

# ESTUDIO DE MODELADO MOLECULAR DE INHIBIDORES DE LA ENZIMA DIHIDROFOLATO REDUCTASA HUMANA

Rodrigo Tosso<sup>1,2</sup>, Lucas Gutierrez<sup>1,2</sup>, Sebastián Andujar<sup>1,2</sup>, Emilio Angelina<sup>3</sup>,  
Fernando Suvire<sup>1,2</sup>, Justo Cobo<sup>4</sup>, Ricardo Enriz<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Química, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis, Chacabuco 917, 5700 San Luis, Argentina.

<sup>2</sup> IMIBIO-SL, Ejército de los Andes 950, 5700 San Luis, Argentina.

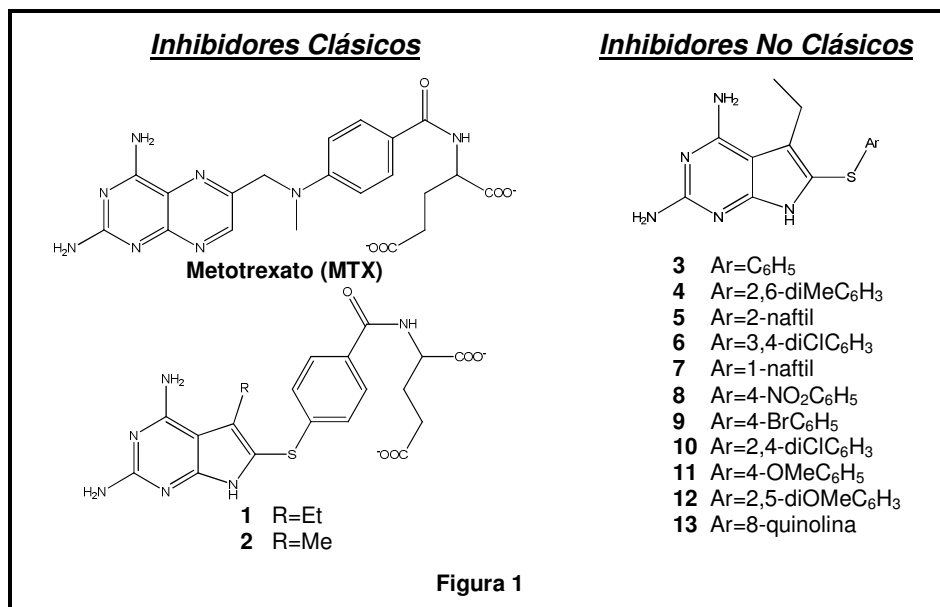
<sup>3</sup> Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura. Universidad Nacional del Nordeste.

<sup>4</sup> Departamento de Química Inorgánica y Orgánica, Universidad de Jaén, España.  
E-mail: rdtosso@unsl.edu.ar

## INTRODUCCION

La dihidrofolato reductasa (DHFR) es la enzima encargada de reducir el ácido dihidrofólico a ácido tetrahidrofólico. Esta enzima está presente en mamíferos, protozoos, bacterias y hongos; sin embargo, su estructura es diferente en los distintos organismos, mostrando diferente sensibilidad a sus respectivos inhibidores, lo que la convierte en un excelente blanco para el desarrollo de fármacos antineoplásicos, antibacterianos y antiprotozoarios más específicos y eficaces.

En el presente trabajo se realizó un estudio de modelado molecular de una serie de compuestos reportados previamente por Gangjee *et al.*<sup>1</sup> (Figura 1), llevándose a cabo cálculos de Dinámica Molecular (DM), utilizando la información cristalográfica obtenida del Protein Data Bank (código: 2W3M). Además, sabiendo que los sistemas enzima-ligando son muy grandes para realizar cálculos mecanocuánticos e incluso también puede serlo el número de ligandos a evaluar, el próximo paso de nuestro estudio fue la construcción de un modelo reducido del sitio de unión de la DHFR para llevar a cabo cálculos semiempíricos, *ab initio* y DFT.



## **METODOS DE CALCULO**

Todas las simulaciones de DM, los análisis de las trayectorias correspondientes y el cálculo de la energía libre de unión por el método de Interacción de Energía Lineal (en inglés, LIE), se realizaron con el paquete de programas GROMACS 4.0, utilizando el campo de fuerza OPLS-AA.

Para poder decidir cuáles son los aminoácidos que están interactuando con nuestros ligandos y así evitar perder interacciones moleculares importantes, se calcularon los espectros de interacción residuo–inhibidor por descomposición de la energía libre, utilizando el paquete de programas AMBER12 y empleando el método MM-GBSA (Molecular Mechanics – Generalized Born Surface Area).

Las optimizaciones PM6 del modelo reducido con los distintos ligandos se llevaron a cabo utilizando el programa MOPAC2009. Para realizar dichas optimizaciones se tuvieron en cuenta las coordenadas de los residuos del punto de mínima energía potencial obtenido a partir de las simulaciones de dinámica molecular, dejándose libres las cadenas laterales de los aminoácidos pero manteniéndose fijas las posiciones de los átomos que componen el backbone.

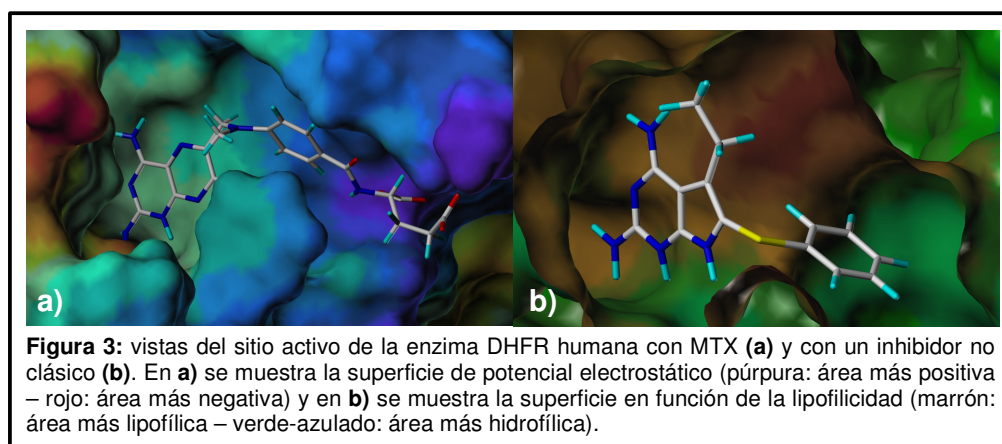
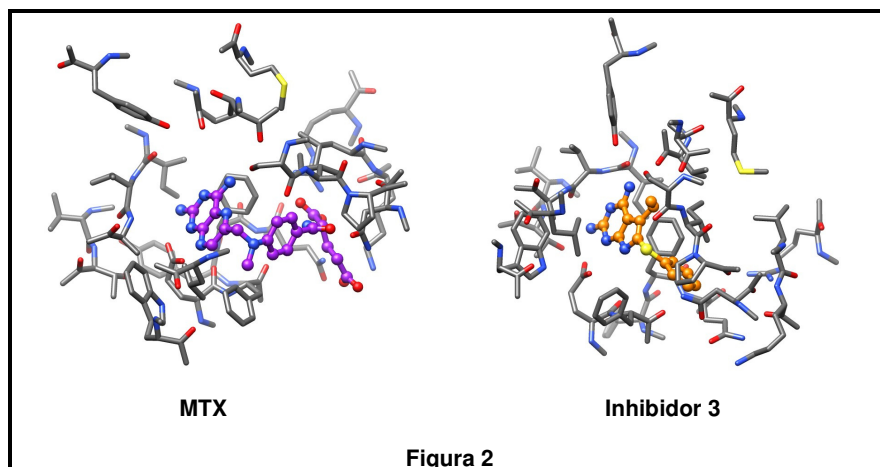
Una vez finalizadas las optimizaciones, se efectuaron cálculos puntuales *ab initio* (RHF/6-31G(d)) y DFT (PBE/6-31G(d)) utilizando el programa Gaussian03, con el objeto de lograr una mejor aproximación de la energía de unión.

## **RESULTADOS Y CONCLUSIONES**

Los espectros obtenidos por descomposición de la energía libre resultaron ser muy parecidos entre los inhibidores clásicos (dentro de los cuales se incluyen los compuestos 1, 2 y MTX), reflejando modos de unión similares. Para este tipo de inhibidores los residuos que dan interacciones estabilizantes son: Ile7, Glu30, Phe31, Phe34, Asn64, Leu67, Arg70 y Val115. Sin embargo, las interacciones más importantes están dadas por los residuos Glu30 y Arg70, ya que estos aminoácidos son capaces de formar puentes salinos con el ligando. Asimismo, los residuos Phe31 y Phe34 dan lugar a interacciones de tipo  $\pi$ -stacking y el aminoácido Asn64 forma enlaces de tipo puente de hidrógeno con los ligandos. También es necesario destacar la presencia de un bolsillo hidrofóbico conformado por algunos de los residuos recientemente mencionados.

Para los otros inhibidores estudiados (llamados no clásicos), el espectro es diferente de aquel observado para los inhibidores clásicos. Aquí las interacciones más relevantes son solamente 5 y están dadas por los siguientes residuos: Ile7, Glu30, Phe31, Phe34 y Val115. Éste no es un resultado inesperado considerando que estos compuestos no poseen una cadena flexible constituida por un residuo de L-glutamato y, por lo tanto, todas las interacciones estabilizantes dadas por esa porción del ligando se pierden.

A pesar de estos resultados, se consideró prudente incluir en el modelo reducido no sólo aquellos aminoácidos que involucran las interacciones moleculares más favorables mostradas en los diferentes espectros sino también a todos los residuos que contribuyen a estabilizar o desestabilizar el sistema en más de 1 kcal/mol. Esto deriva en un modelo reducido que incluye 23 aminoácidos, los cuales son: Ile7, Val8, Ala9, Leu22, Trp24, Glu30, Phe31, Tyr33, Phe34, Gln35, Met52, Thr56, Ser59, Ile60, Pro61, Asn64, Leu67, Lys68, Arg70, Val115, Tyr121, Val135 y Thr136. (Figuras 2 y 3)



Es interesante destacar que el residuo Glu30 (altamente conservado) es importante para la unión de todos los inhibidores a la DHFR y su grupo carboxilo terminal es un importante punto de anclaje, dado que los compuestos estudiados presentan un anillo con un átomo de nitrógeno protonado, confiriéndole una carga positiva.

A partir de las energías de unión obtenidas por los diferentes métodos, se determinaron las distintas correlaciones entre la energía de unión predicha por los distintos métodos y los valores de actividad inhibitoria ( $IC_{50}$ ) de cada compuesto, con valores de  $R^2$  que varían entre 0.78 y 0.82, dependiendo del método. Esto nos indica que a partir de este modelo se podría predecir el potencial efecto inhibitorio de compuestos no sintetizados con un aceptable grado de precisión.

## REFERENCIAS

- 1- Gangjee, A., Zeng, Y., Talreja, T., McGuire, J.J., Kisliuk, R.L., and Queener, S.F. (2007). Design and synthesis of classical and nonclassical 6-arylthio-2,4-diamino-5-ethylpyrrolo[2,3-d]pyrimidines as antifolates. *J Med Chem* 50, 3046-3053.