

EXPLORACIÓN DE INSECTICIDAS GABAÉRGICOS: INTERACCIÓN CON EL RECEPTOR GABA_A Y CON MEMBRANAS BIOLÓGICAS

María Salomé Gastaldi^{1,2}, Mariela E. Sánchez-Borzone^{1,2}, Virginia Miguel^{1,2}, Daniel A. García^{1,2}

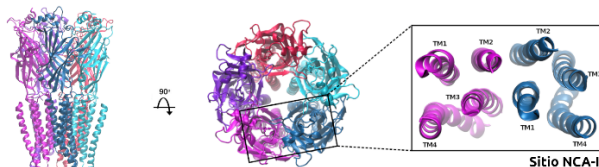
¹ Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Cátedra de Química Biológica. Córdoba, Argentina.

² Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIBYT – CONICET UNC). Córdoba, Argentina.



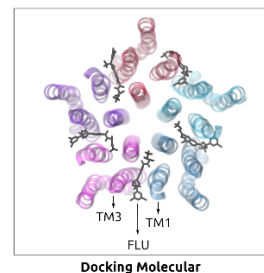
Introducción

El receptor GABA_A de insectos (RDL) es un blanco importante para insecticidas naturales y artificiales que actúan bloqueando el canal e inhibiendo el flujo de iones a través de él. Nuestro objetivo consiste en caracterizar en un receptor de unión del insecticida Fluralaner (FLU), sitio denominado antagonista no competitivo II (NCA-II), para desarrollar herramientas que nos permitan obtener nuevos compuestos insecticidas que compartan este mismo sitio de interacción. Además, pretendemos evaluar si estos compuestos son capaces de interactuar con la membrana donde está embebido el receptor y modularlo.



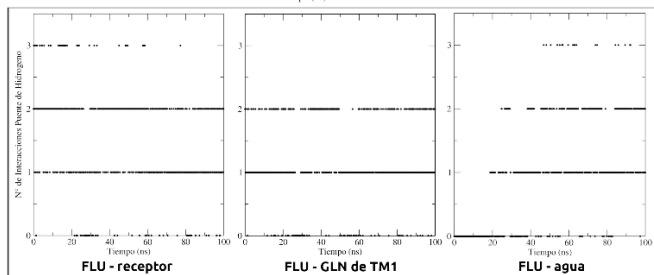
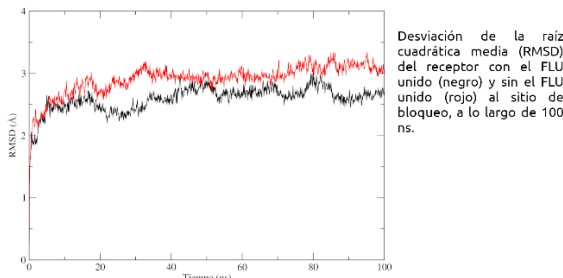
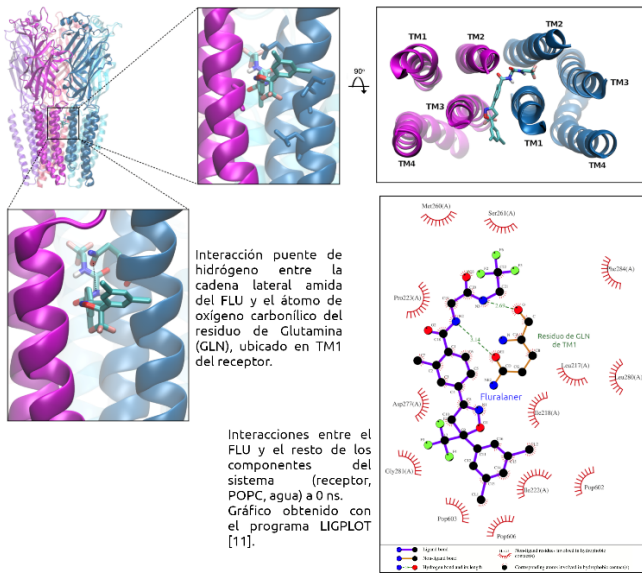
Materiales y Métodos

- Modelado por homología utilizando el programa MODELLER[1]: generación de modelos 3D del homopentámero RDL de *Aedes aegypti*, a partir de distintos templates, correspondientes a diferentes estados conformacionales del canal. Los mismos se desarrollaron previamente en nuestro grupo de trabajo, dado que no existe una estructura cristalográfica disponible del receptor GABA_A de insectos.
- Ensayos de Docking Molecular mediante el programa AutoDock Vina[2]: evaluación de la performance de los 10 modelos con el fin de determinar cuál de ellos es capaz de replicar la pose de unión del Fluralaner. Considerando además que el sitio de interacción se encuentra en la interfaz entre dos subunidades del receptor, hemos analizado todas las interfaces posibles de los 10 modelos.
- Módulo AnteChamber[3] y paquete Gaussian 03[4]: obtención de la estructura 3D de la molécula de Fluralaner. Cálculos cuánticos de optimización de la geometría y distribución de cargas.
- Simulaciones de Dinámica Molecular de detalle atómico, utilizando GROMACS v.2018.6 con aceleración de GPU[5]: caracterización de las interacciones ligando-receptor-membrana, a partir de los resultados obtenidos en los ensayos de Docking Molecular. El complejo ligando-receptor se embebió en una bicapa lipídica hidratada pre-equilibrada de POPC, y se simuló durante 100 ns. Se utilizó el campo de fuerza AMBER99SB-ILDN[6] para el receptor, GAFF[7] para el Fluralaner y All Atom(AA) Slipid[8] para los lípidos. Se utilizó el modelo TIP3P[9] para las moléculas de agua y se empleó la interfaz AnteChamber Python Parser (ACPYPE)[10] para traducir los archivos de parámetros que se utilizaron con el código GROMACS.



Resultados

El modelo obtenido a partir del template 3RHW (PDB ID), que posee una conformación abierta del canal, fue el que mejor replicó tanto las interacciones reportadas por ensayos bioquímicos, como así también la orientación espacial de la molécula de Fluralaner en el sitio de bloqueo del receptor.



Conclusiones

- Los ensayos de Docking Molecular del Fluralaner en el sitio NCA-II nos permitieron seleccionar un modelo del GABA_A de *Aedes aegypti* que reproduce tanto las interacciones reportadas por ensayos bioquímicos, como así también la orientación espacial de la molécula de Fluralaner en el sitio de bloqueo del receptor.
- El uso de herramientas de Bioinformática, Modelado Molecular y Simulaciones de Dinámica Molecular, nos permitió validar el modelo seleccionado ya que las interacciones observadas entre el Fluralaner y los componentes del sistema fueron las esperadas.

1. Eswar N et al. Protein structure modeling with MODELLER. Structural Proteomics: high-throughput methods, 2006; p. 145-159.
 2. Trott, O. and A.J. Olson, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. J Comput Chem, 2010. 31(2): p. 455-61.
 3. Wang, J., Wang, W., Kollman P.A.: Cso, D. A. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. Journal of Molecular Graphics and Modelling, 25, 2006, 247-260.
 4. M. Frisch, C. Trucks, H. Schlegel, G. Scuseria, M. Robb, J. Cheeseman, J. Montgomery Jr., T. Vreven, K. Kudin, J. Burant, Gaussian 03, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2004, p. 4.
 5. M.J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Pall, J.C. Smith, B. Hess, E. Lindahl. GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. SoftwareX 1 (2015) 19-25.
 6. Lindorf-Larsen K, Phana S, Palini K, Maragakis P, Kleger J, et al. (2010) Improved side chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. Proteins 78: 1950-1958.
 7. J. Wang, R.M. Wolf, J.W. Caldwell, P.A. Kollman, D.A. Case. Development and testing of a general amber force field. J Comput Chem, 23 (2002) 1334-1374.
 8. JPM, JSmbeck, A.P. Lyubartsev. Derivation and systematic validation of a refined all-atom force field for phosphatidylcholine lipids. J. Phys. Chem. B 116 (2012) 3164-3179.
 9. W.L. Jorgensen, J. Chandrosskhar, J.D. Madura, R.W. Impey, M.L. Klein. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. J. Chem. Phys. 79 (1983) 926-935.
 10. A.V. Sousa da Silva, W.F. Vranken. ACPYPE – antechamber python parser interface. BMC Res Notes 5 (2012) 367.
 11. Wallace A C, Laskowski R A, Thornton J M (1996). LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein ligand interactions. Protein Eng., 8, 127-134.

