

## Interacciones moleculares de un flavonoide prenilado con transportadores de antimicóticos dependientes de ATP

Barceló, S<sup>1</sup>, Peralta MA<sup>2</sup>, Ortega MG<sup>2</sup>, Cabrera JL<sup>2</sup>, Pérez C<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Farmacología. Facultad de Odontología. Universidad de Buenos Aires.

<sup>2</sup>Farmacognosia. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. IMBIV (CONICET).

Recibido: 22/11/13

Aceptado: 14/03/14

### RESUMEN

Uno de los principales mecanismos para la resistencia de *Candida albicans* a azoles es la sobreexpresión de transportadores que extruyen los fármacos antimicóticos y disminuyen su concentración intracelular. Anteriormente nuestros laboratorios habían informado que el flavonoide prenilado 2', 4'-dihidroxi - 5'-(1''-dimetilalil)-6-prenil pinocembrina (6PP) inhibe en forma competitiva los transportadores *cdr*, dependientes del ATP, además de ser antimicrobiano per se.

En este trabajo realizamos estudios bioinformáticos para analizar los posibles sitios de interacción molecular estereoespecífica del 6PP, fluconazol y adenosín trifosfato (ATP) con los transportadores *cdr1* y *cdr2*. Se confeccionaron los modelos tridimensionales de los ligandos y de los transportadores a través de estudios de homología de datos respecto de otras macromoléculas.

Se calculó la variación de energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) asociada a 45 modelos de interacción molecular y se estudiaron *cdr1* y *cdr2* en forma comparativa, dada su similitud estructural. Se seleccionaron los modelos más probables desde el punto de vista termodinámico.

El 6PP y el fluconazol podrían competir de diversas maneras por un sitio estereoespecífico que atraviesa la membrana de la levadura. Este sitio, numerado como 1, fue estudiado exhaustivamente, es común a los transportadores *cdr1* y *cdr2* y aporta selectivamente distintos aminoácidos. Entre estos últimos, los de mayor participación en los modelos de interacción fueron, en *cdr1* y *cdr2*, respectivamente: PHE 754, 756 y TYR 747, 749.

Se seleccionaron los 9 mejores complejos formados por cada ligando, de acuerdo a su energía de afinidad decreciente (en KJ/mol en mejor modelo de *cdr2*: 6PP = -9,3; fluconazol = -6,8).

Además el flavonoide prenilado competiría con el ATP en el dominio citosólico y con menor probabilidad lo imitaría el fluconazol ( $\Delta G$  en KJ/mol en mejor modelo de *cdr2*: 6PP = -8,2, ATP = -7,6; fluconazol = -6,7). Los aminoácidos de mayor participación serían, en *cdr1* y *cdr2*, respectivamente: PHE 956, 958; LEU 945, 947; y ARG 909, 911.

Estos hechos podrían dar cuenta de la gran inhibición del crecimiento de *Candida albicans* provocada por el 6PP, que según trabajos previos es superior a la esperable de la inhibición del sitio de transporte del fluconazol.

Palabras clave: interacciones estereoespecíficas; unión específica entre ligandos y macromoléculas; sitios de unión de moléculas; acoplamiento de moléculas

### ABSTRACT

The overexpression of transporters that extrude antifungal agents is one of the major mechanisms of resistance to azoles in *Candida albicans*. Due these pumps, the drugs decrease their intracellular concentration and therefore their activity.

Previously, our labs had reported that the prenylated flavonoid 2', 4'-hydroxy -5'-(1''-methylallyl)-6-prenyl pinocembrine (6PP) inhibits the ATP-dependent *cdr* transporters through a competitive mechanism. Besides that, it has an antimicrobial activity by itself.

In this work we carried out bioinformatic studies in order to analyze the possible interactions between the transporters and the ligands 6PP, fluconazole (flz) and adenosine triphosphate (ATP). Three-dimensional models were built through studies on homology comparing different molecules.

Gibbs energy variation ( $\Delta G$ ) for 45 complexes formed by *cdr1* and *cdr2* pumps was calculated. The most probable models were selected from the thermodynamic point of view.

6PP and fluconazole could compete in different ways by a transmembrane stereospecific site of *Candida albicans* *cdr* pumps. The most probable site, numbered as 1 is shared by *cdr1* and *cdr2*, and was exhaustively analyzed. It contributes selectively with some aminoacids.

The most important participation was due to phenylalanine (PHE) in position 754,756 and tyrosine (TYR) 747,749, for *cdr1* and *cdr2*, respectively.

The best 9 complexes were selected, according to decreasing values of affinity energy ( $\Delta G$  as KJ/mol in the best model for *cdr2*: 6PP = -9,3; fluconazole = -6,8).

In addition, the prenylated flavonoid 6PP may compete with ATP in the cytosolic domain and fluconazole would mimic it, even with lower affinity ( $\Delta G$  as KJ/mol in the best model of *cdr2*: 6PP = -8,2, ATP = -7,6; fluconazole = -6,7). The aminoacids having higher participation would be, for *cdr1* and *cdr2*, respectively: PHE 956, 958; leucine (LEU) 945, 947; and arginine (ARG) 909, 911.

The above described interactions could be added to those previously reported by our work team and account for the high growth inhibition of *C. albicans* produced by 6PP.

**Key words:** stereospecific interactions; binding between ligands and macromolecules; molecule binding sites; docking

## INTRODUCCIÓN

Las micosis son patologías importantes en la consulta médica y odontológica. Tienen prevalencia creciente en el mundo, particularmente en pacientes inmunodeprimidos como consecuencia del SIDA, malnutrición, trasplantes, etc. Su extensión y severidad constituyen aspectos críticos, junto con las interacciones medicamentosas y el desarrollo de resistencia a los antifúngicos disponibles.

Dado que la extrusión de antimicrobianos mediada por transportadores representa un mecanismo importante de resistencia, su inhibición incrementaría la concentración intracelular de dichos fármacos y consecuentemente revertiría la resistencia a

los mismos (Fig.1).

En trabajos anteriores se demostró que el 6PP, flavonoide prenilado aislado de la leguminosa cordobesa *Dalea elegans* (Fig.2), además de ser antimicrobiano per se, inhibe en forma competitiva los transportadores tipo *cdr* presentes en *Candida albicans* resistente a azoles (Pérez et al., 2003; Peralta et al., 2012).

Tal acción inhibitoria del 6PP se reflejaría en el crecimiento celular y conduciría a la recuperación de la eficacia antimicótica del fluconazol. En efecto, el

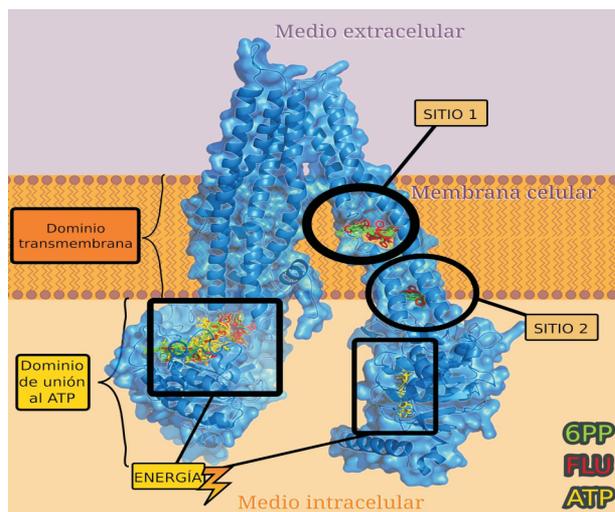


Figura 1. Transportador *cdr2* de *Candida albicans*: sitios de unión del 6PP, fluconazol y ATP. Se muestra un esquema tridimensional del transportador *cdr2* anclado a la membrana plasmática. Los sitios 1 y 2 son los de mayor probabilidad de unión del 6PP y fluconazol, según cálculos de la energía de afinidad correspondientes a las interacciones moleculares entre ellos y el *cdr2*. Dichas interacciones fueron estimadas por análisis bioinformático de acoplamiento molecular de los ligandos con el transportador. Los sitios 1 y 2 se encuentran en el dominio transmembrana; el 1 tiene mayor probabilidad de unir 6PP y fluconazol que el 2. El ATP se uniría a un dominio doble generador de energía para el transportador; se encontraron mayores probabilidades de interacción del ATP en el subdominio izquierdo. Las moléculas de los distintos ligandos se muestran en colores: verde (6PP), rojo (fluconazol), y amarillo (ATP). Todos los modelos se generaron y visualizaron a través de los programas VINA-AUTODOCK y PYMOL, respectivamente.

agregado de 6PP 100  $\mu\text{M}$  a distintas concentraciones del azol disminuye más de 1.000 veces la concentración inhibitoria 50 (CI50) del medicamento respecto del valor alcanzado en ausencia del flavonoide. Resulta de interés destacar que la CI50 del fluconazol resultante es similar a la obtenida en *C. albicans* sensible.

Sin embargo, a concentraciones menores de 6PP, la inhibición del crecimiento es mucho mayor que la esperada de la inhibición de los sitios transportadores tipo cdr (Peralta et al., 2012). Esto sugiere la participación adicional de otros sitios de acción del 6PP.

Los transportadores cdr utilizan como fuente de energía el ATP celular, razón por la cual son clasificados como ABC (sigla inglesa que proviene de "ATP binding cassette"). Existen diversos transportadores de tipo ABC relacionados clínicamente con la resistencia de *C. albicans* a azoles, entre ellos el cdr1 y el cdr2 (Maesaki et al., 1999; Tsao et al., 2009).

En este contexto, el objetivo de este trabajo fue analizar las posibles interacciones moleculares del flavonoide 6PP, el fluconazol y ATP (Fig.2) con los mismos. Para ello se utilizaron métodos bioinformáticos que analizan la estructura química de las moléculas involucradas y sus posibles reconocimientos estereoespecíficos, sobre la consideración de distintas variables que incluyen la energía físico-química requerida y las similitudes respecto de otras moléculas registradas en bases de datos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para confeccionar la estructura tridimensional de los transportadores cdr2 y cdr1 se utilizaron programas bioinformáticos de

interpretación de la estructura primaria de proteínas y de ajuste por homología con estructuras previamente analizadas por cristalografía. Además, se realizó un estudio acerca de las interacciones de las macromoléculas (Kelley and Sternberg, 2009) con sus ligandos en sus respectivos dominios (Marchler-Bauer et al, 2011).

A partir de la base de datos "Protein" del National Center for Biotechnology Information (NCBI), se precisó la secuencia de aminoácidos o estructura primaria de las proteínas transportadoras cdr2 y cdr1, siguiendo su codificación por los genes CDR2 y CDR1, respectivamente, según White et al. (2002).

Se confeccionaron los modelos tridimensionales de los transportadores con el programa bioinformático Phyre2 (Kelley and Sternberg, 2009).

Por otra parte, se plasmaron las estructuras tridimensionales de las moléculas de los ligandos 6PP, fluconazol y ATP utilizando el programa Avogadro (Marcus D Hanwell, et al., 2012).

El análisis de los sitios de interacción se realizó aplicando el programa VINA AUTODOCK (Trott, 2010).

A través del programa AUTODOCKTOOLS (Sanner, 1999) y The PyMOL Molecular Graphics System (PYMOL) se visualizaron los complejos macromolécula-ligando.

Se analizó la homología entre cdr2 y cdr1 a través de la función Multiseq (alineamiento estructural) del programa Visual Molecular Dynamics (VMD; Humphrey, 1996).

## RESULTADOS

En este trabajo se realizaron estudios bioinformáticos para analizar los posibles sitios de

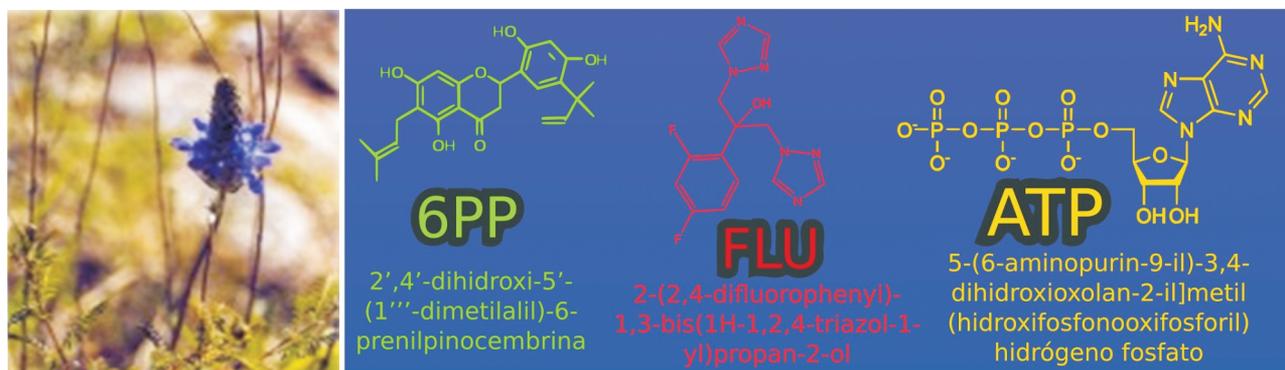


Figura 2. Estructura química de los compuestos 6PP, fluconazol y ATP que se unen a los transportadores cdr2 y cdr1. Se muestran el 6PP (en verde, extraído de *Dalea elegans*, izquierda), en rojo el fluconazol y en amarillo el ATP.

interacción molecular estereoespecífica del 6PP, fluconazol y ATP con los transportadores *cdr2* y *cdr1*.

A partir de la base de datos "Protein" del National Center for Biotechnology Information (NCBI), se precisó la secuencia de aminoácidos o estructura primaria de la proteína transportadora *cdr2*, codificada por el gen *CDR2*, según White, et al. (2002).

A continuación se confeccionaron los modelos tridimensionales del transportador mediante el análisis y la comparación de homología estructural con moléculas conocidas previamente cristalografiadas. Los datos obtenidos, con el programa bioinformático Phyre2 (Kelley y Sternberg, 2009), se muestran en la Fig.1. El modelo tiene un 100 % de confianza (excelente indicador) y 65% de cobertura (muy bueno). El *cdr2* es una molécula gigante con forma de tijera; presenta una sección que atraviesa la membrana plasmática y un dominio doble de unión al ATP inmerso en el espacio intracelular.

Por otra parte, la Fig.2 muestra las estructuras tridimensionales de las moléculas de los ligandos 6PP, fluconazol y ATP, plasmadas a través de programa Avogadro (Hanwell, et al., 2012).

Luego se analizaron los posibles sitios de interacción compartidos por las moléculas del transportador *cdr2*, fluconazol y 6PP en el dominio transmembrana. Aplicando el programa VINA AUTODOCK (Trott, 2010) se estimaron los dos sitios con mejor probabilidad para la competencia entre el 6PP y el fluconazol, denominados 1 y 2, respectivamente, en orden decreciente de probabilidad (Fig.1). Este análisis es particularmente importante ya que indica la probabilidad de unión específica de los ligandos en el canal que el transportador configura específicamente en el dominio transmembrana.

La Fig.3 muestra con detalles el sitio 1 de *cdr2* y los distintos modos de interacción del 6PP y fluconazol.

A fin de estudiar la probabilidad de formación de complejos estables ligando-transportador se calculó la variación de energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) asociada a 45 modelos posibles de interacción molecular. La Fig.4 muestra los modelos de interacción más probables del sitio 1 de *cdr2* con 6PP (izquierda) y fluconazol (derecha). A través del programa AUTODOCKTOOLS (Sanner, 1999), se visualiza la unión  $\pi$  sostenida sobre sendos ciclos aromáticos del fluconazol y la tirosina ubicada en la posición 747 de *cdr2*.

Se estudió el grado de homología de la estructura primaria por alineamiento o comparación

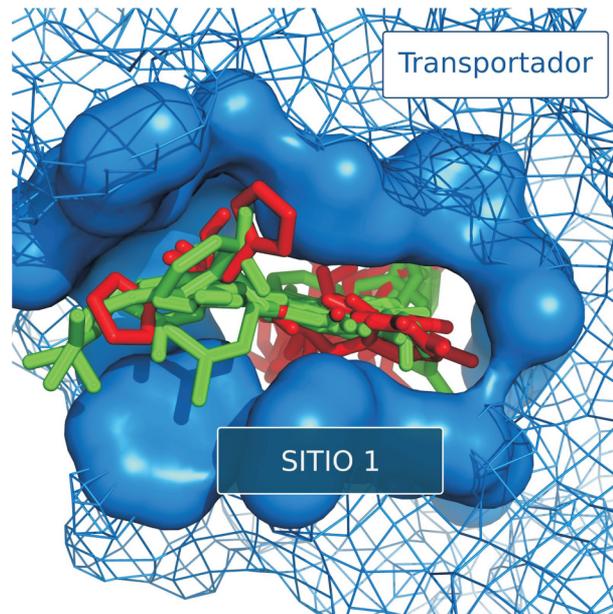


Figura 3. Interacciones del 6PP y fluconazol con el sitio 1 del transportador *cdr2* Modelo tridimensional. En azul se muestra un reticulado corresponde a una zona del transportador y una superficie que representa los aminoácidos involucrados en las interacciones. Los modelos moleculares del 6PP y fluconazol se representan en verde y rojo respectivamente. Se generaron nueve modelos tanto para el 6PP como para el fluconazol, los cuales se visualizan como superpuestos. Las estructuras de los ligandos fueron construidas con el programa AVOGADRO.

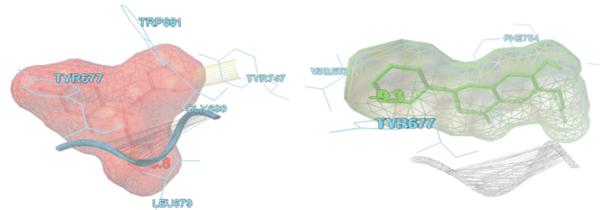


Figura 4. Modelos de interacción del 6PP y fluconazol con el sitio 1 del transportador *cdr2*. Izquierda: modelo más probable de unión del fluconazol (energía de afinidad: -6.8 KJ/mol). Se observa el esqueleto carbonado del fluconazol y la superficie molecular del compuesto representada en rojo. En celeste el bucle del sitio 1 y la estructura química de los aminoácidos del transportador que interaccionan con el ligando. En amarillo la unión  $\pi$  entre ciclos aromáticos del fluconazol y la tirosina 747. Derecha: modelo más probable de unión del 6PP (energía de afinidad: -9.3 KJ/mol). Se observa el esqueleto carbonado del 6PP en verde, y un reticulado que representa la superficie molecular del compuesto. En celeste idem gráfico de la izquierda. Los modelos de interacción fueron construidos y visualizados con los programas VINA-AUTODOCK y AUTODOCKTOOLS, respectivamente.

de secuencias según el programa BLAST (Altschul, 1997). Se obtuvieron los siguientes resultados: 85% de identidad, 92% de positividad, y un E-VALUE de 0.00. Identidad, expresada como porcentaje, es la medida en que dos secuencias coinciden en cuanto a aminoácidos y posiciones de los mismos. El porcentaje de positividad engloba todos los aminoácidos idénticos (% identidad) y a los que no coinciden pero físico-químicamente son similares. E-VALUE: representa el número de diferentes alineaciones o coincidencias con calificaciones equivalentes o mejores que la evaluada en este caso, que se espera que ocurra en una búsqueda de base de datos al azar. Cuanto más bajo sea el valor, mejor será el alineamiento y la puntuación.

Debido las similitudes estructurales (estructura terciaria) encontradas entre cdr1 y cdr2 dada por

$$\% \text{ similitud} = \frac{\text{aminoácidos en azul}}{\text{aminoácidos totales}} \geq 90 \%$$

(Fig.5), según el programa Visual Molecular Dynamics (VMD, Humphrey, 1996), se decidió analizar sus interacciones en forma comparativa.

Así, se seleccionaron los nueve mejores modelos de interacción del 6PP y del fluconazol con el sitio 1 tanto para cdr1 como para cdr2, puntuados por la energía de afinidad en orden decreciente (Fig.6). Se utilizaron programas bioinformáticos específicos (VINA-AUTOCOOCK) y se seleccionaron los modelos más probables desde el punto de vista termodinámico, según su mayor energía de afinidad.

Como puede observarse, el 6PP y el fluconazol podrían competir de diversas maneras por un sitio estereoespecífico transmembrana, común a los transportadores cdr1 y cdr2, uniéndose selectivamente a distintos aminoácidos (tabla 1). Entre estos últimos, los de mayor participación en los modelos de interacción fueron: fenilalanina (PHE ubicación 754 en cdr1, 756 en cdr2) y tirosina (TYR ubicación 747 en cdr1, 749 en cdr2).

Entre todas las uniones probables, se seleccionaron las 9 mejores para cada ligando, puntuadas por su energía de afinidad decreciente ( $\Delta G$  en KJ/mol en mejor modelo de cdr2: 6PP = -9,3, fluconazol = -6,8).

Además de actuar sobre los sitios de transporte, y según muestra la Fig.7, el flavonoide competiría con el ATP en el dominio citosólico y con menor probabilidad lo haría el fluconazol ( $\Delta G$  en

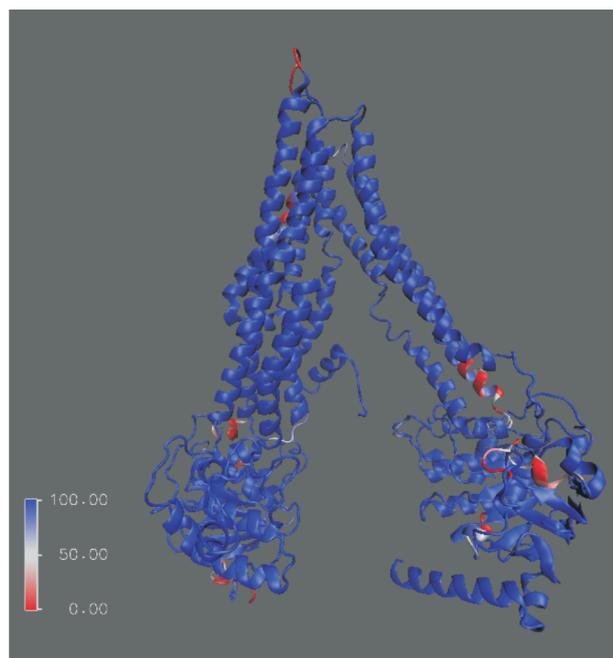


Figura 5. Diferencias y similitudes de los transportadores cdr2 y cdr1 Alineamiento estructural entre los transportadores cdr2 y cdr1 mediante la herramienta Multiseq del programa VMD. Se aplica la escala cromática RMSD que parte del azul (100% de homología entre las macromoléculas) y llega hasta el rojo (0%). Los tonos de gris representan los valores intermedios. Tanto el sitio 1 (para 6PP y fluconazol) como el dominio del ATP presentan una gran similitud debido a que son primordialmente azules.

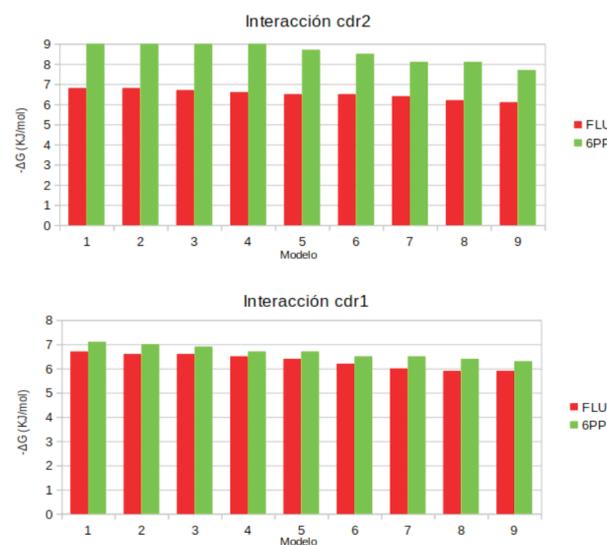


Figura 6. Variación de energía libre de Gibbs ( $-\Delta G$ ) correspondiente a las interacciones del 6PP y fluconazol con el sitio 1 de los transportadores cdr2 y cdr1. Se analizaron los mejores nueve modelos de interacción del 6PP (barras en verde) y del fluconazol (barras en rojo) con el sitio 1.

KJ/mol en el mejor modelo de cdr2: 6PP = -8,2, ATP = -7,6; fluconazol = -6,7). Los aminoácidos de mayor participación fueron, en cdr1 y cdr2, respectivamente: PHE posiciones 956, 958; LEU 945, 947; y ARG 909, 911. La tabla 2 consigna los aminoácidos que participan en las uniones del dominio energético.

En síntesis, el 6PP y el fluconazol compiten por el sitio 1 de los transportadores cdr1 y cdr2 de *Candida albicans*. Además, ambos compiten por el dominio del ATP, en el siguiente orden decreciente de afinidad: 6PP, ATP, fluconazol.

## DISCUSIÓN

Uno de los principales mecanismos para la resistencia de *Candida albicans* a azoles es la sobreexpresión de transportadores que expulsan los fármacos antimicóticos y disminuyen su concentración intracelular (Fig. 1 y 9).

Estudios previos realizados en nuestros laboratorios determinaron que una sustancia de origen vegetal bloquea en forma competitiva los transportadores dependientes del ATP del tipo cdr y revierte la resistencia al fluconazol. Se trata del flavonoide 2', 4'-dihidroxi-5'-(1'''-dimetilalil)-6-prenilpinocembrina abreviado como 6PP, que además es antimicrobiano per se (Fig.2, Pérez et al., 2003; Peralta et al., 2012).

Dado que existen varios transportadores

Sitio 1 de cdr2				Sitio 1 de de cdr1			
cdr2		FLU	6PP	6PP	FLU	cdr1	
Orden	Tipo	Nº mods	Nº mods	Nº mods	Nº mods	Orden	Tipo
761	ARG	1				763	ARG
758	HIS		1	2		760	HIS
755	TYR			2		757	TYR
754	PHE	9	9	7	9	756	PHE
753	GLY				2	755	GLY
752	TYR			1		754	TYR
751	ALA	2		1	5	753	ALA
750	LEU	1	6	2	6	752	GLY
747	TYR	1	1	6	9	749	TYR
746	ASN			3	1	748	ASN
715	PRO			6	1	717	PRO
712	GLN			3	9	714	GLN
711	ALA			2		713	ALA
708	PHE			2		710	PHE
706	ARG			3	1	708	ARG
683	ARG	2				685	ARG
681	TRP	7	7			683	TRP
680	GLY	7	2			682	GLY
679	LEU	1				681	LEU
677	TYR	5	9			679	TYR
676	PRO		1			678	PRO
674	PRO	1	1			676	PRO
673	LEU	3	4			675	LEU
672	VAL		4			674	VAL
671	PHE	1	1	1		673	PHE

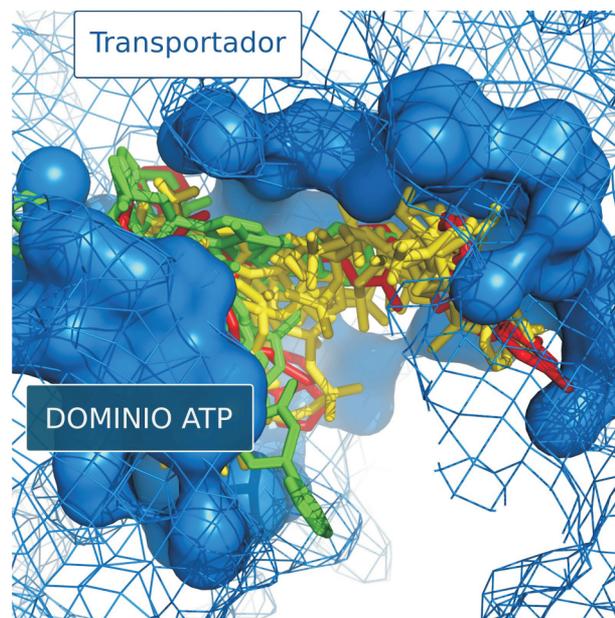


Figura 7. Interacciones del 6PP, fluconazol y ATP con el subdominio izquierdo del ATP del transportador cdr2. Modelo tridimensional; en azul se muestra un reticulado que corresponde a una zona del transportador y una superficie que representa los aminoácidos involucrados en las interacciones. Los modelos moleculares del 6PP, fluconazol y ATP se representan en verde, rojo y amarillo respectivamente. Se generaron nueve modelos tanto para el 6PP como para el fluconazol, y el ATP, los cuales se visualizan como superpuestos. Las estructuras de los ligandos fueron confeccionadas con el programa AVOGADRO.

Tabla 1: Aminoácidos que intervienen en las interacciones del fluconazol y el 6PP con el sitio 1 de los transportadores cdr1 y cdr2. Los aminoácidos se consignan según tipo y orden dentro de la estructura primaria en cada macromolécula. El tipo se nombra según el código clásico de tres letras. En cada fila se expresa la cantidad de modelos de interacción y los aminoácidos comunes a los transportadores, con sus respectivas ubicaciones. En fila marrón oscuro: aminoácidos que participan en todas las interacciones analizadas. En marrón claro: aminoácidos que participan en tres de las cuatro interacciones analizadas. En violeta: idem fila marrón oscuro pero con diferente aminoácido en cdr1 y cdr2 (ambos alifáticos o neutros).

		cdr2			cdr1				
aminoácidos		ATP	6PP	FLU	FLU	6PP	ATP	aminoácidos	
Orden	Tipo	Nº mods	Orden	Tipo					
1024	ASP					2	1	1026	ASP
1019	LEU		2	1				1021	LEU
1014	VAL		4					1016	VAL
1012	GLU	1		1				1014	GLU
1011	VAL	2	6	3				1013	VAL
1008	THR	1	1					1010	THR
997	GLU				2			999	GLU
995	ALA				1			997	ALA
993	GLY				1			995	GLY
969	LYS		2					971	LYS
961	ARG				1	1	2	963	ARG
959	TYR						1	961	TYR
958	ALA	1	2	1	1		1	960	ALA
957	SER	2	5					959	SER
956	PHE	1	2	1	1	1	2	958	PHE
955	GLY		1	1		1		957	GLY
954	LEU		1					956	LEU
953	ALA		1					955	ALA
952	GLU				2	2	1	954	GLU
948	SER				1	1	1	950	SER
947	THR					1	1	949	THR
946	PRO				1			948	PRO
945	LEU	2	1		2	2	1	947	LEU
944	HIS	3	1					946	HIS
943	VAL				2			945	VAL
942	ASP	1						944	ASP
941	GLY					2	1	943	GLY
940	GLN					1	1	942	GLN
939	GLN	2				4	6	941	GLN
937	TYR	6	5	1				939	TYR
936	GLY	2	4	1				938	GLY
935	ILE		2	1				937	ILE
933	ARG	1	1					935	ARG
932	GLN	4	1	1				934	GLN
915	ILE		1	2				917	ILE
914	ILE		1	2				916	ILE
911	THR		1	2				913	THR
910	VAL			1	1	1	1	912	VAL
909	ARG	6	1	2	3	4	4	911	ARG
907	SER	4	2	1				909	SER
904	ASN				2	4	7	906	ASN
901	THR				1			903	THR
900	THR						5	902	THR
885	PRO					1		887	PRO
884	LYS					1		886	LYS
882	TRP					1		884	TRP
870	LYS			1				872	LYS
868	ILE				3	1		870	ILE
867	LYS		1	2	2	1		869	LYS
866	VAL				2		1	868	VAL
865	GLN		1	1				867	GLN
864	TYR		1	3	1	1	1	866	TYR
860	ARG					1		862	ARG
843	GLY	3		2				845	GLY
842	LYS	4		2				844	LYS
838	LYS			1				840	LYS
836	ASN			2				838	ASN
599	LYS				2	3	3	601	LYS
598	VAL	2			2	5	4	600	VAL
597	PRO	1		1	3		1	599	PRO
596	LEU	1	1	1		1		598	LEU
595	GLU	1						597	GLU
592	ILE			1				594	ILE
48	PHE					1		50	PHE
44	LEU					3	1	46	LEU
41	ILE						1	43	ILE
40	ASN				1			42	ASN
31	HIS					1	3	33	HIS
29	GLU					1		31	GLU
28	ASN				1			30	ASN
25	HIS				1			27	HIS
24	ASN				1			26	ASN
22	SER					1		24	SER

Tabla 2. Aminoácidos que intervienen en las interacciones del fluconazol, 6PP y ATP con el subdominio izquierdo del ATP en los transportadores cdr1 y cdr2.

Los aminoácidos se consignan según tipo y orden dentro de la estructura primaria en cada macromolécula. El tipo se nombra según el código clásico de tres letras.

En cada fila se expresa la cantidad de modelos de interacción y los aminoácidos comunes a los transportadores, con sus respectivas ubicaciones. En fila marrón oscuro: aminoácidos que participan en todas las interacciones analizadas. En marrón claro: aminoácidos que participan en tres de las cuatro interacciones analizadas.

ABC en *Candida albicans*, entre ellos elegimos el cdr2 y el cdr1 para continuar nuestros estudios, dada su implicancia en la resistencia a azoles (Tsao et al., 2009). A raíz de la alta homología entre cdr2 y cdr1 demostrada en los análisis de alineamiento estructural (Fig. 5) y en hallazgos de otros autores (Gauthier et al, 2003), decidimos comparar las interacciones posibles de los dos transportadores citados con los ligandos.

Los resultados muestran que el 6PP y el fluconazol podrían interactuar tanto con el cdr1 como con el cdr2 en dos sitios del dominio transmembrana, siendo el denominado como 1 más probable que el 2 (Fig. 1). La ubicación de dichos sitios en el dominio transmembrana, dentro del canal que el transportador configura cerca de la superficie de entrada, es altamente auspiciosa. En efecto, se buscaba una interacción ligando-transportador tal que la sección del canal se viera afectada, disminuyendo la extrusión de medicamentos como el fluconazol.

En los dos sitios de transporte (dominio transmembrana) analizados, el 6PP inhibiría la unión de azoles en forma competitiva. Esto contribuiría a revertir el eflujo de azoles y la resistencia en *Candida albicans*. Tales datos son consistentes con los resultados experimentales obtenidos en nuestros laboratorios previamente (Fig. 1, 3 y 9; Peralta et al., 2012).

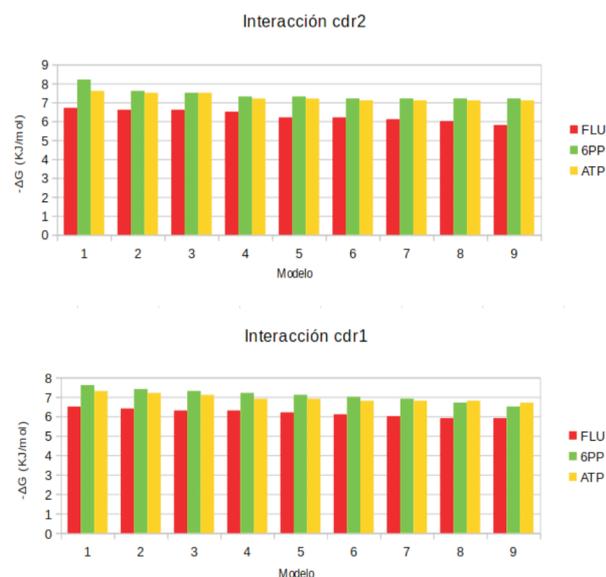


Figura 8. Variación de energía libre de Gibbs ( $-\Delta G$ ) correspondiente a las interacciones del 6PP, fluconazol y ATP con el subdominio izquierdo del ATP en los transportadores cdr2 y cdr1. Se analizaron los mejores nueve modelos de interacción del 6PP (verde), del fluconazol (rojo) y del ATP (amarillo) con el sitio de éste último.

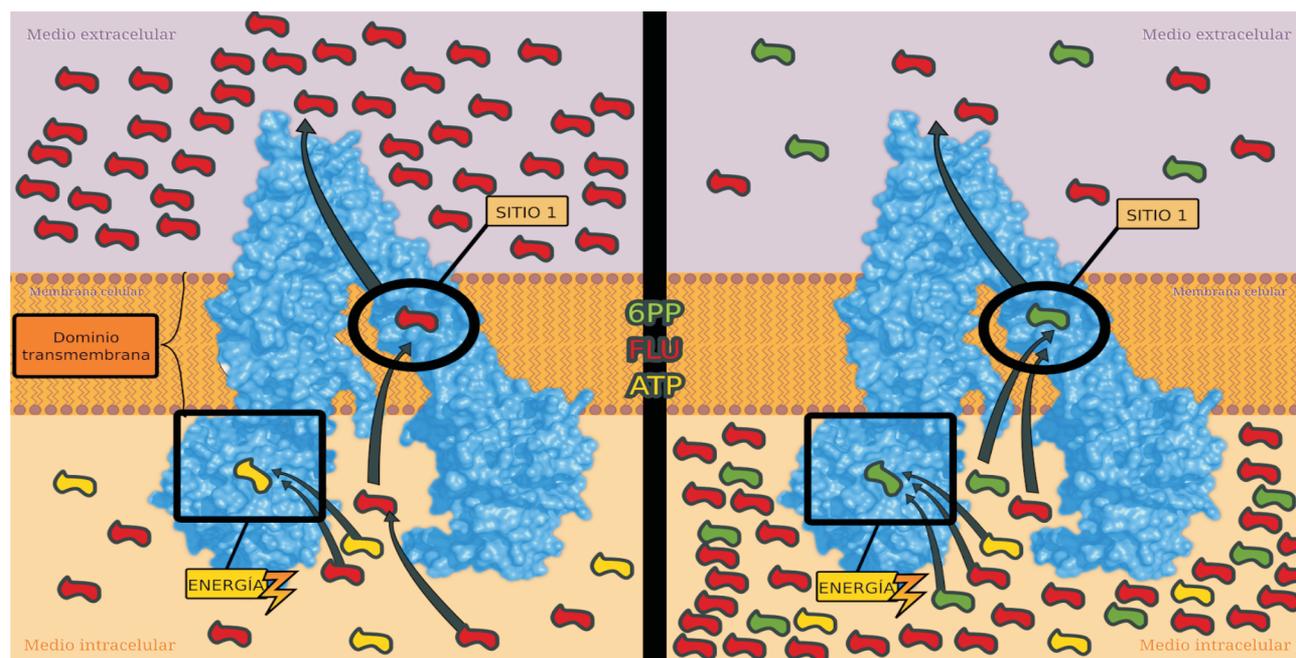


Figura 9. El 6PP revierte la resistencia a azoles en *Candida albicans* Esquema tridimensional del transportador cdr2. Izquierda: levadura resistente debido al eflujo de fluconazol mediado por transporte activo. Derecha: reversión de la resistencia por agregado de 6PP(verde), que inhibe el transportador. Sitio 1 y dominio del ATP: idem figura 1.

Dando mayor profundidad y expansión a los datos citados, el análisis bioinformático brinda detalles de los tipos de enlaces químicos y múltiples probabilidades de interacción del 6PP y fluconazol con el sitio 1 (Fig. 3, 4 y 6 y tabla 1). Cabe destacar que en todos los modelos de interacción, el 6PP se une con mayor afinidad que el fluconazol al sitio 1 de los transportadores *cdr1* y *cdr2*, con lo cual bloquearía más eficazmente las bombas expulsoras.

En las interacciones del sitio 1 participan aminoácidos en común, entre los cuales se destacan la fenilalanina (PHE ubicación 754 en *cdr1*, 756 en *cdr2*) y la tirosina (TYR ubicación 747 en *cdr1*, 749 en *cdr2*, tabla 1). Los citados residuos son potenciales blancos para el estudio de nuevos agentes terapéuticos así como también para la manipulación genética de los transportadores. La dilucidación de las estructuras químicas involucradas podría conducir a la confección de modelos de interacciones moleculares para distintos ligandos y su posterior incorporación a bases de datos aplicables a diversos análisis estructurales.

Por otra parte, se confeccionaron y analizaron modelos para la unión de 6PP, ATP y fluconazol en el dominio generador de energía del transportador (Fig. 7 y 8; tabla 2). Nuevamente, el 6PP tiene mayor afinidad por el sitio generador de energía, seguido por el del ATP y el fluconazol. Al inhibir la activación del transportador, disminuiría también la extrusión de antimicóticos azólicos y la resistencia a los mismos (Fig. 9).

Estas interacciones del 6PP con los transportadores podrían sumarse a las informadas previamente por algunos de nosotros, ya sea por inhibición de la síntesis de ATP mitocondrial en hepatocitos y células tumorales (Elingold y co., 2008) o por bloqueo de los transportadores *cdr* de *C. albicans*, Peralta et al., 2012).

Por otra parte, teniendo en cuenta los resultados obtenidos hasta ahora, y eventualmente con la exploración de nuevos sitios adicionales de interacción, se podría proponer al 6PP como modelo de ligando para ser evaluado e incorporado a bases de datos pertinentes.

Los estudios bioinformáticos son importantes herramientas complementarias a las experimentales para la identificación y optimización de la unión específica de distintas sustancias a macromoléculas. Por cierto, numerosas drogas han sido desarrolladas sobre la base de estos estudios; entre ellas, los inhibidores de las proteasas del VIH (Kitchen et al., 2004).

La información generada tendría gran utilidad en futuros estudios farmacológicos a fin de predecir la

estructura química de sustancias con potencialidad terapéutica.

## RECONOCIMIENTOS

Este trabajo fue subsidiado por FONCYT, PICT 1576, préstamo BID n° 2437. M. A. Peralta, M. G. Ortega y J.L. Cabrera son miembros de la carrera del investigador científico del CONICET.

Agradecemos el asesoramiento científico sobre bioinformática de los profesores de Introducción a la bioinformática molecular M. Martí y A. Turjanski (Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires).

## BIBLIOGRAFÍA

Altschul, S. F., et al. (1997). «Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs». *Nucleic Acid Res* 25: pp. 3389-402. PMID 9254694

Avogadro: an open-source molecular builder and visualization tool. Version 1.1.1. <http://avogadro.openmolecules.net/>

Cafaratti M, Ortega MG, Scarafia ME, Ariza Espinar L, Juliani H. (1994). Prenylated flavanones from *Dalea elegans*. *Phytochemistry* 36: 1083-1084

Elingold I, Isollabella MP, Casanova M, Celentano AM, Pérez C, Cabrera JL, Diez RA, Dubin M. (2008). Mitochondrial toxicity and antioxidant activity of a prenylated flavonoid isolated from *Dalea elegans*. *Chem-Biol Interact.* 171: 294-305.

Gauthier Christian, Sandra Weber, Anne-Marie Alarco, Omar Alqawi, Roni Daoud, Elias Georges, and Martine Raymond (2003). Functional Similarities and Differences between *Candida albicans Cdr1p* and *Cdr2p* Transporters. *Antimicrob Agents Chemother.* May 47(5): 1543-1554.

Hanwell, Marcus D, Donald E Curtis, David C Lonie, Tim Vandermeersch, Eva Zurek and Geoffrey R Hutchison (2012). "Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform" *Journal of Cheminformatics* 4:17.

Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., "VMD - Visual Molecular Dynamics" (1996). *J. Molec. Graphics* vol. 14, pp. 33-38.

Kelley LA and Sternberg MJE. *Phyre2: Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server* (2009). *Nature Protocols* 4, 363 - 371.

Kim J and Sudbery P. *Candida albicans, a major human fungal pathogen.* (2011). *J Microbiol.* 49:171-177.

Kitchen, DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J (2004). *Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications.* *Nat Rev Drug Discov.* Nov;3(11):935-49.

Maesaki S, Marichal P, Vanden Bossche H, Sanglard D, Kobno S. (1999). *Rhodamine 6G-efflux for the detection of CDR1-overexpressing azole-resistant Candida albicans strains.* *J antimicrob Chemother.* 44:27-31.

Marchler-Bauer A et al. (2011). *"CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins."*, *Nucleic Acids Res.* 39(D)225-9.

National Center for Biotechnology Information (NCBI): [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

Peralta, M.A, M. Calise, M. C. Fornari, M. G. Ortega, R. A. Diez, J. L. Cabrera, C. Pérez (2012). *A prenylated flavanone from Dalea elegans inhibits rhodamine 6G efflux and reverses fluconazole resistance in Candida albicans.* *Planta Medica* 78 (10): 981-987, DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1298627>.

Pérez C, Tiraboschi IN, Ortega MG, Agnese AM, Cabrera JL. (2003). *Further antimicrobial studies of 2',4'-dihidroxy-5'-(1''',1'''-dimethylalil)-6-prenylpinocembrin from Dalea elegans.* *Pharm Biol.* 41: 171.

PyMOL: *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4* Schrödinger, LLC.

Sanglard D, Ischer F, Monod M, Bille J. *Cloning of Candida albicans genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene.* *Microbiology.* 1997 Feb;143 (Pt 2):405-16.

Sanner, Michel F. . *Python: A* (1999). *Programming Language for Software Integration and Development.* *J. Mol. Graphics Mod.* Vol 17, February. pp 57-61.

Trott O., A. J. Olson, *AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading.* (2010). *Journal of*

*Computational Chemistry* 3, 455-461.

Tsao S., Fariba Rabkhoodae, Martine Raymond (2009). *Relative Contributions of the Candida albicans ABC Transporters Cdr1p and Cdr2p to Clinical Azole Resistance.* *Antimicrob. Agents Chemother.* 53(4): 1344–1352.

White T, Holleman S, Dy F, Mirels L, Stevens D. (2002). *Resistance mechanisms in clinical isolates of Candida albicans.* *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 1704-1713.

Dirección para correspondencia:

Catedra de farmacología,  
Marcelo. T. de Alvear 2142, 5° B Piso, (C1122AAH) ,  
Ciudad Autónoma de Buenos Aires  
Correo electrónico: [cperez@farmaco.odon.uba.ar](mailto:cperez@farmaco.odon.uba.ar)