



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
ESCUELA DE GRADUADOS
PROGRAMA DE GRADUADOS EN QUIMICA

**DISEÑO DE COMPUESTOS CON POTENCIAL ACTIVIDAD
ANTITUMORAL EN BASE AL ESTUDIO BIOINFORMÁTICO DE LA
INTERACCIÓN TUBULINA-EPOTILONA**

POR KAREN ROXANA NAVARRETE FUENTES

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Concepción
para optar al grado académico de Doctor en Ciencias con mención en Química

Tutor: Dr. Joel Alderete, Universidad de Concepción

Prof. Co-tutor: Dra. Verónica Jiménez, Universidad Andrés Bello

Noviembre 2018

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento



ÍNDICE GENERAL

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE GENERAL	iii
RESUMEN	xii
SUMMARY.....	xiii
1. INTRODUCCION.....	1
1.1 Tubulina y microtúbulos	1
1.2 Epotilonas	8
1.3 Diseño racional de fármacos. Screening Virtual.....	12
1.4 Modelos de asociación epotilona-tubulina.....	14
2. HIPÓTESIS	21
3. OBJETIVOS.....	22
3.1 Objetivo General	22
3.2 Objetivos Específicos.....	22
4. MATERIALES Y MÉTODOS	23
4.1 Dinámica Molecular.....	23
4.1.1 Construcción de Modelos	23
4.1.1.1. Epotilonas	23
4.1.1.2. Tubulina Nativa	26
4.1.1.3. Tubulina Mutada.....	27
4.1.1.4. Complejos Tubulina-Epotilona.....	28
4.1.2 Parámetros de Simulación	28
4.1.3 Análisis de Dinámica Molecular	30
4.1.3.1. Análisis Conformacional de Epotilonas	31
4.1.3.2. Modos de Asociación Epotilona-Tubulina	32

4.1.4	Energías Libres de Asociación	33
4.2	Screening Virtual	34
4.2.1	Preparación de ligandos.....	35
4.2.1.1.	Base de datos	35
4.2.1.2.	Selección de compuestos	36
4.2.1.3.	Asignación de cargas y obtención de archivos pdbqt.....	37
4.2.1.4.	Compuestos activos conocidos	38
4.2.2	Preparación del receptor	38
4.2.3	Parámetros docking	39
4.2.4	Docking	39
4.2.5	Identificación de compuestos hits	40
4.3	Ensayos de polimerización	40
4.3.1	Ensayos de polimerización de tubulina.....	41
5.	ESTUDIO DE LA ASOCIACION DE TUBULINA CON EPOTILONAS A y B	43
5.1	Análisis conformacional de epotilonas nativas libres	47
5.2	Análisis conformacional de epotilonas nativas en complejos con tubulina	50
5.3	Modelos de asociación de epotilonas nativas	56
6.	ASOCIACION DE TUBULINA CON DERIVADOS DE EPOTILONAS ...	61
6.1	Conformación de derivados de epotilonas libres	63
6.2	Conformación de derivados de epotilonas en asociación a tubulina	66
6.3	Asociación epotilona-tubulina para derivados de epotilonas.....	75
6.3.1	Sitio de asociación.....	76
6.3.2	Modificaciones en C15.....	85
6.3.3	Modificaciones en C21.....	91
6.3.4	Modificaciones en C12.....	94
6.4	Estructura y dinámica del dímero de tubulina	105
7.	EFFECTOS DE MUTACIONES EN LA ASOCIACION DE EPOTILONA B	110

8. SCREENING VIRTUAL.....	126
8.1 Selección de algoritmo de docking molecular	126
8.2 Screening virtual	131
8.3 Compuestos hits	136
8.4 Ensayos de polimerización de tubulina.....	140
CONCLUSIONES.....	144
ABREVIACIONES Y ACRÓNIMOS	149
BIBLIOGRAFÍA	151
ANEXO	160
ARTICULOS.....	181



INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Ángulos diedros de las conformaciones de las epotilonas A y B en complejos con tubulina. Los valores calculados corresponden a los ángulos diedros de las estructuras representativas de los sistemas obtenidos por DM.	44
TABLA 2. Resumen de los resultados de clusterización del análisis de las epotilonas libres y en asociación a tubulina obtenidas de las dinámicas de producción de. Los <i>cluster</i> comunes se refieren a las conformaciones que han sido encontradas en ambos estados, epotilonas, libres y en complejos.	73
TABLA 3. Energías de interacción promedio para los complejos epotilona-tubulina obtenidos desde simulaciones de DM de 20 ns. Las energías de interacción son reportadas como la suma de los términos electrostáticos (E_{elec}) y van der Waals (E_{vdw}) y están expresados en kcal/mol.	84
TABLA 4. Factores de resistencia de fármacos, definidos como el valor de IC50 obtenidos para la línea mutante de β -tubulina dividido por el obtenido por la línea parental[63, 64]......	112
TABLA 5. Propiedades fisicoquímicas de compuestos activos a β -tubulina utilizados para filtrar moléculas <i>decoys</i>	129
TABLA 6. Resultados de <i>docking</i> molecular del conjunto de compuestos activos y decoys realizados utilizando distintas estructuras de β -Tubulina, donde corresponde a TXL a docetaxel, TA1 a taxol y D a decoys.....	130
TABLA 6. Score (kcal/mol) obtenido por VINA de los 12 ligandos seleccionados.	135

INDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1. Los heterodimeros de tubulina se unen para formar núcleos cortos de MT. Este proceso es seguido de un alargamiento de los MT en ambos extremos para formar un cilindro que se compone de heterodimeros de tubulina. Cada microtúbulo tiene un extremo positivo de β -tubulina y un extremo negativo de α -tubulina.4
- FIGURA 2. Efecto de las drogas del tipo antimitóticas. Cuando las células son expuestas a agentes antimitóticos como el paclitaxel, detienen la mitosis debido a la activación crónica del control del ensamblaje del huso mitótico. A continuación, estas siguen uno de los varios caminos. Las células pueden morir directamente en la mitosis, dividirse desigualmente o pueden salirse de la mitosis sin dividirse. En este caso las células pueden morir en la interfase, detenerse en la interfase o continuar con ciclos celulares adicionales en ausencia de división.....6
- FIGURA 3. Estructuras de compuestos que se asocian a tubulina; a) Desestabilizantes y b) Estabilizantes de los MT.7
- FIGURA 4. Estructura de las epotilonas, R=H en EPA y R=CH₃ en EPB.9
- FIGURA 5. a) Estructura de la epotilona C, y de sus análogos inactivos con modificaciones en C8; b) análogo desmetilado, c) epimerizado y d) dimetilado...11
- FIGURA 6. Representación del sitio de unión de la EPA con la tubulina del complejo obtenido mediante RMN (color rojo: hélice H1, amarillo: H7 hélice)[26].15
- FIGURA 7. Representación del sitio de unión de la EPA con la tubulina. Los enlaces de hidrógeno de la EPA con los diferentes residuos de β -tubulina se representan en líneas discontinuas [29].16
- FIGURA 8. Interacciones relevantes de la asociación EPA-tubulina reportada en el modelo de Prota. Las abreviaciones de una letra de los aminoácidos son los siguientes; A, Ala; C, Cys; D, Asp; E, Glu; F, Phe; G, Gly; H, His; I, Ile; K, Lys; L, Leu; M, Met; N, Asn; P, Pro; Q, Gln; R, Arg; S, Ser; T, Thr; V, Val; W, Trp; y Y, Tyr[31].18
- FIGURA 9. Epotilonas nativas (A y B) y derivados estudiados en esta tesis.25
- FIGURA 10. Estructuras representativas de las epotilonas A y B en complejos con tubulina, obtenidas de las simulaciones de DM en comparación al modelo cristalográfico PDB 4I50 (EPA RMSD: 0.8797 Å, EPB RMSD: 2.6262 Å).45

FIGURA 11. Comparación de las estructuras cristalográficas de los PDB 1TVK y	46
FIGURA 12. Estructuras representativas de las epotilonas A y B en complejos con tubulina, obtenidas de las simulaciones de DM en comparación al modelo cristalográfico PDB 1TVK	46
FIGURA 13. Ángulos diedros del macrociclo de las epotilonas considerados en el estudio.....	48
FIGURA 14. Distribución de ángulos diedros para EPA (color rojo) y EPB (color azul) libres obtenidos de las simulaciones de dinámica de producción de 20ns en solución acuosa. Los ángulos diedros son reportados en grados. Las líneas verdes y amarillas indican los valores de ángulos reportados para las estructuras de las epotilonas A y B respectivamente, cristalizadas en metanol [57, 58].	49
FIGURA 15. Distribución de ángulos diedros para EPA libre (color rojo) y en asociación con tubulina (color azul) obtenidos de las simulaciones de dinámica de producción de 20ns en solución acuosa. Los ángulos diedros son reportados en grados.....	53
FIGURA 16. Distribución de ángulos diedros para EPB libre (color rojo) y en asociación con tubulina (color azul) obtenidos de las simulaciones de dinámica de producción de 20ns en solución acuosa. Los ángulos diedros son reportados en grados.....	54
FIGURA 17. Distribución de ángulos diedros para las epotilonas A (color rojo) y B (color azul) en complejos con tubulina obtenidos de las simulaciones de dinámica de producción de 20 ns en solución acuosa. Los ángulos diedros son reportados en grados.....	55
FIGURA 18. Estructura representativa del complejo EPA-tubulina obtenida por dinámica molecular.....	57
FIGURA 19. Estructura representativa del complejo EPB-tubulina obtenido por dinámica molecular.....	59
FIGURA 20. Modificaciones estructurales de las epotilonas estudiadas.	62
FIGURA 21. Distribución de ángulos diedros para las 18 epotilonas libres obtenidos de las simulaciones de dinámica de producción de 20 ns en solución acuosa.	64
FIGURA 22. Conformaciones de las 18 epotilonas en solución a lo largo de la simulación de DM. Los colores de las representaciones indican el tiempo (nanosegundos) del progreso de la simulación.....	65

FIGURA 23. Distribución de ángulos diedros para las eptilonas en complejos con tubulina obtenidos de las simulaciones de dinámica de producción de 20 ns en solución acuosa. Los ángulos diedros son reportados en grados.....	67
FIGURA 24. Conformaciones de las 18 eptilonas en el sitio activo a lo largo de la simulación de DM. Los colores de las representaciones indican el tiempo (nanosegundos) del progreso de la simulación.....	68
FIGURA 25. RMSF (Å) para el macrociclo de las eptilonas determinados para las eptilonas libres (azul) y en asociación a tubulina (negro) a lo largo de la trayectoria de la dinámica molecular de producción de 20 ns.....	70
FIGURA 26. Representaciones de los <i>cluster</i> comunes para las conformaciones de las eptilonas activas analizadas. a) <i>Cluster</i> comunes para las eptilonas A, B, 3, 4, 14, 19 y 20 y b) <i>cluster</i> comunes para las eptilonas 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 15. (Máx RMSD 0.616).....	74
FIGURA 27. Representaciones de los <i>clusters</i> más poblados de las conformaciones comunes entre las eptilonas activas analizadas. a) <i>Cluster</i> común de las eptilonas A, B, 3, 4, 14, 19 y 20 y b) <i>Cluster</i> común de las eptilonas 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 15.....	75
FIGURA 28. Resumen de las interacciones encontradas en los complejos de tubulina con los 20 derivados de las eptilonas nativas obtenido del análisis de las trayectorias de las simulaciones de DM.....	77
FIGURA 29. Resultados de los cálculos de energía libre de asociación relativa utilizando los métodos MM/GBSA (línea roja) y MM/PBSA (línea azul) para la serie de 20 complejos eptilona-tubulina estudiados en esta tesis. Los cálculos de energía libre de asociación fueron realizados tomando 800 <i>frames</i> a lo largo de la dinámica de producción de 20 ns. Los valores de energía libre de asociación relativa son reportados tomando como referencia la energía libre de asociación de EPB. .	83
FIGURA 30. Comparación entre los modos de asociación de derivados de las eptilonas obtenidas mediante I DM (color amarillo) con respecto a la estructura cristalográfica de EPA en el complejo de PDB 4I50 (color gris). Los valores de RMSD para cada eptilona fueron calculados a lo largo de los 20 ns de DM manteniendo alineada las estructuras proteicas.....	79
FIGURA 31. Comparación entre los modos de asociación de las eptilonas a) 14 y b) 16, obtenidos por DM.....	87
FIGURA 32. Comparación entre los modos de asociación de las eptilonas a) 5 (color azul) y b) 7 (color gris), obtenidos por DM.....	90

FIGURA 33. Representaciones del sitio de asociación de a) EP8 y b) EP9, en complejos con tubulina obtenidos por DM.....	94
FIGURA 34. Representación de los modos de asociación de EP17 (color azul) y EP18 (color gris), obtenidos por DM, donde se observa el gran cambio en la orientación de la cadena lateral de C21.	97
FIGURA 35. Comparación entre los modos de asociación de EP20 (color azul) y EP8 (color gris), obtenidos por DM. La modificación presente en la estructura de los ligandos corresponde a la epimerización de C12 (EP20-C12S, EP8-C12R)....	99
FIGURA 36. Representación de los modos de asociación de EPA (color azul) y EP14 (color gris), obtenidos por DM y donde existe la modificación del anillo epóxido por uno ciclopropano.	103
FIGURA 37. Modelos de asociación epotilona–tubulina, donde existe una sustitución del grupo a) ciclopropano (EP5) por el b) ciclobutano (EP15) en la estructura del ligando.....	104
FIGURA 38. Efecto de la asociación en el <i>M-loop</i> de la tubulina en la tubulina libre y en asociación a los distintos derivados. La representación gris corresponde a la tubulina libre.....	106
FIGURA 39. a) Diferencias de RMSF en angström (Å) entre la estructura de β -tubulina pertenecientes a los distintos complejos con epotilonas y en su estado libre. Los residuos destacados corresponden a los de mayor flexibilidad. b) Representación de la α -tubulina, en la cual se incluyen los residuos de mayor flexibilidad con relación a los datos de RMSF obtenidos.	108
FIGURA 40. RMSD (Å) para las estructuras de los complejos en asociación a EPB con tubulina nativa y mutada obtenida a partir del análisis de la trayectoria de la dinámica de producción de 20ns. Todas las mutaciones fueron realizadas en la β -tubulina.	111
FIGURA 41. Δ RMSF (Å) para las estructuras de los complejos en asociación a EPB con tubulina nativa y mutada obtenida a partir del análisis de la trayectoria de la dinámica de producción de 20ns. En la figura se indican con color los residuos de mayor cambio en la flexibilidad como consecuencia de las mutaciones.....	113
FIGURA 42. Comparación de la región perteneciente al <i>M-loop</i> de las estructuras representativas de los complejos EPB-tubulina nativa y sus derivados mutantes. El porcentaje indica la presencia de la interacción electrostática entre los residuos Arg278 y Asp226 a lo largo de las trayectorias de las dinámicas de producción.	116

FIGURA 43. Estructuras del sitio de asociación de los complejos epotilona B-tubulina superpuestas para tubulina nativa y mutadas, en donde se muestra el tiempo de evolución de la posición de los ligandos a lo largo de la dinámica de producción de 20 ns.	118
FIGURA 44. Volumen calculado del sitio de asociación para los complejos de EPB-tubulina formando con tubulina nativa y sus derivados mutantes.	119
FIGURA 45. Gráfico resumen de los residuos pertenecientes al sitio de asociación identificados para los complejos de EPB con tubulina nativa y mutadas. Los recuadros negros representan las interacciones existentes en más de un 75% de la trayectoria de DM mientras que los recuadros grises representan las interacciones existentes entre un 50 y 75% de la trayectoria de las simulaciones.	121
FIGURA 46. Representaciones de la asociación de EPB con tubulina nativa y mutadas.	125
FIGURA 47. Resultados de docking de las estructuras cristalograficas de a)1TVK y b) 4I50, donde el color azul representa a la estructura original, verde conformación obtenida de VINA y gris de AUTODOCK.	128
FIGURA 48. Representación del sitio activo y la grilla considerado para la realización del SV.	132
FIGURA 49. Diagrama de flujo de la estrategia <i>Screening Virtual</i> utilizado.	133
FIGURA 50. Resultados de SV de los 12 compuestos seleccionados.	136
FIGURA 51. Compuestos <i>Hits</i> seleccionados del <i>Screening Virtual</i>	137
FIGURA 52. Detalles de la interacción ligando-tubulina de los compuestos seleccionados del <i>Screening Virtual</i> , obtenidas mediante simulaciones de dinámica molecular.	139
FIGURA 53. Efecto de los compuestos seleccionados del SV y de un reconocido agente polimerizante (Taxol) en la polimerización de tubulina, determinados por ensayos de polimerización de tubulina <i>in vitro</i> . La tubulina fue incubada con los doce compuestos <i>hits</i> (5 μ M) y Taxol (5 μ M), respectivamente. La fluorescencia (Ex:360 nm, Em:420 nm) fue monitoreada cada 1 minuto por 60 minutos.	142
FIGURA 54. Compuestos seleccionados de los resultados de los ensayos de polimerización de tubulina, donde se muestran algunas de sus propiedades fisicoquímicas. Estos compuestos corresponden a promotores de polimerización de tubulina.	143

RESUMEN

En esta tesis se propuso identificar nuevos agentes de asociación a tubulina con potencial actividad antitumoral a partir de la búsqueda de compuestos que imiten el mecanismo de acción de epotilonas, agentes antimitóticos actualmente utilizados en ensayos clínicos. Para ello se obtuvieron modelos de asociación de 20 complejos epotilona-tubulina mediante simulaciones de Dinámica Molecular. Estos modelos fueron validados con la información sobre la relación entre estructura y actividad disponible para dicha serie de derivados. Una vez identificados los residuos de tubulina e interacciones más relevantes en la asociación tubulina-epotilona se realizó *Screening Virtual (SV)* usando librerías de moléculas de la base de datos ZINC que fueron filtradas según criterios farmacológicos y estructurales. Entre los compuestos mejor evaluados del SV se seleccionaron 12 candidatos para realizar ensayos biológicos, testeando su actividad biológica a través de medidas de polimerización de tubulina *in vitro*, resultando tres de los compuestos ser agentes promotores de la polimerización de tubulina y por lo tanto potenciales nuevos compuestos antitumorales.

SUMMARY

In this thesis, Virtual Screening and other bioinformatic methods are proposed to identify new tubulin-binding compounds with potential antitumor activity, using as reference the epothilone-tubulin model. To obtain active compound that reproduce the mechanism of epothilone, models of 20 epothilones-tubulin complexes were obtained by simulations of Molecular Dynamics. These models with experimental information available for series of derivatives were validated. Virtual Screening was carried out and libraries of molecules from the ZINC database were used. These compounds according to the pharmacological and progressive criteria were filtered, and then ligand-tubulin interaction by Molecular Docking was evaluated. Among the compounds, the best score ligands were selected. Finally, the biological activity of the 12 hits compounds selected were tested through in vitro tubulin polymerization assays. The results showed that these compounds three correspond to agents that promote tubulin polymerization.

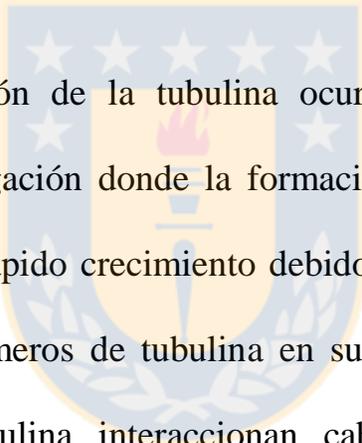
1. INTRODUCCION

1.1 Tubulina y microtúbulos

Los microtúbulos (MT) son componentes claves del citoesqueleto de células eucariotas y esenciales para el desarrollo y mantenimiento de la forma celular, transporte de vesículas, mitocondrias y otros componentes, señalización celular y más importantemente en la división celular y en la mitosis. Los MT son polímeros proteicos filamentosos de longitud micrométrica, con una estructura tubular de 24 nm de diámetro exterior y 12 nm de diámetro interior y están formados por la polimerización de la tubulina (100000 Da), que constituye la unidad biológica de los MT en solución [1–3].

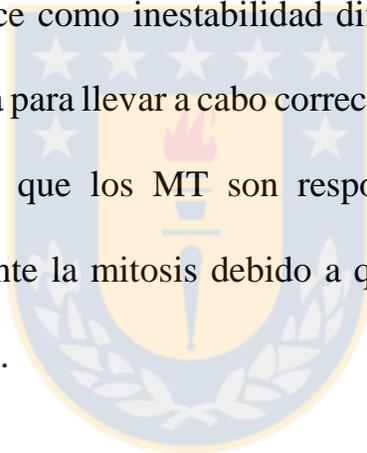
La tubulina es una proteína compuesta por dos unidades: α - y β -tubulina que se disponen de forma tubular filamentosa [4]. Cada monómero contiene alrededor de 450 aminoácidos y un nucleótido de guanina, y su secuencia se encuentra muy conservada en todos los organismos eucariotas. Los monómeros alfa y beta comparten cerca del 40% de identidad de secuencia y sus estructuras tridimensionales son muy

similares. Cada dímero de tubulina está asociado a dos moléculas de guanosin trifosfato (GTP). El nucleótido unido a α -tubulina, no es intercambiable mientras que el que se encuentra unido a β -tubulina puede ser intercambiado por guanosin difosfato (GDP). El GTP es necesario para la polimerización de la tubulina, este proceso ocurre espontáneamente seguido de la hidrólisis de GTP a GDP.



La polimerización de la tubulina ocurre mediante un proceso de nucleación-elongación donde la formación de un pequeño núcleo es seguida de un rápido crecimiento debido a la adición reversible y no covalente de dímeros de tubulina en sus extremos. Es así como los dímeros de tubulina interaccionan cabeza con cola para formar filamentos rectos o protofilamentos que posteriormente se asocian de forma paralela, estableciendo contactos laterales entre ellos para formar la pared cilíndrica de los MT. Los MT comúnmente consisten de 12 o 13 protofilamentos alineados de forma paralela (FIGURA 1). Los cilindros pueden alargarse o contraerse mediante la adición o eliminación de subunidades en los extremos. Los MT están polarizados con α -tubulina expuesta en el extremo negativo que corresponde al de

crecimiento más lento y β -tubulina en el extremo positivo donde el crecimiento es más rápido. [5–7]. Sin embargo, este crecimiento puede detenerse durante la polimerización y ocurrir de manera repentina una despolimerización, llegando incluso en ocasiones a desaparecer o a reiniciar el proceso de polimerización. Este fenómeno por el cual los MT pueden crecer, encogerse y rápidamente cambiar entre estos dos estados se conoce como inestabilidad dinámica. Esta propiedad es de vital importancia para llevar a cabo correctamente las diversas funciones celulares de las que los MT son responsables, y es especialmente importante durante la mitosis debido a que permite el ensamblaje del huso mitótico[8].



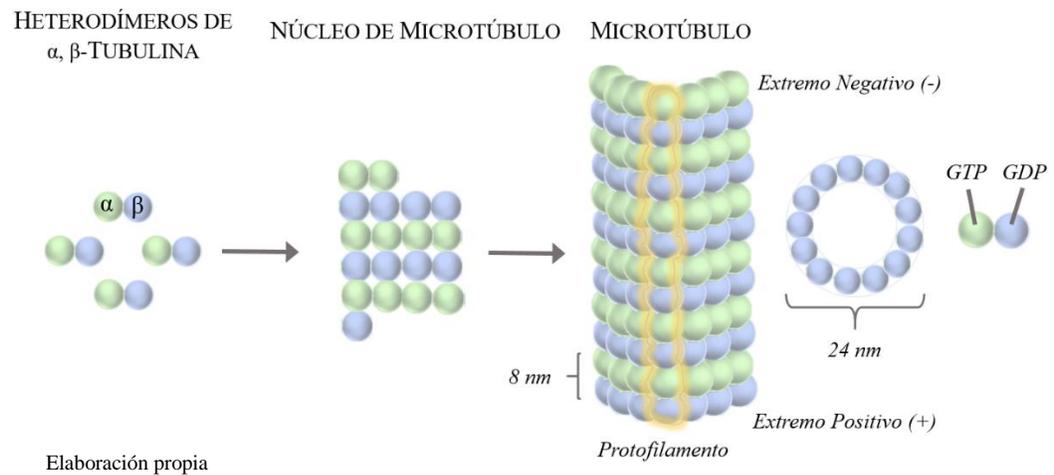
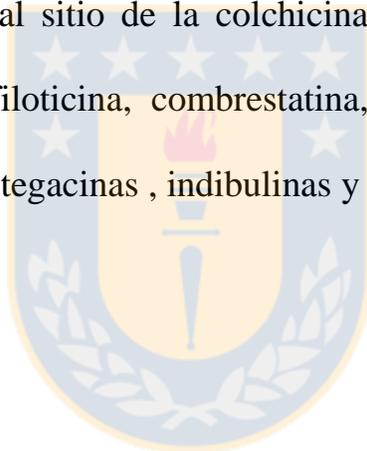


FIGURA 1. Los heterodimeros de tubulina se unen para formar núcleos cortos de MT. Este proceso es seguido de un alargamiento de los MT en ambos extremos para formar un cilindro que se compone de heterodimeros de tubulina. Cada microtúbulo tiene un extremo positivo de β -tubulina y un extremo negativo de α -tubulina.

Durante la década de 1970 la tubulina comenzó a ser utilizada como sitio de acción de compuestos con actividad antitumoral, considerando que al interactuar con la proteína estos alteran el proceso de polimerización y dinámica de los MT perturbando el proceso normal de mitosis mediante la prevención de formación del huso y la segregación cromosómica generando la muerte celular (FIGURA 2). Los agentes antimitóticos que se asocian a tubulina se clasifican en dos grandes grupos, compuestos desestabilizantes y compuestos estabilizantes de MT. Los compuestos desestabilizantes (FIGURA 3.a) inhiben la

polimerización de tubulina en altas concentraciones, a través de la unión no covalente sobre dos dominios de la tubulina: el dominio vinca y el dominio colchicina. [9, 10]. Dentro de los compuestos que se unen al sitio vinca se encuentran los alcaloides vinca (vinblastina, vincristina, vindesina y vinflunina), las criptoficinas y dolastatinas (eribulina, espongistatina, rizoxina, maitansinoides y tasidotina). Los compuestos que se asocian al sitio de la colchicina incluyen a colchicina y sus análogos, podofiloticina, combrestatina, CI-980, 2-metoxioestradiol, fenilhistinas, estegacinas, indibulinas y curacinas [11].



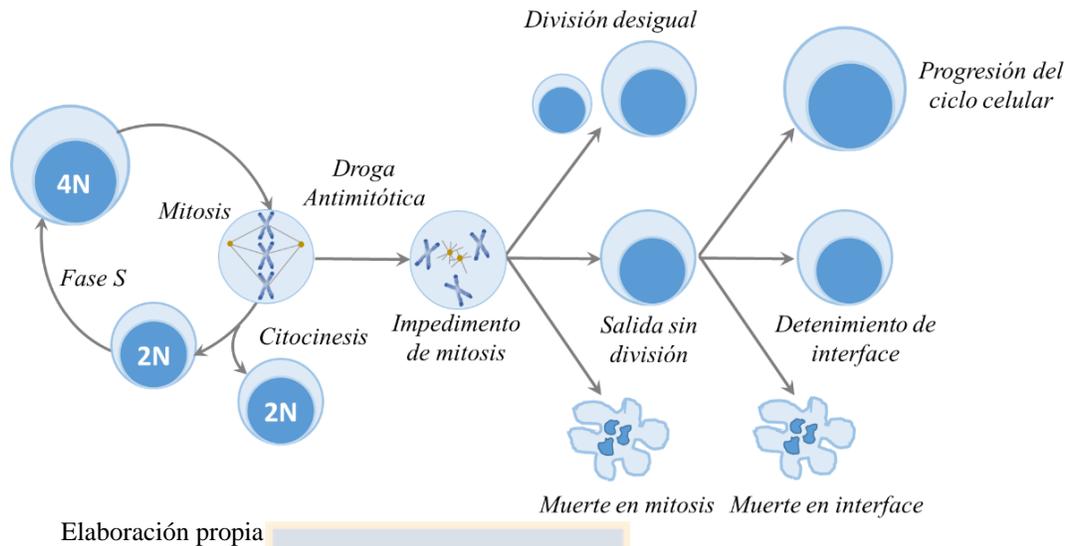
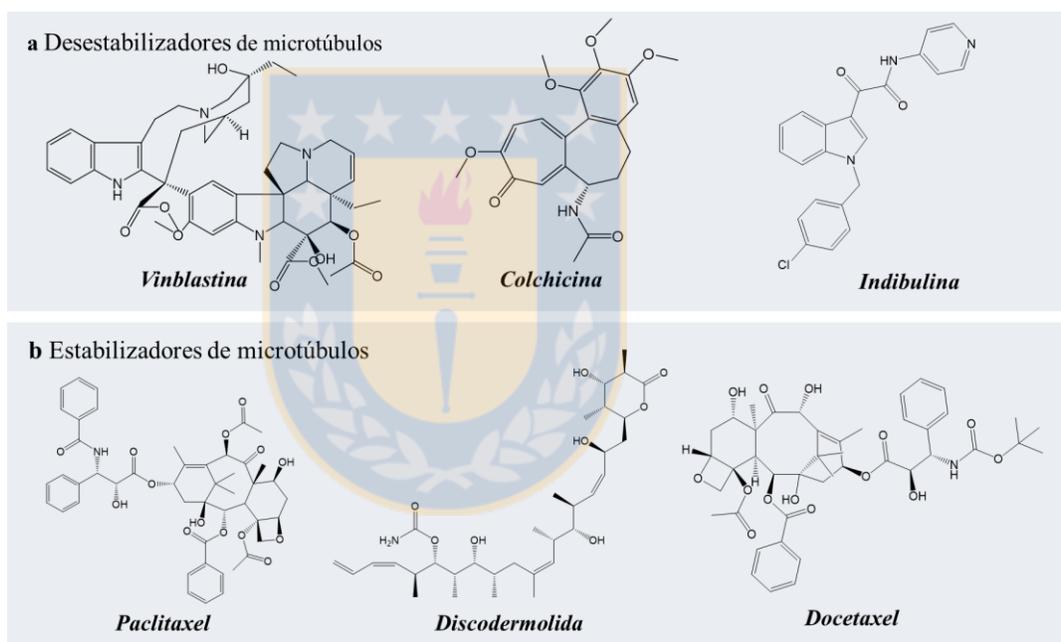


FIGURA 2. Efecto de las drogas del tipo antimitóticas. Cuando las células son expuestas a agentes antimitóticos como el paclitaxel, detienen la mitosis debido a la activación crónica del control del ensamblaje del huso mitótico. A continuación, estas siguen uno de los varios caminos. Las células pueden morir directamente en la mitosis, dividirse desigualmente o pueden salir de la mitosis sin dividirse. En este caso las células pueden morir en la interfase, detenerse en la interfase o continuar con ciclos celulares adicionales en ausencia de división.

Por otro lado, los compuestos estabilizantes de MT son agentes que favorecen la polimerización de tubulina a altas concentraciones y estos incluyen agentes que se asocian al sitio del paclitaxel en la β -tubulina (FIGURA 3.b): paclitaxel, docetaxel, patupilona, discodermolida, eleuterobinas, sarcodictinas, ciclostreptina, dictioestatina, y al sitio de unión de laulimalida, y pelorusido A. El primer agente antimitótico para el que se reportó este mecanismo de acción fue paclitaxel (Taxol®) [12,

13], compuesto actualmente aprobado para el tratamiento de varios tipos de cáncer. A partir de su descubrimiento e incorporación clínica, se inició una búsqueda de agentes antitumorales que operan por el mismo mecanismo interfiriendo con la función microtubular.



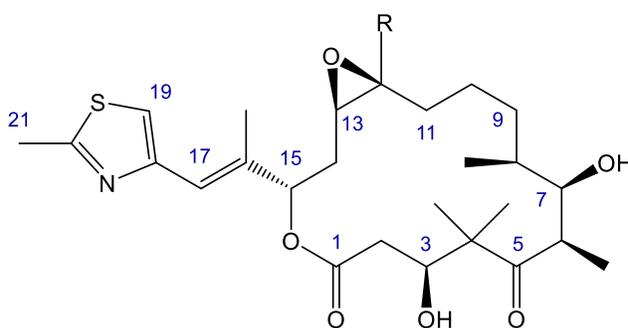
Elaboración propia

FIGURA 3. Estructuras de compuestos que se asocian a tubulina; a) Desestabilizantes y b) Estabilizantes de los MT.

1.2 Epotilonas

Algunos de los agentes antitumorales más activos, tales como los taxanos, han sido difíciles de desarrollar debido a la escasez de sus fuentes naturales[14]. Dentro de los compuestos más promisorios para el desarrollo de nuevos agentes antitumorales con propiedades análogas al taxol se encuentran las epotilonas, compuestos macrocíclicos de origen natural, descubiertos como metabolitos secundarios de la mixobacteria *Sorangium cellulosum* [15], y con reconocidas propiedades antitumorales. Las epotilonas nativas A (EPA) y B (EPB) (FIGURA 4) comparten la misma estructura a excepción de un grupo metilo adicional en C12 de la EPB, e inducen la polimerización de tubulina *in vitro* en ausencia de cualquier proteína de asociación a MT y GTP. La EPB es un promotor de la polimerización más potente que la EPA o el taxol[16]. A diferencia del taxol las epotilonas han demostrado inhibir el crecimiento de células que sobre expresan P-glicoproteína lo que indica que estos compuestos podrían ser útiles para el tratamiento de tumores resistentes a múltiples fármacos. Las epotilonas son significativamente más solubles en agua que los taxanos, por lo que su

uso en formulaciones médicas acarrearía menos problemas que estos, disminuyendo los efectos secundarios de la droga. Este perfil *in vitro* hace de las epotilonas compuestos con atractivas propiedades en comparación a otros medicamentos utilizados en el tratamiento de cáncer. Diversos estudios clínicos de epotilonas (ixabepilona, BMS-310705, patupilona, KOS-862, y sagopilona), han demostrado los avances de este tipo de compuestos en un espectro relativamente amplio de acción, incluyendo el tratamiento de cáncer de pulmón, ovarios, mama y de linfomas, entre otros, estimulándose la síntesis de una gran cantidad de derivados de epotilonas en la búsqueda de nuevos fármacos [17, 18].

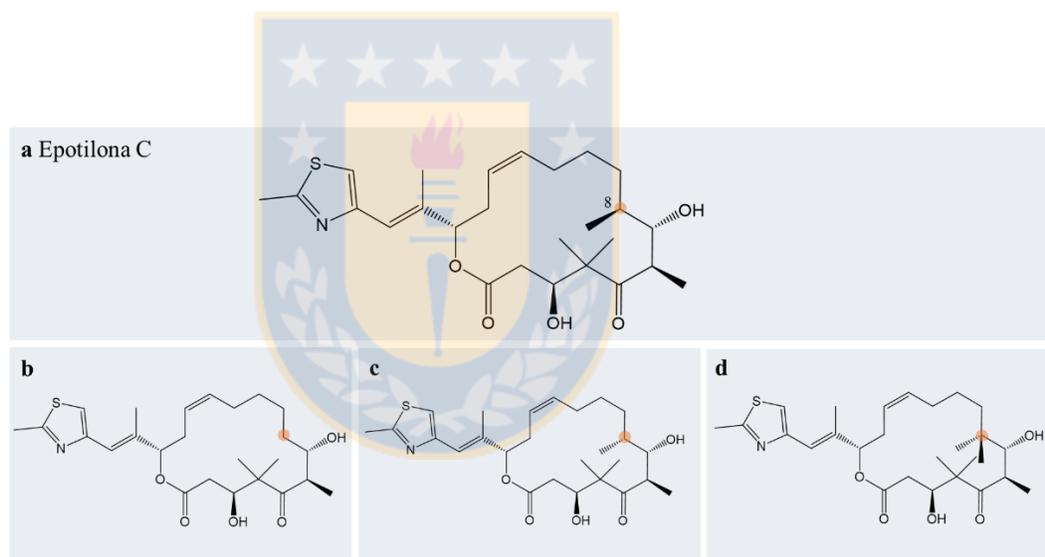


Elaboración propia

FIGURA 4. Estructura de las epotilonas, R=H en EPA y R=CH₃ en EPB.

Los primeros estudios sobre las relaciones estructura-actividad de epotilonas se centraron en la región del epóxido en C12-C13. Los resultados de estos indican que las modificaciones en esa región afectan la actividad estabilizante de MT. Esto queda demostrado en las epotilonas nativas A y B donde la adición de grupo metilo en C12 en la EPB otorga un aumento considerable en potencia en la inducción de la polimerización de tubulina *in vitro* en comparación a la EPA o el paclitaxel. Sin embargo, se ha observado que la presencia del anillo epóxido en C12-13 no es requerido, debido a que las desoxiepotilonas (epotilona C y epotilona D) que carecen del epóxido son potentes estabilizadores de MT. Por otro lado, el grupo liderado por Rubén Buey [19] determinó que la epimerización del C15 y C13 genera compuestos de baja afinidad por la tubulina. Además, se determinó que el cambio en la cadena lateral de tiazol por piridina tiene un efecto favorable en EPA, pero que ocurre lo contrario en EPB. Además, se sabe que la deshidroxilación en C3-OH, metilación del C12 y la desmetilación, epimerización y dimetilación del C8, producen cambios significativos en la actividad biológica de las epotilonas. En el caso de la epotilona C (FIGURA 5.a) que posee un 72% de actividad de polimerización de

tubulina (%TP), su actividad se ve drásticamente reducida debido a modificaciones en C8, obteniendo actividades de 23, 11 y 2% como consecuencia de la desmetilación (FIGURA 5.b), epimerización (FIGURA 5.c) y dimetilación (FIGURA 5.d) respectivamente. De manera similar la deshidroxilación en C3-OH produce la inactividad de la epotilona modificada según lo reportado en bibliografía[20, 21].



Elaboración propia

FIGURA 5. a) Estructura de la epotilona C, y de sus análogos inactivos con modificaciones en C8; b) análogo desmetilado, c) epimerizado y d) dimetilado.

Es evidente entonces que se producen importantes cambios en la actividad de la epotilona como resultado de pequeñas modificaciones estructurales, sin embargo, aún se desconoce el origen de dicha pérdida

de actividad. Una hipótesis es que las modificaciones estructurales debilitan la interacción con tubulina por pérdida de la conformación que adopta la epotilona en el sitio de unión. El hecho de que la actividad presentada por las epotilonas sea tan susceptible a modificaciones es una desventaja para efectos de continuar con la síntesis de análogos potencialmente activos. En este sentido, la búsqueda de otros compuestos que compartan el modo de asociación de las epotilonas es de gran relevancia en el diseño de nuevos fármacos.

1.3 Diseño racional de fármacos. *Screening Virtual*

Las estrategias convencionales en el diseño de fármacos se basan en la síntesis y ensayos de actividad para una gran cantidad de sustancias, sobre la base de modificaciones estructurales de compuestos de actividad biológica conocida. Una de las dificultades de este tipo de estrategia es que, tras extensos y costosos procesos de desarrollo, sólo unos pocos compuestos resultan ser efectivos para el tratamiento de una cierta enfermedad. Como respuesta a este problema surgió el diseño racional de fármacos, donde la utilización de herramientas

computacionales ha proporcionado mejoras en tiempo y costo en la obtención de posibles fármacos y han sido cruciales no sólo para predecir la potencialidad de nuevos fármacos, sino también como estrategia auxiliar para comprender sus mecanismos de acción farmacológica.

El *Screening Virtual* (SV) es una de las técnicas bioinformáticas de mayor importancia en el actual diseño racional fármacos. El SV permite identificar moléculas potencialmente activas (*hits*) frente a un determinado receptor a partir del análisis de bases de datos o colecciones virtuales de estructuras químicas[22–25]. A continuación, estos compuestos *hits* suelen ser sometidos a una refinación para obtener una estructura o una serie de estructuras activas (*leads*), que son el punto de partida para el desarrollo de nuevas drogas. La disminución del costo y tiempo en la obtención de posible nuevos fármacos convierten al SV en una alternativa ventajosa para la búsqueda de nuevos compuestos que emulen el mecanismo de acción de las epotilonas en su asociación a la proteína tubulina. Para ello es imprescindible identificar un modelo de asociación epotilona-tubulina que proporcione información valiosa

acerca de la unión del ligando con el receptor y que permita realizar una correcta búsqueda de nuevos compuestos.

1.4 Modelos de asociación epotilona-tubulina

Las investigaciones realizadas sobre la asociación epotilona-tubulina han demostrado que la interacción ocurre en un segmento flexible de la proteína capaz de albergar epotilonas, como también a otros fármacos, a pesar de ser una zona altamente expuesta al medio. No obstante, todavía existen controversias con relación a los detalles de dicha asociación. Algunos de los modelos publicados hasta la fecha presentan significativas discrepancias y sólo se han basado en la interacción de las epotilonas A y B con tubulina. El grupo liderado por T. Carlomagno [26, 27], publicó datos estructurales del complejo EPA-tubulina obtenido por RMN, señalando que el anillo tiazol de la epotilona interacciona con el anillo aromático del residuo His227 de la tubulina, mientras que el grupo C7-OH interacciona con los residuos Thr274 y Arg282, bloqueando la cadena lateral del residuo Arg282, que forma un enlace de hidrógeno con la cadena lateral del residuo Thr274 (FIGURA

6). Además, el residuo Arg276 de la estructura proteica interacciona con el segmento hidrofóbico C15-C18 de la cadena lateral de la epotilona, y con el anillo tiazol de la epotilona [28].

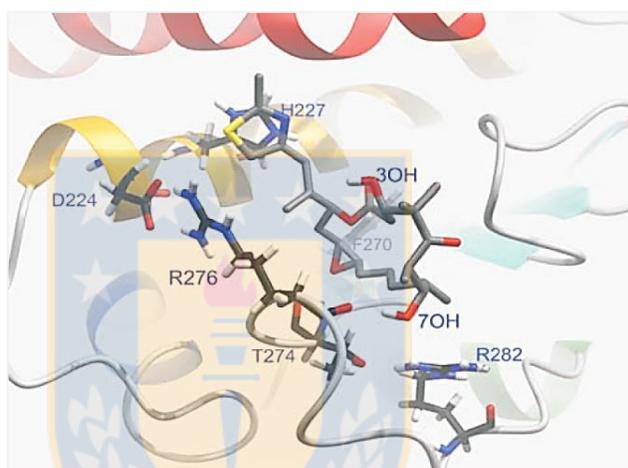


FIGURA 6. Representación del sitio de unión de la EPA con la tubulina del complejo obtenido mediante RMN (color rojo: hélice H1, amarillo: H7 hélice)[26].

Un año más tarde, Nettles y col [29] propuso otro modelo de asociación para el complejo EPA-tubulina obtenido a partir de cristalografía electrónica. En este modelo se encontró que la epotilona unida a la tubulina se estabilizaba debido a que los grupos C1-CO, C3-OH, C5-CO y C7-OH posicionados en un costado del macrociclo del ligando,

participaban en una red de contactos con los residuos Thr274, Arg276 y Arg282. Además, el nitrógeno del anillo tiazol serviría como aceptor de protones del residuo His227. Las interacciones restantes en el modelo ligando-proteína son principalmente hidrofóbicas, originándose desde el C3 al C11 (FIGURA 7).

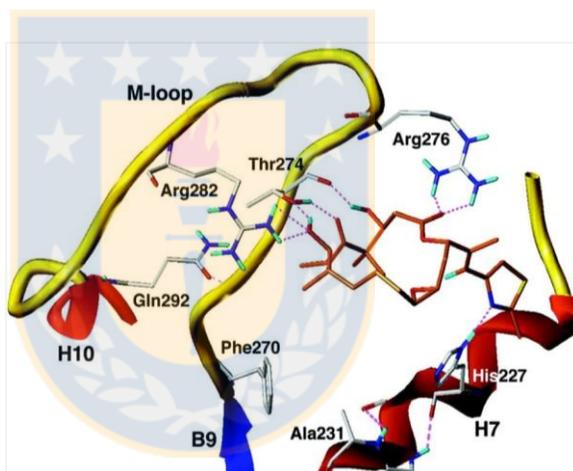


FIGURA 7. Representación del sitio de unión de la EPA con la tubulina. Los enlaces de hidrógeno de la EPA con los diferentes residuos de β -tubulina se representan en líneas discontinuas [29].

La mayor crítica hacia la estructura del complejo EPA-tubulina reportada por Nettles, es que la conformación que adopta la epotilona en el complejo difiere significativamente de las conformaciones del

ligando accesibles en disolución[30]. En particular, el epóxido del macrociclo en el complejo de Nettles se encuentra orientado en una dirección totalmente contraria a lo propuesto en el modelo de Carlomagno, que sí es consistente con los datos reportados para la conformación de las epotilonas en disolución.

Casi diez años más tarde, Prota[31] reportó una estructura cristalográfica de alta resolución del complejo entre $\alpha\beta$ -tubulina, la proteína RB3-estamina, y tubulina tirosina ligasa en presencia de EPA. El modo de asociación de EPA en el complejo difiere de la propuesta en el modelo de Nettles, pero se asemeja al modelo derivado de RMN. De acuerdo con esta nueva estructura, el ligando se une en el sitio del taxol de β -tubulina, e induce la estructuración de la M-loop en una hélice corta. Además, el O-1, C3-OH, C7-OH, y el átomo de nitrógeno de la cadena lateral de tiazol forman enlaces hidrógeno con los residuos Thr276, Gln281 y Asp226 de β -tubulina, respectivamente (FIGURA 8). En cuanto a la EPB, no existe información cristalográfica acerca de la estructura de este ligando en un complejo de la tubulina, sin embargo, en un informe, Díaz y col[32]. han estudiado el modo de unión de las

epotilonas A y B a la tubulina y los MT usando técnicas de RMN, mostrando que ambos ligandos adoptan una conformación en el complejo que es similar a la estructura de rayos X encontrado de EPA en el complejo con $\alpha\beta$ -tubulina de *Prota*. Además, este estudio reveló que la estructuración de la M-loop en la tubulina se produce en la asociación con epotilonas.

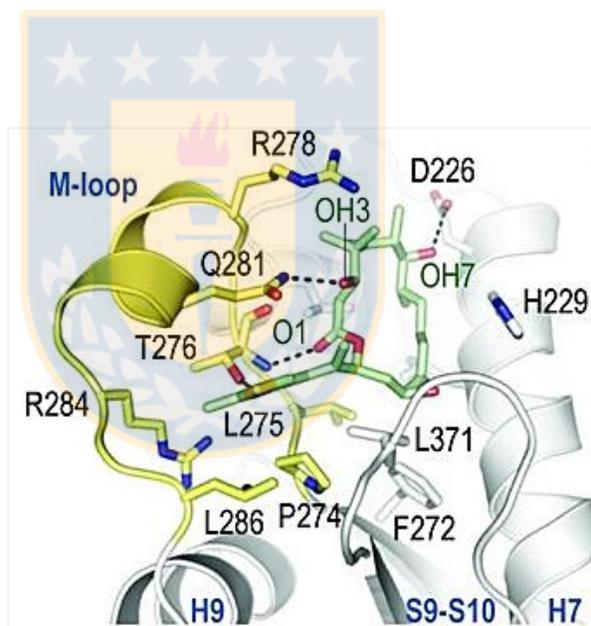


FIGURA 8. Interacciones relevantes de la asociación EPA-tubulina reportada en el modelo de *Prota*. Las abreviaciones de una letra de los aminoácidos son los siguientes; A, Ala; C, Cys; D, Asp; E, Glu; F, Phe; G, Gly; H, His; I, Ile; K, Lys; L, Leu; M, Met; N, Asn; P, Pro; Q, Gln; R, Arg; S, Ser; T, Thr; V, Val; W, Trp; y Y, Tyr[31].

La información reportada con relación al complejo epotilona-tubulina constituye una base para continuar con el estudio del modo de unión en este tipo de sistemas. Disponer de un modelo de interacción a nivel molecular para epotilonas es de gran relevancia, no sólo para dar cuenta de su actividad antitumoral, sino también para diseñar nuevos fármacos que imiten dicha interacción, y que, por lo tanto, posean propiedades farmacológicas similares.

En este trabajo tesis se propuso obtener un modelo de asociación epotilona-tubulina mediante Dinámica Molecular(DM), para ser utilizado en la búsqueda de compuestos con potencial actividad antitumoral mediante SV. Para ello se utilizó la estructura de Prota[31] como modelo de partida de tubulina y un conjunto de 20 epotilonas de distinta actividad para estudiar complejos ligando-receptor mediante DM. A partir de estos estudios se identificaron los residuos proteicos responsables de la asociación y se evaluó la existencia de diferencias conformacionales significativas entre los complejos formados por epotilonas activas e inactivas, a fin de racionalizar el efecto de las modificaciones estructurales en la actividad de dichos compuestos. Los

modelos de asociación fueron validados comparando la información obtenida con datos experimentales reportados en bibliografía. Una vez obtenido y validado el modelo de asociación tubulina-ligando, se utilizó SV para identificar nuevos compuestos con potenciales propiedades anticancerígenas. De los compuestos mejor evaluados fueron seleccionados 12, los cuales fueron sometidos a ensayos *in vitro* de actividad biológica determinada como actividad de polimerización de tubulina, siguiendo protocolos previamente reportados.



2. HIPÓTESIS

En la presente tesis se propuso aplicar un conjunto de técnicas bioinformáticas para elucidar el modo de interacción epotilona-tubulina y para utilizar dicho modelo en la búsqueda de nuevos fármacos con potencial actividad antitumoral. Las hipótesis que sustentaron este trabajo de tesis fueron las siguientes:

Existe una conformación bioactiva para epotilonas activas que maximiza las interacciones presentes en el complejo epotilona-tubulina y que no puede ser adoptada por epotilonas inactivas.

La formación del complejo epotilona-tubulina produce cambios conformacionales en la estructura proteica como resultado de la asociación.

La identificación de los residuos de tubulina que ejercen mayor influencia en la asociación de epotilonas, permite el diseño de nuevos compuestos con potencial actividad antitumoral.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Identificar compuestos con potencial actividad antitumoral que compartan el mecanismo de acción de epotilonas activas, a partir de un estudio bioinformático del modelo de asociación epotilona-tubulina.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar un modelo de asociación epotilona-tubulina mediante DM, que reproduzca tendencias experimentales de energía libre de asociación, y efecto de mutaciones en la actividad de epotilonas.
- Seleccionar candidatos potencialmente activos que reproduzcan las interacciones del modelo epotilona-tubulina mediante SV.
- Evaluar la actividad de polimerización de tubulina *in vitro* para un conjunto limitado de candidatos seleccionados tras SV.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Dinámica Molecular

4.1.1 Construcción de Modelos

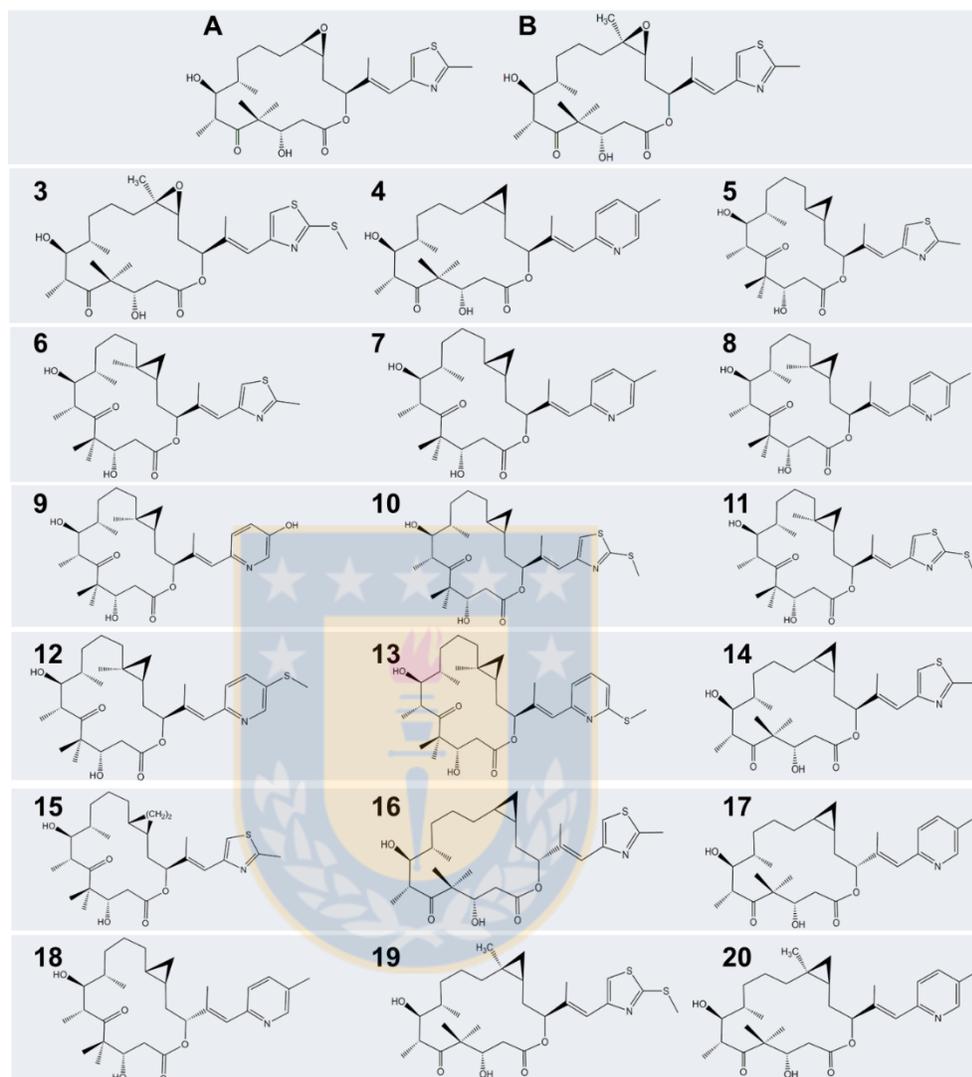
La estructura cristalográfica del complejo tubulina-estatmina-TTL-EPA de resolución 2.30 Å (PDB 4I50) obtenida de la base de datos *Protein Data Bank* [33], fue utilizada como modelo de partida para la construcción de los sistemas en estudio considerando el dímero de tubulina. Estos sistemas fueron creados con la herramienta xLeap del programa AMBER 12[34].

4.1.1.1. Epotilonas

Para el desarrollo de esta tesis se realizó una selección de epotilonas para las cuales existen datos experimentales y que poseen modificaciones estructurales consideradas relevantes en la actividad polimerizante de estos compuestos[19] (FIGURA 9). Las coordenadas

iniciales de los derivados de las epotilonas nativas fueron construidos a partir de la estructura de la EPA con el programa GaussianView05[35] y fueron optimizadas a un nivel semiempírico PM6, empleando el programa Gaussian 03[36]. Las cargas atómicas RESP fueron obtenidas mediante cálculos químicos cuánticos del tipo HF/6-31G* empleando el programa Gaussian 03 y el módulo Antechamber[37] del paquete AmberTools 12. Los parámetros de las epotilonas se obtuvieron del campo de fuerza GAFF [38].





Elaboración propia

FIGURA 9. Epotilonas nativas (A y B) y derivados estudiados en esta tesis.

4.1.1.2. Tubulina Nativa

Las coordenadas iniciales de $\alpha\beta$ -tubulina fueron tomadas de la estructura de PDB 4I50. Los estados de protonación de todos los residuos ionizables se establecieron a pH 7.4, utilizando el servidor web PROPKA 3.1. que permite la predicción de pKa de proteínas, basado sobre los efectos de la desolvatación de residuos aminoácidos y las interacciones intra-proteína [39, 40]. De acuerdo a los resultados obtenidos, seis residuos aminoácidos catiónicos (His37, His61, His139, Lys166, His192 y His309) y tres residuos aniónicos (Glu183, Glu200 y Asp392) están protonados y se encuentran en la proximidad del sitio activo correspondiente a EPA en la estructura del complejo PDB 4I50. A continuación, la estructura fue solvatada en una caja periódica de tipo paralelepípeda de agua explícita con moléculas de agua TIP3P extendiéndose 10 Å desde la proteína hacia todos los lados. Para la neutralización del sistema se añadieron iones Na⁺.

4.1.1.3. Tubulina Mutada

La estructura de $\alpha\beta$ -tubulina mutada se construyó a partir de la tubulina nativa, modificando los residuos seleccionados con la herramienta de modelado *Mutator Plugin* versión 1.3, implementada en VMD 1.9[41]. Para el estudio fueron consideradas cuatro mutaciones puntuales Phe272Val, Thr276Ile, Arg284Gln y Gln294Glu. A continuación, fueron establecidos los estados de protonación de todos los residuos ionizables a pH 7.4 el servidor web PROPKA 3.1, del mismo modo que el caso de la tubulina nativa. En total se protonaron 9 residuos. Por último, el sistema fue solvatado en una caja periódica de tipo paralelepípeda de agua explícita con moléculas tipo TIP3P extendiéndose 10 Å desde la proteína hacia los lados. Para la neutralización del sistema se añadieron iones Na⁺.

4.1.1.4. Complejos Tubulina-Epotilona

La estructura del complejo epotilona-tubulina, se obtuvo a partir de 4I50. Para obtener modelos iniciales, la estructura optimizada de cada epotilona fue localizada en el sitio de interacción, de manera tal de alcanzar la máxima superposición entre átomos correspondientes con la estructura cristalográfica de la EPA en 4I50. Luego, fueron establecidos los estados de protonación con el servidor web PROPKA a pH 7.4. y las estructuras de cada uno de los 20 complejos epotilona-tubulina fueron solvatadas en cajas periódicas paralelepípedas de agua TIP3P extendiéndose 10 Å desde la proteína hacia los lados. Para la neutralización del sistema se añadieron iones Na⁺.

4.1.2 Parámetros de Simulación

Los archivos de topologías (prmtop) y coordinadas (inpcrd) necesarios para la simulación se crearon con el módulo xLeap del programa AMBER 12. Las simulaciones fueron realizadas usando el módulo

Sander del programa AMBER 12. El método PME (Particle Mesh Ewald method) con un cutoff de 10 Å fue aplicado para interacciones electrostáticas de largo alcance. El termostato de Langevin fue utilizado en las dinámicas moleculares para controlar la temperatura. El algoritmo SHAKE fue utilizado para limitar las distancias de enlace entre átomos pesados y de hidrógeno. Antes de las dinámicas de registro, se realizaron procesos de minimización (25000 pasos; 1 paso equivale a 2 ps), calentamiento (a los 300 K, temperatura inicial: 25000 pasos, luego se aumentó la temperatura hasta los 400 K realizando un incremento cada 10 K con 10000 pasos y a los 400 K, temperatura final: 100000 pasos), enfriamiento (desde los 400 K disminuyendo cada 10 K con 10000 pasos, hasta llegar a la temperatura de equilibrio) y equilibrio a 300K con timestep de 2 fs (5000000 pasos; equivalente a 10 ns). En los sistemas de epotilonas libres, tubulina libre y complejos epotilona-tubulina la etapa de registro fue realizada con un tiempo de simulación de 20 ns, a una temperatura constante de 300 K, a una presión de 1 bar, considerando un colectivo NPT para asegurarnos obtener un adecuado muestreo conformacional. Todas las simulaciones fueron realizadas con el programa AMBER 12 utilizando el campo de fuerza

AMBERFF99SB[42]. Una vez finalizadas las dinámicas se llevó a cabo un estudio conformacional, comparando las preferencias conformacionales de la proteína y ligando, tanto libres como asociados, considerando epotilonas con distintos grados de actividad biológica.

4.1.3 Análisis de Dinámica Molecular

Se analizaron las trayectorias de DM mediante cálculos de RMSD (Root-Mean-Square Deviation) y RMSF (Root Mean Square Fluctuation). El RMSD corresponde a la desviación de la raíz cuadrática media y es un valor que indica la variación existente en una superposición de un conjunto de coordenadas atómicas como resultado de un alineamiento estructural. Por lo tanto, el RMSD indica el grado de divergencia entre estructuras alineadas y cuanto menor sea el valor de RMSD al realizar dicha comparación estructural mayor es la similitud de las mismas. La herramienta `g_rmsd` perteneciente a GROMACS [43], fue utilizada para obtener RMSD de epotilonas y proteínas.

RMSF es una medida de la flexibilidad local de una estructura. A partir de una simulación de dinámica molecular, el RMSF del átomo o de un residuo da cuenta del grado de fluctuación de las coordenadas de dicho átomo respecto a su promedio temporal. Los cálculos fueron realizados utilizando la herramienta `g_rmsf` perteneciente a GROMACS para obtener RMSF en epotilonas y residuos de aminoácidos

El volumen de la cavidad del sitio activo de las estructuras de los complejos epotilona-tubulina fue determinado por la herramienta CASTp, utilizando estructuras representativas para cada complejo. CASTp (<http://cast.engr.uic.edu>) es una herramienta online que localiza y realiza medida de cavidades de estructuras 3D de proteínas [44].

4.1.3.1. Análisis Conformacional de Epotilonas

Se realizó análisis conformacional de epotilonas. Para esto fueron extraídas 2000 estructuras de la dinámica de producción de manera de evaluar las preferencias conformacionales de epotilonas libres y en asociación a tubulina. Las evoluciones temporales de 19 ángulos diedros

fueron extraídas desde la dinámica de producción como descriptores conformacionales del macrociclo. Cada ángulo de torsión fue representado por el símbolo ω y subíndices correspondientes al primer y último átomo de la cadena considerado en el diedro. Por lo tanto ω_{1-4} indica que el ángulo diedro está formado por la cadena de átomos C1-C2-C3-C4, de acuerdo a la numeración señalada en la FIGURA 4. Complementariamente fueron construidos histogramas polares para representar las distribuciones de los ángulos a lo largo de la dinámica de producción para cada torsión usando MATLAB 7.0. De las 19 torsiones analizadas se consideraron 16 pertenecientes solo al macrociclo de la estructura de las epotilonas para realizar una clusterización de conformaciones a lo largo de cada trayectoria con el programa VEGAZZ [45, 46].

4.1.3.2. Modos de Asociación Epotilona-Tubulina

Las estructuras de complejos epotilona-tubulina obtenidas de dinámicas de producción de 20 ns fueron utilizadas para identificar los residuos

claves que constituyen el sitio de asociación para cada ligando. Los residuos de tubulina fueron considerados ser parte del sitio de asociación si estos se encontraban localizados a distancias menores de 4.0 Å desde el ligando en más de un 50% de los *frames* correspondientes a la dinámica de producción. Además, fueron determinados valores promedios de energías de interacción de tipo electrostáticas (E_{elec}) y van der Waals (E_{vdW}) entre residuos pertenecientes al sitio activo y eptilonas, a lo largo de la dinámica de producción, de manera de dar cuenta de los aspectos generales de la asociación eptilona-tubulina. Los cálculos de energías fueron realizados con el módulo *Energy Plugin* versión 1.4 de NAMD.

4.1.4 Energías Libres de Asociación

La estructura de los complejos eptilona-tubulina obtenidos por DM fueron utilizados para calcular energías libres mediante los métodos MM-PBSA y MM-GBSA[47, 48]. Para el cálculo se obtuvieron 800 *snapshots* a lo largo de la dinámica de producción y considerando igb 2 para el modelo Generalizado de Born. Las energías de asociación fueron

calculadas utilizando herramientas proporcionadas por AMBER 12. La energía libre de unión para la asociación proteína-ligando ($\Delta G_{unión}$) se estimó tomando la diferencia entre las energías de solvatación del complejo proteína-ligando (ΔG_{solv}^{PL}), de la proteína (ΔG_{solv}^P), del ligando (ΔG_{solv}^L) y la energía libre de formación del complejo en fase gas (ΔG_{gas}) (ecuación 1).

$$\Delta G_{unión} = \Delta G_{gas} - \Delta G_{solv}^{PL} - \Delta G_{solv}^P - \Delta G_{solv}^L \quad (1)$$



4.2 *Screening Virtual*

El SV realizado en esta tesis está basado en la estructura de la tubulina considerando la conformación proteica adoptada en el complejo con epotilona B. El protocolo de SV contempla pasos previos de preparación tanto de los ligandos a testear como del receptor. Luego de la preparación de los sistemas se ejecutó el *Docking* Molecular de manera de encontrar compuestos afines al receptor de interés.

4.2.1 Preparación de ligandos

4.2.1.1. Base de datos

Se realizó una búsqueda de base de datos de ligandos para su utilización en el SV. Dentro de estas se seleccionó la base de datos ZINC[49–51] ya que constituye una de las bases de datos con mayor repositorio de compuestos comercialmente disponibles para la realización de SV. ZINC actualmente tiene cerca de 23 millones de compuestos distribuidos en distintas librerías según ciertos criterios de selección, es así como encontramos compuestos del tipo *Fragment-Like*, *Lead-Like* y *Drug-Like*. Los compuestos de la librería *Fragment-Like* tienen masa molar menor o igual a 250 g/mol, poseen logP (Coeficiente de partición) menor o igual a 3.5 y un número de enlaces rotables menor o igual a 5. Los compuestos tipo *Lead-Like* poseen pesos moleculares entre 250 g/mol y 350 g/mol, poseen logP menor o igual a 3.5 y un número de enlaces rotables menor o igual a 5. Por último, los compuestos tipo *Drug-Like* poseen masa molar mayor o igual a 150 g/mol y menores o

iguales a 500 g/mol, poseen logP menor o igual a 5, un número de enlaces rotables menor o igual a 7, área de superficie polar menor a 150 Å², número de donantes de hidrógeno menor o igual a 5 y número de aceptores de hidrógeno menor o igual a 10. En esta tesis se trabajó con compuestos del tipo *Drug-Like*.

4.2.1.2. Selección de compuestos

Debido a que la librería *Drug-Like* posee aproximadamente 13 millones de compuestos se procedió a una filtración (selección) de manera de reducir el número de compuestos a testear de forma *in silico*. Para esto se consideró sólo compuestos con masa molar entre 300 g/mol y 500 g/mol y que tuvieran un área superficial polar entre 70 y 150 Å², obteniéndose de esta forma una librería filtrada de aproximadamente 7 millones de compuestos. Además, considerando el hecho de que compuestos de tipo anti-mitóticos que se asocian a la tubulina ya reconocidos como el taxol poseen un alto peso molecular (853.9 g/mol) se decidió considerar compuestos con peso molecular mayor a 500 g/mol que están fuera de las librerías señaladas en el apartado anterior. En

la base de datos ZINC es posible encontrar una librería de compuestos en donde no han sido aplicado filtros de exclusión, razón por la cual consta de más de 20 millones de compuestos y es posible encontrar ligandos de alto peso molecular. Es así como aplicando filtros de peso molecular fue posible obtener una librería adicional con 170769 compuestos de pesos moleculares entre 500 y 900 g/mol, para probar su afinidad a tubulina. Todos los filtros aplicados se realizaron con programas creados en lenguaje Python.

4.2.1.3. Asignación de cargas y obtención de archivos pdbqt

Considerando que las estructuras de los compuestos obtenidos desde ZINC conservan todos los hidrógenos debido a que fueron descargados en formato MOL2, no fue necesaria la adición de los mismos. Para la creación de los archivos PDBQT, necesarios para la realización de *Docking* Molecular con el programa Autodock Vina (VINA) [52], se adicionaron cargas atómicas parciales de tipo Gasteiger a todos los ligandos utilizando un programa escrito en Python.

4.2.1.4. Compuestos activos conocidos

Los agentes de asociación de tubulina Paclitaxel[53], EPA[54] y Docetaxel[55], conocidos por su potente actividad antimitótica fueron utilizados como controles positivos en la realización de *Docking* Molecular.

4.2.2 Preparación del receptor

Las coordenadas iniciales de la proteína fueron obtenidas de las simulaciones de DM de los complejos epotilona-tubulina. Los estados de protonación de todos los residuos ionizables se establecieron a pH 7.4, utilizando el servidor web PROPKA 3.1., como fue mencionado en el apartado de dinámica molecular. La adición de hidrógenos de la estructura proteica minimizada y equilibrada se realizó con la aplicación AutoDockTools 4 (ADT) de Autodock [56]. Una vez adicionados los hidrógenos se adicionaron las cargas atómicas parciales tipo gasteiger y la nomenclatura adecuada para cada tipo de átomo compatible con Autodock.

4.2.3 Parámetros *docking*

El programa AutoDock Vina (VINA) fue utilizado para los procedimientos de *Docking* Molecular. Fue establecido un tamaño de caja para el sitio activo de $21.56 \text{ \AA} \times 23.29 \text{ \AA} \times 15.64 \text{ \AA}$ con 0.375 \AA de espaciado ($55 \times 60 \times 40$ *grid points*), el cual abarca perfectamente el sitio de asociación de epotilonas previamente analizado. Además, se consideró una libre rotación de todos los enlaces de los compuestos con libertad conformacional, generación de 100 conformaciones para cada ligando y la utilización del Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA) en la ejecución del *Docking* Molecular.

4.2.4 *Docking*

El *Docking* molecular fue ejecutado con el programa VINA. Una vez terminado el *Docking* molecular, se realizó una inspección visual de los resultados, a fin de observar el grado de similitud existente entre las conformaciones generadas y las nativas de los sistemas tubulina-ligando con el fin de validar los resultados obtenidos.

4.2.5 Identificación de compuestos *hits*

De los resultados obtenidos del SV fueron seleccionados los 100,000 compuestos de mayor afinidad, según valores de *score* entregados por VINA. Luego este conjunto de ligandos fue agrupado según características estructurales y propiedades fisicoquímicas con el servidor online ChemMine tools[57]. Finalmente, se seleccionaron 12 compuestos candidatos o compuestos *hits* para realizar medidas experimentales de actividad de polimerización de tubulina *in vitro*.

4.3 Ensayos de polimerización

Los compuestos *hits* fueron sometidos a mediciones experimentales de actividad de polimerización de tubulina. Para ello, se emplearon protocolos espectrofotométricos previamente reportados en literatura[58], para tubulina libre y en asociación con los ligandos, bajo la supervisión del Dr. José Leonardo Guzmán en el Laboratorio de Fisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

4.3.1 Ensayos de polimerización de tubulina

Se estudió el efecto de los ligandos en la polimerización de la tubulina utilizando un kit de ensayo de polimerización de tubulina por fluorescencia (BK011P, Cytoskeleton, Denver, CO, USA). El taxol fue utilizado como un control positivo para compuestos del tipo estabilizantes de la polimerización de tubulina. Los compuestos *hits* seleccionados fueron testeados *in vitro* a una concentración final de 3 μM . La tubulina fue disuelta en el buffer 1 (80 mM PIPES, 2.0 mM MgCl_2 , 0.5 mM EGTA pH 6.9, 10 μM reportador fluorescente) suplementado con GTP 1.0 mM hasta una concentración de 10 mg/mL. A continuación, se preparó la mezcla de reacción de tubulina con 85 μL de la proteína en buffer 1-GTP, 243 μL de buffer 1, 4.4 μL de GTP 100 mM y 112 μL de buffer glicerol (80 mM PIPES, 2 mM MgCl_2 , 0.5 mM EGTA, 60% glicerol, pH 6.9), hasta una concentración final de tubulina 2 mg/mL (condiciones de ensayo estándar) y fue mantenida en hielo. Luego, 5 μL de los compuestos *hits* y de taxol (utilizado como control positivo) fueron pipeteados en 13 pocillos de la placa de 96 pocillos negra Corning Costar proporcionada en el kit. La placa debió ser

calentada previamente por 1 minuto a 37°C en el lector del espectrofluorimetro. La polimerización de la tubulina fue iniciada pipeteando 50 µL de la mezcla de reacción de tubulina anteriormente mencionada en los pocillos con los ligandos y monitoreada midiendo el cambio de fluorescencia (Ex: 360 nm, Em:420 nm). La fluorescencia fue medida utilizando el equipo NOVOSTAR multireader (BGM, Alemania).



5. ESTUDIO DE LA ASOCIACION DE TUBULINA CON EPOTILONAS A y B

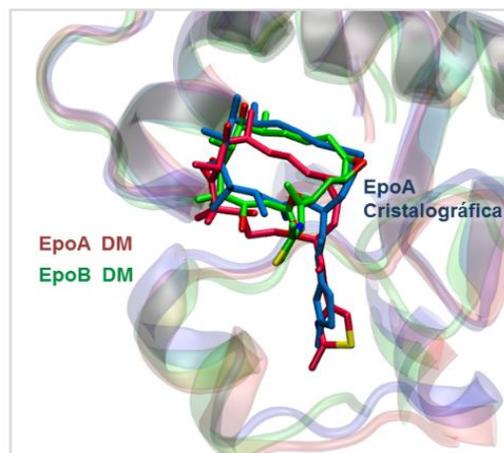
El modelo cristalográfico del complejo tubulina-estatmina-TTL-EPA de PDB 4I50 fue empleado como estructura de referencia para la realización de DM con epotilonas A y B. A partir de estas simulaciones se estudió la conformación de las epotilonas en los complejo mediante el análisis de ángulos diedros (TABLA 1), mostrando un alto nivel de consistencia con la información experimental de rayos X y RMN disponible para la conformación de las epotilonas en asociación a tubulina previamente reportado por Carlomagno y Canales[32], donde fueron utilizados experimentos TR-NOESY para evaluar las características conformacionales de las epotilonas nativas en asociación a MT, y los modelos ya mencionados de Carlomagno y Prota[26, 31]. Esto permitió validar el sistema utilizado como referencia. Complementariamente, fueron comparadas las estructuras representativas de los complejos de epotilonas nativas con el modelo cristalográfico del PDB 4I50 de manera de validar la parametrización y protocolos empleados en el desarrollo de esta tesis. Las estructuras obtenidas para las epotilonas en los complejos demostraron ser

coherentes con las descritas para estos sistemas. Durante las simulaciones, los ligandos se posicionan y orientan en el mismo lugar de asociación observado para la epotilona en el complejo cristalográfico. Además, la conformación del sitio activo de la proteína presenta gran similitud con el modelo obtenido por Prota[31], tal como se observa en la FIGURA 10.

TABLA 1. Ángulos diedros de las conformaciones de las epotilonas A y B en complejos con tubulina. Los valores calculados corresponden a los ángulos diedros de las estructuras representativas de los sistemas obtenidos por DM.

Ángulos Diedros	EPA	EPA	EPA	EPA	EPB	EPA	EPB
	Carlomagno [26]	Nettles [29]	Canales [32]	Prota [59]	Canales [32]		
C1C2C3C4	-152,5	92,6	-174,7	-167,2	174,3	-171,8	160,6
C2C3C4C5	-51,7	59,2	-58,6	-58,7	-61,9	-55,3	-68,9
C3C4C5C6	-43	-157,9	-74,6	-83,3	-52,0	-84,8	-32,0
C4C5C6C7	156,4	126,1	147,1	139,1	152,7	150,8	148,6
C5C6C7C8	-70	-152,2	-61,4	-60,0	-64,2	-61,6	-57,6
C6C7C8C9	-74,8	71,4	-68,2	-68,5	-74,8	-57,3	-88,9
C7C8C9C10	164,1	75,1	168,1	169,4	161,3	171,1	172,5
C8C9C10C11	-171,9	170,4	177,1	-151,9	170,3	-175,8	-175,2
C9C10C11C12	-178	68,0	170,9	-170,0	146,3	-179,6	100,0
C10C11C12C13	-129,2	85,6	-105,7	-126,6	-102,3	-123,1	-107,7
C11C12C13C14	4,1	-4,6	-2,8	0,4	-2,0	7,6	9,7
C12C13C14C15	76,3	-131,4	98,0	87,9	103,1	79,8	114,2
C13C14C15O1	-62,6	65,3	-75,4	-88,0	-63,3	-85,4	-66,6
C14C15O1C1	179,5	174,4	149,7	168,8	112,6	149,1	94,7
C15O1C1C2	176,3	-162,5	164,8	171,8	163,9	-175,9	174,5
O1C1C2C3	-124,3	-99,8	-47,1	-36,2	-55,2	-34,8	-62,6
C14C15C16C17	-129,7	90,4	-116,7	-147,1	-118,1	-120,9	45,0
C15C16C17C18	178,9	177,1	176,3	163,3	176,6	162,4	-161,0

Elaboración propia



Elaboración propia

FIGURA 10. Estructuras representativas de las epotilonas A y B en complejos con tubulina, obtenidas de las simulaciones de DM en comparación al modelo cristalográfico PDB 4I50 (EPA RMSD: 0.8797 Å, EPB RMSD: 2.6262 Å).

Por otro lado, fueron realizadas DM tomando como referencia la estructura de EPA en PDB 1TVK (FIGURA 11), y cuyos datos conformacionales del ligando se encuentran en la TABLA 1, columna 1. Los resultados indicaron que las DM basadas en PDB 1TVK presentan discrepancias con los resultados obtenidos de PDB 4I50 (FIGURA 12.a), y las simulaciones de complejos de epotilonas nativas derivadas de la propia estructura cristalográfica (FIGURA 12.b). Estos resultados avalan la correcta elección de la estructura de PDB 4I50 como referencia para la realización de las DM y el fuerte impacto que tiene la elección del modelo cristalográfico en los resultados obtenidos.

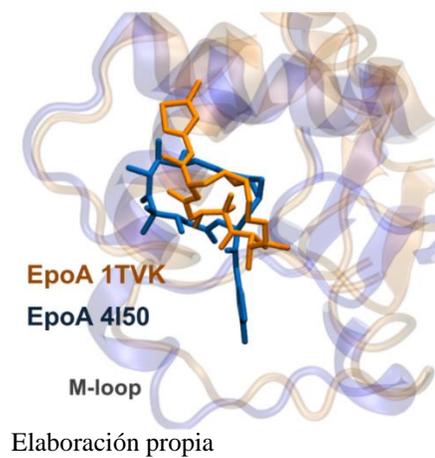


FIGURA 11. Comparación de las estructuras cristalográficas de PDB 1TVK y 4I50.

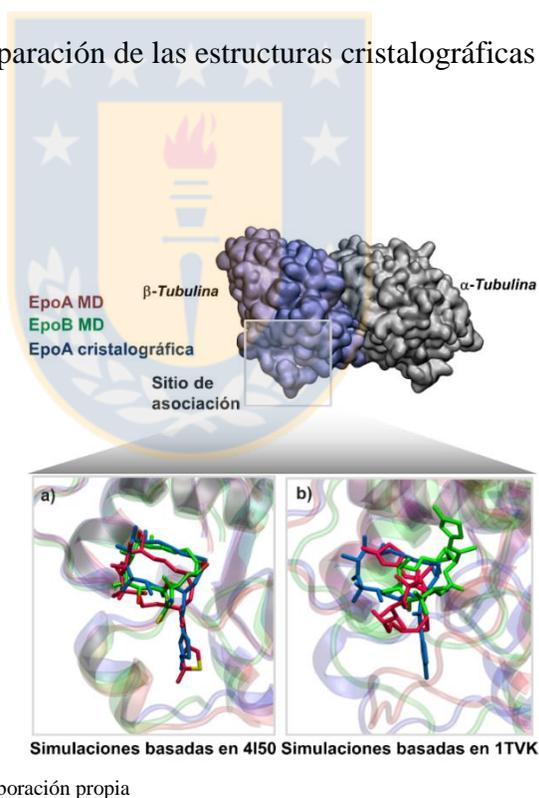


FIGURA 12. Estructuras representativas de las epotilonas A y B en complejos con tubulina, obtenidas de las simulaciones de DM en comparación al modelo cristalográfico PDB 1TVK.

5.1 Análisis conformacional de epotilonas nativas libres

Se obtuvieron histogramas polares para dar cuenta de la distribución de 16 ángulos diedros seleccionados (FIGURA 13) del macrociclo, utilizados como descriptores conformacionales, de las estructuras de las epotilonas a lo largo de las simulaciones de DM en solución acuosa. La FIGURA 14 muestra un histograma polar con las distribuciones de ángulos diedros para las epotilonas nativas libres analizadas, en el cual se incluyen también los valores de los ángulos diedros correspondientes a las estructuras de las epotilonas A y B libres cristalizadas reportados en literatura[54]. Las principales diferencias conformacionales entre las estructuras obtenidas de DM y las cristalizadas se observaron en la región C5-C10 correspondientes a los diedros ω_{2-5} , ω_{5-8} , ω_{6-9} y ω_{7-10} y en la cadena de lateral de tiazol (diedro ω_{14-18}), esto en el caso de EPA y en las regiones correspondientes a los diedros ω_{2-5} , ω_{5-8} , ω_{6-9} y ω_{14-18} del macrociclo y la cadena lateral, en EPB. Por otro lado, al comparar los resultados de las simulaciones de las epotilonas nativas A y B libres en solución, estos dan cuenta de un aumento de la flexibilidad de EPB en comparación con EPA, debido a que fue observado un espectro más

amplio de los valores para los ángulos diedros ω_{7-10} , ω_{9-12} , ω_{12-15} , ω_{14-1} y ω_{13-16} en EPB. Este resultado proporciona la primera evidencia cuantitativa con respecto al efecto de la metilación en C12 en las propiedades conformacionales de epotilonas.

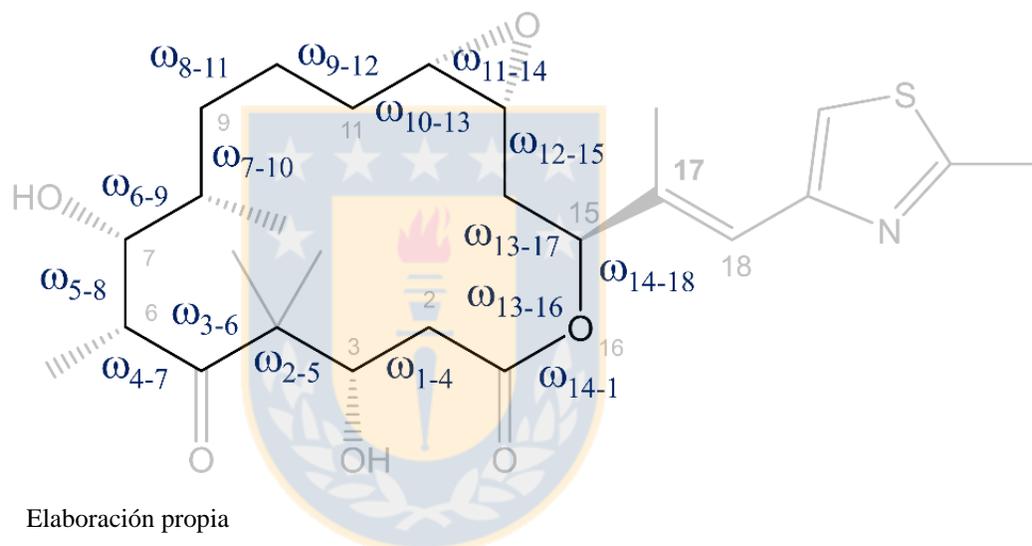
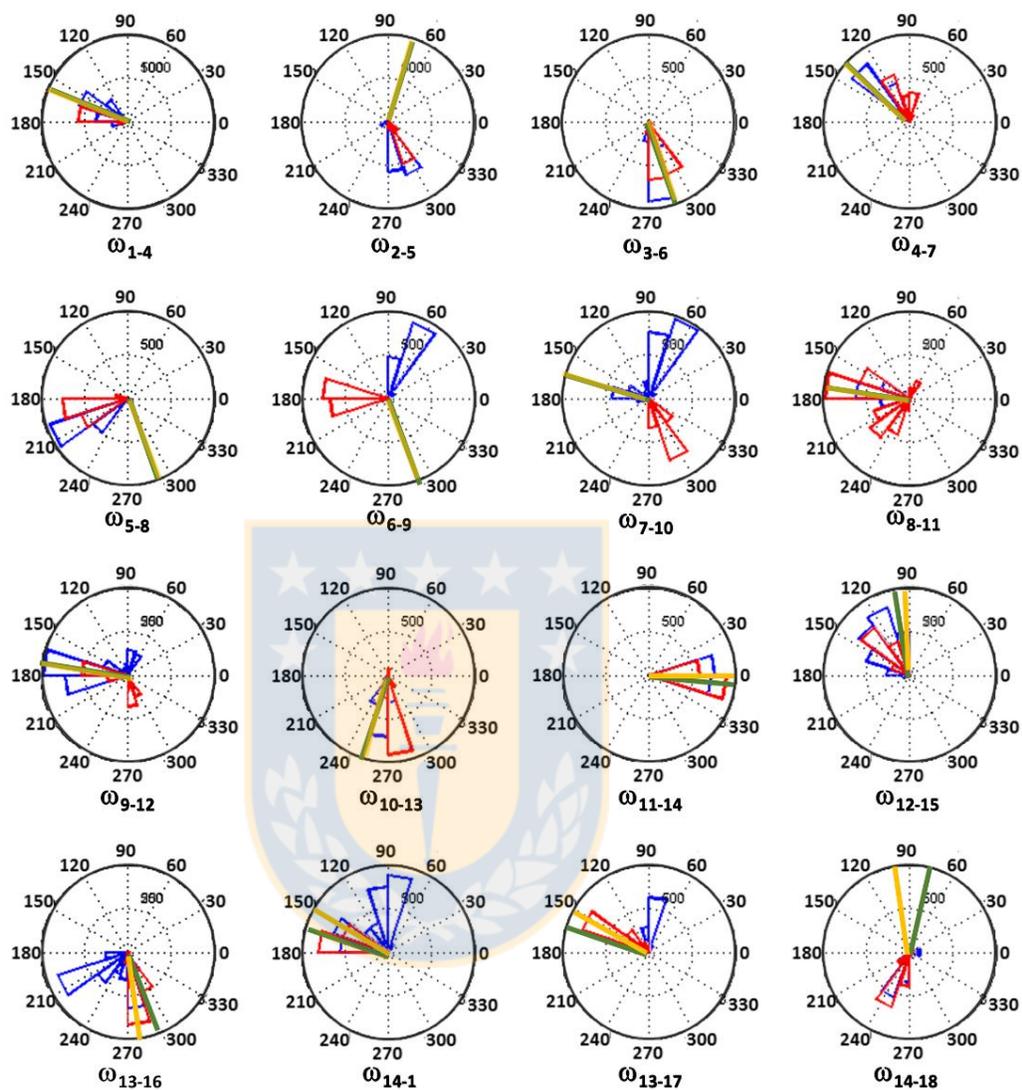


FIGURA 13. Ángulos diedros del macrociclo de las epotilonas considerados en el estudio.



Elaboración propia

FIGURA 14. Histograma polar para la distribución de 16 ángulos diedros utilizados como descriptores conformacionales en las estructuras de EPA (color rojo) y EPB (color azul) libres obtenidos de las simulaciones de dinámica de producción de 20ns en solución acuosa. Los ángulos diedros son reportados en grados. Las líneas verdes y amarillas indican los valores de ángulos reportados para las estructuras de las epotilonas A y B respectivamente, cristalizadas en metanol [54, 60].

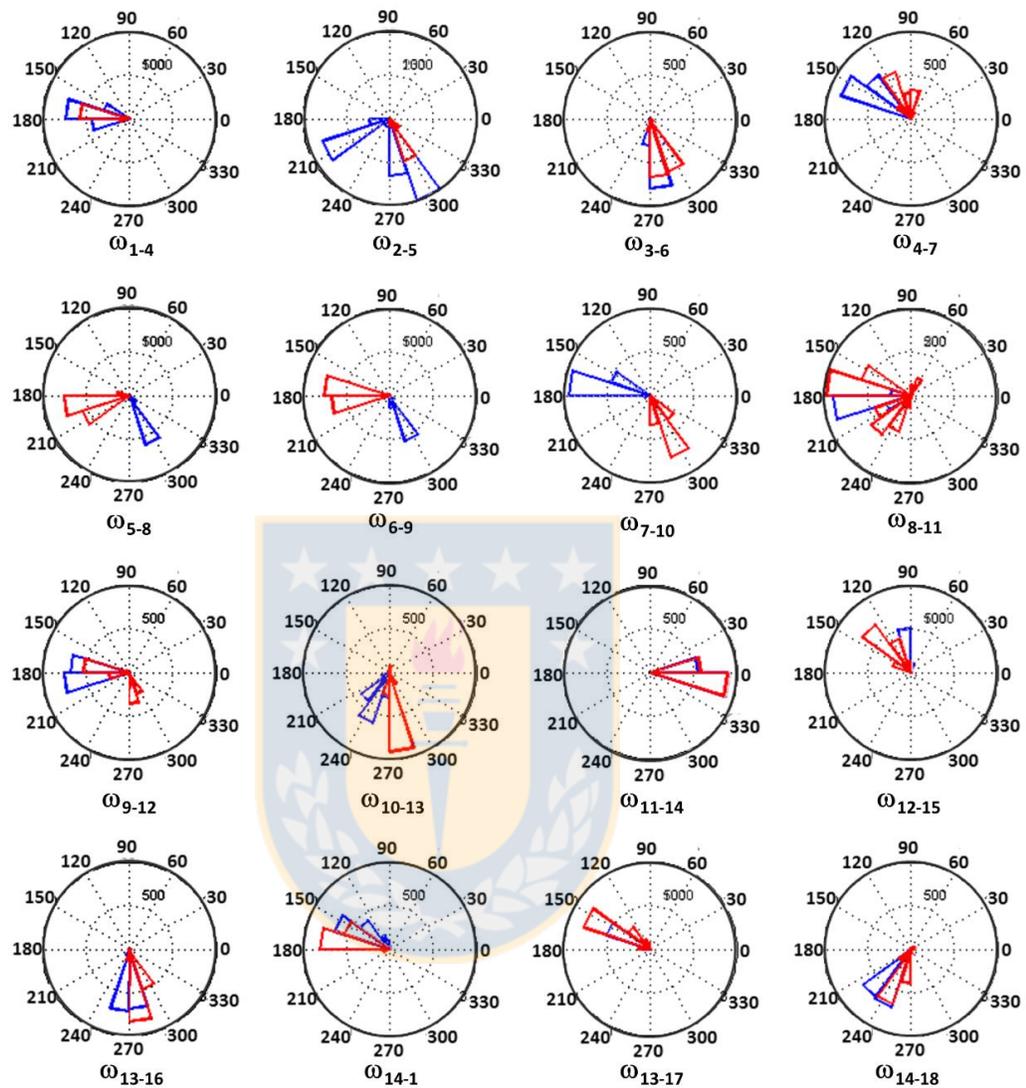
5.2 Análisis conformacional de epotilonas nativas en complejos con tubulina

Por otra parte, se obtuvo información estructural de los cambios conformacionales implicados en la asociación epotilona-tubulina. Las conformaciones de las epotilonas en asociación fueron extraídas de 2000 estructuras de la dinámica de producción y se analizaron en términos de las distribuciones de los 16 ángulos diedros al igual que en el caso de las DM de las epotilonas libres en solución. Los resultados muestran la existencia de reorganizaciones conformacionales de las epotilonas nativas como efecto de la asociación, lo que se evidencia por la marcada diferencia entre los perfiles conformacionales del ligando libre y en asociación a tubulina (FIGURAS 15-17). La conformación de la región C1-C5 está más restringida en la estructura de EPB en el complejo, pero los valores promedios correspondientes a los valores de los ángulos diedros no difieren significativamente de las torsiones observadas en el estado libre. Para EPA no se observó una restricción conformacional significativa en esta región como consecuencia de la asociación. En la región C6-C12 los perfiles determinados para los

ángulos diedros ω_{6-9} , ω_{7-10} y ω_{9-12} , difieren de las conformaciones obtenidas para el ligando libre, en ambas epotilonas. En el caso de ω_{6-9} una de las conformaciones predominantes aparece como consecuencia de la asociación a tubulina. Para el diedro ω_{7-10} , la estructura en asociación de EPB muestra dos rangos factibles, los cuales difieren del valor predicho para el ligando libre. Por otro lado, el diedro ω_{9-12} adopta dos posibles conformaciones una de las cuales corresponde a la torsión observada para el ligando libre y la segunda torsión parece ser consecuencia de la asociación. Estos resultados sugieren que la región C6-C12 de las epotilonas nativas es relevante para la asociación del ligando en el sitio activo puesto que se somete a un importante cambio conformacional al producirse la interacción. La región comprendida entre C12-C1 pareciera tener una reorganización conformacional producto la asociación, debido al cambio de los valores promedios de los diedros ω_{12-15} , ω_{13-16} , y ω_{14-1} los cuales presentan menores distribuciones que en el caso de la epotilona libre. Finalmente, la conformación de EPB complejada muestra una variación significativa en los diedros ω_{13-17} y ω_{14-18} que describen la orientación de la cadena lateral de tiazol, de una manera similar que en EPA. Estos resultados de

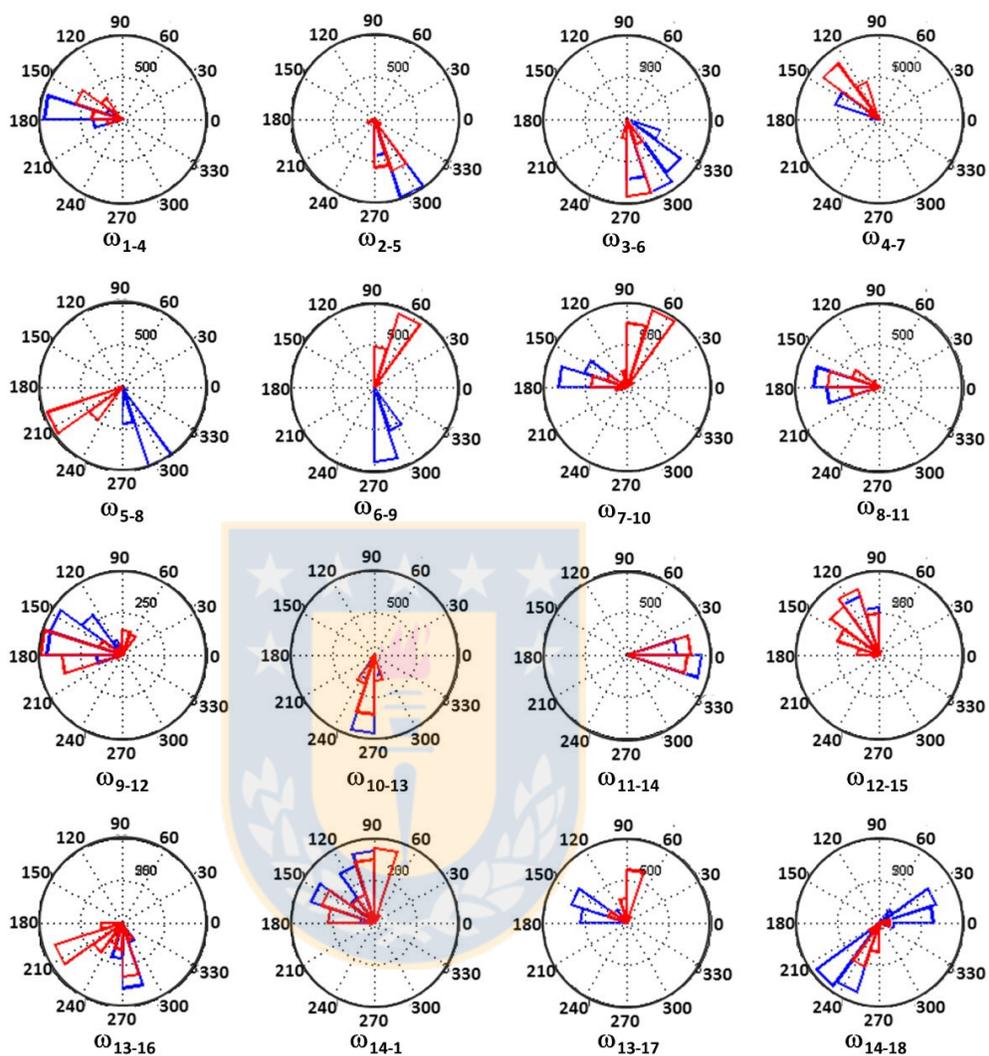
DM sugieren que dicha cadena lateral participa de interacciones relevantes en el sitio activo y que coinciden con información experimental que da cuenta de los principales cambios en la actividad de las epotilonas como consecuencia de modificaciones estructurales en esta región[61]. En cuanto al anillo epóxido, este mantiene su conformación *exo* con respecto al macrociclo en la epotilona asociada a tubulina tal como se encontró en la epotilona libre.





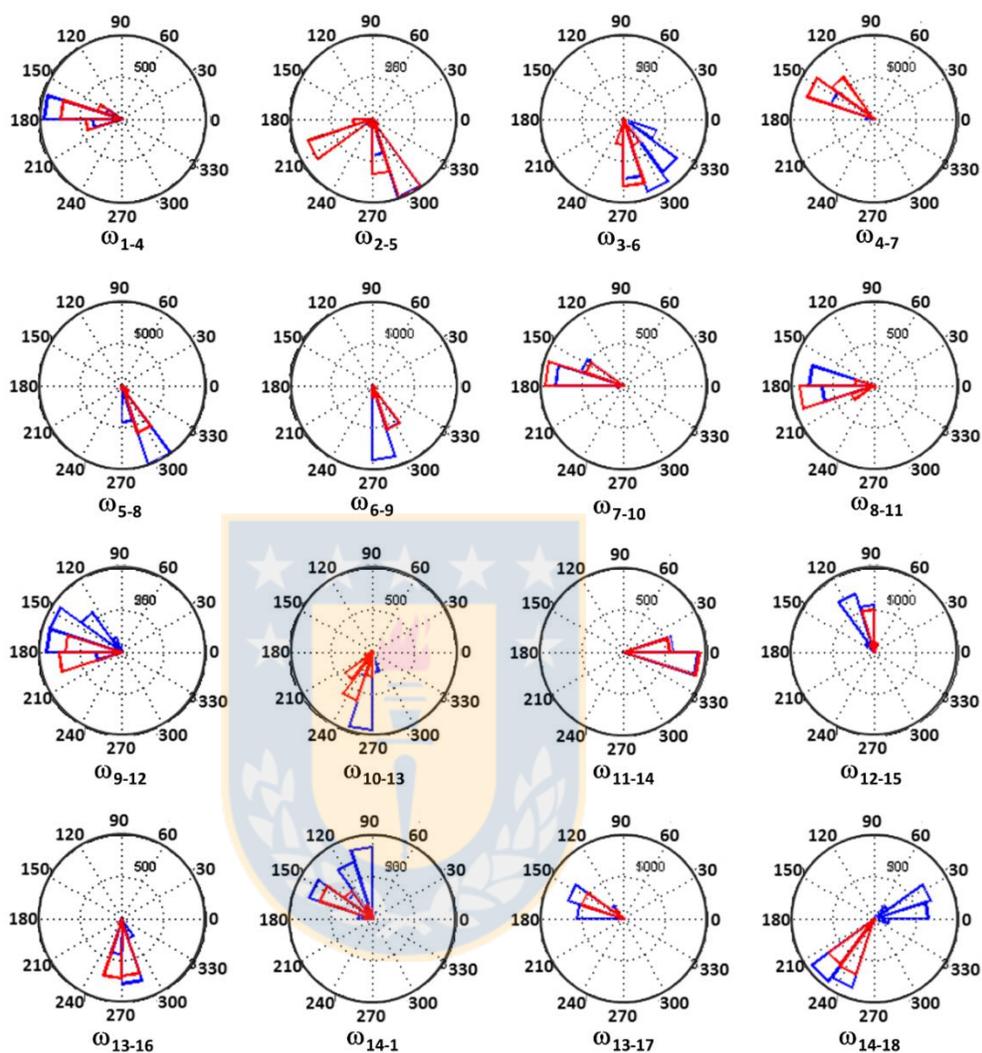
Elaboración propia

FIGURA 15. Distribución de ángulos diedros para EPA libre (color rojo) y en asociación con tubulina (color azul) obtenidos de las simulaciones de dinámica de producción de 20ns en solución acuosa. Los ángulos diedros son reportados en grados.



Elaboración propia

FIGURA 16. Distribución de ángulos diedros para EPB libre (color rojo) y en asociación con tubulina (color azul) obtenidos de las simulaciones de dinámica de producción de 20ns en solución acuosa. Los ángulos diedros son reportados en grados.



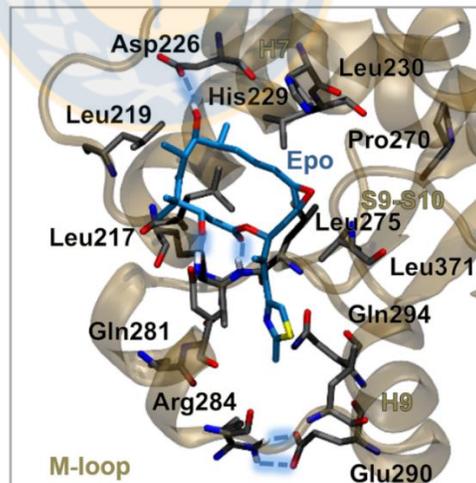
Elaboración propia

FIGURA 17. Distribución de ángulos diedros para las epotilonas A (color rojo) y B (color azul) en complejos con tubulina obtenidos de las simulaciones de dinámica de producción de 20 ns en solución acuosa. Los ángulos diedros son reportados en grados.

5.3 Modelos de asociación de epotilonas nativas

El análisis de las trayectorias de las simulaciones de DM, permitió identificar las interacciones más relevantes de los complejos tubulina-epotilona. En el caso de EPA, el anillo epóxido se sitúa dentro de la cavidad hidrofóbica formada por los residuos Phe270, Pro272, Leu273 y Leu361. La comparación del modelo obtenido mediante DM y el cristalográfico de los complejos EPA-tubulina, indica que la mayoría de las interacciones más significativas observados en el modelo cristalográfico también son en las estructuras representativas obtenidas por DM. Los grupos C3-OH, C7-OH y N20 del macrociclo y la cadena lateral tiazolica de EPA interactúan para formar enlaces de hidrógenos con los residuos Thr276, Gln281, Asp226 y Thr276 a distancia de ~1,8 Å, ~2,0 Å, ~3,0 Å y ~4,0 Å, respectivamente. Se encontraron además interacciones entre Leu217, Leu219, Leu230, Leu275, Leu286 y Leu371 con los grupos metilos de C4, C6, C8, C21. Además, los residuos Leu215, Leu217, Asp224 y Leu228 participan de una serie de interacciones intermoleculares responsables de la asociación del anillo tiazol de la cadena lateral de las epotilonas con la proteína (FIGURA

18). Junto con esto, fueron observados dos puentes salinos en el sitio activo, por un lado, la interacción electrostática entre los residuos Glu290 y Arg284, pertenecientes al *M-loop*, y otro entre los residuos Asp227 y Lys299 de la hélice H9. Adicionalmente, en la simulación de DM del complejo de EPA, se observó la formación de dos enlaces de hidrógenos entre los residuos de Leu275 y Gln294, y entre Ser280 y Arg284, además de interacciones hidrofóbicas entre las leucinas Leu275 y Leu217.



Elaboración propia

FIGURA 18. Estructura representativa del complejo EPA-tubulina obtenida por dinámica molecular.

En el caso del complejo de EPB, los residuos Leu217, Leu230 y Leu275 participan de contactos hidrofóbicos con el grupo metilo de C12 del anillo epóxido, el cual se encuentra orientado hacia dentro del sitio activo como se muestra en la FIGURA 19. Gran parte de las interacciones en las que participa EPB corresponden a las que mantiene EPA con la tubulina. Los residuos de Asp226, Thr276 y Gln281, se mantienen en contacto con los grupos C7-OH (3.0 Å), CO (3.0Å) y C3-OH (3.0Å) de la EPB respectivamente, además de la anteriormente señalada interacción electrostática, responsable de la estabilización del *M-loop* del sitio activo, entre Glu290 y Arg284. Cabe destacar que la presencia del grupo metilo en EPB, marca una diferencia en cuanto a la actividad de las eptilonas nativas. Según nuestros resultados la presencia del grupo metilo favorece la estabilidad del complejo de EPB, permitiendo que el ligando fortalezca las interacciones hidrofóbicas en el sitio de asociación.

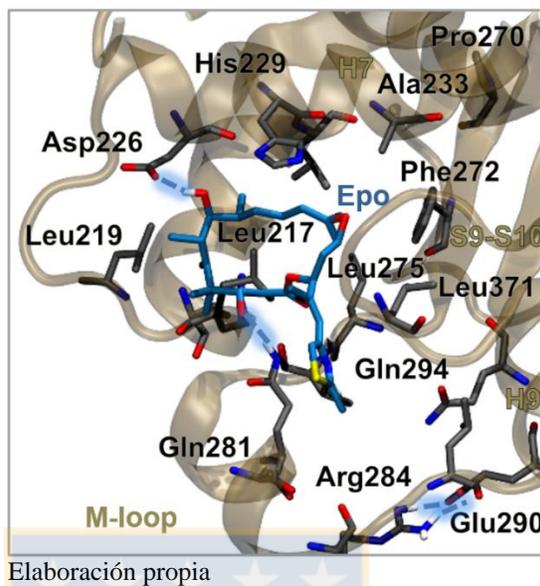


FIGURA 19. Estructura representativa del complejo EPB-tubulina obtenido por dinámica molecular.

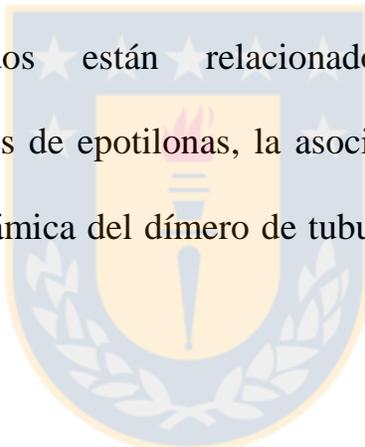
Los resultados obtenidos de DM concuerdan con el análisis conformacional, donde se observó la presencia de cambios conformacionales en las epotilonas nativas al asociarse a tubulina. Dichos rearrreglos ocurren en las regiones que participan directamente en las interacciones intermoleculares, y son parte de la estabilización de los complejos. La información proporcionada por las simulaciones da cuenta tanto de la correcta elección de la estructura de referencia 4I50, como de los parámetros utilizados en la realización de la DM. Esto

permitió poder continuar con el estudio de algunos derivados de las epotilonas nativas.



6. ASOCIACION DE TUBULINA CON DERIVADOS DE EPOTILONAS

Se realizaron DM para una serie de sistemas, los que incluyen epotilonas libre y en complejos con tubulina, considerando 18 derivados de epotilonas nativas con distinto grado de actividad biológica [19] (FIGURA 20). Para cada uno de los sistemas se obtuvieron los modelos cuyos resultados están relacionados con las preferencias conformacionales de epotilonas, la asociación epotilona-tubulina y la estructura y dinámica del dímero de tubulina, temas que se discuten a continuación.



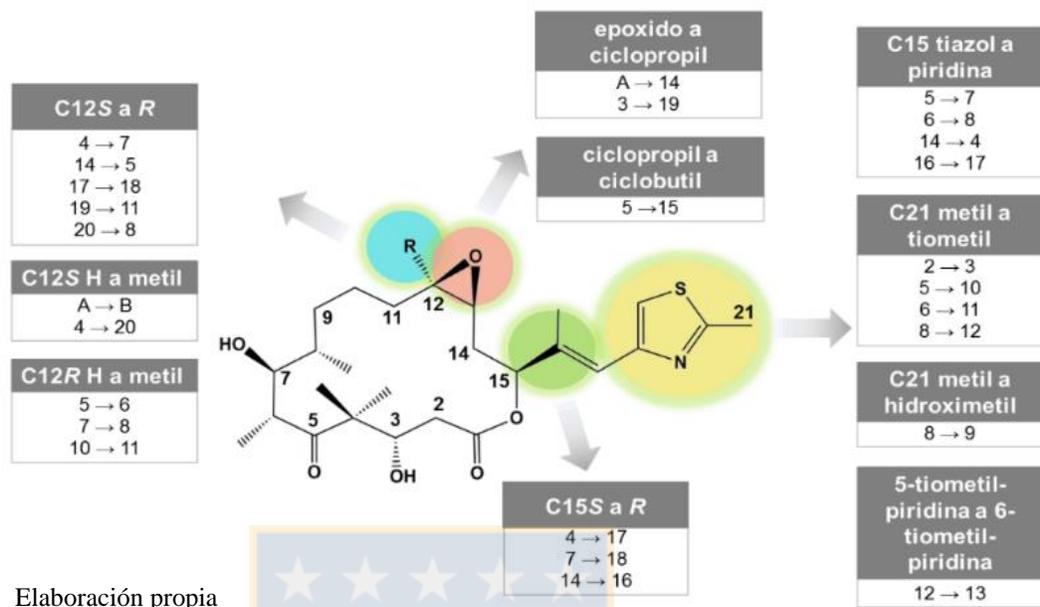
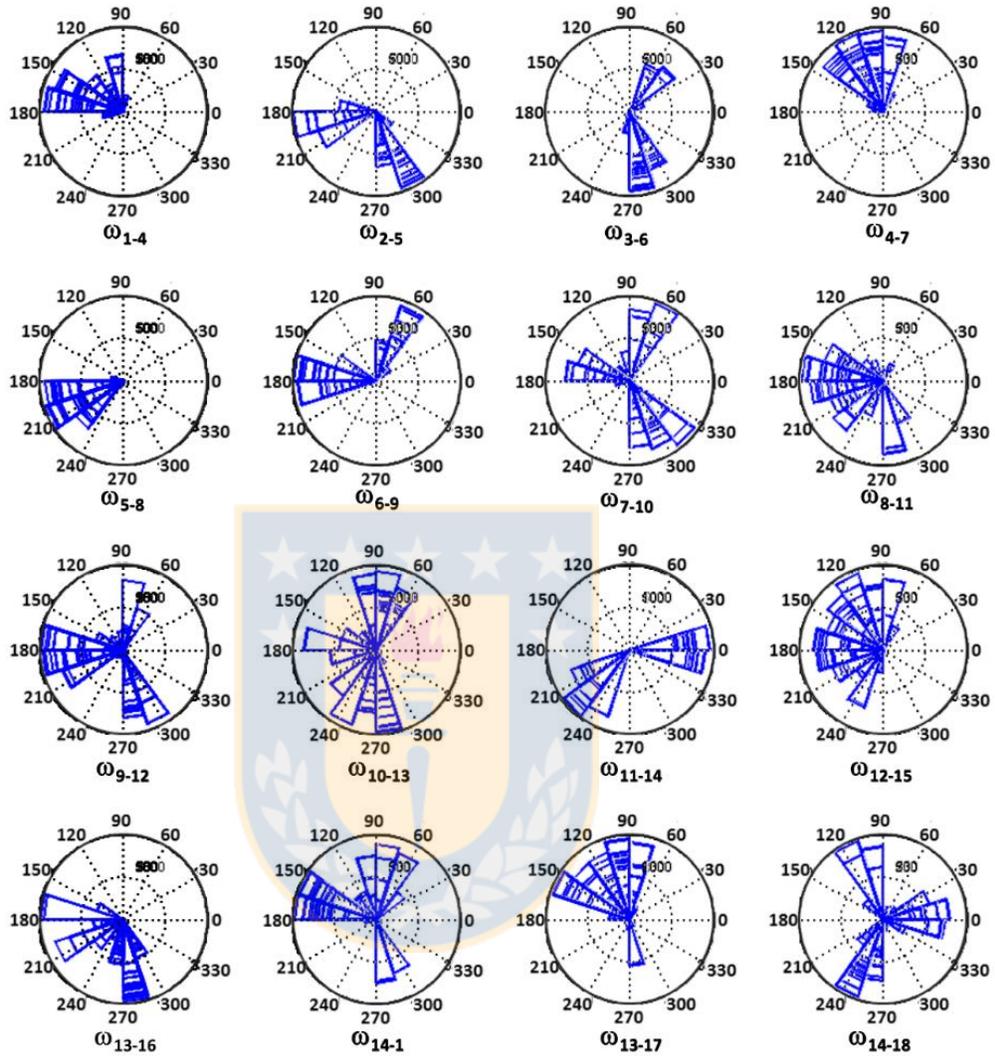


FIGURA 20. Modificaciones estructurales de las epotilonas estudiadas.

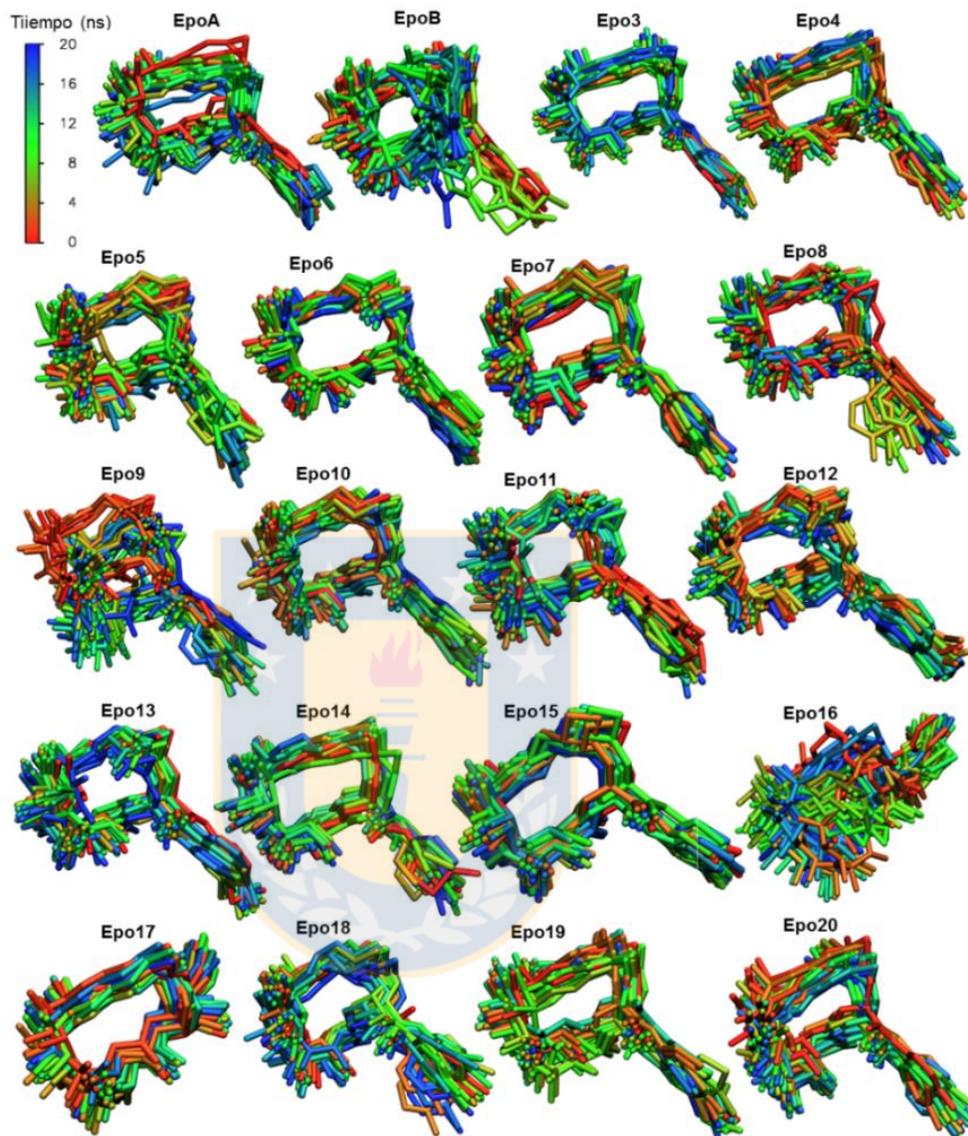
6.1 Conformación de derivados de epotilonas libres

Al igual que para las epotilonas nativas, se obtuvieron histogramas polares para dar cuenta de la distribución de 16 ángulos diedros seleccionados en los 18 derivados de epotilonas nativas estudiados. La FIGURA 21 muestra un resumen de los resultados obtenidos para el conjunto de derivados. El detalle de cada epotilona se encuentra en el ANEXO (FIGURAS A2-A21). Los resultados muestran que los rangos de los ángulos diedros accesibles para algunas regiones del macrociclo de las epotilonas están restringidos (FIGURA 21). Es así como, la región C4-C8 donde se encuentran los grupos C5-CO, C6-CH₃ y C7-OH (diedros ω_{1-4} , ω_{4-7} y ω_{5-8}) es una de las que presenta una menor distribución de los valores de ángulos diedros, predominando las conformaciones anticlinal y antiperiplanar. Esto a pesar de que los patrones de las conformaciones para cada epotilona en estado libre muestran diferencias significativas en el número de posibles conformaciones adquiridas a lo largo de las simulaciones de DM, tal y como se observa en la FIGURA 22.



Elaboración propia

FIGURA 21. Distribución de ángulos diedros para las 18 epotilonas libres obtenidos de las simulaciones de dinámica de producción de 20 ns en solución acuosa.

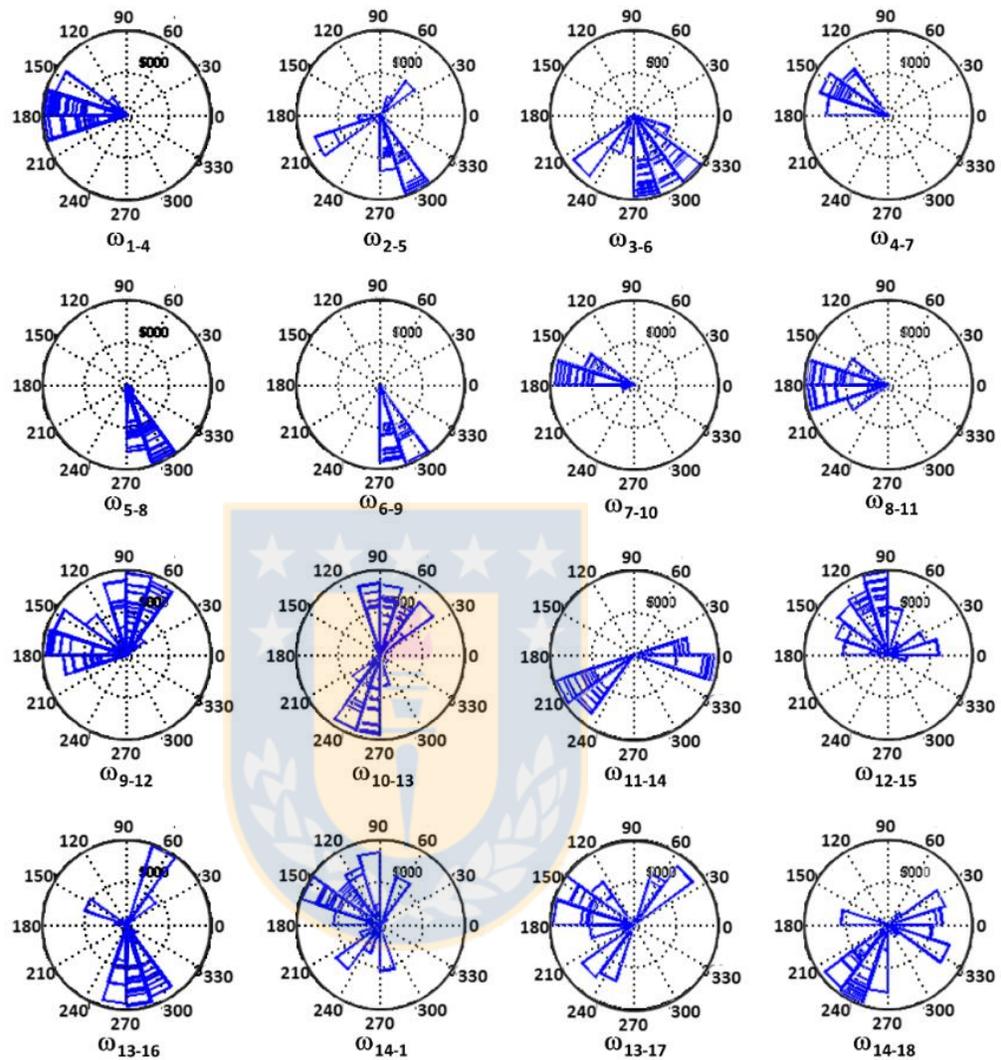


Elaboración propia

FIGURA 22. Conformaciones de las 20 epotilonas en solución a lo largo de la simulación de DM. Los colores de las representaciones indican el tiempo (nanosegundos) del progreso de la simulación.

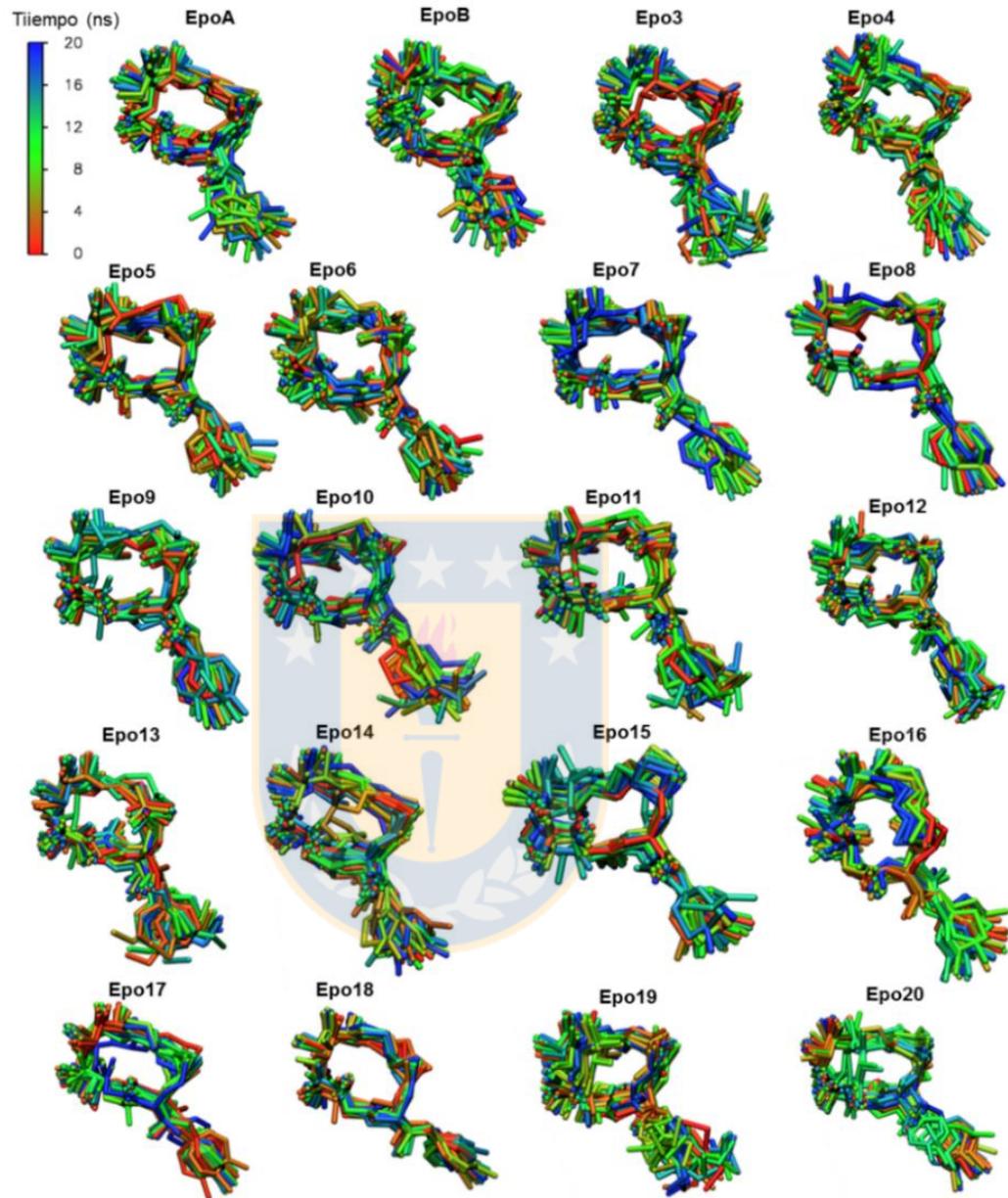
6.2 Conformación de derivados de epotilonas en asociación a tubulina

Para analizar los efectos de la asociación en la conformación de los derivados, se obtuvieron histogramas polares para las epotilonas en los distintos complejos. Se observaron grandes diferencias en la distribución de los ángulos diedros ω_{3-6} , ω_{5-8} , ω_{6-9} y ω_{7-10} , ya que pasan de conformaciones sinclinal también a anticlinal en ω_{3-6} , de antiperiplanar a sinclinal en ω_{5-8} , de antiperiplanar y sinclinal a solo sinclinal en ω_{6-9} y en ω_{7-10} . Además, se observó una disminución en las distribuciones en ω_{1-4} , ω_{4-7} , ω_{5-8} , ω_{6-9} , ω_{7-10} y ω_{8-11} , al comparar epotilonas libres con cada uno de sus respectivos complejos de los derivados analizados (FIGURA 23). Dichos resultados demuestran que se producen cambios conformacionales en las epotilonas por efectos de la asociación a tubulina. Esto se puede observar también en la FIGURA 24, donde se indican los cambios conformacionales de las epotilona asociada a tubulina en la simulación para cada uno de los sistemas, y que en el caso de algunas epotilona como la 9 y 16 se observa claramente como la conformación se ve restringida en el sitio de interacción.



Elaboración propia

FIGURA 23. Distribución de ángulos diedros para las epotilonas en complejos con $\alpha\beta$ -tubulina obtenidos de las simulaciones de dinámica de producción de 20 ns en solución acuosa. Los ángulos diedros son reportados en grados.



Elaboración propia

FIGURA 24. Conformaciones de las 20 epotilonas en el sitio activo a lo largo de la simulación de DM. Los colores de las representaciones indican el tiempo (nanosegundos) del progreso de la simulación.

Para complementar los resultados obtenidos del análisis conformacional, fueron empleados cálculos de RMSF para describir la flexibilidad de las epotilonas antes y después de la asociación como se muestra en la FIGURA 25. Estos resultados confirman que las epotilonas son moléculas altamente flexibles en solución y su libertad conformacional se ve drásticamente afectada en el complejo con tubulina a excepción de EPB, ya que parece ser igualmente flexible en ambos estados. Los resultados indican que el grupo C3-OH presenta una gran flexibilidad en comparación a otras regiones del macrociclo. Con relación a esto, algunos estudios han demostrado que derivados con modificaciones en C3, como las que presentan las epotilonas 3-desoxi y 3-desoxi-2,3-dideshidro donde se ha eliminado el grupo C3-OH, poseen una alta actividad biológica [62]. Esto sugiere que los derivados que presentan una modificación estructural, como las antes mencionadas, se encontrarían más restringidos conformacionalmente, favoreciendo la estabilidad de las demás interacciones en el sitio activo. La información obtenida de los RMSF, evidencia que la libertad conformacional de epotilonas en asociación está claramente restringida.

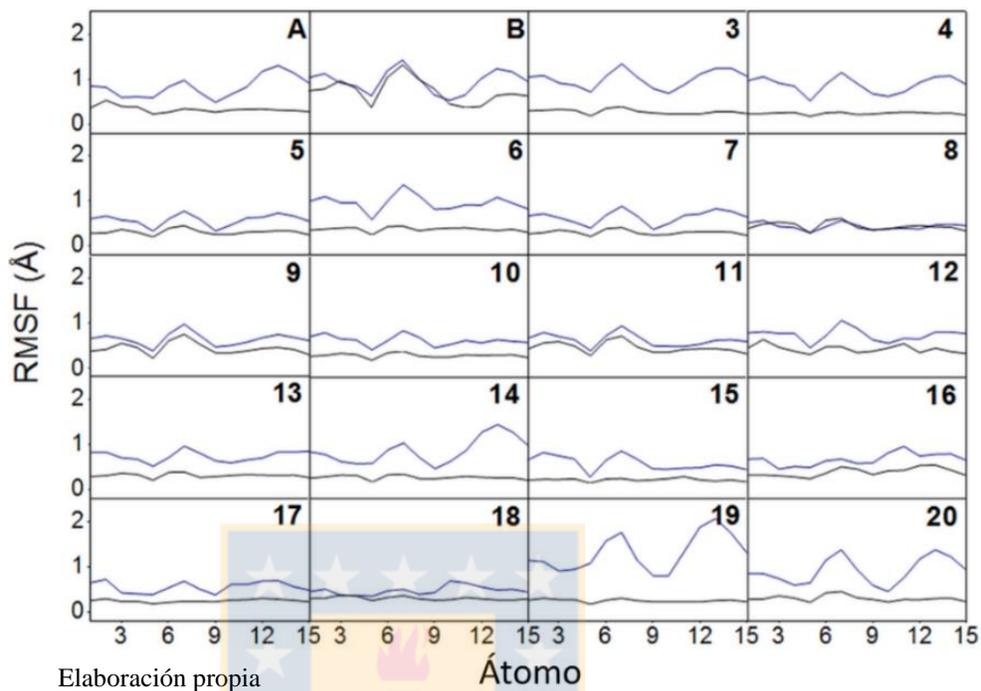


FIGURA 25. RMSF (Å) para el macrociclo de las epotilonas determinados para las epotilonas libres (azul) y en asociación a tubulina (negro) a lo largo de la trayectoria de la dinámica molecular de producción de 20 ns.

Finalmente, se analizó el conjunto de conformaciones obtenidas de las trayectorias de DM para realizar la búsqueda de conformaciones bioactivas para cada derivado de las epotilonas nativas. En este sentido generalmente se ha aceptado que el conjunto de conformeros en solución de un fármaco contiene la forma bioactiva en una proporción abundante. Por lo tanto, se espera que conformaciones bioactivas se encuentren tanto en el estado libre como en los distintos complejos de

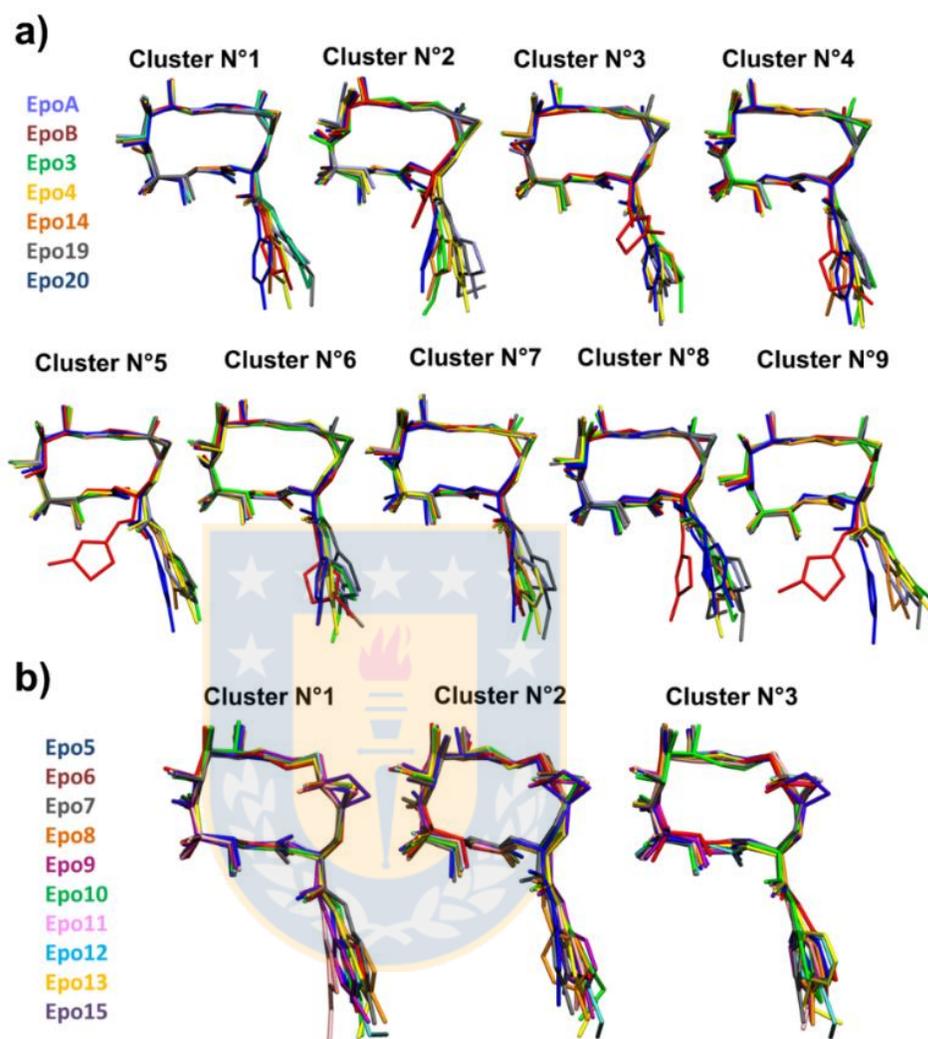
epotilona. Para dilucidar esta interrogante, fueron clusterizadas las estructuras de las epotilonas recuperadas de las trayectorias de DM en estado libre y asociación con tubulina. Dicha clusterización fue basada en el análisis de los 16 ángulos diedros mencionados anteriormente. De esta manera fue posible identificar conformaciones comunes entre los estados libres y en complejos con la proteína. El número de las conformaciones comunes entre ambos estados del conjunto de derivados de epotilonas analizados se muestran en la TABLA 2. Estos resultados muestran notorias diferencias entre las especies activas e inactivas. En el caso de las epotilonas activas, fue encontrado un gran número de conformaciones comunes entre las epotilonas libres y cuando interaccionan con tubulina, lo que sugiere que la conformación bioactiva de estos ligandos se encuentra presente en su estado libre en solución. Por otro lado, en el caso de las epotilonas inactivas no se encontraron conformaciones comunes entre los estados libres y en asociación a tubulina. Estos resultados indican que las epotilonas activas son capaces de someterse a una preorganización conformacional adecuado cuando están en el estado libre, correspondiente a la conformación bioactiva que las epotilonas inactivas son incapaces de

adquirir. Continuando con esto, se encontraron *clusters* comunes para las epotilonas activas. En las epotilonas A, B, 3, 4, 14, 19 y 20 fueron encontrados nueve *cluster* comunes (FIGURA 26.a) y para las epotilonas 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 15, cuatro *cluster* comunes (FIGURA 26.b). El RMSD individual máximo para las 17 moléculas del conjunto en donde fueron encontrados *cluster* comunes no fue superior a 1 Å. Además, los resultados demuestran que el macrociclo de cada ligando tiene una conformación común preferida. Todos estos análisis realizados a las conformaciones de las epotilonas en su estado libre y asociado a tubulina contribuyen a la identificación de la conformación bioactiva de las epotilonas. La FIGURA 27, muestra representaciones de los *clusters* más poblados de las conformaciones comunes entre las epotilonas activas analizadas.

TABLA 2. Resumen de los resultados de clusterización del análisis de las epotilonas libres y en asociación a tubulina obtenidas de las dinámicas de producción de. Los *cluster* comunes se refieren a las conformaciones que han sido encontradas en ambos estados, epotilonas, libres y en complejos.

Epotilona	Número de clusters		
	Libre	Complejo	Comunes
A	653	577	149
B	648	491	168
3	547	342	96
4	650	418	105
5	361	299	69
6	541	352	56
7	379	301	71
8	363	515	80
9	443	333	77
10	361	234	71
11	382	452	76
12	459	423	89
13	469	379	69
14	669	404	89
15	232	140	34
16	738	439	0
17	519	438	0
18	375	363	0
19	562	422	98
20	496	285	62

Elaboración propia



Elaboración propia

FIGURA 26. Representaciones de los *cluster* comunes para las conformaciones de las eptilonas activas analizadas. a) *Cluster* comunes para las eptilonas A, B, 3, 4, 14, 19 y 20 y b) *cluster* comunes para las eptilonas 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 15. (Máx RMSD 0.616).

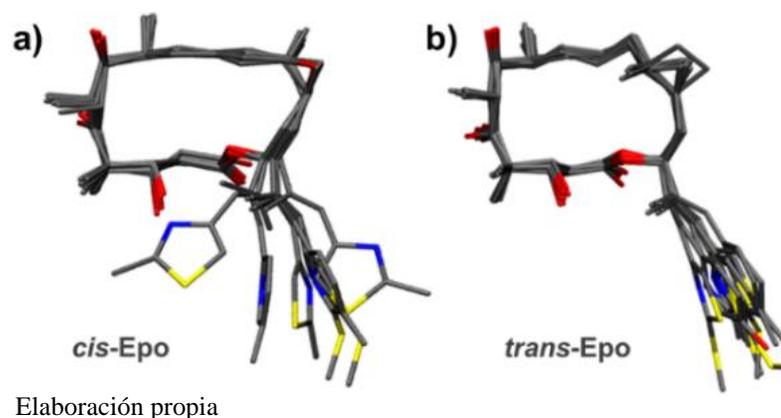


FIGURA 27. Representaciones de los *clusters* más poblados de las conformaciones comunes entre las epotilonas activas analizadas. a) *Cluster* común de las epotilonas A, B, 3, 4, 14, 19 y 20 y b) *Cluster* común de las epotilonas 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 15.

6.3 Asociación epotilona-tubulina para derivados de epotilonas

Por último, se utilizaron las simulaciones de DM para analizar los detalles estructurales de la asociación epotilona-tubulina y del correspondiente sitio de asociación para los análogos de las epotilonas nativas estudiados.

6.3.1 Sitio de asociación

Para analizar el sitio de asociación de la tubulina, se utilizaron estructuras obtenidas de DM para identificar los residuos que gobiernan dicha asociación. Se consideraron los residuos pertenecientes al sitio activo de la tubulina los que se mantuvieron a una distancia menor a los 4Å de la estructura del ligando en más de un 50% de las estructuras examinadas en la dinámica de producción. La FIGURA 28 muestra un resumen de los patrones de las interacciones identificadas. Los bloques negros representan las interacciones que se encuentran en más de un 75% de los *frames* de muestra, mientras que los bloques grises representan las interacciones que se observaron entre un 50 a 75 % de las estructuras analizadas. Estos resultados indican que las epotilonas en los complejos exhiben interacciones similares, en el sitio de asociación. Los residuos claves para la interacción comunes en todos los sistemas tubulina-epotilona son Leu217, Leu219, Leu230, Leu233, Leu272, Leu275 y Leu371, Asp226, His229, Pro274, Thr276 y Gln281.

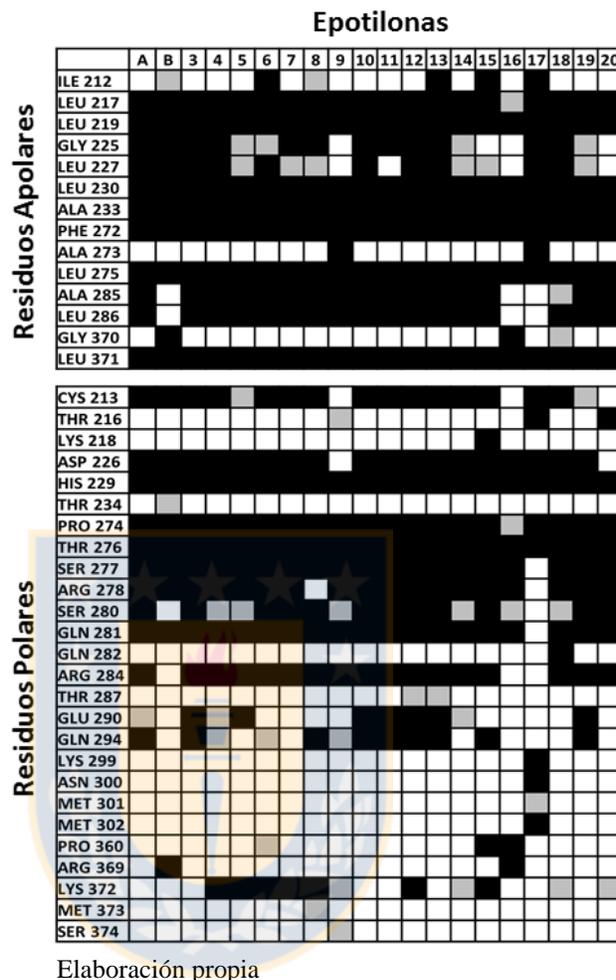


FIGURA 28. Resumen de las interacciones encontradas en los complejos de tubulina con los 20 derivados de las epotilonas nativas obtenido del análisis de las trayectorias de las simulaciones de DM.

Por otro lado, se realizó una comparación de la conformación de cada uno de los derivados en asociación a tubulina obtenidos de DM, con el modelo cristalográfico de Prota[31]. Los resultados indican que todos los ligandos ocupan regiones similares en el sitio de asociación

comparada con lo observado en la estructura cristalográfica (FIGURA 29), pero exploran la cavidad de una manera única y cualitativamente diferente. Además, la posición promedio de los ligandos a lo largo de la dinámica de producción se mantuvieron estables como lo indicaron los cálculos de RMSD manteniendo alineada la estructura de la proteína, esto sugiere una interacción estable con el receptor (ANEXO, FIGURA A1).



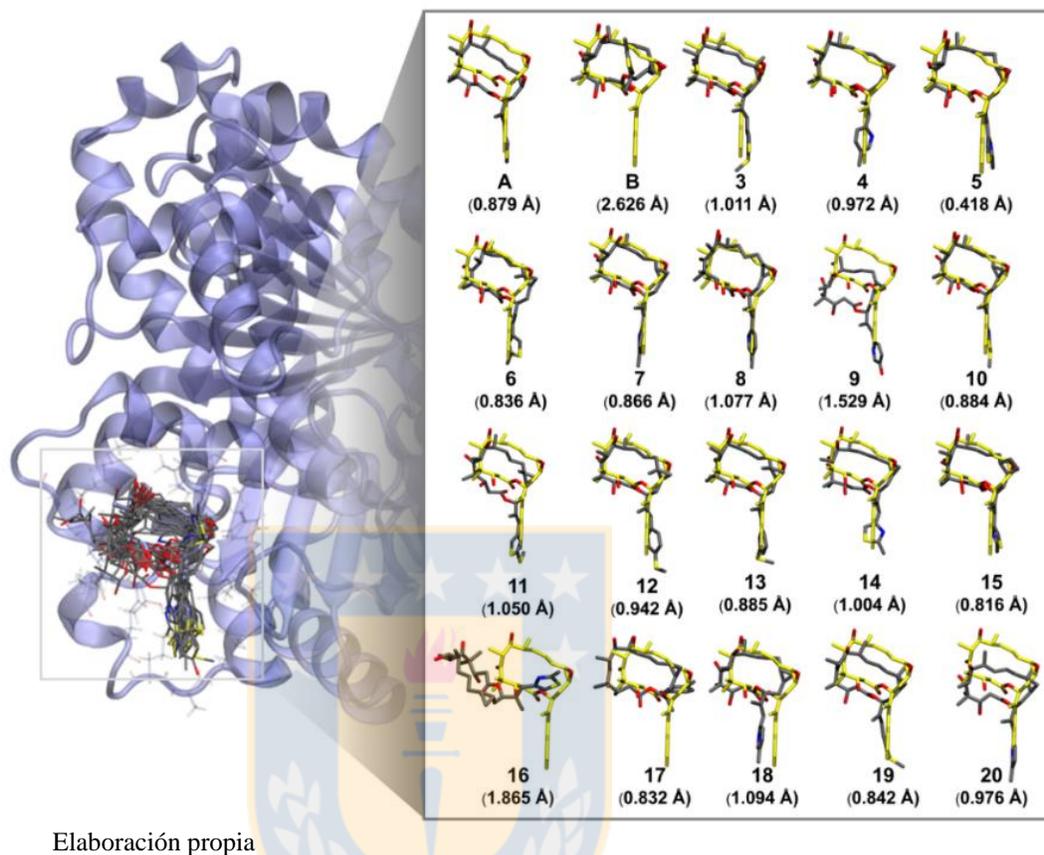


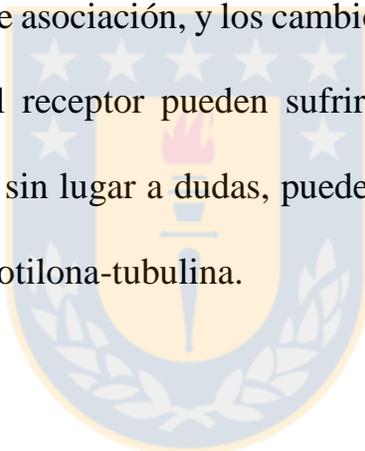
FIGURA 29. Comparación entre los modos de asociación de derivados de las epotilonas obtenidas mediante 1 DM (color amarillo) con respecto a la estructura cristalográfica de EPA en el complejo de PDB 4I50 (color gris). Los valores de RMSD para cada epotilona fueron calculados a lo largo de los 20 ns de DM manteniendo alineada las estructuras proteicas.

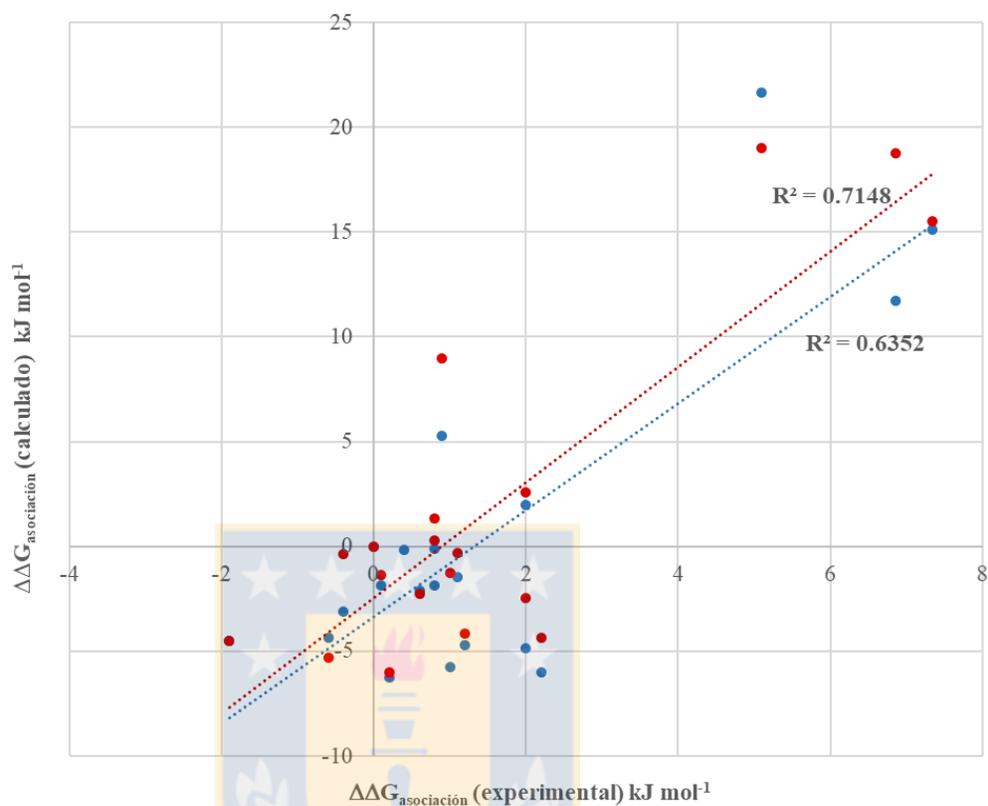
En las distintas simulaciones de los complejos se encontraron interacciones relevantes que son responsables de la estabilización de sitio activo de la tubulina. Por ejemplo, el residuo Glu290 forma un puente salino con Arg284, ambos partes del *M-loop*. Otro puente salino

fue observado entre los residuos de Asp297 y Lys299 de la hélice H9, mientras que el residuo Leu275 forma un enlace hidrógeno con Gln294 y Ser280 y Arg284 forman otro enlace hidrógeno. Fueron observadas además interacciones hidrofóbicas entre las leucinas 275 y 217 pertenecientes al *M-loop* y a la hélice H6 de la tubulina, respectivamente. Todas las interacciones descritas anteriormente son responsables de la estabilización del *M-loop*, el cual corresponde a un segmento proteico de directa interacción con el ligando. Estas interacciones también están reportadas para la referencia cristalográfica de la estructura del complejo[31]. Sin embargo, reportes previos[63] han demostrado que el puente salino entre Glu290 y Arg284 tiene un comportamiento distinto en el complejo del taxol con tubulina, ya que se observó que la formación de este puente solo se observa ausencia de ligando, debido a que en el *M-loop*, cuando la tubulina interactúa con el taxol, el residuo de Arg284 forma un nuevo puente salino con Glu44 lo que ocasiona una pequeña apertura del sitio de asociación. Estos resultados muestran cómo se dispone el sitio de interacción, y concuerdan con el análisis previo de los residuos relevantes para la asociación de las epotilonas nativas.

Los resultados son coherentes con los aspectos energéticos de la interacción epotilona-tubulina determinados, ya que las simulaciones dan cuenta de una gran contribución del término de van der Waals (E_{vdw}) comparado con la interacción electrostática (E_{elec}) entre las epotilonas y los residuos del sitio de asociación. Esto, es un resultado esperado considerando la predominancia de los residuos apolares dentro del sitio de asociación a epotilonas [64, 65]. Además, los cálculos predicen una estabilización global del complejo EPB-tubulina comparado con del complejo de EPA, el cual está predominado por el aumento del valor del término electrostático de la energía de interacción residuo-ligando (TABLA 3). Para la serie de derivados de epotilona estudiados no se encontró una relación estadísticamente significativa entre las energías de interacción determinadas y actividades biológicas reportadas, sugiriendo así un origen diferente para las diferencias de actividad dentro del conjunto de compuestos en estudio. Paralelamente, fueron realizados cálculos de energías libre de asociación utilizando los métodos MM/GBSA y MM/PBSA de manera de comparar con tendencias experimental determinadas previamente. Los resultados de los cálculos fueron procesados como energías libres de asociación

relativas para el set de 20 derivados estudiados, mostrando una pobre correlación lineal entre los valores calculados y experimentales como se observa en la FIGURA 30. La mala correlación obtenida está relacionada con el hecho que las metodologías MM/GBSA y MM/PBSA consideran algunas aproximaciones, ignorando algunos factores como la energía de asociación proveniente de las moléculas de agua en el sitio de asociación, y los cambios conformacionales que tanto ligando como el receptor pueden sufrir al producirse la asociación. Dichos factores, sin lugar a dudas, pueden ser relevantes en el caso de la interacción epotilona-tubulina.





Elaboración propia

FIGURA 30. Resultados de los cálculos de energía libre de asociación relativa utilizando los métodos MM/GBSA (línea roja) y MM/PBSA (línea azul) para la serie de 20 complejos epotilona-tubulina estudiados en esta tesis. Los cálculos de energía libre de asociación fueron realizados tomando 800 *frames* a lo largo de la dinámica de producción de 20 ns. Los valores de energía libre de asociación relativa son reportados tomando como referencia la energía libre de asociación de EPB.

TABLA 3. Energías de interacción promedio para los complejos epotilona-tubulina obtenidos desde simulaciones de DM de 20 ns. Las energías de interacción son reportadas como la suma de los términos electrostáticos (E_{elec}) y van der Waals (E_{vdw}) y están expresados en kcal/mol.

Epotilona	Energía de interacción Epotilona-Tubulina (kcal mol ⁻¹)		
	E_{elec}	E_{vdw}	Total
A	-25.3	-46.5	-71.8
B	-16.4	-42.2	-58.6
3	-26.0	-52.9	-79.0
4	-30.2	-43.8	-73.9
5	-18.1	-47.7	-65.8
6	-20.5	-51.0	-71.5
7	-24.5	-43.6	-68.1
8	-17.9	-45.7	-63.6
9	-18.4	-41.5	-59.9
10	-16.3	-52.9	-69.1
11	-16.3	-52.0	-68.3
12	-17.2	-55.1	-72.3
13	-29.6	-52.9	-82.5
14	-19.5	-45.3	-64.9
15	-18.5	-47.8	-66.3
16	-10.8	-33.6	-44.3
17	-25.7	-41.4	-67.2
18	-27.0	-42.7	-69.7
19	-25.4	-53.0	-78.4
20	-20.5	-42.7	-63.2

Elaboración propia

Finalmente, fueron estudiados los detalles de la asociación de los derivados de las epotilonas nativas, en términos de las distintas modificaciones estructurales presenten en los 20 derivados considerados en esta tesis (FIGURA 20) y cómo estas pueden afectar la asociación.

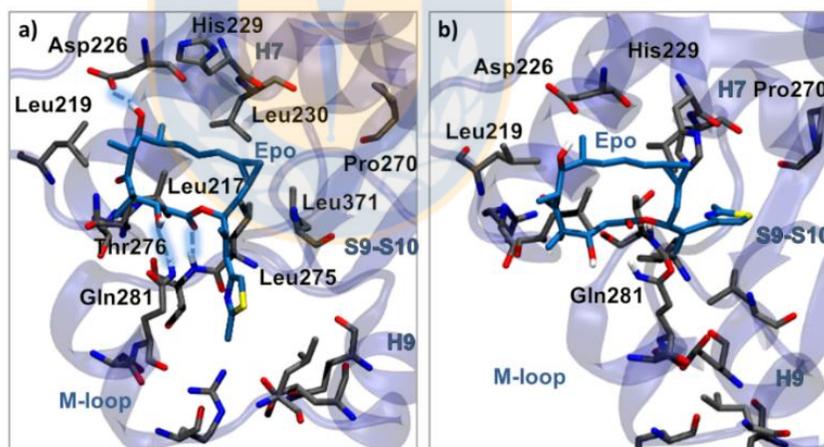
6.3.2 Modificaciones en C15

La primera modificación estudiada corresponde a la epimerización de C15. Los detalles de la asociación mediante DM indican que la modificación estereoquímica desde S a R en el carbono de C15 en el caso de las epotilonas 4 y 17 (Modificación de EP4 a EP17) implica una disminución en el número de interacciones observadas en EP17. El complejo EP4-tubulina presenta interacciones relevantes entre los residuos de Asp226 y Gln281 y C7-OH (2.0 Å) y C3-OH (2.5Å) del ligando, respectivamente. Además, el residuo Thr276 interacciona fuertemente con el grupo carbonilo de C1 y el anillo de piridina de la cadena lateral (1.9 Å y 2.0Å). Además, EP4 presenta contactos hidrofóbicos con Leu217, Leu219, Leu275, Leu286 y Leu371. Algunas

de estas interacciones se ven desfavorecidas en el epímero R (EP17), ya que se pierden los contactos entre la epotilona y los residuos Thr276, Gln281 y Leu286.

En el siguiente caso, la epimerización de EP7(C15S) a EP18(C15R), el complejo de la EP7 se destaca por los contactos entre los residuos Thr276 con las cadenas laterales del ligando (2.0 Å) y carbonilo de C1(2.0Å), Asp226 con C7-OH (3.0 Å), y entre Gln281 y C3-OH (3.0Å), además de interacciones hidrofóbicas entre las leucinas que se encuentran en la cavidad Leu 217, 219, 275 y 286 con el ligando. En contraparte, EP18 muestra un distanciamiento con el entorno proteico, en especial, con los residuos Asp226 y Gln281, cuyas interacciones con la epotilona se ven perjudicadas. Continuando con las epimerizaciones en C15, la modificación en EP14 que da lugar a la EP16, implica un drástico cambio en la asociación ligando-proteína, ya que las interacciones observadas en EP14 con los residuos Asp226, Thr276 y Gln281 prácticamente desaparecen por efectos del cambio conformacional experimentado. Estos resultados también comprueban lo demostrado experimentalmente en los modelos moleculares

construidos a partir de la estructura de EPA determinada por difracción de rayos X [54], donde se aprecia que con el C15 en configuración S, la cadena lateral está aproximadamente en el plano del anillo de epotilona, a diferencia de cuando el C15 está en configuración R donde la cadena lateral es perpendicular a este plano. Este efecto está notablemente observado en los casos de las EP4 y EP14, donde la cadena lateral se pliega por debajo del macrociclo (FIGURA 31).



Elaboración propia

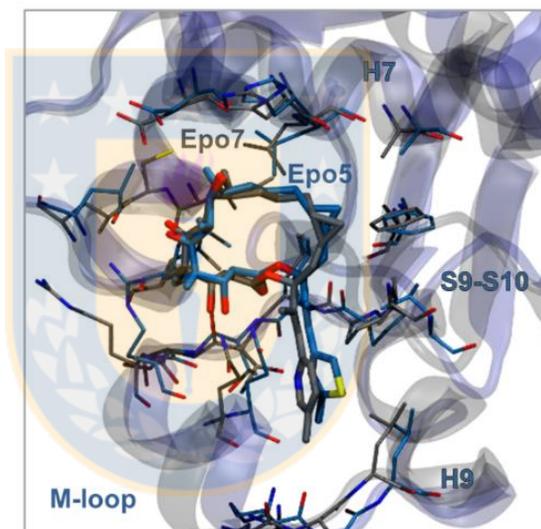
FIGURA 31. Comparación entre los modos de asociación de las epotilonas a) 14 y b) 16, obtenidos por DM.

De manera similar, fue analizado el cambio del anillo tiazol a piridina en la cadena lateral de C15 de la estructura de las epotilonas. En este

caso, experimentalmente mediante la obtención de constantes de asociación fue observado que el efecto de las modificaciones varió de acuerdo a la estereoquímica de los carbonos C12 y C15[19]. Las simulaciones indican que la asociación de EP5 destaca por las interacciones de Thr276 y Gln281 con el carbonilo de C1 y C3-OH e hidrofóbicas con Leu217, Leu219, Leu275 y Leu286. Al reemplazar el tiazol de la cadena lateral de la epotilona por piridina, se observó que esto no tuvo mayor relevancia en la asociación dado que en la EP7 las interacciones presentes son las mismas observadas que su análogo tiazólico y el ligando adopta una posición similar en ambos casos (FIGURA 32). El cambio en la cadena lateral de EP6 (modificación de EP6 a EP8), según lo observado en la simulación no tiene un mayor efecto en la asociación. Las interacciones relevantes son las dadas entre los residuos de Asp226, Thr276 y Gln281 y C7-OH (3.0Å), C1-CO (2.0Å) y C3-OH (2.0Å), respectivamente y cabe destacar que la modificación del anillo de la cadena lateral no produjo cambios en la disposición del ligando en el sitio de asociación. Continuando con las modificaciones, en el cambio en la cadena lateral de EP14 que da origen a la EP4, las interacciones más importantes en la EP14 fueron entre los

grupos C7-OH (4.0 Å), C1-CO (2.4 Å) y C3-OH (3.0Å) del ligando y los residuos Asp226, Thr276 y Gln281, y mantenidas en la asociación de la EP4 con distancias promedios de 2.0 Å, 1.9 Å y 2.5 Å respectivamente. El último cambio estudiado fue el que se da en EP16 y EP17, donde la cadena lateral se encuentra en el carbono con estequiometria S, a diferencia de los casos señalados anteriormente. En la asociación de la EP16 se observó una importante interacción entre los residuos de His229 y Thr276 con el nitrógeno del anillo tiazol de la cadena lateral y con C3-OH. Por efectos de la epimerización de C15, se observó como la cadena lateral se pliega perpendicular al macrociclo del ligando hacia dentro de la cavidad, provocando a su vez que la estructura de la epotilona se encuentre más expuesta. Este hecho fue observado también en los otros derivados que presentan dicha epimerización. La introducción de un anillo sustituyente de mayor tamaño al tiazol provoca un efecto negativo en la asociación debido a que las interacciones observadas previamente en la EP16 se pierden en EP17. En este caso la estructura del ligando en la cavidad se encuentra en una posición menos apropiada para interactuar con tubulina, gran parte de las interacciones observadas en los demás derivados estudiados no se

observan en el complejo de EP17, y las conformaciones adoptadas por ambas epotilonas varían. Cabe destacar que las epotilonas que presentan una epimerización en el carbono C15 (C15S a R) son las que presentan experimentalmente una menor afinidad por la proteína.



Elaboración propia

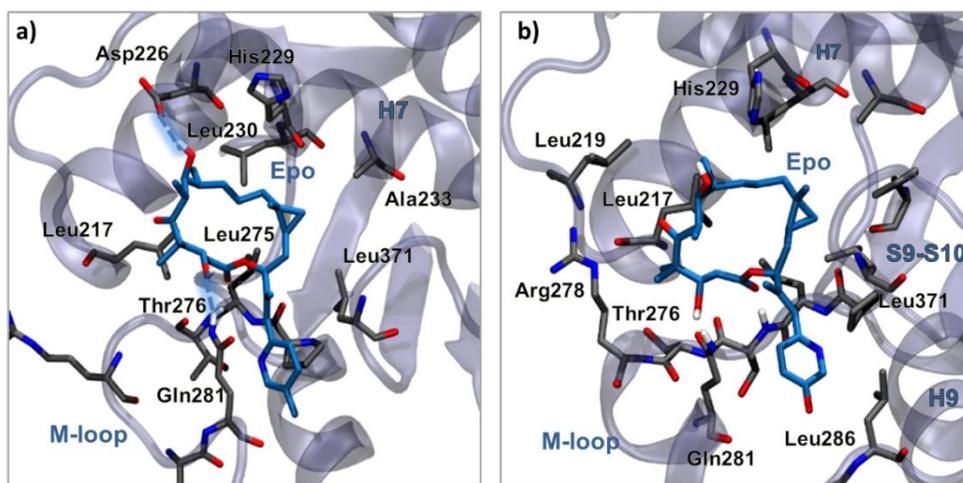
FIGURA 32. Comparación entre los modos de asociación de las epotilonas a) 5 (color azul) y b) 7 (color gris), obtenidos por DM.

6.3.3 Modificaciones en C21

La segunda modificación estudiada corresponde la incorporación de distintos sustituyentes en C21 de la cadena lateral. En primer lugar, fue analizado el cambio del sustituyente en C21 desde metilo a tiometilo entre las epotilonas EP2→EP3, EP5→EP10, EP6→EP11 y EP8→EP12. En segundo lugar, desde metilo a hidroximetilo dado en EP8 y EP9. Y finalmente, la modificación desde 5-tiometil-piridina a 6-tiometil-piridina en EP12 y EP13. Cabe señalar que la cadena lateral y en especial la zona de la estructura de las epotilonas del carbono C21, se encuentra en un bolsillo hidrofóbico que se encuentra expuesto al solvente. Esto es común para todos los complejos analizados que presentan modificaciones en C21. Según lo observado en las simulaciones de las epotilonas con modificaciones en esta región, las interacciones predominantes en el sitio de asociación son entre Asp226, Thr276 y Gln281 y C7-OH, C1-CO y C3-OH de la estructura del ligando. En cuanto al ligando, su posición y orientación en la cavidad no presentó mayores cambios por efectos de la modificación.

La incorporación del grupo tiometilo no tuvo mayor impacto en los complejos analizados, excepto en la asociación de EP12. En la asociación de EP8, además de las interacciones comunes para todo el grupo de derivados se destaca la del nitrógeno de la piridina con el residuo de Thr276. Al comparar los modos de asociación de EP8 y EP12, se observó que para EP12 las interacciones se vieron restringidas y solo se mantuvieron enlaces hidrógeno entre el ligando con el residuo de Thr276. Esto explica los cambios de energías experimentales desfavorables debido a las diferencias estructurales entre EP8 y EP12. En los demás casos, los cambios de energías fueron favorables. Experimentalmente, los cambios de epotilona 2→3, 5→10 y 6→11 tienen un efecto positivo en la afinidad por la proteína. Los detalles termodinámicos experimentales indican que, si bien el cambio es desfavorable entálpicamente, lo es favorable entrópicamente[19]. Esto sugiere que el incremento en la afinidad de unión se debería a la reorganización entrópicamente favorable de las moléculas del disolvente más que las interacciones entre el ligando y la proteína.

Para el segundo caso estudiado, la sustitución del metilo por el grupo hidroximetilo en la cadena lateral de piridina, primero se analizó EP8 que posee el grupo metilo. Las simulaciones de DM indicaron que el complejo de EP8–tubulina, está caracterizado por las interacciones entre Asp226, Gln281 y C7-OH y C3-OH del ligando y el residuo de Thr276 que forma enlaces de hidrógenos con el grupo carbonilo de C1 y el nitrógeno del anillo de piridina de la cadena lateral, además de las interacciones hidrofóbicas con Leu217, Leu219, Leu275 y Leu286. En EP9 que corresponde a la que posee el sustituyente hidroximetilo en C21, se observaron dos interacciones estables durante la simulación entre los residuos de Gln281 y Thr276 con C3-OH y C1-CO de la epotilona, además el ligando adquirió una posición distinta en el sitio de asociación. Estos resultados son coherentes con la información experimental, ya que se informa de un efecto ligeramente desfavorable lo que podría estar relacionado con las diferencias en las interacciones de cada modo de asociación (FIGURA 33).



Elaboración propia

FIGURA 33. Representaciones del sitio de asociación de a) EP8 y b) EP9, en complejos con tubulina obtenidos por DM.

Por último, al sustituir el grupo 5-tiometil-piridina a 6-tiometil-piridina si bien experimentalmente fue informado un cambio desfavorable energéticamente, a través de las simulaciones de DM no fue observado ningún efecto positivo ni negativo para la asociación epotilona-tubulina.

6.3.4 Modificaciones en C12

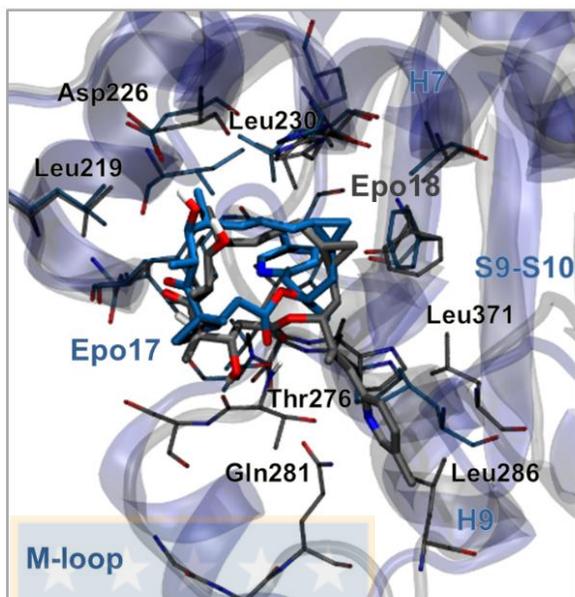
Una de las modificaciones más estudiadas en la estructura de las epotilonas corresponde a la región de C12, ya que experimentalmente

se ha visto que la adición de un grupo metilo en el caso de la epotilona nativas genera un considerable aumento de la actividad polimerizante de EPB comparada con EPA. Para observar cómo los cambios en esta zona de la estructura de la epotilona son capaces de afectar la conformación del ligando y su interacción con tubulina es que a través de DM se estudió el efecto de la epimerización del carbono 12 desde S a R, la sustitución de hidrógeno por un grupo metilo en ambos epímeros de C12 y modificaciones del anillo epóxido, sustituyéndolo en primera instancia a un anillo ciclopropilo y luego desde el anillo ciclopropilo a ciclobutilo.

Anteriormente se observó que el cambio en la estereoquímica de C15 desde S a R produjo un efecto negativo en el complejo epotilona-tubulina al comparar EP 4 (C15S) y EP17(C15R). En este caso al comparar EP4 y EP7, donde existe un cambio estereoquímico en C12 desde S a R, se observó en EP7 un leve desplazamiento del ligando y *M-loop* en la tubulina a consecuencia de la modificación. A pesar de esto, la asociación del ligando con la tubulina no fue interrumpida, ya que se observaron las mismas interacciones que en el caso de la EP4,

los residuos Asp226, Gln281 y Thr276 con los grupos C7-OH, C3-OH y C1-CO y el nitrógeno de la piridina de la cadena lateral. También fue analizado el cambio desde C15 S a R en EP14 a EP16 que fue desfavorable, al igual que en EP4. La epimerización de C12 en EP14 en el complejo no tuvo mayor incidencia en la posición y orientación del ligando ni en el sitio de asociación. Por lo mismo, la interacción de EP5 con la tubulina fue similar a lo observado en la EP14 (epímero C12S).

Los resultados de DM para el complejo de EP17 indican que se encuentra estabilizado principalmente por las interacciones entre los residuos de Asp226 y Thr276 con C7-OH y el carbonilo de C1 del ligando. Al observar el complejo de EP18 que corresponde al epímero con C12R de EP17, se destaca el cambio de la posición del ligando en el sitio activo, ya que la cadena lateral, de estar plegada hacia dentro del sitio activo, se desplazó hacia afuera ubicando en línea al macrociclo de la epotilona. Como resultado de esto, el complejo se ve favorecido debido a la presencia de nuevos contactos intermoleculares ligando-proteína que no fueron observados en EP17 (FIGURA 34).



Elaboración propia

FIGURA 34. Representación de los modos de asociación de EP17 (color azul) y EP18 (color gris), obtenidos por DM, donde se observa el gran cambio en la orientación de la cadena lateral de C21.

El complejo de EP19 está caracterizado por las interacciones de Asp226, Thr276 y Gln281 con C7-OH, C1-CO y C3-OH y Leu217, Leu219, Leu230 y Leu275 con el macrociclo de la epotilona. La epimerización de C12 en EP19(C12S) que da lugar a EP11(C12R) implica un cambio en la orientación del grupo metilo que se encuentra en dicho carbono. En los primeros tres cambios analizados (epotilona 4→7, 14→5 y 17→18) el sustituyente de C12 es un hidrógeno. El grupo metilo de EP11 se orienta hacia fuera del sitio activo desfavoreciendo las

interacciones hidrofóbicas que fueron observadas para esa región en EP19, y que en EP11 no. Además, debido a la modificación y la posición del grupo metilo se observó un cambio en la orientación de ligando lo que puede afectar su asociación. Algo similar fue lo observado en la modificación entre EP20 y EP8, donde EP20 corresponde al epímero con C12S y EP8 a C12R, y ambas presentan un grupo metilo en C12. No obstante, en EP8 se observó claramente un cambio no solo en la orientación del grupo metilo de C12, sino también un desplazamiento de todo el ligando en comparación a EP20. Estas diferencias afectaron a las interacciones que en principio fueron observadas en EP20, entre Leu217, Leu219, Leu230, Leu275 y Leu286 y el macrociclo, y los residuos Thr276 y Gln281 con los grupos C1-CO y C3-OH del ligando (FIGURA 35). Los resultados obtenidos por DM son consistentes con la información experimental que se tiene y da cuenta del efecto de modificaciones estereoquímicas en C12. Estos indican que el efecto en la afinidad proteína-ligando depende principalmente de los sustituyentes de C12, ya que para análogos de EPA, es decir, para derivados con sustituyente hidrógeno en C12 no fue observado cambio en la afinidad o presentó un leve efecto favorable. Sin embargo, para

análogos de EPB, es decir, para derivados con sustituyente metilo en C12 la modificación era totalmente desfavorable para el complejo.

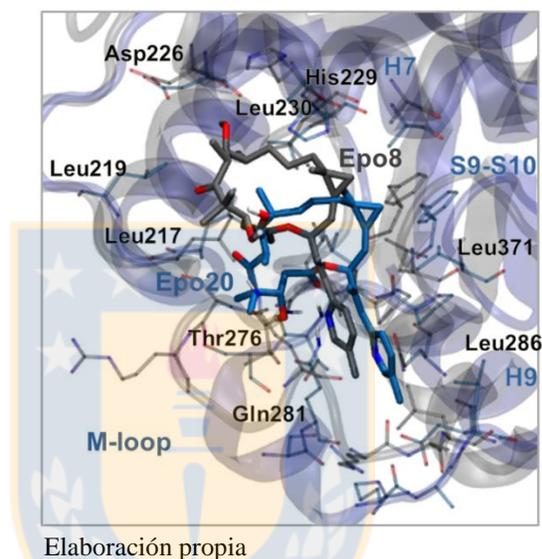


FIGURA 35. Comparación entre los modos de asociación de EP20 (color azul) y EP8 (color gris), obtenidos por DM. La modificación presente en la estructura de los ligandos corresponde a la epimerización de C12 (EP20-C12S, EP8-C12R).

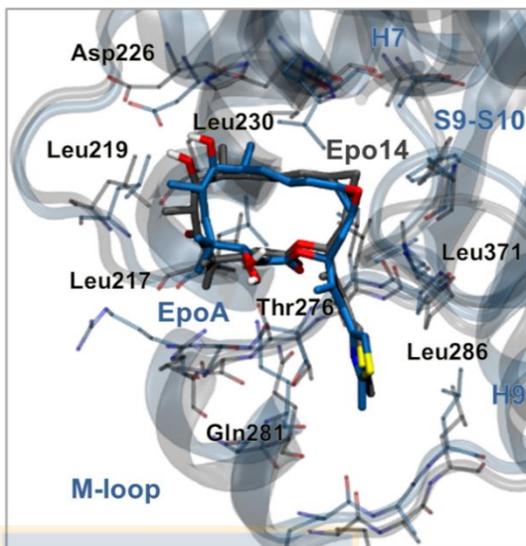
Por otro lado, fue analizada directamente modificación del sustituyente en C12. Esto se observó en una primera parte al estudiar a las epotilonas nativas, y cuyo efecto es positivo para la asociación, ya que incrementa de forma muy notable la afinidad (-8.1 kJ mol^{-1}). En el capítulo 5, se analizó en detalle las diferencias estructurales y conformacionales, para

EPA y EPB, tanto libre como en asociación a la proteína el cual ha sido motivo de varias investigaciones. Un segundo caso, considerando como origen de la modificación una estructura de epotilona con C12 de estereoquímica S, es el que se presenta en EP4 y EP20. La diferencia de estos derivados con las epotilonas nativas es debida a la cadena lateral, ya que presentan un anillo de piridina en lugar de tiazol. Experimentalmente, se demostró que al igual que en las epotilonas nativas la incorporación del metilo en C12 tiene un efecto energéticamente favorable para la asociación, aunque menos notorio ($\Delta\Delta G_{35^\circ\text{C}} \text{ epotilona } 4 \rightarrow 20 = -1.8 \text{ kJmol}^{-1}$). Los resultados obtenidos de las simulaciones indican que EP20 se posiciona levemente distinto a EP4 en el complejo. En la asociación de EP20 el residuo de Thr276 interacciona con el grupo carbonilo de C1 y C3-OH, a diferencia de EP4 donde solo hay una interacción de Thr276 con el grupo carbonilo. Además, el grupo metilo introducido, se posiciona hacia el interior del sitio activo logrando establecer contactos hidrofóbicos. Esto podría contribuir a la diferencia de afinidad de asociación calculada experimentalmente y ha sido lo observado en otros modelos para la asociación epotilona-tubulina, como el publicado por Nettles. Además,

fue estudiada la incorporación del grupo metilo en C12 considerando el epímero R. Los cambios analizados fueron entre las epotilonas 5→6, 7→8 y 10→11. Anteriormente, se había mencionado que las interacciones predominantes del complejo de EP5 estaban dadas entre los residuos de Gln281 y Thr276 con C3-OH y el carbonilo de C1 e interacciones hidrofóbicas del ligando con la proteína. En el sistema EP6, epímero S (C12 S) de EP5, el cambio en la orientación del grupo metilo produce que este se desplace hacia fuera del sitio activo. De esta manera, se limitan los contactos principalmente con las leucinas de esa región con la proteína. Algo similar es lo que ocurre en la asociación de los derivados 7 y 8, donde por efectos de la epimerización se produce un desplazamiento del ligando en el sitio activo y también la conformación del *M-loop* en el complejo de EP8 varía. Además, se observó que parte de los contactos importantes entre el ligando y la proteína se ve desfavorecida, dentro de estas las interacciones entre el residuo de Asp226, Gln281 y Thr276 con los grupos C7-OH, C3-OH y con el nitrógeno del anillo de piridina de la cadena lateral del ligando. En el último de los casos donde existe un cambio en la estereoquímica en C12, EP11 correspondiente al ligando que presenta el grupo metilo

se posicionó de manera similar en el sitio activo a su análogo no metilado. En cuanto a las interacciones, EP11 en el complejo está en contacto con los mismos residuos proteicos, orientando el grupo metilo hacia fuera de la cavidad desfavoreciendo contactos de tipo hidrofóbico en el complejo.

En un último lugar, se analizó el efecto de la modificación de la región del epóxido en C12. Se estudiaron dos casos, primero la sustitución del anillo epóxido por uno ciclopropano y en el segundo la sustitución de un anillo ciclopropano por uno ciclobutano. Los resultados de DM obtenidos para analizar la sustitución del anillo epóxido, indicaron en ambos casos que los complejos no sufren cambios en cuanto a la posición u orientación del ligando ni a la conformación de la proteína. Las principales interacciones son mantenidas en los complejos que poseen el anillo ciclopropano. Sin embargo, la presencia del ciclopropano favorece las interacciones del tipo hidrofóbicas que puede tener la región de C12 de los ligandos debido al entorno proteico de esa zona (FIGURA 36).

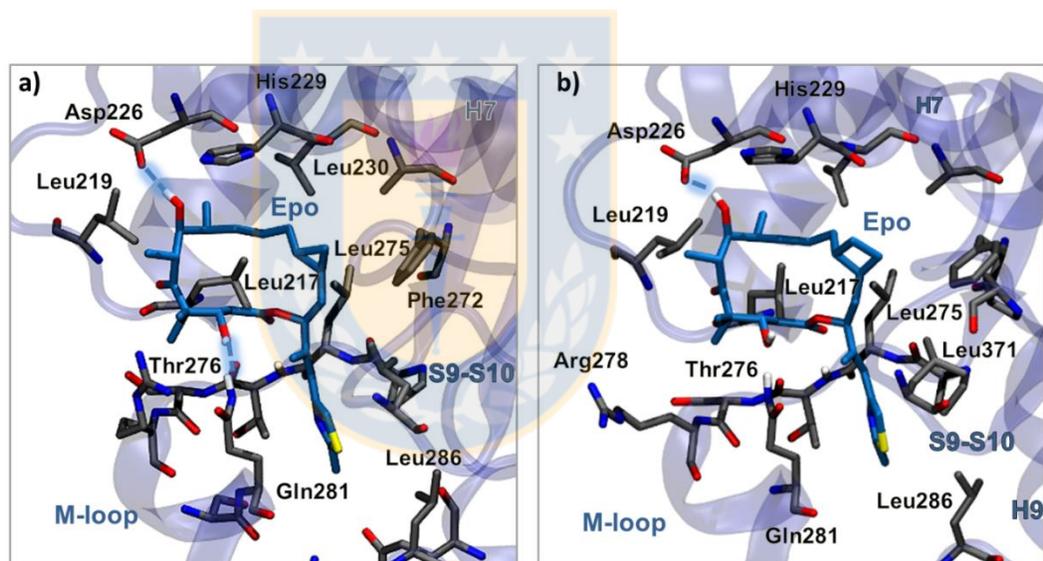


Elaboración propia

FIGURA 36. Representación de los modos de asociación de EPA (color azul) y EP14 (color gris), obtenidos por DM y donde existe la modificación del anillo epóxido por uno ciclopropano.

En cuanto a la sustitución del anillo ciclopropano por un ciclobutano, existe un desplazamiento de EP15 en el sitio activo en comparación a EP5 (FIGURA 37). Los resultados indican además que los residuos de la región donde ocurre la asociación también se desplazan provocando que la cavidad este más expuesta al solvente. Esto a diferencia de lo observado en EP5 que corresponde a la que posee el anillo ciclopropano, y que implicaría un debilitamiento de las interacciones que se presentan en dicho complejo. Por su parte, experimentalmente el grupo de Canales[32] encontró que la afinidad de los derivados aumentó por la

introducción del grupo ciclopropano pero esta disminuía al aumentar el tamaño del anillo, es decir, cuando la sustitución fue por el anillo ciclobutano. Es así como las simulaciones dan cuenta de lo reportado experimentalmente, permitiendo ver el detalle de como las distintas modificaciones estructurales en una serie de derivados afecta a la asociación.

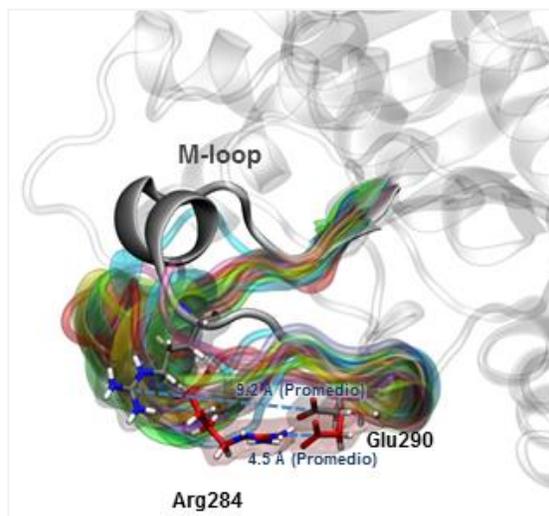


Elaboración propia

FIGURA 37. Modelos de asociación epotilona–tubulina, donde existe una sustitución del grupo a) ciclopropano (EP5) por el b) ciclobutano (EP15) en la estructura del ligando.

6.4 Estructura y dinámica del dímero de tubulina

Finalmente, se analizaron los cambios en la estructura del dímero de tubulina debido a la asociación a las epotilonas. Los resultados indican grandes diferencias en la conformación del *M-loop* entre la tubulina libre y complejada para la serie de 20 derivados de las epotilonas estudiadas (FIGURA 38). En el caso de la tubulina libre, el *M-loop* adopta una posición más cerrada al sitio activo a diferencia de lo observado en los complejos, ya que el *M-loop* tiende a abrirse de manera de mejorar la asociación receptor-ligando. Esto es principalmente debido al establecimiento de un puente salino entre los residuos Arg284 y Glu290, el cual fue observado en la mayoría de los complejos con los derivados de la epotilonas y no en la tubulina libre. Estos residuos se encuentran en la parte inferior del *M-loop*. Además, cabe destacar que el residuo de Leu275 forma un enlace de hidrógeno con Gln294, como así también entre los residuos Ser280 y Arg284 y se observaron interacciones hidrofóbicas entre Leu275 del *M-loop* y Leu217 de la hélice H6, interacciones que también han sido reportados en la estructura cristalina citada previamente.



Elaboración propia

FIGURA 38. Efecto de la asociación en el *M-loop* de la tubulina en la tubulina libre y en asociación a los distintos derivados. La representación gris corresponde a la tubulina libre.

Para examinar los cambios locales en la tubulina como consecuencia de la asociación con epotilonas, fueron realizados cálculos de RMSF para cada residuo. Esto permitió determinar las regiones que presentan mayor variación en la flexibilidad al comparar la tubulina en estado libre y en los distintos complejos. Por lo tanto, fueron calculados Δ RMSF para β -tubulina que corresponde al monómero que está directamente interaccionando con el ligando y para la α -tubulina. La FIGURA 39 compara las fluctuaciones relativas de los residuos de β -tubulina en los distintos complejos con las epotilonas. En vista de los resultados, los

complejos de tubulina adoptan un comportamiento dinámico muy diferente en comparación con la tubulina no asociada. Los mayores cambios en la flexibilidad fueron observados en el sitio activo, donde se produce la interacción epotilona-tubulina. Los residuos Pro37, Ser38, Asp39, Lys40, Thr41, Ile42, Gly43-44, Arg47, Ser48, Ala58, Pro175, Gly246 y Ala281 corresponden a los de mayor flexibilidad. Gran parte de estos residuos se encuentran en el extremo negativo de la tubulina, región de interface en donde la α -tubulina interactúa con los consecutivos monómero a lo largo del protofilamento. Gran parte de los resultados mostrados y discutidos en este capítulo se encuentran en un artículo publicado en el año 2017[66].

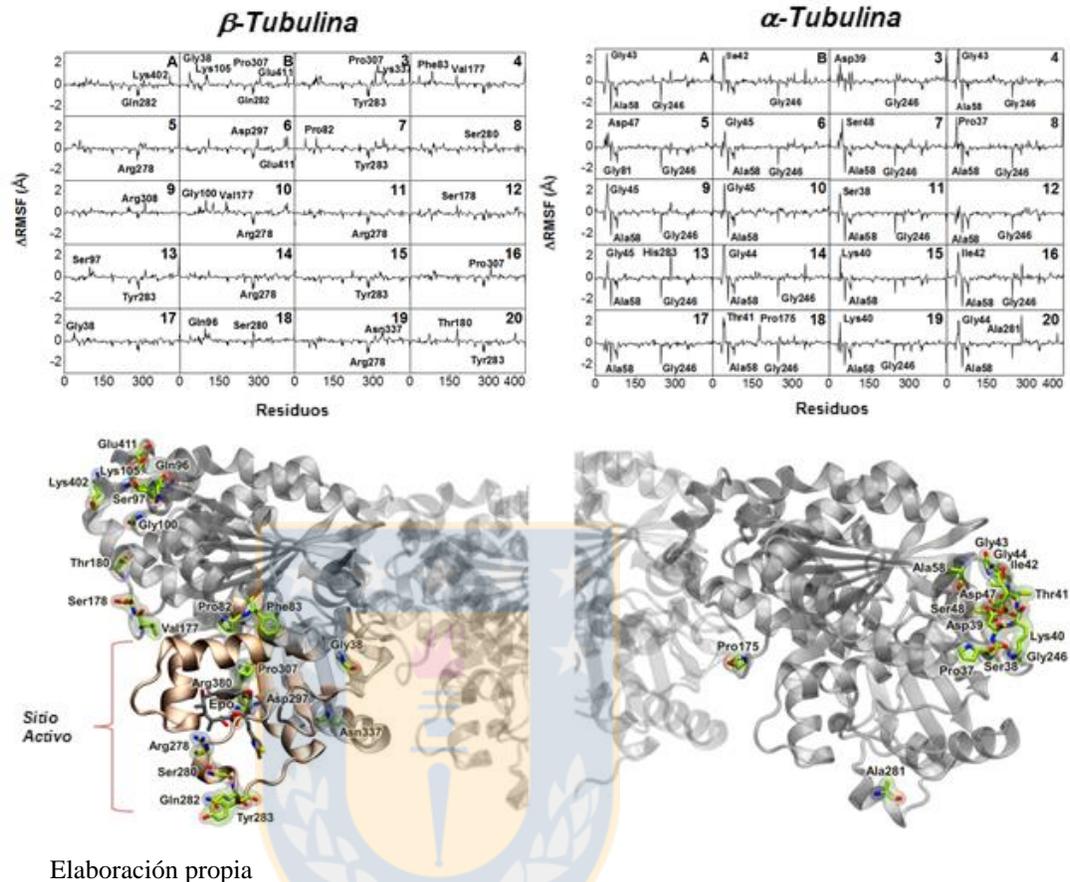


FIGURA 39. a) Diferencias de RMSF en angström (Å) entre la estructura de β -tubulina pertenecientes a los distintos complejos con epotilonas y en su estado libre. Los residuos destacados corresponden a los de mayor flexibilidad. b) Representación de la α -tubulina, en la cual se incluyen los residuos de mayor flexibilidad con relación a los datos de RMSF obtenidos.

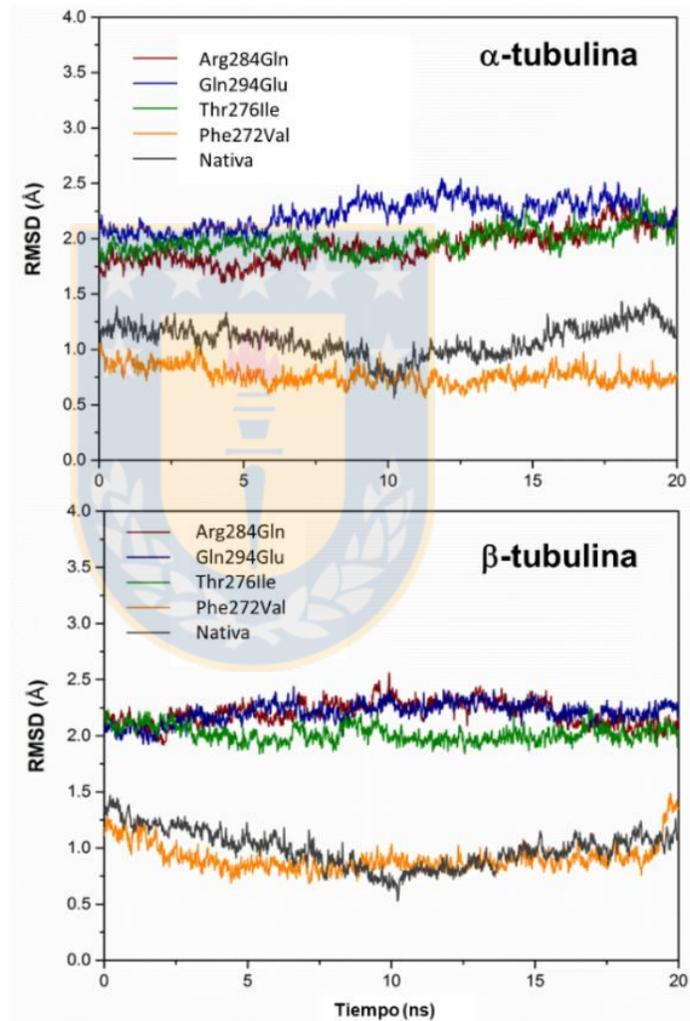
Los resultados obtenidos permitieron establecer que se producen cambios conformacionales en las epotilonas por efectos de la asociación, restringiéndose su libertad conformacional en los complejos con tubulina. Además, se comprobó que existen conformaciones

comunes entre las epotilonas activas libres y cuando interaccionan con tubulina, lo que sugiere que las epotilonas activas son capaces de someterse a una preorganización conformacional adecuado cuando están en el estado libre, correspondiente a la conformación bioactiva que las epotilonas inactivas son incapaces de adquirir. En cuanto a la asociación cabe destacar que en la interacción epotilona-tubulina los residuos de tubulina claves y comunes en todos los sistemas analizados correspondieron a Leu217, Leu219, Leu230, Leu233, Leu272, Leu275 y Leu371, Asp226, His229, Pro274, Thr276 y Gln281 y que el *M-loop* experimenta cambios conformacionales debido a la asociación. Por su parte, los ligandos ocuparon regiones similares en el sitio de asociación comparada con lo observado en la estructura cristalográfica, pero exploran la cavidad de una manera única y cualitativamente diferente. Finalmente, cabe destacar que el efecto de las modificaciones analizadas en distintas regiones de la estructura de las epotilonas fue variado, destacando el efecto de la epimerización de C15S a C15R en el cual fue observado un cambio en la orientación de la cadena lateral que no fue favorable para la asociación.

7. EFECTOS DE MUTACIONES EN LA ASOCIACION DE EPOTILONA B

Se estudiaron las propiedades dinámicas y estructurales de la tubulina nativa y mutada en complejo con EPB. Con este análisis se buscó proporcionar información estructural en relación con la resistencia a fármacos dada por mutaciones de tubulina, cuyos resultados fueron presentados en un artículo[67] y se discutirán más detalladamente a continuación. La FIGURA 40, muestra los RMSD para la α - y β -tubulina nativa y sus mutantes Phe272Val, Thr276Ile, Arg284Gln y Gln294Glu, obtenidos a partir de 20 ns de la dinámica de producción de complejos EPB-tubulina. Los valores de RMSD se calcularon a lo largo de la trayectoria con respecto a la estructura promedio del complejo EPB-tubulina nativa. De acuerdo a los resultados, la proteína experimenta grandes desplazamientos en comparación a tubulina nativa como consecuencia de las mutaciones con la excepción de la mutante Phe272Val. En este caso la proteína mutada presentó un perfil de RMSD muy similar en comparación a la proteína nativa, este efecto ha sido reportado debido a que esta mutante presenta un menor efecto de resistencia de los fármacos (TABLA 4). Es importante notar que las dos

subunidades del dímero de proteína exhiben desplazamientos similares, indicando que los efectos de cambios estructurales debido a las mutaciones se distribuyen en una amplia región de la proteína.



Elaboración propia

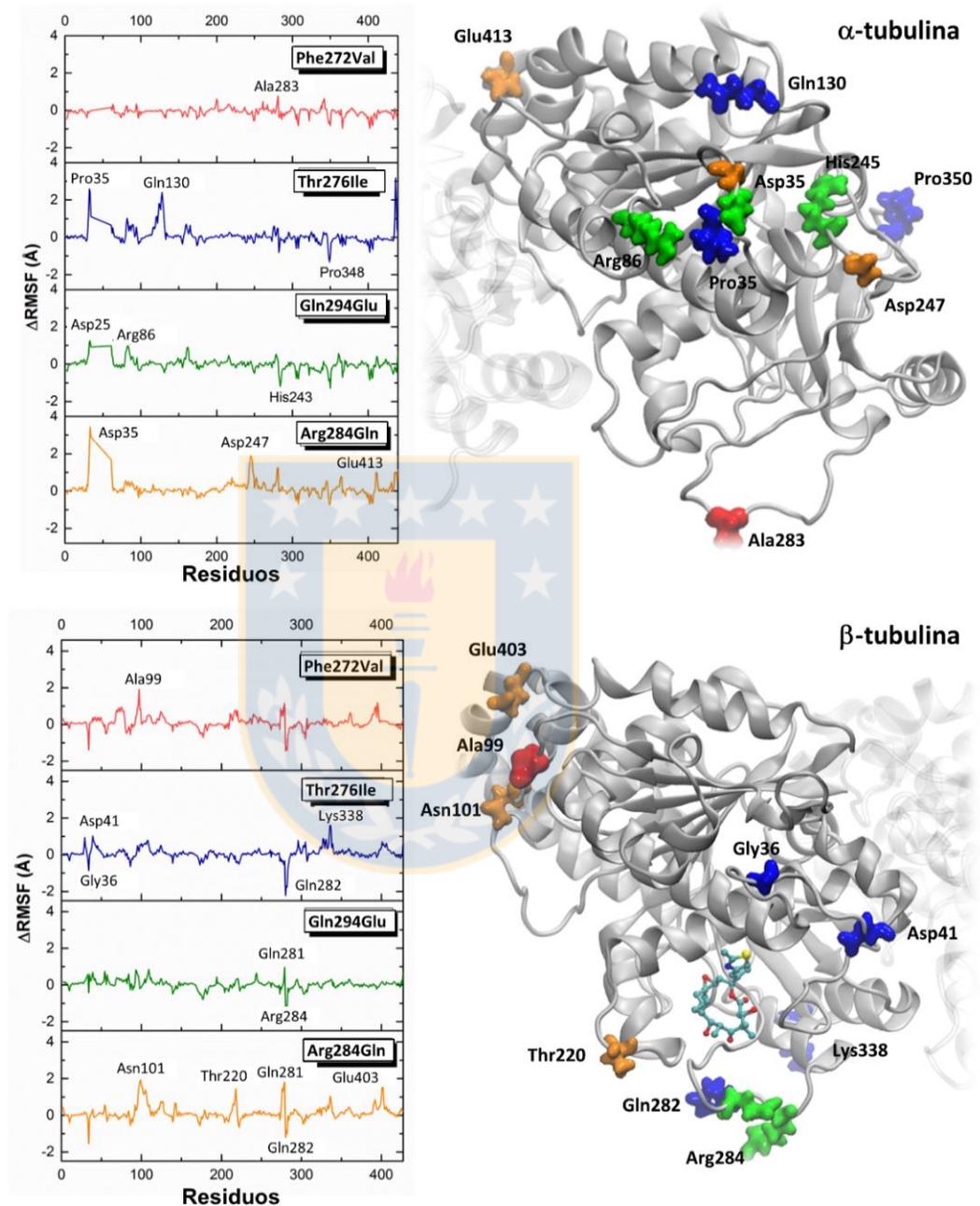
FIGURA 40. RMSD (Å) para las estructuras de los complejos en asociación a EPB con tubulina nativa y mutada obtenida a partir del análisis de la trayectoria de la dinámica de producción de 20ns. Todas las mutaciones fueron realizadas en la β -tubulina.

TABLA 4. Factores de resistencia de fármacos, definidos como el valor de IC50 obtenidos para la línea mutante de β -tubulina dividido por el obtenido por la línea parental[68, 69].

Droga	Mutación			
	Phe272Val	Thr276Ile	Arg284Gln	Gln294Glu
EPA	8.9	40	57	72
EPB	2.8	25	24	95

Elaboración propia

Los cambios conformacionales locales debido a las mutaciones fueron analizados realizando cálculos de RMSF por residuo (Δ RMSF), considerando como referencia una estructura representativa de tubulina nativa. Los cálculos de Δ RMSF informan el grado de movimiento de cada C α alrededor de su posición promedio en las β -tubulinas mutadas comparadas con el movimiento observado en la estructura nativa, de forma tal que mayores valores de Δ RMSF corresponden a regiones de la proteína que se hacen más flexibles a consecuencia de las mutaciones, mientras que las regiones de bajo Δ RMSF corresponden a las más restringidas conformacionalmente. De acuerdo a estos resultados las mayores fluctuaciones se produjeron en las regiones de tubulina donde se producen contactos interdimeros o en el sitio de unión a EPB (FIGURA 41).



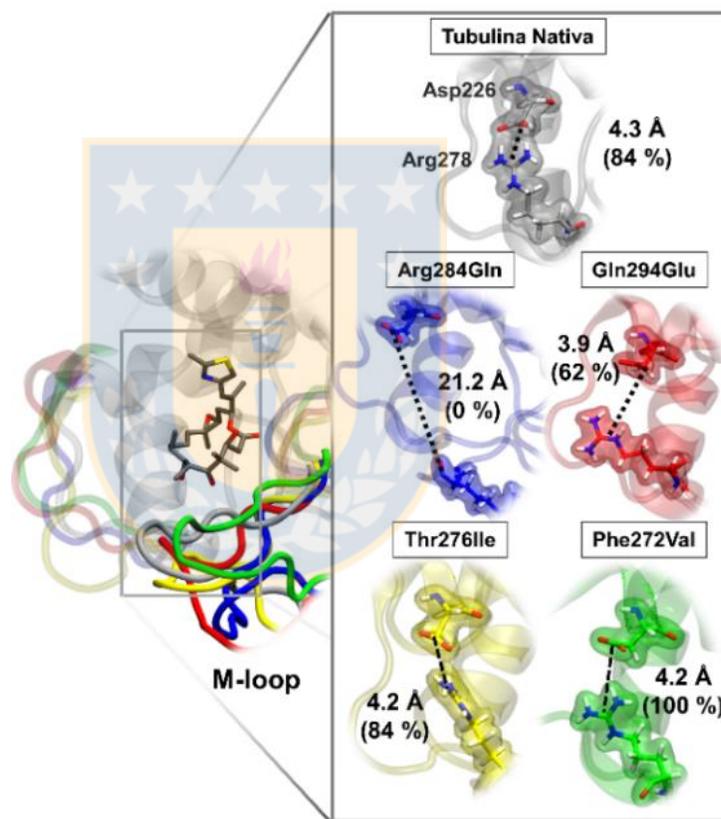
Elaboración propia

FIGURA 41. ΔRMSF (\AA) para las estructuras de los complejos en asociación a EPB con tubulina nativa y mutada obtenida a partir del análisis de la trayectoria de la dinámica de producción de 20ns. En la figura se indican con color los residuos de mayor cambio en la flexibilidad como consecuencia de las mutaciones.

En particular, el *M-loop* de la β -tubulina experimenta una gran variación de la fluctuación en las mutantes Thr276Ile, Arg284Gln y Gln294Glu, lo que sugiere que estos residuos mutados son críticos para que el *M-loop* mantenga su conformación de una forma adecuada de manera de permitir la asociación eficaz con el ligando. Por otra parte, la mutación Phe272Val no influye en cambios importantes de la flexibilidad del *M-loop*, pero si en las regiones donde se producen interacciones laterales a lo largo de los protofilamentos. Por lo tanto, dichos resultados sugieren que los cambios en RMSD y RMSF inducidos por las mutaciones puntuales en tubulina pueden estar relacionadas con la resistencia a fármacos alterando la conformación y dinámica de las regiones de la proteína que están implicadas en la efectiva asociación del ligando y en el ensamblaje de los MT. Una comparación estructural más detallada del sitio de asociación entre los complejos de EPB y sus derivados con tubulina mutada se observa en la FIGURA 42. La figura destaca los cambios conformacionales que se produjeron en la región del *M-loop* de la tubulina por efectos de las mutaciones, el cual adopta una orientación más hacia el interior de la cavidad de asociación en los complejos con la proteína nativa y en mutante Phe272Val. Además, se observó una

fuerte interacción electrostática durante la simulación en los complejos de tubulina nativa y en las mutantes Phe272Val y Thr276Ile, el cual incluye las cadenas laterales de los residuos Arg278 y Asp224, y mantienen distancias promedio de 3.9-4.3 Å en un 84-100 % de la trayectoria de DM. Esta interacción se encontró que es menos significativa en la mutante Gln294Glu (62 %) y no fue observada en la estructura del complejo de la mutante Arg284Gln (0%). Para corroborar si se producen cambios indicados en el sitio de asociación de la eptilonas se llevaron a cabo DM de 20 ns también sobre la estructura de la tubulina nativa. Los resultados indicaron la inexistencia de la interacción electrostática entre los residuos Arg278 y Asp226 en todas las estructuras equilibradas. Esto sugiere que el *M-loop* sufre una reorganización conformacional al asociarse a la EPB. Teniendo en cuenta que el *M-loop* no sólo es relevante para el sitio de asociación de eptilonas, sino que también participa en los contactos laterales interdiméricos que confieren estabilidad a los MT, la información obtenida demuestra que la interacción intra-proteína entre los residuos Arg278 y Asp226 se podría considerar relevante al igual que la existente entre Arg286 y Glu292 observada en los complejos eptilona-tubulina

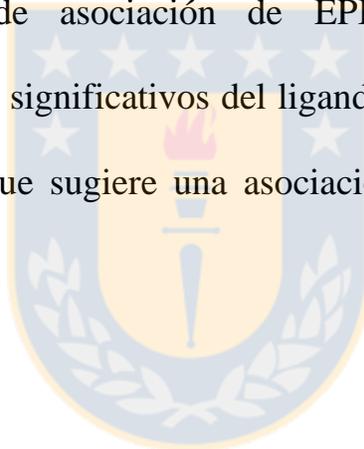
de la serie de 18 derivados estudiados anteriormente. Esto permitiría que se produzca una asociación eficaz del ligando y la correcta estabilización del *M-loop* de manera que adquiera una conformación para favorecer la polimerización de tubulina en MT estables.

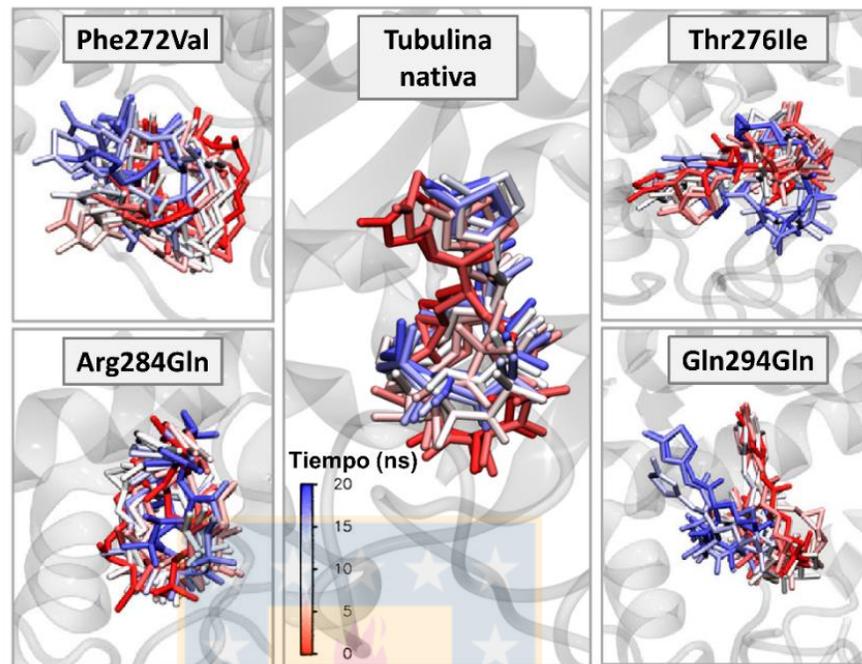


Elaboración propia

FIGURA 42. Comparación de la región perteneciente al *M-loop* de las estructuras representativas de los complejos EPB-tubulina nativa y sus derivados mutantes. El porcentaje indica la presencia de la interacción electrostática entre los residuos Arg278 y Asp226 a lo largo de las trayectorias de las dinámicas de producción.

En cuanto al sitio de asociación, la FIGURA 43 muestra la evolución temporal de la ubicación del ligando a lo largo de la dinámica de producción en complejo con tubulina nativa y en las mutantes Arg284Gln, Gln294Glu, Thr276Ile y Phe272Val. De acuerdo a los resultados, el ligando adopta distintas orientaciones dentro de la cavidad proteica, lo que sugiere una gran influencia de las mutaciones puntuales en el modo de asociación de EPB. Además, se observaron desplazamientos significativos del ligando en Gln294Glu, Thr276Ile y Phe272Val lo que sugiere una asociación menos efectiva que en la tubulina nativa.

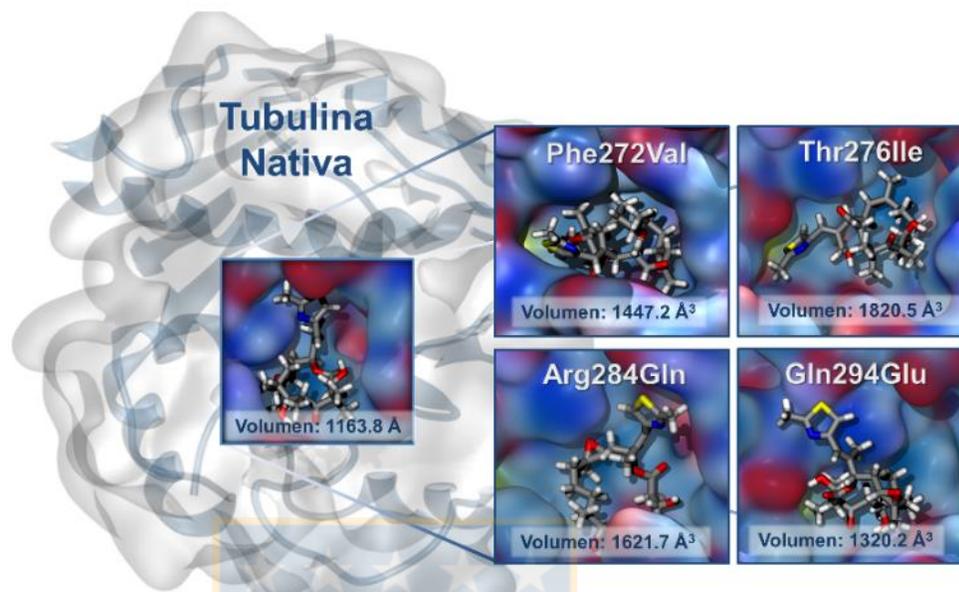




Elaboración propia

FIGURA 43. Estructuras del sitio de asociación de los complejos epotilona B-tubulina superpuestas para tubulina nativa y mutadas, en donde se muestra el tiempo de evolución de la posición de los ligandos a lo largo de la dinámica de producción de 20 ns.

Se analizó también el cambio en volumen de la cavidad del sitio activo. Los resultados indicaron que existen cambios por efectos de las mutaciones ya que en todas estas la cavidad del sitio de asociación del receptor experimenta un notable aumento del volumen en comparación a la proteína nativa como se observa en la FIGURA 44.



Elaboración propia

FIGURA 44. Volumen calculado del sitio de asociación para los complejos de EPB-tubulina formando con tubulina nativa y sus derivados mutantes.

Para analizar cómo al aumento en el volumen la cavidad del sitio activo de la tubulina afecta a la asociación, fueron identificados los residuos que son parte del sitio activo de la proteína. La FIGURA 45 muestra un resumen grafico de los residuos del sitio de asociación identificados para los complejos de EPB-tubulina nativa y sus variantes mutantes. Los residuos de la proteína considerados como parte del sitio activo fueron aquellos que permanecieron a distancias menores de 4.0 Å desde el ligando en más de un 50 % de la trayectoria de DM. En la figura los

recuadros negros representan las interacciones que se observaron en más de un 75 % de la simulación, mientras que los recuadros grises representan las interacciones que se observaron entre un 50 a 75% de la trayectoria. En general, los resultados indican que las tubulinas mutadas establecen menos contactos polares con el ligando en comparación a la proteína nativa. Esto en particular en la región comprendida entre los residuos Lys119 y Glu27, mientras que la mayoría de las interacciones apolares fueron retenidas en los complejos de EPB con tubulina mutada. Por lo tanto, la pérdida de interacciones polares favorables sobre la proteína con mutaciones podría ser una consecuencia del aumento del volumen de la cavidad donde ocurre la interacción con el ligando, lo que a su vez podría estar relacionado con la resistencia a los fármacos debido al debilitamiento de las interacciones fármaco-receptor responsables de la formación eficaz de los complejos.

RESIDUOS POLARES						RESIDUOS APOLARES					
Residuo	Nativa	R284Q	Q294E	T276I	F272V	Residuo	Nativa	R284Q	Q294E	T276I	F272V
21 LYS						25 VAL					
23 GLU						217 LEU					
28 ASP						219 LEU					
29 GLU						227 LEU					
216 THR						230 LEU					
218 LYS						233 ALA					
222 PRO						272 PHE					
226 ASP						275 LEU					
229 HIS						279 GLY					
234 THR						286 LEU					
274 PRO						362 GLY					
276 THR						363 LEU					
277 SER											
278 ARG											
280 SER											
283 TYR											
284 ARG											
360 PRO											
361 ARG											
366 SER											

Elaboración propia

FIGURA 45. Gráfico resumen de los residuos pertenecientes al sitio de asociación identificados para los complejos de EPB con tubulina nativa y mutadas. Los recuadros negros representan las interacciones existentes en más de un 75% de la trayectoria de DM mientras que los recuadros grises representan las interacciones existentes entre un 50 y 75% de la trayectoria de las simulaciones.

Por último, estructuras representativas de los complejos de EPB con tubulina nativa y mutadas son mostradas en la FIGURA 46, donde se observan los detalles de la interacción proteína-ligando. En el caso de la tubulina nativa con EPB, cuya asociación ya había sido descrita en el

primer apartado de resultados, el anillo epóxido de la epotilona está cercano a los residuos de Leu230 y Phe272 y el grupo metilo de C12 participa de contactos hidrofóbicos con la cadena lateral de Leu230. En este modelo se observó un enlace de hidrógeno entre los residuos de Asp226, Thr276 y Gln281 con los grupos C7-OH , C1-CO y C3-OH del ligando que coincide con lo reportado previamente en modelos farmacóforos [68]. En el caso de la tubulina con mutación Phe272Val fueron encontrados contactos apolares entre el grupo metilo de C4, C6 y C12 con los residuos Leu230-Leu275, Ala233 y Leu363. En este caso la cadena lateral del anillo tiazólico se encuentra en una posición más expuesta al solvente donde el grupo carbonilo de C1 forma un enlace de hidrógeno con Gly280. En el caso de la mutante Thr276Ile, el anillo epóxido está posicionado en una región comprendida entre los residuos Ala233 y Phe272, donde la cadena lateral del anillo tiazólico del ligando está rodeado por los residuos polares Arg278, Asp226 y Lys218. El grupo C1-CO interactúa con la cadena lateral de His229, el grupo C3-OH del ligando forma un enlace de hidrógeno con el grupo carbonilo de Arg278 y el grupo C7-OH del ligando interactúa con el residuo de Arg361. En el caso de la mutante Arg284Gln el átomo de oxígeno del

anillo epóxido interactúa con los residuos apolares Leu217 y Leu219, donde los grupos metilos de C4 están en contacto con la cadena lateral de Leu363. Este modelo preserva la interacción entre el residuo Thr276 y la región entre C5-C7 del ligando, como es observado en el complejo con tubulina nativa, donde la cadena del anillo tiazólico participa de contactos polares con los residuos de Arg361 y Asp28. Finalmente, en el caso de la mutante Gln294Glu la cadena lateral del anillo tiazólico y el anillo epóxido están considerablemente más expuestos al solvente en comparación a la estructura del ligando con tubulina nativa, revelando una asociación menos efectiva del ligando lo que podría estar relacionado con la mayor resistencia de fármacos inducida por la mutación Gln294Glu. En este modelo el grupo carbonilo de C1 del ligando interacciona con el grupo guanidinio del residuo Arg278. El grupo C3-OH interactúa con la cadena lateral de Asp226 y la región de C5-C7 del ligando interactúa con los residuos Arg278 y Ser277. Además, los grupos metilos de C4 participan de contactos apolares con Leu219, Leu230 y Leu275. Por lo tanto, los resultados antes mencionados nos revelan que estas mutaciones en la estructura de la tubulina producen marcados efectos en la asociación de la epotilona que

lo podría estar relacionado con la resistencia a fármacos debido a una interacción más débil del ligando en la formación de los complejos.

La información obtenida de los análisis realizados indicó que la tubulina experimenta cambios conformacionales y en la movilidad como consecuencia de las mutaciones. Las regiones de mayor fluctuación o movilidad en comparación a estructura de la tubulina nativa corresponden al sitio donde ocurren la asociación con el ligando y los contactos interdimeros, destacándose la región del *M-loop* que es importante para la interacción epítolona-tubulina. Estos cambios a su vez se vieron reflejados en diferencias en el volumen de la cavidad de sitio de asociación de tubulina nativa en comparación a las correspondientes mutantes, y por lo tanto a propia asociación, y pueden estar relacionado con la resistencia a los fármacos debido al debilitamiento de las interacciones fármaco-receptor responsables de la formación eficaz de los complejos.

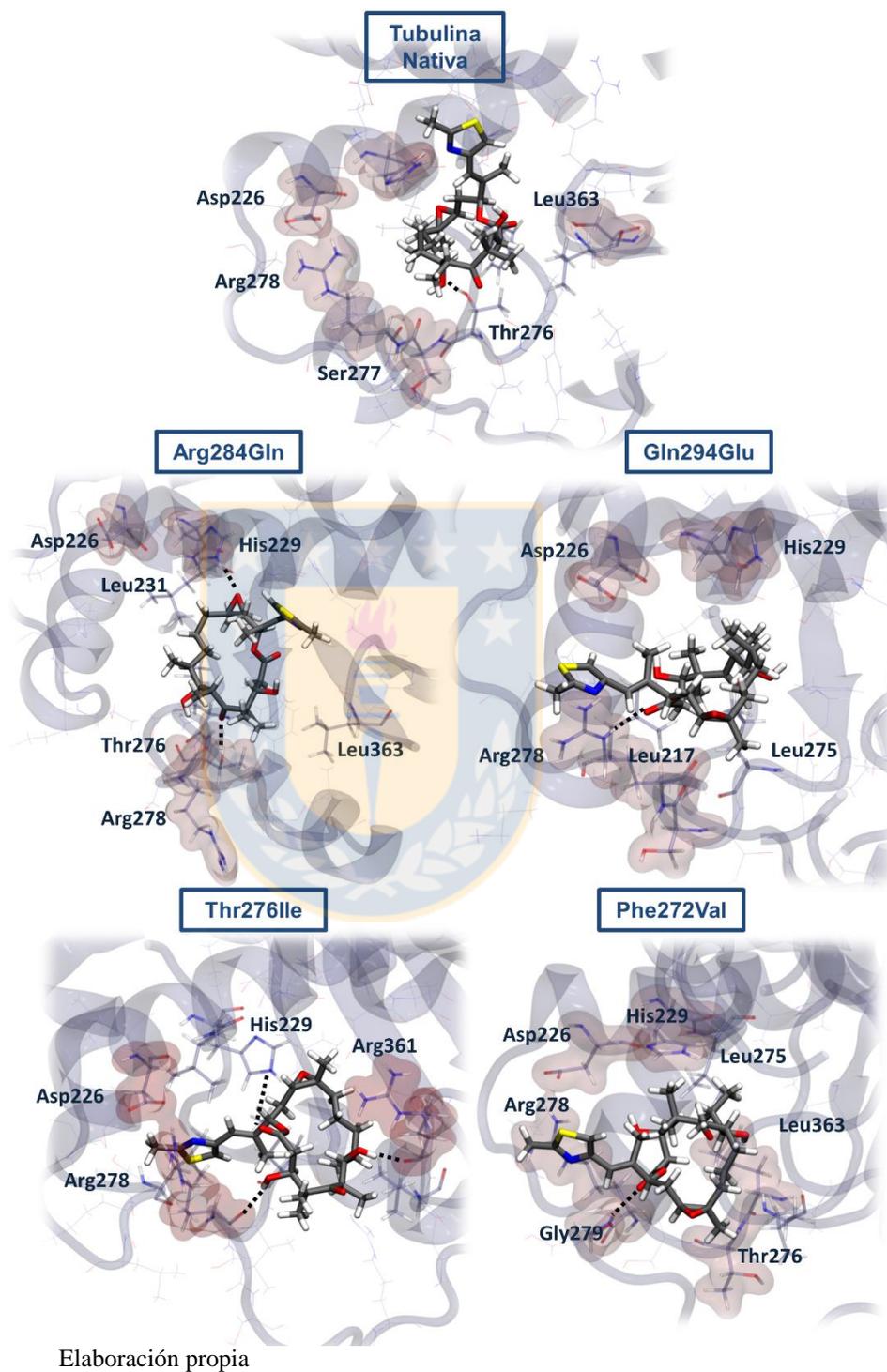


FIGURA 46. Representaciones de la asociación de EPB con tubulina nativa y mutadas.

8. SCREENING VIRTUAL

Para realizar la búsqueda de nuevos compuestos estabilizantes de la polimerización de tubulina fue seleccionada la estructura representativa del complejo de EPB-tubulina obtenido de DM. Dicho modelo para la tubulina fue originado desde la estructura cristalográfica de la proteína RB3-estamina, y tubulina tirosina ligasa en presencia de EPA (PDB 4I50). De la estructura representativa del complejo EPB-tubulina solo fue utilizado el monómero de β -tubulina, debido a que el sitio de asociación se encuentra en esa región y a que los procedimientos de SV se centran solo en el lugar donde ocurre la asociación del receptor.

8.1 Selección de algoritmo de *docking* molecular

La primera etapa dentro del procedimiento de SV consistió en seleccionar el algoritmo de *docking* entre dos programas gratuitos ampliamente utilizados: Autodock4 (AUTODOCK) y VINA, que se diferencian básicamente en la parametrización de la función de *scoring*

[52, 56]. Para ello, se evaluó capacidad de ambos métodos para reproducir las conformaciones cristalográficas de los ligandos en el sitio de asociación, considerando las estructuras 1TVK y 4I50. Las pruebas fueron realizadas considerando la estructura de la proteína rígida, permitiendo solo la flexibilidad del ligando. Los resultados (FIGURA 47) muestran que ambos programas reproducen exitosamente la estructura del complejo descrito en el modelo 4I50, mientras que para el modelo 1TVK la posición y conformación del ligando obtenido del *docking* es distinta de la conformación cristalográfica (RMSD 6.345Å). Estos resultados demostraron la importancia de la selección de la estructura del receptor. Finalmente se testeó la estructura del complejo EPB-tubulina obtenido de las simulaciones de DM, resultando que con ambos algoritmos de *docking* la conformación resultante del ligando corresponde a la del modelo obtenido por DM. Dado que los dos algoritmos mostraron resultados similares, se decidió seguir adelante con el algoritmo de menor costo computacional, es decir, VINA, que presenta una aceleración de aproximadamente dos órdenes de magnitud en comparación con el programa AUTODOCK, lo cual es una gran ventaja al momento de evaluar base de datos de millones de compuestos.

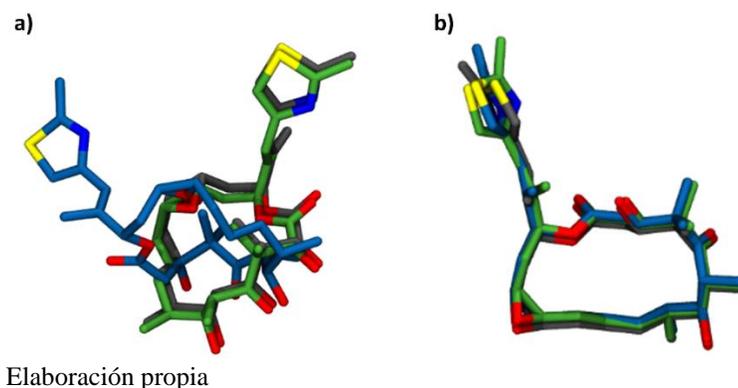


FIGURA 47. Resultados de docking de las estructuras cristalograficas de a)1TVK y b) 4I50, donde el color azul representa a la estructura original, verde conformación obtenida de VINA y gris de AUTODOCK.

Otro método de validación realizado fue la utilización de un conjunto de compuestos que consideran ligandos activos frente a tubulina (TABLA 5) y *decoys*, con el fin de comprobar que el algoritmo seleccionado puede diferenciar entre compuestos activos e inactivos. Los *decoys* son moléculas que poseen propiedades físicas similares a los compuestos activos, pero difieren significativamente en su estructura por lo que se presumen inactivas contra un determinado receptor y son utilizados para validar el rendimiento de un *docking* molecular o SV[70–73]. Para esta validación del protocolo SV, se obtuvo una base de datos formada por 53 compuestos entre activos y *decoys*, a partir de la base de datos ZINC utilizando el programa DecoyFinder[74].

TABLA 5. Propiedades fisicoquímicas de compuestos activos a β -tubulina utilizados para filtrar moléculas *decoys*.

Propiedad	Mínimo	Máximo
Masa molar	300	800
LogP	2.1	7.4
Aceptores de enlaces de hidrogeno	3	14
Donantes de enlaces de hidrogeno	0	5
Numero de enlaces rotables	2	13
Área superficial polar molecular	30	224

Elaboración propia

Los resultados de SV utilizando la librería que contiene compuestos activos y *decoys* son mostrados en la TABLA 6. Estos corroboran la correcta elección de la estructura de tubulina obtenida por DM para la realización del SV, ya que el programa logra identificar a los cuatro compuestos activos dentro de los ligandos con mayor afinidad por dicho receptor. Estos están dentro de los diez compuestos de mayor score, en comparación a los resultados obtenidos por la estructura cristalográfica donde solo uno se encuentra en el *top diez*.

TABLA 6. Resultados de *docking* molecular del conjunto de compuestos activos y decoys realizados utilizando distintas estructuras de β -Tubulina, donde corresponde a TXL a docetaxel, TA1 a taxol y D a decoys.

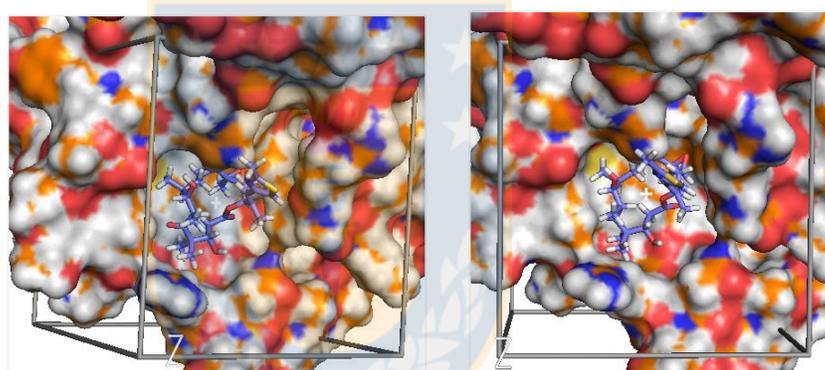
Estructura de β -Tubulina	DM		Cristalográfica (4I50)	
	Ligando	Score	Ligando	Score
Resultados	EPB DM	-9.7	D1	-9.2
	EPA DM	-9.5	D2	-8.6
	D1	-9.2	D3	-8.4
	D2	-8.7	D7	-8.4
	D3	-8.5	D4	-8.3
	D4	-8.5	TXL	-8.2
	D5	-8.4	D5	-8.2
	TA1	-8.3	D8	-8.1
	TXL	-8.3	D11	-8
	D6	-8.3	D9	-8
	D7	-8.3	D15	-8
	D8	-8.2	D12	-7.9
	D9	-8.2	D13	-7.9
	D10	-8.2	D6	-7.8
	D11	-8.1	D16	-7.8
	D12	-8	D14	-7.7
	D13	-8	D10	-7.7
	D14	-7.9	EPB DM	-7.6
	D15	-7.9	D17	-7.6
	D16	-7.9	D22	-7.6
	D17	-7.8	TA1	-7.5
	D18	-7.7	D24	-7.5
	D19	-7.6	D20	-7.5
	D20	-7.6	D21	-7.5
	D21	-7.6	D18	-7.5
	D22	-7.6	D25	-7.5
	D23	-7.6	D23	-7.5
	D24	-7.5	EPA DM	-7.4
	D25	-7.5	D27	-7.4
	D26	-7.4	D28	-7.4
	D27	-7.4	D31	-7.4
	D28	-7.4	D29	-7.4
	D29	-7.4	D19	-7.3
D30	-7.3	D33	-7.3	
D31	-7.3	D34	-7.2	
D32	-7.3	D35	-7.2	
D33	-7.2	D30	-7.1	

D34	-7.1	D36	-7.1
D35	-7.1	D32	-7.1
D36	-7.1	D37	-7.1
D37	-7.1	D26	-7
D38	-7	D38	-7
D39	-6.8	D39	-6.8
D40	-6.7	D41	-6.7
D41	-6.7	D40	-6.6
D42	-6.6	D42	-6.5
D43	-6.6	D43	-6.5
D44	-6.5	D45	-6.3
D45	-6.3	D44	-6.3
D46	-6.3	D46	-6.2
D47	-6.2	D47	-6.1
D48	-5.9	D48	-5.8
D49	-5.6	D49	-5.6

8.2 – Screening virtual

Una vez seleccionado el algoritmo de *Docking* y la estructura de receptor, fue realizado el SV. En primer lugar, la estructura del receptor seleccionada fue procesada con el programa ADT con el cual fueron adicionadas las cargas tipo Gasteiger y tipo de átomos compatibles con el programa VINA utilizado para la realización del SV. Una vez preparada la estructura de β -tubulina, se analizó el ligando nativo en el sitio de asociación de manera de establecer las dimensiones de la caja donde ocurre la interacción receptor-ligando. La creación de la caja se llevó a cabo considerando un tamaño de puntos de grilla de $60 \times 60 \times$

60 en cada una de las tres coordenadas X, Y y Z, situándose centradas en el sitio de unión de EPB con un espaciado entre los puntos de 0.375 Å (FIGURA 48). Esto garantizó un volumen suficientemente grande como para acomodar ligandos de distintos tamaños, en la superficie del receptor.



Elaboración propia

FIGURA 48. Representación del sitio activo y la grilla considerado para la realización del SV.

La realización del SV se llevó a cabo considerando la estrategia mostrada en la FIGURA 49. En una primera parte fueron obtenidos los ligandos de la base de datos ZINC. De esta base de datos fue utilizado el paquete *Drug-like* que considera compuestos con masas molares entre

150 a 500 g/mol, $\log P \leq 5$, número de donantes de enlaces de hidrógenos ≤ 5 y un número de aceptores de hidrógenos ≤ 10 .

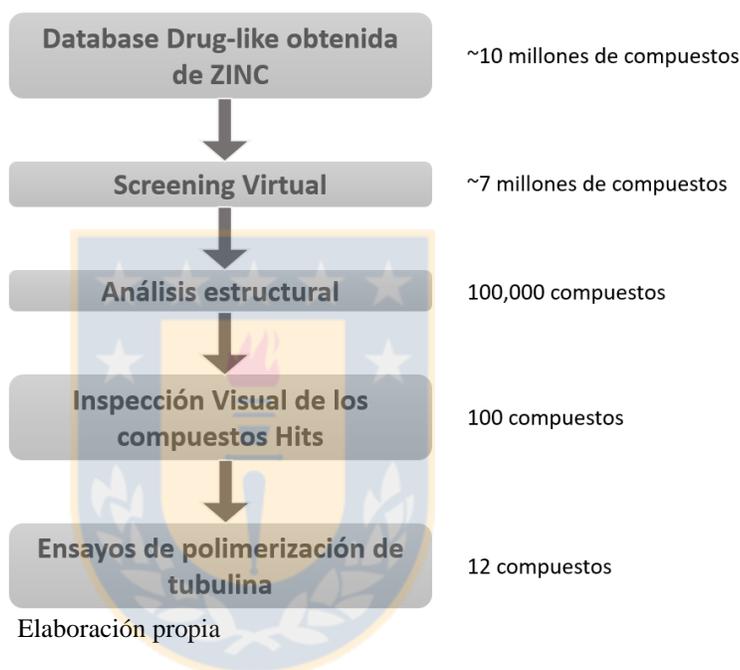


FIGURA 49. Diagrama de flujo de la estrategia *Screening Virtual* utilizado.

Con el fin de reducir el número inicial de compuestos, se filtraron según las siguientes propiedades; masa molecular entre 300-500 g/mol, $\log P \leq 5$, número de enlaces rotables ≤ 7 , área superficial polar 70-150 Å², número de aceptores de hidrógenos ≤ 5 y número de donantes de

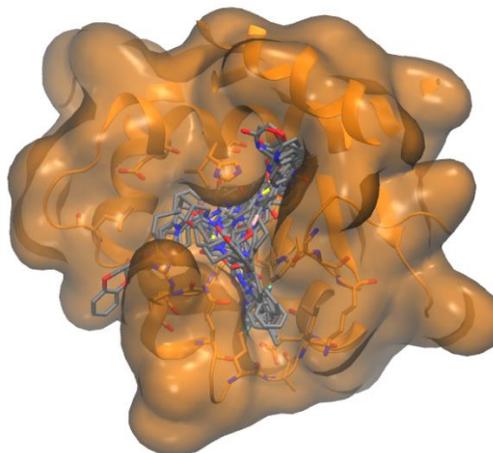
hidrógenos ≤ 10 . Con esto se redujo la base de datos de aproximadamente 10,000,000 compuestos a 7,000,000. Además, se decidió incluir compuestos de masa molar mayor a 500 g/mol debido a que gran parte de los ligandos afines a β -tubulina que se asocian en el denominado sitio del taxol poseen masa molar elevada. Para esto se realizó una búsqueda en la base de datos de ZINC obteniéndose una librería de 170,769 ligandos. Posteriormente los más de 7,000,000 de compuestos fueron preparados estableciendo las cargas tipo *Gasteiger* a todos los ligandos. Una vez procesados los ligandos se ejecutó el SV, obteniéndose la predicción de las conformaciones de asociación de cada ligando. A continuación, los resultados fueron analizados considerando los *scores* entregados por VINA, seleccionándose los 100,000 compuestos de mayor afinidad por tubulina. Se realizó un análisis estructural, clusterizando los ligandos seleccionados mediante herramientas online de *ChemMine tools*[75], el cual permitió agrupar los compuestos según su similitud estructural. Fue así como de los cien *cluster* más poblados y estructuralmente distintos se obtuvieron compuestos representativos con los cuales se realizó una inspección visual en el sitio de asociación. Finalmente se seleccionaron 12 ligandos

(FIGURA 50), los cuales presentan una gran afinidad por la β -tubulina teniendo energías de asociación entre -11.2 kcal/mol y -8.6 kcal/mol, mostrados en la TABLA 6. Cabe destacar que, aunque algunos de los compuestos analizados presentaron energías de asociación más altas que el ligando natural EPA (energías menores a -10.8 kcal/mol). No obstante, en la selección de compuestos se priorizaron aquellos estructuralmente distintos a los ya reconocidos como compuestos estabilizantes de tubulina.

TABLA 7. Score (kcal/mol) obtenido por VINA de los 12 ligandos seleccionados.

Ligando	Score (kcal/mol)
L1	-8.6
L2	-10.4
L3	-11.1
L4	-10.2
L5	-9.6
L6	-9.5
L7	-10.3
L8	-10.6
L9	-11.2
L10	-9.3
L11	-10.8
L12	-9.4

Elaboración propia

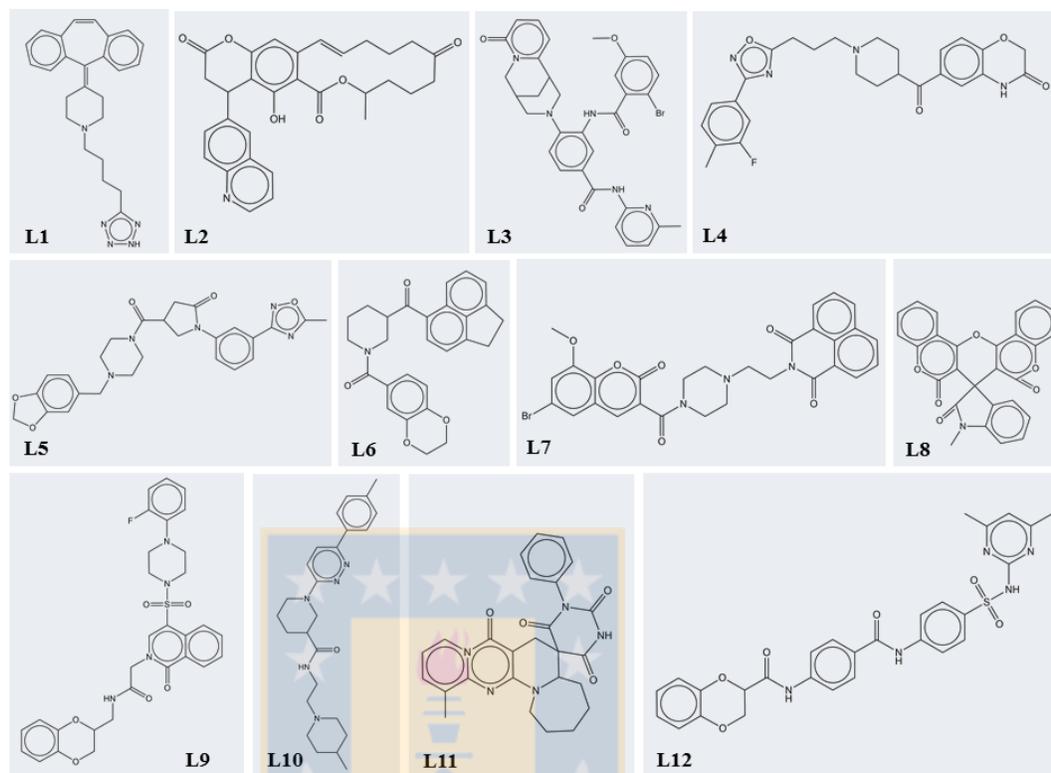


Elaboración propia

FIGURA 50. Resultados de SV de los 12 compuestos seleccionados.



Para confirmar el modo de asociación y analizar los detalles, fueron realizadas simulaciones de DM de los compuestos *hits* seleccionados que se muestran en la FIGURA 51. Estas simulaciones se realizaron considerando solvente explícito, el dímero de tubulina y las mismas condiciones que las realizadas para los sistemas epotilona-tubulina expuestos anteriormente.

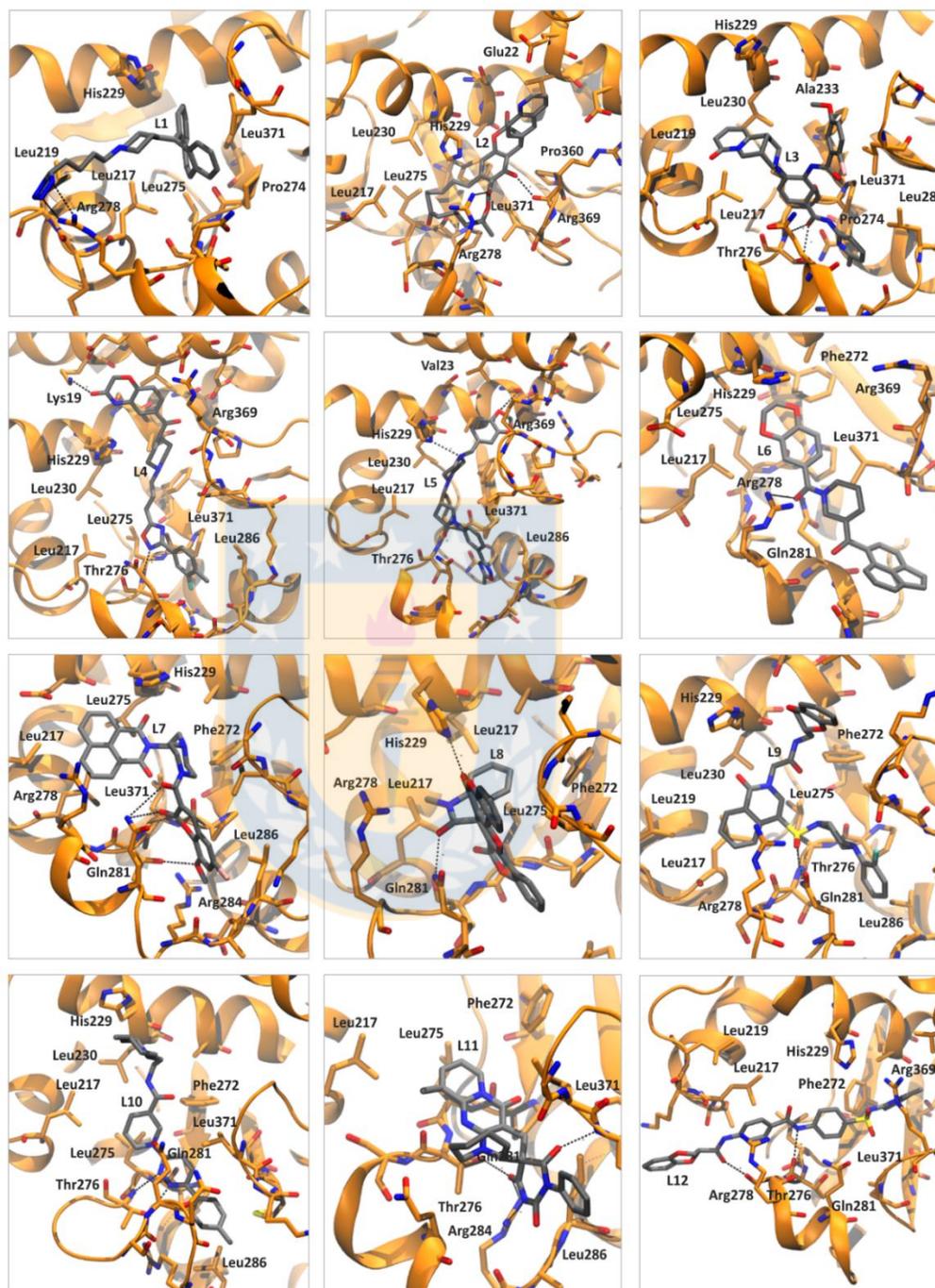


Elaboración propia

FIGURA 51. Compuestos *Hits* seleccionados del *Screening Virtual*.

Los resultados indican que cada uno de los compuestos mantiene una interacción estable en el sitio de asociación a lo largo de la DM (FIGURA 52). El anillo tetrazol de L1 interacciona con el residuo de Arg278 y mantiene interacciones hidrofóbicas con las leucinas del sitio activo. En el complejo de L2, los residuos de Arg278 y Arg369 interacciona con los grupos CO del macrociclo y OH del ligando. El

compuesto L3 presenta un enlace hidrógeno con el residuo de Thr276 de la proteína, al igual que el compuesto L4 que interacciona con dicho residuo y con Lys29. En el caso del complejo del compuesto L5 se observaron enlaces hidrógeno entre el residuo de His229 y Thr276 con el anillo del piperazina y con el grupo CO de otro de los anillos del ligando. El Ligando L6 interacciona con el residuo de Arg278, L7, L8 y L9 con el residuo de Gln281, además de los residuos de His229 con L8 y Thr276 con L9 y las leucinas Leu217, Leu219, Leu275 y Leu371 que constituyen la zona de interacción hidrofóbica de la proteína. Por último, se observó en los complejos de los ligandos L10, L11 y L12 enlaces hidrógeno entre el anillo de piperazina de L10, del grupo CO de L11 y NH de L12 con el residuo de Thr276. Por su parte el ligando L11 también presenta un enlace hidrógeno con Arg284 y L12 con Arg278. En general fue observado que los ligandos seleccionados del SV presentan algunas de las interacciones consideradas como relevantes en la interacción de las epotilonas con tubulina. Estos compuestos fueron sometidos a ensayos de polimerización de tubulina utilizando el kit de ensayo de polimerización de tubulina por fluorescencia, siguiendo el protocolo descrito en la sección de métodos y metodología.



Elaboración propia

FIGURA 52. Detalles de la interacción ligando-tubulina de los compuestos seleccionados del *Screening Virtual*, obtenidas mediante simulaciones de dinámica molecular.

8.4 Ensayos de polimerización de tubulina

Fueron realizados ensayos de polimerización de tubulina *in vitro* de los 12 compuestos hits seleccionados del SV siguiendo el procedimiento descrito en bibliografía (BK011P, Cytoskeleton, Inc) y detallado en el apartado Metodología y Métodos 4.3.1. Los compuestos *hits* fueron testeados a una concentración final de 3 μM . En resumen, la tubulina fue disuelta en el buffer 1 hasta una concentración de 10 mg/mL. A continuación, se preparó la mezcla de reacción de tubulina con 85 μL de la proteína, hasta una concentración final de tubulina 2 mg/mL y fue mantenida en hielo. Luego, 5 μL de los compuestos *hits* y de Taxol (utilizado como control positivo de promotor de polimerización de tubulina) se adicionaron a la placa de 96 pocillos. Es así como la polimerización de la tubulina fue iniciada pipeteando 50 μL de la mezcla de reacción de tubulina anteriormente mencionada en los pocillos con los ligandos a testear y monitoreada midiendo el cambio de fluorescencia. Tal como se muestra en la FIGURA 53, la intensidad de la fluorescencia en el conjunto de compuestos testeados aumenta a medida que avanza la reacción de polimerización de tubulina. Los

resultados indicaron que tres de los doce compuestos presentan características polimerizante de tubulina, ya que, si bien estos compuestos *hits* no igualan la capacidad del Taxol que es un reconocido agente polimerizante, su capacidad promotora es notoria. Las propiedades fisicoquímicas de los ligandos activos se muestran en la FIGURA 54, los que podrían ser el punto de partida en el diseño de nuevos compuestos polimerizantes de tubulina que siguen el mecanismo de asociación de las epotilona.



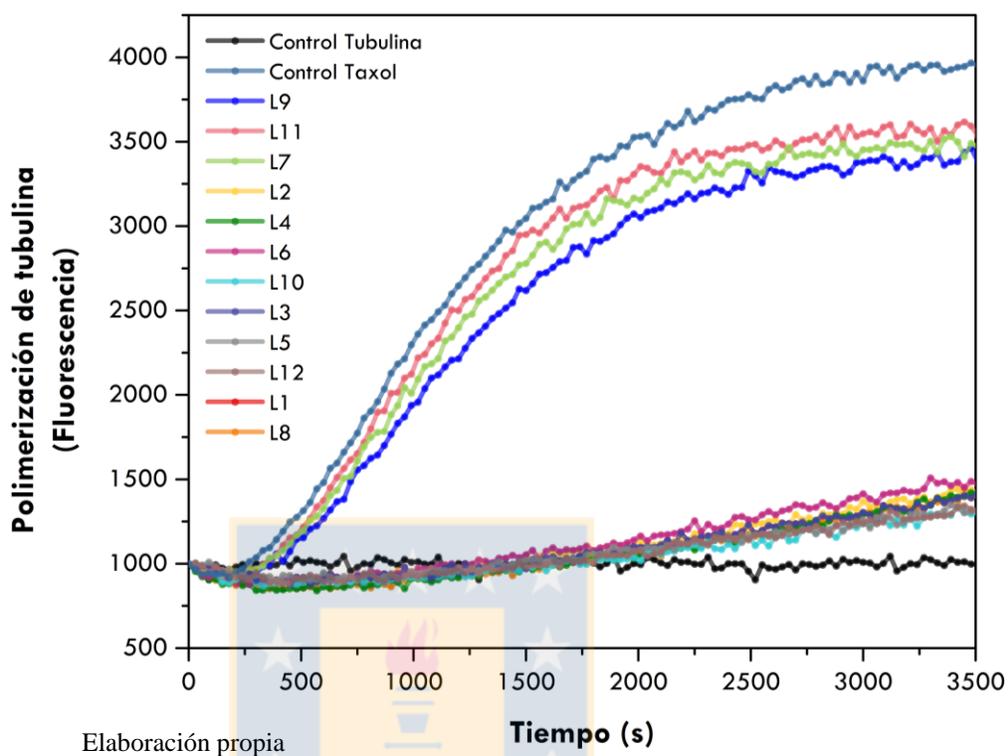


FIGURA 53. Efecto de los compuestos seleccionados del SV y de un reconocido agente polimerizante (Taxol) en la polimerización de tubulina, determinados por ensayos de polimerización de tubulina *in vitro*. La tubulina fue incubada con los doce compuestos *hits* (5 μ M) y Taxol (5 μ M), respectivamente. La fluorescencia (Ex:360 nm, Em:420 nm) fue monitoreada cada 1 minuto por 60 minutos.

	L7	L9	L11
<i>Peso Molecular</i>	590.43	592.649	471.517
<i>Log P</i>	3.31	2.98	3.18
<i>NDH</i>	0	1	1
<i>NAH</i>	9	10	9
<i>Carga Neta</i>	0	0	0
<i>PSA (Å²)</i>	102	110	112
<i>Enlaces Rotables</i>	5	7	1

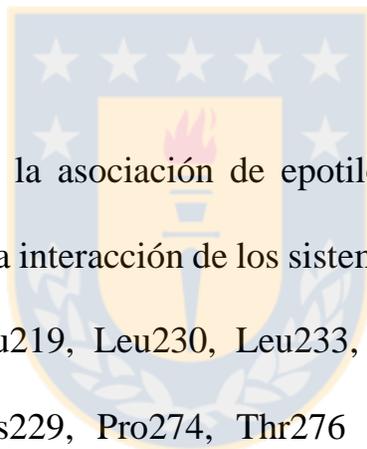
FIGURA 54. Compuestos seleccionados de los resultados de los ensayos de polimerización de tubulina, donde se muestran algunas de sus propiedades fisicoquímicas, donde NDH corresponde a el número de donantes de hidrógeno, NAH a el número de aceptores de hidrógeno y PSA (Polar Surface Area) corresponde a el Área de superficie polar. Estos compuestos corresponden a promotores de polimerización de tubulina.

CONCLUSIONES

En este trabajo se utilizó una sucesión de técnicas bioinformáticas para estudiar el modo de asociación de epotilonas nativas, con el fin de contar con un modelo válido para la búsqueda de nuevos compuestos activos. Los resultados mostraron la correlación del modelo obtenido por DM con la información experimental más reciente que existe para los sistemas epotilona-tubulina, el que permitió realizar la búsqueda con resultados positivos de ligandos afines a β -tubulina. Del trabajo realizado se llegó a las siguientes conclusiones:

- Algunas regiones de la estructura de las epotilonas se encuentran restringidas conformacionalmente por efectos de la asociación. Debido a que se producen cambios conformacionales en las epotilonas en complejo con tubulina en comparación a las epotilonas libres, confirmándose que las epotilonas son moléculas altamente flexibles en solución y su libertad conformacional se ve drásticamente afectada en el complejo.

- Existen conformaciones comunes entre eptilonas activas libres y en asociación a tubulina. Las eptilonas activas son capaces de someterse a una preorganización conformacional adecuado cuando están en el estado libre, correspondiente a la conformación bioactiva que las eptilonas inactivas son incapaces de adquirir.



- En cuanto a la asociación de eptilonas a tubulina, los residuos claves para la interacción de los sistemas estudiados corresponden a Leu217, Leu219, Leu230, Leu233, Leu272, Leu275 y Leu371, Asp226, His229, Pro274, Thr276 y Gln281. Además, existen algunas interacciones importantes para la estabilización del sitio activo de la tubulina, como los puentes salinos entre los residuos Glu290 y Arg284 ambos correspondientes al M-loop y entre Asp297 y Lys299 de la hélice H9. Por su parte, los ligandos ocupan regiones similares en el sitio de asociación a lo reportado experimentalmente, pero exploran la cavidad de una manera única y cualitativamente diferente. Algunas modificaciones en la estructura de las eptilonas

generan efectos negativos en la asociación, como por ejemplo la epimerización en C15 desde C15S a C15R donde la cadena lateral que se encuentra originalmente en el plano del anillo de la epotilona se posiciona perpendicular al anillo, afectando la interacción ligando-receptor.

- La tubulina presenta cambios conformacionales y rearrreglos debido a la asociación, en la región de interface y en particular en el *M-loop*. Dicho *M-loop* es capaz de desplazarse por efectos de la asociación, mejorando así la asociación epotilona-tubulina. Esto debido al establecimiento de un puente salino entre los residuos Arg284 y Glu290 presente en la mayoría de los complejos con los derivados de la epotilonas y no en la tubulina libre.
- Los resultados del análisis de distintas mutaciones en β -tubulina indicaron que la presencia de estas podría relacionado con la resistencia a los fármacos, ya que se observó un efecto negativo de las mutaciones en la asociación de tubulina con epotilona B. La tubulina experimenta grandes desplazamientos en comparación a

tubulina nativa como consecuencia de las mutaciones en especial en regiones que están implicadas en la efectiva asociación del ligando y en el ensamblaje de los microtúbulos. Además, el *M-loop* sufre una reorganización conformacional al asociarse a la epotilona B y en los complejos con las distintas mutante, afectando tanto a la asociación del ligando y la correcta estabilización del *M-loop*.

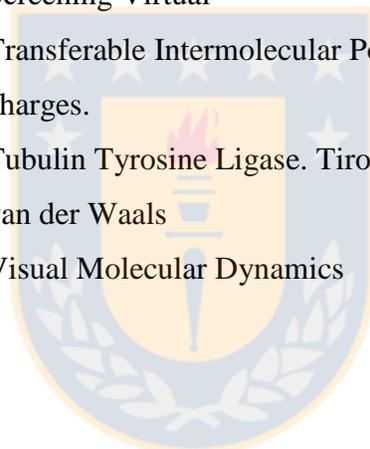
- Fue realizado un *Screening Virtual* basado en la estructura del receptor, en este caso utilizando la estructura de β -tubulina obtenida de las simulaciones de DM. Los resultados indicaron que de la librería utilizada en el *Screening* existen compuestos que presentan una gran afinidad por la β -tubulina teniendo energías de asociación entre los -11.2 kcal/mol hasta los -8.6 kcal/mol. Experimentalmente tres de ellos resultaron ser agentes polimerizantes de tubulina. Estos ligandos presentan algunas de las interacciones claves para la asociación de las epotilonas y por lo tanto representan nuevos compuestos que siguen el modo de asociación de epotilona-tubulina y que podrían ser utilizados en el desarrollo fármacos.

- En resumen, fueron utilizadas simulaciones de dinámica molecular para examinar la asociación epotilona-tubulina de una serie de 20 derivados, las cuales mostraron que son moléculas altamente flexibles y pueden adoptar conformaciones de tal manera de maximizar la interacción con el receptor. El sistema epotilona-tubulina es susceptible al efecto de cambios en la estructura de la epotilona y mutaciones de β -tubulina, los que afectan directamente a la asociación entre en ligando-receptor y a la región interdimero en el caso de las mutaciones. La estructura del modelo de epotilona β -tubulina obtenido por dinámica molecular fue utilizado como punto de partida para la búsqueda de nuevos compuestos afines a tubulina. Producto de esto se obtuvieron tres compuestos que presentan actividad polimerizante de tubulina y comparten el mecanismo de acción de epotilonas.

ABREVIACIONES Y ACRÓNIMOS

ADMET	Absorción, Distribución, Metabolismo, Eliminación y
AMBER	Toxicidad Assisted Model Building with Energy Refinement. Construcción asistida de modelos con refinamiento energético
CHARMM	Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics
DM	Dinámica molecular
EP	Epotilona
EPA	Epotilona A
EPB	Epotilona B
FEP	Free Energy Perturbation
GA	Genetic algorithm. Algoritmo genético
GAFF	General Amber Force Field
GDP	Guanosine DiPhosphate. Guanosín difosfato
GTP	Guanosine TriPhosphate. Guanosín trifosfato
MM	Molecular mechanics. Mecánica molecular
MM/PBSA	Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area
MM/GBSA	Molecular Mechanics Generalized-Born Surface Area
MSA	Microtubule Stabilizing Agents. Agentes estabilizantes de microtúbulos
MT	Microtúbulos
NAMD	NANoscale Molecular Dynamics
NPT	Colectivo isoterma-isobárico
NVE	Colectivo microcanónico
NVT	Colectivo canónico
PME	Particle-Mesh Ewald
PDB	Protein Data Bank. Banco de datos de proteínas
PDBQT	Protein Data Bank, Partial Charge (Q), and Atom Type (T)

Pipes	Ácido piperazin-N,N'-bis (ácido 2-etanosulfónico)
PSF	Protein Structure File
QM	Quantum mechanics. Mecánica Cuántica
RESP	Restrained ElectroStatic Potencial
RMSD	Root Mean Square Deviation. Desviación de la raíz cuadrática media
RMSF	Root Mean Square Fluctuations. Fluctuaciones de la raíz cuadrática media
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SV	Screening Virtual
TIP3P	Transferable Intermolecular Potentials with Three Point charges.
TTL	Tubulin Tyrosine Ligase. Tirosina Tubulina Ligasa (Enzima)
vdW	van der Waals
VMD	Visual Molecular Dynamics



BIBLIOGRAFÍA

1. Nogales E, Wolf SG, Downing KH (1998) Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 391:199–203
2. Nogales E (2000) Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem* 69:277–302
3. Pellegrini F, Budman DR (2005) Review: tubulin function, action of antitubulin drugs, and new drug development. *Cancer Invest* 23:264–73
4. Kingston DGI (2009) Tubulin-Interactive Natural Products as Anticancer Agents(1). *J Nat Prod* 72:507–515
5. Jordan MA, Wilson L (2004) Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 4:253–65
6. Jordan M (2012) Mechanism of Action of Antitumor Drugs that Interact with Microtubules and Tubulin. *Curr Med Chem Agents* 2:1–17
7. Jordan MA, Wilson L (1998) Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Curr Opin Cell Biol* 10:123–130
8. Jackson JR, Patrick DR, Dar MM, Huang PS (2007) Targeted anti-mitotic therapies: can we improve on tubulin agents? *Nat Rev Cancer* 7:107–17
9. Tozer GM, Kanthou C, Baguley BC (2005) Disrupting tumour blood vessels. *Nat Rev Cancer* 5:423–435
10. Kanthou C, Tozer GM (2009) Microtubule depolymerizing vascular

- disrupting agents: novel therapeutic agents for oncology and other pathologies. *Int J Exp Pathol* 90:284–294
11. Dumontet C, Jordan MA (2010) Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 9:790–803
 12. Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT (1971) Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc* 93:2325–2327
 13. Amos LA, Löwe J (1999) How Taxol® stabilises microtubule structure. *Chem Biol* 6:R65–R69
 14. Nicolaou KC, Yang Z, Liu JJ, et al (1994) Total synthesis of taxol. *Nature* 367:630–634
 15. Bollag DM, McQueney PA, Zhu J, Hensens O, Koupal L, Liesch J, Goetz M, Lazarides E, Woods CM (1995) Epothilones, a New Class of Microtubule-stabilizing Agents with a Taxol-like Mechanism of Action. *Cancer Res* 55:2325–2333
 16. Altmann K-H, Wartmann M, O'Reilly T (2000) Epothilones and related structures – a new class of microtubule inhibitors with potent in vivo antitumor activity. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* 1470:M79–M91
 17. Goodin S, Kane MP, Rubin EH (2004) Epothilones: mechanism of action and biologic activity. *J Clin Oncol* 22:2015–25
 18. Nicolaou KC, Namoto K, Li J, et al (2001) Synthesis and Biological Evaluation of 12,13-Cyclopropyl and 12,13-Cyclobutyl Epothilones. *ChemBioChem* 2:69–75
 19. Buey RM, Díaz JF, Andreu JM, O'Brate A, Giannakakou P, Nicolaou KC, Sasmal PK, Ritzén A, Namoto K (2004) Interaction of Epothilone Analogs

- with the Paclitaxel Binding Site: Relationship between Binding Affinity, Microtubule Stabilization, and Cytotoxicity. *Chem & Biol* 11:225–236
20. Nicolaou KC, Ritzén A, Namoto K, Buey RM, Díaz JF, Andreu JM, Wartmann M, Altmann K-H, O’Brate A, Giannakakou P (2002) Chemical synthesis and biological evaluation of novel epothilone B and trans-12,13-cyclopropyl epothilone B analogues. *Tetrahedron* 58:6413–6432
 21. Erdélyi M, Pfeiffer B, Hauenstein K, Fohrer J, Gertsch J, Altmann K-H, Carlomagno T (2008) Conformational preferences of natural and C3-modified epothilones in aqueous solution. *J Med Chem* 51:1469–73
 22. Walters WP, Stahl MT, Murcko MA (1998) Virtual screening—an overview. *Drug Discov Today* 3:160–178
 23. McInnes C (2007) Virtual screening strategies in drug discovery. *Curr Opin Chem Biol* 11:494–502
 24. A. Srinivas Reddy, S. Priyadarshini Pati, P. Praveen Kumar, H.N. Pradeep,, G. Narahari Sastry, (2007) Virtual Screening in Drug Discovery - A Computational Perspective. *Curr Protein Pept Sci* 8:23
 25. Jorgensen WL (2004) The many roles of computation in drug discovery. *Science* 303:1813–8
 26. Carlomagno T, Blommers MJJ, Meiler J, Jahnke W, Schupp T, Petersen F, Schinzer D, Altmann K-H, Griesinger C (2003) The High-Resolution Solution Structure of Epothilone A Bound to Tubulin: An Understanding of the Structure–Activity Relationships for a Powerful Class of Antitumor Agents. *Angew Chemie Int Ed* 42:2511–2515
 27. Reese M, Sánchez-Pedregal VM, Kubicek K, Meiler J, Blommers MJJ, Griesinger C, Carlomagno T (2007) Structural Basis of the Activity of the Microtubule-Stabilizing Agent Epothilone A Studied by NMR Spectroscopy in Solution. *Angew Chemie Int Ed* 46:1864–1868

-
28. Kumar A, Heise H, Blommers MJJ, et al (2010) Interaction of epothilone B (patupilone) with microtubules as detected by two-dimensional solid-state NMR spectroscopy. *Angew Chem Int Ed Engl* 49:7504–7
29. Nettles JH, Li H, Cornett B, Krahn JM, Snyder JP, Downing KH (2004) The binding mode of epothilone A on alpha,beta-tubulin by electron crystallography. *Science* 305:866–9
30. Taylor RE, Chen Y, Beatty A, Myles DC, Zhou Y (2003) Conformation-activity relationships in polyketide natural products: a new perspective on the rational design of epothilone analogues. *J Am Chem Soc* 125:26–7
31. Prota AE, Bargsten K, Diaz JF, Marsh M, Cuevas C, Liniger M, Neuhaus C, Andreu JM, Altmann K-H, Steinmetz MO (2014) A new tubulin-binding site and pharmacophore for microtubule-destabilizing anticancer drugs. *Proc Natl Acad Sci* 111:13817–13821
32. Canales A, Nieto L, Rodríguez-Salarichs J, et al (2014) Molecular Recognition of Epothilones by Microtubules and Tubulin Dimers Revealed by Biochemical and NMR Approaches. *ACS Chem Biol* 9:1033–1043
33. Berman HM (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28:235–242
34. D.A. Case, T.A. Darden, T.E. Cheatham, III, C.L. Simmerling, J. Wang, R.E. Duke, R. Luo, R.C. Walker, W. Zhang, K.M. Merz, B. Roberts, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, J. Swails, A.W. Goetz, I. Kolossváry, K.F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, R.M. Wolf, J. and PAK (2012) Amber 12.
35. Roy Dennington TK and JM (2009) GaussView, Version 5,. In: Semichem Inc., Shawnee Mission KS,. http://www.gaussian.com/g_tech/gv5ref/gv5citation.htm. Accessed 19 Apr 2013
36. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J.M.Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Peters CG and JAP (2004) GAUSSIAN 03.
-

Gaussian, Inc., Wallingford CT

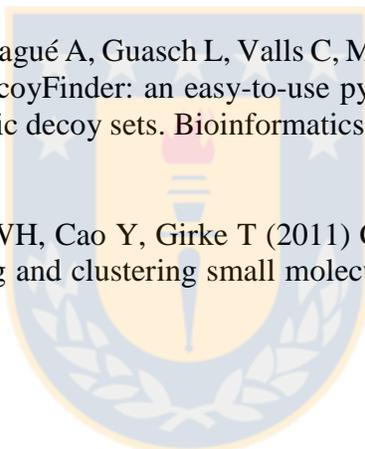
37. Wang J, Wang W, Kollman PA, Case DA (2006) Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *J Mol Graph Model* 25:247–60
38. Wang J, Wolf RM, Caldwell JW, Kollman PA, Case DA (2004) Development and testing of a general amber force field. *J Comput Chem* 25:1157–74
39. Olsson MHM, Søndergaard CR, Rostkowski M, Jensen JH (2011) PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions. *J Chem Theory Comput* 7:525–537
40. Dolinsky TJ, Nielsen JE, McCammon JA, Baker NA (2004) PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res* 32:W665-7
41. Humphrey W, Dalke A, Schulten K (1996) VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14:33–38
42. Lindorff-Larsen K, Piana S, Palmo K, Maragakis P, Klepeis JL, Dror RO, Shaw DE (2010) Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins* 78:1950–8
43. Berendsen HJC, van der Spoel D, van Drunen R (1995) GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comput Phys Commun* 91:43–56
44. Dundas J, Ouyang Z, Tseng J, Binkowski A, Turpaz Y, Liang J (2006) CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. *Nucleic Acids Res* 34:W116-8

-
45. Pedretti A, Villa L, Vistoli G (2002) VEGA: a versatile program to convert, handle and visualize molecular structure on Windows-based PCs. *J Mol Graph Model* 21:47–49
46. Pedretti A, Villa L, Vistoli G (2004) VEGA – An open platform to develop chemo-bio-informatics applications, using plug-in architecture and script programming. *J Comput Aided Mol Des* 18:167–173
47. Kollman PA, Massova I, Reyes C, et al (2000) Calculating Structures and Free Energies of Complex Molecules: Combining Molecular Mechanics and Continuum Models. *Acc Chem Res* 33:889–897
48. Gohlke H, Case DA (2004) Converging free energy estimates: MM-PB(GB)SA studies on the protein-protein complex Ras-Raf. *J Comput Chem* 25:238–250
49. Irwin JJ, Sterling T, Mysinger MM, Bolstad ES, Coleman RG (2012) ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. *J Chem Inf Model* 52:1757–1768
50. Irwin JJ, Shoichet BK ZINC--a free database of commercially available compounds for virtual screening. *J Chem Inf Model* 45:177–82
51. Sterling T, Irwin JJ (2015) ZINC 15 – Ligand Discovery for Everyone. *J Chem Inf Model* 55:2324–2337
52. Trott O, Olson AJ (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 31:455–61
53. Eric K. Rowinsky, M.D., and Ross C. Donehower MD Paclitaxel (Taxol) — NEJM. <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199504133321507>. Accessed 6 Feb 2013
-

54. Höfle G, Bedorf N, Steinmetz H, Schomburg D, Gerth K, Reichenbach H (1996) Epothilone A and B—Novel 16-Membered Macrolides with Cytotoxic Activity: Isolation, Crystal Structure, and Conformation in Solution. *Angew Chemie Int Ed English* 35:1567–1569
55. Bissery MC, Guénard D, Guéritte-Voegelein F, Lavelle F (1991) Experimental antitumor activity of taxotere (RP 56976, NSC 628503), a taxol analogue. *Cancer Res* 51:4845–52
56. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 30:2785–91
57. Backman TWH, Cao Y, Girke T (2011) ChemMine tools: an online service for analyzing and clustering small molecules. *Nucleic Acids Res* 39:W486–91
58. Bonne D, Heuséle C, Simon C, Pantaloni D (1985) 4',6-Diamidino-2-phenylindole, a fluorescent probe for tubulin and microtubules. *J Biol Chem* 260:2819–25
59. Prota AE, Bargsten K, Zurwerra D, Field JJ, Díaz JF, Altmann K-H, Steinmetz MO (2013) Molecular mechanism of action of microtubule-stabilizing anticancer agents. *Science* 339:587–90
60. Heinz DW, Schubert W-D, Höfle G (2005) Much Anticipated—The Bioactive Conformation of Epothilone and Its Binding to Tubulin. *Angew Chemie Int Ed* 44:1298–1301
61. Nicolaou KC, Roschangar F, Vourloumis D (1998) ChemInform Abstract: Chemical Biology of Epothilones. *ChemInform* 29:no-no
62. Erdélyi M, Navarro-Vázquez A, Pfeiffer B, et al (2010) The Binding Mode of Side Chain- and C3-Modified Epothilones to Tubulin. *ChemMedChem* 5:911–920

-
63. Mitra A, Sept D (2008) Taxol Allosterically Alters the Dynamics of the Tubulin Dimer and Increases the Flexibility of Microtubules. *Biophys J* 95:3252–3258
64. Li X, Ye L, Wang X, Shi W, Qian X, Zhu Y, Yu H (2013) Molecular Modeling and Molecular Dynamics Simulation Studies on the Interactions of Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls with Estrogen Receptor- β . *Arch Environ Contam Toxicol* 65:357–367
65. Shen M, Zhou S, Li Y, Pan P, Zhang L, Hou T (2013) Discovery and optimization of triazine derivatives as ROCK1 inhibitors: molecular docking, molecular dynamics simulations and free energy calculations. *Mol Biosyst* 9:361
66. Jiménez VA, Alderete JB, Navarrete KR (2017) Molecular modeling study on the tubulin-binding modes of epothilone derivatives: Insight into the structural basis for epothilones activity. *Chem Biol Drug Des* 90:1247–1259
67. Navarrete KR, Alderete JB, Jiménez VA (2015) Structural basis for drug resistance conferred by β -tubulin mutations: a molecular modelling study on native and mutated tubulin complexes with epothilone B. *J. Biomol. Struct. Dyn.*
68. Giannakakou P, Gussio R, Nogales E, Downing KH, Zaharevitz D, Bollbuck B, Poy G, Sackett D, Nicolaou KC, Fojo T (2000) A common pharmacophore for epothilone and taxanes: molecular basis for drug resistance conferred by tubulin mutations in human cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2904–9
69. Giannakakou P, Snyder J (2008) Resistance to Microtubule-Targeting Drugs. In: Fojo T (ed) *Role Microtubules Cell Biol. Neurobiol. Oncol.* SE - 15. Humana Press, pp 357–394
70. Graves AP, Brenk R, Shoichet BK (2005) Decoys for docking. *J Med Chem* 48:3714–28
-

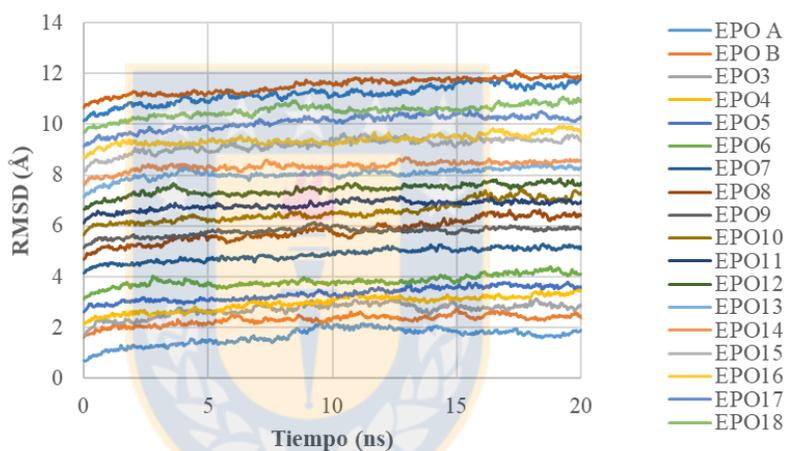
71. Mysinger MM, Carchia M, Irwin JJ, Shoichet BK (2012) Directory of useful decoys, enhanced (DUD-E): better ligands and decoys for better benchmarking. *J Med Chem* 55:6582–94
72. Cereto-Massagué A, Guasch L, Valls C, Mulero M, Pujadas G, Garcia-Vallvé S (2012) Structural bioinformatics DecoyFinder: an easy-to-use python GUI application for building target-specific decoy sets. *Bioinforma Appl NOTE* 28:1661–1662
73. Wallach I, Lilien R (2011) Virtual Decoy Sets for Molecular Docking Benchmarks. *J Chem Inf Model* 51:196–202
74. Cereto-Massagué A, Guasch L, Valls C, Mulero M, Pujadas G, Garcia-Vallvé S (2012) DecoyFinder: an easy-to-use python GUI application for building target-specific decoy sets. *Bioinformatics* 28:1661–2
75. Backman TWH, Cao Y, Girke T (2011) ChemMine tools: an online service for analyzing and clustering small molecules. *Nucleic Acids Res* 39:W486–91



ANEXO

FIGURA A1. Cálculos de RMSD (\AA) obtenidos de las simulaciones de dinámica molecular de producción de 20 ns de los complejos epotilona–tubulina para el esqueleto de (a) la proteína y (b) el ligando.

(a)



(b)

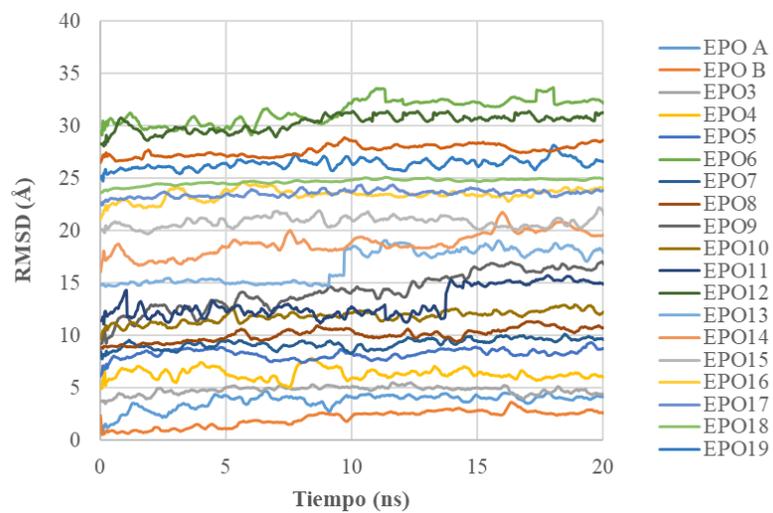


FIGURA A2. Distribución de ángulos diedros para la epotilona A libre en solución obtenidos de las simulaciones de dinámica de producción de 20ns en solución acuosa. Los ángulos diedros son reportados en grados.

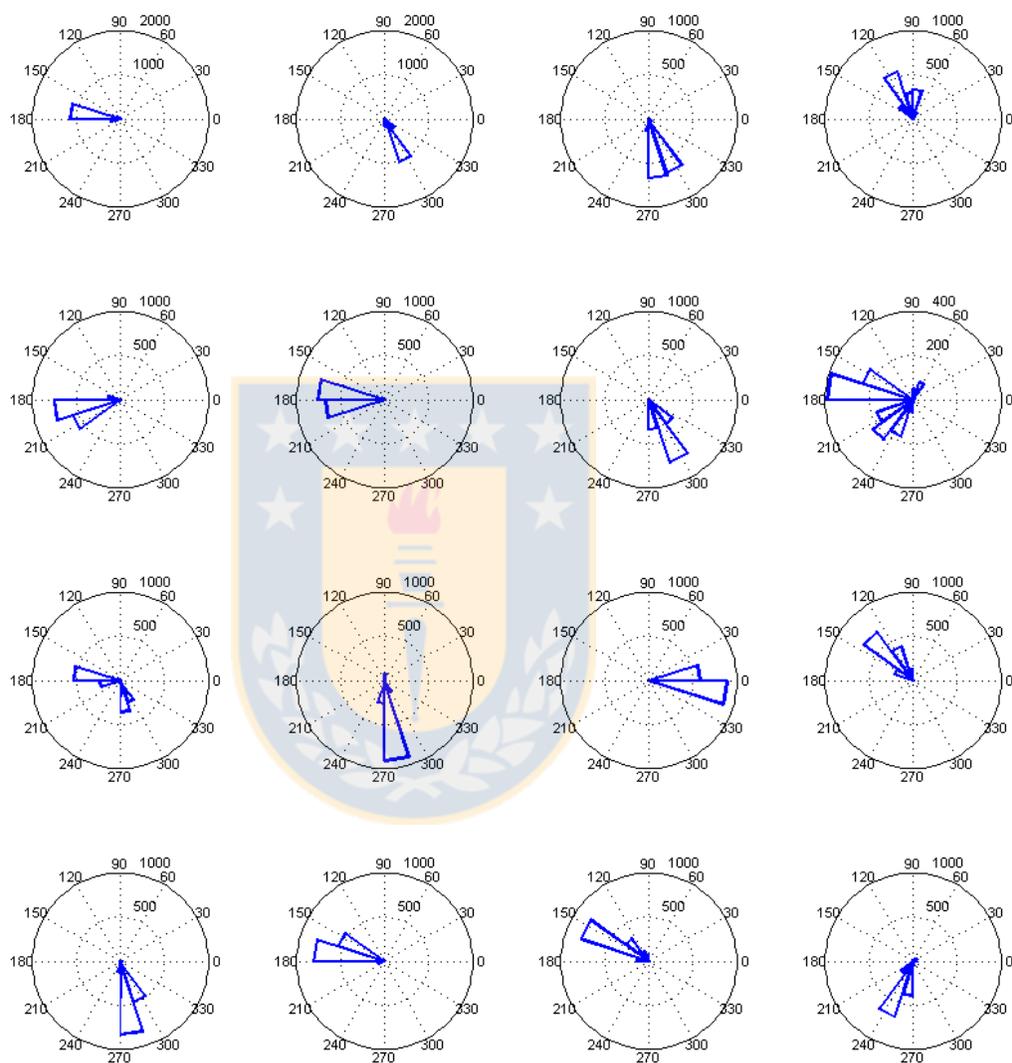


FIGURA A3. Distribución de ángulos diedros para la epotilona B libre en solución obtenidos de las simulaciones de dinámica de producción de 20ns en solución acuosa. Los ángulos diedros son reportados en grados.

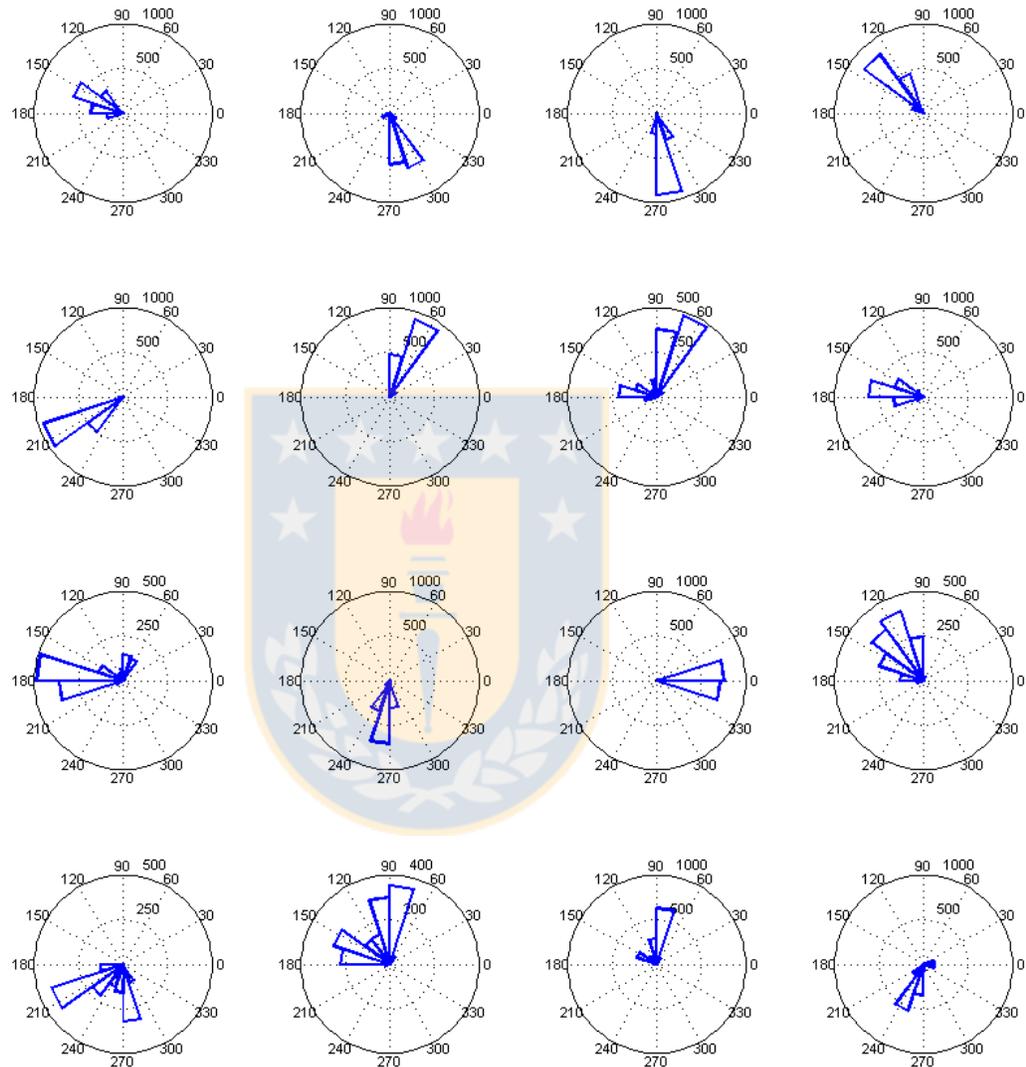


FIGURA A4. Distribución de ángulos diedros para la epotilona 3 libre en solución obtenidos de las simulaciones de dinámica de producción de 20ns en solución acuosa. Los ángulos diedros son reportados en grados.

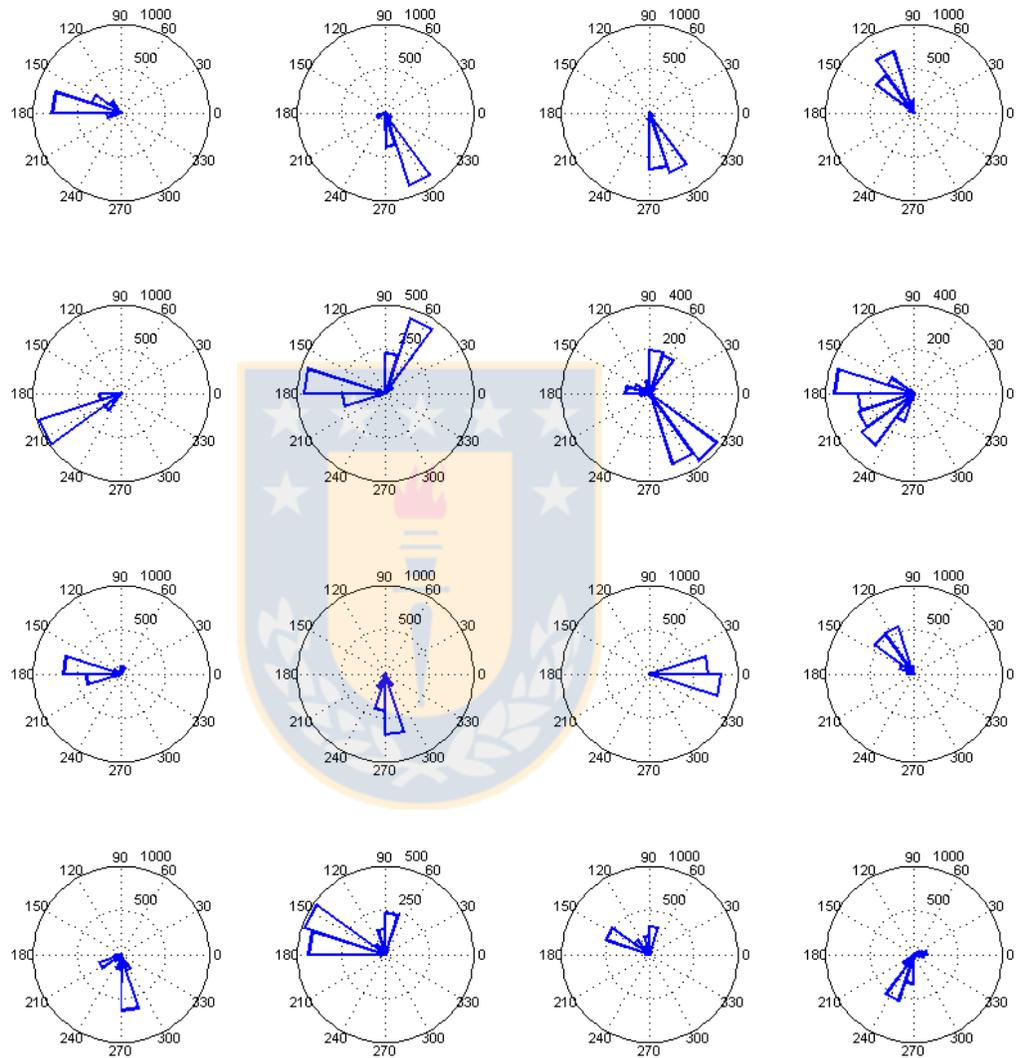


FIGURA A5. Distribución de ángulos diedros para la epitolona 4 libre en solución obtenidos de las simulaciones de dinámica de producción de 20ns en solución acuosa. Los ángulos diedros son reportados en grados.

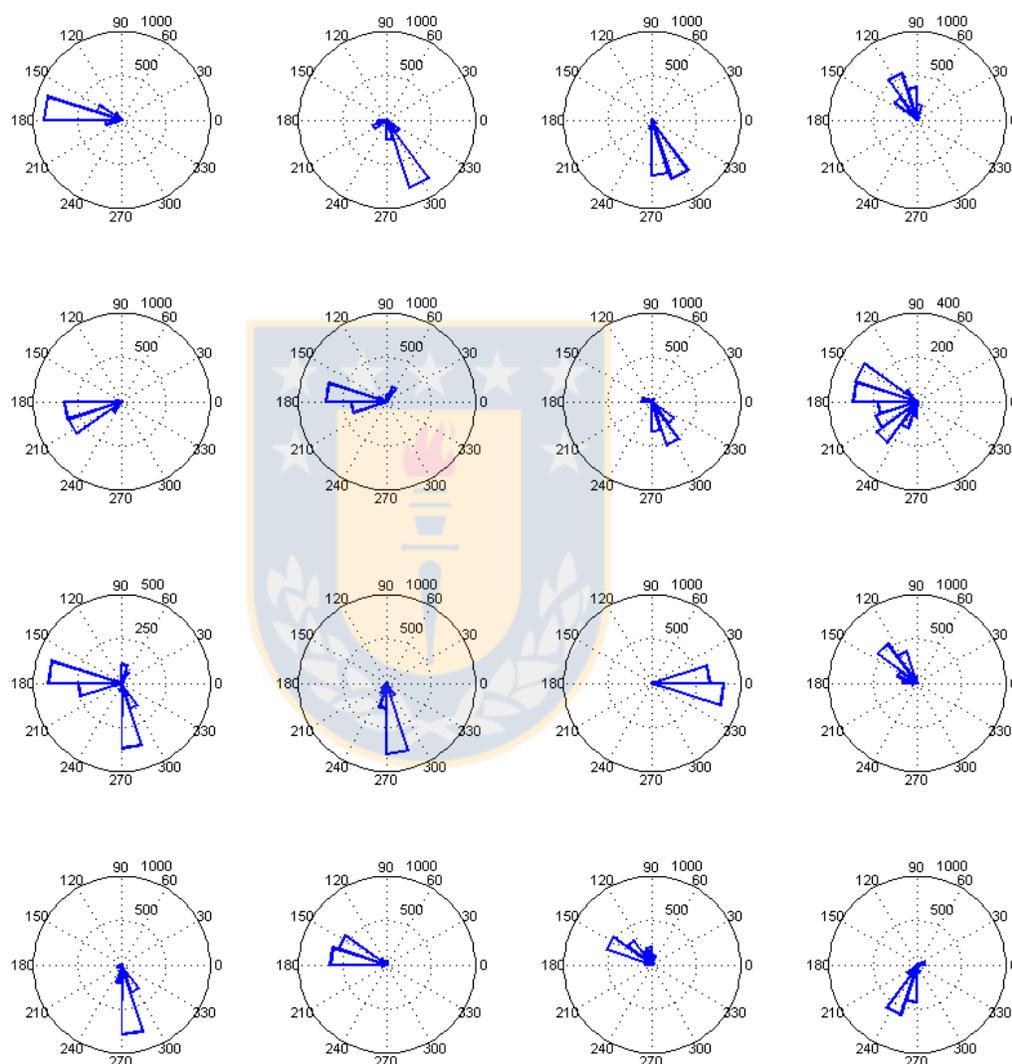


FIGURA A6. Distribución de ángulos diedros para la epotilona 5 libre en solución obtenidos de las simulaciones de dinámica de producción de 20ns en solución acuosa. Los ángulos diedros son reportados en grados.

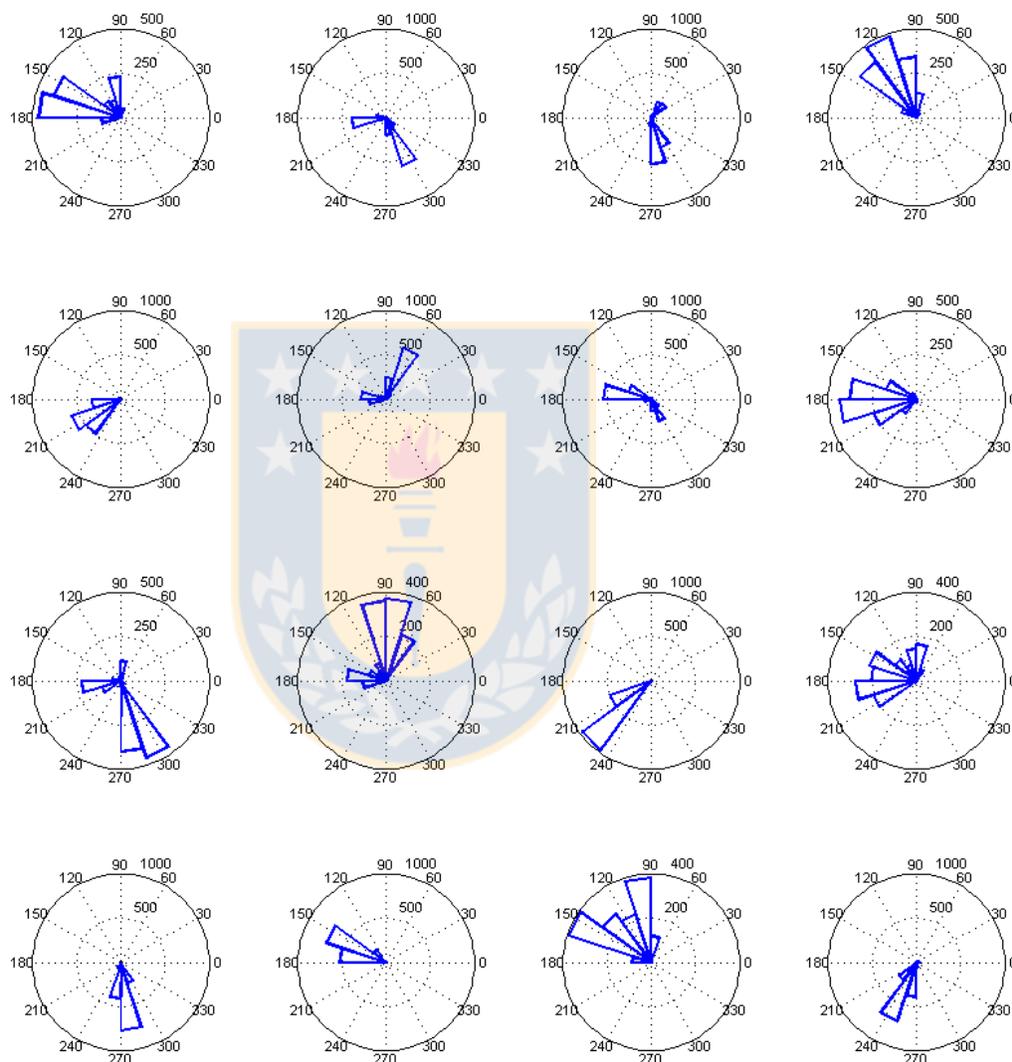


FIGURA A7. Distribución de ángulos diedros para la epotilona 6 libre en solución obtenidos de las simulaciones de dinámica de producción de 20ns en solución acuosa. Los ángulos diedros son reportados en grados.

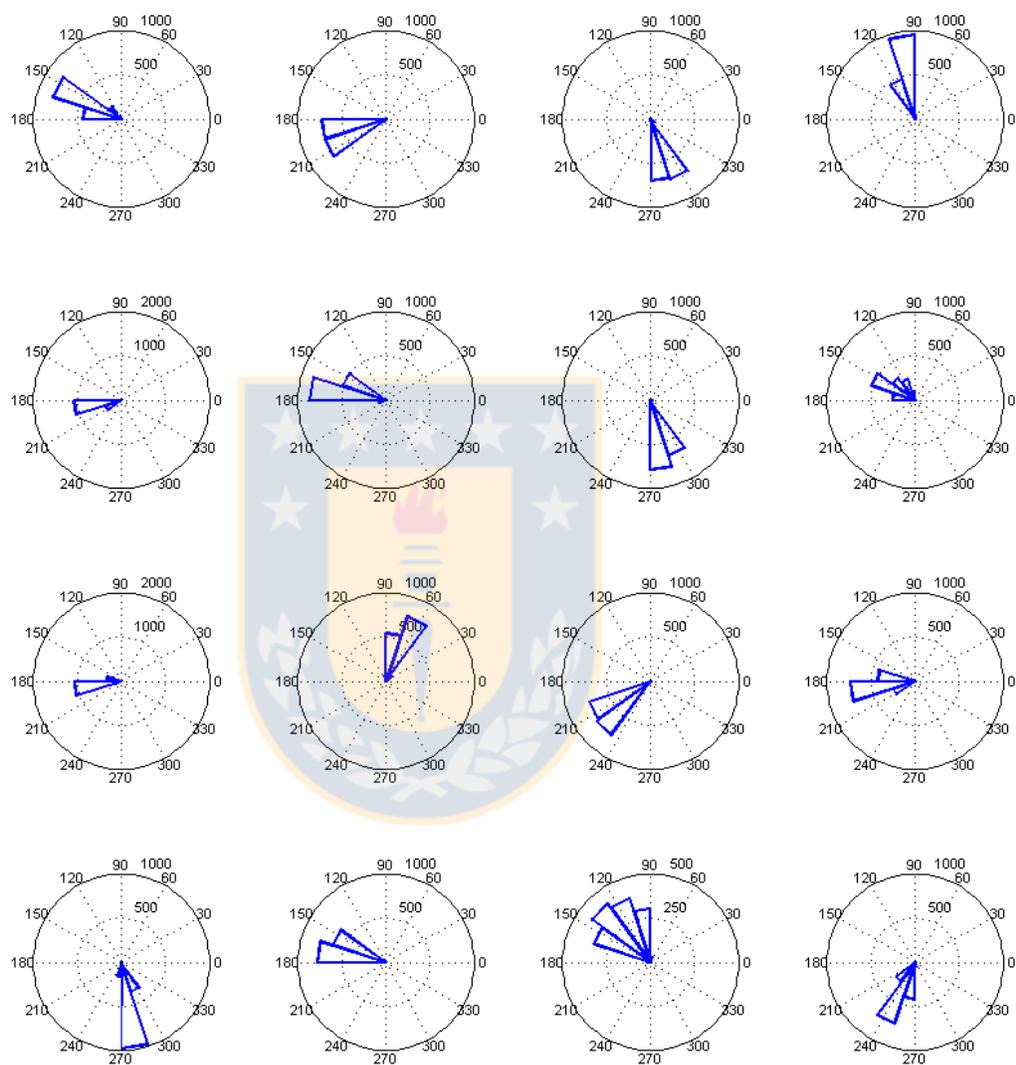


FIGURA A8. Distribución de ángulos diedros para la epotilona 7 libre en solución obtenidos de las simulaciones de dinámica de producción de 20ns en solución acuosa. Los ángulos diedros son reportados en grados.

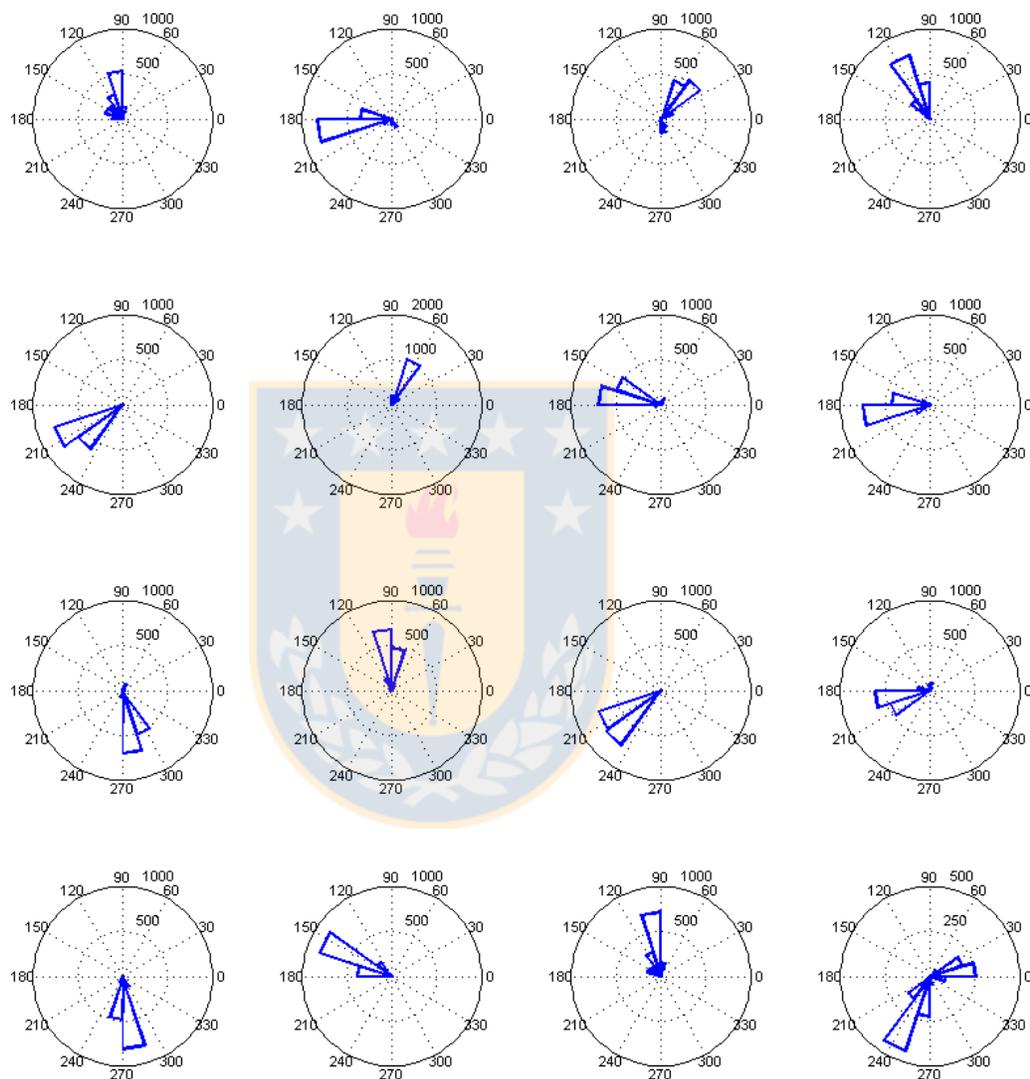


FIGURA A9. Distribución de ángulos diedros para la epotilona 8 libre en solución obtenidos de las simulaciones de dinámica de producción de 20ns en solución acuosa. Los ángulos diedros son reportados en grados.

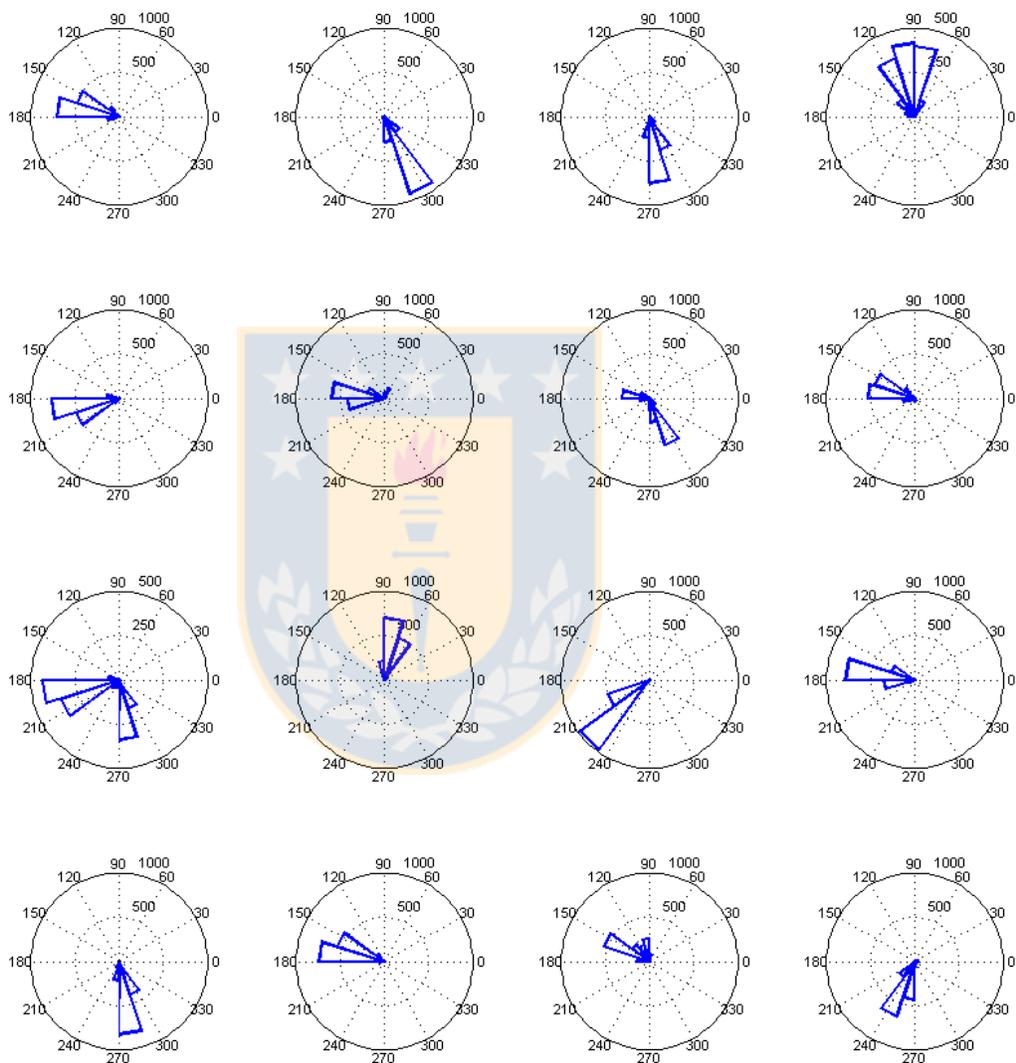


FIGURA A10. Distribución de ángulos diedros para la epotilona 9 libre en solución obtenidos de las simulaciones de dinámica de producción de 20ns en solución acuosa. Los ángulos diedros son reportados en grados.

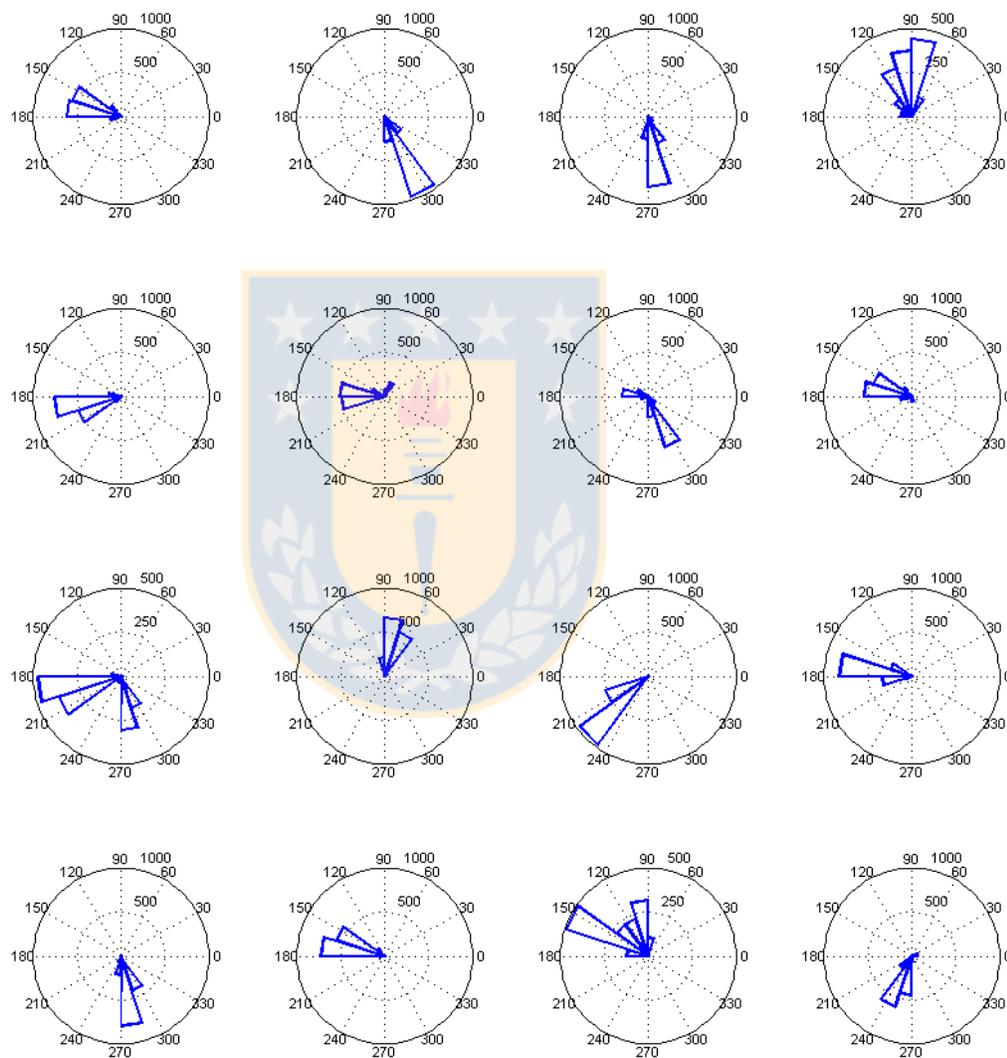


FIGURA A11. Distribución de ángulos diedros para la epotilona 10 libre en solución obtenidos de las simulaciones de dinámica de producción de 20ns en solución acuosa. Los ángulos diedros son reportados en grados.

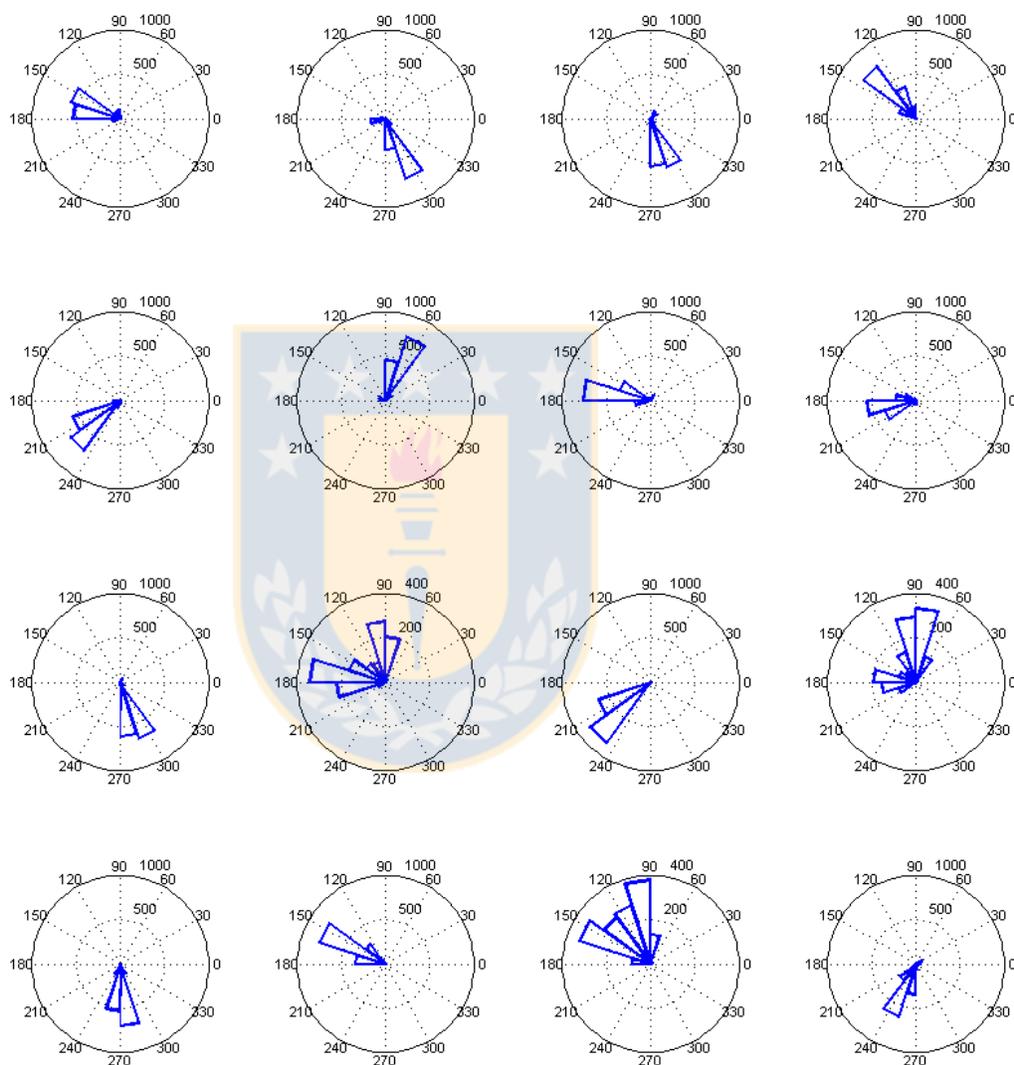


FIGURA A12. Distribución de ángulos diedros para la epotilona 11 libre en solución obtenidos de las simulaciones de dinámica de producción de 20ns en solución acuosa. Los ángulos diedros son reportados en grados.

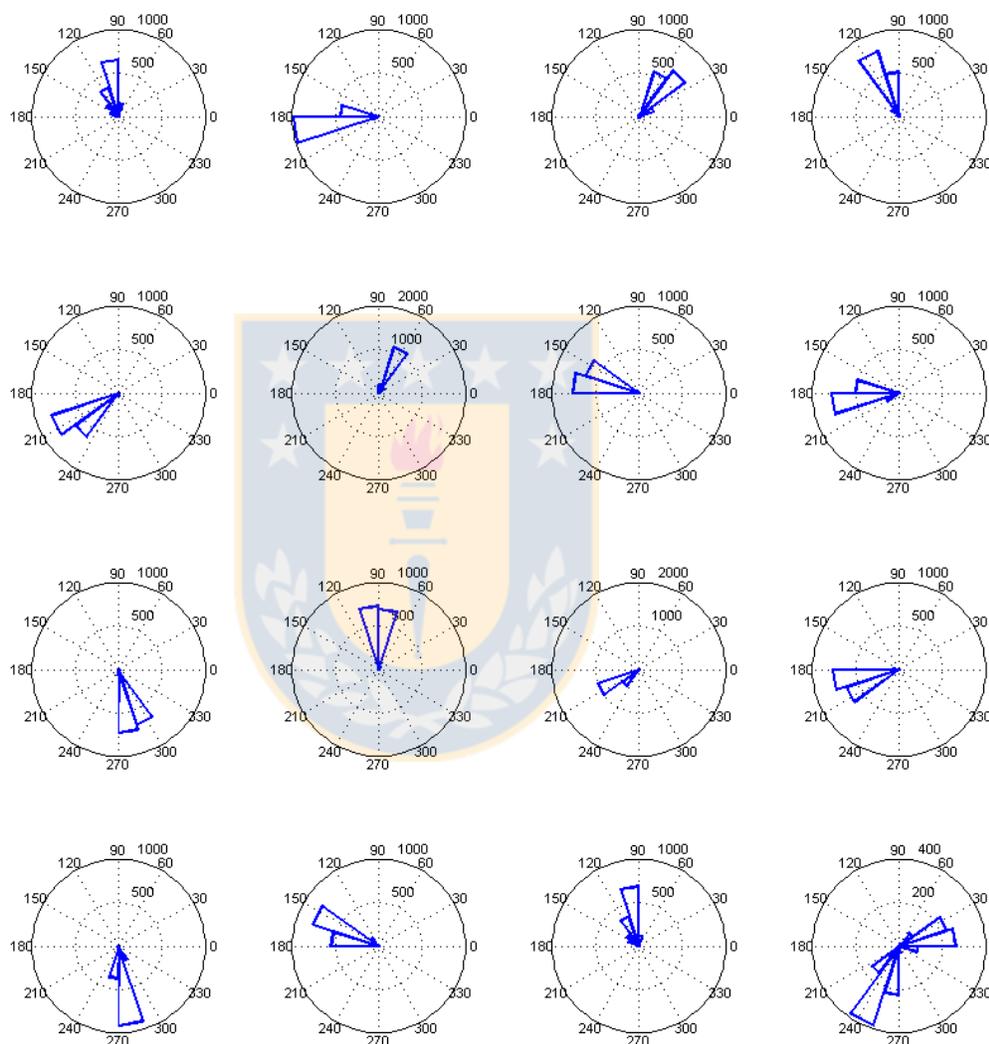


FIGURA A13. Distribución de ángulos diedros para la epotilona 12 libre en solución obtenidos de las simulaciones de dinámica de producción de 20ns en solución acuosa. Los ángulos diedros son reportados en grados.

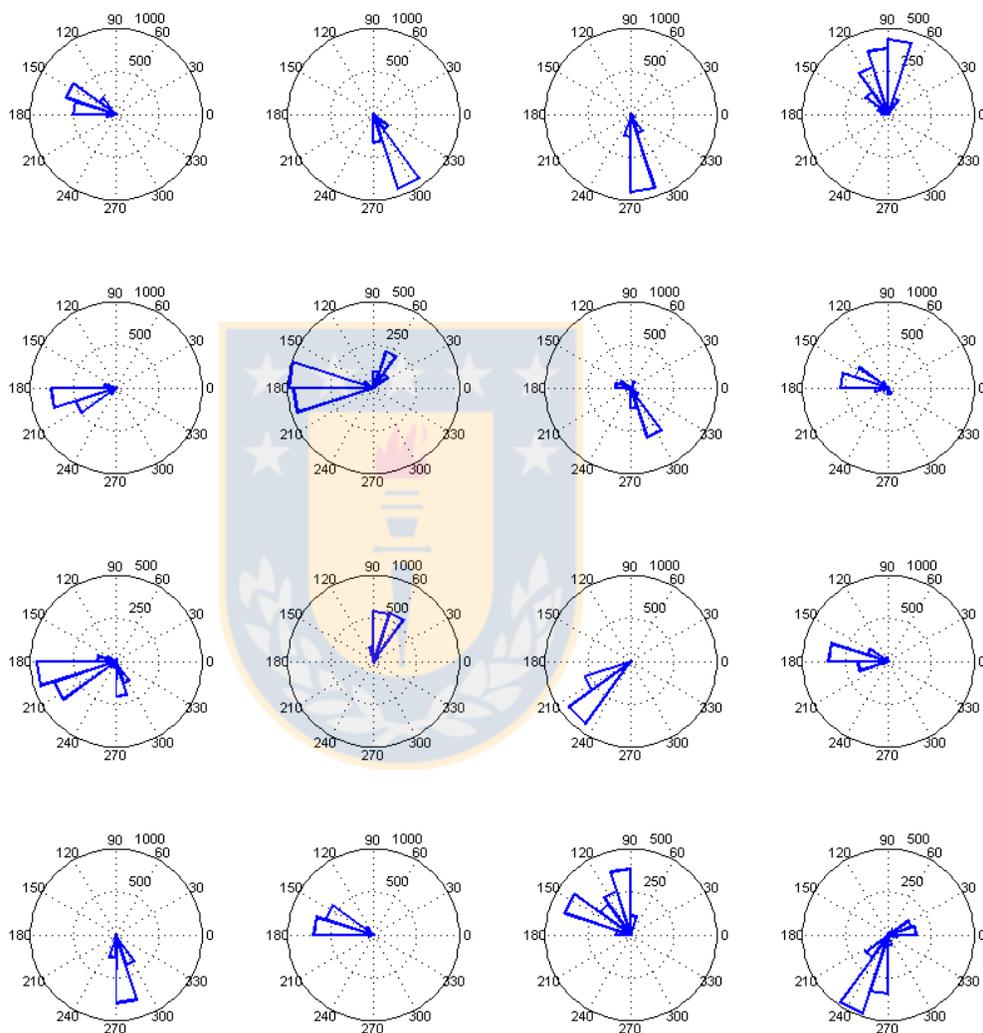


FIGURA A14. Distribución de ángulos diedros para la epotilona 13 libre en solución obtenidos de las simulaciones de dinámica de producción de 20ns en solución acuosa. Los ángulos diedros son reportados en grados.

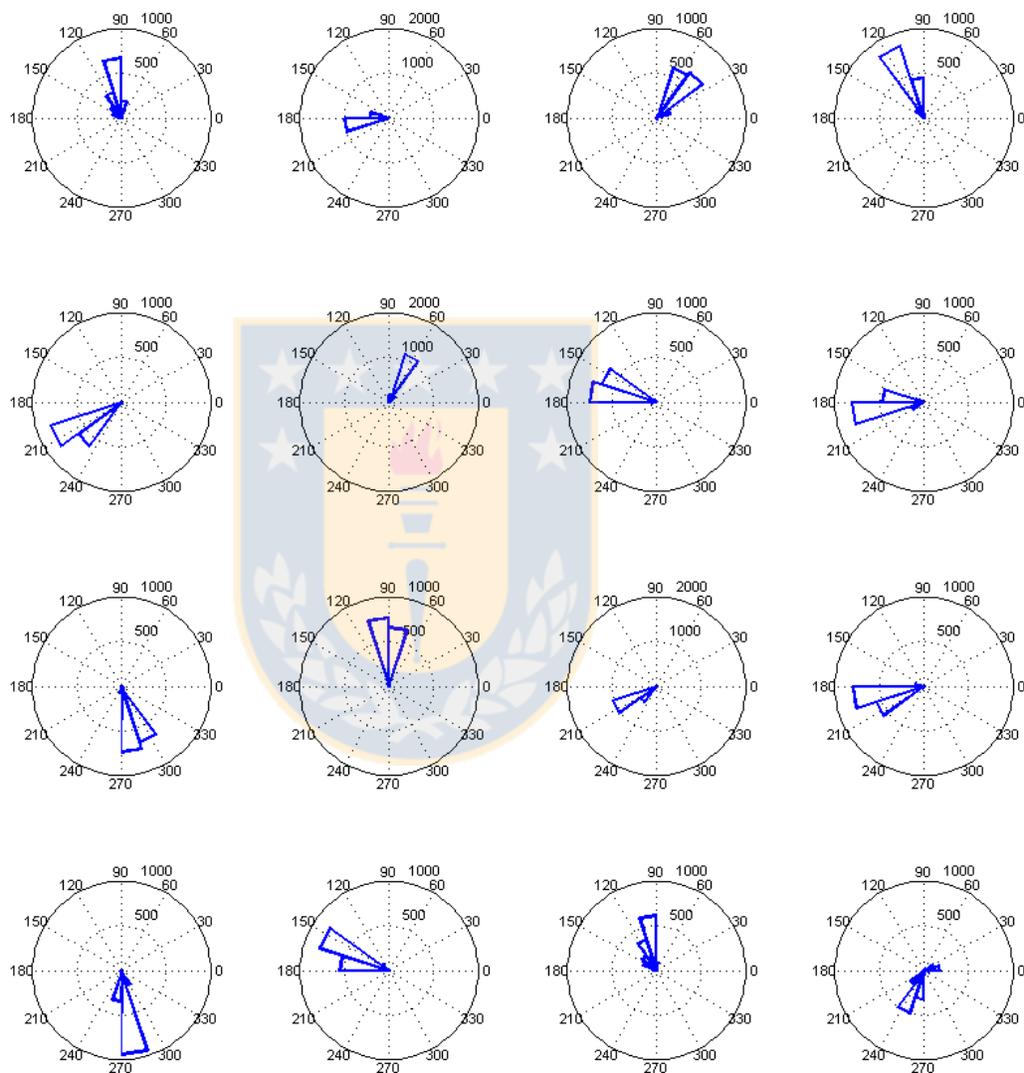


FIGURA A15. Distribución de ángulos diedros para la epotilona 14 libre en solución obtenidos de las simulaciones de dinámica de producción de 20ns en solución acuosa. Los ángulos diedros son reportados en grados.

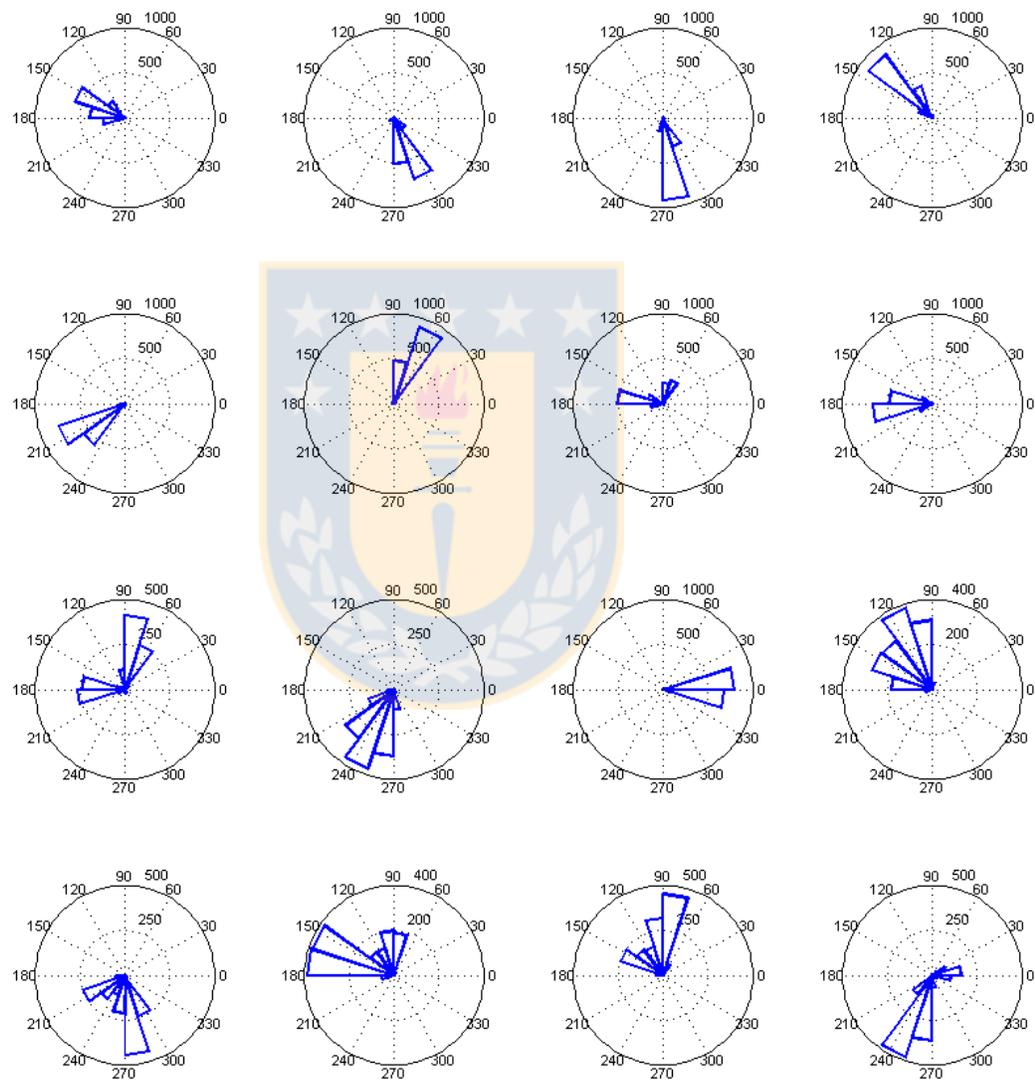


FIGURA A16. Distribución de ángulos diedros para la epotilona 15 libre en solución obtenidos de las simulaciones de dinámica de producción de 20ns en solución acuosa. Los ángulos diedros son reportados en grados.

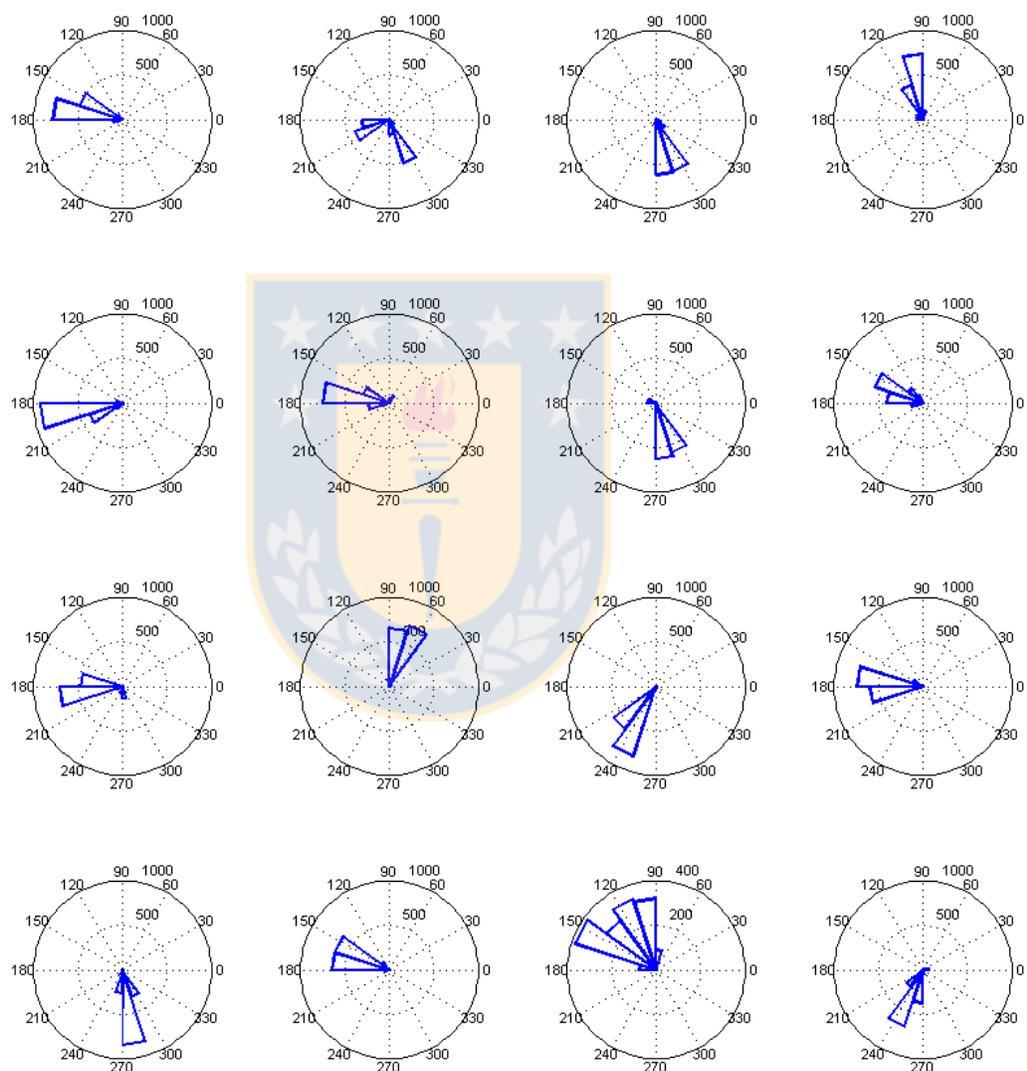


FIGURA A17. Distribución de ángulos diedros para la epotilona 16 libre en solución obtenidos de las simulaciones de dinámica de producción de 20ns en solución acuosa. Los ángulos diedros son reportados en grados.

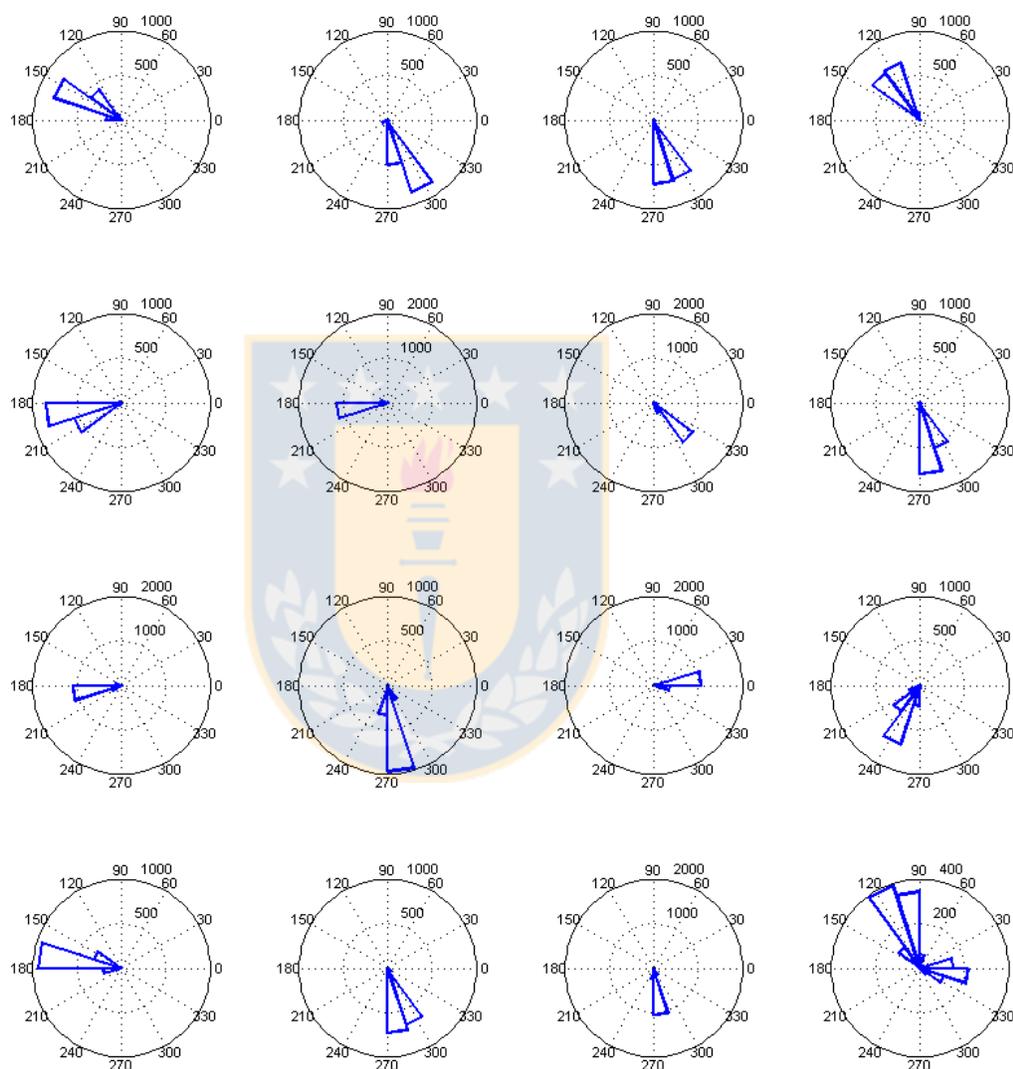


FIGURA A18. Distribución de ángulos diedros para la epotilona 17 libre en solución obtenidos de las simulaciones de dinámica de producción de 20ns en solución acuosa. Los ángulos diedros son reportados en grados.

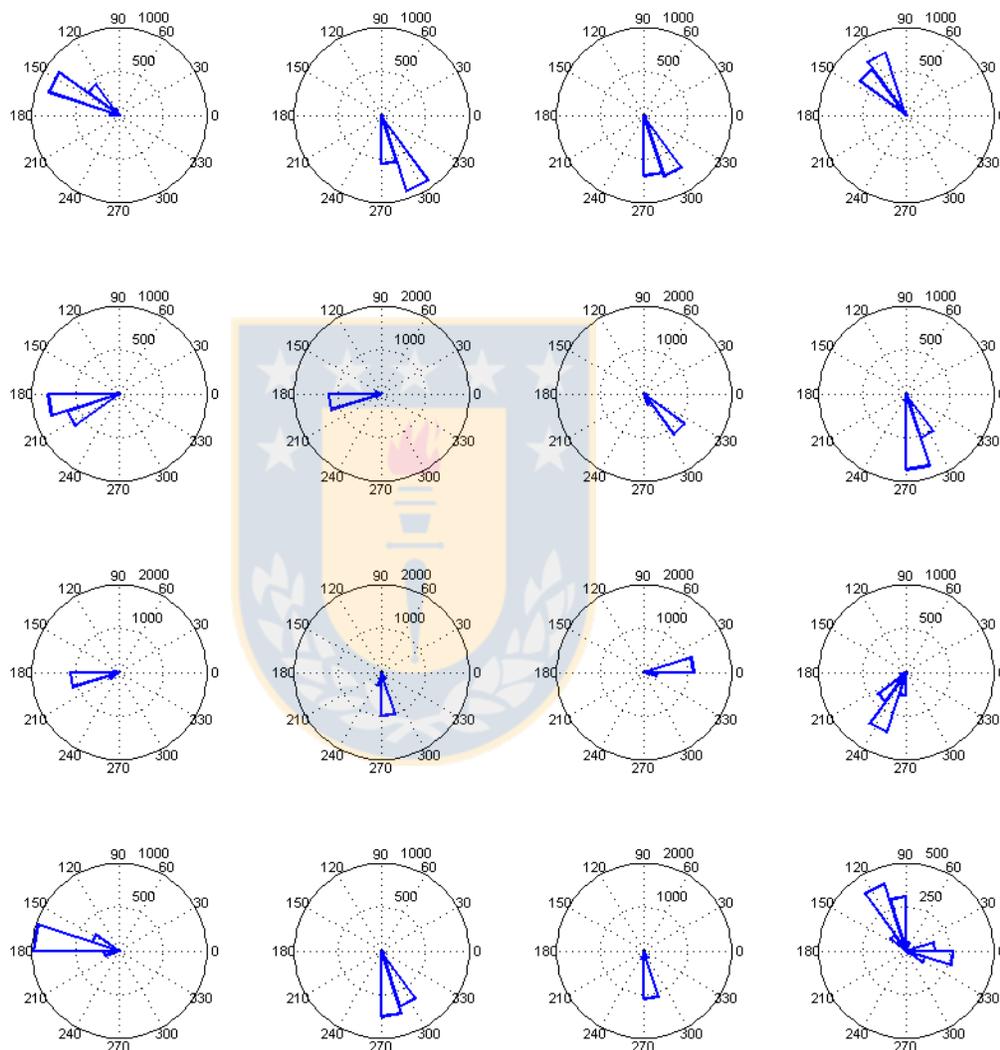


FIGURA A19. Distribución de ángulos diedros para la epotilona 18 libre en solución obtenidos de las simulaciones de dinámica de producción de 20ns en solución acuosa. Los ángulos diedros son reportados en grados.

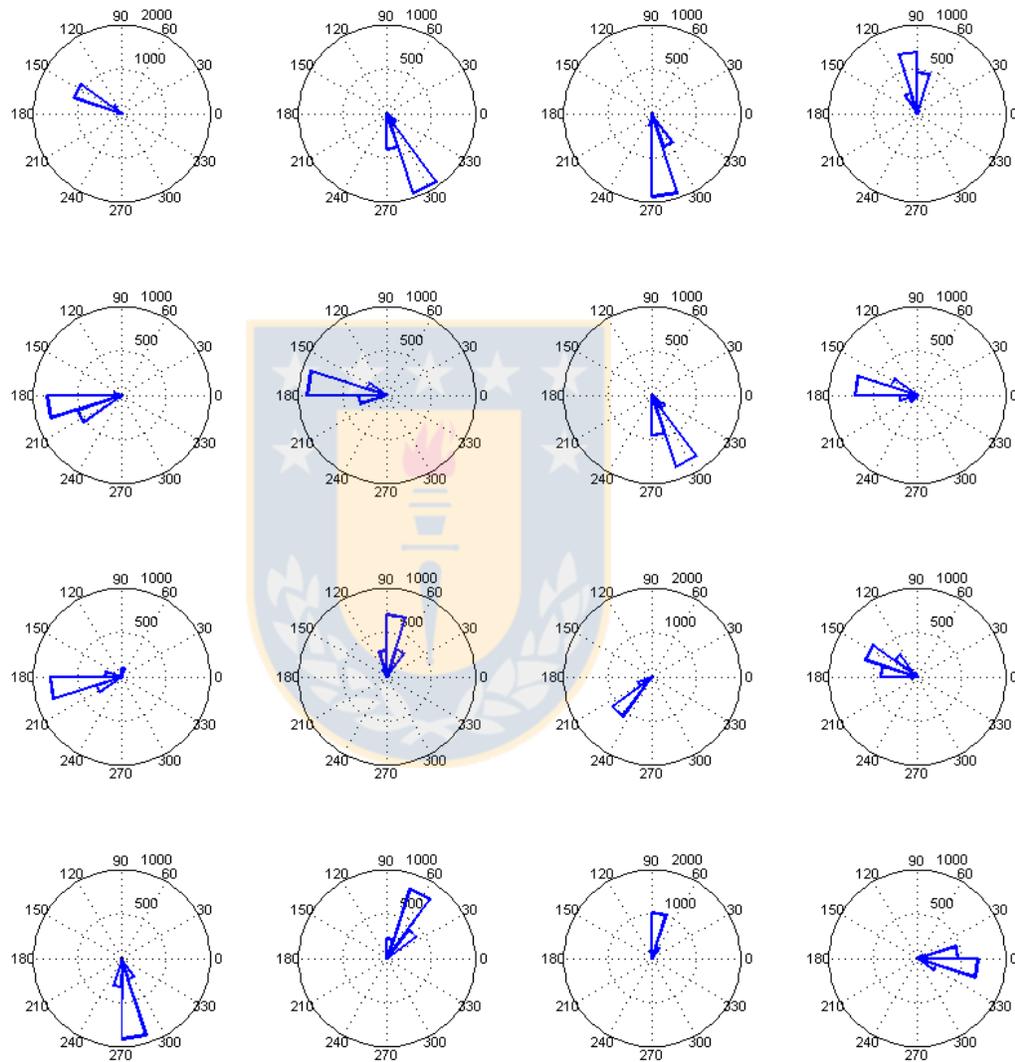


FIGURA A20. Distribución de ángulos diedros para la epotilona 19 libre en solución obtenidos de las simulaciones de dinámica de producción de 20ns en solución acuosa. Los ángulos diedros son reportados en grados.

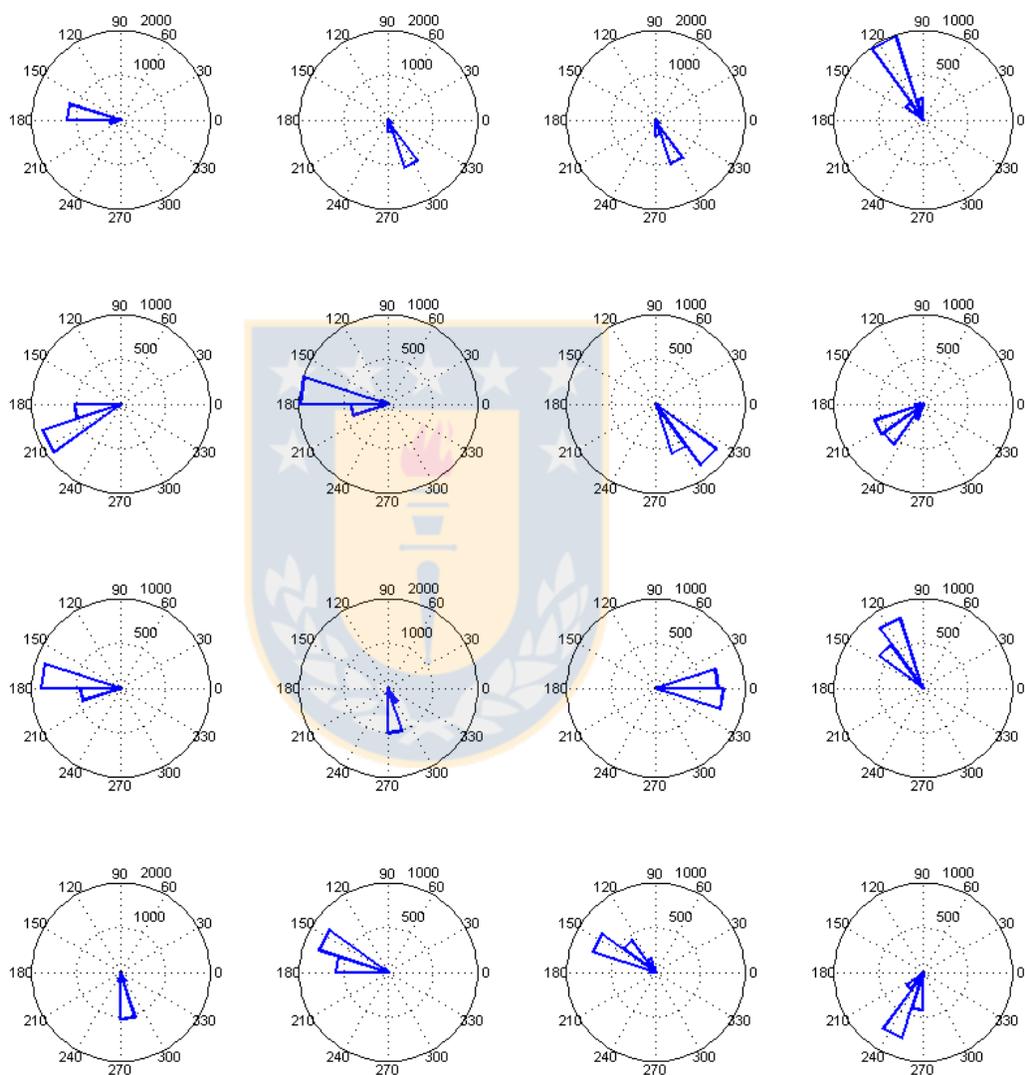
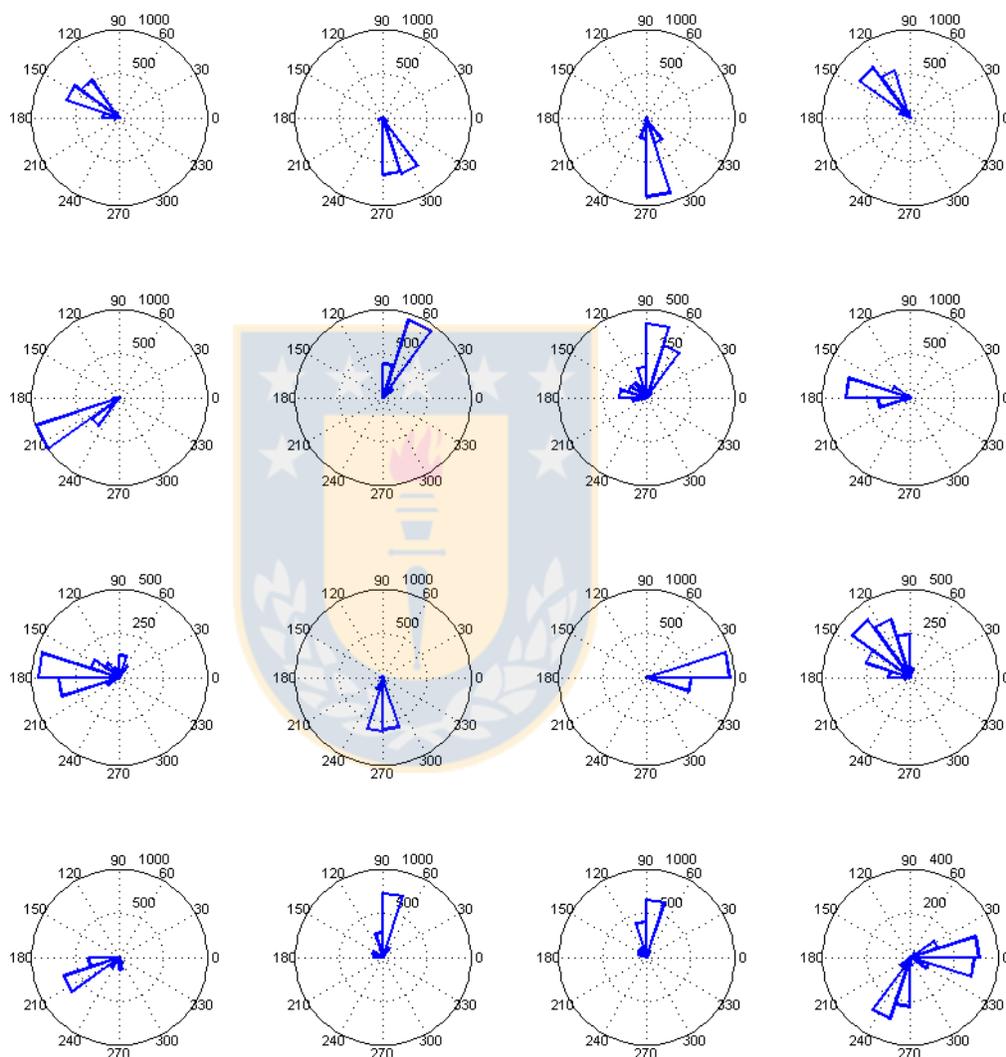


FIGURA A21. Distribución de ángulos diedros para la epotilona 20 libre en solución obtenidos de las simulaciones de dinámica de producción de 20ns en solución acuosa. Los ángulos diedros son reportados en grados.



ARTICULOS

El trabajo realizado en esta Tesis dio lugar a las siguientes publicaciones, cuyas copias se adjuntan en las siguientes páginas:

1. Jiménez VA, Alderete JB, Navarrete KR (2014) Structural insight into epothilones antitumor activity based on the conformational preferences and tubulin binding modes of epothilones A and B obtained from molecular dynamics simulations. *J Biomol Struct Dyn* 1–15
2. Navarrete KR, Alderete JB, Jiménez VA (2015) Structural basis for drug resistance conferred by β -tubulin mutations: a molecular modelling study on native and mutated tubulin complexes with epothilone B. *J. Biomol. Struct. Dyn.*
3. Jiménez VA, Alderete JB, Navarrete KR (2017) Molecular modeling study on the tubulin-binding modes of epothilone derivatives: Insight into the structural basis for epothilones activity. *Chem Biol Drug Des* 90:1247–1259