

ANÁLISIS *IN SILICO* DE LA NATURALEZA DE LAS INTERACCIONES QUE DETERMINAN LA ESPECIFICIDAD Y LA SELECTIVIDAD DE LA PLASMEPSINA II DEL *PLASMODIUM FALCIPARUM* POR SUS SUSTRATOS E INHIBIDORES: IMPLICACIONES PARA EL DISEÑO DE INHIBIDORES MÁS SELECTIVOS

Autoría principal: Pedro Alberto Valiente Flores

Otros autores: Tirso Pons Hernández, Alejandro Gil Ley, Yasel Guerra Borrego, Isel Pascual Alonso, Williams Ernesto Miranda y Yusvel Sierra Gómez

Colaboradores: Gerrit Groenhof, Maarten G Wolf, Daniel Seeliger, Serena Donini, Pedro Geraldo Pascutti, Paulo Ricardo Batista, Ernesto Raúl Caffarena, Isabelle Florent

Entidad ejecutora principal: Centro de Estudios de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana (UH)

Autor de correspondencia

Dr. Pedro Alberto Valiente Flores: Calle 25 #455 e/ J e I, Vedado, Plaza de la Revolución, La Habana, Cuba, CP 10 400. Teléfono: 832 4830, Fax: 832 1321, E-mail: valiente@fbio.uh.cu

Pedro Alberto Valiente Flores (30%). Realizó la mayor parte de los trabajos de predicción *in silico* que incluyeron: i) la identificación de conformaciones específicas de la PlmII no exploradas por las proteasas aspárticas humanas: CatDh, renina y pepsina, ii) el cribado virtual de inhibidores selectivos de la PlmII, iii) el desarrollo de una nueva parametrización del método LIE, iv) la optimización de la selectividad de inhibidores peptido-miméticos no selectivos de la PlmII y v) la predicción de residuos funcionales de la PlmII. Además participó en el diseño teórico y el análisis de los resultados en todas las etapas del trabajo, así como en la escritura de los artículos científicos publicados.

Tirso Pons Hernández (25%). Participó en el diseño de los experimentos y el análisis de los resultados, así como en la escritura de los artículos científicos publicados.

Alejandro Gil Ley (15%). Participó en el desarrollo de una nueva parametrización del método LIE, así como en la escritura de dos de los artículos científicos publicados.

Yasel Guerra Borrego (10%). Diseñó y ejecutó los ensayos de inhibición de los compuestos obtenidos frente a la plasmepsina II y la catepsina D humana.

Isel Pascual Alonso (10%). Diseñó y ejecutó la evaluación de la actividad inhibitoria de los compuestos seleccionados en cultivos *in vitro* de cepas del *Plasmodium falciparum* resistentes y no resistentes a la cloroquina.

Williams Ernesto Miranda Delgado (5%). Participó en la evaluación de la estabilidad del modo de unión de los complejos PlmII: Inhibidor mediante simulaciones de dinámica molecular.

Yusvel Sierra Gómez (5%). Participó en los ensayos de inhibición de los compuestos obtenidos frente a la plasmepsina II y la catepsina D humana.

RESUMEN

La plasmepsina II (PlmII) constituye una diana terapéutica atractiva para el desarrollo de nuevos antimaláricos debido a que esta enzima participa en las etapas iniciales de la degradación de la hemoglobina. El impacto científico de este trabajo radica en que por primera vez se explica que los inhibidores no peptídicos selectivos derivados de la 4-aminopiperidina estabilizan a la PlmII en conformaciones específicas que no son exploradas por las proteasas aspárticas humanas: catepsina D (CatDh), renina y pepsina durante las simulaciones de dinámica molecular (MD). A partir del cribado virtual de una base de compuestos químicos, empleando como receptor estas conformaciones específicas, se identificaron inhibidores selectivos de la PlmII para los cuales se demostró experimentalmente su actividad inhibitoria del crecimiento de cultivos *in vitro* de cepas del *Plasmodium falciparum* resistentes y no resistentes a la cloroquina. Por otra parte, se obtuvo un nuevo modelo de parametrización del método de estimación lineal de la energía libre (LIE) que permitió el cálculo más preciso de la energía libre de unión de los complejos PlmII: Inhibidor. También, se predice por primera vez *i)* que la introducción de residuos alifáticos voluminosos en la posición P3 de inhibidores péptido-miméticos no selectivos podría mejorar la selectividad de estos compuestos por la PlmII, con respecto a la CatDh, *ii)* nuevos residuos funcionales de la PlmII conservados en las plasmepsinas (Plms) de otras especies de *Plasmodium* útiles para el diseño de inhibidores selectivos, *iii)* la interacción directa del lazo L3 de la PlmII con diferentes sustratos e inhibidores. Este último resultado contribuye a explicar las evidencias experimentales que indican la importancia de regiones distantes al centro activo para la función de la PlmII.

COMUNICACIÓN CORTA

Las dianas moleculares más estudiadas en el *Plasmodium falciparum* para el desarrollo de nuevos compuestos antimaláricos son las proteasas que participan en la vía de degradación de la hemoglobina (Hb), pues se ha demostrado que los inhibidores de estas enzimas detienen el crecimiento del parásito en experimentos *in vitro* y en modelos animales [1-4]. De estas enzimas, la PlmII, una proteasa aspártica que participa en las etapas iniciales de la degradación de la Hb, ha sido la más estudiada, pues se han resuelto experimentalmente mediante difracción de rayos X (DRX) varias estructuras tridimensionales (3D) y se han identificado varios

inhibidores péptido-miméticos y no peptídicos mediante el cribado virtual y metodologías de alto flujo [5, 6]. Sin embargo, a excepción de los inhibidores no peptídicos derivados de la 4-aminopiperidina, la mayoría de los compuestos de naturaleza peptídica presentan una baja selectividad por la PlmII, con respecto a la catepsina D humana (CatDh). La baja selectividad de estos inhibidores limita su utilización en la biomedicina [7] pues la inhibición de la CatDh afectaría los procesos intracelulares de degradación proteolítica en los lisosomas y provocaría desórdenes neurodegenerativos letales [8].

Por otra parte, numerosos estudios cinéticos indican que el subsitio S3 del centro activo de la PlmII determina la especificidad de esta enzima por los sustratos sintéticos. Este subsitio tiene una marcada preferencia por residuos hidrofóbicos voluminosos y no tolera residuos cargados en la posición P3 del sustrato [9-11]. A pesar de estos elementos, aún se desconoce a nivel molecular la naturaleza de las interacciones que determinan la especificidad y la selectividad de la PlmII por sus sustratos e inhibidores. Esta información sería útil, además, para el diseño de inhibidores que bloqueen de forma simultánea las otras Plms presentes en la vacuola digestiva de *P. falciparum*, debido al elevado porcentaje de identidad en secuencia (% ID) de la PlmII con sus proteínas parálogas y ortólogas [12].

En este trabajo se analizó por primera vez la naturaleza de las interacciones que determinan la especificidad y la selectividad de la PlmII por sus sustratos e inhibidores mediante la combinación de diferentes herramientas bioinformáticas que incluyen métodos de comparación de secuencias, estructuras 3D y simulaciones de MD. Estos resultados son de gran utilidad para el diseño de inhibidores de la PlmII asistido por computadoras. Desde el punto de vista metodológico, se desarrollaron tres nuevas parametrizaciones del método LIE que permitieron calcular de forma sistemática los valores de los parámetros α y γ a partir de la razón de desolvatación no polar ponderada (WNDR). **Estos nuevos modelos de parámetros permitieron calcular con mayor exactitud los valores de la energía libre de unión de cinco complejos PlmII: Inhibidor, por lo que podrían ser empleados en el estudio de otros complejos receptor ligando y en las etapas de refinamiento de compuestos líderes.** Estos resultados se encuentran incluidos en las publicaciones Valiente *et al* (2010), Gil *et al* (2011) y en la tesis de doctorado Valiente (2012).

También se desarrolló una novedosa metodología para la identificación de inhibidores selectivos de la PlmII mediante la combinación del análisis de componentes principales (PCA) y las simulaciones de anclaje molecular (Figura 1). De acuerdo a nuestros resultados, el movimiento de apertura lateral de la región de la cubierta de la PlmII exploró un conjunto de conformaciones específicas no accesibles a las proteasas aspárticas humanas: CatDh, renina y pepsina durante las simulaciones de MD. Estas conformaciones específicas de la PlmII son solo estabilizadas por los inhibidores no peptídicos selectivos derivados de la 4-aminopiperidina. Por otra parte, estos análisis permitieron establecer diferencias estructurales no observadas a partir de la comparación de la estructura 3D de estas enzimas. **Estos resultados constituyen la principal novedad científica**

de este trabajo pues permitieron la identificación de conformaciones específicas de la PmII útiles para el diseño de inhibidores selectivos asistido por computadoras. Estos resultados se encuentran contenidos en la tesis de doctorado Valiente (2012).

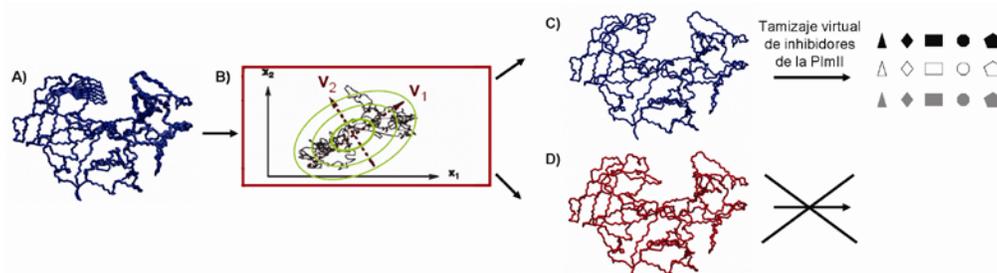


Figura 1 Diagrama del procedimiento desarrollado en este trabajo para la identificación de inhibidores selectivos de la PmII mediante la combinación del análisis de componentes principales (PCA) de las simulaciones de MD y los métodos de anclaje molecular. A) Conjunto de conformaciones de la PmII obtenido a partir de concatenar las trayectorias de 24 simulaciones de MD de 50 ns. De igual forma se obtuvieron los conjuntos de la estructura 3D de las proteasas aspárticas humanas: pepsina, renina y CatDh. B) Esquema de la proyección de la trayectoria de las simulaciones de MD de los sistemas estudiados sobre el conjunto de autovectores obtenidos a partir del PCA. C) Se seleccionaron las conformaciones específicas de la PmII (color azul) para realizar el tamizaje virtual de inhibidores selectivos de esta enzima. Los compuestos seleccionados pertenecientes a diferentes familias se representan como triángulos, rombos, rectángulos, círculos y pentágonos. D) La CatDh y las conformaciones no específicas de la PmII se emplearon para excluir los compuestos con menor grado de selectividad.

El análisis del modo de unión de los complejos de la PmII con los inhibidores derivados de la 4-aminopiperidina muestra que estos compuestos interactúan con los residuos ubicados en la cubierta (M75, Y77), el bolsillo interior de la cubierta (W41, P43, V82, V105, T108, T114, Y115) y los subsitios S3 (I14, M15, S118, F120, I123), S1' (F111) y S3' (T298). **Este hallazgo es de gran importancia para el diseño de inhibidores selectivos pues permitió localizar los residuos críticos para este proceso en la estructura 3D de la enzima.** Estos resultados se encuentran contenidos en las publicaciones Valiente *et al* (2008), Gil *et al* (2011) y en la tesis de doctorado Valiente (2012).

A partir del cribado virtual de una base de compuestos químicos empleando como receptor las conformaciones específicas de la PmII identificadas se seleccionaron inhibidores selectivos de la PmII. El compuesto más selectivo, el inhibidor RJC01092¹, se une 70 veces más fuerte a la PmII con respecto a la CatDh. El análisis comparativo del modo de unión, los valores de K_i y las contribuciones energéticas a la ΔG_{calc} de este compuesto con respecto al inhibidor selectivo derivado de la 4-aminopiperidina, IH4, sugiere que para optimizar la potencia y selectividad del inhibidor RJC01092 es necesario incrementar el valor modular de

¹ Código del compuesto en la base de datos Hitfinder de la compañía Británica Maybridge.

la componente no polar de la ΔG_{calc} , mediante la introducción de grupos hidrofóbicos en su estructura química que interaccionen con los residuos correspondientes a los motivos DTG y los subsitios S3, S1, S1' y S3' de la PImII. Sin embargo, de los compuestos evaluados solo el ligando SPB07935, un inhibidor con un índice de selectividad igual a 60, mostró una actividad inhibitoria del crecimiento de cultivos *in vitro* de cepas del *Plasmodium falciparum* resistentes (**FcB1**, IC50 = 8 μ M) y no resistentes (**3D7**, IC50²= 5 μ M) a la cloroquina. **Este resultado constituye el principal aporte práctico de este trabajo pues se informa la identificación de un inhibidor selectivo de la PImII que inhibe el crecimiento del parásito en cultivos *in vitro*.** Estos resultados se encuentran contenidos en la tesis de doctorado Valiente (2012).

El estudio de los determinantes estructurales y energéticos que determinan la especificidad del subsitio S3 es trascendente para el diseño de inhibidores selectivos asistido por computadoras. En este trabajo se predice por primera vez que las interacciones de van der Waals de la Met15 con los residuos en la posición P3 del sustrato determinan la marcada preferencia del subsitio S3 de la PImII por residuos hidrofóbicos voluminosos. Debido a que la sustitución de la Met15 por la Gln14, es la principal diferencia entre el subsitio S3 de la PImII y la CatDh, también se determinó el efecto de la sustitución Met15Gln sobre la afinidad de la PImII por sustratos sintéticos. Como resultado se predijo la disminución de la afinidad del mutante Met15Gln con respecto a la PImII nativa, por un sustrato que contiene un residuo de Ile en la posición P3. **Este resultado podría ser de gran importancia para el diseño de inhibidores péptido-miméticos más selectivos de la PImII con respecto a la CatDh mediante la introducción de residuos alifáticos voluminosos en la posición P3 de estos ligandos.** Estos resultados se encuentran contenidos en la tesis de doctorado Valiente (2012) y en una publicación enviada Valiente *et al* (2013).

Además, se destaca la predicción de siete residuos de la PImII: Y17, V105, T108, L191, L242, Q275 y T298 importantes para la interacción con sustratos e inhibidores que son conservados en las PImI del *P. falciparum*, mediante la combinación de métodos de análisis de secuencias, estructuras 3D y simulaciones de MD. La inclusión de las simulaciones de MD en nuestra metodología de predicción permitió observar la interacción diferencial del lazo L3 de la PImII con inhibidores de diferentes familias. **Este resultado permitió explicar los experimentos de mutagénesis sitio-específico realizados por Liu *et al.* [13] e Itsvan *et al.* [14] que evidenciaron la importancia de regiones distantes al centro activo en la función de la PImII.** Estos resultados se encuentran contenidos en las publicaciones Valiente *et al* (2008), Gil *et al* (2011) y en la tesis de doctorado Valiente (2012).

Referencias bibliográficas

Estos resultados forman parte de la **tesis de doctorado**:

² Concentración de un inhibidor que disminuye al 50% el crecimiento de cepas del parásito.

Valiente (2012) Análisis *in silico* de la naturaleza de las interacciones que determinan la especificidad y la selectividad de la plasmepsina II del *Plasmodium falciparum* por sus sustratos e inhibidores: implicaciones para el diseño de inhibidores más selectivos. Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.

También se describen en las publicaciones:

- Valiente P A, Batista PR, Pupo A, Pons T, Valencia A, and Pascutti, P.G. (2008) Predicting functional residues for *Plasmodium falciparum* plasmepsins by combining sequence and structural analysis with molecular dynamic simulations. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* Vol 73 (2): 440-457.
- Valiente, P A, Ley, A.G., Batista, P.R., Caffarena, E. R., Pons, T., and Pascutti P. G (2010) New parametrization approaches of the LIE method to improve free energy calculations of PlmII-Inhibitors complexes. *Journal of Computational Chemistry* Vol 31 (5): 2723-2734.
- Ley AG, Valiente P A, Pascutti PG, and Pons T (2011) Computational Perspectives into Plasmepsins Structure-Function Relationship: Implications to Inhibitor Design. *Journal of Tropical Medicine* Vol 2011: 657483.
- Valiente P A, Wolf M G, Seeliger D, Donini S, Ley AG, Pons T, and Groenhof G (2013) Free Energy Calculations of PlmII: Substrate Complexes. Implications for Inhibitor Design. *Journal of Computer Aided Molecular Design* (enviada).

Otras referencias citadas

[1] R.G. Banerjee, D. E, In: *Antimalarial Chemotherapy, Mechanism of Action, Resistance, and New Directions in Drug Discovery*, ed. Rosenthal, P. J. (Humana, Totowa, NJ), pp. 43–63, (2001).

[2] T.S. Haque, A.G. Skillman, C.E. Lee, H. Habashita, I.Y. Gluzman, T.J. Ewing, D.E. Goldberg, I.D. Kuntz and J.A. Ellman, Potent, low-molecular-weight non-peptide inhibitors of malarial aspartyl protease plasmepsin II, *J Med Chem*, 42 (1999) 1428-1440.

[3] D.S. Soni S, Rosen KM, Chafel M, Chishti AH, Hanspal M., Characterization of events preceding the release of malaria parasite from the host red blood cell., *Blood Cells Mol Dis*, 35 (2005) 201-211.

[4] P.J. Rosenthal, In: *Antimalarial Chemotherapy, Mechanisms of Action, Resistance, and New Directions in Drug Discovery*, ed. Rosenthal, P. J. (Humana, Totowa, NJ), (2001) 325–345.

[5] A.M. Silva, A.Y. Lee, S.V. Gulnik, P. Maier, J. Collins, T.N. Bhat, P.J. Collins, R.E. Cachau, K.E. Luker, I.Y. Gluzman, S.E. Francis, A. Oksman, D.E. Goldberg and J.W. Erickson, Structure and inhibition of plasmepsin II, a hemoglobin-degrading enzyme from *Plasmodium falciparum*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 (1996) 10034-10039.

- [6] A. Kiso, K. Hidaka, T. Kimura, Y. Hayashi, A. Nezami, E. Freire and Y. Kiso, Search for substrate-based inhibitors fitting the S2' space of malarial aspartic protease plasmepsin II, *J Pept Sci*, 10 (2004) 641-647.
- [7] C. Boss, S. Richard-Bildstein, T. Weller, W. Fischli, S. Meyer and C. Binkert, Inhibitors of the Plasmodium falciparum parasite aspartic protease plasmepsin II as potential antimalarial agents, *Curr Med Chem*, 10 (2003) 883-907.
- [8] E. Siintola, S. Partanen, P. Strämme, A. Haapanen, M. Haltia, J. Maehlen, A.-E. Lehesjoki and J. Tyynelä, Cathepsin D deficiency underlies congenital human neuronal ceroid-lipofuscinosis, 129 (2006) 1438-1445.
- [9] J. Westling, P. Cipullo, S.H. Hung, H. Saft, J.B. Dame and B.M. Dunn, Active site specificity of plasmepsin II, *Protein Sci*, 8 (1999) 2001-2009.
- [10] B.B. Beyer, J.V. Johnson, A.Y. Chung, T. Li, A. Madabushi, M. Agbandje-McKenna, R. McKenna, J.B. Dame and B.M. Dunn, Active-site specificity of digestive aspartic peptidases from the four species of Plasmodium that infect humans using chromogenic combinatorial peptide libraries, *Biochemistry*, 44 (2005) 1768-1779.
- [11] B.M. Dunn and S. Hung, The two sides of enzyme-substrate specificity: lessons from the aspartic proteinases, *Biochim Biophys Acta*, 1477 (2000) 231-240.
- [12] J.B. Dame, C.A. Yowell, L. Omara-Opyene, J.M. Carlton, R.A. Cooper and T. Li, Plasmepsin 4, the food vacuole aspartic proteinase found in all Plasmodium spp. infecting man, *Mol Biochem Parasitol*, 130 (2003) 1-12.
- [13] J. Liu, E.S. Istvan and D.E. Goldberg, Hemoglobin-degrading plasmepsin II is active as a monomer, *J Biol Chem*, 281 (2006) 38682-38688.
- [14] E.S. Istvan and D.E. Goldberg, Distal substrate interactions enhance plasmepsin activity, *J Biol Chem*, 280 (2005) 6890-6896.