

2.08.01 - Bioquímica / Química de Macromoléculas
MODELAGEM MOLECULAR DE INIBIDORES POTENTES E SELETIVOS PARA A ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

Ana L. M. Karl^{1*}, Isabella A. Guedes², Laurent E. Dardenne³

1. Bolsista de Mestrado no Programa de Pós Graduação do LNCC
2. Bolsista de Pós-Doutorado em Modelagem Computacional do LNCC – Co-orientadora
3. Pesquisador do LNCC – Departamento de Mecânica Computacional / Orientador

Resumo:

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh). A AChE é um importante alvo farmacológico, uma vez que deficiências em seu funcionamento estão associadas a diversos quadros patológicos graves, como a Doença de Alzheimer (DA). Este trabalho teve como propósito compreender o modo de interação de inibidores potentes e seletivos com atividade multialvo no sítio de ligação da AChE, sintetizados por um grupo colaborador da UFRGS, através de estudos de atracamento molecular. A metodologia envolveu as seguintes etapas: (i) seleção de conformações da proteína-alvo, (ii) estudo de moléculas de água estruturais, (iii) preparação das estruturas, (iv) validação da metodologia, (v) e estudos de *ensemble docking*. A metodologia de *ensemble docking* utilizada permitiu a observação de interações importantes dos inibidores testados e outras características que auxiliaram no entendimento da seletividade e potência das moléculas investigadas.

Palavras-chave: modelagem molecular; acetilcolinesterase; *ensemble docking*.

Apoio financeiro: CNPq.

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: LNCC.

Introdução:

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa multifatorial progressiva caracterizada por alterações neurológicas, degeneração e comprometimento da cognição^[1]. É a causa mais comum de demência, afetando de 4-8% da população idosa e cerca de 35 milhões de pessoas em todo o mundo^[2]. Por não possuir cura, a DA continua a ser um importante alvo para o desenvolvimento de novos fármacos. A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima do tipo serina hidrolase. É responsável pela finalização dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas através da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina

(ACh)^[3]. A AChE é um importante alvo farmacológico para o tratamento da DA, dado a perda de atividade colinérgica observada em pacientes com DA^[4,5] e o papel da AChE na aprendizagem e memória sugerido por alguns estudos^[4,5]. Atualmente, sua inibição é uma das principais abordagens farmacológicas da DA, sendo o mecanismo de ação principal de 3 dos 4 fármacos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*): donepezil (Aricept®), rivastigmina (Exelon®) e galantamina (Razadyne®, Reminyl®). O sítio ativo da AChE é composto por uma tríade formada pelos resíduos de aminoácidos S200, H440 e E327, e é o responsável pela hidrólise da ACh. Além do sítio catalítico, a AChE possui ainda outros 4 sítios: sítio aniônico (W84, Y130, T330 e F331), sítio de ligação do grupo acil (F288 e F290), sítio oxianiônico (G118, G119 e A201) e sítio aniônico periférico (PAS – *peripheral anionic site*, em inglês) (D72, Y71, Y121, W279, Y334), que localiza-se na entrada no sítio ativo, é altamente flexível e está envolvido na modulação alostérica do sítio ativo^[6]. Os inibidores investigados nesse trabalho, sintetizados por um grupo colaborador experimental de síntese orgânica do Instituto de Química da UFRGS, são multialvo e baseados nas estruturas dos fármacos (i) tacrina e (ii) tianeptina (Figura 1). O (i) foi o primeiro inibidor da AChE a ser aprovado para o tratamento da DA^[7]. Apesar da descontinuidade de sua prescrição por sua hepatotoxicidade, ainda é utilizado como base para o desenvolvimento de novos fármacos para a DA^[8]. O (ii), por sua vez, é um antidepressivo neuroprotetor que age na recaptção de serotonina. Os compostos avaliados se mostraram potentes para a enzima AChE, obtendo valores de IC₅₀ na escala de nanomolar. O objetivo desse trabalho é prever e investigar o modo de interação de inibidores potentes e seletivos da AChE utilizando técnicas de atracamento molecular.

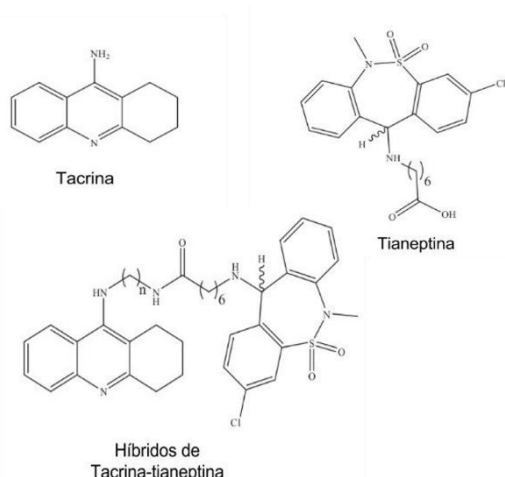


Figura 1 - Estruturas 2D da tacrina, tianeptina e compostos híbridos de tacrina-tianeptina.

Metodologia:

Atualmente existem diversas estruturas tridimensionais da AChE disponíveis no banco de estruturas *Protein Data Bank* (PDB) [9,10]. As estruturas utilizadas nos estudos de *ensemble docking* foram selecionadas seguindo critérios pré-estabelecidos: (i) complexadas com ligantes volumosos e flexíveis análogos à tacrina que interagissem tanto com o sítio ativo da enzima quanto com o PAS, (ii) valor de resolução menor ou igual a 3 Å, e (iii) diferentes conformações do resíduo de aminoácido W279 para representar a flexibilidade conformacional do PAS. As estruturas da AChE selecionadas para os estudos de atracamento foram 1ZGC (*Torpedo californica*)^[11], 2CKM (*Torpedo californica*)^[12] e 1Q83 (*Mus musculus*)^[13]. Não foram selecionadas estruturas de *Homo sapiens* por não haver complexos com inibidores de tamanho similar aos que estão sendo avaliados. Após a seleção, as estruturas selecionadas foram alinhadas utilizando a ferramenta *super* do programa Pymol [14] para investigar a presença de moléculas de água estruturais altamente conservadas. Quatro moléculas de água (2004, 2027, 2067 e 2107, no complexo 1Q83) foram utilizadas durante os estudos de atracamento molecular. Os complexos foram preparados utilizando a ferramenta PrepWizard/PROPKA [15] da suíte de aplicativos Maestro, definindo pH = 7 para a predição dos estados de protonação dos resíduos de aminoácidos, respeitando os estados de protonação já descritos na literatura: E202 e E327 carregados negativamente e H440 neutra em ND1. Os ligantes nativos (i.e. originalmente complexados com a enzima durante a obtenção da estrutura experimental do complexo) foram mantidos na cavidade da enzima para otimização da previsão dos

estados de protonação e da rede de ligações de hidrogênio. Todos os ligantes foram preparados através da ferramenta LigPrep/Epik^[16] da suíte de aplicativos Maestro em pH = 7. Foram gerados os dois isômeros possíveis para cada composto, devido à presença de um centro estereogênico no grupo tianeptina. Para cada configuração (i.e. R e S), quatro conformações de anéis foram geradas, sendo selecionadas as duas de menor energia potencial. O protocolo de atracamento molecular utilizado neste trabalho pode ser dividido em duas etapas: (i) estudos de *redocking* e (ii) estudos de *ensemble docking*. O estudo (i) teve por objetivo validar a preparação do sistema e o desempenho do programa de atracamento em experimentos com a enzima AChE. O estudo (ii) consistiu na realização de ensaios de atracamento em cada estrutura representante com o objetivo de incluir implicitamente a flexibilidade proteica. Ambos os estudos foram realizados utilizando o programa Glide [17] (método *XP docking - Extra Precision Docking*).

Resultados e Discussão:

Através do alinhamento estrutural foi possível observar variações conformacionais de resíduos de aminoácidos na região do PAS (Figura 2), principalmente do resíduo W279, que se apresentou em três diferentes orientações. A conformação deste resíduo de aminoácido está diretamente relacionada com o modo de ligação de diferentes inibidores com o PAS, indicando a importância dos estudos de *ensemble docking* considerando as três conformações selecionadas para simular parcialmente a flexibilidade da proteína.

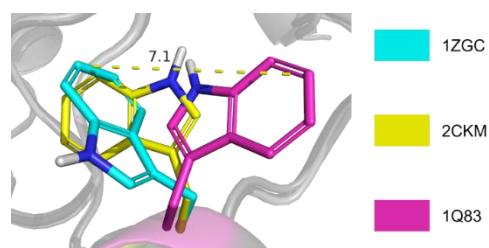


Figura 2 – Diferentes orientações do W279 nas estruturas 1ZGC (azul), 2CKM (amarelo) e 1Q83 (rosa).

A validação do protocolo foi bem sucedida, como mostram os resultados de *redocking* (Tabela 1). A análise dos resultados mostra que o protocolo de atracamento adotado obteve sucesso em prever o correto modo de ligação do grupo análogo à tacrina, presente em todos os inibidores testados, validando o protocolo de preparação das estruturas. Além disso, foi observado que o estado de

protonação do resíduo de aminoácido E202 tem forte influência no sucesso de *redocking*, pois não é possível prever o correto modo de ligação da tacrina no sítio ativo considerando esse resíduo neutro.

Tabela 1 - Resultados de *redocking* com e sem águas estruturais. São considerados sucessos as soluções que possuem RMSD (*root mean square deviation*) menor ou igual a 2 Å.

Complexo	Glide		
	GScore ^a	RMSD ^b	
1Q83	Com águas	-19.688	2.69
	Sem águas	-20.290	2.91
1ZGC	Com águas	-17.975	1.32
	Sem águas	-17.548	1.64
2CKM	Com águas	18.303	1.19
	Sem águas	-19.282	1.76

^a valores dados em kcal/mol. ^b valores dados em Å.

Os resultados dos ensaios considerando a presença das águas estruturais se mostraram melhores comparados aos experimentos sem sua presença. A presença dessas moléculas se mostra importante devido à participação na rede de ligações de hidrogênio, principalmente nos casos de grupos químicos dos inibidores que interagem com a proteína por intermédio destas moléculas de água. Desta forma, as quatro moléculas de água foram consideradas nos estudos posteriores de *ensemble docking*. Nos estudos de *ensemble docking* com os inibidores utilizando as três conformações selecionadas da enzima AChE, o programa Glide conseguiu prever o modo de ligação reportado na literatura para o grupo análogo à tacrina, presente nos inibidores testados, caracterizado por: (i) π -stacking com W84 e F330, e (ii) ligação de hidrogênio entre o átomo de nitrogênio positivamente carregado do grupo tacrina com o oxigênio da carbonila da cadeia principal do resíduo H440. As diferenças mais significativas entre os modos de ligação preditos estão relacionados com o grupo tianeptina dos inibidores que se ligam ao PAS.

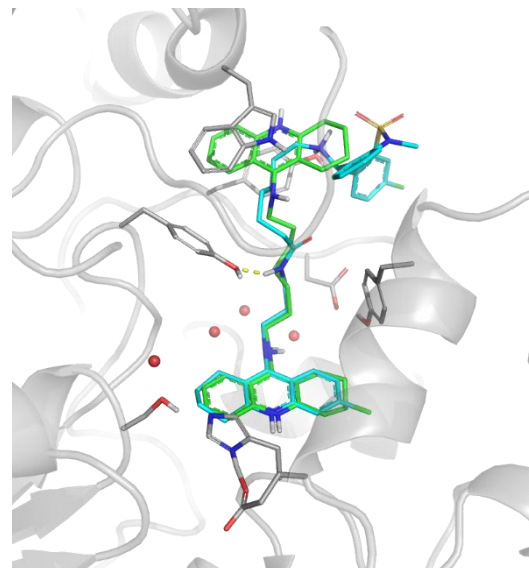


Figura 3 - Modo de ligação do inibidor **2d** (azul claro) sobreposto ao encontrado para a bis-(7)-tacrina (verde).

Através dos estudos de *ensemble docking* foi possível compreender como o tamanho dos *linkers* de carbono influencia na afinidade dos inibidores. Os resultados sugerem que a porção variável do ligante (*n*) (Figura 1) composta por dois ou três átomos de carbono proporciona uma interação ótima com toda a cavidade enzimática, uma vez que permite: (i) as interações conservadas entre a porção tacrina e a porção inferior da cavidade de ligação, (ii) a localização da porção da tianeptina na entrada da cavidade, proporcionando interações importantes com o PAS, e (iii) a formação de ligações de hidrogênio entre o grupo amida do ligante e os resíduos de tirosina no meio da cavidade do sítio.

Através dos experimentos realizados foi possível identificar interações dos compostos potentes com resíduos de aminoácido importantes da cavidade de ligação da enzima AChE, permitindo um melhor entendimento das propriedades que podem conferir potência e seletividade aos compostos estudados.

Conclusões:

O estudo de *ensemble docking* possibilitou considerar parcialmente a flexibilidade dessa enzima, dado que o Trp279 possui diferentes orientações nas três estruturas representativas selecionadas. Utilizando esta estratégia, foi possível observar: (i) interações importantes na cavidade de ligação da AChE; (ii) influência do tamanho do comprimento do *linker* de carbono na manutenção de interações importantes, e (iii) características envolvidas na seletividade e potência das moléculas estudadas.

Referências bibliográficas

- [1] J. Godyń, J. Jończyk, D. Panek, B. Malawska, Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials, *Pharmacol. Rep.* 68 (2016) 127–138. doi:10.1016/j.pharep.2015.07.006.
- [2] A. Wimo, L. Jönsson, J. Bond, M. Prince, B. Winblad, Alzheimer Disease International, The worldwide economic impact of dementia 2010, *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 9 (2013) 1–11.e3. doi:10.1016/j.jalz.2012.11.006.
- [3] J.L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, I. Silman, Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein, *Science*. 253 (1991) 872–879.
- [4] R.T. Bartus, On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis, *Exp. Neurol.* 163 (2000) 495–529. doi:10.1006/exnr.2000.7397.
- [5] R.T. Bartus, R.L. Dean, B. Beer, A.S. Lippa, The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction, *Science*. 217 (1982) 408–414.
- [6] L. Savini, A. Gaeta, C. Fattorusso, B. Catalanotti, G. Campiani, L. Chiasserini, C. Pellerano, E. Novellino, D. McKissic, A. Saxena, Specific Targeting of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Recognition Sites. Rational Design of Novel, Selective, and Highly Potent Cholinesterase Inhibitors, *J. Med. Chem.* 46 (2003) 1–4. doi:10.1021/jm0255668.
- [7] L. Ismaili, B. Refouvet, M. Bencheikroun, S. Brogi, M. Brindisi, S. Gemma, G. Campiani, S. Filipic, D. Agbaba, G. Esteban, M. Unzeta, K. Nikolic, S. Butini, J. Marco-Contelles, Multitarget compounds bearing tacrine- and donepezil-like structural and functional motifs for the potential treatment of Alzheimer's disease, *Prog. Neurobiol.* (2016). doi:10.1016/j.pneurobio.2015.12.003.
- [8] D. Ferrari, L.H. Yang, E.W. Miles, M.F. Dunn, Beta D305A mutant of tryptophan synthase shows strongly perturbed allosteric regulation and substrate specificity, *Biochemistry (Mosc.)*. 40 (2001) 7421–7432.
- [9] H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne, The Protein Data Bank, *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 235–242.
- [10] F.C. Bernstein, T.F. Koetzle, G.J. Williams, E.F. Meyer Jr, M.D. Brice, J.R. Rodgers, O. Kennard, T. Shimanouchi, M. Tasumi, The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures, *J. Mol. Biol.* 112 (1977) 535–542.
- [11] H. Haviv, D.M. Wong, H.M. Greenblatt, P.R. Carlier, Y.-P. Pang, I. Silman, J.L. Sussman, Crystal Packing Mediates Enantioselective Ligand Recognition at the Peripheral Site of Acetylcholinesterase, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 11029–11036. doi:10.1021/ja051765f.
- [12] E.H. Rydberg, B. Brumshtein, H.M. Greenblatt, D.M. Wong, D. Shaya, L.D. Williams, P.R. Carlier, Y.-P. Pang, I. Silman, J.L. Sussman, Complexes of Alkylene-Linked Tacrine Dimers with *Torpedo californica* Acetylcholinesterase: Binding of Bis(5)-tacrine Produces a Dramatic Rearrangement in the Active-Site Gorge, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 5491–5500. doi:10.1021/jm060164b.
- [13] Y. Bourne, H.C. Kolb, Z. Radic, K.B. Sharpless, P. Taylor, P. Marchot, Freeze-frame inhibitor captures acetylcholinesterase in a unique conformation, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101 (2004) 1449–1454. doi:10.1073/pnas.0308206100.
- [14] The PyMOL Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC, n.d.
- [15] M.H.M. Olsson, C.R. Søndergaard, M. Rostkowski, J.H. Jensen, PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical p K a Predictions, *J. Chem. Theory Comput.* 7 (2011) 525–537. doi:10.1021/ct100578z.
- [16] J.C. Shelley, A. Cholleti, L.L. Frye, J.R. Greenwood, M.R. Timlin, M. Uchimaya, Epik: a software program for pK(a) prediction and protonation state generation for drug-like molecules, *J. Comput. Aided Mol. Des.* 21 (2007) 681–691. doi:10.1007/s10822-007-9133-z.
- [17] R.A. Friesner, R.B. Murphy, M.P. Repasky, L.L. Frye, J.R. Greenwood, T.A. Halgren, P.C. Sanschagrin, D.T. Mainz, Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein–Ligand Complexes, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 6177–6196. doi:10.1021/jm051256o.