

**COMPARACIÓN DE MODELOS DE PREDICCIÓN UTILIZANDO
HERRAMIENTAS DE QUÍMICA COMPUTACIONAL EN EL ESTUDIO DE
LAS INTERACCIONES DE POSIBLES INHIBIDORES DEL QUÓRUM
SENSING EN EL RECEPTOR LASR.**

JAVIER ERNESTO VERGARA LORDUY



**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
MAESTRÍA EN QUÍMICA
CARTAGENA DE INDIAS D.T. Y C.**

2018

**COMPARACIÓN DE MODELOS DE PREDICCIÓN UTILIZANDO
HERRAMIENTAS DE QUÍMICA COMPUTACIONAL EN EL ESTUDIO DE
LAS INTERACCIONES DE POSIBLES INHIBIDORES DEL QUÓRUM
SENSING EN EL RECEPTOR LASR.**

JAVIER ERNESTO VERGARA LORDUY

**RICARDO VIVAS REYES
TUTOR**

**TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO
PARA OPTAR AL TITULO DE MAGISTER EN QUÍMICA**

**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES.
MAESTRÍA EN QUÍMICA
CARTAGENA DE INDIAS D.T. Y C.**

2018

TABLA DE CONTENIDO

INDICE DE TABLAS.....	5
INDICE DE FIGURAS.....	6
RESUMEN.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
2. GENERALIDADES.....	11
2.1 Quórum Sensing.....	11
2.2 Autoinductores.....	13
2.3 Sistemas de Quórum Sensing en bacterias Gram Negativas.....	14
2.4 Función de las proteínas tipo <i>LuxR</i>	15
2.5 Métodos Computacionales.....	16
2.5.1 Mecánica Molecular.....	17
2.5.2 Teoría del Funcional de la Densidad.....	18
2.5.3 Acoplamiento o <i>Docking</i> Molecular.....	19
2.5.4 QSAR Y 3D-QSAR.....	20
2.5.5 Mínimos Cuadrados Parciales (PLS).....	21
3. OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo general.....	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
4. METODOLOGÍA.....	24
4.1 Acoplamiento Molecular y Optimización de ligandos.....	24
4.2 Análisis QSAR CoMFA basado en el ligando y en el Acoplamiento Molecular.....	27

4.3 Análisis estadístico de modelos y desarrollo de Mínimos Cuadrados Parciales	28
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
6. CONCLUSIONES.....	44
7. BIBLIOGRAFÍA.....	45
8. ANEXOS.....	51

INDICE DE TABLAS

DESCRIPCIÓN	PÁGINAS
Tabla 1. Estructuras de acil homoserina lactonas producidas por diferentes especies de bacterias.	14
Tabla 2. Clasificación de los ligandos AHLs con actividad anti- <i>quórum sensing</i> .	26
Tabla 3. Poses más estables (menor energía de unión) de los ligandos AHLs dentro del sitio activo de LasR.	29
Tabla 4. Resultados de PLS CoMFA para el modelo basado en el ligando.	37
Tabla 5. Resultados de PLS CoMFA para el modelo basado en el <i>docking</i> molecular.	37
Tabla 6. Actividades predichas vs experimentales para ambos modelos CoMFA.	38
Tabla 7. Actividades biológicas predichas vs experimentales de las moléculas del conjunto de prueba.	41

INDICE DE FIGURAS

DESCRIPCIÓN	PÁGINAS
Figura 1. Esquema del quórum sensing en bacterias gram negativas.	12
Figura 2. Algunos fenotipos regulados por el quórum sensing en bacterias Gram negativas.	12
Figura 3. Representación de autoinductores en bacterias Gram negativas y Gram positivas.	13
Figura 4. Regulación de la expresión de los genes por autoinductores.	15
Figura 5. Izquierda: Modelo CoMFA donde se indican las interacciones estéricas favorables en verde y desfavorables en amarillo. Derecha: Modelo CoMSIA donde se indican las interacciones hidrofóbicas favorables en azul y desfavorables en verde.	21
Figura 6. Alineamiento de las mejores poses de todos los 28 compuestos acoplados dentro del sitio de unión de LasR.	31
Figura 7. Interacciones existentes entre la región R de los ligandos PHLs y los residuos, Tyr-47, Trp-60 y Arg-61.	32
Figura 8. Puentes de halógenos presentes en los ligandos E20, E21 y E22.	33
Figura 9. Las distancias existentes entre el átomo de bromo y el átomo de oxígeno del residuo Tyr-47 es mayor cuando el sustituyente se encuentra en la posición 3 del anillo.	34
Figura 10. Alineamiento estructural de los compuestos basado en el ligando de mayor actividad biológica inhibitoria.	35
Figura 11. Alineamiento estructural de los compuestos basado en las conformaciones espaciales energéticamente más estables dentro del complejo ligando-LasR (Docking).	36
Figura 12. Actividad calculada vs experimental para el modelo 1 obtenida por análisis PLS usando CoMFA.	39
Figura 13. Actividad calculada vs experimental para el modelo 2 obtenida por análisis PLS usando CoMFA.	40
Figura 14. Conjunto de ligandos utilizados para la validación externa.	41
Figura 15. Mapas de contorno CoMFA para los modelos 1 y 2.	42

RESUMEN

Quórum Sensing es la regulación de la expresión génica en respuesta a las fluctuaciones en la densidad de población celular. Las bacterias que detectan el quórum producen y liberan moléculas con señales químicas llamadas autoinductores. Teniendo en cuenta que muchas bacterias gram negativas usan Acil homoserina lactonas como autoinductores y poseen proteínas de las familias LuxI-LuxR, los estudios computacionales son un enfoque alternativo para abarcar una amplia variedad de bacterias perjudiciales para el hombre, como la *Pseudomonas aeruginosa*.

Por lo tanto, en este estudio se combinaron herramientas de la química computacional tales como acoplamiento molecular y Relación Cuantitativa Estructura-Actividad tridimensional (3D-QSAR) para realizar un modelo que permitiera predecir con menor error y mayor precisión las actividades biológicas de posibles candidatos que inhiban los circuitos del Quórum Sensing frente a los modelos de predicción convencionales, esto fue corroborado mediante el coeficiente de correlación de predicción del modelo no convencional ($R^2=0.967$); se logró reducir la dispersión residual de los datos frente al modelo convencional y debido a esto se obtuvieron actividades biológicas predichas bastante cercanas a las reportadas experimentalmente.

Palabras claves: Quórum Sensing, Acoplamiento Molecular, 3D-QSAR, Alineamiento Molecular, Mínimos Cuadrados Parciales.

1. INTRODUCCIÓN

Quorum Sensing (QS) es un mecanismo de comunicación celular utilizado por bacterias para coordinar comportamientos grupales de un modo dependiente de la densidad celular (Liu, Gao, Huang, & Shao, 2012), de tal forma que permite a las bacterias actuar como un grupo multicelular en lugar de células individuales aisladas (S. T. Rutherford & Bassler, 2012). Este sistema de comunicación implica la producción de señales químicas llamadas autoinductores (AI), que aumentan su concentración proporcionalmente a la expansión de la población, cuando se alcanza una concentración suficiente de éste y por lo tanto un "quórum" de células presentes en un entorno determinado, las señales químicas son capaces de unirse y activar una proteína receptora afín y luego iniciar cambios en la expresión génica (Hense & Schuster, 2015); permitiendo a una población de bacterias regular la expresión de fenotipos y por lo tanto controlar el comportamiento en una comunidad a gran escala (Zhonghua, Yaohong, Juan, & Jigeng, 2009), incluida la producción de factores de virulencia, formación de biofilm, bioluminiscencia, esporulación y conjugación entre otros comportamientos (Palmer, Streng, & Blackwell, 2011; Rutherford & Bassler, 2012).

En las bacterias Gram negativas, el QS implica la producción de una molécula señal pequeña difusible al medio, a menudo la N-acil L-homoserina lactona (AHL) (Fuqua & Greenberg, 2002), la enzima LuxI produce la molécula de AHL requerida, que se difunde en el medio extracelular y al alcanzar la concentración requerida el autoinductor se une y activa el receptor LuxR, que a su vez activa la transcripción génica (Galloway, Hodgkinson, Bowden, Welch, & Spring, 2011).

Varias especies de bacterias patógenas usan el circuito de QS para regular el tiempo y el grado de producción de factores de virulencia, incluidos importantes patógenos humanos como *Staphylococcus aureus* (SA), *Acinetobacter baumannii* (AB) y *Pseudomonas aeruginosa* (PA) (Rutherford & Bassler, 2012). PA es una bacteria Gram-negativa ubicua que es responsable de muchas infecciones nosocomiales (Obritsch, Fish, MacLaren, & Jung, 2005) e infección crónica. La PA es la causa principal de muerte en pacientes con fibrosis quística (Finnan, Morrissey, Gara, & Boyd, 2004). En estudios realizados por Venturi & Fuqua, 2013; Welsh & Blackwell, 2016, se ha demostrado que PA posee una red compleja de tres circuitos de QS distintos: Las, Rhl y Pq cuyos receptores de tipo LuxR asociados (LasR y RhLR) y receptor de tipo LysR (PqsR, también conocido como MvfR) regulan subconjuntos distintos de genes asociados a la virulencia tras la activación que ocurre por medio de moléculas señalizadoras (Maddocks & Oyston, 2008). Recientemente, un estudio reveló que los antagonistas múltiples funcionan al unirse y estabilizar la enzima LasR en una conformación que lo inhabilita a unirse al ADN (Suneby, Herndon, & Schneider, 2017).

Dado que el QS está relacionado con la virulencia en bacterias patógenas, existe interés en estudiar y desarrollar inhibidores de QS como una posible terapia antimicrobiana debido a que el mecanismo de virulencia no interfiere en el crecimiento de los microorganismos (Hentzer & Givskov, 2003). Para ayudar a la comprensión de la interacción molecular entre análogos y reguladores de QS es necesario realizar estudios con nuevos enfoques.

En el presente estudio se combinaron dos estrategias computacionales del modelado molecular: acoplamiento molecular y 3D-QSAR (relación cuantitativa de estructura actividad tridimensional). El acoplamiento molecular se realizó para proporcionar una mayor comprensión de los probables modelos de unión entre una serie de 28 ligandos que interactúan en el sitio

activo del receptor LasR en PA y también para encontrar las características estructurales más importantes que afectan las actividades inhibitorias. Se aplicaron dos metodologías de 3D-QSAR para obtener una correlación entre la actividad biológica de un conjunto de moléculas y su estructura tridimensional con el fin de derivar los requisitos estructurales esenciales para la actividad inhibitoria del QS mediante el uso del análisis comparativo de campo molecular (CoMFA).

2. GENERALIDADES

2.1 Quórum Sensing

Quórum Sensing (QS) es el mecanismo mediante el cual unas moléculas con función señalizadora le permiten a una bacteria conocer el número determinado de especies que se encuentran en el medio y éste dicta cuando la densidad poblacional alcanza un valor crítico para que respondan de una manera fijada genéticamente. La respuesta puede ser la emisión de luminiscencia, formación de biopelículas, el inicio de la formación de nódulos radicales, entre otros comportamientos. Este mecanismo está basado en la formación de pequeñas moléculas señalizadoras llamadas autoinductores (AIs), las cuales son liberadas en el medio extracelular y detectadas por otras bacterias a través de receptores específicos. Existen diferentes formas de comunicarse con las demás bacterias, básicamente estas se agrupan en dos: una es la comunicación vía péptidos y la otra es la comunicación a través de moléculas llamadas acil homoserina lactonas (AHL); lenguajes usados por bacterias Gram positivas y Gram negativas respectivamente.

En bacterias Gram negativas el modelo actual para el QS en su mayor parte mantiene que la asociación de AHLs específica con su receptor LuxR es un paso clave para la activación del sistema del QS. Así, una forma viable de controlar la virulencia puede ser interferir con las señales del QS utilizando moduladores de los reguladores transcripcionales tipo LuxR. A baja densidad bacteriana pequeñas cantidades del autoinductor son producidas por una enzima del tipo LuxL; el autoinductor difunde pasivamente al medio extracelular a favor de un gradiente y son inmediatamente diluidos en los alrededores del medio. Un incremento en la densidad de población bacteriana resulta en una acumulación gradual de autoinductores dentro y alrededor de las células (Figura 1).

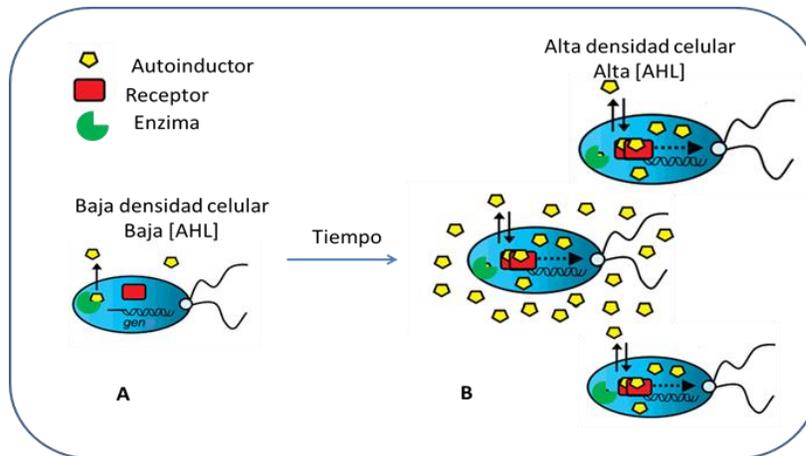


Figura 1. Esquema del *quórum sensing* en bacterias gram negativas. A) Baja densidad celular. B) Alta densidad celular. (Adaptado de (Geske, O'Neill, Miller, Mattmann, & Blackwell, 2007))

El autoinductor activa específicamente un receptor transcripcional por unión a este (González & Marketon, 2003). Los receptores activados luego interactúan con secuencias del ADN objetivo y mejoran o bloquean la transcripción de los genes regulados por el quórum sensing, resultando en la activación sincronizada de ciertos fenotipos en una población bacteriana (Figura 2) (Henke & Bassler, 2004).

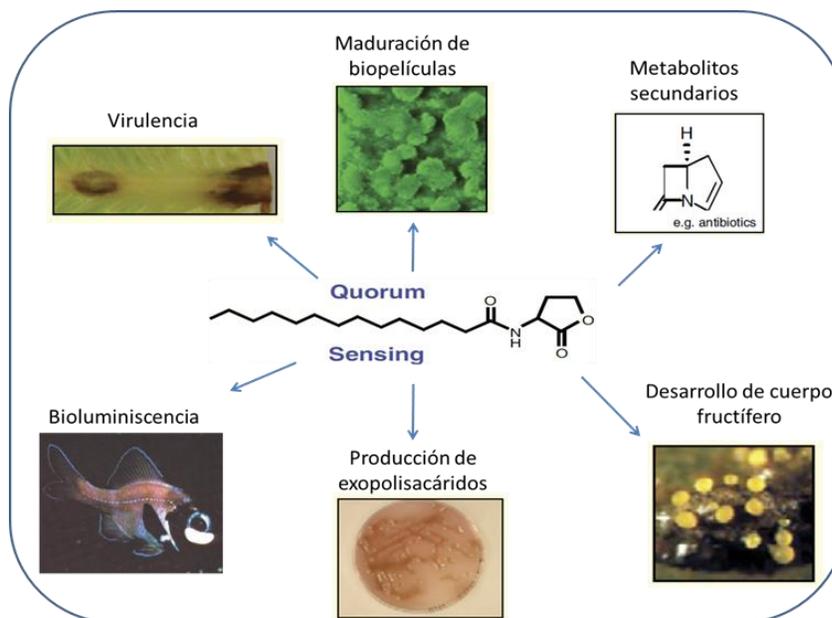
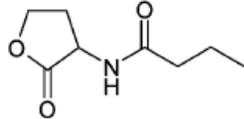
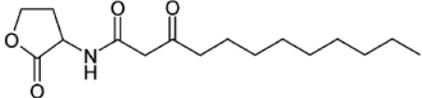
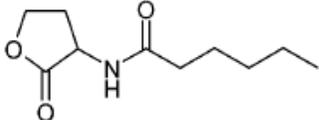
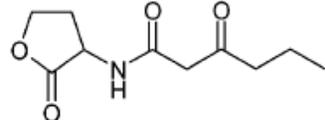
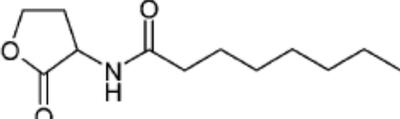
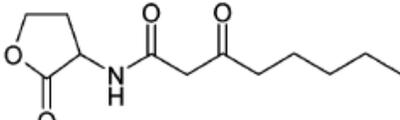


Figura 2. Algunos fenotipos regulados por el *quórum sensing* en bacterias Gram negativas

diferente (Williams, Winzer, Chan, & Cámara, 2007). En este sentido la molécula señal se pueden comparar como palabras dentro de una lengua, cada una tiene un significado diferente.

Tabla 1. Estructuras de acil homoserina lactonas producidas por diferentes especies de bacterias

Nombre	Estructura	Microorganismo
N-butiril-homoserina lactona (C4-HSL)		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
N-3-oxo-dodecanoil-homoserina lactona (3-oxo-C12-HSL)		
N-hexanoil-homoserina lactona (C6-HSL)		<i>Chromobacterium Violaceum</i>
N-3-oxo-hexanoil-homoserina lactona(3-oxo-C6-HSL)		<i>Vibrio fischeri</i>
N-octanoil-homoserina lactona(C8-HSL)		<i>Burkholderia cepacia</i>
N-3-oxo-octanoil-homoserina lactona (3-oxo-C8-HSL)		<i>Agrobacterium tumefaciens</i>

2.3 Sistemas de Quórum Sensing en bacterias Gram Negativas

Las acil homoserina lactonas (AHLs) son el mayor grupo de autoinductores presentes en las bacterias Gram negativas, estas moléculas han conservado el anillo homoserina lactona con una cadena lateral acil variable. Basados en la longitud de los grupos acil, las AHLs pueden en general ser clasificadas como moléculas de cadena corta o cadena larga. Las AHLs de cadena corta tienen entre 4 a 8 átomos de carbono en la cadena acil, mientras las AHLs

de cadena larga tienen de 10 a 18 carbonos. El nivel de saturación de la cadena acil acoplada y la presencia o ausencia de sustituciones hidroxilo u oxo en la posición C-3 de la cadena acil proporcionan diversificación y especificidad para el circuito del quórum sensing presente en una población bacteriana mixta (Laue, y otros, 2000). Una variedad de cepas de bacterias diferentes pueden tener el mismo autoinductor, pero este puede estar involucrado en la regulación de diferentes fenotipos en cada cepa. Por ejemplo, 3-oxo-C6-HSL regula el fenómeno de bioluminiscencia en *Vibrio fischeri*, pero activa la producción de exopolisacáridos en *Erwinia stewartii* (Watson, Minogue, Val, von Bodman, & Churchill, 2002). (Figura 4)

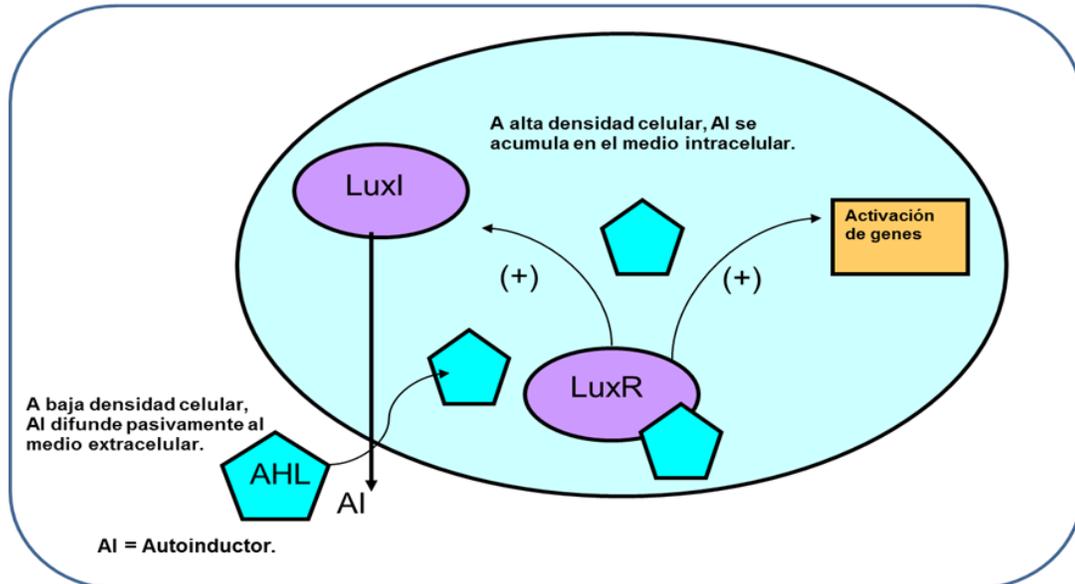


Figura 4. Regulación de la expresión de los genes por autoinductores. **AI** = autoinductor. (Adaptado de (Bassler, Schauder, Shokat, & Surette, 2001))

2.4 Función de las proteínas tipo *LuxR*

Las proteínas tipo *LuxR* (receptores transcripcionales) son responsables por la unión a su autoinductor *AHL* y se dimeriza para posteriormente unirse específicamente a los promotores de los genes y activar la transcripción. Los trabajos realizados con las proteínas *LuxR* de *V. fischeri*, *LasR* de *P.*

aeruginosa, *TraR* de *A. tumefaciens*, muestran que estas presentan dos dominios (Bottomley, Muraglia, Bazzo, & Carfi, 2007) (Vannini, y otros, 2002). El dominio amino terminal involucrado en la unión de los autoinductores *AHL* y el dominio carboxi terminal requerido para la unión y activación transcripcional (Choi & Greenberg, The C-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein contains an inducer-independent lux gene activating domain, 1991) (Choi & Greenberg, 1992). Los residuos en el dominio carboxi terminal son también requeridos para la multimerización de la proteína *LuxR* y los multímeros son la especie que se une a las secuencias promotoras de ADN (Stevens, Dolan, & Greenberg, 1994). Estudios realizados por el grupo de investigación de Química Cuántica y Teórica muestran que este tipo de proteínas presenta una alta homología en la región de unión de la homoserina lactona, lo anterior puede ser utilizado en el futuro como alternativas de control bacteriano masivo (Ahumado, Diaz, & Vivas, 2010).

2.5 Métodos Computacionales

El modelado molecular también llamado química computacional está compuesto de dos grandes ramas. Los métodos de mecánica molecular basados en la mecánica clásica; aquí se consideran los átomos como partículas puntuales (dotadas de masa y carga) que interaccionan unos con otros mediante enlaces. Los métodos de estructura electrónica que se basan en la aplicación de la mecánica cuántica a los sistemas atómicos y moleculares (Gutiérrez, 2004).

Todos los métodos independientemente de su fundamento teórico pretenden abordar un conjunto básico de propiedades cuyos exponentes más destacados son la energía de una determinada disposición espacial de núcleos, la geometría óptima de un sistema molecular (disposición geométrica de los núcleos considerados que brinde la energía más baja con el método de cálculo empleado) y otras propiedades moleculares como las

frecuencias vibracionales, el momento dipolar, polarizabilidad, hiperpolarizabilidad, etc.

2.5.1 Mecánica Molecular

La mecánica molecular (MM) considera los átomos como esferas unidas por resortes (representando los enlaces entre átomos) según los criterios de la física clásica. Por lo tanto en dicha simplificación se consideran solo los núcleos de los átomos sin tener en cuenta explícitamente los electrones.

Los distintos métodos dentro de la MM comparten el hecho general que se basan en las mismas leyes de la física clásica. Se diferencian en el tipo de ecuaciones que definen cómo varía la energía potencial de una molécula con la geometría de sus átomos componentes; además se diferencian por el tipo de átomos entendiéndose por ello las características que definen su número atómico dado en el entorno molecular en que se encuentre y/o finalmente en el conjunto de parámetros que ajustan las ecuaciones aplicadas a los átomos definidos por su tipo y los valores experimentales o calculados por otros métodos que se emplean para la parametrización. Estos tres componentes definen lo que se conoce con el nombre de campo de fuerza y definen completamente un método de MM.

Existe una gran variedad de campos de fuerza desarrollados en función de los grupos de moléculas empleados como referencia en la parametrización. Desde los aplicados a moléculas orgánicas pequeñas y medianas, por ejemplo TRIPOS (Clark, Cramer, & Van Opdenbosch, 1989), MMFF94 (Halgren, 1996), a los dirigidos a macromoléculas (AMBER (Cornell, y otros, 1995), CHARMM (Brooks, y otros, 1983).

2.5.2 Teoría del Funcional de la Densidad

Un procedimiento alternativo y conceptualmente distinto para obtener información acerca de un sistema y que permite calcular su energía incluyendo la correlación electrónica aparece con la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) (Koch & Holthausen, A Chemist's Guide to Density Functional Theory, 2001), desarrollada por Hohenberg y Kohn en 1964 (Hohenberg & Kohn, 1964). Estos autores demostraron que la energía del estado fundamental de un sistema electrónico está únicamente definida por su densidad electrónica $\rho_0(x,y,z)$. El método del funcional de la densidad no intenta calcular la función de onda molecular, sino que consiste en expresar la energía electrónica del estado fundamental como un funcional de la densidad electrónica $E_0 = E_0[\rho_0]$, donde ρ_0 es una función de solamente tres variables. Así, la energía se expresa como una suma de funcionales dependientes de la densidad electrónica. Algunos de estos sumandos tienen en cuenta el efecto del intercambio electrónico y de la correlación electrónica. En definitiva, la teoría del funcional de la densidad intenta calcular E_0 y otras propiedades moleculares del estado fundamental a partir de la densidad electrónica de dicho estado (Parr & Yang, 1989).

Realmente por esta aproximación es posible determinar propiedades termodinámicas, cinéticas y estructurales con una precisión comparable a la correlacionada con los métodos *ab initio*, pero con mucho menos esfuerzo computacional. El conocimiento de la reactividad de una molécula es un concepto esencial, es de crucial interés por que permite entender las interacciones que suceden durante un mecanismo de reacción. En adición, DFT ha proporcionado un marco muy sólido para el estudio de la reactividad química (Parr & Yang, 1989). A través de esta aproximación ha sido posible identificar con variables fundamentales del DFT conceptos químicamente significativos los cuales han sido establecidos intuitivamente, como lo son la

electronegatividad y la dureza química. Esta identificación ha sido muy importante para determinar su valor absoluto y para entender los principios asociados con ellos. Adicionalmente, ha sido posible derivar nuevos conceptos, de tipo local y global que contienen información acerca de la respuesta de una especie química cuando interactúa con diferentes tipos de reactivos.

2.5.3 Acoplamiento o *Docking* Molecular

Los programas de simulación del reconocimiento molecular entre macromoléculas y ligandos de bajo peso molecular o *docking* (anglicismo que suele traducirse por acoplamiento) realizan una exploración de las posiciones relativas entre la enzima y el ligando (poses), evaluando las interacciones intermoleculares presentes en cada pose explorada (Kapetanovic, 2008). Como resultado de esta exploración se obtiene una colección de las posibles poses que el programa ordena según el valor que su función de evaluación le otorga a cada solución, la cual se conoce como *scoring* o puntaje. Sin embargo para un estudio de acoplamiento se requieren dos componentes esenciales: el algoritmo de búsqueda y la función de evaluación.

Después de realizar y analizar los resultados del *docking* aquellos ligandos con los mejores puntajes de evaluación son candidatos a síntesis. Este tipo de aproximación es bastante frecuente cuando se dispone de la estructura de la proteína o bien de un modelo confiable del receptor resuelto por homología. Así, se han identificado ligandos para más de 50 receptores tanto de estructura conocida (Brenk, y otros, 2002) (Grüneberg, Stubbs, & Klebe, 2002) como a partir de modelos teóricos (Vangrevelinghe, y otros, 2003) (Shoichet, 2004). Otra ventaja que ofrece el uso de los protocolos del *docking* es la identificación del modo de unión, es decir la orientación y conformación que el ligando adopta en la cavidad de la proteína y con menor

frecuencia se utiliza para identificar el sitio activo (Hetényi & van der Spoel, 2002). En la actualidad existen muchos programas de *docking* disponibles y entre los más utilizados se encuentran DOCK (Kuntz, Blaney, Oatley, Langridge, & Ferrin, 1982), SYBYL (Tripos International, 1997), FLEXX (Rarey, Kramer, Lengauer, & Klebe, 1996), GOLD (Jones, Willett, Glen, Leach, & Taylor, 1997), AUTODOCK2.4 (Gehlhaar, y otros, 1995), GLIDE (Goodsell & Olson, 1990), ICM-DOCK (McMartin & Bohacek, 1997).

2.5.4 QSAR Y 3D-QSAR

Las relaciones cuantitativas de estructura-actividad permiten relacionar los cambios estructurales de una serie de compuestos con los cambios presentes en la actividad. En la actualidad existen diferentes aproximaciones por las que se puede desarrollar un estudio QSAR.

En los métodos 3D-QSAR se relaciona la forma con propiedades de las moléculas con características moleculares específicas y la orientación espacial que toman dichas moléculas. Entre ellos resalta el análisis CoMFA (*comparative molecular field analysis*) introducido por Cramer en 1988 (Cramer, Patterson, & Bunce, 1988), donde se calculan las energías de interacción estérica (Van der Waals) y electrostática (Coulomb) entre cada molécula y un átomo o grupo de prueba adecuados situados en puntos regularmente espaciados de una malla tridimensional que rodea a todos los compuestos alineados proporcionando toda la información necesaria para comprender las actividades biológicas. El análisis CoMSIA (*comparative molecular similarity indices analysis*), desarrollado por Klebe, (Klebe, Abraham, & Mietzner, 1994) es análogo al anterior pero considera cinco campos moleculares: estérico, electrostático, dador y aceptor de hidrógeno, e hidrofóbico (Figura 5).

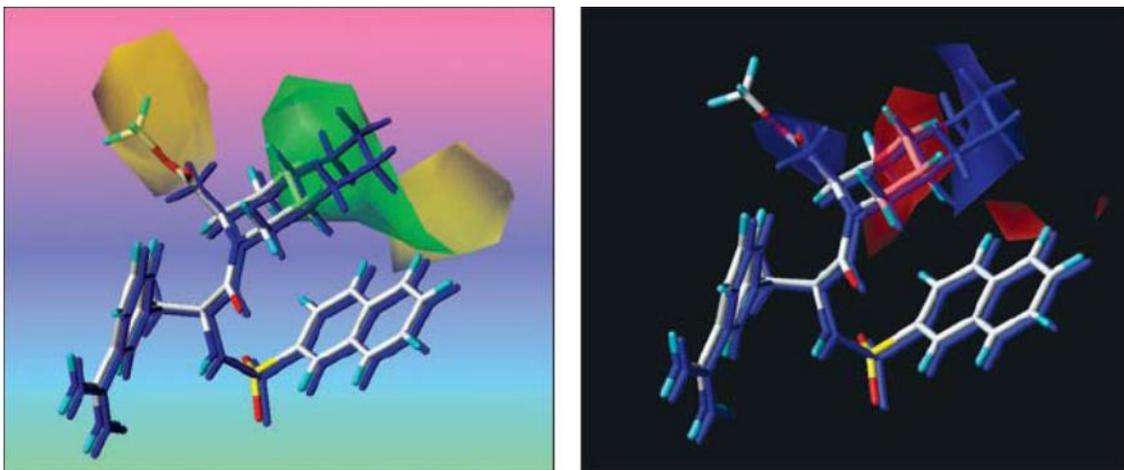


Figura 5. Izquierda: Modelo CoMFA donde se indican las interacciones estéricas favorables en verde y desfavorables en amarillo. Derecha: Modelo CoMSIA donde se indican las interacciones hidrofóbicas favorables en azul y desfavorables en verde (figura de www.optive.com/data/SYBYL).

2.5.5 Mínimos Cuadrados Parciales (PLS)

En una regresión de PLS se combinan los rasgos de la regresión de cuadrados múltiples o mínimos cuadrados *Ordinarios* (OLS) con el de los componentes principales. En esencia, los PLS calculan las cargas de las propiedades moleculares sobre los componentes denominados *variables latentes* para explicar una propiedad dependiente tal como la actividad biológica, en lugar de buscar maximizar la varianza explicada en las propiedades físicas como en el Análisis de Componentes Principales (PCA). Cada variable latente sucesiva es ortogonal a todas las variables latentes previas. En otro contraste con el PCA, cada variable latente sucesiva de los PLS aporta una explicación adicional de la varianza en la propiedad dependiente, lo que resulta en un incremento en el R^2 de ajuste. El significado estadístico del R^2 para un ajuste PLS se evalúa utilizando el número de variables latentes incluidas como los p grados de libertad atendiendo los cuadrados de las medias (MS) según la ecuación:

$$F_{p, n-p-1} = \frac{MS_{regr}}{MS_{error}} \quad (1)$$

Donde los cuadrados de las medias de regresión y error se dan, respectivamente como sigue:

$$MS_{regr} = \frac{\sum(\hat{Y} - \bar{Y})^2}{p} \quad (2)$$

y

$$MS_{error} = \frac{\sum(Y - \hat{Y})^2}{n-p-1} = s^2 \quad (3)$$

Si bien el significado de cada variable latente sucesiva podría ser evaluado con pruebas F parciales, el número de variables latentes a incluir es escogido a partir de los resultados de la validación cruzada. En la validación cruzada se desarrollan múltiples modelos para los cuales una o más moléculas son omitidas, luego cada modelo es utilizado para predecir la actividad biológica de las moléculas excluidas. La predictividad global del modelo se expresa entonces en términos de σ^2 , el cual es formalmente equivalente a R^2 excepto que los valores predichos, más que valores de ajuste son los que se emplean en la ecuación:

$$R^2 = \frac{SS_{regr}}{SS_{media}} = \frac{SS_{media} - SS_{error}}{SS_{media}} \quad (4)$$

Donde las sumas de los cuadrados (SS) vienen dadas por:

$$SS_{media} = SS_{regr} + SS_{error} = \sum(\hat{Y} - \bar{Y})^2 + \sum(Y - \hat{Y})^2 = \sum(\bar{Y} - Y)^2 \quad (5)$$

(Y doble barra es la media global; Y es la media de un grupo individual)

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Comparar modelos de predicción mediante la actividad biológica inhibitoria de posibles antagonistas del quórum sensing en la enzima LasR mediante herramientas de química computacional.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar las características estructurales y químicas responsables de la actividad antagonista de los ligandos frente al receptor LasR utilizando acoplamiento molecular.
- Analizar cualitativa y cuantitativamente las interacciones no covalentes existentes en los complejos ligando-LasR.
- Analizar los parámetros estadísticos con el fin de medir la predicción de actividades biológicas de cada modelo obtenido.

4. METODOLOGÍA

4.1 Acoplamiento Molecular y Optimización de ligandos

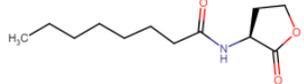
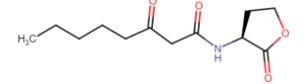
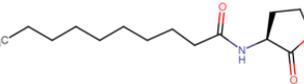
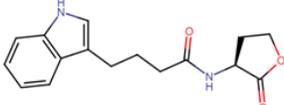
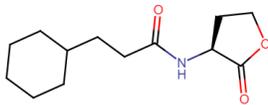
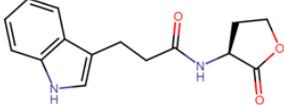
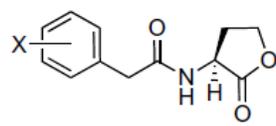
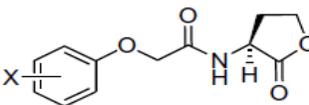
Los datos de actividad biológica de los 28 ligandos *in vitro* (Tabla 2), reportada como la mitad de la concentración inhibitoria máxima (IC₅₀) para la inhibición de la enzima LasR (enzima objetivo) fueron tomados de la publicación de Blackwell y colaboradores (Blackwell, Grant, & Mattmann, 2008). El Laboratorio Blackwell ha sido estudiado y seguido desde 2005 por el grupo de Química Cuántica y Teórica debido a que los compuestos sintetizados por dicho grupo son algunos de los inhibidores de biofilm más potentes conocidos y proporcionan una nueva vía para el control de infecciones. Con el fin de que la diferencia entre los valores de la actividad biológica no fuera demasiado amplia, los valores de IC₅₀ se convirtieron en los correspondientes valores de pIC₅₀ utilizando la fórmula:

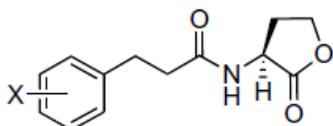
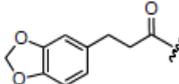
$$pIC_{50} = -\log IC_{50} \quad (6)$$

Al disponer de la estructura bidimensional de los ligandos, se inició la construcción tridimensional de dichas moléculas por medio del Gausview 5.0.8 a partir de la estructura del ligando nativo co-cristalizado (N-3-oxo-dodecanoil-homoserina lactona). Se optimizaron las geometrías moleculares de las estructuras obtenidas mediante la teoría funcional de la densidad (DFT) usando el funcional X3LYP junto con la base de cálculo 6-311G haciendo uso del paquete computacional Gaussian09 (Frisch, y otros, 2004). Para el estudio de las interacciones de unión ligando-receptor se descargó la estructura proteica LasR (código PDB 3IX3) de *Pseudomonas aeruginosa* (Nair & Zou, 2009) del Protein Data Bank. Las características estructurales de los ligandos responsables de la actividad antagonista, tales como el impedimento estérico y potencial electrostático se cuantificaron y analizaron

mediante la suite SYBYL-X (Tripos International, 1997) utilizando el descriptor CoMFA generado por la herramienta QSAR tools. Los cálculos de acoplamiento se realizaron con el complemento Surflex Doc basándose en Algoritmos Genéticos en el espacio torsional, se mantuvieron las longitudes de enlace y los ángulos constantes, por lo cual las interacciones significativas de Van der Waals sólo pudieron relajarse mediante rotaciones de enlace, mientras que la optimización no alteró la estereoquímica de las moléculas. Para la búsqueda conformacional se seleccionó el algoritmo genético Lamarckiano donde se calcularon 200 iteraciones, es decir, el número de conformaciones registradas. Una vez el protocolo de docking descrito fue validado mediante el cálculo de la raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) se reprodujo mediante SYBYL-X de tal forma que fue mostrada la posición y orientación tomada por el ligando nativo en la estructura de rayos-X de la proteína. Los demás compuestos análogos de AHLs fueron optimizados y acoplados siguiendo el mismo protocolo. La mejor pose de cada ligando fue seleccionada teniendo en cuenta la menor energía libre del docking generada por el programa y su posición dentro del sitio de unión.

Tabla 2. Clasificación de los ligandos AHLs con actividad *anti-quórum sensing*

Grupo	Estructura base	Compuesto	Sustituyente (X)	pIC ₅₀
AHL		1	-	6.96
		A3	-	5.76
	 Acil homoserina lactonas	A4	-	6.60
OA (otros análogos)		9	-	5.08
		B11	-	5.76
		B14	-	6.08
FHL		8	4-Br	5.41
		C6	3-Cl	5.40
		C8	3-Br	5.39
		C10	4-I	5.76
		C11	3-I	5.33
		C14	3-NO ₂	6.21
FOHL		D15	4-OCF ₃	5.33
		E16	3-CH ₃	5.11
		E20	4-Cl	5.33
		E21	4-Br	5.68
		E22	4-I	5.70
		B7	4-Br	6.47
		E26	4-CH ₃	5.37

FPHL		E27	3-CH ₃	5.05
		E28	4-OCH ₃	5.17
		E29	4-F	4.92
		E30	4-Cl	5.66
		E31	3-Br	5.48
		E33	3-I	5.74
		E37	4-NO ₂	5.52
		E38	3-NO ₂	5.47
		E39		5.47

4.2 Análisis QSAR CoMFA basado en el ligando y en el Acoplamiento Molecular

Se tomó el resultado del acoplamiento molecular para realizar un análisis 3D-QSAR detallado, teniendo en cuenta el alineamiento de los inhibidores basado en el ligando con mayor actividad biológica en la diana (pIC_{50}) y en el docking molecular, esto con el fin de comparar cuál de los dos tipos de alineamiento muestra una mejor correlación y por ende cual de ambos podía representar mejor un posible modelo. El descriptor CoMFA se realizó utilizando la opción de QSAR en SYBYL X. Las energías de campo estérico y electrostático fueron calculadas utilizando los potenciales de Lennard-Jones y Coulomb respectivamente, con una constante dieléctrica $1/r$ dependiente de la distancia en todas las intersecciones. Para calcular las energías estéricas y electrostáticas se utilizó el campo de fuerza de SYBYL X, Tripos. El punto de corte para estas energías se estableció en 30 kcal mol^{-1} indicando que cualquier valor de campo estérico o electrostático que superara dicho valor fue reemplazado por 30 kcal mol^{-1} .

4.3 Análisis estadístico de modelos y desarrollo de Mínimos Cuadrados Parciales

La construcción de los modelos de predicción de actividad biológica se llevó a cabo mediante el análisis estadístico de mínimos cuadrados parciales (PLS por sus siglas en inglés), donde inicialmente se realizó el método de validación cruzada "*Leave one out*" para ambos análisis 3D-QSAR, se fijó un valor de filtrado de columna mínimo de 2,00 kcal/mol para mejorar la relación señal-ruido entre los puntos cuya variación de energía se encontraban por debajo de dicho límite. En ambos modelos la columna CoMFA se usó como la variable independiente, mientras que los valores de actividad biológica pIC_{50} se tomaron como la variable dependiente en el análisis por PLS para derivar los modelos finales 3D QSAR mediante el análisis convencional; esto es, sin validación cruzada a partir de los modelos con los valores más altos de Q^2 o R^2_{cv} , (coeficiente de validación cruzada) fijando el número óptimo de componentes en dichos valores. Finalmente la predictibilidad de los modelos se midió mediante parámetros estadísticos (Ecuaciones 1-5) tales como el error estándar de predicción, los valores F y el coeficiente de correlación (R^2), datos que permitieron deducir cual de ambos modelos posee una mejor predicción, basado en el ligando con mayor actividad biológica en la diana o en el acoplamiento molecular.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó la construcción tridimensional de los 28 ligandos por medio del *sketcher* de SYBYL X, se tomó la decisión de construir los análogos de AHLs a partir de la estructura que tiene el ligando nativo co-cristalizado para aprovechar su conformación. Como los ligandos poseen una subestructura común con el AHL nativo la construcción estos consistió en agregar aquellas modificaciones que posee cada uno a la estructura base (anillo homoserina lactona), luego éstas fueron optimizadas por el método de cálculo descrito en la sección 4.1 y se obtuvo así la estructura más estable de cada ligando teniendo en cuenta la menor energía libre de minimización.

Tabla 3. Poses más estables (menor energía de unión) de los ligandos AHLs dentro del sitio activo de LasR.

Compuesto	IC ₅₀ (μ M)	Energía de unión (Kcal/mol)
1	0.11	-7.39
A3	1.75	-7.11
A4	0.25	-7.82
9	8.34	-9.35
B11	1.75	-8.12
B14	0.83	-8.99
8	3.89	-8.26
C6	3.97	-8.25
C8	4.06	-8.46
C10	1.72	-8.55
C11	4.63	-8.84

C14	0.61	-8.44
D15	4.67	-7.37
E16	7.8	-7.55
E20	4.7	-7.68
E21	2.1	-8.04
E22	2.0	-8.07
B7	0.34	-8.67
E26	4.3	-8.26
E27	8.9	-8.18
E28	6.8	-7.87
E29	12	-7.69
E30	2.2	-8.32
E31	3.3	-8.53
E33	1.8	-9.07
E37	3.0	-8.91
E38	3.4	-8.89
E39	3.4	-7.77

Los resultados de las poses top o conformaciones menos energéticas obtenidos a partir del proceso de docking molecular entre el receptor transcripcional LasR y los 28 ligandos son mostrados en la tabla 3. Tales resultados fueron muy satisfactorios debido a que todos presentaron una forma de unión muy parecida a la que presenta el ligando nativo dentro del pocket (bolsillo) del receptor LasR. En la Figura 6 se muestra la mejor pose tomada para cada ligando en el sitio activo de LasR. Para los ligandos que no poseían sustituyentes halogenados, grupos nitro y metilenos en sus cadenas ramificadas (*AHLs* y *OA*) se puede observar que el grupo carbonilo perteneciente al anillo lactona, y el grupo amida de la cadena acil están orientados de forma correcta hacia los aminoácidos con los cuales forman las

interacciones de tipo puente de hidrógeno. Estas interacciones se reproducen en cada uno de los análogos, lo cual indica que su diferencia en cuanto a la actividad antagonista se debe a la ubicación y orientación de sus cadenas laterales dentro del bolsillo hidrofóbico que posee la diana en su sitio activo, puesto que las cadenas laterales de dichos ligandos son en esencia alifáticas (*AHLs*) y con anillos voluminosos (*OA*) que permiten mantener interacciones no polares dentro de la enzima *LasR*.

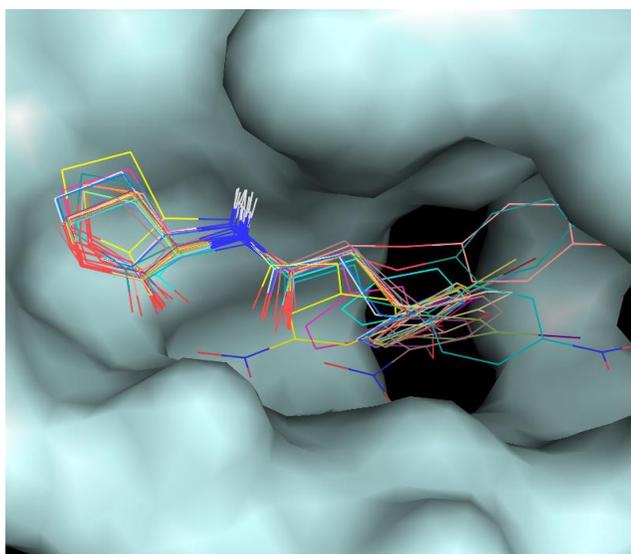


Figura 6. Alineamiento de las mejores poses de todos los 28 compuestos acoplados dentro del sitio de unión de *LasR*

El análisis de los resultados del *docking* de los ligandos pertenecientes al grupo *FHLs* sugiere que los grupos polares de la región base (anillo homoserina lactona,) excepto el oxígeno del anillo lactona forman interacciones tipo puente de hidrógeno con los residuos Tyr-56, Trp-60, Asp 73 y Ser 129, por tal motivo, y como se menciona arriba las diferencias en cuanto a su capacidad inhibitoria frente al receptor *LasR* están relacionadas con la región de las cadenas laterales aciles variables (región R) entre un grupo y otro de dichos ligandos (Figura 7). Un ejemplo de esto es la posición que ocupa el átomo de yodo sobre el anillo fenilo en los ligandos que lo

poseen en su estructura. Por tal motivo, la conformación que toma el ligando C10 le permite formar una interacción entre el yodo y el oxígeno del grupo carbonilo del aminoácido Tyr-47, tal interacción es muy débil entre por ejemplo el ligando C11 y Tyr-47 y nula entre el ligando C14 y Tyr-47, este tipo de puentes de halógeno son posibles debido a la tendencia que poseen los halógenos a interactuar con los pares de electrones solitarios de átomos de oxígeno pertenecientes a grupos carbonilo, hidroxilo, carboxilato cargado, o grupos fosfatos.

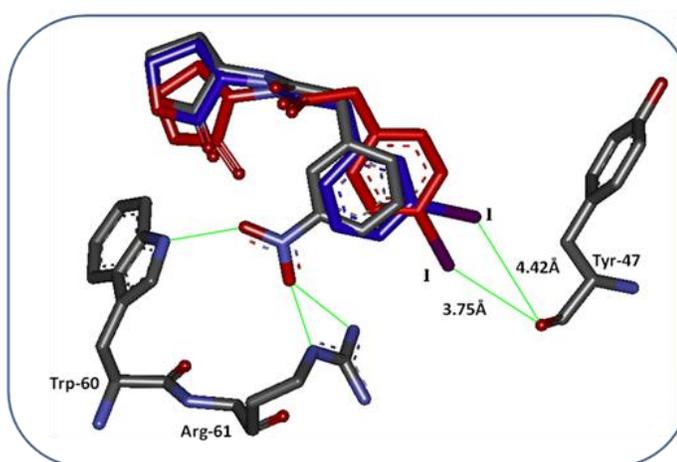


Figura 7. Interacciones existentes entre la región R de los ligandos (C10 en rojo, C11 en azul y C14 en gris) PHLs y los residuos, Tyr-47, Trp-60 y Arg-61

Los ligandos del grupo *FOHLs* presentan un modo de unión entre ellos muy similar, por lo tanto es muy evidente que la actividad antagonista al igual que el grupo de los *FHLs* dependa del sustituyente y de su localización en el anillo, a pesar de esto su actividad antagonista es moderada comparada con la mostrada por los ligandos pertenecientes a los grupos *FHLs* y *FPHLs*, lo anterior se puede explicar por la presencia del átomo de oxígeno en la región R de estos ligandos el cual puede generar una desestabilización en la densidad electrónica del anillo aromático, lo que resultaría en una disminución en la energía de interacción π - π entre el anillo de los ligandos de

este grupo y el anillo aromático de la Tyr-64 (Figura 8), sumado a esto en comparación con el grupo metilen presente en los otros grupos, la rotación alrededor de los enlaces del oxígeno es más restringida por los pares libres que presenta dicho átomo.

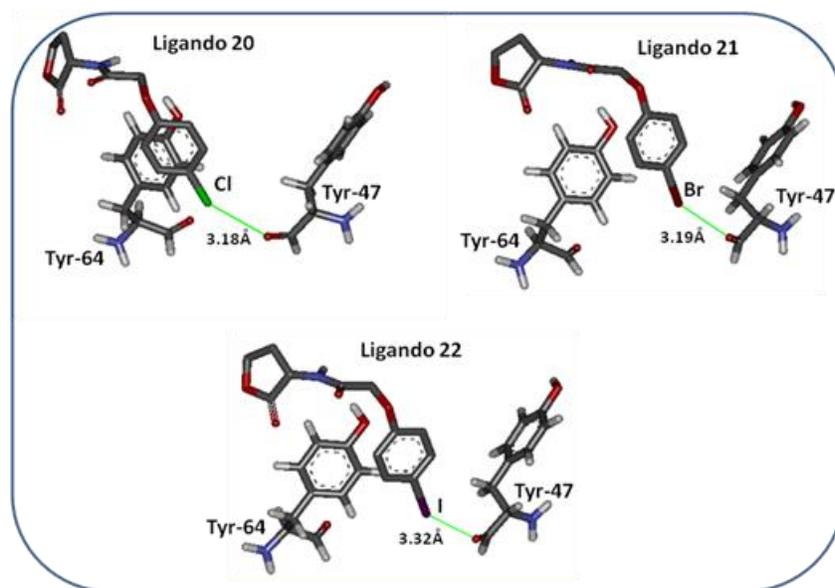


Figura 8. Puentes de halógenos presentes en los ligandos E20, E21 y E22. En todos los casos la suma de los radios de Van der Waals de los átomos involucrados en puentes de halógeno excede la distancia mostrada en el gráfico.

Los ligandos que pertenecen al grupo *FPHLs* son varios y aquellos que poseen el sustituyente en la posición 4 del anillo tienen en general mayor actividad antagonista que los que poseen la sustitución en la posición 3 del anillo aromático (Figura 9), esto se refleja en su valor de IC_{50} . Para tratar de explicar esta tendencia se analizó la estructura química de los ligandos 8 y E31, en los cuales se observa que solo se diferencian en la ubicación del sustituyente halógeno sobre el anillo aromático.

La interacción entre el átomo de bromo de los ligandos y el oxígeno del grupo carbonilo del residuo Tyr-47 solo es posible cuando el bromo está en la posición 4 del anillo aromático del ligando, tal interacción no es posible cuando el bromo se encuentra sustituido en la posición 3 del anillo aromático,

ya que la distancia entre el átomo de oxígeno del grupo carbonilo de Tyr-47 y el átomo de bromo es 4.49 Å mucho mayor que la suma de sus radios de Van der Waals (3.37 Å). Mientras que en el ligando 8 la distancia entre dichos átomos es aceptable.

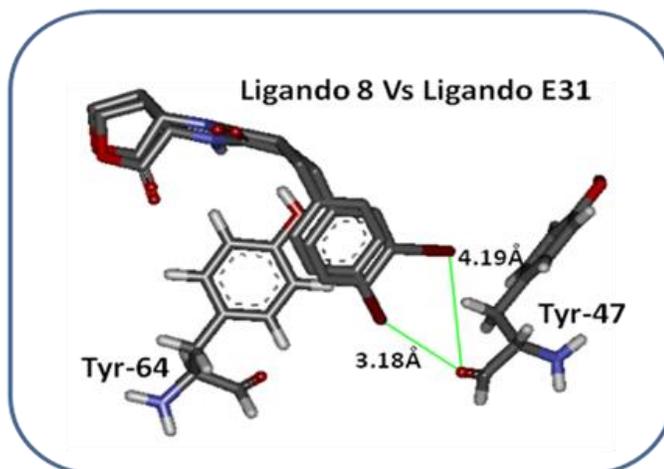


Figura 9. Las distancias existentes entre el átomo de bromo y el átomo de oxígeno del residuo Tyr-47 es mayor cuando el sustituyente se encuentra en la posición 3 del anillo, por tal motivo no puede existir una interacción muy fuerte entre estos átomos.

El análisis cualitativo descrito anteriormente es ratificado por el valor del *RMSD* calculado para la conformación acoplada con respecto a la conformación del ligando nativo presente en el complejo cocrystalizado, para tal cálculo se obtuvo un valor de 0.59 Å. Estudios recientes comparan varios programas de *docking* y sus algoritmos para analizar este tipo de problemas en particular (Warren, y otros, 2006). Estos estudios se enfocaron en el valor del *RMSD* como una medida de la exactitud que tienen los programas de acomplamiento molecular para predecir una pose óptima en un proceso de validación. Una pose computada es considerada correcta si su valor de *RMSD* es menor de 2 Å. Teniendo esto en cuenta, podemos afirmar que SYBYL-X reproduce correctamente la forma de unión y las interacciones presentes entre el receptor *LasR* y su ligando nativo. Por lo tanto podemos tener certeza acerca de las predicciones que dicho programa realice sobre el

conjunto de compuestos en estudio, debido a que estos son estructuralmente similares a las acil homoserina lactonas.

Luego de realizar el cálculo y estudio de las interacciones entre la enzima LasR y sus antagonistas, se desarrolló el alineamiento de los ligandos para obtener consigo dos diferentes modelos y analizar posteriormente mediante datos estadísticos cuál de estos es más predictivo. Para el alineamiento basado en el ligando se tomó como molécula modelo el ligando 1 debido a que es el antagonista con mayor actividad biológica (mayor pIC_{50}), mientras que para el alineamiento basado en el acoplamiento molecular se tomaron las poses top de cada una de las moléculas en el conjunto de entrenamiento, esto es, las conformaciones espaciales más estables energéticamente en el complejo LasR-ligando de acuerdo al puntaje obtenido en la energía de unión del *docking*. Las figuras 10 y 11 muestran la superposición de todas las moléculas para el alineamiento basado en el antagonista 1 y en las poses top de cada ligando respectivamente.

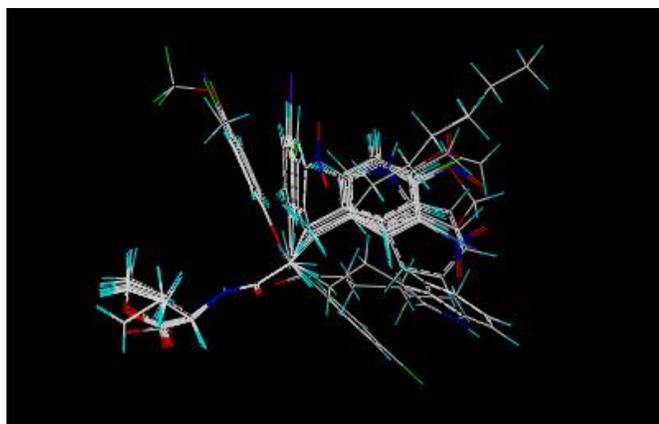


Figura 10. Alineamiento estructural de los compuestos basado en el ligando de mayor actividad biológica inhibitoria (pIC_{50})

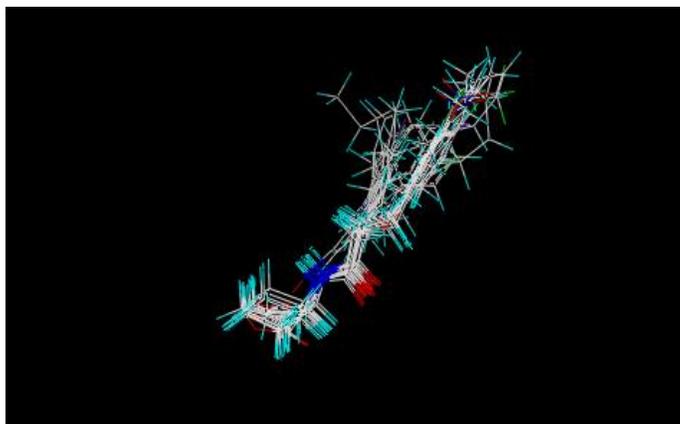


Figura 11. Alineamiento estructural de los compuestos basado en las conformaciones espaciales energéticamente más estables dentro del complejo ligando-LasR (Docking)

Los resultados obtenidos del análisis PLS para cada uno de los modelos son mostrados en las tablas 4 y 5. Para el modelo basado en el ligando se obtiene un valor de Q^2 de 0.509, mientras que para el modelo basado en el docking molecular Q^2 fue de 0.553, lo que supone que al mismo número de componentes para ambos modelos (6 componentes) hay una correlación ligeramente marcada para el modelo basado en el docking, ahora bien, el coeficiente de correlación normal para el segundo modelo fue mayor que el primer modelo ($R^2= 0.967$), con un error estándar de predicción menor ($SEE=0.099$), en consecuencia el modelo basado en el docking molecular a quien llamaremos modelo 2 provee mayor confianza estadística y productividad que el modelo 1 (basado en el ligando).

Tabla 4. Resultados de PLS CoMFA para el modelo basado en el ligando

Resultados estadísticos	CoMFA
Q ²	0.509
R ²	0.866
SEE	0.199
Probabilidad de R ² =0	0.000
F	22.653
Componentes	6
Fracción Estérica (%)	0.691
Fracción Electroestática (%)	0.309

Tabla 5. Resultados de PLS CoMFA para el modelo basado en el docking molecular

Resultados estadísticos	CoMFA
Q ²	0.553
R ²	0.967
SEE	0.099
Probabilidad of R ² =0	0.000
F	103.205
Componentes	6
Fracción Estérica (%)	0.687
Fracción Electroestática (%)	0.313

La Tabla 6 muestra la actividad experimental vs la predicha calculada por los modelos y sus respectivos residuos, aquí se observa que la dispersión residual de los datos para el modelo 2 es menor que para el modelo 1, lo que comprueba que el modelo 2 posee mucha mayor predicción, esto se debe a que en este tipo de modelo se eligen las conformaciones estructurales más probables para cada ligando en la interacción con los residuos aminoacídicos del sitio activo LasR-ligando, por lo que se obtienen actividades muy cercanas a las reportadas experimentalmente.

Tabla 6. Actividades predichas vs experimentales para ambos modelos CoMFA

Antagonistas	Modelo 1 (ligando)			Modelo 2 (docking)	
	pIC ₅₀ (M) experimental	pIC ₅₀ (M) predicho	Residuo	pIC ₅₀ (M) predicho	Residuo
1	6,96	6,875	0,085	6,933	0,027
8	5,41	5,382	0,028	5,469	-0,059
9	5,08	5,12	-0,040	5,065	0,015
A3	5,76	5,787	-0,027	5,687	0,073
A4	6,60	6,718	-0,118	6,783	-0,183
B7	6,47	5,937	0,533	6,311	0,159
B11	5,76	5,369	0,391	5,731	0,029
B14	6,08	6,224	-0,144	6,079	0,001
C6	5,40	5,387	0,013	5,359	0,041
C8	5,39	5,309	0,081	5,348	0,042
C10	5,76	5,709	0,051	5,679	0,081
C11	5,33	5,341	-0,011	5,353	-0,023
C14	6,21	6,316	-0,106	6,199	0,011
D15	5,33	5,387	-0,057	5,291	0,039
E16	5,11	5,02	0,090	5,136	-0,026
E20	5,33	5,525	-0,195	5,383	-0,053
E21	5,68	5,603	0,077	5,66	0,020
E22	5,70	5,668	0,032	5,69	0,010
E26	5,37	5,603	-0,233	5,519	-0,149
E27	5,05	5,346	-0,296	5,251	-0,201
E28	5,17	5,116	0,054	5,119	0,051
E29	4,92	5,168	-0,248	5,016	-0,096
E30	5,66	5,669	-0,009	5,539	0,121
E31	5,48	5,57	-0,090	5,406	0,074
E33	5,74	5,528	0,212	5,828	-0,088
E37	5,52	5,628	-0,108	5,506	0,014
E38	5,47	5,42	0,050	5,353	0,117

E39	5,47	5,484	-0,014	5,519	-0,049
-----	------	-------	--------	-------	--------

Las Figuras 12 y 13 muestran los gráficos de dispersión lineal de la actividad experimental vs predicha para los dos modelos, donde podemos apreciar que si existe un buen modelo de ajuste, los puntos se alinean a lo largo de la línea diagonal, por lo que a pesar de que existe una buena correlación para el modelo basado en el ligando con mayor actividad biológica ($R^2= 0.866$), la predicción del modelo basado en el docking molecular es bastante precisa ($R^2= 0.967$), lo que corrobora los datos calculados por el campo CoMFA.

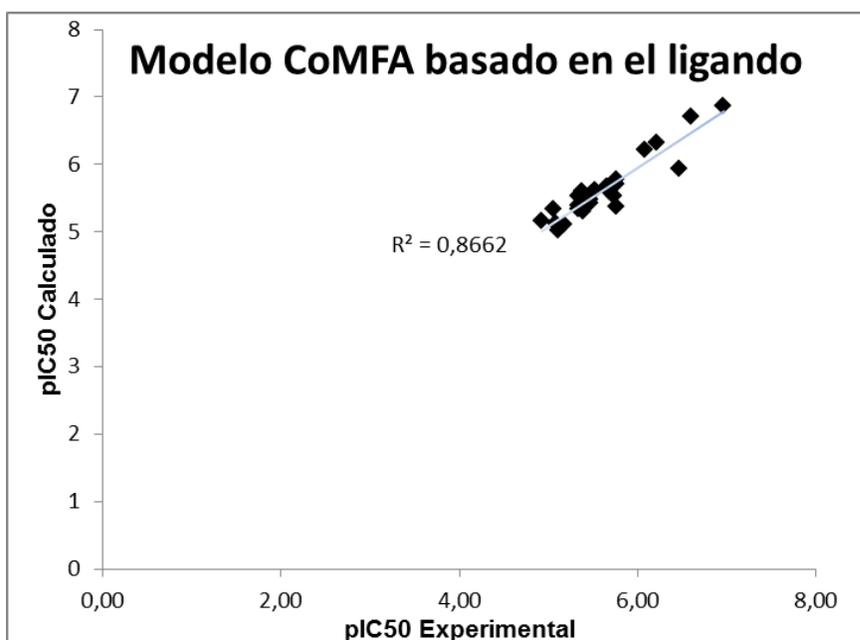


Figura 12. Actividad calculada vs experimental para el modelo 1 obtenida por análisis PLS usando CoMFA

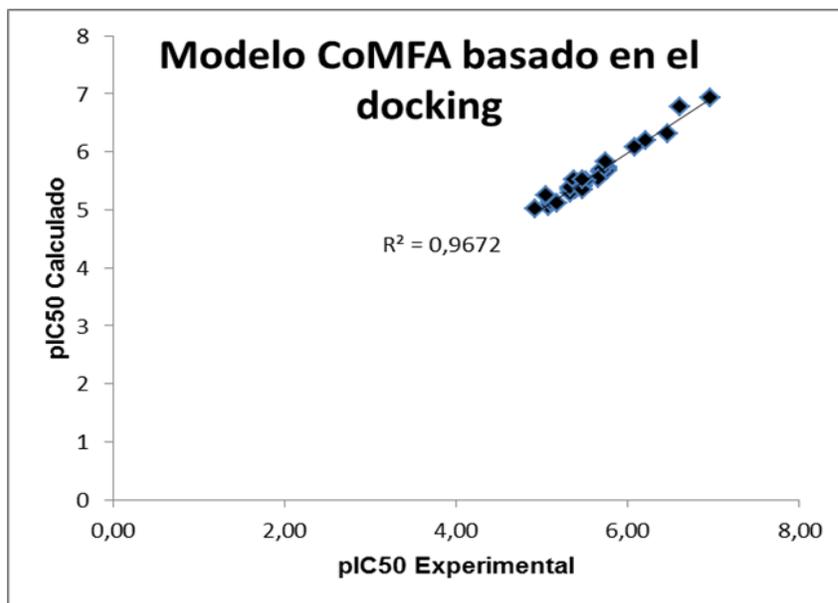


Figura 13. Actividad calculada vs experimental para el modelo 2 obtenida por análisis PLS usando CoMFA

Para validar los modelos QSAR 3D construidos, se realizó una validación externa. La Figura 14 muestra los cinco compuestos que se usaron en el conjunto de prueba. Sus valores de pIC_{50} variaron entre 4.50 y aproximadamente 7.00 y sus actividades biológicas se predijeron de la misma manera que para los modelos CoMFA. Como se observa en la Tabla 7, la desviación media obtenida de los valores de pIC_{50} del estudio fue 0,93 para el modelo basado en el ligando y 0,99 para el modelo basado en el docking molecular, lo que sugiere que el modelo 2 tiene una mayor predicción que el modelo 1, de modo que el modelo basado en el acoplamiento podría ser de gran ayuda para proporcionar una buena predicción para la estimación de afinidades de nuevos compuestos antes de su síntesis.

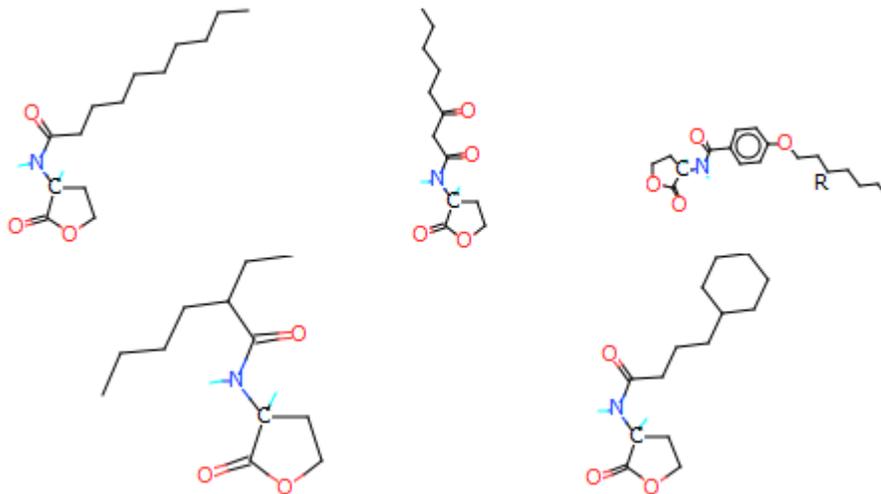


Figura 14. Conjunto de ligandos utilizados para la validación externa (de arriba a abajo y de izquierda a derecha: 6, OOHL, R6, S1, S7)

Tabla 7. Actividades biológicas predichas vs experimentales de las moléculas del conjunto de prueba

Conjunto de prueba	Modelo 1 (ligando)			Modelo 2 (docking)	
	Experimental pIC ₅₀ (M)	Predicho pIC ₅₀ (M)	Residuo	Predicho pIC ₅₀ (M)	Residuo
6	6,60	6,970	-0,370	6,588	0,012
OOHL	6,96	6,615	0,345	6,933	0,027
R6	6,00	5,950	0,050	5,986	0,014
S1	4,54	4,830	-0,290	4,587	-0,047
S7	5,00	5,082	-0,082	5,086	-0,086
CoMFA R ²	0,927			0,994	

La Figura 15 muestra los mapas o gráficos de contorno estéricos y electrónicos para el compuesto B7 en los modelos CoMFA basado en el ligando (modelo 1) y en el docking molecular (modelo 2) de izquierda a derecha respectivamente, el cual tiene una relativa alta actividad biológica inhibitoria en el receptor LasR.

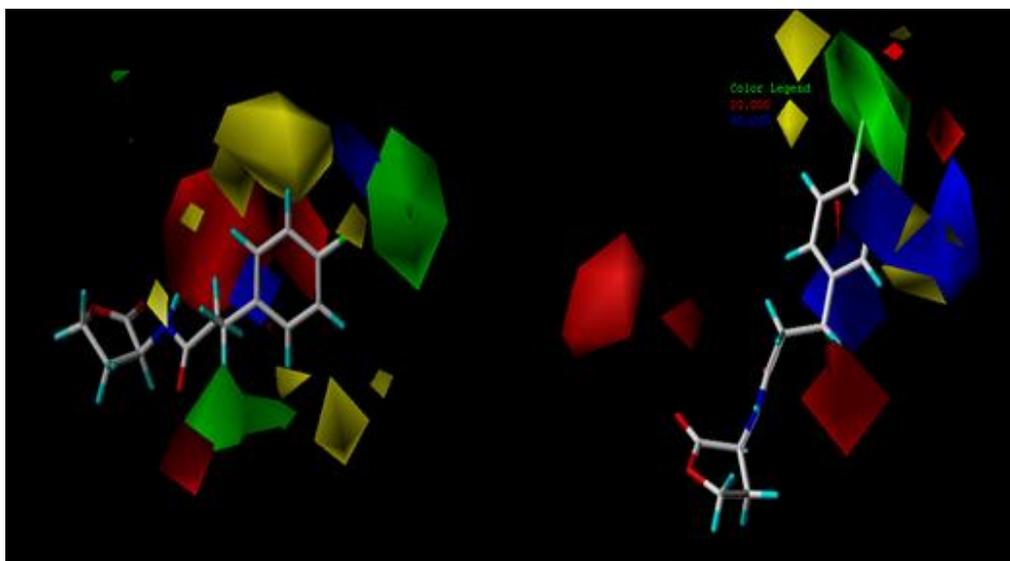


Figura 15. Mapas de contorno CoMFA para los modelos 1 (izquierda) y 2 (derecha) mostrando las contribuciones estéricas y electrostáticas favorecidas y desfavorecidas

La contribución estérica está definida por los mapas de contornos de color verde, los cuales representan regiones de alta tolerancia estérica (contribución del 80%), mientras que los mapas de contornos de color amarillo representan regiones de efecto estérico desfavorables (20% de contribución). La contribución electrostática se define por mapas de contornos de color azul que representan las regiones donde los grupos con carga positiva aumentan la actividad (80% de contribución) y los contornos de color rojo donde los grupos con carga negativa mejoran la actividad (20% de contribución).

Podemos observar que para el ligando B7 utilizado para ilustrar los mapas de contorno CoMFA, para ambos modelos las regiones favorecidas estéricamente coinciden en posiciones cercanas al átomo de cloro (Cl), esto es debido a que la alta electronegatividad de esta región favorece las interacciones con los residuos aminoacídicos que posean cargas parcialmente positivas en sus estructuras, mientras que las más desfavorecidas como era de esperarse, coinciden a lo largo del anillo de

benceno, por lo que grupos R con bastante volumen no podrían incluirse en estas zonas, ya que probablemente disminuiría la actividad. Las regiones con carga positiva que favorecen el campo electrostático se pueden observar que están sobre la mayoría de los átomos de hidrógeno, y esto trae consigo el aumento de la actividad contribuida en esta zona debido a que estos pueden formar enlaces de hidrógeno que son de vital importancia en el estudio de interacciones ligando-proteína, mientras que los grupos funcionales polarizados como el carbonilo (C=O) favorecen las regiones electrostáticas con contribuciones de carga negativa y por lo tanto incluir posibles grupos funcionales fuertemente polarizados en esta zona podría ser una alternativa para potenciar las interacciones en el sitio activo de LasR, mejorando la actividad biológica del compuesto estudiado.

6. CONCLUSIONES

De este trabajo se concluye que existe una afinidad marcada entre los ligandos antagonistas utilizados y el receptor tipo LuxR, LasR ratificado por el valor del RMSD calculado para la conformación acoplada respecto a la conformación del ligando nativo presente en el complejo co-cristalizado, la cual fue de 0.59 Å y teniendo en cuenta que estudios han mostrado que valores de RMSD menores a 2 Å son considerados aceptables, se puede afirmar que dicho acoplamiento reproduce correctamente la forma de unión y las interacciones presentes entre el receptor LasR y su ligando nativo.

Para los modelos creados se puede aseverar que la dispersión residual de los datos para el modelo 2 es menor que para el modelo 1, lo que comprueba que el modelo 2 posee mucha mayor predicción ($R^2= 0.967$), esto se debe a que en este tipo de modelo se eligen las conformaciones estructurales más estables para cada ligando dentro de las interacciones con los residuos aminoacídicos del sitio activo de la diana LasR, por lo que se obtienen actividades muy cercanas a las reportadas experimentalmente. Finalmente los mapas de contorno generados por los modelos CoMFA sugieren que la actividad inhibitoria de nuevos ligandos podrían mejorar agregando grupos voluminosos en posiciones cercanas a los heteroátomos, mientras que grupos que puedan formar puentes de hidrógeno y grupos funcionales fuertemente polarizados en las regiones mostradas favorecen las interacciones electrostáticas con contribuciones de carga positiva y negativa respectivamente, por lo que se ha desarrollado un modelo que puede ser de gran utilidad para proponer potenciales moduladores del *Quórum Sensing* partiendo de los diferentes ligandos con base estructural de AHLs desarrollados a lo largo del presente estudio.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Ahumedo, M., Diaz, A., & Vivas, R. (2010). Theoretical and structural analysis of the active site of the transcriptional regulators LasR and TraR, using molecular docking methodology for identifying potential analogues of acyl homoserine lactones (AHLs) with anti-quorum sensing activity. *European journal of medicinal chemistry*, 45(2), 608-615.
- Bassler, B. L., Schauder, S., Shokat, K., & Surette, M. G. (2001). The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Molecular microbiology*, 41(2), 463-476.
- Blackwell, H., Grant, D., & Mattmann, E. (2008). Evaluation of a focused library of N-aryl l-homoserine lactones reveals a new set of potent quorum sensing modulators. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18, 5978–5981.
- Bottomley, M. J., Muraglia, E., Bazzo, R., & Carfi, A. (2007). Molecular insights into quorum sensing in the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* from the structure of the virulence regulator LasR bound to its autoinducer. *Journal of Biological Chemistry*, 282(18), 13592-13600.
- Brenk, R., Naerum, L., Grädler, U., Gerber, H. D., Garcia, G. A., Reuter, K., & Klebe, G. (2002). Virtual screening for submicromolar leads of tRNA-guanine transglycosylase based on a new unexpected binding mode detected by crystal structure analysis. *Journal of medicinal chemistry*, 46(7), 1133-1143.
- Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S., & Karplus, M. (1983). CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *Journal of computational chemistry*, 4(2), 187-217.

- Choi, S. H., & Greenberg, E. P. (1991). The C-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein contains an inducer-independent lux gene activating domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(24), 11115-11119.
- Choi, S. H., & Greenberg, E. P. (1992). Genetic dissection of DNA binding and luminescence gene activation by the *Vibrio fischeri* LuxR protein. *Journal of bacteriology*, 174(12), 4064-4069.
- Clark, M., Cramer, R. D., & Van Opdenbosch, N. (1989). Validation of the general purpose tripos 5.2 force field. *J. Comput. Chem*, 10, 982–1012.
- Cornell, W. D., Cieplak, P., Bayly, C. I., Gould, I. R., Merz, K. M., Ferguson, D. M., & Kollman, P. A. (1995). A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *Journal of the American Chemical Society*, 117(19), 5179-5197.
- Cramer, R. D., Patterson, D. E., & Bunce, J. D. (1988). Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 110(18), 5959-5967.
- Fiolhais, C., Nogueira, F., & Marques, M. A. (2003). *A primer in density functional theory* (Vol. 620). Springer Science & Business Media.
- Frisch, M. T., Schlegel, H., Scuseria, G., Robb, M., Cheeseman, J., Montgomery Jr, J., . . . N. (2004). Gaussian 09. *Molecular wave function calculator to obtain a series of atomic and molecular properties*, 16, 961-970. Wallingford CT.
- Gehlhaar, D. K., Verkhivker, G. M., Rejto, P. A., Sherman, C. J., Fogel, D. R., Fogel, L. J., & Freer, S. T. (1995). Molecular recognition of the inhibitor AG-1343 by HIV-1 protease: conformationally flexible docking by evolutionary programming. *Chemistry & biology*, 2(5), 317-324.

- Geske, G. D., O'Neill, J. C., Miller, D. M., Mattmann, M. E., & Blackwell, H. E. (2007). Modulation of bacterial quorum sensing with synthetic ligands: systematic evaluation of N-acylated homoserine lactones in multiple species and new insights into their mechanisms of action. *J Am Chem Soc*, 129(44), 13613-25.
- González, J. E., & Marketon, M. M. (2003). Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 574-592.
- Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (1990). Automated docking of substrates to proteins by simulated annealing. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 8(3), 195-202.
- Grüneberg, S., Stubbs, M. T., & Klebe, G. (2002). Successful virtual screening for novel inhibitors of human carbonic anhydrase: strategy and experimental confirmation. *Journal of medicinal chemistry*, 45(17), 3588-3602.
- Gutiérrez, H. (2004). *Modelización molecular de los receptores de adenosina y sus ligandos en el marco de diseño de fármacos asistido por ordenador*. Tesis doctoral, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona.
- Halgren, T. A. (1996). Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *Journal of computational chemistry*, 17(5-6), 490-519.
- Henke, J. M., & Bassler, B. L. (2004). Bacterial social engagements. *Trends in cell biology*, 14(11), 648-656.
- Hetényi, C., & van der Spoel, D. (2002). Efficient docking of peptides to proteins without prior knowledge of the binding site. *Protein Science*, 11(7), 1729-1737.
- Hohenberg, P., & Kohn, W. (1964). Inhomogeneous Electron Gas. *Phys. Rev.*, 136, 864-871.

- Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R., & Taylor, R. (1997). Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. , 267(3),. *Journal of molecular biology*, 267(3), 727-748.
- Kapetanovic, I. M. (2008). Computer-aided drug discovery and development (CADD): in silico-chemico-biological approach. *Chemico-biological interactions*, 171(2), 165-176.
- Klebe, G., Abraham, U., & Mietzner, T. (1994). Molecular similarity indices in a comparative analysis (CoMSIA) of drug molecules to correlate and predict their biological activity. *Journal of medicinal chemistry*, 37(24), 4130-4146.
- Kleerebezem, M., Beerthuyzen, M. M., Vaughan, E. E., De Vos, W. M., & Kuipers, O. P. (1997). Controlled gene expression systems for lactic acid bacteria: transferable nisin-inducible expression cassettes for *Lactococcus*, *Leuconostoc*, and *Lactobacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11), 4581-4584.
- Koch, W., & Holthausen, M. C. (2001). *A Chemist's Guide to Density Functional Theory* (Second Edition ed.). Wiley-VCH.
- Kuntz, I. D., Blaney, J. M., Oatley, S. J., Langridge, R., & Ferrin, T. E. (1982). A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *ournal of molecular biology*, 161(2), 269-288.
- Laue, B. E., Jiang, Y., Chhabra, S. R., Jacob, S., Stewart, G. S., Hardman, A., & Williams, P. (2000). The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, N-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl) homoserine lactone, via HdtS, a putative novel N-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiology*, 146(10), 2469-2480.
- McMartin, C., & Bohacek, R. S. (1997). QXP: powerful, rapid computer algorithms for structure-based drug design. . *Journal of computer-aided molecular design*, 11(4), 333-344.

- Nair, S., & Zou, Y. (2009). Molecular basis for the recognition of structurally distinct autoinducer mimics by the *Pseudomonas aeruginosa* LasR quorum-sensing signaling receptor. *Chemistry & Biology*, 16, 961-970.
- Parr, R. G., & Yang, R. G. (1989). *Density-functional theory of atoms and molecules*. . Oxford university press.
- Rarey, M., Kramer, B., Lengauer, T., & Klebe, G. (1996). A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *Journal of molecular biology*, 261(3), 470-489.
- Shoichet, B. K. (2004). Virtual screening of chemical libraries. *Nature*, 432(7019), 862-865.
- Stevens, A. M., Dolan, K. M., & Greenberg, E. P. (1994). Synergistic binding of the *Vibrio fischeri* LuxR transcriptional activator domain and RNA polymerase to the lux promoter region. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(26), 12619-12623.
- Tripos International. (1997). SYBYL X. *Molecular Modeling from Sequence Through Lead Optimization*. South Hanley Rd., St. Louis, Missouri , USA.
- Vangrevelinghe, E., Zimmermann, K., Schoepfer, J., Portmann, R., Fabbro, D., & Furet, P. (2003). Discovery of a potent and selective protein kinase CK2 inhibitor by high-throughput docking. *Journal of medicinal chemistry*, 46(13), 2656-2662.
- Vannini, A., Volpari, C., Gargioli, C., Muraglia, E., Cortese, R., De Francesco, R., & Di Marco, S. (2002). The crystal structure of the quorum sensing protein TraR bound to its autoinducer and target DNA. *The EMBO journal*, 21(17), 4393-4401.
- Warren, G. L., Andrews, C. W., Capelli, A. M., Clarke, B., LaLonde, J., Lambert, M. H., . . . Head, M. S. (2006). A Critical Assessment of Docking Programs and Scoring Functions. *Journal of Medicinal Chemistry*, 5912-5931.

- Watson, W. T., Minogue, T. D., Val, D. L., von Bodman, S. B., & Churchill, M. E. (2002). Structural basis and specificity of acyl-homoserine lactone signal production in bacterial quorum sensing. *Molecular cell*, 9(3), 685-694.
- Williams, P., Winzer, K., Chan, W. C., & Cámara, M. (2007). Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 362, 1119–1134.