

Temática: I Taller Internacional de Biología Computacional y Bioinformática

Análisis computacional de las interacciones entre el inhibidor alostérico fidelósido y la quinesina Eg5

Computational analysis of the interactions between the allosteric inhibitor fideloside and Eg5 kinesin

Jennifer Suárez^{1*}, Enrique Colina², Daniel Alpízar³, Ángel Sánchez Lamar¹

¹ Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba

² Departamento de Bioquímica, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba

³ Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos, La Habana, Cuba

* jnsn990506a@gmail.com

Resumen

Eg5 es una quinesina que desempeña un papel crucial en la formación y mantenimiento de la bipolaridad del huso mitótico. La inhibición de Eg5 puede resultar en arresto mitótico y muerte celular regulada. Por ello, inhibidores de Eg5 han sido investigados en el control de la proliferación de células cancerígenas. Con tal fin, son de preferencia los inhibidores que se unen al bolsillo alostérico de Eg5 (no competitivos). En el extracto acuoso obtenido de *Phyllanthus orbicularis* Kunth, el principal fitocomponente es un flavonoide-C-glicosidado que ha sido denominado “fidelósido”, cuya estructura presenta similitud con flavonoides que actúan como inhibidores no competitivos de Eg5, como es el caso de la moreloflavona. El objetivo de este trabajo es modelar, *in silico*, empleando métodos bioinformáticos, la interacción química entre fidelósido y Eg5. Para ello, se realizó un procedimiento de anclaje molecular empleando como receptor las formas abierta y cerrada del lazo L5 de la quinesina. Se obtuvieron seis modelos representativos a partir del anclaje molecular semi-rígido teniendo en cuenta la puntuación y los valores de RMSD. Los complejos fidelósido-Eg5 se optimizaron energéticamente y estabilizaron empleando simulaciones de dinámica molecular al vacío por 1 ns. Los modelos seleccionados se mantuvieron estables durante las simulaciones de dinámica molecular. Los aminoácidos involucrados en la unión con el ligando son comunes a los registrados para otros inhibidores de Eg5 y las energías de unión son similares.

Palabras clave: flavonoide-C-glicosidado, husos monopolares, huso mitótico, agentes anti-mitóticos, moreloflavona

Abstract

*Eg5 is a kinesin that plays a crucial role in the formation and maintenance of mitotic spindle bipolarity. Inhibition of Eg5 may result in mitotic arrest and regulated cell death. Therefore, Eg5 inhibitors have been investigated in the control of cancer cell proliferation. For this purpose, inhibitors that bind to the allosteric pocket of Eg5 (non-competitive) are preferred. In the aqueous extract obtained from *Phyllanthus orbicularis* Kunth, the main phytochemical component is a flavonoid-C-glycoside that has been named "fideloside", whose structure presents similarity with flavonoids that act as non-competitive inhibitors of Eg5, as is the case of morelloflavone. The aim of this work is to model, in silico, using bioinformatics methods, the chemical interaction between fideloside and Eg5. For this purpose, a molecular anchoring procedure was performed using the open and closed forms of the L5 loop of kinesin as receptors. Six representative models were obtained from the semi-rigid molecular anchoring taking into account the score and RMSD values. The fideloside-Eg5 complexes were energetically optimized and stabilized employing vacuum molecular dynamics simulations, for 1 n. The selected models remained stable during the molecular dynamics simulations. The amino acids involved in ligand binding are common to those reported for other Eg5 inhibitors and the binding energies are similar.*

Keywords: *flavonoid-C-glycoside, monopolar spindles, mitotic spindle, anti-mitotic agents, morelloflavone*

Introducción

El cáncer comprende un grupo de enfermedades en las que las células se dividen continuamente y excesivamente. La división celular es un proceso altamente regulado por mecanismos de control que aseguran la producción de dos células idénticas. Los puntos de control del ciclo celular previenen la acumulación y propagación de errores genéticos durante la división celular; estos pueden retrasar la progresión del ciclo celular o, en respuesta al daño irreparable en el ADN, inducir la muerte celular. Las mutaciones asociadas al cáncer, que perturban el control del ciclo celular, permiten una división celular continua al comprometer la habilidad de las células de regular el ciclo celular (Bertoli & de Bruin, 2021).

El cáncer constituye un serio problema de salud para la humanidad y se estima que se incrementará rápidamente en los próximos años. Desde el año 2012, en Cuba constituye la primera causa de muerte. Cada año se diagnostican más de 36 mil pacientes y se registran más de 22 mil fallecidos por esta causa (Cancio et al., 2019).

Muchas drogas anti-cáncer provenientes de productos naturales que son usadas hoy en la clínica incluyen agentes que afectan el ciclo celular inhibiendo el estado de hiperproliferación de las células tumorales y, como consecuencia, la inducción de muerte celular, que es el resultado esperado de la quimioterapia. Sobre la base de su modo de acción estas drogas se subdividen en grupos diferentes, entre los que se encuentran las drogas que inhiben la función del huso

mitótico, y que han demostrado ser excepcionalmente exitosas en la clínica. Estas afectan los microtúbulos y son llamadas clásicamente drogas antimitóticas. Sin embargo, las limitaciones en su empleo radican en efectos clínicos colaterales como: la toxicidad, mutagenicidad, afecciones neurológicas y hematológicas. Adicionalmente, puede producirse, en casos de tratamientos prolongados, un efecto de resistencia adquirida (Piloto & Sanchez-Lamar, 2015). Por consiguiente, a día de hoy se continúa la búsqueda de nuevos blancos de drogas que inhiban la progresión de la mitosis.

Los primeros agentes antimitóticos que entraron en ensayos clínicos tenían como blanco principal la tubulina. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado investigaciones con nuevos blancos: quinasas, proteínas motoras y complejos multiproteicos involucrados en la mitosis.

Eg5 es una proteína motora perteneciente a la familia de las quinesinas y ha sido validada como blanco quimioterapéutico en terapias anti-cáncer. Debido a que Eg5 actúa en la separación de los centrosomas, su inhibición impide que el huso mitótico asuma su configuración bipolar y resulta en la formación de un aparato mitótico monopolar, lo que puede conllevar a la muerte celular. La mayoría de los inhibidores son compuestos que actúan en el bolsillo alostérico (L5/ α 2/ α 3) de esta proteína. En los ensayos clínicos, estos son preferencialmente aplicados, ya que los inhibidores que actúan por el sitio de unión del ATP usualmente no pueden cruzar las membranas celulares (Henriques & Bonnato, 2017). Hasta la fecha han sido informados varios inhibidores sintéticos de la quinesina Eg5 como el monastrol, la S-tritil-L-cisteína, ispinesib y filanesib. Todos estos inhibidores, a pesar de su buena actividad inhibitoria en cultivos celulares, han presentado problemas durante las etapas de ensayos clínicos, debido a una farmacocinética deficiente, elevadas dosis de uso con riesgo citotóxico a células sanas y resistencia adquirida en variantes mutadas de la proteína, por lo que nuevas alternativas para la inhibición de la proteína por este sitio se hacen necesarias (Ogunwa et al., 2019) (Gao et al., 2017). En años recientes, la búsqueda de nuevos compuestos que pudieran actuar sobre la quinesina Eg5 como blanco molecular fundamental, se ha orientado hacia los compuestos obtenidos de extractos vegetales. Dichos extractos presentan un amplio espectro especies moleculares, tales como los terpenos, las flavonas y las lactonas, con actividades antineoplásicas previamente informadas (Ogunwa et al., 2019; Pfeffer et al., 2016).

El extracto acuoso de la planta *Phyllanthus orbicularis* Kunth (Phyllanthaceae) presenta diversas propiedades farmacológicas y un amplio espectro de actividad antimutagénica y/o radioprotectora del ADN frente a radiación γ y UV (Francioso et al., 2019; Sánchez-Lamar et al., 2015).

Perfiles realizados de UPLC-DAD (280 nm) de extractos acuosos de *P. orbicularis* muestran que el metabolito que prevalece en la planta corresponde a un compuesto flavonoide-C-glicosidado, que ha sido denominado “fidelósido”. Esta familia de compuestos ha mostrado efectividad como agentes terapéuticos anticancerígenos (Francioso et al., 2019). Por otro lado, el extracto acuoso de *P. orbicularis* mostró una reducción drástica de la proliferación celular en cultivos células de ovario de hámster chino (por sus siglas en inglés CHO) al emplear concentraciones de $> 100 \mu\text{g/mL}$ y en el caso de células humanas, como MRC5 y XP4PA, se obtuvieron resultados similares a concentraciones $> 10 \mu\text{g/mL}$ (Verhnes et al. 2013; Sánchez-Lamar et al., 1999). Existen otros compuestos flavonoides, como la moreloflavona (MF) y la kolaflavonona, con conocida actividad antiproliferativa, que guardan similitudes estructurales con el fidelósido. Ambos compuestos mencionados anteriormente tienen como blanco molecular la quinesina Eg5 (Alrzai et al., 2021; Ogunwa et al., 2019). Siendo el compuesto fidelósido el componente mayoritario del extracto acuoso de *P. orbicularis*, los resultados anteriormente descritos refieren la posibilidad de un efecto inhibitorio en alguno de los componentes clave de la maquinaria de división celular, como Eg5. Sin embargo, el mecanismo real por el cual este inhibe la proliferación celular aún no ha sido dilucidado.

Las validaciones experimentales con la planta han sido realizadas con todo el extracto acuoso, el que comprende varios metabolitos. Para poder dilucidar el responsable principal de sus propiedades, se hace necesario evaluar la actividad de sus componentes de forma independiente. Es por ello, que los estudios con fidelósido, su componente principal, son imprescindibles.

A pesar de que en la actualidad existen metodologías experimentales que permiten dilucidar a nivel molecular el mecanismo de interacción de pequeños ligandos con sus estructuras proteicas, estos son extremadamente costosos. En los últimos años, gracias a la evolución acelerada de los medios de cómputo y, con ellos, de la bioinformática, han surgido procedimientos teóricos que ayudan a la investigación y comprensión de fenómenos de interés químico y/o biológico, que permiten sugerir el comportamiento molecular y obtener información mediante cálculos matemáticos, a fin de estimar las propiedades de dichos sistemas (Lindert, 2016).

Existe poca información respecto a cómo el extracto acuoso de *P. orbicularis* es capaz de inhibir la proliferación celular. El compuesto mayoritario de este extracto es un flavonoide c-glicosilado conocido comúnmente como “fidelósido”, con similitudes estructurales a otros inhibidores de la proteína Eg5, por lo tanto, dicho compuesto pudiera ejercer una

actividad inhibitoria sobre la misma. La modelación molecular *in silico*, empleando métodos bioinformáticos, posibilita una mejor información de la naturaleza de las interacciones fidelósido-Eg5.

Tomando en consideración todos los elementos anteriormente expuestos, el presente trabajo se propone analizar la naturaleza de las interacciones entre el ligando fidelósido y el receptor Eg5, mediante el empleo de herramientas bioinformáticas. Para dar cumplimiento a ello, se propone obtener las estructuras en formato pdb y los archivos de parametrización del compuesto fidelósido, y de las formas abierta y cerrada de Eg5 empleando el repositorio de estructuras 3D PDB y el servidor en línea CgenFF; predecir los mejores modelos de asociación Eg5-fidelósido mediante el anclaje molecular con la utilización de funciones de puntuación y los valores de RMSD; optimizar energéticamente la asociación de los mejores complejos Eg5-fidelósido, a través de dinámicas moleculares (DM) al vacío de 1 ns; e identificar los principales tipos de interacciones que estabilizan el complejo mediante el empleo del programa LigPLot+ v2.

Metodología computacional

Preparación del ligando

La estructura 3D de fidelósido fue obtenida de estudios anteriores (Francioso et al., 2019). El software *AutoDock Tools* v1.5.6 (Morris et al., 2009) se empleó en la preparación del ligando para las simulaciones. Todos los átomos de hidrógeno fueron añadidos a la molécula, las cargas Gasteiger calculadas, los hidrógenos no polares eliminados, se asignó el tipo de átomo AD4 para cada átomo y todos los ángulos de torsión fueron definidos como flexibles siguiendo la metodología de Verma et al. (2017). Las estructuras finales se exportaron en formato pdbqt, que contiene las cargas atómicas, la definición del tipo de átomo y la información topológica.

Preparación del receptor

La estructura 3D de la proteína Eg5 se obtuvo de la Base de Datos de Proteínas RCSB (RCSB *Protein Data Bank* por sus siglas en inglés) (www.rcsb.org). Debido a la flexibilidad del lazo L5 en el sitio de inhibición no competitivo, la estructura de la quinesina fue descargada tanto en la forma abierta (PDB ID: 1ii6), como en la cerrada (PDB ID: 3ken) del lazo L5. En el caso de la forma cerrada, fue construido el lazo faltante empleando el programa *Chimera* y

tomando como referencia el fichero de la forma abierta; el nuevo archivo fue guardado en formato PDB. Las estructuras en formato PDB fueron depuradas dejando solo la molécula de ADP y el ion Mg^{2+} en el sitio activo. Las formas del receptor fueron finalmente preparadas mediante el uso del software *AutoDock Tools* v1.5.6 (Morris et al., 2009) y exportadas como pdbqt.

Obtención de los complejos fidelósido-Eg5 mediante anclaje molecular

El anclaje molecular brinda la posibilidad de llevar a cabo simulaciones en un receptor contra un solo ligando o una librería de moléculas pequeñas. En el primer caso, el usuario necesita especificar el receptor y el ligando a ser anclados como archivos pdb o pdbqt, mientras que, en el segundo, en lugar de un solo ligando, el usuario debe seleccionar una carpeta que contenga las moléculas que van a ser analizadas con el receptor en formato pdbqt, requerido para el funcionamiento de *AutoDock Vina* (di Muzio et al., 2017).

Los complejos fidelósido-Eg5 se obtuvieron mediante el uso del programa *AutoDock Vina* v1.2.0 (Trott & Olson, 2010). El espacio de búsqueda en el sitio de interacción se especificó mediante el empleo de cajas cúbicas usando las herramientas de *AutoDock Tools* v1.5.6 (Morris et al., 2009). El sitio fue localizado teniendo en cuenta que fidelósido debe comportarse como inhibidor no competitivo de la quinesina Eg5, tal como el ligando MF que se une al bolsillo alostérico L5/ α 2/ α 3. El espaciado empleado en las cajas en el *AutoDock Vina* fue 1Å. Fueron establecidos el centro y tamaño de las cajas. De esta forma, los centros fijados fueron: (24; 24; 54) Å y (22; 25; 51) Å, para las formas abierta y cerrada respectivamente. Los tamaños de las cajas teniendo en cuenta cada eje x, y, z, fueron: (28; 22; 22) Å para la forma abierta y (30; 28; 28) Å para la forma cerrada de Eg5.

Se realizaron simulaciones de anclaje molecular empleando el programa *AutoDock Vina* v1.2.0 (Trott & Olson, 2010). Para las simulaciones se tuvo en cuenta la flexibilidad de los ángulos de torsión de fidelósido, mientras que en el caso de la proteína Eg5, los residuos del bolsillo de unión alostérico fueron considerados rígidos. Como resultado de las simulaciones se obtuvo un total de 100 modelos (para cada forma del receptor), dado que se realizaron cinco repeticiones de 20 modelos cada una.

Los resultados del anclaje molecular fueron visualizados en *Chimera*, programa que se encuentra segmentado en un centro que provee servicios básicos y visualización, y extensiones que brindan un mayor nivel de funcionalidad. Las extensiones son escritas en Python o en una combinación con C/C++ (Pettersen et al., 2004).

La extensión *ViewDock* de Chimera permite examinar las orientaciones de los ligandos del anclaje en *DOCK*. *DOCK* calcula las posibles orientaciones de unión del ligando con las moléculas receptoras; a menudo, una base de datos extensa de compuestos es empleada en una búsqueda contra una proteína blanco, en las que cada compuesto es tratado como ligando y el blanco como receptor. Métodos simples de puntuación son utilizados en la identificación de los modos de unión más favorables. El resultado consiste en un largo número de ligandos candidatos en las orientaciones de unión consideradas más favorables del *DOCK*. Es posible la visualización de más de uno de los resultados del *DOCK* a la vez (Pettersen et al., 2004).

Los diferentes conformeros de cada complejo fidelósido-Eg5 obtenidos mediante las simulaciones de anclaje molecular se agruparon empleando como criterio de selección, la determinación de la energía libre de unión, los valores de desviación media cuadrática (RMSD por sus siglas en inglés) y la inserción en el bolsillo de inhibición. De esta forma, de cada grupo se seleccionaron las conformaciones que presentaban las menores energías libres de unión, según la función de puntuación del *AutoDock Vina*, los menores valores de RMSD y el modo de unión adecuado. Los modelos seleccionados fueron guardados en ficheros pdb.

Optimización y minimización energética de los complejos fidelósido-Eg5 mediante simulaciones de Dinámica Molecular al vacío.

Los métodos de anclaje molecular no consideran la completa flexibilidad de la molécula blanco. El uso de simulaciones de DM puede no solo optimizar los efectos estéricos locales entre la proteína y el ligando, sino también corregir y optimizar el modo inicial de unión del ligando, así como brindar información detallada sobre las interacciones y estimar la contribución de energía libre de cada residuo en el sitio de unión. Mediante las simulaciones de DM se pueden obtener múltiples conformaciones teniendo en cuenta la flexibilidad del receptor (Shi et al., 2017).

La minimización energética de los complejos se llevó a cabo mediante simulaciones de dinámica molecular empleando el programa *NAMD* v2.12 (Phillips et al. 2005) y el campo de fuerza *CHARMM36* (Vanommeslaeghe et al., 2010).

Como estructuras de partida se emplearon las conformaciones representativas de los complejos fidelósido-Eg5 obtenidos por anclaje molecular. Fueron generados los archivos de escritura de los elementos formadores del complejo (fidelósido, Eg5, ADP y Mg^{2+}) y evaluados en el programa *VMD* (*Visualizer Molecular Dynamics* por sus siglas en inglés; Humphrey et al., 1996). Los parámetros para fidelósido y los componentes no proteicos (ADP y Mg^{2+}) de los receptores se obtuvieron a través del servidor CGenFF (<https://cgenff.paramchem.org>).

Los campos de fuerzas contienen un gran número de parámetros con el objetivo de desarrollar un modelo capaz de aproximarse lo mejor posible a los valores experimentales. Por ello, una fase importante en la parametrización consiste justamente en obtener estos parámetros de datos experimentales. En MM, esta información proviene de datos estructurales, energéticos o electrónicos. Además, para complementar estos datos experimentales, se recurre a los cálculos cuánticos *ab initio* que son capaces de reproducir resultados experimentales en muchos sistemas (Bueren-Calabuig, 2014).

Las simulaciones de DM se llevaron a cabo al vacío, usando un conjunto NVT, flexibilizando únicamente los ligandos y los residuos aminoacídicos que se encontraban a 10 Å del ligando previamente anclado. La temperatura se fijó a 310 K y se controló con el termostato Langevin. El paso de tiempo se fijó cada 2 femtosegundos (fs) y las simulaciones se llevaron a cabo por 1 ns, luego de una minimización energética de 1000 picosegundos (ps) (500 000 pasos). Las simulaciones de cada complejo se realizaron bajo condiciones periódicas de frontera (*PBC* del inglés, *Periodic Boundary Conditions*). Los resultados de las DM fueron visualizados en el software *VMD* (Humphrey et al., 1996) y guardados los gráficos de RMSD (Å) vs tiempo (ps), correspondientes a cada simulación con el uso de la herramienta *Xmgrace*.

Análisis de las interacciones involucradas en la estabilización de los complejos

Las interacciones hidrofóbicas y los enlaces de hidrógeno de la posición final en los complejos fidelósido-Eg5, seleccionados mediante simulaciones de DM, fueron analizadas usando el programa *LigPLot+* v2.1 (Laskowski & Swindells, 2011). Para ello, las últimas coordenadas atómicas de las simulaciones de DM al vacío fueron exportadas a archivos PDB y analizadas como estructuras 2D con el programa *LigPLot+* v2.1 (Laskowski y Swindells, 2011).

Resultados y discusión

Obtención de los complejos fidelósido-Eg5 mediante anclaje molecular

Mediante el programa *AutoDock Vina* v1.2.0 (Trott & Olson, 2010) se realizaron simulaciones de anclaje molecular con el objetivo de formar complejos fidelósido-Eg5 representativos del modo de unión de los inhibidores no competitivos en el bolsillo alostérico. Las simulaciones se realizaron para la forma abierta y cerrada del lazo L5 de la quinesina y se obtuvieron 100 modelos para cada una.

De todos los modelos resultantes fueron seleccionados, en cada caso, 3 conformaciones representativas teniendo en cuenta la inserción del ligando en la zona L5/ $\alpha 2/\alpha 3$, los valores de RMSD más cercanos a cero y las menores energías de Gibbs, de acuerdo a la función de puntuación del programa *AutoDock Vina* v1.2.0 (Trott & Olson, 2010).

Para el caso de la forma abierta, los dos primeros modelos propuestos por el programa fueron descartados por no encontrarse correctamente insertados en el sitio de inhibición, a pesar de presentar los menores valores de energías de unión y RMSD. Fueron seleccionados entonces 3 modelos (denominados modelos 1, 2 y 3, correspondientes a las energías de unión (Tabla 1)), con valores energéticos dentro del rango de búsqueda establecido, valores de RMSD adecuados y que sí se encontraban en el sitio evaluado. La figura 1 muestra los patrones de inserción de los complejos fidelósido-Eg5 formados por los conformeros seleccionados. En el modelo 1 (Figura 1 A), el ligando queda insertado en el bolsillo alostérico del receptor Eg5 con el anillo C en la abertura del bolsillo formada entre las hélices $\alpha 2/\alpha 3$, los anillos A y B en dirección al lazo L5 y el glicósido orientado hacia el exterior del bolsillo. En el modelo 2 (Figura 1 B), el ligando fidelósido se sitúa en el receptor con similar posicionamiento al del modelo 1, pero muestra diferencias en el ángulo de inserción en el bolsillo de inhibición. En el modelo 3 (Figura 1 C), fidelósido muestra un modo de inserción del ligando similar al modelo 1 con diferencias en los enlaces rotables.

Los tres modelos de la forma abierta quedaron dispuestos en el bolsillo alostérico con el anillo C hacia la abertura formada entre las hélices $\alpha 2/\alpha 3$ del sitio de inhibición, y los anillos A y B en dirección al lazo L5, es decir, la estructura básica del flavonoide insertada en el bolsillo. Por otro lado, el glicósido se sitúa hacia el exterior interactuando con residuos de la superficie de la proteína. Los modelos presentaron algunas variaciones en el ángulo de inserción del ligando y la rotación de ciertos enlaces, en especial, del glicósido.

Para la forma cerrada del lazo L5 de la proteína, se procedió de igual manera. En este caso se seleccionaron los tres primeros modelos indicados por el programa, correctamente insertados, y con valores de RMSD y energías libres de unión que se muestran en la Tabla 2. En los modelos 1 y 2, el anillo C de fidelósido quedó insertado entre las hélices $\alpha 2/\alpha 3$ del sitio de inhibición; los anillos A y B quedaron situados en dirección al lazo L5 y el glicósido hacia fuera del bolsillo (Figura 2 A, B). El Modelo 2 muestra similar posicionamiento al del modelo 1 en el receptor, con diferencias en el ángulo de inserción en el bolsillo de inhibición. El modelo 3 el ligando se asocia al receptor con el anillo C insertado hacia el bolsillo en dirección $\alpha 2/L5$ y el glicósido orientado a la hélice $\alpha 3$ (Figura 2 C). Los valores de RMSD y de energía de unión se muestran en la Tabla 2.

Los 6 mejores modelos seleccionados del Anclaje Molecular, muestran energías de unión cercanas al valor registrado por Ogunwa, Taii, et al., (2019) para MF: -8,4 kcal/mol. Con excepción del modelo 3 de la forma cerrada de Eg5, todos los ligandos se insertan en el bolsillo alostérico siguiendo el mismo patrón observado para la MF, con el anillo bencénico unido al anillo ciclado con O (equivalentes a los anillos A y B de fidelósido) hacia el lazo L5 y el otro benceno del flavonoide (equivalente al anillo C de fidelósido) hacia la abertura formada entre las hélices $\alpha 2/\alpha 3$, por lo que la forma de unión de fidelósido al bolsillo de inhibición L5/ $\alpha 2/\alpha 3$, es similar a la del inhibidor MF (Figura 3).

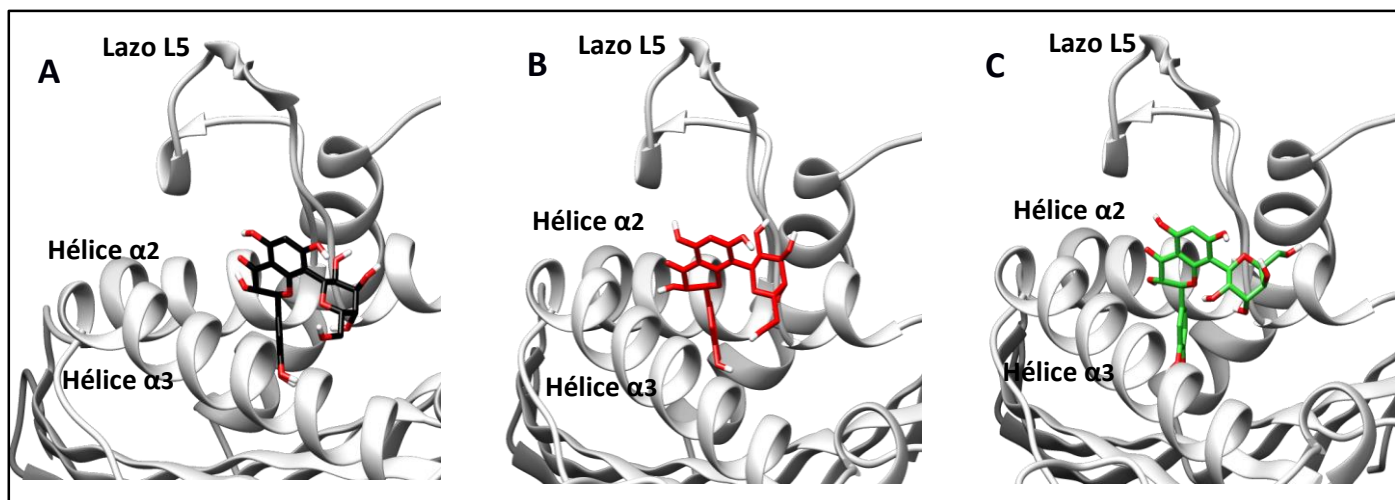


Figura 1. Complejos fidelósido-Eg5 seleccionados de los modelos obtenidos del Anclaje Molecular usando el programa *AutoDock Vina* v1.2.0 (Trott & Olson, 2010) en la forma abierta del lazo L5 del receptor Eg5. A) Modelo 1 del complejo

fidelósido-Eg5 con el ligando fidelósido en negro. B) Modelo 2 con el ligando en rojo. C) Modelo 3 con fidelósido representado en verde. En gris claro la proteína Eg5.

Tabla 1. Valores de RMSD y energía de Gibbs (ΔG) obtenidos durante el anclaje molecular. Los colores se corresponden con los declarados en la figura 1 para cada modelo.

Modelo	ΔG (kcal/mol)	RMSD
1	-8,20	6,79
2	-7,90	7,64
3	-7,80	6,86

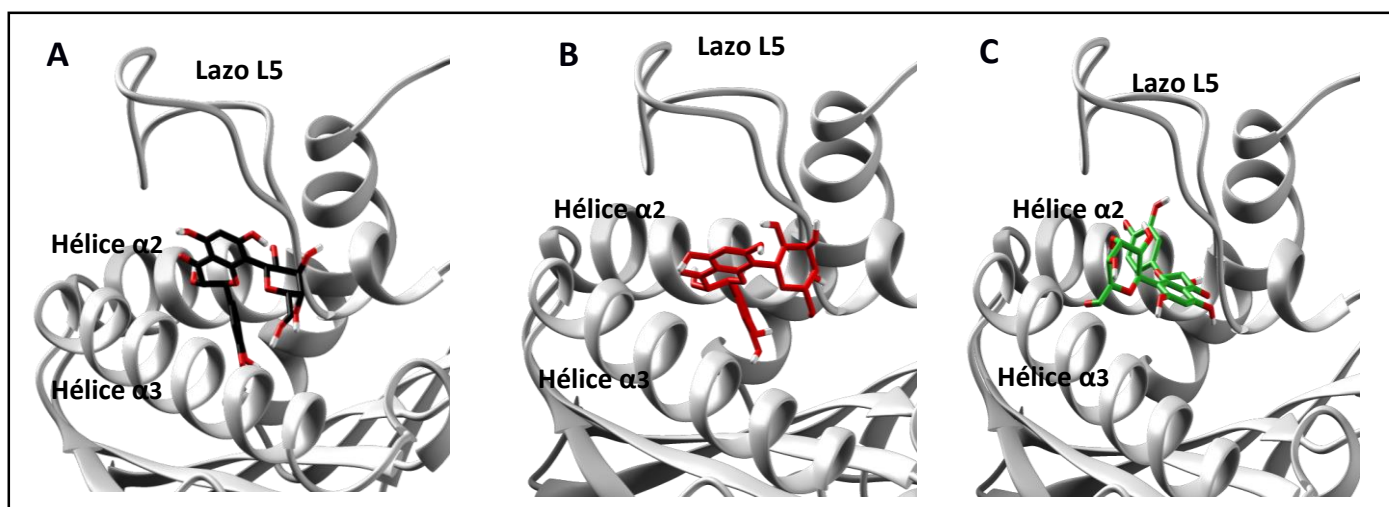


Figura 2. Complejos fidelósido-Eg5 seleccionados de los modelos obtenidos del Anclaje Molecular usando el programa *AutoDock Vina* v1.2.0 (Trott & Olson, 2010) en la forma cerrada del lazo L5 del receptor Eg5. A) Modelo 1 del complejo fidelósido-Eg5 con el ligando fidelósido representado en negro. B) Modelo 2 con el ligando en rojo. C) Modelo 3 del complejo fidelósido-Eg5, fidelósido en verde. En gris claro se muestra la quinesina Eg5.

Tabla 2. Valores de RMSD y energía de Gibbs (ΔG) obtenidos durante el anclaje molecular. Los colores de los modelos se corresponden a los declarados en la figura 2.

Modelo	ΔG (kcal/mol)	RMSD
1	-8,30	0,00
2	-8,20	1,25
3	-7,20	2,96

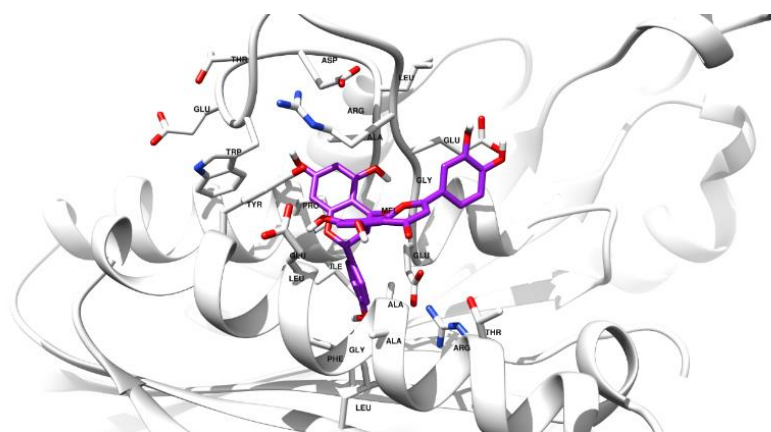


Figura 3. Configuración de unión de la moreoflavona al sitio alostérico L5/ α 2/ α 3 en Eg5. El biflavonoide se une al bolsillo con el grupo apigenina dentro del bolsillo alostérico y el grupo luteolina en la región expuesta al solvente.

Optimización y minimización energética de los complejos fidelósido-Eg5 mediante simulaciones de Dinámica Molecular al vacío.

Teniendo en cuenta que el anclaje molecular no considera la flexibilidad de las cadenas laterales del receptor, se realizó un proceso de optimización y minimización energética de los complejos seleccionados del anclaje molecular mediante DM al vacío por 1 ns. En estas simulaciones se consideraron flexibles los enlaces rotables de los ligandos y los residuos aminoacídicos que se encontraban a 10 Å del ligando, para así optimizar las interacciones ligando-receptor, sin tener en cuenta la acción del medio. Con el objetivo de evaluar la estabilidad de los complejos durante las simulaciones, se construyeron gráficos de RMSD (Å) vs Tiempo (ps).

Las posiciones finales de los ligandos obtenidas de las DM fueron comparadas con las del anclaje molecular (Figuras 4 y 6). En el caso de la forma abierta, el ligando del modelo 1 sufrió una ligera traslación que lo acercó hacia la interfase de la hélice $\alpha 2$ y el lazo L5 (Figura 4 A). En el modelo 2 se observan rotaciones de los enlaces para aproximar los anillos a $\alpha 2$ /L5 (Figura 4 B). En el modelo 3, el ligando se aleja un poco del bolsillo para estabilizar sus interacciones y la traslación es un poco más pronunciada que en el modelo 1 (Figura 4 C).

En el caso de los modelos de la forma cerrada del lazo L5, el modelo 1 el ligando sufrió una ligera traslación para adentrarse más en el bolsillo de inhibición hacia la zona de unión de las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 3$, y un poco en dirección al lazo L5 (Figura 6 A). En el modelo 2, algunos enlaces del ligando rotaron para acercar el anillo C y el glicósido del ligando hacia la hélice $\alpha 2$ del receptor (Figura 6 B). En el modelo 3 el ligando experimentó la rotación de algunos de sus enlaces y se acerca más a la abertura formada por las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 3$ (Figura 6 C).

La estabilidad de los complejos fidelósido-Eg5 fue evaluada mediante gráficos de RMSD (\AA) vs Tiempo (ps), contruidos mediante el uso de la herramienta *Xmgrace* (Figura 5 y 7).

La figura 5 muestra la estabilidad de los complejos después de transcurrido 1 ns de la simulación al vacío. En esta imagen se observa que, en el caso de los modelos 1 y 2, las variaciones iniciales resultado de la ligera traslación y rotación de los enlaces, es muy leve. Como es de esperar, esta variación se hace más notable para el modelo 3, puesto que la traslación fue mayor. Luego se mantuvo estable, por lo que las variaciones iniciales no son significativas.

En la forma cerrada, los 3 modelos sufrieron leves traslaciones y rotaciones de enlaces, lo cual se comprueba en el gráfico de estabilidad mostrado en la Figura 7. La variación inicial del modelo 3 es un poco más notable, pero aun así no significativa.

Por tanto, todos los modelos seleccionados se mantienen estables por 1 ns de evaluación tras la DM al vacío.

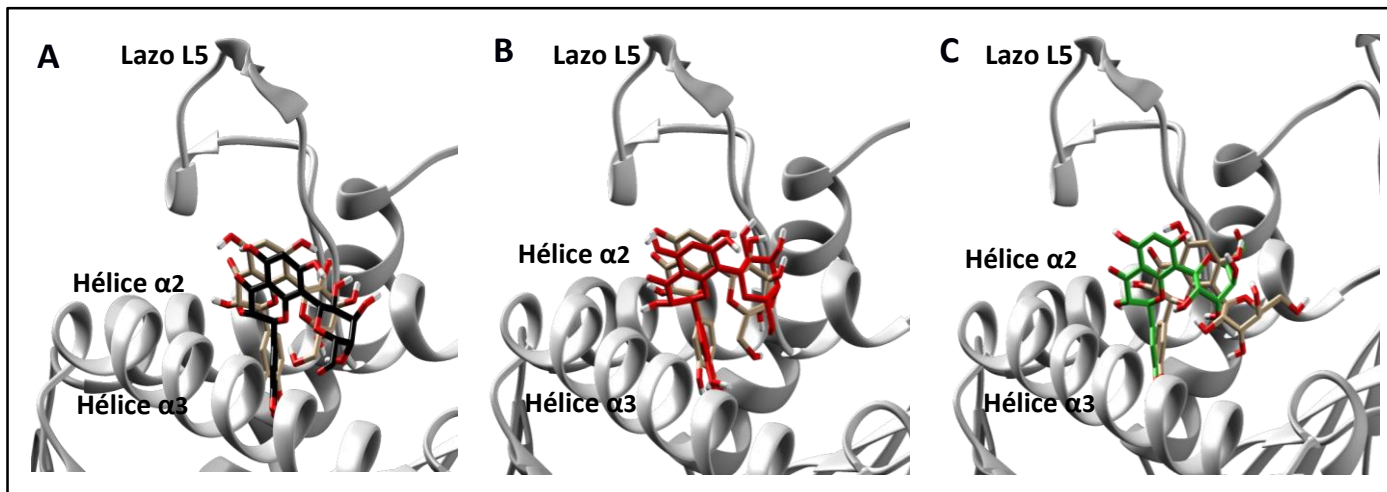


Figura 4. Resultado de las simulaciones de Dinámica Molecular al vacío de 1 ns empleando el programa *NAMD* v2.12 (Phillips et al. 2005) y el campo de fuerza *CHARMM36* (Vanommeslaeghe et al., 2010) a las que fueron sometidas los modelos representativos obtenidos del Anclaje Molecular, en la forma abierta del lazo L5 del receptor Eg5. Se muestra una comparación entre las posiciones iniciales de los ligandos (modelos del Anclaje Molecular) y las posiciones finales (modelos de la Dinámica Molecular). A) Modelo 1 del ligando en su posición inicial mostrada en negro). B) Modelo 2 del ligando con su posición inicial (rojo). C) Modelo 3 del ligando en su posición inicial (verde). Posiciones finales en bronceado.

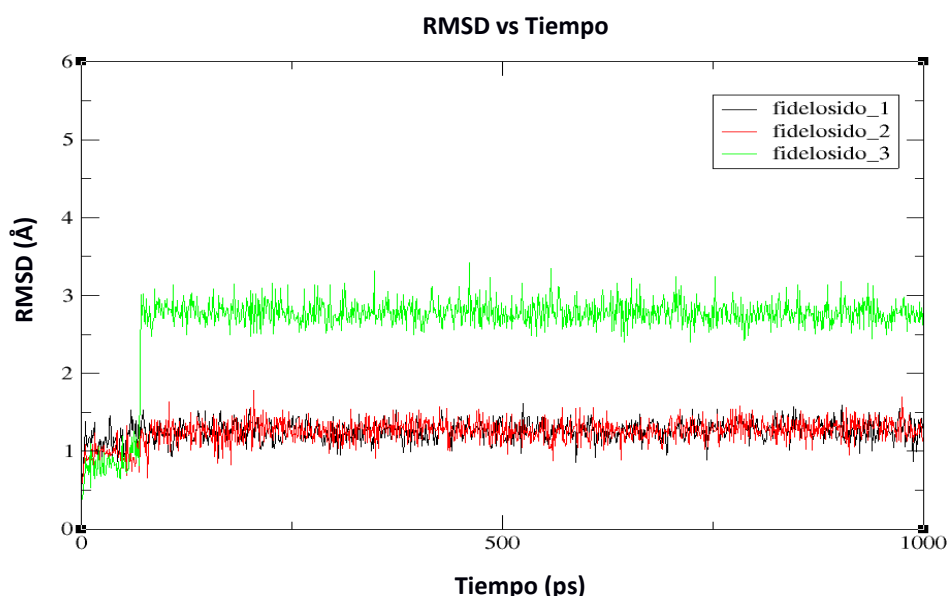


Figura 5. Estabilidad de los complejos fidelósido-Eg5 en la forma abierta de Eg5 evaluada mediante gráficos de RMSD (Å) vs Tiempo (ps) con el uso de la herramienta *Xmgrace*. Modelos 1 (negro), 2 (rojo), 3 (verde). Se observa una ligera variación inicial, más marcada para el modelo 3, y luego una estabilidad hasta los 1000 ps.

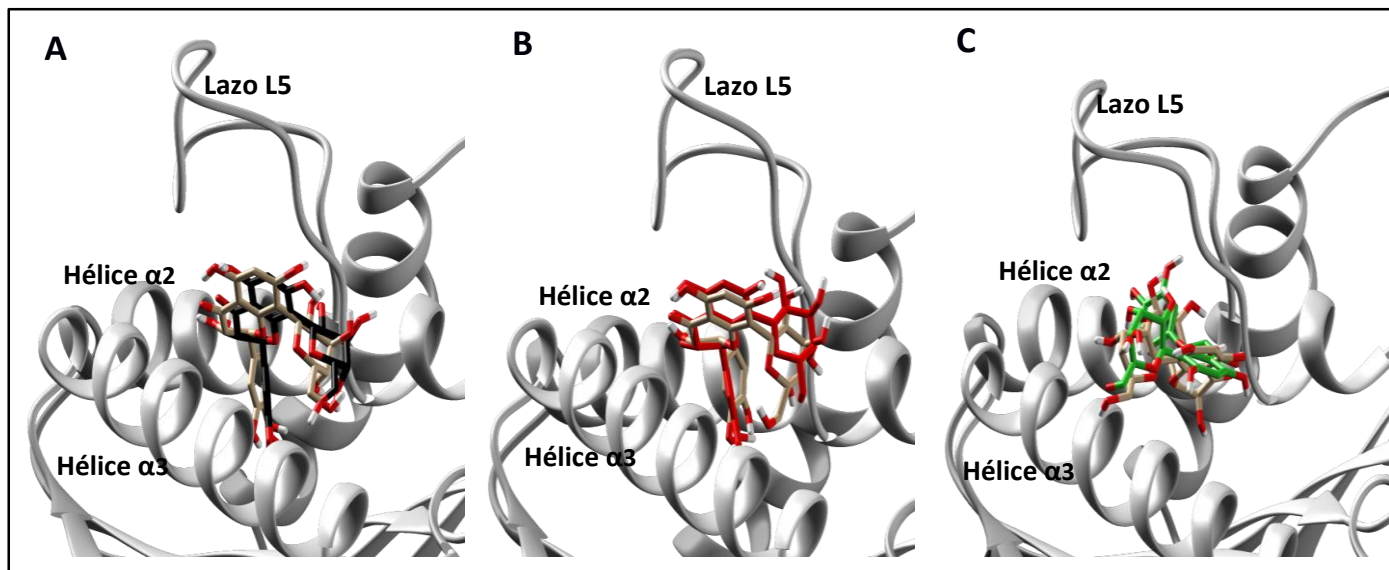


Figura 6. Resultado de las simulaciones de Dinámica Molecular al vacío de 1 ns empleando el programa *NAMD* v2.12 (Phillips et al. 2005) y el campo de fuerza *CHARMM36* (Vanommeslaeghe et al., 2010) a las que fueron sometidas los modelos representativos obtenidos del Anclaje Molecular, en la forma cerrada del lazo L5 del receptor Eg5. Se muestra una comparación entre las posiciones iniciales de los ligandos (modelos del anclaje molecular) y las posiciones finales (modelos de la Dinámica Molecular). A) Modelo 1 del ligando en su posición inicial (negro). B) Modelo 2 del ligando en su posición inicial (rojo). C) Modelo 3 del ligando en su posición inicial (verde). Las posiciones finales del ligando se muestran en bronceado. En la posición final del ligando se observa que este experimentó la rotación de algunos de sus enlaces y se acerca más a la abertura formada por las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 3$.

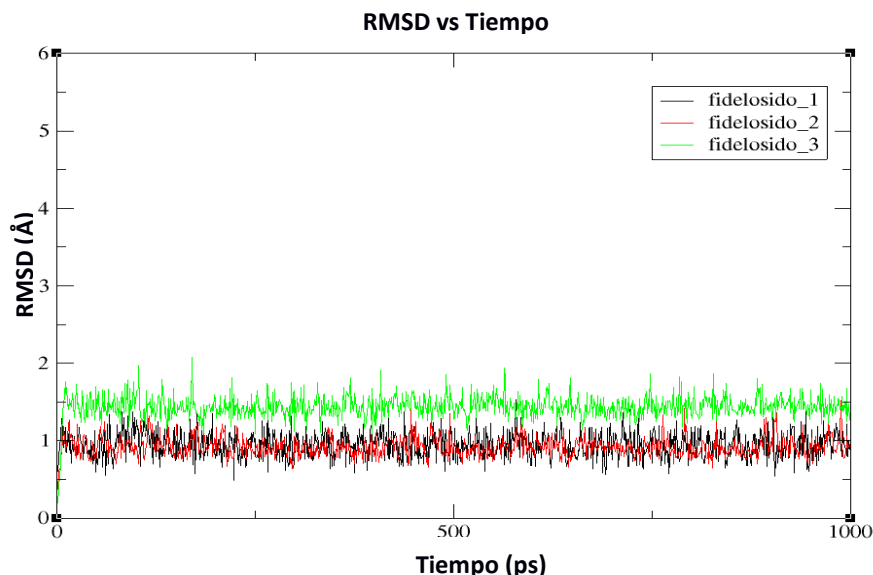


Figura 7. Estabilidad de los complejos Fidelósido-Eg5 evaluada mediante gráficos de RMSD (Å) vs Tiempo (ps) con el uso de la herramienta *Xmgrace*. Modelos 1 (negro), 2 (rojo), 3 (verde). Los modelos 1 y 2 se mantienen más estables y prácticamente sin variación inicial. En el caso del modelo 3 se observa una ligera variación inicial y luego estabilidad hasta los 1000 ps.

Análisis de las interacciones involucradas en la estabilización de los complejos.

Con el propósito de realizar un análisis más riguroso de la interacción de los complejos, fueron visualizados los residuos aminoacídicos del bolsillo de inhibición involucrados en la unión del ligando, a partir de una representación 2D obtenida con el programa *LigPlot+* v2.11 (Laskowski & Swindells, 2011).

Las principales interacciones de los complejos fidelósido-Eg5 formados en las DM fueron analizadas mediante el programa *LigPlot+* v2.11 (Laskowski & Swindells, 2011). Las figuras 8 y 9 muestran las representaciones 2D de los ligandos y los residuos aminoacídicos del bolsillo de inhibición involucrados en la interacción para las formas abierta y cerrada de Eg5, respectivamente.

Para la forma abierta, el modelo 1 (Figura 8 A) muestra interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos: Phe 239, Ile 136, Ala 218, Thr 112, Glu 118, Arg 119, Tyr 211; y enlaces de hidrógeno con los residuos: Leu 214, Glu 116, Arg 221, Gly 117 y Glu 215. El modelo 2 (Figura 8 B) muestra interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos: Phe

239, Ala 218, Thr 112, Arg 119, Tyr 211, Gly 117 y Leu 214; y enlaces de hidrógeno con los residuos: Glu 116, Arg 221, Glu 118 y Glu 215. El modelo 3 (Figura 8 C) muestra interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos: Ala 218, Gly 217, Leu 160, Ser 232, Glu 116, Arg 221 y Leu 214; y enlaces de hidrógeno con los residuos: Glu 118, Glu 215 y Thr 112.

Para la forma cerrada, el modelo 1 (Figura 9 A) muestra interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos: Thr 222, Leu 160, Leu 214, Phe 239, Tyr 211, Glu 215, Ala 218; y enlaces de hidrógeno con los residuos: Glu 118, Arg 221, Glu 116 y Gly 117. En el caso del modelo 2 (Figura 9 B) se identifican interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos: Gly 117, Tyr 211, Glu 215, Leu 214, Arg 221, Ala 218, Ile 136, Pro 137; y enlaces de hidrógeno con los residuos: Glu 118 y Glu 116. El modelo 3 (Figura 9 C) muestra interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos: Ala 218, Gly 117, Ala 133, Glu 118, Leu 214, Pro 137, Arg 119, Tyr 211 y Gly 215; y enlaces de hidrógeno con los residuos: Arg 221 y Glu 116.

Como se puede observar, los complejos fidelósido-Eg5 se encuentran estabilizados por interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno en proporciones similares.

Según estudios de Ogunwa, Taii, et al., (2019) y Ogunwa et al. (2019), la MF ocupa el bolsillo alostérico L5/ α 2/ α 3 rodeado por los residuos aminoacídicos: Ile 136, Glu 116, Glu 118, Trp 127, Gly 117, Ala 133, Glu 215, Leu 214 y Tyr 211, con un enlace de hidrógeno formado entre la MF y el residuo Tyr 211. Con excepción del Trp 127, todos los aminoácidos con los que interactúa MF, están comprendidos en los mostrados para los complejos fidelósido-Eg5.

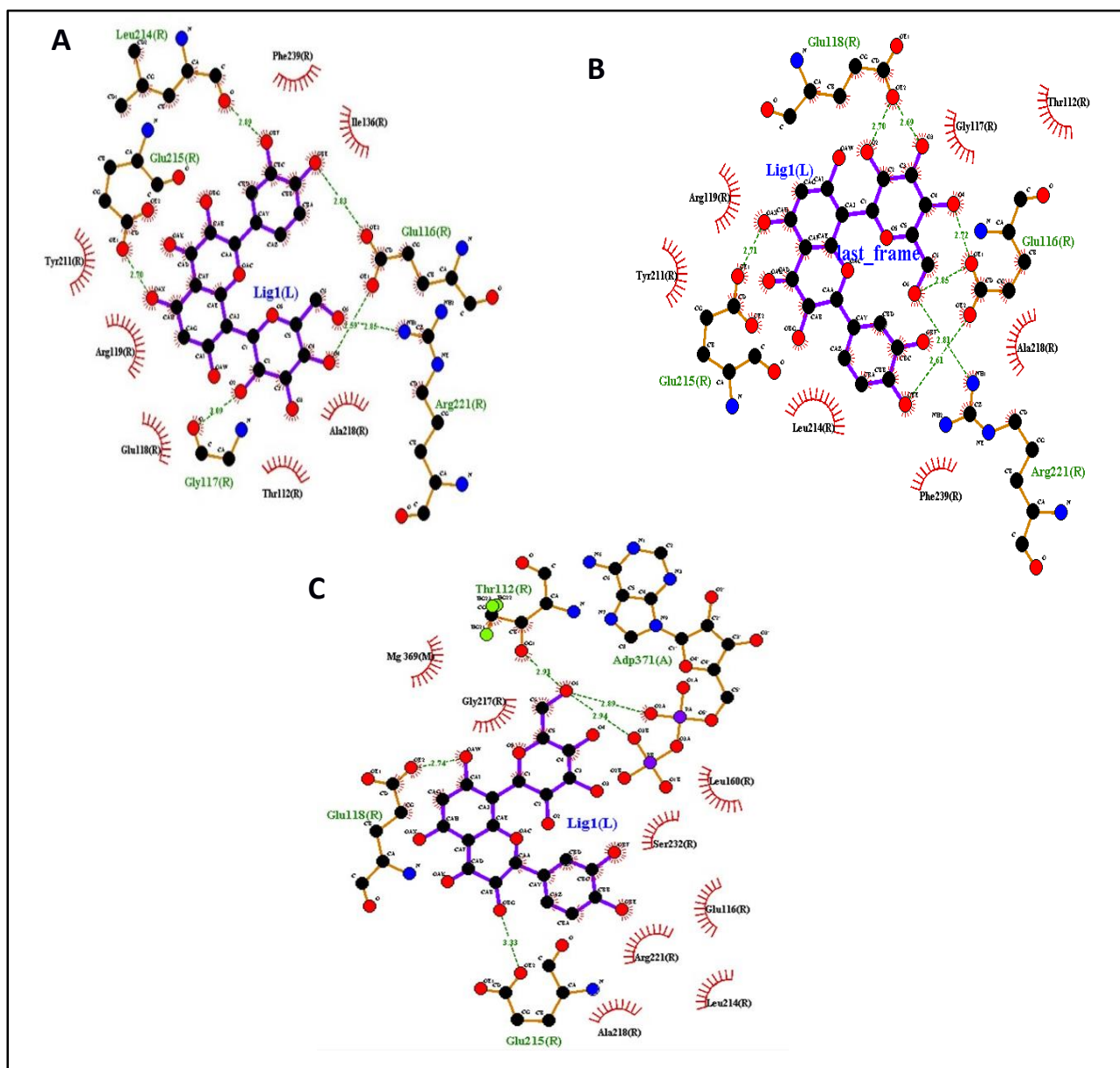


Figura 8. Principales interacciones de los complejos fidelósido-Eg5 obtenidos de las DM al vacío y analizadas mediante el programa *LigPlot+* v2.11 (Laskowski & Swindells, 2011) en la forma abierta de Eg5. Se muestra la representación 2D de los ligandos y los residuos aminoacídicos del bolsillo de inhibición involucrados la interacción. Interacciones hidrofóbicas en abanicos rojos y enlaces de hidrógeno representados en verde. A) Interacciones en el modelo 1. B) Modelo 2. C) Modelo 3.

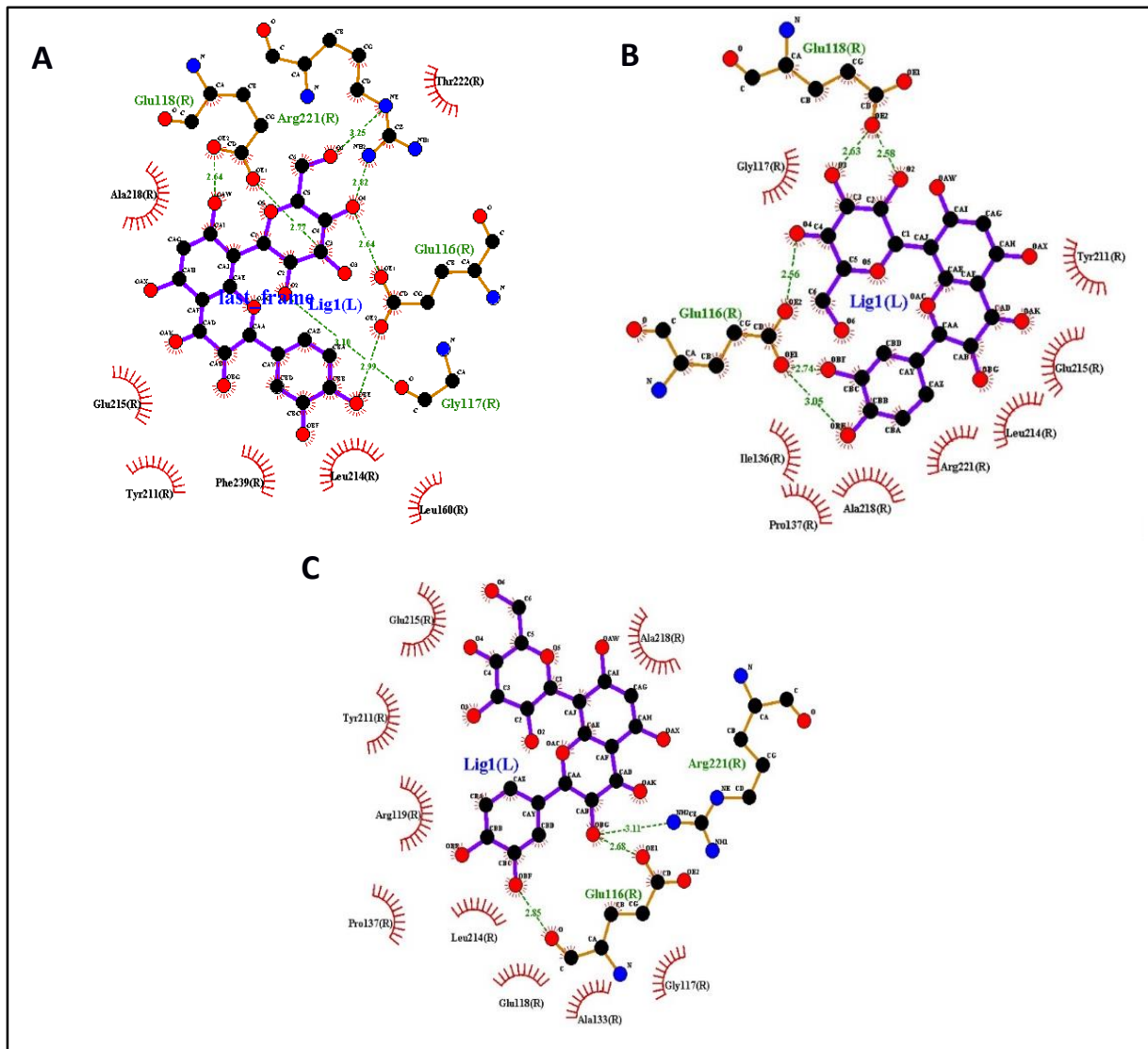


Figura 9. Principales interacciones de los complejos fidelósido-Eg5 obtenidos de las DM al vacío y analizadas mediante el programa *LigPlot+* v2.11 (Laskowski & Swindells, 2011) en la forma cerrada de Eg5. Se muestra la representación 2D de los ligandos y los residuos aminoacídicos del bolsillo de inhibición involucrados la interacción. Interacciones hidrofóbicas en abanicos rojos y enlaces de hidrógeno representados en verde. A) Interacciones en el modelo 1. B) Modelo 2. C) Modelo 3.

Conclusiones

En este trabajo, las herramientas bioinformáticas fueron empleadas con el objetivo de conocer la forma de interacción entre el compuesto fidelósido y la quinesina Eg5, una proteína que participa en el ciclo celular y que es considerada un blanco quimioterapéutico. A partir de la obtención de diferentes modelos representativos del complejo fidelósido-Eg5 mediante anclaje molecular, y la optimización energética de los mismos mediante simulaciones de DM al vacío, fue posible proponer el patrón de inserción del inhibidor en el sitio de inhibición alostérico de la proteína, las principales interacciones que estabilizan la unión del complejo, así como evaluar la similitud de interacción con otros inhibidores de la quinesina reportados en la literatura.

Las simulaciones de DM fueron empleadas con el objetivo de optimizar los efectos estéricos locales entre la proteína y el ligando, corregir y optimizar el modo inicial de unión del ligando, así como estimar la contribución de energía libre de cada residuo en el sitio de unión. Sin embargo, estas fueron realizadas al vacío y no muestran la interacción con un medio externo, así como la influencia de este medio en la estabilidad del sistema. Por ello, se debe considerar en investigaciones futuras, llevar a cabo las DM solvatadas de tales complejos.

A pesar de las disímiles ventajas que ofrecen las herramientas bioinformáticas, es necesario validar experimentalmente en perspectivas futuras, la capacidad real de inhibición de fidelósido sobre la actividad de la quinesina Eg5 y, por consiguiente, en la formación de un huso mitótico bipolar.

Referencias

- Alrazi, I. M. D., Ogunwa, T. H., Kolawole, A. O., Elekofehinti, O. O., Omotuyi, O. I., Miyanishi, T., & Maruta, S. (2021). Kolaflavanone, a biflavonoid derived from medicinal plant *Garcinia*, is an inhibitor of mitotic kinesin Eg5. *The Journal of Biochemistry*, 170(5), 611–622. <https://doi.org/10.1093/jb/mvab083>.
- Bertoli, C. & de Bruin, R. A. M. (2021, 10 septiembre). Cell cycle control in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(1), 74-88. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00404-3>.
- Bueren-Calabuig, Juan A. (2014). 17 - Dinámica molecular. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1066360>.

- Cancio, G., Caridad, M., R Pérez, R., de la Caridad, & T. (2019). Diagnóstico y el tratamiento del cáncer en Cuba. *Nucleus*, 66, 27-31. <http://scielo.sld.cu/pdf/nuc/n66/2075-5635-nuc-66-27>.
- di Muzio, E., Toti, D., & Polticelli, F. (2017). DockingApp: a user friendly interface for facilitated docking simulations with AutoDock Vina. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 31(2), 213–218. <https://doi.org/10.1007/s10822-016-0006-1>.
- Francioso, A., Franke, K., Villani, C., Mosca, L., D’Erme, M., Frischbutter, S., Brandt, W. N., Sánchez-Lamar, A., & Wessjohann, L. A. (2019). Insights into the Phytochemistry of the Cuban Endemic Medicinal Plant *Phyllanthus orbicularis*: Fideloside, a Novel Bioactive 8-C-glycosyl 2,3-Dihydroflavonol. *Molecules*, 24(15), 2855. <https://doi.org/10.3390/molecules24152855>.
- Henriques, J. A. P. & Bonatto, D. (2017). Anti-mitotic agents: Are they emerging molecules for cancer treatment? *Pharmacology & Therapeutics*, 173, 67-82. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.007>.
- Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K. VMD: Visual molecular dynamics. (1996) *J Mol Graph*, 14(1), 33-38.
- Laskowski, R.A., Swindells, M.B. (2011). LigPlot+: Multiple Ligand–Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. *J Chem Inf Model*, 51(10), 2778-2786.
- Lindert, S. (2016). Computational methods in drug discovery. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 12, 2694-2718. <https://doi.org/10.3762/bjoc>.
- Morris, G.M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*, 30(16), 2785-2791.
- Ogunwa, T. H. (2019). *Studies on Novel Inhibitor of Mitotic Kinesin Eg5: A validated Chemotherapeutic Target* [Disertación de doctorado]. Fisheries and Environmental Sciences Nagasaki University.
- Ogunwa, T. H., Laudadio, E., Galeazzi, R., & Miyanishi, T. (2019). Insights into the Molecular Mechanisms of Eg5 Inhibition by (+)-Morelloflavone. *Pharmaceuticals*, 12(2), 58. <https://doi.org/10.3390/ph12020058>.

- Ogunwa, T. H., Taii, K., Sadakane, K., Kawata, Y., Maruta, S., & Miyanishi, T. (2019). Morelloflavone as a novel inhibitor of mitotic kinesin Eg5. *The Journal of Biochemistry*, 166(2), 129–137. <https://doi.org/10.1093/jb/mvz015>.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera: A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.
- Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., & Villa, E. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem*, 26(16), 1781-1802.
- Piloto, J. & Sanchez-Lamar, A. (2015, mayo). Blancos mitóticos de drogas naturales y nuevas estrategias para la terapia anti-cáncer. *REVISTA CUBANA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS*, 4(2), 3-15. <http://www.rccb.uh.cu>.
- Sánchez-Lamar, A., Fiore, M. F., Cundari, E. C., Ricordy, R. R., Cozzi, R. C., & de Salvia, R. D. S. (1999). Phyllanthus orbicularis Aqueous Extract: Cytotoxic, Genotoxic, and Antimutagenic Effects in the CHO Cell Line. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 161, 231–239. <http://www.idealibrary.com>.
- Shi, D., Zhou, S., Liu, H., Liu, H. & Yao, X. (2017, 15 noviembre). Molecular dynamics simulations and novel drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 13(1), 23-37. <https://doi.org/10.1080/17460441.2018.1403419>.
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, NA. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
- Vanommeslaeghe, K., Hatcher, E., Acharya, C., Kundu, S., Zhong, S., Shim, J. (2010). CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *J Comput Chem.*, 31(4), 671-690.
- Verma, K., Kannan, K. (2017). Exploring β -Tubulin Inhibitors from Plant Origin using Computational Approach. *Phytochem Anal*, 28(3), 230-41.