

Identificación de compuestos con afinidad de unión por la proteína Lon en *Acinetobacter baumannii* por medio de un análisis *in silico*.

David Orlando Lara Sanabria
Natalia Chicuasque Pérez

Asesora Externa
Ibeth Cristina Romero Calderón

Asesora Interna
Ruth Mélida Sanchez Mora



Bogotá D.C.
28 de enero de 2022

Características de *Acinetobacter baumannii*

Infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS)

Cocobacilo pleomórfico corto, Gram negativo.

Prevalencia del 2% al 8% de infecciones hospitalarias por Gram negativos

Representando entre un 45%-70% de las neumonías y un 20%-30% de bacteriemias

Presente en infecciones de tejidos blandos, piel, pulmonares y urinarias

Resistencia a antibióticos implicada en *Acinetobacter baumannii*

La OMS ha incluido a *Acinetobacter baumannii* dentro de la lista de patógenos ESKAPE.

Tasas de resistencia a los carbapenémicos superan el 90% en algunas partes del mundo.

En Colombia la resistencia de *Acinetobacter baumannii* a los carbapenémicos supera el 50% lo que resulta en una situación preocupante.

Se prioriza la búsqueda y desarrollo de nuevos antibióticos

Búsqueda de una molécula blanco de interés

Proteasa Lon como blanco terapéutico



Proteasa de serina dependiente de ATP

Posible Molécula blanco de interés patogénico

Funciones fisiológicas en *A. baumannii*

- Degradación de proteínas mal plegadas
- Deficiencia ocasiona motilidad disminuida
- Influye en el mantenimiento de la envoltura celular
- Su inhibición causa muerte programada en la célula

Ubicada en el citoplasma

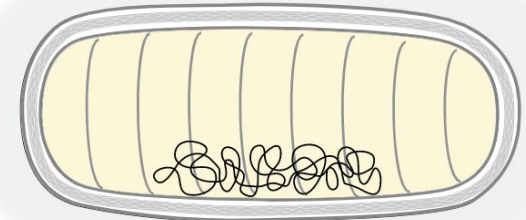
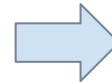


Figura 1. Ubicación de la proteína Lon

Objetivo general

- Identificar compuestos con afinidad de unión por la proteína Lon de *Acinetobacter baumannii* por medio de un análisis *in silico*.

Objetivo específico

1. Identificar los aminoácidos que forman la región catalítica o sitio activo de la proteína Lon de *Acinetobacter baumannii* necesarios para el acoplamiento molecular.

```

2736181 aaattagtc tttttcaac attttctatt gtcattgcct tgtaattttt aaaaataca
2736241 tcactataaa aaacatggca acctcgttgt cactcattag gagtgccat gtcggaact
2736301 attatgaatg aaaaaactga cttagagcct caggttccaa gtgtattacc actattagcc
2736361 ttacgtgatg tgggtgttta tccacacatg cagattgcgc tatttggggg tcgtgaaaaa
2736421 tcatcaatg cagttgatg ggtcgtaac agtgaacaatt tagtatttgg agttgcccac
2736481 aaagaticgc ttacagaaga aattgatcac gacaatttat accagtagcg tacagtcgct
2736541 aaagattgtc aagtagttaa tcatgaaaat gatgaaaact gcattaaagt acttattgaa
2736601 ggcttaccat gttctaagtt gaaaaaaatt atcgtagaag atagtattt gactgcccga
2736661 catgaattaa ttccaatgac gattaatgta gataaggcaa cgcaagaac tcgtttacaa
2736721 gagttacgta acttatttc tcaaatgca gaagcaaaa tacgtaatgc acgtgaaactg
2736781 gttgctgctg ccaacaaaat cgaagattta ttgcaattga tgttctcgt agcaactcgt
2736841 gtgcctctaa atattgaaat taagcagaaa tttttagagt acgatgagt tgaagctcat
2736901 ttgcaagagt tgatgaaact cttgatgaat caatctgctg aacagcaaat tgaagcaact
2736961 ttacatgaca cgtgaaacg ccaaatgga aagaaccaac gtgaatact tctaataaga
2737021 aaaaagaaag tcaattcaag tgaactttcc gacatgaatg cgggtgctga agatgacgt
2737081 gctgaaatag agaacgctc tgcgtaagct gatttaccctg aacacgtacg taanaaaagcc
2737141 gaagctgagt tccgtaaac taagcaatg cacctcgcac ctagtgaagc tgctgtgta
2737201 cgtaatatc tgaagtgat tctagatag ccatggaaaca aagcagcaca agtcaattt
2737261 aacctgaaca aagcgaaga gattcctgat gccgatcatt atggcttga tgacgttaa
2737321 gatcgtattg ttgagtacct agctgttcaa tcaagttgga aaaaactcaa agccctatc
2737381 ctttgcctgg ttggacctc aggggttggg aaaaactcac ttggtgaatc agtagcga
2737441 gcaacaggtc gtgaattgt tgcgatggc cttggtggcg tacgtgatg agcagaatt
2737501 cgtggacacc gtcgtacta tattggtgcg atgccagga aactcgtgca gctttaaaca
2737561 aaagtggte tgaagaacc attgttcta ctgcagaaa ttgacaagt ggcacaagac
2737621 taccgtggte atctgcttc tgccttgcct gaagtgcctg atccatcaca aaacagtaag
2737681 ttcaacgatc actatttaga tcttgatctt gacctttctg aagtgatgt catctgact
2737741 gcaaacgca tgaatattc agaagccttg ttggaccgta tggaaattat tgcctaccg
2737801 ggttataacc aagatgaaaa agttaacatt gctgagcgtt acctgttcc taagaacatt
2737861 aagaacaatg gcctacgtc aaaaagattt actattcatg aagaagcgt tctgacatt
2737921 gttcaacgct atacacgta agctggcgt cgtaatatg aacgtgaagt ttctaaaatt
2737981 gcagtaaag tctgaaaaga agcagtaagt aaaaactca aaaaactca cgttgacgtt
2738041 acctctgcca atcttctga ataccaggt cccataaat ttgacttgg tatggccga
2738101 gatgaagcac aagtaggcc tgaataatg ttggcatgga ctctctagg tggtagattg
2738161 ctactattg aagttgcagc tgttaaaagg aaagtaaat tcattacaac cgttcaactc
2738221 ggtgatgtaa tgaagaatc aattaccaca gcaatgactg tagtacgac acgtgccgat
2738281 gaactggaaa ttgaagcatc tgccttggaa gaaactgatg tacacgttca ctactctgaa
2738341 ggtgcaactc caaaaagatg tccatctgct gtttagcgc taacaactgc acttgatca
2738401 gcatttactg gaattgcgat tgcaccgat attgcaatga caggtgaaac aagtctaggt
2738461 ggtcgtgca tgcgatcgg tggcttggaa gagaacttc ttgctgaca tctggttgg
2738521 atcaagctcg tctttatcc tcaagataac gttcgtgatt tggcagaat tccagacaat
2738581 gtgaaaagag gattgaaat caaagctgtg aaaagcattg atgaaactt acttttaga
2738641 ttaacttca tgcxaaagc ttactcaaa acaccgatg taaaaccggt ggaagctca
2738701 aaagcagcg ctcactaatt tacatataaa aagagagggc ttcgctctc tttttttgt

```

Ubicación de la secuencia del gen Lon dentro de la secuencia genómica completa de *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii
cepa AB 307-0294

Permitió identificar

Secuencia con 2430 nucleótidos

Dónde su producto es la proteína Lon

Figura 2. Secuencia del gen Lon por GENBANK

Tomado de:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP001172.2>

Búsqueda de la secuencia proteica y ortólogos

Base de datos **Uniprot** para obtener la secuencia de aminoácidos de la proteína (809 aa)

Búsqueda de proteínas con afinidad u homólogas con la herramienta **BLASTp**

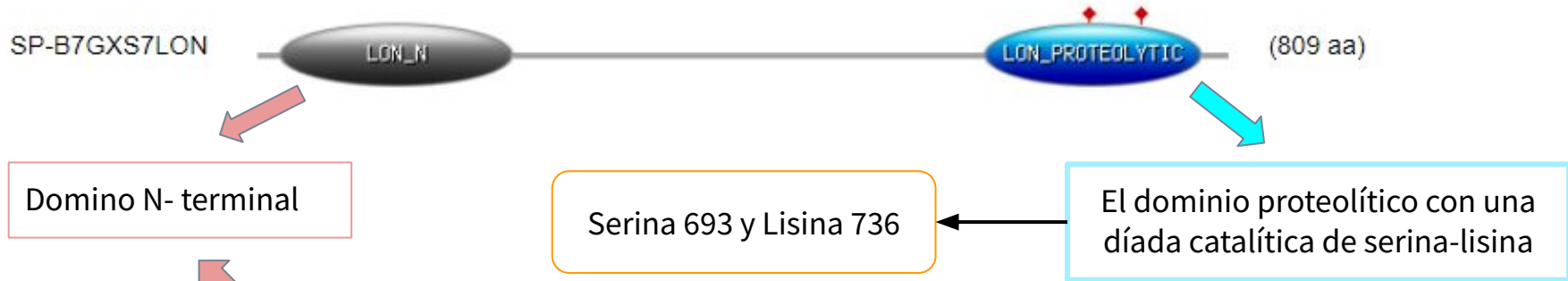
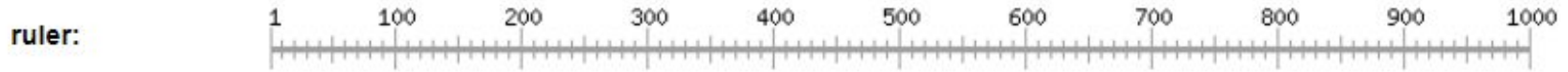
De los resultados se escogieron 4 proteínas con el mayor porcentaje de identidad

Proteína	Porcentaje de Identidad
DNA-binding ATP-dependent protease La (<i>K. pneumoniae</i>)	100%
Endopeptidase La (<i>G. bacterium</i>)	93.57%
Lon protease (<i>E. coli</i>)	73.67%
Lon protease homolog 2, peroxisomal isoform X2 (<i>Homo sapiens</i>)	51.40%

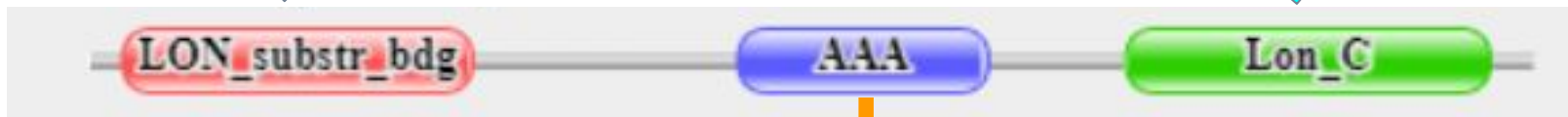
Fuente: Elaboración Propia

Tabla 1. Proteínas encontradas por **BLASTp** y su porcentaje de identidad con la proteína Lon de *A. baumannii*.

ScanProsite



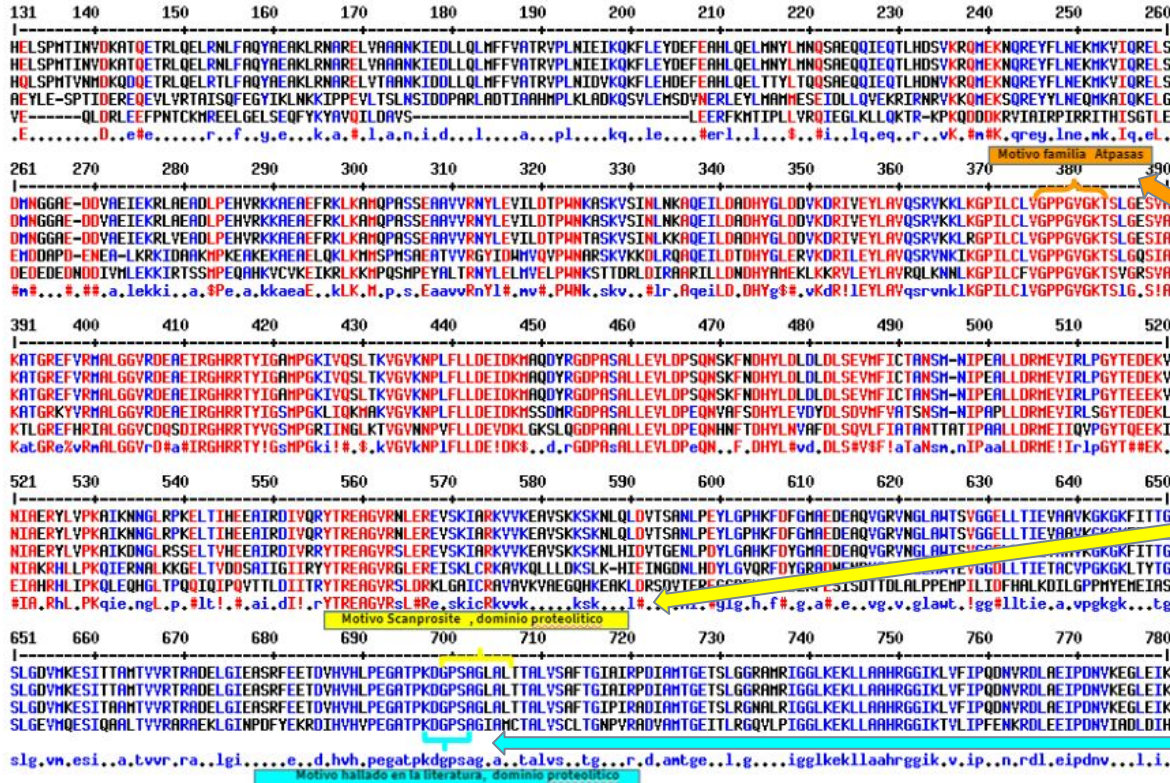
Pfam



Familia de Atpas asociadas con diversas actividades celulares

Figura 4. Dominios proporcionados por las herramientas ScanProsite y Pfam.

Alineamiento múltiple de secuencias



- 1 Proteasa Lon de *A. baumannii*
- 2 Proteasa La de *K. pneumoniae*
- 3 Endopeptidasa La de *G. bacterium*
- 4 Proteasa Lon de *E. coli*
- 5 Proteasa Lon Humana

Motivo familia Atpasas
VGPPGVGKT

Motivo que hace parte del dominio Familia de Atpasas asociadas con diversas actividades celulares (AAA)

GPSAGLAL

Motivo encontrado por Scanprosite que está presente en el dominio proteolítico.

KDGPS

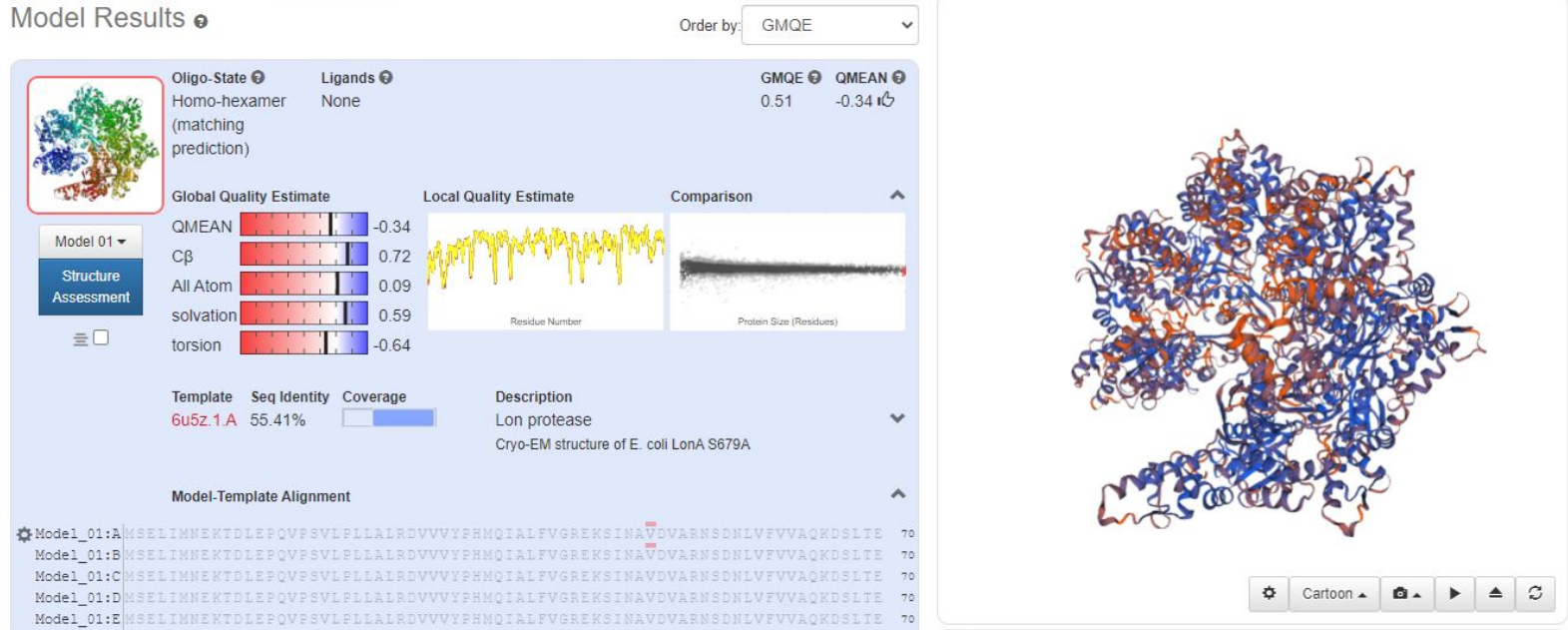
Motivo que hace parte del dominio proteolítico.

Figura 3. Alineamiento Múltiple de Secuencias por Multalin

Objetivo específico

2. Determinar la energía de unión o energía de acoplamiento entre compuestos químicos y el sitio activo de la proteína Lon de *Acinetobacter baumannii* mediante acoplamiento molecular.

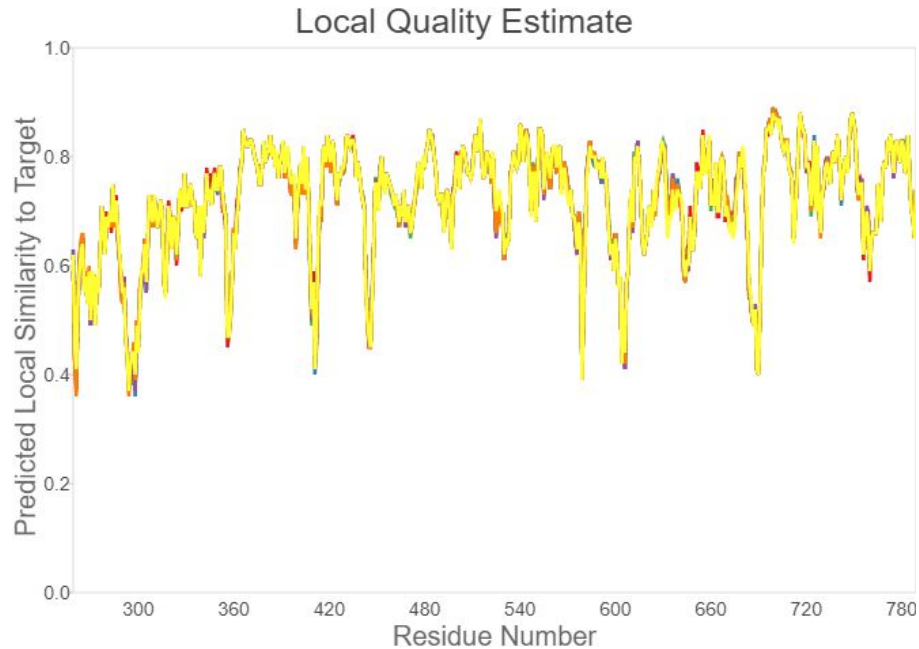
Modelado de la estructura tridimensional de la Proteína Lon



Resultados de la estructura tridimensional de la proteína Lon de *Acinetobacter baumannii* por SWISS MODEL

Figura 5. Modelo tridimensional proporcionado por **SWISS-MODEL**.

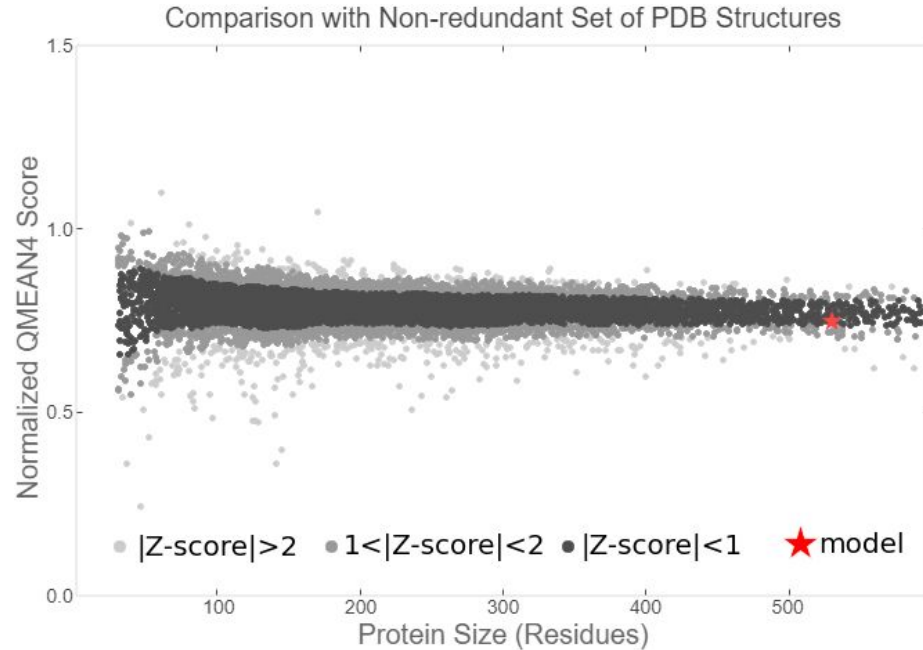
Calidad Local Estimada



Muestra, para cada residuo del modelo resultante, la similitud esperada con la estructura nativa.

Figura 6. Gráfico de calidad local estimada

Gráfico de comparación



Indica que el QMEAN del modelo construido se encuentra cerca de la media del valor esperado de las estructuras reportadas en el PDB de tamaño similar.

Figura 7. Gráfico de comparación de QMEAN

Validación del Modelo 3DE

ProSA-web

Gráfico de Z-score ProSA-web

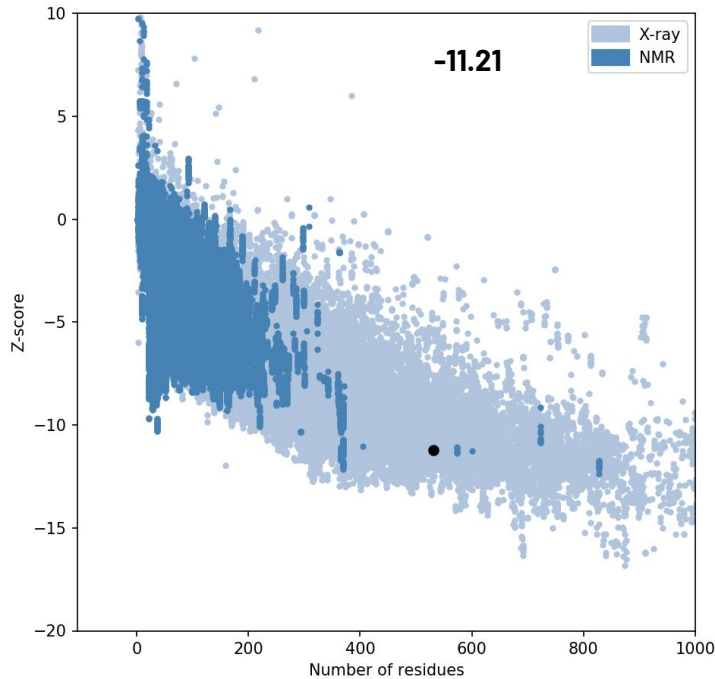
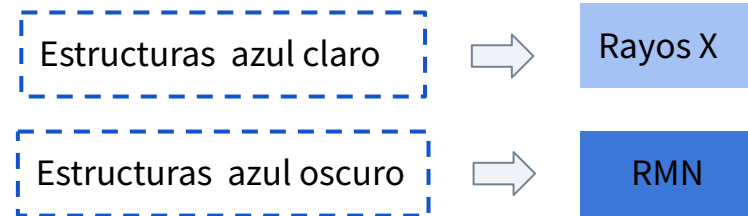
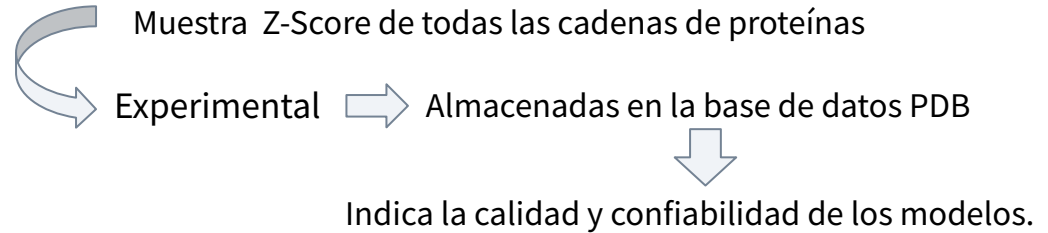
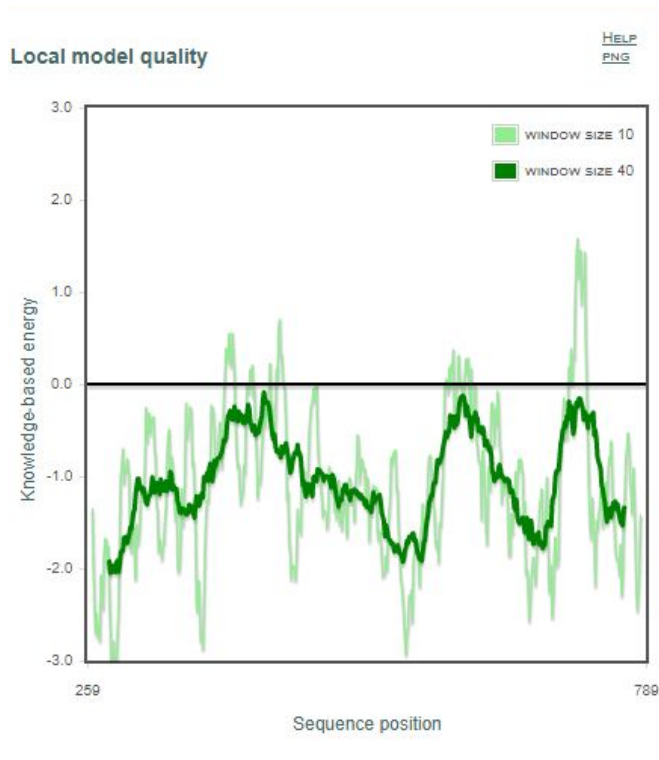


Figura 8. Gráfico de **Z-Score**



Punto negro en la gráfica indica que el modelo tiene un Z-Score aceptable

Gráfico de energía de residuos



Gráfica de las energías de los residuos en función de la posición de la secuencia de aminoácidos.

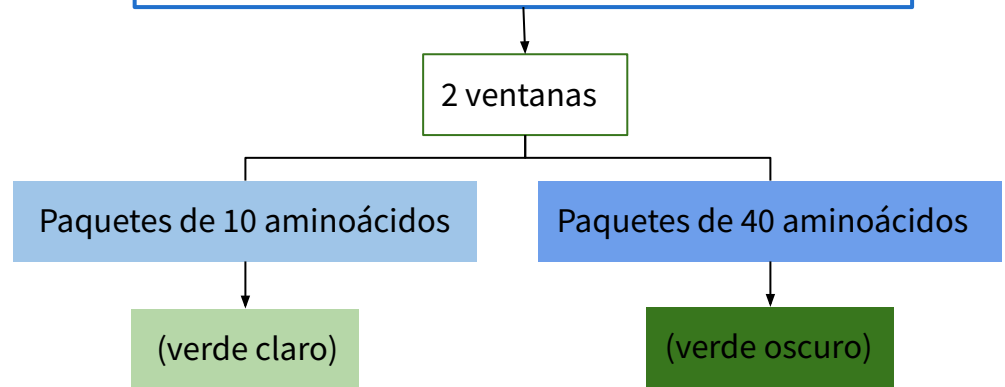
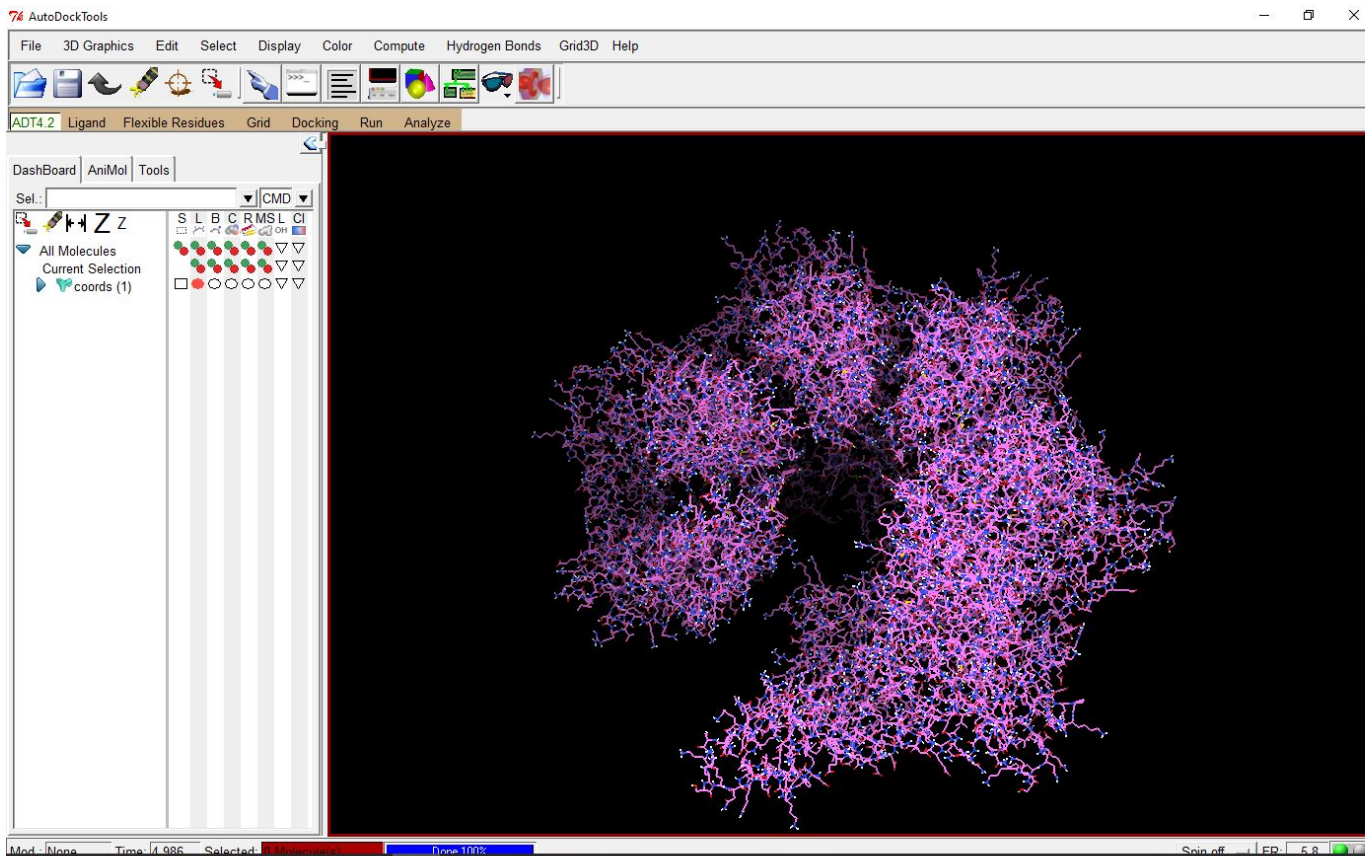


Figura 9. Gráfico de energía de residuos

Docking Molecular

**Acondicionamiento del modelo, ligando natural,
AutoDock Tools, AutoDock Vina.**

Acondicionamiento del modelo en AutoDockTools



Adición de Hidrógenos a la estructura



Eliminación de moléculas de agua

Determinación de la caja y coordenadas

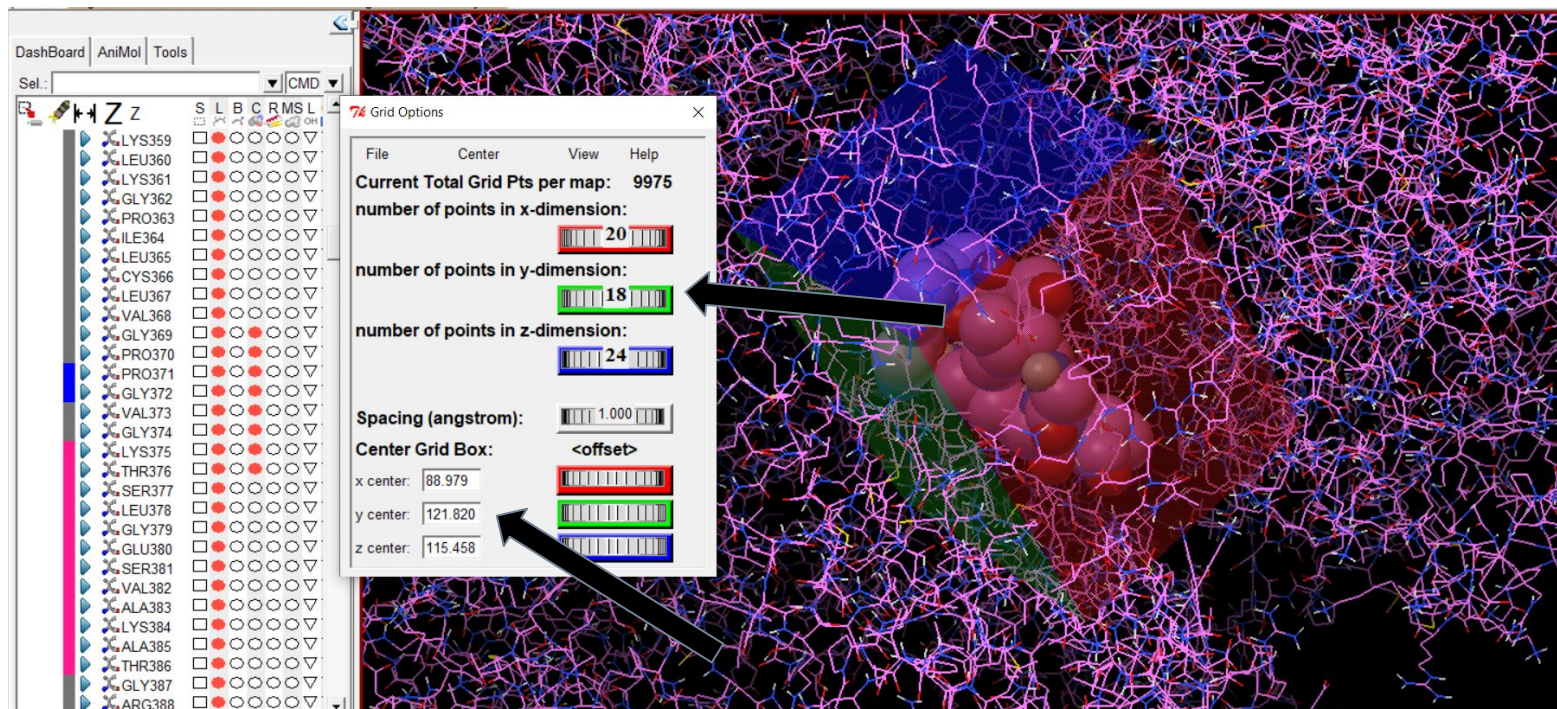


Figura 13. Establecimiento de la caja y sus coordenadas en el sitio de acoplamiento.

Docking molecular con el ligando natural utilizando Autodock Vina



mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode rmsd l.b.	rmsd u.b.
1	-7.0	0.000	0.000
2	-6.9	1.246	2.175
3	-6.8	1.189	2.367
4	-6.7	1.183	1.765
5	-6.7	5.556	9.194
6	-6.6	5.418	8.810
7	-6.5	5.472	9.048
8	-6.5	5.309	8.293
9	-6.4	5.878	9.551

Figura 14. Resultados de energías de unión del docking realizado a la proteína Lon y su ligando natural.

Docking masivo entre Proteasa Lon y compuestos con potencial unión a la proteína

Se utilizó una librería de compuestos comerciales similares a fármacos



A partir de la base de datos **ZINC** disponible en el servidor **TACC** de la Universidad de Texas



Se identificaron cerca de 1000 compuestos que presentaron afinidad por la proteasa Lon con energías de unión entre **-7.8 a -6.8 Kcal/mol**.

TestSet (Tiny: 10 Ligands : Run time ~1 hr)
ZINC-in-trials (Sm: 9,270 Ligands : Run time ~5 hrs)
ZINC-fragments (Lrg: 546,003 Fragments : Run time ~20 hrs)
Enamine-PC (Med: 43,339 Ligands : Run time ~12 hrs)
Enamine-AC (Lrg: 445,239 Ligands : Run time ~36 hrs)
Enamine-HTSC (XLrg: 2,141,514 Ligands : Run time ~48 hrs)

Figura 15. Base de datos (**ZINC-fragments 546,003**) en la cual se realizó el docking masivo.

Objetivo específico

3. Predecir las propiedades farmacocinéticas (ADMET) de los compuestos que presenten mejor energía de unión con la proteína Lon de *A. baumannii*.

Análisis de propiedades farmacocinéticas ADMET

De los cerca de 1000 compuestos que presentaron afinidad por la proteasa Lon

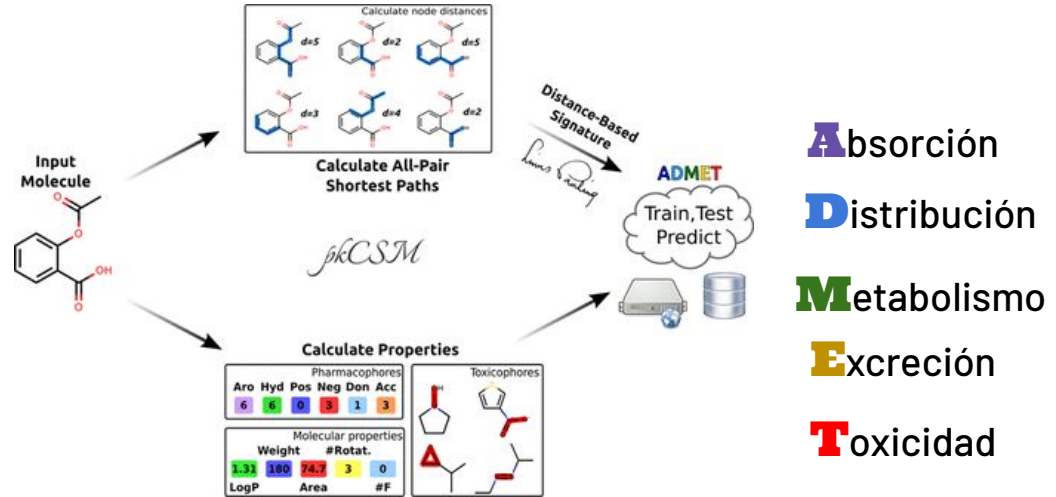


Se seleccionaron los 100 primeros cuya energía de unión fue mayor de -7.0 Kcal/mol



A los cuales se les realizó análisis de las características farmacocinéticas ADMET *in silico*

Para lo cual se utilizó la herramienta **pkCSM**



Absorción

Distribución

Metabolismo

Excreción

Toxicidad

Figura 16. Flujo de trabajo de **pkCSM**.

Análisis de propiedades farmacocinéticas ADMET

Compuesto	Energía de unión Lon Kcal/mol	Permeabilidad Caco-2	Absorción Intestinal Humana (HIA)	Sustrato de glicoproteína P	Unión a Proteínas Plasmáticas	Barrera Hematoencefalica	Sustrato CYP2D6	Sustrato CYP3A4	Inhibición de CYP2D6	Inhibición de CYP3A4	Inhibición de CYP2C9	Inhibición de CYP2C19	Inhibición de CYP1A2	Sustrato OCT2 Renal	Toxicidad AMES	Inhibición humana hERG I	Inhibición humana hERG II	Toxicidad Oral Aguda	Hepato toxicidad
ATP	-7.0	-0.575	20.127	SI	0.483	-2.751	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	2.424	NO
ZINC000003435531	-7.4	1.168	94.079	NO	0.294	-0.251	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	NO	NO	NO	NO	2.168	NO
ZINC000005006669	-7.4	1.34	94.079	NO	0.276	-0.251	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	NO	NO	NO	NO	1.191	NO
ZINC000034924974	-7.3	1.326	96.971	SI	0.225	-0.38	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	2.269	NO
ZINC000000426267	-7.2	0.95	92.459	SI	0.324	-0.212	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	NO	NO	NO	NO	2.283	NO
ZINC000041721989	-7.2	1.041	93.255	NO	0.191	-0.437	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	2.304	NO

Tabla 2. Compuestos escogidos mediante energía de unión y características de propiedades farmacocinéticas ADMET

Discusión

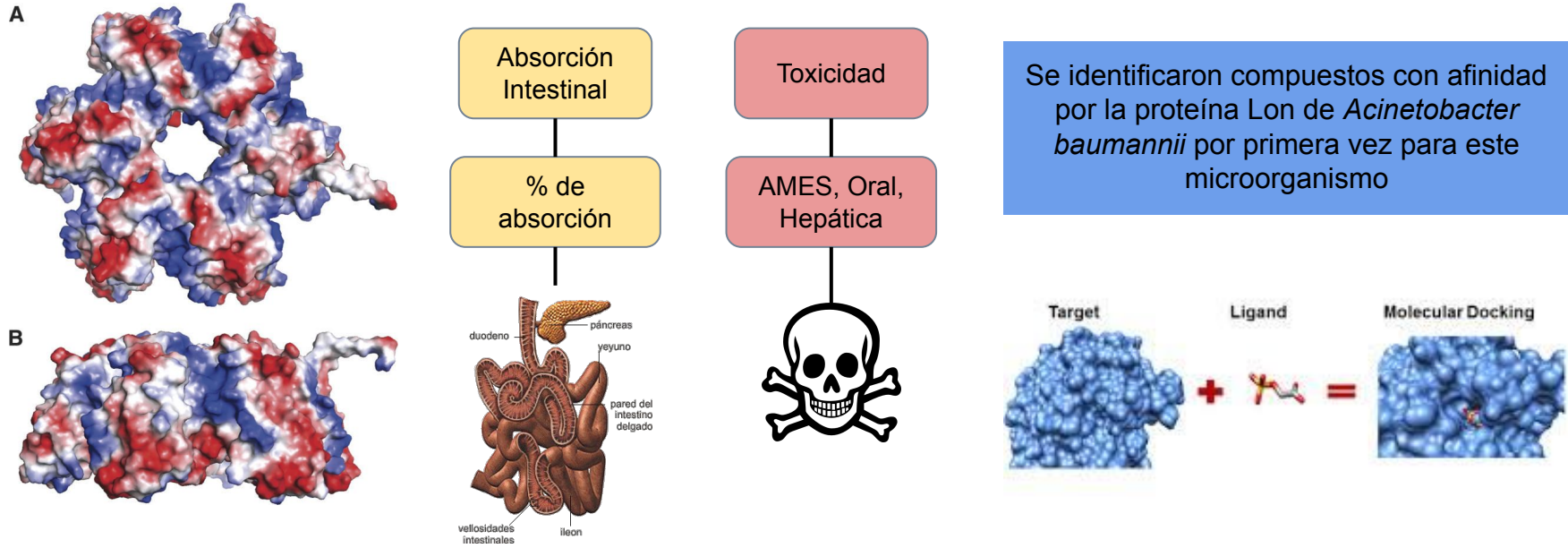


Figura 17. Estructura cristalografica de la proteasa Lon de *E. coli*

Tomado de: Rotanova T, Botos I, Melnikov E, Rasulova F, Gustchina A, Maurizi M, Wlodawer A. Slicing a protease: Structural features of the ATP-dependent Lon proteases gleaned from investigations of isolated domains. *Protein Science*. [Internet]. 2006.

Conclusiones

- Gracias a este estudio *in silico* se identificaron los aminoácidos que forman la región catalítica o sitio activo de la proteína Lon, el cual es una díada catalítica serina-lisina en los aminoácidos Serina 693 y Lisina 736 (S693 y K736), los cuales difieren con respecto a la proteasa Lon ortóloga humana y corresponden con el sitio donde fue elaborada la caja para la búsqueda de compuestos con afinidad por esa región.
- El estudio permitió conocer características de la proteína Lon de *A. baumannii* que lo hacen un posible blanco terapéutico y además gracias a este abordaje *in silico* se pudieron obtener unos compuestos con afinidad por la región exclusivamente presente en proteasas Lon bacterianas y que no está presente en humanos tales como ZINC000003435531, ZINC000005006669, ZINC000034924974, ZINC000000426267 y ZINC000041721989, en este caso para proteasa Lon de *A. baumannii*.

Perspectivas Futuras

- Con los resultados obtenidos mediante el estudio *in silico* el siguiente paso podría ser darle continuidad a la caracterización de la proteína Lon de *Acinetobacter baumannii* como posible blanco terapéutico a nivel *in vitro*.

Referencias

- <http://www.ehu.eus/biomoleculas/peptidos/pep1.htm>
- <https://www.tamps.cinvestav.mx/~ertello/bioinfo/sesion09.pdf>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AYG20431.1>
- <https://swissmodel.expasy.org/docs/help>
- <http://biosig.unimelb.edu.au/pkcs/>
- Chaari A, Mnif B, Bahloul M, Mahjoubi F, Chtara K, Turki O, et al. *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia: epidemiology, clinical characteristics, and prognosis factors. *Int J Infect Dis*.
- Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet D et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis.

Referencias

- Pei J, Yan J, Jiang Y. Characterization of the ATP-Dependent Lon-Like Protease in *Methanobrevibacter smithii*. Archaea. [Internet]. 2016 [cited 25 jun 2020].
- <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>
- <https://prosite.expasy.org/scanprosite/>
- <http://pfam.xfam.org/>
- <https://swissmodel.expasy.org/>
- <https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>
- <https://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK/>
- Rotanova T, Botos I, Melnikov E, Rasulova F, Gustchina A, Maurizi M, Wlodawer A. Slicing a protease: Structural features of the ATP-dependent Lon proteases gleaned from investigations of isolated domains. Protein Science. [Internet]. 2006. [cited 24 jul 2021].