



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA

DE SAN LUIS POTOSÍ

POSGRADO EN CIENCIAS INTERDISCIPLINARIAS

**Identificación de compuestos químicos que se unan a la GTPasa Gpn1
humana en experimentos computacionales de acoplamiento molecular**

TESIS QUE PRESENTA

QFB. JULIO ALBERTO MUÑIZ LUNA

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO

EN CIENCIAS INTERDISCIPLINARIAS

DIRECTOR DE TESIS: DR. ROBERTO SÁNCHEZ OLEA

CO-DIRECTOR DE TESIS: DRA. MÓNICA RAQUEL CALERA MEDINA

AGOSTO 2018

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular y en el Laboratorio de Biología Celular del Instituto de Física de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, bajo la dirección del Dr. Roberto Sánchez Olea y de la Dra. Mónica Raquel Calera Medina. Se agradece el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología que otorgó la beca no. 447565 a Julio Alberto Muñoz Luna. Para la realización de este trabajo se contó con la aportación del Proyecto de Ciencia Básica Conacyt no. 254075 (MRC).

Tesis que presenta:

QFB. JULIO ALBERTO MUÑOZ LUNA

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS INTERDISCIPLINARIAS**

JURADO

Director de tesis: Dr. Roberto Sánchez Olea

Co-Director de tesis: Dra. Mónica Raquel Calera Medina

Tutor académico: Dr. José Guadalupe Sampedro Pérez

Sinodal: Dra. Rosario Esperanza Moctezuma Martiñón

Sinodal: Dr. Carlos Espinosa Soto

AGOSTO 2018

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi hija Valentina por ser la motivación y luz que ilumina mi vida. A Diana mi esposa por su infinita paciencia, sacrificio, consejos, amor y comprensión durante este proceso, mi siempre compañera. A mi mamá por su incondicional apoyo y cariño, por ser fuente de entusiasmo y formar mis inicios en el mundo de la ciencia, y ser la responsable de mi crecimiento académico a lo largo de mi vida. A mi papá por ser siempre mi ejemplo de tranquilidad y enseñarme que la paciencia es también una forma de acción, por siempre cuidar que tuviera lo necesario para continuar mi vida académica.

Agradecimientos

Quiero agradecer profundamente al Dr. Roberto Sánchez Olea y a la Dra. Mónica Raquel Calera Medina por haber depositado su confianza en mí y permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por su paciencia, tiempo, motivación e invaluable consejos, por compartir sus conocimientos y experiencia en todo momento.

A la Dra. Nina Pastor Colón por abrir amablemente las puertas de su laboratorio durante mi estancia en el Centro de Dinámica Celular de la Universidad Autónoma del estado de Morelos y permitir que trabajara bajo su consejo, así como a Ángel Santiago por su paciencia y orientación en la fundamental parte computacional y de docking.

A mis compañeros de laboratorio, Angélica, Tania, Martín y Karla por sus observaciones en las reuniones de grupo, por su compañía y amistad, a Aurelio Hernández por su interés en mi trabajo e importantes recomendaciones experimentales.

Quiero agradecer a Rogelio por compartir su conocimiento y vasta experiencia en la purificación de las proteínas recombinantes, por sus sabios consejos, asesoría incondicional e invaluable compañía.

Agradezco también a Gema por su orientación, consejos y apoyo tanto en Cuernavaca donde gentilmente me recibió, como en San Luis Potosí, de igual forma por permitirme trabajar a partir de sus modelos a los que ha dedicado mucho tiempo y esfuerzo.

Finalmente a mis sinodales quienes han sido indispensables para mejorar el presente trabajo en todos los sentidos y que me han brindado en todo momento su absoluta disposición cuando lo he necesitado.

Resumen

La proteína Gpn1 pertenece, junto con Gpn2 y Gpn3, a la familia de las GTPasas GPN. Las tres proteínas se encuentran universalmente conservadas en células eucariontes y son esenciales para la vida, posiblemente debido a su participación en la acumulación nuclear de la RNA polimerasa II, la enzima que transcribe la totalidad de los genes que codifican para proteínas. Gpn1 forma un homodímero Gpn1/Gpn1 o un heterodímero Gpn1/Gpn3. Aún no se ha determinado la estructura cristalográfica de Gpn1 humana pero sí la de una forma trunca de la Gpn1 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, lo que nos ha permitido aplicar herramientas de modelado y dinámica molecular para generar modelos estructurales del homodímero de Gpn1 y del heterodímero Gpn1/Gpn3 humanas. En este trabajo utilicé estos modelos y técnicas computacionales de acoplamiento molecular o “docking” para identificar moléculas pequeñas con la capacidad de interactuar con Gpn1 a nivel atómico. Además, determiné el efecto de los compuestos seleccionados sobre la actividad enzimática de GTPasa de Gpn1 recombinante y del complejo HisGpn1/Gpn3. De igual forma se establecieron las condiciones para obtener a HisGpn1 y HisGpn1/Gpn3 humanas como poblaciones monodispersas en experimentos de dispersión dinámica de luz, con perspectivas a evaluar próximamente el efecto de los fármacos identificados en la integridad del homodímero de Gpn1 y del heterodímero Gpn1/Gpn3. La disponibilidad de inhibidores farmacológicos de la función de Gpn1 acelerará la identificación de los procesos celulares y moleculares regulados por esta GTPasa esencial en células humanas.

Índice general

1. Introducción	1
1.1 Gpn1 y cáncer	3
2. Objetivos	6
2.1 Objetivo General	6
2.2 Objetivos Específicos	6
3. Materiales y Métodos	7
3.1 Generación de modelos	7
3.2 Simulación por dinámica molecular	7
3.3 Búsqueda de cavidades sobre la superficie del modelo de Gpn1	8
3.4 Obtención de ligandos	8
3.5 Acoplamiento o docking molecular	9
3.6 Análisis post-docking	10
3.7 Purificación de HisGpn1 en bacterias <i>Escherichia coli</i>	11
3.8 Expresión de Gpn1 recombinante humana	12
3.9 Cromatografía de afinidad	12
3.10 Cromatografía de exclusión molecular	13
3.11 Almacenamiento de HisGpn1 y HisGpn1/Gpn3	13
3.12 Electroforesis en gel desnaturalizante (SDS/PAGE)	13
3.13 Ensayos de dispersión dinámica de luz (DLS)	14
3.14 Ensayos de actividad enzimática de GTPasa	14
3.15 Determinación de actividad enzimática de HisGpn1 y HisGpn1/Gpn3 recombinantes	15
4. Resultados	17
4.1 Modelado por homología	17

4.2 Dinámica molecular	18
4.3 Clustering	20
4.4 Obtención de ligandos	20
4.5 Acoplamiento o docking molecular.....	21
4.6 Análisis post-docking	23
4.7 Purificación de HisGpn1 y HisGpn1/Gpn3.....	25
4.8 Actividad enzimática de HisGpn1 y HisGpn1/Gpn3 recombinantes	27
4.9 Efecto de la concentración de HisGpn1 y HisGpn1/Gpn3 recombinantes sobre su actividad de GTPasa	28
4.10 Curso temporal de actividad de GTPasa para G1 y H1.....	29
4.11 Efecto de los diferentes fármacos en la actividad de GTPasa de G1 y H1	30
5. Discusión	38
6. Conclusiones y Perspectivas.....	42
7. Referencias.....	44

Índice de figuras

1.1 Incidencia en defunciones de pacientes con diferentes tipos de cáncer de acuerdo a datos de la OMS en 2015.....	4
1.2 La sobre-expresión de GPN1 o GPN3 acorta el período de sobrevida en pacientes con cáncer de mama del subtipo HER2+.....	5
3.1 Estrategia general para determinar la unión de fármacos a Gpn1.....	9
3.2 Protocolo para la purificación de HisGpn1.....	11
3.3 Descripción general del ensayo GTPase-Glo optimizado.....	16
4.1 Modelos del monómero de Gpn1 generados por I-TASSER.....	18
4.2 Cambios estructurales al inicio y al final de la simulación por dinámica molecular en el modelo 1 del monómero Gpn1.....	18
4.3 Cambios estructurales al inicio y al final de la simulación por dinámica molecular en el Gpn1 “modificada” del monómero Gpn1.....	19
4.4 Centro de cluster para los modelos de Gpn1.....	20
4.5 Fármacos que se acoplan a la superficie del modelo 1 de Gpn1 humana.....	21
4.6 Concordancia entre los ligandos obtenidos por docking y las cavidades predichas por Metapocket.....	21
4.7 Representación de los fármacos unidos en la región del C-terminal.....	22
4.8 Acercamiento al sitio de unión a GTP.....	22
4.9 Representación de la isosuperficie del modelo 1 de Gpn1 humana.....	22
4.10 Sitios de interés para el acoplamiento de fármacos sobre la superficie de Gpn1.....	24
4.11 Sitios de unión de los fármacos resultantes de procesamiento post-docking acoplados sobre los sitios de interés en la superficie de Gpn1.....	24
4.12 Fracciones de HisGpn1 colectadas durante en los diferentes pasos del proceso de purificación.....	25
4.13 Cromatograma de HisGpn1 separada en columna de exclusión molecular.....	26
4.14 Actividad enzimática intrínseca de G1 y H1.....	27
4.15 Efecto de la concentración de HisGpn1 recombinantes sobre su actividad de GTPasa.....	28
4.16 Efecto de la concentración de HisGpn1/Gpn3 recombinantes sobre su actividad de GTPasa.....	28
4.17 Curso temporal de actividad de GTPasa para HisGpn1 en presencia de GTP.....	29
4.18 Curso temporal de actividad de GTPasa para HisGpn1/Gpn3 en presencia de GTP.....	29
4.19 Efecto de propranolol en la actividad de GTPasa de HisGpn1.....	30
4.20 Efecto de propranolol en la actividad de GTPasa de HisGpn1/HisGpn3.....	31
4.21 Efecto de bisacodilo en la actividad de GTPasa de HisGpn1.....	32
4.22 Efecto de bisacodilo en la actividad de GTPasa de HisGpn1/Gpn3.....	32
4.23 Efecto de rosiglitazona en la actividad de GTPasa de HisGpn1.....	33
4.24 Efecto de rosiglitazona en la actividad de GTPasa de HisGpn1/Gpn3.....	34
4.25 Efecto de idarubicina en la actividad de GTPasa de HisGpn1.....	34
4.26 Efecto de idarubicina en la actividad de GTPasa de HisGpn1/Gpn3.....	35
4.27 Efecto de doxorubicina en la actividad de GTPasa de HisGpn1.....	36

4.28 Efecto de doxorubicina en la actividad de GTPasa de HisGpn1/Gpn3.....36

Tablas

Tabla 1. Fármacos resultantes del análisis *post-docking*.....23

Capítulo I - Introducción

Las GTPasas son una superfamilia de proteínas que funcionan como interruptores moleculares y participan en una gran variedad de funciones celulares, incluyendo la transducción de señales, la síntesis de proteínas, la migración celular, el tráfico vesicular y la reorganización del citoesqueleto [1 y 2]. Las GTPasas tienen una alta afinidad por los nucleótidos de guanina e hidrolizan el GTP. Estas proteínas alternan entre un estado activo, donde tienen unido GTP, y un estado inactivo, donde la GTPasa se encuentra unida a GDP. La familia de GTPasas formada por las proteínas GPN contiene a los parálogos denominados Gpn1, Gpn2 y Gpn3. Las tres proteínas se encuentran presentes y son esenciales en todos los organismos eucariontes. Estas proteínas se caracterizan por presentar un motivo denominado GPN, el cual consiste de los residuos de Gly-Pro-Asn (GPN). Como el resto de las GTPasas, las proteínas GPN presentan los cinco motivos involucrados en la unión e hidrólisis de nucleótidos G1-G5 [3].

Diversos estudios han demostrado que Gpn1 cumple un papel fundamental en la importación nuclear de la RNA polimerasa II (RNAPII) [4], la enzima responsable de la transcripción de la totalidad de los genes que codifican para proteínas. La supresión de la expresión de Gpn1 en células humanas resulta en la acumulación de Rpb1, la subunidad de mayor tamaño de la RNAPII, en el citoplasma [4]. Así mismo en *Saccharomyces cerevisiae* la disminución de Gpn1 también conduce a una acumulación citoplasmática de Rpb1 [4]. Dicha acumulación también se observa en levaduras que expresan solo Gpn1 mutada en su sitio de unión a nucleótidos o en su motivo GPN. En *Saccharomyces cerevisiae* la reducción de la función de Gpn1 conduce a defectos adicionales a la deslocalización de la RNAPII, incluyendo defectos en la cohesión de cromátidas [5] y alteraciones en el ciclo celular. Resulta interesante que el extremo C-terminal de Gpn1 no se encuentra conservado entre eucariotas y que además está ausente en arqueas [3].

En 2015 Niesser y colaboradores reportaron la estructura cristalográfica de Gpn1 en una conformación cerrada unida a GDP y en una conformación abierta unida a un análogo no hidrolizable de GTP, siendo esta la primera vez que una GTPasa GPN en eucariotas se logró cristalizar.

Nuestro grupo de trabajo reportó recientemente la purificación de la proteína HisGpn1 humana producida en bacterias [6]. La purificación de Gpn1 cuenta con la suficiente concentración de proteína y pureza para su cristalización, sin embargo hasta el momento no se ha logrado determinar la estructura cristalográfica de la GTPasa Gpn1 humana. Recientemente el interés en los métodos computacionales para el estudio de proteínas se ha incrementado, principalmente por la producción de información útil tanto a nivel estructural como funcional. La disponibilidad de estructuras proteicas tanto por cristalografía o por modelado molecular abren la posibilidad de descubrir nuevos ligandos con la capacidad de unirse, y potencialmente de regular la función de dichas proteínas, por métodos computacionales. El enfoque del descubrimiento de fármacos asistido por computadora implica el análisis de ligandos que potencialmente interactúan con un blanco de interés a nivel atómico. En nuestro grupo se ha empleado I-TASSER (Iterative Threading Assembly Refinement) para la construcción de un modelo de resolución atómica de Gpn1 humana a partir de su secuencia de aminoácidos y la disponibilidad de la estructura tridimensional experimental de la proteína ortóloga de *Saccharomyces cerevisiae*, la cual se encuentra en el Protein Data Bank (PDB). La Gpn1 humana contiene 374 aminoácidos, dos inserciones que no se encuentran en ninguna otra GTPasa y una cola C-terminal desde los residuos 279 a 374. El núcleo de GTPasa en Gpn1 contiene los motivos G1 a G5 que se requieren en otras GTPasas para la unión e hidrólisis del GTP [3]. Además, se ha propuesto dos posibles arreglos oligoméricos para Gpn1, una forma homodimérica (Gpn1/Gpn1) y otra heterodimérica con Gpn3 (Gpn1/Gpn3).

El desafío es emplear efectivamente la información estructural obtenida a partir de los métodos computacionales y fármacos con la capacidad de unirse a las cavidades superficiales de las proteínas para

el descubrimiento de nuevas terapias, generación de nuevas moléculas, rediseño de moléculas existentes cuyas propiedades farmacológicas se considera podrían mejorar, o incluso utilizar fármacos cuya actividad ya es conocida, en padecimientos para los cuales no se consideraría su administración. Una vez que se hayan identificado los ligandos que se unan a Gpn1 por acoplamiento molecular o “docking”, así como la fuerza de las interacciones de unión, se procederá a probar experimentalmente el efecto de dichos compuestos en las funciones bioquímicas específicas de Gpn1 humana recombinante purificada de bacterias, incluyendo su actividad de GTPasa y capacidad para formar un complejo con Gpn3, ya que existe la posibilidad de que los fármacos unidos a la interfase impidan la formación de dichos complejos.

1.1 Gpn1 y cáncer.

Actualmente el cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo y de acuerdo a los estudios más recientes concluidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) causó 8.8 millones de muertes en 2015, en la figura 1 se muestran los tipos de cáncer más comunes. El avance de los estudios moleculares en cáncer ha proporcionado argumentos para establecer subclasificaciones de los pacientes con cáncer de mama que son de gran importancia diagnóstica y terapéutica. La identificación temprana del cáncer de mama hace más probable que el cáncer responda positivamente a un tratamiento y puede dar lugar a una mayor probabilidad de supervivencia, menos morbilidad y una reducción en el costo de tratamiento, además de considerar que cada tipo de cáncer requiere un tratamiento específico, como cirugía, radioterapia y quimioterapia de acuerdo a la evolución del mismo.

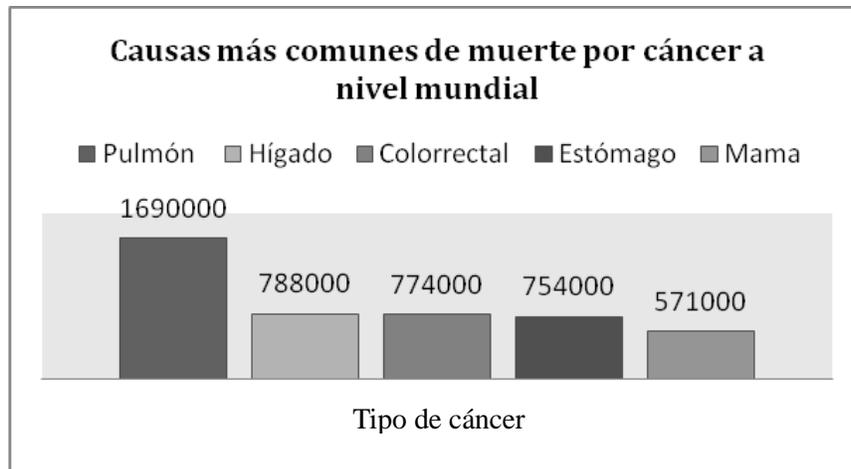


Figura 1.1. Incidencia en defunciones de pacientes con diferentes tipos de cáncer de acuerdo a datos de la OMS en 2015.

Un análisis de un estudio grande de pacientes con cáncer de mama realizado por nuestro grupo identificó que la sobreexpresión de Gpn1/Gpn3 ocurre en un porcentaje elevado de pacientes con cáncer de mama. Interesantemente, la sobreexpresión de Gpn1 o Gpn3 está involucrada en el acortamiento significativo en el período de vida exclusivamente en el subgrupo de pacientes con cáncer de mama del subtipo HER2+, las cuales sobreexpresan el receptor 2 al factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) (Fig. 1.2). Las vías de señalización activadas por el receptor HER2 contribuyen positivamente al crecimiento y proliferación de las células mamarias. Una sobreexpresión de la proteína HER2 causa una reproducción fuera de control de las células mamarias. Es importante señalar que el cáncer de mama HER2+ presenta una tendencia a ser más agresivo que el cáncer de mama HER2-negativo. Por tanto, considerando que la sobreexpresión de Gpn1 acorta significativamente el período de vida de las pacientes con cáncer de mama HER2+, proponemos investigar a largo plazo la hipótesis de que la inhibición de la función de Gpn1 podría beneficiar la calidad de vida y extender el período de vida de dichos pacientes. Proponemos que en este tipo de cáncer la inhibición de la función de Gpn1/Gpn3 con fármacos podría limitar la expansión de las células cancerosas. Conociendo que Gpn1/Gpn3 se sobreexpresan en otros subtipos de cáncer de mama y son proteínas esenciales, existe la posibilidad de que la inhibición

farmacológica de estas proteínas podría ayudar en el tratamiento de pacientes con cualquier tipo de cáncer de mama.

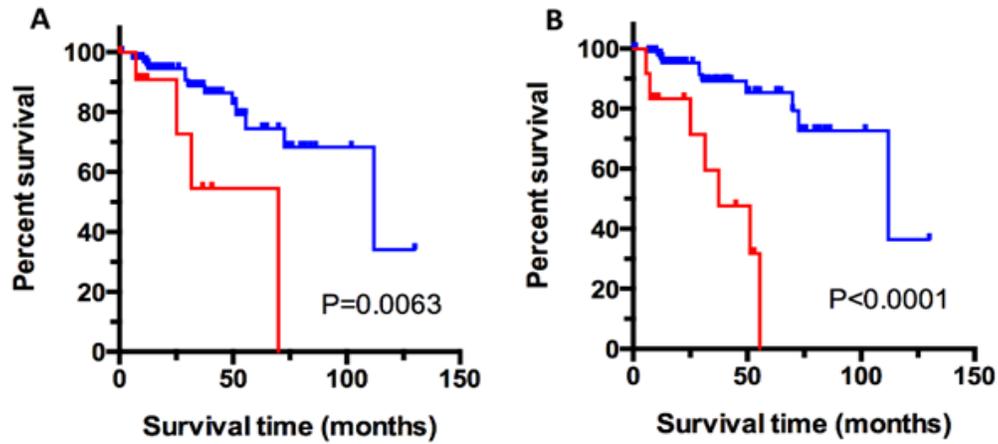


Figura 1.2. La sobre-expresión de GPN1 o GPN3 acorta el período de sobrevida en pacientes con cáncer de mama del subtipo HER2+. Los pacientes con cáncer de mama HER2+ que sobre-expresan los genes GPN1 (A, rojo) o GPN3 (B, rojo) tienen un período de sobrevida más corto que aquellos pacientes con cáncer de mama Her2+ que no sobre-expresan ninguno de estos dos genes (azul, A y B).

Actualmente se emplean fármacos en la quimioterapia que inhiben la función de proteínas que son necesarias para la multiplicación tanto de células normales como cancerosas, lo cual aunque genera efectos secundarios no deseados, son útiles en el tratamiento del cáncer. Sin embargo, el hecho de que la expresión de Gpn1 y Gpn3 se asocia significativamente con un acortamiento del período de vida en pacientes con cáncer de mama del subtipo HER2+, los fármacos que inhiban selectivamente a Gpn1/Gpn3 serían de especial importancia para el tratamiento de estos pacientes. Cabe mencionar que fármacos que inhiban Gpn1/Gpn3 ayudarían a la identificación de las funciones celulares de estas proteínas esenciales.

Capítulo II - Objetivos

2.1 Objetivo General

Identificar fármacos que se unan a la GTPasa Gpn1 humana por medio de experimentos computacionales de acoplamiento molecular o “*docking*”.

2.2 Objetivos Específicos

- I. Identificar mediante experimentos computacionales de acoplamiento molecular o “*docking*” fármacos que tengan la capacidad de unirse a cavidades en la superficie de la GTPasa de Gpn1 humana.
- II. Determinar las condiciones experimentales para medir la actividad enzimática de HisGpn1 recombinante *in vitro*.
- III. Probar experimentalmente el efecto de los fármacos que unan Gpn1 humana en los experimentos computacionales en la actividad enzimática de la GTPasa de Gpn1 humana recombinante *in vitro*.

Capítulo III - Materiales y Métodos

3.1 Generación de modelos.

El modelo estructural de Gpn1 humana se realizó mediante modelado computacional por homología. Este enfoque se fundamenta en la identificación de una o más estructuras de proteínas conocidas que probablemente se asemejan a la estructura de una secuencia problema, y posteriormente en la producción de un alineamiento que mapea residuos en la secuencia problema a residuos en la o las secuencias de su base de datos.

La herramienta bioinformática utilizada para este trabajo es I-TASSER (Iterative Threading ASSEmblY Refinement) a través de su servidor en la dirección <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>, emplea un enfoque jerárquico de la estructura de las proteínas y realiza predicción de funciones [4], identifica moldes estructurales de un archivo PDB, que en este caso se empleó 5HCN, el cual corresponde a Npa3 en complejo con un análogo no hidrolizable del GTP, posteriormente se genera la estructura final 3D a través de su base de datos. En base a modelos atómicos construidos mediante simulaciones de ensamble de fragmentos a partir de moldes iterativos.

3.2 Simulación por dinámica molecular.

Los métodos de simulación de dinámica molecular producen trayectorias de posiciones atómicas, velocidades y/o energías como una función del tiempo. Por otra parte, la resolución de estructuras macromoleculares obtenidas a partir de experimentos de cristalografía de rayos X, RMN o modelado por homología permiten la obtención de imágenes estáticas en el tiempo o incluso algún indicio del movimiento de las moléculas, sin embargo ninguna de ellas nos permite visualizar el comportamiento de estas moléculas respecto al tiempo, por ello la necesidad de llevar a cabo simulaciones por dinámica molecular.

3.3 Búsqueda de cavidades en la superficie del modelo tridimensional de Gpn1 humana.

Conocer la ubicación de sitios de unión al sustrato o ligando de enzimas en las cavidades de las proteínas receptoras hace posible diseñar inhibidores o antagonistas de las mismas. La superficie de la proteína puede formar cavidades que fungen como sitios de unión de ligandos de moléculas pequeñas. Por lo tanto, la identificación de cavidades en la superficie de una proteína a menudo es el punto de partida para el diseño de fármacos basado en la estructura. La detección apropiada del sitio de unión del ligando es un requisito previo para el acoplamiento de la proteína-ligando. La herramienta empleada para determinar las cavidades de Gpn1 es el metaservidor Metapocket 2.0, un método de consenso, en el que los sitios de unión predichos por ocho métodos: LIGSITEcs, PASS, Q-SiteFinder, SURFNET, Fpocket, GHECOM, ConCavity y POCASA se combinan para mejorar la tasa de éxito de la predicción [5], teniendo como principal objetivo identificar los sitios de unión del ligando en la superficie de la proteína. Desde el sitio <http://projects.biotec.tu-dresden.de/metapocket/index.php> se adjunta el archivo en formato PDB donde se encuentra la estructura del monómero de Gpn1 modelado por I-TASSER, la búsqueda del número de cavidades se establece en 8.

3.4 Obtención de ligandos.

La obtención de ligandos fue realizada a partir de la base de datos ZINC (<http://zinc.docking.org/>) desarrollada por la Universidad de California en San Francisco, cuya particularidad y objeto de interés es que los compuestos químicos almacenados en ella son disponibles comercialmente. Los criterios de selección para los compuestos químicos están basados en la regla de Lipinski, fundamentada en las propiedades moleculares con relevancia farmacocinética en el cuerpo humano, limitando la búsqueda a aquellos ligandos cuyo coeficiente de reparto octanol-agua (logP) se encuentre entre 0 y 5.0, además de considerar solamente aquellas moléculas con un peso que se encuentre entre 160 y 500g/mol [6].

3.5 Acoplamiento o “docking” molecular.

Este procedimiento computacional intenta predecir la unión no covalente de macromoléculas o, más frecuentemente, de una macromolécula o receptor que para este trabajo fue el modelo de Gpn1 humana y una molécula pequeña (ligando) de manera eficiente, comenzando con sus estructuras no unidas, estructuras obtenidas a partir de simulaciones o modelado de homología, como es el presente caso.

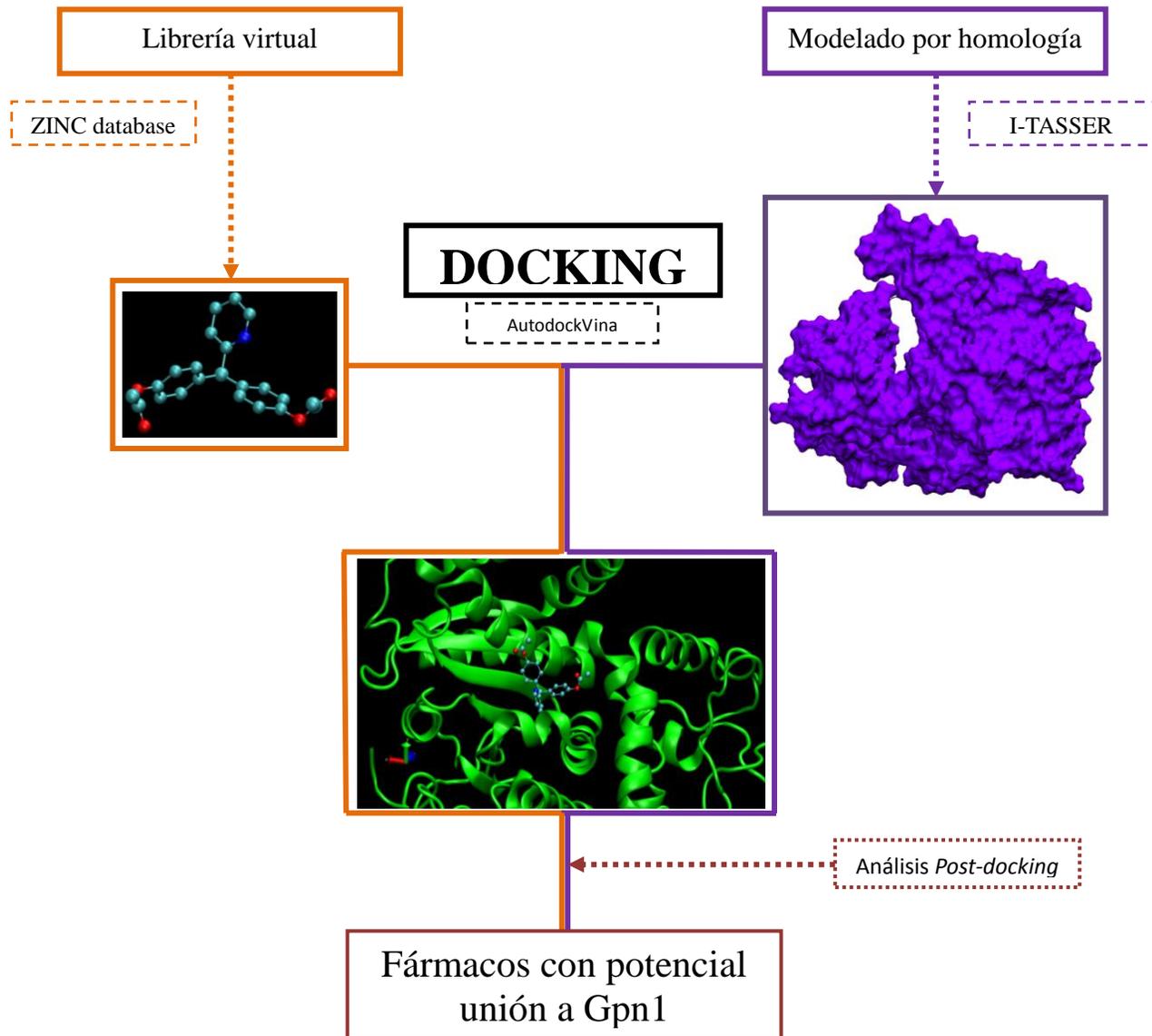


Figura 3.1. Estrategia general para determinar la unión de fármacos a Gpn1. Se representan los dos elementos esenciales para la realización de docking molecular, el ligando que corresponde modelo del monómero de la GTPasa Gpn1 y los ligandos a acoplar, diseñados a partir de la base de datos de ZINC (<http://zinc.docking.org/>).

El objetivo es predecir las conformaciones ligadas y la afinidad de unión, para ello existe una gran cantidad de software que permite la realización de estudios de acoplamiento molecular. Para este trabajo se empleó el plugin AutoDock Vina en PYMOL.

Autodock emplea mapas de interacción para el docking, mismos que calcula con el programa Autogrid [7]. El examen visual de las geometrías de unión predichas o poses, contribuye crucialmente a encontrar un compuesto que presente una afinidad de unión potenciada en alguno de los sitios de interés para el modelo de Gpn1 humana, mismos que por consecuencia presentarían la posibilidad de afectar su función. El número de poses a generar fue establecido en 5 y el tamaño de la caja corresponde a 75 Å en el eje de las "x", 66 Å en el eje de las "y", y 56 Å en "z".

3.6 Análisis post-docking.

Una vez generadas las 5 poses correspondientes a la orientación de cada uno de los 1752 ligandos respecto al modelo de Gpn1, se obtiene el cálculo de la energía de afinidad así como la distancia de enlace entre el complejo ligando-Gpn1. La selección de compuestos químicos que potencialmente se unan a la GTPasa Gpn1 estará fundamentada en aquellos compuestos que tengan la mayor energía de afinidad, es decir, un valor de energía libre de Gibbs más negativo, y para aquellos que presenten la menor distancia de interacción, los criterios establecidos aplicables a estos parámetros, son que el compuesto químico deberá tener una energía de afinidad con valores inferiores a -8 kJ/mol y la distancia igual o menor que 8 Å.

3.7 Purificación de HisGpn1 en bacterias *Escherichia coli*.

Se examinará el efecto de los fármacos obtenidos en los experimentos computacionales de acoplamiento molecular o “docking” en ensayos *in vitro* utilizando Gpn1 recombinante humana aislada de bacterias *E. coli*. Para alcanzar este objetivo será necesaria la aplicación de un protocolo adecuado para producir Gpn1 humana como proteína recombinante en un sistema heterólogo. La obtención de Gpn1 humana recombinante brindará la posibilidad de realizar ensayos bioquímicos y biofísicos para comprender su funcionamiento y probar los efectos con la exposición a fármacos que presentan energías de afinidad elevadas de acuerdo a los resultados del docking computacional.

El protocolo empleado por González-González et al., 2017 para expresar y purificar Gpn1 humana recombinante etiquetada con histidinas (Fig. 3.2), permitirá purificar a Gpn1 con un alto grado de pureza, correctamente plegada y con la capacidad de unir nucleótidos de guanina e hidrolizar GTP [2].

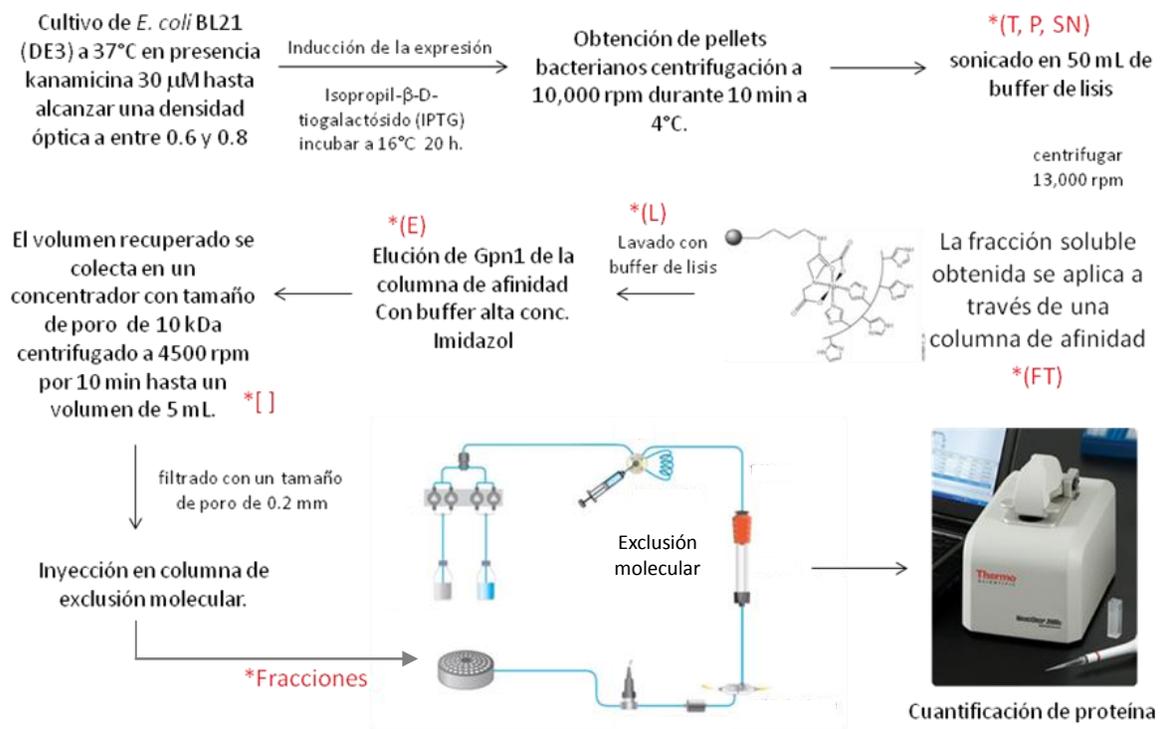


Figura 3.2. Protocolo para la purificación de HisGpn1 y HisGpn1/Gpn3.

3.8 Expresión de HisGpn1 recombinante humana.

Bacterias competentes *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido para expresar HisGpn1 se cultivaron a 37°C con agitación a 200 rpm en medio LB y presencia del antibiótico de selección kanamicina 30 µM hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm entre 0.6 y 0.8. Posteriormente se llevó a cabo la inducción de la expresión con isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG) a una concentración final de 0.1 mM a 16°C durante 20 h. Finalizada la inducción se obtienen los pellets bacterianos por centrifugación del cultivo a 10,000 rpm durante 10 min a una temperatura de 4°C. Los pellets se congelaron a -20°C hasta su uso. Para dar comienzo a la purificación es necesario resuspender los pellets y lisar las células, para lo cual se sonicaron las bacterias procedentes de 1 L de cultivo en 50 mL de buffer de lisis (Tris 50 mM, pH 7.5, NaCl 100 mM, imidazol 30 mM, y Tween-20 al 0.2%). Finalizado el sonicado se centrifugó el lisado a 13,000 rpm durante 30 min a 4°C y se recuperó la fracción soluble.

3.9 Cromatografía de afinidad.

La cromatografía de afinidad separa a las proteínas en base a la interacción reversible que sostienen con iones metálicos acoplados a una matriz de cromatografía. Gpn1 se expresó con la etiqueta de 6xHis, por lo que se puede purificar por su unión a los iones metálicos de níquel. La histidina es el aminoácido que exhibe la interacción más fuerte, ya que los grupos donantes de electrones en el anillo de imidazol de histidina forman fácilmente enlaces de coordinación con metales de transición inmovilizados como el caso del níquel. La fracción soluble obtenida se aplica a través de una columna de afinidad conteniendo níquel previamente equilibrada con el buffer de lisis. Posteriormente la resina fue lavada con 70 mL del mismo buffer. Finalmente Gpn1 se eluyó de la columna de afinidad con 14 mL de buffer de elución (Tris 50 mM, pH 7.5, NaCl 100 mM, imidazol 300 mM). Una concentración elevada de imidazol desplaza a la etiqueta de histidinas en Gpn1 del níquel; el volumen recuperado se colectó en un concentrador con tamaño de poro de 10 kDa el cual se centrifugó a 4,500 rpm durante 10 min hasta alcanzar un volumen

final de 5 mL. Los 5 mL del concentrado se pasaron por un filtro con un tamaño de poro de 0.2 μm y las proteínas se separaron en una columna de exclusión molecular.

3.10 Cromatografía de exclusión molecular.

El método de cromatografía utilizado como paso final en la purificación de Gpn1 es la filtración en gel. Ésta se usa para eliminar los contaminantes que puedan estar presentes con la proteína parcialmente purificada y también puede ser especialmente útil en la determinación de los pesos moleculares nativos para proteínas oligoméricas. Para purificar Gpn1 se utilizó una columna Superdex 200 16/600 en un equipo AKTA PURE 25M, de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

3.11 Almacenamiento de HisGpn1 y HisGpn1/Gpn3.

La realización de los stocks tanto para HisGpn1 como HisGpn1/Gpn3 fue llevada a cabo a partir de una concentración de 0.86 mg/mL y 1.52 mg/mL respectivamente, resultantes de las fracciones correspondientes al centro del pico en el cromatograma de exclusión molecular, las concentraciones de almacenamiento para ambas enzimas fueron ajustadas a 20 μM y a una concentración de glicerol al 10% para su protección al congelamiento que se efectuó a -20°C .

3.12 Electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida (SDS/PAGE).

La electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizantes (SDS/PAGE) es uno de los métodos más usados para la separación de mezclas de proteínas en función de sus pesos moleculares. Los geles de poliacrilamida constituyen un excelente medio de soporte para separaciones electroforéticas, dado que reúnen una serie de propiedades idóneas. Representa una herramienta para verificar la calidad de nuestra purificación en diferentes etapas de la misma, ya que son tomadas muestras desde el lisado hasta que finalmente se tiene concentrada la proteína en el último paso de la purificación.

3.13 Ensayos de dispersión dinámica de luz (DLS).

Los ensayos de dispersión dinámica de luz (DLS) se realizaron con Gpn1 humana recombinante para medir su tamaño hidrodinámico, polidispersión y posible agregación. La luz dispersada es una función del tamaño hidrodinámico y la concentración de la muestra. Debido a que las moléculas o partículas grandes se mueven más lentamente que las pequeñas, se produce una función de correlación definida, estas fluctuaciones están directamente relacionadas con la velocidad de difusión de las moléculas en la solución y ocurren por el movimiento browniano de las mismas. A partir de la función de correlación se calcula el coeficiente de difusión de las moléculas. Finalmente también es posible calcular el radio hidrodinámico de la proteína y una estimación del peso molecular. Para este trabajo es fundamental obtener de manera recombinante a HisGpn1 y HisGpn1/Gpn3 como monodispersas, ya que se desea probar si algún compuesto químico pudiera afectar la estabilidad del complejo.

3.14 Ensayos de actividad enzimática de GTPasa.

La actividad de GTPasa intrínseca de Gpn1 purificada se llevó a cabo en ensayos enzimáticos con el kit GTPase-Glo Assay de manera semicuantitativa. Este ensayo evalúa la actividad de GTPasa detectando la cantidad de GTP remanente después de la hidrólisis de GTP en una reacción de GTPasa. El GTP remanente se convierte en ATP usando el Reactivo GTPase-Glo; posteriormente se detecta el ATP usando luciferina como sustrato de la luciferasa para producir bioluminiscencia en forma de oxiluciferina. Una GTPasa altamente activa hidroliza más GTP, reduciendo la cantidad de ATP producido a partir de GTP y reduciendo la producción de luz. Una GTPasa menos activa hidroliza menos GTP, dejando una mayor cantidad de GTP para convertirse en ATP y producir más luz, por tanto la cantidad de luminiscencia generada es inversamente proporcional a la actividad enzimática [8].

Con la finalidad de establecer las condiciones idóneas para la determinación de la actividad de GTPasa de acuerdo a nuestras necesidades, se evaluaron distintas variables como la concentración de HisGpn1 y

HisGpn1/Gpn3, los tiempos de reacción en cada paso durante el desarrollo del ensayo, la concentración de GTP, el volumen de preincubación, el volumen de reacción de GTPasa, y el curso temporal de la reacción, entre otros.

3.15 Determinación de actividad enzimática de HisGpn1 y HisGpn1/Gpn3 recombinantes.

Para verificar que HisGpn1 y HisGpn1/Gpn3 purificadas fueran activas, se realizó el ensayo de actividad enzimática en placas de 384 pozos. El volumen de reacción de GTPasa depositado en cada pozo fue de 3 μL a una concentración de HisGpn1 y HisGpn1/Gpn3 de 5 μM , GTP 5 μM y DTT 1 mM utilizando el buffer GAP/GEF como vehículo. Cabe destacar que para este ensayo la proporción de enzima/GTP fue estequiométricamente 1:1. La reacción de GTPasa se efectuó durante 60 min a 25°C; posteriormente se añadió el reactivo Glo reconstituido, compuesto por ADP 1 mM, reactivo Glo 500x, y buffer Glo como vehículo, del cual se agregan 3 μL a cada pozo donde se desarrolló la reacción de GTPasa. Esta reacción de conversión de GTP a ATP se llevó a cabo durante 30 min; finalmente para la producción de luminiscencia se agregaron 6 μL de reactivo de detección, siempre respetando la proporción de volúmenes 1:1:2 entre la reacción de GTPasa, conversión de GTP a ATP y detección de luminiscencia. La medición de luminiscencia se llevó a cabo en un lector de placas VICTOR X4 Multilabel (Perkin-Elmer) (Fig. 3.3).

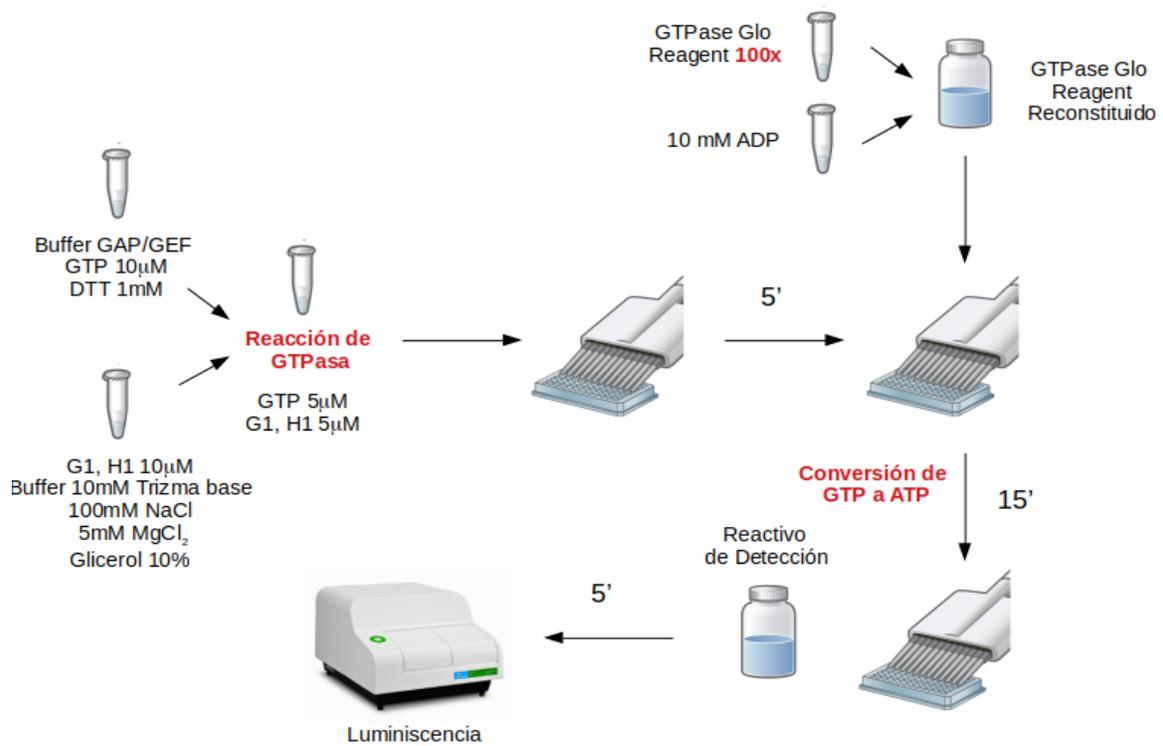


Figura 3.3. Descripción general del ensayo GTPase-Glo optimizado. Este diagrama muestra la descripción general de los protocolos para realizar actividad de GTPasa intrínseca con reducción en los tiempos de reacción de GTPasa y en la reacción de conversión de GTP a ATP, también se muestra una reducción de 5 veces la concentración del reactivo GTPase Glo.

Capítulo IV – Resultados

4.1 Modelado por homología.

Se generaron cuatro modelos de Gpn1 en dos conformaciones distintas las cuales fueron denominadas “conformación abierta” para aquellos donde los ligandos son moléculas de GTP, y “conformación cerrada” a aquellos con el nucleótido GDP como ligando, dicha conformación está determinada a partir de la posición de los residuos que se encuentran entre la Phe 198 y Val 243 formando dos alfa hélices correspondientes a la inserción 2. La diferencia entre cada uno de los modelos está determinada energéticamente.

Los modelos en conformación abierta, unidos a GTP, son nombrados como Modelo 1 y Gpn1 modificada (Fig. 4.1A) desde estudios anteriores realizados por nuestro grupo. La modificación a la que se hace mención fue llevada a cabo de igual forma por nuestro grupo para trabajos previos, corresponde a un arreglo manual realizado sobre la estructura de la proteína que consiste en la separación del extremo carboxilo del resto de Gpn1, con la finalidad de que al realizar la dinámica en presencia de la GTPasa Gpn3 fuera favorecida la formación del heterodímero del que experimentalmente se tiene evidencia. Los modelos en conformación cerrada, unidos a GDP, son nombrados como Modelo 27 y Modelo 28 (Fig. 4.1B) desde trabajos previos realizados por nuestro grupo.

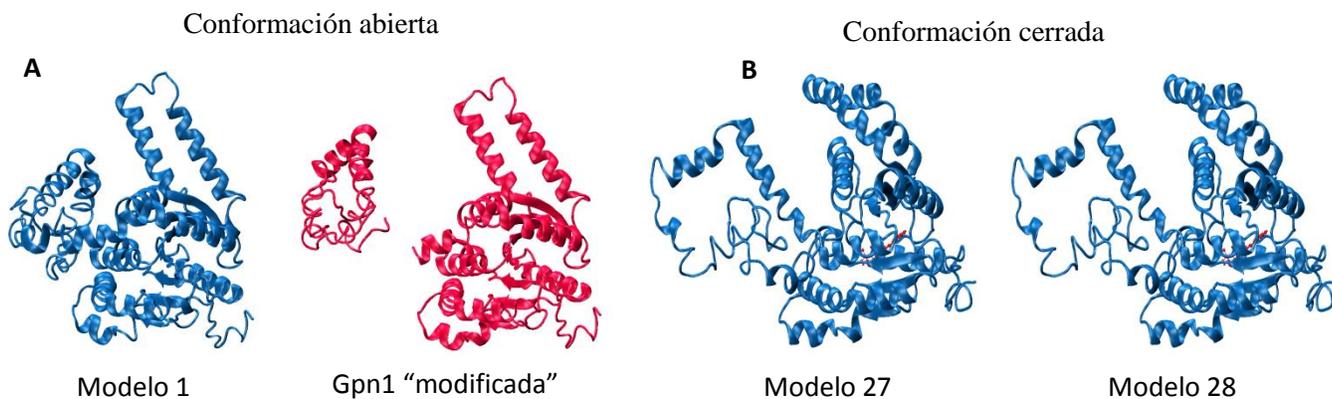


Figura 4.1. Modelos del monómero de Gpn1 generados por I-TASSER. La conformación abierta corresponde al Modelo 1 y al modelo denominado Gpn1 “modificada”, en ambas el ligando es una molécula de GTP. Los modelos 27 y 28 presentan la “conformación cerrada”, la cual tiene unido GDP. La conformación abierta o cerrada está determinada por la posición de los residuos entre Phe 198 y Val 243 (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>).

4.2 Dinámica molecular.

Para la identificación de fármacos que puedan unirse a las cavidades de la superficie de Gpn1 humana, se necesita primero identificar el modelo representativo de todos los generados en una dinámica molecular.

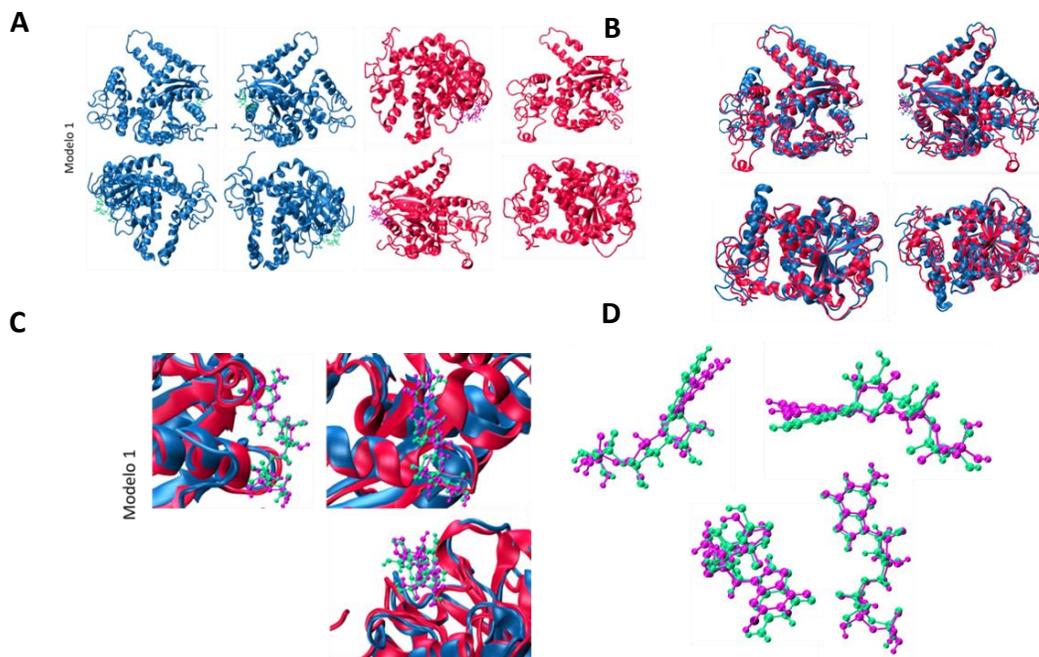


Figura 4.2. Cambios estructurales al inicio y al final de la simulación por dinámica molecular en el Modelo 1 del monómero Gpn1. (A) Inicio y final de la dinámica molecular de 50 nanosegundos. (B) Superposición del primer y último nanosegundo de la dinámica. (C) Acercamiento del sitio de unión del GTP en la superposición del inicio y final de la dinámica. (D) Superposición del GTP para verificar el movimiento.

El modelo únicamente representa un momento de la existencia de la molécula, pero no brinda información acerca de la estabilidad ni los efectos que tienen sobre ella el medio ni el tiempo.

Se realizaron dinámicas moleculares sobre los modelos para la conformación abierta (Fig. 4.2A, Modelo 1) y cerrada (Fig. 4.3A, Gpn1 “modificada”), donde se generaron 1000 frames por cada nanosegundo. Para estas dinámicas el tiempo establecido para cada uno de los cuatro modelos fue de 50 ns. Se produjeron 50,000 frames por dinámica, siendo 200,000 en total. Cada modelo tardó aproximadamente 6-7 días y con la posibilidad de correrse en paralelo.

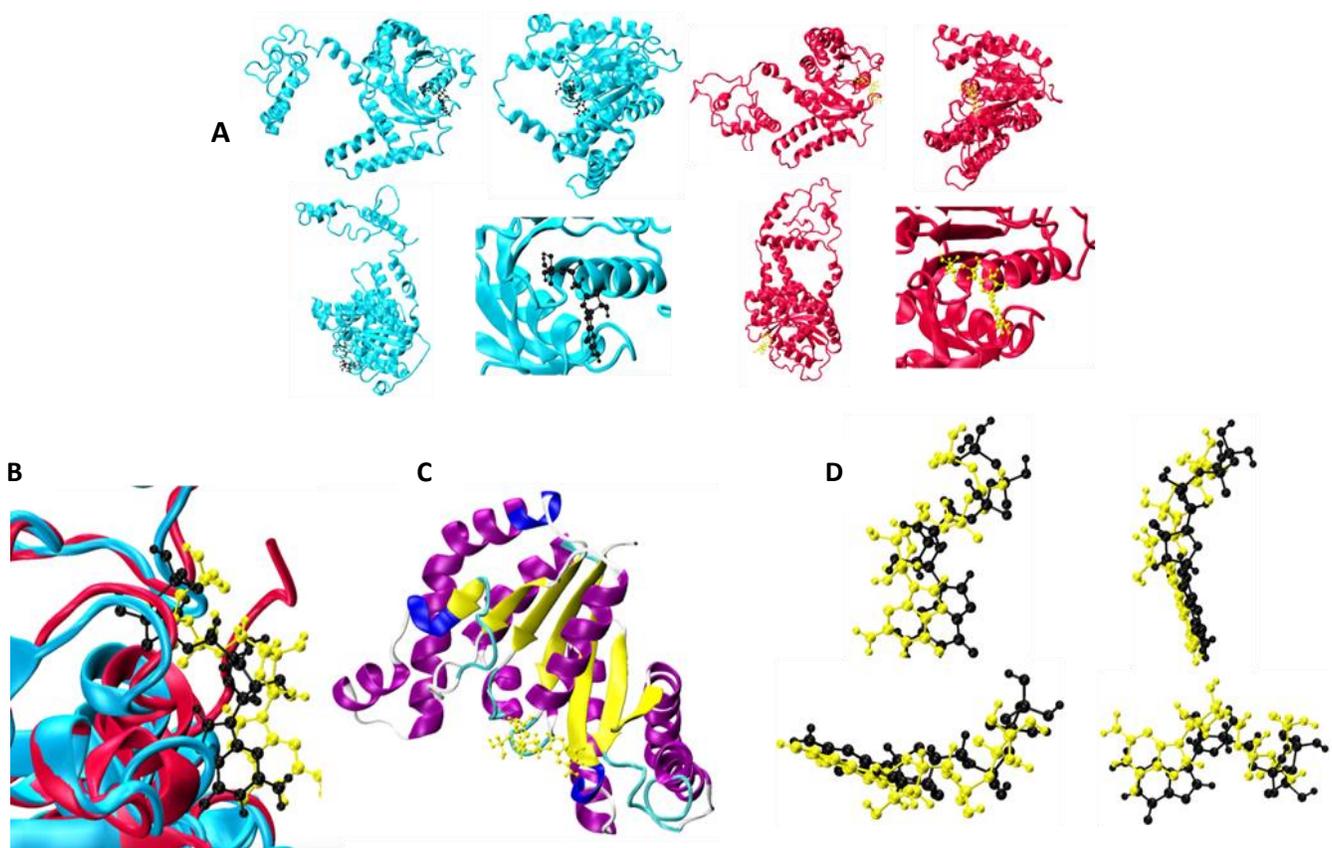


Figura 4.3. Cambios estructurales al inicio y al final de la simulación por dinámica molecular en el modelo de Gpn1 “modificada”. (A) Inicio y final de la dinámica molecular de 50 nanosegundos, las flechas indican la separación realizada del carboxilo. (B) Acercamiento del sitio de unión del GTP en la superposición del inicio y final de la dinámica. (C) Representación del núcleo principal de la proteína. (D) Superposición del GTP del primer y último nanosegundo de la dinámica para verificar su movimiento.

4.3 Clustering.

El “clustering” o agrupamiento proporciona un medio para agrupar y dar sentido a la información en la trayectoria de la dinámica molecular. Se realizó el clustering y procesamiento posterior a los modelos unidos a GTP. El clustering del modelo 1 realizado sobre cadena principal fue a partir de un total de 50,000 frames, insertando un “skip” o salto de 100 tomas, es decir, muestreando una toma y omitiendo cien; sucesivamente se seleccionan 500 permitiendo el análisis real y confiable de grandes cantidades de imágenes como las generadas por cada dinámica.

El cluster 1 para el modelo 1 (Fig. 4.4A) fue de 477 miembros siendo el centro de cluster el frame número 238, con un corte de 2 Å. Para el clustering de Gpn1 cortada (Fig. 4.4B) también sobre cadena principal, se obtuvieron:

Cluster 1 con 407 miembros y centro de cluster el frame #264.

Cluster 2 con 81 miembros y centro de cluster el frame #15, ambos con un corte de 2 Å.

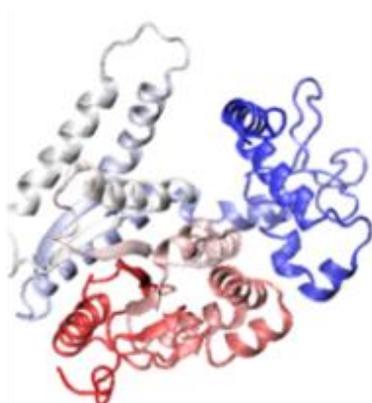


Figura 4.4. Centro de cluster para el monómero de Gpn1. Frame #264 correspondiente al centro de cluster para el modelo 1.

4.4 Obtención de ligandos.

De la base de datos ZINC y como criterio de selección con base en la Regla de Lipinski descritos con anterioridad (en la sección de Materiales y Métodos), se encontraron 1752 compuestos que cumplen con estas características.

4.5 Acoplamiento o docking molecular.

Se empleó el Plugin Vina de PyMOL para realizar el docking de las moléculas obtenidas a partir de ZINC para la superficie del modelo 1 de Gpn1 humana (Figs. 4.5, 4.6 y 4.7), en base a la estimación de la afinidad en unión entre la proteína y el ligando. El docking fue realizado sobre la totalidad de la superficie de la proteína, y así, teniendo los resultados para las cavidades de Metapocket, se llevó a cabo una comparación de los sitios de unión a ligando y si éstos concordaban o no con lo predicho por Metapocket. Se encontró que en las cavidades predichas hay acoplamiento de ligandos, y que además existen sitios no considerados como cavidades por Metapocket pero por docking estos son de buena afinidad para los ligandos (Fig. 4.9).

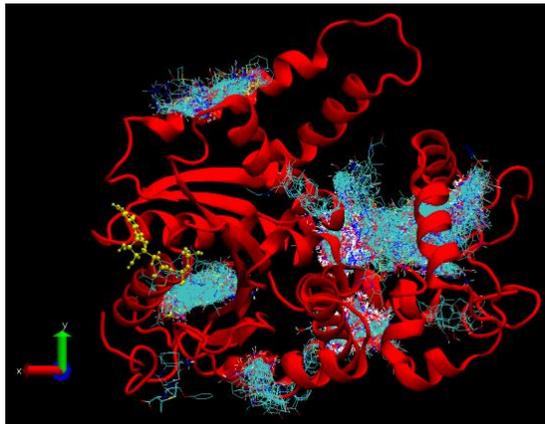


Figura 4.5. Fármacos que se acoplan a la superficie del modelo 1 de Gpn1 humana. Se muestra la pose que presenta una mayor energía de afinidad siendo en total 1752 compuestos. unidos.

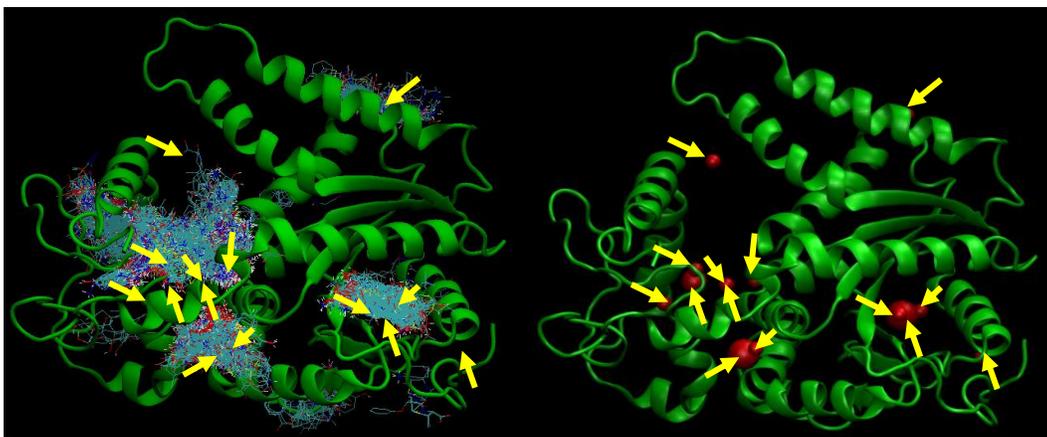


Figura 4.6. Concordancia entre los ligandos obtenidos por docking y las cavidades predichas por Metapocket.

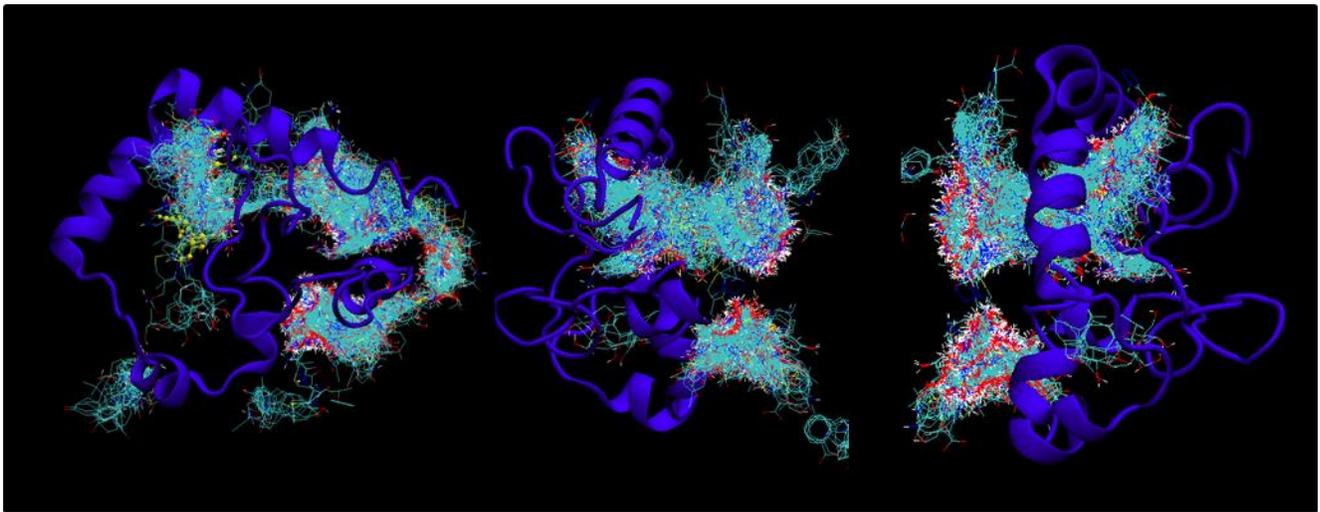


Figura 4.7. Representación de los fármacos unidos solamente en la región del extremo C-terminal. Dada la poca conservación de esta región, se sugiere constituye un blanco potencialmente selectivo.

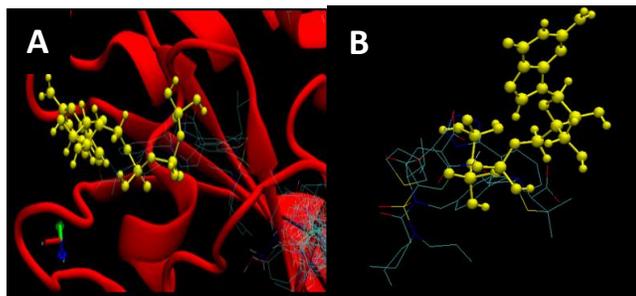


Figura 4.8. Acercamiento al sitio de unión a GTP. (A) Representación de la estructura secundaria de los residuos que interactúan con GTP y representación de la estructura en barra de 3 ligandos que se acoplaron al mismo sitio. (B) Silenciamiento de la proteína, los 3 ligandos se observan en superposición con el GTP. Los ligandos acoplados al sitio de unión a GTP son: ticarcilina, primidona y ácido desoxicólico.

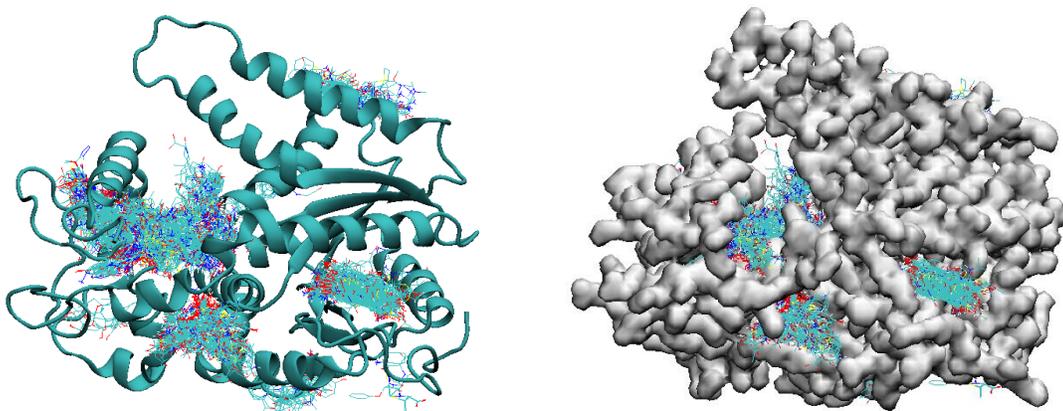


Figura 4.9: Representación de la isosuperficie del modelo 1 de Gpn1 humana (A) en comparación con el mismo modelo en representación de caricatura (B). La isosuperficie es una superficie de valor constante, se puede visualizar volumétricamente los campos generados por los átomos de Gpn1 humana y la interacción de los ligandos con ellos.

4.6 Análisis post-docking.

Una vez visualizadas las geometrías de unión y estimadas las interacciones para cada una de las 5 poses, es posible determinar a los mejores candidatos para interactuar con Gpn1.

Como se mencionó anteriormente, en este trabajo se establecieron tres criterios para considerar a los compuestos químicos como candidatos para su adquisición y pruebas *in vitro* con las proteínas recombinantes (Tabla 1):

- i. Su energía de enlace en función de la energía libre de Gibbs (ΔG), misma que determina la fuerza del complejo proteína ligando.
- ii. La distancia entre el compuesto químico y los carbono α de Gpn1, expresada en Å.
- iii. Sitio de unión respecto a la superficie de Gpn1.

La organización de los compuestos químicos se representa con base en los criterios de energía de unión y distancia. Además la elección de los mismos se realizó de acuerdo a su sitio de unión en la proteína, considerando de especial interés por ser únicos en Gpn1, a la superficie de contacto con Gpn3, el extremo carboxilo terminal, la inserción 2 y el sitio de unión a nucleótido.

Tabla 1. Fármacos resultantes del análisis post-docking.

Fármaco	Energía de enlace ΔG (kcal/mol)	Distancia (Å)	ID Autodock Vina	ID ZINC
Superficie de contacto				
Bisacodilo	-7	5.58	FDA_state00369	3830321
Idarrubicina	-9.4	5.14	FDA_state00652	3830923
Carboxilo				
Dicumarol	-8.5	5.09	FDA_state01125	3869855
Inserción 2				
Rosiglitazona	-7.2	3.86	FDA_state01431	968330
Propranolol	-6.7	4.48	FDA_state01418	20240
Pendiente docking				
Doxorrubicina				

Debido a que el efecto de la unión de los compuestos químicos dependerá del sitio de la proteína al cual presenten mayor afinidad (Fig. 4.11), es importante la identificación de los sitios de interés para el acoplamiento de los mismos, siendo las inserciones 1 y 2, el extremo carboxilo, los sitios de unión a nucleótido y a GTP, y la alfa hélice correspondiente a la superficie de contacto implicada en la formación de los dímeros Gpn1/Gpn1 o Gpn1/Gpn3, representados en la figura 4.10.

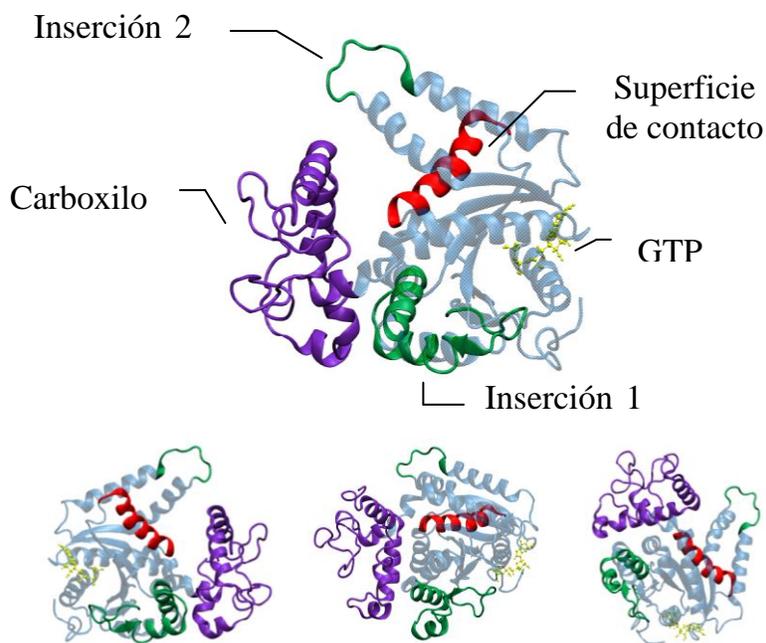


Figura 4.10. Sitios de interés para el acoplamiento de fármacos sobre la superficie de Gpn1.

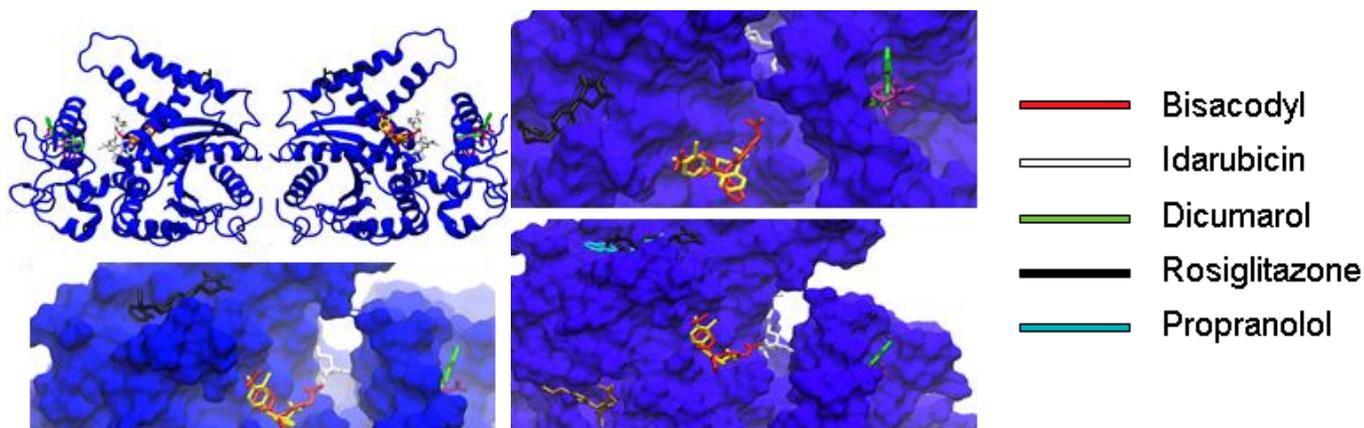


Figura 4.11. Sitios de unión de los fármacos resultantes de procesamiento post-docking acoplados sobre los sitios de interés en la superficie de Gpn1.

4.7 Purificación de HisGpn1 y HisGpn1/Gpn3.

La calidad de la purificación se observó mediante la separación de las proteínas por electroforesis en un gel desnaturalizante y en el cromatograma de la exclusión molecular (Figs. 4.12 y 4.13). Las bandas señaladas en el gel desnaturalizante corresponden al peso molecular de Gpn1, misma que se espera encontrar en la fracción soluble (sobrenadante) posterior a la centrifugación del lisado total. La presencia de Gpn1 en la muestra correspondiente al pellet indica pérdida de la proteína, así como la que no es retenida por la columna de afinidad (Flow through) y la obtenida al realizar el lavado de la columna, sin embargo, se recupera una cantidad de proteína suficiente en la muestra que corresponde a la elución, misma que se puede observar de forma importantemente elevada cuando es concentrada, y finalmente una mayor cantidad de proteína es colectada en las fracciones 10, 11 y 12 pertenecientes al centro del pico proveniente de la filtración en gel.

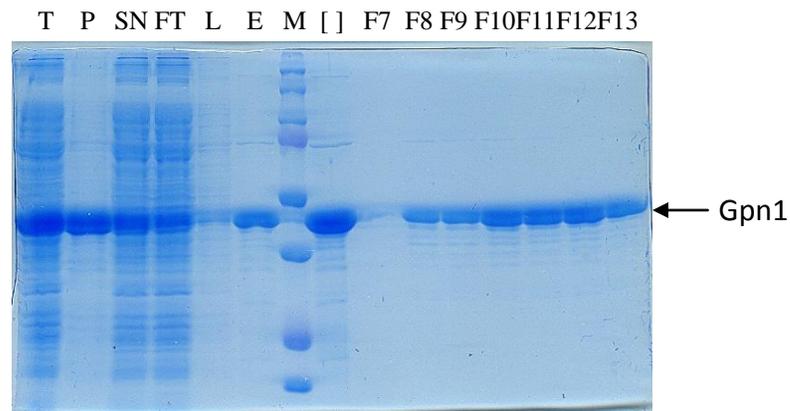


Figura 4.12. Fracciones de HisGpn1 colectadas durante los diferentes pasos del proceso de purificación fueron separadas mediante SDS-PAGE y se visualizaron por tinción con azul de Coomassie. La migración corresponde a HisGpn1 con un peso molecular aproximado de 43 kDa. **T**= Lisado total de bacterias por sonicación. **P**= Pellet bacteriano generado después de la centrifugación del extracto total. **SN**= Sobrenadante generado después de la centrifugación del extracto total. **FT**= Flow through, fracción soluble colectada tras su paso por la columna de afinidad. **L**= Lavado de la columna de afinidad con buffer de lavado. **E**= Fracción de elución. **M**= Marcador de peso molecular. **[]**= Concentrado de la fracción de elución. **F**= Fracciones correspondientes a la separación en columna de exclusión molecular.

Gpn1 es obtenida por cromatografía en gel como una sola población, comienza a eluir a partir del mililitro 65 y hasta el 85, las fracciones se colectan a partir del mililitro 70 hasta el 85, recuperando 15 fracciones de 1mL cada una. El volumen al cual eluye la proteína corresponde al peso molecular esperado para Gpn1 en su forma dimérica. Posterior a la primera inyección mostrada en azul en la figura 4.14, se realiza una segunda inyección de las fracciones que corresponden al centro del pico de la primera inyección, con la finalidad de aumentar el grado de pureza de la proteína.

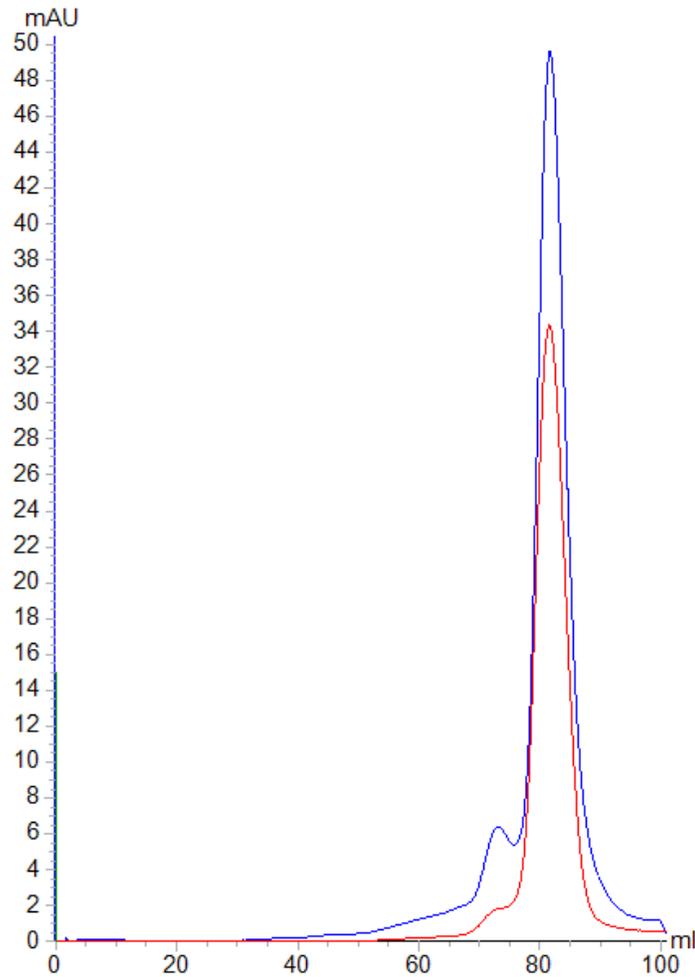


Figura 4.13. Cromatograma de HisGpn1 separada en una columna de exclusión molecular. La mayor concentración de HisGpn1 se obtiene en el volumen de elución que se encuentra entre 65 y 85 mL, se observa una sola población de proteína que corresponde al peso molecular para un dímero de Gpn1. En azul se muestra la primera inyección de la fracción concentrada de afinidad. En rojo se representa una segunda inyección con la fracción que se colectó del primer pico en una primera separación.

4.8 Actividad enzimática de GTPasa de HisGpn1 y HisGpn1/Gpn3 recombinantes.

Uno de nuestros principales objetivos es probar aquellos fármacos resultantes del estudio de acoplamiento molecular sobre la actividad enzimática de HisGpn1 y HisGpn1/Gpn3 recombinantes. Para el cumplimiento de este objetivo, primero se realizó la determinación de la actividad enzimática para ambas proteínas en ausencia de fármaco (Fig. 4.14). Tanto HisGpn1 (G1) como HisGpn1/Gpn3 (H1) recombinantes resultaron capaces de hidrolizar GTP, presentando una reducción en las unidades relativas de luminiscencia a los 5 min de iniciada la reacción. La cantidad de GTP hidrolizado se puede considerar en relación a las cuentas totales de GTP convertido a ATP en ausencia de enzima, pudiéndose considerar este valor como el 100%.

Otra variable importante a considerar fue la relación entre la cantidad de GTP hidrolizado y el tiempo que le toma a ambas enzimas llevar a cabo dicha reacción, en la figura 4.14 se muestra el curso temporal de la actividad de GTPasa para HisGpn1/Gpn3 2.5 μM en presencia de GTP 10 μM .

Una vez establecidas las condiciones para la determinación de la actividad enzimática de G1 y H1, se efectuó el protocolo establecido anteriormente para conocer el efecto de incubación de ambas enzimas en presencia de los fármacos: Propranolol, bisacodilo, rosiglitazona, idarrubicina y doxorubicina.

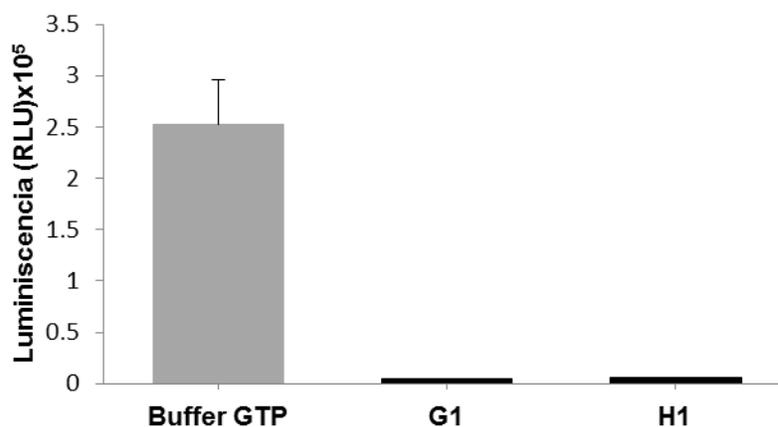


Figura 4.14. Actividad enzimática intrínseca de G1 y H1. Se muestra la luminiscencia producida por el GTP remanente posterior a la reacción de GTPasa de forma independiente entre HisGpn1 5 μM y HisGpn1/Gpn3 5 μM con GTP 5 μM para cada una, en relación estequiométrica 1:1 y con 15 min de incubación.

4.9 Efecto de la concentración de HisGpn1 y HisGpn1/Gpn3 recombinantes sobre su actividad de GTPasa.

La capacidad hidrolítica de GTP para HisGpn1 (G1) como HisGpn1/Gpn3 (H1) recombinantes correlacionó con su concentración. Se probaron concentraciones de 2.5, 5, 7.5 y 10 μM para G1 y de 1, 1.5, 2 y 2.5 μM para H1 mostrados en las figuras 4.15 y 4.16.

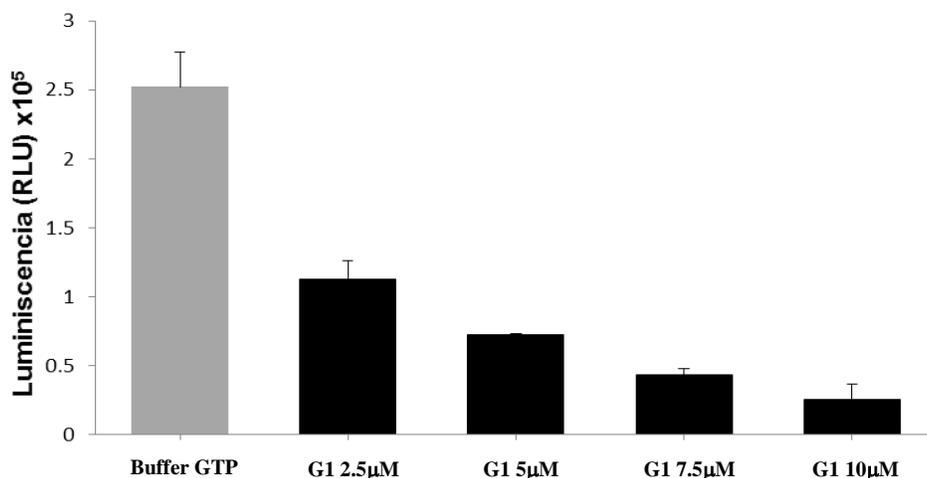


Figura 4.15: Efecto de la concentración de HisGpn1/Gpn1 recombinante sobre su actividad de GTPasa. La reacción de GTPasa fue realizada en presencia de 5 μM GTP con una duración de 5 minutos, todas las condiciones se llevaron a cabo por triplicado.

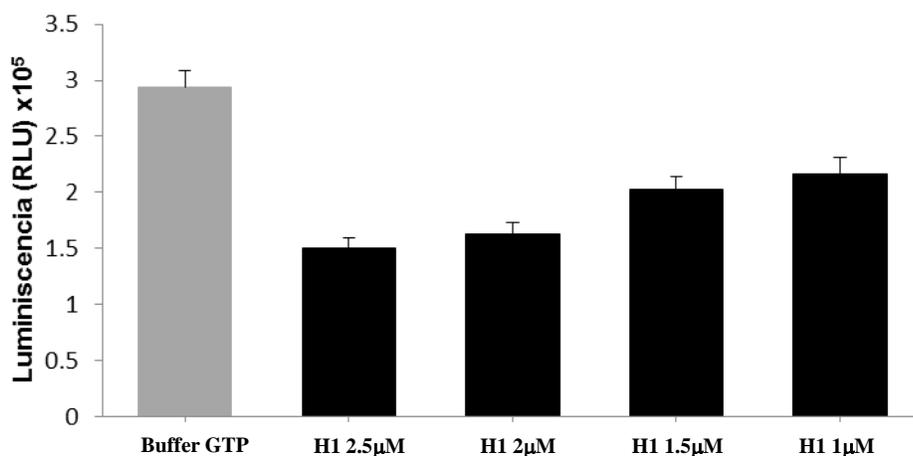


Figura 4.16: Efecto de la concentración de HisGpn1/Gpn3 recombinante sobre su actividad de GTPasa. La reacción de GTPasa fue realizada en presencia de 5 μM GTP con una duración de 5 minutos, todas las condiciones se llevaron a cabo por triplicado.

4.10 Curso temporal de la actividad de GTPasa para G1 y H1.

Tanto G1 como H1 hidrolizan la mayor parte de GTP en los primeros 5 minutos de reacción cuando la relación estequiométrica es 1:4 entre la enzima y el nucleótido respectivamente (Figs. 4.17 y 4.18).

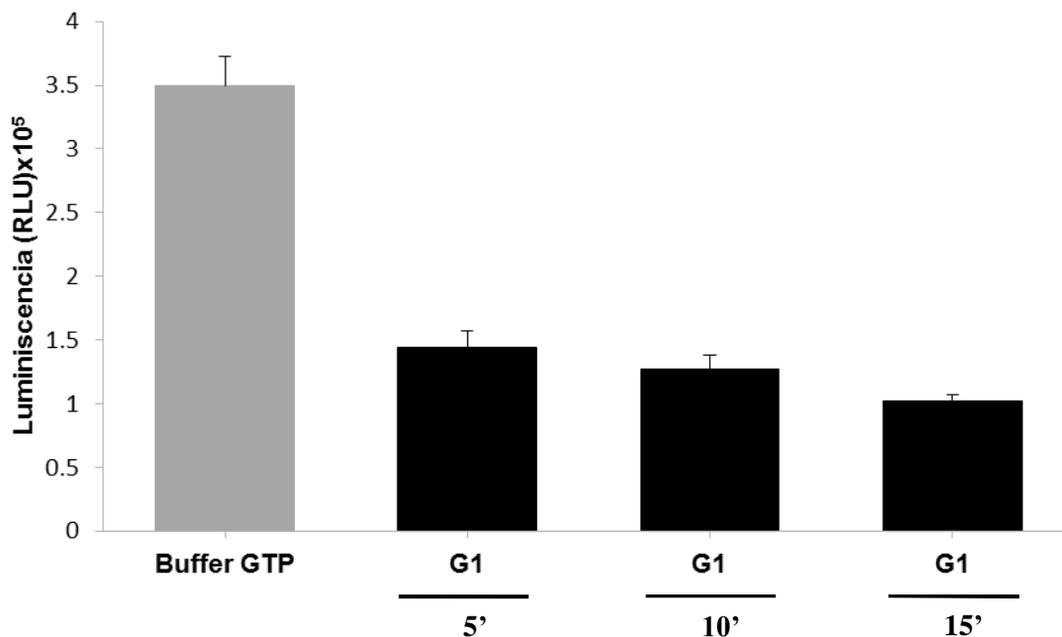


Figura 4.17: Curso temporal de actividad de GTPasa para HisGpn1 2.5 μ M en presencia de GTP 10 μ M.

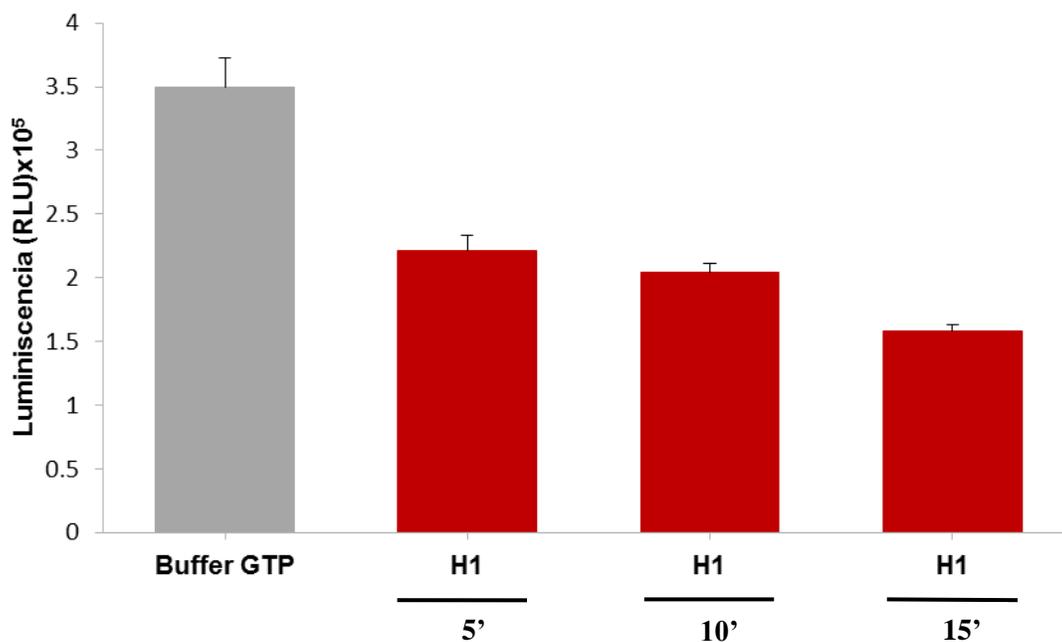


Figura 4.18: Curso temporal de actividad de GTPasa para HisGpn1/Gpn3 2.5 μ M en presencia de GTP 10 μ M.

4.11 Efecto de los diferentes fármacos en la actividad de GTPasa de G1 y H1.

La reacción de GTPasa para G1 y H1 fue llevada a cabo en presencia de los compuestos químicos resultantes del análisis post-docking, siendo estos propranolol, bisacodilo, rosiglitazona, idarubicina y doxorubicina, en las condiciones descritas anteriormente para su preincubación antes de la reacción de GTPasa.

El propranolol presenta unión en la inserción 2 de Gpn1 y presenta una energía de enlace de -6.7 kcal/mol y una distancia de enlace de 4.48 Å, como se muestra en las figuras 4.19 y 4.20 no se obtuvieron cambios importantes respecto a los controles para G1 y H1 en las concentraciones probadas para la actividad de GTPasa, a pesar de ello los ligeros cambios observados son inversos en ambas enzimas, G1 muestra una ligera tendencia a disminuir su actividad, y H1 tiende a aumentar respecto a los controles.

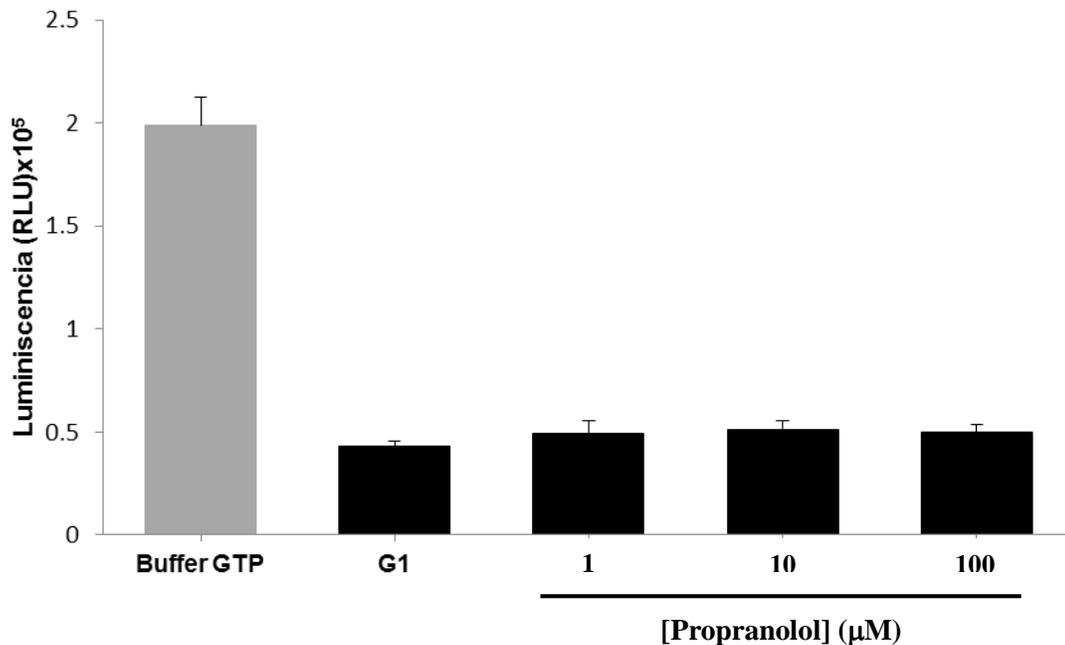


Figura 4.19: Efecto de Propranolol sobre la actividad de GTPasa de HisGpn1 $2.5\mu\text{M}$. La reacción de GTPasa fue realizada en presencia de una concentración final de GTP $5\mu\text{M}$ con una duración de 5 minutos, todas las condiciones se llevaron a cabo por triplicado. Propranolol fue solubilizado en agua.

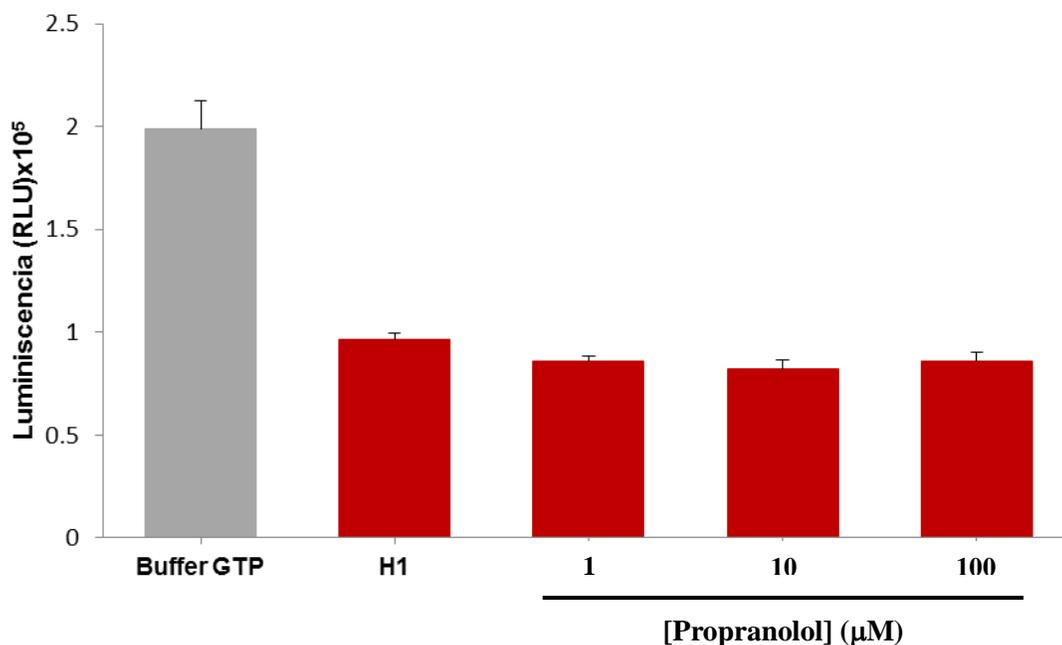


Figura 4.20: Efecto de Propranolol sobre la Actividad de GTPasa de HisGpn1/Gpn3 2.5μM. La reacción de GTPasa fue realizada en presencia de una concentración final de GTP 5μM con una duración de 5 minutos, todas las condiciones se llevaron a cabo por triplicado. Propranolol fue solubilizado en agua.

De acuerdo a los resultados del *docking*, el bisacodilo presenta una unión de -7 kcal/mol a una distancia de 5.58 Å de la alfa hélice que representa la superficie de contacto tanto con Gpn1 para formar el homodímero, como con Gpn3 para la formación del heterodímero. El bisacodilo demostró claramente incrementar la actividad de enzimática para G1 en forma dependiente de la concentración, con un mayor aumento a 1 μM de 60% para G1 y H1 (Figs. 4.21 y 4.22).

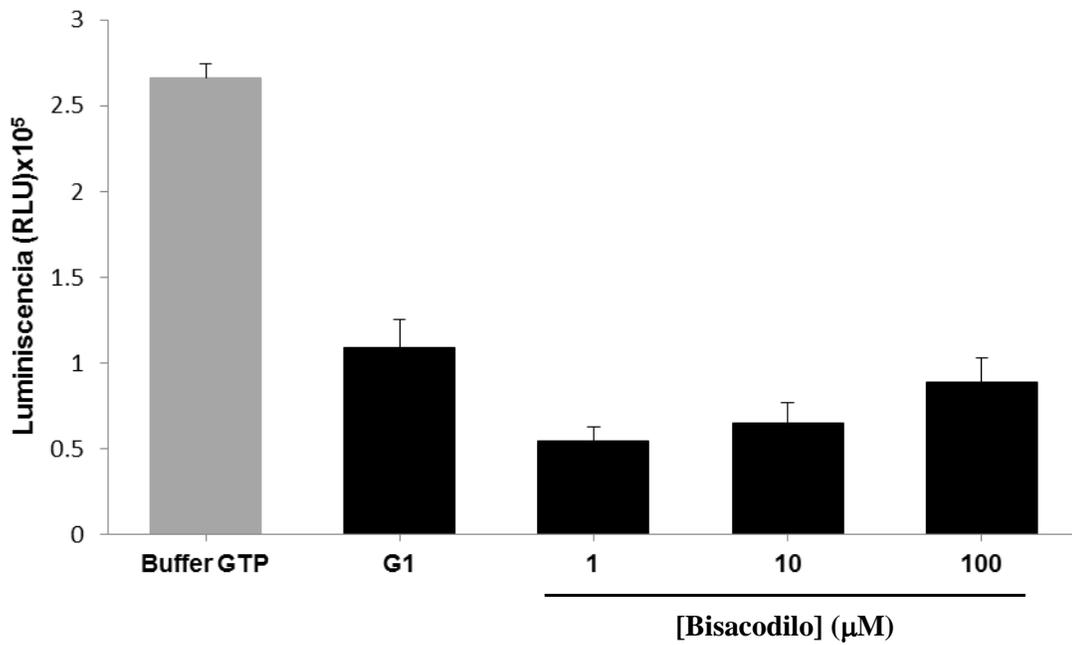


Figura 4.21: Efecto del bisacodilo sobre la actividad de GTPasa de HisGpn1 2.5 μM . La reacción de GTPasa fue realizada en presencia de una concentración final de GTP 5 μM con una duración de 5 minutos, todas las condiciones se llevaron a cabo por triplicado. El bisacodilo fue solubilizado en ácido acético a una concentración final de 0.05%.

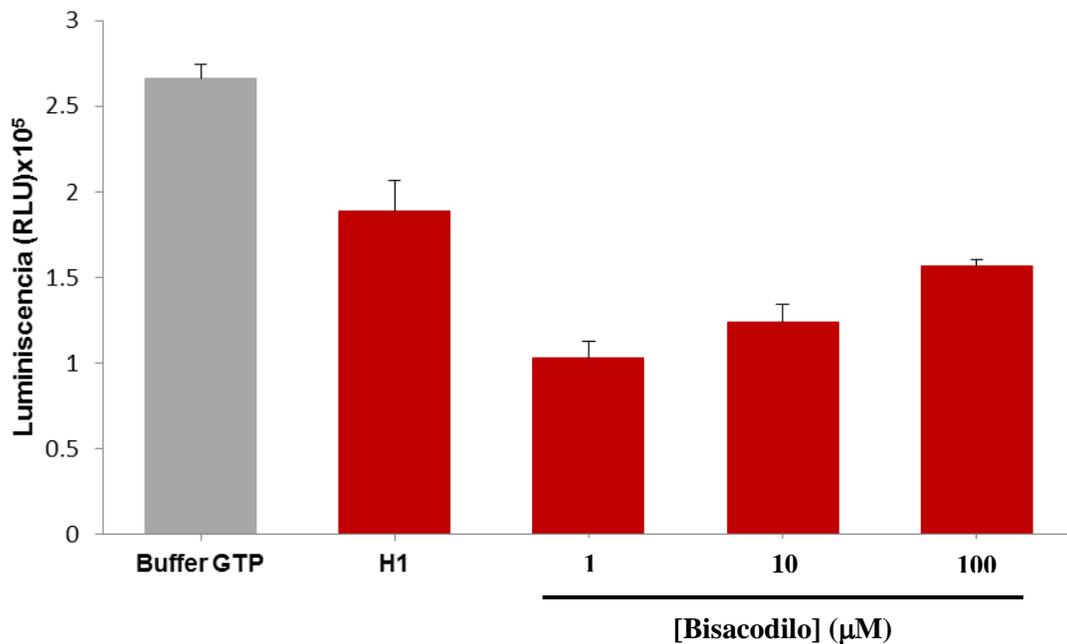


Figura 4.22: Efecto de bisacodilo sobre la actividad de GTPasa de HisGpn1/Gpn3 2.5 μM . La reacción de GTPasa fue realizada en presencia de una concentración final de GTP 5 μM con una duración de 5 minutos, todas las condiciones se llevaron a cabo por triplicado. El bisacodilo fue solubilizado en ácido acético a una concentración final de 0.05%.

ra el caso de la rosiglitazona, no se observaron cambios a las diferentes concentraciones respecto al control en G1 (Fig. 4.23), sin embargo el GTP remanente fue menor al 10% lo que dificulta la identificación de variaciones en caso de presentarse, esto probablemente debido a que la reacción de GTPasa fue más larga por cuestiones de manipulación.

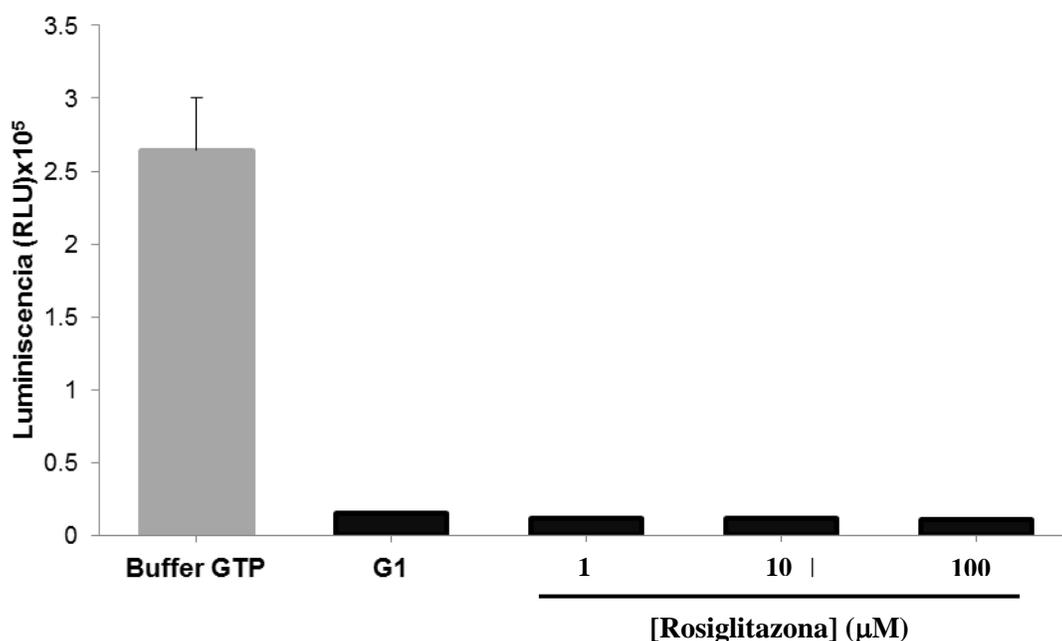


Figura 4.23: Efecto de rosiglitazona sobre la actividad de GTPasa de HisGpn1 2.5 μM . La reacción de GTPasa fue realizada en presencia de una concentración final de GTP 5 μM con una duración de 5 minutos, todas las condiciones se llevaron a cabo por triplicado. Rosiglitazona fue solubilizada en DMSO a una concentración final de 0.02%.

H1 por otro lado presentó una reducción en la mitad de su actividad a todas las concentraciones probadas (Fig. 4.24), la rosiglitazona de acuerdo a los resultados de *docking* se une en la inserción 2 al igual que el propranolol, su energía de enlace es de -7.2 kcal/mol a una distancia de 3.86 Å.

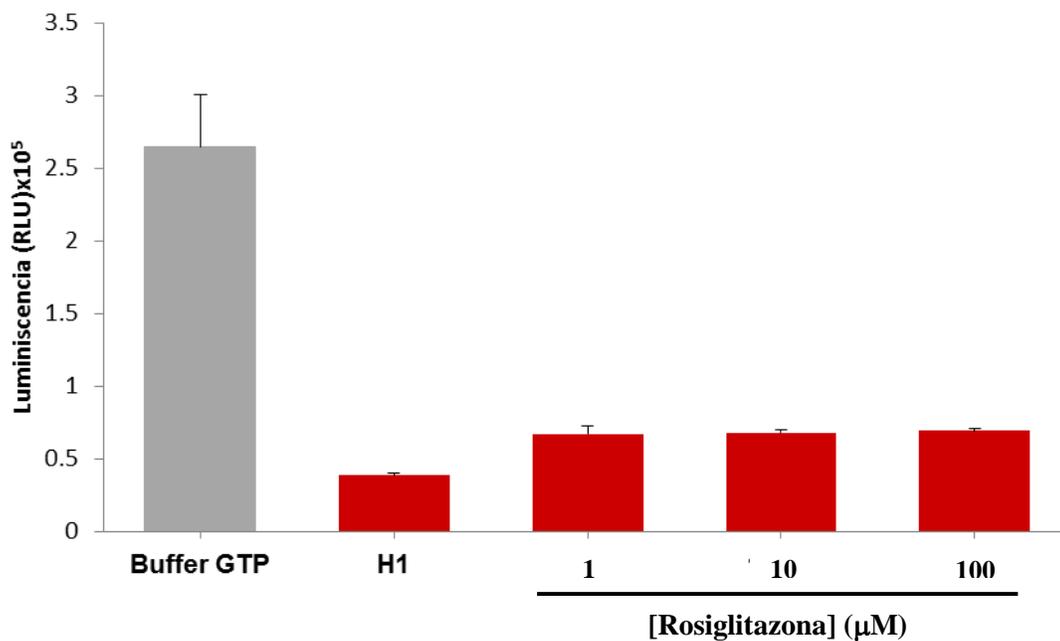


Figura 4.24. Efecto de Rosiglitazona sobre la actividad de GTPasa de HisGpn1/Gpn3 2.5μM. La reacción de GTPasa fue realizada en presencia de una concentración final de GTP 5μM con una duración de 5 minutos, todas las condiciones se llevaron a cabo por triplicado. Rosiglitazona fue solubilizada en DMSO a una concentración final de 0.02%.

La actividad de GTPasa para G1 preincubada con la idarrubicina no presentó cambios respecto a su control a las distintas concentraciones (Fig. 4.25).

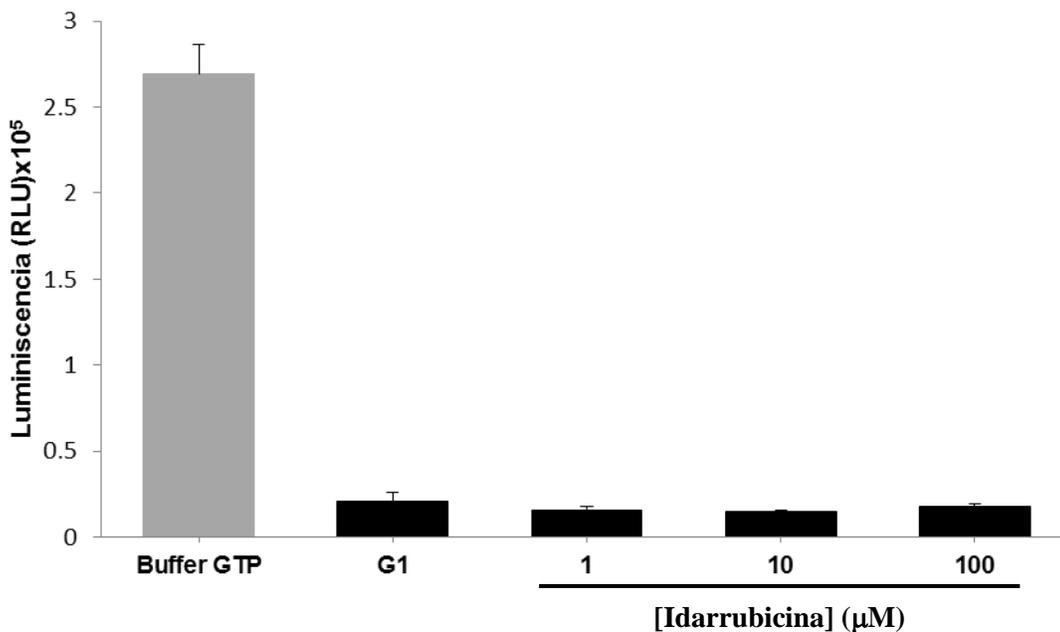


Figura 4.25: Efecto de idarubicina sobre la actividad de GTPasa en HisGpn1 2.5μM. La reacción de GTPasa fue realizada en presencia de una concentración final de GTP 5μM con una duración de 5 minutos, todas las condiciones se llevaron a cabo por triplicado. Idarubicina fue solubilizada en metanol a una concentración final de 0.05%.

En la figura 4.26 se observa una reducción de la actividad de GTPasa dependiente de la concentración de la idarrubicina, a 1 μM del fármaco la actividad se observa estimulada respecto al control, mientras que a 100 μM la actividad es similar a la del control.

La idarrubicina presenta la mayor energía de unión a Gpn1 de todos los fármacos probados por *docking*, con una energía de -9.4kcal/mol y una distancia de 5.14\AA respecto a la superficie de contacto.

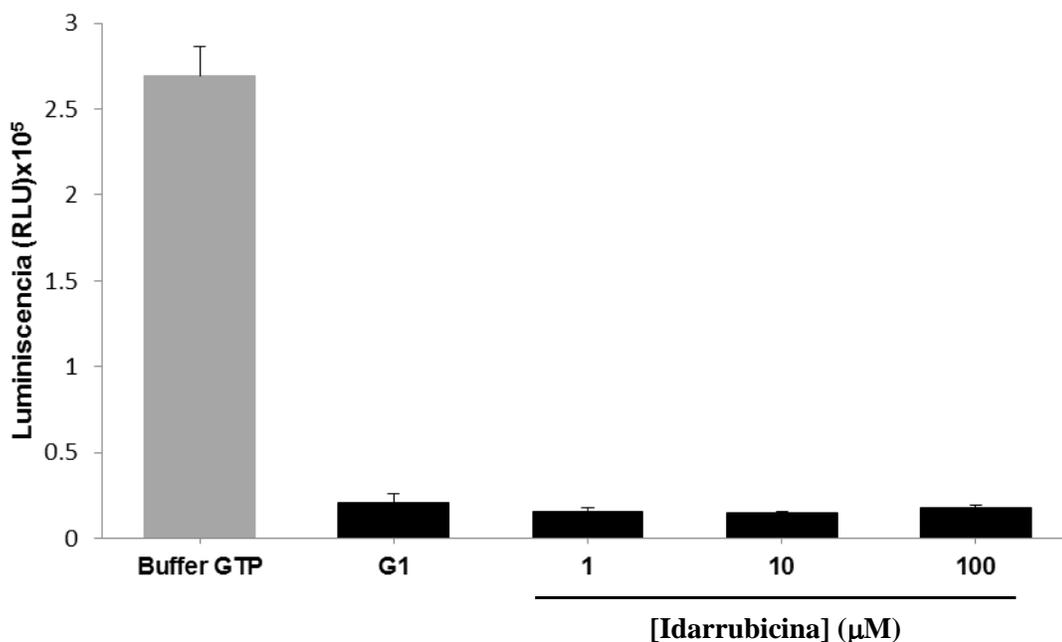


Figura 4.26: Efecto de idarrubicina sobre la actividad de GTPasa de HisGpn1/Gpn3 2.5 μM . La reacción de GTPasa fue realizada en presencia de una concentración final de GTP 5 μM con una duración de 5 minutos, todas las condiciones se llevaron a cabo por triplicado. Idarrubicina fue solubilizada en metanol a una concentración final de 0.05%.

La doxorubicina a diferencia de los demás compuestos químicos, no se ha probado aún en experimentos computacionales de acoplamiento molecular, sin embargo, se decidió emplear en experimentos de actividad enzimática dado a su similitud estructural con la idarrubicina, ya que ambas pertenecen a la familia de las antraciclinas, misma que como ya se mencionó, tiene el mejor resultado en el *docking* de acuerdo a su energía y distancia de enlace.

Al igual que para la idarrubicina, la doxorubicina no mostró afectar la actividad enzimática de G1 respecto a su control (Fig. 4.27).

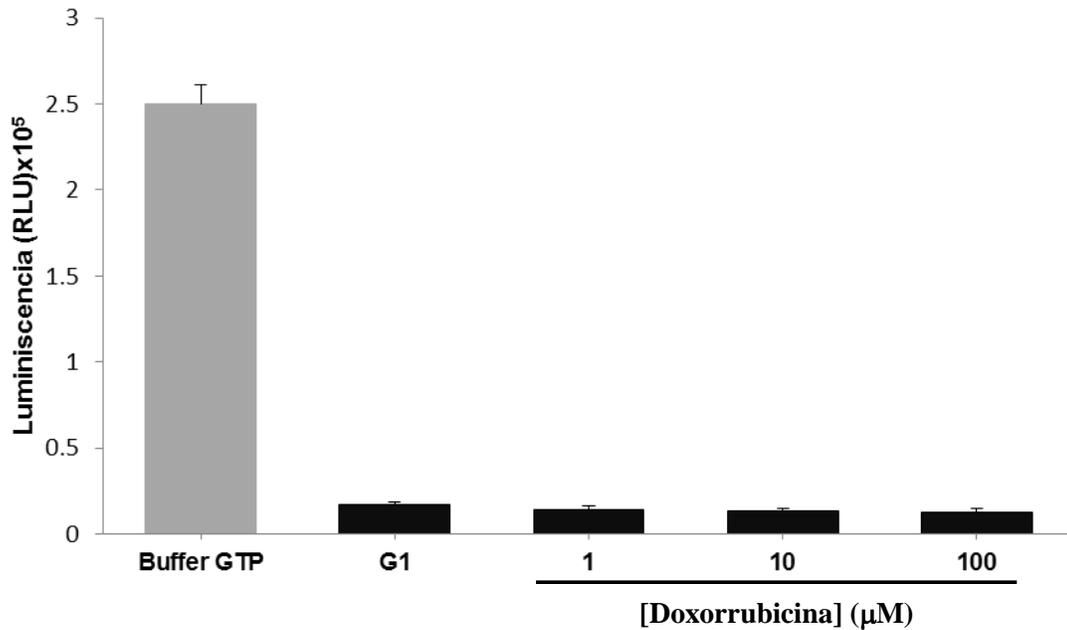


Figura 4.27: Efecto de doxorubicina sobre la actividad de GTPasa de HisGpn1 2.5 μM . La reacción de GTPasa fue realizada en presencia de una concentración final de GTP 5 μM con una duración de 5 minutos, todas las condiciones se llevaron a cabo por triplicado. Doxorubicina fue solubilizada en agua.

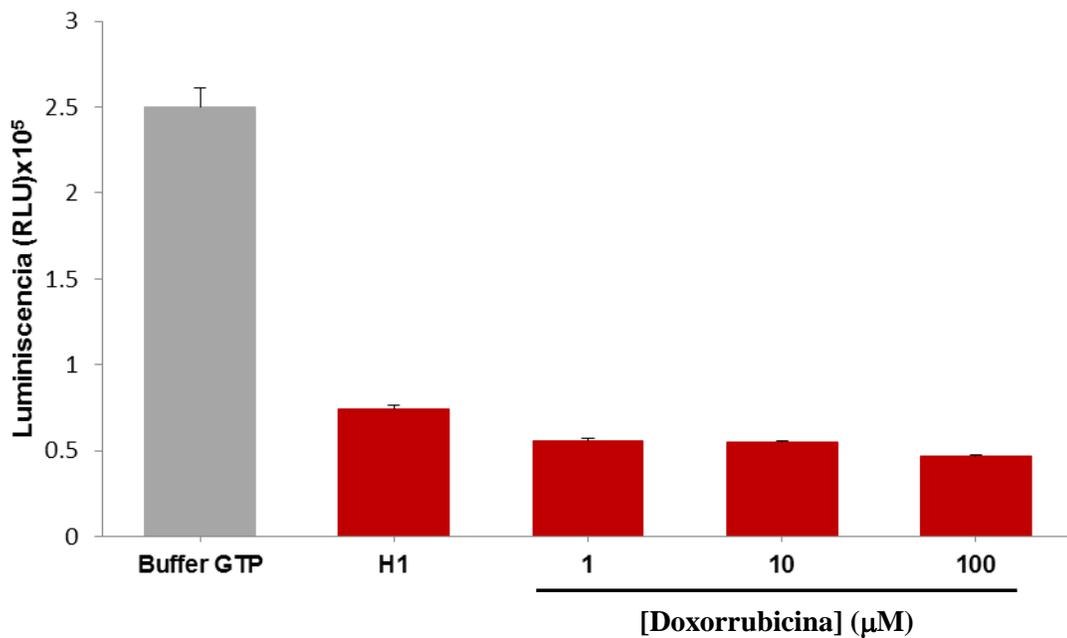


Figura 4.28: Efecto de doxorubicina sobre la actividad de GTPasa de HisGpn1/Gpn3 2.5 μM . La reacción de GTPasa fue realizada en presencia de una concentración final de GTP 5 μM con una duración de 5 minutos, todas las condiciones se llevaron a cabo por triplicado. Doxorubicina fue solubilizada en agua.

Para H1 se observa un aumento en la actividad de GTPasa mostrada en la figura 4.28 en las tres concentraciones probadas, el mayor incremento respecto al control es observado a 100 μ M de la doxorubicina.

Capítulo V - Discusión

Las proteínas GPN continúan emergiendo como un blanco atractivo para la exploración de las vías de señalización intracelular. La dificultad que ha representado el establecimiento de las condiciones para poder cristalizar a las GPN humanas se ha subsanado gracias al avance de los métodos computacionales de modelado. En el presente trabajo se empleó el modelo molecular generado para la proteína Gpn1 humana en su estado monomérico en conformación abierta unido al ligando GTP para la realización de experimentos de acoplamiento molecular o *docking*. El modelo de Gpn1 humana generado por I-TASSER está basado principalmente en su ortólogo Npa3 de *Saccharomyces cerevisiae*. En esta proteína se ha reportado que existen dos conformaciones estructurales dependientes de la unión de nucleótidos de guanina [6], una conformación abierta cuando Npa3 se encuentra unido a GTP, y una conformación cerrada si está unido a GDP. Los modelos para Gpn1 humana resultantes por I-TASSER fueron cuatro, dos con unión a GTP y dos unidos a GDP, con sus conformaciones abierta y cerrada respectivamente. El patrón de la raíz cuadrática media de la desviación estándar (RMSD) obtenido en estas simulaciones por dinámica molecular de 50 ns indican que estructuralmente la proteína presenta una tendencia a estabilizarse, misma que se evidencia al realizar la superposición del inicio y final de la dinámica como control de calidad para verificar justamente el movimiento de las estructuras, una manera de incrementar el grado de confianza en los modelos es realizar simulaciones con tiempos mayores para visualizar de forma más amplia la tendencia de la curva. Una simulación de 50 ns como la presentada en este trabajo es generalmente considerada como corta, sin embargo este intervalo de tiempo representa una manera eficaz de obtener tendencias con optimización del tiempo de cómputo, tomando en cuenta que para estas simulaciones de 50 ns presentadas para los 4 modelos, se necesitan aproximadamente 7 días para cada uno. Con base en el RMSD, se determinó que los modelos pueden considerarse como confiables y útiles.

También se logró en este trabajo realizar el agrupamiento o *clustering* para los modelos de Gpn1 unidos a GTP realizado sobre cadena principal, tal agrupamiento fue efectuado a partir de una muestra

representativa de 500 de las 50,000 imágenes totales de la simulación, facilitando su análisis, de manera positiva el cluster 1 para el modelo 1 presentó un 95.4% de estructuras que no difieren más de 2 Å respecto a su cadena principal, entendiéndose como pocas variaciones en la estructura de la proteína a lo largo de la simulación. De igual forma que para el caso de la tendencia del RMSD, se puede sugerir incrementar el tiempo de simulación con la finalidad de obtener la imagen más representativa de un periodo más grande del comportamiento de la proteína. En esta parte del trabajo los resultados permitieron tomar la estructura más representativa de la simulación para el análisis de cavidades por Metapocket.

De manera paralela realicé el diseño de la biblioteca de ligandos a probar sobre la superficie del modelo Gpn1 humana unido a GTP con base en la regla de 5 de Lipinski, parte fundamental de este estudio es eventualmente realizar pruebas experimentales de los compuestos químicos a nivel celular, por lo tanto los criterios de diseño de la biblioteca deberían facilitar este tipo de ensayos como lo reportado por Benet y colaboradores (2016), teóricamente todos los fármacos deberían tener la capacidad de atravesar la membrana plasmática dados los criterios del coeficiente de partición octanol-agua, peso molecular, donadores y aceptores de hidrógeno. Cabe mencionar que existen fármacos con buena biodisponibilidad oral y que no cumplen con la regla de 5 de Lipinski, por lo que se deberá tener cuidado al descartar estos compuestos químicos al tratar de considerar de manera estricta este criterio, algunos ejemplos son descritos como excepciones a la regla como lo expuesto por Petit (2012).

Se generaron los dos elementos más importantes para el estudio de acoplamiento, el receptor (modelo de Gpn1 humana) y la biblioteca de fármacos, y con ello el cumplimiento del primer objetivo específico de este trabajo. Existe una gran cantidad de software que permite la realización de estudios de acoplamiento, simplemente para el año 2010 se habían reportado hasta 23 métodos [12], es importante señalar que la metodología empleada para nuestro estudio de acoplamiento está basada en la frecuencia con que se usa Autodock 4.0 y los resultados reportados .

Hasta la fecha no se ha reportado ningún estudio de acoplamiento sobre alguna GTPasa GPN, sin embargo, existen múltiples estudios sobre la familia de GTPasas Ras donde se han empleado métodos computacionales para la identificación de compuestos químicos que potencialmente pudieran unirse a ellas, en el año 2017 Welsch y colaboradores propusieron que la inhibición de pan-Ras puede ser una estrategia terapéutica efectiva para algunos cánceres y que el diseño basado en estructura de moléculas pequeñas dirigidas a múltiples sitios adyacentes para crear inhibidores multivalentes puede ser efectivo para algunas proteínas [13].

Como se describió anteriormente con más detalle, la selección de fármacos se estableció de acuerdo a su sitio de unión, energía de afinidad y distancia de enlace, los criterios de corte son muy variados y dependen de las necesidades de cada sistema. Considerando el sitio de unión de los ligandos, es posible inferir sobre el efecto que pudiera presentar en la proteína, los sitios que exclusivamente se encuentran en Gpn1 tales como el extremo C-terminal, el par de inserciones 1 y 2, la superficie de contacto entre Gpn1/Gpn1 para el homodímero y Gpn1/Gpn3 para el heterodímero, así como el sitio de unión a nucleótido, son de suma importancia para los fines del presente trabajo. Bartuzi (2017) reporta las múltiples consecuencias que se esperan de la unión de ligando a proteínas G de acuerdo al sitio de acoplamiento.

Respecto a los fármacos resultantes del procesamiento *post-docking*, fueron incluidos sertralina, rosiglitazona y propranolol a pesar de no cumplir con los criterios de corte según la energía libre de Gibbs, esta inclusión fue llevada a cabo debido al interés por explorar los posibles efectos sobre su sitio de unión a Gpn1 predicho por el *docking* y al no encontrar mejores candidatos en términos de energía con unión a esos sitios.

Un punto que no debe pasar por alto es que las pruebas experimentales sobre la proteína recombinante, no se llevaron a cabo sobre la estructura monomérica de Gpn1, una oportunidad evidente de mejora para este trabajo es realizar el experimento de acoplamiento sobre los modelos en la forma homodimérica y heterodimérica, ya que numerosos resultados por parte de nuestro grupo de trabajo sugieren que la

unidad funcional corresponde a Gpn1 en complejo con Gpn3. Para los ensayos de actividad enzimática se modificó el método establecido por el fabricante y reportado en el trabajo original por Mondal y colaboradores (2015) donde describen la duración de cada uno de los pasos para la determinación de la actividad de GTPasa. Considerando las tres reacciones enzimáticas necesarias, el fabricante recomienda que la reacción de GTPasa se lleve a cabo en un periodo de 60 a 120 min, sin embargo de acuerdo con nuestros resultados G1 y H1 a 5 μM en presencia de GTP 5 μM , presentaron una hidrólisis de GTP de más del 95% en los primeros 5 min. Podemos considerar que la unión de un fármaco a Gpn1 podría afectar su actividad tanto de manera positiva como negativa, con la finalidad de poder visualizar cualquiera de estos dos efectos, el ensayo de actividad se realizó en proporción 4:1, GTP 10 μM con G1 y H1 2.5 μM .

Los resultados obtenidos al preincubar a las enzimas en presencia de bisacodilo mostraron un incremento en su capacidad de hidrólisis de GTP de forma inversa a la concentración de fármaco, siendo más evidente el incremento gradual de la actividad de GTP para HisGpn1/Gpn3 que para Gpn1 homodimérica.

Capítulo VI - Conclusiones y Perspectivas

En este trabajo se logró la identificación de compuestos químicos que presentan la capacidad de unirse a la GTPasa Gpn1 humana modelada por homología a través de experimentos computacionales de acoplamiento molecular o “docking. También se llevó a cabo de manera exitosa la determinación de las condiciones necesarias para realizar los ensayos de actividad enzimática de HisGpn1 en su forma homodimérica y heterodimérica como HisGpn1/Gpn3 con una reducción importante en los tiempos de las reacciones enzimáticas de hidrólisis de GTP y de conversión de GTP a ATP, e igualmente se consiguió una reducción en el volumen de los reactivos a emplear, aumentando la capacidad en el número de ensayos a realizar. Al establecer las condiciones ideales para la determinación de la actividad intrínseca de HisGpn1 y HisGpn1/Gpn3, fue posible observar por ejemplo, que más del 90% del GTP agregado es hidrolizado por ambas enzimas en los primeros 5 minutos de la reacción.

Para los fármacos donde no se observaron cambios en estos ensayos, tales como inhibición o incrementos con alguna tendencia, no se puede descartar la posibilidad de que efectivamente se unan en las regiones donde presentaron acoplamiento en los experimentos computacionales, dado que se tienen bases teóricas sólidas acerca de su interacción con Gpn1 en función de la energía de enlace y su distancia. Cabe señalar que no necesariamente debe existir una relación entre la actividad enzimática y la integridad de los complejos, ya que teóricamente, en el dado caso de que se pudiera conseguir la perturbación de HisGpn1 y/o HisGpn1/Gpn3 probando en un futuro los compuestos químicos resultantes del *docking*, todas las subunidades (Gpn1 y Gpn3) han demostrado tener la capacidad de hidrólisis de GTP, pero a su vez por dispersión dinámica de luz se deberían dos poblaciones de proteína que difieren en tamaño, teniendo como resultado una muestra polidispersa. Dado lo anterior, resulta fundamental para este estudio tener la capacidad y condiciones para obtener a ambas enzimas HisGpn1 y HisGpn1/Gpn3 como poblaciones monodispersas al realizar ensayos de dispersión dinámica de luz, ya que es indicio de que la purificación de las proteínas recombinantes por afinidad y por filtración en gel fue exitosa, resulta

interesantemente relevante por el hecho de que los fármacos identificados por acoplamiento molecular podrían presentar la capacidad de perturbar tanto al homodímero como al heterodímero. Por ejemplo, se puede pensar que fármacos que se unen a la α -hélice de la superficie de contacto entre ambas, pudieran interrumpir por algún fenómeno de impedimento estérico la formación del complejo, de ser así, se espera encontrar a la población de proteína como polidispersa en los ensayos de dispersión dinámica de luz.

Resulta de suma importancia recordar que en la actualidad se emplean fármacos en la quimioterapia contra el cáncer cuya función es la inhibición de la función de proteínas, con la consecuencia de producir efectos secundarios no deseados. Conociendo que una sobreexpresión de Gpn1 y Gpn3 se asocia significativamente con un acortamiento del período de vida en pacientes con cáncer de mama del subtipo HER2+, la finalidad de este estudio se vuelve trascendental para identificación de compuestos químicos que inhiban selectivamente a Gpn1/Gpn3.

Referencias

1. Leipe et al., 2002. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J Mol Biol.* 317(1):41-72.
2. Wittinghofer and Vetter, 2011. Structure-function relationships of the G domain, a canonical switch motif. *Annu Rev Biochem.* 80:943-71.
3. Gras et al., 2007. Structural insights into a new homodimeric self-activated GTPase family. *EMBO Rep.* 8(6):569–575.
4. Staresincic et al., 2011. GTP-dependent binding and nuclear transport of RNA polymerase II by Npa3 protein. *J. Biol. Chem.* 286(41):35553-35561.
5. Alonso B, et al. (2011) A role for GPN-loop GTPase yGPN1 in sister chromatid cohesion. *Cell Cycle* 10(11):1828-37.
6. Gonzalez-Gonzalez et al., 2017. Human Gpn1 purified from bacteria binds guanine nucleotides and hydrolyzes GTP as a protein dimer stabilized by its C-terminal tail. *Protein Expr Purif.* 132:85-96.
7. Niesser et al., 2015. Structure of GPN-Loop GTPase Npa3 and Implications for RNA Polymerase II Assembly. *Mol Cell Biol.* 36(5): 820–831.
8. Yang J y Zhang Y. Protein Structure and Function Prediction Using I-TASSER, *Curr Protoc Bioinformatics.* *Curr Protoc Bioinformatics.* 2015; 52: 5.8.1–5.815.
9. Huang B. 2009. MetaPocket: A Meta Approach to Improve Protein Ligand Binding Site Prediction, *OMICS A Journal of Integrative Biology.* *OMICS.* 2009 Aug; 13(4):325-30.
10. Benet et al., 2016. BDDCS, the Rule of 5 and Drugability. *Adv Drug Deliv Rev.* 101:89–98.

11. Forli et al., 2016. Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nat. Protoc.* 11(5):905–919.
12. Mondal et al., 2015. A Homogenous Bioluminescent System for Measuring GTPase, GTPase Activating Protein, and Guanine Nucleotide Exchange Factor Activities. *ASSAY and Drug Development Technologies* October 2015. *Assay Drug Dev Technol.* 2015 Oct 1; 13(8): 444–455.
13. Eweas et al., 2014. Advances in molecular modeling and docking as a tool for modern drug discovery. *Der Pharma Chemica* 6(6):211-228.
14. Petit et al., 2012. Softening the Rule of Five—where to draw the line? *Bioorg Med Chem.* 20(18): 5343–5351.
15. Ferreira, Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules* 2015, 20, 13384-13421. *Molecules.* 2015 Jul 22;20(7):13384-421.
16. Welsch et al., 2017. Multivalent Small-Molecule Pan-RAS Inhibitors. *Cell.* Feb 23;168(5):878-889.
17. Bartuzi et al., 2017. Recent Advances and Applications of Molecular Docking to G Protein-Coupled Receptors. *Molecules.* 2017 Feb 22;22(2). pii: E340.
18. Huang et al., 2016. Dual ATPase and GTPase activity of the replication-associated protein (Rep) of beak and feather disease virus. *Virus Res.* 213(2):149-161.
19. Seeliger y Groot, 2010. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. *J Comput Aided Mol Des.* 24(5):417–422.
20. Forget et al., 2010. The protein interaction network of the human transcription machinery reveals a role for the conserved GTPase RPAP4/GPN1 and microtubule assembly in nuclear import and biogenesis of RNA polymerase II. *Mol. Cell Proteomics* 2019(12):2827-2839.

21. Sliwoski et al., 2014. Computational Methods in Drug Discovery. Pharmacol Rev. 2013 Dec 31;66(1):334-95.
22. Hwang et al., 2012. Structure-based design and screening of inhibitors for an essential bacterial GTPase Der. J Antibiot (Tokyo). 2012 May;65(5):237-43.
23. Cuanalo et al., 2011. What do you know about... Virtual Screening?. Rev. mex. cienc. farm vol.42 no.2 México abr./jun. 2011: 54-55.
24. Kangas E y Singh M. 1998. Energy Minimization: Molecular Dynamics, Lecture 16, Introduction to computational Molecular Biology.
25. Alfaro-Pérez JA. 2014. Métodos de simulación molecular: una revisión de las herramientas más actuales. Ingeniería: Portal de revistas académicas, 24(2):117-127.
26. Suarez C. 2013. Simulación por dinámica molecular de polímeros anfifílicos: Dependencia del pH, longitud de la cadena polimérica y cadena alquílica.
27. Villoutreix et al., 2007. Free Resources to Assist Structure-Based Virtual Ligand Screening Experiments. Current Protein and Peptide Science 8:381-411.
28. Glen RC y Allen SC. 2003. Ligand-Protein Docking: Cancer Research at the Interface between Biology and Chemistry. Current Medicinal Chemistry 10:763-777.