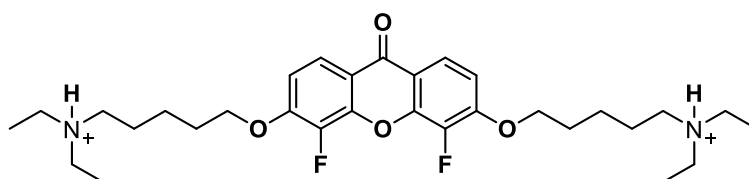


Figura 1.7. Estructura del **F2C5**.

1.1.4.1.3- Xantonas con actividad anti-cáncer

Entre las actividades biológicas descritas para las xantonas, es notable la actividad inhibidora del crecimiento *in vitro* sobre líneas celulares tumorales. Además de la potente actividad anti-tumoral, algunas xantonas se han descrito por sus efectos anti-mutagénicos y quimio-preventivos del cáncer, en calidad de inhibidores de promotores tumorales *in vitro* e *in vivo*.

1.1.4.1.3.1- α - Mangostina

El mangostán (*Garcinia mangostana* Linn) es un árbol tropical de crecimiento lento de hojas coriáceas. Estudios fitoquímicos han demostrado que el pericarpio del *Garcinia mangostana* contiene una variedad de metabolitos secundarios, tales como xantonas preniladas y oxigenadas. Una de las más estudiadas por su considerable actividad contra muchas líneas celulares del cáncer es la α -mangostina (**Figura 1.8**) y sus congéneres.

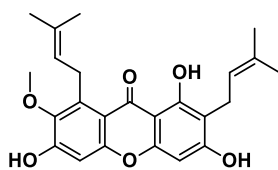


Figura 1.8. α -mangostina.

La α -mangostina induce la muerte celular programada (apoptosis) porque afecta el normal funcionamiento de las mitocondrias, ocasionando una caída en el potencial de la membrana celular, y posterior activación de las caspasas (mediadores esenciales de los procesos de apoptosis). La actividad anti cancerígena de la α -mangostina podría ser atribuida en principio al gran número de grupos fenólicos en la molécula, una observación interesante que corrobora lo dicho anteriormente, es que la sustitución de alguno de los grupos -OH, por un grupo metoxilo decrece notablemente la

potencia con la cual puede reducir el potencial de la membrana celular, y por lo tanto, su capacidad para inducir la apoptosis celular.

1.1.4.1.4- Derivados xantónicos como drogas:

Aunque actualmente no hay drogas en el mercado con el esqueleto xantónico, dos compuestos en particular han mostrados resultados positivos en su aplicabilidad como agentes antitumorales en fase clínica: ácido Gamboico y DMXAA.

1.1.4.1.4.1- Ácido Gamboico (AG):

Este compuesto es el componente principal de la gutagamba (38), guta o gomaguta (es una gomorresina segregada por árboles de la familia de las gutíferas), el cual es una medicina tradicional del sudeste asiático. Dicho compuesto ha sido ampliamente estudiado por sus propiedades anti-tumorales y anti-inflamatorias. El ácido gamboico (**Figura 1.9**) se encuentra en **fase I** de pruebas clínicas en China. Después de estudios iniciales se ha reportado que **AG** inhibe la proliferación celular y metástasis (39). En cuanto a su mecanismo de acción se ha reportado su capacidad para interaccionar con varios blancos moleculares; por ejemplo, se ha reportado su capacidad para inducir apoptosis por su unión al receptor de transferrina (40), y también por su intervención en vías que involucran al factor nuclear $\kappa\beta$ (*NF- $\kappa\beta$*) (41). También hay evidencias de que **AG** se une a la proteína *HSP90* y de este modo causa una disminución en la actividad de otras biomoléculas las cuales son activadas por *HSP90*, las mismas están involucradas en procesos de angiogénesis, crecimiento celular y metástasis. Es decir que el resultado neto es una inhibición de estos procesos.

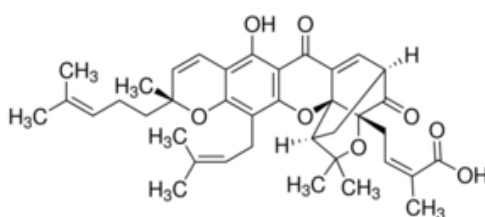


Figura 1.9. Estructura **Acido Gamboico**.

1.1.4.1.4.2- DMXAA:

Este compuesto (**Figura 1.10**) presenta promisorio actividad anti-cáncer debido a su capacidad para actuar como un agente de disrupción vascular (VDAs) (42). Se ha demostrado que la actividad anti-tumoral de este compuesto es via la activación del factor de necrosis tumoral (α -*TNF*) (43), lo cual produce una disminución en el flujo de sangre al tumor (**Figura 1.11**). DMXAA ha entrado en **fase III** de pruebas clínicas en Estados Unidos para el tratamiento de cáncer de próstata.

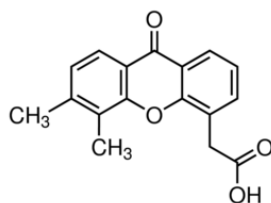


Figura 1.10. Estructura **DMXAA**.

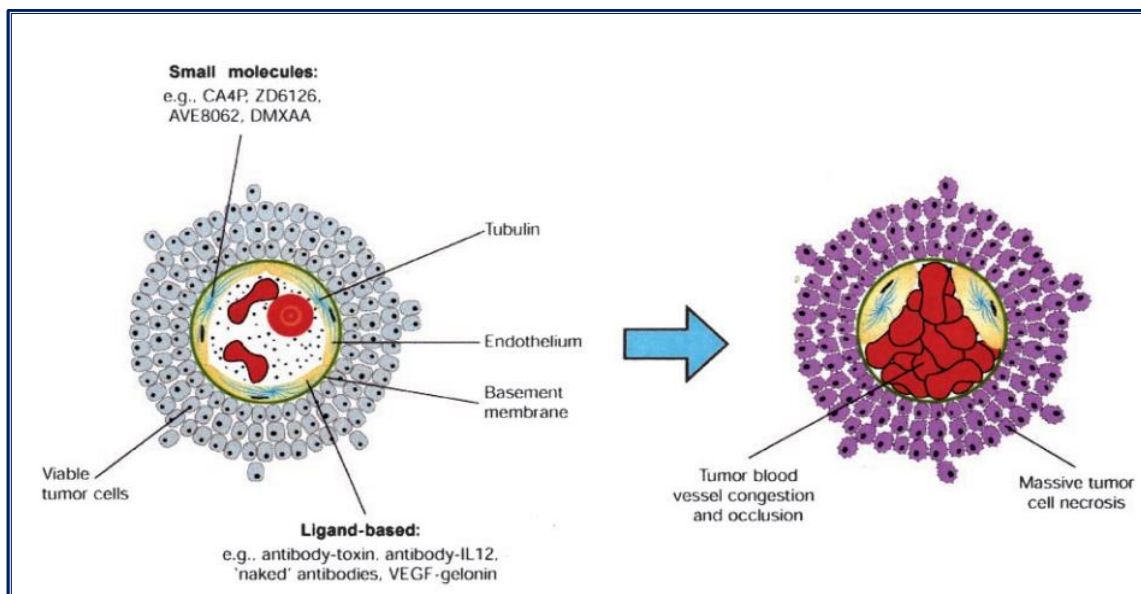


Figura 1.11. Mecanismo de acción de los agentes de disrupción vascular. VTAs explotan las diferencias entre los vasos sanguíneos en tejidos normales y tumorales, causando una rápida y efectiva oclusión de la vasculatura tumoral, ocasionando una masiva necrosis en las células del tumor. (Imagen tomada del trabajo titulado: '*Vascular Targeting Agents as Cancer Therapeutics*'⁽⁴³⁾)

1.1.4.2- QUINOLONAS:

Las quinolonas son una clase estructural especial de las quinolinas. Estos heterociclos fusionados nitrogenados se encuentran en varios productos naturales, especialmente en alcaloides, y son a menudo utilizados como punto de partida para el diseño de compuestos sintéticos con diversas propiedades farmacológicas. Hay un amplio número de compuestos de esta familia ya empleados en medicina (antimicrobianos actualmente aprobados para su uso); así como también moléculas 'lead' para el desarrollo de nuevas y más potentes drogas. Dentro de las actividades biológicas reportadas para esta familia de compuestos se pueden mencionar: anti-cáncer, antimicrobianos, anticonvulsivos, antiinflamatorios, y agentes cardiovasculares (44).

Las quinolonas en particular están caracterizadas estructuralmente por un sistema 1,4-dihidro-4-oxo-3-piridina y un anillo bencénico fusionado (**Figura 1.12**).

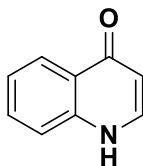


Figura 1.12. Esqueleto de quinolona.

Se ha investigado ampliamente la aplicabilidad de estos compuestos como agentes antimicrobianos, algunos ejemplos de drogas comerciales de esta familia aprobadas por la FDA son: Ciprofloxacina (**Figura 1.13**), y Ofloxacina (**Figura 1.14**).

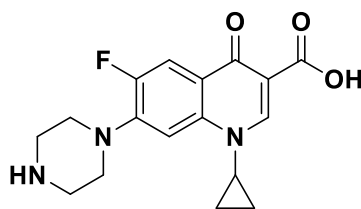


Figura 1.13. Ciprofloxacin.

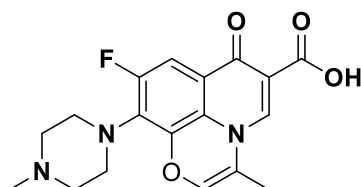


Figura 1.14. Ofloxacin

1.1.4.3- CHALCONAS:

Esta familia de compuestos son considerados precursores de los flavonoides e isoflavonoides, y constituyen así una de las principales clases de productos naturales, ampliamente distribuidos en frutas, vegetales, especias, té, etc. Las chalconas naturales y sus análogos sintéticos presentan un amplio espectro de actividades biológicas (45), dentro de las cuales se pueden mencionar: antioxidante, citotoxicidad, anti-cáncer, antimicrobianos, antihistamínicos y anti-inflamatorios.

Químicamente las chalconas o 1,3-diaril-2-propen-1-onas consisten en cadenas de flavonoides abiertas, en las cuales los dos anillos aromáticos están unidos por un sistema carbonílico α,β -insaturado (Figura 1.15).

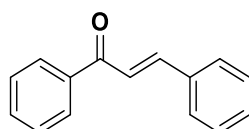


Figura 1.15. Estructura esqueleto chalcona.

A continuación se dan algunos ejemplos de chalconas con actividades reportadas en diversos contextos:

1.1.4.3.1- Actividad antioxidante:

Se conocen varios compuestos de origen natural con actividad antioxidante; caracterizados por reducir el daño causado por especies reactivas de oxígeno (ROS). En este sentido, los compuestos fenólicos representan la mayor clase de antioxidantes derivados de plantas. Ellos tienen la capacidad de reaccionar con los radicales libres y de este modo prevenir la peroxidación de lípidos (46). Muchas chalconas con diversos sustituyentes, como isoprenilos o hidroxilos (compuestos fenólicos) poseen potencial antioxidante. En la Figura 1.16 se muestra a modo de ejemplo la estructura de una chalcona caracterizada por dicha actividad.

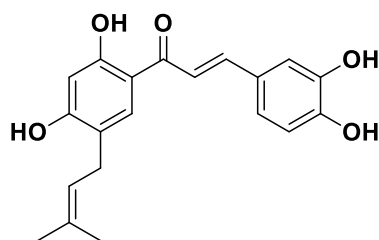


Figura 1.16. 3-Brussochalcona A, compuesto antioxidante.

1.1.4.3.2- Actividad Anti-Cáncer:

En un trabajo reciente (47) se reporta una serie de chalconas con actividad anticancerígena. En la **Figura 1.17** se representa el compuesto más activo de la serie. La actividad citotóxica de esta chalcona se ha asociado con la acumulación de p53 y p21, proteínas inductoras de apoptosis.

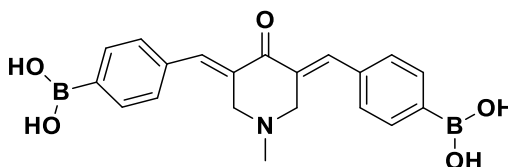


Figura 1.17. Estructura chalcona Borónica.

1.1.5- El rol fundamental de la Síntesis Orgánica en la generación de nuevas entidades Químicas:

La Química Orgánica, especialmente en su campo sintético ejerce un papel fundamental en la obtención de nuevos compuestos, constituyendo un pilar esencial para el progreso de la química medicinal. De la **Figura 1.2**, se desprende que la síntesis orgánica contribuyó a la generación de más del 70 % de las drogas comerciales generadas entre 1981 y 2014, ya sea mediante síntesis total de nuevos compuestos o por semisíntesis, es decir, modificaciones de sustratos naturales.

El trabajo desarrollado en esta tesis involucra la generación de nuevos compuestos, con esqueletos ('*scaffold*') pertenecientes a las familias antes mencionadas; en todos los casos los nuevos compuestos se generaron por síntesis total, partiendo de sustratos sencillos asequibles comercialmente.

1.1.6- Sistemas de aplicación específicos:

1.1.6.1- MDM2-p53: interés biológico

El gen supresor tumoral p53, conocido como 'el guardián del genoma' es un factor de transcripción de genes requeridos en la reparación del ADN, arresto del ciclo celular, apoptosis y angiogénesis, en respuesta a estrés celular (64). Se encuentra mutado en un amplio rango de cánceres humanos con una frecuencia aproximada del 50 % (65). En otros casos, donde el gen supresor tumoral p53 se encuentra en su forma Wild-type (sin mutaciones), se han observado otros motivos para la inactivación de esta vía (66); donde uno de los mismos es la sobreexpresión de MDM2, un regulador negativo de p53 (**Figura 1.18**). La sobreexpresión de MDM2 es debida a amplificación del gen que lo codifica aproximadamente en el 7% de los cánceres humanos (67-68). La sobreexpresión puede ocurrir también por un incremento en la actividad de factores transcripcionales como SMAD3/4, los cuales se unen al promotor de MDM2 (69-70).

En las células normales (sin estrés), p53 es una proteína muy inestable con una vida media que van de 5 a 30 minutos, y está presente a bajos niveles debido a la degradación continua mediada por MDM2; dicha proteína es una E3 ligasa, y regula los niveles de p53 por ubiquitinación, marcándolo para su posterior degradación en el proteosoma (71-73). Como contrapartida, p53 media la transcripción de MDM2, el cual mantiene luego relativamente bajos los niveles de p53 en células proliferando normalmente (74). Posteriormente, si las células son expuestas a estrés (como por ejemplo, daño al ADN o activación de oncogenes), p53 y MDM2 se encuentran fosforilados, e interaccionando con factores que inhiben la formación del complejo MDM2-p53. De este modo, en ausencia de inhibición, los niveles de p53 aumentan muy rápidamente y activan la transcripción de los genes necesarios, ya sea para remediar daños en el ADN y evitar de este modo mutaciones, o bien para activar mecanismos de senescencia o apoptosis.

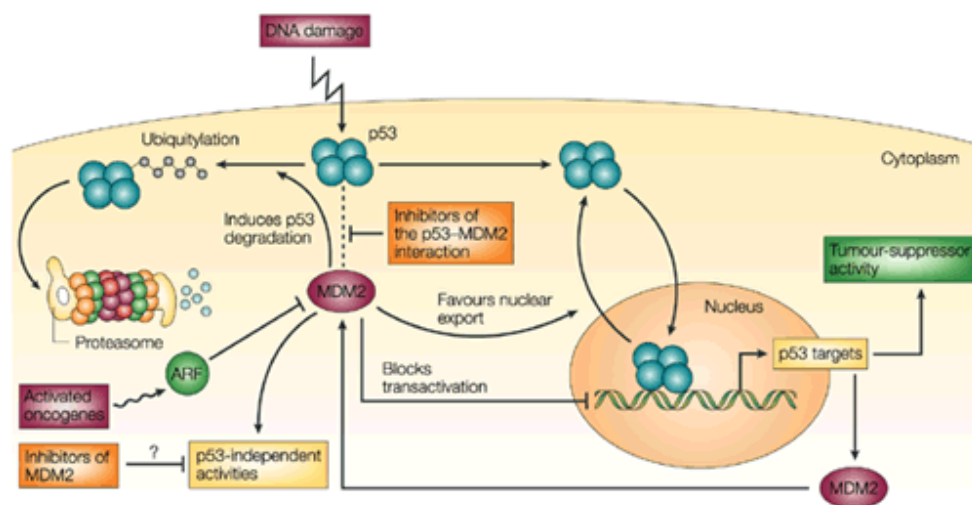


Figura 1.18- Mecanismo de regulación y acción de p53.

De este modo, para aquellos tipos de cáncer, para los cuáles MDM2 se encuentre sobre expresado, y por lo tanto inhibiendo constantemente la vía de p53, una alternativa terapéutica es el desarrollo de inhibidores de MDM2, bloqueando de este modo su regulación sobre los niveles del gen supresor tumoral p53.

Nutlin-3a es un conocido inhibidor de este complejo; tratamientos con este compuesto causan incrementos en los niveles de p53, posterior arresto del ciclo celular y apoptosis (75). A partir de su descubrimiento, la compañía Hoffman- La Roche, creó una segunda generación de derivados de Nutlin-3a, de los cuáles el compuesto RG7112 se encuentra en la fase-I de ensayos clínicos, con mejores resultados que algunos de sus predecesores, los cuales resultaron ser altamente tóxicos a las altas dosis necesarias para obtener los resultados clínicos deseados (76).

1.1.6.2- Enfermedad de Alzheimer (EA): Hipótesis colinérgica y el desarrollo de inhibidores de Acetilcolinesterasa

La EA es un proceso neurodegenerativo múltiple del sistema nervioso central, que se caracteriza clínicamente por la pérdida progresiva de la memoria a corto plazo y de la atención, seguida de la afectación de otras habilidades cognitivas, como el lenguaje y el pensamiento abstracto, el juicio crítico y el reconocimiento de lugares o personas.

Debido a que la EA presenta una etiología multifactorial, se pueden mencionar varias hipótesis cuando se discute acerca de su patogenia (77-79): Entre ellas pueden mencionarse las hipótesis colinérgica, amiloidea, de la proteína tau, glutamatérgica, del estrés oxidativo e inflamatoria, siendo las primeras tres las más citadas. Uno de los objetivos de esta tesis, tal como se acaba de mencionar, involucra la optimización de inhibidores de AChE, por tal motivo desarrollaremos a continuación solo la hipótesis colinérgica.

1.1.6.2.1- Hipótesis colinérgica:

De todas las hipótesis que intentan describir la patogénesis de la EA quizás sea esta la que más se ha estudiado y probado. La correlación encontrada entre el déficit colinérgico (entre otros disminución del neurotransmisor acetilcolina, **Figura 1.19**) y la pérdida de las capacidades cognitivas de los enfermos es lo que ha motivado la intensa investigación en este punto, siendo una de las aproximaciones terapéuticas más explotada y desarrollada en los últimos años, donde en definitiva se busca aumentar/mantener los niveles de Acetilcolina (ACh) funcional en el medio sináptico. Como resultado de la misma ha sido la puesta en el mercado de los únicos fármacos comercializados hasta el momento para el tratamiento paliativo de esta enfermedad.

Basándose en la estructura y los mecanismos bioquímicos de la sinapsis, una de las estrategias terapéuticas involucra el desarrollo de inhibidores de acetilcolinesterasa, justamente por ser dicha enzima la responsable de la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina. De hecho, los fármacos actualmente comercializados actúan por este mecanismo molecular. Algunos ejemplos son: tacrina, donepezilo y rivastigmina.

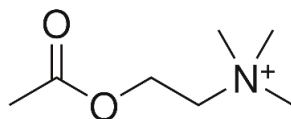


Figura 1.19- Estructura del neurotransmisor Acetilcolina.

A pesar de que si bien actualmente la hipótesis colinérgica se encuentra cuestionada debido a los nuevos avances en neurociencia (80), es indiscutible que ha sido la base de inspiración para la búsqueda de un nuevo entendimiento en enfermedades neurodegenerativas como la EA.

1.1.6.2.2- Función biológica de la enzima AChE: Sinapsis colinérgica

La enzima AChE cumple su función en el sistema nervioso central y periférico siendo su tarea específica la hidrólisis del neurotransmisor catiónico ACh en la sinapsis colinérgica.

En la sinapsis colinérgica, la enzima colinacetiltransferasa (ChAT), presente en la neurona presináptica, cataliza la síntesis de ACh a partir de colina y acetil-coenzima A, siendo ACh empaquetada y transportada en vesículas de transporte (**Figura 1.20**). Los potenciales de acción disparan la liberación de ACh al espacio sináptico, donde se puede unir a receptores muscarínicos localizados en las membranas pre- y postsinápticas. El receptor muscarínico M2, ubicado en la membrana presináptica regula la liberación de neurotransmisor mediante una recaptación negativa. En la membrana postsináptica, M1 traduce la señal a través de un camino que involucra a diacilglicerol (DAG), inositol-1,4,5-trifosfato (ins-(1,4,5)P3) y una

kinasa dependiente de Ca^{2+} . La ACh es hidrolizada en el espacio sináptico por un tetrámero de AChE (AChE-T), que se encuentra unido a la membrana mediante una cola similar a colágeno. Por su parte, la forma monomérica de AChE (AChE-M) también puede ser encontrada en estado soluble en el espacio sináptico. Por último, un eficiente mecanismo de recaptación de colina la ingresa a la célula presináptica y es tomada por la ChAT para sintetizar nuevamente ACh.

Por último, es justamente debido al rol esencial que juega la enzima AChE en el sistema nervioso, que ha sido un blanco atractivo para el diseño racional de inhibidores (AChEIs) (81).

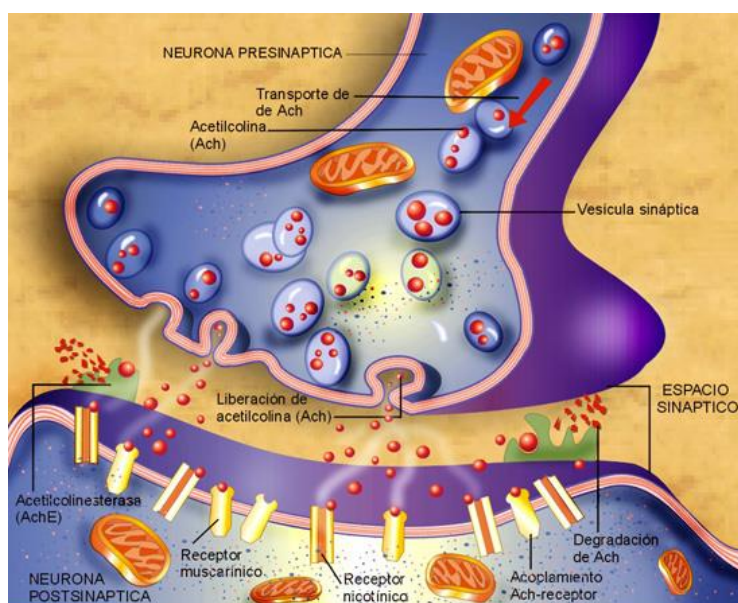


Figura 1.20- Representación de la regulación colinérgica.

1.2- Antecedentes fundantes del marco conceptual:

1.2.1- Interacciones Proteína-Proteína:

Como se dijo previamente, uno de los objetivos fundamentales de esta Tesis es el estudio de interacciones relevantes en medios biológicos con el fin último de entender mecanismos subyacentes en el reconocimiento molecular, ya sea de complejos proteína-proteína como proteína-ligando, y sus proyecciones en el desarrollo de nuevas herramientas aplicables por ejemplo en el diseño racional de fármacos.

Las interacciones proteína-proteína son centrales en la mayoría de los procesos biológicos –desde comunicación intercelular hasta muerte celular programada- y representan de este modo una clase importante de blancos moleculares en terapias humanas. Por esta razón, modular interacciones proteína-proteína y principalmente mediante pequeñas moléculas es de gran interés, más aún porque la utilización de otros tipos de terapias, como las que involucran anticuerpos monoclonales, no son aplicables para el desarrollo de antagonistas intracelulares por su falta de permeabilidad celular. Sin embargo, el desarrollo de pequeños compuestos antagonistas presenta varias dificultades. Dichas dificultades pueden deberse principalmente a las características de las interfaces de los complejos proteína-proteína, como lo son la planaridad y las grandes dimensiones de estos sitios (aproximadamente entre 750 y 1500 Å² es el área superficial a cada lado de la

interface (48)). Aunque en este sentido es importante mencionar que no es necesario que pequeñas moléculas cubran todo el sitio de unión entre proteínas para provocar la disrupción de dicho complejo, de hecho, sólo un reducido número de aminoácidos de la interface contribuyen mayoritariamente a la energía libre de formación de dicho complejo (9, 49-51) (este conjunto de residuos es comúnmente denominado como '*hot spot*'). Además, para muchas interacciones proteína-proteína, la aparente complementariedad entre las dos superficies involucra un grado significativo de flexibilidad y adaptabilidad (52,53). Consecuentemente, por ser las proteínas moléculas flexibles puede haber conformaciones del sitio de unión que son 'adecuadas' para la unión de ligandos pequeños, pero que no son visibles en un único cristal (54-56).

A las dificultades inherentes a las características de estos sistemas biológicos en particular, es necesario añadir la falta de un entendimiento completo de los fenómenos que gobiernan los procesos de binding. Cuando se pretende elucidar los mecanismos detrás de los fenómenos de unión en sistemas complejos como lo son las proteínas se deben tener en cuenta varios factores, a menudo interdependientes, como: las propiedades de hidratación del sitio de binding en estudio, la fuerza de las interacciones resultantes, el balance entrópico entre sustratos y productos, etc. Uno de los esfuerzos clave en la interpretación de estos problemas por parte del grupo de investigación en el que fue gestada esta tesis está puesto, justamente, en el entendimiento de esa interrelación entre las causas de unión; por contraposición a la concepción general del problema figurado incluso según el "principio de Gulliver", o la suma de muchísimas contribuciones pequeñísimas (muchas cuerdas diminutas para atar un gigante), cuando en verdad esas contribuciones no tienen por qué ser aditivas.

Para ello, es importante racionalizar el modo de organización estructural de las proteínas y las interacciones no covalentes que la determinan.

1.2.2- Estructura e hidratación de las proteínas:

La funcionalidad de las proteínas depende fuertemente de su estructura. La organización estructural de las mismas consiste en cuatro niveles de complejidad (**Figura 1.21**) la estructura primaria, que es la unión covalente de los aminoácidos que la componen; la estructura secundaria, que es la primera etapa de organización espacial, formada a partir de la interacción por puentes de hidrógeno de los grupos carbonilo y amida de la cadena principal (que otorgan la denominada estructura local de la proteína); la estructura terciaria, que constituye la disposición tridimensional de la proteína en el espacio y, finalmente, la estructura cuaternaria que consiste en la asociación de varias subunidades proteicas. Esta organización estructural depende del establecimiento de interacciones no covalentes, las cuales describiremos someramente a continuación.

1.2.3- Interacciones no covalentes

A grandes rasgos, se denomina interacciones no covalentes a aquellas uniones intra o inter moleculares en las que no se comparten electrones. Dentro de esta clasificación se enmarcan principalmente todos los tipos de interacciones electrostáticas pero, también, aquellas más difícilmente catalogables como, por ejemplo, el efecto hidrofóbico.

En el contexto de la dinámica molecular, estas interacciones son a menudo simplificadas para facilitar su consideración matemática. El caso más evidente es el de las llamadas interacciones de Van der Waals o interacciones de corto alcance.

Las interacciones de Van der Waals surgen de la interacción electrostática instantánea de los distintos componentes de los sistemas fisicoquímicos y están presentes en todos ellos. En simulaciones de dinámica molecular, estas interacciones se simplifican, ajustándolas a un potencial que reproduzca los efectos observados experimentalmente a un bajo costo computacional; por lejos el potencial más utilizado es el de Lennard-Jones o potencial 6-12.

Como puede verse en la **Figura 1.22**, las interacciones de Lennard-Jones se caracterizan por tener una fase atractiva débil, que decrece rápidamente con la distancia (a la sexta potencia) y una parte repulsiva fuerte que aumenta aún más rápidamente con la distancia inter partícula.

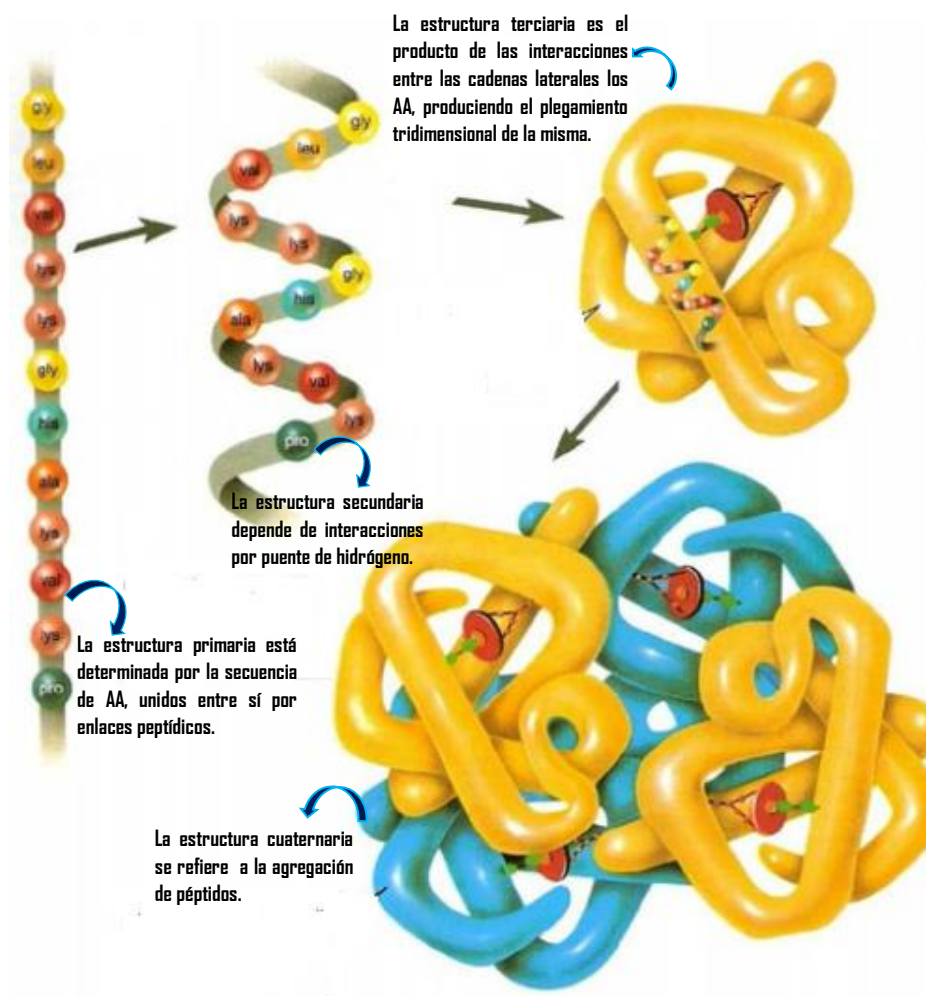


Figura 1.21- Jerarquías de organización estructural en proteínas.

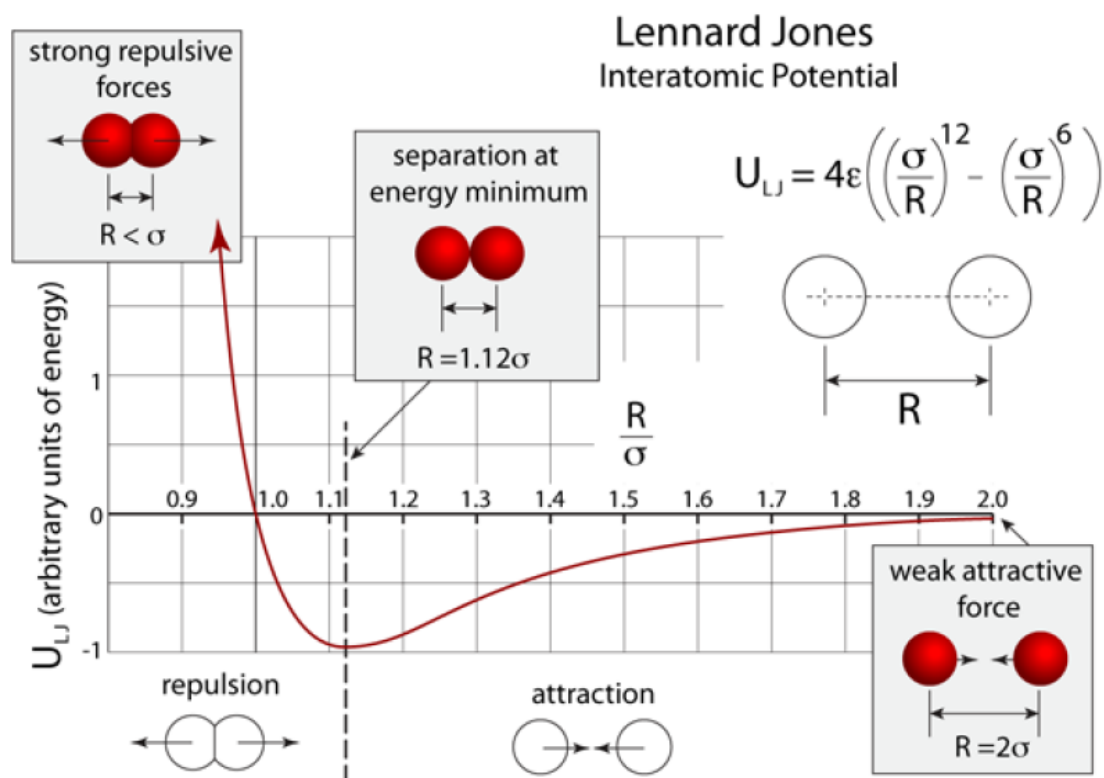


Figura 1.22- Potencial de interacción de Lennard Jones

En el caso de las interacciones de carga, se siguen en dinámica molecular los mismos principios de aplicación de la ley de Coulomb de cargas estacionarias, esto es:

$$F = \frac{1}{4 \pi \epsilon_0} \frac{|q_1 q_2|}{r^2}$$

Siendo ϵ_0 la permitividad eléctrica en el vacío, “q” las respectivas cargas y “r” la distancia entre ellas. Como puede observarse, las interacciones de carga o coulombicas decaen mucho más lentamente con la distancias que las de Van der Waals. Otra característica importante en la historia de la implementación de la ley de coulomb en medios materiales (condiciones distintas de las de vacío) es la incorporación de un término adicional en el denominador llamado “permitividad relativa” o “constante dieléctrica”.

Otra interacción no covalente, de gran relevancia en biofísica en general y en la estructura de proteínas en particular, es el puente de hidrógeno, un tipo particular de interacción electrostática. El enlace o “puente” de hidrógeno es un tipo de enlace muy particular, que aunque en algunos aspectos resulta similar a las interacciones de tipo dipolo-dipolo, tiene características especiales. Constituyendo un tipo específico de interacción polar que se establece entre dos átomos significativamente electronegativos, generalmente O/ N, y un átomo de H, unido covalentemente a uno de dichos átomos electronegativos. En un enlace de hidrógeno tenemos que distinguir entre el átomo DADOR del hidrógeno (aquel al que está unido covalentemente el hidrógeno) y el ACEPTOR, que es al átomo de O/N al cual se va a enlazar el hidrógeno. Otra

consideración importante acerca de este tipo de interacciones es que son altamente direccionales. Esto implica que adquieren su mayor fortaleza cuando los tres átomos implicados están en línea recta (ángulo de enlace 180°). La fortaleza del enlace de hidrógeno es muy dependiente además de la distancia entre los átomos y disminuye con ella de forma exponencial.

En la mayoría de los campos de fuerzas, incluidos AMBER y CHARMM, los enlaces de hidrógeno no se modelan de manera explícita y quedan contemplados por la combinación de interacciones electrostáticas y de van der Waals, usando radios de Lennard-Jones inusualmente cortos para los átomos involucrados. En la **Figura 1.23** se muestran los términos de no enlace implementados en los campos de fuerza de AMBER.

$$\sum_{no_union} \left(\frac{A}{r^{12}} - \frac{B}{r^6} \right) + \sum_{no_union} \left(\frac{q_i q_j}{\epsilon r} \right)$$

Figura 1.23- Término de no unión campo de fuerza típico de AMBER.

Podemos observar, que tal como se indicó previamente, en el segundo término correspondiente al tratamiento de interacciones electrostáticas, aparece en el denominador la constante dieléctrica o permitividad relativa que surge de la aplicación de la ley de Coulomb en medios materiales. El valor a utilizar en sistemas complejos para la constante dieléctrica es un tema no resuelto. En el interior proteico, se espera que la "constante dieléctrica local" resulte similar al vacío, mientras que si la interacción electrostática está expuesta al agua, la misma se torna irrelevante por el apantallamiento y la solvatación. Sin embargo, como veremos, la hidrofobicidad local puede jugar un papel central en la modulación de dichas interacciones, ya sea por la geometría de nanoconfinamiento o por la presencia de hidrófobos que organicen, labilicen o expulsen al solvente, impidiendo la hidratación y la consecuente disrupción de la interacción considerada (por ejemplo, puente de hidrógeno). Luego, las proteínas solubles precisamente protegen o arropan a sus puentes de hidrógenos de la cadena principal mediante los grupos hidrofóbicos de sus cadenas laterales en interacciones de tres cuerpos que exacerban a la interacción de pares electrostática. Sin embargo, la presencia de defectos en este tipo de empaquetamiento ha sido determinada como fundamental en procesos de binding (7,61).

Finalmente, las interacciones hidrofóbicas se dan como consecuencia de la estructura del agua y se considera que su fuerza impulsora es entrópica. De este modo, la energía libre involucrada en el proceso de hidratación de cuerpos hidrofóbicos es siempre positiva, es decir, es un proceso no espontáneo o energéticamente desfavorable. Si bien las primeras presunciones adjudicaban esta característica a un valor también positivo en la contribución entálpica (dada la falta de afinidad entre el hidrófobo y el agua), Evans y Frank demostraron en 1945 que en realidad, la no espontaneidad del proceso se debe principalmente a la pérdida de entropía del sistema (62). Esta pérdida de entropía se puede explicar a nivel molecular por el grado de ordenamiento adicional que impone justamente el factor entálpico: el agua tiende a minimizar el contacto con el hidrófobo (con el que interactúa pobremente) y a maximizar la red de puentes de hidrógeno con sus pares. En pocas palabras, el agua sobre la superficie hidrofóbica se encuentra más "ordenada" o estructurada que el agua en el seno de la solución. Entendido lo anterior resulta relativamente simple deducir el origen de la energía favorable de

interacción entre dos cuerpos hidrofóbicos en agua: la unión de dos cuerpos hidrofóbicos minimiza la superficie de contacto entre el hidrófobo y el agua, liberándose en el proceso algunas moléculas de la interfase. Estas moléculas retornan al seno de la solución, donde pueden completar sus cuatro puentes de hidrógeno característicos (reducidos normalmente a tres en la interfase) y poseen además, un mayor número disponible de microestados de idéntica entalpía, o, en otras palabras, una mayor entropía. Es interesante notar que este tipo de motivo de unión, si bien energéticamente favorable, difiere en naturaleza con el resto de las interacciones no covalentes que hemos mencionados, puesto que no se trata de una interacción específica entre los dos cuerpos hidrofóbicos intervinientes, sino, más bien, el efecto secundario de maximizar otras tantas. La consecuencia de este efecto hidrofóbico en la unión proteína-ligando es un aumento en la afinidad cada vez que se entierra superficie hidrofóbica del sitio de unión y del ligando al formar el complejo (63). Se cree también que este efecto dirige el plegamiento de proteínas, en un fenómeno denominado colapso hidrofóbico (**Figura 1.24**); de este modo, la contundente relevancia del efecto hidrofóbico como motivo de unión en la naturaleza, nos da una idea de la necesidad de no desatender la influencia que puede tener el agua, más allá de la propia identidad fisicoquímica de las demás moléculas intervinientes.

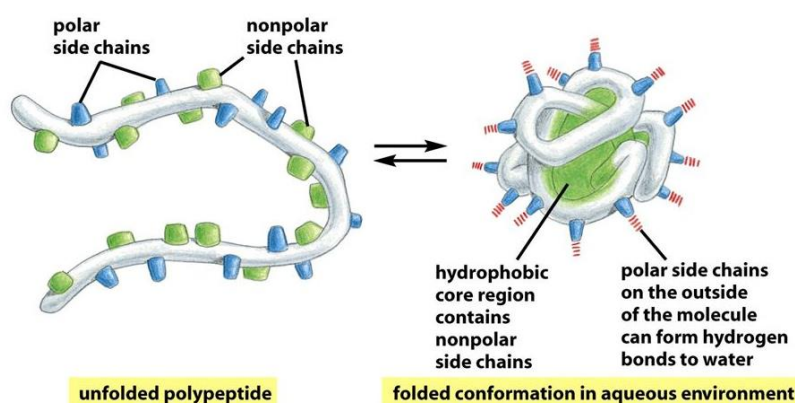


Figura 1.24- Representación esquemática del fenómeno denominado 'colapso hidrofóbico'.

1.2.4- El caso especial de los puentes de Hidrógeno de la cadena principal (backbone): Su carácter contexto-dependiente.

Como se expuso previamente, uno de los principales determinantes estructurales en proteínas son los puentes de hidrógeno del 'backbone' o por sus siglas en inglés BHBs (backbone hydrogen bonds). Dichas interacciones no covalentes son estables cuando el agua es significativamente excluida de su entorno local por los grupos hidrofóbicos de las cadenas laterales de los aminoácidos. Sin embargo, este requerimiento no necesariamente se cumple a lo largo de toda la proteína, y particularmente en sitios de binding, los cuáles pueden presentar propiedades de hidratación marcadamente diferentes de otras regiones de la superficie proteica (3,7,8, 57-61). Precisamente, ha sido sugerido que las propiedades de hidratación que presentan los sitios de binding juegan un papel central en los procesos de asociación ligando-proteína, así como también proteína-proteína (3,7,8, 57-61), ya que se espera que las moléculas de agua de hidratación resulten lábiles y sean desplazadas del sitio de binding al formarse un complejo determinado. De hecho, el remplazo de moléculas de agua 'desfavorables' por grupos del ligando complementarios a la superficie de la proteína ha sido establecido como una de las

fuerzas impulsoras principales para el binding y, como tal, se ha incorporado en estrategias computacionales basadas en la estructura. Además, estudios de unión de pequeñas moléculas de prueba, han sido combinados con mapas de exclusión dictados por el patrón de moléculas de agua fuertemente unidas, con el objetivo de detectar sitios de binding. De acuerdo con este escenario heterogéneo para la hidratación de proteínas, ha sido establecida la existencia de BHBs parcialmente expuestos al solvente, así como también su relevancia para los procesos de binding en proteínas (8). Una serie de investigaciones lideradas por el profesor Ariel Fernandez, las cuáles identificaron puentes de Hidrógeno incompletamente protegidos (parcialmente expuestos al solvente) permitieron codificar el proceso de unión en términos de dichos "defectos de empaquetamiento" que resultarían "pegajosos" debido a la necesidad de protección *intermolecular* adicional (61).

Los estudios dirigidos por el profesor Ariel Fernandez fueron una categórica fuente de inspiración del trabajo desarrollado a lo largo de esta tesis, es importante mencionar que dicho modo de observación se ha basado mayormente en el análisis de las estructuras tridimensionales determinadas experimentalmente para una serie de proteínas. Sin embargo, es muy importante destacar en este punto que por ser justamente las proteínas moléculas flexibles, la estructura de una proteína obtenida experimentalmente (en particular por cristalografía de rayos X) captura meramente a aquella estructura más probable dentro de su dinámica estructural. Es decir que hablar de estructura es, más bien, hablar de toda una dinámica estructural. Existe todo un paisaje conformacional para una misma proteína, con mayor o menor población (probabilidad) de estructuras preferidas, de acuerdo con su estabilidad relativa en ese ensamble. Sin embargo, tal vez, aquellas conformaciones estructuralmente más defectuosas, sean las que poseen mayores potencialidades adhesivas.

En el transcurso de la presente tesis, y con el objetivo de estudiar/esclarecer la dependencia contextual de interacciones no covalentes como lo son BHBs, estudiaremos la hidratación de sistemas complejos como son las proteínas, mediante simulaciones de dinámica molecular, haciendo foco principalmente en las propiedades de hidratación de sus BHBs. Además realizaremos matrices de contacto, dónde estudiaremos el tiempo promedio de vida de un determinado BHBs, con el objetivo final de establecer relaciones entre su comportamiento/estabilidad con la exposición local al agua (solvente). De este modo, se verá que algunas de las particularidades de las conformaciones menos estables, pueden cumplir un rol fundamental en la fisicoquímica de interacción y como pueden estar justificadas por sus características locales de hidratación.

Referencias:

- 1) N Giovambattista, PJ Rossky and PG Debenedetti, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2012**, 63, 179; N Giovambattista, PG Debenedetti and PJ Rossky, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **2009**, 106, 15181.
- 2) B.J. Berne et al. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2009**, 60, 85.
- 3) JL Kulp III, et al, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 10740.
- 4) H Acharya et al., *Faraday Discuss.* **2010**, 146, 353.
- 5) LM Alarcón, DC Malaspina, EP Schulz, M.A Frechero and GA Appignanesi, *Chem. Phys.* **2011**, 388, 47.
- 6) CFJ Faul and M Antonietti, *Adv. Mater.* **2003**, 15, 673; TH Rehm and C Schmuck, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 3597.
- 7) A Fernández and R Scott, *Phys. Rev. Lett.* **2003**, 91, 018102; A Fernández and M Lynch, *Nature*, **2011**, 474, 502.
- 8) SR Accordino, JA Rodríguez Fris, GA Appignanesi and A. Fernández, *Eur. Phys. J E*, **2012**, 35, 59; SR Accordino, MA Morini, MB Sierra, JA Rodríguez Fris, GA Appignanesi and A Fernández, *Proteins: Struct, Funct & Bioinf*, **2012**, 80, 1755; SR Accordino, JA Rodríguez Fris and GA Appignanesi, *PLoS ONE*, **2013**, 8, e55123.
- 9) AA Bogan and KS Thorn *J Mol Biol*, **1998**, 208, 1, J. Li and Q. Liu, *Bioinformatics*, **2009**, 25, 743.
- 10) Paul, S. M.; Mytelka, D. S.; Dunwiddie, C. T.; Persinger, C. C.; Munos, B. H.; Lindborg, S. R.; Schacht, A. L. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, 9, 203.
- 11) Ertl, P. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, **2003**, 43, 374.
- 12) Jorgensen WL. *Science*. **2004**, 303, 1813.
- 13) Talele TT, Khedkar SA, Rigby AC. *Curr Top Med Chem* **2010**, 10, 127.
- 14) Van Drie JH. *J Comput Aided Mol Des* **2007**, 21, 591.
- 15) Hartman GD, Egbertson MS, Halczenko W, Laswell WL, Duggan ME, Smith RL, Naylor AM, Manno PD, Lynch RJ, Zhang G. *J Med Chem* **1992**, 35, 4640.
- 16) Goodsell, D. S.; Olson, A. J. *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.* **1990**, 8, 195.
- 17) Hart, T. N.; Read, R. J. *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.* **1992**, 13, 206.
- 18) Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **1998**, 19, 1639.
- 19) Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R. J. *Mol. Biol.* **1997**, 267, 727.
- 20) Oshiro, C. M.; Kuntz, I. D.; Dixon, J. S. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **1995**, 9, 113.
- 21) Kitchen, D.B.; Decornez, H.; Furr, J.R. y Bajorath, J. **2004**, 3, 935.
- 22) Meng, E. C.; Shoichet, B. K.; Kuntz, I. D. *J. Comput. Chem.* **1992**, 13, 505.
- 23) Eldridge, M. D.; Murray, C. W.; Auton, T. R.; Paolini, G. V.; Mee, R. P. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **1997**, 11, 425.
- 24) Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. *The Protein Data Bank. Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, 235.
- 25) Groom, C. R.; Bruno, I. J.; Lightfoot, M. P.; Ward, S. C. *The Cambridge Structural Database. Acta Cryst.* **2016**, 72, 171.
- 26) Gohlke, H.; Hendlich, M.; Klebe, G. *J. Mol. Biol.* **2000**, 295, 337.
- 27) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **2009**, 30, 2785.
- 28) David J. Newman, and Gordon M. Cragg. *J. Nat. Prod.* **2016**, 79, 629.
- 29) Josefin Rose´n, Johan Gottfries, Sorel Muresan, Anders Backlund, and Tudor I. J. *Med. Chem.* **2009**, 52, 1953.
- 30) Larsson, J.; Gottfries, J.; Muresan, S.; Backlund, A. *J. Nat. Prod.* **2007**, 70, 789.
- 31) Oprea, T. I.; Gottfries, J. *J. Comb. Chem.* **2001**, 3, 157.
- 32) Rose´n, J.; Lovgren, A.; Kogej, T.; Muresan, S.; Gottfries, J.; Backlund, A. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2009**, 23, 253.
- 33) Wold, S.; Esbensen, K.; Geladi, P. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1987**, 2, 37.
- 34) B. E. Evans, K. E. Rittle, M. G. Bock, R. M. DiPardo, R. M. Freidinger, W. L. Whitter, G. F. Lundell, D. F. Veber, P. S. Anderson, R. S. L. Chang, V. J. Lotti, D. J. Cerino, T. B. Chen, P. J. Kling, K. A. Kunkel, J. P. Springer, and J. Hirshfield. *J. Med. Chem.*, **1988**, 31, 2235.

- 35) Fukai, T.; Yonekawa, M.; Hou, A.-J.; Nomura, T.; Sun, H.-D.; Uno, J. *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1118. Don, M.-J.; Huang, Y.-J.; Huang, R.-L.; Lin, Y.-L., *Chem. Pharm. Bull.*, 2004, 52, 866. Groweiss, A.; Cardellina, II, J.H.; Boyd, M.R., *J. Nat. Prod.*, **2000**, 63, 1537.
- 36) Cordell, G. A.; Kinghorn, A. D.; Pengsuparp, T.; Cai, L.; Constant, H.; Fong, H. S.; Lin, Z. L.; Pezutto, J. M.; Ingolfssdottir, K.; Wagner, H.; Hughes, S. H., *J. Nat. Prod.* **1995**, 58, 1024.
- 37) Riscoe, M.; Winter, R.; Ignatushchenko, M. V.; Bachinger, H. P.; Hinrichs, D. J., *FEBS Lett.* **1997**, 409, 67.
- 38) H. Auterhoff, H. Frauendorf, W. Liesenklas and C. Schwandt, *Arch. Pharm.*, **1962**, 295, 833.
- 39) Y. Yang, L. Yang, Q. D. You, F. F. Nie, H. Y. Gu, L. Zhao, X. T. Wang and Q. L. Guo, *Cancer Lett.*, **2007**, 256, 259.
- 40) S. Kasibhatla, K. A. Jessen, S. Maliartchouk, J. Y. Wang, N. M. English, J. Drewe, L. Qiu, S. P. Archer, A. E. Ponce, N. Sirisoma, S. C. Jiang, H. Z. Zhang, K. R. Gehlsen, S. X. Cai, D. R. Green and B. Tseng, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2005**, 102, 12095.
- 41) M. K. Pandey, B. Sung, K. S. Ahn, A. B. Kunnumakkara, M. M. Chaturvedi and B. B. Aggarwal, *Blood*, **2007**, 110, 3517.
- 42) G. W. Rewcastle, G. J. Atwell, L. Zhuang, B. C. Baguley and W. A. Denny, *J. Med. Chem.*, **1991**, 34, 217.
- 43) Philip E. Thorpe, *Clinical Cancer Research*. **2004**, 10, 415.
- 44) Suresh Kumar, Sandhya Bawa and Himanshu Gupta, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **2009**, 9, 1648.
- 45) Di Carlo, G.; Mascolo, N.; Izzo, A.A.; Capasso, F. *Life Sci.*, **1999**, 65, 337.
- 46) Morel, I.; Lescoat, G.; Cogrel, P.; Sergent, O.; Pasdeloup, N.; Brissot, P.; Cillard, P.; Cilliard, J. *Biochem. Pharmacol.*, **1993**, 45, 13.
- 47) Achanta, G.; Modzelewska, A.; Feng, L.; Khan, S.R.; Huang, P. *Mol. Pharmacol.*, **2006**, 70, 426.
- 48) Lo Conte, L.; Chothia, C. & Janin, J. *J. Mol. Biol.* **1999**, 285, 2177.
- 49) Clackson, T. & Wells, J. A. *Science*, **1995**, 267, 383.
- 50) DeLano, W. L. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, 12, 14.
- 51) Ma, B., Elkayam, T., Wolfson, H. & Nussinov, R. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **2003**, 100, 5772.
- 52) Sundberg, E. J. & Mariuzza, R. A. *Structure Fold. Des.* **2000**, 8, 137.
- 53) DeLano, W. L., Ultsch, M. H., de Vos, A. M. & Wells, J. A. *Science*, **2000**, 287, 1279.
- 54) Teague, S. J. *Nature Rev. Drug Discov.* **2003**, 2, 527.
- 55) Luque, I. & Freire, E. *Proteins*, **2000**, S4, 63.
- 56) Ma, B., Shatsky, M., Wolfson, H. J. & Nussinov, R. *Protein Sci.* **2002**, 11, 184.
- 57) Qvist, M. Davidovic, D. Hamelberg and B. Halle, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, 105, 6296.
- 58) T. Young, R. Abel, B. Kim, B.J. Berne and R.A. Friesner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2007**, 104, 808.
- 59) C.Wang, B.J. Berne and R.A. Friesner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011** 108, 1326.
- 60) R.A. Friesner et al., *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 6177.
- 61) A. Fernandez, in *Transformative Concepts for Drug Design: Target Wrapping Vol.I* (Springer: Heidelberg, **2010**), pp. 1-224.
- 62) Frank, H. S. *Free. J. Chem. Phys.* **1945**, 13, 478.
- 63) Bohm, H.-J.; Klebe, G. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 2588.
- 64) Levine, A. J. *Cell*, **1997**, 88, 323.
- 65) Olivier M., Hollstein M., Hainaut P. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2010**, 2, 001.
- 66) Levine A.J., Hu W., Feng Z. *Cell Death Differ.* **2006**, 13, 1027.
- 67) Oliner J.D., Kinzler K.W., Meltzer P.S., George D.L., Vogelstein B. *Nature*, **1992**, 358, 80.
- 68) Momand J., Jung D., Wilczynski S., Niland J. *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 3453.
- 69) G. Bond G.L., Hirshfield K.M., Kirchhoff T., Alexe G., Bond E.E., Robins H., Bartel F. et al. *Cancer Res.* **2006**, 66, 5104.
- 70) Araki S., Eitel J.A., Batuello C.N., Bijangi-Vishehsaraei K., Xie X.J., Danielpour D., Pollok K.E. et al. *J Clin Invest*; **2010**, 120, 290.
- 71) Haupt Y., Maya R., Kazaz A., Oren M. *Nature*; **1997**, 387, 296.
- 72) Kubbutat M.H., Jones S.N., Vousden K.H. *Nature*; **1997**, 387, 299.
- 73) Honda R., Tanaka H., Yasuda H. *FEBS, Lett*; **1997**, 420, 25.
- 74) Wu X., Bayle J.H., Olson D., Levine A.J. *Genes Dev*; **1993**, 7, 1126.

- 75) Tovar C., Rosinski J., Filipovic Z., Higgins B., Kolinsky K., Hilton, H., Zhao X. et al. Proc Natl Acad Sci USA; **2006**, 103, 1888.
- 76) Rebecca Voltan, Arianna Gonelli, Paola Secchiero and Giorgio Zauli. Journal of Hematology & Oncology. **2017**, 10, 133.
- 77) Karim, A. y Jason, E. **2011**, 9, 586.
- 78) Dana, M.N.; Peter, T.N. y Murphy, M.P. Current Neuropharmacology, **2011**, 9, 674.
- 79) Carreiras, M.C.; Eduarda, M.; Perry, M.J.; Ana Paula, F. y Marco-Contelles, J. Current Topics in Medicinal Chemistry, **2013**, 13, 1745.
- 80) Contestabile, A. Behavioural Brain Research, **2011**, 221, 334.
- 81) Quinn, D.M. Chemical Reviews, **1987**, 87, 955.
- 82) Jiangke Qin, Wenli Lan, Zhong Liu, Jun Huang, Huang Tang and Hengshan Wang. Chemistry Central Journal, **2013**, 7, 78.

CAPITULO 2

A medida que los métodos de la química estructural se apliquen de modo más profundo a problemas fisiológicos, se encontrará que la importancia del enlace de hidrógeno para la fisiología es mayor que la de cualquier otra característica estructural.

Linus Pauling. The Nature of the Chemical Bond. 1939.

2.1- Descripción general y objetivos de estudio del capítulo

Linus Pauling predijo correctamente la formación de estructuras secundarias en proteínas, basándose en la asunción de que la conformación más estable debía maximizar la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares entre los residuos. Tal como observado por el Prof. Ariel Fernandez, estos puentes de hidrógeno, para prevalecer en un medio acuoso con fuerte propensión al apantallamiento de cargas, deben ser protegidos por las cadenas laterales de los aminoácidos aledaños. Sin embargo, el entorno local de los protagonistas de estas interacciones (átomos de N del grupo amida y O del carbonilo), como ya se mencionó previamente, puede diferir a lo largo de la proteína. Sobre todo en los sitios de binding estas diferencias se pueden acentuar, resultando en regiones con propiedades de hidratación marcadamente diferentes de otras regiones superficiales de dichas macromoléculas. Justamente, o mejor dicho, convenientemente, aquellas zonas más reactivas de la proteína, presentan una disposición de cadenas laterales tal que, de alguna manera tornan más vulnerables a los puentes de hidrógeno del backbone en esa región (1-6). A lo largo de este capítulo observaremos las implicancias de esta característica para la dinámica de las proteínas en medio acuoso. De este modo, uno de los principales objetivos de este capítulo es estudiar la manera en la cual el entorno local (hidrofóbico o hirofílico) modula interacciones no covalentes. Comenzamos realizando estudios en sistemas modelo muy simples, para finalmente abordar estas cuestiones en sistemas complejos como los son complejos proteína- proteína.

El entendimiento de las relaciones entre hidrofobicidad e interacciones no covalentes sigue siendo una materia pendiente en el esfuerzo de la comunidad científica. Hoy en día, existen pocos estudios que exploren estas relaciones de una manera sistemática y clara. Sin embargo, mucho se ha avanzado en el conocimiento de los requerimientos para que ocurra el autoensamblado de moléculas en solución. Se ha demostrado por ejemplo, que el autoensamblado de superficies hidrofóbicas de dimensiones nanométricas, requiere de una etapa de deshidratación o "dewetting", que ocurre a una determinada distancia de separación entre los cuerpos en la cual el agua se vuelve termodinámicamente inestable (7-10). Por otra parte, estudios muy recientes han explorado la respuesta del agua confinada entre superficies inhomogéneas, con

diferentes arreglos de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos alternados. Se ha demostrado que el comportamiento del agua en estos casos, varía de manera difícil de predecir, pero, además, existe una dependencia para nada trivial entre el comportamiento observado y la disposición de estos grupos (7,11-13). Estudios de potencial de fuerza media, demostraron que la energía de unión entre placas con la misma cantidad de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos dispuestos en diferentes arreglos o patrones presentan energías de unión muy diferentes (8). Estos últimos hallazgos permiten vislumbrar indicios de una tendencia cooperativa del efecto hidrofóbico y, por lo tanto, de una naturaleza no aditiva del fenómeno.

En este contexto, en el presente capítulo nos proponemos intentar racionalizar la naturaleza no aditiva de interacciones no covalentes relevantes a los procesos de ensamblado. De este modo, comenzamos analizando este efecto en sistemas muy simples, representados por superficies planas en las que se coloca una carga reactiva en el centro, rodeada por entornos químicos diferentes. Calculamos potenciales de fuerza media o PMF (Potential of Mean Force) para estimar interacciones atractivas entre dichas placas paralelas. Así, estudiamos la forma en que el entorno local (restos hidrofóbicos o hidrofílicos) modula la interacción entre los grupos cargados. Además realizamos estudios en vacío con el objetivo de explicar explícitamente el papel del disolvente y la hidrofobicidad local. Por otra parte, comparamos los resultados anteriores con los obtenidos para placas no cargadas con el objetivo de identificar y racionalizar la no aditividad de las diferentes interacciones no covalentes. Los resultados obtenidos (mediante simulaciones de dinámica molecular) darán cuenta de la posibilidad de modular interacciones de carga por medio de la elección de los grupos del entorno. Así demostraremos que, mientras más hidrofóbico sea el comportamiento del material, mayor resultara la interacción entre cargas en entornos acuosos. Adicionalmente, vale la pena mencionar en este punto que esta primera serie de estudios forman parte central de los contenidos desarrollados en la tesis de Joan Manuel Montes de Oca; luego, para consideraciones adicionales los remito a la lectura de la misma (dichos contenidos forman parte además de uno de los trabajos surgidos de la presente tesis: Joan Manuel Montes de Oca, et al. "*Studies on electrostatic interactions within model nano-confined aqueous environments of different chemical nature*", The European Physical Journal E, 2017, 40: 78).

Luego, el escenario descrito anteriormente es, de alguna manera, una generalización de los conceptos desarrollados por el Prof. Ariel Fernández. Nuestro grupo de investigación ha colaborado intensamente con el profesor Fernández en dicha línea (4,5,14) y de hecho los estudios que se presentarán en este capítulo realizados en complejos proteicos, están inspirados en sus resultados. Sus investigaciones (6,15,16) introdujeron la idea de la existencia de puentes de hidrógeno deficientes y demostraron su relevancia en los procesos de binding en proteínas. El enfoque propuesto por Fernández, se basa, justamente, en el reconocimiento de interacciones electrostáticas dependientes del contexto. Estos puentes de hidrógeno "defectuosos", denominados Dehidrones (6), se caracterizan por estar insuficientemente protegidos del agua circundante. En última instancia, los motivos que justifican su empobrecimiento energético, son los mismos sobre los cuáles se desea indagar en la primera parte de este capítulo con el estudio de sistemas simples (la interacción por puente de hidrógeno no deja de ser un caso particular de interacción electrostática, y por lo tanto, se ve afectada por los mismos factores que aquí nos proponemos estudiar).

Una de las características más sobresalientes de los Dehidrones es su adhesividad inherente. Dado que acercar grupos apolares refuerza el puente de hidrógeno de la proteína, por desplazamiento u ordenamiento del agua circundante, existe

una ganancia neta de energía determinada experimentalmente en unas 3.9 Kcal/mol (6), la cual promueve la asociación con el ligando. Se trata de una contribución sin dudas significativa, si consideramos que la energía que separa un estado plegado (activo) y desnaturalizado (inactivo) en proteínas, se estima en apenas unas 5/10 Kcal/mol (17,18). En definitiva, es este delicado estado de equilibrio que se establece entre las formas plegada y desnaturalizada lo que lo caracteriza su termodinámica; así las proteínas se debaten continuamente entre un estado desplegado en el que prevalece la entropía y un estado más condensado, en el que se paga el precio entrópico por medio de los puentes de hidrógeno inter e intra moleculares que se forman en el plegado y de otras contribuciones tales como el efecto hidrofóbico, interacciones de Van der Waals, etc.

Es justamente por la precariedad del equilibrio termodinámico que se establece en la disposición espacial de las proteínas, que existe cierta "flexibilidad" y libertad de movimiento intrínseca en su estructura. Después de todo, la proteína tiene todo un abanico de estructuras localmente estables dentro del paisaje de energía conformacional (19).

Una consideración importante en este punto, es que justamente por ser las proteínas objetos inherentemente dinámicos, considerar solo la estructura del PDB, *Protein Data Bank* (sobre todo las obtenidas por cristalografía de rayos X), puede estar velando información realmente relevante para la comprensión de sus características fisicoquímicas (y sobre todo si tenemos presente en este punto que la funcionalidad de una proteína es altamente dependiente de su estructura). De este modo, la consideración de defectos de empaquetamiento inherentes a la estructura del PDB, es decir, caracterizar sus dehidrones, podría estar subestimando a ciertos eventos sólo evidentes a partir de una descripción dinámica.

Otra teoría que sienta los precedentes y es motivo de inspiración para el estudio que se va a realizar consecutivamente en este capítulo es la denominada "teoría del O-ring" (traducible como teoría del anillo) propuesta inicialmente por Bogan y Thorn y modificada por Li (1,3). El estudio de Bogan demuestra que existe una regularidad en los sitios de unión en proteínas por presentar algunos pocos grupos químicos energéticamente relevantes para el binding (sobre una base de datos de interfaces proteína-proteína, de grandes dimensiones y mayormente planas, se ha encontrado que sólo unos pocos residuos resultarían "*hot spots*"; dichas determinaciones fueron realizadas por medio de la utilización del método de *Alanine Scanning*, es decir mutando uno por uno los residuos de la interfase por alanina). A su vez, los mismos suelen verse rodeados de residuos cuya identidad química no es demasiado relevante pero que "acondicionan" la interfase ocluyendo al solvente. En definitiva, podríamos interpretar que estos residuos circundantes, modulan la constante dieléctrica efectiva y la disposición geométrica del agua para reforzar las interacciones relevantes.

Por lo dicho anteriormente, en la segunda parte de este capítulo, ahondamos en la dinámica de puentes de hidrógeno del backbone en proteínas y vinculamos/correlacionamos su comportamiento con sus propiedades de hidratación locales. En definitiva, estudiamos las propiedades de hidratación de sitios de binding por medio de simulaciones de dinámica molecular (MD), centrando nuestra atención particularmente en el comportamiento y propiedades de hidratación de los BHBs (en definitiva, y tal como se mencionó previamente, constituye un caso particular de interacción electrostática). Realizamos además matrices de propensión de BHBs, (dónde se representa el tiempo promedio que permanece formado un determinado BHBs a lo largo de la dinámica), las cuales revelaron la existencia de BHBs cuya persistencia neta en la dinámica difiere

marcadamente de su correspondiente estado en el PDB (esto es, formado o no formado). Estos BHBs donde el PDB 'falla' en predecir el comportamiento dinámico los denominamos como 'Camaleónicos' (CBHBs), precisamente por su tendencia a cambiar su prescripción estructural entre el PDB a un estado opuesto cuanto se encuentra en solución, esto es, durante la dinámica. Adicionalmente, encontramos que estos CBHBs no se encuentran homogéneamente distribuidos a lo largo de la proteína, sino que existe un claro enriquecimiento de los mismos en los sitios de unión de los complejos estudiados. Finalmente, estudiamos como se vinculan la exposición local al solvente y su estabilidad; así como también su comportamiento como 'blancos' a cubrir por ligandos/drogas. De hecho, uno de los resultados más interesantes de este trabajo fue que encontramos que cuando la proteína apo forma el complejo correspondiente con su diana natural (y consecuentemente el entorno local de estos BHBs cambia), la mayoría de los CBHBs son 'estabilizados'/ Quencheados. Un comportamiento similar se observó también en los complejos formados entre la proteína apo y las drogas o pequeñas moléculas disruptivas (aunque menos óptimo en algunos casos, es decir la restitución de 'estabilidad' no fue total).

De este modo, el análisis de propensiones de puentes de hidrógeno, tendría la potencialidad para sentar las bases en el desarrollo de nuevas herramientas de interés, ya sea aplicables a la detección de sitios de binding así como también en el diseño de drogas, contando asimismo con la ventaja adicional de ser completamente ortogonales con técnicas predictivas actualmente utilizadas y bien establecidas.

Luego, los resultados de esta segunda serie de estudios sobre complejos proteicos son parte del contenido desarrollado en los trabajos: "*Chameleonic" backbone hydrogen bonds in protein binding and as drug targets*, The European Physical Journal E., 2015, 38:1; y *Dynamic Analysis of Backbone-Hydrogen-Bond Propensity for Protein Binding and Drug Design*. Biopolymers for Medical Applications. Chapter 13.

2.2- Métodos:

En la primera parte de este capítulo estudiamos la termodinámica de unión de dos placas equivalentes y paralelamente enfrentadas (**incisos 2.3**), tanto en agua como en vacío. Cada placa fue construida funcionalizando los grupos superficiales de una estructura de átomos de carbono en un arreglo tipo diamante, resultando en una estructura de hexágonos muy similar en geometría a la placa autoensamblada hexagonal que se obtiene sobre la cara (111) del oro. El primer grupo de sistemas ensayados está compuesto por sistemas de placas con una carga central, rodeada de entornos con grupos de polaridad creciente (como se muestra en la **Figura 2.1**). En cada caso, la placa paralela con la que interacciona tiene exactamente el mismo entorno químico pero la carga central posee signo opuesto. Todos los sistemas fueron hidratados con el modelo de agua TIP3P dentro de una caja rectangular de aproximadamente 5x7x5 nm con condiciones periódicas de contorno. Las simulaciones moleculares fueron llevadas a cabo en GROMACS (20,21) package versión 5.1.1 con los campos de fuerzas AMBER99 y GAFF.

Para el potencial de fuerza media (PMF) utilizamos dinámicas sesgadas con umbrella sampling a incrementos en la distancia entre las placas de 0.3nm. Todas las ventanas de muestreo fueron primero equilibradas por 2ns seguida de una etapa de

recolección de datos por 4ns adicionales. El potencial de sesgo fue elegido teniendo en cuenta la energía requerida para sobrepasar la barrera de energía para la deshidratación de cada sistema. Para el cálculo del potencial de Fuerza media se empleó el método WHAM (22). Finalmente, para establecer herramientas de comparación, realizamos estos mismos procedimientos para placas con los mismos entornos químicos pero sin la carga central. Se utilizaron también las dinámicas de umbrella sampling para calcular propiedades de interés a medida que las placas se aproximan entre sí. Para terminar, realizamos un mapeo de las propiedades termodinámicas del solvente hidratando las superficies aisladas, utilizando el método GIST (23-25) (Grid Inhomogeneous Solvation Theory) recientemente incluido en AmberTools.

En la segunda parte del capítulo (**sección 2.5**), estudiamos complejos proteína- proteína para los cuales fue posible el desarrollo de pequeñas moléculas disruptivas de su interacción (26). Los casos que hemos estudiado son: MDM2 (PDB: 1ZIM)/ nutlin-2 (PDB: 1RVI)/ p53 (PDB: 1YCR) (27); IL-2 (PDB:1M4C)/ SP4206 (PDB: 1PY2)/IL-2 receptor α -chain (PDB:1Z92) [28], BCL-XL (PDB: 1R2D)/ABT-73734 (PDB: 2YXJ)/BAD-derived peptide (aminoácidos 100-126) (PDB: 2BZW) [29] y ZipA (PDB: 1F7W)/Compound 1 (PDB: 1Y2F)/FtsZ-derived peptide (PDB: 1F47) (aminoácidos 367-383) (30). En cada sistema, se indica primero la proteína no ligada (en su forma apo), luego el complejo de la misma con una molécula disruptiva, y por último el correspondiente complejo proteína- proteína con su diana natural; en todos los casos se indican los códigos correspondientes de dichas estructuras en el Protein Data Bank (PDB).

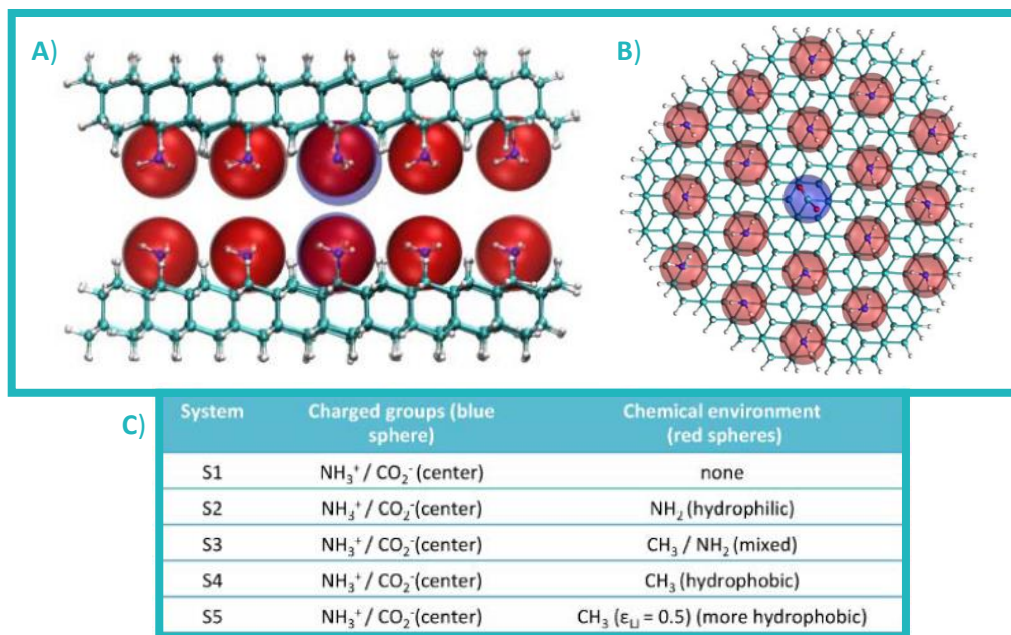


Figura 2.1: descripción de los sistemas de estudio. (A) vista lateral del sistema. (B) vista superior. (C) Descripción de los sustituyentes utilizados en el centro de la placa (esfera azul en "A" y "B") y como entorno químico de las cargas (esferas rojas).

Luego, con el objetivo de estudiar el comportamiento dinámico de los sistemas previamente mencionados, se llevaron a cabo simulaciones de dinámica molecular por medio del paquete de simulaciones de AMBER. A continuación se detallan las condiciones bajo las cuáles se realizaron dichos experimentos teóricos:

- **Condiciones periódicas de contorno:**

La simulación de un sistema, sea éste una molécula individual o un conjunto de átomos o moléculas, requiere establecer las condiciones de contorno para el mismo. La condición más simple es que dicho sistema esté aislado. Esta condición, si bien en general inapropiada, puede ser parcialmente aceptable para moléculas en fase gaseosa pero no resulta apropiada en absoluto para simular líquidos, soluciones o sólidos.

La simulación del sistema inmerso en el vacío produce efectos generalmente indeseados debido a que los átomos en contacto con el vacío estarán afectados por fuerzas diferentes a las que existen en un sistema con las condiciones reales, produciendo una distorsión de la superficie de energía potencial. Por esta razón, podemos tratar de evitar, al menos en parte, estos efectos indeseados introduciendo *condiciones periódicas de contorno*.

El establecer condiciones periódicas de contorno significa que el sistema está determinado por una celda unidad que se replica periódicamente en el espacio. Tanto la celda unidad como sus imágenes son consideradas para el cálculo.

En la **Figura 2.2** es posible observar el caso bidimensional (por simplicidad en el dibujo) dado por un rectángulo y sus imágenes. En esta figura se muestra que cada partícula está rodeada por otras, es decir, que no hay partículas en los límites –no hay límites-. Cada partícula está sometida a interacción de todas las partículas de su alrededor, ya sea por las propias partículas de la caja o sus imágenes.

Es evidente que si la interacción se extiende sin límite es posible que una partícula sea afectada dos veces por otra, la “real” y su imagen. Para evitar esta situación artificial se establece un radio de corte (RC) para el potencial, que limite el alcance de la interacción. En la **Figura 2.2** vemos que la partícula 1 interactúa con las 2, 3” y 4’, las cuales están dentro de RC. En resumen, cada partícula interactúa con otras o sus imágenes según cuál de ellas se encuentre más próxima, a esto se lo denomina *convención de imagen mínima*. El RC no puede ser muy pequeño, puesto que produciría una situación irreal, ni debe superar la mitad de la caja ($RC \leq L/2$, donde L es la longitud de la arista menor) puesto que no se lograría el efecto buscado. Si alguna partícula, en su trayectoria, abandona la caja, una de sus imágenes ingresa por el lado opuesto. De esta manera se mantiene constante el número de partículas en la simulación (31).

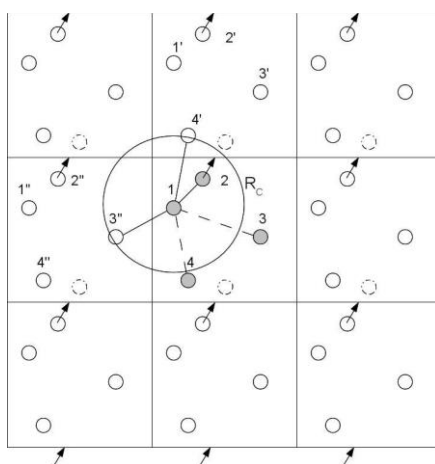


Figura 2.2- Condiciones periódicas de contorno para un sistema bidimensional.

- **Criterios de corte en el cálculo de interacciones (Cut-off):**

La cantidad de términos covalentes (enlaces, ángulos y diedros) al ser evaluados aumentan con orden uno respecto a la cantidad de átomos del sistema, mientras que los términos no covalentes (interacciones de Van der Waals y electrostáticas) lo hacen con el cuadrado del número de átomos. Por lo tanto, estos últimos son los de mayor consumo de tiempo de cálculo. En Dinámica Molecular, este tipo de interacciones debe calcularse entre todos los pares de átomos del sistema, pero para un sistema de muchas interacciones esto no resulta práctico.

Como se explicó en el punto anterior, el problema se puede solucionar aplicando la convención de imagen mínima y una distancia de truncamiento de interacciones (cut-off) o radio de corte (R_c). Cuando se define un valor de R_c las interacciones tipo van der Waals de a pares que están a una distancia mayor a éste son consideradas nulas, solo se consideran aquellas con las imágenes más cercanas.

Sin embargo, para las interacciones electrostáticas, no es el caso, porque son interacciones de muy largo alcance, incluso involucrando interacciones con átomos de la celda y sus imágenes. Por lo tanto, para este tipo de interacción se requieren metodologías eficientes para su cálculo, por ejemplo el método de sumatoria de Ewald o campo de reacción, y valores (o funciones) de corte elegidas cuidadosamente. (31)

En todos los casos se utilizó un valor de cut-off de 10 angstroms en el cálculo de las interacciones de corto rango (Van der Waals).

- **Dinámica molecular con restricciones:**

En una simulación, a medida que se aumenta el paso de integración se pueden obtener trayectorias más prolongadas con menor cantidad de pasos de integración. Sin embargo, pasos de integración muy grandes pueden generar inestabilidades debido a que los átomos pueden acercarse demasiado generando potenciales muy grandes. Por este motivo, el valor máximo del paso de integración se encuentra limitado a un décimo (o menos en lo posible) del periodo más pequeño de vibración de enlace. En el caso de moléculas bioorgánicas, este periodo corresponde al enlace "átomo pesado-hidrógeno" que es de 10^{-14} s. Entonces el paso de integración máximo permitido sería de 1 fs.

Una solución a esta limitación es congelar las vibraciones de estos enlaces de corto período, restringiéndolos a su valor de equilibrio mientras que el resto de los grados de libertad del sistema varían de acuerdo a su propia dinámica. El algoritmo más utilizado para este fin es SHAKE, que permite incrementar el paso de integración hasta 2 fs. (32). Dicho algoritmo fue utilizado en todas las simulaciones realizadas en este trabajo.

- **Ensamble Isotérmico- Isobárico (N,T,P) :**

Un ensamble es una idealización, que consiste en considerar un conjunto con un gran número de configuraciones de sistema, en el mismo estado termodinámico, pero con diferentes estados dinámicos de las partículas que lo constituyen. Esta colección de configuraciones representa una muestra apropiada de todos los estados microscópicos y, por lo tanto, sus propiedades promedio son las del sistema promedio ideal.

Distintas restricciones macroscópicas derivan en diferentes tipos de ensambles, con características particulares.

En las simulaciones de Dinámica Molecular llevadas a cabo en la presente tesis se emplearon condiciones de presión y temperatura constantes (N, T, P) durante las etapas de producción. En dicha condición, el sistema intercambia energía térmica con los alrededores, pero no materia. Su número de partículas, presión y temperatura son constantes.

- **Control de presión y temperatura:**

A medida que la simulación avanza, el sistema se encuentra en situaciones de no equilibrio, en especial cuando comienza, debido a que no siempre se parte de configuraciones iniciales lo suficientemente relajadas. La energía potencial de las configuraciones fuera del equilibrio se convierte consecuentemente en energía cinética, aumentando la temperatura del sistema. Existen varios métodos para enfriar el sistema, los cuales acoplan un baño térmico. Entre estos métodos, se encuentra el termostato de Berendsen, que regula la entrada y salida de calor utilizando un factor λ dependiente del tiempo que aumenta o disminuye proporcionalmente la velocidad de cada partícula cada n cantidad de pasos de integración (33). Este método utiliza un tiempo de decaimiento τ en el cual el sistema se relaja. Cuanto más grande es el valor de τ , más lento es el tiempo de relajación efectiva.

Otros métodos, más complejos, permiten intercambios estocásticos de calor entre los grados de libertad del sistema y del baño térmico. Entre éstos, los referentes son el termostato de Nosé-Hoover y de Langevin (34).

Particularmente, las simulaciones en un ensamble NTP mantienen constante la presión mediante la variación del volumen. Muchos de los métodos para controlar la presión son análogos a los usados en el control de temperatura. Entonces, el sistema puede ser acoplado a un “baño de presión” que modifica las dimensiones de la caja cada una determinada cantidad de pasos. Al igual que en el baño térmico, existe una constante de acoplamiento τ_P , y además otra que tiene en cuenta la compresibilidad del sistema, κ (en sistemas bioorgánicos es usualmente la compresibilidad del agua). Este método de regulación de la presión se conoce como baróstato de Berendsen (33).

Todas las simulaciones realizadas en este trabajo fueron llevadas a cabo a una temperatura de 300 K, utilizando para controlar dicha temperatura el termostato de Langevin.

- **Otras consideraciones:**

TIP3P fue el modelo de agua seleccionado. En todos los casos se siguieron los mismos protocolos de minimización y equilibración. Las etapas de equilibración fueron testeadas por monitoreo de las propiedades termodinámicas del sistema como temperatura, presión y energía. Para todas las proteínas en su forma apo realizamos producciones de 50 ns con un espaciado equidistante entre las configuraciones guardadas de 5 ps, obteniendo de este modo un total de 10000 fotos. Para todos los demás sistemas, ya sea complejos proteína- pequeña molécula o complejos proteína- proteína, las dinámicas de producción fueron de 20 ns con el mismo espaciado entre configuraciones, guardando un total de 4000 configuraciones. Las diferencias en los tiempos de simulación se justifican por diferencias en las propiedades inherentes de cada sistema (complejos o proteínas apo), dado que las proteínas en su estado no ligado poseen una mayor movilidad.

Para determinar el sitio de binding de cada proteína usamos un simple criterio geométrico, identificando los BHBs en la proteína objeto de estudio cuya distancia, medida desde N/O del grupo amida o carbonilo respectivamente, y cualquier

átomo pesado de su diana natural es menor a 6 Å (5,35) (criterio I). Otra posibilidad, que proporciona un tamaño un poco menor para el sitio de binding, es utilizar el mismo criterio geométrico pero con respecto a todos los átomos pesados de las drogas (pequeñas moléculas) contempladas en este estudio (criterio II). De este modo, determinamos BHBs localizados dentro de la interfase o sitio de binding de interés; sin embargo, la proteína podría tener otros sitios de unión que no los estaríamos contemplando.

Para los cuatro sistemas estudiados, el criterio I localiza en promedio un 15 % de los BHBs como pertenecientes al sitio de binding; en tanto que el criterio II reduce este porcentaje a la mitad de este valor aproximadamente.

Como ya se mencionó previamente, la estabilidad de las interacciones no covalentes como lo son BHBs se espera que dependa fuertemente con las propiedades de hidratación de su entorno local (5, 6, 35, 36). Por este motivo, primero determinamos la existencia de heterogeneidades en las propiedades de hidratación; para esto, calculamos la probabilidad de vacancia de agua como $P(N=0)$, en un pequeño volumen de observación (esférico), de radio 4 Å (37, 38) sobre cada sitio de interés, con N siendo el número de moléculas de agua dentro de dicho volumen, luego $P(N=0)$ se calculó computando el número de configuraciones para las cuales el volumen observacional está vacío (sin moléculas de agua), dividido el número total de configuraciones. Este indicador, tal como se explicará detalladamente en el **inciso 2.5** de este capítulo, constituye una buena estimación de las fluctuaciones de densidad locales y representa una buena medida de hidrofobicidad local. En primer término calculamos $P(N=0)$ en volúmenes de observación centrados en todos los átomos pesados de la proteína para simulaciones de 50 o 20 ns de acuerdo al sistema. Un valor de $P(N=0)$ cercano a la unidad implica que la región que se está estudiando (el átomo sobre el cual se centra el volumen de observación) está en un entorno completamente 'seco' o desolvatado. Si nos focalizamos en la superficie de la proteína, encontramos que la mayoría de la superficie está bien hidratada (superficie hidrofílica) mientras que se observa un 'parche', dónde la probabilidad de vacancia es muy superior, en la región perteneciente al sitio de binding. Este resultado, ya previamente anticipado por trabajos desarrollados en el grupo de S. Grade (38) es compatible con la presunción de que los ligandos deben desplazar agua fácilmente removable (lábil) del sitio de unión para formar un complejo determinado (39-42). Sin embargo, un detalle importante a tener en cuenta aquí, es que nosotros explícitamente nos interesa estudiar/determinar la relevancia de los BHBs como protagonistas de los fenómenos de binding, por tal motivo decidimos calcular la probabilidad de vacancia ($P(N=0)$), sobre los átomos de N (del grupo amida) y O (del grupo carbonilo) de los BHBs.

2.3- Estudio de interacciones no covalentes en sistemas modelo

2.3.1- Potenciales de fuerza media para el ensamble de placas cargadas

En la **Figura 2.3** se muestran los perfiles de energía obtenidos para placas cargadas con distintos entornos químicos en función de la distancia que las separa. Las energías de binding se obtienen de la diferencia en energía entre el primer mínimo (mínimo absoluto) y el plateau a grandes distancias. Entonces, de este gráfico se puede concluir que existe una clara tendencia: a medida que aumenta la hidrofobicidad de los grupos rodeando la carga, el valor absoluto de la energía de unión aumenta.

Adicionalmente, las posiciones y tamaños de los picos y valles secundarios, nos dan información sobre las diferentes etapas del proceso de deshidratación. Más aún, el último hombro en el paisaje de energía antes de la deshidratación completa, muestra la distancia exacta a la que la capa final de agua comienza a ser termodinámicamente inestable. En correlato con las tendencia observada para las energías de binding, la distancia a la que ocurre la deshidratación completa entre las placas (dewetting) decrece progresivamente a medida que las placas se tornan más hidrofílicas (ver también **Figura 2.4**). Entonces, las placas hidrofóbicas cargadas inducen el secado a distancias para nada triviales, pues son significativamente mayores que el ancho regular de la capa de hidratación en superficie. En cambio, el colapso de placas hidrofílicas ocurre solo cuando la última capa de agua es removida por efecto estérico. Una observación menor pero pertinente para aclarar el gráfico anterior es el caso espacial del SI, en el cual no hay grupos funcionales rodeando la carga (la carga sobresale al plano de la placa) y, entonces, ese espacio disponible es ocupado por una capa extra de agua. En esta situación, el mínimo del PMF aparece a distancias mayores que en los otros casos, debido a la imposibilidad del sistema para desplazar esa última capa por medios estéricos.

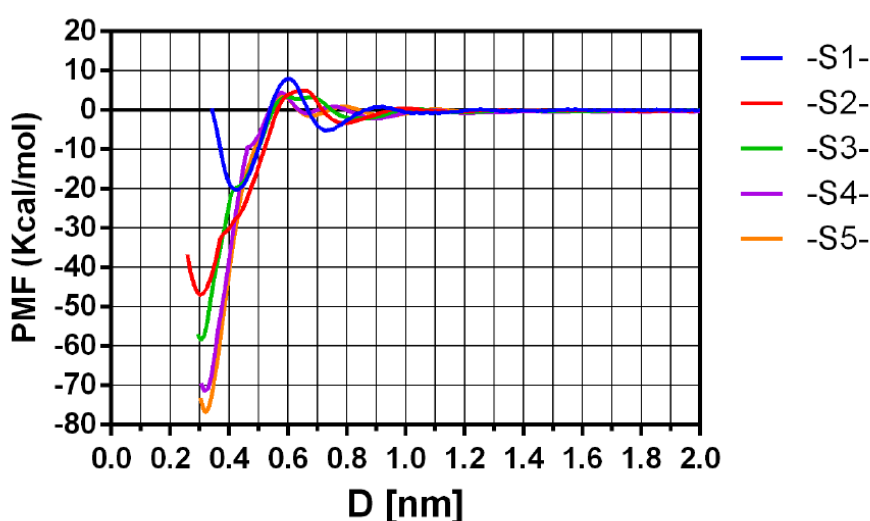


Figura 2.3: potencial de fuerza media obtenido en agua para los sistemas cargados. La leyenda corresponde a la nomenclatura de los sistemas mostrada en la **figura 2.1**.

Con el objetivo de aislar de la energía de unión el efecto producido por el agua, en la **figura 2.5** se muestra el potencial de fuerza media inducido por el agua. Este gráfico se obtiene de la diferencia entre el PMF en agua (mostrado anteriormente) y el PMF para el mismo sistema obtenido en vacío. Dado que todo el proceso de ensamblado en vacío es gobernado primariamente por las interacciones electrostáticas entre las cargas (interacciones de largo alcance), todos los perfiles de energía obtenidos en vacío son muy similares (con una diferencia máxima del 12%). Por lo tanto, podemos concluir que toda la diferencia en la energía de enlace observada en agua se debe a la diferencia en la incidencia del agua sobre las interacciones. Una observación interesante digna de mencionar antes de pasar al siguiente estudio, es que todos los perfiles energéticos inducidos por el agua muestran valores positivos (i.e. repulsivos), más característicos de superficies

hidrofílicas. En realidad, lo que se ve es que, a medida que agregamos grupos más hidrofóbicos rodeando a la carga, el comportamiento global de la placas se torna "menos hidrofílico", o menos repelido por el agua.

Este comportamiento casi hidrofílico es razonable si tenemos en cuenta la influencia de las cargas netas (ver sección PMF de placas neutras). Antes de proseguir con el estudio de placas neutras solo queda presentar algunos análisis de los cambios en los comportamientos del agua a medida que las placas se aproximan entre sí. Todos estos estudios se realizaron sobre las ventanas equilibradas de umbrella sampling.

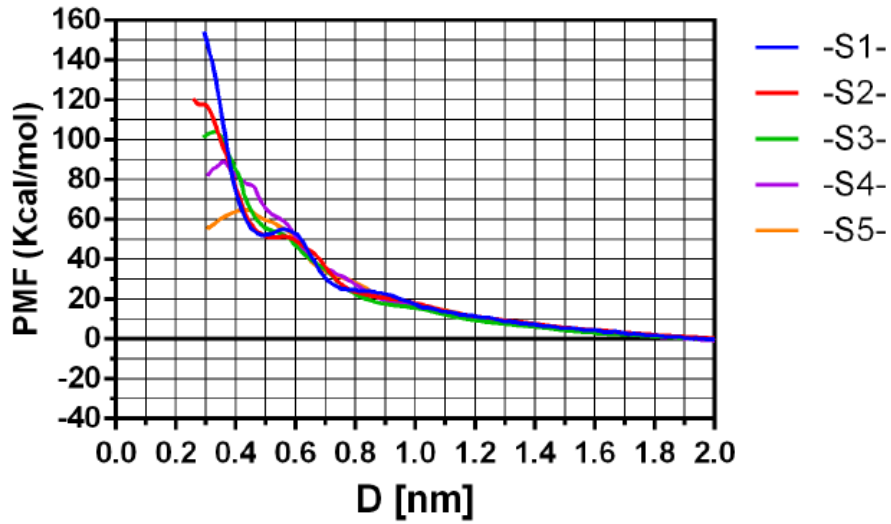


Figura 2.4: PMF de unión inducido por el agua, obtenido de sustraer el PMF en vacío al obtenido en agua.

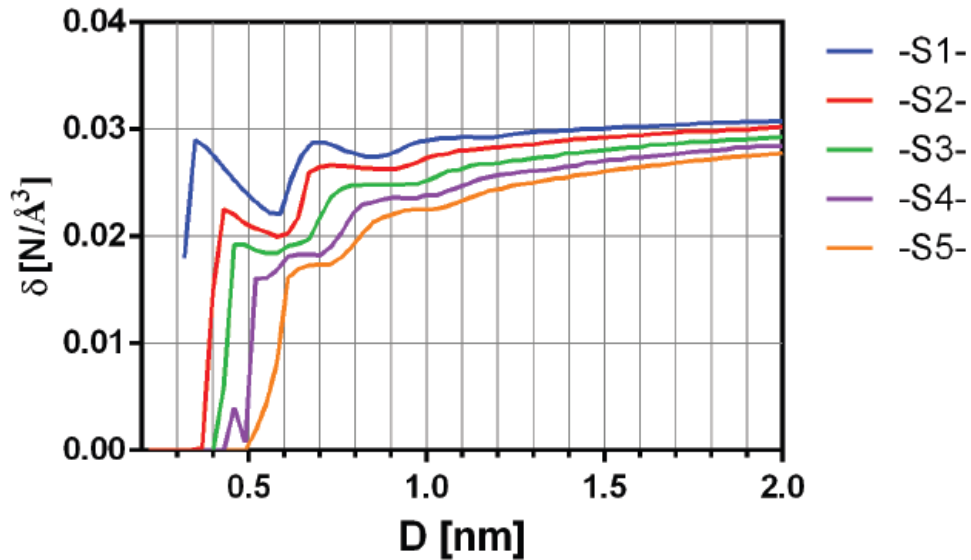


Figura 2.5: densidad promedio de agua entre las placas en función de la distancia que las separa.

En la **Figura 2.5** se muestra la densidad de agua en función de la distancia entre las placas, calculada como el promedio en la densidad de todas las moléculas que ocupan el espacio entre las placas, promediado además sobre los 4ns de la simulación de muestreo. Como se puede ver en la figura, las gráficas de densidad corroboran lo dicho al analizar los PMF: la densidad decae mucho antes en las placas que se comportan más hidrofóbicamente. Es decir, el proceso de secado ocurre en las placas hidrofóbicas a distancias conmensurables con la capa de hidratación (es posible acomodar todavía una capa de agua), en cambio, el secado de las placas hidrofílicas ocurre solo cuando no es suficiente el espacio entre las placas para mantener la hidratación. Esto último demuestra que el secado ("dewetting") no es un efecto gobernado por el factor estérico, sino que en sistemas hidrofóbicos, el agua se vuelve termodinámicamente inestable mucho antes de sufrir restricciones espaciales.

Más allá del valor abstracto de densidad comentado anteriormente, es interesante analizar también la distribución local de esa densidad entre las placas. Con este objetivo en mente, a continuación en la **Figura 2.6** se muestra una representación en dos dimensiones de la distribución de densidad espacial, a una distancia relevante (0.62nm) para dos casos extremos de comportamiento: S2 (comportamiento hidrofílico) y S4 (hidrofóbico).

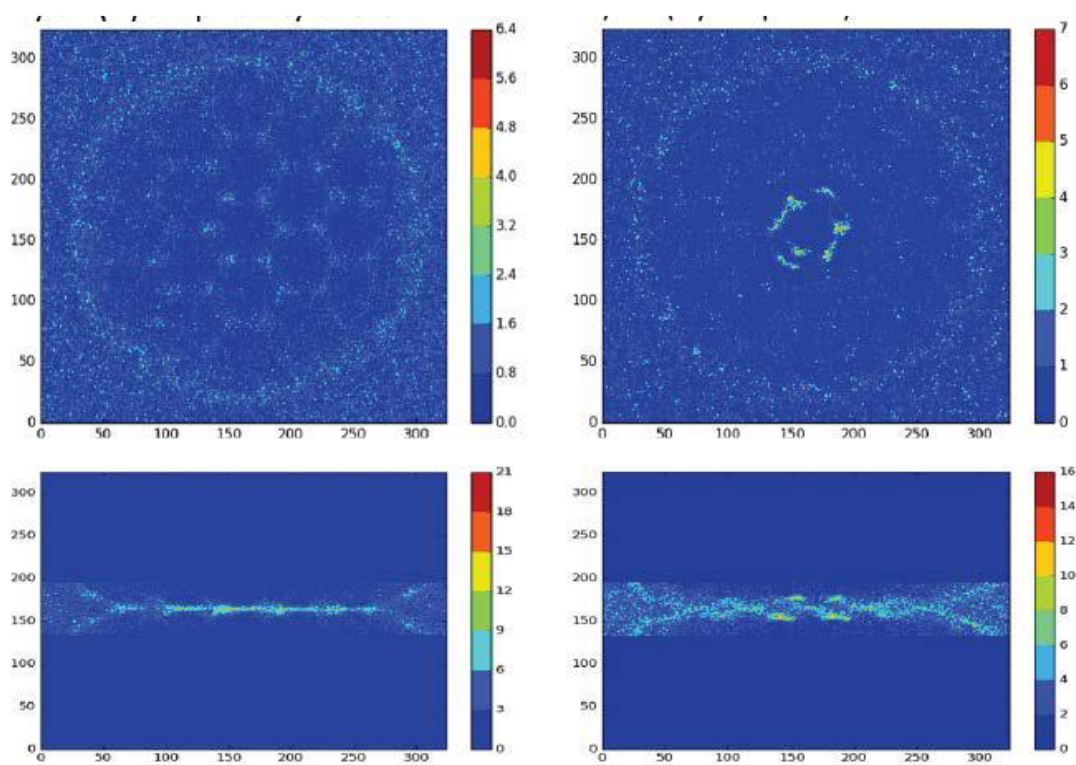


Figura 2.6: Mapa bidimensional de la densidad de agua local para (izquierda) el sistema S4 (entorno hidrofóbico) a 0.62 nm de distancia entre las placas y (derecha) para el sistema S2 (entorno hidrofílico) a la misma separación. En ambos casos se muestra arriba la vista superior y abajo la vista lateral.

Tanto la perspectiva lateral de las placas como la superior nos dan una idea de la influencia del entorno en el ordenamiento local del agua próxima a la carga central. Los grupos metilo terminales claramente promueven la deshidratación local en las cercanías de la carga en la situación de confinamiento, mientras que las cargas rodeadas por grupos $-NH_2$ permanecen

fuertemente hidratadas a la misma separación entre placas. Una observación interesante que no hemos terminado de explorar es el aparente incremento de la densidad en los bordes de las placas para ambos sistemas, probablemente justificada por la capacidad del agua bulk para formar puentes de hidrógeno con el agua entre las placas. Por último, se puede advertir un claro ordenamiento del agua en la placa terminada en $-\text{CH}_3$, lo que sugiere (como ya hemos dicho) una naturaleza no del todo hidrofóbica.

2.3.2- Perfiles de energía en placas neutras.

Análogamente a lo explicado para placas cargadas, aquí se presenta el mismo tipo de estudio, pero reemplazando la carga central en cada caso, por el mismo grupo funcional del entorno (**Figura 2.7**).

Estos estudios nos permitirán poner de manifiesto la naturaleza sinérgica (i.e. no aditiva) que existe entre la interacción de cargas y el efecto del entorno.

System	Charged groups	Chemical environment (red spheres)
S1	none	NH_2 (hydrophilic)
S2	none	$\text{CH}_3 / \text{NH}_2$ (mixed)
S3	none	ClI_3 (hydrophobic)
S4	none	CH_3 ($\epsilon_U = 0.5$) (more hydrophobic)

Figura 2.7: descripción de los grupos utilizados para funcionalizar la superficie (fueron reemplazados los grupos centrales de las placas cargadas por los mismos grupos del entorno). En el último sistema, **S4**, se atenuó el potencial de interacción de Lennard-Jones típico (carbono alifático- oxígeno del agua) reduciendo dicha interacción al mitad de su valor original (el resultado es una placa más hidrofóbica).

Una vez obtenidos los perfiles de energía libre de asociación, completamente equivalentes a los obtenidos para las placas cargadas con las que comparten entornos químicos, podemos notar que las diferencias observadas en el primer caso prácticamente desaparecen al reemplazar las cargas por grupos neutros. Tal vez, la observación más desconcertante es el valor negativo (favorable) de la energía de binding para el sistema uno, S1 (entorno hidrofílico). Esto se puede deber a la contribución conjunta de varios componentes menores. Por ejemplo, sabemos que el efecto hidrofóbico depende de todo el volumen del sistema y no solo de la identidad química de la cara funcionalizada, además, es posible que los grupos $-\text{NH}_2$ logren cierto grado de interacción electrostática una vez que el agua es expelida.

Otra confirmación de los aspectos que venimos detallando a lo largo del capítulo, proviene de la ubicación de los picos y valles observados en este nuevo estudio. Como se puede notar, éstos coinciden puntualmente con los observados en placas cargadas, esto quiere decir, que el comportamiento del solvente en la interfase está primariamente gobernado por la química colectiva de la superficie y no es sustancialmente alterado por la presencia de cargas.

A continuación describiremos la influencia del agua en los perfiles de energía obtenidos en placas neutras. Aunque no es el objetivo de este estudio establecer un análisis riguroso del proceso de ensamblado de placas neutras, un mejor entendimiento de estos sistemas puede proveernos de herramientas conceptuales para entender la dependencia entre el

agua nanoconfinada y la estructura química de las superficies. Como se puede ver en la **Figura 2.8**, excepto por la placa con parámetros de Lennard-Jones atenuados a la mitad, el efecto del agua es siempre repulsivo. Resultados previos en sistemas grafíticos (que han demostrado un comportamiento más cercano al hidrofílico que al hidrofóbico (43-48) sugieren que este efecto se debe al denso empaquetamiento de carbono de las placas de diamante allí utilizadas. De hecho, los términos de interacción de Van der Waals de las placas podrían ser suficientemente importantes como para competir eficientemente con la interacciones agua-agua. En efecto, esta es la razón por la que decidimos incluir un sistema con interacciones de Lennard-Jones atenuadas (una estrategia que ya había sido utilizada en el grupo en el estudio de las propiedades del grafeno (43)) como sistema de referencia con propiedades netamente hidrofóbicas.

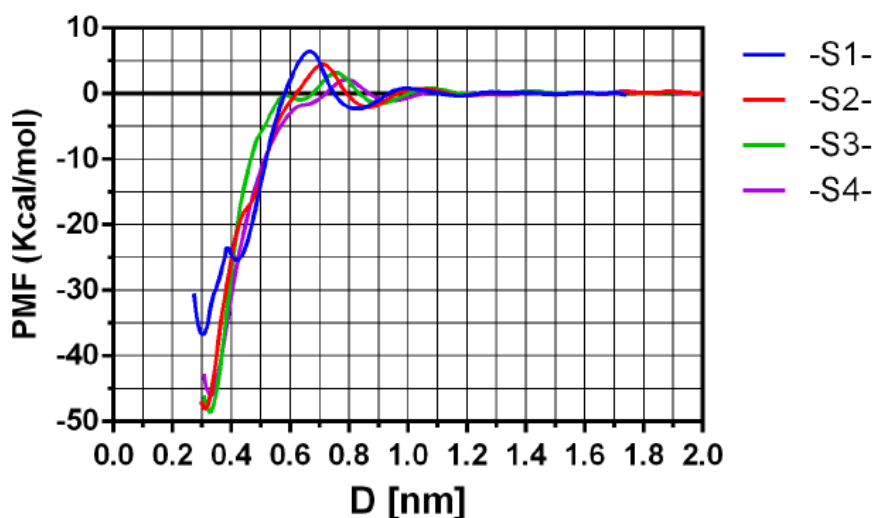


Figura 2.8: Perfil de energía obtenido para el ensamble entre placas neutras en agua. La leyenda utiliza nomenclatura descrita en la figura 2.7.

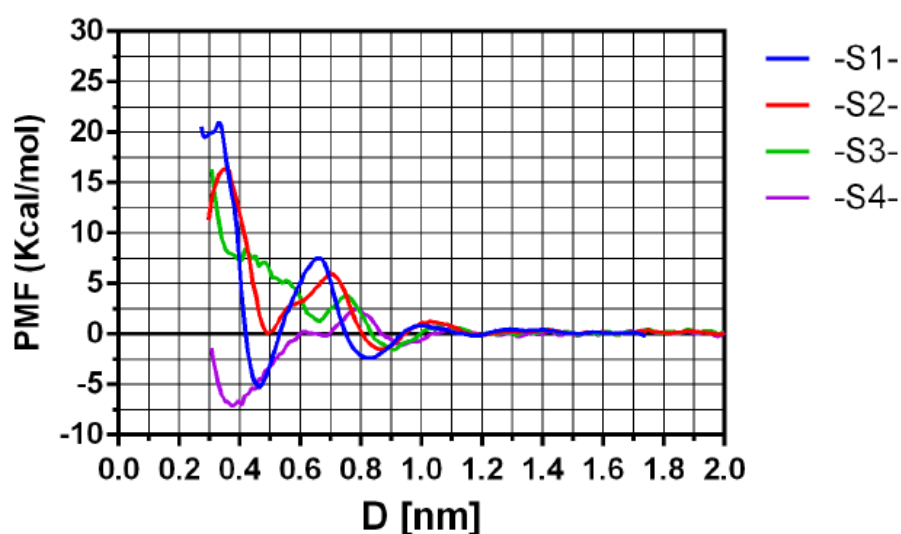


Figura 2.9: PMF de unión entre placas inducido por el agua, obtenido como la diferencia entre los PMFs obtenidos en agua y en vacío.

2.3.3- Comparación directa entre sistemas neutros y cargados

Para poder discriminar adecuadamente la contribución contexto-dependiente de las interacciones electrostáticas, en la **Figura 2.10** se ilustra el resultado de restar los paisajes de energía obtenidos para placas neutras, de sus relativos en placas cargadas. Dado que la única diferencia entre ambos sistemas es que en los sistemas neutros las cargas son reemplazadas por grupos del entorno, el efecto observado será mayormente debido a la energía libre resultante de agregar una carga central en cada sistema.

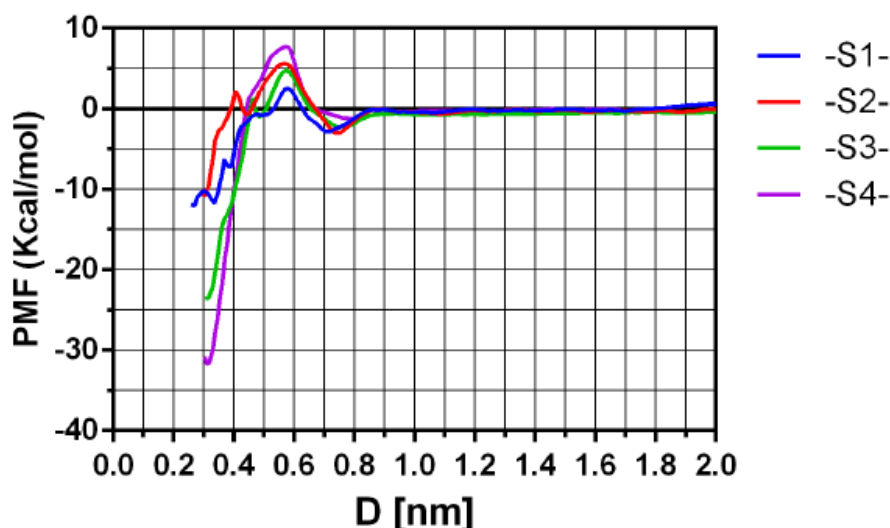


Figura 2.10: PMF resultante de sustraer el PMF de los sistemas neutros a aquellos equivalentes en sistemas cargados (mismos grupos funcionales en el entorno al grupo central).

De este cálculo se puede concluir que existe una fuerte variación de la energía requerida para incluir exactamente la misma carga, dependiendo del entorno químico en la que se la coloca. De hecho, los dos extremos en comportamiento presentan una diferencia de aproximadamente 20 kcal/mol.

2.3.4- Estudio de placas con cargas en distinta localización

Para inspeccionar con mayor profundidad la naturaleza contexto-dependiente de las interacciones electrostáticas, en esta sección consideraremos placas con exactamente la misma carga y el mismo entorno químico, pero desplazando la carga sobre distintas posiciones de la superficie. Para este estudio se prepararon tres sistemas con placas terminadas en metilos ($-\text{CH}_3$) ubicando la carga en tres posiciones: centro, intermedio y borde. En todos los casos, la placa opuesta es idéntica pero de carga contraria, de manera de que las posiciones se correspondan. Para resumir, estamos estudiando tres sistemas hidrofóbicos, químicamente idénticos, cuya única diferencia radica en la disposición espacial de los grupos superficiales; así, cualquier diferencia de comportamiento puede ser solo atribuida, justamente, al efecto no aditivo entre la carga y el entorno.

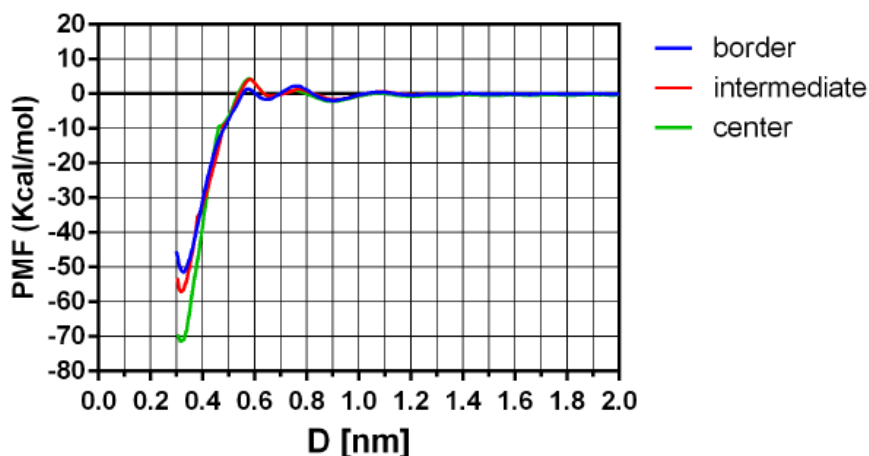


Figura 2.11: PMF para placas de idéntica carga y entorno (-CH₃) en agua. En azul: carga posicionada en el borde de la placa. Verde: carga en el centro de la placa. Rojo: posición intermedia a las anteriores.

Se comprueba en la **Figura 2.11** que el valor del mínimo obtenido para la placa con cargas centrales es mucho más pronunciado que para aquel con la carga en el borde (con un comportamiento intermedio pero más cercano al observado para el sistema con carga central para el sistema "intermedio"). Es evidente que, en el proceso de ensamblado, aquellas cargas más protegidas del ataque del agua (aquellas rodeadas de grupos hidrofóbicos) tienen la capacidad de interactuar más intensamente. Mientras que en las cargas en el borde de la interfase, más expuestas al solvente, este requisito no es completamente satisfecho. Es sobresaliente el hecho de que en superficies biológicamente activas, los sitios más reactivos se presentan justamente arreglados de modo que las interacciones fundamentales, centradas en la superficie, quedan resguardadas del solvente (1,3).

2.3.5- Análisis sobre placas aisladas

Para concluir el estudio de las propiedades del solvente en contacto con las superficies implementadas en este capítulo, se realizaron estudios en placas en solitario; es decir, para cada placa por separado.

El primer resultado que se mostrará corresponde al Potencial de Fuerza Media de moléculas de agua a medida que se acercan a la carga central. Esta estimación se realizó a partir de la función de distribución radial ($g(r)$) de carga-agua (tomando semicírculos de muestreo de radio crecientes centrados en las cargas). Una vez obtenida la $g(r)$, el PMF se calcula como: $PMF(r) = -k_B T \ln g(r) + C$. Siendo k_B la constante de Boltzmann y " r " la distancia a la carga.

Del paisaje de energía obtenido y representado en la **Figura 2.12** podemos inferir que, si bien no existe una diferencia en el cambio de energía libre resultante de "traer" una molécula de agua desde el bulk hasta las proximidades de la carga, la energía requerida para sobrepasar la barrera de activación es significativamente mayor a medida que la placa se torna más hidrofóbica (aproximadamente 1 kcal/mol, que es en efecto, la misma magnitud que la profundidad del pozo de potencial). Este hecho nos está indicando el costo energético de desplazar las moléculas de agua rodeando la carga. Esto es particularmente relevante si se piensa que la "facilidad" de remoción de esas moléculas es susceptible de ser extrapolada a la situación en la que, en lugar de otra molécula de agua, un ligando se aproxima a la carga.

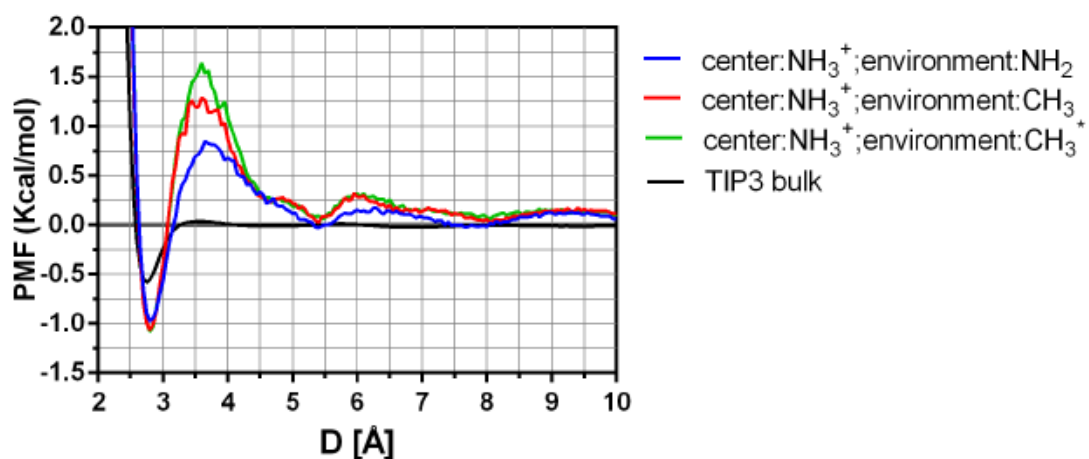


Figura 2.12: perfil de energía de unión de agua al centro de placas aisladas.

2.3.6- Teoría de solvatación inhomogénea (GIST)

Para el estudio de GIST, se emplearon los mismos tres sistemas utilizados en el cálculo del PMF del agua (placas terminadas en -NH_2 , -CH_3 y -CH_3^+ con L-J atenuado).

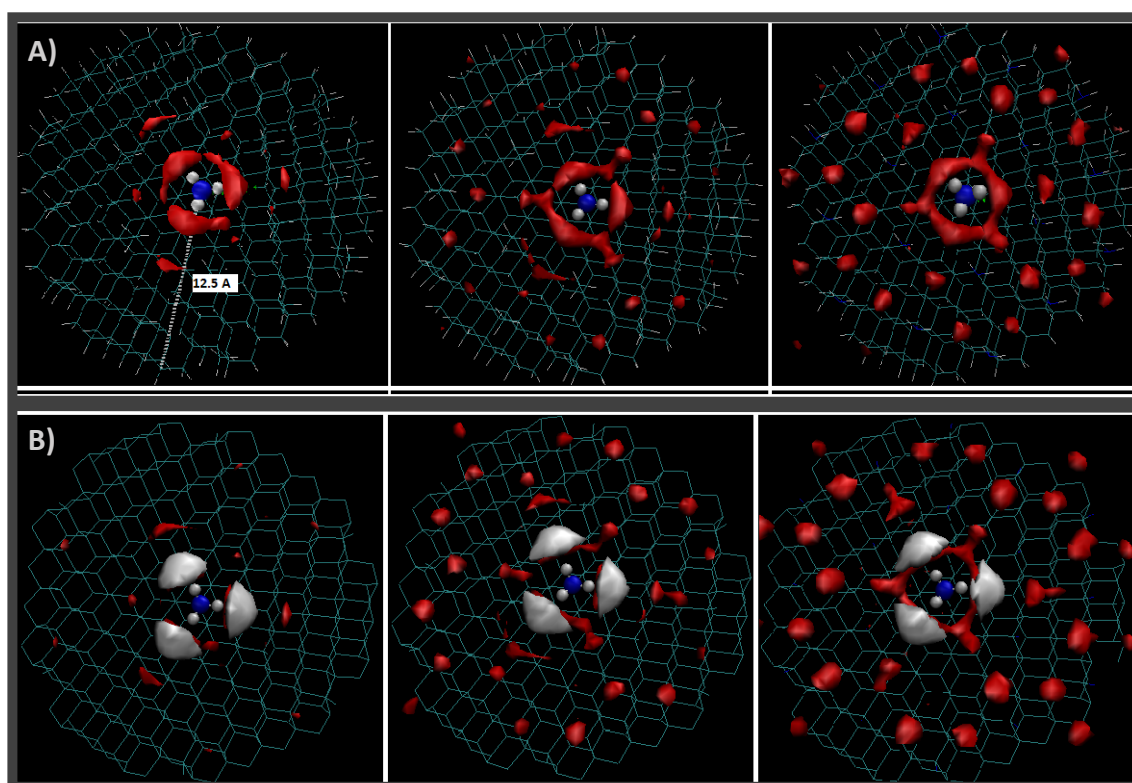


Figura 2.13: (A) Estudio GIST para sistemas: hidrofílico (izquierda), hidrofóbico (centro) e hidrofóbico con interacciones de L-J atenuadas a la mitad (derecha). Los volúmenes en rojo representan los sitios en los que la densidad de oxígeno es cuatro veces mayor que en el agua bulk y los volúmenes en color blanco indican los sitios en los que la densidad de hidrógeno es cuatro veces la del bulk. (B) Estudio GIST para moléculas de agua con al menos una energía de interacción de al menos 0.1 kcal/mol.

En la **Figura 2.13 A** se puede ver que el sistema más fuertemente hidrofóbico (L-J modificado) posee una mayor propensión a la deshidratación, incluso en las regiones próximas a la carga, mientras que el sistema terminado en $-NH_2$ es el que presenta agua más fuertemente unida (sitios con densidad cuatro veces mayor que la del bulk). Es interesante mencionar que las moléculas de agua en contacto directo con la carga parecen ser las únicas con una clara tendencia a orientarse preferencialmente. La **Figura 2.13 B**, a su vez, muestra las regiones donde el solvente interactúa con energías significativamente superiores a la media (energías de al menos 0.1 kcal/mol). Este gráfico muestra, como era de esperar, una interacción exacerbada del solvente para las placas hidrofílicas comparado con las hidrofóbicas. En particular, podemos distinguir claramente un anillo bien definido de agua fuertemente unida a la carga. La superficie más hidrofóbica, a su vez, muestra un patrón de solvatación más débil, incluso alrededor de la carga (el anillo no es completamente visible). Este factor es un fuerte indicador de la facilidad de remoción del agua en las proximidades del sitio de interacción. Por supuesto, dado que estamos trabajando sobre superficies aisladas, el efecto de confinamiento no es completo, y por lo tanto, el agua tiene la capacidad de hidratar cualquiera de los sistemas. En este caso, estamos tomando en cuenta apenas una leve diferencia en la facilidad de deshidratación de las distintas superficies, pero siendo aún relevante debido a que esta tendencia se ve exacerbada al agregar el efecto del confinamiento (como quedó claro en los perfiles del PMF).

2.4- Otras consideraciones:

En este punto y antes de pasar a estudiar la dependencia contextual de interacciones no covalentes (y específicamente aquellas de índole electrostática como lo son los puentes de hidrógeno) en sistemas biológicos reales, resulta de utilidad revisar/rever otros resultados interesantes que nos permitan *acercarnos* a una comprensión más acabada de la hidrofobicidad en la nanoescala; y consecuentemente la modulación de interacciones no covalentes en sistemas donde su complejidad inherente nos exige mayores consideraciones.

Ordenando los resultados presentados en la sección anterior de este capítulo, podemos destacar que hemos mostrado evidencias de que el incremento en las propiedades hidrofóbicas de una superficie exacerban, de manera no aditiva, las interacciones de carga en un ambiente confinado. Hemos demostrado además, que este efecto se debe exclusivamente a un comportamiento diferencial del solvente en dichas superficies. Más aún, de la diferencia obtenida de sustraer los PMF para placas neutras de sus análogas cargadas, aprendimos que se puede modular una misma interacción para dar diferencias energéticas de como mínimo un 20%.

Por otra parte, previamente en nuestro grupo de trabajo, se estudió el impacto de la geometría en las propiedades del agua de hidratación, o visto desde la otra cara de la moneda, el impacto de la geometría de una superficie en su hidrofobicidad (43-48). Así como también la dependencia con la identidad química de dichas superficies. Para esto se realizaron simulaciones por dinámica molecular de placas gráficas y de monocapas autoensambladas de alcanos (SAMs). Estos estudios fueron desarrollados detalladamente en la Tesis doctoral de Sebastián Accordino.

Tal como se mencionó previamente en la introducción del presente capítulo, las fluctuaciones de densidad representan una buena medida de hidrofobicidad local, dado que superficies tipo hidrofóbicas presentan grandes fluctuaciones de densidad

comparadas con superficies con propiedades hidrofílicas (en la **inciso 2.5** de este capítulo se realiza una descripción detallada al respecto). La **Figura 2.14** muestra las fluctuaciones de densidad de agua normalizadas, $\sigma^2 / \langle N \rangle$, en esferas de observación para cavidades de diferentes tamaños talladas en las SAMs. Podemos ver que el grado de hidrofobicidad depende fuertemente de la curvatura en las SAMs. Las cavidades son más hidrofóbicas que la monocapa perfecta, es decir, sin cavidad, aunque el rol de la geometría se vuelve más conspicuo a medida que el tamaño de la cavidad (el ancho de la cavidad, L) se aproxima el régimen subnanométrico. Las cavidades subnanométricas no se llenan de agua debido a la reticencia de las moléculas de agua a romper su coordinación de puente de hidrógeno para penetrar en la cavidad. Por lo tanto la hidrofobicidad es claramente dependiente de la curvatura para superficies cóncavas en las SAMs. Este resultado es interesante ponerlo expresamente de manifiesto en este punto, por su relevancia por ejemplo, en el contexto del binding de proteínas, dado que se espera que los sitios de binding (muchas veces constituidas por "bolsillos") contengan moléculas de agua fácilmente removibles, las cuales deberían ser desplazadas por el ligando durante la asociación (5,9, 39).

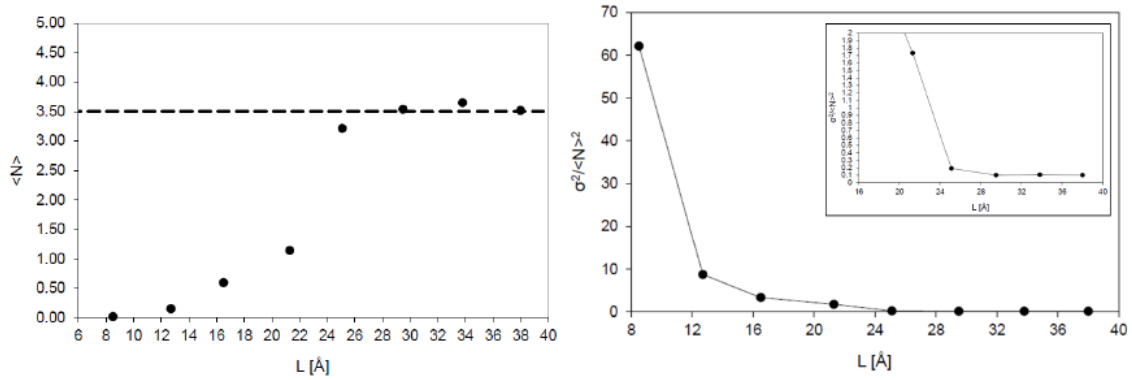


Figura 2.14: a) Valor medio, $\langle N \rangle$, del número de moléculas de agua dentro del volumen de observación para las cavidades en función del ancho, L , de las mismas. La línea negra segmentada representa el valor medio para una monocapa perfecta. b) Fluctuaciones de densidad de agua normalizadas, $\sigma^2 / \langle N \rangle$, en función del ancho, L , de la cavidad. En el inset se puede observar que los valores de $\sigma^2 / \langle N \rangle$ tienden a un valor constante (el valor para la monocapa "perfecta") a medida que L aumenta.

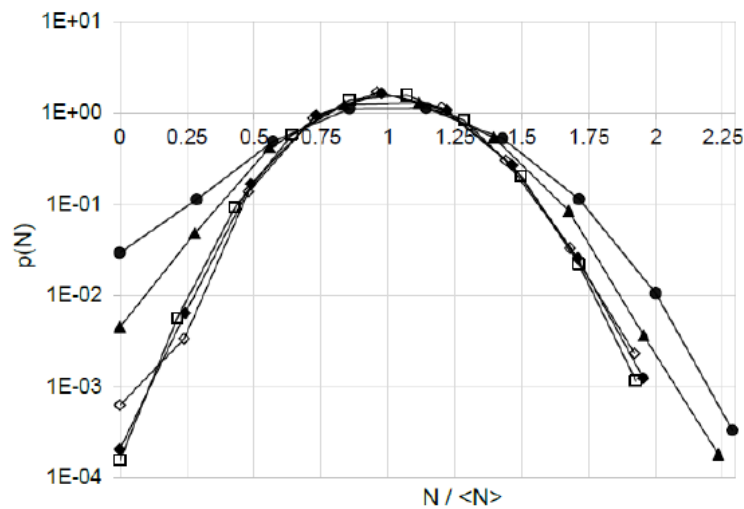


Figura 2.15: Distribuciones de probabilidad al observar N moléculas de agua, $p(N)$, dentro de un pequeño volumen de observación esférico de radio $r = 3; 3$ Å tangente a las diferentes superficies estudiadas. Círculos negros: SAM con terminación en grupos $-CH_3$. Cuadrados: SAM con terminación en grupos $-CH_2OH$. Rombos negros: Grafeno con los parámetros de Lennard-Jones $\sigma_{CO} = 3; 275$ Å y

$\epsilon_{CO} = 0,114$ kcal/mol. Rombos vacíos: Grafeno con los parámetros de Lennard-Jones $\sigma_{CO} = 3,275$ Å y $\epsilon_{CO} = 0,114$ kcal/mol y modelo de agua SPC/E. Triángulos: Grafeno con los parámetros de Lennard-Jones $\sigma_{CO} = 3,41$ Å y $\epsilon_{CO} = 0,065$ kcal/mol

La **Figura 2.15** muestra distribuciones de probabilidad $p(N)$, resultantes de observar el número de moléculas de agua dentro de un pequeño volumen de observación de radio 3.3 Å (similar a una molécula de metano), tangente a las superficies de diferentes naturaleza que fueron estudiadas. De este modo, cuanto más anchas sean las distribuciones mayores serán las fluctuaciones de densidad. Podemos ver que las fluctuaciones de densidad de agua en el grafeno, con los parámetros de Lennard-Jones no modificados, son casi idénticas a aquellas para la SAM hidrofílica (la SAM funcionalizada con grupos -OH en la superficie); y muy diferentes de aquellas para la SAM hidrofóbica (la SAM con grupos metilo, -CH₃, en la superficie). Además, se puede observar que el término de atracción agua-carbono es relevante en los sistemas gráficos, ya que al atenuar artificialmente dichas interacciones, las fluctuaciones de densidad de agua aumentan en la superficie del grafeno, invirtiendo su comportamiento hacia uno típico hidrofóbico. Esta hidrofilidad del grafeno debida a la alta densidad de átomos de que siente cada molécula de agua, se ha verificado recientemente experimentalmente, pues el ángulo de contacto envejece desde un valor típicamente hidrofílico hasta uno hidrofóbico a medida que el sistema se contamina al aire (las medidas anteriores realizadas sin las precauciones apropiadas, habían sufrido este efecto) (53).

En función de los resultados presentados previamente, y con el objetivo de alcanzar una representación más fidedigna de la complejidad característica de sistemas biológicos reales, el próximo paso sería el estudio de la modulación de interacciones no covalentes (de naturaleza electrostática) considerando simultáneamente la química del entorno y la curvatura del mismo (vimos previamente que las propiedades del agua de hidratación varían según el grado de concavidad de una superficie, por lo tanto es de esperar que interacciones de índole electrostática sean moduladas tanto por la química del entorno, como ya lo vimos, como por la curvatura). Esto excede al trabajo realizado por el grupo de investigación en el cual fue concebida esta tesis al momento de la escritura de la misma. En relación a lo anterior, vale la pena mencionar algunos resultados parcialmente vinculados (49) dónde estudiaron el proceso de formación de puentes de hidrógeno intermoleculares, en cavidades de diferentes tamaños generadas artificialmente, colocando un centro aceptor de puentes de hidrógeno (acetonitrilo) rodeado de grupos hidrofóbicos (metanos). En la **Figura 2.16** se observan perfiles de energía libre del proceso de formación del puente de hidrógeno en consideración, esto es entre amonio y acetonitrilo (este último perteneciente a la cavidad); para dos modelos de sitios de binding con diferentes valores de SASA (superficie accesible al solvente, A_0 = obtenido con una prueba de 1.4 Å de radio). Dichos perfiles se obtuvieron mediante corridas de 'Steered Molecular Dynamics' y por aplicación de la igualdad de Jarzynski (50).

De dichos perfiles podemos observar que en sitios pequeños, dónde el donador (acetonitrilo) se encuentra 'enterrado' en un entorno hidrofóbico, hay una tendencia a disminuir los valores de energía libre para el estado formado del puente de hidrógeno en consideración, con respecto a la situación en la cual el aceptor se encuentra en una superficie plana y consecuentemente su exposición al solvente es mucho mayor. De los perfiles de energía libre antes mencionados, también se puede destacar la presencia de un estado de transición de mayor energía cuando el ligando se mueve desde la segunda esfera de solvatación hacia la formación del contacto directo. Finalmente, si bien el enfoque del trabajo antes mencionado

es diferente, y no se pone *especial* atención en cómo podrían estar las propiedades del solvente (agua) involucradas en la obtención de los diferentes perfiles de energía libre para una y otra situación, sí nos dan un indicio de cómo interacciones electrostáticas pueden verse moduladas por la curvatura de la superficie en consideración (tal como se suponía, por los resultados expuestos con anterioridad dónde se mostró como la curvatura de una superficie podía modificar las propiedades del agua de hidratación, o dicho de otro modo, la hidrofobicidad de la misma).

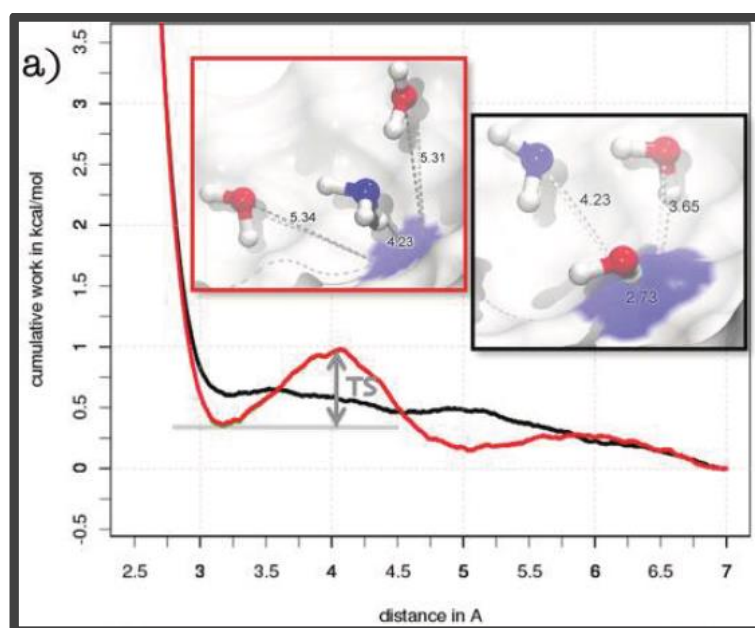


Figura 2.16: Perfil de energía libre de asociación entre un amonio (donor de enlace de Hidrógeno), y un sitio de binding conteniendo un único aceptor de puentes de hidrógeno, con grados de accesibilidad de solvente variables. Línea roja: bajos niveles de área superficial accesible al solvente, SASA ($\text{\AA}^2$: 3.8 $\text{\AA}^2$), en este caso un estado de transición aparece entre el estado enlazado y no enlazado; dicho estado no se observa al estudiar sitios de mayores dimensiones ($\text{\AA}^2$: 13.7 $\text{\AA}^2$). La imagen fue tomada del trabajo titulado '*Shielded Hydrogen Bonds as Structural Determinants of Binding Kinetics: Application in Drug Design*'.

2.5- Estudios de la dinámica de BHBs en complejos Proteína- Proteína: determinación de CBHBs y su relevancia en procesos de Binding.

La especificidad de función de una proteína radica en primera instancia en su secuencia lineal de aminoácidos, y en última instancia en la estructura tridimensional que los mismos adopten. Dicho de otro modo, la funcionalidad de una proteína es altamente dependiente de su estructura. Tal como se mencionó previamente, las proteínas poseen todo un abanico de estructuras localmente estables dentro del paisaje de energía conformacional (**Figura 2.17**). Por tal motivo, la mera consideración de la presencia o ausencia de puentes de hidrógeno en estructuras experimentales puede estar velando información relevante de la dinámica de la proteína. Tal como hemos indicado en la introducción de este capítulo y como veremos con más detalle al avanzar en el mismo, al analizar explícitamente la propensión dinámica de puentes de hidrógeno del backbone (BHBs) en simulaciones de dinámica molecular de proteínas, descubrimos la existencia de ciertos BHBs

presentes en el PDB pero cuya persistencia en la dinámica es muy baja, o bien, la situación opuesta, es decir BHBs completamente ausentes en el PDB pero con una elevada persistencia en la dinámica. Llamamos a estos BHBs como 'Camaleónicos' justamente por su capacidad de cambiar de un estado al opuesto según se observe el PDB o la dinámica de la proteína. Veremos que dichos CBHBs están ubicados precisamente en regiones donde la accesibilidad al solvente o hidratación local difiere de las condiciones requeridas para BHBs estables o correctamente "protegidos" por las cadenas laterales. Adicionalmente, como también veremos más adelante, encontramos que dichos CBHBs no se encuentran homogéneamente distribuidos en la proteína, sino que su presencia se acentúa en sitios de unión, y además que su 'estabilidad' puede ser restituida al formarse el complejo con el ligando natural o eventualmente algunos ligandos artificiales.

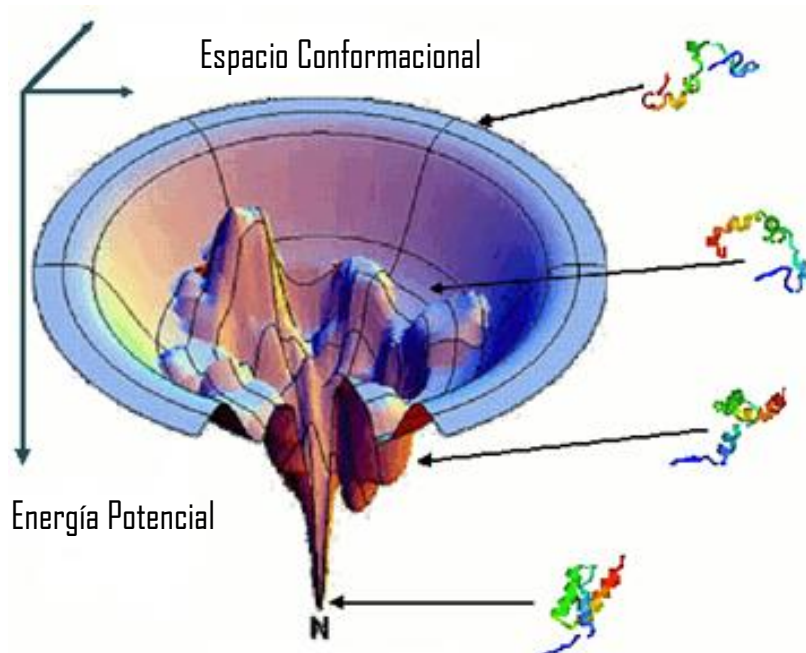


Figura 2.17: Representación esquemática del paisaje de energía potencial para el espacio conformacional en proteínas.

2.5.1- Probabilidad de Vacancia, $P(N=0)$: Una medida de hidrofobicidad local.

En una serie de estudios recientes del grupo de investigación en dónde se desarrolló esta tesis, se caracterizaron una serie de propiedades del agua de hidratación sobre un total de 62 proteínas. En principio se estudió la movilidad del agua sobre la superficie de la proteína (agua hallada a menos de 4Å) en comparación con el agua masiva (más de 14 Å desde la superficie proteica); en la **Figura 2.18** se representan los resultados de este estudio, allí se puede observar una movilidad reducida para el agua de hidratación, al menos a tiempos cortos, evidenciado por valores más pequeños de MSD (desplazamiento cuadrático medio, o 'MSD' por sus singlas en inglés), indicando un régimen subdifusivo a tiempos cortos, tendiendo finalmente al comportamiento del agua 'bulk' a tiempos mayores.

Posteriormente, y centrando el interés en los puentes de hidrógeno del backbone, por su relevancia en la determinación de la estructura tridimensional en proteínas, se estudió el comportamiento del agua (movilidad) en los dominios de desolvatación de todos los BHBs de dichas proteínas (definidos dichos dominios como la intersección de dos esferas de 6 Å centradas sobre los carbonos alfa de los aminoácidos protagonistas del BHB en consideración). De este modo, por estar estas moléculas en regiones muy cercanas al Backbone se esperaría que presenten valores de movilidad reducidos. En contraposición con esta suposición, se encontró que las moléculas de agua en el entorno inmediato de BHBs localizados en sitios de binding eran más rápidas ($\langle r^2(t) \rangle$: 5 Å²), con respecto a aquellas localizadas sobre BHBs fuera de los sitios de unión ($\langle r^2(t) \rangle$: 3.5 Å²) (5).

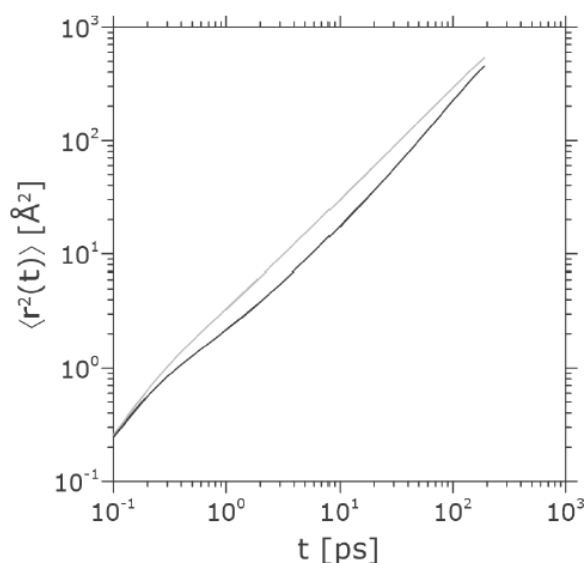


Figura 2.18: Desplazamiento cuadrático medio (MSD), para moléculas cercanas a las superficies proteicas (moléculas de agua a menos de 4 Å, curva negra); moléculas de agua representativas del solvente masivo (a distancia mayores de 14 Å desde la superficie proteica).

Por los resultados presentados previamente, que nos indican que el agua de hidratación tiene una movilidad exacerbada en sitios de binding, y por nuestros intereses ya manifestados de intentar dilucidar ciertos aspectos de la modulación de interacciones no covalentes en ambientes de nanoconfinamiento, nos dispusimos a estudiar de manera más detallada las propiedades de hidratación de una serie de interfaces de complejos proteína-proteína de comprobada relevancia terapéutica (complejos detallados en la sección de métodos 2.2). Adicionalmente, es importante destacar que el hecho de estudiar estos tipos de complejos puntualmente no representa necesariamente una pérdida de generalidad ya que, como se mencionó previamente, los 'hot spot' de los sitios de binding en proteínas representan en el común de los casos apenas unos pocos aminoácidos del total (1, 26).

Luego, se han propuesto una serie de diferentes medidas de hidrofobicidad (7, 12,51) (con base estructural, dinámica y termodinámica); una de dichas medidas consiste en la cuantificación de las fluctuaciones de densidad de agua (28). Se ha demostrado que medidas directas de densidad de agua superficial no representan una buena medida de hidrofobicidad. Esto puede ser de esperar por el hecho de que el agua 'aborrece' el vacío, y de este modo, existe una tendencia a hidratar tanto

superficies polares como también apolares; y por tal motivo perfiles de densidad normales al plano de la superficie tienen características similares. Sin embargo, y en contraposición de las superficies hidrofílicas donde el agua puede estar sujeta a significantes interacciones atractivas; interacciones muy débiles serán características de las superficies de tipo hidrofóbicas: así en este último caso el agua tendrá tiempos de residencias bajos y será fácilmente removible.

De este modo, el agua de hidratación de superficies hidrofóbicas se caracteriza por presentar una dinámica exacerbada (12), mayor compresibilidad (7, 12, 51) y mayores fluctuaciones de densidad (12). Luego, y tal como se comentó en el inciso 2.4 de este capítulo, las fluctuaciones de densidad de diferentes monocapas autoensambladas de alcanos demostraron que superficies tipo hidrofóbicas efectivamente presentan fluctuaciones de densidad mucho mayores que las monocapas funcionalizadas con grupos hidrofílicos; de este modo se evidencia que las fluctuaciones de densidad representan una buena medida de hidrofobicidad local. Fluctuaciones de densidad de agua normalizadas, $\sigma^2 / \langle N \rangle$, en pequeños volúmenes de observación (donde N es el número de moléculas dentro de dicho volumen) están relacionadas con la energía libre de formación de una cavidad de dicho radio (12). De hecho, grandes fluctuaciones de densidad implican una elevada **probabilidad de vacancia** de moléculas de agua dentro de la esfera de observación ($P(N=0)$). Dicho parámetro se calcula sumando el número de configuraciones donde el volumen de observación se encuentra vacío dividido el número total de configuraciones contempladas. Para un volumen de observación pequeño, $m = k_B T \ln[P(N=0)]$, donde m es la energía libre de formación de la cavidad, k_B es la constante de Boltzmann, y T es la temperatura absoluta. Luego, un elevado valor para la probabilidad de vacancia en un lugar determinado indica un trabajo favorable de creación de la cavidad en dicho sitio (12), y así una elevada hidrofobicidad.

En este trabajo, primero calculamos la probabilidad de vacancia, $P(N=0)$, en volúmenes de observación centrados en todos los átomos pesados de la proteína MDM2 en su forma apo para largas corridas de Dinámica Molecular (50 ns), ver **Figura 2.19** (en el capítulo introductorio de esta tesis se especificó la gran relevancia terapéutica de la proteína MDM2, y el consecuente interés que despierta su estudio). Valores de este parámetro próximos a la unidad implican que el átomo en consideración está en un entorno completamente anhidro o desolvatado (ausencia de la primera capa de hidratación). De este modo, si nos centramos en átomos pesados superficiales de la proteína MDM2 encontramos que la mayoría de la superficie está bien hidratada (es hidrofílica), mientras que una región específica, ubicada en el sitio de binding de dicha proteína con su diana natural p53, presenta valores de probabilidad de vacancia sustancialmente mayores. Como ya se mencionó en la parte introductoria del presente capítulo, este resultado es compatible con una serie de estudios realizados sobre otros sistemas proteicos por el grupo de Shekhar Garde (12), reforzando la idea de que se espera que los diferentes ligandos remuevan agua de hidratación lábil del sitio de unión al formar un complejo determinado.

Sin embargo, tal como se manifestó en reiteradas ocasiones, nosotros en esta tesis estamos específicamente interesados en estudiar las propiedades y la relevancia de los BHBs como protagonistas o impulsores de los fenómenos de binding. Por tal motivo, a continuación calculamos $P(N=0)$ sobre los átomos protagonistas de dichas interacciones, esto es el átomo de N del grupo amida y el átomo de O del grupo carbonilo, sobre cada uno de los BHBs del PDB.

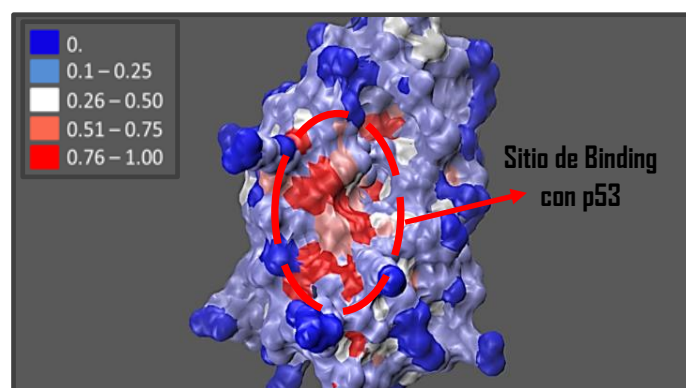


Figura 2.19: Probabilidad de vacancia calculada en esferas de 4 Å de radio, centradas en todos los átomos pesados de la proteína MDM2 en su forma APO.

2.5.2- Probabilidad de vacancia de agua en el entorno de los puentes de hidrógeno del Backbone:

En la **Figura 2.20** se muestran los resultados obtenidos para los cálculos de la probabilidad de vacancia de agua en el entorno de los BHBs de la proteína MDM2, dichos cálculos fueron realizados sobre largas corridas de Dinámica Molecular (50 ns en el caso de la proteína apo, y 20 ns para el caso del complejo). Allí podemos observar el comportamiento encontrado para la proteína en su forma APO, del dominio N-terminal de MDM2, MDM2_N, en la **Figura 2.20 B**; y el complejo de MDM2_N con un fragmento del p53, perteneciente al dominio de transactivación (52) en la **Figura 2.20 A**. La preponderancia de colores rojos en el complejo (probabilidad de vacancia cercana a la unidad) nos habla de una clara propensión a la deshidratación de los BHBs de MDM2, cuando dicha proteína se encuentra formando el complejo con p53. Este resultado implica que la antes mencionada predominancia de regiones hidrofílicas (probabilidad de vacancia cercanas a cero) en la superficie de la proteína APO fuera del sitio de binding (**Figura 2.19**) está dada por cadenas laterales bien hidratadas, las cuales protegen a los BHBs promoviendo su secado. Sin embargo, cuando observamos los resultados obtenidos para la proteína MDM2 en su forma APO (B), podemos observar la existencia de un significativo número de BHBs localizados principalmente en el sitio de binding o sus inmediaciones, inmersos en entornos **NO anhidros** (zonas azules). De este modo, es evidente que las propiedades de hidratación en el entorno local de los BHBs a lo largo de la proteína varían significativamente, con predominancia de BHBs enterrados, pero también con ciertos BHBs que están al menos parcialmente expuestos al agua. De este modo, es de esperar que las regiones de binding sean más fluctuantes, y sus BHBs puedan presentar un comportamiento dinámico exacerbado (el agua podría competir por formar puentes de hidrógeno con la amida y el carbonilo de dichos BHBs, produciendo la disrupción, al menos temporal, de los mismos). Por tal motivo, a continuación realizamos una serie de análisis de las propensiones dinámicas de BHBs, en dónde determinamos la fracción de tiempo que cada BHB permanece formado en corridas de Dinámica Molecular; finalmente vinculamos estos resultados con las probabilidades de vacancia previamente determinadas.

2.5.3- Análisis de propensiones dinámicas de puentes de hidrógeno del Backbone:

En la sección anterior vimos que los BHBs, uno de los principales determinantes de la estructura proteica, pueden presentar efectivamente entornos locales de hidratación muy diferentes a lo largo de la proteína. Particularmente, las propiedades

de hidratación dentro de los sitios de binding son muy diferentes respecto de otras regiones donde los BHBs están enterrados, y consecuentemente su hidratación/hidrofobicidad es marcadamente diferente. La intensidad de este tipo de interacciones no covalentes y de índole electrostática se espera que sea modulada por las características de su entorno local tal como se demostró previamente para sistemas modelo. De este modo, la dinámica de los BHBs puede verse significativamente alterada en los sitios de binding debido a estas propiedades diferenciales de hidratación. Con el objetivo de esclarecer esta dependencia, desarrollamos matrices de contacto de BHBs dinámicas (o de tiempo de vida media de cada interacción). A dichas matrices las denominamos como DBHB-CM (por las siglas en inglés, Dynamic BHB- Contact Matrix). Realizamos el análisis para diferentes proteínas, tanto en su forma apo como formando parte de complejos. Dichas matrices fueron realizadas calculando la fracción de tiempo que cada interacción permanece formada a lo largo de una serie de producciones de dinámica molecular. Tal como se indicó en el inciso 2.2 del presente capítulo, para el caso de las proteínas en su forma apo los promedios se realizaron sobre producciones de 50 ns (evaluadas sobre 10000 configuraciones equidistantes) en cuanto a los complejos, los tiempos evaluados fueron algo menores (producciones de 20 ns) debido a la mayor rigidez inherente observada en estos casos (en este sentido, en el próximo capítulo evaluaremos exhaustivamente la convergencia de esta métrica). En la **Figura 2.21** se muestran, a modo de ejemplo, gráficos de RMSD (por sus siglas en inglés, Root Mean Square Deviation, o desviación cuadrática media) calculado para todos los carbonos alfa de los aminoácidos pertenecientes al sitio de binding, para uno de los sistemas proteicos estudiados (MDM2 apo y MDM2-p53).

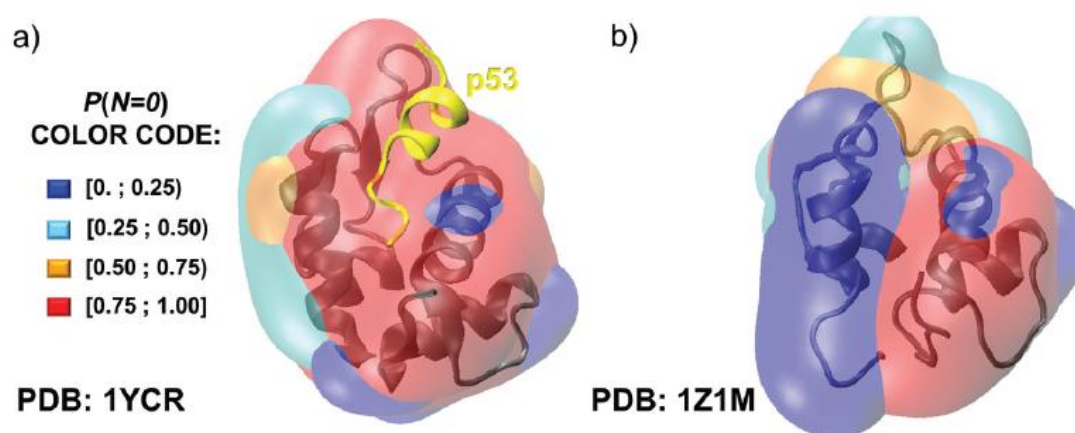


Figura 2.20: A) Probabilidad de vacancia para los BHBs en la proteína MDM2, formando el complejo con p53. B) Probabilidad de vacancia para los BHBs en la proteína MDM2 en su forma apo.

Luego, un determinado BHB se considera formado en una configuración específica, si el par de residuos (i,j) satisface el siguiente criterio geométrico: distancia N-O con $r < 3.5 \text{ \AA}$; corte para el ángulo N-H-O mayor que 140° . Así, el correspondiente elemento de matriz (i,j) es 1. De lo contrario, cuando alguno de los dos criterios no se cumple será 0. Posteriormente, promediamos los resultados obtenidos para cada elemento de matrix (i,j) sobre el total de configuraciones evaluadas.

Finalmente, las matrices DBHB-CM contienen valores en el rango entre 0 y 1, los cuales corresponden a una interacción nunca formada o formada durante toda la dinámica respectivamente. Una aclaración pertinente en este punto es que para mayor claridad al interpretar los resultados, descartamos todos aquellos contactos que NO hayan estado inicialmente presentes en el PDB, y que durante la dinámica se formen menos del 10 % del tiempo total evaluado, esto no altera los resultados obtenidos, mientras que permite una visualización más clara de los mismos.

En este punto estamos en posición de dilucidar la relación entre estabilidad de un determinado BHB (entendida en relación al tiempo que permanece formada la misma, o su propensión) y exposición al solvente. Calculamos entonces el valor medio de probabilidad de vacancia para los BHBs que permanecieron formados durante la dinámica más de 80 % del tiempo (de muy alta propensión o estabilidad), y en contraposición, para aquellos que estuvieron formados menos del 30 % del tiempo total (los de menor persistencia). Restringimos además este análisis únicamente para los BHBs localizados dentro de los sitios de binding de las diferentes proteínas apo estudiadas. En la **Figura 2.22**, donde se reflejan los resultados de este análisis, se puede observar que aquellos BHBs que son muy estables se encuentran en un ambiente completamente desolvatado (Promedio de $P(N=0)$: 0.928; $s= 0.108$, siendo s la desviación estándar); mientras que para los menos persistentes están en promedio mucho más expuestos al solvente (Promedio de $P(N=0)$: 0.399, con grandes valores de desviación estándar, $s: 0.228$). Otro resultado destacado de este estudio fue que la población de los BHBs menos estables disminuye considerablemente cuando observamos los respectivos complejos, ya sea con su diana natural o con pequeñas moléculas disruptivas de los complejos en consideración.

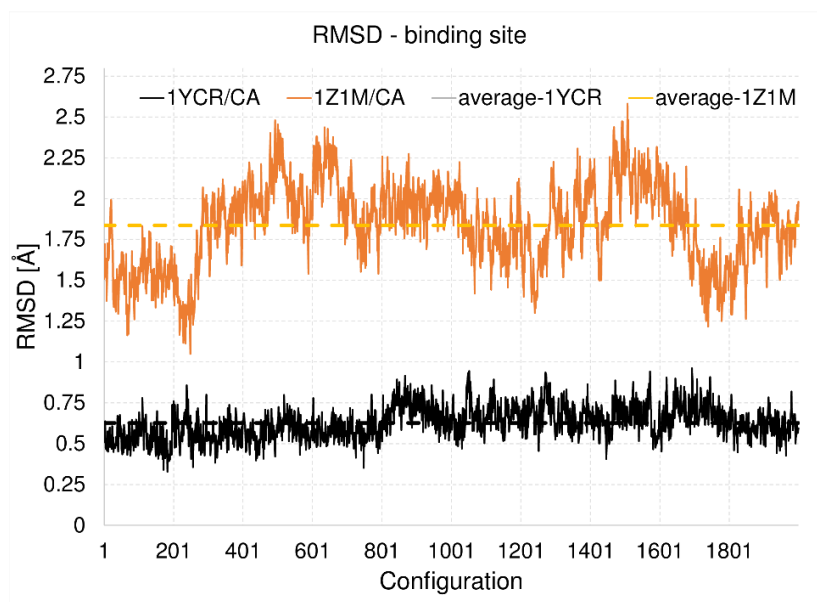


Figura 2.21: RMSD (Å), sobre todos los carbonos alfa de los aminoácidos pertenecientes al sitio de binding. **Negro:** complejo MDM2-p53, **Naranja:** MDM2 en su forma apo. El número de configuraciones no corresponde al total de configuraciones de las dinámicas de producción, sino que este cálculo se realizó sobre configuraciones recortadas del total de manera equidistante.

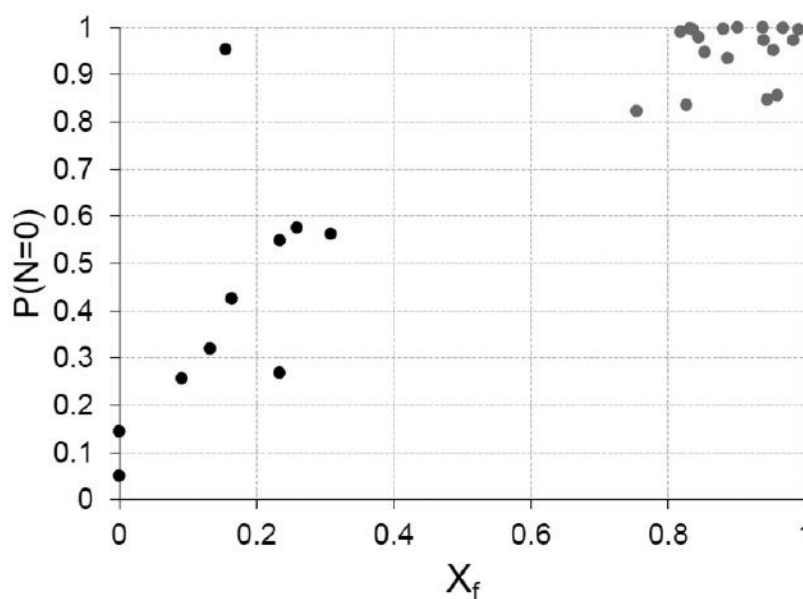


Figura 2.22: Representación de la probabilidad de vacancia de agua, $P(N=0)$, para BHBs formados durante una fracción de tiempo, X_f , mayor a 0.8 (muy estables) y aquellos formados para X_f menor a 0.3 (los BHBs menos persistentes).

En la **Figura 2.23 (a)** mostramos la matriz de contactos dinámica resultante para la proteína MDM2 en su forma apo. En la **Figura 2.23 (b)** mostramos de manera análoga la matriz de contactos de su PDB (obtenido de manera experimental), la cual denominamos PDB-BHB-CM, y finalmente en la **Figura 2.23 (c)**, se muestra la matriz resultante de restar las dos anteriores (PDB-BHB-CM menos DBHB-CM); a esta última matriz la denominamos matriz de distancias (DM), y nos permite visualizar fácilmente que tanto cambia para una determinada proteína su comportamiento entre el PDB y su dinámica en solución. De este modo, los valores de D (distancia) en esta última matriz, oscilan entre 0 y 1, donde valores próximos a cero indican pequeñas diferencias, y como contrapartida, valores cercanos a la unidad indican regiones de grandes fluctuaciones entre la dinámica y el PDB. En la **Figura 2.24 (a)** mostramos la matriz de distancia, DM , para el complejo MDM2-p53. De manera análoga, en la **Figura 2.24 (b)** se presentan los resultados obtenidos para el complejo entre MDM2 y una conocida molécula disruptiva de dicha interacción, Nutlin-2 (concebida con fines terapéuticos). En los gráficos, colores intensos representan valores próximos a la unidad y por lo tanto grandes diferencias, mientras que los colores en la gama de los grises (más pálidos) indican pequeñas diferencias.

Si nos focalizamos en los resultados obtenidos para la proteína en su forma apo, podemos ver que mientras que la mayoría de los BHBs del PDB son estables durante la dinámica, y por lo tanto poseen bajos valores de distancia, D , aun así existe un número significativo de BHBs que presentan elevados valores de D . Estas interacciones puntualmente representan BHBs que o bien están presentes en el PDB pero desaparecen durante la dinámica o bien son interacciones que estuvieron ausentes en el PDB pero que posteriormente estuvieron persistentemente formadas durante la dinámica. Justamente de aquí surge su denominación como puentes de hidrógeno 'Camaleónicos', por su cambio de estado (y entonces de color) entre las matrices.

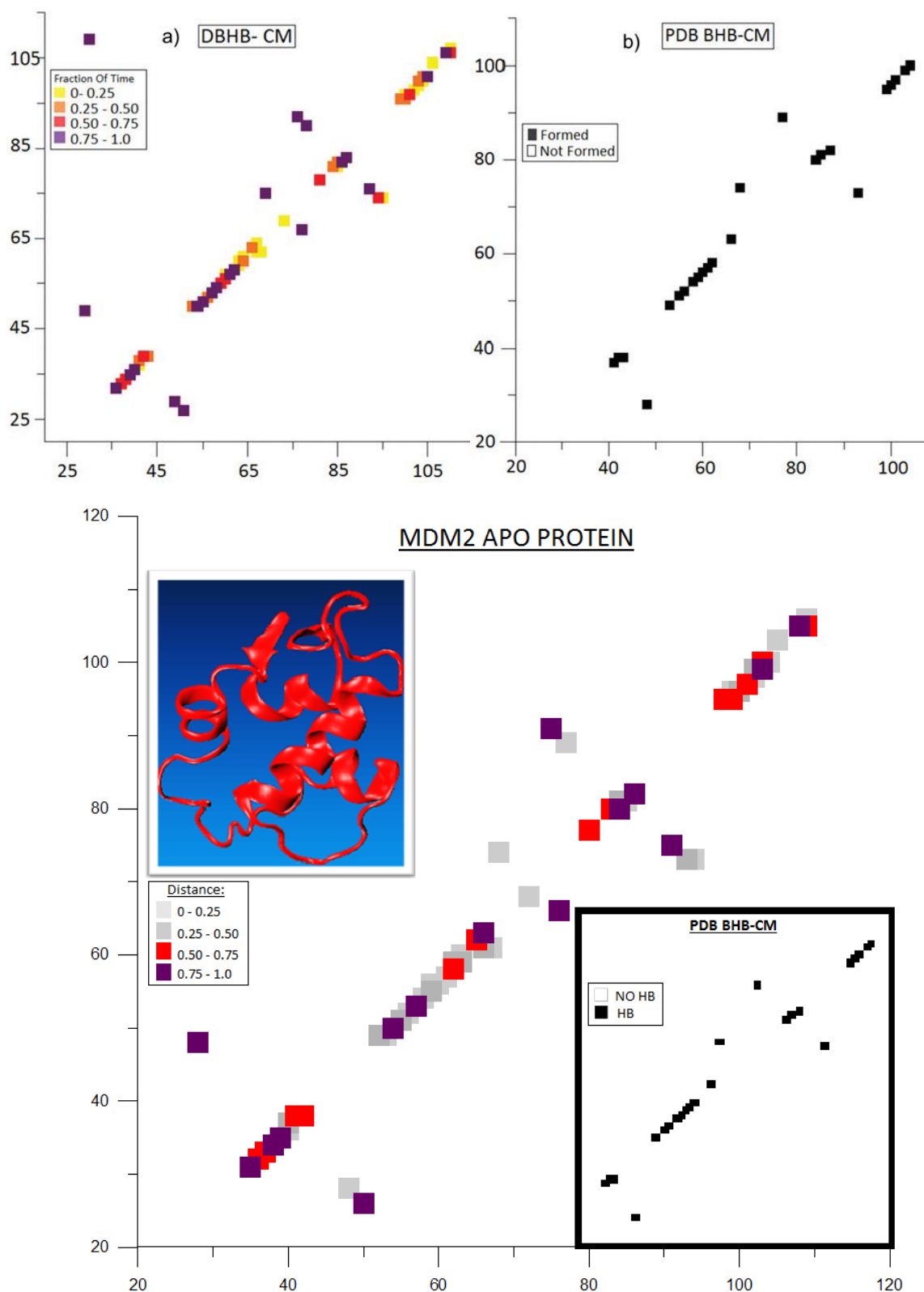


Figura 2.23: A) Matriz de contactos dinámica, DBHB-CM, para la proteína MDM2 en su forma APO. B) Matriz de contactos para el PDB de dicha proteína, PDB BHB-CM. C) Matriz de distancia, DM.

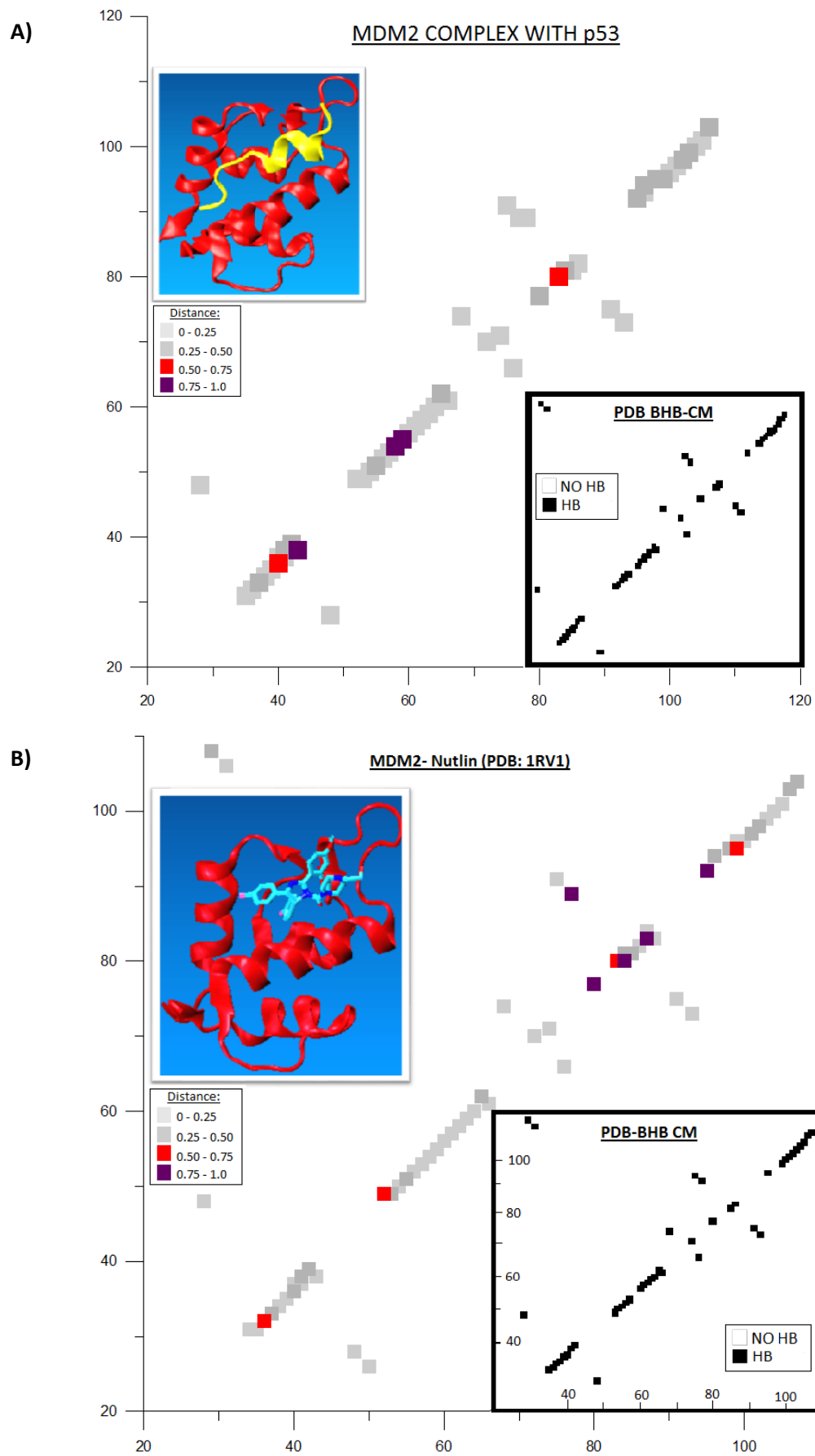


Figura 2.24: A) Matriz de distancia, DM , para el complejo MDM2-p53. B) Matriz de distancias, DM , complejo MDM2-Nutlin2.

En este sentido, el estado dinámico de dicha interacción, es decir su comportamiento en solución, permanece oculto en la estructura obtenida de modo experimental, el PDB (especialmente si el método de obtención fue la cristalografía de rayos X), bajo un estado opuesto. Finalmente, la determinación de estos CBHBs necesita únicamente de la estructura experimental de la proteína apo y un análisis de su comportamiento dinámico, llevado a cabo en este caso mediante simulaciones de dinámica molecular (eventualmente esta información podría encontrarse en datos experimentales recogidos con técnicas como RMN, un problema en este sentido puede ser las restricciones de aplicabilidad propias de esta técnica experimental).

Por otra parte, cuando nos focalizamos en los resultados de estos estudios obtenidos para el complejo, puntualmente en la matriz de distancia, **DM (Figura 2.24 a)**: se muestra la performance para el complejo MDM2-p53, podemos ver que el comportamiento dinámico de la proteína y del PDB (PDB BHB-CM) son muy similares; en este caso la mayoría de los CBHBs pertenecientes al sitio de binding desaparecieron como resultado de la estabilización ganada por la proteína, en este caso, bajo complejación con el p53. Encontramos un resultado similar para el caso del complejo MDM2-nutlin2, dicha molécula disruptiva actúa mimetizando el comportamiento del p53 y representa uno de los primeros inhibidores potentes desarrollados en este contexto. Es interesante notar que ciertos elementos de la estructura secundaria son bastante desordenados en la proteína MDM2 en su forma apo (por ejemplo la región comprendida entre los residuos 101 al 107). La diferencia en este sentido es evidente al formar el complejo, donde dicha proteína alcanza un arreglo perfectamente 'estructurado' (tanto con p53 como con nutlin-2). Justamente estos residuos se encuentran alojados en regiones de la proteína apo donde el agua es muy accesible al entorno local de los BHBs allí localizados (esto lo podemos observar en la **Figura 2.20**). Sin embargo, cuando dicha proteína se encuentra formando parte del complejo (ya sea con p53 como con alguna molécula disruptiva, nutlin-2 por ejemplo), estos BHBs son estabilizados y se ordenan en un arreglo estructural de tipo hélice alfa, precisamente debido a cambios en las propiedades de hidratación de su entorno local, promovidos por la 'protección' adicional que aporta el ligando. Entonces, y como un modo más de contrastar los efectos antes mencionados, realizamos simulaciones partiendo del PDB de la proteína MDM2 apo pero ahora con Nutlin-2 localizada en su sitio de binding; y efectivamente encontramos que la estructura secundaria de esta alfa hélice es significativamente re-estructurada durante dicho experimento computacional (**Figura 2.25**). Es importante mencionar que la plasticidad del sitio de unión de MDM2 a p53 ha sido descrita de manera experimental, como resultado de la observación de los cambios conformacionales de MDM2 que acompañan el proceso de unión de dicha proteína a p53 (52). En este trabajo (52) se mostró que el sitio de binding de la proteína MDM2 bajo complejación con p53 experimenta una expansión, debido a una reorganización de sus dos sub-dominios pseudosimétricamente relacionados; resultando de este modo en un desplazamiento de los elementos de estructura secundaria que comprenden las paredes y piso del sitio de unión a p53. Adicionalmente, y en acuerdo también con nuestros resultados, ha sido demostrado que MDM2 comienza a ser más estable y rígido bajo unión con su diana natural, p53 (52).

Posteriormente, repetimos los análisis de propensión dinámica de BHBs antes mencionados para 3 sistemas más, esto es tanto el estudio sobre las proteínas en su forma apo como formando parte de complejos, con su diana natural y con pequeñas moléculas disruptivas (todos mencionados previamente en la descripción de métodos, **inciso 2.2**); y encontramos

en todos los casos resultados similares (en las **Figuras 2.26, 2.27 y 2.28** se muestran las matrices de distancias para dichos sistemas, comparando en los tres casos los resultados para las formas apo y complejada).

Por último, en la **Figura 2.29** se muestra la distribución de probabilidad para los valores de distancia de matriz, **D** (en valor absoluto), de todos los elementos de las matrices de distancia, *DM*, para los cuatros sistemas proteicos estudiados. Allí se puede observar la distinción realizada entre BHBs pertenecientes a sitios de binding y aquellos denominados como 'resto', que hacen referencia a todos aquellos BHBs que no pertenecen a los sitios de unión. Tal como se indicó detalladamente en los métodos (**inciso 2.2**) utilizamos dos criterios para determinar BHBs pertenecientes a sitios de binding. En la **Figura 2.29** se puede observar que arribamos a resultados similares con ambos criterios. Estas distribuciones revelan un claro dominio de dos poblaciones bien diferenciadas, a pequeños y grandes valores de **D**. El pico a valores de **D** bajos, presente en todas las distribuciones, es obviamente esperable, ya que implica a todos aquellos BHBs que son estables (su comportamiento en solución no dista del PDB); sin embargo, la segunda población localizada a valores de **D** altos, indica la presencia de aquellos BHBs aquí denominamos como Camaleónicos, CBHBs. Probablemente el resultado más interesante de todo este estudio es el claro enriquecimiento de CBHBs que poseen los sitios de binding (esta observación es muy clara para ambos criterios implementados en la determinación del sitio de unión), como lo indica el segundo pico a la derecha del gráfico. Para descartar que este efecto sea simplemente debido a la naturaleza superficial de los BHBs presentes en el sitio de binding, los cuáles se espera que sean más lábiles que aquellos que se encuentran 'enterrados' en el interior de la proteína, presentamos la distribución para los BHBs localizados fuera del sitio de binding pero que se los puede clasificar como 'superficiales' (el criterio adoptado para la determinación de los mismos fue simplemente proximidad a moléculas de agua, luego si la distancia entre dicho BHBs y la primer molécula encontrada es menor a 6 Å, dicho BHB se consideró superficial). Como es de esperar, en comparación a la curva que refleja el comportamiento del 'resto', los BHBs 'superficiales' son un poco más lábiles que los no superficiales o enterrados. Sin embargo, el comportamiento sigue siendo muy diferente de la clara bimodalidad y el consecuente enriquecimiento en CBHBs, observado para los sitios de binding.

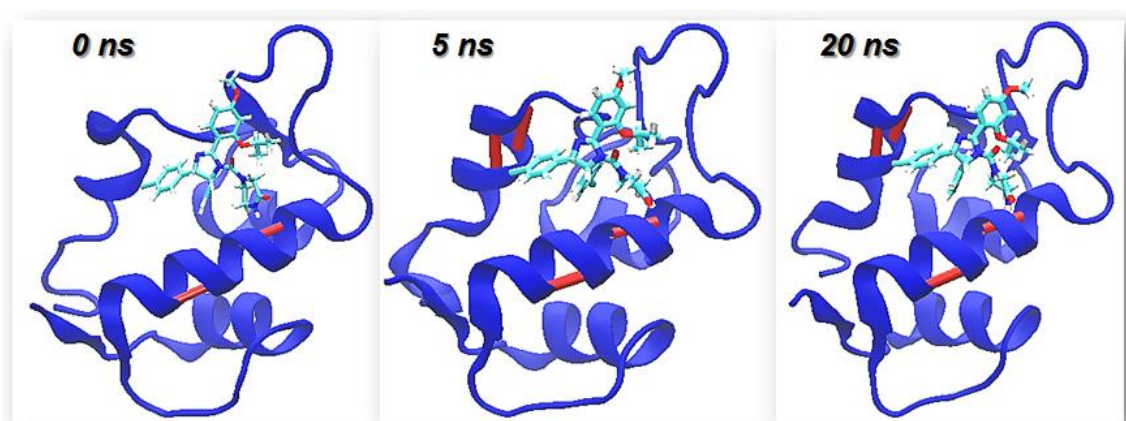


Figura 2.25: Diferentes configuraciones de la simulación del complejo formado entre la proteína MDM2 en su forma apo y Nutlin-2. En bordo se indican cuando los diferentes puentes de hidrógeno que fueron determinados como CBHBs para esta proteína se van formando.

Hasta este punto describimos detalladamente las evidentes diferencias cualitativas entre las proteínas en su estado apo y los diversos complejos (específicamente en cuanto a la existencia de CBHBs y su localización preferencial en sitios de unión). Con el objetivo de cuantificar estas diferencias, y poner de manifiesto expresamente la relevancia de los CBHBs en los procesos de binding, usamos valores de distancia, **D**, mayores que 0.5 (son aquellos pertenecientes al segundo pico en la **Figura 2.29**) como un valor de corte para determinar CBHBs. Así encontramos que para las 4 proteínas estudiadas, más del 80 % de sus CBHBs desaparecen bajo formación del complejo. En la **Figura 2.30** se presentan los resultados para dicho estudio. De estos valores podemos observar que para las proteínas MDM2, BCL y Zip, todos los CBHBs presentes en sus correspondientes formas apo, son removidos bajo formación del complejo con sus dianas naturales; sólo para el caso de la proteína IL-2 la remoción es sólo parcial. Un resultado similar se obtiene cuando comparamos los valores de distancia para cada CBHBs entre las proteínas apo y los correspondientes complejos formados con pequeñas moléculas disruptivas, aunque en estos casos la performance desarrollada por éstas puede ser un poco menos óptima en términos de remoción de los CBHBs.

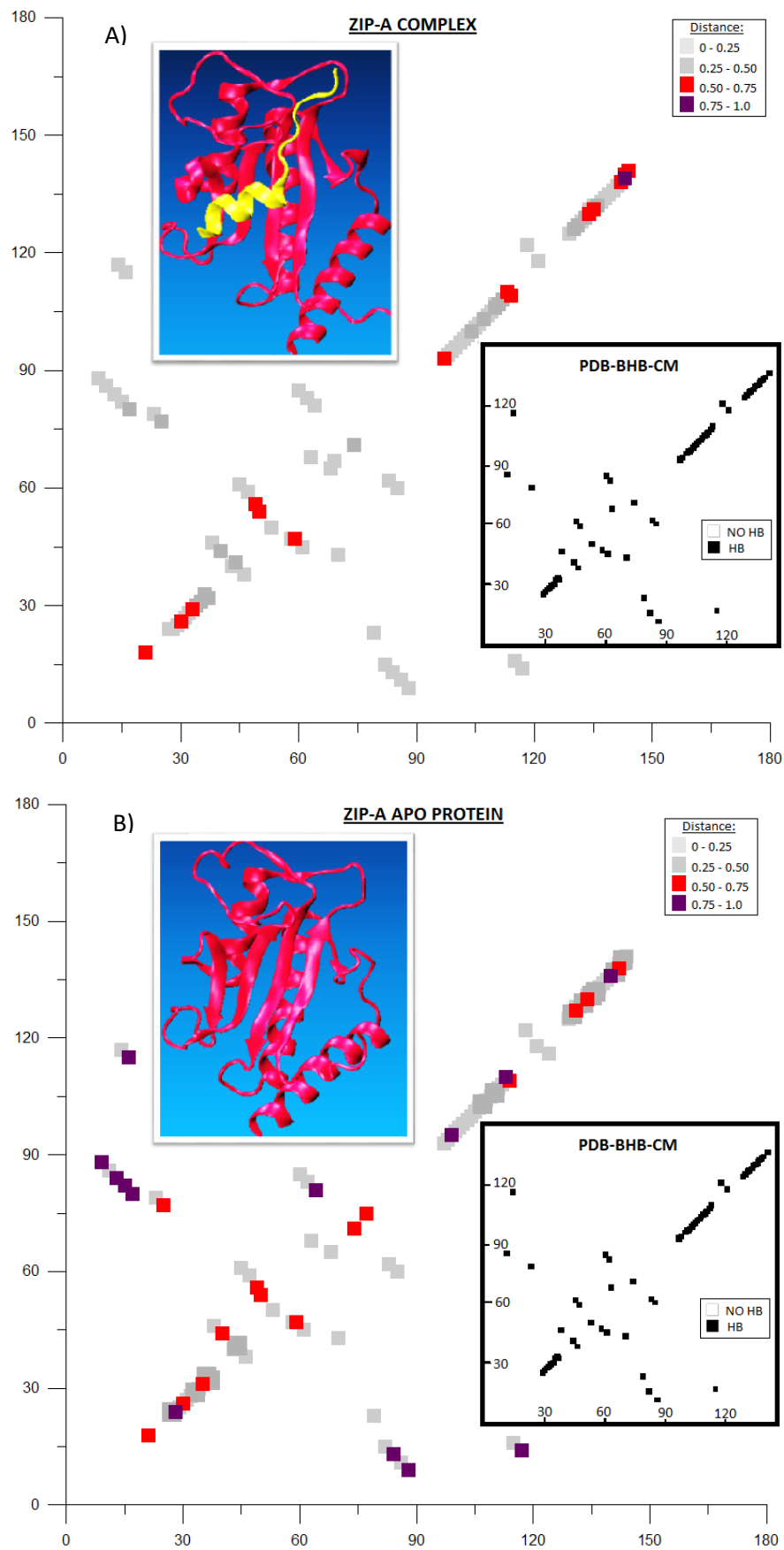


Figura 2.26: Matrices de distancia para la proteína Zip-A. A) Resultados para el complejo Zip-A con su ligando natural. B) Resultados para la forma apo.

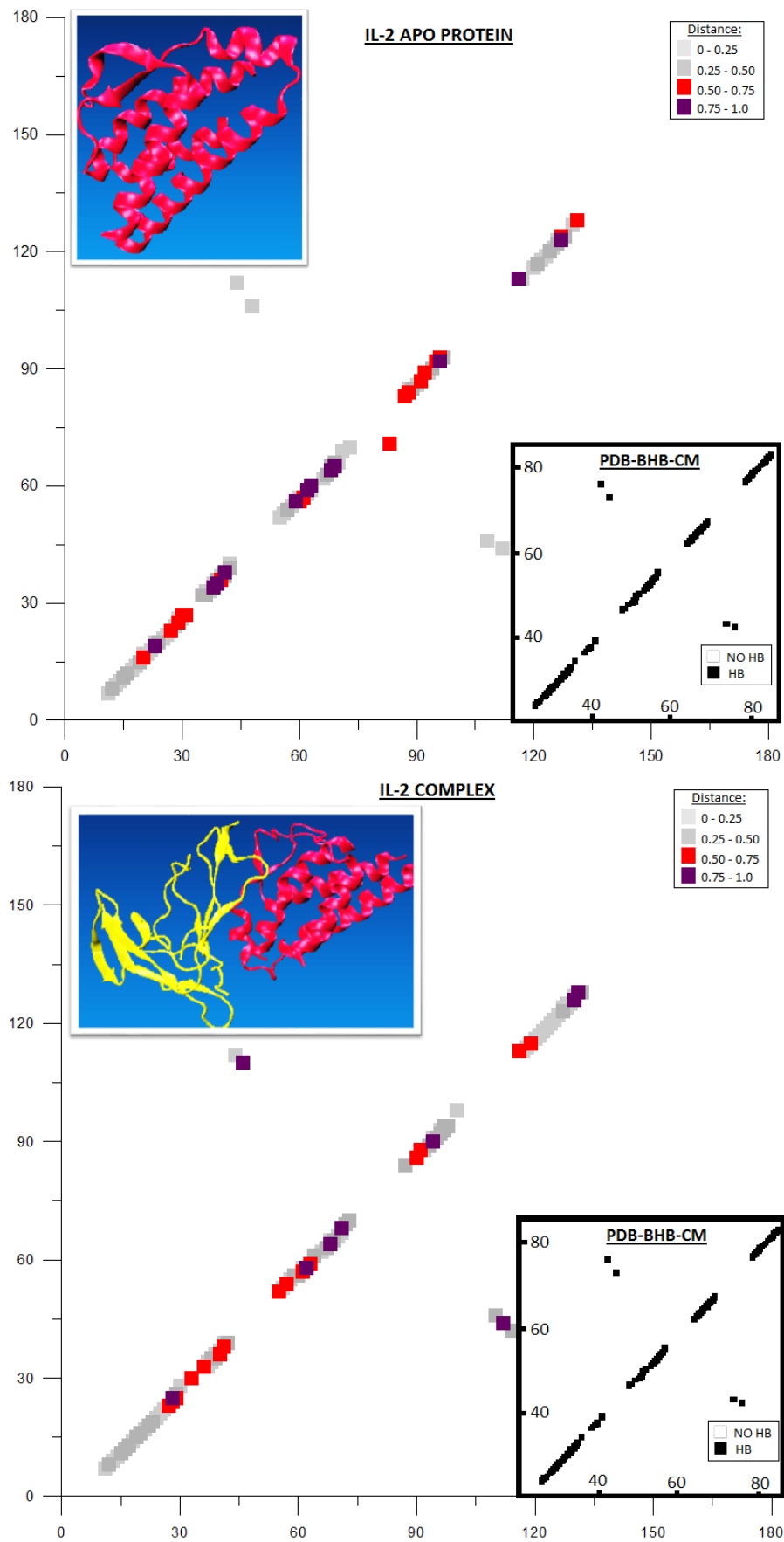


Figura 2.27: Matrices de distancia para la proteína IL-2. A) resultados para el complejo con su ligando natural. B) Resultados para la forma apo.

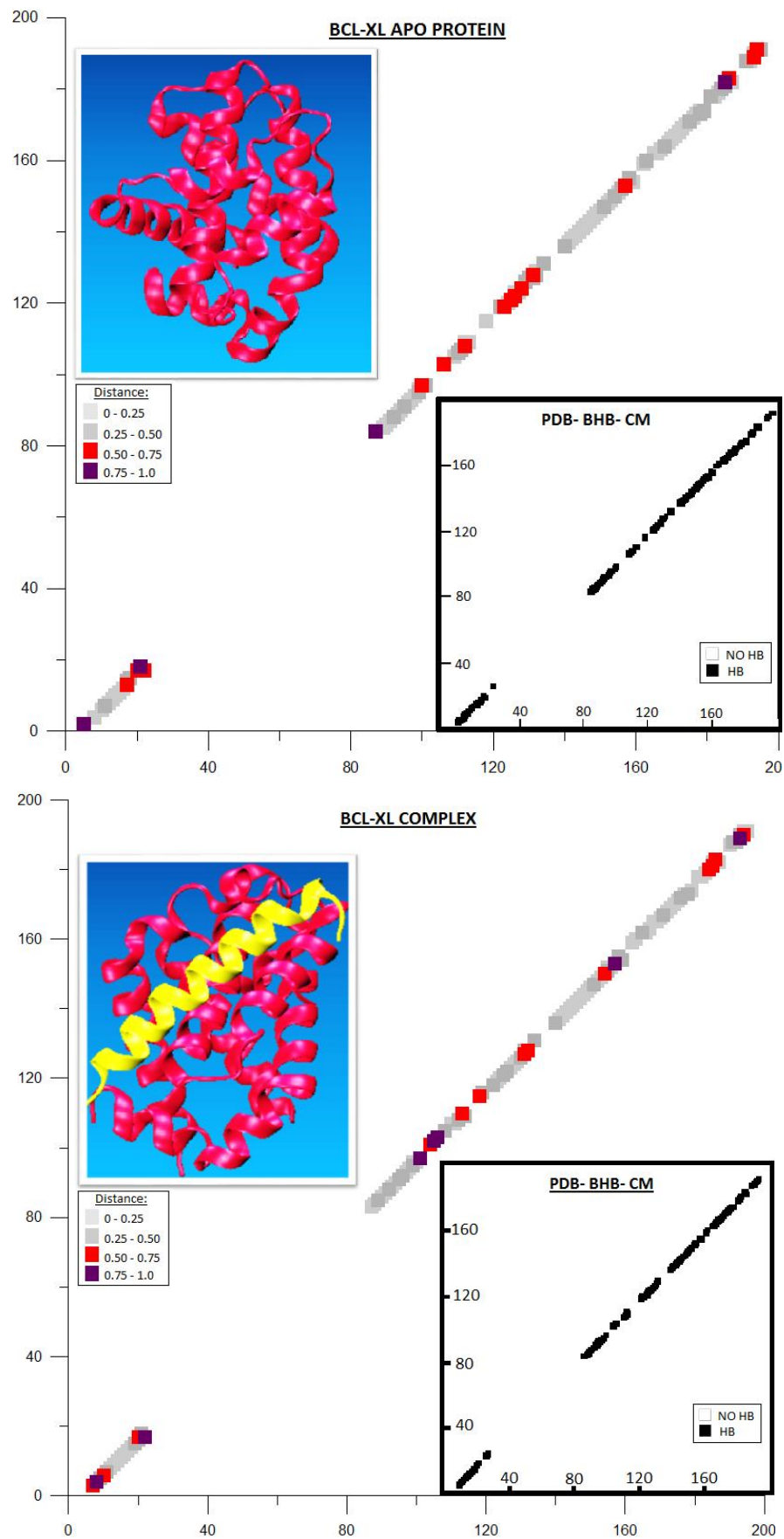


Figura 2.28: Matrices de distancia para la proteína BCL-XL. A) Resultados para la forma apo. B) resultados para el complejo con su ligando natural.

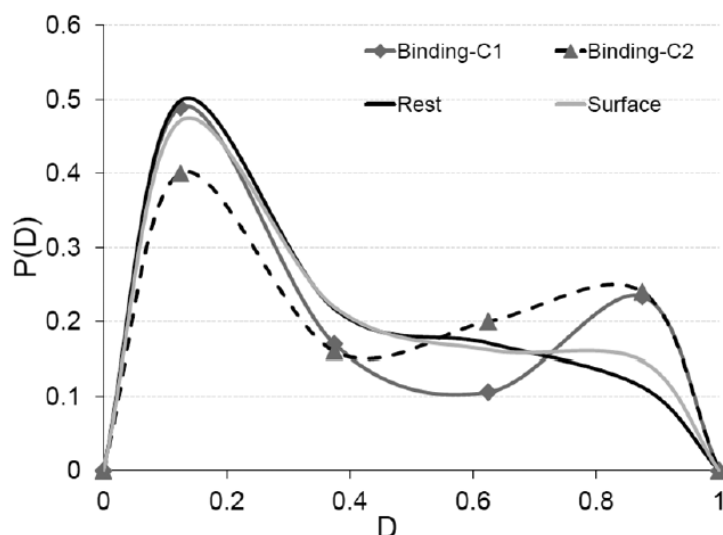


Figura 2.29: Distribución de densidad de probabilidad para los valores de distancia, **D**, para todos los BHBs de los 4 sistemas proteicos estudiados. Incluyendo una discriminación entre BHBs pertenecientes a sitios de unión (según criterio I y criterio II); así como también aquellos pertenecientes al 'Resto' y 'superficie'.

Finalmente, y a modo de resumen de los resultados expuestos previamente, hasta este punto mostramos la existencia de CBHBs y la aparente relevancia de estos motivos estructurales en procesos de unión, evidente por el claro enriquecimiento de éstos en los sitios de binding. En el próximo capítulo evaluaremos el alcance 'cuantitativo' de los estudios mencionados hasta aquí en comparación ya sea con datos experimentales, o bien otros métodos bien establecidos, como son cálculos de energía libre a partir de simulaciones de Dinámica Molecular.

Una consideración más es que a partir de aquí, y en los siguientes capítulos, a todos aquellos CBHBs pertenecientes a sitios de unión los llamaremos CHBs, para mayor simplicidad (de modo de prescindir de la necesidad de aclarar en todo momento la localización de los mismos, como pertenecientes o no al sitio de binding).

Mol	CBHBs		Apo Prot	Complex (Prot.-Prot.)			Complex (Prot.-Mol.)	
M D M 2	54	50	0.89	0.12	v		0.06	v
	57	53	0.90	0.16	v		0.11	v
	62	58	0.69	0.09	v		0.12	v
	99	95	0.56	0.29	v		0.59	X
	100	96	0.45	0.10	v		0.05	v
	103	99	0.85	0.29	v		0.17	v
I L - 2	39	35	0.84	0.40	v		Not formed	—
	41	38	0.87	0.66	X		0.36	v
	61	57	0.56	0.61	X		0.37	v
	68	64	0.77	0.77	X		0.90	X
	69	65	0.77	0.41	v		0.57	X
B	100	96	0.94	0.09	v		0.10	v
C	125	121	0.54	0.29	v		0.41	v
L	126	122	0.52	0.39	v		0.81	X
Z	40	44	0.58	0.38	v			
I	44	41	0.45	0.39	v			
P	64	81	0.85	0.17	v			

Figura 2.30: Valores de distancia, **D**, para los diferentes CBHBs (indicados con los números de residuo del par de aminoácidos involucrados en dicho puente de hidrógeno), para cada uno de los 4 sistemas estudiados. Allí se indican los respectivos valores para las proteínas apo, y los respectivos complejos. Valores de distancia que caen por debajo de 0.5 indican remoción de dicho CBHBs.

2.6- Conclusiones del capítulo

A partir de los primeros estudios desarrollados en este capítulo, llevados a cabo sobre sistemas modelo constituidos por placas cargadas con entornos químicos diferenciales en la proximidad de dichas cargas, hemos mostrado evidencias de la modulación de interacciones electrostáticas según las propiedades de sus entornos locales. Más específicamente, demostramos que el incremento en las propiedades hidrofóbicas de una superficie exacerban, de manera no aditiva, las interacciones de carga en un ambiente confinado. Además, dimos cuenta de que este efecto se debe exclusivamente a un comportamiento diferencial del solvente en dichas superficies. En tal sentido, los grupos hidrofóbicos promueven la deshidratación local de las cargas, evitando su apantallamiento y favoreciendo la interacción.

Posteriormente, el ‘traslado’ de los estudios anteriores a sistemas complejos reales, es decir, estudios de modulación de interacciones no covalentes, (y particularmente aquellas de índole electrostática como lo son los puentes de hidrógeno del *backbone*, BHBs) llevados a cabo en proteínas, revelaron la existencia de BHBs cuya propensión a la formación durante la dinámica en solución difiere significativamente de la información con la que contamos al observar estructuras experimentales (PDB). Denominamos a estas interacciones como CBHBs. Además vinculamos las fracciones de tiempo que una determinada interacción permanece formada (entendida en este contexto como una medida de su estabilidad) con sus propiedades de hidratación locales, mediante estudios de probabilidad de vacancia, $P(N=0)$, que como se dijo, representan un buen estimador de las fluctuaciones de densidad, y en última instancia de hidrofobicidad local. Finalmente, revelamos que los sitios de binding, donde la cadena peptídica justamente se encuentra considerablemente expuesta al solvente, están enriquecidos en CBHBs, evidenciando de este modo su relevancia en procesos de binding.

Referencias:

- 1) Bogan, A. A. & Thorn, K. S. *J. Mol. Biol.* **1998**, 280, 1.
- 2) Kulp, J. L., Pompliano, D. L. & Guarnieri, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 10740.
- 3) Li, J. & Liu, Q. *Bioinformatics*, **2009**, 25, 743.
- 4) Montes de Oca, J., Rodriguez Fris, A., Appignanesi, G. & Fernández, A. *FEBS J.* **2014**, 281, 3079.
- 5) Sierra, M. B. *et al. Eur. Phys. J. E*, **2013**, 36, 62.
- 6) Fernández, A. *Transformative concepts for drug design: Target wrapping. Transformative Concepts for Drug Design: Target Wrapping* (2010).
- 7) Giovambattista, N., Rossky, P. J. & Debenedetti, P. G. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2012**, 63, 179.
- 8) Hua, L., Zangi, R. & Berne, B. J. *J. Phys. Chem. C*. **2009**, 113, 5244.
- 9) Huang, X., Margulis, C. J. & Berne, B. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, 100, 11953.
- 10) Lum, K., Chandler, D. & Weeks, J. D. *J. Phys. Chem. B*. **1999**, 103, 4570.
- 11) Giovambattista, N., Debenedetti, P. G. & Rossky, P. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, 106, 15181.
- 12) Jamadagni, S. N., Godawat, R. & Garde, S. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **2011**, 2, 147.
- 13) Acharya, H., Vembanur, S., Jamadagni, S. N. & Garde, S. *Faraday Discuss.* **2010**, 146, 395.
- 14) Schulz, E., Frechero, M., Appignanesi, G., Fernández, A. & Haak, J. *PLoS One*, **2010**, 5, e12844.
- 15) Fernández, A. & Scott, R. *Biophys. J.* **2003**, 85, 1914.
- 16) Fernández, A. *Phys. A Stat. Mech. its Appl* **2002**, 307, 235.
- 17) Dill, K. A., Ozkan, S. B., Shell, M. S. & Weikl, T. R. *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, 37, 289.
- 18) Dill, K. A. & MacCallum, J. L. *Science*. **2012**, 338, 1042.
- 19) Levy, Y. & Onuchic, J. N. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2006**, 35, 389.
- 20) Berendsen, H. J. C., van der Spoel, D. & van Drunen, R. *Comput. Phys. Commun.* **1995**, 91, 43.
- 21) Lindahl, E., Hess, B. & van der Spoel, D. *J. Mol. Model.* **2001**, 7, 306.
- 22) Kumar, S., Bouzida, D., Swendsen, R. H., Kollman, P. A. and Rosenberg, J. M. I. *J. Comput. Chem.* **1992**, 13, 1011.
- 23) Nguyen, C. N., Cruz, A., Gilson, M. K. & Kurtzman, T. *J. Chem. Theory Comput.* **2014**, 10, 2769.
- 24) Nguyen, C., Gilson, M. K. & Young, T. Structure and Thermodynamics of Molecular Hydration via Grid Inhomogeneous Solvation Theory. *arXiv: 1108.4876 [q-bio.BM]* (2011).
- 25) Ramsey, S. *et al. J. Comput. Chem.* **2016**, 37, 2029.
- 26) J.A. Wells and C.L. McClendon, *Nature*. **2007**, 450, 1001.
- 27) L.T. Vassilev *et al.*, *Science*, **2004**, 303, 844.
- 28) B.C. Raimundo *et al.*, *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 3111.
- 29) M. Bruncko *et al.*, *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 641.
- 30) T.S. Rush, J.A. Grant, L. Mosyak and A. Nicholls, *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 1489.
- 31) Leach, A.R. *Molecular Modelling: Principles and Applications*. Second Edition. Wesley Longman Limited. Edinburgh, Harlow, England. **1997**.
- 32) Ryckaert, J.-P.; Ciccotti, G. y Berendsen, H.J.C. *Journal of Computational Physics*, **1977**, 23, 327.
- 33) Berendsen, H.J.C.; Postma, J.P.M.; van Gunsteren, W.F.; DiNola, A. y Haak, J.R. *The Journal of Chemical Physics*, **1984**, 81, 3684.
- 34) Izaguirre, J.A.; Catarella, D.P.; Wozniak, J.M. y Skeel, R.D. *The Journal of Chemical Physics*, **2001**, 114, 2090.
- 35) S.R. Accordino, M.A. Morini, M.B. Sierra, J.A. Rodriguez Fris, G.A. Appignanesi and A. Fernandez, *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.* **2012**, 80, 1755.
- 36) S.R. Accordino, J.A. Rodriguez-Fris, G.A. Appignanesi and A. Fernandez, *Eur. Phys. J. E*, **2012**, 35, 59.
- 37) D.A. Case *et al.* AMBER10, University of California, San Francisco, CA, **2008**.
- 38) L.M. Alarcon, J. A. Rodriguez Fris, M. A. Morini, M.B. Sierra, S. A. Accordino, J. M. Montes de Oca, V. I. Pedroni and G. A. Appignanesi, In *Membrane Hydration*, Editor: E. A. Disalvo, Springer Verlag, Berlin, **2015**.
- 39) Qvist, M., Davidovic, D., Hamelberg and B. Halle, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, 105, 6296.
- 40) T. Young, R. Abel, B. Kim, B.J. Berne and R.A. Friesner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, 104, 808.

- 41) C.Wang, B.J. Berne and R.A. Friesner, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **2011**, 108, 1326.
- 42) R.A. Friesner et al., J. Med. Chem. **2006**, 49, 6177.
- 43) Accordino, S. R., Montes De Oca, J. M., Rodriguez Fris, J. A. & Appignanesi, G. A. J. Chem. Phys. **2015**, 143, 154704.
- 44) Shih, C.-J. et al. Phys. Rev. Lett. **2012**, 109, 176101.
- 45) Hummer, G., Rasaiah, J. C. & Noworyta, J. P. *Nature*, **2001**, 414, 188.
- 46) Li, L., Bedrov, D. & Smith, G. D. J. Chem. Phys. **2005**, 121, 011502.
- 47) Athawale, M. V., Jamadagni, S. N. & Garde, S. J. Chem. Phys. **2009**, 131, 115102.
- 48) Liwei Li, Dmitry Bedrov, A. & Smith, G. D. J. Phys. Chem. **2006**, 110, 10509.
- 49) Peter Schmidtke, F. Javier Luque, James B. Murray, and Xavier Barril. J. Am. Chem. Soc. **2011**, 133, 18903.
- 50) Jarzynski, C. Phys. Rev. E: Stat., Nonlinear, Soft Matter Phys. **2006**, 73, 046105.
- 51) Giovambattista, N., P. G. Debenedetti, C. F. Lopez and P. J. Rossky. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **2008**, 105, 2274.
- 52) Uhrinova, S., D. Uhrin, H. Powers, K. Watt, D. Zheleva, P. Fischer et al. J. Mol. Biol. **2005**, 350, 587.
- 53) Z. Li et al., Nat. Mater. **2013**, 12, 925.

CAPITULO 3

Life is water dancing to the tune of solids.

Albert Szent-Gyorgyi (1972)

(¿O viceversa?)

3.1- Descripción general y objetivos de estudio del capítulo:

En el capítulo anterior revelamos la existencia de BHBs cuyas propensiones dinámicas cambian significativamente con respecto a su prescripción en el POB; denominamos a estas interacciones como CBHBs. Observamos un enriquecimiento de estos motivos en sitios de binding, y además una estabilización o restitución de estas interacciones en las formas complejadas de las proteínas estudiadas. A lo largo del presente capítulo, por un lado ahondaremos en la relevancia de estas interacciones en procesos de binding, más específicamente y con dicho objetivo en mente, estudiaremos el comportamiento y manifestación de CHBs (CBHBs pertenecientes a sitios de binding) bajo una serie de condiciones que se enumeran a continuación: simulaciones con solventes mixtos, *Alanine Scanning* computacional de los hot spot de p53 y racionalización del complejo MDM2-Nutlin 3a (dicho compuesto es un conocido inhibidor del complejo MDM2-p53 (10)), así como también una discriminación del aporte al binding de diversos fragmentos constituyentes de dicho inhibidor. Por otra parte, y una vez esclarecida la relevancia de CHBs en procesos de binding, exploraremos la aplicación cuantitativa de los análisis de propensión dinámica de BHBs, mediante el estudio de una serie de pequeñas moléculas disruptivas del complejo MDM2-p53, y contrastaremos la performance de esta nueva metodología con los correspondientes valores experimentales de afinidad así como también con respecto a otros métodos computacionales, como por ejemplo cálculos de energía libre de formación de los respectivos complejos mediante métodos bien establecidos como MM-GBSA y MM-PBSA. Finalmente, y una vez validada la aplicación con fines cuantitativos de los estudios de propensiones dinámicas de puentes de hidrógeno, en el próximo capítulo presentaremos los resultados de la evaluación teórica de una serie de nuevos compuestos sintéticamente factibles y pertenecientes a las familias descritas en el capítulo introductorio de esta tesis, como potenciales moléculas disruptivas del complejo MDM2-p53. Resulta oportuno mencionar además que parte de los resultados desarrollados a lo largo de este capítulo forman parte de los contenidos de una de las publicaciones surgidas de esta tesis: Cintia A. Menéndez, et al., "*Hydrogen bond dynamic propensity studies for protein binding and drug design*", PLOS ONE, 2016, 11(10): e0165767.

3.2- Convergencia y reproducibilidad de las medidas de propensión dinámica de BHBs:

Antes de seguir avanzando con los estudios de propensión dinámica de BHBs necesitamos conocer con algo más de detalle la dinámica de los procesos de formación y ruptura de los diferentes puentes de hidrógeno, y por extensión la reproducibilidad y convergencia de estas medidas.

De este modo se realizaron diversas simulaciones por Dinámica Molecular de la proteína MDM2 en su forma apo y holo. Por un lado, evaluamos simulaciones breves, de tiempo constante, y promediamos sobre diferentes números de réplicas (promedios en el ensamble). En contraste, realizamos promedios sobre largas trayectorias, y un número menor y fijo de réplicas (promedios en el tiempo). A continuación se detallan los números de réplicas exactos y tiempos evaluados en cada caso:

MDM2-apo:

- Simulaciones a partir del PDB: 1ZIM
- Hasta 70 réplicas de 1 ns.
- Promedios en el tiempo sobre 3 y 8 réplicas de hasta 150 ns.

MDM2-p53:

- Simulaciones a partir del PDB: 1YCR
- 20 réplicas de 1 ns.
- 8 réplicas de hasta 40 ns.

En el caso del complejo MDM2-p53 se evaluaron tiempos de simulación y número de réplicas menores debido a la rápida convergencia de los resultados (de hecho, no existen prácticamente fluctuaciones en el comportamiento de ninguno de los BHBs evaluados). Los resultados obtenidos están en acuerdo con otras medidas de fluctuación estructural como por ejemplo factores de temperatura o " *β -factors*". En la **Figura 3.2** se presenta dicha medida para todos los átomos del *Backbone* de la proteína, discriminada por residuos, para MDM2 en ambas formas, apo y holo. Adicionalmente, en la **Figura 3.3** se presentan los valores RMSD tomando como referencia en ambos casos la estructura de la proteína MDM2 en el PDB utilizado como punto de partida (Apo: 1ZIM, Complejo: 1YCR). De ambas medidas se desprende que las fluctuaciones estructurales para la proteína MDM2, cuando se encuentra complejada con su diana natural, p53, son sustancialmente menores que en su forma no ligada.

En la **Figura 3.1**, se detallan los valores de Propensión Dinámica (fracciones de tiempo que permanece formada dicha interacción según parámetros geométricos) y sus correspondientes valores de desviación estándar para todos los BHBs del sitio de binding, para la proteína MDM2 en su forma APO y formando parte del complejo con p53. Allí se puede ver que para la proteína MDM2 en su forma apo hay varios BHBs cuyo comportamiento varía considerablemente entre las distintas réplicas (valores de desviación estándar grandes), y consecuentemente los valores de propensión en estos casos serán

altamente dependientes del tiempo evaluado y número de réplicas. En contraste para el caso del complejo MDM2-p53, todos los BHBs estudiados tienen propensiones dinámicas cuyos valores de desviación estándar son pequeños, además en este último caso los valores medios de propensión no se ven prácticamente afectados por los tiempos o número de réplicas que se contemplan en su evaluación.

Residuo (PDB)		MDM2-apo-IZIM				MDM2-p53: 1YCR			
		70*1 ns		8*150 ns		20*1 ns		8*40 ns	
		Propensión	DESV	Propensión	DESV	Propensión	DESV	Propensión	DESV
54	50	0.798	0.156	0.846	0.193	0.980	0.008	0.967	0.006
57	53	0.890	0.073	0.864	0.057	0.949	0.012	0.926	0.011
61	57	0.690	0.222	0.793	0.157	0.964	0.015	0.963	0.004
62	58	0.643	0.201	0.558	0.187	0.959	0.010	0.944	0.007
66	61	0.443	0.331	0.266	0.289	0.838	0.023	0.860	0.023
91	75	0.904	0.096	0.831	0.155	0.967	0.015	0.947	0.020
93	73	0.882	0.176	0.839	0.203	0.972	0.010	0.964	0.009
99	95	0.531	0.330	0.313	0.302	0.901	0.049	0.892	0.046
100	96	0.577	0.410	0.566	0.410	0.956	0.017	0.927	0.020
103	99	0.428	0.308	0.255	0.322	0.880	0.048	0.817	0.027

Figura 3.1: Valores de propensión dinámica para: A) Proteína MDM2 en su forma APO (PDB: IZIM) como promedio de 70 réplicas de 1 ns (500 configuraciones equidistantes en cada réplica), y como promedio de 8 réplicas de 150 ns (30000 configuraciones en cada réplica). B) Proteína MDM2 formando el complejo con p53 (PDB: 1YCR), como promedio de 20 réplicas de 1 ns (500 configuraciones), y como promedio de 8 réplicas de 40 ns (8000 configuraciones equidistantes por cada réplica).

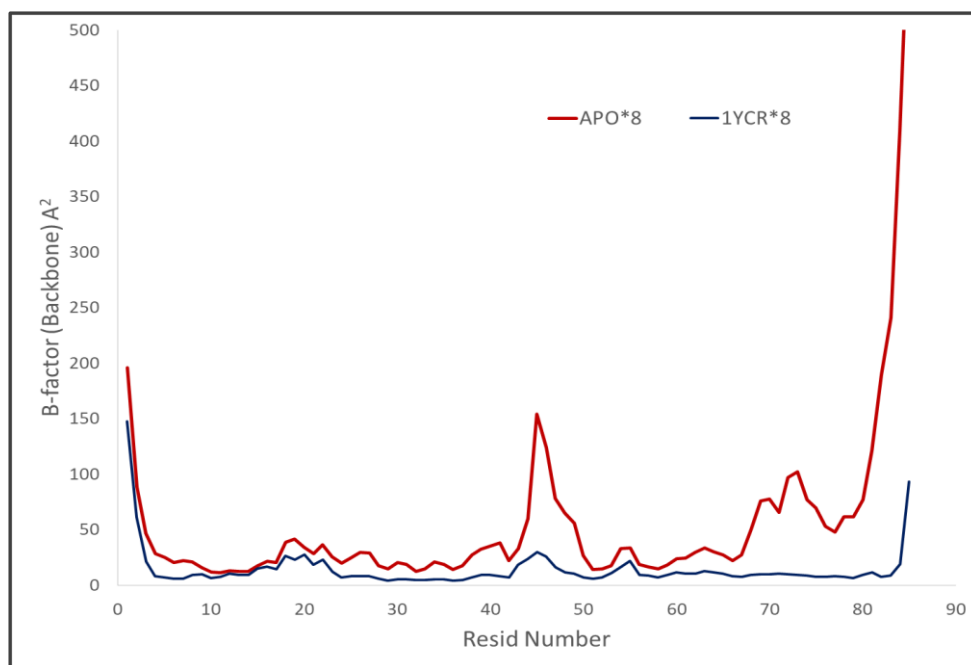


Figura 3.2: Valores de B -factor expresado por residuo, para los átomos de *Backbone*, obtenidos a partir de simulaciones de dinámica molecular. Rojo: valores promedio para la proteína MDM2-apo, azul: valores promedio para MDM2 en el complejo con p53.

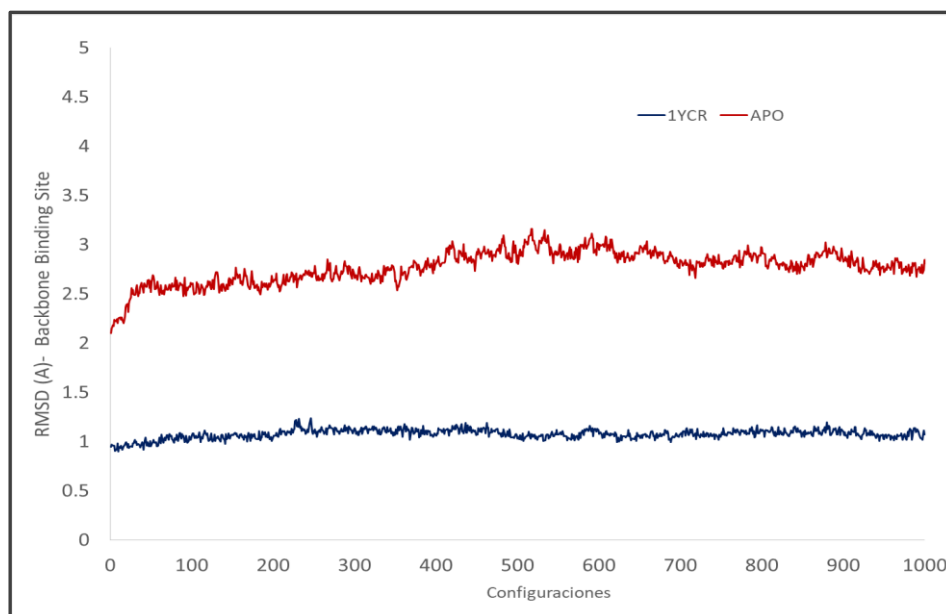


Figura 3.3: Valores de RMSD, calculados sobre los átomos de Backbone del sitio de binding, informados como valores promedio de 8 réplicas de 40 ns cada una de ellas. Rojo: MDM2 en su forma apo. Azul: MDM2-p53.

En este punto es importante realizar una consideración acerca de los valores de propensión listados en la **Figura 3.1** y el criterio adoptado para la determinación de CHBs utilizado en el capítulo anterior (**Figura 2.30**). Justamente una situación posible que impediría la aplicación de este análisis (puntualmente la determinación de CHBs tal cómo se describió hasta el momento) sería el hecho de no contar con información experimental de la proteína de interés en su forma apo; por tal motivo resulta de utilidad indagar en otros modos a partir de los cuales determinar aquellos BHBs de interés; en este sentido una alternativa podría ser comparar los valores medios de propensión y/o sus desviaciones estándar, obtenidos de simulaciones de la proteína de interés formando parte de algún complejo, y simulaciones de dicha proteína sin ligando alguno. Entonces, si nos focalizamos puntualmente en el valor medio de esta medida, podríamos definir como CHBs a todos aquellos BHBs cuya propensión es cercana o menor a 0.5 (de este modo capturaríamos los BHBs equivalentes a todas aquellas interacciones que estuvieron inicialmente formadas en el PDB y que su propensión dinámica en solución se vio fuertemente alterada); en tal caso vemos que determinamos prácticamente las mismas interacciones como relevantes al menos en el caso de MDM2 (BHBs comunes a ambos criterios: 62-58, 99-95, 100-96, 103-99). Discrepancias puntuales según ambos criterios, como los BHBs 54-50 y 57-53, las podemos entender en términos de que en realidad inicialmente (en la estructura experimental) estas interacciones podrían estar muy próximas al valor de corte utilizado para decidir si la misma es considerada o no, en tal caso una minimización de la estructura experimental sería conveniente antes de determinar la prescripción de BHBs en el PDB. Si observamos sólo los valores de propensión dinámica en solución vemos que son interacciones evidentemente estables en la dinámica (permanecen formadas alrededor del 80 % del tiempo). Por otra parte, con el segundo modo de determinación de BHBs relevantes incluiríamos en el grupo de CHBs a la interacción 66-61 que no fue considerada previamente. Esto probablemente pudo deberse a los tiempos de simulación y número de réplicas considerados en principio. Finalmente, fueron justamente las discrepancias enumeradas previamente las que nos empujaron a realizar una caracterización más detallada del comportamiento de cada una de estas interacciones en la

proteína MDM2 en su forma apo con respecto al complejo MDM2-p53; dichos resultados se comentan en el siguiente inciso de esta sección.

3.2.1- Caracterización de BHBs: SASA, beta-factor, perfiles de energía libre y convergencia de las medidas de propensión.

A continuación se describirán diversos parámetros (área superficial accesible al solvente -comúnmente denominada SASA por sus siglas en inglés-, β -factor, perfiles de energía libre, valores de propensión en función del número de réplicas y del tiempo de simulación considerado, etc) para lograr una mayor comprensión del comportamiento diferencial de los diversos BHBs clasificados como CHBs según alguno de los dos criterios antes mencionados.

En todos los casos las simulaciones no sesgadas se realizaron siguiendo las consideraciones desarrolladas en la sección de métodos del capítulo anterior (**inciso 2.2**). En cuanto a los perfiles de energía libre, los mismos se calcularon de dos maneras: por un lado mediante las simulaciones no sesgadas se construyeron distribuciones de distancias N-O de las diferentes interacciones estudiadas, dichas distribuciones describen una función de correlación de a pares ($g(r)$), y por lo tanto se puede obtener el perfil de energía libre de dicha interacción como función de las distancias N-O aplicando la siguiente relación, PMF (Potential of Mean Force) = $-K_b.T.\ln(g(r)) + c$, siendo K_b la constante de Boltzman y r la distancia entre los átomos de N de la amida y O del carbonilo protagonista de dicha interacción. Una segunda opción involucró la utilización de dinámicas sesgadas: así se condujeron una serie de 'Steered Molecular Dynamics' (SMD) (1) (de manera muy resumida, la idea central detrás de cualquier simulación de SMD es la aplicación de una fuerza externa sobre un átomo o grupo de ellos dentro del sistema de interés, y posterior estudio de la evolución de dicho sistema bajo estas condiciones); y por aplicación de la igualdad de Jarzynski (2) se obtuvo el perfil de energía libre como función de las distancias N-O, a partir del trabajo promedio realizado fuera del equilibrio en un ensamble de dinámicas de 'estiramiento'.

$$e^{-\frac{\Delta G}{k_B T}} = \left\langle e^{-\frac{W}{k_B T}} \right\rangle$$

Igualdad de Jarzynski

Dónde K_b representa la constante de Boltzman, T la temperatura y W el trabajo.

Una de las dificultades prácticas en la obtención de un PMF de este modo es la difícil convergencia de los resultados. Por tal motivo en este trabajo aplicamos ASMD (por sus siglas en inglés 'Adaptive Steered Molecular Dynamics') (3-7); dicha técnica muestra mejoras en la convergencia de los resultados. En este caso la coordenada de reacción se divide en segmentos, dentro de los cuales se llevan a cabo un conjunto de SMD y los promedios de Jarzynski son allí determinados tal como se muestra en la **Figura 3.4**.

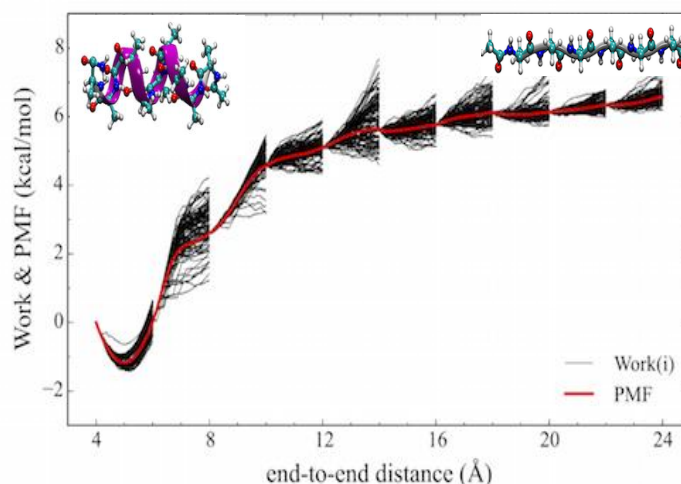


Figura 3.4: PMF (línea roja) obtenido por aplicación de ASMD.

En la aplicación de esta última metodología, tanto para la proteína apo como holo se realizaron 25 réplicas iniciales de SMD, en todos los casos llevando el par de átomos seleccionados (N y O de ciertos BHBs) desde 2.5 a 5 Å en 0.5 ns de simulación. Posteriormente se tomaron 10 grupos aleatorios con 10 réplicas cada uno, y se estimaron valores de desviación estándar tomando como valor umbral 0.5 Kcal/mol (criterio arbitrario de convergencia utilizado); en los casos en los que dicho valor fue superior se realizaron 25 réplicas adicionales. Posteriormente, se realizaron 25 réplicas de SMD, en este caso llevando el sistema desde 5.0 a 7.5 Å en 0.5 ns de simulación, utilizando en todos los casos como configuración inicial la réplica del primer grupo más cercana al promedio de Jarzynski. Estos últimos estudios fueron realizados durante una estancia de investigación en el grupo dirigido por Xavier Barril (Universitat de Barcelona).

3.2.1.1- Clasificación termodinámica de CHBs:

A continuación podremos ver que es posible clasificar los diversos CHBs de MDM2 según la dinámica subyacente al proceso de ruptura de los mismos. De este modo, en las **Figuras 3.5 y 3.6** se muestran los valores de propensión dinámica del BHB 100-96, (previamente clasificado como uno de los CHBs de MDM2), respectivamente para MDM2 en su forma apo y para el complejo, MDM2-p53.

En dichas figuras se encuentra desglosada la información dada como un promedio global en la **Figura 3.1**. De la información volcada allí se puede apreciar, por un lado, la convergencia inmediata de las propensiones para el complejo, ya sea que se contemplen los promedios en el ensamble como así también en el tiempo. Una consideración adicional en este punto, más allá de los valores medios para este parámetro, consiste en observar la magnitud de las desviaciones estándar de dichas medidas, las cuales hablan de la reproducibilidad en el comportamiento de esta interacción entre réplicas. En tanto que, si observamos esta interacción en la proteína en su forma apo, podemos apreciar una alta dependencia de los valores medios con el número inicial de réplicas (promedios en el tiempo): si observamos el caso en el que se toman solo 3 réplicas iniciales (amarillo) vemos que los valores medios para este parámetro son considerablemente diferentes que para el caso en los que los promedios se realizaron sobre 8 réplicas (verde); y además que en el tiempo total evaluado (150 ns) no hay

convergencia en el valor medio entre estos dos casos. Este comportamiento se puede entender observando la **Figura 3.7**, dónde se muestra la evolución temporal de 3 réplicas cualesquiera. Vemos que la dinámica de la interacción es marcadamente diferente de una réplica a la otra, para la réplica 2, MD2, este BHB permanece formado prácticamente durante toda la dinámica de 150 ns (su propensión oscila de manera constante en torno a 0.9); en la réplica 1, MD1, en cambio, dicho BHB permanece formado hasta los 120 ns, dónde se rompe completamente y permanece de este modo por los 30 ns restantes. Finalmente, MD3, es un caso intermedio entre el descripto para MD1 y MD2. Una importante consideración en este punto es que en este caso no hay convergencia entre las diferentes réplicas en los tiempos evaluados.

En definitiva esta dinámica lenta de formación y ruptura de la interacción la podemos comprender un poco mejor si observamos la **Figura 3.8**, dónde se presentan distribuciones de distancias N-D para este BHB. Allí vemos para la proteína en su forma apo una distribución claramente bimodal, indicándonos la existencia de un equilibrio entre al menos dos tipos de conformaciones bien distintas (mostraremos en breve con algunos ejemplos puntuales que puede haber más de una conformación que dé lugar a este patrón): un grupo de ellas en dónde la interacción permanece formada y otro con un comportamiento opuesto; dónde la transición entre un tipo de conformaciones y la otra puede involucrar decenas de nanosegundos.

Por lo expuesto previamente se desprende que para lograr un muestreo adecuado de las propensiones dinámicas de interacciones de este tipo el número de réplicas iniciales que se consideren será altamente relevante, al menos en los períodos de tiempo aquí explorados.

En la **Figuras 3.9 A y B** se presentan perfiles de energía libre para el mismo CHB, obtenidos respectivamente aplicando ASMD y mediante la construcción de funciones de correlación de pares $g(r)$, en dinámicas no sesgadas. En el segundo caso, los valores de energía libre allí representados se encuentran referenciados de modo que sean comparables con el análisis de ASMD (se toma como referencia a la distancia N-D de 2.5 Å). Es importante destacar la coherencia en los resultados obtenidos según ambas metodologías; en ambos casos es clara la detección de un segundo mínimo en los perfiles de energía libre para la proteína MDM2 en su forma apo a distancias perfectamente comparables (aproximadamente 5 Å de distancia entre los átomos de N y D). En tanto que, para el complejo MDM2-p53 dicha posibilidad no fue detectada.

Luego, en la **Figura 3.10** se ilustra a modo de ejemplo una conformación de las diversas dinámicas de estiramiento llevadas a cabo, a partir de las cuales se construyó el perfil de energía libre para esta interacción aplicando ASMD. Nuevamente, en dicha imagen se representa el comportamiento de la proteína MDM2 en su forma apo: allí se puede observar como una molécula de agua puentea este BHB constituyendo uno de los caminos de 'ruptura' de la interacción con un menor trabajo. En la **Figura 3.11 A** se ven reflejados los diferentes caminos de 'ruptura' de este BHB, durante el primer tramo de estiramiento, esto es distancias N-D desde 2.5 hasta 5.0 Å.

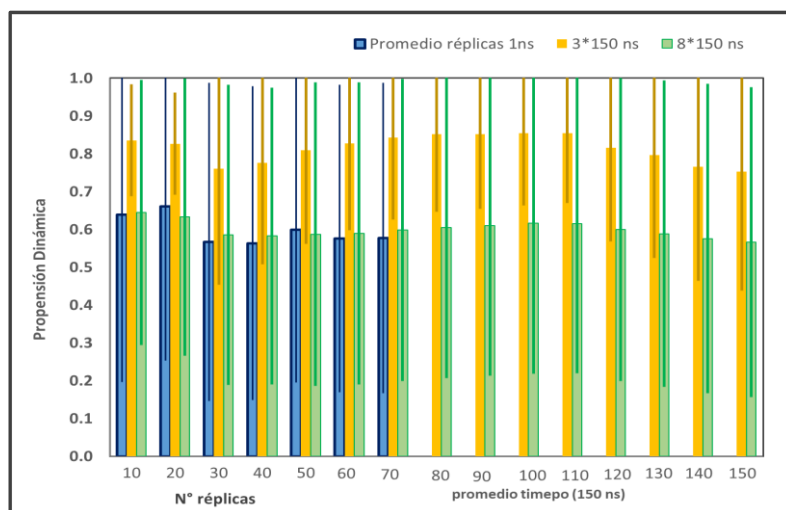


Figura 3.5. Propensiones dinámicas para el BHB 100-96, evaluados sobre dinámicas en solución de la proteína MDM2-*apo*. Como función de: en azul número de réplicas, en Amarillo promedio en el tiempo sobre 3 réplicas, y en verde promedios en el tiempo sobre 8 réplicas. Las líneas en cada caso indican desviación estándar de dichos promedios.

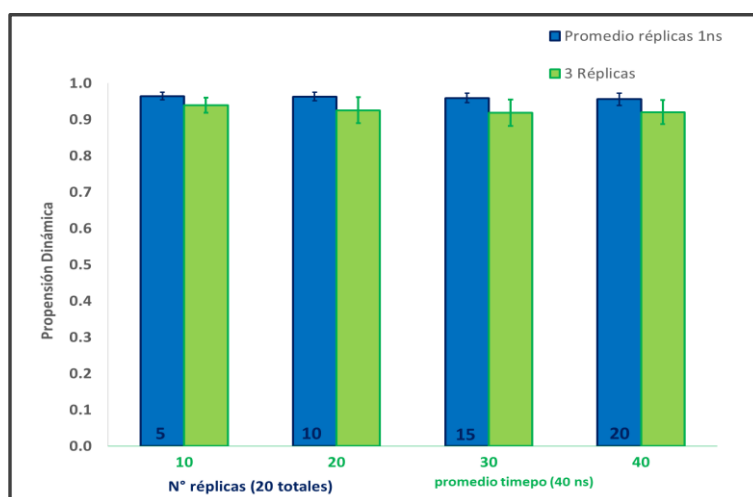


Figura 3.6. Propensiones dinámicas para el BHB 100-96, evaluados sobre dinámicas del complejo MDM2-p53. Como función de: en Azul número de réplicas, y en verde promedios en el tiempo sobre 8 réplicas y hasta 40 ns. Las líneas en cada caso indican desviación estándar de dichos promedios.

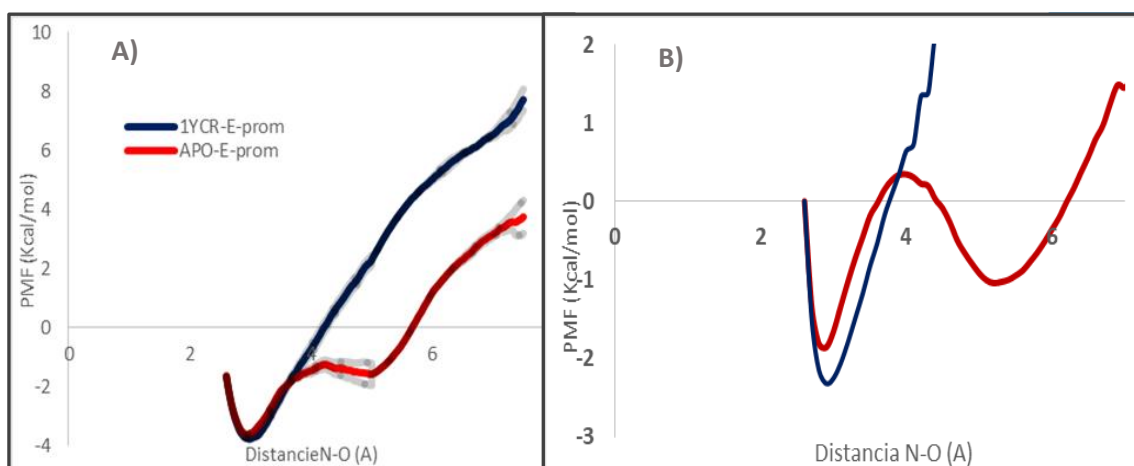


Figura 3.9. A) PMF para el BHB 100-96, como función de la distancia N-O de dicha interacción, obtenido por ASDM. B) PMF para la misma interacción obtenido a partir de la función de correlación de a pares para dicho CHB, determinada sobre dinámicas no sesgadas. En

ambos casos, en azul se representan los resultados del complejo MDM2-p53 y en rojo la performance de la proteína MDM2 en su forma apo. En la figura A en color gris se encuentran representadas las desviaciones estándar de dicho perfil a cada punto para ambos casos.

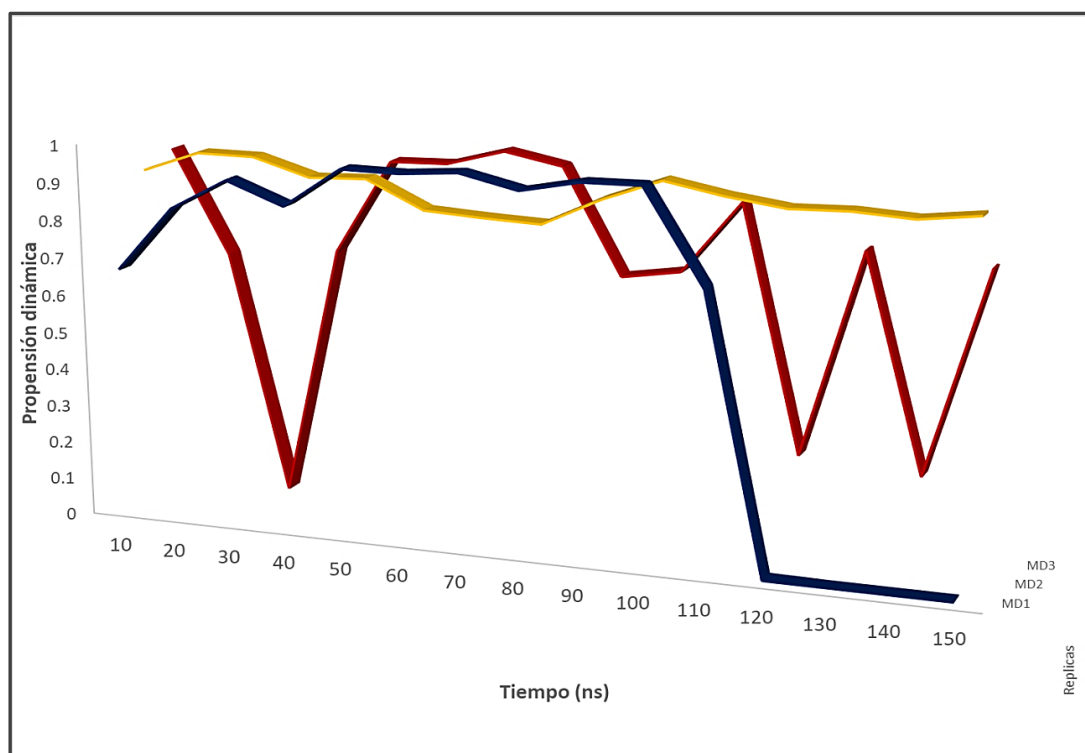


Figura 3.7. Propensiones dinámicas del CHB 100-96 en función del tiempo, evaluadas sobre dinámicas en solución de la proteína MDM2-apo, para 3 réplicas aleatorias, MD1, MD2 y MD3.

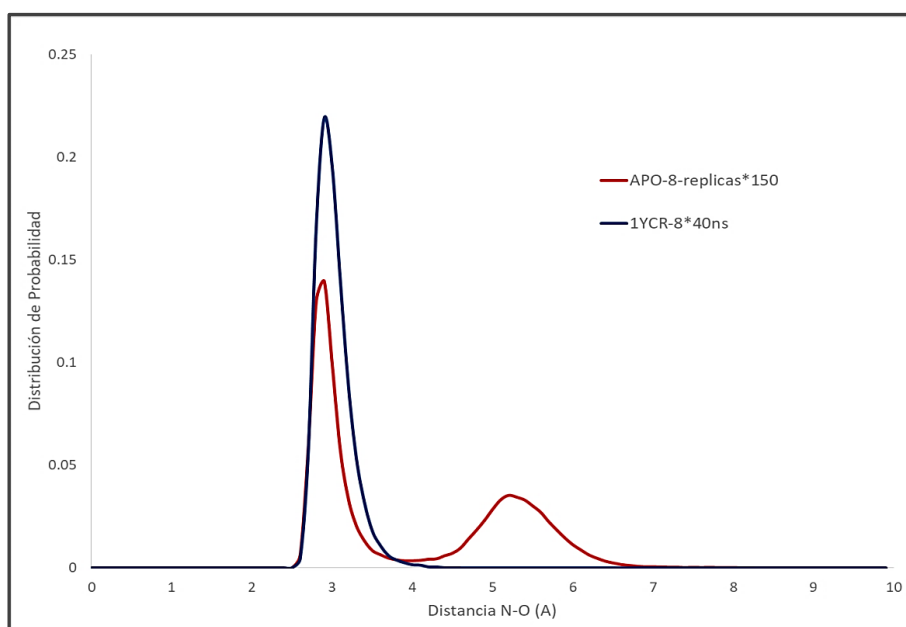


Figura 3.8. Distribución de probabilidad de las distancias N-O del BHB 100-96, como función de la distancia expresada en Å entre dichos átomos, y evaluadas sobre: en rojo, la proteína MDM2 en su forma apo; y en azul, el complejo MDM2-p53. Dichas distribuciones fueron construidas a partir de datos de distancias N-O tomados de 8 dinámicas de 150 ns para el caso de la proteína apo (240000 configuraciones equidistantes); y sobre 8 dinámicas de 40 ns para el caso del complejo (64000 configuraciones equidistantes).

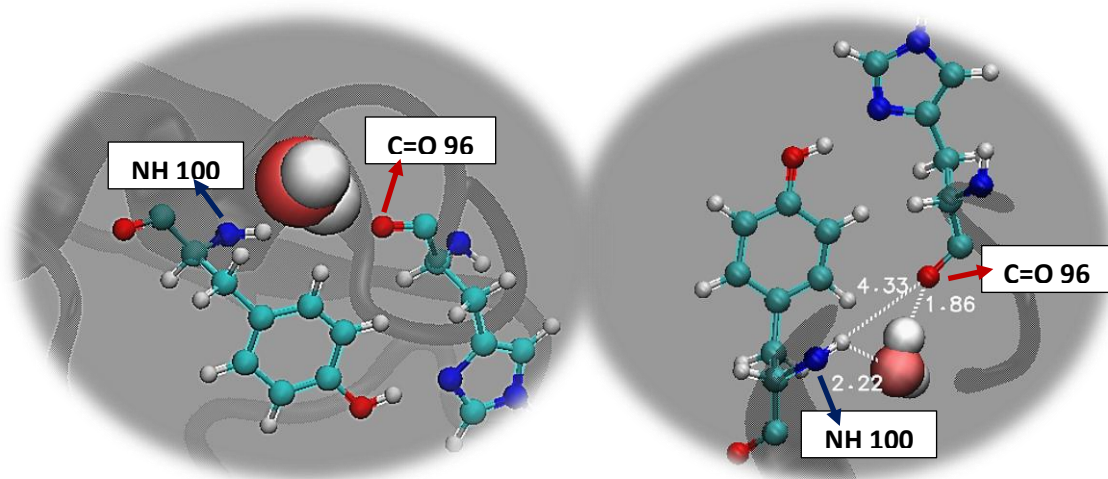


Figura 3.10. Configuración representativa de uno de los caminos encontrados en las dinámicas de 'ruptura' del BHB 100-96. A la derecha, vista de perfil; a la izquierda vista superior. Aquí se esquematizan: en *CPK* (modo de representación del programa VMD) los aminoácidos 100-96, y en *VDW* las moléculas de agua en el entorno local de dicho BHB. En esta imagen la correspondencia de identidad atómica y colores utilizados es: rojo para los átomos de oxígeno, blanco átomos de hidrógeno, azul para los átomos de nitrógeno y cian para los átomos de carbono.

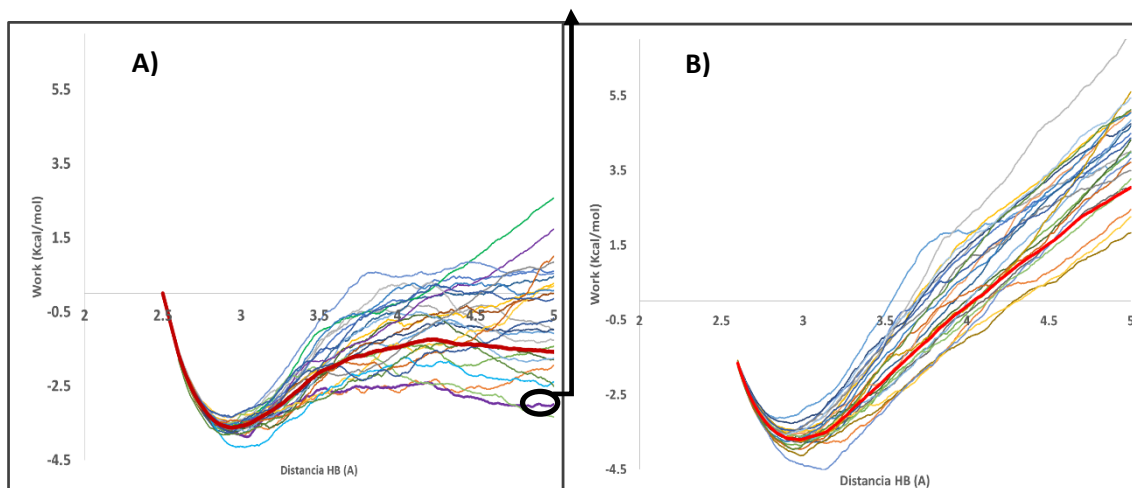


Figura 3.11. Trabajo en función de la distancia N-O del CHB 100-96, expresada en Å: A) para 25 réplicas diferentes de la proteína MDM2-apo. B) 25 réplicas diferentes complejo MDM2-p53. En ambos casos en rojo se representa el PMF construido por aplicación de la igualdad de Jarzynski a partir de las trayectorias de estiramiento allí representadas.

Por lo expuesto previamente, y más allá de las configuraciones específicas antes consideradas, es evidente que para la proteína MDM2 en su forma apo existe un abanico de conformaciones que dan lugar a un estado donde está interacción se pierde (está no formada); en tanto que dichas conformaciones no son accesibles para el complejo MDM2-p53. También resulta evidente que la dinámica de las transiciones entre uno y otro mínimo puede tomar hasta decenas de nanosegundos.

Un comportamiento opuesto al descrito previamente lo presenta el CHB 62-58; caracterizado por una dinámica rápida para el proceso de ruptura y restitución de la interacción; dónde no existen cambios conformacionales mayores, sino que la interacción se pierde por una elongación de las distancias N-O o cambios en la direccionalidad. En tal sentido a partir de la distribución de distancias N-O, **Figura 3.13**, podemos ver claramente que la ruptura de este tipo de BHBs es principalmente por una elongación y que no hay cambios conformacionales mayores involucrados (dicha distribución no es

bimodal como en el caso analizado previamente). Por otra parte queda claro a partir de las **Figuras 3.12 y 3.14**, y debido justamente a esta dinámica más rápida de ruptura y formación de la interacción, que el número de réplicas consideradas no es tan preponderante como en el caso anterior ya que en los tiempos aquí analizados, sólo en una réplica se puede lograr un buen muestreo para la estimación del valor de propensión de dicho BHB. En tal sentido, si observamos la **Figura 3.14** podemos ver que réplicas independientes a lo largo del tiempo convergen a un mismo valor de propensión.

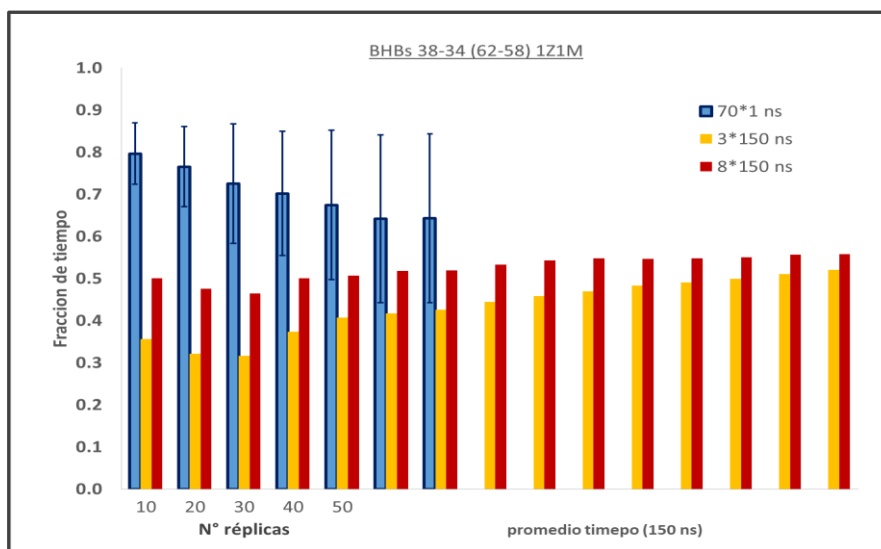


Figura 3.12. Propensiones dinámicas para el BHB 62-58, evaluadas sobre dinámicas en solución de la proteína MDM2-*apo*. Como función de: en Azul número de réplicas, en Amarillo promedio en el tiempo sobre 3 réplicas, y en rojo promedios en el tiempo sobre 8 réplicas.

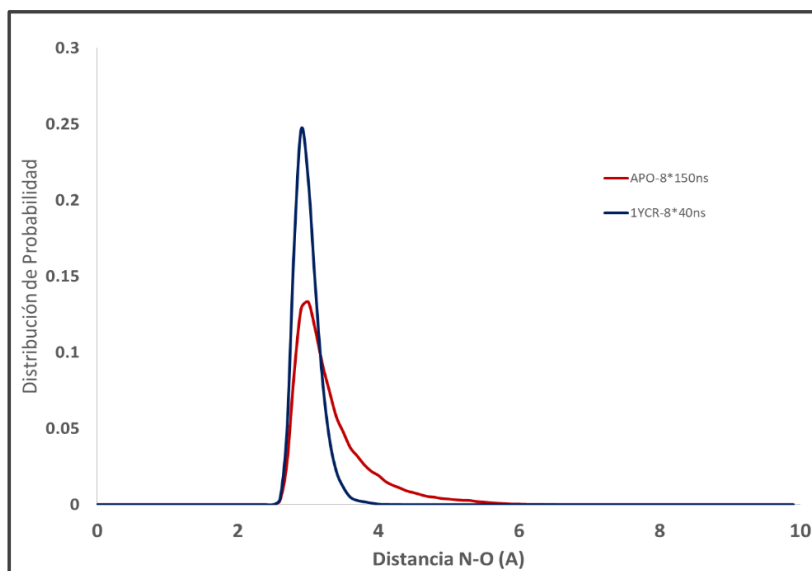


Figura 3.13. Distribución de probabilidad de las distancias N-O del BHB 62-58, como función de la distancia expresada en Å entre dichos átomos, y evaluadas sobre: en rojo, la proteína MDM2 en su forma *apo*; y en azul, el complejo MDM2-p53. Dichas distribuciones fueron construidas a partir de datos de distancias N-O tomados de 8 dinámicas de 150 ns para el caso de la proteína *apo* (240000 configuraciones equidistantes); y sobre 8 dinámicas de 40 ns para el caso del complejo (64000 configuraciones equidistantes).

Los perfiles de energía libre para el proceso de ruptura de esta interacción también son coherentes con las observaciones previas. En la **Figura 3.15** podemos ver que por ambos métodos no se detecta un segundo mínimo a distancias N-O mayores,

es decir que no existe un equilibrio entre una familia de conformaciones para las cuales este BHBs está formado y su contraparte, una familia de conformaciones dónde no esté presente.

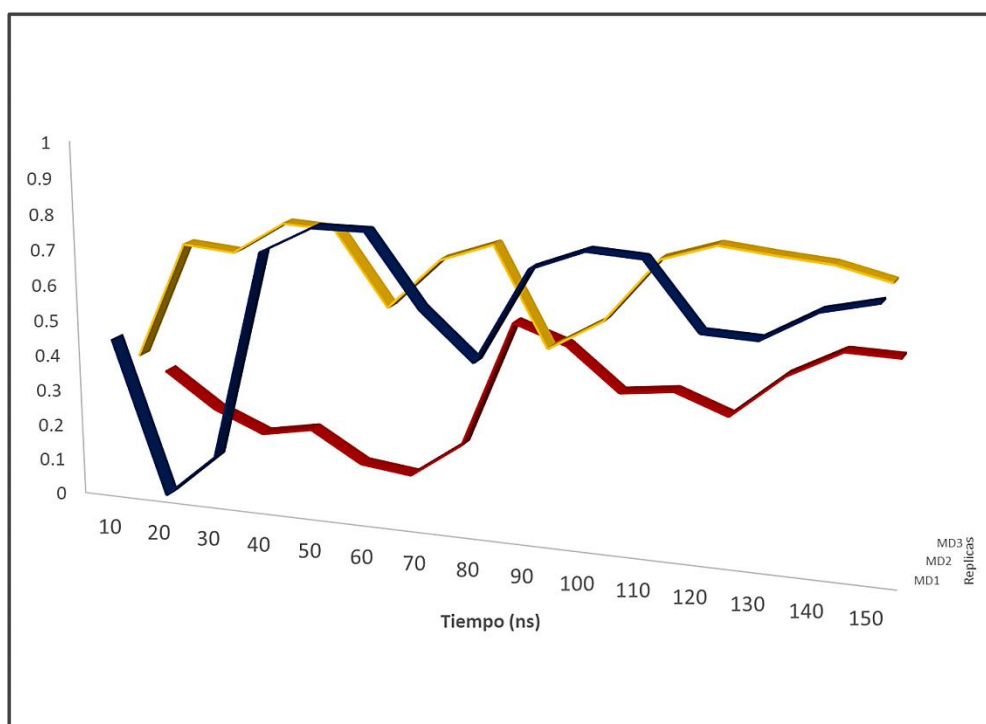


Figura 3.14. Propensiones dinámicas del BHB 62-58 en función del tiempo (expresado en ns), evaluadas sobre dinámicas en solución de la proteína MDM2-apo, para 3 réplicas aleatorias, MD1, MD2 y MD3.

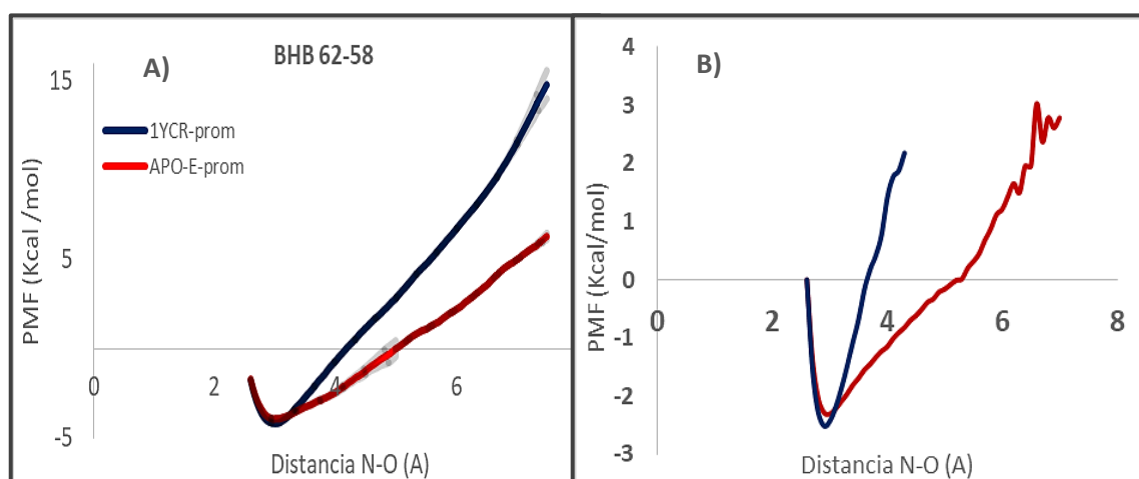


Figura 3.15. A) PMF para el BHB 62-58, como función de la distancia N-O de dicha interacción, obtenido por ASMD. B) PMF para la misma interacción obtenido a partir de la función de correlación de pares para dicho BHBs, determinadas sobre dinámicas no sesgadas. En ambos casos, en azul se representan los resultados del complejo MDM2-p53 y en rojo la performance de la proteína MDM2 en su forma apo. En la figura A en color gris se encuentran representadas las desviaciones estándar de dicho perfil a cada punto para ambos casos.

Finalmente, los CHBs 66-61, 99-95 y 103-99 pertenecen al primer grupo (presentan un comportamiento del tipo del CHB 100-96), es decir que son BHBs caracterizados por un dinámica lenta. Por otra parte los CHBs 54-50 y 57-53 pertenecen al segundo grupo, es decir, BHBs caracterizados por una dinámica de ruptura y restitución de dicha interacción rápida.

3.2.1.2- Propiedades de hidratación puntuales de CHBs:

Por otra parte, en el capítulo anterior develamos también la existencia de propiedades de hidratación diferenciales en el entorno de BHBs a lo largo de la proteína. Más precisamente, encontramos que todos aquellos BHBs que resultaron tener propensiones dinámicas promedio muy altas se encontraron en entornos desolvatados. En este sentido, y con el objetivo de dar algo de claridad a una de las preguntas principales que se planteó desde el inicio de esta tesis (¿de qué modo pueden las interacciones no covalentes verse moduladas por el contexto?) fue que decidimos estudiar las propiedades de hidratación de los CHBs antes mencionados, pero ahora de manera diferencial entre períodos de tiempo en los cuáles una interacción puntual permanece o no formada (para el caso de CHBs con una dinámica lenta). En la **Figura 3.17 A**, revelamos las propiedades de hidratación del CHB 100-96, comparando su comportamiento entre la forma Apo y el complejo; así como también entre diferentes períodos de tiempo dentro de una misma réplica de la proteína en su forma apo para los cuales está interacción manifestó una alta propensión dinámica (aproximadamente 0.9) y, en contraposición, períodos de tiempos en los cuales este BHB no estuvo formado. De este modo, las diferencias en las propiedades de hidratación entre las diversas situaciones en consideración son muy notorias: por un lado si comparamos los resultados para la proteína apo vemos que en los períodos de tiempo en los cuales la interacción estuvo no formada se encuentra bien solvatada (presenta una primera esfera de hidratación). Luego, y como contrapartida, para el periodo en el cual esta interacción permaneció formada más del 90% del tiempo, encontramos que su entorno fue completamente anhidro. Finalmente, si consideramos el comportamiento en una réplica aleatoria del **complejo** (recordemos que no existen prácticamente diferencias entre los valores de propensión hallados para esta interacción entre las diversas réplicas y además que dichos valores promedio son superiores a 0.9) observamos al igual que en el caso anterior que nuevamente el entorno local es anhidro. Luego, en la **Figura 3.16** se muestran valores de SASA evaluados específicamente sobre los átomos protagonistas de las interacciones aquí consideradas (NH-CO). En dicha figura se presenta una evolución temporal de dicho parámetro evaluado sobre NH 100-CO 96, puntualmente para la réplica MD1 (nomenclatura equivalente **Figura 3.7**). De este modo se hace evidente una perfecta complementariedad entre propensiones dinámicas y la exposición local al solvente (considerando la exposición local al solvente tanto a partir de mediciones de SASA como así también la presencia o no de una primera esfera de hidratación **Figura 3.7, Figura 3.16 y Figura 3.17 B**), describiendo una relación inversamente proporcional entre ambos parámetros. Es decir, observamos valores de SASA elevados y la presencia de una primera esfera de hidratación para los períodos de tiempo en los cuales el CHB 100-96 permaneció no formado y viceversa. Una consideración conveniente en este punto es que los valores negativos de SASA obviamente no tienen significado físico alguno, en tal caso un valor más realista sería simplemente '0'. La obtención de valores negativos está dada porque para el cálculo de este parámetro se utilizó el método LCPO (aproximación de superficies atómicas a partir de combinaciones lineales de superposiciones de a pares) (8), implementado en el paquete cpptraj de amber tools.

De este modo y por lo expuesto previamente, resulta clara la dependencia contextual de interacciones no covalentes como BHBs, dónde su estabilidad está directamente relacionada con la exposición local al solvente.

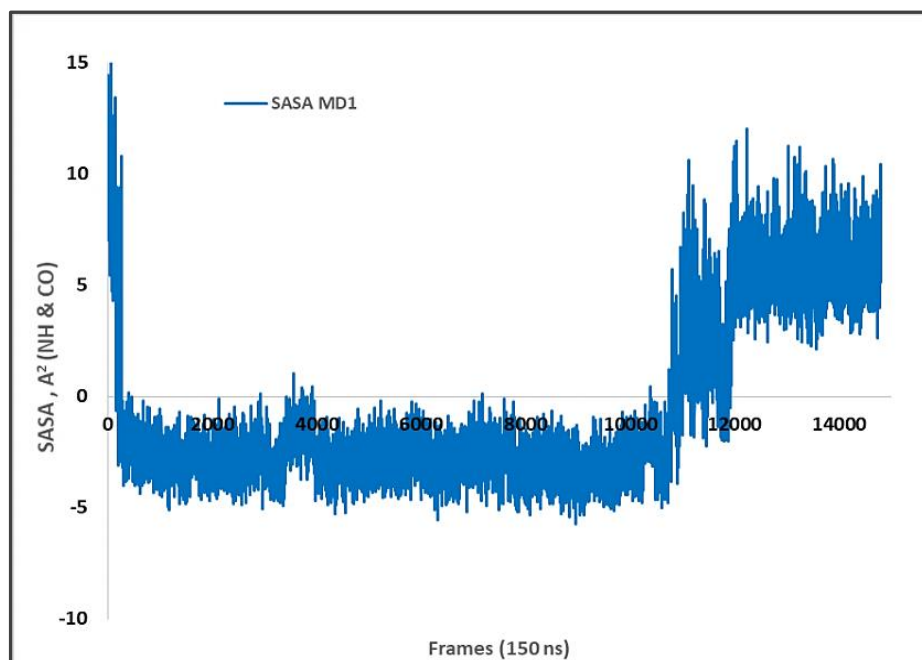


Figura 3.16. Evolución temporal de valores de SASA calculado sobre los átomos protagonistas del BHB 100-96 (NH y CO). Para la proteína MDM2 en su forma apo (réplica MD1).

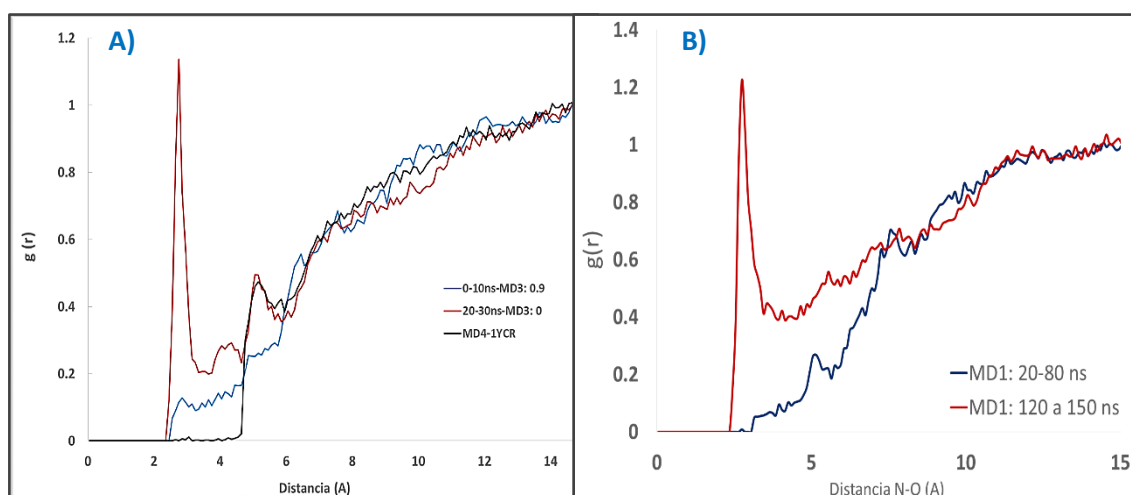


Figura 3.17. Función de distribución radial, $g(r)$, del agua (considerando los átomos de oxígeno del solvente) en el entorno del BHB 100-96 (calculado sobre el O del carbonilo). A) Rojo: para la proteína MDM2 apo (réplica MD3) en un lapso de tiempo donde la propensión dinámica de este BHB es 0. Azul: para la proteína MDM2-apo en un período de tiempo para el cual la propensión dinámica de esta interacción es 0.9. Negro: una réplica aleatoria del complejo MMD2-p53. B) Rojo: para la proteína MDM2 apo (réplica MD1) en un lapso de tiempo donde la propensión dinámica de este BHB es 0. Azul: para la proteína MDM2-apo en un período de tiempo para el cual la propensión dinámica de esta interacción es 0.9.

3.2.1.3- Dinámicas con solventes mixtos:

La utilización de mezclas de solventes orgánicos miscibles con agua resulta inquietante ya que dichos compuestos podrían tener la capacidad de proporcionar cambios en la hidrofobicidad local (o en la hidratación) y de este modo brindar algo más de información relevante concerniente al estudio de modulación de interacciones no covalentes por su entorno local. Por esta razón, llevamos a cabo dinámicas con diversos solventes mixtos (Etanol 20%, Isopropanol 5% y piridina 1%), en

diferentes condiciones utilizando el programa pyMDmix (9). Estos estudios fueron realizados también en el marco de una estancia de investigación dentro del grupo dirigido por el Profesor Xavier Barril.

La interpretación de resultados obtenidos no resulta sencilla; el hecho de que las moléculas orgánicas utilizadas como cosolventes, como el etanol o isopropanol, tengan la capacidad de formar puentes de hidrógeno, suma complejidad. En tal sentido, observamos en algunos casos, precisamente, que dichas moléculas remplazaban (al menos parcialmente) al agua y formaban puentes de hidrógeno con el carbonilo y/o amida, como es el caso del CHB 100-96 (ver **Figura 3.21**). Por otra parte, y por lo visto previamente en dinámicas realizadas en agua, un muestreo adecuado puede requerir largos tiempos de simulación y/o elevados números de réplicas (al menos en algunos casos dónde la dinámica de ruptura y restitución de la interacción que se está considerando es lenta); en tanto que para las diferentes mezclas de solventes utilizadas se realizaron 3 réplicas de 100 ns únicamente, los resultados que se dan a continuación son más bien de índole cualitativo ya que el muestreo alcanzado de este modo puede resultar insuficiente según el caso que se esté considerando.

Aun así, es posible realizar una serie de observaciones interesantes. En la **Figura 3.18** se representa la evolución temporal de propensiones dinámicas para el BHB 100-96; allí podemos ver que inicialmente la interacción no se encuentra formada y progresivamente se va restituyendo. Es interesante notar el ordenamiento diferencial de las moléculas de etanol en el entorno de dicha interacción cuando la misma se encuentra formada o no. En la **Figura 3.18** se incluyen a modo de ejemplo dos imágenes que representan lo antes descripto. En la misma figura se presenta también una $g(r)$ para el ordenamiento del agua en el entorno de los átomos constituyentes de dicha interacción calculada sobre configuraciones de los períodos de tiempo indicados en corchetes (los colores de los corchetes se corresponden luego con el color utilizado en la $g(r)$ del agua). De manera coincidente con las observaciones previas, encontramos que para el lapso de tiempo en el cuál la interacción está formada la misma se encuentra en un ambiente anhidro; y en este caso puntual, y por lo visto en las imágenes, parte de este contexto local hidrofóbico lo proporciona el solvente orgánico (en la **Figura 3.20** se puede observar como el etanol orienta su metilo hacia el HB, confiriéndole un ambiente mas hidrofóbico a dicha interacción). Por otra parte, en la **Figura 3.29** se muestran las correspondientes distribuciones de distancias N-O, para los tres períodos de tiempo marcados en corchetes en la **Figura 3.18** (de nuevo los colores utilizados son coherentes entre ambos gráficos). Allí podemos ver cómo la interacción evoluciona desde un estado no formado, cuyas distancias N-O rondan los 5 Å (rojo), hasta lograrse la restitución de la interacción con distancias en torno a los 3.0 Å (azul), pasando por configuraciones intermedias entre las anteriores (amarillo). Aquí vemos una vez más que las transiciones entre un estado y otro pueden tomar decenas de nanosegundos.

Sin embargo, tal como se mencionó en el principio de este inciso, algo más de complejidad a este análisis es sumado por la posibilidad de formación de puentes de hidrógeno por parte del cosolvente, principalmente en los casos en los que se utiliza etanol e isopropanol. La **Figura 3.21** da cuenta claramente de este hecho; allí se representa la distribución de átomos de oxígeno del etanol en el entorno del carbonilo del residuo 96 (involucrado en el CHB 100-96) para la réplica MD2. Dicha distribución fue evaluada sobre los 100 ns de simulación; para la cual la interacción en consideración prácticamente no se forma. Allí podemos notar un ordenamiento de los átomos de O del etanol entorno a los 3 Å del O del carbonilo involucrado en dicho CHB; de este modo es evidente que el etanol tiene la capacidad de interaccionar por medio de puentes de hidrógeno

con átomos del backbone de la proteína, y en el caso de este BHB puntual incluso reemplazar (al menos parcialmente) el agua antes alojada allí.

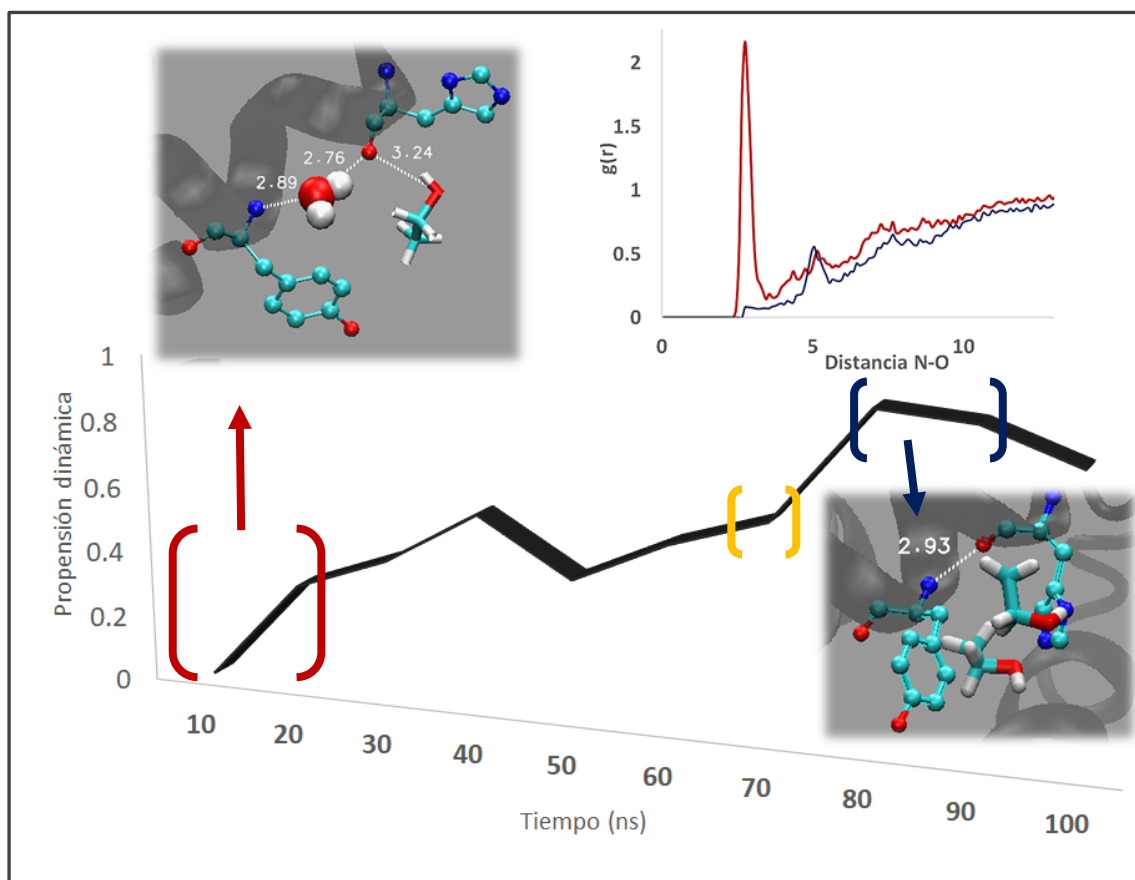


Figura 3.18. Evolución temporal de propensiones dinámicas para el CHB 100-96 en la réplica MD3, utilizando etanol 20% como cosolvente.

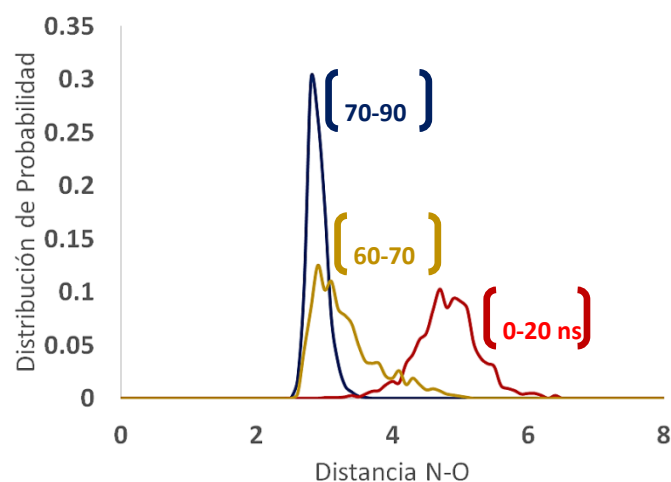


Figura 3.19. Distribuciones de probabilidad de las distancias N-O del CHB 100-96 para la réplica MD3. Los colores utilizados son coherentes con los de la figura 3.18; luego, y entre corchetes se indican los periodos de tiempo sobre los cuáles se calcularon dichas distribuciones.

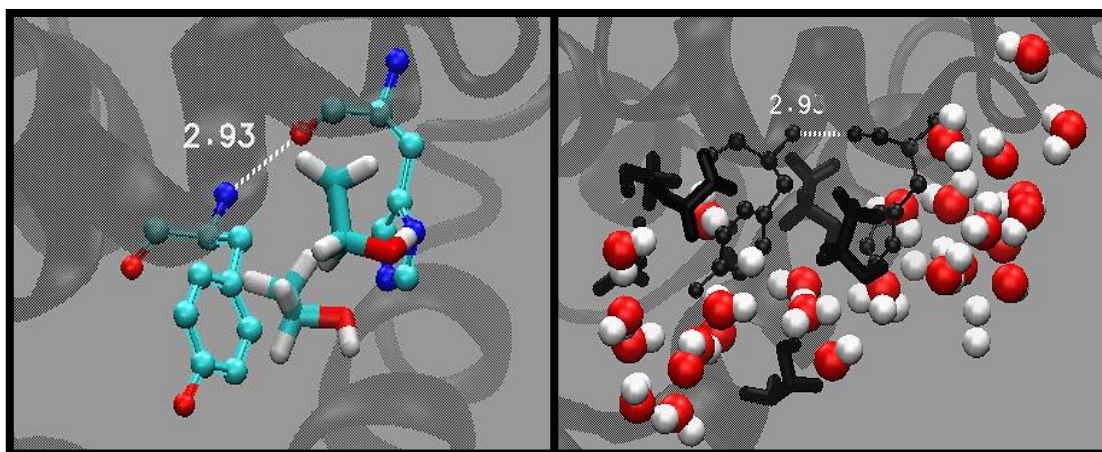


Figura 3.20. Imágenes de una configuración correspondiente al período de tiempo comprendido entre los 70 y 90 ns (corchete azul de la imagen 3.18 y 3.19). Ambas figuras corresponden a la misma configuración; a la derecha se puede ver la ausencia de moléculas de agua en el entorno local del CHB 100-96, en negro se representan las cadenas laterales de los aminoácidos 100-96 y las moléculas de etanol. A la izquierda se esquematizan: *CPK* (modo de representación del programa VMD) los aminoácidos 100-96, y en *bonds* las moléculas de etanol en el entorno local de dicho BHB. En esta imagen la correspondencia de identidad atómica y colores utilizados es: rojo para los átomos de oxígeno, blanco átomos de hidrógeno, azul para los átomos de nitrógeno y cyan para los átomos de carbono.

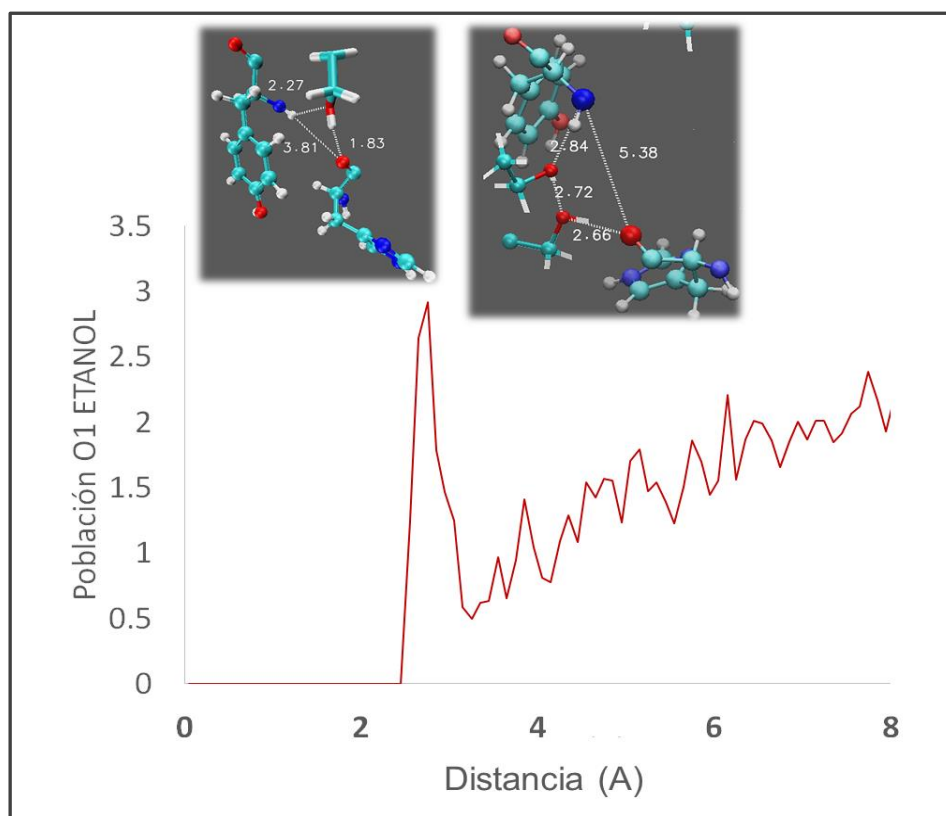


Figura 3.21. Distribución para los átomos de O del etanol en el entorno del CHB 100-96 (considerando O del carbonilo del aminoácido 96). En las imágenes se representan a modo de ejemplo configuraciones puntuales de la réplica MD2, cuyo ensamble de configuraciones da origen a la distribución aquí desplegada. Los colores utilizados para las diferentes identidades atómicas son equivalentes a las de la figura 3.20; luego, los residuos 100-96 se esquematizan en el modo de representación *CPK* del programa VMD, en tanto que para las moléculas de etanol se emplea el modo *bonds* de dicho programa.

En definitiva, y en parte por las propiedades químicas inherentes al cosolvente que se está utilizando, para algunos de los CHBs como es el caso del CHB 100-96, no es posible establecer una tendencia absolutamente clara. Se detectaron

comportamientos del mismo tipo para los CHBs 99-95 y 103-99, cabe resaltar que todos estos BHBs pertenecen a una misma hélice, y forman parte precisamente de una de las regiones más 'desordenadas' de la proteína (ver **Figura 3.2**), por lo tanto es de esperar que la 'rigidización' de toda esta zona conlleve un costo entrópico elevado (tal como se mencionó en varias ocasiones a lo largo de esta tesis, los BHBs son uno de los principales determinantes de estructura en proteínas, consecuentemente es esperable que la restitución de BHBs desencadene una rigidización/ordenamiento al menos localmente). En contraposición al comportamiento ejemplificado previamente con el CHB 100-96, encontramos cambios mucho más rotundos y menos ambiguos en el comportamiento de otros CHBs, como es el caso del BHB 62-58; además, por lo visto previamente en cuanto a la dinámica de ruptura rápida de esta interacción, en este caso sí será posible arribar a resultados cuantitativos, aún cuando estamos considerando un número menor de réplicas.

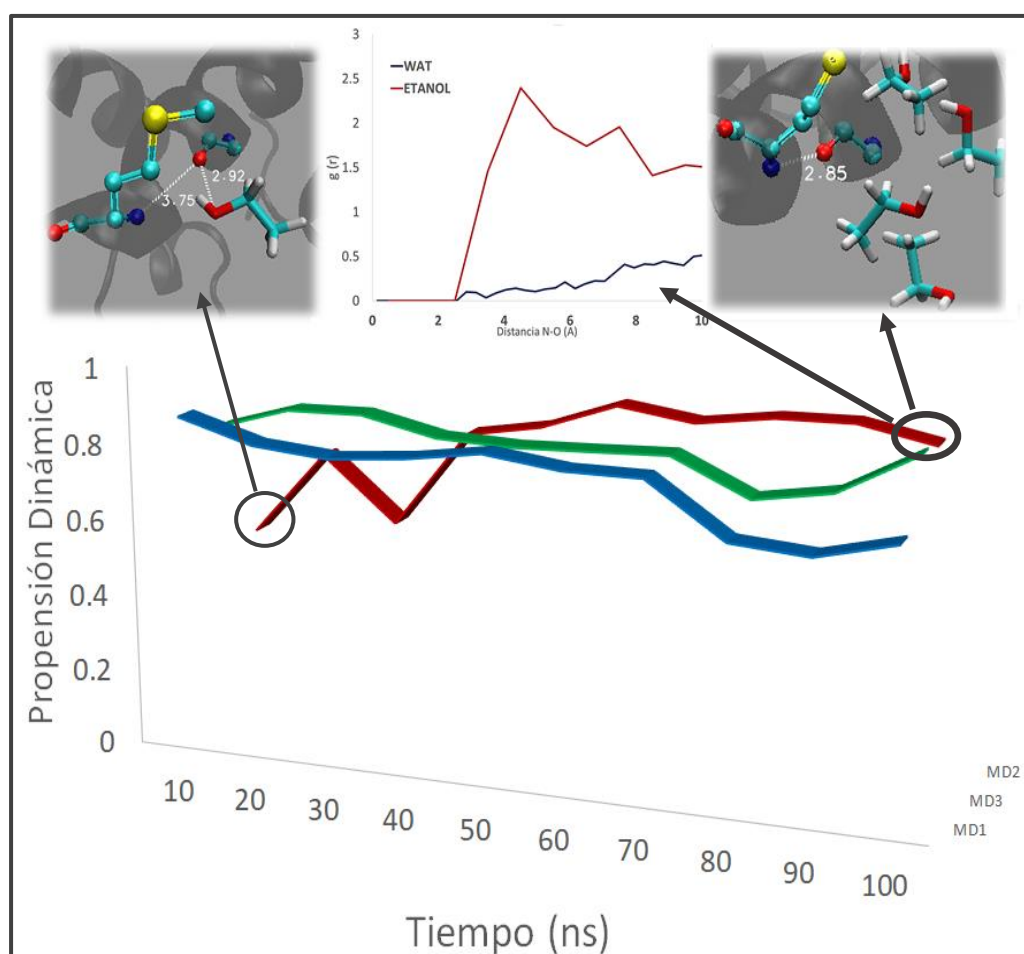


Figura 3.22. Evoluciones temporales de las propensiones dinámicas para el CHB 62-58, esquematizadas sobre 3 réplicas independientes, llevadas a cabo con etanol al 20 % como cosolvente. En la parte superior se muestran configuraciones específicas pertenecientes a los intervalos de tiempo indicados sobre la réplica MD2. Allí se esquematizan: en *CPK* (modo de representación del programa VMD) los aminoácidos 62-58, y en *bonds* las moléculas de etanol en el entorno local de dicho BHB. En esta imagen la correspondencia de identidad atómica y colores utilizados es: rojo para los átomos de oxígeno, blanco átomos de hidrógeno, azul para los átomos de nitrógeno, amarillo corresponde a átomos de azufre, y cian para los átomos de carbono. Adicionalmente, en la parte central se muestra también la distribución del solvente en el entorno de este CHB para los últimos 10 de la réplica MD2.

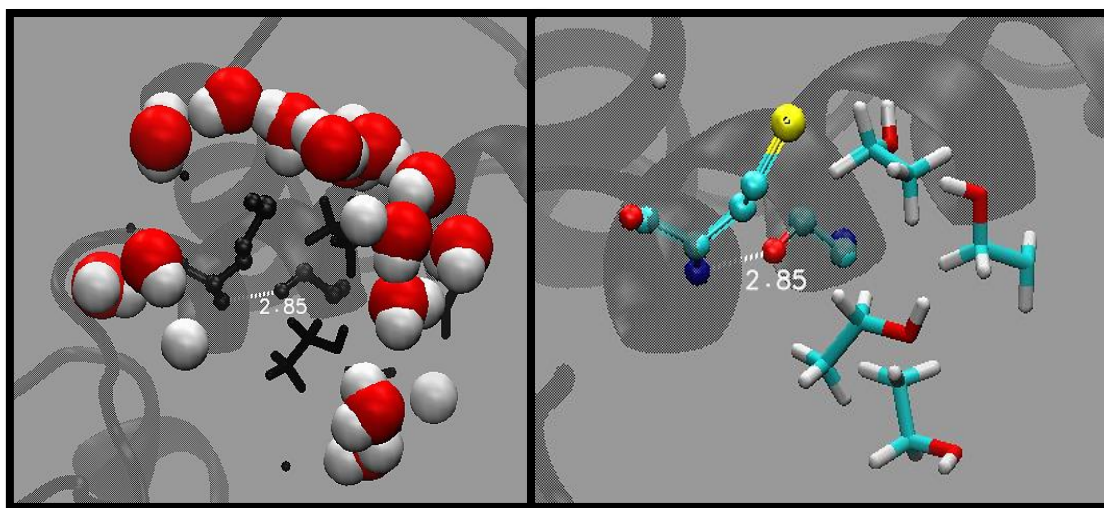


Figura 3.23. Ambas imágenes son representaciones de una misma configuración perteneciente al lapso final de la réplica MD2 (rojo en la figura 3.23). En la imagen de la izquierda, en negro se representan tanto las cadenas laterales de los residuos involucrados en el CHB 62-58, como así también las moléculas de etanol en el entorno inmediato de dicha interacción. A la derecha, se esquematizan: en *CPK* (modo de representación del programa VMD) los aminoácidos 62-58, y en *bonds* las moléculas de etanol en el entorno local de dicho BHB. En esta imagen la correspondencia de identidad atómica y colores utilizados es: rojo para los átomos de oxígeno, blanco átomos de hidrógeno, azul para los átomos de nitrógeno, amarillo corresponde a átomos de azufre, y cian para los átomos de carbono. Adicionalmente, en la parte central se muestra también la distribución del solvente en el entorno de este CHB para los últimos 10 de la réplica MD2.

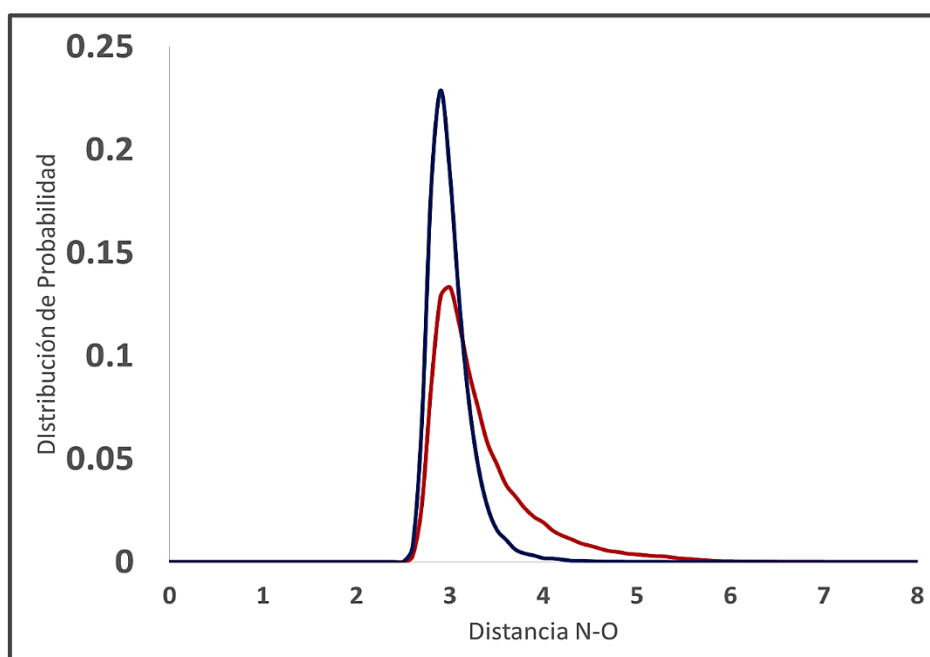


Figura 3.24. Distribuciones de probabilidad de distancias N-O para el CHB 62-58 como función de la distancia entre dichos átomos (dada en Å), calculadas sobre la proteína MDM2 apo. En azul distribuciones para las 3 réplicas de 100 ns utilizando etanol 20% como cosolvente; en rojo 8 réplicas de 150 ns cada de ellas, utilizando únicamente agua como solvente.

A partir de la información volcada en las **Figuras 3.22, 3.23 y 3.24** podemos ver que la interacción aquí considerada (CHB 62-58) claramente tiene un comportamiento diferencial respecto a las dinámicas llevadas a cabo en agua, dónde resulta evidente la modulación de dicha interacción no covalente debido a cambios en el contexto local, atribuibles únicamente a la presencia de moléculas de etanol. En tal sentido, la información más destacable quizás es la reflejada en la **Figura 3.24**, dónde se puede ver que las distribuciones de distancias N-O del BHB en consideración se corren a valores más bajos,

describiendo de este modo una curva más estilizada y prácticamente indiscernible a la manifiesta por el complejo MDM2-p53 (**Figura 3.13**). Adicionalmente si observamos la **Figura 3.22** vemos que las tres réplicas convergen a valores similares de propensión, y por lo visto anteriormente para la dinámica de este BHB dónde observamos que la ruptura y restitución de la interacción están circunscritas en un proceso rápido, y por lo tanto no existe una dependencia determinante con el número de réplicas iniciales evaluadas, podemos considerar los resultados aquí obtenidos de un modo cuantitativo. En la **Figura 3.23**, en tanto, se representa una configuración particular perteneciente al último lapso de tiempo de la réplica MD2; dichas imágenes esquematizan el ordenamiento del etanol en el entorno local de esta interacción, y de este modo, el cambio en las propiedades de hidratación en el entorno inmediato de los átomos protagonistas de la misma. Luego, y como una consecuencia final, resulta evidente la estabilización de este CHB, entendiendo a la misma en términos del porcentaje de tiempo que dicha interacción se encuentra formada según los criterios geométricos aquí considerados (adicionalmente, y tal como se refleja en las distribuciones desplegadas en la **Figura 3.24**, las probabilidades encontradas para las distancias N-O superiores a los 3.5 Å son prácticamente nulas en estas condiciones, es decir, empleando un 20 % de etanol como cosolvente; y manifiestan de este modo un nítido contraste respecto de las dinámicas llevadas a cabo utilizando únicamente agua como solvente, dónde se evidencia una probabilidad apreciable de encontrar al par de átomos considerados a distancias superiores a dicho valor de corte, 3.5 Å). En este mismo sentido, y como una evidencia adicional de lo antes manifestado, si observamos la distribución del solvente en el entorno local del CHB 62-58 (considerando el átomo de oxígeno del carbonilo del residuo 58), evaluada sobre el ensamble de configuraciones pertenecientes a los últimos 10 ns de la réplica MD2, y presentada en la **Figura 3.22**, podemos observar: la contundente ausencia de una primera esfera de solvatación de moléculas de agua (curva azul). Más aún, en el mismo gráfico se representa la distribución de los átomos de carbono del metilo terminal del etanol (rojo), dónde es posible observar su ordenamiento en el entorno inmediato de dicho CHB.

Finalmente, y debido a los motivos explícitos previamente, obtenemos que la propensión dinámica de este BHB pasa de un valor cercano a 0.5, en dinámicas llevadas a cabo únicamente con agua como solvente; a un valor aproximado de 0.8, para las dinámicas dónde se utilizó etanol como cosolvente. Lo anterior, visto en términos relativos, implica un incremento en su tendencia a la formación de aproximadamente un 60%; y dicha modulación es directamente atribuible a la presencia de un cosolvente con regiones hidrofóbicas.

A continuación, consideraremos los resultados obtenidos para el CHB 66-61, el cuál describe una situación intermedia respecto a las observadas y desarrolladas hasta el momento. En principio, en la **Figura 3.25, 3.26 y 3.27** mostramos los resultados de los estudios de convergencia con respecto al número de réplicas y tiempos de simulación para este BHB, así como también los perfiles de energía libre para el proceso de ruptura de dicha interacción y las correspondientes distribuciones de distancias N-O.

Luego, y tal como se había mencionado previamente, este BHB presenta una dinámica para la ruptura y restitución de la interacción lenta similar al CHB 100-96. Esto es, una dinámica caracterizada por un equilibrio entre conformaciones en las cuales el BHB está presente y conformaciones describiendo una condición opuesta (específicamente con distancias entre los átomos de N-O de unos 5 Å). Pero, aun así, observamos que si se evalúan réplicas lo suficientemente largas (como las aquí consideradas, 150 ns), los valores de propensión dinámica promedio así determinados, convergen de manera

independiente al número inicial de réplicas que se consideren (una digresión quizás relevante en este punto, es que este es obviamente el comportamiento esperado cualquiera sea el fenómeno que se esté estudiando, lo cual en otras palabras implica el cumplimiento de la hipótesis de ergodicidad). Luego, y por lo expuesto previamente, es que atribuimos a esta interacción un comportamiento con características 'intermedias', entre las circunscritas al CHB 100-96 (como dicho previamente, caracterizado por una dinámica lenta para el proceso de ruptura y restitución de dicha interacción, donde el valor promedio de propensión determinado es altamente dependiente del número inicial de réplicas consideradas para dinámicas de 150 ns, como las aquí evaluadas), y las descriptas por el CHB 62-58 (caracterizado por una dinámica rápida para dicho proceso, lo cual en otras palabras implica, independencia del valor promedio de propensión dinámica determinado con respecto al número inicial de réplicas consideradas, en los tiempos aquí evaluados).

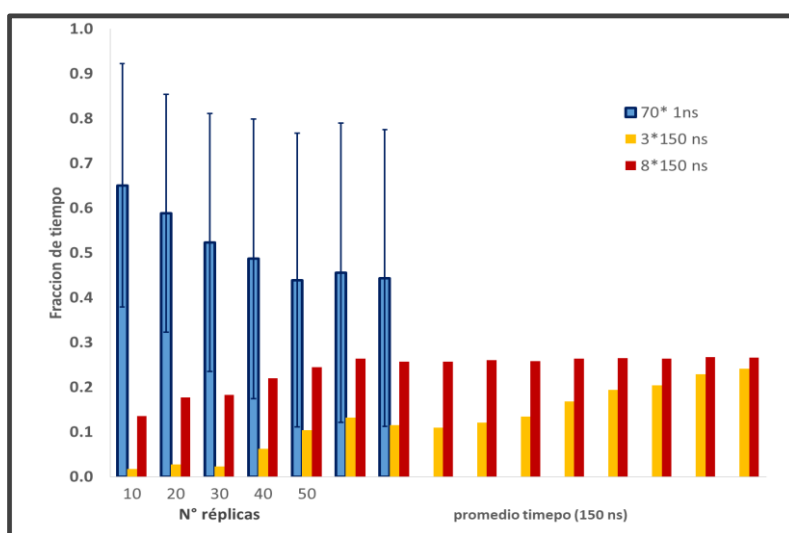


Figura 3.25. Propensiones dinámicas para el BHB 66-61, evaluadas sobre dinámicas en solución de la proteína MDM2-apo. Como función de: en azul número de réplicas, en amarillo promedio en el tiempo sobre 3 réplicas, y en rojo promedios en el tiempo sobre 8 réplicas.

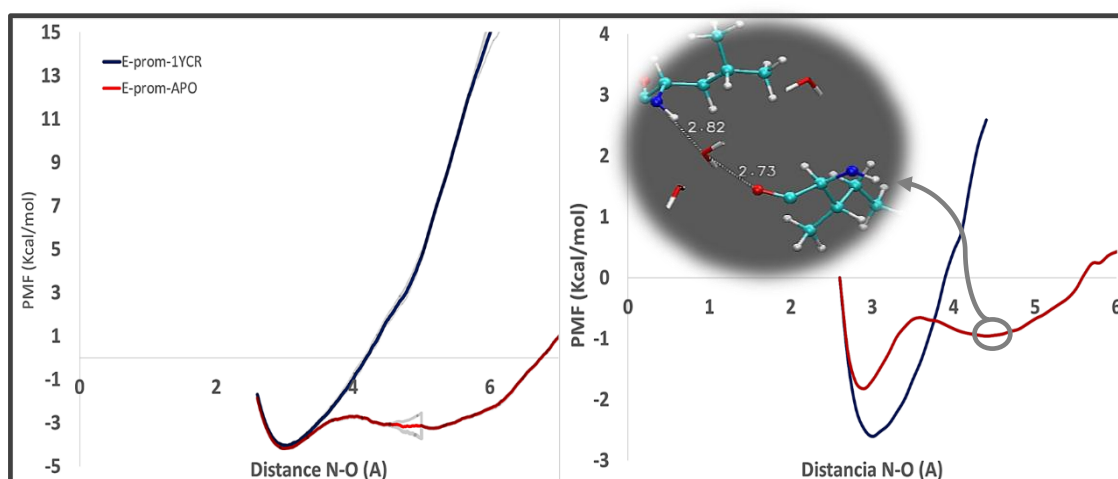


Figura 3.26. A) PMF para el CHB 66-61, como función de la distancia N-O de dicha interacción, obtenido por ASMD. B) PMF para la misma interacción obtenido a partir de la función de correlación de a pares para dicho BHBs, determinadas sobre dinámicas no sesgadas. En este último caso se muestra, a modo de ejemplo, una configuración correspondiente al segundo mínimo del perfil de energía libre manifestado para la proteína MDM2 en su forma apo. Luego, en ambos casos, en azul se representan los resultados del complejo MDM2-p53 y en rojo la performance de la proteína MDM2 en su forma apo.

En las **Figuras 3.28 y 3.29** se muestran una serie de resultados para el CHB 66-61, obtenidos a partir de las dinámicas con solventes mixtos. En la primera de dichas figuras, se muestran las evoluciones temporales para las propensiones dinámicas de dicha interacción para las 3 réplicas aquí evaluadas; en la misma figura se correlacionan además las diferencias en las propiedades de hidratación local (descriptas a partir de las funciones de distribución radial para el agua en el entorno de los átomos protagonistas de este CHBs) con la evolución temporal de los valores de propensiones. Puntualmente, se esquematizan dichos resultados sobre la réplica MD2, para los dos períodos de tiempo allí denotados con corchetes (0-50 ns y 50-100 ns). Resulta clara una vez más la relación entre propiedades locales de hidratación y estabilidad para este BHB (una vez más, entendida en términos de sus propensiones dinámicas). En tanto que, en la **Figura 3.29** se considera el ordenamiento del solvente en el entorno de los átomos protagonistas de esta interacción para las réplicas MD1 y MD3. En rojo se representan los átomos de carbono del etanol (del metilo más alejado del hidroxilo), en amarillo los átomos de oxígeno del hidroxilo de dicho cosolvente orgánico, y finalmente en azul el ordenamiento de los átomos de oxígeno del agua. Luego, en la **Figura 3.27** se muestra además la distribución de distancias N-O del CHB 66-61 para las tres réplicas en las cuales se utilizó etanol al 20 % como cosolvente. De dicha gráfica podemos ver que la población en el segundo pico ha disminuido notoriamente respecto a la proteína en su forma apo, cuyas dinámicas fueron realizadas en agua únicamente. Adicionalmente, si en dicha gráfica no se incluye la réplica MD2 vemos la desaparición completa del segundo pico en las distribuciones de distancias N-O (en dicha réplica la interacción se encuentra inicialmente por unos 30 ns no formada, recién a partir de los 60 ns se restituye y finalmente convergen las 3 réplicas a valores similares de propensión).

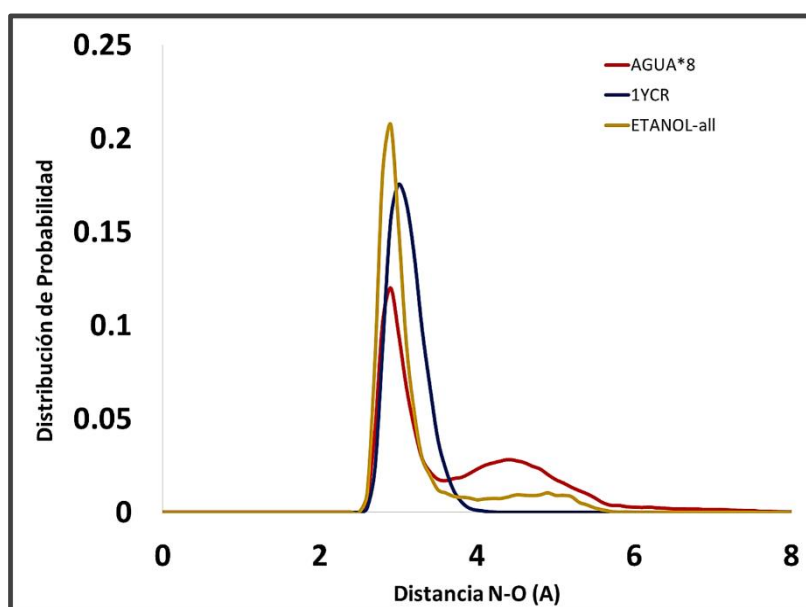


Figura 3.27. Distribuciones de probabilidad de distancias N-O para el CHB 66-61 como función de la distancia entre dichos átomos (expresada en Å), calculadas para la proteína MDM2. En azul distribuciones para 8 réplicas de 40 ns para el complejo MDM2-p53 (PDB: 1YCR); en rojo 8 réplicas de 150 ns cada de ellas para la proteína en su forma apo, para ambas utilizando únicamente agua como solvente; luego, en amarillo MDM2 apo utilizando etanol 20% como cosolvente.

Por lo expuesto previamente, una vez más podemos correlacionar la modulación de una interacción no covalente con cambios en las propiedades de hidratación locales. Más específicamente y en términos cuantitativos, si consideramos un valor promedio de las propensiones dinámicas para las 3 réplicas llevadas a cabo utilizando etanol al 20 % como cosolvente frente al correspondiente valor descrito para las dinámicas utilizando sólo agua como solvente, vemos un incremento en dicho parámetro que va de 0.3 (dinámicas en agua) a 0.7 (aproximadamente para las dinámicas con solventes mixtos); lo anterior visto en términos relativos implica un aumento superior al 100 % en la tendencia a la formación de dicha interacción.

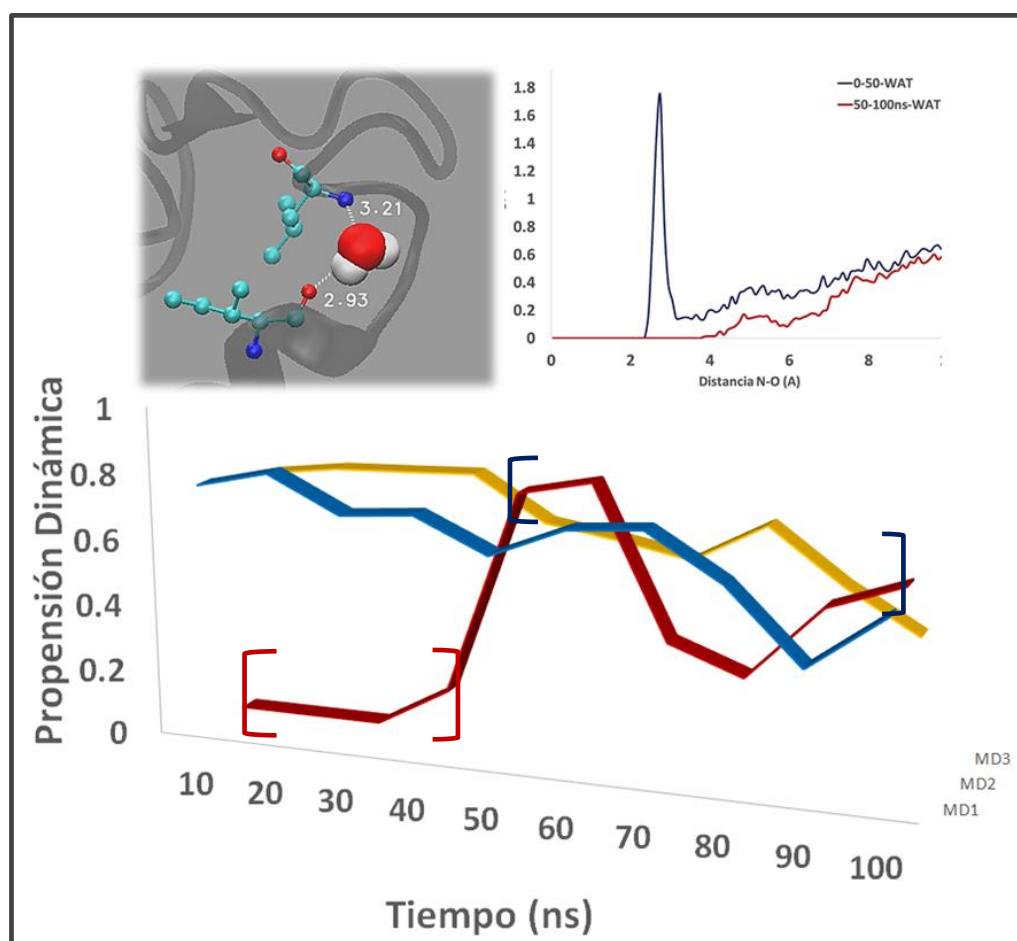


Figura 3.28. Evoluciones temporales de las propensiones dinámicas para el CHB 66-61, evaluadas sobre 3 réplicas independientes llevadas a cabo con etanol al 20 % como cosolvente. En la parte superior se muestra la distribución del agua en el entorno del CHBs 66-61 ($g(r)$) para la réplica MD2 en dos períodos de tiempo diferentes indicados con corchetes en la imagen (los colores utilizados son coincidentes). Luego, en la imagen superior es esquematiza a modo de ejemplo una de las configuraciones halladas para el sistema perteneciente al período de tiempo que va desde 0 hasta los 40 ns. En la misma, en el modo de representación *CPK* del programa VMD los aminoácidos 66-61, y en *VDW* moléculas de agua en el entorno inmediato a dicho CHB.

Finalmente, y a modo de conclusión parcial de los diversos resultados recogidos hasta el momento, destacamos la relación (de proporcionalidad inversa) entre el grado de exposición al solvente, de una determinada interacción no covalente, con su estabilidad (la misma entendida en términos del período de tiempo que dicha interacción está presente de acuerdo con criterios geométricos). En otras palabras, la modulación observada sobre diversos BHBs es atribuible a cambios en sus

propiedades de hidratación locales. Dichos resultados fueron manifiestos mediante la implementación de simulaciones de dinámica molecular de la proteína MDM2 en su forma apo, utilizando únicamente agua como solvente, así como también, mezclas de agua y diversos solventes orgánicos. En este punto resulta necesario mencionar que para las demás mezclas utilizadas, puntualmente isoropropanol (5%) y piridina (1%), los resultados obtenidos fueron similares a los enumerados anteriormente.

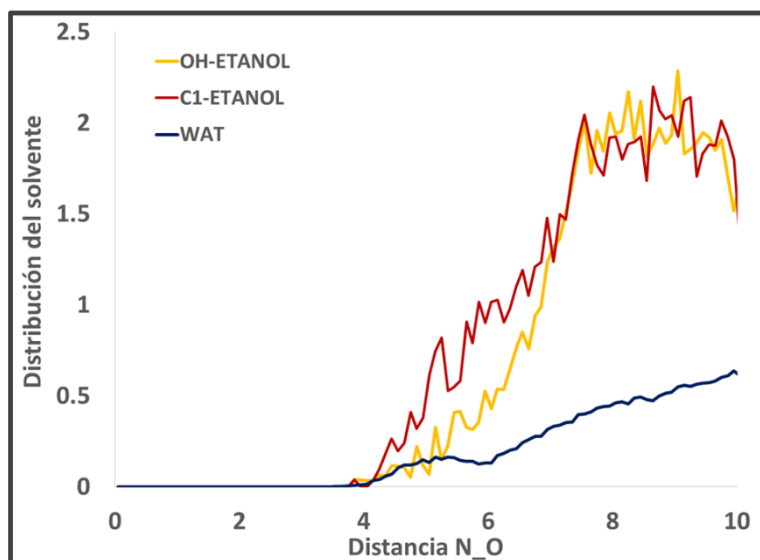


Figura 3.29. Distribución del solvente en el entorno del CHB 66-61 (contemplando el O del grupo carbonilo de dicho BHB), como función de la distancia a dicho átomo de la proteína MDM2 (unidades en Å); para las réplicas MD1 y MD3. Azul: agua, Amarillo: oxidrilo del etanol, Rojo: metilo terminal del etanol (más alejado del oxidrilo).

3.3- Propiedades de unión de los CHBs:

En el capítulo anterior se realizaron dos observaciones importantes relacionadas con las propiedades de unión de los puentes de hidrógeno camaleónicos. En primer lugar se identificó un claro enriquecimiento de dichos motivos en sitios de binding; en segundo lugar se demostró la restitución de la estabilidad de dichos BHBs, tanto en complejos proteína-ligando como así también proteína-proteína. Ambos hechos nos anticipan las características adhesivas de los puentes de hidrógeno camaleónicos.

De este modo, en la presente sección estudiaremos las propiedades de unión de los CHBs, en principio mediante experimentos de 'alanine scanning' computacional de los diferentes 'hot spot' de p53; posteriormente, racionalizaremos la formación del complejo MDM2-Nutlin 3a y evaluaremos las contribuciones al binding (en términos de propensiones dinámicas de CHBs) de diversos fragmentos de dicho inhibidor del complejo MDM2-p53. Finalmente, evaluaremos el alcance cuantitativo de los estudios de propensiones dinámicas de puentes de hidrógeno.

3.3.1- Estudio de 'Alanine Scanning' computacional de la interface MDM2-p53:

Experimentos de *Alanine Scanning* (mutaciones puntuales sobre la forma *Wild Type* por alanina en p53, y posteriores determinaciones en el cambio de energía libre de formación del complejo con MDM2), determinaron a los residuos: PHE-19, TRP-23 y LEU-26 (10) como hot spots de p53 (principales contribuyentes a la energía libre de formación del complejo). De

este modo, llevamos a cabo estudios de *Alanine Scanning* computacional mediante mutaciones de cada uno de estos residuos por alanina con el objetivo de cuantificar su impacto en los correspondientes CHBs de MDM2. En primer lugar mutamos el residuo PHE 19 en la forma *Wild Type* de p53 por alanina y realizamos simulaciones por Dinámica Molecular de dicho complejo. Dicha mutación la realizamos reemplazando la cadena lateral del residuo en cuestión por un grupo metilo (cadena lateral de la alanina) sobre la configuración reportada en el PDB para el complejo MDM2-p53 (PDB: 1YCR). Adicionalmente, como la estructura reportada para p53 en el PDB: 1YCR es sólo un pequeño fragmento de la proteína completa (son específicamente solo 10 aminoácidos, AA) se decidió restringir la posición de los carbonos alfa con el objetivo de conservar la estructura de tipo hélice alfa a la que dan origen dichos residuos. Al evaluar el impacto producido por el remplazo de este residuo en las propensiones dinámicas de los diversos CHBs encontramos que la dinámica del CHB 62-58 se vio claramente perturbada. Más precisamente, la tendencia a la ruptura de este BHB aumentó en un 103 % con respecto a los valores medios presentados para el complejo *Wild Type* (el tiempo que esta interacción permaneció no formada pasó de una fracción menor al 6% a un 12 % aproximadamente cuando la mutación fue efectuada). De este modo, esta labilización de la interacción resulta importante sólo en términos relativos; pero dada la estabilidad reportada para las diversas interacciones para el complejo MDM2-p53 (altos valores de propensión y muy bajos valores de desviación estándar), este impacto es lo suficientemente notorio como para ser considerado. De todos modos, estos resultados pueden ser entendidos en términos del modo en el cuál se llevaron a cabo dichos experimentos computacionales; ya que en definitiva lo que estamos haciendo es reemplazar la cadena lateral de un determinado residuo dentro de una configuración estructural que fue alcanzada por la forma *Wild Type*. Las razones en la elección de este tipo de simulaciones, y no una situación más fidedigna de un proceso de *Alanine Scanning* (experimentos húmedos) dónde en primer lugar se realiza la mutación y luego se someten a asociación dichas proteínas, resultan un tanto obvias: el tiempo de cómputo que sería necesario y la complejidad del experimento computacional planteado. Además, dichos esfuerzos no tendrían sentido ya que no es el objetivo realizar en este punto una estimación cuantitativa de la energética asociada con cada hot spot particular, sino que el objetivo en consideración es la elucidación cualitativa de las diversas interacciones aquí presentadas como CHBs. En este mismo sentido es importante mencionar que para cada mutación en estudio se realizaron dinámicas de 40 ns cada una de ellas, entonces, y por lo visto previamente en los análisis de convergencia, el muestreo aquí contemplado podría aún ser insuficiente; pero nuevamente, como el espíritu en este punto no es realizar una determinación de índole cuantitativa sino cualitativa no representa esto un problema. En tal caso, si la tendencia es ya observada con esta cantidad de muestreo, al considerarse más réplicas o tiempos mayores de simulación, podríamos eventualmente ver un asentamiento de dicho efecto. Pero en definitiva, y a los fines cualitativos aquí perseguidos, esta cantidad de muestreo resulta suficiente.

Retomando con los resultados, la mutación de TRP 23 por alanina conllevó a un incremento en la tendencia disruptiva del CHB 57-53 del 55 % comparado con la situación *Wild Type*. Finalmente, la mutación de la LEU 26 por alanina promovió una disminución en la tendencia a la formación del CHB 99-95 en un 120% en comparación a la forma del complejo no mutado, de este modo esta interacción pasó a no estar formada aproximadamente el 35 % del tiempo. Estas inferencias nos indican que la mutación de estos residuos hidrofóbicos por alanina resulta en una labilización de ciertos CHBs de MDM2 por pérdida justamente de contexto, en este caso puntual proporcionada por residuos de la diana natural p53. Finalmente, y más allá de

la índole meramente cualitativa de los resultados, es importante destacar que mediante simulaciones de dinámica molecular simples y por aplicación de análisis de propensiones de puentes de hidrógeno fue posible detectar el efecto impartido por la mutación de los residuos energéticamente más relevantes de p53 en la unión con MDM2 (dicho efecto contemplado en términos de la labilización ocasionada sobre una serie de CHBs intermoleculares de MDM2, previamente clasificados como CHBs).

3.3.2- Estudio de las propiedades de binding con MDM2, del inhibidor Nutlin-3a:

Nutlin-3a es una potente molécula disruptiva del complejo MDM2-p53 (10,11). Este inhibidor mimetiza la acción de p53 colocando motivos hidrofóbicos en los sitios donde la diana natural localiza tres residuos de iguales características químicas (PHE 19, TRP 23 y LEU 26) identificados como hot spot de p53 (10,11). En este inciso desarrollaremos los resultados obtenidos de estudios realizados sobre el proceso de unión de Nutlin-3a a MDM2; en este sentido, condujimos una serie de simulaciones de Dinámica Molecular para el complejo formado entre dicho compuesto y MDM2 en una configuración de su forma apo. Usamos el PDB: 1ZIM y ajustamos el número de residuos a la misma región reportada para MDM2 en diversos complejos, ya sea con p53, así como también con diversas moléculas disruptivas. En otras palabras, recortamos los primeros 25 residuos y los últimos 10; es importante mencionar que procedimos de este modo justamente para evitar situaciones en las cuales estos residuos pudieran estar obstruyendo el sitio de unión de MDM2 con p53. En tal sentido, también es importante decir que posteriormente en los siguientes estudios cuantitativos no se considerará la 'restitución' o cambios inducidos por las diversas moléculas evaluadas en el CHB 103-99 por estar justamente muy próximo a estas regiones (podría ser evaluado, pero aquí no será considerado por los largos tiempos de simulación requeridos). De este modo, esta estructura de MDM2 fue minimizada y equilibrada hasta la obtención de valores de RMSD constantes (alcanzados en unos 50 ns). Luego, a partir de una de estas configuraciones de la proteína (ya equilibrada), formamos el complejo MDM2*-Nutlin-3a (MDM2* hace referencia a la configuración de MDM2 obtenida como se indica previamente) por superposición con la estructura reportada experimentalmente para dicho complejo (PDB: 4HG7). Finalmente evaluamos el proceso de unión de dicha molécula a partir de 4 réplicas independientes de dinámica molecular, de 20 ns cada una. En la **Figura 3.31** se representa la evolución temporal del complejo MDM2*-Nutlin-3a durante el proceso de binding. A partir de las imágenes podemos observar que el sitio de binding de MDM2 va progresivamente evolucionando hacia una conformación más estructurada en el tiempo a medida que los CHBs de dicha proteína son estabilizados por cambios en el entorno local provistos por Nutlin-3a. Este efecto es particularmente notorio en la hélice alfa más próxima al extremo N-terminal de MDM2; esta es una región de elevadas fluctuaciones estructurales en la proteína en su forma apo (recordar **Figura 3.2**), luego bajo formación del complejo se logra la restitución de dicho motivo estructural (hélice alfa).

Posteriormente estudiamos la propensión dinámica a la formación de los HBs identificados previamente como CHBs, para el complejo MDM2*-nutlin-3a. Tal como se explicó previamente, simulamos el proceso de binding de la molécula en consideración partiendo desde la forma no ligada para la proteína. En la **Figura 3.31** mostramos la estabilidad de los diferentes CHBs una vez formado el complejo. De este modo, podemos observar que esta molécula disruptiva del complejo MDM2-p53 tiene la capacidad de estabilizar varios de los CHBs de MDM2, aunque en algunos casos, como los CHBs 99-95 y 103-99 la estabilización alcanzada, al menos en los tiempos aquí contemplados, es parcial.

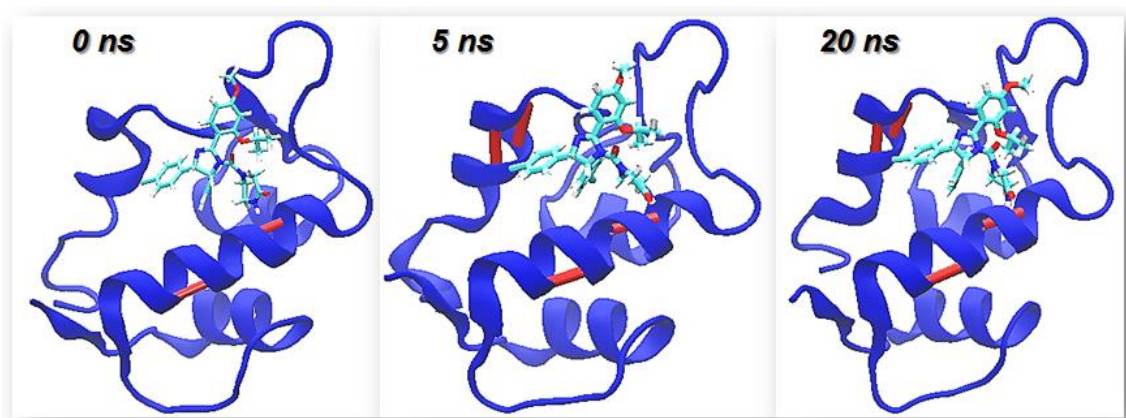


Figura 3.30. Evolución temporal del complejo MDM2*- Nutlin 3a.

Además, y como una forma adicional de evidenciar la relevancia de los CHBs en el binding, condujimos un estudio en el cual evaluamos el impacto o las contribuciones de diversas porciones de la molécula nutlin-3a en la formación del complejo con MDM2, en términos de estabilización de diversos CHBs. Es decir, eliminamos el anillo 1 o 2 (tal como se muestra en la **Figura 3.32**) y realizamos simulaciones de dinámica molecular siguiendo exactamente el mismo protocolo que antes, pero ahora con el fragmento restante de dicha molécula y evaluamos nuevamente propensiones dinámicas a la formación de los CHBs. Dichos resultados se detallan en la **Figura 3.33**. Allí podemos ver que los dos anillos de Nutlin-3a presentan diferentes impactos en la estabilización de los CHBs 62-58, 99-95 y 100-96. De este modo, si comparamos los resultados obtenidos para los fragmentos de Nutlin-3a con el efecto de la molécula entera o el efecto de p53, podemos visualizar la potencialidad de este método en el desarrollo de una nueva herramienta, aplicable por ejemplo en la optimización de ligandos (y con la ventaja no menor de ser ortogonal a las diversas metodologías ya existentes).

		nutlin- 3a
RES	PROM	
54	50	0.95
57	53	0.94
62	58	0.69
99	95	0.66
100	96	0.93
103	99	0.54

Figura 3.31. Propensiones dinámicas para el complejo MDM2*-Nutlin 3a.

Es importante aclarar que la elección de los tiempos de simulación y el número de réplicas considerados, surge de un balance entre confiabilidad de los resultados obtenidos y tiempos de computo invertidos, esta última variable cobra mayor importancia aún si se considera que se pretende aplicar la técnica para evaluar la performance de una batería de compuestos. En relación a este último punto, en la **Figura 3.34** se muestra la evolución temporal de propensiones dinámicas para los CHBs aquí considerados; allí podemos observar que los valores de propensión convergen a lo largo del tiempo, excepto para el puente de hidrógeno 103-99, por tal motivo y tal como se detalló previamente, la performance de esta

interacción no será considerada de manera cuantitativa (nuevamente, y tal como se expresó previamente, podría ser considerada sólo si se evaluaran tiempos mayores). Además vale la aclaración de que el comportamiento descrito en la **Figura 3.35** sólo se observó para las moléculas de mayores afinidades, en cambio y como ya veremos detalladamente a continuación, para compuestos de afinidades moderadas las fluctuaciones en las propensiones de los diversos CHBs evaluados perduraron en general durante todo el período de tiempo aquí considerado (ver **Figura 3.37**). Aún así, y en lo que a las evaluaciones cuantitativas de esta metodología respecta, lo dicho previamente no necesariamente es un inconveniente ya que si la performance de un determinado compuesto es sub-óptima la situación antes descrita es incluso esperable.

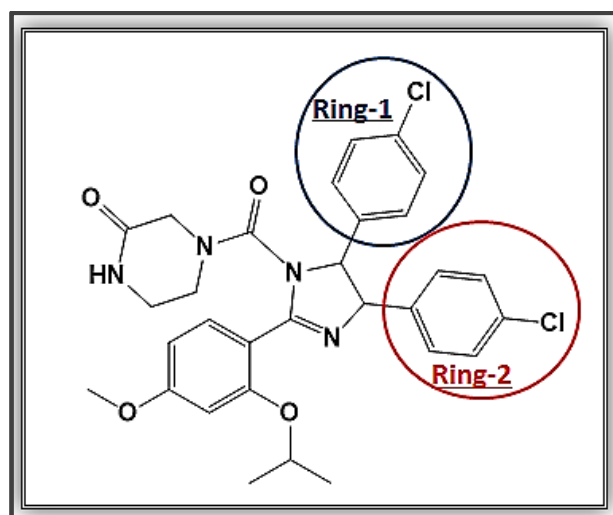


Figura 3.32. Estructura química del inhibidor Nutlin-3a. Se destaca allí los diversos fragmentos que fueron suprimidos, los resultados para cada una de estas dos situaciones se representan en la figura 3.33.

				Nutlin-3a*	
RESIDUO (CHBs)				Sin anillo- 1	Sin anillo- 2
LEU	MET	54	50	0.904	0.953
LEU	VAL	57	53	0.939	0.922
MET	GLY	62	58	0.510	0.672
ILE	GLU	99	95	0.771	0.173
TYR	HIE	100	96	0.605	0.584
ILE	ILE	103	99	0.510	0.435

Figura 3.33. Propensiones dinámicas para los complejos formados entre MDM2* y dos fragmentos de Nutlin-3a.

3.3.3- Estudio de binding de moléculas de diferentes afinidades:

Finalmente, y con el objetivo de explorar características cuantitativas de los análisis de propensiones de puentes de hidrógeno, estudiamos la unión a MDM2 de una serie de pequeñas moléculas, de afinidad y características químicas diversas. Posteriormente comparamos estas medidas con métodos tradicionales, como cálculos de energía libre de binding. El set de molécula que estudiamos fueron: compuesto 14-b (12), Nutlin-3a (10), compuesto- 1a (13) y finalmente el compuesto Ding-1a (14); en la **Figura 3.35** se representan las estructuras químicas de dichos ligandos. En todos los casos el estudio de binding

se realizó exactamente del mismo modo cómo fue descrito previamente para Nutlin-3a. En el caso del compuesto Ding I-a (y debido a que no existen datos experimentales para dicho compuesto), la configuración de partida para las posteriores dinámicas de producción fue obtenida mediante la utilización del programa de docking Autodock 4.0 y la validación del algoritmo de búsqueda (y el protocolo puntual aquí utilizado) se llevó a cabo con el compuesto I-a.

Consideramos en todos los casos la performance promedio de los diferentes compuestos con respecto a los diferentes CHBs evaluados; es decir que obtuvimos valores promedio sobre las propensiones dinámicas de las interacciones consideradas (o de manera equivalente se podrían informar distancias de matriz), y llamamos a este valor como Propensión Media, PM (o en el caso de distancias lo llamamos DMM, distancias de matriz media). En este punto vale la pena aclarar que quizás resulta más apropiado describir la performance de un set de ligandos en términos de PM y no DMM, ya que en muchas ocasiones podemos no contar con una estructura cristalográfica de referencia, más aún si se trata de evaluaciones predictivas de compuestos aún no ensayados experimentalmente en dicho contexto.

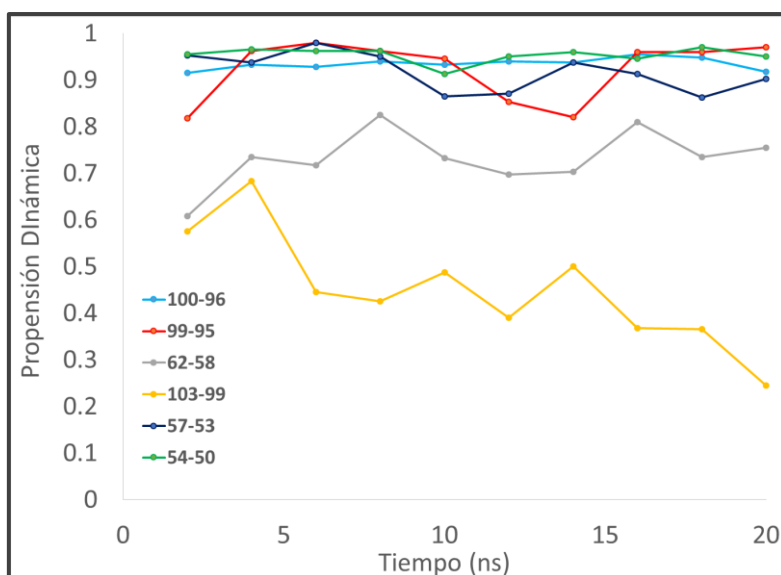


Figura 3.34. Evolución temporal de las propensiones dinámicas de los BHs: 54-50, 57-53, 103-99, 62-58, 99-95, y 100-96, discriminando su comportamiento de manera individual, para una réplica aleatoria del complejo MDM2*-Nutlin 3a.

Adicionalmente, comparamos la performance en términos cuantitativos de la metodología propuesta frente a la alcanzada por cálculos de energía libre de formación de los diversos complejos en consideración: dichos cálculos fueron realizados mediante los métodos MM-GBSA y MM-PBSA, evaluados en todos los casos sobre 1000 configuraciones igualmente espaciadas a lo largo de dinámicas de 20 ns, y como un promedio de 4 réplicas; los resultados se detallan por compuesto y réplicas de los respectivos complejos en la **Figura 3.38**.

En la **Figura 3.36** se presentan la relación existente entre los valores de PM (propensión media) y el logaritmo de los valores de IC_{50} experimentales para dichos compuestos. De allí se desprende que en principio las propensiones dinámicas de puentes de hidrógeno nos permitirían distinguir entre compuestos de diferentes afinidades. De todos modos, es importante resaltar que más allá de que el objetivo central aquí fue indagar justamente en las características cuantitativas

de esta metodología, aun así resulta evidente la necesidad de ampliar el número de compuestos a evaluar para poder determinar la robustez de la metodología aquí propuesta.

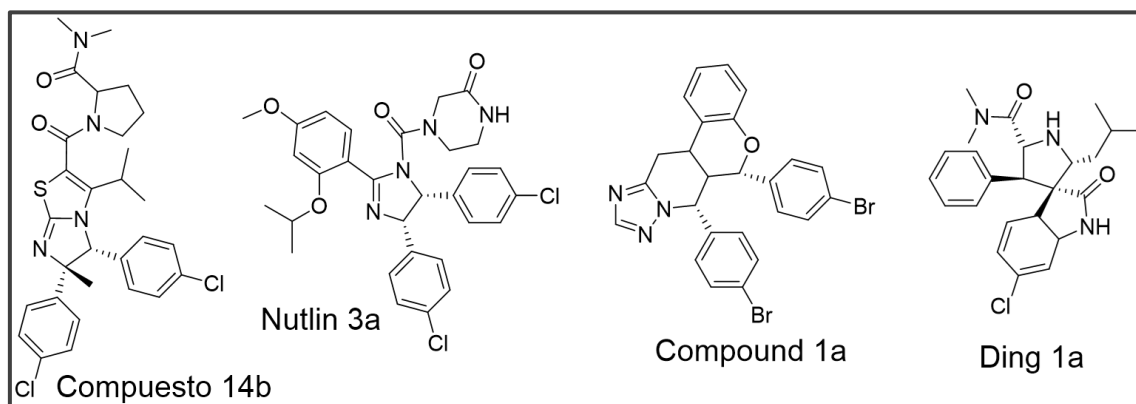


Figura 3.35. Estructuras químicas del set de compuestos evaluados.

Por otra parte, en la **Figura 3.37** se representan para cada uno de los diversos compuestos estudiados, las evoluciones temporales de los valores de PM, discriminando además la performance para cada una de las réplicas consideradas para los diversos complejos aquí considerados. Allí podemos observar tal cómo se mencionó previamente y sobre todo para los compuestos de actividades más moderadas, que no hay convergencia entre las diferentes réplicas evaluadas; tal como se indicó esta puede ser una situación esperable para compuestos con una performance sub-óptima, descrita en términos de su capacidad para restituir los diversos CHBs determinados para la proteína blanco. De todos modos, según los resultados aquí mostrados, el muestreo realizado resultaría en principio suficiente (fue posible discriminar los diversos compuestos en términos de PM, de manera coherente con los datos experimentales de afinidad para los mismos). De todos modos, como ya mencionado, en un futuro sería necesario evaluar de una manera mucho más sistemática el impacto según tiempos de simulación y número de réplicas considerados, sobre un set de validación que contemple una mayor cantidad de compuestos.

Por otra parte, si observamos los valores obtenidos de los cálculos de energía libre de formación de los complejos aquí considerados (**Figura 3.38**), vemos que sólo nos permitirían discriminar el compuesto menos activo, es decir Ding-1a, de los demás; adicionalmente si comparamos los resultados obtenidos por los estudios de propensiones dinámicas de puentes de hidrógeno con los cálculos de energía libre de formación de los diversos complejos, resulta evidente la obtención de una mejor performance para la primera metodología. En este sentido entonces, y más allá de las consideraciones mencionadas previamente, podemos vislumbrar de manera auspiciosa la implementación de los estudios de propensiones de puentes de hidrógeno como metodología cuantitativa.

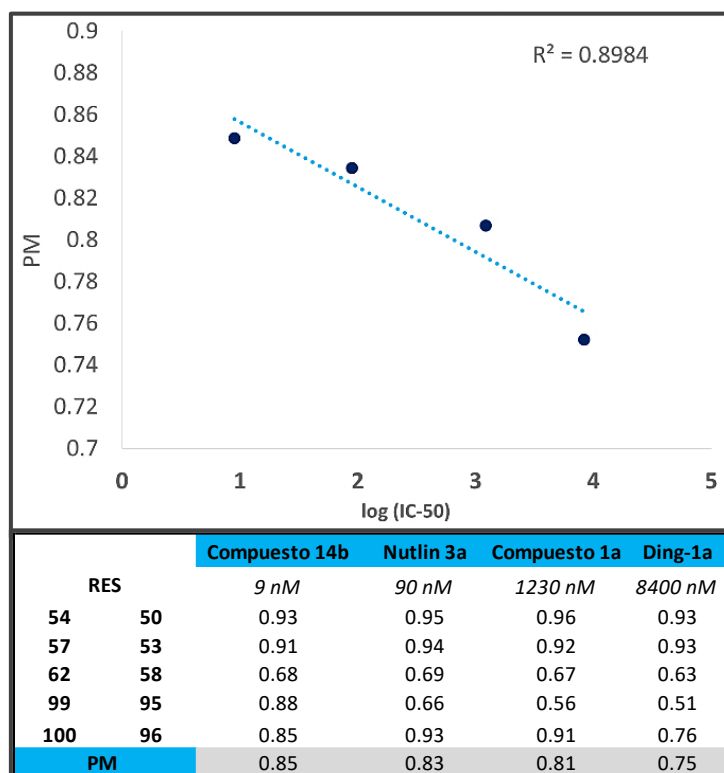


Figura 3.36. En el gráfico se representa la correlación entre los valores de propensiones dinámicas promedio para los CHBs de MDM2 (PM) y el logaritmo de los valores de IC_{50} para el set de compuestos aquí evaluados. En la tabla se representan los valores desglosados de PM, es decir, se muestran propensiones dinámicas para cada una de las interacciones consideradas.

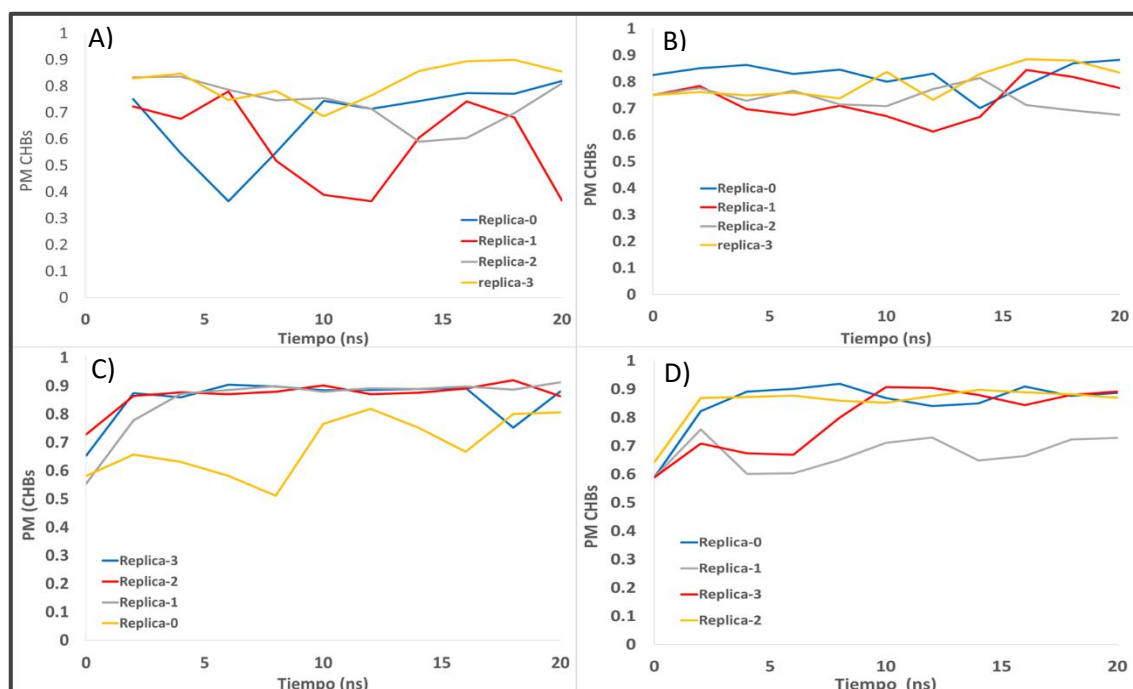


Figura 3.37. Evoluciones temporales de los valores medios de propensión dinámica sobre los CHBs de MDM2. Resultados para los complejos: A) MDM2* - Ding 1a, B) MDM2* - compuesto 1a, C) MDM2* - compuesto 14b, y D) MDM2* - Nutlin 3a.

	Compuesto 14b				Nutlin-3a			
	GBSA	DESV.	PBSA	DESV.	GBSA	DESV.	PBSA	DESV.
MD3	-28.0	4.2	-25.4	3.5	-33.0	3.3	-29.6	3.3
MD2	-29.2	2.8	-24.1	3.1	-36.4	2.9	-32.7	3.3
MD1	-28.2	3.0	-23.8	3.3	-36.9	3.2	-31.5	3.6
MD0	-24.3	3.1	-22.5	3.5	-34.6	4.0	-29.0	3.9
PROMEDIO	-27.4	2.2	-24.0	1.2	-35.2	1.8	-30.7	1.7
	Compuesto 1a				Compuesto Ding 1a			
	GBSA	DESV.	PBSA	DESV.	GBSA	DESV.	PBSA	DESV.
MD3	-35.3	3.8	-31.9	3.9	-21.5	4.7	-19.1	4.7
MD2	-35.1	5.8	-32.0	5.4	-19.9	2.7	-15.4	3.7
MD1	-36.2	3.8	-33.0	3.9	-20.5	3.4	-15.8	3.5
MD0	-33.7	3.8	-30.3	3.6	-20.2	3.3	-14.7	2.8
PROMEDIO	-35.1	1.1	-31.8	1.1	-20.5	0.7	-16.2	1.9

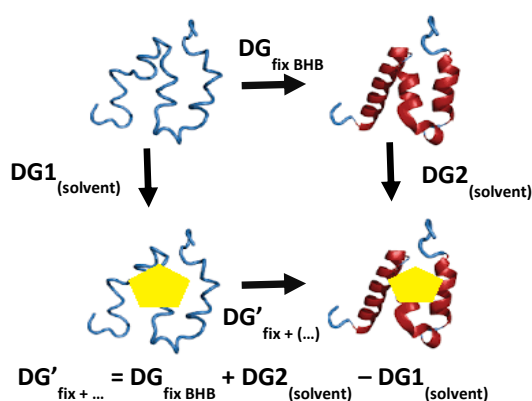
Figura 3.38. Valores de energía libre para la formación de los complejos MDM2*-Compuesto 14b, MDM2*-Nutlin-3a, MDM2*- compuesto-1a, MDM2*- compuesto Ding-1a.

3.4 Otras consideraciones

Adicionalmente, como parte del trabajo realizado en la estancia de investigación llevada a cabo en la Universidad de Barcelona en el grupo dirigido por Xavier Barril, y en un intento de algún modo por cuantificar y racionalizar la adhesividad de los CHBs, se llevaron a cabo una serie de experimentos computacionales (simulaciones de Dinámica Molecular), utilizando cosolventes orgánicos, en un par de condiciones diferentes: las cuales involucraron la utilización o no, de restricciones de posición, sobre un set de átomos específicos.

De este modo, y con el objetivo dual antes manifestado, fue planteada la siguiente hipótesis de partida (esquematzada en el ciclo termodinámico a continuación):

Hipótesis: 'Cambios en el entorno local de ciertos BHBs (promovidos por la asociación con un determinado ligando) y la consecuente estabilización de dicha interacciones, promueven una "rigidización" del receptor (Ej: MDM2); donde el costo entrópico del proceso global (menor libertad conformacional del sistema) se compensa con un incremento en la energía libre de formación de dicho complejo, comparando ambos tipos de conformaciones para la macromolécula (receptor) en consideración ($DG'_{fix+...} < 0$)'.



De esta manera, se procedió a estimar cada uno de los términos allí planteados del siguiente modo:

DG1: estimaciones de la energía libre de interacción de un determinado cosolvente orgánico (piridina) con la macromolécula, en este caso, MDM2 en su forma apo.

DG2: estimaciones de la energía libre de interacción de un determinado cosolvente orgánico (piridina) con la macromolécula, en este caso, MDM2 en su forma apo, pero empleando restricciones de posición, de modo tal, de forzar a un conjunto de BHBs a permanecer formados. Para tal fin, se aplicaron restricciones de posición únicamente sobre los átomos directamente involucrados en dichas interacciones, esto es: N (del grupo amida) y O (del grupo carbonilo).

DG_{fix BHBs}: estimación del costo energético de restringir la libertad conformacional de la proteína, contemplando la serie de BHBs que fueron fijados. Con tal propósito, se estimó la función de partición de dicho sistema como: $Z = \sum e^{-\beta e_i}$, sobre los perfiles de energía libre del proceso de ruptura de dichas interacciones previamente determinados, tanto para la proteína MDM2 en su forma apo, como así también formando el complejo con p53. La diferencia de energía libre para cada BHBs fijado fue luego calculada luego como: $DG_{fix\ BHB} = (-k_b.T.ln. Z (MDM2-p53)) - (-k_b.T.ln. Z (MDM2apo))$. Siendo T la temperatura, y k_b la constante de Boltzman.

3.4.1- Primeras observaciones cualitativas:

En principio se restringieron las posiciones sobre un total de 10 BHBs a lo largo de la proteína MDM2 apo (los mismos se listan en la imagen a continuación, **Figura 3.39**), y se realizaron bajo estas condiciones simulaciones de dinámica molecular utilizando piridina al 1% como mezcla de solventes. Luego, se estimó la energía libre de dicho solvente interaccionando con la proteína a partir de un ensamble de 300.000 configuraciones (3 réplicas de 100 ns cada una de ellas), y dichos resultados fueron contrastados con respecto a simulaciones equivalentes para MDM2 apo, pero sin haber aplicado ningún tipo de restricciones de posición. Estos resultados se reflejan cualitativamente en la **Figura 3.39**. De este modo, resulta nítido el incremento sustancial de la energía libre de interacción del solvente orgánico cuando únicamente una serie de BHBs fue sujeto a permanecer formado.

A partir de estos primeros promisorios resultados, se procedió a identificar un set mínimo de BHBs a ser fijados, y pertenecientes únicamente al sitio de binding. El objetivo es identificar de este modo las principales interacciones responsables de los resultados previos. Para esto, se estudió el comportamiento de toda la serie de BHBs antes considerados, y se exploraron las relaciones existentes en su comportamiento (esto es, si sus tendencias a la formación o ruptura, están correlacionadas, anti correlacionadas o no correlacionadas). Una vez más, el análisis propuesto fue concebido con la intención principal de eliminar BHBs cuyo comportamiento podría estar influenciado por cambios en la prescripción de interacciones aledañas.

Para esto se utilizaron ensambles de configuraciones de la proteína MDM2 en su forma apo, y se construyó una matriz de correlación, vinculando a todos los BHBs antes mencionados: en las mismas, un valor de 1 implica un comportamiento completamente correlacionado, luego un valor de -1 nos habla de la condición contraria, es decir, se trata de interacciones completamente anti correlacionadas entre sí, y finalmente, un valor de 0 implica que no existen relaciones entre sus comportamientos. Para la construcción de dicha matriz simplemente se consideró el estado de cada interacción (respecto

a las demás) configuración a configuración, en un ensamble de 300.000 imágenes diferentes del sistema. Finalmente, a partir de la información colectada de este modo, se construyó el dendograma expuesto en la **Figura 3.40**.

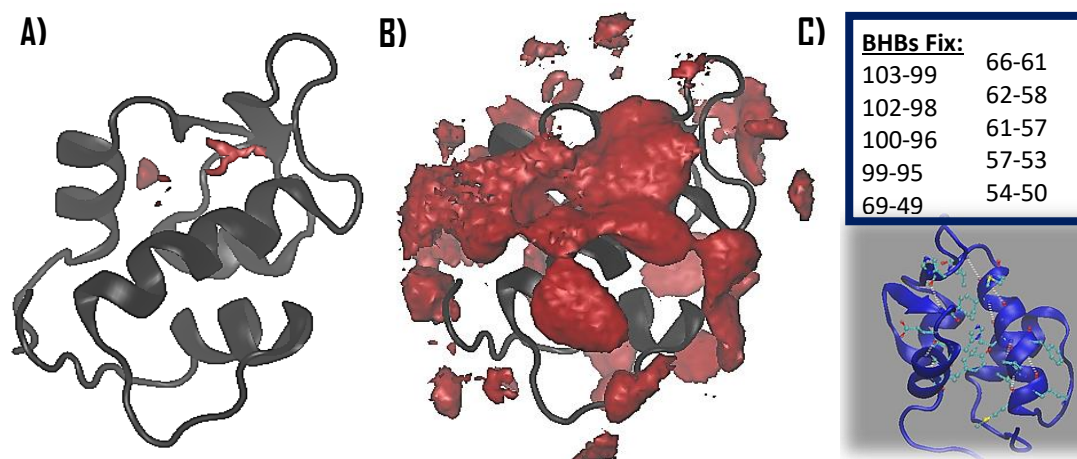


Figura 3.39. A) En gris, proteína MDM2 en su forma apo, en el modo de representación del programa VMD *new cartoon*, en rojo, y en el modo de representación *isosurface*, regiones en las cuáles el solvente orgánico, piridina, está interaccionando con la proteína con una energía menor a -2.8 Kcal/mol. B) Manteniendo exactamente las mismas consideraciones que en el caso A, se representa la proteína MDM2 apo, para la cuál se restringió la posición de los BHBs listados en la tabla C. C) BHBs restringidos durante las dinámicas de la proteína MDM2 apo. Las restricciones de posición de aplicaron únicamente sobre los átomos de N (del grupo amida) y O del carbonilo.

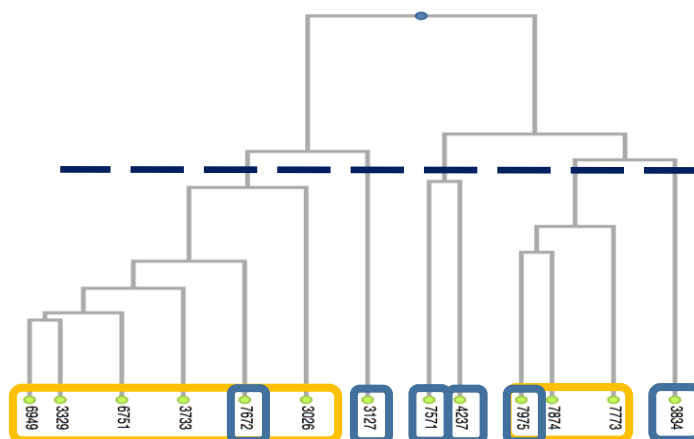


Figura 3.40. Dendograma para los BHBs de MDM2 fijados en las dinámicas con piridina al 1%. La numeración allí indicada es la asignada por el programa de simulación AMBER, luego, la equivalencia con la secuencia aminoacídica de la proteína, es el número allí indicado más 24 (esto debido a que los primeros 24 residuos no están resueltos experimentalmente). La línea superior azul indica el nivel de corte considerado al momento de considerar las diferentes familias de interacciones. En azul se destaca el mínimo set de BHBs fijado en los estudios cuantitativos comentados a continuación.

Finalmente, se definió un mínimo set de interacciones a fijar a partir de las familias definidas en el dendograma (**Figura 3.40**). Otorgando especial interés a aquellos BHBs pertenecientes al sitio de binding, cuyo comportamiento difiera entre la forma apo de la proteína y el complejo formado con p53 (en definitiva, aquellas interacciones que dan origen a las mayores

fluctuaciones estructurales en la proteína en su estado no ligado), y adicionalmente, por inspección visual de los mismos (esto es, considerando de manera especial aquellos BHBs candidatos que se encuentran en el entorno de los *hot spot* de p53, ver **Figura 3.41**, a modo de ejemplo), se seleccionaron los BHBs: 103-99, 100-96, 99-95, 66-61 y 62-58 (todas estas interacciones son coincidentes con los BHBs de MDM2 previamente determinados como CHBs, según alguno de los criterios antes mencionados).

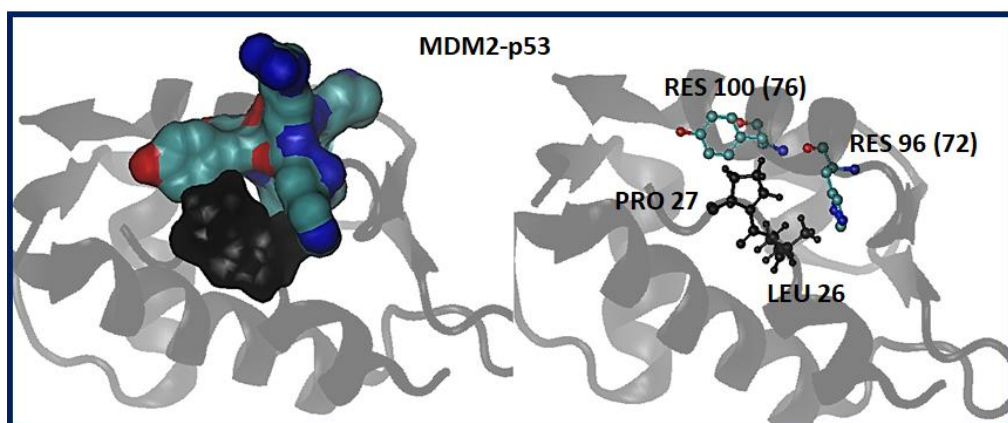


Figura 3.41. Ambas imágenes ilustran la misma configuración para el complejo MDM2-p53 (correspondiente a la estructura experimental PDB: 1YCR). Se muestra a modo de ejemplo una de las interacciones, CHB 100-96, ubicada en la familia más numerosa del dendograma, y seleccionada para ser restringida a permanecer formada en los estudios cuantitativos posteriores. En ambas imágenes, en negro se representan los residuos LEU 26 y PRO 27 de p53 (ambos en el entorno inmediato de dicha interacción). Luego, el código de colores utilizados para los residuos 100-96 de MDM2 son: azul para nitrógeno, rojo para átomos de oxígeno, y cian para los átomos de carbono.

3.4.2- Resultados cuantitativos:

Una vez definido el conjunto de BHBs a fijar, se procedió a realizar las estimaciones energéticas de los diferentes componentes del ciclo termodinámico antes propuesto. Aunque, antes de comentar dichos resultados, resulta preciso desviar momentáneamente la atención hacia la serie de imágenes reflejadas en la **Figura 3.42**. Dichas imágenes dan cuenta de las diferencias conformacionales existentes en MDM2, cuando se encuentra unida a p53 respecto a su forma no ligada (esto no resulta novedoso, ya lo habíamos observado previamente); pero lo más destacable en este punto es la ínfima diferencia en los valores de RMSD para los átomos constituyentes de todo el backbone de dicha proteína, cuando se compara dicha macromolécula luego de haber sido simulada restringiendo las posiciones del set de BHBs antes mencionados en piridina al 1%, respecto a la forma complejada con p53 (el valor específicamente es de tan solo 0.7 Å, el cuál es muy inferior a los 3.4 Å, que separan a dicha proteína en su forma apo –sin aplicar restricciones conformacionales puntuales- de su estructura en el complejo).

Luego, y con el objetivo de estimar **DG1** y **DG2**, fueron definidos los diferentes *sitios de solvente* (esto es, sitios de interacción o *hot spot* del solvente orgánico, piridina, interactuando con la macromolécula) considerando un valor de corte de -2.3 Kcal/mol. En la **Figura 3.43** se recogen los valores de las mayores energías de interacción de la piridina con MDM2 (en valor absoluto), halladas dentro de cada uno de los diferentes sitios de solvente previamente determinados. Por otra parte, en la **Figura 3.44** se incluyen las estimaciones energéticas correspondientes al término previamente definido como

DG Δ BHBs, discriminado dichos resultados por cada interacción. Dichas estimaciones fueron realizadas sobre el primer mínimo en los correspondientes perfiles de energía libre de las interacciones consideradas, esto es hasta los 4.5 Å.

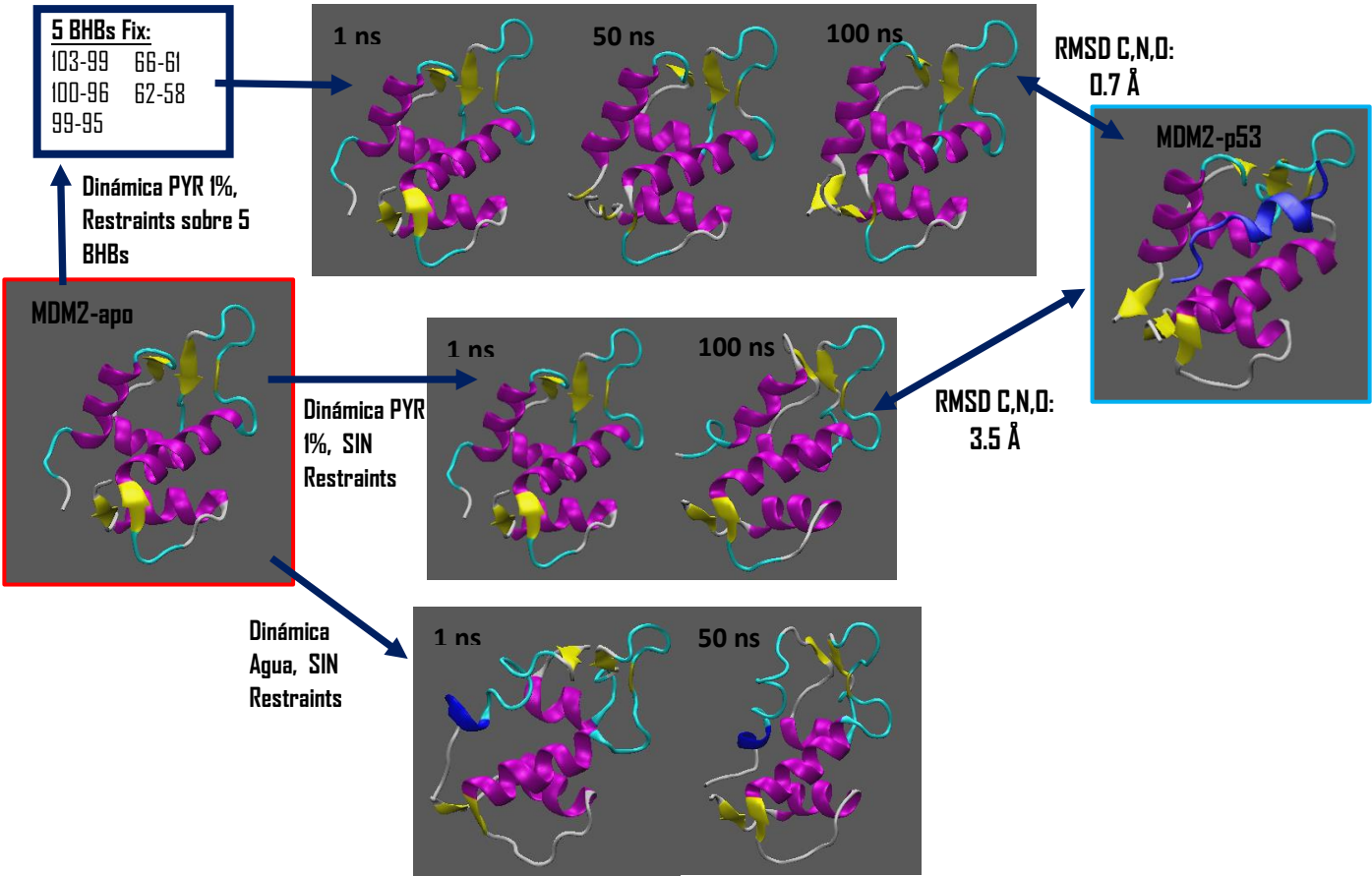


Figura 3.42. Representaciones secuenciales de una una serie de experimentos computacionales (simulaciones de dinámica molecular) realizados sobre MDM2 apo: en la parte superior, se muestran una serie de imágenes correspondientes a simulaciones realizadas utilizando piridina al 1% como cosolvente orgánico, y restringiendo la posición de 5 BHBs (indicados en la imagen). En el medio, condiciones de simulaciones equivalentes a las anteriores, pero sin aplicación de retriicciones. En la parte inferior, configuraciones adoptadas por MDM2 en simulaciones realizadas únicamente empenado agua como solvente. A la derecha se ilustra la estructura del complejo MDM2-p53, hallada experimentalmente (PDB: 1YCR).

PYR 1%- 5 BHBs FIX		PYR 1%- FREE	
Volumen	Energía (Kcal/mol)	Volumen	Energía (Kcal/mol)
97.5	-3.39	41.5	-2.61
164.88	-3.8	150	-2.51
64.62	-2.97	32.5	-2.44
29.12	-2.67	21.25	-2.42
20	-2.62	12.88	-2.38
28.25	-2.6	3.25	-2.31
18.88	-2.43		
12.38	-2.42		
6.62	-2.36		
SUMA	-25.26	SUMA	-14.67

Figura 3.43. Caracterización de los diferentes sitios de solvente hallados en los dos casos de estudio: columna de la izquierda, caracterización '*hot spot*' para las dinámicas de MDM2 apo, restringiendo las posiciones de 5 BHBs. Derecha (**DG2**), resultados equivalentes a los anteriores, para la proteína MDM2 apo completamente libre (**DG1**).

BHBs	DG fix (Kcal/mol)
66-61	0.05
62-58	0.32
99-95	4.76
100-96	0.02
103-99	0.77
SUMA	5.92

Figura 3.44 Estimaciones energéticas de **DGfix**, discriminadas por cada interacción restringida.

Finalmente, obtenemos que el cambio de energía libre de formación del complejo, $\Delta G_{\text{fix BHBs}}^{\circ} + (\dots)$, entre ambas condiciones aquí exploradas, resulta en unas -5 Kcal/mol. De este modo, la pérdida de libertad conformacional global, observada como una 'rigidización' del sistema, efectivamente estaría compensada por una ganancia (nada despreciable) de energía libre de formación del complejo en consideración, cuando se compara la generación del mismo, a partir de un ensamble de estructuras altamente fluctuantes versus conformaciones más rígidas. Adicionalmente, vale la pena enfatizar el hecho de que la transición entre un tipo de conformaciones y otra, en este caso, fue 'promovida' únicamente mediante restricciones en BHBs específicos, los cuales habían sido previamente caracterizados como CHBs (al menos, según alguno de los criterios antes explorados).

3.5- Conclusiones del capítulo

A lo largo de este capítulo indagamos detalladamente en el comportamiento diferencial de interacciones no covalentes, específicamente BHBs, según cambios en las propiedades de hidratación de su entorno local; de este modo, establecimos relaciones directas entre el grado de exposición al solvente de un determinado BHB y su estabilidad, medida en términos de su propensión dinámica (damos cuenta de lo anterior mediante estudios de BHBs de la proteína MDM2 tanto en su forma apo como holo, así como también mediante la utilización de dinámicas con solventes mixtos, dónde la modulación de dichas interacciones no covalentes es inducida por la presencia de un co-solvente de naturaleza orgánica).

Posteriormente, y con el objetivo de caracterizar cualitativamente las propiedades de unión de diversos BHBs aquí clasificados como CHBs, se condujeron una serie de experimentos como *Alanine Scanning* computacional de los residuos determinados experimentalmente como hot spot en p53 y racionalización de la formación del complejo MDM2-Nutlin-3a, así como también, racionalización de las contribuciones de diversos fragmentos de dicho compuesto en el binding. En todos los casos fue posible dar cuenta de sus propiedades de unión en términos de propensiones dinámicas de puentes de hidrógeno. Luego, indagamos en la utilización de esta metodología en la clasificación cuantitativa de una serie de conocidos inhibidores del complejo MDM2-p53, resultando evidente la potencialidad de la misma en tal sentido.

Adicionalmente, y a partir de los estudios expuestos en el **inciso 3.4**, indagamos en la existencia de un posible mecanismo retroalimentativo para procesos de complejación, el cuál encontraría su origen en el comportamiento diferencial de ciertos BHBs, esto es: debido a cambios en las propiedades de hidratación local de los mismos, se induce/favorece su formación, y de manera simultánea, la pérdida entrópica asociada con la rigidización global del sistema, promovida de este modo, es compensada por una optimización de las interacciones directas que tienen lugar entre el ligando en consideración y la proteína, en este caso, MDM2.

Referencias:

- 1) S. Park and K. Schulten, J. Chem. Phys. **2004**, 120, 5946.
- 2) C. Jarzynski Phys. Rev. Lett. **1997**, 78, 2690.
- 3) G. Ozer, S. Quirk, and R. Hernandez, J. Chem. Phys. **2012**, 136, 215104.
- 4) G. Ozer, E. Valeev, S. Quirk, and R. Hernandez, J. Chem. Theory Comput. **2010**, 6, 3026.
- 5) G. Ozer, S. Quirk, and R. Hernandez, J. Chem. Theory Comput. **2012**, 8, 4837.
- 6) G. Ozer, T. Keyes, S. Quirk, and R. Hernandez, J. Chem. Phys. **2014**, 141, 064101.
- 7) H. R. Bureau, D. Merz Jr., E. Hershkovits, S. Quirk and R. Hernandez, PLoS ONE, **2015**, 10, e0127034.
- 8) Weiser, J.; Shenkin, P.S.; Still, W.C. J. Comput. Chem., **1999**, 20, 217.
- 9) Daniel Alvarez-Garcia and Xavier Barril. J Med Chem. **2014**, 57, 8530.
- 10) Wells J A and McClendon CL. Nature **2007**, 450, 1001.
- 11) Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z et al. Science. **2004**, 303, 844.
- 12) Miyazaki M, Naito H, Sugimoto Y, Kawato H, Okayama T, Shimizu H, Miyazaki M, Kitagawa M, Seki T, Fukutake S, Aonuma M and Soga T. Bioorg. Med. Chem. Lett. **2013**, 23, 728.
- 13) Allen JG, Bourbeau MP, Wohlhieter GE, Bartberger MD, Michelsen K, Hungate R et al. J. Med. Chem. **2009**, 52, 7044.
- 14) Ding K, Lu Y, Nikolovska-Coleska Z, Qiu S, Ding Y, Gao W et al. J. Am. Chem. Soc. **2005**, 127, 10130.

CAPITULO 4

*Hacer predicciones es muy complicado,
especialmente si son sobre el futuro.*

Niels Bohr.

4.1- Descripción general y objetivos de estudio del capítulo:

Sin lugar a dudas, el desarrollo de metodologías teóricas que permitan predecir adecuadamente la actividad inhibitoria de potenciales inhibidores antes de que dichos compuestos sean sintetizados, es de gran relevancia en el desarrollo de fármacos. En tal sentido, en el capítulo anterior se mostró el potencial uso en términos cuantitativos de los estudio de propensiones dinámicas de puentes de hidrógeno. En este capítulo aplicaremos dicha metodología, desarrollada a lo largo de esta Tesis, en la evaluación teórica de una serie de compuestos sintéticamente factibles como inhibidores del complejo MDM2-p53. Asimismo, se aplicarán conjuntamente otras técnicas computacionales bien establecidas como simulaciones de *Docking* Molecular y cálculos de energía libre. Más específicamente, todas las geometrías iniciales de los diversos compuestos a evaluar serán obtenidas por medio de simulaciones de *Docking* Molecular, además consideraremos como un primer filtro la función de puntuación de dichas simulaciones; y posteriormente aplicaremos métodos computacionalmente más demandantes como lo son cálculos de energía libre a partir de configuraciones obtenidas de simulaciones de dinámica molecular para los diversos complejos (MM-GBSA y MM-PBSA), así como también estudios de propensiones dinámicas de puentes de hidrógeno. Finalmente, resulta importante aclarar que obviamente consideramos imprescindible la contrastación experimental posterior de las predicciones computacionales aquí realizadas, pero dicho horizonte (considerablemente más ambicioso) excede a los objetivos originariamente planteados en esta Tesis y, sobre todo, a las posibilidades materiales y temporales.

4.2- Estudios de Docking y Dinámica molecular

El programa Autodock4 (1) fue empleado en las simulaciones de *Docking* Molecular. En todos los casos se utilizó una conformación fija para el receptor, en tanto que se exploraron diversas conformaciones para el ligando (*Docking* semiflexible). A los residuos de la proteína se le asignaron cargas pertenecientes al campo de fuerza ff99 (2). Las coordenadas iniciales de la proteína MDM2 fueron tomadas de la estructura de rayos X (PDB: IYCR), removiendo todas las

moléculas de agua y el ligando. La grilla empleada en las simulaciones fue construida empleado *AutoGrid*. Ésta fue centrada en el sitio de binding de MDM2 a p53 pero con dimensiones tales que incluyan toda la proteína (100 x 100 x 100 puntos con un espaciado entre ellos de 0,375 Å). La elección de estas condiciones para el protocolo de docking (docking ciego) se tomó considerando la posibilidad de descartar todos aquellos compuestos que no interaccionaran preferencialmente con el sitio de binding de MDM2 a p53. Adicionalmente, como los compuestos que muestren los mejores resultados (en términos de función de puntuación y unión preferencial en el sitio de binding de MDM2 con p53) serán evaluados en simulaciones de Dinámica Molecular, la elección de llevar a cabo un protocolo de *Docking* ciego consideramos no será un problema en la obtención de una geometría adecuada para los diversos complejos en consideración. El número máximo de evaluaciones de energía fue de 1×10^7 y el número máximo de generaciones de 5×10^5 sobre una población de 150 individuos. Para cada compuesto, 200 geometrías fueron generadas y se las agrupó con un valor umbral de RMSD de 1,0 Å.

La construcción de cada ligando evaluado en las simulaciones, tanto de *Docking* como de Dinámica molecular, se realizó con el módulo del programa *antechamber*, usando el campo de fuerza GAFF (*General AMBER Force Field*) (2, 3, 4).

Finalmente, y tal cómo se mencionó en el capítulo anterior, la validación del algoritmo de búsqueda se realizó con el compuesto-la (PDB: 3JZK) (5), según la nomenclatura utilizada previamente. En este sentido se logró reproducir el modo de unión de dicho compuesto con un valor de RMSD en torno a 1 Å entre la estructura experimental y la obtenida mediante el protocolo de docking aquí aplicado. En la **Figura 4.1** se puede ver una superposición de dichas estructuras.

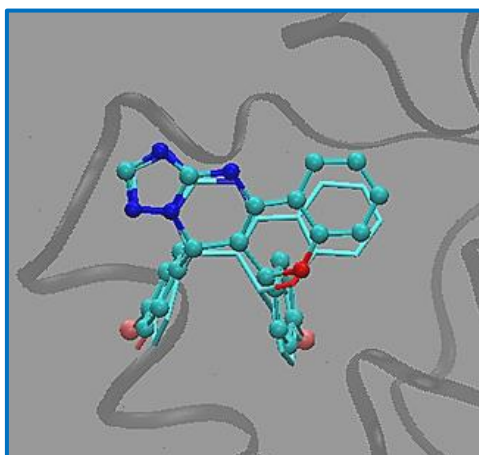


Figura 4.1. Superposición del compuesto la en su estructura determinada experimentalmente por difracción de rayos X (color cyan, representación 'CPK'); y la estructura predicha por el protocolo de docking aquí aplicado (cyan, representación 'bonds').

Por otra parte, en la **Figura 4.2** se muestran los resultados de la función de puntuación del protocolo de docking aquí implementado para el set de inhibidores de MDM2 estudiados en el capítulo anterior. A partir de dichos resultados podemos ver que en principio esta técnica nos permitiría discernir compuestos muy activos de aquellos de actividad moderada.

Inhibidor	IC-50 (μ M)	Puntuación Autodock
Compuesto 14 b	9	-9
Nutlin 3a	90	-9
Compuesto 1a	1230	-8
Ding 1a	8400	-7

Figura 4.2. Valores de puntuación del protocolo de docking aplicado. En todos los casos dicho valor corresponde a la pose de menor energía.

Además, es importante aclarar en este punto que no es el objetivo de este trabajo realizar un *Screening Virtual* en la búsqueda de nuevos "scaffolds", sino más bien proponer modificaciones sencillas de compuestos con actividad ampliamente reportada en este contexto, como lo serán derivados de Chalconas (6, 7, 8, 12), o bien se evaluarán familias de compuestos novedosos en esta aplicación específica, pero aún así, con un alto grado de similitud estructural con inhibidores reportados. Este último es el caso de los diversos derivados de quinolonas, isoquinoleinas y cromonas aquí propuestos (11, 14). De este modo, los diversos ligandos propuestos y evaluados computacionalmente fueron concebidos en primer lugar teniendo en cuenta su capacidad de mimetizar a los 3 residuos establecidos como *hot spot* de p53 (9), y luego, pero no menos importante, considerando su factibilidad sintética. Por otra parte, y en lo que respecta a los tipos de compuestos puntuales que se decidió explorar, se valoró la experiencia del grupo de síntesis orgánica dirigido por Dario Gerbino, en la obtención de sistemas heterocíclicos (15, 16). Adicionalmente, será evidente la incorporación preferencial de ciertos sustituyentes, como prenilos; dicha elección responde a la documentada relevancia de este tipo de motivos estructurales tanto en este contexto biológico específicamente (12), como así también en muchos otros (17, 18) y además, debido a su amplia distribución en diversas familias de compuestos bioactivos de origen natural (18, 19, 20).

4.2.1- Resultados de las simulaciones de Docking Molecular:

En las **Figuras 4.3 y 4.4** se despliegan las estructuras de los diversos compuestos evaluados, así como también valores de puntuación de los cálculos de *Docking Molecular* para cada compuesto; dichos resultados se presentan discriminados por familias. En base a los mismos fue posible descartar la familia de las isoquinoleinas y/o cromonas (Aspergilitina puntualmente puede ser considerada como representante de ambos grupos) ya que las funciones de puntuación para los compuestos agrupados dentro de esta clasificación estructural fueron mayores que -7 (menores en valor absoluto), y principalmente porque estos ligandos mostraron la capacidad de interaccionar de manera preferencial con MDM2 en regiones fuera del sitio de binding con p53 (puntualmente las isoquinoleinas, a excepción únicamente de Aspergilitina). Una aclaración pertinente acerca de las isoquinoleinas aquí estudiadas es que dichos compuestos ya habían sido sintetizados por el grupo dirigido por el profesor Teodoro Kaufman tal como fueron evaluados; es importante esta aclaración porque será evidente para el lector las discrepancias estructurales de tales exponentes con respecto a los demás ligandos aquí considerados (por ejemplo, ausencia de grupos prenilos u otros sustituyentes de naturaleza hidrofóbica sobre dichos *scaffolds*). De todos modos, esto no le quita interés a su estudio, ya que fueron justamente estas evaluaciones las que señalaron el potencial uso de novedosos *Scaffold*, como cromonas, en este contexto (puntualmente Aspergilitina mostró la capacidad de unirse principalmente en el sitio estudiado). Más aún, fue en parte en base a estos resultados que se

propusieron sutiles modificaciones posteriores, que permitieron arribar a compuestos con un esqueleto base muy similar a los anteriores, pero con posibilidades de funcionalización más apropiadas para la propuesta aquí perseguida (quinolonas).

De este modo, los resultados desplegados en la **Figura 4.3** muestran lo antes dicho. Únicamente Aspergilitina, mostró la capacidad de interaccionar con MDM2 preferencialmente en el sitio de binding con p53; aun así resulta evidente la incapacidad de este compuesto para mimetizar simultáneamente los 3 hot spot de p53 (ver imagen incluida en la **Figura 4.3**). Por tal motivo, y considerando funcionalizaciones adecuadas de precursores en la síntesis de este compuesto es que se plantean los derivados de cromonas posteriores. Obviamente también podrían plantearse diversas funcionalizaciones sobre Aspergilitina; en tal sentido la decisión de explorar en principio diversas cromonas se basa únicamente en la mayor facilidad práctica en la obtención de este tipo de *Scaffold*. De dichos compuestos, C4 mostró la mejor performance en cuanto a los valores de score así como también en su capacidad para mimetizar los 3 hot spot de p53.

A continuación y considerando la posibilidad de una funcionalización adicional en el sistema heterocíclico previamente explorado (cromonas) es que se propusieron diversas quinolonas. En la **Figura 4.4** se recogen los resultados para compuestos derivados de chalconas y quinolonas.

Una consideración oportuna es que los compuestos aquí denominados como CH-2, CH-3, y CH-4 fueron evaluados previamente en ensayos in vitro (7). Los estudios de *Docking* de dichos compuestos aquí realizados reflejaron la incapacidad de los mismos en mimetizar simultáneamente los 3 hot spot de p53. Posteriormente los compuestos pertenecientes a esta familia, y propuestos a continuación (CH-5, CH-6 y CH7), fueron pensados de modo tal de suplir dichas 'deficiencias' (**Figura 4.5**). Además, sería posible acceder a estas moléculas en solo tres pasos de síntesis y partiendo de sustratos asequibles comercialmente (Inciso 4.3, **Figura 4.10**). Ambos grupos mostraron una mejor performance respecto a los ligandos descriptos previamente (isoquinoleinas y cromonas): la mayoría de los mismos mostraron la capacidad de mimetizar a los 3 hot spot de p53 así como también mayores valores de score (en valor absoluto).

Adicionalmente, varios de los compuestos pertenecientes a la familia de las quinolonas mostraron valores incluso comparables al inhibidor Nutlin-3a. Una vez más, dichos compuestos fueron propuestos considerando simultáneamente su capacidad para mimetizar los hot spot de p53, así como también su factibilidad sintética. En este último sentido, en el inciso 4.3, **Figura 4.9** se presenta una ruta sintética que permitiría abordar a dichas moléculas, con la ventaja adicional de que la mayor parte de esta secuencia sintética ya está reportada (10).

Posteriormente, fueron estudiados en simulaciones de Dinámica Molecular convencionales diversos complejos de estos últimos compuestos con MDM2 (chalconas y quinolonas), con el objetivo de alcanzar una mejor comprensión del modo de unión de los mismos, así como también abordar a cuantificaciones energéticas más precisas para los procesos de formación de los complejos en consideración (discriminando adicionalmente las contribuciones por residuos); persiguiendo tal fin, se aplicaron los métodos MM-GBSA y MM-PBSA. En este sentido, vale la pena mencionar que el modelo de Poisson-Boltzman (PB) es teóricamente más riguroso que el de método generalizado de Born (GB), y por ende el primero es considerado superior para el cálculo de energías. Sin embargo, en nuestro sistema los valores obtenidos con ambos métodos se ajustan de un modo similar a los resultados experimentales (capítulo 3, **Figura 3.38**). Tal como se vio en el

capítulo 3, para este sistema dichos métodos nos permitirían distinguir adecuadamente entre compuestos de actividad moderada con respecto a inhibidores más potentes.

Finalmente, también se evaluó la performance de los mejores candidatos en estudios de propensiones dinámicas de puentes de hidrógeno siguiendo el mismo protocolo descrito en el capítulo 3 para el set de moléculas de validación.

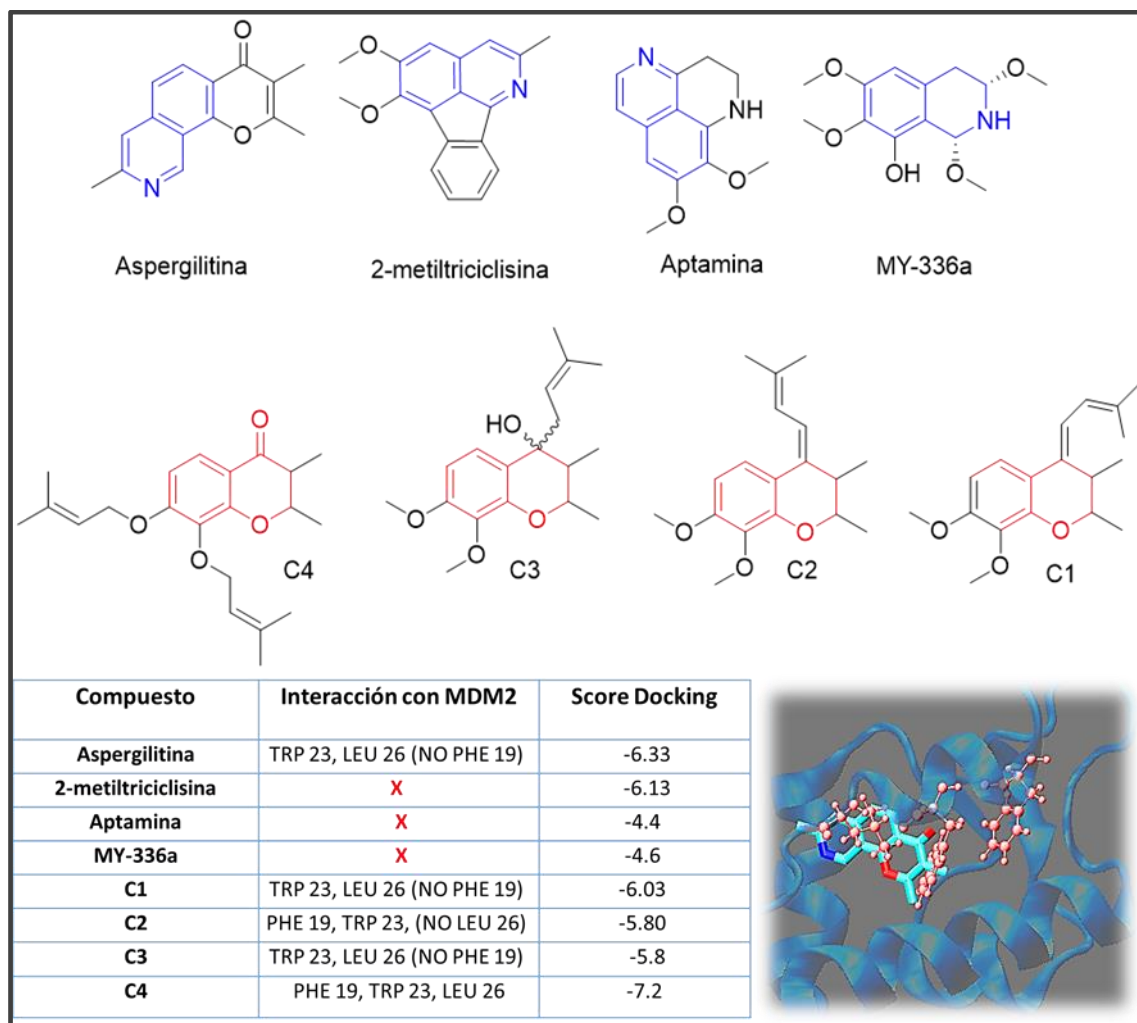
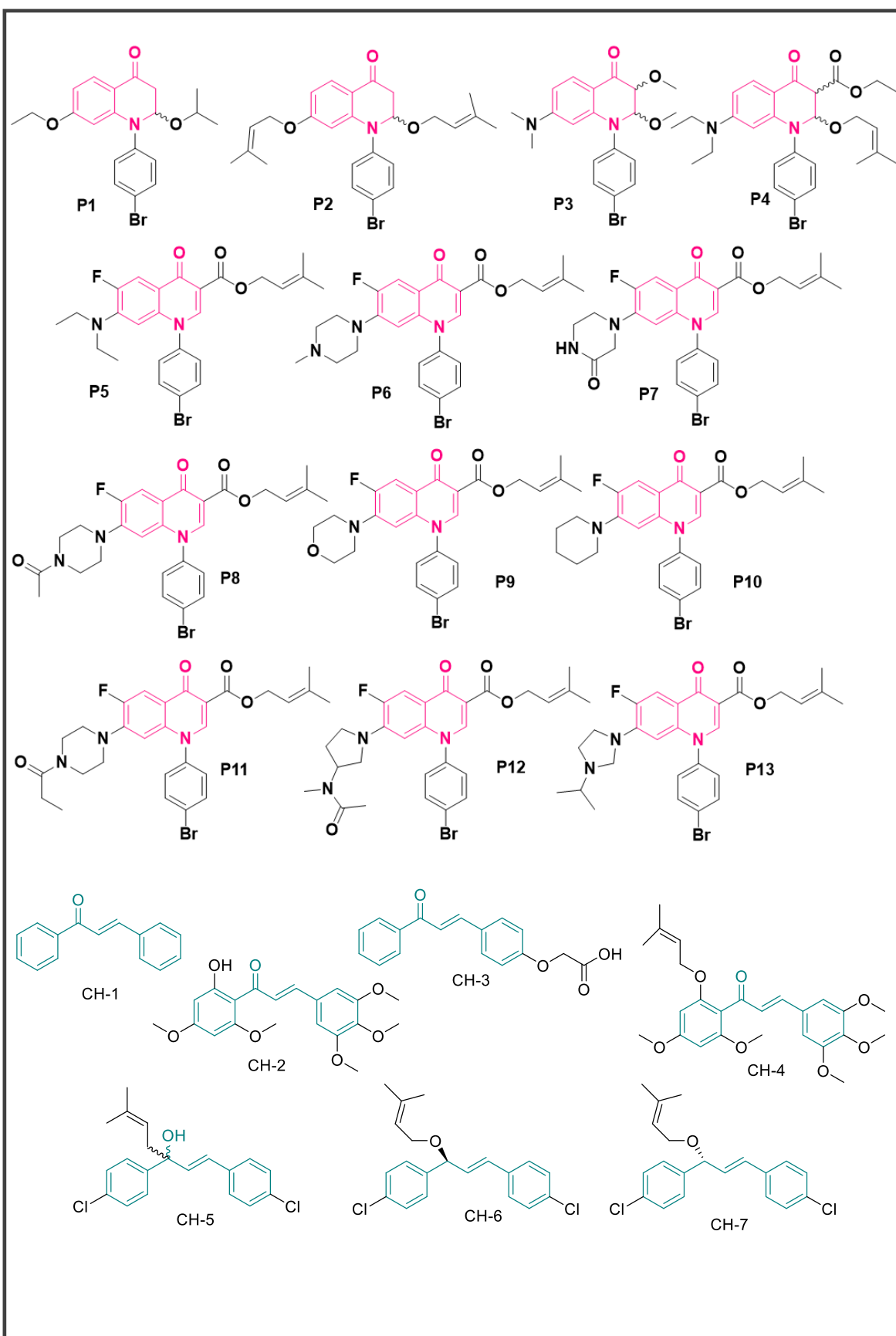


Figura 4.3. Estructura de los compuestos pertenecientes a la familia de las isoquinoleinas (esqueleto base en azul) y cromonas (esqueleto base en rojo). En la tabla se reflejan las puntuaciones de cada compuesto según el protocolo de docking aplicado. En la misma también se da información en la columna central respecto de la capacidad de mimetizar los residuos determinados como hot spot de p53 (en lo casos en que se incluye una cruz implica la interacción preferencial de dicho compuesto con MDM2 en un sitio diferente al aquí considerado). En la imagen se representa el modo de unión predicho para 'Aspergilitina' (cyan, representación bonds) en superposición con los hot spot de p53 (rojo, representación CPK). Dicha imagen fue generada con el programa VMD.



Compuesto	Mimetización p53	Score
P1	PHE 19, TRP 23, LEU 26	-6.77
P2	PHE 19, TRP 23, LEU 26	-7.91
P3	PHE 19, TRP 23, LEU 26	-7.68
P4	PHE 19, TRP 23, LEU 26	-8.48
P5	PHE 19, TRP 23, LEU 26	-8.92
P6	PHE 19, TRP 23, LEU 26	-8.42
P7	PHE 19, TRP 23, LEU 26	-9.17
P8	PHE 19, TRP 23, LEU 26	-9.52
P9	PHE 19, TRP 23, LEU 26	-9.14
P10	PHE 19, TRP 23, LEU 26	-8.99
P11	PHE 19, TRP 23, LEU 26	-9.09
P12	PHE 19, TRP 23, LEU 26	-9.67
P13	PHE 19, TRP 23, LEU 26	-8.91
CH-1	TRP 23, LEU 26, LEU 26	-5.9
CH-2	TRP 23, LEU 26, LEU 26	-5.4
CH-3	TRP 23, LEU 26, LEU 26	-6.15
CH-4	TRP 23, LEU 26, LEU 26	-7.09
CH-5	PHE 19, TRP 23, LEU 26	-7.41
CH-6	PHE 19, TRP 23, LEU 26	-7.40
CH-7	PHE 19, TRP 23, LEU 26	-7.60

Figura 4.4. Se muestran en primer lugar las estructuras de los compuestos evaluados en las simulaciones de docking molecular. Luego, en la tabla se dan los valores de score del protocolo de docking aplicado para los diferentes compuestos, así como también una breve descripción de su capacidad para mimetizar los hot spot de p53. Las descripciones en rojo hacen referencia a la incapacidad de 'cubrir' simultáneamente (en una misma pose de docking) los residuos PHE 19, TRP 23 y LEU 26 de p53 (hot spot).

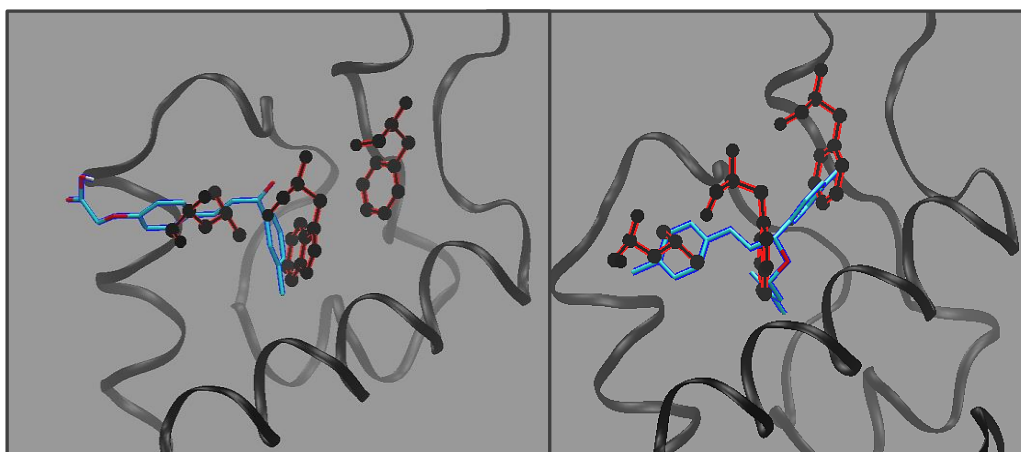


Figura 4.6. A la izquierda, superposición de la pose de menor energía predicha por el protocolo de Docking Molecular para el compuesto CH-3 (color cyan, representación licorice del programa VMD), con los tres hot spot de p53 (Phe 19, Trp 23 y Leu 26, dichos residuos con bordes rojos y centro negro, representación CPK del programa VMD). A la derecha, superposición de la pose de menor energía predicha por el protocolo de Docking Molecular para el compuesto CH-7 (color cyan, representación licorice del programa VMD), con los mismos aminoácidos de p53 (dichos residuos con bordes rojos y centro negro, representación CPK del programa VMD).

4.2.2- Resultados de las simulaciones de Dinámica Molecular:

Todas las simulaciones de dinámica molecular convencional se realizaron siguiendo las mismas especificaciones generales descritas detalladamente en el capítulo 2 (inciso 2.2. Métodos). Luego, y en lo que respecta a la conducción de los estudios de propensiones dinámicas de puentes de hidrógeno, tanto la formación de los diferentes complejos a evaluar cómo así también los números de réplicas y tiempos de simulación, fueron definidos del mismo modo como se procedió en los estudios realizados en el capítulo 3 para el set de moléculas de validación.

En la **Figura 4.7** se muestran los resultados obtenidos para los cálculos de energía libre de formación de los diferentes complejos en consideración, a partir de las dos metodologías aplicadas (MM-GBSA y MM-PBSA). Dichos resultados son valores promedio sobre las 4 réplicas realizadas para cada sistema (cálculos específicamente realizados sobre un total de 1000 configuraciones por cada una de dichas réplicas, las mismas espaciadas de manera equidistante sobre los 20 ns de simulación). Los sistemas evaluados fueron elegidos contemplando los compuestos para cada familia, que hayan mostrado la mejor performance en las simulaciones de *Docking* Molecular. Específicamente, se estudiaron por dinámica molecular los complejos con MDM2 de los compuestos P1, P2, P4, P5, P6 y P7 de los derivados de quinolonas (los compuestos P8, P9, P10, P11, P12 y P13 presentaron puntuaciones para la función de score del protocolo de *Dockings* similares a P7, lo cual es esperable por su elevada similitud estructural, por dichos motivos no fueron involucrados en este estudio ya que resulta razonable la obtención de resultados muy similares); en tanto que CH-6 y CH-7 fueron los seleccionados dentro de los derivados de chalconas por presentar los valores más elevados de score en los cálculos de *Docking* Molecular (valores considerados en términos absolutos). En la **Figura 4.7** se presentan además los valores de PM (propensiones dinámicas medias) para dicho conjunto de sistemas; nuevamente, dichos cálculos fueron realizados siguiendo el protocolo descrito detalladamente en el capítulo precedente.

A partir de la información volcada en la **Figura 4.7**, podemos ver que para los sistemas que mostraron mejores performance en el estudio de propensiones dinámicas de puentes de hidrógeno (PM) fueron los derivados pertenecientes a la familia de las quinolonas, (**P5, P6 y P7**) dichos compuestos presentan el mismo patrón de sustitución y difieren únicamente en el grupo amino que sustituye la posición 7 de dicho heterociclo. Adicionalmente, las diversas metodologías aquí aplicadas arribaron a resultados coherentes entre sí para dichos derivados (es decir, mostraron los mayores valores, en términos absolutos en los cálculos de energía libre ya sea mediante GB/PSA, así como también las mayores puntuaciones en las simulaciones de *Docking* Molecular). Más específicamente dentro de dichos compuestos, P5, obtuvo valores de PM comparables con el **compuesto -14b** del set de validación (el más potente de los inhibidores aquí contemplados con un valor de IC_{50} de 9 nM). Por su parte, ambos derivados de chalconas obtuvieron los valores más bajos de PM (es decir, una peor performance en comparación con los anteriores).

En síntesis, se puede concluir que de acuerdo a las metodologías predictivas aquí aplicadas, los candidatos con perspectivas más favorables resultaron ser los compuestos P5, P6 y P7. En el siguiente inciso se describe de manera detallada los modos de interacción predichos, mediante simulaciones de *Docking* Molecular y posteriores simulaciones por Dinámica Molecular, para estos análogos con la proteína MDM2. Finalmente, y aunque dicho trabajo esté fuera del contenido

presentado en esta tesis, se espera poder acceder a dichas estructuras siguiendo la ruta sintética descrita en el inciso 4.3 (Figura 4.9).

4.2.2.1- Modo de interacción predicho para los compuestos P5, P6 y P7:

En la Figura 4.8 se muestran las contribuciones, discriminadas por residuo, a la energía libre de formación de los diversos complejos formados entre los compuestos P5, P6 y P7 con MDM2, respectivamente. En todos los casos, las contribuciones representadas en dicha figura fueron calculadas por medio del método MM-GBSA. De dicha figura se desprende que los tres análogos interaccionan de modos muy similares con MDM2, y lo hacen principalmente con los residuos: LEU 54, VAL 93, HIE 96 e ILE 99. Algunas diferencias aparecen en el caso del complejo MDM2-P5, dónde se evidencia la posibilidad de interaccionar con varios de los aminoácidos en el entorno del residuo LEU 54; como resultado de lo antes dicho se observa un número mayor de interacciones pero de menor magnitud; en los otros dos casos estudiados, en cambio, la contribución en esta región está mucho más acotada a la interacción únicamente con la LEU 54 (esto es, menos interacciones pero de mayor magnitud). De todos modos, y más allá de las diferencias puntuales antes enunciadas, es esperable que el modo de interacción para estos compuestos sea similar dadas justamente sus similitudes estructurales. En tal sentido, y por lo dicho previamente, podemos esperar una performance (en términos de los métodos predictivos aplicados previamente) y modos de unión similares para los demás compuestos propuestos con el mismo patrón de sustitución (P8, P9, P10, P11, P12 y P13).

Compuesto	PBSA (Kcal/mol)	GBSA (Kcal/mol)	PM
P-1	-24.4625	-28.015	0.732
P-2	-27.49	-31.135	0.561
P-4	-28.3975	-31.785	0.6939
P-5	-29.7925	-34.5	0.841
P-6	-28.65	-37.605	0.702
P-7	-29.825	-33.525	0.7635
CH-6	-25.146	-29.404	0.689
CH-7	-23.7586	-26.80394	0.67

Figura 4.7. Resultados de las diversas metodologías predictivas aplicadas (MM-PBSA, MM-GBSA y PM) para la serie de compuestos propuestos.

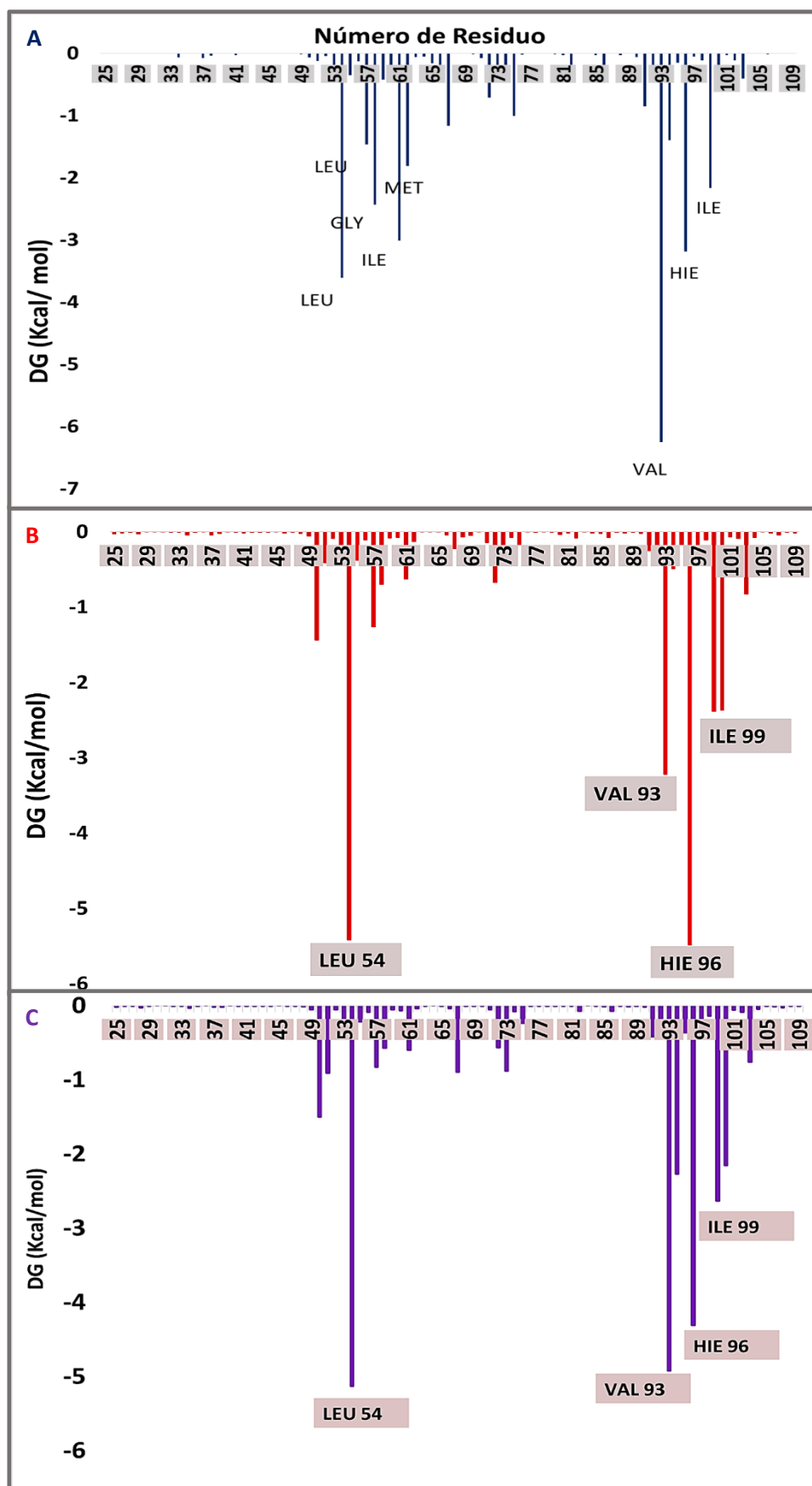


Figura 4.8. Descomposición por residuos de la energía libre de formación de los complejos A): P5-MDM2, B): P6-MDM2, C): P7-MDM2.

4.3- Síntesis Orgánica:

En la **Figura 4.9** se ilustra la ruta sintética que permitiría acceder a los compuestos que mostraron una mejor performance en términos de los métodos predictivos aquí testeados, (P5, P6 y P7). Dicha secuencia ya fue previamente reportada (10), a excepción del cuarto paso, dónde se plantea la obtención del éster derivado (**5**) mediante una reacción de sustitución nucleofílica, utilizando bromuro de prenilo como reactante. Las reacciones previas involucradas son, en primer término una reacción de condensación entre la 2,4-dicloro-5-fluoracetofenona (**1**) y dietilcarbonato, en presencia de hidruro de sodio, que permite acceder al acetato derivado correspondiente, 2,4-dicloro-5-fluorbenzoil etil acetato (**2**). El tratamiento posterior de dicho éster con trietilortoformiato en anhídrido acético, conduce al intermediario enol éter, el cuál luego de evaporarse el solvente a sequedad, reacciona con la anilina deseada (en este caso *p*-bromoanilina), en presencia de diclorometano a temperatura ambiente, para dar el enamino ceto éster derivado (**3**). La siguiente reacción de ciclación para dar el intermediario 1,4-dihidro-4-oxo-quinolina-3-carboxilato, es llevada a cabo con hidruro de sodio en tetrahidrofurano (THF); la posterior hidrólisis del acetato intermediario con hidróxido de sodio en THF permite acceder al ácido derivado (**4**); el cuál por reacción con bromuro de prenilo en un medio básico permitiría obtener el correspondiente derivado prenilado (**5**). Finalmente, dichas 7-cloro-4-quinolinas reaccionan con las aminas deseadas, en presencia de *N*-metil-2-pirrolidinona, para obtener el 7-amino derivado de interés (**6**).

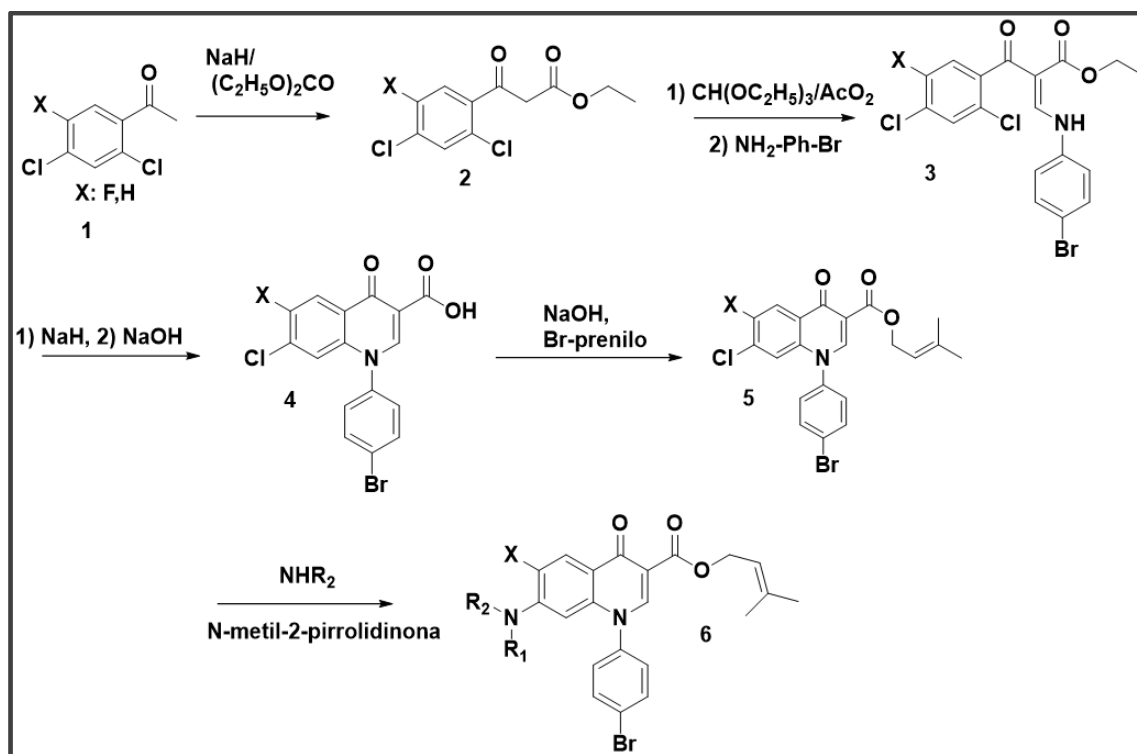


Figura 4.9. Ruta sintética que permitiría acceder a los compuestos P5, P6 y P7.

En la **Figura 4.10** se ilustra la secuencia sintética que permitiría acceder a los compuestos CH-6 y CH-7; los análogos sintetizados siguiendo esta ruta y allí reflejados, se corresponden con compuestos altamente equivalentes (el único motivo

por el cuál dicha secuencia no fue validada específicamente para los compuestos CH-6 y CH-7 radica en la no disponibilidad del sustrato de partida pertinente). Por otra parte, si bien dichos ligandos manifestaron una peor performance en término de los diversos métodos predictivos aquí aplicados comparados con los derivados pertenecientes a la familia de las quinolonas, igualmente resulta importante llevar a cabo los correspondientes ensayos de inhibición experimentales a los fines de contrastar los cálculos teóricos aquí presentados. Dichos compuestos, análogos de CH-6 y CH-7, fueron obtenidos como una mezcla de enantiómeros y no fueron posteriormente resueltos, ya que en principio, y según las diversas metodologías aplicadas, no habría diferencias cuantitativamente importantes entre la capacidad de inhibición de ambos estereoisómeros. La secuencia sintética parte de sustratos asequibles comercialmente, e involucra tan solo tres pasos de reacción sencillos, con rendimientos de producto aislado de moderados a bueno. El primer paso consiste en una condensación aldólica que, a partir de 4-bromoacetofenona (**1**) (en este punto, para acceder específicamente a los compuestos CH-6 y CH-7 sería necesario utilizar 4-cloroacetofenona) y 4-clorobenzaldehído (**2**) en presencia de hidróxido de sodio libre de solventes, permite acceder a la chalcona correspondiente (**3**) con buenos rendimientos (13). El paso siguiente involucra la reacción de reducción selectiva del carbonilo para dar el alcohol derivado (**4**). Dicha transformación se llevó a cabo con hidruro de Litio y Aluminio en éter, controlando cuidadosamente la temperatura ($-30\text{ }^{\circ}\text{C}$); en este sentido, se evidenció reducción del doble enlace cuando la reacción se llevó a cabo a mayor temperatura ($0\text{ }^{\circ}\text{C}$). En cuanto al último paso de la secuencia, involucra una reacción de sustitución nucleofílica bimolecular, utilizando bromuro de prenilo como reactante. En este paso, la utilización de hidruro de sodio, para generar el alcóxido intermediario correspondiente, permitió acceder al producto deseado con los mejores rendimientos. En este sentido, se exploraron otras opciones, como la utilización de Ag_2O , pero en tal caso los rendimientos fueron muy bajos.

En el **anexo 1** de esta Tesis se incluye la caracterización estructural de dichos compuestos, así como también descripciones técnicas de los distintos pasos de síntesis.

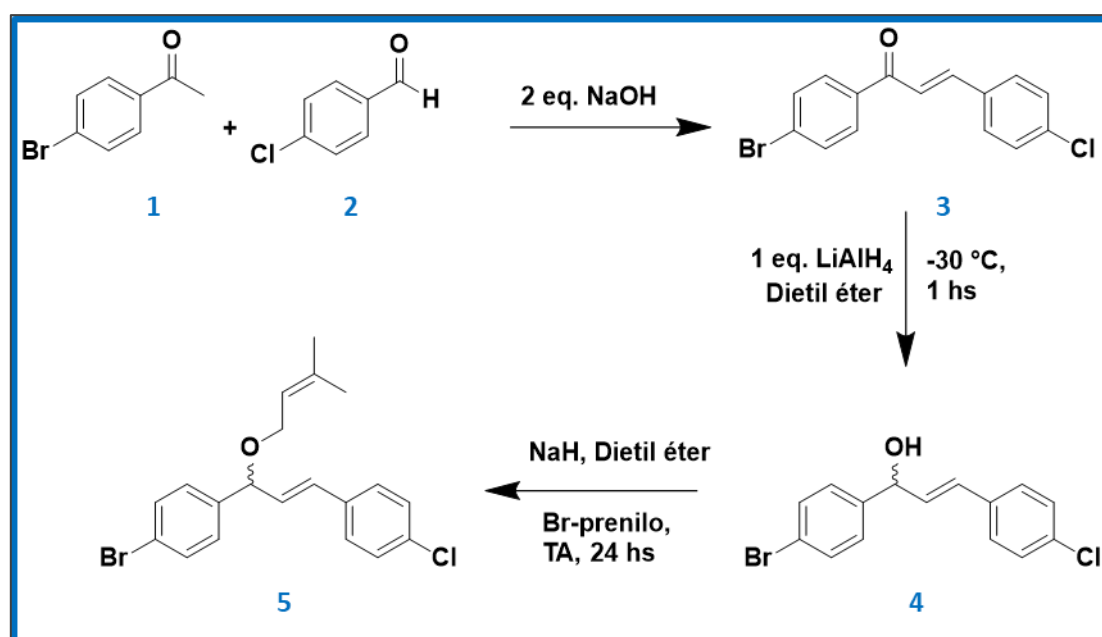


Figura 4.10. Ruta sintética utilizada en la obtención de los compuestos análogos de CH-6 y CH-7.

4.4- Conclusiones del capítulo:

Tal cómo se mencionó en el inicio de este capítulo, el desarrollo de metodologías predictivas de la capacidad inhibitoria de un potencial inhibidor resulta de obvia relevancia en el desarrollo de fármacos. A lo largo de este capítulo y mediante la aplicación de estudios de propensiones dinámicas de puentes de hidrógeno, en conjunto con otras metodologías predictivas, fue posible identificar novedosos compuestos, estructuralmente pertenecientes a la familia de las quinolonas, como promisorios inhibidores del complejo MDM2-p53.

Una vez más, y más allá que dicho objetivo excede los objetivos de esta Tesis, resulta imprescindible la contrastación experimental de los resultados aquí presentados, a fin de validar las metodologías predictivas aplicadas, y sobre todo la aplicación cuantitativa de los estudios de propensiones dinámicas de puentes de hidrógeno. Se espera que dicho trabajo sea acometido dentro de las tareas futuras, complementarias al presente trabajo de Tesis.

Referencias:

- 1) Morris, G.M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M.F.; Belew, R.K.; Goodsell, D.S. y Olson, A.J. *Journal of Computational Chemistry*, **2009**, 30, 2785.
- 2) Wang, J.; Cieplak, P. y Kollman, P.A. *Journal of Computational Chemistry*, **2000**, 21, 1049.
- 3) Wang, J.; Wolf, R.M.; Caldwell, J.W.; Kollman, P.A. y Case, D.A. *Journal of Computational Chemistry*, **2004**, 25, 1157.
- 4) Cornell, W.D.; Cieplak, P.; Bayly, C.I.; Gould, I.R.; Merz, K.M.; Ferguson, D.M.; Spellmeyer, D.C.; Fox, T.; Caldwell, J.W. y Kollman, P.A. *Journal of the American Chemical Society*, **1995**, 117, 5179.
- 5) Allen, J.G., Bourbeau, M.P., Wohlhietter, G.E., Bartberger, M.D., Michelsen, K., Hungate, R., Gadwood, R.C., Gaston, R.D., Evans, B., Mann, L.W., Matison, M.E., Schneider, S., Huang, X., Yu, D., Andrews, P.S., Reichelt, A., Long, A.M., Yakowec, P., Yang, E.Y., Lee, T.A., Oliner, J.D. *J.Med.Chem.* **2009**, 52, 7044.
- 6) Mariana Leão, Sara Gomes, José Pedraza-Chaverri, Neuza Machado, Emília Sousa, Madalena Pinto, Alberto Inga, Clara Pereira, and Lucília Saraiva. *J. Nat. Prod.* **2013**, 76, 774.
- 7) Daniela Pereira, Raquel T. Lima, Andreia Palmeira, Hugo Secab, Joana Soarese, Sara Gomes, Liliana Raimundo, Claudia Maciele, Madalena Pinto, Emília Sousa, M. Helena Vasconcelos, Lucília Saraiva, Honorina Cidade, Arabian Journal of Chemistry, ISSN: 1878-5352.
- 8) Raphael Stoll, Christian Renner, Silke Hansen, Stefan Palme, Christian Klein, Anja Belling, Wojciech Zeslawski, Mariusz Kamionka, Till Rehm, Peter Muhlhahn, Ralf Schumacher, Friederike Hesse, Brigitte Kaluza, Wolfgang Voelter, Richard A. Engh, and Tad A. Holak. *Biochemistry*, **2001**, 40, 336.
- 9) Wells J A and McClendon CL. *Nature* **2007**, 450, 1001.
- 10) Daniel T. W. Chu, Prabhavathi B. Fernandes, Akiyo K. Claiborne, Eva Pihuleac, Carl W. Nordeen, Robert E. Maleczka, Jr., and Andre G. Pernet. *American Chemical Society*. **1985**. 85, 1558.
- 11) Holzer P, Masuya K, Furet P, Kallen J, Valat-Stachyra T, Ferretti S, Berghausen J, Bouisset-Leonard M, Buschmann N, Pissot-Soldermann C, Rynn C, Ruetz S, Stutz S, Chène P, Jeay S, Gessier F. *J Med Chem.* **2015**, 58, 6348.
- 12) Mariana Leão, Joana Soares, Sara Gomes, Liliana Raimundo, Helena Ramos, Cláudia Bessa, Glória Queiroz, Sofia Domingos, Madalena Pinto, Alberto Ing, Honorina Cidade, Lucília Saraiva. *Life Sciences*. **2015**, 142, 60.
- 13) Daniel R. Palleros. *Journal of Chemical Education*. **2005**. 81, 1345.
- 14) François Gessier, Joerg Kallen, Edgar Jacoby, Patrick Chène, Thérèse Stachyra-Valat, Stephan Ruetz, Sébastien Jeay, Philipp Holzer, Keiichi Masuya, Pascal Furet. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2015**, 25, 3621.
- 15) Cintia A. Menéndez, Fabiana Nador, Gabriel Radivoy, and Darío C. Gerbino. *Org. Lett.*, **2014**, 16, 2846.
- 16) Jimena Scoccia, Julia Castro, Belén Faraona, Cecilia Bouzat, Víctor S. Martín, Darío C. Gerbino. *Tetrahedron*, **2017**, 73, 2913.
- 17) Susanne Vogel, Susanne Ohmayer, Gabi Brunner, Jörg Heilmann. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2008**, 16, 4286.
- 18) T. Narender, Shweta K. Tanvir, M. Srinivasa Rao, K. Srivastava, S. K. Puri. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2005**. 15, 2453.
- 19) Xi Chen, Emmanuel Mukwaya, Man-Sau Wong, and Yan Zhang. *Pharm Biol*, **2014**; 52, 655.
- 20) Nawong Boonnak, Chatchanok Karalai, Suchada Chantapromma, Chanita Ponglimanont, Hoong-Kun Fun, Akkharawit Kanjana-Opas, Surat Laphookhieod. *Tetrahedron*. **2006**, 62, 8850.

CAPITULO 5

*Cada vez que escucho hablar de ese gato,
empiezo a sacar mi pistola.*

-Stephen Hawking.

(¿Otra manera de expresar lo difícil de hacer predicciones?)

5.1- Descripción general y objetivos:

Tal como se describió brevemente en el capítulo introductorio de esta Tesis, la enfermedad de Alzheimer (AD, por sus siglas en inglés), es un desorden neurodegenerativo que conlleva al deterioro cognitivo progresivo e irreversible, pérdida de memoria y disminución del lenguaje (1). Se ha considerado que varios factores, tanto genéticos como ambientales, juegan un papel crucial en su patogénesis, que se caracteriza por: progresiva pérdida de transmisión neural colinérgica, formación de placas β -amiloides, que conllevan a la generación de placas seniles (SPs) y agregados neurofibrilares de la proteína hiperfosforilada Tau (NFTs por sus siglas en inglés) (2,3).

Los tratamientos paliativos actuales para AD moderada, se basan en la denominada hipótesis colinérgica, e involucran el tratamiento con inhibidores de la enzima Acetilcolinesterasa (AChEI), con el objetivo de mejorar la función cognitiva (4,5). Algunos ejemplos de drogas aprobadas son Rivastigmina, Donepezilo y Galantamina (**Figura 5.1**). De este modo, estas drogas son parte del mismo tipo terapéutico (AChEI), y sólo difieren en sus propiedades farmacológicas y farmacocinéticas; y en algunos de sus efectos secundarios. Desafortunadamente, todas las drogas aprobadas para AD ofrecen sólo un tratamiento paliativo de la enfermedad, pero son incapaces de prevenir la progresión de la misma. De este modo, resulta obvia la necesidad de descubrir nuevas drogas anti-Alzheimer. En este sentido, aproximaciones computacionales pueden ser de gran ayuda en el diseño de nuevos compuestos con propiedades farmacológicas mejoradas. Simulaciones de Dinámica y *Docking* Molecular, así como también otros estudios *in Silico*, fueron reportados sobre Acetilcolinesterasa (6-8). Tal como se mencionó previamente, simulaciones de *Docking* molecular son llevadas a cabo con el objetivo de encontrar el mejor modo de unión entre un pequeño ligando y un determinado receptor; y representa una de las herramientas más ampliamente utilizadas en el diseño de drogas/cribado virtual. En tanto que simulaciones de Dinámica Molecular, es un método bien establecido en el estudio de estructura y dinámica de macromoléculas biológicas.

Por otra parte, en los últimos años, creció el interés sobre diversas xantonas (tanto de origen natural como sintético) capaces de interaccionar con blancos moleculares relacionados a enfermedades neurodegenerativas (9,10). Más específicamente, varios derivados de esta clase de compuestos recibieron atención por sus propiedades como agentes anti- Acetilcolinesterasa (11-14). En la **Figura 5.2** se representan algunos de dichos compuestos a modo de ejemplo.

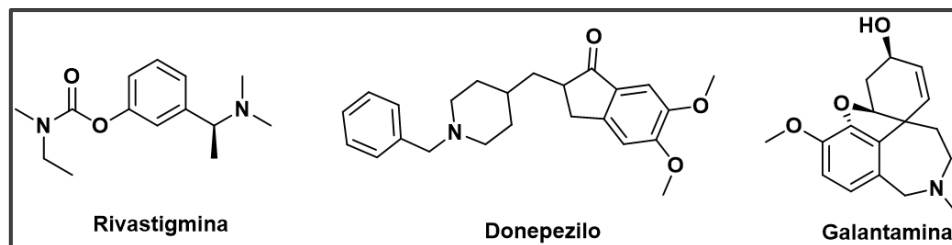


Figura 5.1. Estructura de AChEI aprobados para el tratamiento de AD.

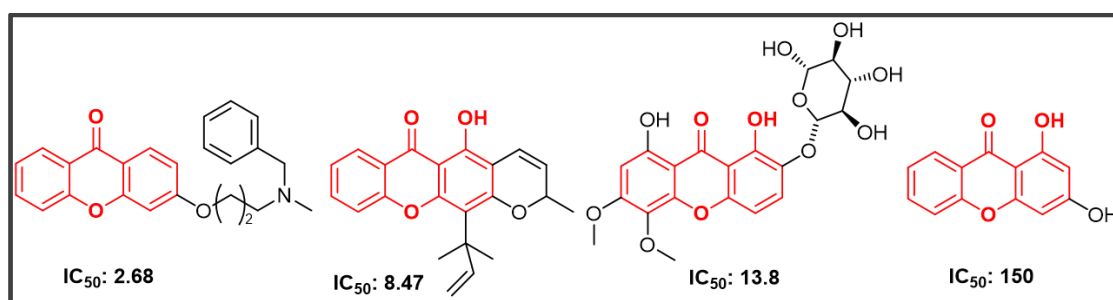


Figura 5.2. Xantonas como agentes anti- AChE. Los valores de IC_{50} están dados en concentraciones micro molar (μM).

En un trabajo reciente, se reportó una serie de derivados sintéticos de 1,3-dihidroxixantonas como agentes anti- AChE (15). De este modo, en el transcurso de este capítulo llevaremos a cabo simulaciones de *Docking* y Dinámica Molecular en principio con el objetivo de establecer las bases moleculares de las interacciones de esta serie de compuestos y AChE, y de este modo racionalizar dichos resultados experimentales. En la **Figura 5.3** se representan las estructuras de los compuestos pertenecientes a esta serie aquí estudiados. Posteriormente, exploraremos modificaciones racionales sobre esta clase de compuestos que permitan potenciar su efecto inhibitorio. En tal sentido, y tal como se mencionó en el capítulo anterior, el desarrollo de métodos computacionales capaces de predecir adecuadamente el efecto inhibitorio de una cierta clase de compuestos previo a la síntesis de los mismos, resulta de suma relevancia en el descubrimiento y diseño de fármacos. Con dicho objetivo, a lo largo de este capítulo evaluaremos las características predictivas y la aplicabilidad, en este contexto específico, de diversas metodologías computacionales.

Finalmente, una nueva serie de 1,3-dihidroxixantonas anfifílicas serán presentadas. Dichos compuestos fueron sintetizados y evaluados en ensayos *in-vitro* como inhibidores de AChE. Esta serie de resultados da origen a uno de los trabajos surgidos de esta Tesis: Cintia A. Menéndez, et al., "*Design, synthesis and biological evaluation of 1,3-dihydroxyxanthone derivatives: Effective agents against acetylcholinesterase*", *Bioorganic Chemistry*, 2017, 75: 201-209.

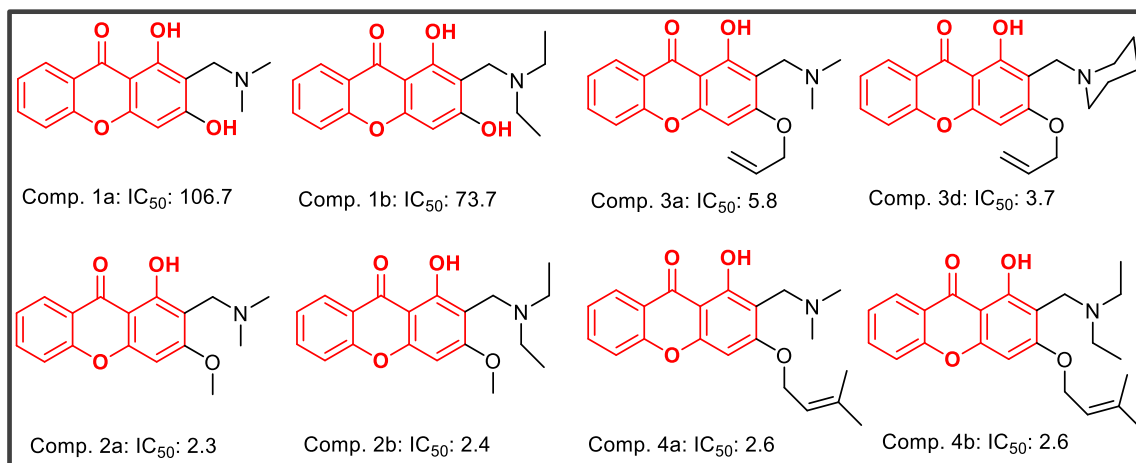


Figura 5.3. Estructura de los derivados sintéticos de 1,3-dihidroxixantonas evaluados estudiados computacionalmente.

5.2- Aplicabilidad de los estudios de propensiones dinámicas de puentes de hidrógeno

En primer lugar evaluaremos la aplicabilidad de los estudios de propensión dinámica de puentes de hidrógeno desarrollados a lo largo de esta Tesis e inspirados en principio en el contexto de interacciones proteína-proteína, en la exploración de las propiedades de BHBs del sitio de binding de la proteína AChE.

De este modo, y con el objetivo final de indagar justamente en el uso cuantitativo/predictivo de las propensiones dinámicas de puentes de hidrógeno tal como fue propuesto a lo largo de los capítulos 3 y 4 de esta tesis, es que se realizaron simulaciones de dinámica molecular de la proteína Acetilcolinesterasa en su forma apo (PDB: IEA5). De este modo, se condujeron simulaciones de 50 ns, y un total de 8 réplicas. Esta elección se basó en los resultados obtenidos previamente para la proteína MDM2 (capítulo 3), dónde se demostró la existencia de puentes de hidrógeno con una dinámica de ruptura que podía demorar decenas de nanosegundos, y dónde se determinó que un muestreo adecuado de la dinámica de dichas interacciones no covalentes resulta altamente dependiente del número de réplicas contempladas (al menos para los tiempos de simulación aquí considerados). Obviamente, en principio no sabemos cuáles serán los comportamientos específicos para los diversos BHBs involucrados en un sistema completamente diferente, como lo es el estudiado en este punto, con respecto a las macromoléculas caracterizadas previamente. Puntualmente, MDM2 pertenece a la familia de las E3 ligasas y está por lo tanto involucrada en modulaciones que contemplan interacciones proteína-proteína; y tal como se mencionó en el capítulo introductorio de esta tesis, dichas interfaces poseen características particulares, tales como elevada planaridad y grandes dimensiones (aproximadamente entre 750 y 1500 Å² es el área superficial a cada lado de la interface (16)). Además, para muchas interacciones proteína-proteína, la aparente complementariedad entre las dos superficies involucra un grado significativo de flexibilidad y adaptabilidad (17,18). Adicionalmente, en los casos de drogas disruptivas de interfaces proteína-proteína, la planaridad inherente de estas interfaces hace que las interacciones de HB del backbone estén más expuestas y, por lo tanto, exista menor estabilidad local en el sitio de binding, y tal como se mencionó previamente, existencia de una mayor flexibilidad y, por ende, se espera la manifestación de información relevante en la propensión dinámica de los BHBs (diferencias con la forma apo). De este modo, y ante dicha exposición parcial al solvente, resultan importantes los aportes

a la desolvatación local por parte del ligando. En contraposición, en la enzima, la propia geometría aporta significativamente a la desolvatación local. La existencia de un bolsillo (cavidad) ya de por sí repele en parte al solvente debido a la renuencia del agua a penetrar en la cavidad sacrificando puentes de hidrógeno agua-agua. Así la rigidez estructural del bolsillo de unión, que la aleja justamente de la situación para la cual se formuló el tratamiento de las propensiones dinámicas de BHBs, puede deberse en parte a estas características de hidratación diferenciales entre ambos tipos de sistemas. Aun así, acumulamos más de 400 ns de simulación (un total de 40000 configuraciones espaciadas de manera equidistante en cada réplica), lo cual resulta suficiente para acceder a un buen conocimiento de la dinámica de la proteína (más aún si consideramos que es una proteína altamente estructurada).

Por otra parte, en la enzima Acetilcolinesterasa, existen interacciones intermoleculares con el sustrato natural de tipo iónicas (subsitio aniónico, perteneciente al sitio catalítico). En este sentido, nuestro enfoque ha tratado con la modulación local de interacciones electrostáticas, pero sólo de tipo puente de Hidrógeno. Sería posible extender dicho enfoque pero, en virtud de lo antes expuesto, puede que ello tampoco sea demasiado relevante, pues la interacción iónica se da en un contexto ya anhidro (enterrada dentro de una cavidad y no sobre la superficie proteica). Finalmente, buena parte de la estabilización por binding se racionaliza, según el método de las propensiones dinámicas de BHBs, por la modulación que el ligando produce de dichas interacciones no-covalentes *intramoleculares* del backbone de la proteína blanco. En tanto que, en las regiones del (múltiple) sitio de unión de la enzima, como en el cuello de botella y el subsitio aniónico, resultarían relevantes interacciones no-covalentes *intermoleculares*.

Por lo tanto, aun a sabiendas de que dicho sistema podría no resultar demasiado apto para el tratamiento de propensiones dinámicas (de hecho, el sistema representa un buen candidato para evaluar los límites de aplicabilidad del método de las propensiones dinámicas de BHBs), de todos modos se eligió trabajar sobre el mismo en esta parte de la Tesis debido a la aplicabilidad aún de un abanico de metodologías computacionales de índole predictivas. Y sobre todo, a la posibilidad de realizar un trabajo integral, con la correspondiente contrastación experimental de los resultados teóricos, en colaboración con el grupo de investigación (también perteneciente al INQUISUR) dirigido por la Doctora Ana Paula Murray, y el cual posee una vasta experticia en este sistema.

En la **Figura 5.4** se representan las distribuciones de probabilidad para las distancias de matriz discriminando entre aquellos BHBs perteneciente al sitio de binding, y el resto, es decir todas aquellas interacciones alojadas en regiones fuera de dicho sitio. La elección del sitio de binding se realizó contemplando interacciones que involucraran algún aminoácido pertenecientes a las diferentes regiones del sitio de unión de la proteína AChE. Dichos residuos se encuentran listados en la **Figura 5.5**, discriminados por su ubicación puntual según pertenezcan al sitio activo, sitio aniónico periférico (PAS), o la región del cuello de botella. En tanto que para la determinación de las distancias de matriz (*DM*) se siguió el mismo procedimiento que el descripto en el capítulo 2. Brevemente, se construyeron matrices de contactos dinámicas (*D-BHB-CM*): dónde se representa básicamente el tiempo de vida medio de una determinada interacción en simulaciones de dinámica molecular de la proteína en solución; por otra parte, se determina la matriz equivalente para el PDB (*PDB-BHB-CM*) (cuando hablamos del PDB hacemos referencia puntualmente a la estructura experimental de dicha proteína, obtenida por cristalografía de rayos X). Adicionalmente, vale la pena recordar que el estado de un determinado BHBs en ambas matrices,

es determinado mediante criterios puramente geométricos (esto es formado o no formado, ya sea en el PDB o en una configuración particular del ensamble generado en la dinámica). Finalmente, para obtener los valores de DM se calcula la diferencia entre ambas matrices, $(PDB-BHB-CM - D-BHB-CM)$ elemento a elemento.

Si recordamos el equivalente a la **Figura 5.4** para los diversos complejos proteína- proteína evaluados en el capítulo 2 (**Figura 2.21**), vemos que el comportamiento dinámico de los BHBs del sitio de unión en AChE es claramente diferente. Más específicamente, observamos una distribución que si bien no describe exactamente el mismo patrón que el descrito por los BHBs fuera del sitio en consideración (el máximo de la distribución para los BHBs pertenecientes al sitio de binding está sutilmente desplazado hacia mayores valores de DM , aún así, están lejos del comportamiento bimodal antes hallado (**Figura 2.21**). En definitiva, observamos que la proteína AChE en su forma apo no se caracteriza por una dinámica en solución exacerbada; y consecuentemente, la estructura dinámica de dicha macromolécula solo manifiesta pequeñas fluctuaciones en torno a la correspondiente estructura determinada experimentalmente por cristalografía de rayos X.

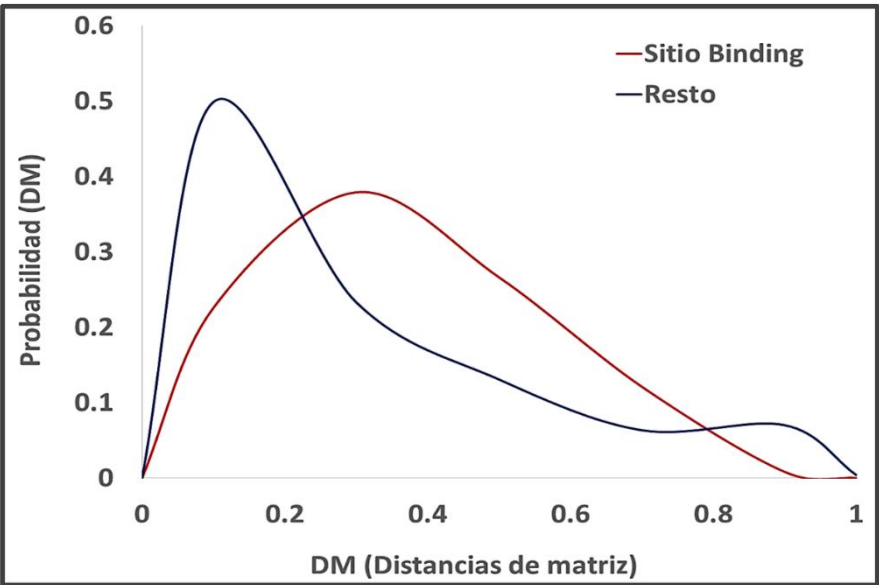


Figura 5.4. Distribuciones de probabilidad para las distancias de matriz (DM) para los BHBs pertenecientes al sitio de unión (Rojo); y para los BHBs fuera de dicha región (Azul).

Proteína	Regiones					
	Sitio Activo				Cuello de Botella	Sitio Aniónico Periférico
	Triada catalítica	Subsitio de Unión Acilo	Subsitio Aniónico	Subsitio Oxianión		
TcAChE	Ser 200, Hie 440, Glu 327	Trp233, Phe290, Phe288	Trp84, Tyr130 y Glu199	Gly118, Gly119 y Ala201	Phe330 y Tyr121	Asp72, Ser122, Trp279 y Tyr334

Figura 5.5. Regiones del sitio de Binding de TcAChE (Torpedo Californica) y los con los correspondientes residuos dentro de cada una de ellas.

Por lo expuesto previamente es que no se explorará la utilización de los estudios de propensión dinámica de BHBs con fines cuantitativos en este escenario. Recordemos en primer lugar que dichos estudios se basan principalmente en la restitución/modulación de interacciones por la presencia de un determinado ligando: ya sea que esta misma molécula cambie las propiedades de hidratación del entorno local de dicha interacción por su mera presencia, o bien, que la misma induzca cambios de un modo indirecto mediante modificaciones conformacionales ocurridas en la proteína, es decir, cambios en las posiciones de las cadenas laterales aledañas a dichos BHBs; pero cualquiera sea el caso, en definitiva, el puntapié inicial para dichas consideraciones es justamente la existencia de CHBs en la proteína en su forma apo. Es decir, interacciones altamente fluctuantes, donde su comportamiento diferencial es vinculable a las propiedades de hidratación en el entorno inmediato de la misma.

Por lo expuesto previamente, es preciso destacar entonces que no detectamos esta situación para AChE en su forma no ligada (al menos NO de un modo significativo: recordemos además que, en base a los estudios previos, clasificamos como CHBs todas aquellas interacciones con valores de *DM* mayores a 0.5). Y más aún, si pretendemos aplicar dichos estudios con fines predictivos de la afinidad de un determinado ligando (fines cuantitativos), entonces resulta poco auspiciosa su implementación en este caso puntual.

Por otra parte, y no menos importante, es necesario tener en mente que si bien el análisis de propensiones en sí no es costoso computacionalmente, requiere efectuar un muestreo adecuado de la dinámica de las interacciones en consideración, lo cual claramente conlleva una inversión importante de tiempos de computo (más aún si consideramos que la proteína tiene más de 500 residuos, lo que incrementa de manera significativa el tamaño del sistema si lo comparamos con MDM2, por ejemplo, dónde sólo teníamos una macromolécula de 85 aminoácidos). En definitiva, y ante este panorama, consideramos conveniente recurrir a otras evaluaciones, que podrían poseer en principio un mejor pronóstico de éxito.

Como una alternativa, exploraremos las propiedades termodinámicas del agua de hidratación en el sitio de binding de la proteína AChE (de alguna manera estamos observando el mismo problema desde la perspectiva opuesta a la considerada previamente). Más específicamente, explotaremos las propiedades termodinámicas diferenciales (heterogeneidades) del agua de hidratación en el sitio de binding de la enzima AChE. De este modo, generaremos un mapa de hidratación de dicho sitio, discriminado diversas regiones según las propiedades de las moléculas de agua allí alojadas. Finalmente, será posible la identificación de regiones dónde la ubicación de moléculas de agua es energéticamente desfavorable, y de este modo, es esperable que dicho solvente pueda ser fácilmente remplazado por un ligando con las propiedades (principalmente químicas) adecuadas. Con tal propósito, aplicaremos la herramienta de análisis GIST (19,20) (análisis de las propiedades termodinámicas del agua, utilizando una grilla en el cálculo), recientemente incorporada en el módulo de análisis de Cpptraj.

Posteriormente, consideremos la utilización de una nueva función de *Score* basada en la capacidad de los diversos ligandos por desplazar/ocupar sitios donde el agua interacciona desfavorablemente con la macromolécula en consideración. Luego, resulta oportuno mencionar que dicha aproximación fue previamente evaluada del mismo modo sobre el factor de coagulación Xa (20).

5.3- Simulaciones de *Docking* Molecular

En principio, se llevaron a cabo simulaciones de *Docking* molecular con el objetivo de racionalizar el modo de unión de las diversas 1,3-dihidroxixantonas derivados (**Figura 5.3**); posteriormente se procedió del mismo modo con los diferentes nuevos análogos que aquí se proponen. Las simulaciones se llevaron a cabo con el programa Autodock 4, siguiendo los mismos lineamientos generales que se aplicaron en el capítulo anterior para los diversos ligandos evaluados con MDM2. La estructura de AChE fue acondicionada a partir del PDB: IUTG (organismo: Torpedo Californica), retirando las moléculas de agua de cristalización así como también el respectivo ligando. La resultante estructura fue minimizada, luego se adicionaron cargas Gasteiger y finalmente fueron removidos todos los átomos de hidrógeno no polares utilizando el programa Autodock Tools (ADT) (22). La caja de simulación fue concebida de manera tal de incluir todos los residuos listados en la **Figura 5.5**. Esto generó una caja de 86 puntos en cada dirección, con un espaciado entre puntos consecutivos de 0.375 Å.

Las estructuras tridimensionales de los diversos compuestos evaluados fueron generadas mediante el programa UCSF-Chimera (21), posteriormente la parametrización de dichos ligandos se realizó con el módulo del programa *antechamber*, usando el campo de fuerza GAFF (*General AMBER Force Field*). El análisis de interacciones en todos los casos se realizó con el programa LigPlot+ (23,24), así como también las diversas figuras 2D incluidas a lo largo de este capítulo. La validación del algoritmo de búsqueda del protocolo de *Docking* aquí aplicado se llevó a cabo con Tacrina, dicha molécula es un conocido inhibidor de AChE. Luego, fue posible hallar la configuración experimental con un valor de RMSD entre ambas (configuración predicha y experimental) entorno a 1 Å.

5.3.1- Resultados de las Simulaciones de *Docking* Molecular

Tal como se mencionó previamente, empleamos simulaciones de *Docking* molecular con el objetivo de racionalizar el modo de interacción de una serie de xantonas con actividad anti- AChE. A grandes rasgos, los resultados de dichas simulaciones indican la capacidad de estas moléculas para interaccionar con residuos pertenecientes al cuellos de botella, como lo es **PHE 330**, residuos del sitio aniónico periférico (PAS), como por ejemplo **TYR 334** y **ASP 72**, y con el residuo **TRP 84** del sitio activo (dentro de dicho sitio, este AA se aloja específicamente en la región del subsitio aniónico, tal como se describe en detalle en la **Figura 5.5**).

En la **Figura 5.6** se incluye de manera representativa una imagen en dos dimensiones de las interacciones formadas entre la enzima AChE y el **compuesto 1a**. Allí se pueden observar en líneas verdes los puentes de hidrógeno que presuntamente se desarrollarían entre este análogo en particular y la enzima (específicamente con los residuos Ser 122 y Tyr 334). Además, en semicírculos rojos se representan los diversos aminoácidos con los cuáles se producen interacciones de Van der Waals. Allí se ven además todas las interacciones antes mencionadas, y en líneas generales comunes a esta serie de nuevos análogos.

Una consideración importante de mencionar en este punto es que la función de Score del protocolo de *docking* aquí empleado no permitió correlacionar adecuadamente las actividades de estos inhibidores con los resultados experimentales.

Posteriormente, y con el objetivo, por un lado de obtener predicciones energéticas para la formación de los diversos complejos más precisas, así como también, cuantificar las diversas interacciones presentes entre estos compuestos y la proteína AChE, es que se llevaron a cabo cálculos de energía libre empleando el método MM-GBSA sobre configuraciones de los diversos sistemas en consideración, obtenidas a partir de simulaciones de Dinámica Molecular. Dichos estudios y los correspondientes resultados de describen en el próximo inciso.

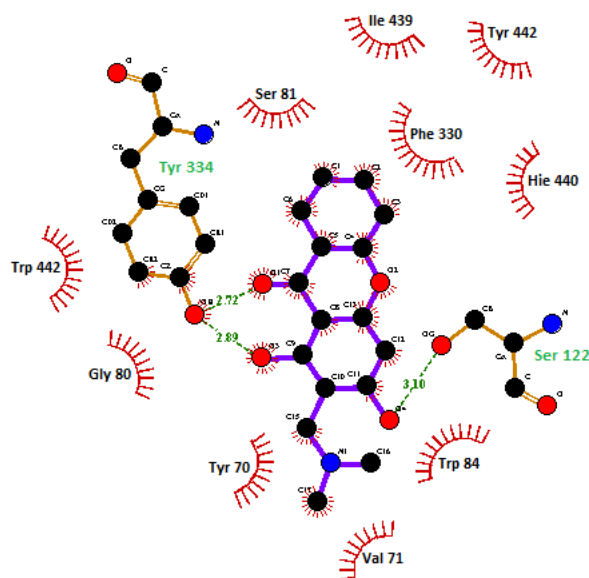


Figura 5.6. Representación en dos dimensiones del compuesto 1a en el sitio de binding de la enzima Acetilcolinesterasa. Las líneas puntuadas verdes representan interacciones por puentes de hidrógeno (los valores allí indicados corresponden a las distancias entre los átomos pesados de dichas interacciones).

5.4- Simulaciones de Dinámica Molecular

Todas las simulaciones realizadas siguieron los lineamientos generales descritos en el inciso de métodos (2.2) del capítulo 2. Las configuraciones iniciales para los diversos complejos fueron tomadas de las simulaciones de *Docking* molecular, posteriormente minimizadas y equilibradas antes de coleccionar datos. Las dinámicas de producción fueron de 10 ns, coleccionando un total de 2000 configuraciones espaciadas de manera equidistante. Finalmente, los cálculos de energía libre se realizaron sobre dicho ensamble configuracional.

5.4.1- Cálculos de energía libre: discriminación por residuos.

En principio realizamos cálculos de energía libre utilizando el método MM-GBSA, y diferenciando las contribuciones puntuales de los diversos residuos de la proteína. De este modo, fue posible identificar la interacción con el **Trp 84** como una de las más relevantes en todos los complejos evaluados. Adicionalmente, detectamos una posible interacción iónica (puente salino) entre el **Glu 199** y el grupo amino de los diversos análogos aquí considerados. Un detalle relevante en este punto es que dicha interacción en algunos casos se manifestó de manera intermitente (como es el caso del **compuesto 2a**). Además, en

los periodos de tiempo en los cuáles dicho puente salino permaneció formado, se produjo en detrimento de otras interacciones, como por ejemplo las involucradas con el **Trp 432**, para el caso puntual de **compuesto 2a**.

En la **Figura 5.7** se representan en primer término las fluctuaciones temporales de las distancias N-O para la interacción electrostática en consideración. Esto es, entre el N del grupo amino del compuesto 2a y el átomo de O de la cadena lateral del aminoácido **Glu 199**. Sucesivamente, se representan gráficos correspondientes a la descomposición por residuos de la energía libre de formación de dicho complejo (**compuesto 2a-AChE**); para configuraciones pertenecientes a dos periodos de tiempo diferenciales: el primero corresponde al espacio de tiempo comprendido entre los 0 y 4 ns, (en dicho periodo la interacción permanece formada); y luego para la ventana de tiempo desplegada entre los 5 y 10 ns, dónde la condición para la interacción electrostática entre el **Glu 199** y el grupo amino del compuesto considerado es opuesta, es decir, no tiene lugar.

De este modo, observamos que las características estructurales de esta serie de análogos resultaban incompatibles con el establecimiento **simultáneo** de ambos grupos de interacciones. Como veremos en breve, este hecho será una de las principales características a explotar al momento de plantear modificaciones sobre estos ligandos con el objetivo de potenciar su actividad inhibitoria.

5.4.2- Cálculos de energía libre globales: aplicación predictiva.

Posteriormente, y con el objetivo de obtener estimaciones energéticas más precisas del proceso de formación de los diversos complejos evaluados, se llevaron a cabo estimaciones globales de dicho proceso. Aunque dichas estimaciones correlacionaron de un modo más adecuado con los datos de inhibición experimentales respecto a la función de score del protocolo de *Docking*, aun así permitieron solo discriminar los compuestos muy poco activos de aquellos agentes anti-AChE moderados (**Figura 5.8**).

Compuesto	IC-50 (μM)	DG (Kcal/mol)
1a	106.7	-29.3
1b	73,7	-31.55
3a	5,8	-41
3d	3,7	-47.3
2a	2,3	-36.5
2b	2,4	-39.9
4a	2,6	-46.6
4b	2,6	-44.39

Figura 5.8. Valores de energía libre para los diversos complejos entre los ligandos listados y AChE. Dichas estimaciones fueron realizadas sobre 2000 configuraciones obtenidas de simulaciones de dinámica molecular, aplicando el método MM-GBSA.

De este modo, los valores de energía libre listados y el logaritmo de los valores experimentales de IC_{50} de dichos inhibidores, describen una relación lineal con un coeficiente de determinación de 0.65.

5.5- Análisis de las propiedades termodinámicas del agua de hidratación: GIST

Tal cómo se describió brevemente en el inicio de este capítulo, exploraremos la implementación de una aproximación predictiva novedosa y alternativa (los diferentes métodos antes aplicados realizan estimaciones energéticas a partir de

cuantificaciones de las diversas interacciones directas que tienen lugar en un determinado complejo, en este caso puntual, entre un ligando y la enzima), cómo lo son estimaciones 'energéticas' realizadas a partir de la caracterización termodinámica del agua de hidratación presente en el sitio de binding de la enzima y que debe ser remplazada por los diversos ligandos en el proceso de complejación.

Esta aproximación, basada en la teoría de solvatación inhomogénea y ya aplicada en otros sistemas biológicos (20), se basa en la detección de regiones donde el agua interacciona desfavorablemente con la proteína, en otras palabras, resulta energéticamente desfavorable que el agua ocupe estas posiciones y por lo tanto, es de esperar, será fácil de remover.

De este modo, en primer lugar se llevaron a cabo simulaciones de dinámica molecular en solución acuosa de la enzima AChE, restringiendo las posiciones de todos los átomos pesados de dicha proteína. Es necesario realizar las simulaciones aplicando restricciones de posición ya que posteriormente se realiza el cálculo de las propiedades termodinámicas del agua en el sitio de interés, utilizando una grilla (cuyos puntos son fijos). Se utilizó la misma estructura para AChE considerada en los estudios previos de Docking, y las simulaciones se realizaron siguiendo exactamente el protocolo dado en el tutorial oficial de Amber para la aplicación de GIST (cuyo link se copia a continuación: <http://ambermd.org/tutorials/advanced/tutorial25/>).

Posteriormente, la grilla dónde se calcularon las propiedades termodinámicas del agua se ubicó en el sitio de binding de manera tal de incluir todos los residuos listados en la **Figura 5.5**. Dichos mapas de hidratación fueron construidos sobre diferentes períodos de tiempo y espaciado entre configuraciones, con el fin de evaluar la convergencia de dicho análisis.

5.5.1- GIST: validación cuantitativa de la metodología.

Las regiones de agua fácil de remover, esto es, agua ubicada en regiones energéticamente desfavorables (con alta energía), fueron determinados a partir de los puntos de la grilla para los cuáles la densidad fue mayor a 1.9 y la energía libre menor a -0.5 Kcal/mol (en términos absolutos); en ambos casos el punto de referencia es el bulk. En la **Figura 5.9** se representan de modo demostrativo dichas regiones sobre el sitio de binding de la enzima AChE.

Dichos mapas de hidratación fueron realizados para los siguientes períodos de tiempo y espaciado entre configuraciones:

- 1) Desde 0 a 20 ns, con un espaciado entre configuraciones sucesivas de 1 ps (20000 configuraciones).
- 2) Desde 0 a 100 ns, con un espaciado entre configuraciones sucesivas de 5 ps (20000 configuraciones).
- 3) Desde 100 a 120 ns, con un espaciado entre configuraciones sucesivas de 1 ps (20000 configuraciones).

Adicionalmente, estimamos las dimensiones de las regiones en las cuáles el agua es fácilmente removible, que fueron ocupadas por cada ligando (por superposición de la conformación adoptada por dicho compuesto en el sitio de unión de la enzima, con el mapa de hidratación en dicha posición). En esta estimación consideramos dos tipos de configuraciones para el ligando:

- A) El modo de unión predicho por el protocolo de *Docking*.
- B) Configuraciones tomadas de las dinámicas de los respectivos complejos, en los momentos en los cuáles no hubieron fluctuaciones en los valores de RMSD para el ligando.

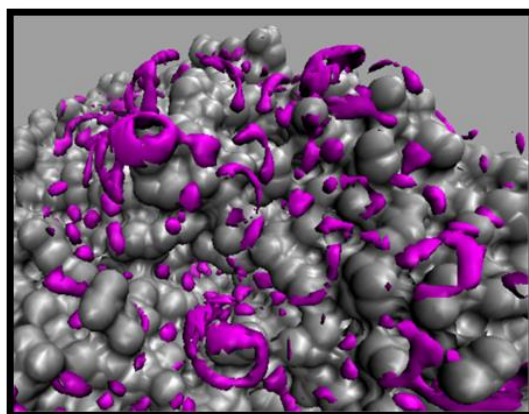


Figura 5.9. En gris se representa la superficie proteica. En violeta se representan las regiones de agua fácil de remover.

De este modo, obtuvimos buenas correlaciones para los tres períodos de tiempo evaluados cuando se consideraron, para los diversos ligandos, configuraciones procedentes de las simulaciones de dinámica molecular (B). Los coeficientes de determinación obtenidos (R^2) fueron 0.78 para el primer período considerado y 0.75 para los dos restantes. Luego, para el caso de las configuraciones directamente procedentes de las simulaciones de *Docking* Molecular los resultados fueron en general más pobres, dando correlaciones con valores de R^2 de: 0.7, 0.63 y 0.58 respectivamente. El hecho de que se hayan obtenido mejores resultados cuando se consideraron configuraciones para el ligando procedente de las simulaciones de dinámica molecular es esperable ya que por lo general dichas técnicas suelen ser aplicadas en este orden, justamente por la capacidad del método de simulación de dinámica molecular para ‘refinar’ los resultados obtenidos a partir de un *Docking* molecular. En la **Figura 5.10** se reflejan los resultados antes mencionados para los 8 derivados xantónicos aquí evaluados.

Compound	Score	GBSA	BOX-1A *	BOX-1B *	BOX-2A *	BOX-2B *	BOX-3A *	BOX-3B *
	<i>docking</i>	(Kcal/mol)						
2a	-10.59	-36.5	434	470	439	478	429	471
4b	-12.92	-44.39	495	494	506	475	500	494
4a	-11.88	-46.6	486	491	492	480	485	496
3a	-11.07	-41	442	446	441	448	437	435
2b	-10	-39.9	464	495	471	497	466	493
1a	-10.14	-29.3	373	384	371	373	370	398
1b	-10.5	-31.55	428	436	425	440	424	434
3d	-12.76	-47.3	513	498	500	498	502	495

Figura 5.10: (*) Regiones de agua fácilmente removibles (dadas como número de puntos de la grilla que representan). 1A, 1B, 2A, 2B, 3A y 3B hace referencia a los períodos contemplados y tipo de configuraciones para el ligando.

Finalmente, a partir de los resultados expuestos previamente, y a modo de conclusión parcial en este punto, podemos resaltar que la aplicación de la metodología aquí descripta permitió obtener resultados en buen acuerdo con las medidas

experimentales; y por lo tanto será considerada posteriormente en la evaluación de nuevos análogos, como una herramienta predictiva adicional.

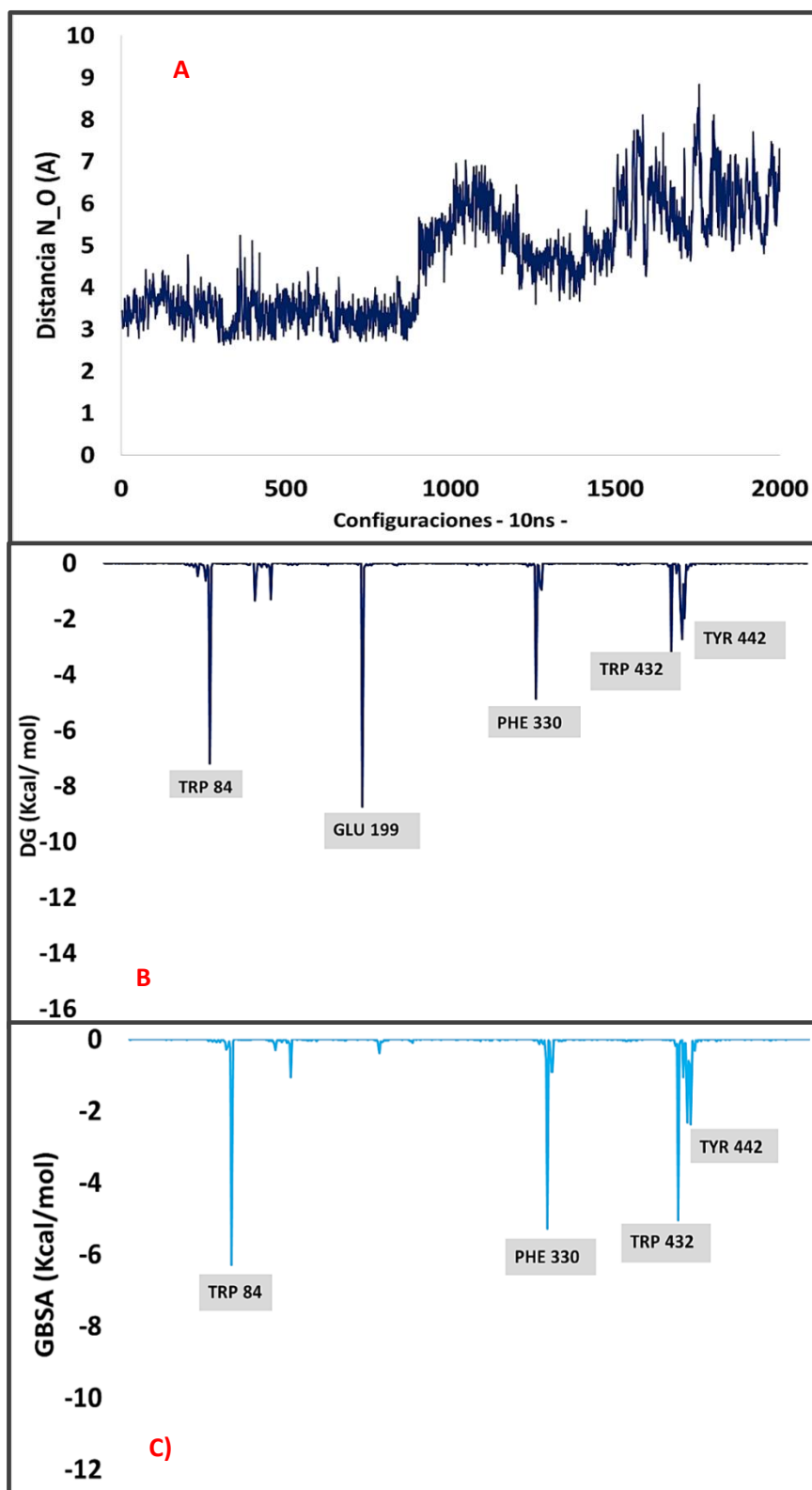
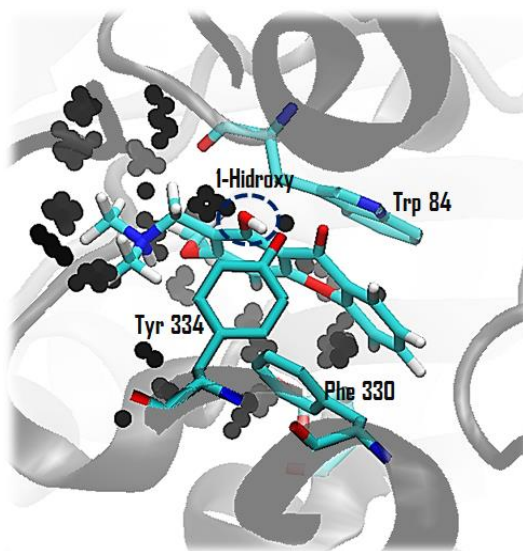


Figura 5.8. a) Distancias en función del tiempo entre el N del grupo amino del compuesto Ia, con respecto al O de la cadena lateral del AA Glu 199. b) Energía libre en Kcal/mol por cada residuo de la proteína, para el período de tiempo que va desde 0 a 4 ns. c) Cálculo de energía libre discriminando la contribución por residuos de la proteína, para el período de tiempo que va desde 5 a 10 ns.

5.5.1- GIST: determinantes cualitativas

Luego, y explotando la información brindada por el mismo estudio, evaluamos cualitativamente la habilidad de los diferentes compuestos en mimetizar apropiadamente el comportamiento reflejado por el solvente. Más específicamente, evaluamos la capacidad de los diferentes ligandos en alojar átomos o grupos hidrofílicos en las regiones donde el agua demostró interactuar favorablemente con el receptor; esto es moléculas de agua fuertemente unidas: fueron seleccionadas como aquellas con una energía libre mayor a -0.5 Kcal/mol (en términos absolutos), de nuevo, tomando como referencia el bulk. Posteriormente, procedimos del mismo modo que en el caso anterior, es decir superpusimos las configuraciones adoptadas por los diferentes compuestos en el sitio de binding con este mapa ahora para agua 'fuertemente unida'. De este modo, fue posible observar que en todos los casos el grupo oxidrilo de la posición uno está localizado en una región donde el agua interacciona de manera favorable con la proteína. Lo mismo se observó para el átomo de oxígeno del carbonilo aledaño, así como también para el oxidrilo (o éter según el compuesto) de la posición tres del esqueleto xantónico. Lo dicho se representa en la figura a continuación. Allí, las esferas negras representan precisamente los sitios de agua fuertemente unida.



5.6- Modificaciones racionales: Motivo estructural para nuevos análogos.

De este modo, pudimos obtener información relevante de los estudios previos, conducente a la incorporación de modificaciones racionales sobre los derivados xantónicos hasta aquí analizados, con el propósito de potenciar su actividad como agentes anti-AChE. Esto es, por medio de cálculos de energía libre y discriminación de la misma por residuos, fue posible establecer dos regiones principales de interacción: por un lado, el sistema tricíclico fusionado interacciona con el residuo Trp 84 y PHE 330 por medio de pi-staking; por otra parte, la región cargada positivamente del grupo amino manifestó la posibilidad de interactuar con el Glu 199 mediante un puente salino. Adicionalmente, los resultados cualitativos antes mencionados del estudio GIST (mapa de agua fuertemente unida) arrojaron claras evidencias de la relevancia del grupo oxidrilo en la posición uno del esqueleto xantónico, el cuál es químicamente compatible con las propiedades del mapa de hidratación en esa región; además, dicho residuo mostró la capacidad de desarrollar interacciones directas con la enzima, puntualmente formando un puente de hidrógeno con la Tyr 334. Además, mediante las simulaciones de dinámica molecular, se observó que estos compuestos oscilaban entre dichas regiones de interacción, pero en algunos casos, siendo incapaces de mantener ambos contactos simultáneamente. Todo lo dicho permite vislumbrar modificaciones simples que potencialmente podrían incrementar la actividad de esta clase de compuestos.

5.6.1- Nuevos derivados:

En base a todos los resultados enumerados previamente proponemos una nueva serie de derivados xantónicos 1,3-dihidroxilados, adecuadamente sustituidos de modo tal que puedan desarrollar interacciones en las dos regiones antes descriptas, pero de manera simultánea. Para lograr tal objetivo proponemos la introducción de un *linker* de mayor longitud entre el sistema tricíclico fusionado (capaz de interactuar con Trp 84, Phe 330 y Tyr 334) y el grupo amino (interaccionando con el Glu 199).

De este modo, proponemos el motivo estructural mostrado en la **Figura 5.11**. Para dichos análogos se realizaron los mismos estudios teóricos y siguiendo los mismos protocolos que los antes descriptos para los derivados xantónicos estudiados inicialmente.

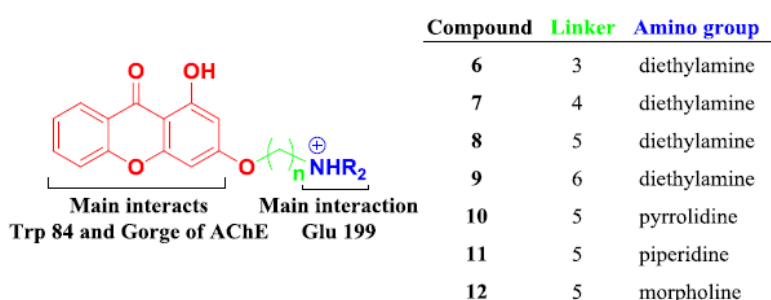


Figura 5.11. Motivo estructural de los nuevos derivados xantónicos.

Como se puede observar, el largo del linker estudiado teóricamente fue de 3 a 6 átomos de carbono, incluyendo grupos etilos como sustituyentes en el grupo amino (6, 7, 8 y 9). En la **Figura 5.11** se representan además los compuestos 10, 11 y 12, aunque dichos compuestos fueron evaluados sólo experimentalmente (para estos últimos derivados, sólo se llevaron a cabo estudios de *Docking* Molecular, los resultados se comentan a continuación).

5.6.2- Resultados Teóricos para los nuevos análogos:

Los resultados de las simulaciones de *Docking* Molecular revelan la capacidad de todos los nuevos derivados xantónicos para interactuar mediante puente salino con el Glu 199; en tanto que las interacciones desarrolladas por el sistema tricíclico fusionado fueron similares a las descriptas por los compuestos tomados aquí como referencia.

Con el objetivo de estimar el rango de actividades esperadas para las nuevas xantonas y adicionalmente determinar una longitud para el linker óptima; de este modo: realizamos estimaciones de energía libre para la formación de los respectivos complejos con AChE por parte de los compuestos en esta nueva serie, además, y del mismo modo como procedimos antes, calculamos el número de puntos de la grilla correspondientes a regiones de agua fácilmente removible ocupados por cada ligando (**Figura 5.12**). Luego, realizamos también estimaciones de las contribuciones energéticas, discriminadas por residuos de la proteína, para el proceso de complejación (**Figura 5.13**).

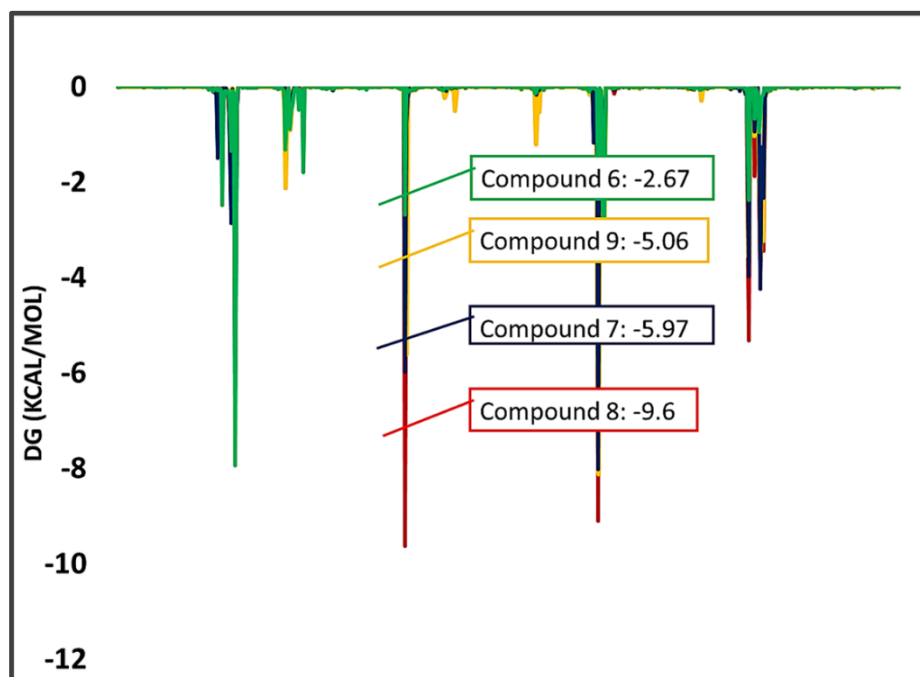


Figura 5.13. Superposición de las estimaciones energéticas para el proceso de formación de los diversos complejos entre AChE y los nuevos derivados xantónicos aquí propuestos. Dichos resultados se muestran discriminados según las contribuciones efectuadas por parte de los diferentes residuos de la proteína.

Compound	Score	GBSA	BOX-					
	<i>docking</i>	(Kcal/mol)	BOX-1A*	BOX-1B*	BOX-2A*	BOX-2B*	3A*	BOX-3B*
6	-11.41	-28.67	279	169	294	178	305	183
7	-11.92	-36.6	418	280	435	293	431	296
9	-12.55	-49.18	429	418	442	413	443	415
8	-12.3	-48.7	416	334	430	350	426	381

Figura 5.12. (*) Regiones de agua fácilmente removibles (dadas como número de puntos de la grilla que representan). 1A, 1B, 2A, 2B, 3A y 3B hace referencia a los períodos contemplados y tipo de configuraciones para el ligando.

A partir de los valores de energía de interacción entre el grupo amino de los compuestos evaluados con el residuo Glu 199, podemos inferir que la longitud de linker óptima debería ser de 5 metilenos. Si observamos los resultados listados en la **Figura 5.12** de manera global surgen como los candidatos más promisorios los compuestos 8 y 9 (compuestos cuyo linker es de 5 y 6 metilenos respectivamente).

Luego, y con el objetivo de contrastar los resultados teóricos aquí presentados, llevamos a cabo la síntesis de esta serie de compuestos (**6-9**) y posteriormente su efecto como agentes anti-AChE fue evaluado mediante el métodos de Ellman's (**Figura 5.14**) (25). Dichos estudios fueron realizados en colaboración con el grupo de investigación dirigido por la Dra. Ana Paula Murray.

Finalmente, y teniendo en cuenta las contrastaciones experimentales expandimos la serie a partir del compuesto que resultó ser más activo (compuesto 8), intercambiando únicamente el grupo amino. De este modo fueron sintetizados y evaluados los compuestos 10-12.

5.7- Síntesis orgánica de los nuevos derivados xantónicos anfifílicos

En la **Figura 5.13** se despliega la ruta sintética conducente a los nuevos derivados xantónicos 1,3-dihidroxiados. Dicha secuencia tiene como puntos de partida compuestos accesibles comercialmente y cuenta tan solo de 3 pasos de reacción. El primero de los mismos involucra la generación del esqueleto xantona 1,3-disustituido, utilizando la reacción de Eaton's (26), el compuesto **1** fue obtenido a partir de la condensación de ácido 2-hidroxibenzoico con fluoroglucinol en presencia de una mezcla de pentóxido de fósforo y ácido metansulfónico como agente de condensación (conocido como reactivo de Eaton's). Dicho compuesto fue obtenido como un sólido amarillo dando un 60 % de rendimiento de producto aislado después de purificación cromatográfica utilizando silica gel 60. La subsecuente esterificación del grupo oxidrilo en la posición 3 del sistema tricíclico fusionado se llevó a cabo en acetona seca/ K_2CO_3 y los correspondientes dibromoalcanos, accediendo de este modo a los intermediarios **2-5**. Posteriormente, dichos compuestos intermediarios fueron tratados con las aminas secundarias apropiadas para dar las correspondientes xantonas anfifílicas **6-12** con buenos rendimientos (75-92%), además dicha reacción fue realizada bajo condiciones suaves, esto es a temperatura ambiente y en un medio únicamente de acetona como solvente (27).

En el anexo I de esta Tesis se incorporan las caracterizaciones estructurales de dichos compuestos (IR y RMN).

5.8- Ensayos de Inhibición de AChE

Se utilizó AChE proveniente de anguila eléctrica (Electric eel AChE), como fuente de colinesterasa. La actividad inhibitoria de AChE se midió *in vitro*, mediante el método espectrofotométrico desarrollado por Ellman con pequeñas modificaciones (25). La enzima liofilizada (500 U) fue disuelta en buffer fosfato A (8mM K_2HPO_4 , 2.3 mM NaH_2PO_4) para obtener una solución madre 5U/ml. Luego, se realizaron diluciones de la enzima con el buffer fosfato B (8 mM K_2HPO_4 , 2.3 mM NaH_2PO_4 , 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.6), generando así finalmente una solución de la enzima 0.126 U/ml. Posteriormente, las muestras fueron disueltas en buffer fosfato B con 2.5 % de metanol como cosolvente. Soluciones de la enzima (300 μ L) y de la muestra (300 μ L) se mezclaron a temperatura ambiente en un tubo testigo e incubadas por 60 minutos a temperatura ambiente. Luego, fue iniciada por adición de 600 μ L de la solución del sustrato (0.5 mM DTNB, 0.6 mM ATCl, 0.1 M Na_2HPO_4 , pH 7.5). La absorbancia fue leída a 405 nm por 120 s a 27 °C. Finalmente la actividad enzimática fue calculada a partir de las comparaciones en las velocidades de la reacción para las muestras con respecto al blanco. Todas las mediciones fueron realizadas por triplicado. Los valores de IC_{50} fueron determinados con GraphPad Prism 5. Tacrina (99 %) fue utilizada como inhibidor de referencia.

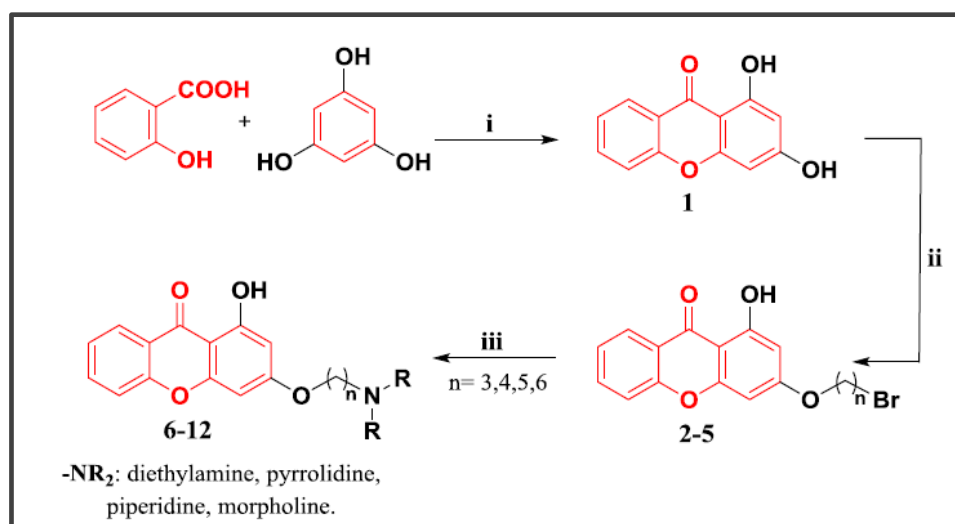


Figura 5.13. Ruta sintética conducente a los nuevos derivados xantónicos 1,3-dihidroxilados: **i)** P_2O_5 , ácido metansulfónico, 80 °C, 2 h; **ii)** $Br(CH_2)_nBr$, K_2CO_3 , acetona, r.t, 24 h; **iii)** amina secundaria, acetona, r.t, 24 h.

Compound	Linker length	Amino group	IC ₅₀ ± SD (μM)
6	3	diethylamine	3.29 ± 0.26
7	4	diethylamine	4.86 ± 0.50
8	5	diethylamine	0.69 ± 0.10
9	6	diethylamine	2.37 ± 0.33
10	5	pyrrolidine	0.95 ± 0.19
11	5	piperidine	0.46 ± 0.02
12	5	morpholine	12.09 ± 1.87
<i>tacrine</i> ^a	–	–	0.029 ± 0.003

^a Reference inhibitor.

Figura 5.14. Resultados de inhibición para los diversos compuestos, determinados mediante el método colorimétrico de Ellman.

5.9- Propuesta de futuras modificaciones

A partir de los resultados obtenidos previamente, y considerando los incrementos de actividad logrados en los compuestos antes propuestos y evaluados; se realizaron evaluaciones teóricas de un par de nuevos compuestos, los cuales mantienen las características estructurales antes señaladas, esto es: el sistema tricíclico fusionado del esqueleto xantónico (manteniendo el hidroxilo de la posición 1) y un grupo cargado positivamente en la cadena lateral, separados ambos motivos por un linker de longitud adecuada. De este modo, en la **Figura 5.15** se muestran las estructuras de estas novedosas xantonas aquí evaluadas computacionalmente. En este punto, vale la pena destacar que una característica común a estas moléculas, es la incorporación de aminoácidos que contengan grupos aminos o derivados en sus cadenas laterales, los cuáles podrían estar cargados en condiciones fisiológicas, y de este modo interactuar de manera análoga a los compuestos de la serie anterior.

Dicho esto, y más allá de las evaluaciones que aquí se presentan, es importante mencionar la necesidad de corroborar las predicciones en cuanto al modo de interacción de los derivados xantónicos propuestos, sintetizados y biológicamente

evaluados hasta este punto (estamos haciendo referencia específicamente a la obtención de información estructural experimental de los respectivos complejos, mediante cristalografía de rayos X, por ejemplo). Dichos estudios sentarían una base de conocimiento mucho más firme para el desarrollo de nuevas generaciones de xantonas como agentes anti-AChE, con actividades inhibitorias potenciadas. Más allá de la evidente importancia de los estudios mencionados, este objetivo está fuera del alcance de esta tesis.

Los nuevos análogos teóricamente propuestos, en principio serían sintéticamente accesibles, y dicha secuencia implicaría la utilización de aminoácidos (puntualmente lisina o arginina), lo cual podría permitir acceder a estructuras de una mayor complejidad, en relativamente pocos pasos de síntesis. Además, estos nuevos ligandos podrían tener la ventaja adicional de ser compuestos más biocompatibles, justamente por sus características estructurales.

En la **Figura 5.15** se muestran además los resultados de las puntuaciones obtenidas a partir de las simulaciones de *Docking* Molecular. Aquí vale la pena mencionar que si bien los resultados obtenidos para la primera serie de compuestos aquí evaluados (**Figura 5.3**) no tuvieron una adecuada correlación con las determinaciones experimentales, si observamos los resultados para los compuestos **6-9**, volcados en las **Figuras 5.12 y 5.14**, encontramos una mejor performance para dicha metodología. Por lo tanto, y por tratarse de compuestos estructuralmente similares, contemplaremos estos resultados. De este modo, ambos compuestos **X1** y **X2** manifestaron una mejor performance en cuanto a las funciones de *Score de Docking* obtenidas que los derivados anteriores. Posteriormente se llevaron a cabo simulaciones de Dinámica Molecular para el compuesto **X1** (la selección se basó en las posiciones de Docking predichas similares a las de los compuestos anteriores **6-9**), y se aplicó nuevamente el método MM-GBSA para calcular la energía libre del proceso de formación de dicho complejo, así como también su descomposición según las contribuciones de los diferentes residuos de la proteína (**Figura 5.16**). Para dicho complejo se obtuvo un valor de delta de energía libre de -63 Kcal/mol. Dichos resultados lo convierten en un compuesto altamente promisorio. A partir de la información dada en la **Figura 5.16** se puede apreciar la posibilidad de este compuesto de sumar una interacción de alta intensidad con el residuo Glu 327 perteneciente a la triada catalítica (más allá de que la magnitud de dicha interacción puede estar siendo sobre estimada, aun así los resultados no dejan de ser promisorios).

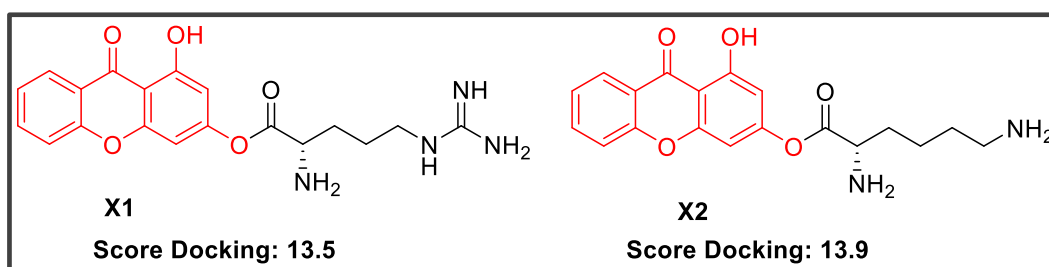


Figura 5.15. Estructura de nuevos derivados incorporando aminoácidos en su estructura.

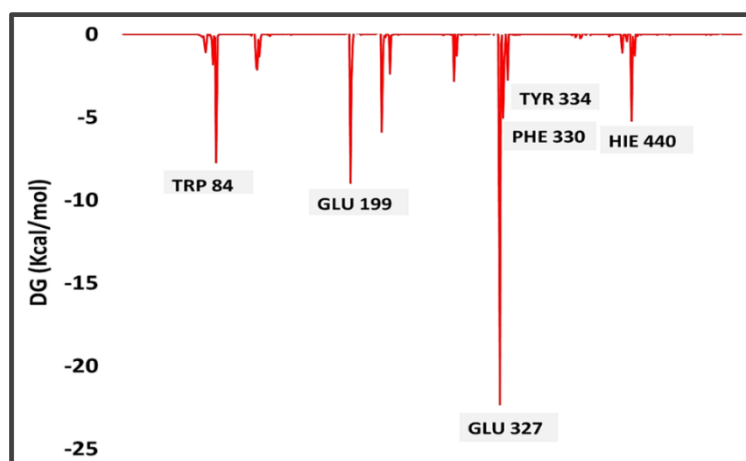


Figura 5.16. Estimación energética para el proceso de formación del complejo entre AChE y XI. Dichos resultados se muestran discriminados según las contribuciones efectuadas por parte de los diferentes residuos de la proteína.

5.10- Conclusiones del Capítulo

A lo largo de este capítulo llevamos a cabo una serie de estudios que nos permitieron racionalizar el modo de interacción de un serie de 1,3-dihidroxixantonas previamente reportadas como agentes anti-AChE. De las diferentes metodologías aplicadas, los estudios de GIST (estudio de las propiedades termodinámicas del agua de hidratación) arrojaron los mejores resultados en cuanto a su capacidad predictiva. Una aclaración pertinente en este punto es que los resultados obtenidos para dicho estudio pueden ser altamente dependientes del tamaño de los compuestos considerados. En este sentido en todos los casos se realizaron comparaciones sobre moléculas pertenecientes a la misma familia de compuestos y sin variaciones trascendentes en el tamaño de los mismos. Además, y más allá de la aproximación cuantitativa antes mencionada para dicho enfoque; fue posible establecer patrones cualitativos en la estructura de los nuevos análogos, a partir de la detección de regiones de agua fuertemente unida, las cuales deberían ser remplazadas con grupos del ligando químicamente compatibles (hidrofílicos).

Luego, y en base a los resultados anteriores, se propusieron modificaciones racionales simples con el objetivo de lograr una potenciación de la actividad inhibitoria; finalmente, se sintetizaron y evaluaron biológicamente una nueva serie de xantonas anfífilas. Dentro de dicha serie, el **compuesto II** mostró el mayor efecto inhibitorio de la enzima AChE con un IC_{50} de 0.46 μ M; esto es aproximadamente un orden de magnitud más potente con respecto a los derivados previos más activos.

Referencias:

- 1) D.M. Walsh, D.J. Selkoe, *Neuron*, **2004**, 44, 181.
- 2) R. León, A.G. Garcia, J. Marco-Contelles, *Med. Res. Rev.* **2013**, 33, 139.
- 3) A. Agis-Torres, M. Söllhuber, M. Fernandez, J.M. Sanchez-Montero, *Curr. Neuropharmacol.* **2014**, 12, 2.
- 4) R. Ling, M. Yoshida, P.S. Mariano, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 4439.
- 5) M. Singh, M. Kaur, H. Kukreja, R. Chugh, D. Silakari, D. Singh, *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 70, 165.
- 6) A) B.K. Goering, Ph.D. Dissertation. Cornell University, **1995**. (B) D. J. Selkoe, *Science*. **2012**, 337, 1488.
- 7) K. Tai, T. Shen, R.H. Henchman, Y. Bourne, P. Marchot, J.A. McCammon, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 6153.
- 8) J. Kua, Y. Zhang, J.A. McCammon, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 8260.
- 9) J.S. Negi, V.K. Bisht, P. Singh, M.S.M. Rawat, G.P. Joshi, *J. Appl. Chem.* **2013**, 1-9.
- 10) K.S. Bhullar, H. Rupasinghe, *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, 1-18.
- 11) S. Panda, M. Chand, R. Sakhuja, S. Jain, *Curr. Med. Chem.* **2013**, 20, 4481.
- 12) A. Rampa, A. Bisi, P. Valenti, M. Recanatini, A. Cavalli, V. Andrisano, V. Cavrini, L. Fin, A. Buriani, P. Giusti, *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 3976.
- 13) F. Belluti, A. Rampa, L. Piazza, A. Bisi, S. Gobbi, M. Bartolini, V. Andrisano, A. Cavalli, M. Recanatini, P. Valenti, *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 4444.
- 14) L. Piazza, F. Belluti, A. Bisi, S. Gobbi, S. Rizzo, M. Bartolini, V. Andrisano, M. Recanatini, A. Rampa, *Bioorgan. Med. Chem.* **2007**, 15, 575.
- 15) J. Qin, W. Lan, Z. Liu, J. Huang, H. Tang, H. Wang, *Chem. Cent. J.* **2013**, 7, 78.
- 16) Lo Conte, L., Chothia, C. & Janin, J. The atomic structure of protein-protein recognition sites. *J. Mol. Biol.* **1999**, 285, 2177.
- 17) Sundberg, E. J. & Mariuzza, R. A. *Structure Fold. Des.* **2000**, 8, 137.
- 18) DeLano, W. L., Ultsch, M. H., de Vos, A. M. & Wells, J. A. *Science*, **2000**, 287, 1279.
- 19) S. Ramsey, C. Nguyen, R. Salomon-Ferrer, R.C. Walker, M.K. Gilson, T. Kurtzman, *J. Comp. Chem.* **2016**, 37, 2029.
- 20) C.N. Nguyen, A. Cruz, M.K. Gilson, T. Kurtzman, *J. Chem. Theory Comput.* **2014**, 10, 2769.
- 21) E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E.J. Ferrin, *Comput. Chem.* **2004**, 25, 1605.
- 22) G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson, *J. Comput. Chem.* **2009**, 16, 2785.
- 23) A.C. Wallace, R.A. Laskowski, J.M. Thornton, *Prot. Eng.* **1996**, 8, 127.
- 24) R.A. Laskowski, M.B. Swindells, *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, 51, 2778.
- 25) G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres, R.M.A. Featherstone, *Biochem. Pharmacol.* **1961**, 7, 88.
- 26) P.E. Eaton, G.R. Carlson, J.T. Lee, *J. Org. Chem.* **1973**, 38, 4071.
- 27) Z.M. Yanga, J. Huang, J.K. Qina, Z.K. Daib, W.L. Lana, G.F. Sua, H. Tanga, F. Yanga, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 85, 487.

CAPITULO 6

*La ciencia será siempre una búsqueda,
jamás un descubrimiento real.
Es un viaje, nunca una llegada.*

-Karl Popper

Conclusiones generales

A lo largo de este trabajo intentamos explorar principalmente cómo las interacciones no covalentes se ven moduladas por las propiedades de hidratación de su entorno local (o desde la otra cara de la misma moneda, como se ven moduladas según la hidrofobicidad o hidrofiliicidad local). Más específicamente, a lo largo de esta Tesis, centramos nuestra atención en el estudio de interacciones no covalentes electrostáticas: en principio en sistemas modelo simples (placas de grafeno funcionalizadas adecuadamente) y luego en sistemas complejos, como lo son las proteínas. En ambos escenarios vimos que los resultados fueron unidireccionales, y revelaron la necesidad imperiosa de considerar explícitamente al agua (medio) como el tercer actor principal en la escena, dónde su presencia o ausencia, no pasa inadvertida, impartiendo una clara modulación de las interacciones no covalentes que en ella tengan lugar. Finalmente, mostramos que dichas observaciones fundamentales pueden ser explotadas, por ejemplo, en el campo del diseño de fármacos.

De este modo, algunas de las contribuciones de este trabajo podrían ser resumidas en los siguientes puntos:

- En el segundo capítulo, en primer lugar examinamos cómo las propiedades del agua de hidratación afectan a las interacciones electrostáticas que en ella tienen lugar. Por medio de un estudio sistemático de las energías de autoensamblado de sistemas con cargas embebidas en distintos entornos químicos, pudimos probar que la hidrofobicidad local optimiza las interacciones de carga. De hecho mostramos que por medio de la selección del entorno químico apropiado se puede duplicar la energía de autoensamblado de los sistemas estudiados, aún con exactamente la misma interacción de cargas. Por último, pero no por ello menos importante, pudimos atribuir casi la totalidad de la diferencia encontrada sobre las energías de enlace a un comportamiento diferencial del agua hidratando cada uno de los sistemas.

- Luego, en parte de los capítulos 2 y 3, indagamos en la modulación de interacciones no covalentes fundamentales para la estructura proteica como los son los puentes de hidrogeno del backbone (BHBs). Allí también dimos cuenta de la influencia del grado de exposición al solvente sobre este tipo de interacciones electrostáticas, mediante simulaciones de Dinámica Molecular con dichas macromoléculas disueltas en un medio de agua pura, así como también, en mezclas incluyendo un cosolvente orgánico. De este modo, en primer lugar, pudimos ver que el nivel de desprotección de BHBs en una serie de proteínas en su forma apo (las mismas involucradas en interacciones proteína-proteína en las vías metabólicas en las cuáles ejercen su función), no solo afecta la intensidad de dicha interacción sino que, finalmente, termina condicionando la estructura local e incluso la dinámica en solución de dichas proteínas. Adicionalmente, comparamos esta situación con la observada para una serie de complejos de estas macromoléculas, tanto con sus ligandos naturales como así también con pequeñas moléculas disruptivas de los correspondientes complejos proteína- proteína. Allí, dimos cuenta de la estabilidad estructural de dichos complejos, en parte, concedida por cambios en las propiedades de hidratación de ciertos BHBs. Finalmente, acuñamos el nombre de CHBs para todos aquellos BHBs con comportamiento diferencial entre su forma apo en solución (dinámica) y su estructura termodinámicamente más estable, como lo es la obtenida experimentalmente, por ejemplo por cristalografía de rayos X. Así, argumentamos también sobre la necesidad de incorporar la noción de las proteínas como objetos inherentemente dinámicos, es decir, de entender que existen motivos de unión y motivos de reconocimiento molecular no necesariamente identificables en la estructura más estable (aquella obtenida de manera experimental) sino, más bien, circunscritos a estados transitorios en la dinámica en solución de dicha proteína.
- También indagamos en las características 'adherentes' de estas zonas de la proteína caracterizadas por una dinámica en solución especialmente exacerbada respecto de lo observable en la estructura cristalina. Luego, probamos que estas zonas de mayor variabilidad dinámica, efectivamente están especialmente involucradas en el reconocimiento y unión de sustratos, y nuevamente, tienden a volverse más rígidas una vez acoplado el ligando.
- En el capítulo 3 realizamos caracterizaciones termodinámicas del proceso de ruptura de dichos CHBs, y los clasificamos según la dinámica observada en el proceso de ruptura y restitución, en interacciones con una dinámica rápida o lenta; luego dicha condición resultó coincidente con la existencia o no de un segundo mínimo en el perfil de ruptura de dicha interacción.
- Hacia el final del capítulo 3 exploramos la utilización de propensiones de puentes de hidrógeno del backbone de un modo predictivo de la eficiencia de un ligando en su unión a la proteína blanco objeto de estudio. De este modo, esta aproximación se validó para un set de moléculas químicamente diversas con reportada capacidad disruptiva de la interacción MDM2-p53. Luego, en el capítulo 4 aplicamos esta nueva metodología, junto a otras aproximaciones bien establecidas en química medicinal, en la búsqueda de nuevos inhibidores del complejo MDM2-p53. Así, se propuso una nueva serie de quinolonas como promisorios candidatos en este contexto.
- En el capítulo 5, en principio indagamos en la aplicación de estudios de propensiones dinámicas de puentes de hidrógeno del backbone en la optimización de nuevos inhibidores de la enzima AChE. Allí se hicieron evidentes las limitaciones de esta nueva metodología en casos en los que la proteína blanco presenta una cavidad de unión bien

definida, y altamente estructurada; y dónde esta característica estructural podría ser conferida (al menos en parte) por la desolvatación de estos sitios (promovida por sus características geométricas inherentes). Luego, en este mismo capítulo, apelamos a la caracterización termodinámica del agua en el sitio de unión de la enzima AChE, y de este modo determinamos aquellas regiones donde el agua interacciona desfavorablemente con la proteína (y por lo tanto caracterizada por una elevada energía). Dicho de otro modo: confeccionamos mapas de hidratación con especial interés en regiones ocupadas por agua fácil de remover. Posteriormente, se evaluó la utilización de una nueva función de puntuación para la clasificación de una serie de ligandos como inhibidores de AChE, en función del número de sitios de agua fácilmente removibles que en teoría serían capaces de desplazar bajo asociación con la proteína. Finalmente, haciendo uso de esta última aproximación (ya empleada del mismo modo en otros contextos), así como también de otras metodologías ampliamente aplicadas en química medicinal, propusimos una serie de modificaciones racionales sobre una serie de xantonas con capacidad inhibitoria de AChE previamente reportada. Así, se sintetizaron y evaluaron biológicamente una set de nuevos derivados xantonicos anfifílicos 1,3-dihidroxilados, de los cuales el **compuesto II** mostró la mayor capacidad inhibitoria con un valor de IC_{50} de 0.46 μ M. Evidenciando de este modo un incremento en su potencia como agente anti-AChE entre uno y dos órdenes de magnitud con respecto a los análogos predecesores.

- ANEXO 1 -

En este anexo se describen los procedimientos experimentales para la obtención de análogos de los compuestos CH-6 y CH-7 (CH-6* y CH-7*), descritos en el capítulo 4; así como también la nueva serie de xantonas anfilílicas descritas en el capítulo 5.

A1. Detalles experimentales generales

Todas las reacciones fueron realizadas bajo atmósfera de argón usando una línea de Schlenk estándar. Todos los solventes fueron secados y destilados antes de su utilización. Las reacciones fueron monitoreadas por TLC (thin-layer chromatography) en placas de sílica gel (60F-254) y luego visualizadas bajo luz UV (ultravioleta) o bien utilizando un 5% de ácido fosfomolibdico en etanol como revelador.

Todos los espectros de ^1H y ^{13}C fueron adquiridos a temperatura ambiente, utilizando cloroformo deuterado, acetona deuterada o dimetilsulfóxido deuterado como solventes, en un espectrofotómetro Bruker Avance ARX-300. En todos los casos los diferentes desplazamientos químicos son reportados en partes por millón (ppm) tomando como referencia tetrametilsilano (TMS), y considerando la señal residual del solvente (CDCl_3 : 7.26 ppm para ^1H NMR y 77.16 ppm para ^{13}C NMR; $\text{DMSO}-d_6$: 2.50 ppm para ^1H NMR y 39.50 ppm para ^{13}C NMR; Acetone- d_6 : 2.09 ppm para ^1H NMR, 30.60 y 205.87 ppm para ^{13}C NMR). Las multiplicidades de las señales se abrevian como: s = singulete, d = doblete, t = triplete, q = quarteto, m = multiplete). Los espectros de IR fueron obtenidos en un espectrometro Perkin-Elmer Paragon 1000 FT-IR, en el modo ATR (Attenuated total reflectance), a temperatura ambiente. Los puntos de fusión de los diferentes compuestos fueron determinados en un instrumento Buchi 510 y no fueron corregidos. Los espectros de masa fueron adquiridos en un equipo Agilent CG-78903 con un detector selectivo de masas MS-5977A MSD, mediante ionización de la muestra a 70 eV. La pureza de los compuestos volátiles y los análisis cromatográficos fueron determinados con un equipo GC Shimadzu (GC-14B) equipado con una columna HP-5MS column (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm), utilizando nitrógeno como gas portador. Los espectros de masa de alta resolución fueron adquiridos en un equipo Thermo Fisher LTQ Orbitrap XL, (para EI) and a Finnigan MAT 95 (para ESI).

La purificación de los diversos compuestos se llevó a cabo por cromatografía en columna flash con Macherey Nagel MN Kieselgel 60M (0.040- 0.063 mm / 230-240 mesh ASTM).

A2- Procedimientos experimentales: obtención de los compuestos CH-6* y CH-7*

A2-1. Síntesis chalcona 3*, 1-(4-bromofenil)-3-(4-clorofenil) prop-2-en-1-ona ¹

¹ Daniel R. Palleros. Journal of Chemical Education. 2004. 81: 1345- 1347.

En un mortero se mezclaron manualmente durante algunos minutos una mezcla equimolar de 4-bromoacetofenona y 4-clorobenzaldehído (0.5 gr y 0.38 gr respectivamente), junto a 2 equivalentes de hidróxido de sodio (0.210 gr). Posteriormente, y una vez que dicha mezcla se encontró homogéneamente como un líquido, el contenido se volcó sobre hielo, se lavó con agua destilada, secó, y finalmente el crudo resultante se purificó por cromatografía en columna utilizando silica gel 60. Así, se obtuvo el producto deseado **3*** como un sólido amarillo muy pálido (0.6 gr, 70% rendimiento), por elución isocrática con hexano/EtOAc (98:2). P.f: 163- 164 °C.

Caracterización: ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3), δ : 121.8, 128.0, 129.3, 129.6, 130.0, 132.0, 133.2, 136.70, 136.76, 143.8, 189.07.

A2-2. Síntesis alcohol derivado 4*, 1-(4-bromofenil)-3-(4-clorofenil) prop-2-en-1-ol:

Bajo atmósfera de argón, se solubilizó la chalcona **3*** (0.6 gr, 1.8 mmol) en dietil éter controlando la temperatura en -30 °C, posteriormente se adicionó lentamente LiAlH_4 (0.45 mmol, 16 mg). Se mantuvo con agitación a la misma temperatura por aproximadamente 1 hora, hasta que la reacción se completó (el avance fue monitoreado por TLC). Es importante resaltar en este punto la necesidad de controlar la temperatura en el rango antes señalado, ya que, cuando la reacción se llevo a cabo a temperatura ambiente o con un baño de hielo, se evidenció la reducción del doble enlace.

Luego el exceso del agente reductor se descompuso mediante el agregado de una solución saturada de cloruro de amonio. El compuesto deseado se extrajo con diclorometano. Así, se obtuvo el producto deseado (como una mezcla de diastereoisómeros) con una consistencia oleosa (70 % rendimiento producto crudo, 0.4 gr) . Dicho compuesto se utilizó sin purificación posterior en la evaluación del próximo paso de reacción.

Caracterización: ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3), δ : 79.06, 79.18, 126.5, 127.03, 127.64, 127.68, 128.5, 128.56, 130.24, 130.41, 131.32, 131.52, 136.56, 141.12, 141.20.

A2-3. Síntesis CH-6* y CH7*, 1-bromo-4-(3-(4-clorofenil)-1-((3-metilbut-2-en-1-il) oxi) alil) benceno:

Bajo atmósfera de argón, se colocó una suspensión de NaH en éter etílico. Posteriormente, se adicionó lentamente el alcohol derivado **4*** (0.4 gr, 1 mmol) se solubilizó en el mismo solvente orgánico y finalmente, se incorporó el haluro de alquilo correspondiente, en este caso bromuro de prenilo (1.5 eq, 1.5 mmol, 0.15 mg). Dicha reacción se dejó evolucionar a temperatura ambiente; y se evaluó su avance por TLC. El exceso de hidruro se descompuso mediante agregado de agua acidulada; posteriormente se realizaron extracciones con diclorometano, y luego de secarse las fases orgánicas con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y posterior eliminación del solvente orgánico en rotavap, se obtuvo el producto crudo como un oleo. Seguidamente, su purificación se efectuó mediante cromatografía en columna utilizando silica gel 60. Así, se obtuvieron los compuestos CH-6* y CH-7* como una mezcla (0.29 gr , 60% rendimiento), por elución isocrática con hexano/EtOAc (98:2).

Caracterización: ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3), δ : 18.06, 25.77, 65.02, 80.68, 120.77, 121.41, 127.71, 128.40, 128.61, 128.63, 129.58, 130.22, 130.26, 130.69, 131.57, 131.77, 133.35, 134.89, 137.38, 140.19.

A3- Procedimientos experimentales y caracterizaciones de las xantonas anfifílicas 1,3-dihidroxiladas (capítulo 5)

A3-1. 1,3-dihidroxixantona (1)²

Bajo atmósfera de argón, se mezcló pentóxido de fósforo (0.90 g, 6.35 mmol) y ácido metansulfónico (0.13 g, 15 mL, 0.10 mol). Dicha mezcla se calentó a 90 °C durante 30 minutos aproximadamente (hasta obtener una solución limpiada). Luego, se adicionó una mezcla de floroglucional (0.38 g, 3 mmol) y ácido 2-hidroxibenzóico (0.46 g, 3 mmol); dicha reacción se mantuvo con calentamiento a reflujo durante 1 hora, monitoreando el avance por TLC. Una vez completada la reacción, la mezcla se volcó sobre una mezcla de agua-hielo. Como resultado en este paso se obtuvo un sólido naranja, el cuál fue filtrado y lavado con agua destilada. Finalmente, el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna utilizando silica gel 60. Así, se obtuvo el producto deseado **1** como un sólido amarillo (0.48 g, 2.1 mmol, 70%), por elución isocrática con hexano/EtOAc (80:20).

Caracterización: P.f. 255-257 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 6.20 (d, *J*= 2.1 Hz, 1 H), 6.37 (d, *J*=2.1 Hz, 1 H), 7.42-7.45 (m, 2 H), 7.55 (td, *J*= 8.0 Hz, 1 H), 8.10 (dd, *J*= 8.0, 1 H, 1.5 Hz), 11.07 (s, 1 H), 12.80 (s, 1 H); IR (KBr), ν (cm⁻¹): 3327, 1654, 1610, 1570, 1491, 1470, 1445, 1222, 1163, 1078, 827, 762. ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ 95.1, 99.1, 103.1, 118.2, 120.7, 125.3, 126.6, 135.7, 156.4, 158.1, 163.8, 165.2, 180.4.

A3-2. Procedimiento general para la síntesis de los derivados 3-bromoalcoxixantonas³

Bajo atmósfera de argón, se hizo reaccionar una mezcla de **1** (100 mg, 0.4 mmol) y K₂CO₃ (110 mg, 0.8 mmol) en acetona seca (2 mL), con los respectivos 1,*n*-dibromoalcanos (0.6 mmol, *n* > 2), a temperatura ambiente durante 24 horas aproximadamente. Dicha reacción fue monitoreada por TLC; y una vez concluida se procesó volcando el contenido sobre hielo. Luego, el resultante sólido amarillo se filtró, lavó con agua destilada, se secó bajo corriente de aire, y el residuo final fue purificado por columna cromatográfica utilizando silica gel 60. De este modo, los correspondientes compuestos **2-5** se obtuvieron por elución isocrática con mezclas hexano/EtOAc (95:5), como sólidos amarillos.

Caracterizaciones estructurales:

Compuesto 2, 3-(3-Bromopropoxi)-1-hidroxi-9H-xanten-9-ona: Rendimiento de producto aislado 60% (sólido amarillo pálido), obtenido por reacción del compuesto **1** y 1,3-dibromopropano. P.f.: 119-121 °C; ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ: 2.28-2.39 (m, 2 H), 3.54 (t, 2 H), 4.12 (t, 2 H), 6.34 (d, 1 H), 6.43 (d, 1 H), 7.42-7.44 (m, 2 H), 7.71 (ddd, 1 H), 8.24 (dd, 1 H), 12.85 (s, 1

² Eaton, P. E.; Carlson, G. R.; Lee, J. T. *J. Org. Chem.* **1973**, *38*(23), 4071-4073.

³ Zheng-Min Yang, Jun Huang, Jiang-Ke Qina, Zhi-Kai Daib, Wen-Li Lana, Gui-Fa Sua, Huang Tanga, Feng Yanga. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *85*, 487-497.

H, OH). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 29.6, 30.0, 66.0, 93.2, 97.5, 104.1, 117.6, 120.1, 124.1, 125.9, 135.1, 156.1, 157.7, 163.6, 165.8, 180.8. IR (KBr): 3450, 2965, 1660, 1611, 1575, 1465, 1297, 1160, 1037, 828 cm^{-1} .

Compuesto 3, 3-(4-Bromobutoxi)-1-hidroxi-9H-xanten-9-ona: Rendimiento de producto aislado 45 % (sólido amarillo); a partir del compuesto **1** y 1,4-dibromobutano. P.f.: 132–135 $^{\circ}\text{C}$; ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 2.76–2.79 (m, 4 H), 3.63 (t, 2 H), 4.25 (t, 2 H), 6.38 (d, 1 H), 6.59 (d, 1 H), 7.49 (m, 1 H), 7.56 (d, 1 H), 7.87 (ddd, 1 H), 8.23 (dd, 1 H), 12.88 (s, 1 H, OH). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 27.7, 29.4, 33.3, 67.6, 93.2, 97.5, 104.0, 117.6, 120.6, 124.1, 125.9, 135.5, 156.1, 157.8, 163.6, 166.1, 180.8. IR (KBr): m 3546, 2959, 1663, 1609, 1572, 1469, 1299, 1158, 1081, 824 cm^{-1} .

Compuesto 4, 3-(5-Bromopentiloxy)-1-hidroxi-9H-xanten-9-ona: rendimiento de producto aislado 50% (sólido amarillo); obtenido por reacción del compuesto **1** y 1,5-dibromopentano. P.f.: 130–132 $^{\circ}\text{C}$; ^1H -RMN: (300 MHz, CDCl_3): δ 1.31–1.40 (m, 2 H), 1.85–2.00 (m, 4 H), 3.46 (t, 2 H), 4.01 (t, 2 H), 6.33 (d, 1 H), 6.41 (d, 1 H), 7.34–7.40 (m, 2 H), 7.70 (ddd, 1 H), 8.24 (dd, 1 H), 12.85 (s, 1 H, OH). ^{13}C -RMN: (75 MHz, CDCl_3): δ 24.8, 28.3, 32.5, 33.5, 68.3, 93.3, 97.5, 104.1, 117.7, 124.1, 126.1, 128.0, 135.1, 156.1, 157.8, 163.7, 166.3, 180.9. IR (KBr): 3460, 2946, 1661, 1609, 1573, 1481, 1296, 1163, 1038, 820 cm^{-1} .

Compuesto 5, 3-(6-Bromohexyloxy)-1-hidroxi-9H-xanten-9-ona: rendimiento de producto aislado 50% (sólido amarillo); obtenido por reacción del compuesto **1** y 1,6-dibromohexano. m.p.: 139–141 $^{\circ}\text{C}$; ^1H -RMN: (300 MHz, CDCl_3): δ 1.35–1.58 (m, 4 H), 1.81–1.92 (m, 4 H), 3.40 (t, 2 H), 4.03 (t, 2 H), 6.31 (d, 1 H), 6.39 (d, 1 H), 7.36–7.41 (m, 2 H), 7.66 (ddd, 1 H), 8.24 (dd, 1 H), 12.85 (s, 1 H, OH). ^{13}C -RMN: (75 MHz, CDCl_3): δ 25.3, 27.9, 28.9, 32.7, 33.8, 68.5, 93.3, 97.5, 103.9, 117.7, 120.7, 124.1, 125.9, 135.0, 157.8, 163.7, 165.1, 166.3, 180.8. IR (KBr): m 3430, 2945, 1662, 1602, 1573, 1462, 1296, 1179, 1074, 823 cm^{-1} .

A3-3. Procedimiento general para la síntesis de los derivados 1-hidroxi-3-aminoalkoxixantona²

Bajo atmósfera de argón, se hizo reaccionar una mezcla de **2-5** (1 mmol) en acetona seca, junto a las correspondientes aminas secundarias (dietilmina, pirrolidina, piperidina, o morfolina, 2.5 mmol). La solución resultante fue agitada a temperatura ambiente hasta que la reacción se haya completado (24–48 horas). El avance de dichas reacciones fue monitoreado por TLC. Finalmente, la mezcla de reacción se volcó sobre hielo y el sólido amarillo pálido resultante fue colectado por filtración, luego lavado con agua destilada, ofreciendo de este modo los compuestos **6-12** respectivamente sin necesidad de purificación adicional.

Caracterizaciones estructurales:

Compuesto 6, 3-(3-(dietilamino) propoxi)-1-hidroxi-9H-xanten-9-ona: rendimiento de producto aislado 85% (sólido amarillo); a partir del compuesto **2** y dietilamina. P.f.: 190–191 $^{\circ}\text{C}$; ^1H -RMN: (300 MHz, CDCl_3): δ 1.06 (t, 6 H), 1.82–1.86 (m, 2 H), 2.42–2.48 (m, 4 H), 2.55–2.59 (m, 2 H), 4.05 (t, 2 H), 6.34 (d, 1 H), 6.41 (d, 1 H), 7.45–7.50 (m, 2 H), 7.71 (ddd, 1 H), 8.23 (dd, 1 H), 12.85 (s, 1 H, OH). ^{13}C -RMN: (75 MHz, CDCl_3): δ 8.8, 29.6, 47.1, 49.2, 65.5, 93.1, 97.5, 104.2, 117.5, 120.3, 124.2, 125.9, 135.1, 156.1, 157.8, 163.5, 165.2, 180.9. IR (film): 3430, 3055, 2986, 1653, 1606, 1468, 1265, 1169, 824, 743 cm^{-1} . HRMS (EI) m/z: 341.1627 calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{NO}_4$, encontrado 341.1631.

Compuesto 7, 3-(4-(Dietilamino) butoxi)-1-hidroxi-9H-xanten-9-ona: rendimiento de producto aislado 80% (sólido amarillo); a partir del compuesto **3** y dietilamina. P.f.: 181–183 $^{\circ}\text{C}$; ^1H -RMN: (300 MHz, CDCl_3): δ 1.14 (t, 6 H), 1.70–1.75 (m, 2 H),

1.77–1.84 (m, 2 H), 2.91–3.02 (m, 6 H), 4.18 (t, 2 H), 6.43 (d, 1 H), 6.67 (d, 1 H), 7.60–7.65 (m, 1 H), 7.73 (d, 1 H), 7.90 (ddd, 1 H), 8.17 (dd, 1 H), 12.81 (s, 1 H, OH). ^{13}C -RMN: (75 MHz, CDCl_3): δ 8.7, 20.6, 26.2, 46.8, 51.2, 67.5, 93.0, 97.3, 103.9, 117.5, 120.5, 124.0, 125.7, 135.1, 155.9, 157.7, 165.6, 163.4, 180.7. IR (film): 3432, 3051, 2985, 1650, 1603, 1465, 1262, 1170, 823, 745 cm^{-1} . HRMS (EI) m/z : 355.1784 calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{NO}_4$, encontrado 355.1789.

Compuesto 8, 3-((5-(dietilamino) pentil) oxi)-1-hidroxi-9H-xanten-9-ona: rendimiento de producto aislado 80% (sólido amarillo); a partir del compuesto **4** y dietilamina. P.f.: 150–151 $^{\circ}\text{C}$; ^1H -RMN: (300 MHz, CDCl_3): δ 1.05 (t, 6 H), 1.51–1.70 (m, 4 H), 1.82–1.93 (m, 2 H), 2.48–2.52 (m, 6 H), 4.05 (t, 2 H), 6.34 (d, 1 H), 6.41 (d, 1 H), 7.45–7.51 (m, 2 H), 7.71 (ddd, 1 H), 8.23 (dd, 1 H), 12.85 (s, 1 H, OH). ^{13}C -RMN: (75 MHz, CDCl_3): δ 24.1, 26.8, 29.1, 47.1, 52.9, 68.7, 93.3, 97.6, 104.2, 117.8, 124.1, 126.1, 135.0, 156.4, 157.8, 163.3, 166.5, 180.9. IR (film): 3440, 2964, 2790, 1660, 1603, 1571, 1472, 1329, 1298, 1179, 1079, 821, 758 cm^{-1} . HRMS (EI) m/z : 369.1940 calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{NO}_4$, encontrado 369.1944.

Compuesto 9, 3-((6-(dietilamino)hexil) oxi)-1-hidroxi-9H-xanten-9-ona: rendimiento de producto aislado 75% (sólido amarillo); a partir del compuesto **5** y dietilamina. P.f.: 110–111 $^{\circ}\text{C}$; ^1H -RMN: (300 MHz, CDCl_3): δ 1.06 (t, $J = 8.0$ Hz, 6 H), 1.24–1.34 (m, 2 H), 1.42–1.55 (m, 4 H), 1.80 (tt, $J = 7.9, 4.7$ Hz, 2 H), 2.42 (t, $J = 7.6$ Hz, 2 H), 3.01 (q, $J = 8.0$ Hz, 4 H), 4.11 (t, $J = 4.7$ Hz, 2 H), 6.37 (d, $J = 1.9$ Hz, 1 H), 6.60 (d, $J = 2.1$ Hz, 1 H), 7.26–7.35 (m, 2 H), 7.56 (td, $J = 7.5, 2.0$ Hz, 1 H), 8.00 (dd, $J = 7.5, 2.0$ Hz, 1 H), 12.71 (s, 1 H, OH). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 8.7, 23.4, 25.6, 26.7, 28.8, 29.8, 46.5, 51.3, 68.5, 93.2, 97.5, 103.9, 117.6, 120.7, 124.1, 125.9, 135.1, 156.1, 157.8, 163.6, 166.3, 180.9. IR (film): 3445, 2955, 1665, 1605, 1571, 1468, 1320, 1170, 824, 747 cm^{-1} . HRMS (EI) m/z : 383.2097 calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{NO}_4$, encontrado 383.2093.

Compuesto 10, 1-Hidroxi-3-(5-(pirrolidin-1-il) pentiloxi)-9H-xanten-9-ona: rendimiento de producto aislado 92% (sólido amarillo); a partir del compuesto **4** y pirrolidina. P.f.: 105–106 $^{\circ}\text{C}$; ^1H -RMN: (300 MHz, CDCl_3): δ 1.47–1.54 (m, 2 H), 1.56–1.63 (m, 2 H), 1.74–1.80 (m, 4 H), 1.81–1.87 (m, 2 H), 2.44–2.52 (m, 6 H), 4.03 (t, 2 H), 6.31 (d, 1 H), 6.39 (d, 1 H), 7.33–7.38 (m, 1 H), 7.40 (d, 1 H), 7.69 (ddd, 1 H), 8.22 (dd, 1 H), 12.82 (s, 1 H, OH). ^{13}C -RMN: (75 MHz, CDCl_3): δ 23.5, 24.3, 28.8, 29.0, 54.3, 56.5, 68.7, 93.3, 97.6, 103.9, 117.7, 120.4, 124.1, 126.0, 135.0, 156.2, 157.8, 163.7, 166.4, 180.9. IR (film): 3430, 2949, 2793, 1662, 1608, 1571, 1468, 1316, 1299, 1166, 1082, 824, 763 cm^{-1} . HRMS (EI) m/z : 367.1784 calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{NO}_4$, encontrado 367.1789.

Compuesto 11, 1-hidroxi-3-((5-(piperidin-1-il)pentil)oxi)-9H-xanten-9-ona: rendimiento de producto aislado 80 % (sólido amarillo); a partir del compuesto **4** y piperidina. P.f.: 101–102 $^{\circ}\text{C}$; ^1H -RMN: (300 MHz, CDCl_3): δ 1.26–1.32 (m, 2 H), 1.40–1.68 (m, 8 H), 1.76–1.82 (m, 2 H), 2.30–2.35 (m, 6 H), 4.05 (t, 2 H), 6.34 (d, 1 H), 6.42 (d, 1 H), 7.32–7.37 (m, 1 H), 7.44 (d, 1 H), 7.71 (ddd, 1 H), 8.26 (dd, 1 H), 12.82 (s, 1 H, OH). ^{13}C -RMN: (75 MHz, CDCl_3): δ 24.2, 24.6, 26.1, 26.8, 29.0, 54.8, 59.5, 68.7, 93.4, 97.6, 103.9, 117.8, 120.8, 124.1, 126.1, 134.9, 156.1, 157.9, 163.6, 166.4, 180.9. IR (film): m 3430, 2930, 2853, 1661, 1607, 1568, 1468, 1298, 1175, 1078, 823, 745 cm^{-1} . HRMS (EI) m/z : 381.1940 calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{NO}_4$, encontrado 381.1945.

Compuesto 12, 1-hidroxi-3-((5-morfolinopentil)oxi)-9H-xanten-9-ona: rendimiento de producto aislado 82 % (sólido amarillo); a partir del compuesto **4** y morfolina. P.f.: 130–131 $^{\circ}\text{C}$; ^1H -RMN: (300 MHz, CDCl_3): δ 1.35–1.50 (m, 4 H), 1.62–1.75 (m, 2 H), 2.41–2.55 (m, 6 H), 4.04–4.11 (m, 6 H), 6.34 (d, 1 H), 6.43 (d, 1 H), 7.36–7.40 (m, 1 H), 7.43 (d, 1 H), 7.71 (ddd, 1 H), 8.26 (dd, 1 H), 12.82 (s, 1 H, OH). ^{13}C -RMN: (75 MHz, CDCl_3): δ 24.0, 26.3, 28.9, 46.5, 59.3, 68.2, 68.6, 93.7, 97.4, 103.7, 117.6, 120.7, 124.1,

126.1, 135.1, 156.1, 157.9, 163.6, 166.3, 180.9. IR (film): 3432, 2941, 1654, 1609, 1568, 1466, 1319, 1266, 1168, 825, 744 cm^{-1} . HRMS (EI) m/z: 383.1733 calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{NO}_5$, encontrado 383.1738.

A4- Espectros de RMN:

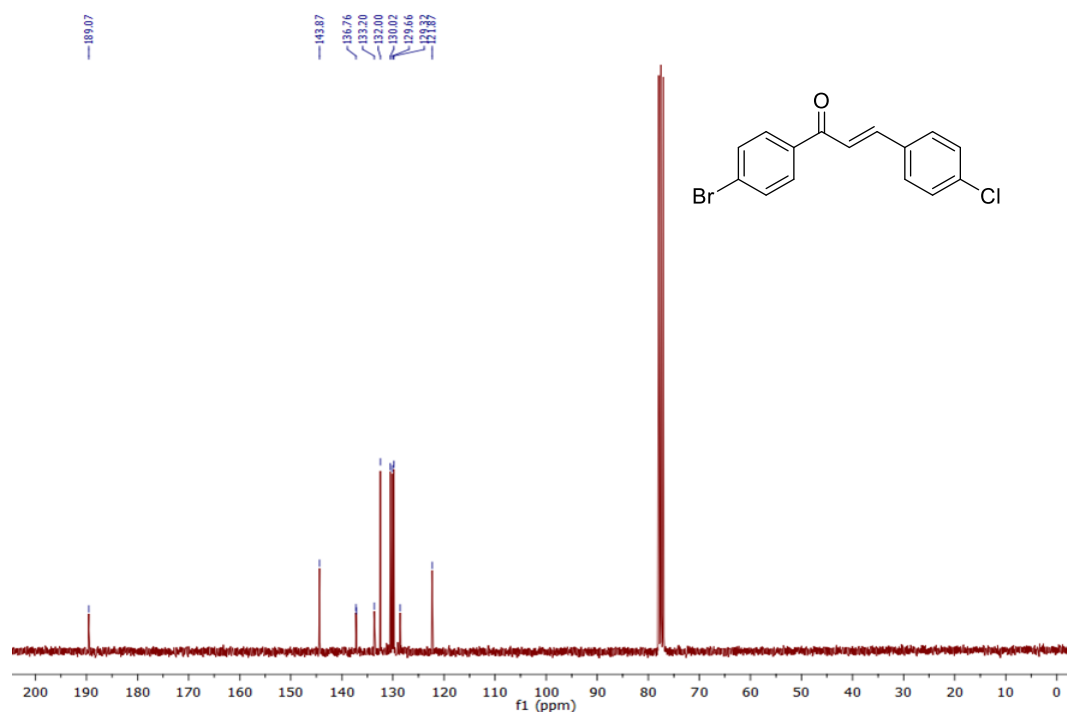


Figura A1. ^{13}C -RMN: 1-(4-bromofenil)-3-(4-clorofenil) prop-2-en-1-ona (75 MHz, CDCl_3).

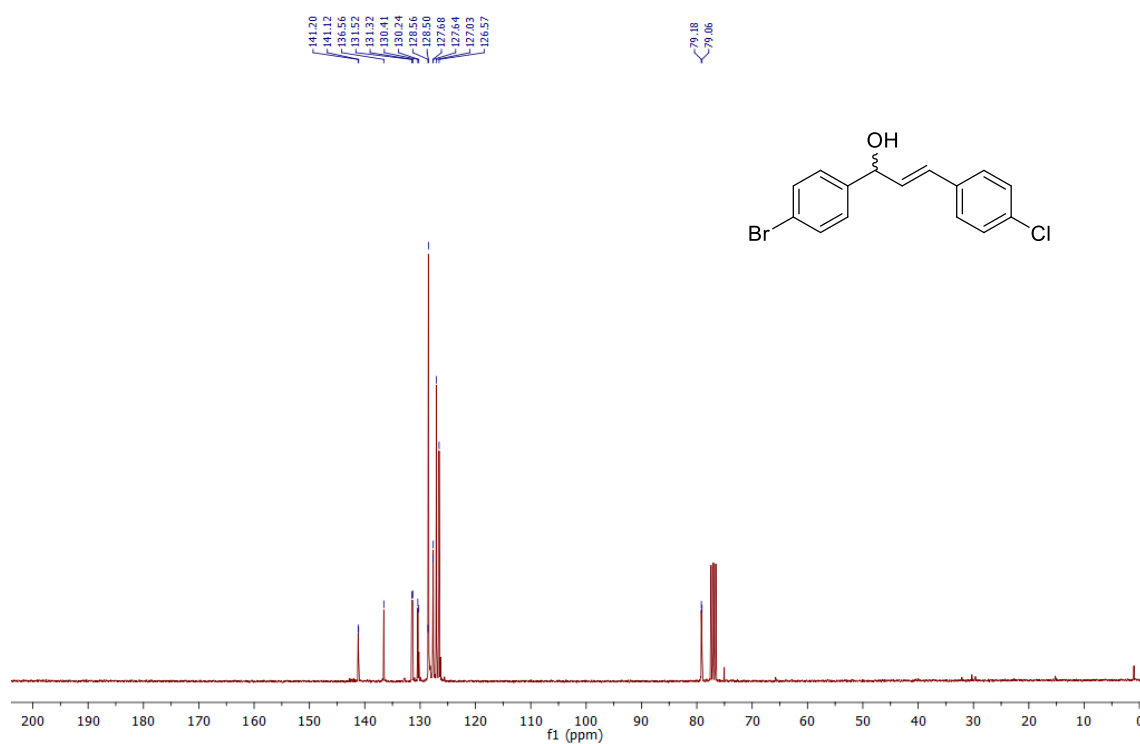


Figura A2. ^{13}C -RMN: 1-(4-bromofenil)-3-(4-clorofenil) prop-2-en-1-ol (75 MHz, CDCl_3).

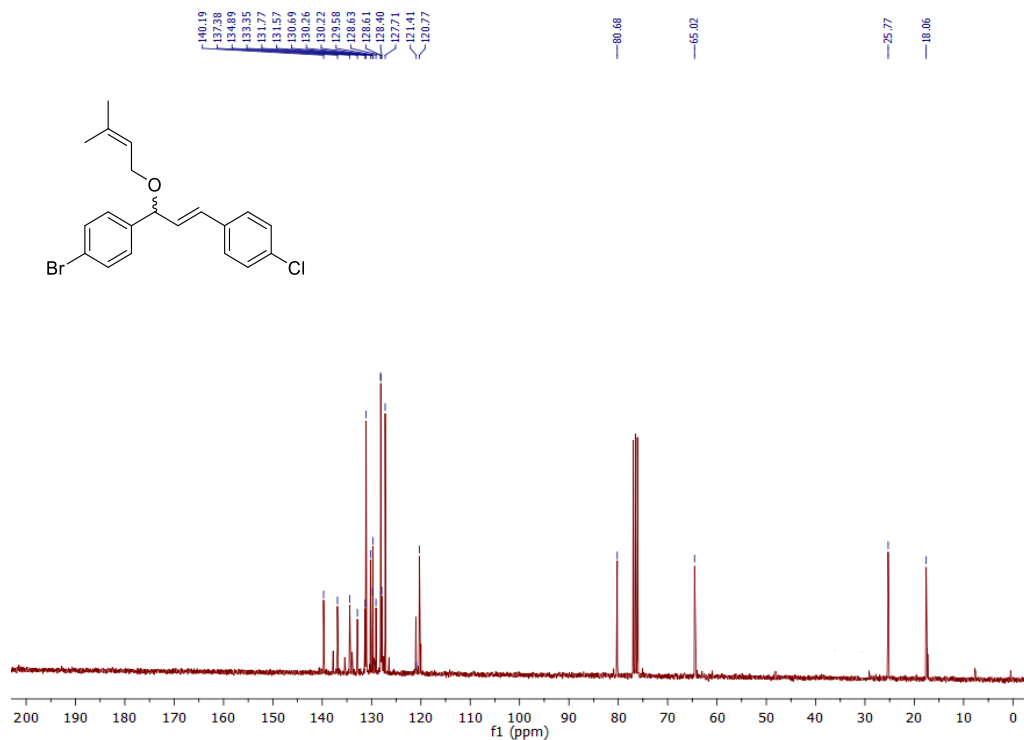


Figura A3. ^{13}C -RMN: 1-bromo-4-(3-(4-clorofenil)-1-((3-metilbut-2-en-1-il) oxi) alil) benzene (75 MHz, CDCl_3).

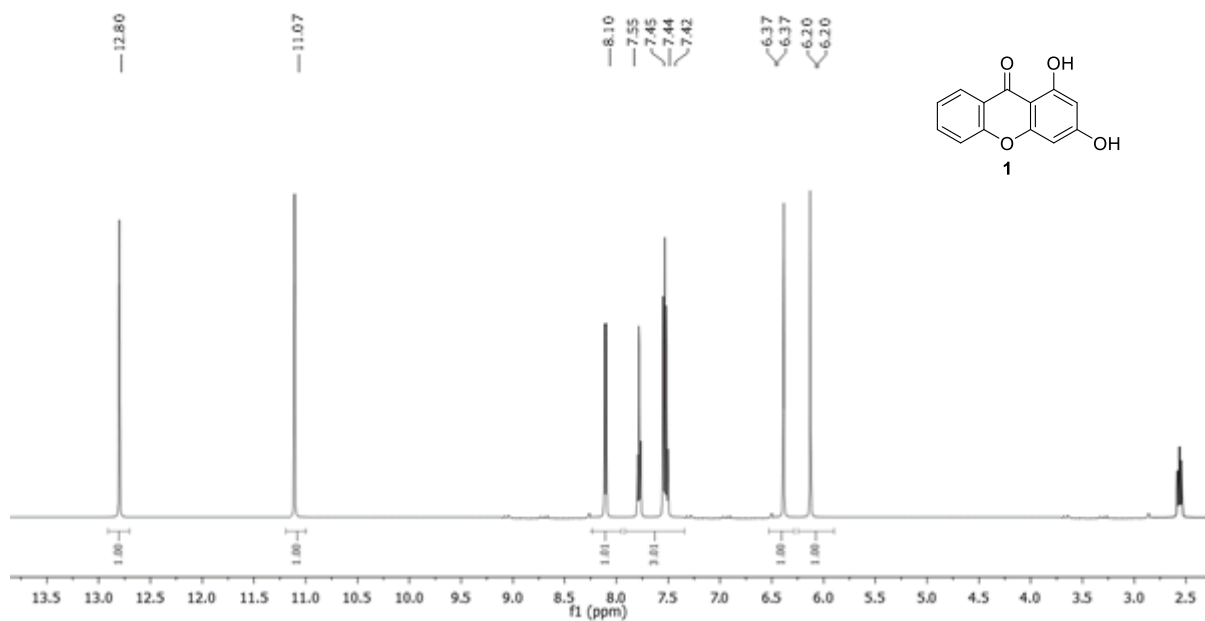


Figura A5. ^1H -RMN: 1,3-dihidroxi-9H-xanten-9-ona (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

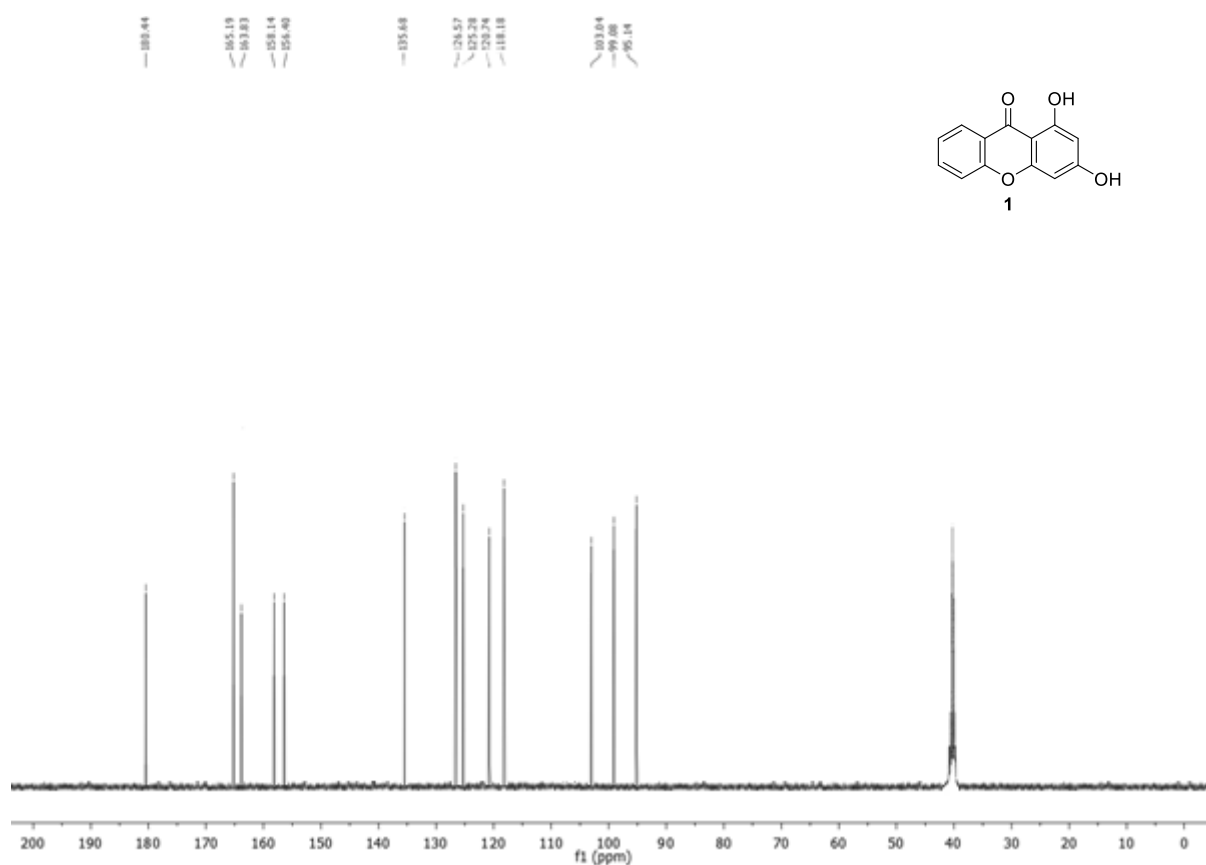


Figura A6. ¹³C-RMN: 1,3-dihidroxi-9H-xanten-9-ona (75 MHz, DMSO-*d*₆).

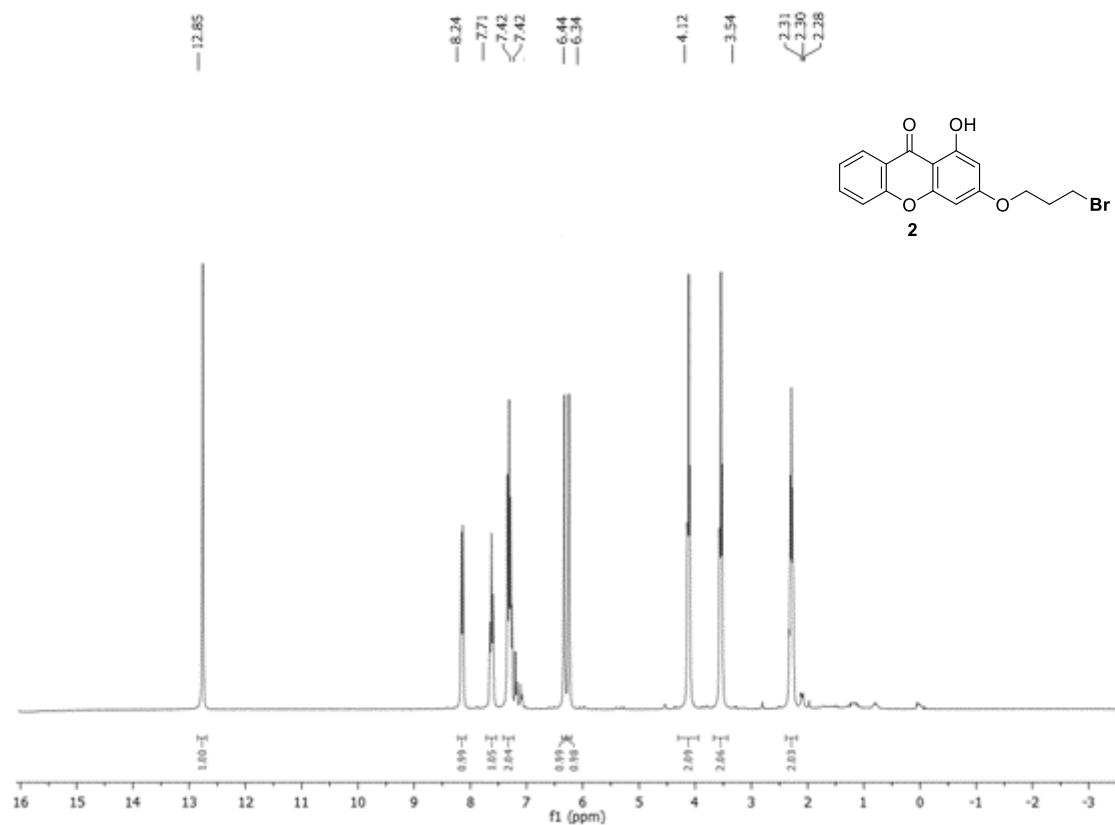


Figura A7. ^1H -RMN of 3-(3-bromopropoxi)-1-hidroxi-9H-xanten-9-ona (300 MHz, CDCl_3).

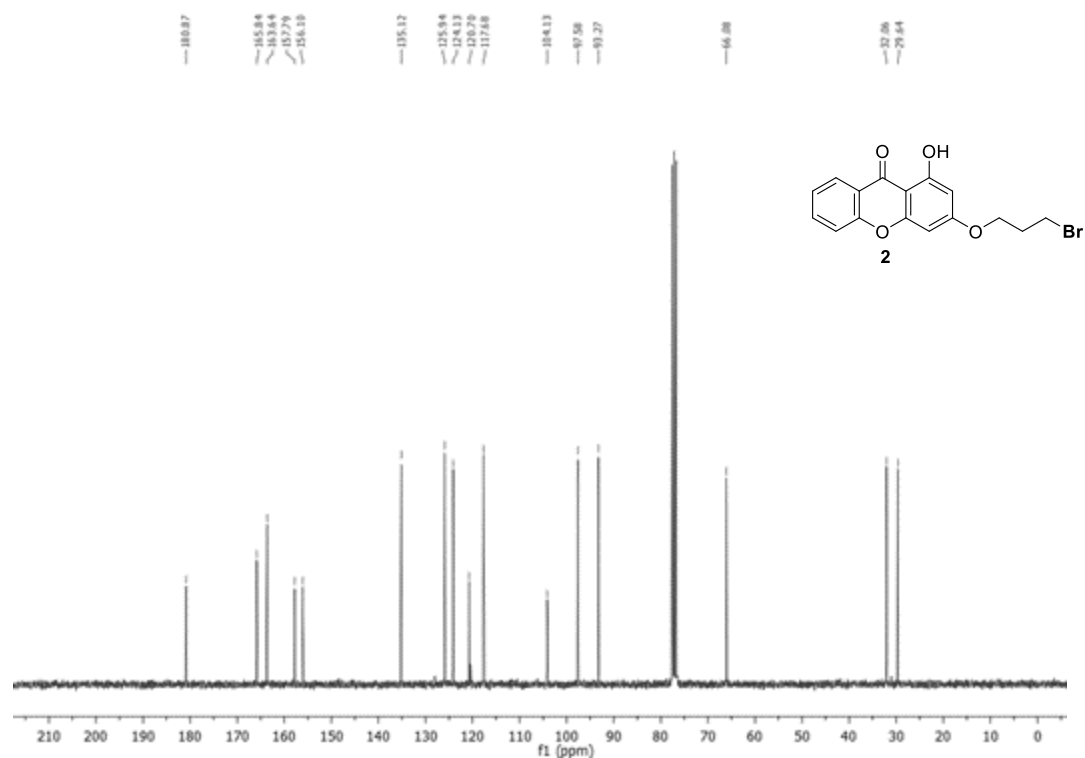


Figura A8. ^{13}C -RMN: 3-(3-bromopropoxi)-1-hidroxi-9H-xanten-9-ona (75 MHz, CDCl_3).

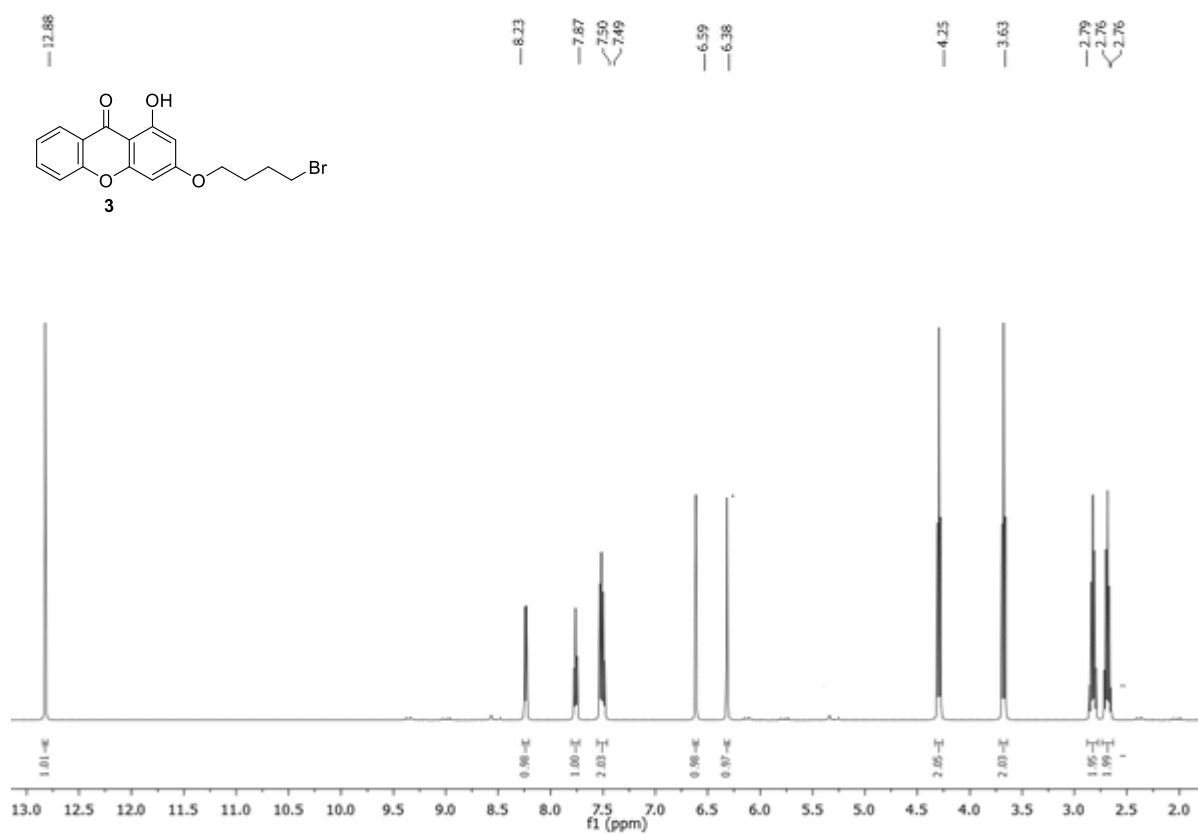


Figura A9. ^1H -RMN: 3-(4-bromobutoxi)-1-hidroxi-9H-xanten-9-ona (300 MHz, CDCl_3).

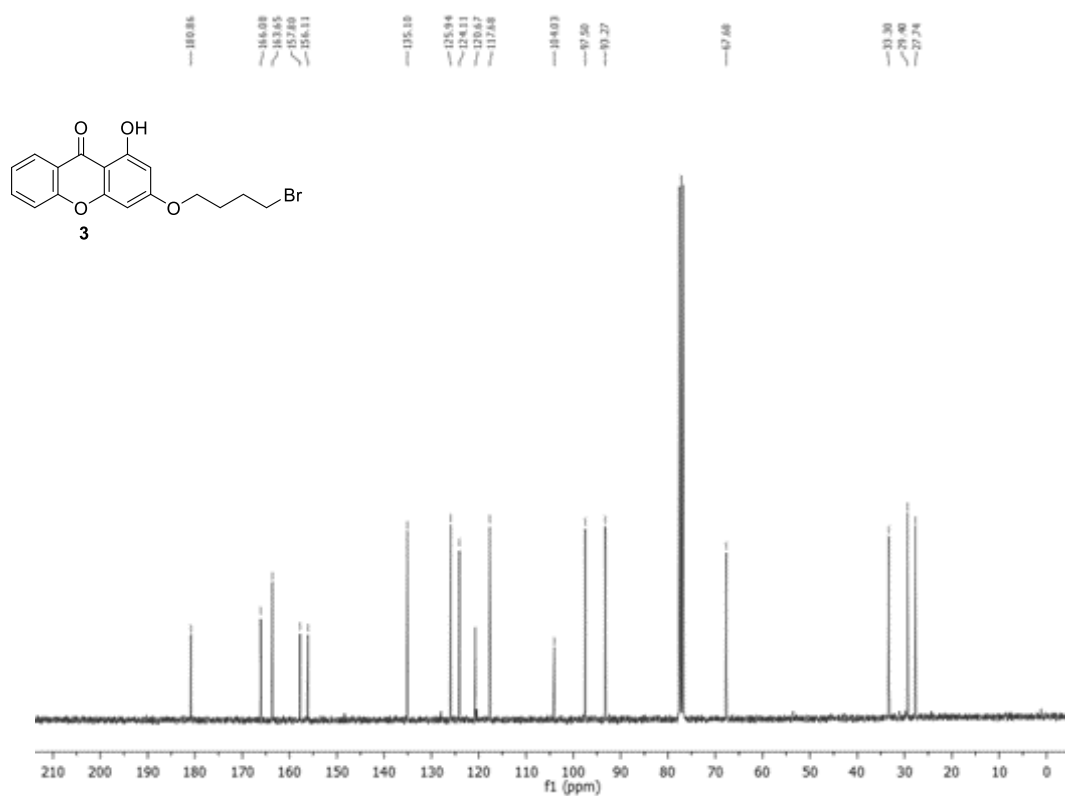


Figura A10. ^{13}C -RMN: 3-(4-bromobutoxi)-1-hidroxi-9H-xanten-9-ona (75 MHz, CDCl_3).

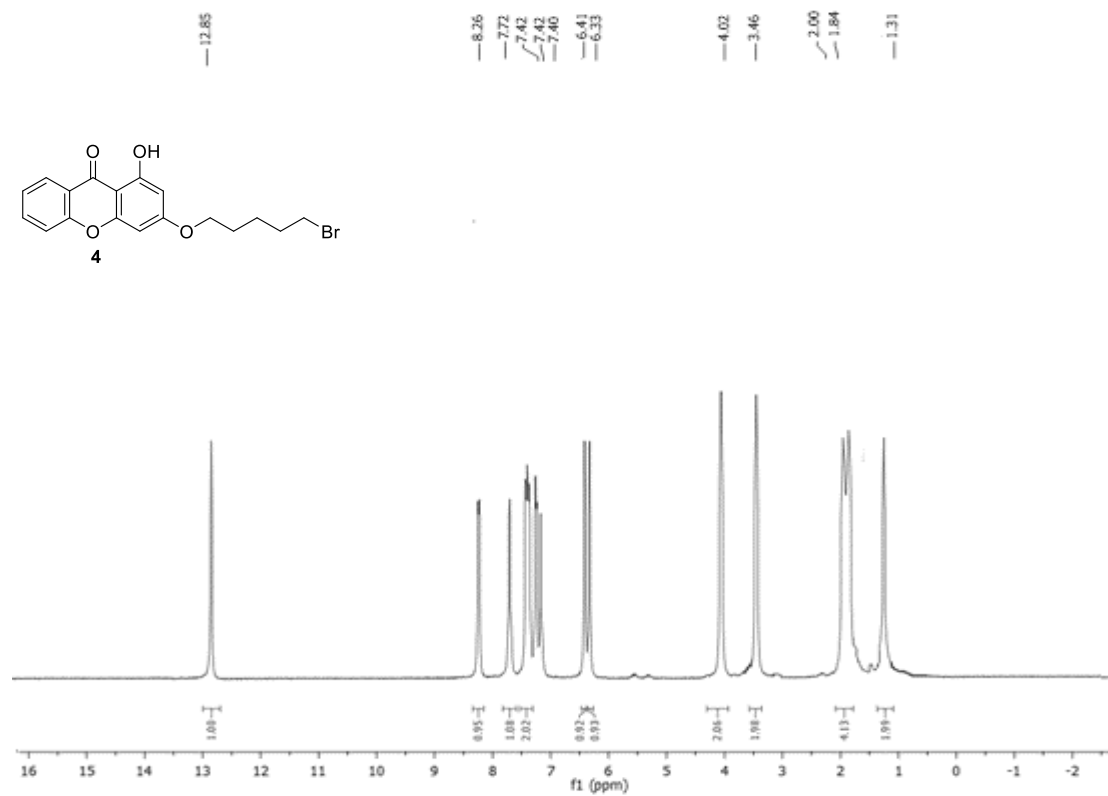


Figura A11. ^1H -RMN: 3-((5-bromopentil) oxi)-1-hidroxi-9H-xanten-9-ona (300 MHz, CDCl_3).

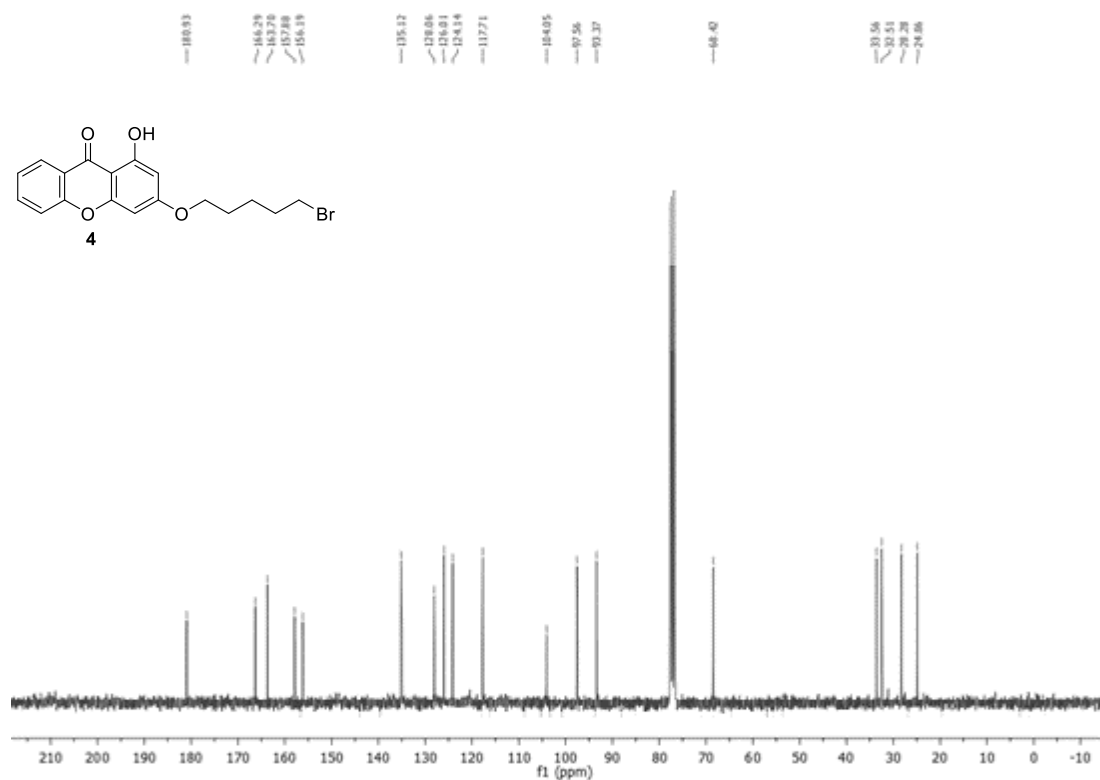


Figura A12. ^{13}C -RMN: 3-((5-bromopentil) oxi)-1-hidroxi-9H-xanten-9-ona (75 MHz, CDCl_3).

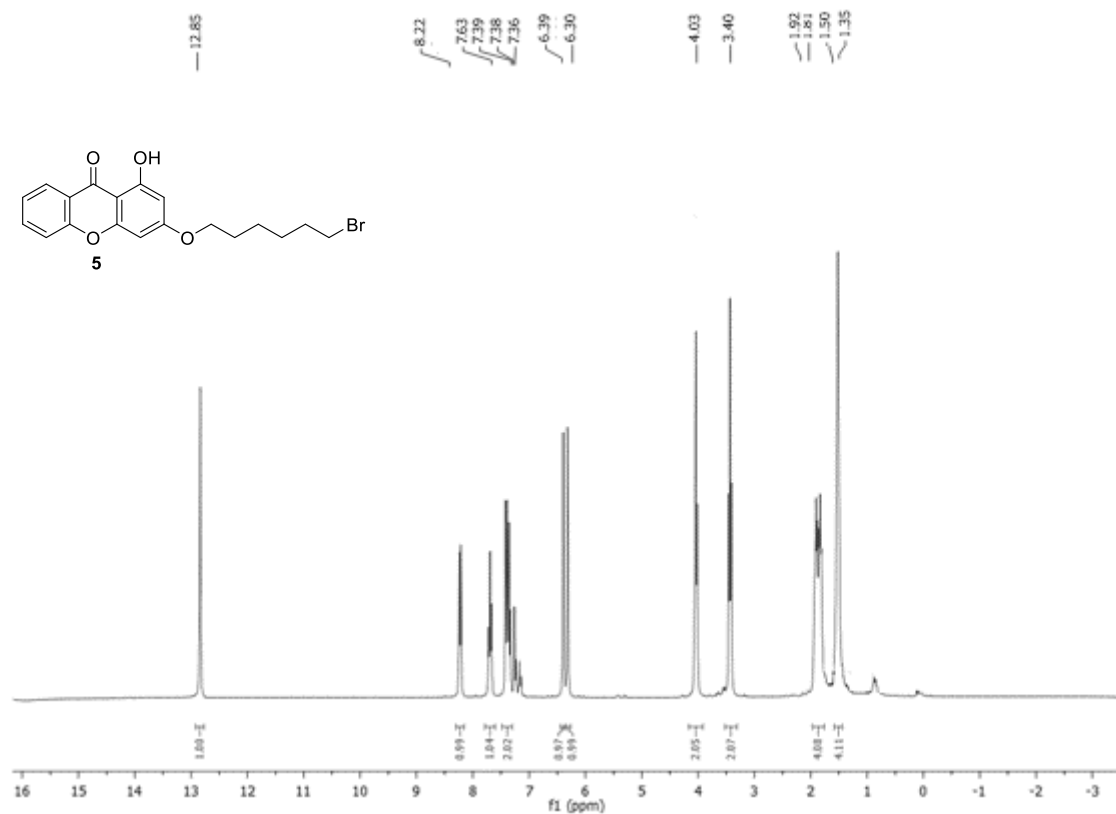


Figura A13. ^1H -RMN: 3-((6-bromohexil) oxi)-1-hidroxi-9H-xanten-9-ona (300 MHz, CDCl_3).

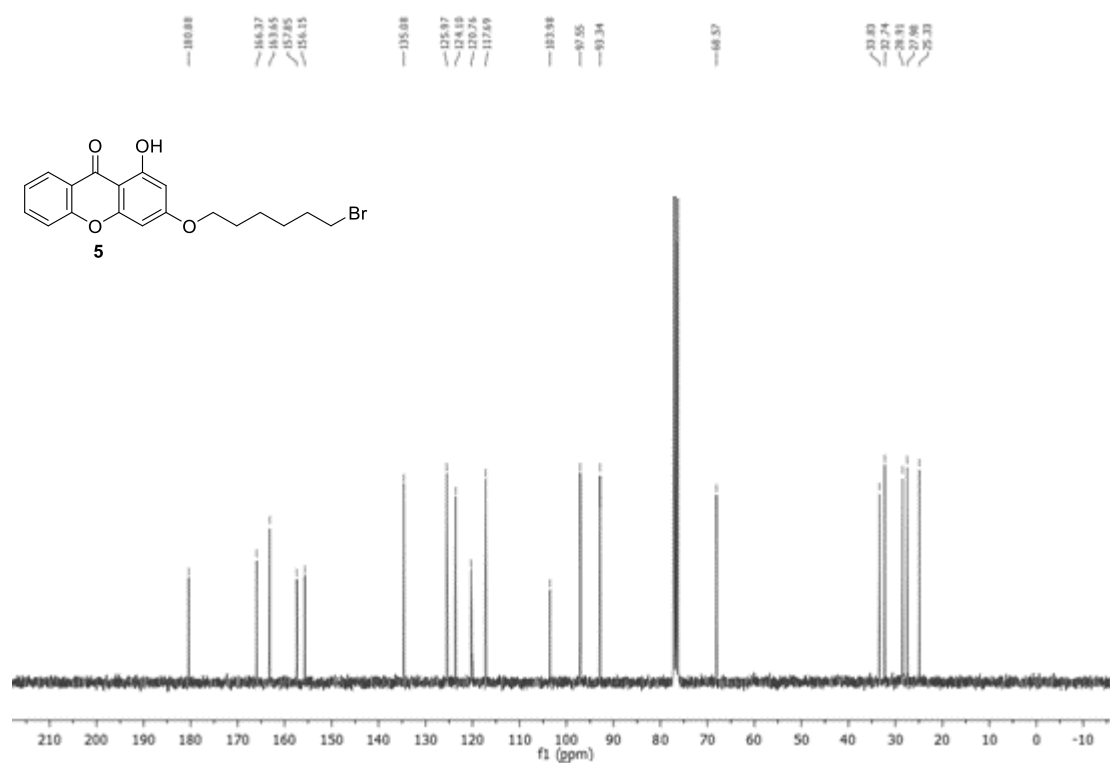


Figura A14. ^{13}C -RMN: 3-((6-bromohexil) oxi)-1-hidroxi-9H-xanten-9-ona (75 MHz, CDCl_3).

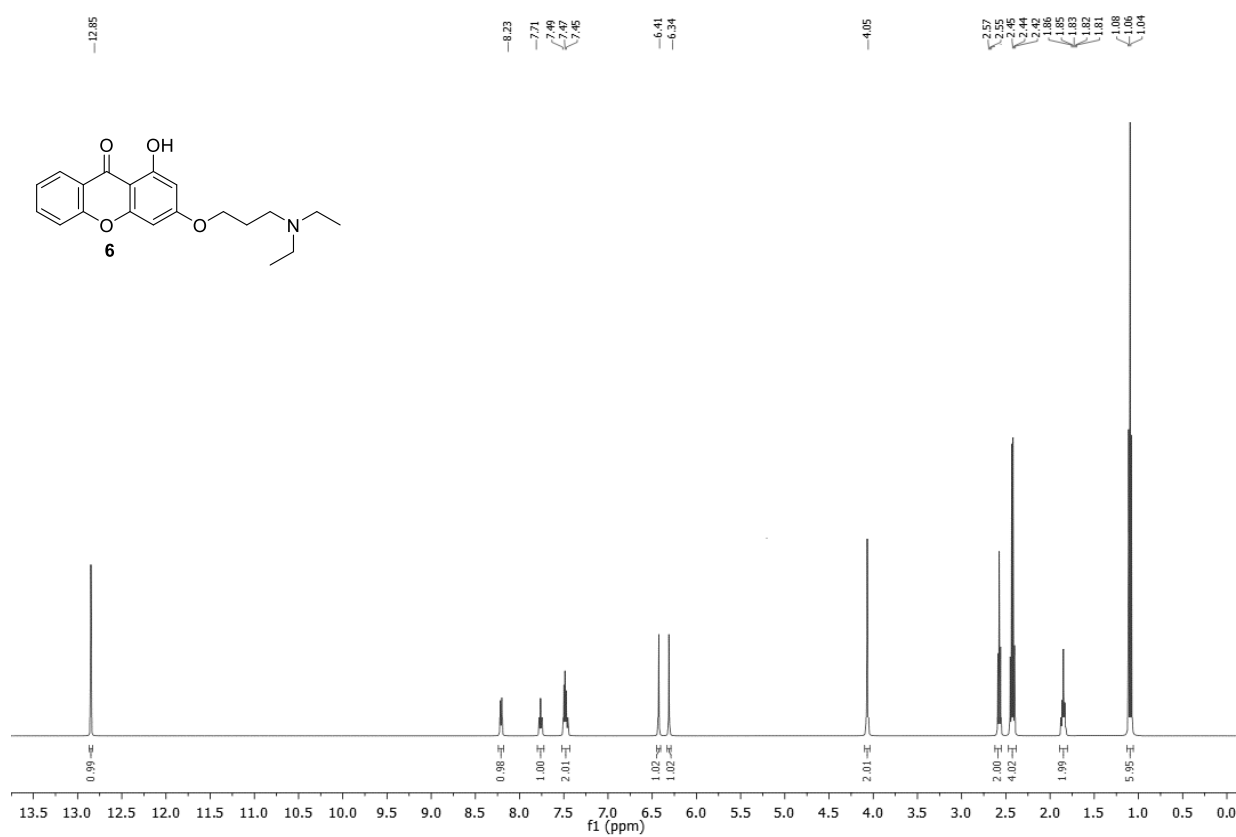


Figura A15. ^1H -RMN: 3-(3-(dietilamino) propoxi)-1-hidroxi-9H-xanten-9-ona (300 MHz, CDCl_3).

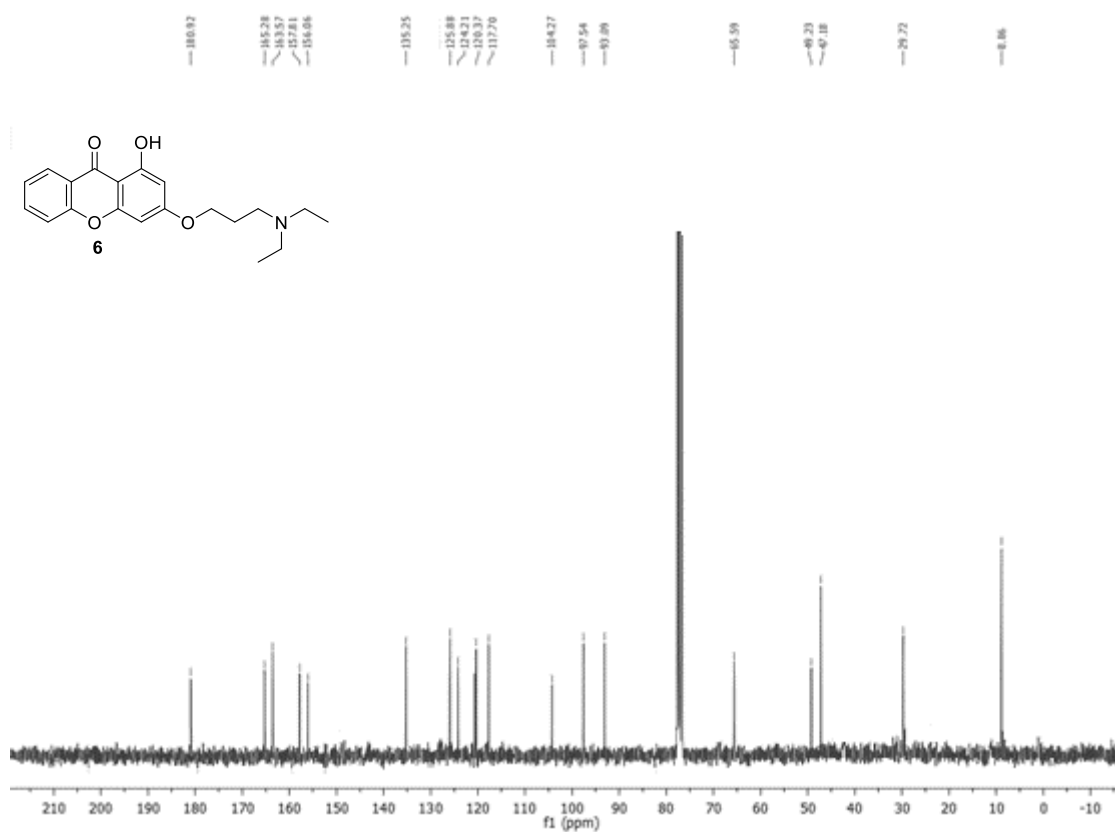


Figura A16. ^{13}C -RMN: 3-(3-(dietilamino) propoxi)-1-hidroxi-9H-xanten-9-ona (75 MHz, CDCl_3).

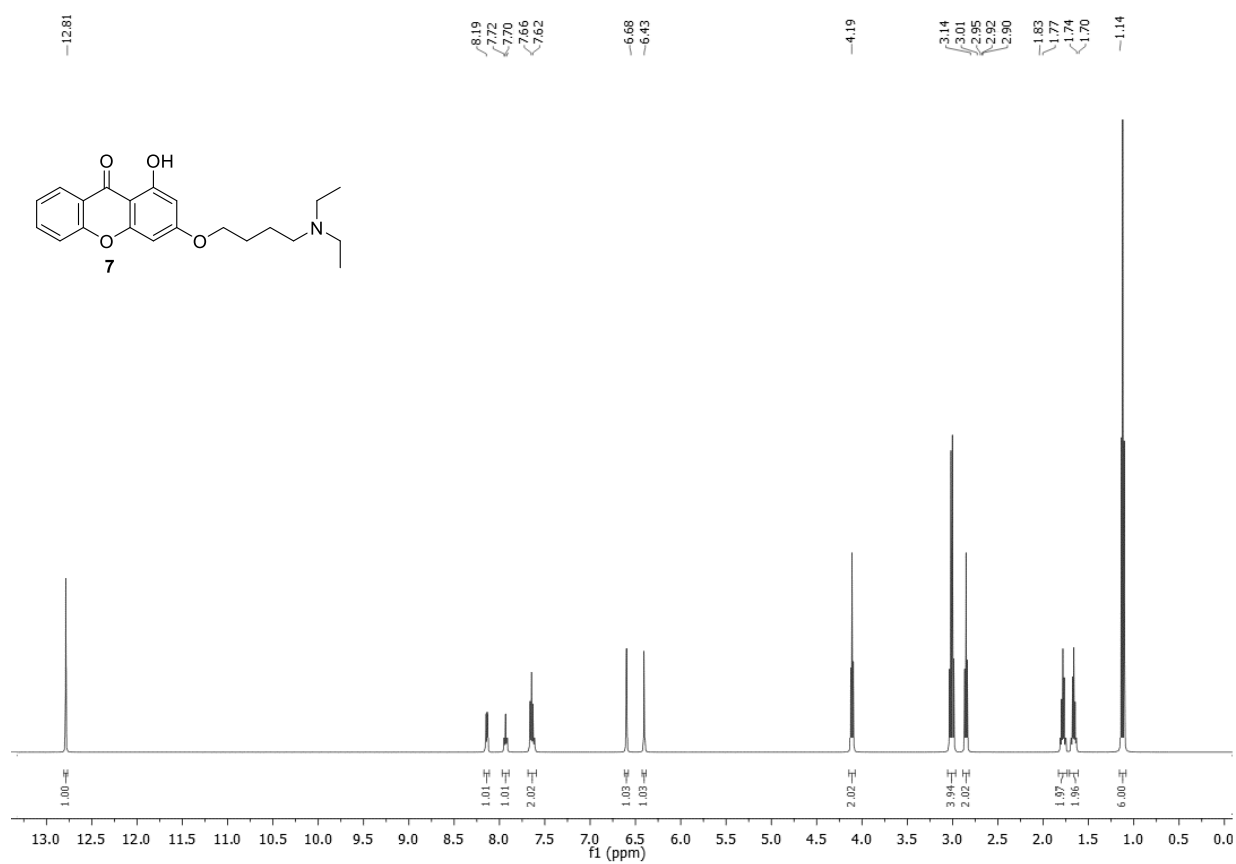


Figura A17. ¹H-RMN: 3-(4-(dietilamino)butoxi)-1-hidroxi-9H-xanten-9-ona (300 MHz, CDCl₃).

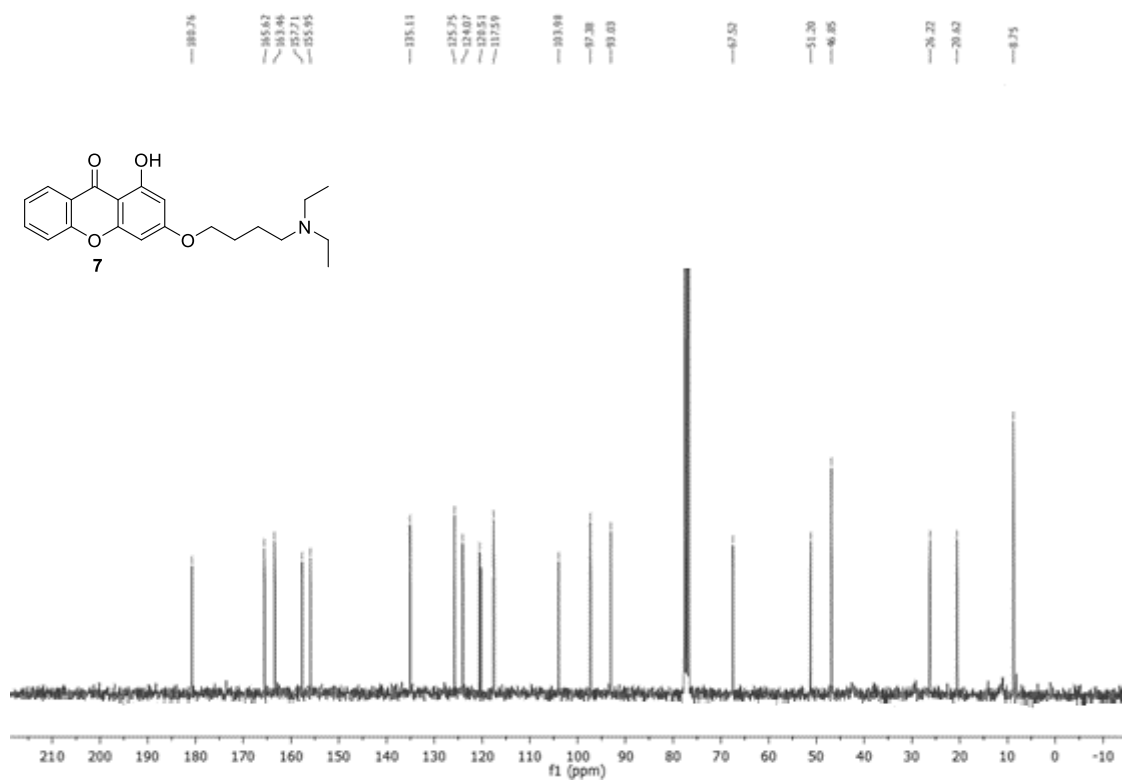


Figura A18. ¹³C-RMN: 3-(4-(dietilamino) butoxi)-1-hidroxi-9H-xanten-9-ona (75 MHz, CDCl₃).

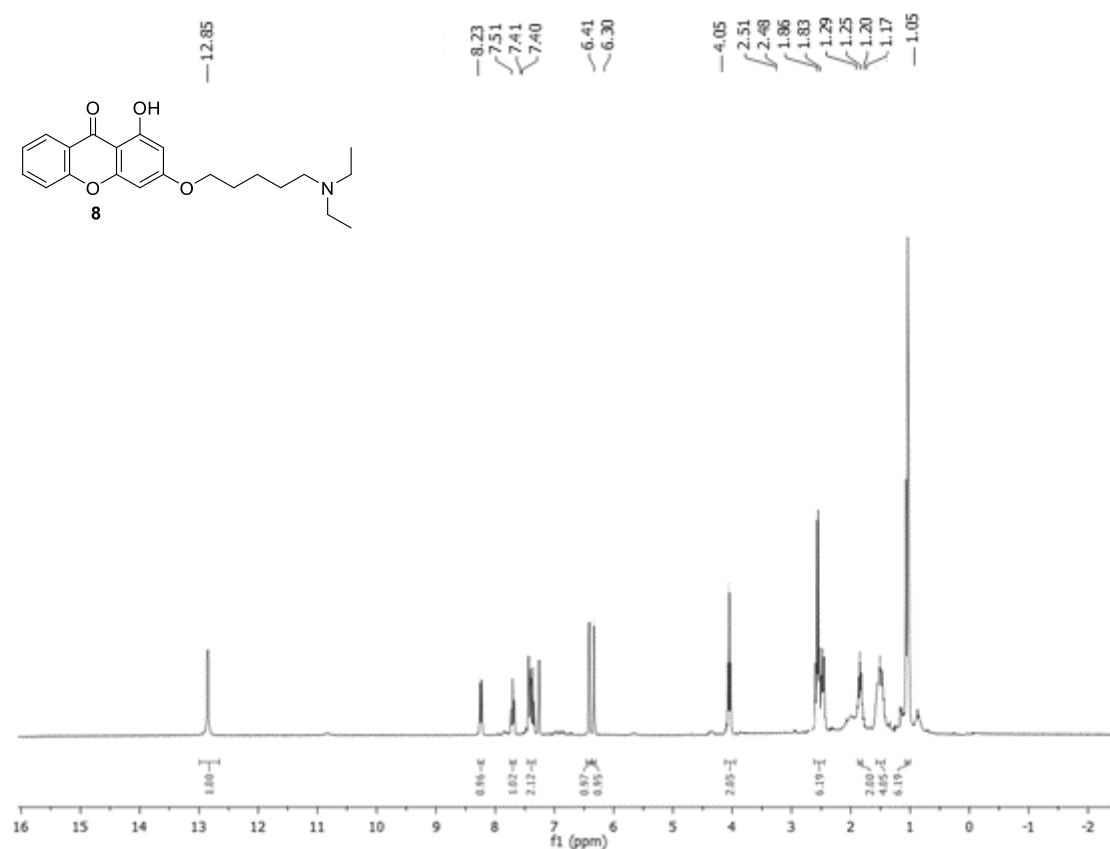


Figura A19. ¹H-RMN: 3-((5-(dielilamino) pentil) oxi)-1-hidroxi-9H-xanten-9-ona (300 MHz, CDCl₃).

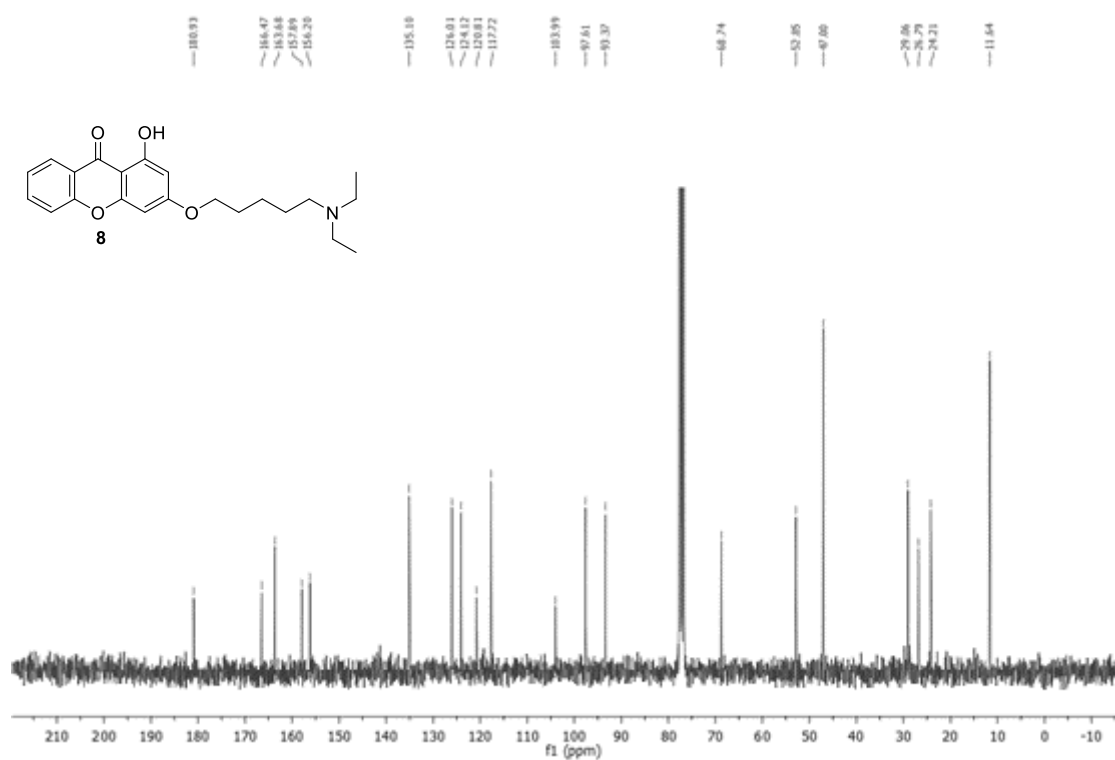


Figura A20. ¹³C-RMN: 3-((5-(dielilamino) pentil) oxi)-1-hidroxi-9H-xanten-9-ona (75 MHz, CDCl₃).

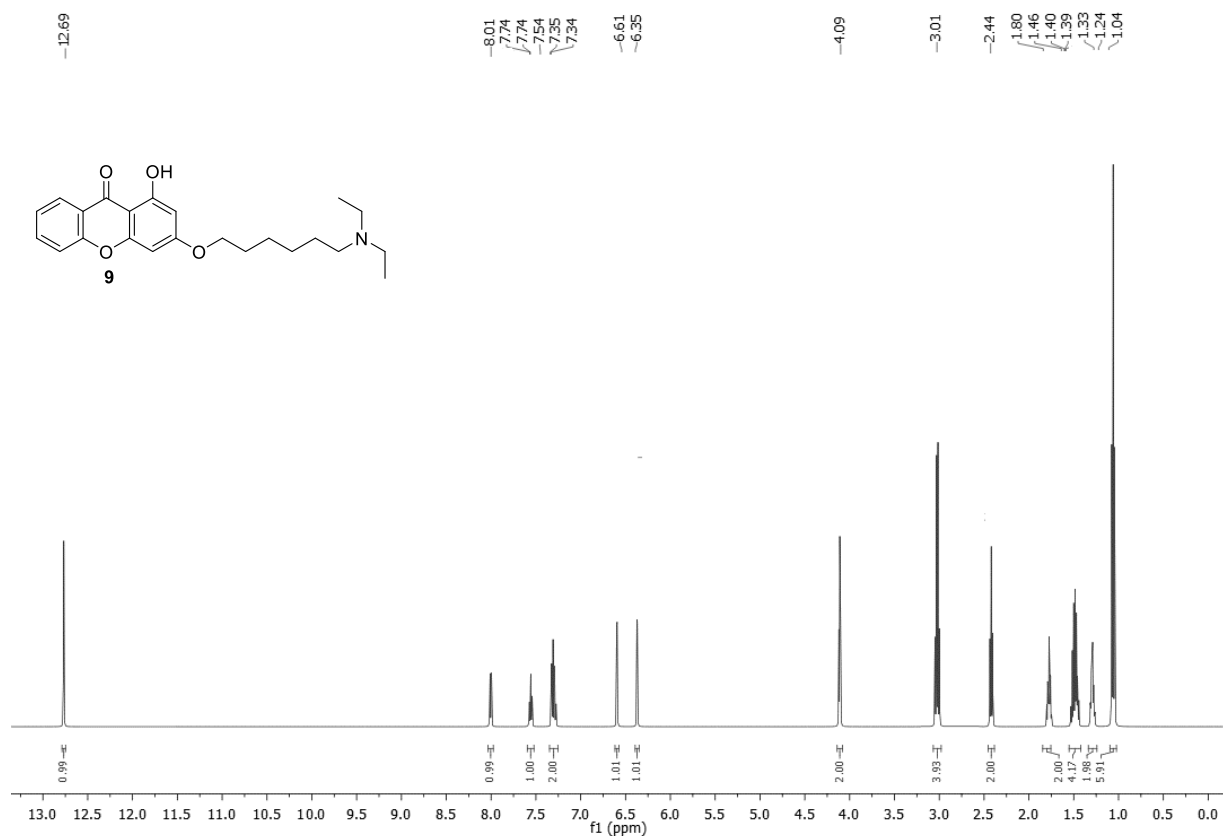


Figura A21. ¹H-RMN: 3-((6-(dielilamino) hexil) oxi)-1-hidroxi-9H-xanten-9-ona (300 MHz, CDCl₃).

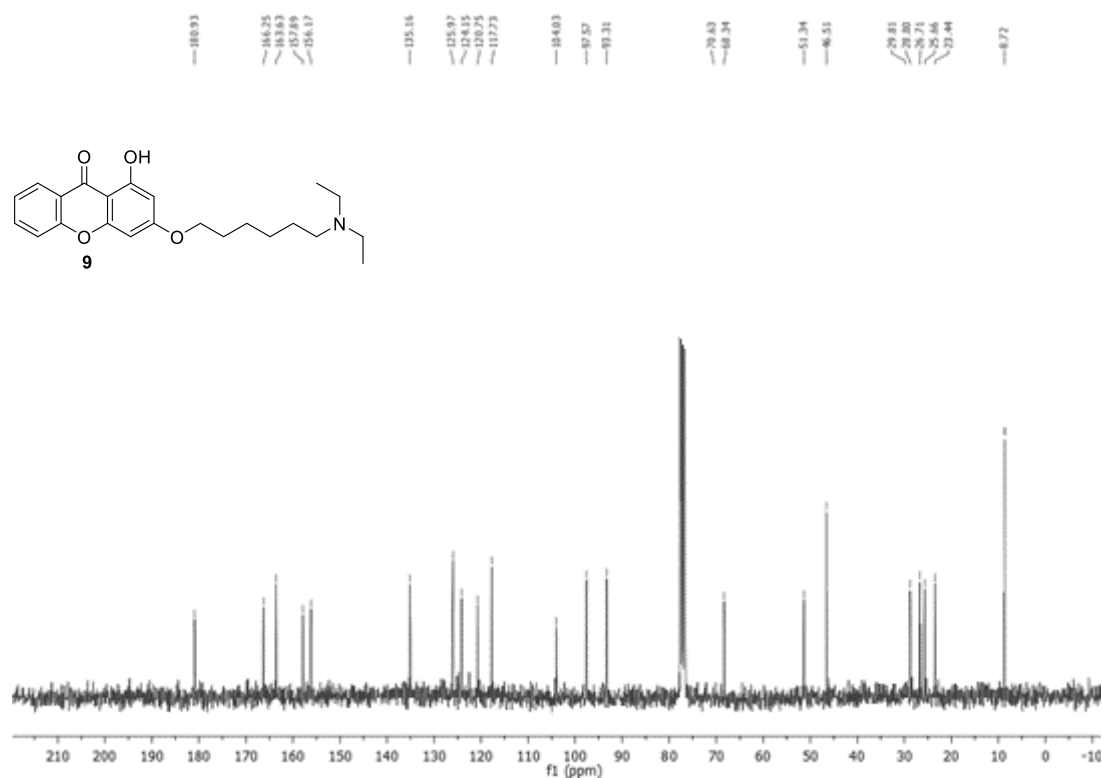


Figura A22. ¹³C-RMN: 3-((6-(dielilamino) hexil) oxi)-1-hidroxi-9H-xanten-9-ona (75 MHz, CDCl₃).

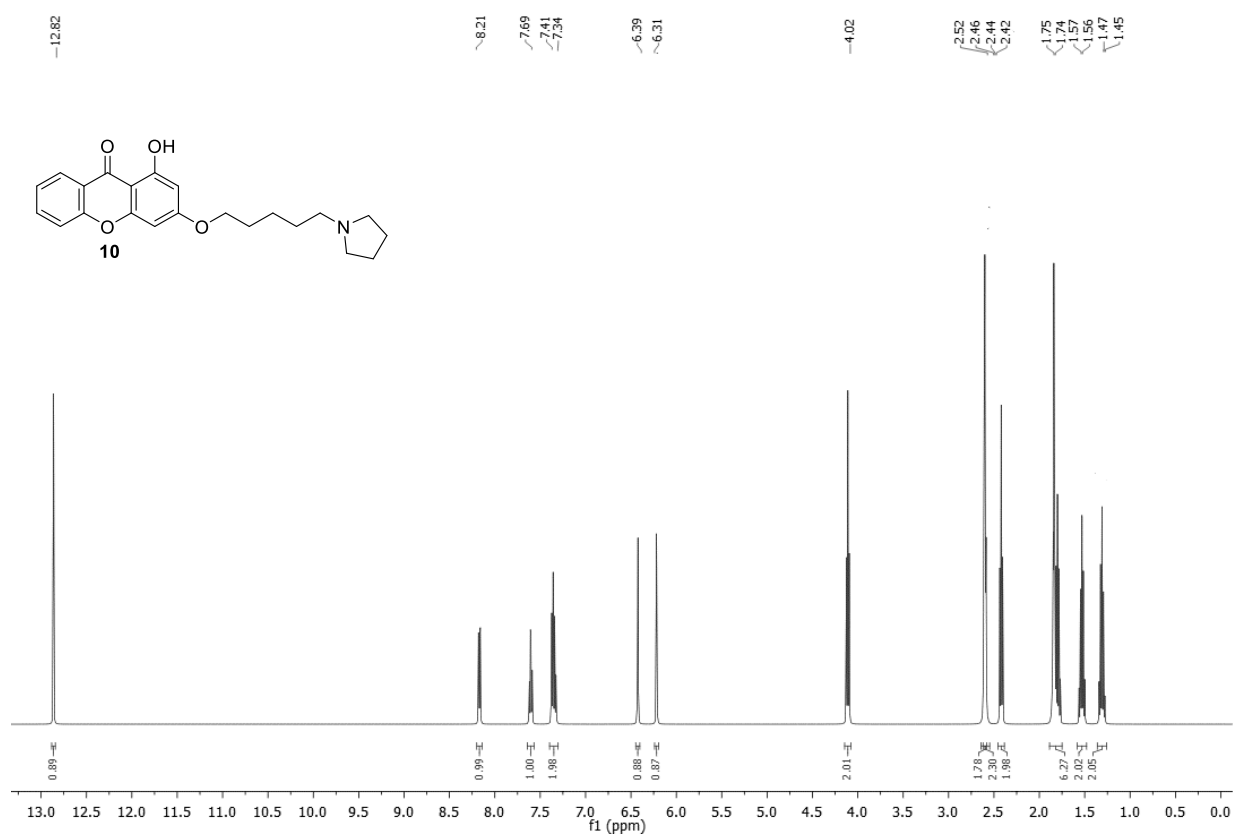


Figura A23. ¹H-RMN: 1-hidroxi-3-((5-(pirrolidin-1-il) pentil) oxi)-9H-xanten-9-ona (300 MHz, CDCl₃).

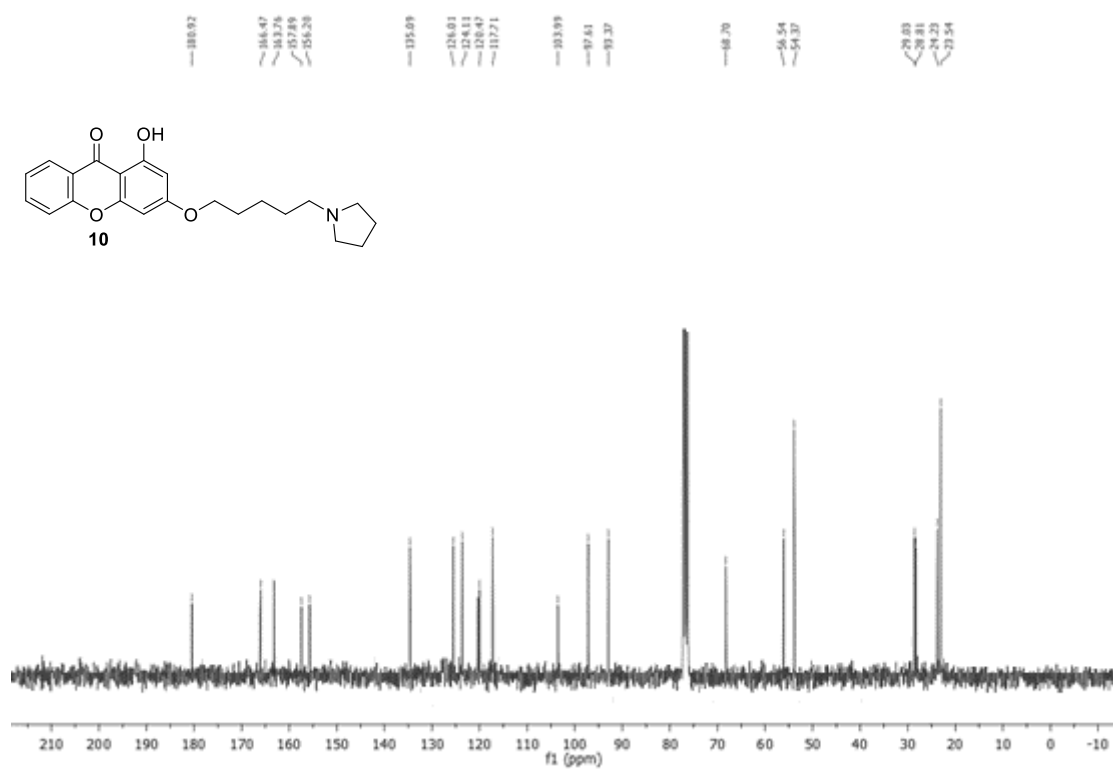


Figura A24. ¹³C-RMN: 1-hidroxi-3-((5-(pirrolidin-1-il) pentil) oxi)-9H-xanten-9-ona (75 MHz, CDCl₃).

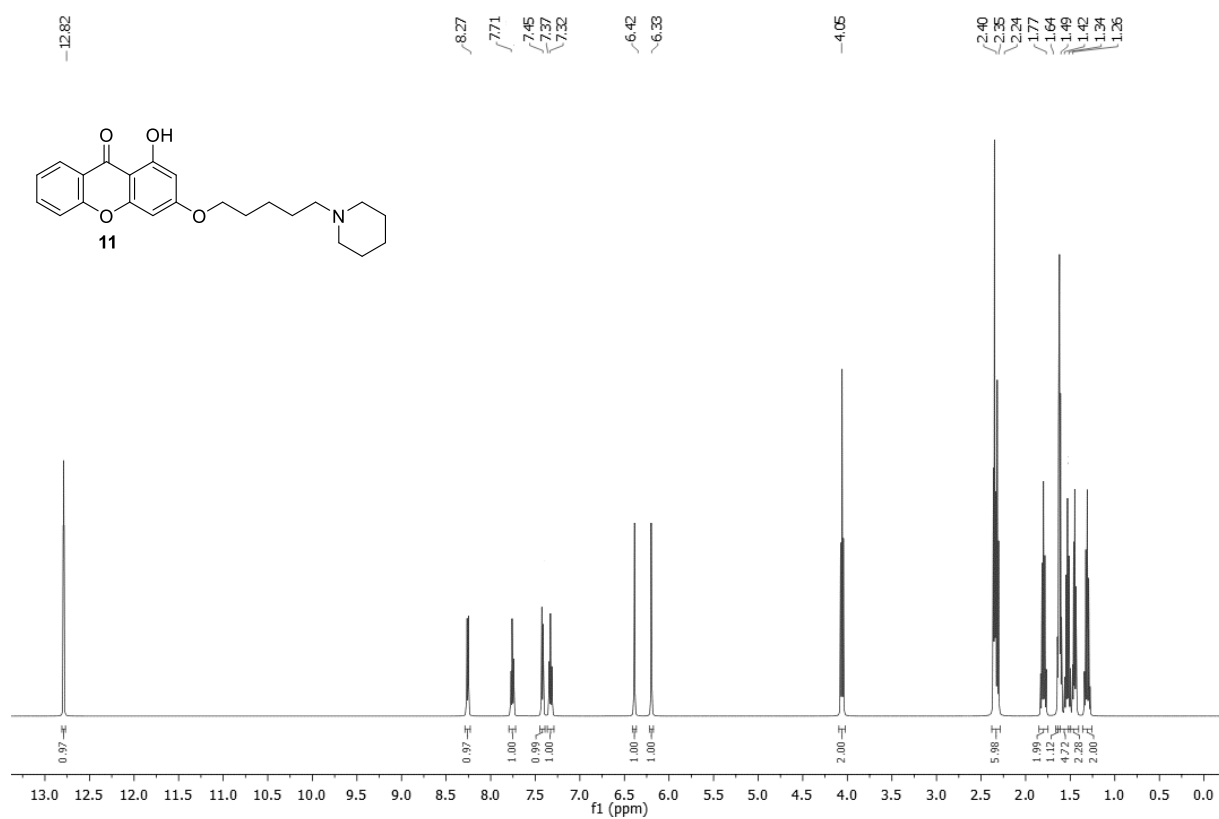


Figura A25. ¹H-RMN: 1-hidroxi-3-((5-(piperidin-1-yl) pentil) oxi)-9H-xanten-9-ona (300 MHz, CDCl₃).

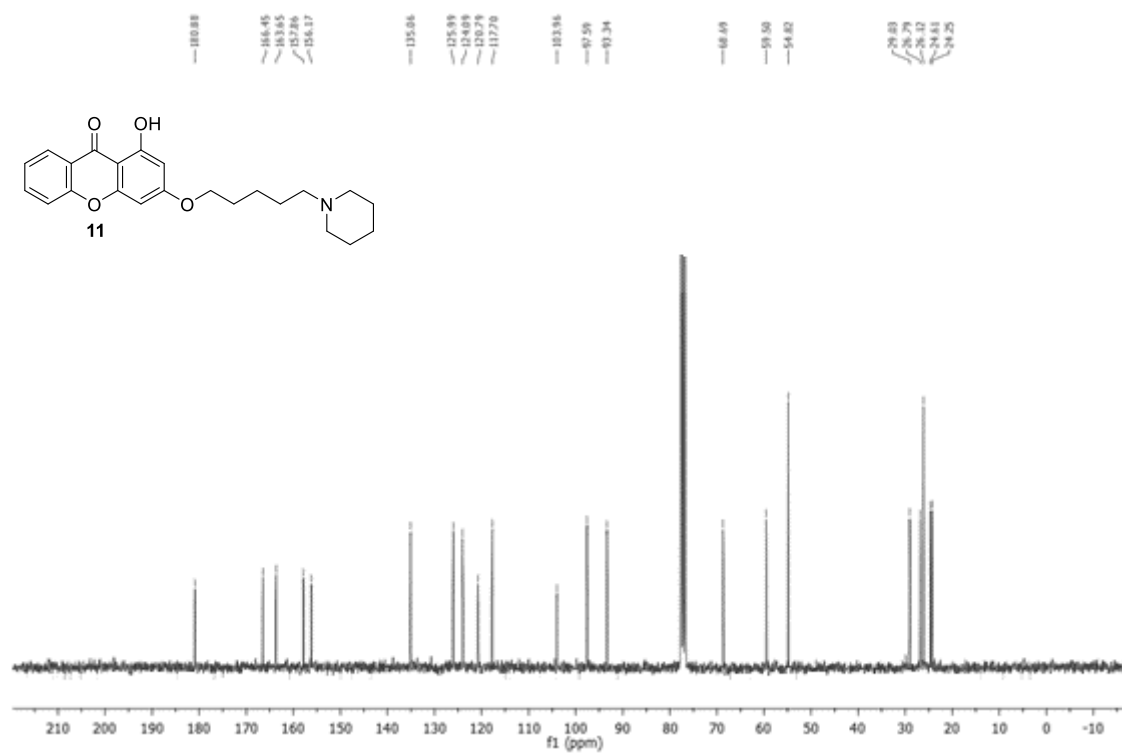


Figura A26. ¹³C-RMN: 1-hidroxi-3-((5-(piperidin-1-yl) pentil) oxi)-9H-xanten-9-ona (75 MHz, CDCl₃).

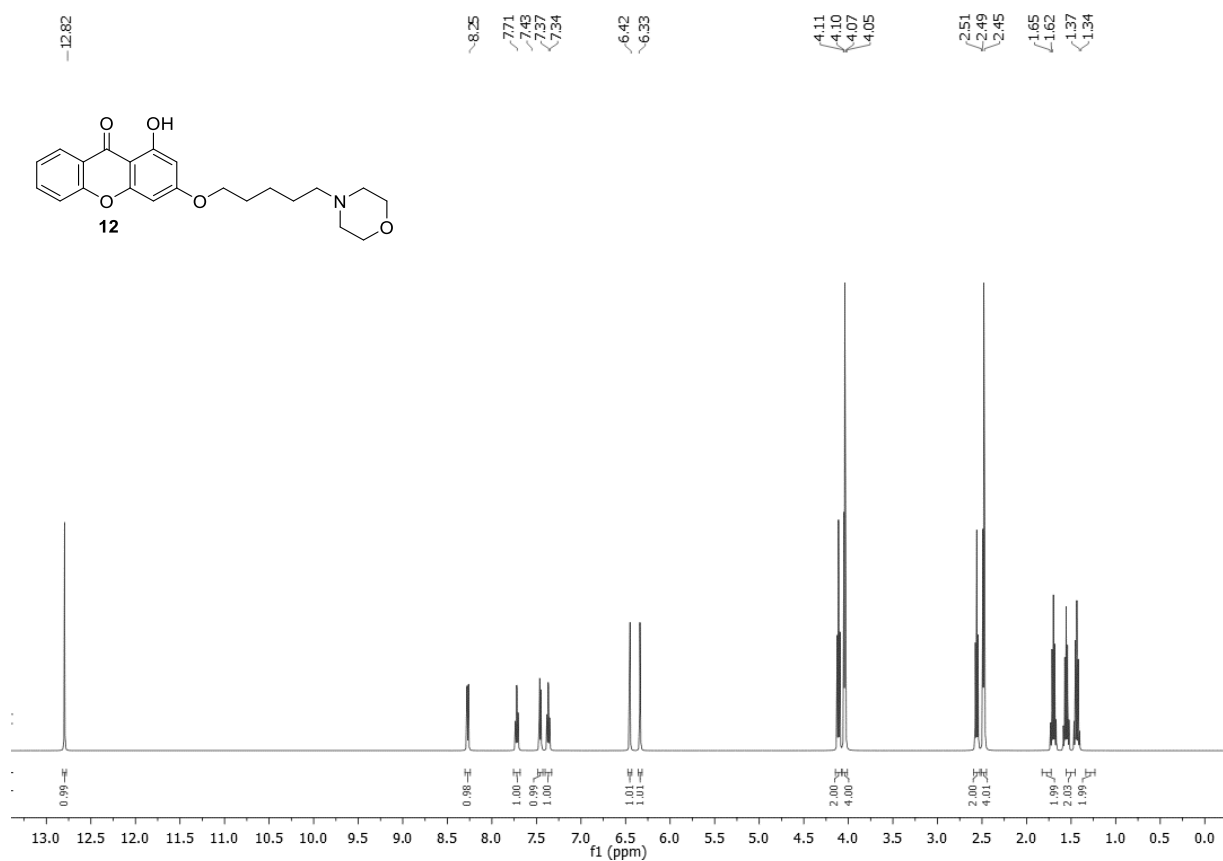


Figura A27. ^1H -RMN: 1-hidroxi-3-((5-morfolinopentil) oxi)-9H-xanten-9-ona (300 MHz, CDCl_3).

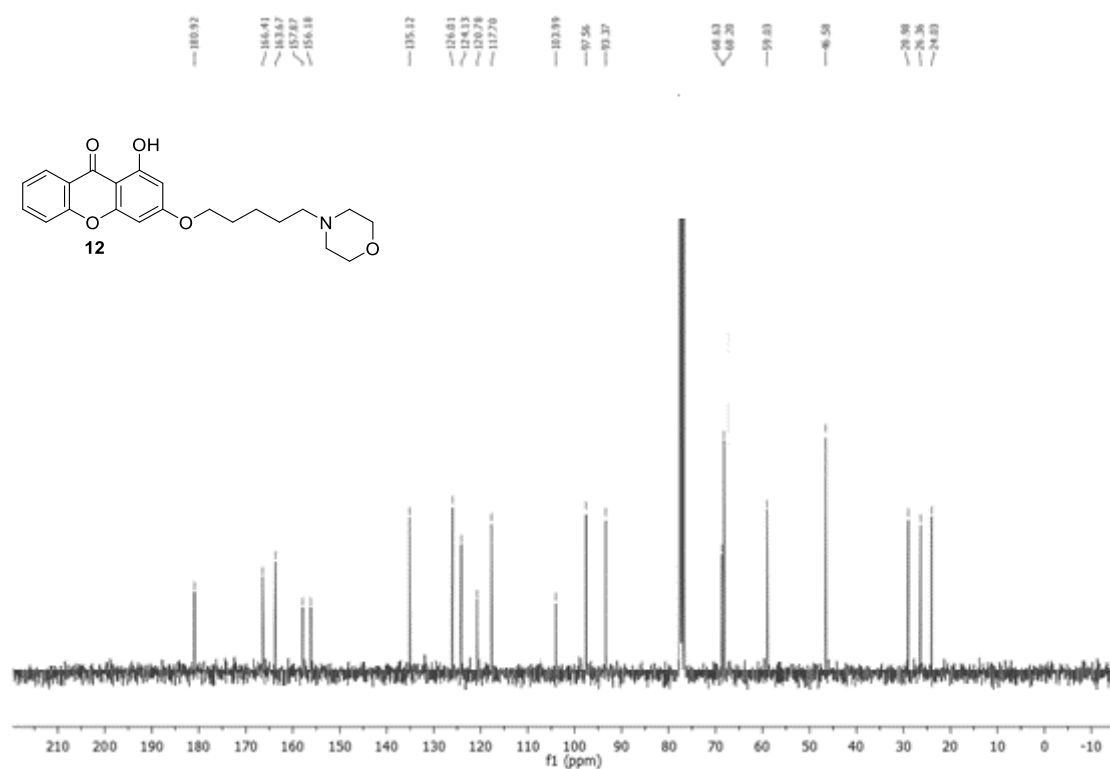


Figura A28. ^{13}C -RMN: 1-hidroxi-3-((5-morfolinopentil) oxi)-9H-xanten-9-ona (75 MHz, CDCl_3).

- AGRADECIMIENTOS -

Hace poco escuché a una persona diciendo algo así como que: 'la necesidad de agradecer, de algún modo, surge desde el reconocimiento de nuestro egoísmo cotidiano e increíblemente naturalizado, en el que vivimos inmersos'. Sus palabras, aun resultando aparentemente controversiales, creo reflejan de un modo sutil y conciso una realidad posible. Y es que en definitiva (y yendo de algún modo a la parte más elemental de la cuestión), si pensamos en una situación muy 'idílica', en la cual fuéramos capaces de subyacer nuestros deseos, necesidades, bienes, etc, etc (en definitiva todo a lo que aplique: mi, mío, nuestro, yo, nosotros etc) ante los de 'un' otro/ otros, es posible vislumbrar con algo de nitidez como agradecer perdería sentido (o al menos, la concepción actual que tenemos del sentimiento de gratitud; en tal sentido, la RAE define gratitud como: el sentimiento que **nos obliga** a estimar el beneficio o favor que se nos ha hecho o ha querido hacer, y a corresponder a él de alguna manera). Luego, y desde una perspectiva excesivamente simplista quizás, si esa fuera la fuerza profundamente naturalizada que nos moviera, ya nadie estaría 'dejando' nada, (en un sentido en el cuál todos los mi, mío, yo, perderían casi completamente importancia); y así, de algún modo todos estaríamos únicamente ganando. Finalmente, espero se entienda (aunque lo dudo jaja), que la intención de lo antes dicho está lejos de desestimar cualquier sentimiento de gratitud, sino por el contrario y de un modo profundamente autocrítico, resignificar su valor.

Luego, y siendo coherente con los 'mi', 'mío', 'yo' cotidianos en mi vida, siento una necesidad inmensa de agradecer a una multitud de personas. Pretender establecer un orden me resulta imposible, aquí simplemente comienzo: en primer lugar me gustaría agradecer a mis directores, Gustavo y Darío, por darme la oportunidad de formar parte de sus grupos de trabajo, por su tiempo y dedicación, paciencia, contención (sobre todo en los últimos meses), en fin, supongo que podría condensar mi agradecimiento hacia ellos con un muy muy sincero ¡ gracias por ser 'mis maestros' -en el sentido más amplio posible de la palabra- a lo largo de este camino !. En este mismo espíritu, Gracias también a todos y cada uno de mis compañeros de trabajo (Joan, Ale, Laureano, Sebastián S. Sebastián A. Jimena, Fabri). Muy especialmente me gustaría agradecerle a Sebastian Accordino por toda su paciencia, ayuda y buena predisposición para transmitirme una inmensidad de conocimientos prácticos, por decirlo de algún modo, sobre todos durante mis primeros pasos en este camino. Sumo a estas mismas gracias particulares, a Jimena y Fabri.

En segundo primer lugar necesito agradecerle a mis papás, y entre las incontables razones que podría mencionar (las cuáles prefiero conservar en lo privado), me gustaría decirles GRACIAS por brindarme los medios y todo su apoyo para poder estudiar. En tercer primer lugar le agradezco a toda mi familia, y afectos en general, sobre todo por estar siempre presentes. En este sentido, me gustaría darle un gracias particular, a una de las personas más importantes en mi vida, mi hermana. Sumo a estas mismas gracias, de manera general, a todos mis amigos (nombrar a todos sin olvidarme de nadie, sería difícil en este momento, considerando la ansiedad por terminar que me aqueja); aun así me gustaría decirle particularmente gracias a Lucho, por las incontables charlas (aún a la distancia), por su tiempo, sus consejos, por escucharme y escucharme y escucharme... A santi, Gastón, Estefa y Mariel, Gracias, por las mismas razones (con mucho énfasis en las gracias por escucharme jaja).

Finalmente, en cuarto primer lugar le agradezco profundamente a todo el pueblo argentino que le da sustento a la educación pública en nuestro país, y de la cuál tuve la inmensa fortuna de ser beneficiaria. En este mismo sentido, agradezco puntualmente a la Universidad Nacional del Sur, lugar dónde curse todos mis estudios; y a CONICET, por brindarme los medios 'materiales' necesarios.

FIN.

