

Interacción de la catecol o-metiltransferasa (COMT) con diversos inhibidores evaluada mediante cálculos computacionales

Sánchez González Sinaí del Rosario¹, Segura Bailón Brenda Anahí¹, Serratos Álvarez Iris Natzielly², Millán Pacheco César³, Vicente Escobar Jonathan Osiris², Galano Jiménez Annia^{2*}

¹Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica. Avenida San Rafael Atlixco No. 186. Colonia Vicentina, Ciudad de México. CP 09340.

²Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Química. Avenida San Rafael Atlixco No. 186. Colonia Vicentina, Ciudad de México. CP 09340.

³Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Morelos. Av. Universidad No. 1001, Colonia Chamilpa 62209 Morelos, México.

*Autor de correspondencia: agal@xanum.uam.mx

Recibido:

23/agosto/2019

Aceptado:

04/noviembre/2019

Palabras clave:

Catecol O-metiltransferasa (COMT), energía de unión, interacciones hidrofóbicas

Keywords:

Catechol O-methyltransferase (COMT), binding energy, hydrophobic interactions

RESUMEN

En este trabajo se estudió la interacción de la Catecol O-metiltransferasa (COMT) con diferentes inhibidores. Dado que la COMT es la enzima responsable de la degradación de catecolaminas y un blanco terapéutico importante en enfermedades neurodegenerativas. En este trabajo, exploramos el reconocimiento molecular entre COMT y dos tipos de inhibidores que presentan propiedades antioxidantes (IICD y derivado de melatonina), por lo que sirven de protección ante el estrés oxidativo, y fueron comparados con los inhibidores por excelencia de la enzima. El análisis principal se centró en estudios de acoplamiento molecular para cada sistema propuesto y en la determinación de la energía libre de unión de las interacciones. Los resultados indicaron que la interacción de COMT-inhibidor está gobernada por las contribuciones hidrofóbicas, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura. Y se comprobó que el IICD, inhibidor modelado computacionalmente y con características antioxidantes, posee una mejor unión con la COMT.

ABSTRACT

In this work the interaction of Catechol O-methyltransferase (COMT) with different inhibitors was studied. Since COMT is the enzyme responsible for the degradation of catecholamines and an important therapeutic target in neurodegenerative diseases. In this work, we explore the molecular recognition between COMT and two types of inhibitors that have antioxidant properties (IICD and melatonin derivative), so they serve as protection against oxidative stress, and were compared with the inhibitors par excellence of the enzyme. The main analysis focused in docking studies for each proposed system and in the determination of the binding free energy of the interactions. The results indicated that the interaction of COMT-inhibitor is governed by hydrophobic contributions, which is consistent with that reported in the literature. And it was found that IICD, an inhibitor computationally modeled and with antioxidant characteristics, has a better binding with COMT.

Introducción

Actualmente el estrés oxidativo se ha convertido en el detonante de diversas enfermedades como hipertensión, cáncer, desórdenes cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas, entre las que destacan las enfermedades como el Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (Estrada y Martínez, 2011; Patel et al., 2019). La oxidación es un proceso bioquímico de pérdida de electrones y va siempre acompañado de otro de reducción. Este proceso es fundamental en la vida ya que participa en los procesos de obtención de la energía celular. Cuando se produce un exceso de oxidación se rompe el equilibrio, este se produce mientras las células del organismo transforman los alimentos en energía, y es cuando aparece el estrés oxidativo (Elejalde Guerra, 2001). El estrés oxidativo provoca desbalance entre la producción y el consumo de oxidantes en el cuerpo humano, en especial de radicales libres, provenientes de fuentes endógenas (procesos inflamatorios metabólicos, estrés emocional) y exógenas (contaminación o radiación ionizante y ultravioleta).

Por lo anterior, ha surgido la necesidad de proponer rutas médicas que permitan minimizar o contrarrestar el estrés oxidativo, y de esta forma controlar dichas enfermedades. El análisis de modelos moleculares ha desempeñado un papel importante en el desarrollo de tratamientos de dichas enfermedades, permitiendo el diseño de nuevas moléculas con las características claves para optimizar los tratamientos.

Actualmente, una de las enzimas más estudiadas para el desarrollo de nuevos productos para luchar con el manejo de los trastornos del sistema nervioso central es la Catecol O-Metiltransferasa (COMT).

Desde el punto de vista bioquímico, la Catecol O-metiltransferasa (COMT) que es la enzima responsable de la degradación de las catecolaminas (dopamina, adrenalina, epinefrina y norepinefrina) juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson. Esta enzima se compone de siete hebras, tiene estructura β -plegada intercalada entre dos conjuntos de α -hélice (hélices $\alpha 1$ a $\alpha 5$ en un lado y hélices $\alpha 6$ a $\alpha 8$ en el otro lado), tal como se muestra en la figura 1 (Zhlguo et al., 2013).

La COMT cuenta con dos isoformas, la soluble (S-COMT) localizada en el citosol y la de membrana (MB-COMT). Adicionalmente, la COMT de humano contiene un polimorfismo valina-metionina en la posición 108.

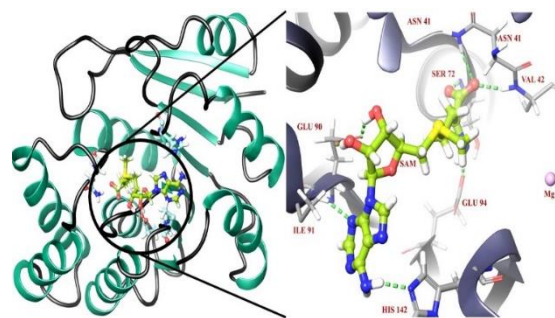


Figura 1. Estructura química de la COMT (ID PDB 3BWY). (Figura visualizada con el software *Maestro* Schödinger Company, 2019).

La COMT que contiene el residuo de metionina en la posición 108 (ID PDB 3BWY) es menos estable que la COMT que contiene a la valina (ID PDB 3BWM) en la misma posición, resultando un decremento en la actividad enzimática, así como en los niveles de proteína *in vivo*. Cabe mencionar que ambas estructuras son solubles.

La S-COMT se conforma de 221 residuos y de un cofactor S-adenosil-L-metionina (SAM) (ver figura 1) que desempeña un papel importante en las interacciones moleculares con sustratos e inhibidores. El sitio activo de la S-COMT está integrado por los siguientes residuos: Asn 41, Val 42, Glu 90, Met 91, His 142, Trp 143 y el ión Mg^{2+} principalmente (Vidgren et al., 1994).

La interacción de la COMT con diversas moléculas que actúan como inhibidores se relaciona directamente con la búsqueda de sistemas que logren minimizar el estrés oxidativo, por ello se ha recurrido al estudio de moléculas que contribuyan como una barrera de protección.

En los últimos años se han diseñado computacionalmente inhibidores, por ejemplo, los análogos a la melatonina, gracias a que ésta posee alta solubilidad en lípidos, tiene baja toxicidad y puede atravesar la barrera fisiológica. Dentro de este grupo de inhibidores se encuentran los denominados Ilcd e IbG, donde se ha reportado que son capaces de eliminar la formación de radicales libres como $-OH$, $-RO_2$. (Galano, 2016).

Por lo anterior, y con el afán de complementar este estudio computacional y evaluar la interacción de estos inhibidores, especialmente el Ilcd y un derivado de melatonina, en esta investigación se propone un análisis de modelado molecular que integra estudios de dinámica molecular, para entender el reconocimiento entre COMT-inhibidor.

En este trabajo, se utilizó la isoforma soluble de la COMT de humano 3BWY.pdb (Vidgren et al., 1994) y los inhibidores que se proponen estudiar son: Ilcd, dopamina, derivado de melatonina (dm) y L-3, 4 dihidroxifenilalanina (Levodopa) (ver figura 2). Dos de ellos (dopamina y Levodopa) son los inhibidores por excelencia de la COMT (Chouza, 1998), debido al papel de ésta en la regulación del nivel de dopamina producida en el cerebro, que genera la eficacia terapéutica del fármaco en el caso de la enfermedad de Parkinson. Su eficacia se relaciona con el nivel de dopamina convertido a partir del fármaco. Los estudios han demostrado que la inhibición de la actividad de la COMT produce una marcada reducción del aclaramiento corporal de la L-dopa y la dopamina (Männistö PT, 1999), lo que lleva a un nivel sostenido de dopamina en el cerebro y mejora de la eficacia (Männistö PT, 1992).

Cabe mencionar que paralelamente también se está estudiando la interacción de la COMT (3BWM.pdb) con los inhibidores mencionados arriba (datos no mostrados en este trabajo). Cuando ya se tengan ambos sistemas bien caracterizados se realizará un estudio comparativo. Además, ambas estructuras son superponibles con un root-mean-square deviation of atomic positions (RMSD) en α de 0.2 Å y los sitios activos son idénticos. Sin embargo, existen diferencias en el empaquetamiento intramolecular en la vecindad del residuo polimórfico 108. En el caso de la estructura 3BWY.pdb hay un desplazamiento en la cadena principal de la metionina 108 y muy cerca de las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 5$. Estas diferencias son importantes porque proporcionan hallazgos de cómo la mutación de valina por metionina puede desestabilizar a la COMT y cómo puede afectar la afinidad con diferentes sustratos o inhibidores.

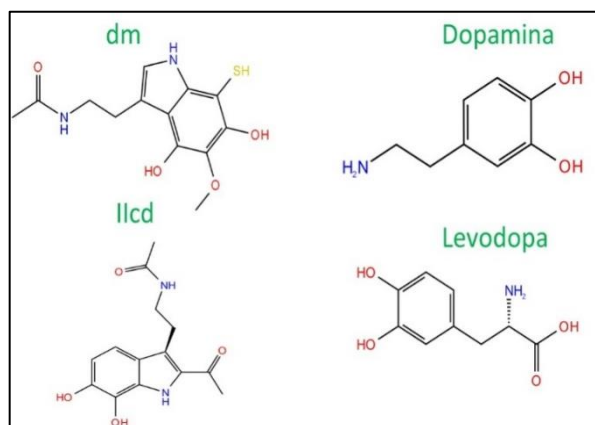


Figura 2. Estructuras químicas de los inhibidores de la COMT: derivado de melatonina (dm), dopamina, Ilcd y L-3, 4 dihidroxifenilalanina (Levodopa).

El análisis computacional también incluye estudios de acoplamiento (docking) de los complejos COMT-inhibidor y a través de criterios energéticos donde se involucra la energía libre de unión (ΔG_u) se determina el mejor sitio de interacción en el complejo, ya que la ΔG_u posee contribuciones del tipo electrostático (ΔG_{elec}) y no electrostático (ΔG_{noelec}), de acuerdo a la ecuación (1):

$$\Delta G_u = \Delta G_{u,elec} + \Delta G_{u,noelec} \quad (1)$$

Y a su vez la ΔG_{elec} está en función de la energía de solvatación (ΔG_{sol}) y la energía coulombica (ΔG_{coul}), de acuerdo a la ecuación (2):

$$\Delta G_{u,elec} = \Delta G_{sol} + \Delta G_{coul} \quad (2)$$

Donde la ΔG_{sol} se define como la energía necesaria para solvatar al sistema. Por otro lado, el ΔG_{coul} se refiere a la energía de interacción entre las cargas de la enzima y el inhibidor. La contribución al ΔG_u por parte de las interacciones hidrofóbicas ($\Delta G_{u,noelec}$) se evaluó como la energía liberada al ocultar el área de la interfase al solvente cuando se forma el complejo.

Lo anterior da pauta a la búsqueda de rutas experimentales que permitan sintetizar nuevos compuestos, probar experimentalmente estos sistemas y así contribuir a minimizar los desórdenes de salud provocados por el estrés oxidativo.

Metodología

Se utilizó la estructura cristalográfica de la COMT de humano (ID PDB 3BWY) y se realizaron estudios de dinámica molecular de 100 ns con el programa NAMD (Philips et al., 2005) y parámetros CHARMM36. Basado en estudio de la estabilidad de trayectorias generadas, se consideraron varios puntos de éstas (10,000; 26,000; 38,000 y 50,000 ps) para estudiar su interacción con los inhibidores.

Se llevaron a cabo estudios de acoplamiento molecular (docking) con el programa *Autodock Vina* (Trott y Olson, 2010) generando 1,000 poses para cada sistema COMT-inhibidor. Bajo criterios energéticos se seleccionaron los mejores complejos.

Posteriormente se utilizó el programa PDB2PQR (Dolinsky, 2004), el cual prepara los archivos seleccionados para cálculos electrostáticos en un medio continuo. Mediante el algoritmo PROPKA (Li, H., et al., 2005) se asignó un estado de protonación para la proteína correspondiente a pH de 7.4 y fuerza iónica de 0.15 de acuerdo a las condiciones fisiológicas en el organismo. Para llevar a cabo los cálculos electrostáticos

se corrieron con el programa *Adaptive Poisson-Boltzmann* (Baker et al., 2001), donde se resuelve la ecuación no lineal de Poisson-Boltzmann.

Posteriormente, se calculó la energía libre de unión COMT-inhibidor con base en las contribuciones electrostáticas y no electrostáticas (ver ecuaciones 1 y 2).

Por otro lado, las interacciones del tipo no electrostático o no polar se evaluaron como la energía liberada al ocultar el área de la interfase al solvente cuando el complejo COMT-inhibidor se forma. Esta energía es proporcional al cambio en el área accesible al solvente y un parámetro semejante a la tensión superficial (γ) cuyo valor es de $0.021 \text{ kJ/mol} \cdot \text{\AA}^{-2}$, por lo que se obtiene $\Delta G_{u, noelec} = (\gamma) ASA_{interfase}$ (Friedman y Honig, 1995).

Se empleó el programa *Visual Molecular Dynamics (VMD)* (Humphrey et al., 1996) para calcular el área de la interfase que queda oculta del solvente en el complejo, a partir de los archivos PDB del complejo y de las moléculas aisladas, de acuerdo a la ecuación (3):

$$\Delta G_{u, noelec} = \gamma (ASA_{COMT-inhibidor} - ASA_{COMT} - ASA_{inhibidor}) \quad (3)$$

Finalmente, a través de la ecuación (1) se determinó el ΔG_u para los complejos COMT-inhibidor.

Resultados y discusión

En la tabla 1 se muestran los resultados correspondientes al ΔG_u para los cuatro sistemas propuestos: COMT-dm, COMT-dopamina, COMT-IIcd y COMT-levodopa. Es importante mencionar que se realizaron estudios de acoplamiento molecular antes y en las diferentes trayectorias generadas durante la dinámica molecular. Posteriormente se determinaron los valores de ΔG_u en cada trayectoria y se observó que en 50,000 ps las energías fueron las más favorables y la tendencia energética de los complejos correlacionó con los valores de ΔG_u antes de realizar la dinámica molecular. A continuación, en la tabla 1, se muestran los valores de ΔG_u de esta última trayectoria.

Tabla 1. Contribución energética en los complejos COMT-inhibidor.

Complejo	ΔG_{sol} (kJ/mol)	ΔG_{coul} (kJ/mol)	ΔG_{noelec} (kJ/mol)	ΔG_u^* (kJ/mol)
COMT-IIcd	147	-29	-427	-309
COMT-dopamina	247	-33	-425	-211
COMT-dm	204	16	-427	-208
COMT-Levodopa	226	-8	-425	-207

$$\Delta G_u^* = \Delta G_{sol} + \Delta G_{coul} + \Delta G_{noelec}$$

Con base en los resultados del ΔG_u se observó que el complejo que tuvo una mejor interacción molecular fue COMT-IIcd ($\Delta G_u = -309 \text{ kJ/mol}$), donde las interacciones hidrofóbicas (ΔG_{noelec}) aportaron una mayor contribución en la unión de la enzima y el inhibidor; y en menor proporción las interacciones electrostáticas, incluso en los cuatro casos de estudio se favoreció el ΔG_{noelec} respecto al ΔG_{coul} . También se observó que la interacción de COMT-dm se obtuvo un $\Delta G_u = -208 \text{ kJ/mol}$ donde este reconocimiento sólo fue favorecido por las interacciones hidrofóbicas. Para los sistemas COMT-dopamina y COMT-Levodopa las energías de unión fueron favorables predominando también las interacciones hidrofóbicas y en menor proporción las electrostáticas.

Los residuos que contribuyeron a la interacción COMT-IIcd fueron principalmente Trp 143, Glu 199 y Asn 170 (figura 3C), estos residuos rodean al cofactor (SAM) de la COMT lo que da el carácter hidrofóbico y correlaciona con lo reportado en la literatura (Rutherford et al., 2008).

Para el resto de los complejos también se identificaron los residuos que fueron responsables del carácter hidrofóbico, por ejemplo, para COMT-dm se encontraron: Asp 141, His 142, Trp 143 (figura 3A), en el complejo COMT-dopamina: Asp 141, His 142, Glu 199 (figura 3B) y finalmente, para COMT-levodopa: Asn 170, His 142, Glu 199 (figura 3D). En todos los casos anteriores se encontró la presencia de Mg^{2+} que es un ión importante para favorecer la unión de los sustratos o inhibidores.

Los residuos que participaron en la unión de estos complejos al menos dos residuos forman parte del sitio activo de acuerdo con lo reportado por Rutherford et al., 2008. Como ya se mencionó, paralelamente se está estudiando la interacción de la COMT usando la estructura 3BWM.pdb con los mismos inhibidores, en los avances se ha observado que cuando la valina está en el sitio 108 la afinidad aumenta principalmente con el IIcd (datos no mostrados). También el ΔG_u es conducido por las interacciones hidrofóbicas respecto a las

interacciones electrostáticas. A continuación, se muestran los complejos más favorables de la COMT (3BWY.pdb) con los diferentes inhibidores.

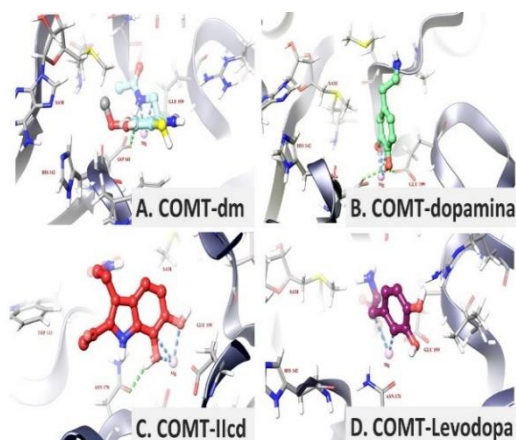


Figura 3. Interacciones moleculares de los complejos: A. COMT-dm; B. COMT-dopamina; C. COMT-Ilcd; D. COMT-Levodopa.

Como se puede observar en la figura anterior el complejo COMT-Ilcd establece al menos tres puentes de hidrógeno respecto a dm, dopamina y levodopa. El inhibidor Ilcd, dopamina y levodopa generaron un ambiente electrostático débil en el sitio activo de la COMT. Como ya se mencionó anteriormente, el Mg^{2+} fue importante en la unión y concuerda con lo reportado en la literatura.

Finalmente, se determinaron los potenciales electrostáticos (para los cuatro complejos) donde se observó que las interacciones hidrofóbicas predominaron en el sitio de unión y en menor proporción contactos electrostáticos tal como se muestra en la figura 4.

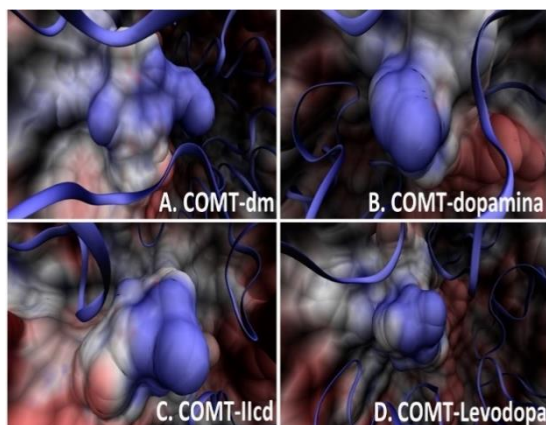


Figura 4. Potenciales electrostáticos de los complejos: A. COMT-dm; B. COMT-dopamina; C. COMT-Ilcd; D. COMT-Levodopa. (Color azul indica cargas positivas, el color rojo cargas negativas y el color blanco cargas neutras).

Con base en los potenciales electrostáticos calculados a través de acoplamiento molecular (figura 4), se observó que al formarse el complejo COMT-inhibidor predominaron las cargas neutras (color blanco) en los cuatro complejos analizados. Sin embargo, en los complejos COMT-Ilcd, COMT-dopamina y COMT-Levodopa fue notable el predominio de interacciones hidrofóbicas. En estos tres complejos, también se observaron contactos electrostáticos (color azul y rojo) en el sitio de unión, principalmente en el complejo COMT-dopamina y esto correlaciona con los resultados de la tabla 1.

Este trabajo contribuye al estudio molecular sobre la inhibición de la COMT ya que ésta es un blanco terapéutico muy importante para desórdenes del sistema nervioso central como lo es la enfermedad de Parkinson. Además de complementar lo ya estudiado por Galano (2016) donde Ilcd presenta funciones antioxidantes importantes para enfermedades neurodegenerativas. La importancia de este trabajo radica en caracterizar la interacción de COMT-Ilcd y COMT-dm principalmente y a su vez complementar una gran cantidad de estudios experimentales y computaciones que se han reportado hasta la fecha para el sistema COMT-dopamina y COMT-Levodopa. A pesar que dopamina y Levodopa son inhibidores principales de la COMT, el IICD presentó una energía muy favorable y estableció más puentes de hidrógeno. Respecto al dm al interactuar con la COMT no presentó contactos electrostáticos, sólo los contactos hidrofóbicos fueron favorecidos. La molécula Ilcd es un potencial antioxidante y la COMT es una diana terapéutica, lo que hace que dicha interacción sea importante para el diseño de fármacos contra enfermedades neurodegenerativas.

En nuestro grupo de investigación se está diseñando caracterizar la interacción de COMT-inhibidor a nivel experimental, lo cual daría luz al mecanismo de reconocimiento molecular y contribuir al desarrollo terapéutico de enfermedades neurodegenerativas.

Conclusiones

En este trabajo se modeló computacionalmente la interacción de la COMT con cuatro inhibidores, de los cuales dopamina y levodopa son los inhibidores por excelencia de esta enzima. Sin embargo, se comprobó que el Ilcd, inhibidor modelado computacionalmente, y con características antioxidantes posee una mejor unión con la COMT ($\Delta G_u = -309 \text{ kJ/mol}$) que dopamina y Levodopa. Esta unión, se debe principalmente al predominio de las interacciones hidrofóbicas respecto a

las interacciones electrostáticas presentes en el sitio activo.

El análisis mostrado en este trabajo permitirá establecer un nuevo sistema para contrarrestar el estrés oxidativo, ya que sirve de base para entender las interacciones moleculares COMT-inhibidor, y así poder sintetizar nuevos compuestos y hacer posible este estudio a nivel experimental.

Agradecimientos

Annia Galano Jiménez agradece al proyecto IFC-2016/1828.

Brenda Anahí Segura Bailón agradece a CONACyT por la beca de posgrado No. 616238 otorgada para los estudios del Doctorado en Ciencias (Ingeniería Química).

Jonathan Osiris Vicente Escobar agradece a CONACyT por la beca de posgrado No. 375880 otorgada para los estudios del Doctorado en Ciencias (Química).

Referencias

Baker Na., Sept D., Holst M., McCammon JA. (2001). Electrostatic of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98:10037-10041.

Chouza C., (1998). Asociación de inhibidores de la catechol-o-metil-transferasa (COMT), su significado y ubicación en la evolución terapéutica de la enfermedad de Parkinson. *Neuro-Psiquiatría.*, 61: 44-50.

Dolinsky, T. J., Nielsen, J. E., McCammon, J. A., Baker, N. A. (2004). PDB2PQR: An Automated Pipeline for the Setup of Poisson-Boltzmann Electrostatics Calculations. *Nucleic Acids Res.*, 32, W665-667.

Elejalde Guerra J.I. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. In *Anales de Medicina Interna. Arán Ediciones, S.,* 18: 50-59.

Estrada I., Martínez H. (2011). Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Parkinson. *Avances.*, 8: 16-22.

Friedman R. A., Honig B. A. (1995). Free Energy Analysis of Nucleic Acid Base Stacking in Aqueous Solution. *Biophysical Journal.*, 69:1528-1535.

Galano A. (2016). Computational-aided design of melatonin analogues with outstanding multifunctional antioxidant capacity. *RSC Advances.*, 6:22951-22963.

Humphrey W., Dalke A., Schulten K. (1996) VMD: Visual molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics.*, 14: 33-38, 27-28.

Li H., Robertson A.D., Jensen J.H. (2005). Very fast empirical prediction and interpretation of protein pKa values. *Proteins.*, 61: 704-721.

Männistö PT, Kaakkola S. (1999). Catechol-O-methyltransferase (COMT): biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. *Pharmacol Rev.*, 51: 593-628.

Männistö PT, Ulmanen I, Lundström K, Taskinen J, Tenhunen J, Tilgmann C, Kaakkola S. (1992). Characteristics of catechol O-methyl-transferase (COMT) and properties of selective COMT inhibitors. *Prog Drug Re.*, 39: 291-350.

Patel C., George J., Modi K., Narechania M., Patel D., González F., Pandya H. (2019). Pharmacophore-based virtual screening of catechol-o-methyltransferase (COMT) inhibitors to combat Alzheimer's disease. *Biomolecular Structure Dynamics.*, 36:3938-3957.

Philips JC., Braun R., Wang W., Gumbart J., Taikhorshid E., Villa E., Chipot C., Skeel R D., Kalé L., Schulten K. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *Comput Chem.*, 26: 1781-1802.

Rutherford K., Trong I., Stenkamp R., Parson W. (2008). Crystal Structures of Human 108V and 108M Catechol O-Methyltransferase. *Journal of Molecular Biology.*, 380: 120-130.

Schrödinger company (2019). Consultado el 15 de junio del 2019, <https://www.schrodinger.com/our-story>

Trott O., Olson A. J. (2010). AutoDockVina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry.*, 31: 455-461.

Vidgrent J., Svensson L., Liljas A. (1994). Crystal structure of catechol O-methyltransferase. *Nature.*, 368: 354-358

Zhiguo Ma., Hongming L., Baojian W. (2013). Structure-based drug design of catechol-O-methyltransferase inhibitors for CNS disorders. *British Journal of Clinical Pharmacology.*, 77: 410-420.