

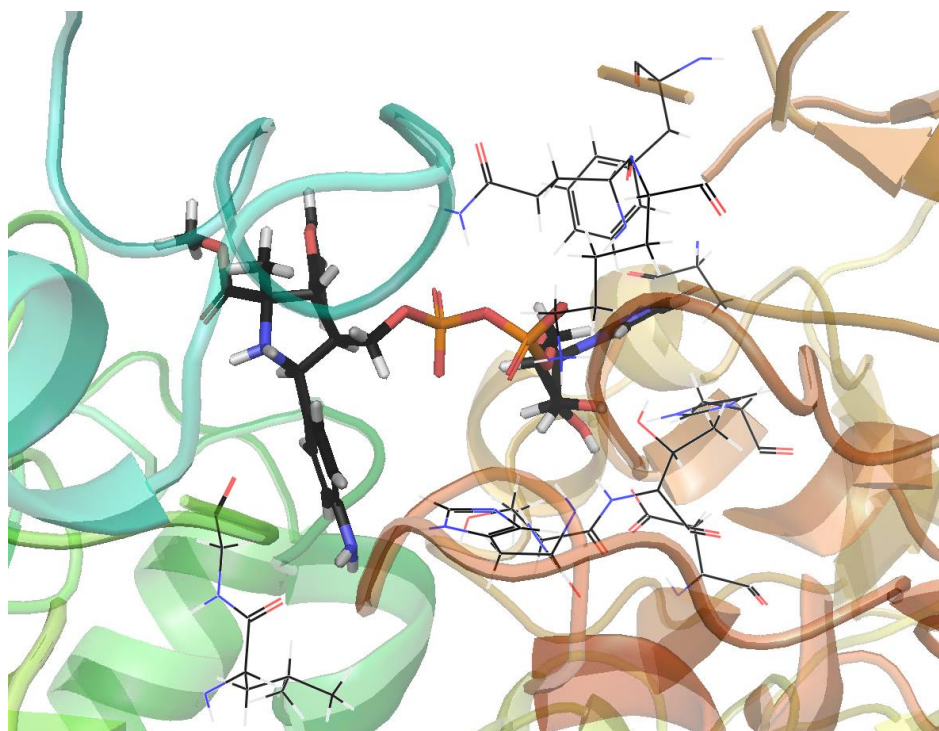


Universidad
Zaragoza



Grado en Química
Trabajo final de grado

Diseño computacional de glicomiméticos dirigidos a glicosiltransferasas.



Ignacio Jesús Sanz Martínez.

Directores:
Prof. Dr. Pedro Merino
Prof. Dr. Tomas Tejero

**Departamento de Química Orgánica
Grupo de Química Bioorgánica
Zaragoza, septiembre 2018**

Diseño computacional de glicomiméticos dirigidos a glicosiltransferasas.

Resumen:

Las Glicosiltransferasas son las enzimas que se encargan de transferir azúcares a diversos receptores como proteínas, lípidos, nucleósido, etc.

Entre las glicosiltransferasas se encuentra la enzima *O*-GlcNAc transferasa (OGT), la cual como su nombre indica, se encarga de la transferencia concreta de la acetilglucosamina. Dicha enzima se relaciona con multitud de trastornos y enfermedades en los seres vivos, incluidos humanos, lo que hace que sea una potencial diana para el desarrollo de moléculas que puedan inhibir su funcionamiento y así convertirse en potenciales fármacos para dichos trastornos.

Varios inhibidores han sido planteados para esta enzima, sin embargo, todos ellos presentan una elevada carga molecular que limita su capacidad de atravesar la membrana celular (biodisponibilidad) lo que los inhabilita como fármacos.

A lo largo de este trabajo se procede al diseño y estudio computacional de numerosos inhibidores dirigidos a la OGT, en todos ellos se busca una mayor biodisponibilidad además de, por supuesto, un buen binding con la enzima. Todo esto con el objetivo de servir de base a posteriores síntesis experimentales y posteriores estudios *in vitro* con la enzima.

Computational desing of glycomimetics directed to glycosyltransferases.

Abstract:

Glycosyltransferases are the enzymes responsible to transfer sugars to proteins, lipids, nucleosides, etc.

Within the glycosyltransferases there is *O*-GlcNAc transferase (OGT) that promotes the *N*-acetylglucosamine transference. The OGT is related to many diseases in mamals, and therefore, the OGT is a potential target for the development of new drugs. That could inhibit the enzyme and thus control the disease.

Numerous inhibitors have been reported, nevertheless, they present a lot of molecular charge and they can not pass the cell membrane (not bioavailable). They do not serve as drugs.

In this poyect, we have donde a computational study to many ligands, seeking to increase bioavailability and a good binding with the protein. The objetive of this work is to serve as a base for future studies.

Índice.

1. Introducción
2. Antecedentes
3. Objetivos
4. Métodos computacionales
5. Resultados y discusión
 - 5.1. Docking pirrolidinas 1
 - 5.1.1. Ligandos elegidos
 - 5.1.2. Resultados de los cálculos de Docking
 - 5.2. Docking pirrolidinas 2
 - 5.2.1. Ligandos elegidos
 - 5.2.2. Resultados de los cálculos de Docking
6. Conclusiones.
7. Bibliografía
8. Anexos
 - 8.1 Estructura, nombre y abreviatura de los 20 aminoácidos que conforman las proteínas.
 - 8.2 Interacciones ligando con los residuos del sitio activo 2D

1. Introducción.

Más allá de ser la principal fuente de obtención de energía biológica, los carbohidratos y moléculas que los contienen (glicoproteínas o glicopeptidos), cobran un papel fundamental en la regulación y proliferación de los seres vivos puesto que se conoce su implicación en numerosas vías de señalización y comunicación, síntesis de metabolitos y su actividad estructural.¹

Entre la multitud de enzimas que toman parte en esta regulación se destacaran aquellas que cumplen la función de catalizar la transferencia de una o más unidades de carbohidratos a otro sustrato.²

Históricamente han sido las glicosil hidrolasas, o glicosidasas, la familia de enzimas más estudiadas. Estas tienen como función hidrolizar enlaces glicosídicos en polisacáridos o especies agregadas de los mismos. Toman un papel fundamental en la regulación de un ser vivo y se pueden relacionar con numerosos trastornos sanitarios como diabetes, fibrosis quística y diversas patologías asociadas a microorganismos. Por ello han sido propuestas como dianas para la síntesis de inhibidores con el objetivo del tratamiento de dichas patologías.³

Por otro lado, las glicosiltransferasas son las enzimas encargadas en catalizar la reacción de transferencia de un grupo glicosídico sobre un sustrato de naturaleza distinta (proteína, nucleósido, lípido, etc.).⁴ De un tiempo a esta parte el interés en su estudio ha aumentado considerablemente puesto que se asocian a diferentes problemas médicos como el cáncer⁵⁻⁶ o procesos neurodegenerativos,⁷⁻⁸ entre otros.

El funcionamiento y consecuencias de acción de estas enzimas aún no se conoce con detalle, por ello resulta muy útil la búsqueda de inhibidores específicos. Con la síntesis y el ensayo de inhibidores o ligandos podemos tanto conocer la implicación real de estas enzimas como desarrollar potenciales fármacos, dada la relación de esta enzima con diferentes trastornos médicos.⁹

Las glicosiltransferasas (GTs) se han clasificado por homología de secuencia en 96 familias dentro de la Carbohydrate Active enZyme data-base (CAZy). Gracias a CAZy podemos saber que tanto el pliegue estructural como el mecanismo de acción son constantes en las diferentes familias. Sin embargo, la especificidad hacia el sustrato es más difícil de predecir.¹⁰ Por esta razón las GTs se han caracterizado en menor medida que las glicosidasas.

Dentro de las diferentes GTs destaca la *O*-GlcNAc transferasa (OGT). Esta enzima es una de las GTs más estudiadas, su función se corresponde en la transferencia de una molécula de *N*-acetilglucosamina, usando una uridina difosfato *N*-acetilglucosamida como sustrato donador, sobre residuos de serina o treonina de diferentes proteínas.¹¹ (figura 1).

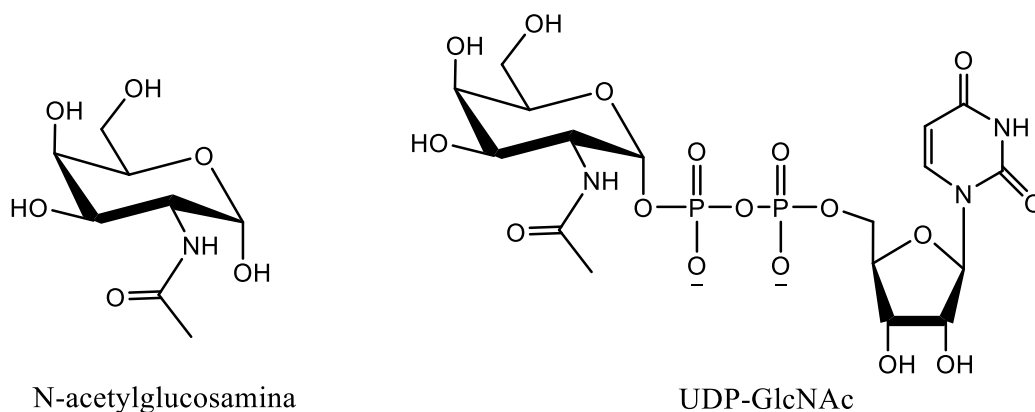


Figura 1: N-acetylglucosamina(izq) y el sustrato donador de la misma. (dcha.)

Esta transferencia está relacionada con multitud de funciones biológicas. Entre ellas la señalización celular,¹² también se ha observado que su bloqueo o sobreexpresión en el desarrollo embrionario produce malformaciones en el feto (concretamente en el caso del pez cebra)¹³ y que toma un papel fundamental en la regulación del metabolismo de la glucosa.¹⁴

La OGT se encuentra en todos los mamíferos (de forma mayoritaria en el páncreas, cerebro, corazón y músculo esquelético) y se han encontrado diferentes expresiones de la misma. Se pueden distinguir la nucleocitoplasmática (ncOGT), contiene 13 tetratricopeptido (TPR) la mitocondrial (mOGT), con 9 TPR, y las expresiones isomorfas cortas (sOGT), que presentan 3 TPR.¹³

La estructura cuaternaria de la OGT humana fue descubierta en 2011. Se corresponde con un péptido con una estructuración cuaternaria en cuatro subunidades, en las cuales las cuatro son equivalentes entre sí, y donde cada una de estas presenta un sitio activo en el cual se fija el aceptor y el donador del glúcido, y es en esta zona donde se cataliza el proceso de transferencia.

La OGT presenta dos plegamientos de Rossmann (estructura compuesta por tres o más láminas beta paralelas unidas por dos hélices alfa en el orden beta-alfa-beta-alfa-beta). Además presenta algunas particularidades entre las que se pueden distinguir que, el dominio N-terminal presenta dos hélices que contribuyen al sitio activo; entre los dos dominios tipo Rossmann aparecen unos pliegues novedosos como una hoja beta de 7 cadenas.¹⁵ (Figura 2). Si nos referimos concretamente al sitio activo, se observa que, en presencia del ligando, la distancia entre el sitio activo y la parte estructural de la enzima se ve incrementado respecto de la estructura en ausencia del mismo. Esto sugiere la acción tipo bisagra de la enzima con el fin facilitar la llegada al centro activo.¹⁶

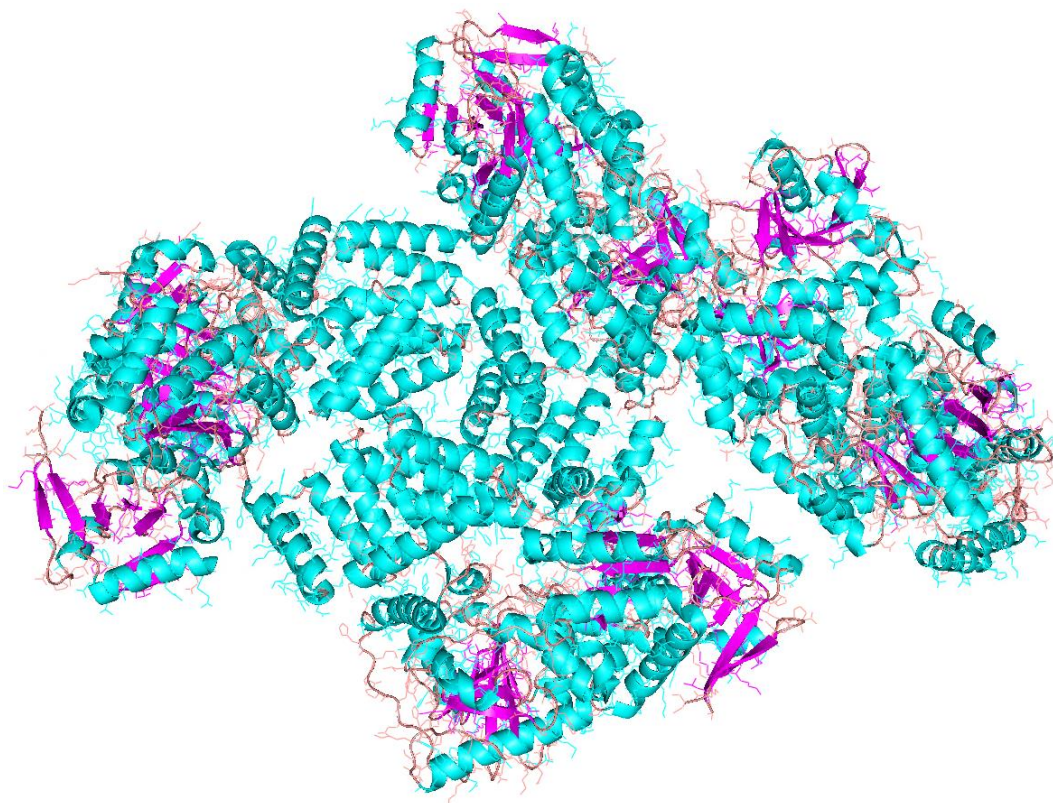


Figura 2: estructura tridimensional de la enzima OGT

El ligando natural que se encuentra en la enzima se corresponde con la molécula de UDP-GlcNAc, que actúa como sustrato donador de la GlcNAc al aceptor correspondiente.

Así pues, conociendo la relación de la enzima OGT con diversos trastornos en la salud humana resulta muy interesante la búsqueda de moléculas que puedan regular su acción, y con ello cumplir una función terapéutica.

El objetivo final ha sido desarrollar una molécula que actué como ligando de la enzima pero que al coordinarse a esta inhiba su acción.¹⁶ Para ello son varias las estrategias que se han seguido (figura 3):

- Modificación de la unidad de glucosa¹⁷(figura 3, **1**).
- sobre el anillo de ribosa (figura 3, **2**)
- Modificaciones en la base nitrogenada¹⁸ (figura 3, **3**).
- Desarrollo de inhibidores bifuncionales,¹⁹ basados en dos fragmentos conjugados que interaccionan, y por consiguiente inhiben, tanto el sitio del donador como el aceptor dentro de la enzima. (figura 3, **4**)

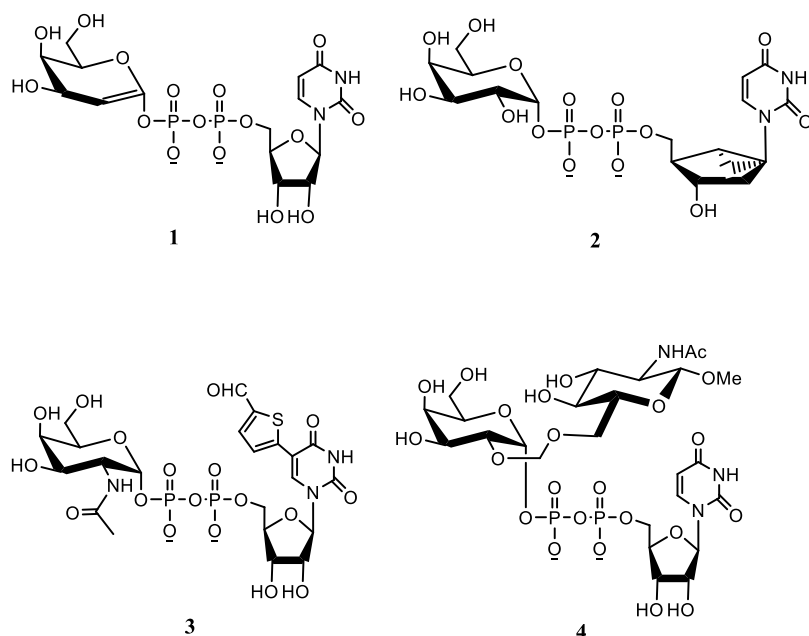


Figura 3: estrategias mayoritarias para el diseño de inhibidores.

Todos estos ligandos dan muy buenos valores de inhibición de OGT, sin embargo, la presencia del grupo pirofosfato le otorga demasiada polaridad y con ello una baja permeabilidad celular, lo que se traduce en una baja biodisponibilidad y por tanto, una incapacidad para su aplicación como medicamentos.

Por ello el actual objetivo se basa en la búsqueda de ligandos que presenten buenos valores de inhibición, pero una polaridad menos elevada y de esta forma sí puedan ser utilizados como fármacos.²⁰

2. Antecedentes del grupo de investigación.

El grupo de investigación de Química Biológica y Computacional de la Universidad de Zaragoza en el que se ha realizado este trabajo de Fin de Grado, entre otros campos de investigación, se ha centrado en las glicosiltransferasas GTs y dentro de estas en aquellas que se encargan de catalizar la reacción de glicosilación sobre una proteína. Entre ellas podemos destacar OGT, GalNAc-T2, POFUT1, POFUT 2, PimA y GpS (figura 4).

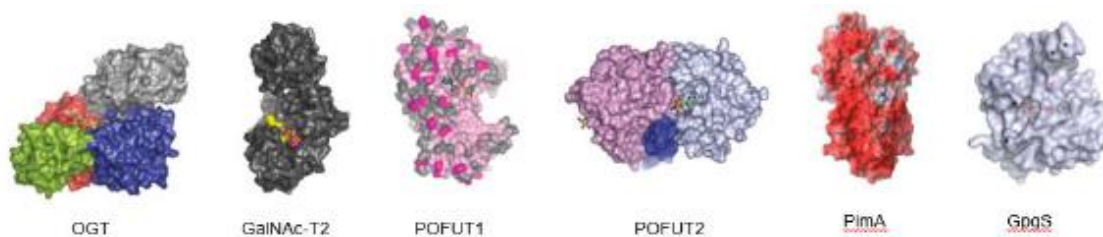


Figura 4: estructura tridimensional de las diferentes GTs estudiadas en el grupo.

De forma más específica, se ha elegido la encima OGT porque se dispone de su estructura tridimensional cristalina, además de ser una potencial diana para la síntesis de inhibidores específicos.

Como se ha comentado, a lo largo del tiempo se han desarrollado numerosos inhibidores en los cuales seguía existiendo el pirofosfato central, lo que limita la bioaccesibilidad de los mismos.¹⁶

En el grupo de investigación se ha tratado de solventar tal problema con el desarrollo de ligandos homólogos al natural **5**, en los que se sustituye uno de los grupos fosfato del puente por una cadena hidrocarbonada y el azúcar por un anillo de pirrolidina (**6**). Con estas modificaciones se busca un ligando más apolar, aumentando la biodisponibilidad, y a la vez consiguiendo una contribución al *binding* de la pirrolidina. Todo esto con el objetivo de conseguir una mayor afinidad del sustrato por la enzima y lograr así una correcta inhibición (figura 5).

Otro de los campos de trabajo del grupo es la organocatálisis, que ha permitido obtener pirrolidinas, aparentemente complejas, útiles para la síntesis de diferentes moléculas interesantes en la inhibición de la OGT (figura 5, **7**).

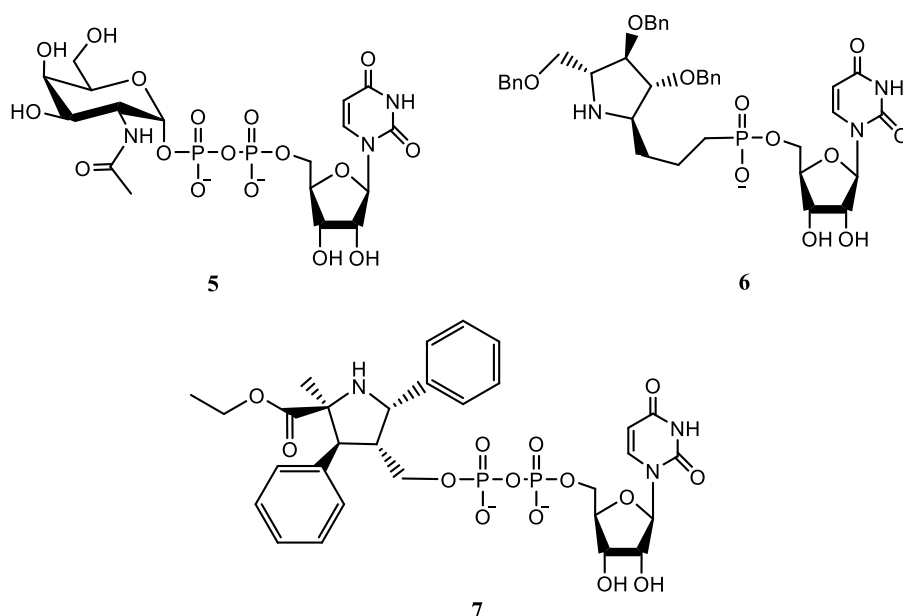


Figura 5: comparativa entre ligando natural y el tipo de ligandos buscados por el grupo.

3. Objetivos.

El objetivo de este Trabajo Fin de Grado consiste en llevar a cabo una valoración por métodos teóricos, *Docking*, de la interacción entre un amplio número de potenciales inhibidores de la OGT.

Para el desarrollo de este objetivo, se pueden diferenciar dos partes:

Una primera en la cual se lleva a cabo el estudio sobre una serie de ligandos, donde se mantiene constante, respecto al natural, el nucleósido. El azúcar se intercambia por una pirrolidina simple que se mantiene invariable en casi todos ellos. El cambio fundamental se realiza sobre el difosfato del puente. En estos ligandos se va cambiando la secuencia química del puente entre la pirrolidina y el nucleósido (totalmente hidrocarbonada, con un único fosfato, además este fosfato se va cambiando de posición, se añaden grupos tipo eter, etc.).

Por otro lado, se evaluarán otra serie de potenciales inhibidores en los cuales lo que se mantendrá constante será tanto el pirofosfato como el nucleósido (UDP) y lo que se irá modificando será la pirrolidina. De esta forma se puede estudiar por comparación la contribución de esta al *binding* del ligando.

Todo ello con la finalidad de limitar de manera muy considerable el número de síntesis experimentales a realizar en el laboratorio. La síntesis de un producto químico como los ligandos con los que se trabajan conlleva un gasto muy elevado, tanto económico como temporal, aún más si se tienen en cuenta los posteriores ensayos experimentales con la propia enzima.

Así pues, gracias al estudio computacional, realizado con un ordenador sencillo, se pueden evaluar numerosos ligandos y con los resultados llevar a cabo una criba, conocer y evaluar el binding de cada uno con la enzima y por consiguiente su potencial validez para continuar los ensayos, pero ahora con un espectro mucho más reducido.

4. Métodos computacionales.

La evaluación de la interacción de los diferentes ligandos con la enzima OGT se basará en cálculos de docking, llevados a cabo mediante software *maestro* de la compañía Schrödinger (<https://www.schrodinger.com/maestro>).

Para la visualización y obtención de representaciones tridimensionales se usará el software *Pymol*, implementado, de igual manera que *maestro*, a partir de Schrödinger.

Para poder llegar a conseguir unos resultados adecuados y correctos acerca de los diferentes ligandos se ha de seguir un protocolo determinado.

En primer lugar, es necesario disponer de un fichero que contenga la estructura cristalina de la enzima (fichero PDB), extraído del Protein Data Bank. Una vez se dispone del fichero se carga dentro del software de *maestro*. Tras la carga del fichero se dispondrá una representación tridimensional de los residuos de la proteína (figura 2).

En este punto ya tendremos una representación de la proteína. Tratándose de la OGT, que teóricamente presenta una subunidad idéntica repetida cuatro veces, se deben eliminar 3 de las 4 subunidades (*delete-Chain-seleccionar 3 de ellas*) para poder trabajar con facilidad. Ya con una única subunidad (figura 6) el siguiente paso es preparar la proteína para realizar los cálculos.

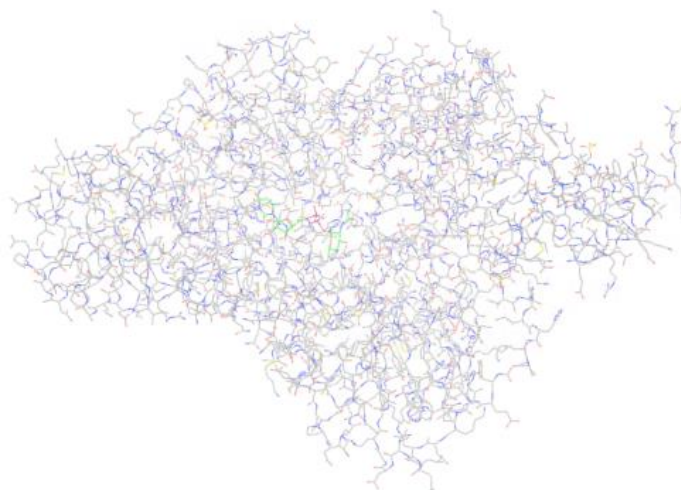


Figura 6: eliminación de las Subunidades no necesarias

En el supuesto que el agua no intervenga en el proceso de catálisis, el primer paso será eliminar las moléculas de aguas presentes en el RX de la proteína (*delete-waters*). Tras la eliminación de las moléculas de agua se debe llevar a cabo una preparación de la proteína

(figura 7). Tras la preparación habrá que optimizarla y minimizarla, para ello se deben seguir los siguientes pasos: *Applications-prime-protein refinement-minimize* y seleccionar que minimice todos los átomos del espacio de trabajo. (Figura 8).

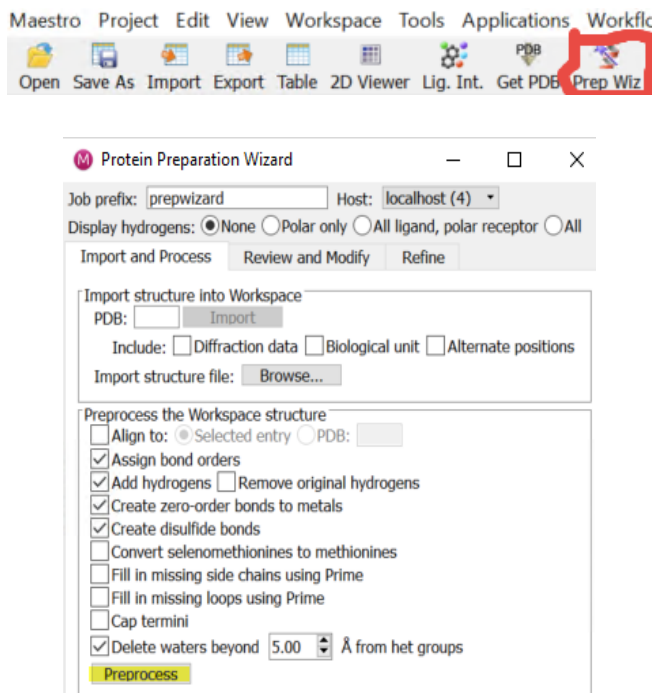


Figura 7: preparación de la proteína.

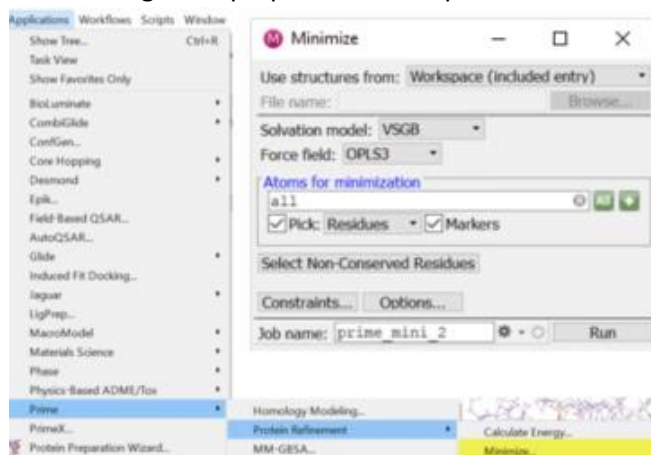


Figura 8: proceso de minimización de la proteína.

Llegados a este punto se puede observar si la proteína ha cambiado tras el refinamiento, para ello únicamente hay que superponer las dos entradas generadas, tras la preparación y tras la minimización.

El siguiente paso se corresponde con fijar la zona catalítica de la enzima, *Glide*, para ello se busca el ligando en el interior de la proteína (*show-ligands*), una vez que únicamente aparezca el ligando en el espacio de trabajo se sigue la siguiente metodología: *Applications-glide-receptor Glide generation-site-centroid in selected residues- "seleccionar el ligando en el workspace"- nombrar de forma reconocible el Glide-y presionar "run".* (figura 9)

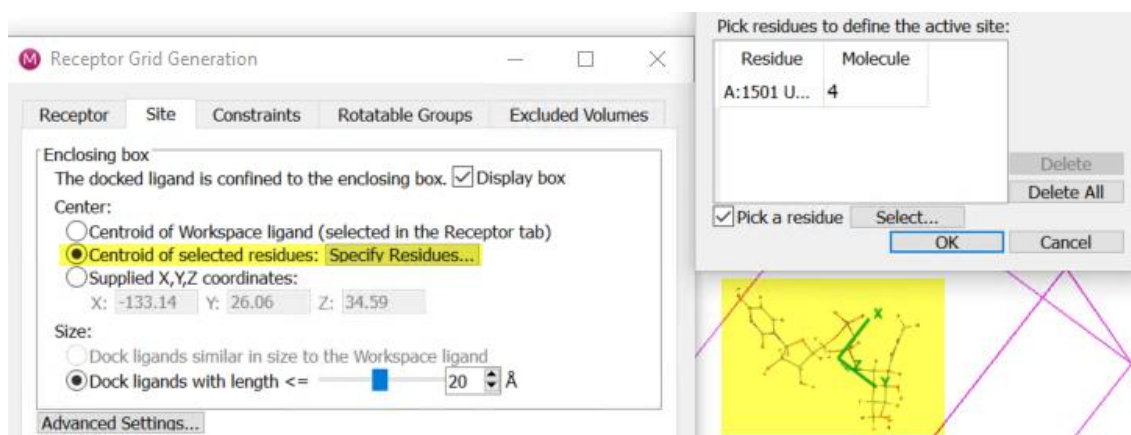


Figura 9: definición del *glide*.

Lo siguiente es preparar todos los ligandos que se quieran evaluar, para ello se pueden importar desde diversos softwares para dibujar estructuras de moléculas (chemdraw en 2D y pasarlo a 3D con chem 3D, gauss view, etc...) o dibujarlas directamente en maestro, en el *workspace* directamente en 3D, o en 2D (*2D sketcher*) y convertirlos a 3D, *create new entry*. Todos los ligandos se agrupan en un mismo grupo.

Una vez obtenidas las estructuras de todos los ligandos se deben preparar y optimizar para la realización de docking, para ello se sigue los siguientes pasos: *applications-Ligprep* “generate posible states at target pH 7.0 +/- 2”-“retain specified chiralities...” (figura 10).

De esta forma, se consiguen todas las conformaciones posibles de los ligandos y todos los posibles estados de ionización que se puedan presentar al pH que se encuentra la enzima dentro del organismo.

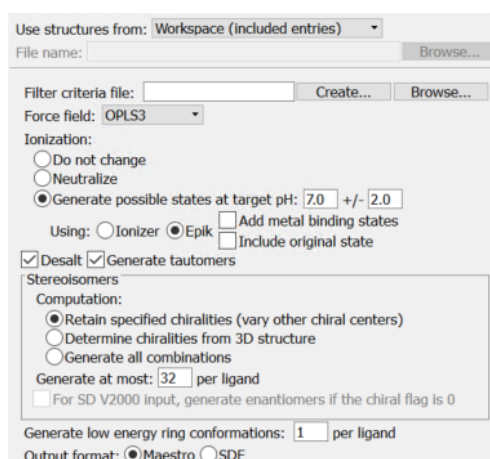


Figura 10: preparación de los ligandos.

Lo último que queda es llevar a cabo el docking, para ello: *applications-glide-Ligand Docking*-“seleccionar el fichero del glide”- “marcar las siguientes opciones (Figura 11)”- “run”.

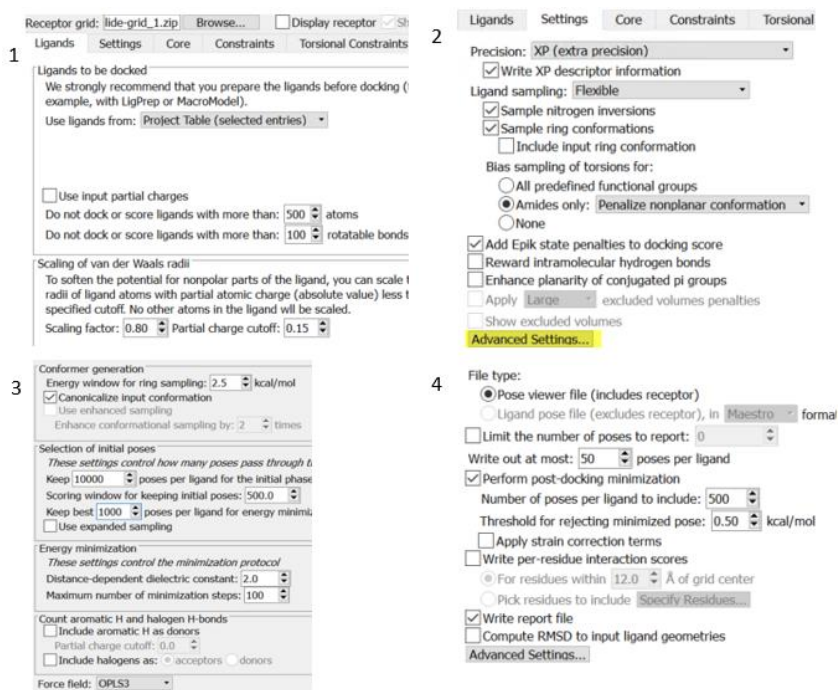


Figura 11: parámetros de realización docking

5. Resultados y discusión.

El objetivo del trabajo consiste en la evaluación de la capacidad inhibitoria de distintos ligandos. Los ligandos a evaluar se dividirán en dos clases. En ambos grupos se incorporará el ligando natural como referencia de comparación frente al resto de moléculas a evaluar.

5.1. Docking pirrolidinas 1 (poliObN)

Un primer grupo de ligandos donde se estudiarán diferentes glicomiméticos. Estos se basarán, en una tónica general, en la sustitución del azúcar por una pirrolidina, mayoritariamente polisustituida por ObN's, y sobre el puente pirofosfato, entre azúcar y nucleósido, se variará por cadenas hidrogenadas con algún grupo fosfato, éter, etc...

5.1.1. Ligandos elegidos.

En este primer docking se llevará a cabo la evaluación de 11 posibles ligandos que sean, potencialmente, buenos inhibidores de la OGT. Realmente se estudiarán 10 ligandos más el natural.

El ligando natural **5** será el primero a incluir en el docking, el segundo ligando a evaluar será un homólogo al natural, pero en este caso se sustituirá un grupo fosfato por una cadena hidrocarbonada **8** (figura 12).

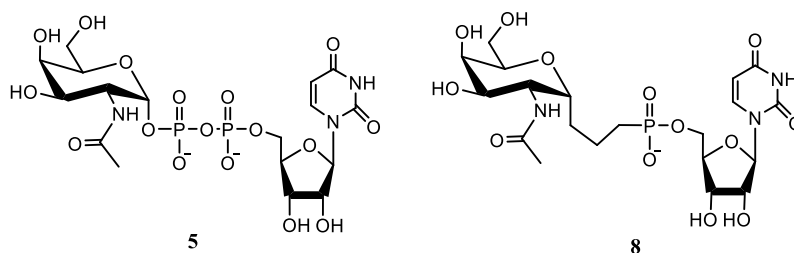


Figura 12: ligandos docking 1 que mantienen el azúcar.

Los siguientes 6 (**6** y **9-13**) ligandos se corresponden con la sustitución del azúcar por una pirrolidina simple, polisustituida por OBn, y adicionalmente se lleva a cabo diferentes variaciones en el pirofosfato, buscando con ello disminuir la polaridad para aumentar la biodisponibilidad.

En el ligando **9** un átomo de oxígeno puente del primer grupo fosfato es eliminado. En el ligando **6**, se elimina totalmente el primer grupo fosfato de la cadena y se sustituye por una cadena hidrocarbonada. En el ligando **10** se sustituye un grupo P(O)OH por un CH₂. El siguiente ligando **11**, mantiene el primer P(O)OH y el resto de átomos del puente se sustituyen por una cadena hidrocarbonada. La estructura del ligando **12** es similar a la anterior, pero mantiene el átomo de oxígeno, que enlaza con el nucleósido. El último de este subgrupo de ligandos **13**, es similar a **6**, pero con un átomo de carbono menos en la cadena que sustituye al grupo fosfato (figura 13).

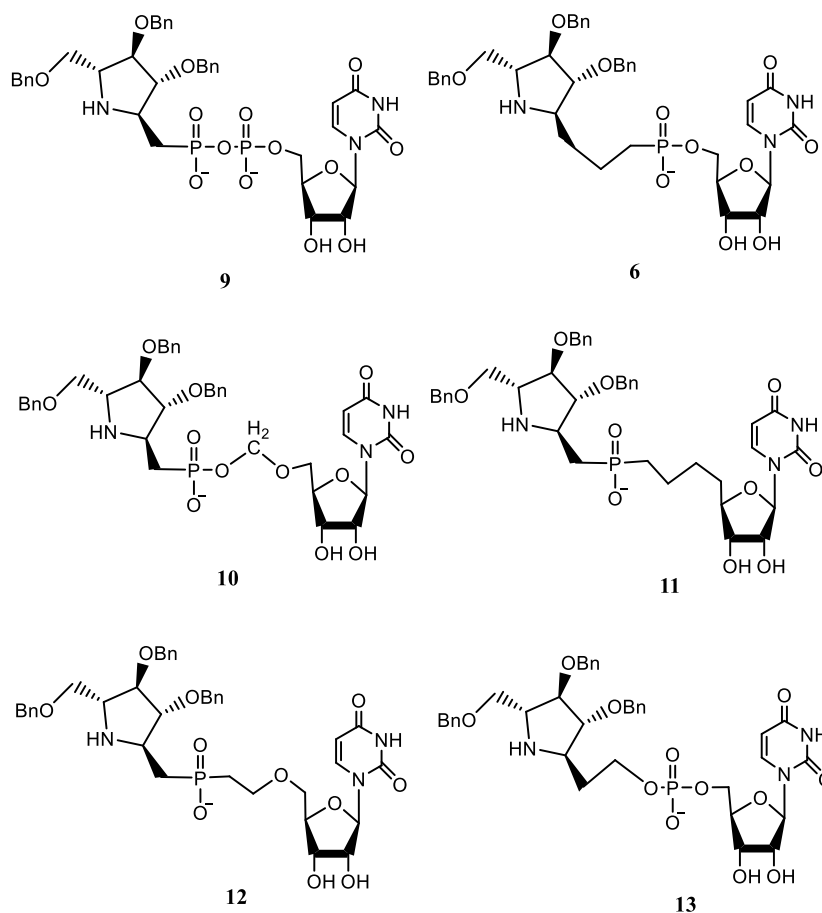


Figura 13: serie de ligandos con pirrolidinas poliOBn.

Para terminar el docking se incluyen 3 ligandos que presentan un sustituyente distinto en el átomo de nitrógeno de la pirrolidina.

En el caso del ligando **14** sobre el átomo de nitrógeno se acoplará un grupo voluminoso como el Boc.

El resto de ligandos serán similares, pero intercambiando el grupo terc-butilo por bencilo, ligando **15**, o por fenilo en el ligando **16** (figura 14).

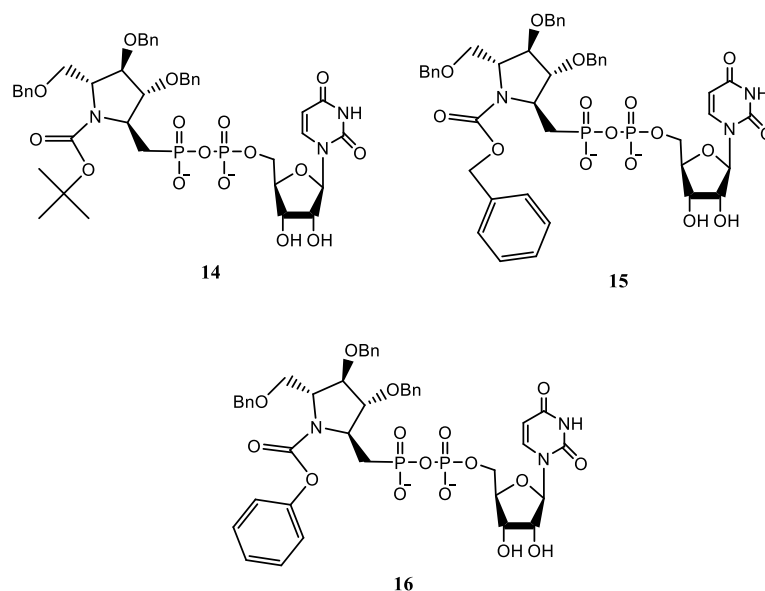


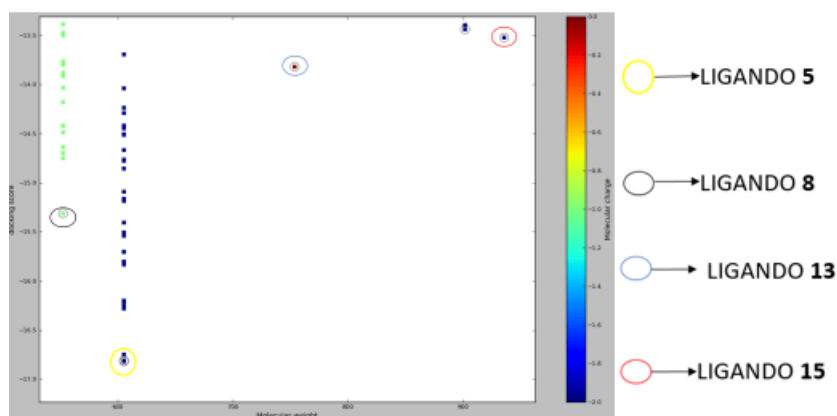
Figura 14: pirrolidinas con sustitución en el nitrógeno del heterociclo.

5.1.2. Resultados de los cálculos de docking.

Sobre todos los ligandos planteados se efectuaron los cálculos de docking de manera conveniente (descrito en métodos computacionales) y a raíz de los resultados obtenidos se realizó el estudio más concreto de los mejores en comparación con el ligando natural.

De todos los valores que nos otorga el cálculo docking el más relevante es el “docking score”, cuanto menor sea este mayor será la interacción de la molécula con el sitio activo de la enzima, o lo que es lo mismo, mayor será la capacidad inhibitoria de los ligandos propuestos.

De esta forma tras la realización del docking sobre los 11 ligandos propuestos, y todas sus conformaciones generadas en los pasos previos, se obtuvieron las siguientes docking scores. El resultado expuesto se corresponde con una organización según un gráfico donde, en el eje vertical se disponen las docking scores, en el eje horizontal el peso molecular de cada ligando, de esta forma unificamos en el grafico todas las conformaciones generadas, y donde el color asignado a cada ligando se corresponde con la carga de la molécula. Además, sobre el grafico obtenido se realizará un zoom para centrarnos en los ligandos que presenten mejores resultados. (figura 15).



Si nos referimos a la conformación y carga del ligando concreto:

| Ligando | Docking Score |
|------------|---------------|
| LIGANDO 5 | -16.818 |
| LIGANDO 8 | -15.312 |
| LIGANDO 13 | -13.820 |
| LIGANDO 15 | -13.523 |

Figura 15: docking scores del primer docking

En definitiva, después del cálculo mediante docking llegamos a la conclusión, que sin tener en cuenta el ligando natural (que obviamente es el que mejor interacciona), los ligandos que pueden competir con el binding del natural se corresponden con el ligando **8**, el ligando **13**, el ligando **15**.

Sobre estos candidatos, se realizará un estudio más exhaustivo de las interacciones con los diferentes residuos que conforman el sitio activo de la OGT. La metodología que se seguirá se corresponderá al estudio del ligando natural y después el del resto de los glicomiméticos.

Entre el ligando y la proteína se pueden diferenciar tres tipos de interacciones: enlaces tipo H Bond, que son relativamente fuertes, interacciones entre sistemas π (π stackings) e interacciones polares de menor intensidad.

El ligando natural se orienta de una forma determinada en el sitio activo, esta orientación viene determinada por las diferentes interacciones que se origina entre el ligando y los aminoácidos que se encuentran en dicho sitio.

De esta forma, la lista total de aminoácidos que interaccionan con la UDP-GlcNAc se corresponde con la siguiente tabla, en la que podemos distinguir las diferentes interacciones que tienen lugar (tabla 1).

Tabla 1: listado de aminoácidos según tipo de interacción con el ligando 5.

| Aminoácidos interacción con ligando 1 | | | |
|---------------------------------------|-----------------------------|----------|---------|
| H Bonds | Interacciones π - π | Contacts | |
| GLY-654 | HID-901 | TYR-841 | ARG-904 |
| LEU-653 | PHE-868 | GLY-919 | PHE-868 |
| HID-498 | | ASN-918 | PHE-694 |
| GLN-839 | | ASN-838 | TYR-655 |
| THR-921 | | PRO-559 | PRO-636 |
| THR-922 | | HID-562 | THR-633 |
| LYS-842 | | PRO-897 | MET-501 |
| ALA-896 | | VAL-895 | |
| ASP-925 | | LEU-866 | |

Una vez conocidos la totalidad de las interacciones nos centraremos en desarrollar de forma detallada las más representativas de todas ellas. Estas son tanto los enlaces de hidrogeno (H Bond) como las interacciones π - π ya que se tratan de las interacciones más intensas. De esta forma se facilita la comprensión de las mismas (figura 16).

Si nos referimos a las interacciones por enlace de hidrogeno del ligando natural con los diversos aminoácidos nos encontramos con que en el caso del glúcido el residuo GLY-654 interacciona mediante un puente de hidrogeno entre su grupo carbonilo y el hidrogeno del grupo OH enlazado a C3.

De la misma manera la LEU-653 forma un enlace de hidrogeno entre su grupo carbonilo y el OH de C1. La HID-498 interacciona mediante uno de sus átomos de nitrógeno del ciclo con un grupo OH de C4.

El grupo pirofosfato central del ligando interactúa con la LYS-842 mediante dos enlaces de hidrogeno, por un lado, con el grupo O⁻ del fosfato más cercano al azúcar mediante uno de sus grupos NH₂ y con el grupo NH restante con el grupo O⁻ del fosfato adyacente a este. La GLN-839 también forma dos enlaces de hidrogeno distintos, por un lado, su NH₂ terminal con el O=P del fosfato, y el otro NH con el O⁻ del mismo grupo fosfato, el adyacente al nucleósido. Para terminar el pirofosfato falta por nombrar la interacción tanto de la THR-921 y 922, ambos grupos NH de cada una de ellas interacciona con el P=O del primer fosfato.

Por último, por parte del nucleósido, el grupo OH del C11 forma un enlace de hidrogeno con el oxígeno del grupo OH terminal del ASP-925. Por su parte la base nitrogenada forma un enlace de hidrogeno mediante el C=O del carbono 16 con el Hidrogeno amínico de la ALA-896 y el NH de la base con el C=O del amino acido. Además, se pueden encontrar dos interacciones tipo π -stacking entre el sistema π de la base y los sistemas π tanto de la HID-901 como de la PHE-868.

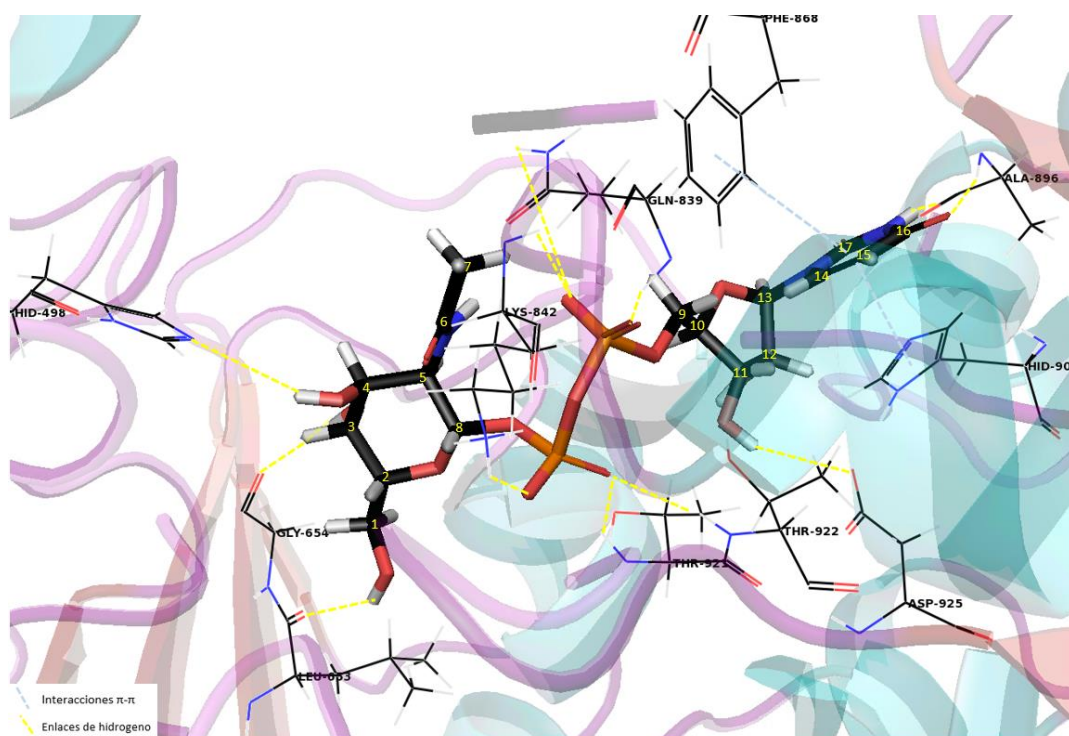


Figura 16: Interacciones más relevantes del ligando **5** con el entorno de la enzima. La numeración de los distintos carbonos no sigue ningún criterio concreto. Los átomos de carbono se representan en negro, los de nitrógeno en azul, los de oxígeno en rojo, hidrogeno blanco y los de fosforo en naranja. (aplicable a todas las figuras).

Una vez se dispone de la referencia de las principales interacciones del ligando natural, es el momento de evaluar los 3 ligandos más relevantes según el docking score obtenido en el proceso experimental.

En la tabla 2 se muestran las principales interacciones del ligando **13**.

Tabla 2: listado de aminoácidos según tipo de interacción con el ligando **13**.

| Aminoácidos interacción con ligando 13 | | | | | |
|---|-----------------------------|----------|---------|---------|---------|
| H Bonds | Interacciones π - π | Contacts | | | |
| THR-560 | HID-901 | PRO-559 | ASN-918 | VAL-895 | THR-922 |
| LEU-653 | | GLY-654 | CYS-917 | LEU-866 | GLN-839 |
| LYS-842 | | TYR-655 | MET-501 | ARG-904 | LEU-563 |
| ASP-925 | | HID-920 | HID-562 | ALA-896 | HID-558 |
| | | HID-498 | LYS-898 | PRO-897 | PHE-694 |
| | | ALA-942 | PHE-837 | THR-921 | |
| | | PRO-656 | PHE-868 | ASN-838 | |

La principal diferencia observable es la aparición de un nuevo aminoácido, la THR-560 que forma un enlace de hidrogeno con el OH del C1, por su parte la interacción con la LEU-653 varía respecto al ligando natural. En este caso el grupo C=O del residuo enlaza con dos hidrógenos de distintos grupos OH de C3 y C4. Al presentar únicamente un grupo fosfato la LYS-842 solo interacciona con el oxígeno del P=O. (figura 17)

La función de la ASP-925 también varía respecto al sustrato natural, y es que, en este caso, son los dos grupos OH del azúcar los que forman el puente de hidrogeno con el oxígeno del OH terminal del aminoácido. El resto de aminoácidos interaccionan de forma homologa al caso natural. (figura 17)

La menor energía de binding de este ligando puede deberse seguramente a la disminución de interacciones tanto π , PHE-868, como por puentes de hidrogeno, ya que se pierden HID-498, GLY-654, GLN-839, THR-921 y THR-922 (figura 17).

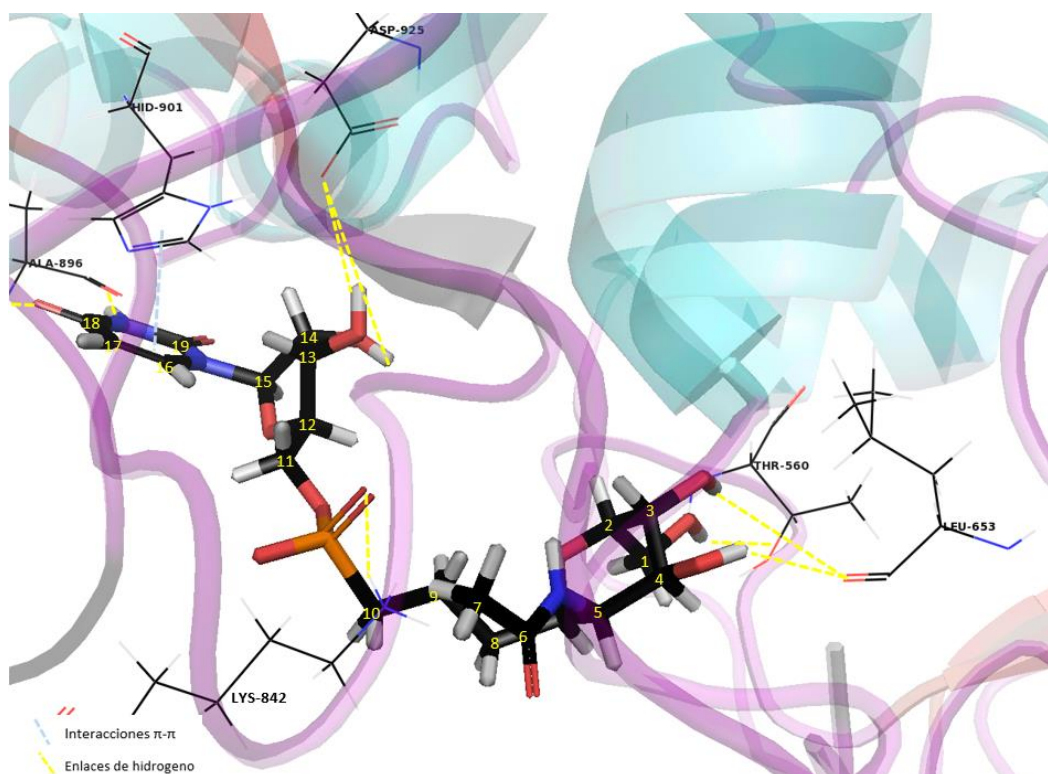


Figura 17: interacciones ligando **8**

Por su parte el ligando **13** interacciona con los siguientes residuos de la OGT. (Tabla 3).

Tabla 3: listado de aminoácidos según tipo de interacción con el ligando **13**.

| Aminoácidos interacción con ligando 13 | | | | | |
|---|-----------------------------|----------|---------|---------|---------|
| H Bonds | Interacciones π - π | Contacts | | | |
| TYR-841 | HID-461 | LYS-634 | LEU-866 | ASN-838 | LEU-653 |
| HID-498 | PHE-868 | LYS-430 | VAL-895 | MET-501 | GLY-654 |
| GLN-839 | HID-901 | HID-499 | PRO-897 | HID-558 | PRO-656 |
| LYS-842 | | ILE-435 | HID-562 | PRO-559 | THR-633 |
| ASP-925 | | ILE-465 | LYS-898 | THR-560 | TYR-632 |
| ALA-869 | | HID-920 | THR-921 | LEU-563 | |
| | | PHE-837 | THR-922 | PHE-694 | |

El número de interacciones en este caso, es claramente superior al ligando **8**. Si se compara frente al ligando **5**, el número de interacciones por enlace de hidrogeno es inferior. En el caso del ligando **13** el único enlace de hidrogeno que se forma con un aminoácido diferente al caso natural es la TYR-841, este aminoácido enlaza mediante el átomo del oxígeno del OH terminal con el NH_2^+ (que se origina al pH de trabajo de la encima) en el ligando. A diferencia del ligando natural, la HIS-498 no forma un puente de hidrogeno con un OH, sino que lo hace con el otro átomo de hidrogeno del nitrógeno de la pirrolidina. Por su parte la LYS-842 y la ASP-925 interaccionan de forma idéntica al ligando **8**. La GLN-839 se escapa un poco al comportamiento observado en el ligando natural, y es que en este caso interacciona con el P=O del fosfato (como en el ligado natural), pero al revés que este, interacciona mediante el otro hidrogeno del grupo amino con el átomo de oxigeno unido al C8. La ALA-896 es idéntica al ligando natural.

Si nos referimos a las interacciones tipo π - π , además de la base nitrogenada con la PHE-868 y HID-901, el ligando **13** presenta una interacción mediante uno de los bencilos unido a C1 con la HID-461. (Figura 18).

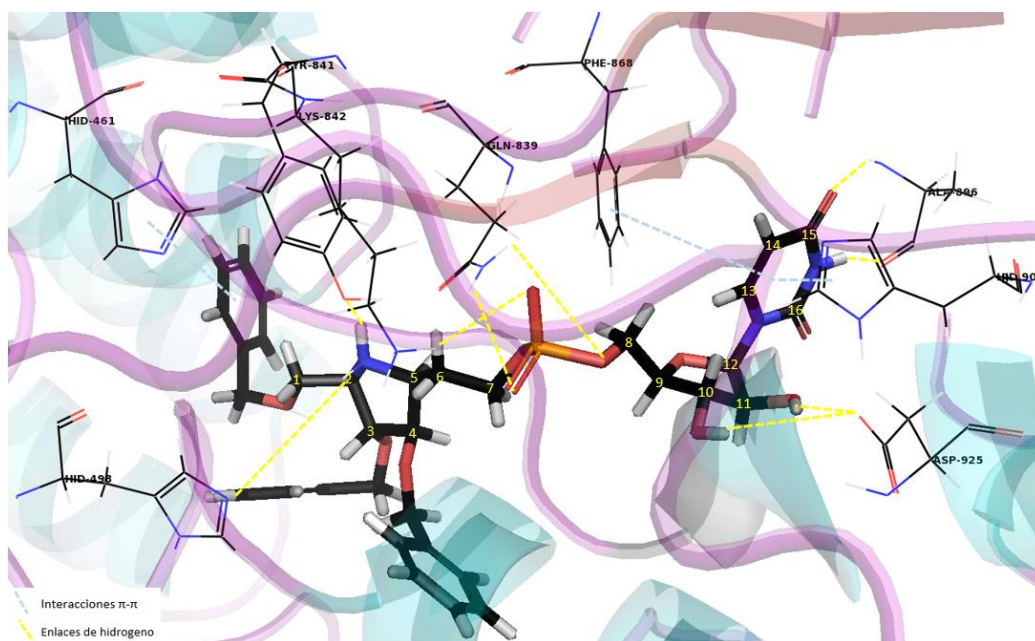


Figura 18: interacciones ligando **13**

Por su parte el ligando 10 interaccionará con los siguientes residuos. (tabla 3)

Tabla 3: listado de aminoácidos según tipo de interacción con el ligando **15**.

| Aminoácidos interacción con ligando 15 | | | | | |
|---|-----------------------------|----------|---------|---------|---------|
| H Bonds | Interacciones π - π | Contacts | | | |
| GLN-839 | HID-461 | LYS-430 | THR-633 | HID-920 | PHE-837 |
| LYS-842 | HID-901 | ASP-431 | TYR-632 | GLY-654 | PHE-868 |
| ASP-925 | | HID-499 | HID-498 | TYR-655 | THR-921 |
| HID-901 | | TYR-841 | HID-496 | PHE-694 | THR-922 |
| LYS-898 | | HID-461 | PRO-559 | PRO-897 | HID-562 |
| ALA-896 | | HID-558 | PRO-656 | ALA-896 | ASN-838 |
| | | LYS-634 | LEU-653 | LEU-866 | |

El ligando número **15** interacciona de forma idéntica al ligando **8** y **13** por los residuos de ASP-925, LYS-842 y de forma idéntica a todos los estudiados con la ALA-896. La GLY-839 es algo diferente al resto de casos puesto que esta además de interaccionar con el P=O del primer fosfato, partiendo desde la pirrolidina, otorga un enlace de hidrogeno con C=O que sale del nitrógeno del ciclo. El ultimo enlace de hidrogeno que se puede observar es el forma entre la HID-901 (el átomo de nitrógeno trisustituido del ciclo) con un grupo OH del glúcido que compone el glucósido. Esta Histidina también da un π -stacking con la base nitrogenada. Como el caso del ligando **13**, en este ligando también hay una contribución de la pirrolidina al binding mediante una interacción π - π , del anillo aromático que presenta HID-461 y el sustituyente CH₂OBn de la pirrolidina. (Figura 19).

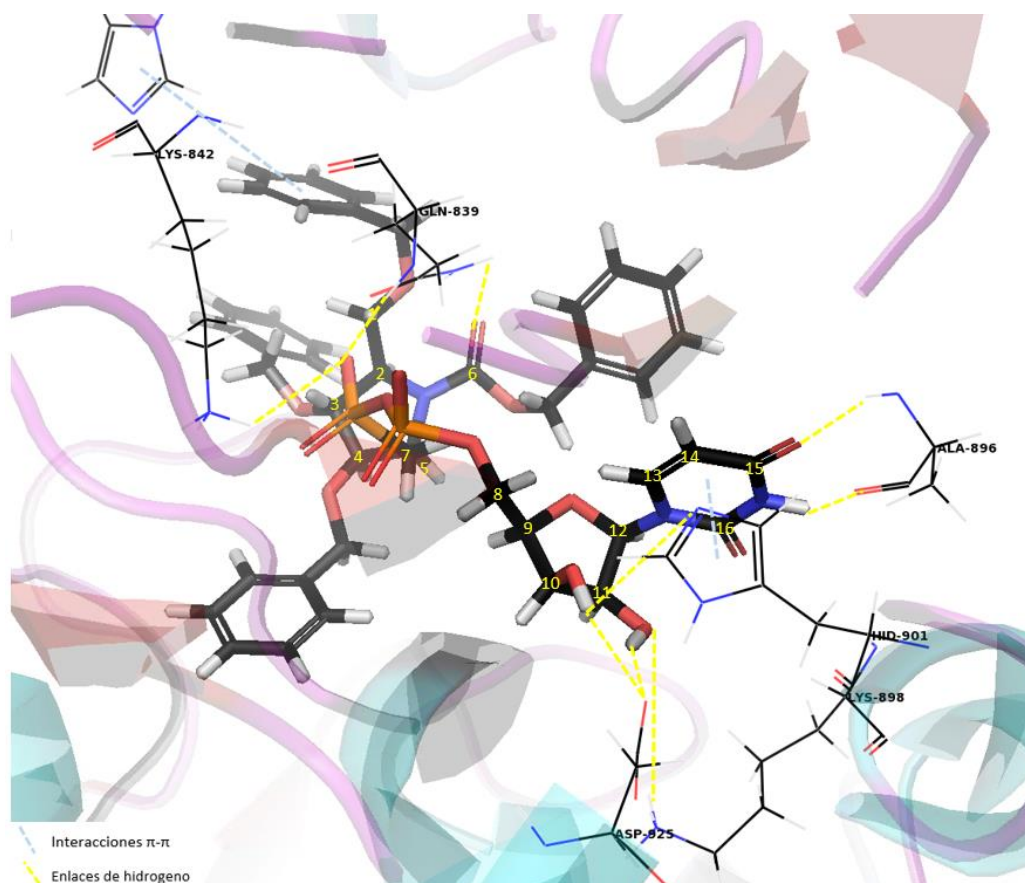


Figura 19: interacciones ligando 10

Como norma general se observa que el sitio de fijación de la base nitrogenada es constante independientemente del ligando, ya que da dos enlaces de hidrogeno con el residuo de ALA-896 y como mínimo una interacción tipo π - π con el aminoácido HID-901. Así, en la superposición de todos los ligandos estudiados, el nucleósido permanece prácticamente invariable en el espacio. (Figura 20)

Si se observa el puente entre la pirrolidina/azúcar y el nucleósido, sí que aparecen cambios considerables en la orientación espacial de cada ligando. Se puede concluir que cuanto más carbonado sea dicho puente más flexible será y por consiguiente más plegamientos podrán aparecer en la molécula en busca de más interacciones. Por otro lado, si se trata de un difosfato, aunque sea más rígido es sustancialmente más polar y da una mayor contribución al binding del ligando. Por esta razón cuando se superponen los ligandos se ve una considerable variación entre unos y otros en este espacio. (figura 20).

Por último, es necesario diferenciar entre la pirrolidina y el azúcar, como se trata de pirrolidinas polibenciladas son sustancialmente más voluminosas que en el caso del azúcar. Esto se traduce en que a la hora de orientarse en el interior de la proteína tanto el ligando **5** como **8** se orienten de forma más o menos similar mientras que el ligando **13** y **15** sean similares entre sí pero considerablemente distintas a estos dos primeros. Se puede razonar basándose en el hecho de que un mayor volumen precisa de un mayor espacio, y lo único que hace el ligando es buscar este factor y minimizar repulsiones. (Figura 20).

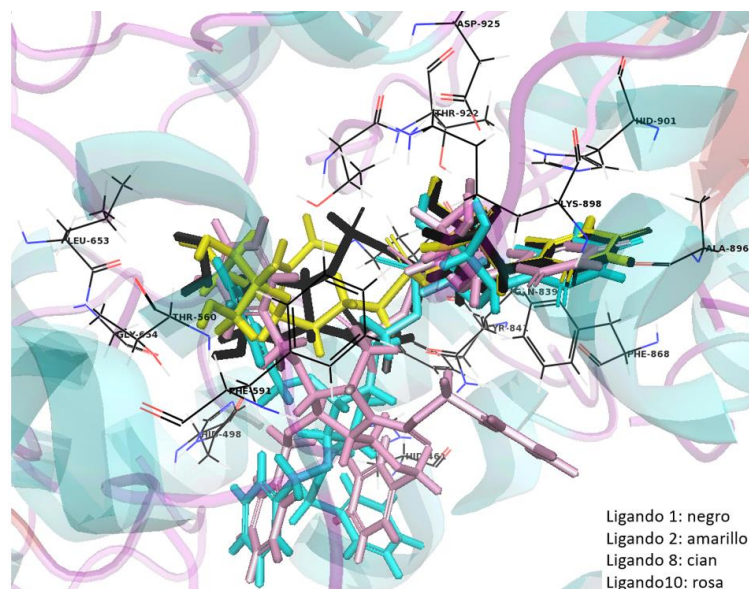


Figura 20: superposición de los ligandos en el sitio activo de la proteína (docking 1)

5.2. Docking pirrolidinas 2.

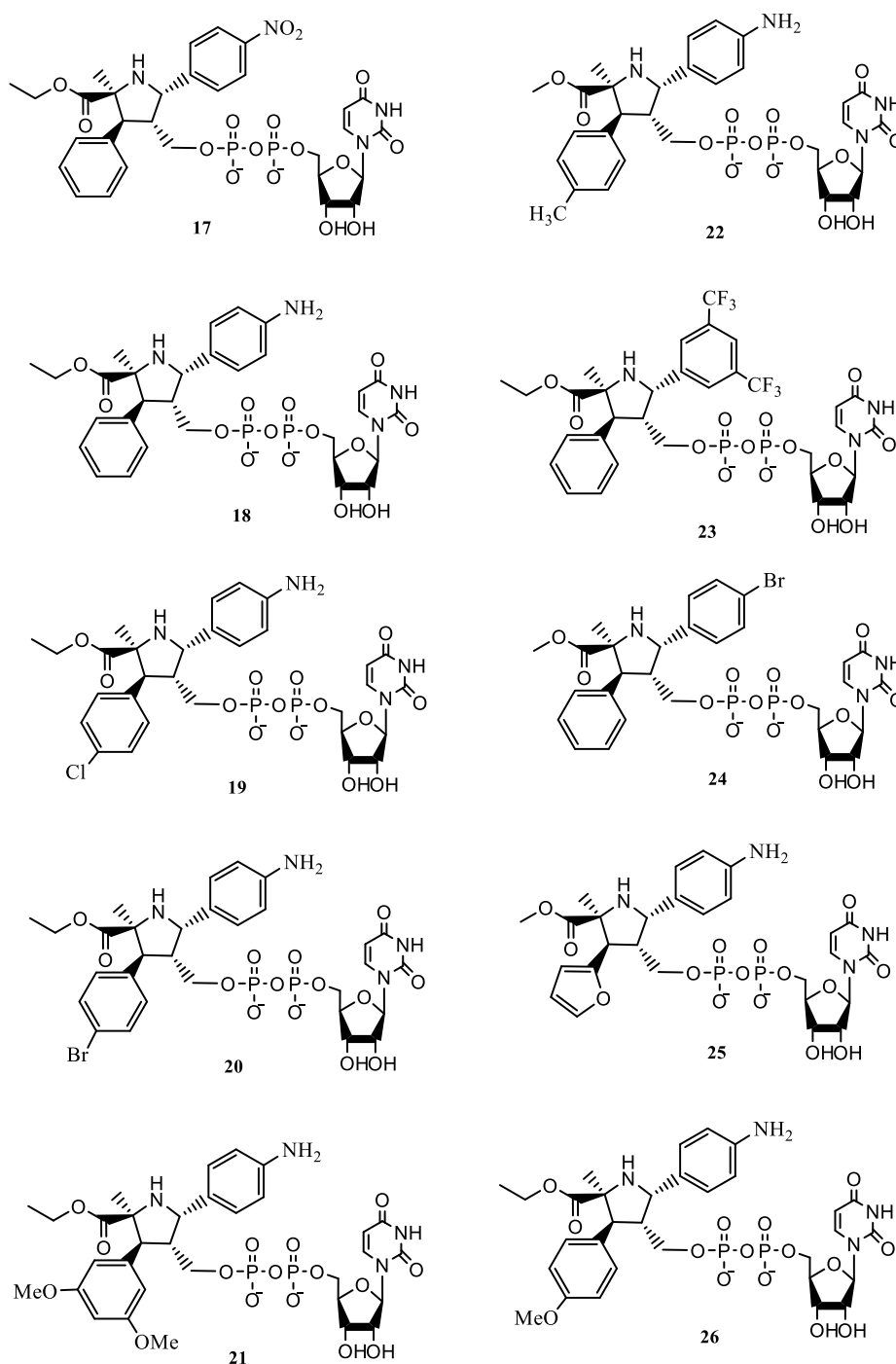
La tónica de trabajo será exactamente la misma que en el primer docking expuesto, la diferencia entre ambos radica en los ligandos propuestos, en el primer caso se correspondía con pirrolidinas sencillas, mientras que en este segundo caso son pirrolidinas sustancialmente más complejas, que gracias a procesos basados en la organocatálisis pueden ser preparadas en el laboratorio.

5.2.1. Ligandos elegidos

El docking se planteará sobre 20 ligandos diferentes, en todos ellos los únicos cambios que se presentarán será sobre los sustituyentes de la pirrolidina que se disponga en lugar del azúcar, el resto del ligando permanecerá idéntico al caso del ligando natural.

Aunque se mantenga el difosfato en el puente que puede disminuir la biodisponibilidad debido a su elevada polaridad, que solamente se cambie la pirrolidina puede ayudar a dilucidar la mayor o menor contribución de esta respecto al resto de pirrolidinas y al propio ligando natural, que por supuesto también se incluirá en el estudio.

Los 20 ligandos que serán evaluados se muestran a continuación. (figura 21).



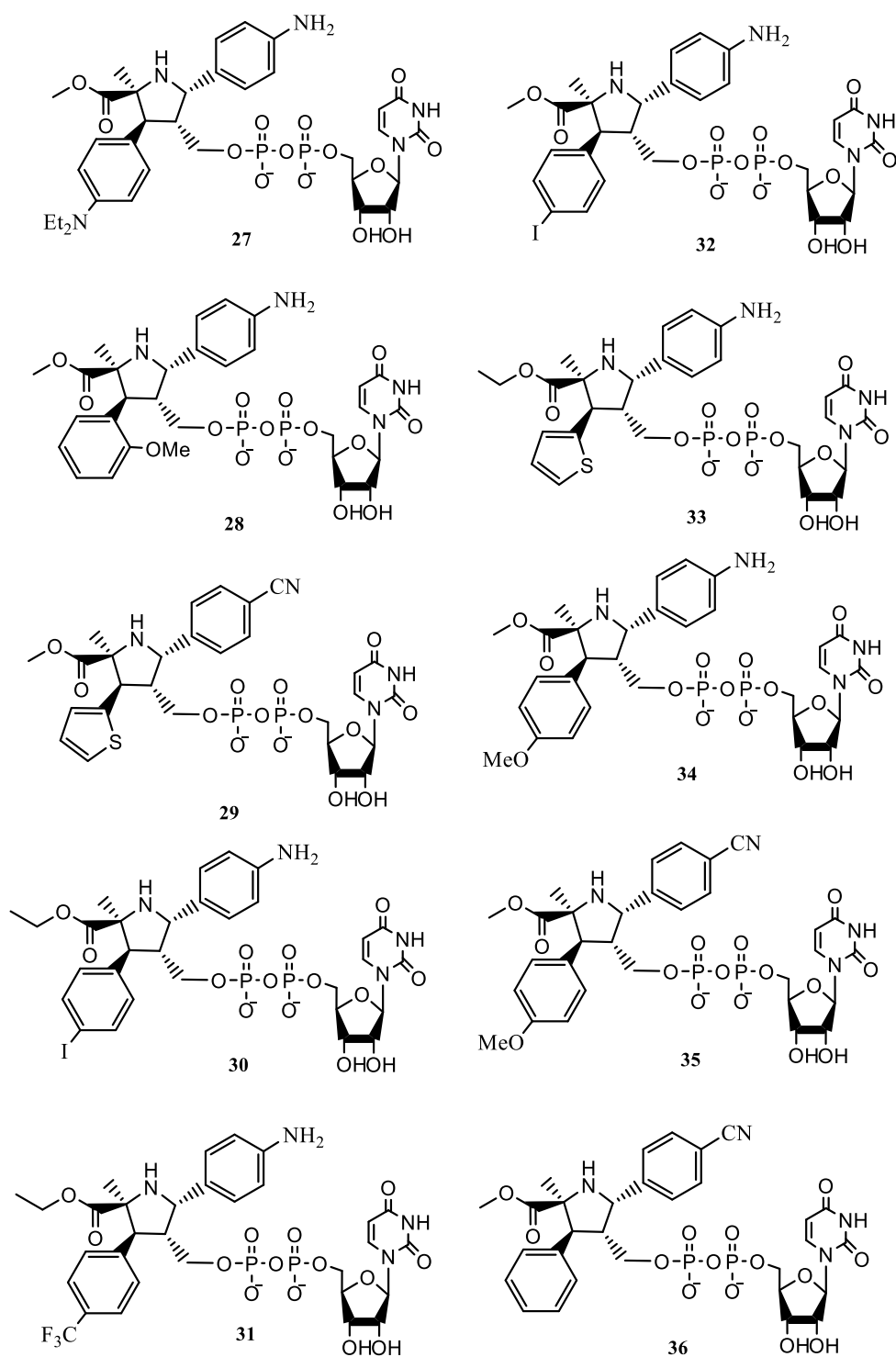
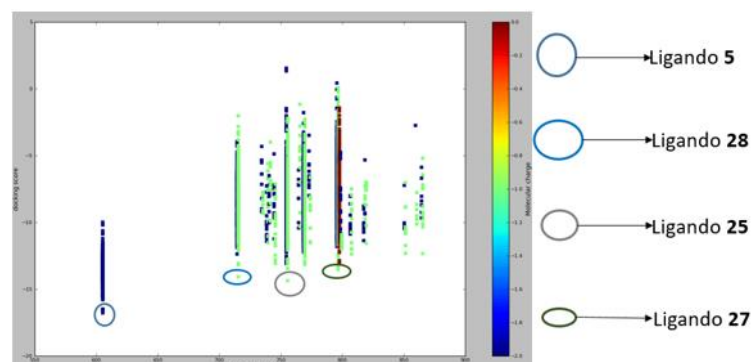


Figura 21: serie de ligandos segundo docking.

1.2.2. Resultados de los estudios de Docking.

La forma de estudiar los resultados del docking es exactamente la misma que en la primera parte del trabajo, en primer lugar, se seleccionaran mediante el docking score de cada uno los mejores ligandos de los 20 planteados, y tras ello se realizará un estudio más exhaustivo.

Los resultados del docking score se estructuran de igual que en la primera parte, según pesos moleculares, carga molecular y puntuación. (Figura 22).



Centrándonos en la mejor puntuación de cada ligando:

| Ligandos | Docking score |
|------------|---------------|
| LIGANDO 5 | -16,792 |
| LIGANDO 28 | -14,374 |
| LIGANDO 25 | -14,088 |
| LIGANDO 27 | -13,541 |

Figura 22: docking scores segundo docking.

Obviamente las interacciones del ligando natural son idénticas a las obtenidas en el primer docking desarrollado, aunque el docking score varía ligeramente esto puede deberse a cuestiones del cálculo efectuado por el software.

Así pues, el desarrollo del ligando natural se encuentra reflejado en el apartado 5.1.2. Por lo que se abordará directamente el estudio de los ligandos propuestos, comenzando por el ligando **28**. (Tabla 4).

Tabla 4: listado de aminoácidos según tipo de interacción con el ligando **28**.

| Aminoácidos interacción con ligando 28 | | | | | |
|---|-----------------------------|----------|---------|---------|---------|
| H Bonds | Interacciones π - π | Contacts | | | |
| LEU-653 | HID-901 | PHE-694 | THR-921 | PHE-837 | GLY-654 |
| LYS-842 | PHE-868 | LEU-563 | HID-562 | HID-558 | |
| GLN-839 | | PRO-656 | LYS-898 | THR-633 | |
| ASP-925 | | PRO-559 | PRO-897 | LYS-634 | |
| THR-922 | | HID-920 | VAL-895 | HID-498 | |
| ALA-896 | | GLY-919 | LEU-866 | THR-560 | |

Los resultados en términos de docking score no son muy diferentes frente al natural a pesar de no presentar interacciones con los residuos de GLY-654, HID-498, y THR-921.

Se puede razonar a través de la explicación de las interacciones que sufren los ligandos que, si se mantienen respecto al natural (puesto que no presenta ninguna interacción con un aminoácido distinto). A diferencia del natural, el ligando **28**, interacciona con el residuo de LEU-653 mediante la anilina del C5. La LYS-842 varía un poco, ya que en este caso únicamente interacciona con el mismo grupo fosfato, un NH_2 tanto con el $\text{P}=\text{O}$ como con el O^- . La GLN-839 otorga una asociación diferencial al ligando natural, además de la interacción con el O^- del fosfato proximal a la pirrolidina, forma un enlace de hidrogeno con el oxígeno del ester (C3). La ASP-925 interacciona de igual manera que en la totalidad de los ligandos planteados, no incluido el natural, descritos en el primer docking.

La THR-922 forma un enlace de hidrogeno, a diferencia del ligando natural, con el azúcar del nucleósido. El OH del residuo interacciona mediante el oxígeno OH del C9. La interacción de la ALA-896 sigue manteniéndose constante. (Figura 23).

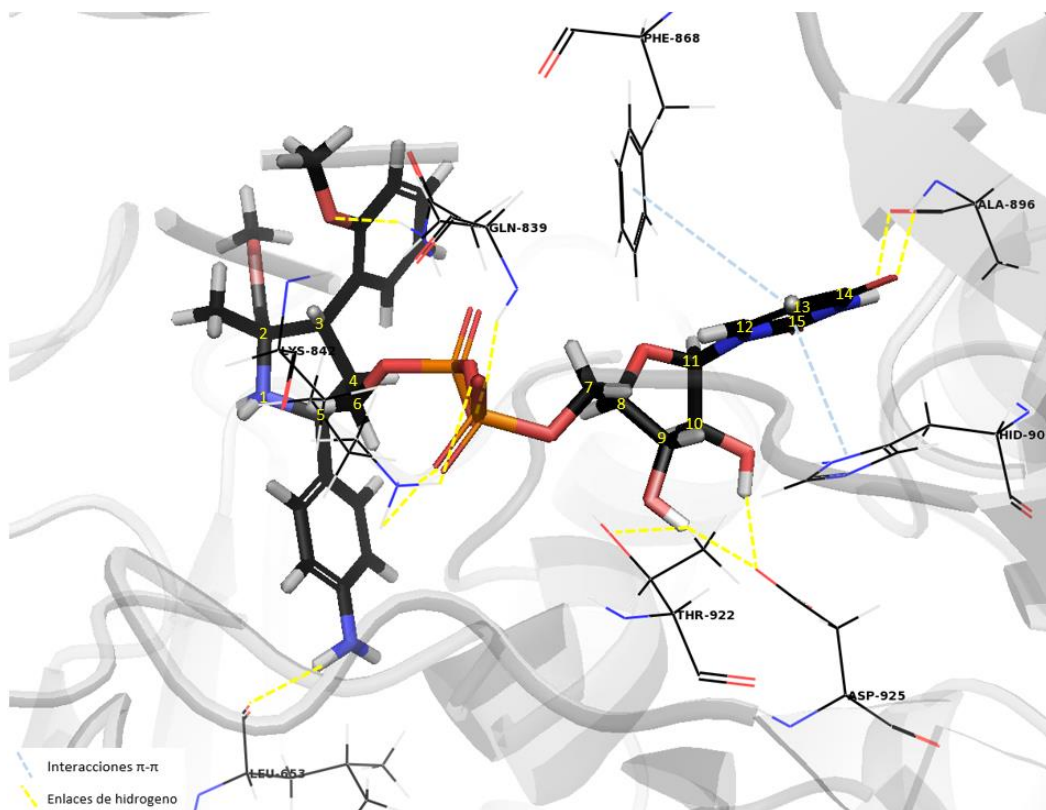


Figura 23: interacciones ligando 12. (C enumerados según 5.2.1 para todo 5.2.2)

El ligando **25** da un docking score muy parecido al ligando **28**, es lógico si analizamos su interacción con los residuos que componen el sitio activo de la OGT. (Tabla 5)

Tabla 5: listado de aminoácidos según tipo de interacción con el ligando **25**.

| Aminoácidos interacción con ligando 25 | | | | | |
|---|-----------------------------|----------|---------|---------|---------|
| H Bonds | Interacciones π - π | Contacts | | | |
| LEU-653 | HID-901 | PHE-694 | THR-921 | PHE-837 | GLY-654 |
| LYS-842 | PHE-868 | LEU-563 | HID-562 | HID-558 | |
| GLN-839 | | PRO-656 | LYS-898 | THR-633 | |
| ASP-925 | | PRO-559 | PRO-897 | LYS-634 | |
| THR-922 | | HID-920 | VAL-895 | HID-498 | |
| ALA-896 | | GLY-919 | LEU-866 | THR-560 | |

Y es que, según el cálculo docking, interacciona con la misma serie de aminoácidos que en ligando **28**. Así pues, únicamente se nombran las diferencias con este y así la comparación con el ligando natural es directa.

El ligando **25** interacciona de forma idéntica con los residuos LYS-842, ALA-869, THR-922 y LEU-653, HID-901 y PHE-686. Sin embargo, tanto con GLN-839 como con ASP-925 no. Con el primer residuo se pierde la interacción con el oxígeno del ester (C3), mientras que la ASP-925 únicamente enlaza por enlace de hidrogeno con el OH unido al C10. (Figura 24)

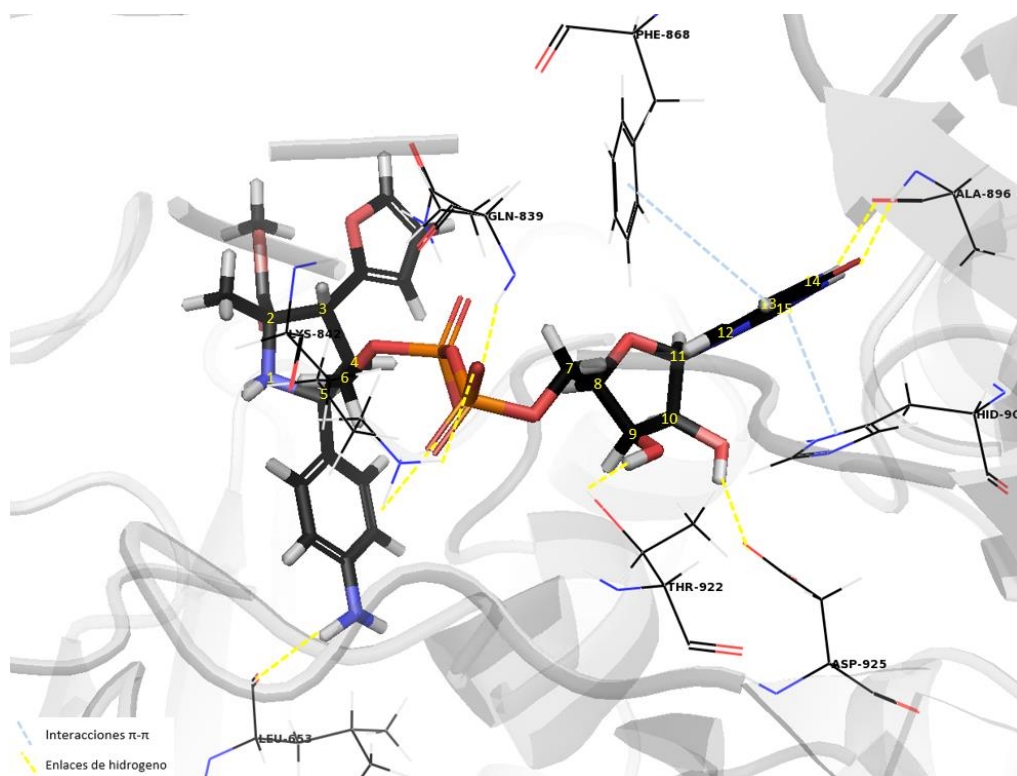


Figura 24: interacciones ligando **25**.

El ultimo ligando a estudiar del segundo docking es el número **27**. (Tabla 6)

Tabla 6: listado de aminoácidos según tipo de interacción con el ligando **27**.

| Aminoácidos interacción con ligando 27 | | | | | |
|---|-----------------------------|----------|---------|---------|---------|
| H Bonds | Interacciones π - π | Contacts | | | |
| LYS-842 | PHE-868 | LEU-654 | LYS-898 | PRO-559 | THR-633 |
| GLN-839 | HID-901 | THR-560 | HID-562 | GLY-433 | HID-498 |
| ASP-925 | | PHE-694 | PRO-897 | LYS-930 | TYR-632 |
| ALA-896 | | LEU-563 | VAL-895 | HID-920 | HID-496 |
| | | ASP-554 | LEU-866 | ASP-931 | HID-558 |
| | | ASN-834 | ARG-904 | ILE-435 | GLY-654 |
| | | THR-921 | PHE-837 | TYR-841 | |
| | | THR-922 | GLY-919 | LYS-634 | |

Esta vez, el número de enlaces de hidrógenos se ve reducido considerablemente frente al natural, puesto que se pierden las interacciones con LEU-653, GLY-654, THR-921 Y THR-922, también se ven reducidas respecto al **25** o **28**. En cuanto a las interacciones de los sistemas π se mantienen constante en la totalidad de los ligandos de esta segunda parte.

La ALA-896 interacciona de forma idéntica a todos los ligandos estudiados, mientras que la ASP-925 actúa de igual manera que en el ligando **28**, y la GLN-839 y LYS-842 igual que en el caso del ligando **25**. (Figura 25)

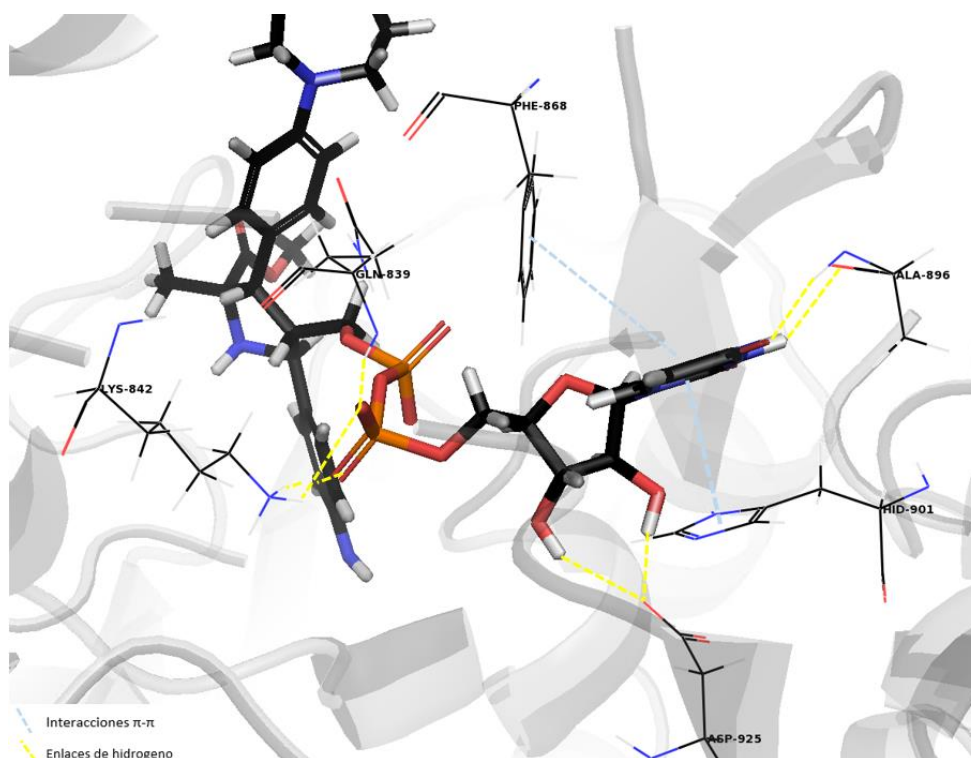


Figura 24: interacciones ligando **27**.

El sitio de fijación del nucleósido es constante y ha de ser fijo en la proteína, ya que los tres ligandos presentan una posición casi idéntica. Esta fijación aparentemente viene determinada por el doble puente de hidrogeno que se forma entre la base nitrogenada y el residuo de ALA-896, sumándole a esto la contribución por parte de la pentosa con residuos de ASP-925 y/o THR-922 dependiendo del ligando. La disposición del difosfato y el azúcar/pirrolidina sí que puede variar, al superponer los 4 ligandos se puede observar claramente como en el caso del ligando natural el pirofosfato adquiere una posición que orienta el azúcar hacia la interacción con los residuos de LEU-653 y GLY-654, mientras que en las diversas pirrolidinas predomina la orientación que aleja el ciclo de la LEU-653 pero a la vez la anilina queda orientada cerca. En el ligando **28** se consigue la interacción del ester con la GLN-839 (figura25)

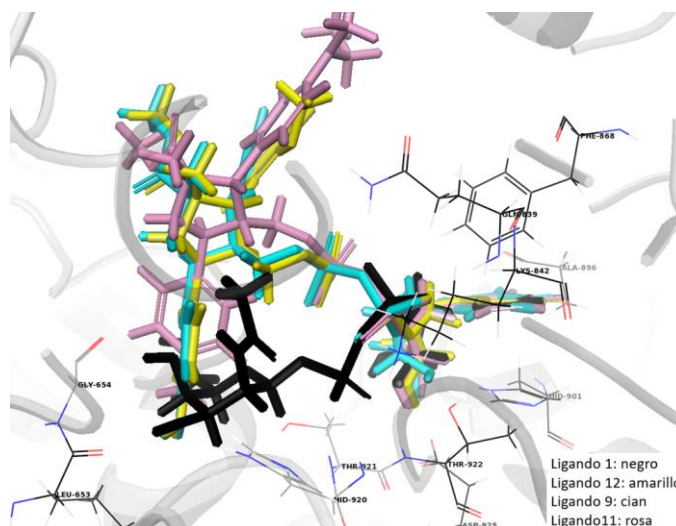


Figura 25: superposición de los ligandos en el sitio activo de la proteína (docking 2)

6. Conclusiones.

En el trabajo se agruparon los potenciales inhibidores en dos grupos. Si nos referimos al primero se ha probado que, por un lado, en el ligando **8** la variación de difosfato por una cadena hidrocarbonada y un fosfato da muy buenos resultados de binding. De la misma forma tanto el ligando **13** como el ligando **15** dan buenos resultados de docking score. Además, en estos se observa como la pirrolidina puede contribuir al binding, tanto con interacciones tipo π , como por puentes de hidrogeno. Esto puede ser muy interesante, puesto que eliminando la elevada polaridad de difosfato central, se trabaja con un grupo fosfato, tanto en el ligando **13** como en el ligando **15**, y se obtienen interacciones comparables. De esta forma se estaría, al menos parcialmente, solucionando problemas de biodisponibilidad por excesos de polaridad.

Por consiguiente, estos tres ligandos ganan un potencial interés en continuar las pruebas experimentales, su síntesis y evaluación experimental mediante ensayos con la enzima, para tener resultados empíricos sobre su posible validez o no como inhibidores de esta.

El estudio del segundo grupo de ligandos desvela los buenos resultados que otorga el docking sobre los ligandos que presentan pirrolidinas diversamente sustituidas. Aunque sobre estas se mantuviese el pirofosfato en el puente entre pirrolidina y nucleósido, se observa cómo según la sustitución que presente la pirrolidina puede interaccionar con los residuos que conforman el sitio activo y de esta forma establecer un buen binding con el ligando.

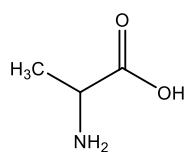
El trabajo a su vez ha servido para observar como la posición del nucleósido se ha de mantener fija dentro de la enzima, puesto que para todos los ligandos es casi idéntica, mientras que lo que sí que puede adoptar diferentes posiciones es el pirofosfato unido a la pirrolidina, puesto que se observa su variación en busca de mejorar su disposición en el interior de la enzima.

7. Bibliografía.

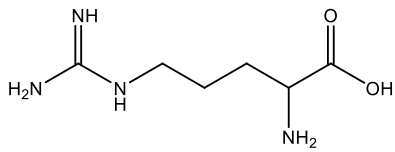
1. Gabius, H. J.; Siebert, H. C.; André, S.; Jiménez-Barbero, J.; Rüdiger, H., Chemical biology of the sugar code. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 740-740 - 764.
2. Blanco, N.; Sanz, A. B.; Rodríguez-Pena, J. M.; Nombela, C.; Farkas, V.; Hurtado-Guerrero, R.; Arroyo, J., Structural and functional analysis of yeast Crh1 and Crh2 transglycosylases. *FEBS J.* **2015**, *282*, 715-731.
3. Thiery, E.; Vincent, S. P.; Reniers, J.; Wouters, J., Stereoselective Synthesis of Boat-Locked Glycosides Designed as Glycosyl Hydrolase Conformational Probes. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *7*, 1472-1472-1484.
4. Gay, L. M.; Zheng, X.-W.; van Aalten, D. M. F., O-GlcNAc transfer: Size matters. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 134-135.
5. Ma, Z.; Vosseller, K., O-GlcNAc in cancer biology. *Amino Acids* **2013**, *45*, 719-733.
6. Singh, J. P.; Zhang, K.; Wu, J.; Yang, X., O-GlcNAc signaling in cancer metabolism and epigenetics. *Cancer Lett.* **2015**, *356*, 244-250.
7. Yuzwa, S. A.; Vocadlo, D. J., O-GlcNAc and neurodegeneration: biochemical mechanisms and potential roles in Alzheimer's disease and beyond. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 6839-6858.
8. Zhu, Y.; Shan, X.; Yuzwa, S. A.; Vocadlo, D. J., The emerging link between O-GlcNAc and Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 34472-34481.
9. Wang, S.; Shen, D. L.; Lafont, D.; Vercoutter-Edouart, A.-S.; Mortuaire, M.; Shi, Y.; Maniti, O.; Girard-Egrot, A.; Lefebvre, T.; Pinto, B. M.; Vocadlo, D.; Vidal, S., Design of glycosyltransferase inhibitors targeting human O-GlcNAc transferase (OGT). *MedChemComm* **2014**, *5*, 1172-1178.
10. Gloster, T. M., Advances in understanding glycosyltransferases from a structural perspective. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2014**, *28*, 131-141.
11. Im, J., Synthesis of a Benzene-containing C1-Phosphonate Analogue of UDP-GlcNAc for the Inhibition of O-GlcNAc Transferase. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2016**, *37*, 7-12.
12. Lynch, T. P.; Reginato, M. J., O-GlcNAc transferase: A sweet new cancer target. *Cell Cycle* **2011**, *10*, 1712-1713.
13. Nagel, A. K.; Ball, L. E., O-GlcNAc transferase and O-GlcNAcase: achieving target substrate specificity. *Amino Acids* **2014**, *46*, 2305-2316.
14. Semba, R. D.; Huang, H.; Luty, G. A.; Eyk, J. E.; Hart, G. W., The role of O-GlcNAc signaling in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Proteomics Clin. Appl.* **2014**, *8*, 218-231.
15. Lazarus, M. B.; Nam, Y.-S.; Jiang, J.-Y.; Sliz, P.; Walker, S., Structure of human O-GlcNAc transferase and its complex with a peptide substrate. *Nature* **2011**, *469*, 564-567.
16. Wang, S.; Cuesta-Seijo, J. A.; Striebeck, A.; Lafont, D.; Palcic, M. M.; Vidal, S., Design of Glycosyltransferase Inhibitors: Serine Analogues as Pyrophosphate Surrogates?. *ChemPlusChem* **2015**, *80*, 1525-1532.
17. Compain, P.; Martin, O. R., Carbohydrate mimetics-based glycosyltransferase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 3077-3092.
18. Merino, P.; Delso, I.; Tejero, T.; Ghirardello, M.; Juste-Navarro, V., Nucleoside Diphosphate Sugar Analogues that Target Glycosyltransferases. *Asian Journal of Organic Chemistry* **2016**, *5*, 1413-1427.
19. Borodkin, V. S.; Schimpl, M.; Gundogdu, M.; Rafie, K.; Dorfmueller, H. C.; Robinson, D. A.; van Aalten, D. M. F., Bisubstrate UDP-peptide conjugates as human O-GlcNAc transferase inhibitors. *Biochem. J.* **2014**, *457*, 497-502.
20. Ghirardello, M.; Sádaba, D.; Delso, I.; Tejero, T.; Perrone, D.; Chinaglia, N.; Marchesi, E.; Fogagnolo, M.; Rafie, K.; van Aalten, D. M. F.; Merino, P., UDP-GlcNAc Analogues as Inhibitors of O-GlcNAc Transferase (OGT): Spectroscopic, Computational, and Biological Studies. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 7264-7272.

8. Anexos.

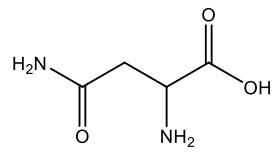
8.1. Estructura, nombre y abreviatura de los 20 aminoácidos que conforman las proteínas.



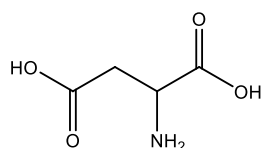
Alanina (ALA)



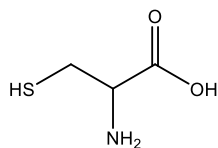
Arginina (ARG)



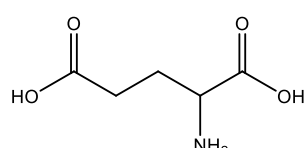
Asparagina (ASN)



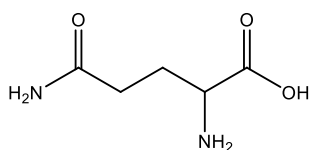
Ácido aspártico (ASP)



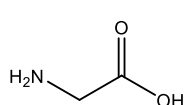
Cisteina (CYS)



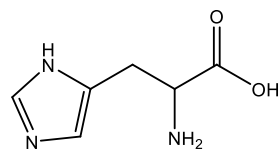
Ácido glutámico (GLU)



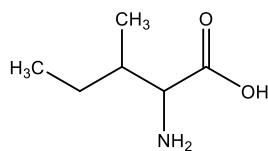
Glutamina (GLN)



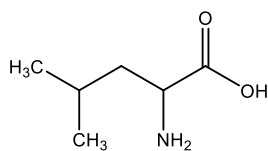
Glicina (GLY)



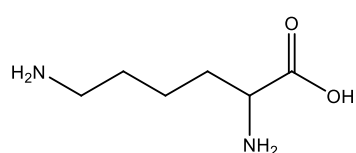
Histidina (HID)



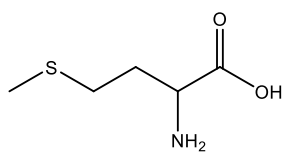
Isoleucina (ILE)



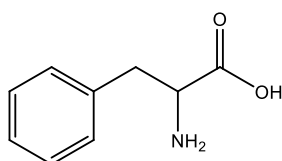
Leucina (LEU)



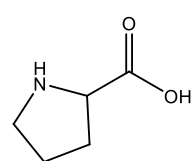
Lisina (LYS)



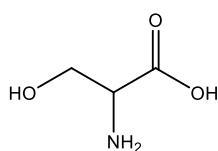
Metionina (MET)



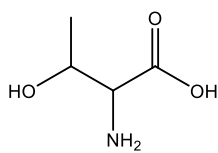
Fenilalanina (PHE)



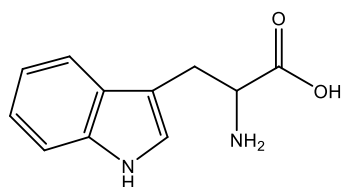
Prolina (PRO)



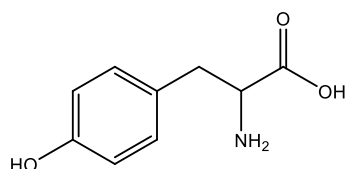
Serina (SER)



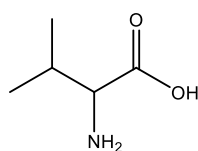
Treonina (THR)



Triptófano (TRP)

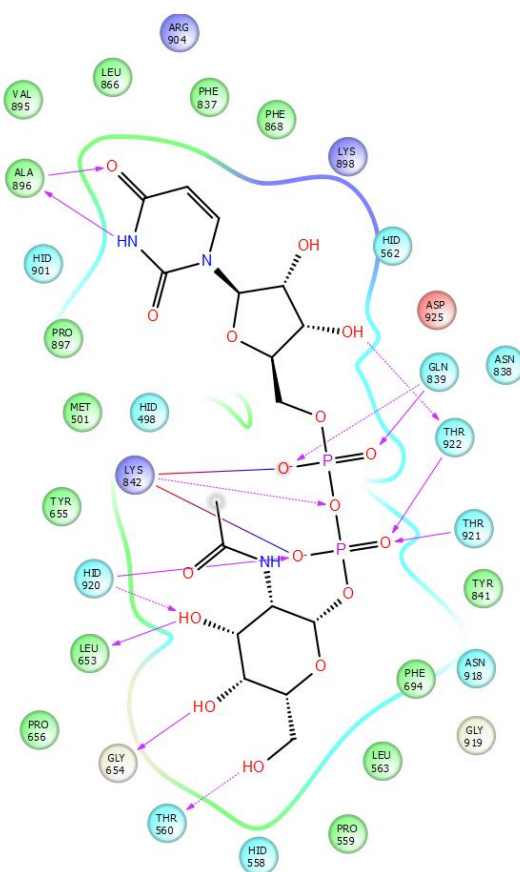


Tirosina (TYR)

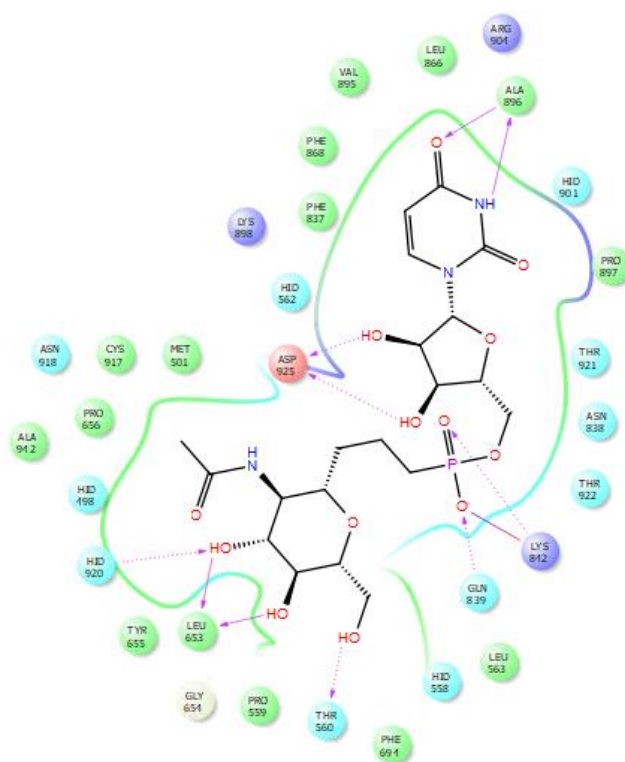


Valina (VAL)

8.2. Interacciones ligando con residuos del sitio activo en 2D.

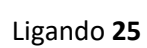
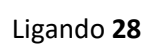


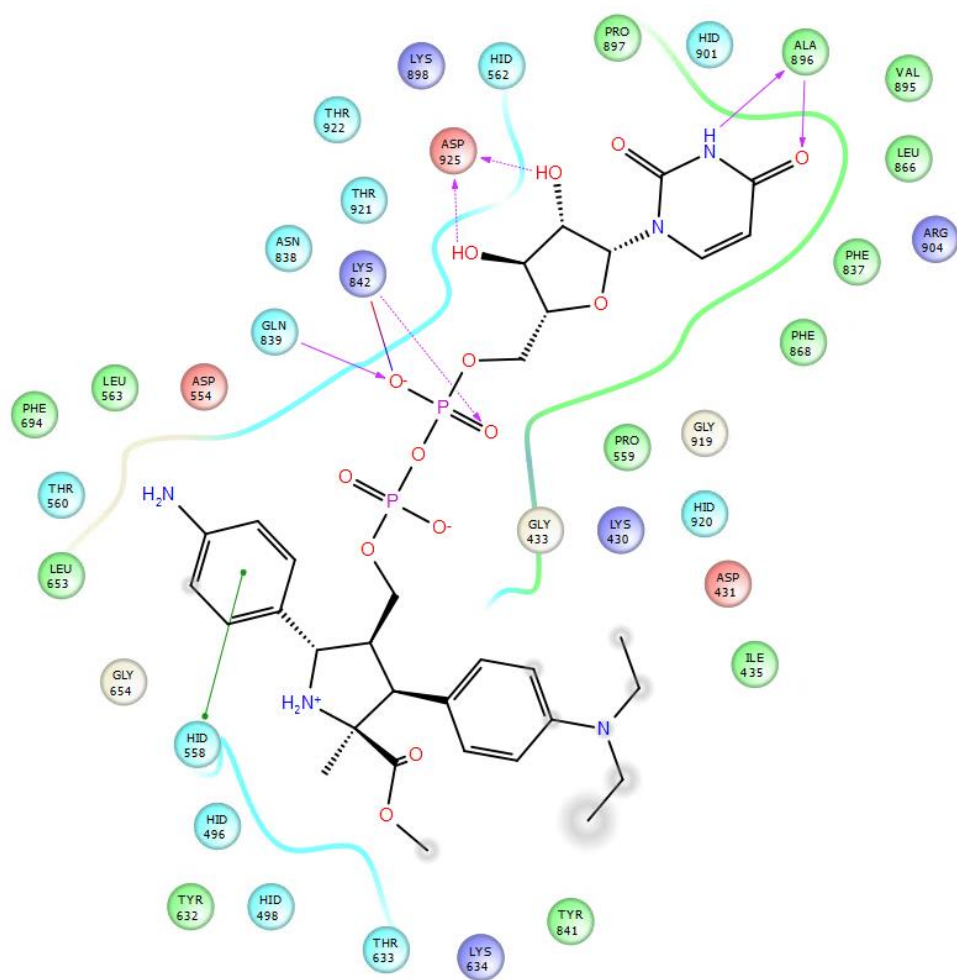
Ligando 5



Ligando 8







Ligando 27