

# Criterios acoplamiento molecular

Molecular docking: practical criteria for selection of biologically active ligands and identification of new therapeutic targets

## Introducción:

Descrito inicialmente en 1982 por Kuntz el acoplamiento molecular se ha vuelto protagonista en la búsqueda de nuevos posibles fármacos, al ser una herramienta de búsqueda y selección con base en la estructura tanto de ligandos como de blancos terapéuticos. Los ligandos son moléculas pequeñas de diferente naturaleza. Mientras que los blancos terapéuticos son moléculas grandes como proteínas o ácidos nucleicos. Entonces, un ligando que se une a un blanco, puede poseer una actividad biológica ya sea de inhibición o de activación.

'El acoplamiento molecular, es un método bioinformático que permite predecir y calcular computacionalmente la posición más favorable de interacción entre un ligando y un blanco, mediante sus representaciones 3D'

Se empleando dos algoritmos centrales. El primero predice las configuraciones o conformaciones estructurales de un ligando ante el blanco proteico. El segundo algoritmo es una función de puntuación para predecir las energías de unión entre el ligando y el blanco. Por lo tanto las funciones de puntuación pueden filtrar compuestos, pudiendo así considerar así el que posea la energía de unión más favorable sea denominado 'potencial cabeza de serie' 'lead' (Phatak et al., 2009).

Las limitaciones de los algoritmos de muestreo e imperfecciones en los de puntaje da resultado a algunos falsos positivos y negativos (Lill, 2011). Entonces el Acoplamiento molecular no posee una regla que se adapte a todos los casos.

## Preparación de la estructura del blanco proteico

Si bien durante la cristalografía de rayos-x, suceden la mayoría de procesos de preparación del blanco proteico, es indispensable realizar algunos ajustes cuando sea necesario. Los más comunes son la adición de hidrogenos y cargas, adición de cadenas laterales, y/o enlaces faltantes, detección y reparación de cadenas rotas. Más precisos serían los estados de protonación de los átomos e identificación de moléculas de agua.

## Estados de protonación

La localización de los átomos de hidrógeno en las proteínas no suele estar presente en las estructuras cristalográficas. Por lo tanto, predecir el correcto estado de protonación es crucial para determinar la configuración de unión del ligando y su afinidad.(Kalliokosky et al 2009). Una predicción incorrecta puede llevar a descartar ligandos bioactivos y seleccionar falsos positivos, y también afecta la precisión en la predicción de interacciones entre ligando y proteína.

- **Funciones de puntaje basadas en campos de fuerza:** Son más susceptibles a errores de protonación, ya que se basan en la suma de fuerzas intermoleculares, intramoleculares y de desolvatación.
- **Funciones de puntaje basadas en el conocimiento:** Se basan en observaciones estadísticas de contactos intermoleculares, siendo menos propensas a errores de protonación. Pues ven que participa con más frecuencia y determinan su afinidad

#### **Variaciones de protonación:**

- Las cadenas laterales de aminoácidos ionizables pueden cambiar sus estados de protonación según el ambiente y el pH.
- La unión del ligando puede implicar ganancia o pérdida de protones, un factor raramente incluido en estudios de acoplamiento molecular.
- Los estados de protonación son difíciles de replicar con precisión debido a la movilidad de los protones, y las simulaciones por mecánica cuántica están fuera del alcance del acoplamiento molecular. En el mejor de los casos, se puede identificar un conjunto de estados de protonación adecuado para el análisis.

**Conformación de ligandos y estados de protonación:** Dada la naturaleza dinámica de las proteínas, hace que los estados de protonación de los residuos ionizables cambien constantemente. Para la predicción de la unión de un ligando y el receptor, es necesario que el estado de protonación del receptor sea:

- Relevante para la conformación unidad
- Corresponda con los datos cristalográficos. Sin choques o impedimentos estéricos y asegurando enlaces de hidrógeno esperados

- pH adecuado

Para la asignación de estados de protonación:

- Cálculo de pKa teórico: calcular el pKa de los residuos a pH fisiol es el método más directo para estimar el estado de protonación
- Microambiente y pH: Para el estado real de protonación, dependera del microambiente de los residuos y del pH fisiológico
- Residuos ionizables: Generalmente, se asume que los ácidos como Asp y Glu están desprotonados, y las bases como Arg y Lys están protonadas. Sin embargo, esta es una

generalización.

Evaluación Precisa del Estado de Protonación:

1. **pH Fisiológico:** Afecta directamente la ionización de los residuos.
2. **Valores Calculados de pKa:** Ayudan a estimar el estado de protonación de los residuos ionizables en condiciones específicas.
3. **Análisis de Estructuras Cristalográficas y Moléculas Bioactivas Conocidas:**  
Proporcionan información experimental sobre cómo se comportan los residuos y ligandos en contextos reales.

## Moléculas de agua en el sitio activo

Las moléculas de agua en el sitio activo son claves en la unión del ligando y el receptor. Además de mediar con los enlaces de hidrógeno, también afectan significativamente a la entropía y la entalpía. (Lie et al. 2011; Cheng et al., 2012; Kroemer, 2007). Dentro del contexto de la selección virtual, la adición de aguas es con frecuencia descuidada, su consideración dentro de los ensayos de acoplamiento sigue siendo un desafío.

Retos:

- **Naturaleza dinámica:** La posición de las moléculas de agua en el sitio activo es variable y no estática. Los ligandos pueden reemplazar fisiológicamente a las moléculas de agua al unirse a su receptor, y no considerar esta dinámica puede resultar en falsos negativos.
- **Precisión en el Acoplamiento:** Aunque incluir moléculas de agua puede mejorar la precisión ante el modo de unión de los inhibidores. También se puede reducir el volumen del dominio de unión, limitando las posibles conformaciones del ligando

Evaluación en la importancia de las moléculas de agua:

1. Replicación y Evaluación: Para evaluar la importancia de las H<sub>2</sub>O, se replica el modo de unión de estructuras experimentales sin las aguas específicas. Si la precisión disminuye, algunas H<sub>2</sub>O pueden ser fundamentales
2. Selección de moléculas de agua: Se deben identificar las moléculas de agua que no afectan significativamente la unión del ligando, tales como aquellas fuera del dominio de unión (más allá de 5 Å de distancia), las cuales pueden ser eliminadas.
3. Estabilidad: Hay moléculas de agua que poseen 3 enlaces de H con el blanco, haciéndolas estables, por tanto deben incluirse en el análisis

Importancia de los puentes de H

- Las moléculas de agua que forman puentes de hidrógeno entre el ligando y el receptor son importantes en los ensayos de acoplamiento molecular.

- Las moléculas de agua importantes, deben considerarse idealmente como moléculas flexibles

## Diferenciación entre moléculas activas y señuelos

RMSD es la desviación de la raíz cuadrática media, esta debe estar por debajo de 2 Å para los átomos pesados para la estructura experimental

## Análisis de la flexibilidad

Dentro del acoplamiento molecular, uno de los mayores retos es la flexibilidad proteica. Actualmente las simulaciones son generalmente realizadas sobre estructuras estáticas. Existen dos enfoques para incorporar la dinámica de las estructuras proteicas; el acoplamiento flexible del receptor y el acoplamiento conjunto (Lill, 2013)

- El acoplamiento flexible del receptor, solo incorpora la flexibilidad en cadenas laterales de residuos dentro del sitio activo
- El acoplamiento conjunto se divide en dos formas:
  - En el primero se generan varias conformaciones de una misma proteína antes de una búsqueda por acoplamiento y cada ligando es acoplado a cada conformación
  - El segundo método evalúa un conjunto de estructuras proteicas en una sola búsqueda de acoplamiento

Las simulaciones de dinámica molecular están consideradas como el método más preciso ante la determinación de estabilidad de un ligando dentro del dominio de unión. Donde también se considere la flexibilidad total de la cadena lateral y la columna vertebral del blanco, además de considerar los efectos del solvente

## Acoplamiento consenso

Dentro del acoplamiento molecular, las funciones de puntuación representan el talón de Aquiles, pues al ser las responsables de seleccionar y clasificar las configuraciones. Puede suceder que sean clasificadas de manera incorrecta. Una solución es un enfoque basado en un resultado consensuado, al incorporar diferentes algoritmos de muestreo y puntuación, se ha demostrado una mejora significativa ante la identificación de poses correctas. Este enfoque puede mejorar las predicciones de afinidad de unión al incluir una función adicional de puntuación. Por ejemplo, el estudio de Houston y Walkinshaw (2013) utilizó Dock, Autodock y Autodock Vina, alcanzando una precisión del 82% en comparación con el 55-64% usando un solo algoritmo. [#ejemplo](#) [#docking](#)

## Falsos Positivos/Negativos en el acoplamiento consenso

El acoplamiento molecular con funciones de puntuación puede enfrentar desafíos al seleccionar y clasificar la configuración correcta de un ligando dentro del sitio de unión. Las puntuaciones de consenso y el muestreo de consenso ayudan a mejorar estos resultados, pero también implican ciertos tipos de errores:

- **Falsos Positivos:**
  - **Definición:** Identificar incorrectamente una configuración de unión del ligando como adecuada (afín) cuando en realidad no lo es.
  - **Impacto:** Pueden resultar en el desperdicio de recursos, ya que se invierte tiempo en probar ligandos que no tienen potencial real.
- **Falsos Negativos:**
  - **Definición:** No identificar una configuración de unión del ligando como adecuada cuando en realidad sí lo es.
  - **Impacto:** Pueden llevar a perder posibles ligandos bioactivos que podrían haber sido efectivos, ya que se descartan antes de probarlos experimentalmente

#### **Desafíos:**

- **Aumento de Falsos Negativos:** El uso de múltiples algoritmos puede aumentar los falsos negativos, pero esto se considera aceptable en entornos académicos o con recursos limitados, donde la calidad de los resultados es más importante.
- **Disminución de Falsos Positivos:** El enfoque de consenso mejora los resultados al reducir los falsos positivos, compensando así el aumento de los falsos negativos y evitando el desperdicio de recursos.

## **Mecánica molecular generalizada Born/Área de superficie (MM-GBSA)**

Las funciones de puntuación, suelen tener dificultades para definir con precisión factores relacionados con la energía libre de unión (interacciones electrostáticas, de solvatación, contribuciones entrópicas) Para mejorarlas se emplean técnicas de cálculo más exigentes:

- Perturbación de energía libre
- Integración Termodinámica
- Respuesta lineal
- Mecánica molecular Poisson-Boltzmann/Área de superficie (MM-PBSA)
- Mecánica molecular generalizada-born/Área de superficie (MM-GBSA)

## **Método MM-GBSA**

- Utiliza una combinación de energías de mecánica molecular (MM), solvatación polar/no polar y entropía para calcular la energía libre de unión ( $\Delta G_{bind}$ ).
- El cálculo de  $\Delta G_{bind}$  se basa en la diferencia entre el complejo unido ( $\Delta G_{com}$ ), el receptor no unido ( $\Delta G_{rec}$ ) y el ligando en solución ( $\Delta G_{lig}$ ).

$$\Delta G_{bind} = \Delta G_{com} - \Delta G_{rec} - \Delta G_{lig} \quad \Delta G(com/rec/lig) = \Delta EMM + \Delta G_{solv} - T(\Delta S)$$

- $\Delta EMM$   $\Delta E_{\{MM\}}$  incluye la energía de enlaces químicos, ángulos y torsión, energías de van der Waals y de Coulomb.
- $\Delta G_{solv}$   $\Delta G_{\{solv\}}$  se descompone en polar ( $\Delta G_{solv,p}$   $\Delta G_{\{solv,p\}}$ ) y no polar ( $\Delta G_{solv,np}$   $\Delta G_{\{solv,np\}}$ ).

### Desarrollo y Evolución de MM-GBSA:

- Inicialmente requería simulaciones de dinámica molecular del complejo proteína-ligando en agua.
- Ahora se ha mejorado utilizando un modelo de solvente implícito continuo y una sola estructura proteica con  $\Delta G$  minimizado.

### Eficiencia del Modelo GB:

- Es más eficiente y rápido para clasificar afinidades de unión de ligandos, haciéndolo adecuado para la detección virtual.
- Preferible a metodologías FEP y TI, ya que maneja ligandos estructuralmente diversos de manera más precisa y eficiente.