



Estudio computacional de la inhibición de la proteína Dihidrofolato reductasa mediante el fármaco metotrexato y búsqueda de nuevos ligandos con potencial terapéutico con la Leucemia Linfoblástica Aguda

Yasmina Lakhlifi El Alami

Plan de Estudios del Estudiante

Subárea 4: Descubrimiento de fármacos asistido por computador (CADD)

Consultor: Miguel Romero Cuevas

Profesor/a responsable de la asignatura: Javier Luis Cánovas Izquierdo

04/03/2019



Esta obra está sujeta a una licencia de Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada [3.0 España de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es/)

FICHA DEL TRABAJO FINAL

Título del trabajo:	Estudio computacional de la inhibición de la proteína Dihidrofolato reductasa mediante el fármaco metotrexato y búsqueda de nuevos ligandos con potencial terapéutico con la Leucemia Linfoblástica Aguda.
Nombre del autor:	<i>Yasmina Lakhli El Alami</i>
Nombre del consultor/a:	<i>Miguel Romero Cuevas</i>
Nombre del PRA:	<i>Javier Luis Cánovas Izquierdo</i>
Fecha de entrega (mm/aaaa):	06/2019
Titulación:	Estudio computacional de la inhibición de la proteína Dihidrofolato reductasa mediante el fármaco metotrexato y búsqueda de nuevos ligandos con potencial terapéutico con la Leucemia Linfoblástica Aguda.
Área del Trabajo Final:	<i>Descubrimiento de fármacos asistido por computador (CADD)</i>
Idioma del trabajo:	Castellano
Palabras clave	methotrexate, cancer, docking
Resumen del Trabajo (máximo 250 palabras): <i>Con la finalidad, contexto de aplicación, metodología, resultados i conclusiones del trabajo.</i>	
<p>Actualmente el cáncer de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) es uno de los más comunes con alta tasa de mortalidad en la infancia.</p> <p>A lo largo de los años se han ido investigando y desarrollando terapias como la radioterapia o la quimioterapia.</p> <p>Este trabajo se ha centrado en el fármaco quimioterapéutico metotrexato (MTX), comúnmente usado por su alta eficacia inhibiendo el enzima Dihidrofolato reductasa (DHFR). Una proteína relacionada con la síntesis de aminoácidos, purinas entre otros elementos. Sin embargo, se han encontrado y estudiado casos de resistencia al fármaco por lo que, el objetivo de este proyecto ha sido la búsqueda bibliográfica y comprensión de los mecanismos de resistencia, el estudio de las interacciones del DHFR-MTX mediante estructuras experimentales en fuentes de datos.</p> <p>Uno de los retos ha sido buscar otras proteínas experimentales mutadas para calcular y analizar las energías de interacción fármaco-proteína, de los cuales compararlas para encontrar interacciones comunes en ambos casos.</p>	

Por consiguiente, se han realizado modelos computacionales de la interacción MTX con DHFR agrestes y resistentes, como base para la búsqueda, y estudios de nuevas moléculas que puedan tener actividad con las proteínas. Como resultado de esta búsqueda y estudio de interacciones se han propuesto 3 ligandos candidatos, una de ellas el fármaco llamado Leucovorin por su posible aplicación en el tratamiento de la ALL.

Finalmente, una vez analizado todos los resultados se concluye que, dentro de los ligandos testeados, el MTX es el que presenta una energía de interacción más favorable. Además, coincidiendo con lo esperado las proteínas resistentes presentan peor interacción que DHFR agreste.

Abstract (in English, 250 words or less):

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) cancer is one of the most common with a high mortality rate in childhood.

Throughout the years of investigation have been developed therapies such as radiotherapy or chemotherapy.

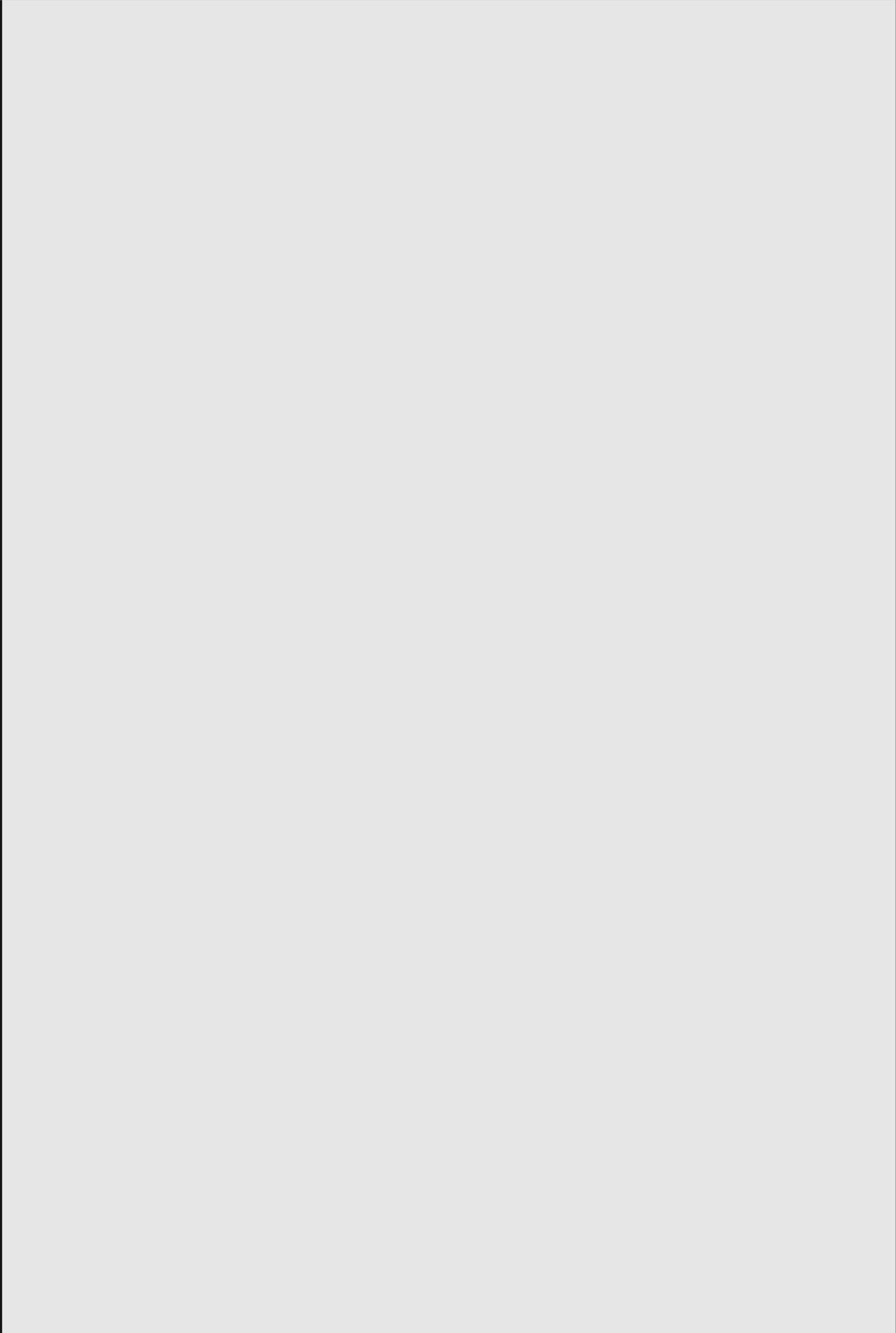
This work focuses on the chemotherapeutic drug metotrexate (MTX), commonly used for its high efficacy by inhibiting the enzyme Dihydrofolate reductase(DHFR): A protein related to the synthesis of amino acids, purines among other elements.

However, there are cases of resistance to the drug. The objective of this project is searching the bibliographic and understanding the mechanisms of resistance and the studying of the interactions of DHFR-MTX through structures crystallized in data sources.

One of the challenges has been to find other mutated experimental proteins to calculate and analyze the drug-protein interaction energies, from which to compare them to find common interactions in both cases.

Therefore, computational models of the MTX interaction with WT and resistant DHFR have been made, as a basis for search, and studies of new molecules that may have activity with proteins. Because of this search and study of interactions 3 candidate ligands have been proposed, one of them the drug called Leucovorin for its possible application in the treatment of ALL.

Finally, once all the results have been analyzed, it is concluded that, within the ligands tested, MTX is the one with the most favorable interaction energy. In addition, coinciding with expectations, resistant proteins show worse interaction than wild-type DHFR.



Índice

1. Introducción	10
1.1 Contexto y justificación del Trabajo	10
1.2 Objetivos del Trabajo	12
1.3 Enfoque y método seguido	13
1.4 Planificación del Trabajo	14
Puntos y planificación del trabajo:	16
1.5 Breve resumen de productos obtenidos	16
1.6 Breve descripción de los otros capítulos de la memoria	17
2. Resto de capítulos	18
2.1. Material y Métodos	18
2.1.1 Búsqueda bibliográfica	18
2.1.2. Obtención de la estructura 3D de las dianas o complejos ligando- diana 18	
2.1.3. Búsqueda y obtención de ligandos	19
2.1.4. Búsqueda de posibles zonas de alostéricas de la proteína DHFR	21
2.1.5. Cálculo de la energía de interacción y docking de las estructuras proteína-ligando	22
2.1.6. Visualización y análisis de estructuras 3D	23
2.2. Resultados	23
Estructura de la proteína WT y las proteínas mutadas	25
2.2.2. Estudio de interacción del MTX con DHFR agreste y mutadas	26
2.2.3. Docking del MTX con DHFR agreste y mutadas	29
2.2.4. Búsqueda de ligandos	34
2.2.5. Tabla de resultados	39
3. Conclusiones	42
4. Bibliografía	¡Error! Marcador no definido.

Lista de figuras

Figura 1. Representación del pathway del metotrexato en la célula.....	9
Figura 2. Entrada del banco de datos Protein Data Bank.....	16
Figura 3. Información de la proteína Dihydrofolate reductasa con ID 1RG7.....	18
Figura 4. Base de datos Zinc15	18
Figura 5. Información del fármaco Methotrexate con ID ZINC159323.....	19
Figura 6. Información del fármaco Methotrexate. La información está distribuida en Targets a fin al fármaco, enzimas con que interactúa, portadores del methotrexate y sus transportadores.	19
Figura 7. Información de la proteína Dihydrofolate reductasa, el target del methotrexate según la base de datos Drugbank	20
Figura 8. Entrada principal de la herramienta Ftmapp y resultado de un ejemplo de la página	21
Figura 9. Entrada principal del Swissdock	21
Figura 11. Alineamiento de las secuencias del 1RG7, 3EIG y 1DLR. En azul se encuentra marcado los aminoácidos mutados de la proteína 3EIG (F31R/Q35E) y en violeta de la proteína 1DLR (L22F)	23
Figura 12. Representación 3D del PDB ID 1RG7. Los colores representan las estructuras secundarias de la cadena y el ligando.....	24
Figura 13. Secuencias coloreadas azul son las posiciones de los aminoácidos mutados F31R/Q35E y de color violeta representa el aminoácido mutado F22L.....	25
Figura 14. Representación 3D del PDB ID 1RG7 interaccionando con el ligando MTX.	25
Figura 15. Representación de las interacciones del MTX y el enzima DHFR experimental con el código PDB 1RG7	26
Figura 16. Secuencia seleccionada del enzima DHFR WT situada a 5 ^a de distancia al ligando	26
Figura 17. Situación del ligando MTX en la proteína mutada. Los colores azules representan la posición de los aminoácidos mutados S31 A y 35 A.	26
Figura 18. Representación de las interacciones del MTX y el enzima DHFR experimental con el código PDB 3EIG	27
Figura 19. Estructura molecular del fármaco Piritrexim.....	28
Figura 20. Comparación de la proteína 3EIG y 1DLR. El ligando piritrexim se sitúa en la misma zona de activación que el MTX	28
Figura 21. Representación del docking MTX y el enzima DHFR no mutada.....	31
Figura 22. Interacciones del MTX y el enzima DHFR mutada.....	32

Figura 23. Interacciones del MTX y el enzima DHFR L22F. Marcado en color violeta el aminoácido mutado.....	32
Figura 24. Estructura del Leucovorin (izquierda) y del MTX (derecha). La diferencia entre ambas se remarca en color azul	34
Figura 25. Mapping de las zonas de activación y/o alostéricas del enzima DHFR.....	34
Figura 26. Alineamiento de la estructura analizada por FTMAP (izquierda DHFR WT y derecha F31R/Q15E) en busca de coincidencias de la zona de activación y el ligando MTX (ligando rojo)	35
Figura 27. Dos ligandos diferenciados derivados del metotrexato	36
Figura 28. Interacción de la proteína DHFRL22F con el fármaco modificado nº1 (izquierda) y el fármaco modificado nº2 (derecha)	37

1. Introducción

1.1 Contexto y justificación del Trabajo

La Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), es el onceavo cáncer con más mortalidad a nivel mundial y el más común de este tipo de tumor en la infancia (30% de los casos)¹. Se caracteriza por la producción rápida y anormal de leucocitos/células blancas defectuosas que, a su vez, no realizan su función inmunológica correctamente.

En relación con las terapias del mismo, la radiación craneal fue una de las terapias primordiales y más utilizadas hasta que cayó en desuso a causa de su alto riesgo de recaída en el sistema nervioso central, por lo que se buscaron nuevas terapias entre las que se comenzó a desarrollar con gran éxito distintos regímenes quimioterápicos¹.

La quimioterapia de la LLA, donde según el riesgo que presenta el paciente, se emplea un protocolo distinto, se estructura en tres fases²:

1. Eliminación masiva de las células cancerígenas mediante fármacos como Vincristina, corticosteroides, entre otros.
2. Eliminación de las células dañadas que hayan quedado en la anterior fase con asparagina, etc.
3. Eliminación de cualquier célula leucémica o pre-leucémica residual con antimetabolitos.

Para este trabajo nos centraremos en uno de los fármacos empleado en la fase 3, el Metotrexato (MTX). Su síntesis se remonta al año 1947 donde posteriormente² en el año 1962, se empezó a utilizar como agente quimioterapéutico:

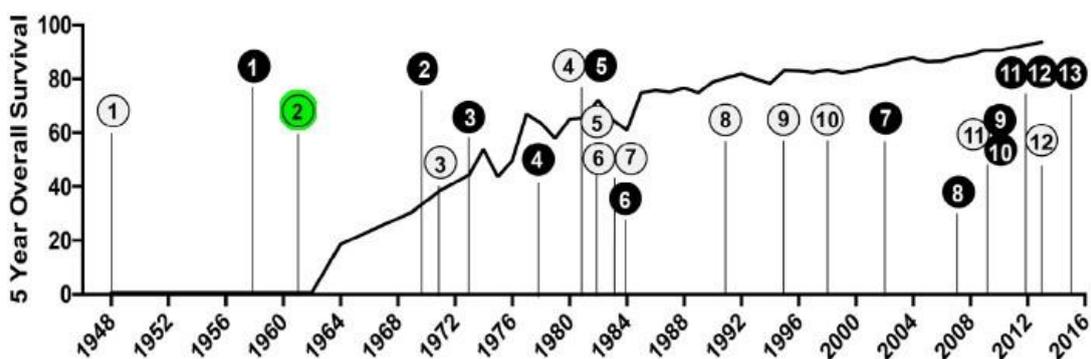


Tabla 1. Representación cronológica del uso del Metrotrexato y otros fármacos para el cáncer de Leucemia Linfoblástica Aguda.

Landmark Advances in Treatment for Pediatric ALL			Landmark Advances in Understanding the Biology of Pediatric ALL		
1	1948	"Transient remissions" induced by aminopterin	1	1958	First cytogenetic study in ALL
2	1961	First use of antimetabolites mercaptopurine and methotrexate	2	1970	First report of Philadelphia chromosome-positive ALL
3	1971	Combination chemotherapy and effective CNS-directed therapy cure approximately 50% of patients	3	1973	First identification of T-cell ALL by spontaneous rosette formation with sheep erythrocytes
4	1981	Re-induction treatment improves outcomes	4	1978	Classification of ALL by chromosome number >50 (hyperdiploidy) is associated with prolonged remission duration
5	1982	Triple intrathecal therapy with methotrexate, hydrocortisone, and cytarabine may effectively substitute for prophylactic cranial irradiation in some patients	5	1981	Immunologic monitoring of residual leukemia
6	1983	Postremission weekly high-dose asparaginase improves outcome	6	1984	First identification of immunophenotype-specific chromosomal translocations: t(11;14) in T-cell ALL and t(1;19) in pro-B ALL
7	1983	Intermediate-dose methotrexate with leucovorin rescue decreases systemic and testicular relapses	7	2002	First genome-wide profiling of gene expression
8	1991	Dexamethasone is more effective than prednisone in preventing CNS relapse	8	2007	First genome-wide study of changes in DNA copy number
9	1995	Inherited genetic polymorphisms in the gene encoding thiopurine methyltransferase influence mercaptopurine toxicity	9	2009	Germline genetic variants associated with the development of ALL
10	1998	Individualized methotrexate dose improves outcome	10	2009	Recognition of Philadelphia chromosome-like "Ph-like" ALL
11	2009	Effective systemic and intrathecal chemotherapy can eliminate the need for prophylactic cranial irradiation in all patients; imatinib improves outcome in Philadelphia chromosome-positive ALL	11	2012	First whole-genome sequencing study to identify driver mutations in early T-cell precursor ALL
12	2013	First trial of chimeric antigen receptor (CAR)-T cell therapy	12	2012	Use of next-generation sequencing to enhance detection of minimal residual disease
			13	2015	Whole genome analysis identified germline genetic mutations in predisposition genes

adapted with permission from Pui et al. 2013

Para comprender la función del MTX en la terapia se muestra el *pathway* que sigue el fármaco:

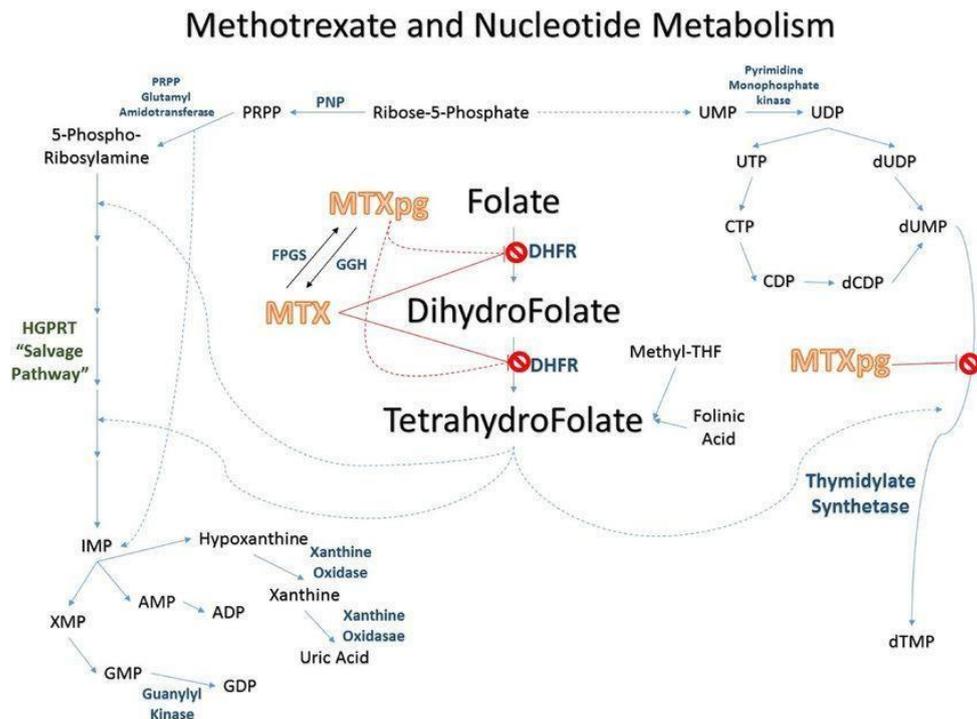


Figura 1. Representación del *pathway* del metrotrexato en la célula.

El MTX entra dentro de la célula por difusión pasiva, y una vez dentro actúa el enzima Poliglutamato Sintasa para añadirle un grupo glutamato y producir el metotrexato poliglutamato (MTXpg). De esta forma al ser más largo y más hidrófilo no acaba siendo sustrato de otros sistemas de transporte y se va acumulando y, en consecuencia, aumenta su eficacia. El MTXpg interactúa con el enzima Dihidrofolato Reductasa (DHFR), un enzima que cataliza la producción del Tetrahidrofolato (THF) el cual es un donador de grupos metilo esenciales para la síntesis de aminoácidos, purinas y timidinas, de esta última

deriva a un metabolito esencial para la correcta reparación y síntesis del DNA. Por lo tanto, las células no se replican, teniendo una repercusión mayor en aquellas poblaciones celulares con un alto grado de división, como son las cancerígenas.

A pesar de su efectividad y su gran uso, se han descrito distintos mecanismos de resistencia al tratamiento ¹⁸:

Tabla 2. Listado de resistencias encontradas y/o estudiadas del tratamiento del LAL con el fármaco MTX.

Listado de resistencias estudiadas^{6,18}
Deterioro del transporte
Falta de formación de polyglutamatos
Incremento de actividad del enzima DHFR
Mutación del enzima DHFR
Aumento de concentración del enzima lisozima y γ -glutamilo hidrolasa

Entre ellas, destaca la aparición de mutaciones del propio enzima DHFR^{19,20}. Ante esto, la búsqueda de nuevas alternativas al MTX se ve esencial para continuar con la mejora del tratamiento y el % de curación. La propuesta del trabajo es buscar nuevos fármacos que puedan tener un modo de unión similar al MTX, pero que logre salvar también las resistencias al mismo.

1.2 Objetivos del Trabajo

Los objetivos generales de ese proyecto son, por un lado, realizar un estudio sobre el mecanismo de interacción del MTX como tratamiento del LLA, concretamente, su actividad como inhibidor del Dihidrofolato Reductasa.

Y, en segundo lugar y una vez comprendido el mecanismo del fármaco- proteína, obtener otros ligandos que puedan mantener la actividad y que logren mejorar las desventajas del MTX.

Para ello, se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Estudio de estructuras 3D de enzima agreste (WT) y enzimas mutantes descritas como resistentes.
2. Estudiar el modo de unión del MTX contra el enzima DHFR y las resistencias surgidas.
3. Hacer una búsqueda de fármacos similares a estructura de MTX.
4. Realizar un docking para analizar su interacción ligando con las distintas dianas enzima WT y enzimas mutadas (resistentes).
5. Propuesta de candidatos a fármacos para la LLA con potencial de mejora de resistencias de la DHFR.

1.3 Enfoque y método seguido

Análisis de los mecanismos de resistencia de la enfermedad a la terapia con MTX, centrándonos en mutaciones de la DHFR que confieran resistencia.

Realizar un estudio 3D de la interacción química del fármaco MTX con el enzima WT y mutadas (resistentes).

Búsqueda de otros ligandos similares al MTX y hacer docking con la proteína para un análisis de la interacción ligando-proteína y posteriormente, propuesta de nuevas moléculas como candidatos a fármacos que, a raíz de los resultados, pudieran tener una actividad similar al MTX frente a la LLA pero solventando los problemas de resistencias descritos.

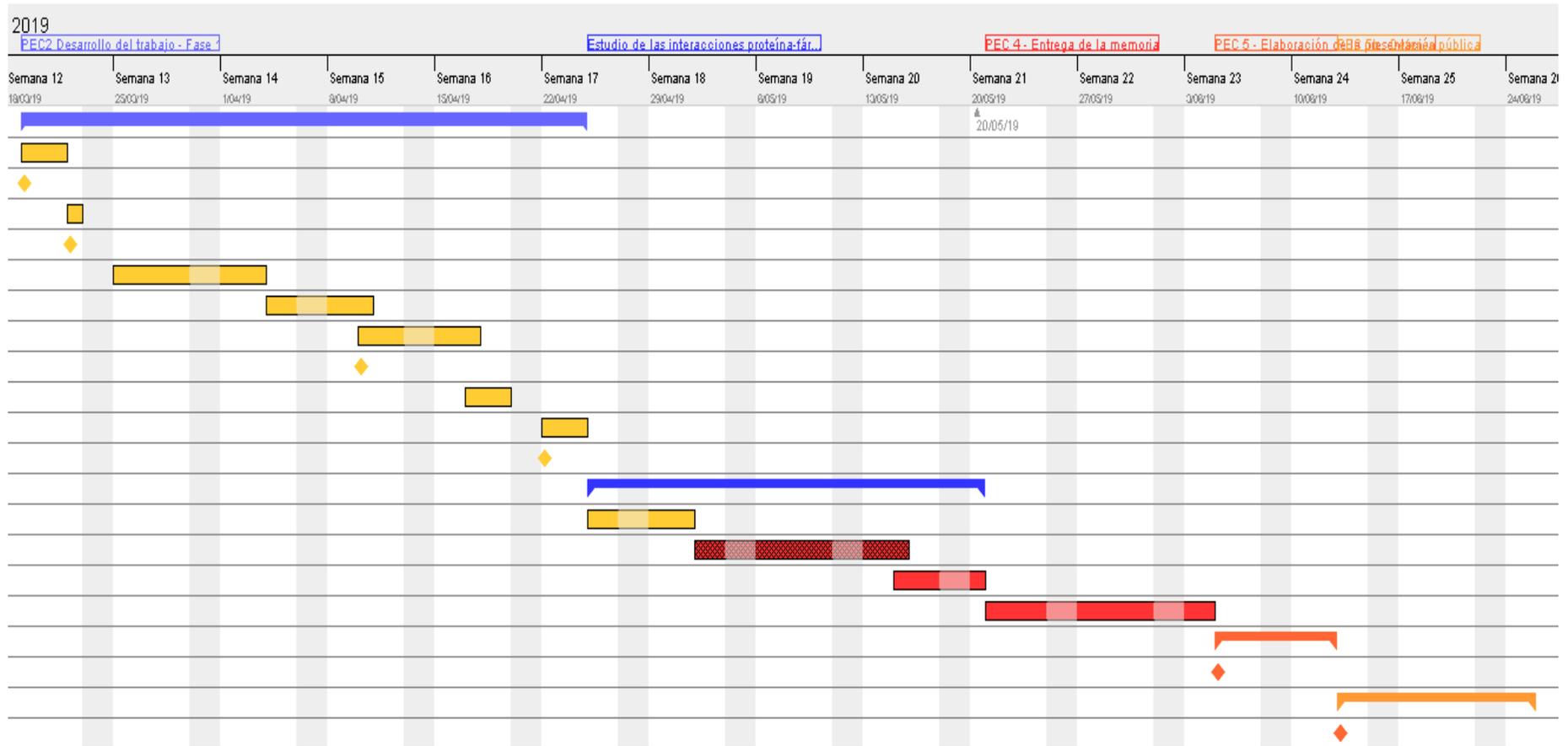
1.4 Planificación del Trabajo

A continuación, se describen las tareas a seguir:

Tabla 3. Tabla de tareas programadas.

Nombre	Fecha de inicio	Fecha de fin
• PEC2 Desarrollo del trabajo - Fase 1	19/03/19	24/04/19
• Búsqueda bibliográfica de mecanismos de resistencia del LAL.	19/03/19	21/03/19
• Listado de artículos donde describen claramente los mecanismos de resistencia	19/03/19	19/03/19
• Búsqueda de proteínas mutadas en PDB y/o otras fuentes	22/03/19	22/03/19
• Obtención de proteínas mutadas 3D	22/03/19	22/03/19
• Estudio de la estructura 3D de la proteína DHFR y mutadas con Chimera	25/03/19	3/04/19
• Docking del MTX junto la proteína, las proteínas mutadas y otras dianas	4/04/19	10/04/19
• Estudio de las interacciones proteína fármaco	10/04/19	17/04/19
• Explicación sobre la interacción entre proteína-fármaco	10/04/19	10/04/19
• Búsqueda de otros ligandos similares al MTX y hacer docking	17/04/19	19/04/19
• Estudio de las interacciones proteína-fármaco	22/04/19	24/04/19
• Obtención de diferencias claras de interacciones respecto a los pasos previos	22/04/19	22/04/19
• PEC 2 Desarrollo fase 2	25/04/19	20/05/19
• Proponer nuevos fármacos	25/04/19	1/05/19
• Redactar los resultados	2/05/19	15/05/19
• Revisión de la memoria	15/05/19	20/05/19
• PEC 4 - Entrega de la memoria	21/05/19	4/06/19
• PEC 5 - Elaboración de la presentación	5/06/19	12/06/19
• Preparación de la defensa	5/06/19	5/06/19
• PEC 5b - Defensa pública	13/06/19	25/06/19
• Defensa	13/06/19	13/06/19

Tabla 4. Diagrama de Gantt representando las tareas programadas.



Puntos y planificación del trabajo:

1. Búsqueda bibliográfica de mecanismos de resistencia del LLA. (3 días)
 - Hito 1: Listado de artículos donde se describe claramente los mecanismos de resistencia.
2. Búsqueda de proteínas mutadas en PDB y/u otras fuentes. (1 día)
 - Hito 2: Obtención de proteínas mutadas 3D.
3. Estudio de la estructura 3D de la proteína DHFR y mutadas con Chimera. (8 días)
4. Docking del MTX junto la proteína, las proteínas mutadas y otras dianas. Estudio de las interacciones proteína fármaco (11 días).
 - Hito 3: Explicación sobre la interacción entre proteína-fármaco.
5. Búsqueda de otros ligandos similares al MTX y hacer docking (3 días)
6. Estudio de las interacciones proteína-fármaco. (3 días).
 - Hito 4: Diferenciaciones claras de las interacciones respecto a los pasos previos.
7. Proponer nuevos fármacos. (5 días).
8. Redactar los resultados (10 días).
9. Revisión de la memoria (4 días).
10. Entrega de la memoria (11 días).
11. Preparación de la defensa (6 días).
 - Hito 5: Preparación del documento.
12. Defensa (13 días).
 - Hito 6: Defensa pública.
13. Búsqueda bibliográfica de mecanismos de resistencia del LLA. (3 días)
 - Hito 1: Listado de artículos donde se describe claramente los mecanismos de resistencia.
14. Búsqueda de proteínas mutadas en PDB y/u otras fuentes. (1 día)*0.
 - Hito 2: Obtención de proteínas mutadas 3D.

En la planificación se tiene en cuenta ciertos riesgos que nos puedan ralentizar las tareas:

1. Cálculo del docking: ante moléculas pesadas se requiere mucho más tiempo de cálculo.
2. No encontrar las estructuras 3D de las proteínas mutadas del DHFR en PDB. Requerirá la búsqueda de otras fuentes y/o alternativas.
3. No encontrar ligandos que mejoren los resultados de interacción MTX-proteínas.
4. Problemas informáticos con los programas 3D (Chimera) por falta de memoria RAM.

1.5 Breve resumen de productos obtenidos

Como resultado del proyecto obtendremos la memoria con la descripción de las tareas realizadas junto con todos los datos resultantes, análisis de los resultados y una breve conclusión del trabajo realizado.

Además, se incluirá una presentación visual para la defensa pública, exponiendo el contenido del trabajo de manera breve y visual para el público.

1.6 Breve descripción de los otros capítulos de la memoria

En el apartado de Material y Métodos se detallarán las fuentes bibliográficas utilizadas como el PubMed²⁷, diferentes bancos de datos como secuencias proteicas, proteínas experimentales, la herramienta online para realizar el docking de las proteínas-fármacos a testear y finalmente el software de visualización Chimera 1.13.1²⁶ y análisis de estas estructuras con

En los resultados se presentarán los cálculos de energía de interacción por cada proteína-ligando, empezando por el fármaco MTX junto a la proteína DHFR y un breve análisis de interacciones. Seguidamente tras una búsqueda de estructuras experimentales del DHFR mutado se realiza el docking con el MTX.

Adicionalmente se propondrá 3 tipos de ligandos distintos y se realizarán los cálculos de la energía de interacción para la proteína WT y sus variantes mutadas.

Finalmente, la conclusión se resumirá el procedimiento realizado y se resumirá los resultados de interacciones más comunes a lo largo de las pruebas realizadas.

2. Resto de capítulos

2.1. Material y Métodos

2.1.1 Búsqueda bibliográfica

Para la búsqueda bibliográfica se ha utilizado PubMed, una base de datos donde se recopila artículos de biomedicina, de revistas de ciencias de la vida y libros online.

Otras fuentes bibliográficas utilizadas han sido las herramientas online de la biblioteca de la *Universidad de Gerona (UdG)*, la *Universidad Abierta de Cataluña (UOC)* y *Google Academy*.

2.1.2. Obtención de la estructura 3D de las dianas o complejos ligando-diana

La base de datos con el cual se utiliza más a lo largo del trabajo es el *Protein Data Bank (PDB)*²², el cual tiene almacenadas estructuras 3D de más de 152.000 biomoléculas (proteínas, ácidos nucleicos y complejos de interés en el campo de la biomedicina u otros campos) y presenta distintas herramientas de visualización, análisis y correspondencias con otras bases de datos.



Figura 2. Entrada del banco de datos *Protein Data Bank*.

Cada entrada presente en la base de datos tiene un ID de 4 caracteres combinando entre números y letras, facilitando así la búsqueda de la muestra con interés de estudio.

Dentro de este pdb ID se muestra todo tipo de información: breve resumen de la estructura, visión 3D, anotaciones a tener en cuenta, secuencia...

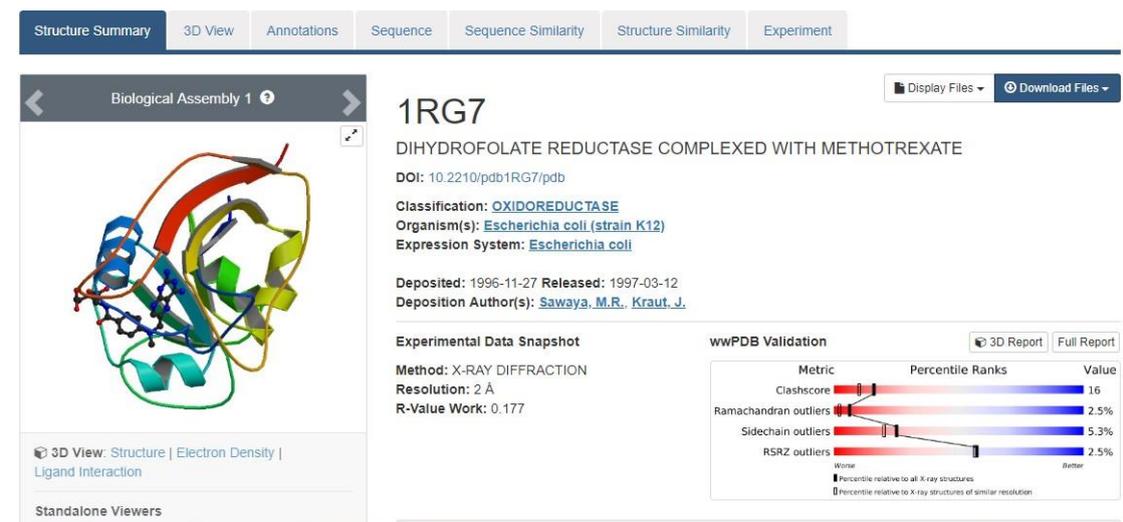


Figura 3. Información de la proteína Dihidrofolate reductasa con ID 1RG7.

Las secuencias de las proteínas que se estudia a lo largo de este proyecto son extraídas de la base de datos de secuencias genéticas *GeneBank*²³.

2.1.3. Búsqueda y obtención de ligandos

En relación con los ligandos se ha utilizado dos bases de datos: Zinc15 y Drugbank.

Zin15 es una base de datos con el objetivo de permitir la accesibilidad de fármacos comercializados para realizar estudios computacionales.

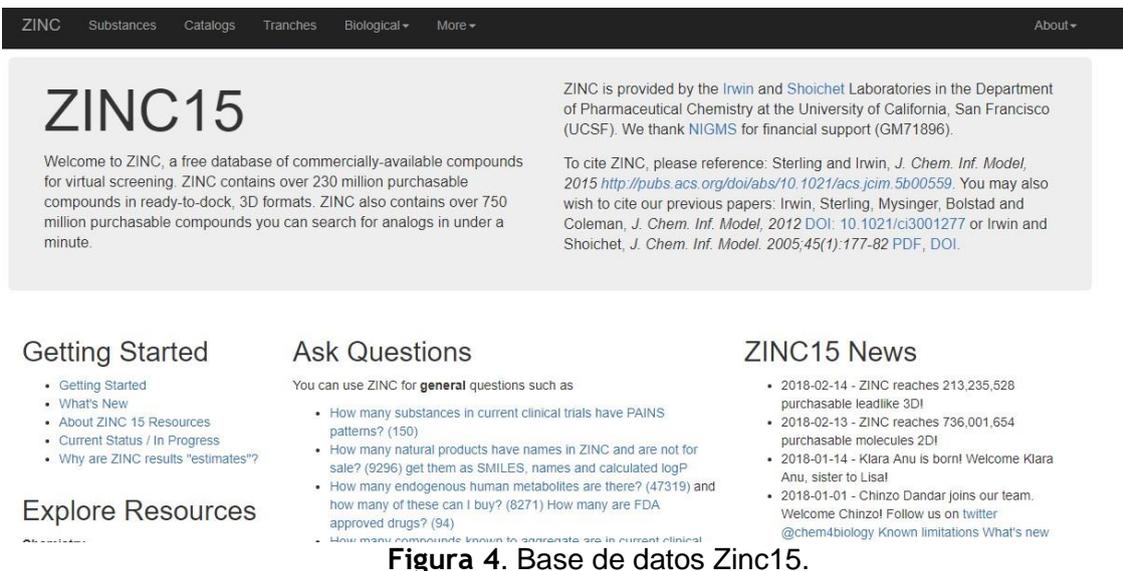


Figura 4. Base de datos Zinc15.

A la hora de buscar el fármaco, Zinc15 muestra códigos como SMILES, InChI e InChI Key. Estos son útiles para realizar el estudio con programas computacionales y/u otro tipo de base de datos de los cuales aceptan este tipo de lenguajes.

ZINC1529323 (Methotrexate)

In: anodyne bb fda for-sale in-stock natural-products

Google Wikipedia PubMed

Added	Availability	Since	Mwt	logP	Download
2005-09-30	In-Stock	2015-08-07	454.447	0.268	↓

Mol Formula	Rings	Heavy Atoms	Hetero Atoms	Fraction sp ³	Tranche
C20H22N8O5	3	33	13	0.25	JCAA

SMILES	<chem>CN(Cc1cnc2nc(N)nc(N)c2n1)c1ccc(C(=O)N[C@@H](CCC(=O)O)C(=O)O)cc1</chem>	↓
InChI	InChI=1S/C20H22N8O5/c1-28(9-11-8-23-17-15(24-11)16(21)26-20(22)27-17)12-4-2-10(3-5-12)18(31)25-13(19(32)33)	↓
InChI Key	FBOZXECLQNJBKD-ZDUSSCGKSA-N	↓

Available 3D Representations

pH range	Net charge	H-bond donors	H-bond acceptors	tPSA	Rotatable bonds	Apolar desolvation	Polar desolvation	Download
Reference	-2	3	12	216	9	6.07	-125.97	↓

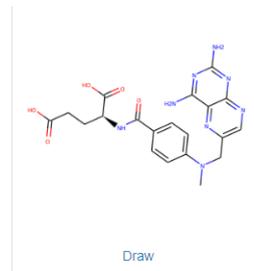


Figura 5. Información del fármaco Methotrexate con ID ZINC159323.

En el caso de DrugBank, a diferencia de la base de datos anterior, este muestra todo tipo de información detallada de un fármaco como los enzimas que interactúa dicho fármaco hasta las funciones más detalladas: .

Methotrexate

Targets (1)
Enzymes (9)
Carriers (1)
Transporters (22)

IDENTIFICATION

Name	Methotrexate
Accession Number	DB00563 (APRD00353)
Type	Small Molecule
Groups	Approved
Description	An antineoplastic antimetabolite with immunosuppressant properties. It is an inhibitor of tetrahydrofolate dehydrogenase and prevents the formation of tetrahydrofolate, necessary for synthesis of thymidylate, an essential component of DNA.

Figura 6. Información del fármaco Methotrexate. La información está distribuida en Targets a fin al fármaco, enzimas con que interactúa, portadores del methotrexate y sus

transportadores.

Name	Dihydrofolate reductase		
Synonyms	• 1.5.1.3		
Gene Name	DHFR		
Organism	Humans		
Amino acid sequence	>1c1 BSEQ0036993 Dihydrofolate reductase MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFS IPEKNRPLKGRINLVSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMWIVGGSS VYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKF EVYEKND		
Number of residues	187		
Molecular Weight	21452.61		
Theoretical pI	7.6		
GO Classification	<table><tr><td>Functions:</td></tr><tr><td>dihydrofolate reductase activity / drug binding / folic acid binding / methotrexate binding / mRNA binding / NADPH binding</td></tr></table>	Functions:	dihydrofolate reductase activity / drug binding / folic acid binding / methotrexate binding / mRNA binding / NADPH binding
Functions:			
dihydrofolate reductase activity / drug binding / folic acid binding / methotrexate binding / mRNA binding / NADPH binding			

Figura 7. Información de la proteína Dihidrofolato reductasa, el target del methotrexate según la base de datos Drugbank.

2.1.4. Búsqueda de posibles zonas de alostéricas de la proteína DHFR

Ante el docking de nuevos ligandos también es importante comprobar la zona de la proteína donde el ligando interactúa, escoger así el clúster posicionado al centro activo y si hay que tener en cuenta otras zonas.

Para ello se utiliza la herramienta FTMap donde insertando el PDB ID de nuestra proteína consigue realizar la simulación:

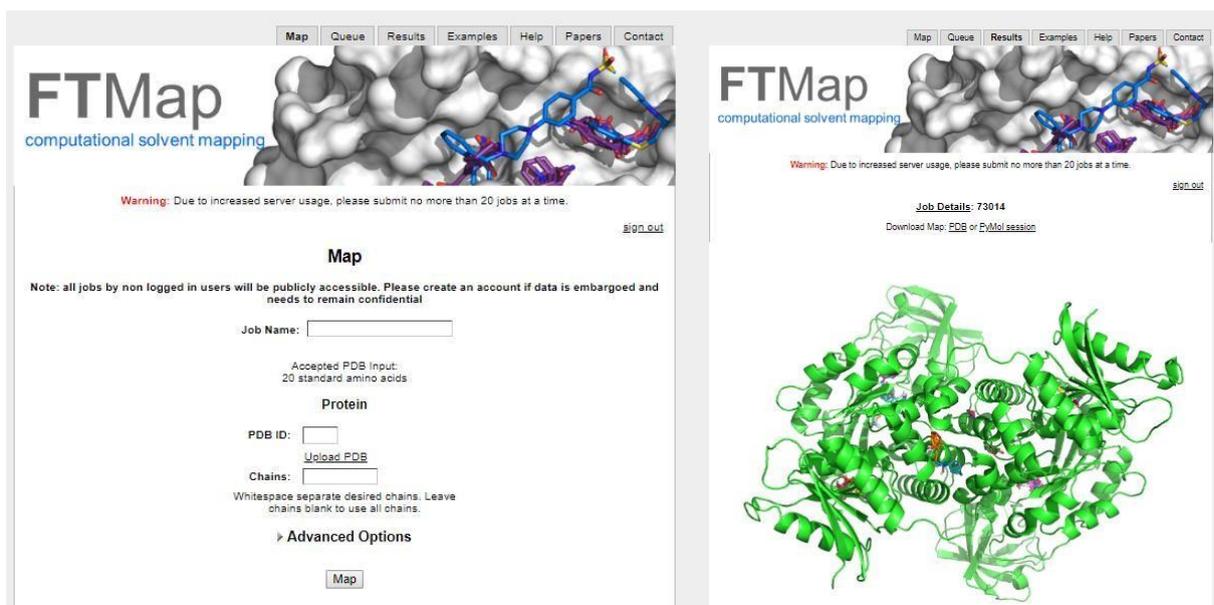


Figura 8. Entrada principal de la herramienta Ftmapp y resultado de un ejemplo de la página.

2.1.5. Cálculo de la energía de interacción y docking de las estructuras proteína-ligando

Para la parte experimental básicamente se ha utilizado las herramientas Swissdock²⁸, SwissSimilarity²⁹ y el programa Chimera 1.13.1.

La herramienta Swissdock tiene como objetivo predecir las interacciones moleculares entre una proteína y un ligando concreto (fármacos, péptidos...), gracias su software EADock DSS²⁸.

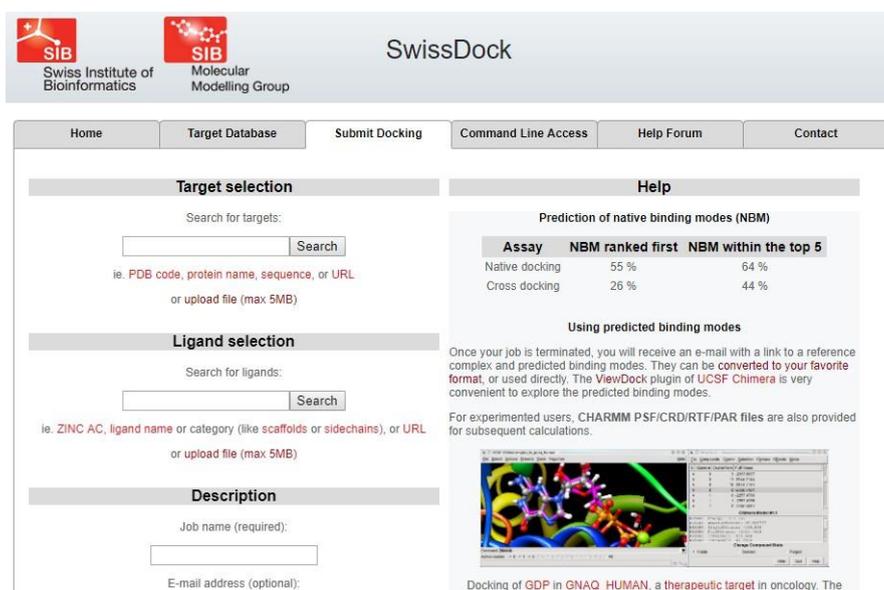


Figura 9. Entrada principal del Swissdock.

En el caso de SwissSimilarity, es una herramienta de búsqueda de fármacos similares al nuestro según las propiedades a tener en cuenta (fármacos en proceso de investigación, comercialmente viable...).

Figura 10. Entrada principal del SwissSimilarity. El código SMILE del Methotrexato se ha introducido como ejemplo para visualizarlo.

2.1.6. Visualización y análisis de estructuras 3D

Por último, el software Chimera 1.13.1 permite la visualización de los resultados del docking y su análisis de la estructura molecular incluyendo así analizar las interacciones entre proteína y ligando, alineamientos de diferentes estructuras proteicas, análisis de secuencias...

2.2. Resultados

2.2.1 Estudio de DHFR y mutaciones descritas

Secuencia de proteínas

Con el objetivo de iniciar el análisis de la estructura del enzima DHFR se selecciona como referencia la secuencia descrita en el banco de datos GeneBank:

Tabla 5. Secuencia proteica de la estructura DHFR agreste.

Secuencia proteína DHFR agreste (WT) (PDB 1RG7)	
1	MISLIAALAVDRVIGMENAMPWNLPA DLAWFKRNTLDKPVIMGRHTWESI
51	GRPLPGRKNIILSSQPGTDDRVTWVKS VDEAIAACGDVPEIMVIGGGRVY
101	EQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPDYEPDDWESV FSEFHDADAQNSHS
151	YCFEILERR

Se han descrito diferentes mutaciones que confieren resistencia al MT:

- Por un lado, la variante humana llamada F31R/Q35E³³ donde se determinó que la afinidad al fármaco MTX se reducía a causa del efecto de varias sustituciones combinadas a la vez de la proteína. Estas sustituciones son los aminoácidos fenilalanina (F) 31 por Arginina (R) 7 y la glutamina (Q) 35 por el glutámico (E).
- Por otro lado, la variante L22F con sustituciones de la leucina(L) 22 por la fenilalanina (F). En este caso³⁴ resulta que la afinidad del MTX a la proteína se reduzca por una mayor separación del anillo nicotinamida y el anillo pteridina del fármaco en comparación a al DHFR WT.

Tabla 6. Secuencia proteica de la estructura DHFR no mutada y de las dos estructuras mutadas F31R/Q35E y F31S/F34S.

Secuencia proteína DHFR F31R/Q35E (PDB 3EIG)

```

1  VGS LNC I VAV S QNM G I G KNG D L P W P P L R N E R R Y F E R M T T T S S V E G K Q N L V
51  I M G K K T W F S I P E K N R P L K G R I N L V L S R E L K E P P Q G A H F L S R S L D D A L K L T
101 E Q P E L A N K V D M V W I V G G S S V Y K E A M N H P G H L K L F V T R I M Q D F E S D T F F P E
151 I D L E K Y K L L P E Y P G V L S D V Q E E K G I K Y K F E V Y E K N D
  
```

Secuencia proteína DHFR L22F (PDB 1DLR)

```

1  VGS LNC I VAV S QNM G I G KNG D F P W P P L R N E R R Y F Q R M T T T S S V E G K Q N L V
51  I M G K K T W F S I P E K N R P L K G R I N L V L S R E L K E P P Q G A H F L S R S L D D A L K L T
101 E Q P E L A N K V D M V W I V G G S S V Y K E A M N H P G H L K L F V T R I M Q D F E S D T F F P E
151 I D L E K Y K L L P E Y P G V L S D V Q E E K G I K Y K F E V Y E K N D
  
```

Para una mejor comprensión de los cambios, alineamos las secuencias de las proteínas descritas:

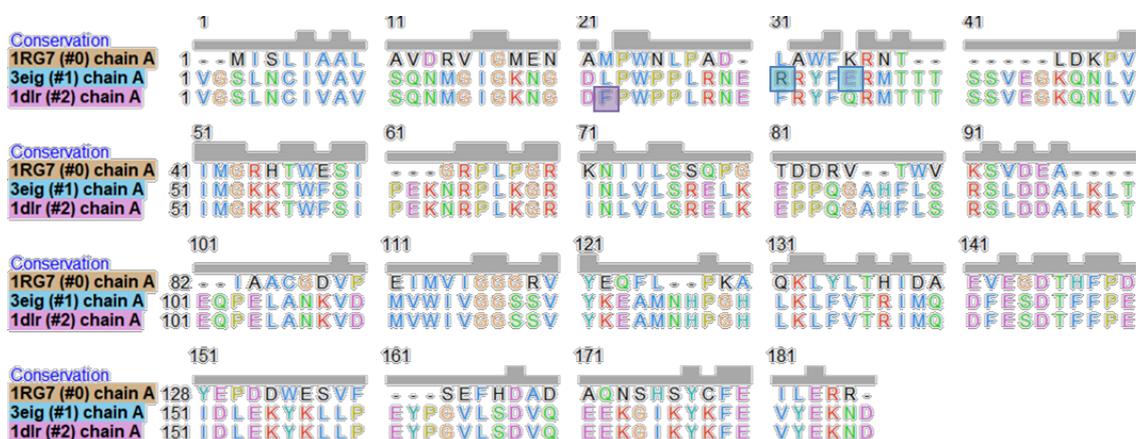


Figura 11. Alineamiento de las secuencias del 1RG7, 3EIG y 1DLR. En azul se encuentra marcado los aminoácidos mutados de la proteína 3EIG (F31R/Q35E) y en violeta de la proteína 1DLR (L22F).

Centrándonos en la línea de *Conservation* este nos muestra la secuencia coincidente de la proteína agreste respecto a las dos estructuras, viendo así que entre estas dos últimas presentan modificaciones en la posición 22, 31 y 35.

Estructura de la proteína WT y las proteínas mutadas

En relación con la estructura de DHFR se ha escogido la proteína experimental con código PDB **1RG7**.

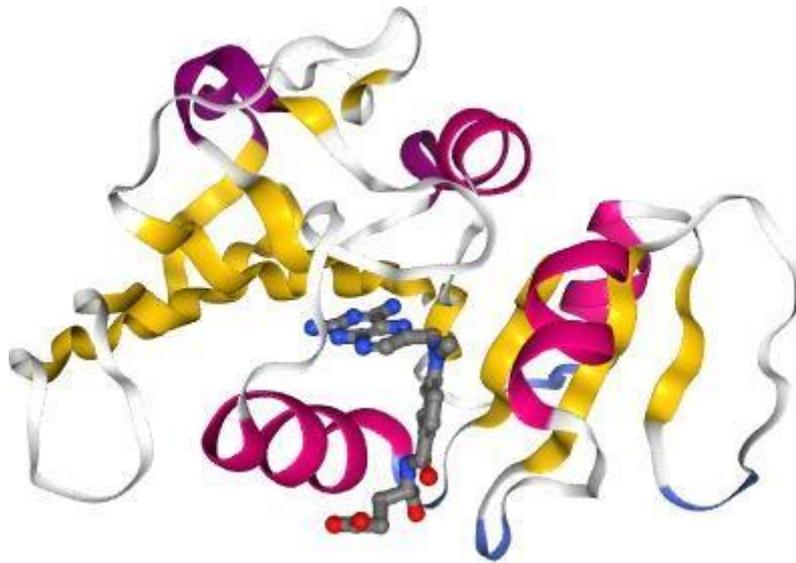


Figura 12. Representación 3D del PDB ID 1RG7. Los colores representan las estructuras secundarias de la cadena y el ligando.

Estructuralmente, la enzima dihidrofolato reductasa está compuesta por 1 cadena de tipo 3-Layer (aba) Sandwich, constituyéndose entre estructuras secundarias y primarias.

En el caso de la enzima con presencia de mutaciones, se ha seleccionado las proteínas experimentales con los siguientes códigos PDB: 1DLR y 3EIG. Estas mutaciones, F31R/Q35E y F22L, se sitúan en el centro activo de la proteína WT:

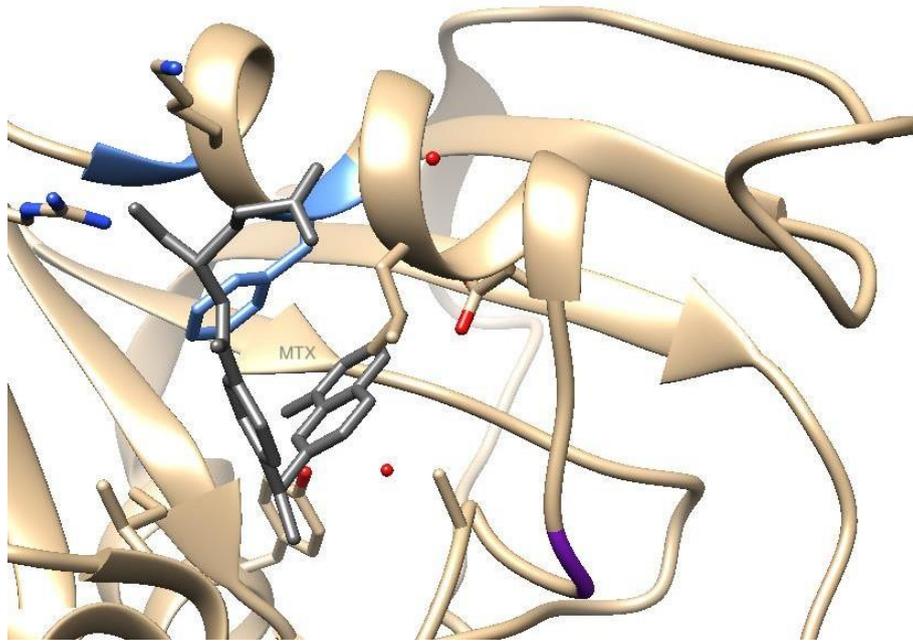


Figura 13. Secuencias coloreadas azul son las posiciones de los aminoácidos mutados F31R/Q35E y de color violeta representa el aminoácido mutado F22L.

2.2.2. Estudio de interacción del MTX con DHFR agreste y mutadas

Una vez que revisadas las secuencias y estructuras del enzima agreste y mutadas (resistentes), se analizan las interacciones del MTX con el enzima:

DHFR agreste

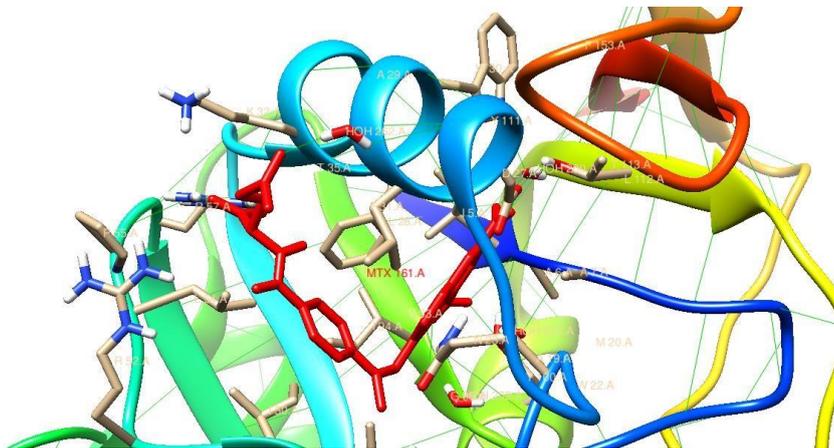


Figura 14. Representación 3D del PDB ID 1RG7 interaccionando con el ligando MTX.

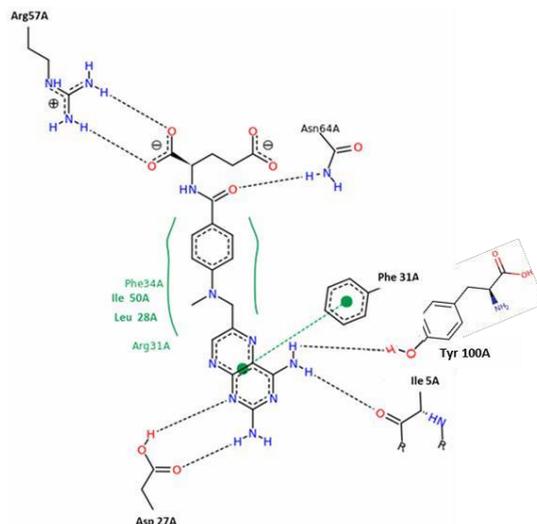


Figura 15. Representación de las interacciones del MTX y el enzima DHFR experimental con el código PDB 1RG7.

Empezando por los carboxilos del final de la estructura del fármaco, se presentan enlaces de hidrogeno con aminoácidos con cadena lateral cargada (Arg), polares (Asn), interacciones π -steking (Phe), aminoácidos con cadena lateral hidrofóbicos en la zona aromática (Tyr, Ile) y finalmente con cadena lateral cargada (Asp).

En relación a la zona de interacción, la secuencia seleccionada en verde representa aquellos nucleótidos dentro de un rango de 5 Å alrededor del ligando:

```

1rg7 (#0) chain A 1 M I S L I A A L A V D R V I G M E N A M P W N L P A D L A W F K R N T L D K P V I M G R H T W E S I
1rg7 (#0) chain A 51 G R P L P G R K N I I L S S Q P G T D D R V T W V K S V D E A I A A C G D V P E I M V I G G R V Y
1rg7 (#0) chain A 101 E Q F L P K A Q K L Y L T H I D A E V E G D T H F P D Y E P D D W E S V F S E F H D A D A Q N S H S
1rg7 (#0) chain A 151 Y C F E I L E R R
  
```

Figura 16. Secuencia seleccionada del enzima DHFR WT situada a 5ª de distancia al ligando.

DHFR F31S/Q35E

En el caso de la proteína mutada, el ligando MTX se sitúa en la zona de los aminoácidos S 31 A y 35A:

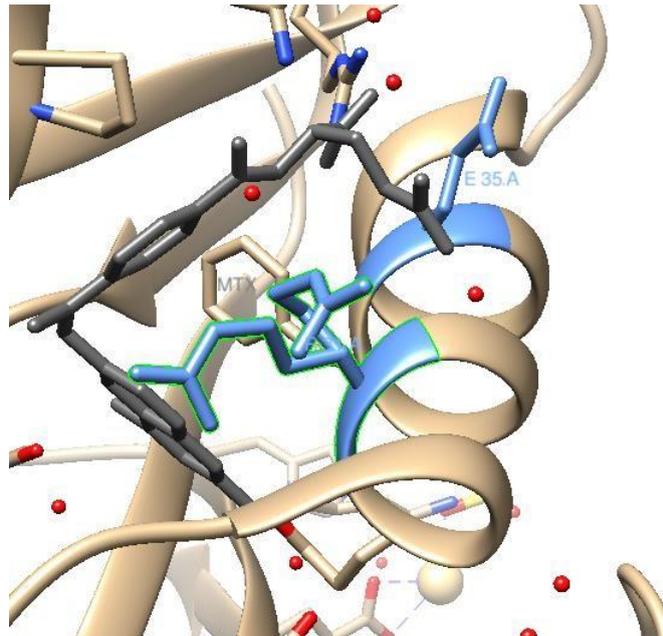


Figura 17. Situación del ligando MTX en la proteína mutada. Los colores azules representan la posición de los aminoácidos mutados S 31 A y 35 A.

Se representa las interacciones del MTX-DHFR mutado:

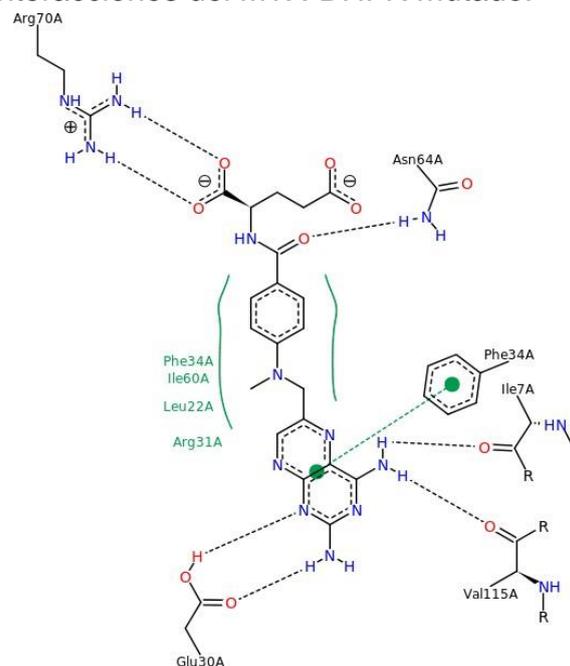


Figura 18. Representación de las interacciones del MTX y el enzima DHFR experimental con el código PDB 3EIG.

Empezando por los carboxilos del final de la estructura del fármaco, se presentan enlaces de hidrogeno con aminoácidos con cadena lateral cargada (Arg), polares (Asn), interacciones hidrofóbicas con el aminoácido mutado (Arg) entre otros, interacciones π -steking (Phe), y finalmente enlaces de hidrogeno con un aminoácido con la cadena lateral cargada (Glu) y apolares (Val e Ile).

Para la proteína DHFR L22F el ligando con que interacciona es un fármaco en estado experimental llamado *Piritrexim*³⁴.

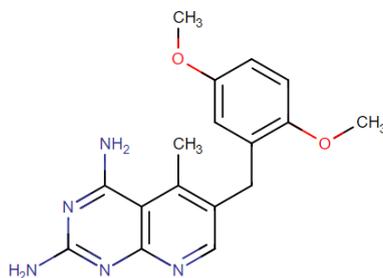


Figura 19. Estructura molecular del fármaco Piritrexim con el que interacciona la proteína DHFR L22F.

El piritrexim se utiliza en pruebas de estudio relacionado en tratamientos contra el cáncer de Uretra y de vejiga donde el target, como en el caso del metotrexato, es el enzima DHFR.

En el caso concreto de la estructura experimental 1DLR, no se analizará las interacciones que presenta con la proteína al ser un fármaco diferente por lo que no es comparable, sin embargo, hay que destacar que el piritrexim se une en el mismo sitio activo que el MTX.

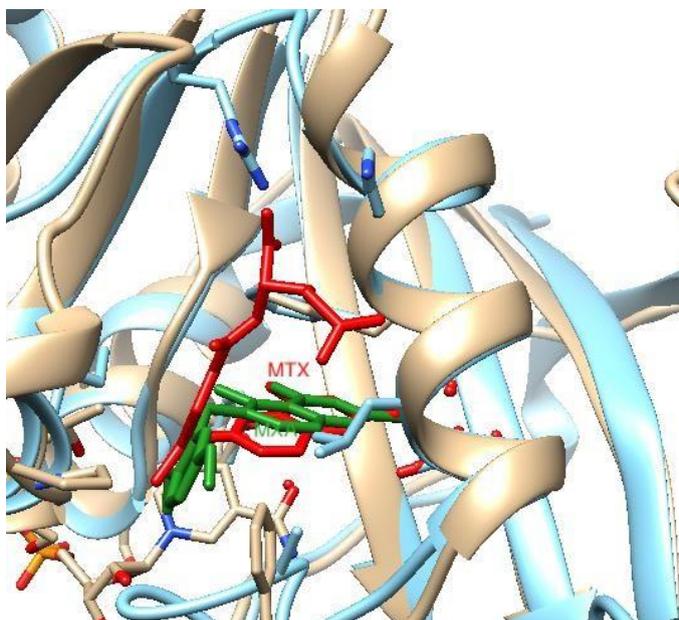


Figura 20. Comparación de la proteína 3EIG y 1DLR. El ligando piritrexim se sitúa en la misma zona de activación que el MTX.

2.2.3. Docking del MTX con DHFR agreste y mutadas

A continuación, se ha analizado las interacciones del enzima DHFR y el MTX mediante un docking en [swissdock](https://www.swissdock.ch/) de las tres estructuras descritas.

Los resultados siguientes muestran las energías de interacción del cluster de menor energía ya que el modelo estructural concuerda con los datos experimentales (cristalográficos):

Tabla 7. Energía de interacción generadas en el docking.

Estructura	Energía (Kcal/mol)
MTX-DHFR World Type (WT)	-15.44
MTX-DHFR F31R/Q35E	-14.31
MTX-DHFR L22F	-11.91

Docking MTX-DHFR WT

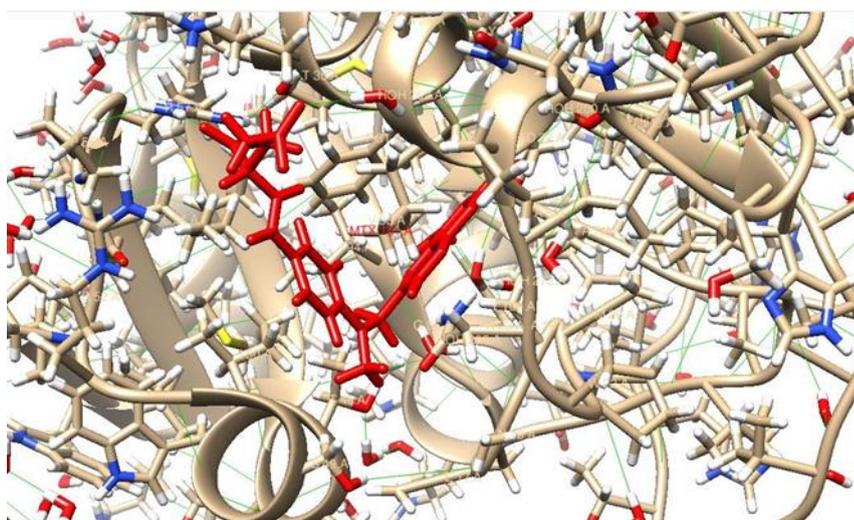
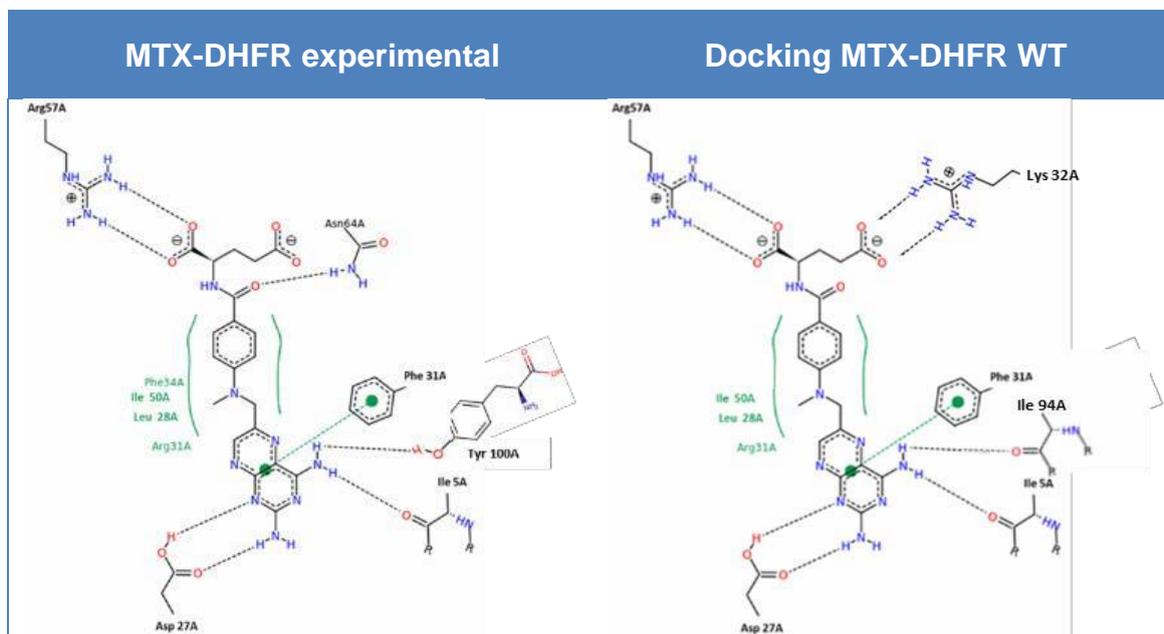


Figura 21. Representación del docking MTX y el enzima DHFR no mutada.

Las interacciones encontradas en el docking DHFR WT-MTX son enlaces de hidrógeno de los grupos amino con aminoácidos hidrofóbicos (Ile) y con cadena lateral con carga positiva (Asp), los grupos carboxilos con aminoácidos con cadena lateral con carga (Arg) y finalmente interacciones aromáticas con Phe en la zona de los anillos del fármaco.

Comparación del docking respecto a su referencia experimental

Tabla 8. Interacciones del fármaco MTX en la proteína experimental y el docking.



Si comparamos ambos resultados, el MTX del docking se sitúa en una posición en la proteína similar al experimental coincidiendo así la mayoría de las interacciones con aminoácidos: enlaces de hidrogeno con Arg 57 A, , Ile 5A y Asp 27^a, interacciones hidrofóbicas con Ile 50 A, Leu 28A, Arg 31A y finalmente π -stacking con Phe 31A.

Docking MTX-DHFR F31R/Q35E

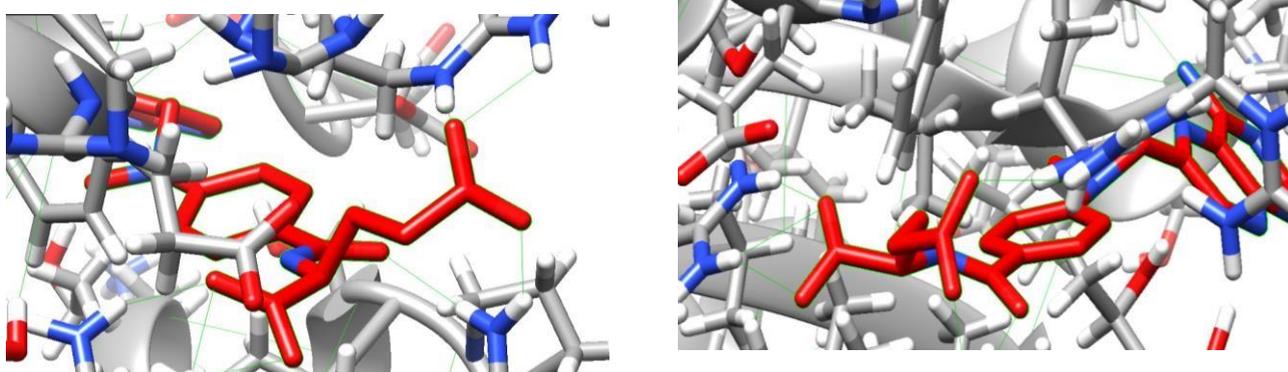
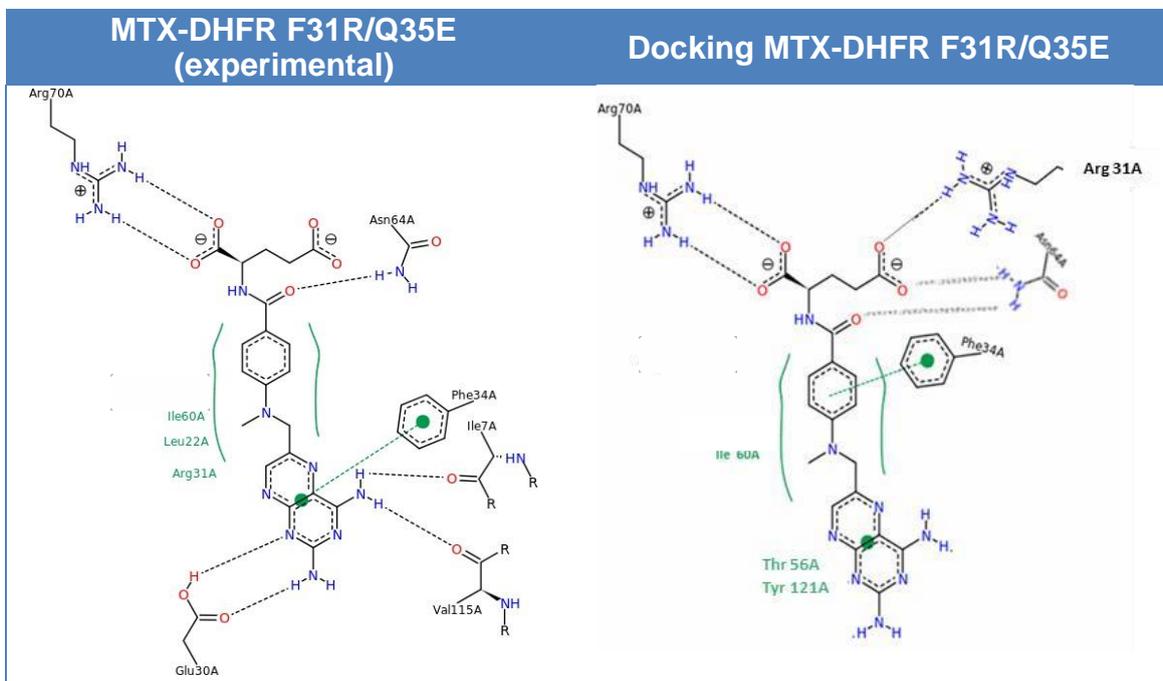


Figura 22. Interacciones del MTX y el enzima DHFR mutada.

En este caso, las interacciones se reducen concentrándose en la zona de los grupos carboxílicos con el aminoácido Arg y el anillo aromático del centro del ligando con Phe.

Viendo que la energía calculada es menor que en el docking de la proteína no mutada, no es de sorprender la reducción de enlaces y otros tipos de interacciones proteína-ligando.

Tabla 9. Interacciones del fármaco MTX en la proteína experimental F31R/Q35E y el docking.



En este caso, a pesar de que el ligando en el docking se sitúe en la misma zona activa que la proteína experimental apenas, se encuentra pocas coincidencias en entre las interacciones de ambas proteínas: Enlace de hidrogeno con el aminoácido Arg 70A e interacciones hidrofóbicas con Ile 60A.

Docking MTX-DHFR L22F

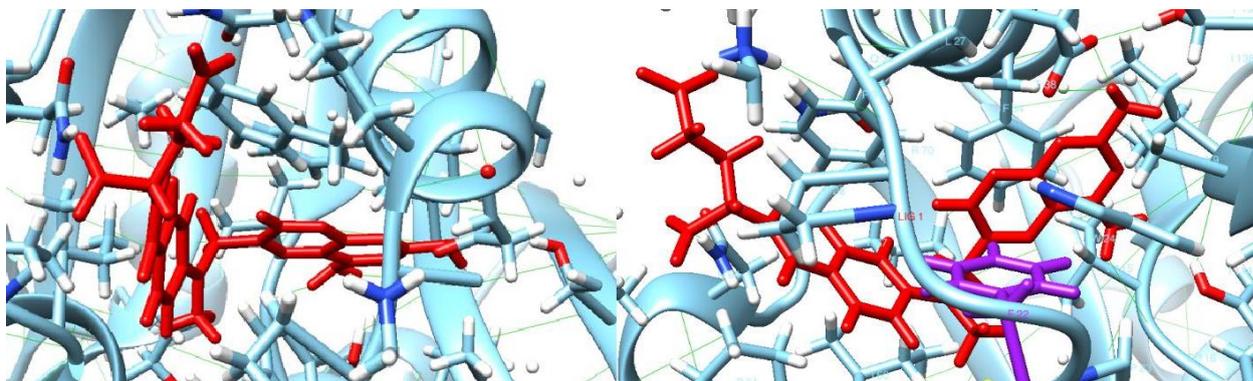


Figura 23. Interacciones del MTX y el enzima DHFR L22F. Marcado en color violeta el aminoácido mutado.

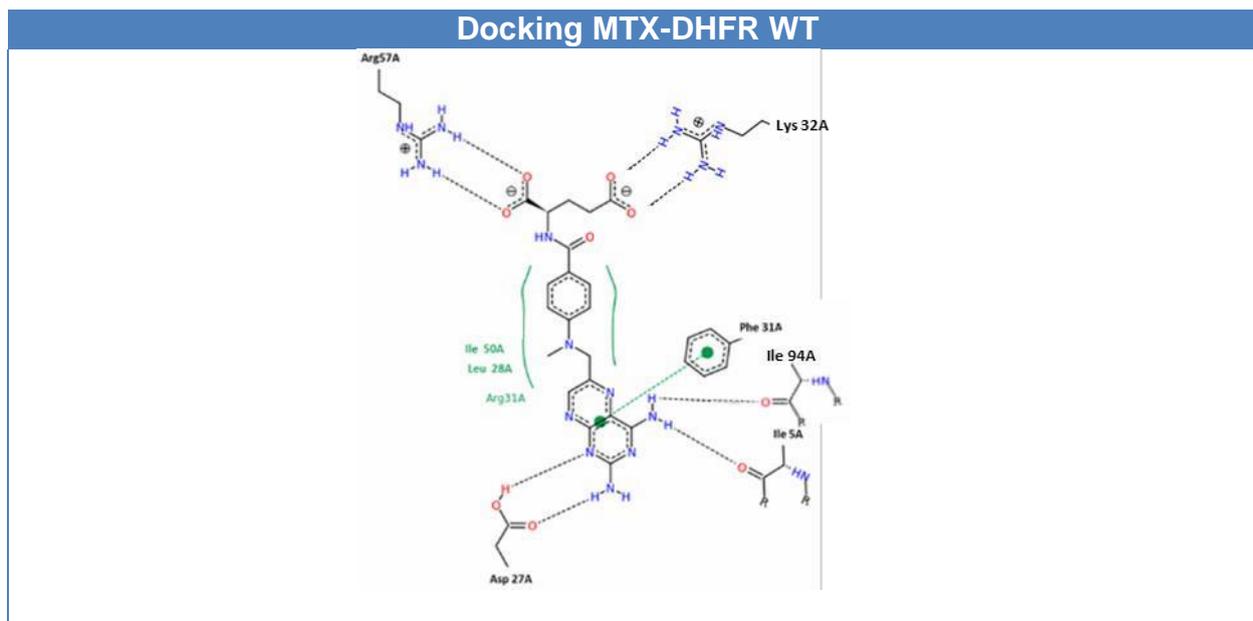
El ligando MTX se sitúa justamente en la zona del aminoácido mutado, aunque tanto las estructuras experimentales como el docking presentan interacciones π -stalking en general, el hecho de que haya más anillos aromáticos en la zona de activación no es indicio de mejor interacción. De hecho, la energía es menor en

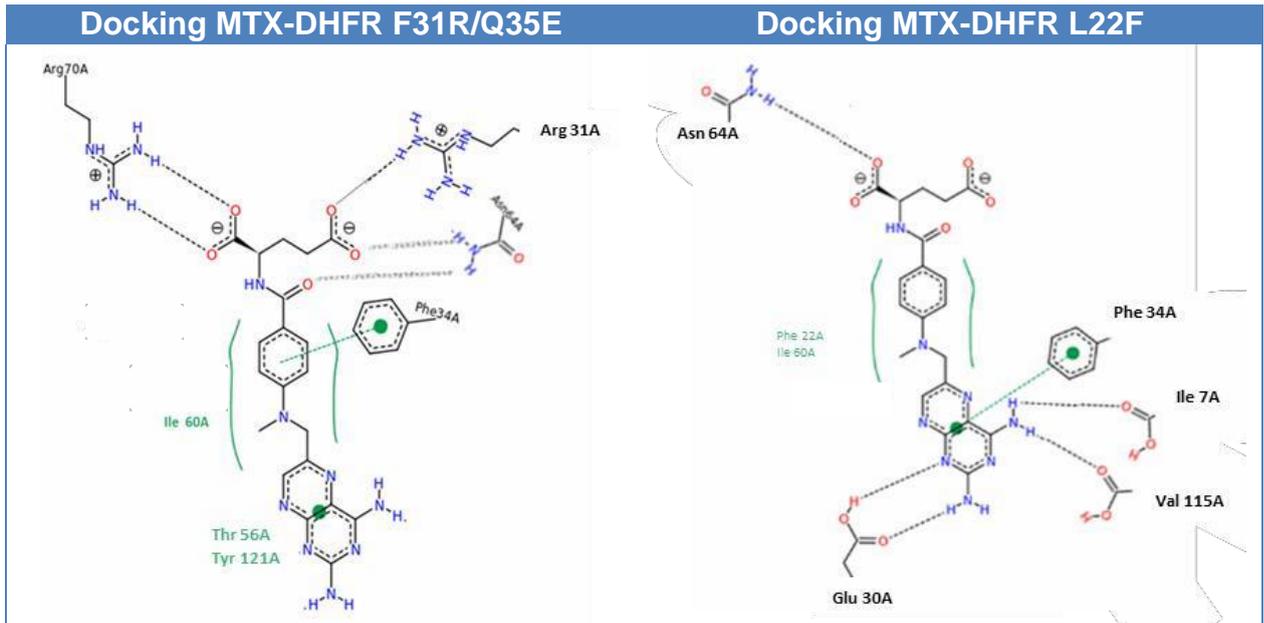
comparación a las demás estructuras y presenta menos enlaces de hidrógeno (con Asn, Ile, Val y Glu).

Comparación del docking de las tres proteínas DHFR

Una vez analizado por separado comparamos los tres dockings en una misma tabla:

Tabla 10. Interacciones del ligando respecto a cada proteína realizada el docking.





2.2.4. Búsqueda de ligandos

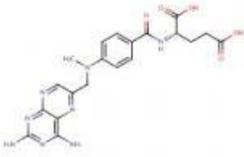
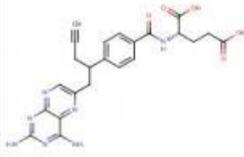
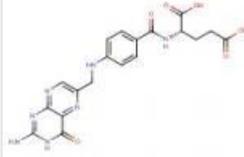
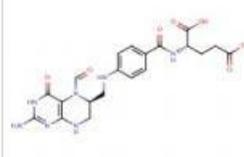
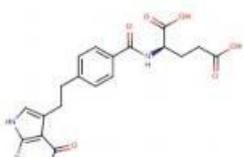
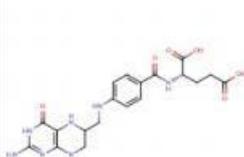
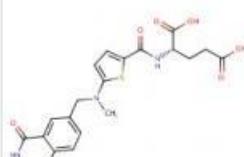
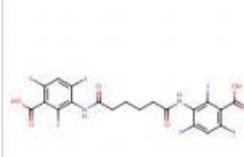
Inicios de búsqueda de posibles ligandos con Swissdock

Una vez analizado las interacciones, el segundo objetivo es encontrar un ligando diferente que pueda mantener el patrón de interacción del MTX con la enzima agreste y pudiera mejorar el mismo con las enzimas resistentes.

Para tener una idea por donde iniciar la búsqueda y testear la interacción del nuevo fármaco se utiliza la herramienta Swiss similarity, en la que se realiza una búsqueda introduciendo los siguientes parámetros:

- Capa electrostática similar al MTX.
- Fármacos aprobados y comercializándose

Ante estas características la herramienta no dos fármacos a escoger:

<p>DB00563, Methotrexate Score : 0.926</p> 	<p>DB06813, Pralatrexate Score : 0.903</p> 	<p>DB00158, Folic Acid Score : 0.879</p> 	<p>DB00650, Leucovorin Score : 0.869</p> 
<p>DB00642, Pemetrexed Score : 0.860</p> 	<p>DB00116, Tetrahydrofolic acid Score : 0.855</p> 	<p>DB00293, Raltitrexed Score : 0.815</p> 	<p>DB04711, Iodipamide Score : 0.795</p> 

Teniendo en cuenta que cuanto más elevado sea el valor Score más coincidencias se presenta en comparación al MTX, se ha escogido el fármaco Leucovorin.

En el caso del Pralatrexate ya se utiliza como tratamiento anticancerígeno inhibiendo el enzima DHFR, sin embargo, el único cambio estructuralmente es la adición de un triple enlace entre los anillos aromáticos.

En el caso del ácido fólico, este se utiliza en los tratamientos quimioterapéuticos para reducir los efectos adversos del MTX debido a que es un precursor de la síntesis de nuevos aminoácidos y ácidos nucleicos (ante la falta de estos precursores por la quimioterapia se genera diferentes efectos en contra del paciente).

El Leucovorin es una forma reducida del ácido fólico, se utiliza también en conjunto con otros fármacos para reducir los efectos secundarios por la falta de ácido fólico y potenciar la eficacia del MTX. Por tanto, estructuralmente hablando la diferencia entre el anterior fármaco y el Leucovorin es que es la forma reducida de esta molécula y se ha escogido este fármaco por su función.

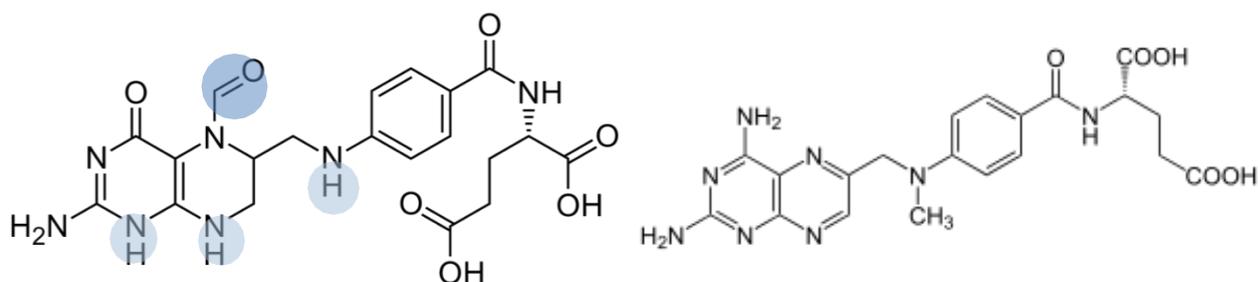


Figura 24. Estructura del Leucovorin (izquierda) y del MTX (derecha). La diferencia entre ambas se remarca en color azul.

Búsqueda de posibles zonas alostéricas

Con el objeto de tener más información para la selección del modelo obtenido para los posibles nuevos ligandos, se ha realizado un estudio de posibles sitios de unión de la enzima mediante FTMap, por si el Leucovorin no presentara el mismo sitio de unión que el MTX.

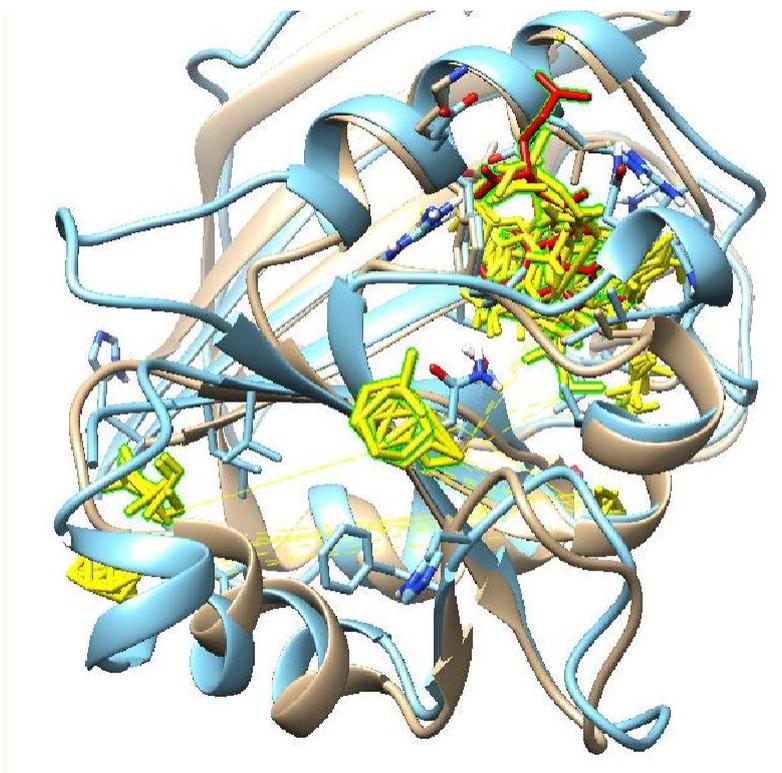


Figura 25. Mapping de las zonas de activación y/o alostéricas del enzima DHFR.

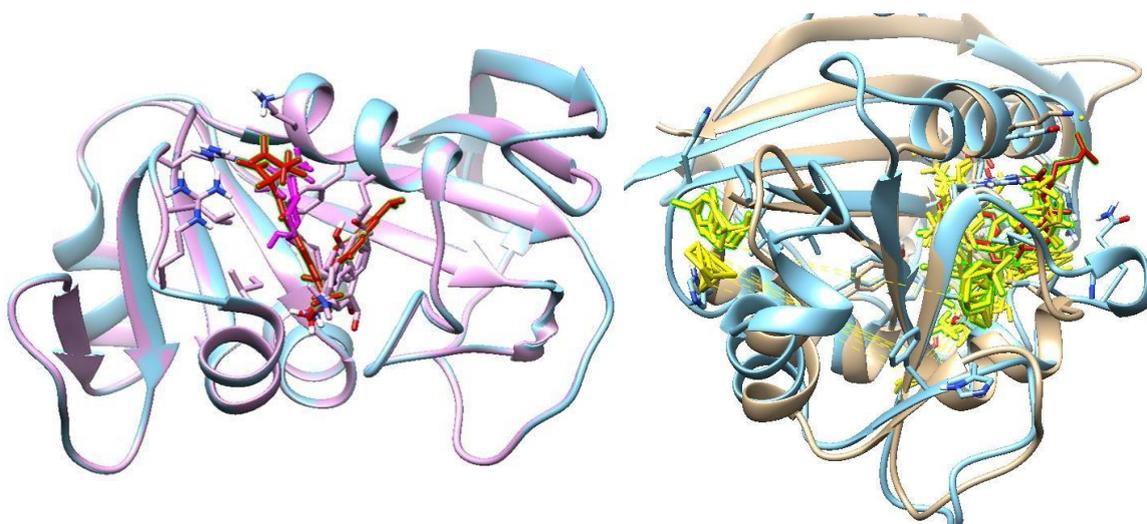


Figura 26. Alineamiento de la estructura analizada por FTMAP (izquierda DHFR W I y derecha F31R/Q15E) en busca de coincidencias de la zona de activación y el ligando MTX (ligando rojo).

Comparando la estructura experimental del DHFR, el ligando MTX se sitúa en el centro de activación de la misma forma que la proteína F31R/Q15E. En la

derecha de la figura se visualiza varias zonas alostéricas en el extremo opuesto del centro.

Energías de interacción con nuevos ligandos

Se realiza finalmente el docking de las tres proteínas junto con el nuevo ligando, leucovorin, el cual se resume en una tabla las energías resultantes:

Tabla 11. Energía de interacción generadas en el docking con el ligando Leucovorin.

Estructura	Energía (Kcal/mol)
Leucovorin-DHFR agreste	-13.22
Leucovorin -DHFR F31R/Q35E	-13.34
Leucovorin -DHFR F31S/F34S	-12.93

Viendo que los resultados del Leucovorin se acercan a resultados similares al docking con el MTX, se testea dos ligandos distintos derivados del MTX:

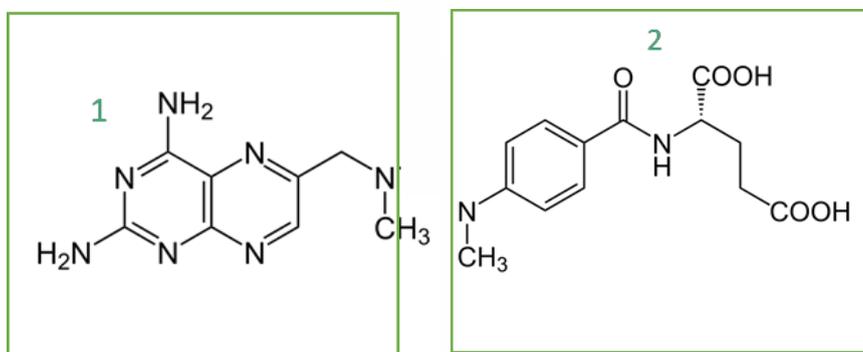


Figura 27. Dos ligandos diferenciados derivados del metotrexato.

Los resultados de las energías de interacción se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 12. Energía de interacción generadas en el docking con los ligandos modificado.

Estructura	Energía (Kcal/mol)
Fármaco mod 1-DHFR agreste	-9.81
Fármaco mod 2-DHFR agreste	-9.92
Fármaco mod 1 -DHFR F31R/Q35E	-9.45
Fármaco mod 2 -DHFR F31R/Q35E	-9.06
Fármaco mod 1 -DHFR L22F	-9.12
Fármaco mod 2 -DHFR L22F	-8.58

Tanto las modificaciones 1 del fármaco y las modificaciones 2 dan resultados similares energéticamente. Esto puede ser ya que hay interacciones donde mayormente coinciden en todos los casos como el π -stalking del Phe 31Å y enlaces de hidrogeno con aminoácidos con carga en la cadena literal como Arg 57Å.

En el caso de la modificación 2 con DHFR L22G, la energía baja corresponde a la falta de interacción con aminoácidos con cadena lateral aromática como se ha ido viendo comúnmente en los anteriores casos.

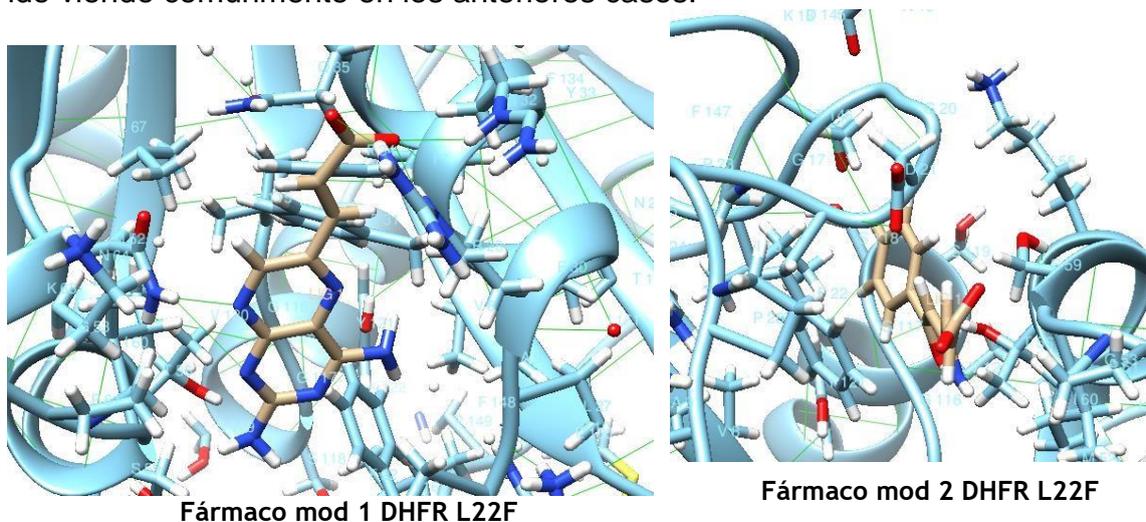


Figura 28. Interacción de la proteína DHFR L22F con el fármaco modificado n°1 (izquierda) y el fármaco modificado n°2 (derecha).

2.2.5. Tabla de resultados

Analizado los ligandos propuestos con las proteínas DHFR WT, DHFR F31S/Q35E y finalmente F22L, se resume en una tabla todas las interacciones comentadas:

Tabla 13. Tabla de resultados de las principales interacciones por proteína y ligando.

Fármaco	Mutación	PDB	Interacción Swiss modeler	Principales interacciones
MTX	WT	1RG7	Enlaces de hidrogeno: Ile, Gly, Asp,Arg), π -stalking (Phe), Van der Waals (Ile, Leu)	Enlaces de hidrogeno con Arg, Ile y Asp, interacciones hidrofóbicas con Ile, Leu, Arg y π -stacking con Phe.
	F31R/Q35E	3EIG	Enlaces de hidrogeno (Arg, Asp), π -stalking (Phe), Van der Waals (Ile, Leu)	Enlace de hidrogeno con el aminoácido Arg 70A e interacciones hidrofóbicas con Ile 60A
	F22L	1DLR		Enlaces de Hidrogeno con Asn, Ile, Val y Glu

Leocovorin	WT	Modelo Swiss modeler	Enlaces de hidrogeno (Arg), π -stalking (Phe) e interacciones hidrofóbicas con Leu.
	F31R/Q35E		Enlaces de hidrogeno con Ser, Lys y Glu, π -stalking con Phe e interacciones hidrofóbicas con Tyr.
	F22L		Enlaces de hidrogeno: Thr y Arg
MTX Modificación nº 1	WT		Interacciones π -stalking con Phe 31Å, interacciones hidrofóbicas con Leu 54Å y enlaces de hidrogeno con Arg 57 y Asp 23
	F31R/Q35E		Interacciones π -stalking con Phe 31Å, interacciones hidrofóbicas con Pro 61Å y enlaces de hidrogeno con Arg 32 y Arg 28
	F22L		Interacciones π -stalking con Phe 22Å y enlaces de hidrogeno con Arg 32Å.
MTX Modificación nº 2	WT		Interacciones π -stalking con Phe 31Å y

			enlaces de hidrogeno con Arg 57Å.
	F31R/Q35E		Interacciones π -stalking con Phe 31 e interacciones hidrofóbicas con Leu 28 y Asn 23Å
	F31S/F34S		No hay enlaces de hidrogeno. Interacciones π stalking con el aminoácido mutado Phe 22.

Viendo los resultados de los ligandos testeados, podemos concluir que metrotrexato es el que mejor energía de interacción demuestra. Comparándolo con los demás ligandos, las interacciones más comunes es el π -stalking con Phe y enlaces de hidrógenos con aminoácidos con su cadena lateral cargada.

En relación a las proteínas DHFR WT y las variantes F31S/Q35E y L22F, claramente las mutaciones presentan menor energía de interacción por lo que serian explicaciones de la resistencia del fármaco en el tratamiento.

Ante el objetivo de buscar un fármaco afín al tratamiento, la elección a escoger seguiría siendo el MTX y como complemento el leucovorin, el segundo fármaco con mejor energía de interacción.

3. Conclusiones

A lo largo del proyecto se ha hecho una búsqueda biográfica en relación al cáncer de Leucemia Linfoblástica Aguda y los tratamientos que se han desarrollado a lo largo de la historia como la radioterapia, y en nuestro caso concreto la quimioterapia.

Dentro de los múltiples agentes quimioterapéuticos encontramos el Metotrexato, un fármaco el cual su gran utilización se remonta en los años 60, sin embargo, a lo largo de los años se han mostrado indicios de resistencia a la terapia.

Dentro los posibles motivos de resistencia se encuentran las mutaciones del enzima DHFR que provocan que el fármaco se una con menor afinidad a la proteína.

Una vez visto la posibilidad de la resistencia causada por una mutación del propio enzima, se encontró dos estructuras variantes experimentales en la bibliografía, de las cuales estaban disponibles su estructura 3D en la base de datos PDB.

Analizando las interacciones antes del docking, predominante los enlaces de hidrogeno y π -stacking con Phe el cual comparando los resultados de las estructuras enzima-ligando a posteriori del cálculo, la situación y las interacciones coinciden con los enzimas experimentales.

Una vez analizado las interacciones de las proteínas junto el MTX como ligando, se ha testado con tres ligandos más diferentes: el Leucovorin, un fármaco extraído por SwissSimilarity por su similitud en la capa electrónica con el MTX, y dos ligandos diferentes derivados del MTX.

Los resultados muestran interacciones menores en comparación con el docking de la proteína DHFR WT a causa de la reducción de los enlaces de hidrógenos y/u otro tipo de interacción.

Una vez visto los resultados, se puede concluir que no se ha encontrado un ligando con mejor interacción al DHFR-MTX original, pero si posibles enlaces a tener en cuenta a mayor búsqueda de ligando.

En relación con el seguimiento del proyecto, a lo largo del desarrollo no se ha conseguido seguir la planificación hecha al inicio por motivos de falta de

organización, herramientas saturadas (ej: SwissSimilarity) o incluso herramientas con el servidor caído durante días (ej: Swisdock).

Además, las dificultades encontradas a lo largo del trabajo se focalizan a la hora de utilizar el Software Chimera. Tanto la proteína como el ligando requería prepararlos previamente para el docking con Chimera pero, ya sea por un fallo de configuración o de guardado, en ciertas ocasiones Swisdock no permitía realizar el cálculo o acababa en error ya que la estructura imputada no estaba correctamente.

Las mejoras del trabajo a tener en cuenta serían, por ejemplo, un análisis más profundo de las estructuras proteína-ligando y no quedarnos en los enlaces de hidrógeno y π -stacking, si no ir más allá como estudiar las zonas polares de la proteína si influyen la posición del fármaco.

Finalmente, los trabajos futuros a contemplar es el docking del fármaco pralatrexate³⁵ ya que es un antimetabolito más afín al DHFR que el MTX y por ello también se utiliza en el tratamiento anticancerígeno y estudiar qué puede hacer que interactúe más y buscar mejoras.

Otro posible trabajo es investigar el campo de los péptidos como aplicación anticancerígena^{36,37} ya que recientemente se han publicado prometedores del campo de la inmunoterapia.

4. Bibliografía

1. Yousef, A., Fargad, R., Alshamaseen, D., Alsheikh, A., Zawiah, M., Kadi, T. (2019). *Folate pathway genetic polymorphisms modulate methotrexate-induced toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia*. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* (2019), 83, 755-762.
2. Heikamp, E.B., Pui, C. (2018). *Next-Generation Evaluation and Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia*. *The Journal of Pediatrics*, 203, 14-26.
3. Vaishnavi, K., Bansal, D., Trehan, A., Jain, R., Attri, S. (2018). *Improving the safety of high-dose methotrexate for children with hematologic cancers in Settings without access to MTX levels using extended hydration and additional leucovorin*. *Pediatric Blood Cancer*, 65, 1-6.
4. Tiwari, P., Ganesan, P., Radhakrishnan, V., Arivahagan, R., Ganesan, T.S., Dhanushkodi, M., Totadri, S., Sagar, T. (2018). *Prospective evaluation of the toxicity profile, and predictors of toxicity of high dose methotrexate in patients of acute lymphoblastic leukemia/lymphoma*. *Pediatric Hematology Oncology Journal*. 3, 1-5.
5. Chemocare. *Leucovorina*. (2019) Recuperado el 13 de marzo en: <https://chemocare.com/es/chemotherapy/drug-info/leucovorina.aspx>.
6. Weigand, M., Frei, E., Graf, N., Buchholz, B., Wolfrom, C., Breuer, A., Wiessler, M. (1999). *Mechanisms of resistance to methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia: circumvention of thymilate synthase inhibition*. *Journal Cancer Res Clinical Oncology*. 125, 513-519.
7. Wheeler, T., Savage, H. (2018) *Dermatology patients' Experiences of information and support received when start methotrexate*. *Dermatological Nursing*. 17(4), 34-38.

8. Evans, W.E, Cheok, M.H. (2006). *Acute lymphoblastic leukaemia: a model for the pharmacogenomics of cancer therapy*. Nature Review. 6, 117-129.
9. Baggott, J., Morgan, S. (2019). *The importance of inhibition of a catabolic pathway of methotrexate metabolism in its efficacy for rheumatoid arthritis*. Medical Hypotheses 122,10-15.
10. Xu, D., Lu, S., Li, Y., Baidya, A., Mei, H., He, Y., Wi.,B.(2018). *Evaluation of methotrexate-conjugated gadolinium(III) for cancer diagnosis and treatment*. Drug Design, Development and Therapy, 12, 3301-3309.

11. Thapa, R., Kim, J., Jeong, J., Shin, B., Choi, H., Yong, C., Kim, J. (2017). *Silver nanoparticle-embedded Graphene oxide-methotrexate for targeted cancer treatment*.
12. Foster, J., Thompson, P., Bernhardt, M., Margolin, J., Hilsenbeck, S., Jo, E., Marquez-Do, D., Scheurer, M., Schafer, E. (2018). *A prospective study of a simple algorithm to individually dose high-dose methotrexate or children with leukemia at risk for methotrexate toxicities*. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 83, 349-360.
13. Abolmaali S.S., Tamaddon A.M., Dinarvand R. (2013). A review of therapeutic challenges and achievements of methotrexate delivery systems for treatment of cancer and rheumatoid arthritis. *Cancer Chemother Pharmacol*, 71, 1115-1130.
14. Huil-Li Ng., Shangying Chen, Eng-Hui Chew, Wai-Keung Chui. (2016). Applying the designed multiple ligands approach to inhibit dihydrofolate reductase and thioredoxin reductase for anti-proliferative activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 115, 63-74.
15. R. Cannon, William, Garrison, Barbara J., Benkovic, Stephen J. (1997). Consideration of the pH-dependent inhibition of Dihydrofolate Reductase by Methotrexate. *JMB*, 271, 566-668.
16. Medlineplus. (2014). *Methotrexate*. Recuperado de: <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a682019.html>
17. Cancer. Cancer. Recuperado el 16 de marzo en: <https://www.cancer.org/cancer/leukemia-in-children/treating/children-with-all.html>.
18. Wojtuszkiewicz, A. et al. (2015). Methotrexate resistance in relation to treatment outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Hematology & Oncology*. 8,61.
19. Organista-Nava, J., Gómez-Gómez, Y., Illades-Aguial, B., et al. (2018) Overexpression of dihydrofolate reductase is a factor of poor survival in acute lymphoblastic leukemia. *Oncology letters*. 15,8405-8411
20. Spencer HT1, Sorrentino BP, Pui CH, Chunduru SK, Sleep SE, Blakley RL. (1996). Mutations in the gene for human dihydrofolate reductase: an unlikely cause of clinical relapse in pediatric leukemia after therapy with methotrexate. *Pubmed*. *Leukemia*.10(3):439-46.
21. Research Gate. *Methotrexate*. Recuperado el 16 de marzo en: https://www.researchgate.net/figure/Methotrexate-Pathway_fig2_319145574
22. RCSB. *Protein Data Bank*. Recuperado el 15 de marzo en: <http://www.rcsb.org/>
23. NCBI *Gen Bank*. *Methotrexate*. Recuperado el 03 de mayo en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
24. Zink15. Recuperado el 16 de mayo en: <http://zinc15.docking.org/substances/home/>
25. Drugbank. *Methotrexate*. Recuperado el 16 de mayo en: <https://www.drugbank.ca/>

26. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE.(2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* Oct;25(13):1605-12
27. NCBI. *PubMed*. Recuperado el 17 de mayo en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21624888>
28. Zoete, V., Daina, A., Bovigny, C., & Michielin, O.(2016).A Web Tool for Low to Ultra High Throughput Ligand-Based Virtual Screening. (2016), *J. Chem. Inf. Model.*, , 56(8), 1399-1404.
29. Research Gate. *Methotrexate*. Recuperado el 16 de marzo en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
30. Research Gate. *Methotrexate*. Recuperado el 16 de marzo en: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB03695>)
31. Research Gate. *Methotrexate*. Recuperado el 16 de marzo en: Pralatrexate <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00650>
32. Volpato, J.P., Yachnin, B.J., Blanchet, J., Guerrero, V., Poulin, L., Fossati, E., Berghuis, A.M., Pelletier, J.N. (2009). Multiple conformers in active site of human dihydrofolate reductase F31R/Q35E double mutant suggest structural basis for methotrexate resistance. *J.Biol.Chem.* 284: 20079-20089
33. Lewis, W.S., Cody, V., Galitsky, N., Luft, J.R., Pangborn, W., Chunduru, S.K., Spencer, H.T., Appleman, J.R., Blakley, R.L. (1995). Methotrexate-resistant variants of human dihydrofolate reductase with substitutions of leucine 22. Kinetics, crystallography, and potential as selectable markers. *J.Biol.Chem.* 270: 5057-5064
34. Drugbank. *Methotrexate*. Recuperado el 03 de junio en: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00563>
35. Drugbank. *Pralatrexate*. Recuperado el 03 de junio en: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB06813>
36. Negishi Y, Nomizu M. (2019). Laminin-derived peptides: Applications in drug delivery systems for targeting. ELSEVIER. *Pharmacology & Therapeutics*. S0163-7258(19)30100-7.
37. Chiozzini C, Olivetta E, Sanchez M, Arenaccio C, Ferrantelli F, Leone P, Federico M. (2019). Tumor cells endowed with professional antigen-presenting cell functions prime PBLs to generate antitumor CTLs. *J Mol Med (Berl)*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00109-019-01797-7>.