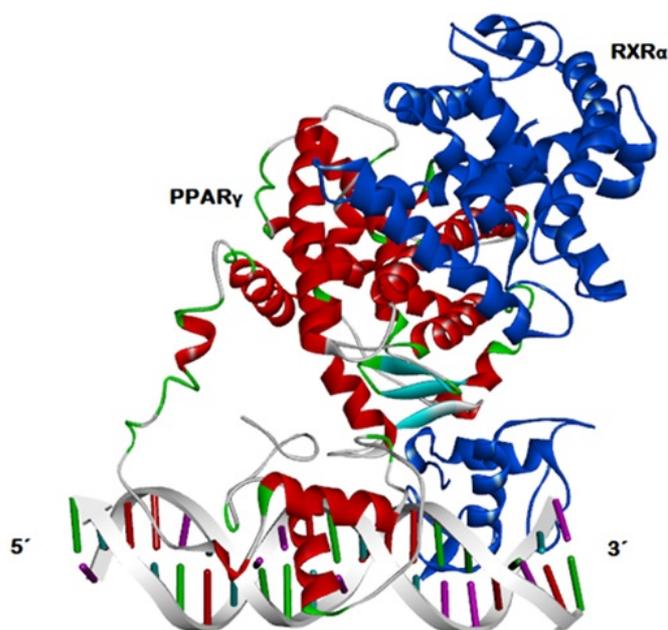


***Interacciones entre el ácido nitroaraquidónico y el receptor nuclear PPAR γ :
calibración de un modelo computacional para predecir su actividad como agonistas***



Victoria Veroli

**Tesina de graduación de la Licenciatura en Bioquímica
Facultad de Ciencias, Universidad de la República
Abril 2014**

**Tutora: Dra. E. Laura Coitiño
Co-Tutora: Dra. Ana Ferreira
Lugar de desarrollo: Laboratorio de Química Teórica y Computacional, Instituto
de Química Biológica, Facultad de Ciencias, UdelaR.**

A mi familia

Agradecimientos

A Laura Coitiño, por haberme recibido en su laboratorio y confiar en mí. Por el tiempo dedicado y la paciencia. Por haberme incentivado desde un primer momento a crecer en el ámbito científico. Gracias por todo lo que me enseñaste a lo largo de estos años.

A Ana Ferreira, por haberme abierto las puertas de su laboratorio que si bien no se pudo continuar con los experimentos la experiencia que adquirí en el mismo me resulta invaluable en estos días.

A mis compañeros de laboratorio Stephanie Portillo, Jenner Bonanata y Lucía Minini por los momentos compartidos tanto dentro como fuera del ámbito académico. Gracias por haberme hecho sentir parte del grupo desde un primer momento y haber estado ahí siempre que los necesitaba.

A Alicia Merlino, la profesora y amiga, el ejemplo de vida. Gracias por los momentos compartidos, por mostrarme el lado apasionante de la ciencia y por creer en mí y estimularme a que siga este camino. No alcanzan las palabras para agradecerte.

A María Lamas, por compartir sus resultados experimentales y haberme ayudado el tiempo que estuve haciendo experimentos en el laboratorio de Inmunología.

A Fabi, por bancarme en los momentos buenos y malos, por ser la amiga que siempre está ahí.

A Vero y a Ceci, amigas en las buenas y en las malas, que me enseñaron el valor de la amistad.

A la ANII por la beca de iniciación a la investigación otorgada en el año 2012 (INI_X_2011_1_3918) dentro de la cual se enmarca gran parte de este trabajo.

RESUMEN

PPAR γ pertenece a la subfamilia de receptores nucleares que regulan la expresión de genes implicados en diversas vías metabólicas. Es por ello que ha surgido como blanco terapéutico para el tratamiento de varias enfermedades de origen metabólico, cáncer y enfermedades vasculares. La regulación de la expresión génica es ejercida mediante la previa dimerización con el receptor X retinoides alfa (RXR α) y la consecuente unión a los elementos de respuesta a PPAR (PPRE) ubicados en los promotores de los genes regulados. Dentro de los posibles ligandos de este receptor se han identificado agonistas totales y parciales, teniendo los primeros la desventaja de originar efectos secundarios como consecuencia del mecanismo por el cual ejercen la fuerte activación de este receptor. Es por ello que se continúa en la búsqueda de agonistas parciales capaces de lograr una activación óptima de PPAR γ sin la consecuente generación de efectos secundarios indeseados. Dentro de los ligandos endógenos de PPAR γ se encuentran los derivados nitrados del ácido oleico y linoleico, los cuales actúan como activadores parciales, presentando el LAN12 una mejor capacidad activadora respecto a OAN9. A su vez, se plantea la posibilidad de que uno de los mecanismos por los cuales los nitroalquenos ejerzan su capacidad activadora sea a través de la formación de aductos covalentes con el residuo Cys285 ubicado en el bolsillo de unión a ligando. Recientemente se han sintetizados derivados nitrados del ácido araquidónico, surgiendo de esta forma el interés por evaluar su capacidad activadora de PPAR γ respecto a la de los nitroalquenos previamente mencionados.

En este trabajo, se realizó una caracterización detallada de la estructura y energética de complejos ligando-receptor formados por lípidos (oleato, linoleato y araquidonato) y nitroalquenos (9/10-nitroleicos, 12/14-nitrolinoleicos y 9/12/14/15-nitroaraquidónicos) con el LBD de PPAR γ , buscando patrones a nivel atómico/electrónico que permitan explicar su capacidad activadora relativa y permitan anticiparla. Se partió de dos estructuras cristalográficas de PPAR γ (1FM6 y 3CWD), integrando diversas herramientas computacionales para determinar la estructura del LBD y sus complejos en solución, incluyendo métodos clásicos (MM y MD), *docking* ligando-receptor y métodos cuánticos a nivel DFT/PCM y ONIOM (DFT:AMBER) para caracterizar la red de EdH y explorar la tendencia a reaccionar con Cys285.

Los estudios mostraron la importancia de la selección de la estructura cristalográfica a la hora de estudiar los complejos ligando-receptor teniendo un efecto significativo en la orientación que adquiere el ligando en el bolsillo de unión. Tanto en 1FM6 como en 3CWD, los nitroalquenos adquieren una localización característica de los activadores parciales dentro del bolsillo. Por otro lado, en términos generales los ligandos estudiados establecen EdH más fuertes con 1FM6 que con 3CWD y en ambos casos se observa que OAN9 y LAN12 establecen más EdH dentro de sus series, mientras que en los nitroaraquidónicos es AN12 que establece más EdH con 3CWD y AN9 con 1FM6. Para los complejos nitroalqueno-3CWD estudiados, la capacidad activadora no estaría impulsada por la formación de aductos covalentes con Cys285. Al estudiar la movilidad de AN15 en 1FM6 se observó que la presencia de este ligando aumenta la flexibilidad del receptor y se detectó la presencia de una molécula de agua que estaría mediando la interacción de EdH con el mismo.

INDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 7 |
| 1.1 - PPAR γ : generalidades | 8 |
| 1.2 - PPAR γ : estructura y modulación de su función por ligandos | 10 |
| 1.3 - Derivados nitrados de ácidos grasos como ligandos endógenos activadores de PPAR γ | 14 |
| 2. OBJETIVOS | 18 |
| 2.1 - Objetivo general | 19 |
| 2.2 - Objetivos específicos | 19 |
| 3. METODOLOGÍA | 20 |
| 3.1 - Modelado de la estructura de los ligandos en solución acuosa | 21 |
| 3.2 - Preparación de estructuras de los LBD de PPAR γ | 21 |
| 3.3 - Estructura y estabilidad de los complejos ligando PPAR γ por <i>docking</i> | 22 |
| 3.4 - Estructura de los complejos ligando-PPAR γ por minimización clásica | 22 |
| 3.5 - Caracterización de la red de EdH en los complejos ligando-PPAR γ | 23 |
| 3.6 - Determinación de la estabilidad y tendencia a formar aductos con Cys285 a nivel ONIOM para los complejos ligando-PPAR γ 3CWD | 23 |
| 3.7 - Evaluación del efecto de la reorganización de carga ligando-LBD sobre la estructura de los complejos (cálculos cuánticos y QM/MM ONIOM) | 24 |
| 3.8 - Análisis de la flexibilidad del LBD de PPAR γ (1FM6 y 3CWD) en ausencia y presencia del ligando AN15(1FM6) | 24 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 26 |
| 4.1 - Influencia de la estructura cristalográfica del LBD de PPAR γ | 27 |
| 4.2 - Comparación por <i>docking</i> de la interacción de los ligandos con el LBD (3CWD y 1FM6) de PPAR γ | 31 |
| 4.3 - Análisis de los complejos ligando-LBD clásicos: estructura, red de EdH y estabilidad | 34 |
| 4.4 - Evaluación de la tendencia de los nitroalquenos a formar aductos con Cys285 | 39 |
| 4.5 - Efectos de reorganización de carga en los complejos OAN9-/AN15-1FM6 | 40 |
| 4.6 - Dinámica molecular del complejo AN15-PPAR γ | 41 |
| 5. CONCLUSIONES | 44 |
| 6. REFERENCIAS | 47 |
| 7. INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA | 53 |

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

| | |
|-----------|----|
| Figura 1 | 8 |
| Figura 2 | 9 |
| Figura 3 | 10 |
| Figura 4 | 11 |
| Figura 5 | 11 |
| Figura 6 | 12 |
| Figura 7 | 14 |
| Figura 8 | 15 |
| Figura 9 | 16 |
| Figura 10 | 25 |
| Figura 11 | 27 |
| Figura 12 | 28 |
| Figura 13 | 29 |
| Figura 14 | 30 |
| Figura 15 | 31 |
| Figura 16 | 33 |
| Figura 17 | 34 |
| Figura 18 | 34 |
| Figura 19 | 35 |
| Figura 20 | 35 |
| Figura 21 | 36 |
| Figura 22 | 37 |
| Figura 23 | 38 |
| Figura 24 | 41 |
| Figura 25 | 42 |
| Figura 26 | 42 |
| Figura 27 | 43 |
| Figura S1 | 59 |
| Figura S2 | 59 |

TABLAS

| | |
|----------|----|
| Tabla 1 | 14 |
| Tabla 2 | 39 |
| Tabla 3 | 39 |
| Tabla 4 | 41 |
| Tabla S1 | 55 |
| Tabla S2 | 54 |
| Tabla S3 | 54 |
| Tabla S4 | 56 |
| Tabla S5 | 56 |
| Tabla S6 | 57 |
| Tabla S7 | 58 |

1. INTRODUCCION

1.1 PPAR γ : generalidades

Los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs) conforman una subfamilia dentro de la superfamilia de receptores nucleares que regulan la expresión génica controlando diversas funciones biológicas¹⁻⁸. Dentro de esta subfamilia, existen tres miembros codificados por distintos genes: PPAR α , PPAR β y PPAR γ ^{9-13*}, los cuales comparten un alto grado de identidad en cuanto a su composición aminoacídica¹⁴ (**Figura 1**). A su vez, existen dos isoformas de PPAR γ , PPAR γ 1 (ver **Figura 1**, esquema inferior) y PPAR γ 2, presentando esta última 30 aminoácidos adicionales N-terminales respecto a la isoforma 1¹⁵. Las dos isoformas se obtienen como consecuencia del corte y empalme alternativo del gen que codifica para este subtipo de receptor.

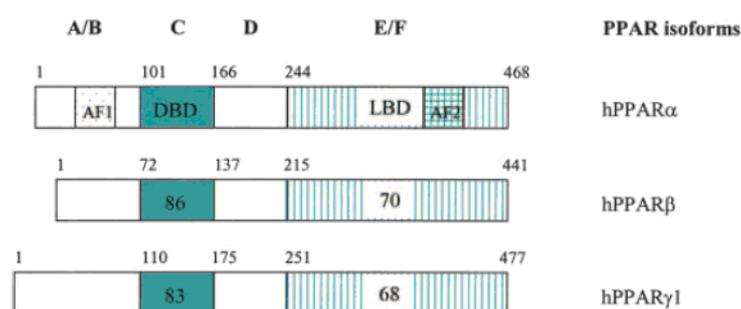


Figura 1: Representación esquemática de los dominios funcionales de los tres miembros de PPARs humanos (hPPAR α , hPPAR β y hPPAR γ). Los números dentro de cada dominio representan los porcentajes de identidad de hPPAR β y hPPAR γ respecto a hPPAR α . El número de aminoácidos que conforman cada PPAR se detallan en la parte superior de las representaciones, tomado de Guan *et al.*¹⁴.

Cada uno de estos receptores presentan patrones diferenciales de distribución tisular y celular. En el caso de PPAR γ existen diferencias entre sus isoformas ya que PPAR γ 2 se expresa casi exclusivamente en el tejido adiposo mientras que PPAR γ 1 además de expresarse en el tejido adiposo se expresa en hígado, riñones, músculo esquelético, colon, monocitos/macrófagos y otros componentes del sistema inmune¹⁶. A su vez, estas isoformas presentan diferencias en cuanto a sus niveles de expresión, siendo el de PPAR γ 2 superior al de PPAR γ 1¹⁷. Por otro lado, PPAR α se expresa preferentemente en el hígado y en menor grado en músculo y corazón mientras que PPAR β es expresado en todo el cuerpo regulando el gasto energético¹⁸.

La mayoría de los genes regulados por PPAR γ pertenecen a la ruta del metabolismo y transporte lipídico, como por ejemplo aquellos que codifican lipoproteína lipasa, proteínas de unión a ácidos grasos y la adiposina¹⁶. Si bien son más conocidas las funciones activadoras de la transcripción de este receptor, también presenta la capacidad de actuar como represor de la transcripción, siendo la disminución de productos proinflamatorios (por ejemplo, productos de las enzimas óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y ciclooxigenasa-2 (COX2)) en monocitos/macrófagos uno de los casos más estudiados¹⁹.

Debido al amplio espectro de genes regulados PPAR γ es que hace algunos años surgió la idea de tomarlo como blanco terapéutico para el tratamiento de varias enfermedades

* También conocidos como NR1C1, NR1C2 y NR1C3 por pertenecer a la subfamilia 1 de los receptores nucleares del grupo C.

de origen metabólico (diabetes de tipo 2, hipertensión y dislipidemia), cáncer y enfermedades vasculares ²⁰. Actualmente se han identificado una amplia variedad de agonistas totales y parciales de PPAR γ , difiriendo éstos en el grado de activación del receptor. Entre los agonistas parciales se encuentran las prostaglandinas, ácidos grasos α,β -insaturados y oxidados, ciertos eicosanoides y ácidos grasos nitrados ²¹, y entre los totales diversos ligandos sintéticos, como Rosiglitazona y Pioglitazona (**Figura 2**). Estos últimos pertenecen a la familia de las tiazolidinedionas (TZDs) y son capaces de actuar como agonistas de PPAR γ sensibilizando los tejidos a la insulina ²², hallazgo que ha llevado a que hayan sido utilizados desde principio de siglo para el tratamiento de la diabetes de tipo 2. Sin embargo, los efectos secundarios asociados a la utilización de estos fármacos, (que incluyen ganancia de peso, edema y retención de fluidos) han vuelto inminente la detención de su uso y el rediseño a fármacos capaces de actuar como ligandos de PPAR γ sin generar efectos nocivos para la salud del paciente ²³. Se cree que una de las causas de estos efectos secundarios es justamente el mecanismo por el cual ejercen la fuerte activación sobre PPAR γ . Es por ello que muchos de los esfuerzos para generar nuevos fármacos se han centrado en el desarrollo de agonistas parciales, con efectos antidiabéticos y sin efectos secundarios indeseados ²⁴. Otro ejemplo de fármaco utilizado, que ejerce su acción a través de la interacción con PPAR γ es el ácido 5-aminosalicílico (5-ASA o Mesalazina), utilizado en el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales (IBDs) ²⁵.

La detección de niveles elevados de PPAR γ en células espumosas derivadas de macrófagos presentes en lesiones tempranas y avanzadas en arterosclerosis ²⁶, sugiere un rol central por parte de estos receptores en el desarrollo de la enfermedad. Ligandos naturales (por ej. 15-desoxi-delta 12,14-prostaglandina J2, 15d-PGJ2) y sintéticos (por ej. TZDs) de PPAR γ tienen la capacidad de suprimir la producción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-12, IL-6 y TNF- α por parte de macrófagos murinos ²⁷. Como la inflamación es crítica en el desarrollo de la arteriosclerosis, la inhibición de la misma dentro de la lesión en desarrollo puede ayudar a atenuar el progreso de la lesión ²⁸.

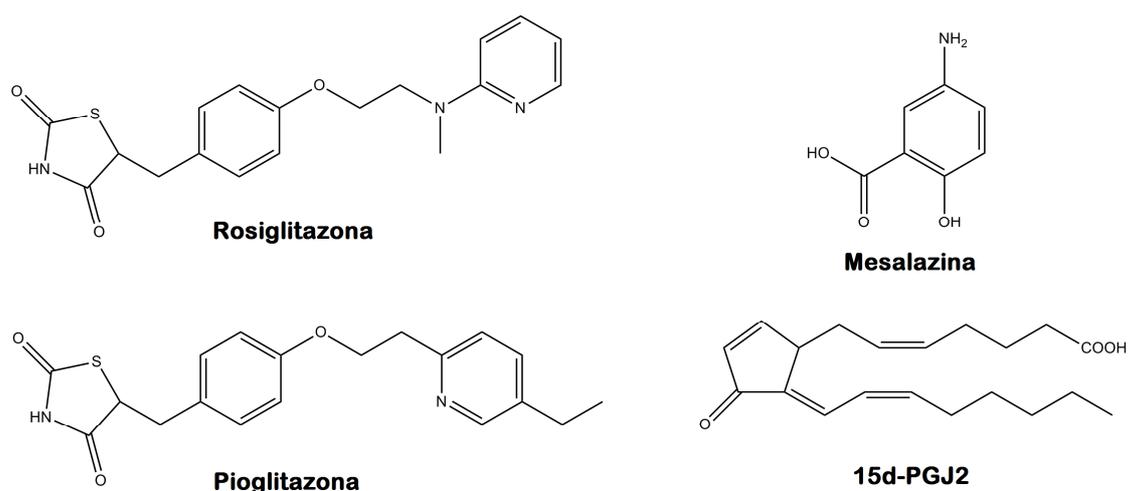


Figura 2: Estructura de ligandos de PPAR γ sintéticos (Rosiglitazona (Avandia®), Pioglitazona (Actos®) y Mesalazina) y endógeno (15-desoxi-delta 12,14-prostaglandina J2 (15d-PGJ2)). Dibujados con ChemBioDraw Ultra 12.0.

1.2 PPAR γ : estructura y modulación de su función por ligandos

PPAR γ presenta cuatro regiones o dominios (ver **Figura 1 y 3**). La región N-terminal está constituida por una región A/B variable dentro de la cual se encuentra la función de transactivación independiente del ligando (AF-1). Luego está la región C conservada compuesta de dos dedos de zinc de tipo II que corresponde al dominio de unión al ADN (DBD) de más de 65 aminoácidos. Por último, la región C-terminal se encuentra dividida en dos regiones, D y E/F: la región bisagra variable de más de 76 aminoácidos que conecta al DBD con el dominio de unión al ligando (LBD) siendo este último relativamente grande (más de 226 aminoácidos) comparado con las otras regiones y portando la función de activación transcripcional 2 (AF-2).

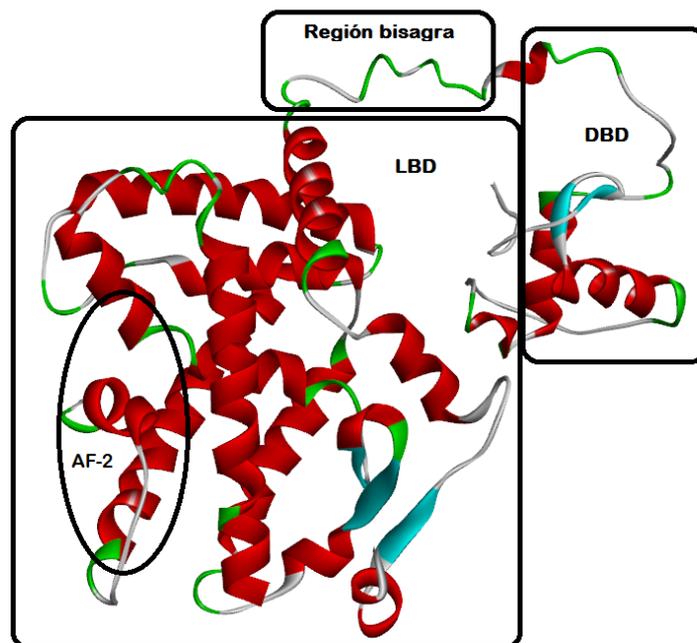


Figura 3: Estructura de PPAR γ proveniente de la cristalografía de rayos X con PDBID:3DZY. Se delimita el dominio de unión al ADN (DBD) y al ligando (LBD, señalando la ubicación de la región asociada a la función de activación transcripcional 2, AF-2) y una región bisagra variable. No se detalla la ubicación del cuarto dominio (región A/B variable) que no se halla presente en ninguna cristalografía disponible hasta el momento. A menos que se especifique otra cosa, esta estructura y los PDB sucesivos se visualizaron con DS Visualizer 3.1 de Accelrys.

La unión de PPAR γ al ADN requerida para que actúe como activador/represor de la transcripción génica requiere de la formación de un heterodímero con la isoforma α del receptor X de retinoides (RXR α)²⁹. La interfase entre ambas proteínas involucra una red de interacciones hidrofóbicas y polares mediadas por cinco hélices del LBD³⁰. La unión de un ligando a PPAR permite reclutar RXR α y formar un heterodímero intermediario. Luego de la unión al ADN este heterodímero sufre cambios conformacionales adicionales como consecuencia de esta interacción. El heterodímero reconoce un elemento de respuesta a PPAR (PPRE) dentro del promotor de los genes cuya secuencia consenso es un repetido de AGGTCA separado por un nucleótido, existiendo una polaridad a la hora de darse esta unión en la cual PPAR γ ocupa la mitad 5' y RXR α la mitad 3' (tal como se muestra en la **Figura 4**)³¹.

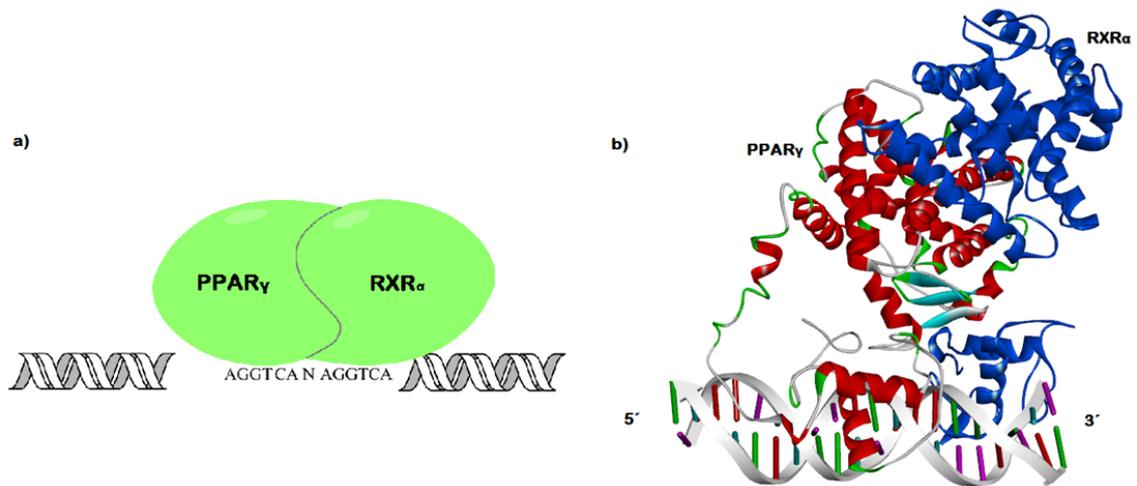


Figura 4: Interacción PPAR γ -RXR α y el ADN. (a) Esquema de la interacción. (b) Estructura cristalográfica (PDBID: 3DZU).

El LBD de PPAR γ está constituido por 13 hélices α (H1-H13, ver **Figura 5a**) y una hoja β de cuatro hebras ³⁰. Tiene un bolsillo de unión al ligando con forma de Y de un volumen que ronda los 1300-1400 Å³, siendo 2-3 veces más grande que los bolsillos de otros receptores nucleares ³². Dentro del mismo se pueden distinguir tres brazos identificados como Arm1, Arm2 y Arm3 (**Figura 5b**). Arm1 se extiende a través del espacio entre H3, H5 y H2. Arm2 está situado entre H3 y la hoja β . Arm3 se extiende a través del espacio entre H12, H4 y H10/H11, siendo esta última cavidad sustancialmente polar mientras que las otras dos son principalmente hidrofóbicas ³³. El sitio de entrada del ligando se encuentra entre la hélice H3 y la hoja β , estando compuesto por varias cadenas laterales hidrofílicas ³⁴. El sitio de unión al coactivador/correpresor (constituido principalmente por residuos hidrofóbicos) está delimitado por las hélices H3, H3' y H4 en la parte superior y por la hélice H12 en la parte inferior ³⁰. La unión de agonistas al LBD induce cambios conformacionales que desplazan el motivo de unión al correpresor LXXXLXXXL y generan motivos LXXLL de unión a coactivadores ³⁴.

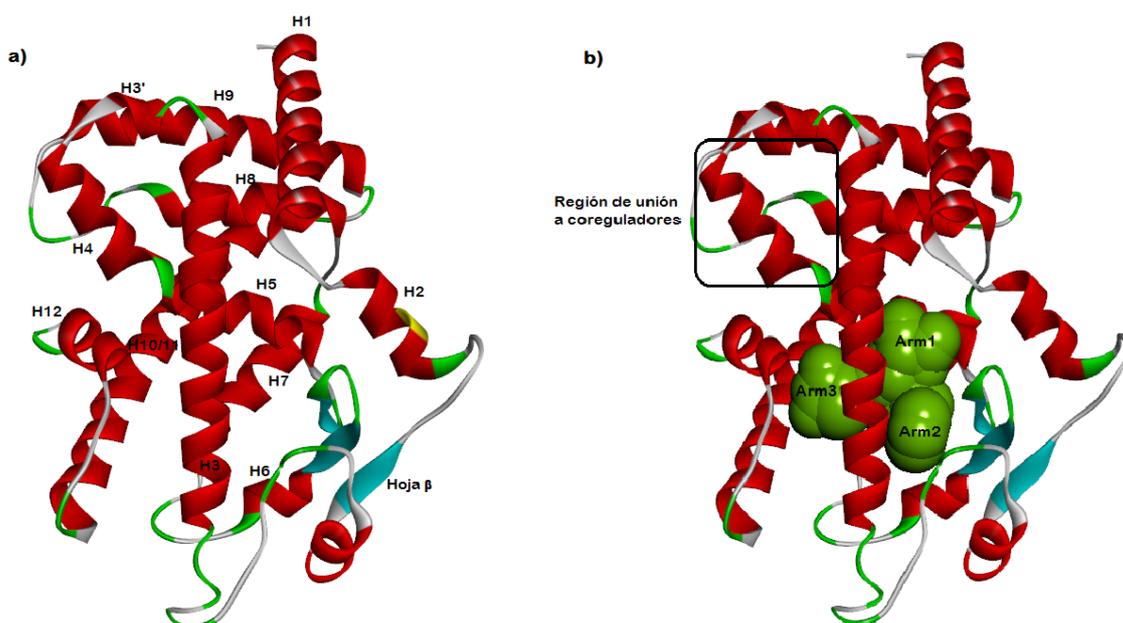


Figura 5: Estructura 3D del dominio de unión al ligando (LBD) de PPAR γ obtenido a partir de la estructura cristalográfica con PDBID:1FM6. (a) Identificación de las α -hélices que forman el LBD. (b) Identificación de los tres brazos (Arm1, Arm2 y Arm3) y la región de unión a coreguladores en la estructura del LBD.

En ausencia de ligandos, el heterodímero PPAR γ /RXR α tiene la capacidad de silenciar genes. Este silenciamiento es mediado por el reclutamiento de un complejo corepresor y de enzimas compactadoras de cromatina que impiden la transcripción génica. En contraste, la unión de ligandos induce cambios conformacionales en el heterodímero promoviendo la liberación del corepresor y la consecuente unión del coactivador y enzimas con actividad histona acetiltransferasa que relajan la estructura de la cromatina³⁵. Existe otra forma de modular la actividad de PPAR γ que es independiente del ligando, y ocurre a través de la fosforilación del residuo Ser82. Se ha propuesto que si dicha fosforilación se da por acción de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK, del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinases*) su actividad se reduce, mientras que si esta misma modificación es llevada a cabo por quinasas dependientes de ciclina (cdk7 y cdk9) se incrementa^{36,37}.

La mayoría de los agonistas endógenos y sintéticos de PPAR γ comparten características como la presencia de una cabeza hidrofílica, una parte central hidrofóbica y un espaciador flexible (ver **Figura 2**)³⁸. Sin embargo, presentan diferencias en cuanto a su orientación dentro del LBD, teniendo en los casos de agonista total e inhibidor (**Figura 6a** y **6c**, respectivamente) una orientación que se caracteriza por tener a su cabeza polar interactuando con la hélice H12 y a los agonistas parciales (**Figura 6d**) ubicados más hacia la región de las hojas β . También se observa la capacidad de PPAR γ de formar interacciones múltiples con hasta tres ligandos tal cual se observa en la **Figura 6d**. Distintos ligandos tienen la capacidad de reclutar distintos coactivadores, lo cual explica que se establezca cierta especificidad entre el tipo de activación de PPAR γ y la actividad biológica que desencadena¹⁶.

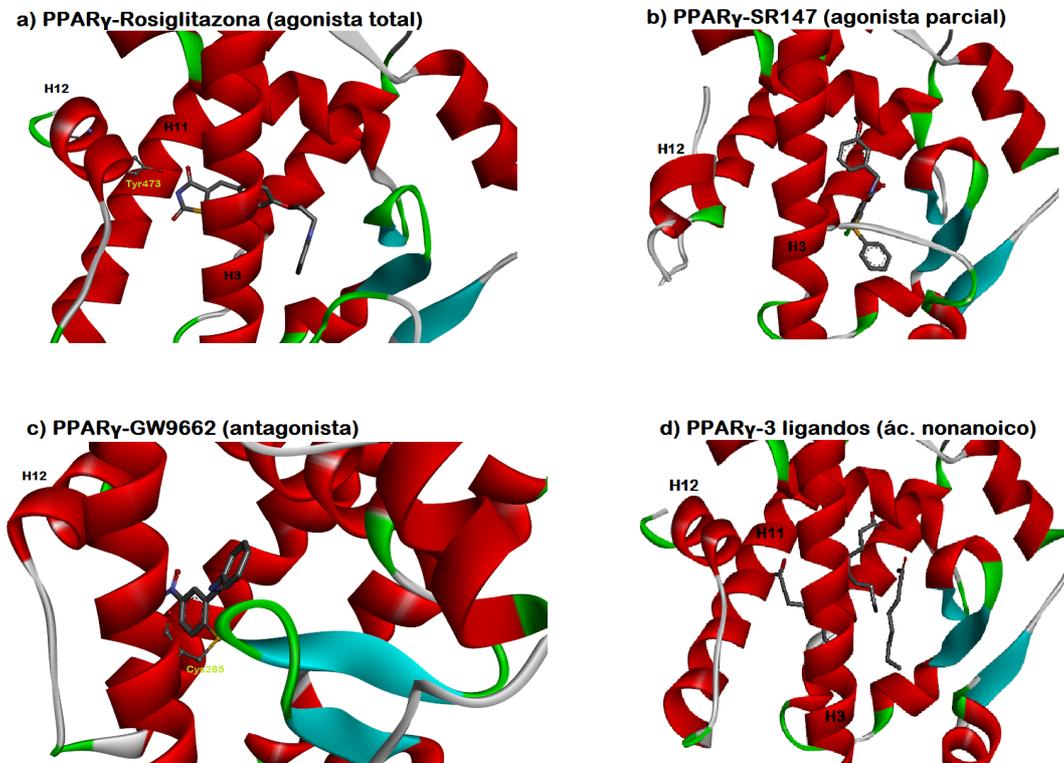


Figura 6: Modos de unión al LBD en complejos de PPAR γ con distintos tipos de ligandos. (a) con el agonista total Rosiglitazona (Avandia®) en la estructura con PDBID: 1FM6. (b) con el agonista parcial SR147 (ácido 5-cloro-1-(3-metoxibencil)-3-(feniltio)-1H-indol-2-carboxílico) en la estructura con PDBID:2Q6R. (c) con el antagonista GW9662 en la estructura con PDBID: 3B0R. (d) Interacciones múltiples con tres ácidos nonanoicos en la estructura con PDBID: 4EM9.

El modo de unión de un agonista total (**Figura 6a**) consiste en establecer enlaces de hidrógeno (EdH) con la hélice H12 (más específicamente con el residuo Tyr473) estabilizándola. Así es anclado apropiadamente respecto a las hélices H3 y H11, lo que se traduce en cambios conformacionales en la región de unión del coactivador que permiten su unión ¹⁹. La unión de un antagonista obstruye este posicionamiento de la hélice H12 a través de la presencia de un grupo voluminoso que sobresale del bolsillo de unión al ligando o incluso, como en el caso del antagonista sintético GW9662 (**Figura 6c**), modificando de forma covalente a la Cys285 de la hélice H3 y bloqueando la unión del ligando ³⁹. En cuanto a los agonistas parciales (**Figura 6b**), éstos establecen interacciones con residuos de la región comprendida entre la hélice H3 y la hoja β , pudiendo afectar la actividad transcripcional a través de la modulación de la interacción de PPAR γ con RXR α ²¹. Otra hipótesis sobre la forma de acción de los agonistas parciales involucraría a la cadena lateral de Phe363 en H7. Normalmente esta cadena lateral ocupa la cara interna de la cavidad del bolsillo de unión al ligando, pero en presencia de agonistas parciales (que a diferencia de los totales, ocupan esta región de la cavidad) se ve obligada a rotar de 90 a 180° e insertarse en un bolsillo hidrofóbico formado por cuatro residuos de la hélice H11 (His449, Leu452, Leu453, Ile456) y por un residuo de la hélice H3 (Phe282). Esto tendría como consecuencia la estabilización de la interacción entre las hélices H7 y H11, favoreciendo que la hélice H12 adopte una orientación que se traduciría en cambios conformacionales en el sitio de unión a coreguladores y permitiría la liberación del corepresor y la subsecuente unión del coactivador. De esta forma los agonistas parciales lograrían también la estabilización de la hélice H12, pero de forma indirecta ⁴⁰.

Como consecuencia del gran volumen que presenta el bolsillo de unión al ligando de PPAR γ , se ha detectado la capacidad de este receptor de formar complejos con más de una molécula, preferentemente ácidos grasos de cadena media ⁴¹. A partir de la estructura cristalográfica resuelta mediante la técnica de difracción de rayos X de PPAR γ con tres ácidos grasos de cadena media (ácido nonanoico) (PDBID:4EM9) (**Figura 6d**), se puede apreciar como cada uno interacciona con uno de los tres brazos (Arms 1-3, ver **Figura 5b**) presentes en el bolsillo de unión al ligando estableciendo interacciones capaces de estabilizar de forma preferencial respecto al complejo PPAR γ -Rosiglitazona la región de la hélice H3 y hoja β , así como también las hélices H11 y H12.

En la última década se han utilizado distintas herramientas de modelado computacional de la estructura y energética (esencialmente *docking* ligando-receptor y simulaciones de dinámica molecular clásica, ver detalles en la sección Metodología) para estudiar la estabilidad de PPAR γ , sus cambios conformacionales y las interacciones con distintos agonistas. La herramienta de *docking* molecular ha sido utilizada esencialmente con el fin de determinar el farmacóforo en agonistas de PPAR γ que determina un modo de unión característico ^{42,43} para ser utilizado en el diseño de nuevos agonistas ⁴⁴ y/o explicar desde el punto de vista molecular la variación en la capacidad de activación de diversos compuestos ⁴⁵. La dinámica molecular se ha aplicado al estudio de la estabilidad y flexibilidad de la estructura de PPAR γ en sus formas activa e inactiva ⁴⁶ y en ausencia y presencia de ligandos de distinto tipo (activadores totales y parciales ⁴⁷) y a examinar los caminos de entrada y salida de ligandos ⁴⁸ y la influencia que tienen las moléculas de agua en la interacción ligando- PPAR γ ^{41 y 49}.

1.3 Derivados nitrados de ácidos grasos como ligandos endógenos activadores de PPAR γ

Se ha reportado que varios derivados nitroalquenos de los ácidos grasos oleico y linoleico son ligandos endógenos de PPAR γ ⁵⁰. Si bien el ácido linoleico nitrado (LNO₂) es menos estable en solución acuosa que el ácido oleico nitrado (OANO₂) (vidas medias del orden de 30 minutos y más de 2 horas, respectivamente) resulta ser un activador más potente de PPAR γ ⁵¹.

Las afinidades relativas de los regioisómeros 12 de LNO₂ (LAN12), 9 y 10 de OANO₂ (OAN9 y OAN10) (**Figura 7**) y de la Rosiglitazona (**Figura 2**) por PPAR γ fueron determinadas en términos de IC₅₀ mostrando que la afinidad de los nitrolípidos es diferencial y que es dependiente del regioisómero considerado⁵¹ (**Tabla 1**). Por otro lado, se determinaron las capacidades activadoras de PPAR γ por parte de estas especies a través del EC₅₀ observándose una mayor capacidad activadora por parte del regioisómero 12 de LNO₂ respecto a 9 y 10 OANO₂, siendo el regioisómero 9 de OANO₂ el que presenta una mayor capacidad activadora dentro de su serie (**Figura 8**). De forma notable, se ve cómo el valor de EC₅₀ del regioisómero LAN12 (EC₅₀=4.5 nM) se encuentra dentro de los rangos comparables con el valor obtenido para el agonista total Rosiglitazona (EC₅₀=6.7 nM)⁵².

Tabla 1: Valores de IC₅₀ de la interacción PPAR γ con 9- y 10-OANO₂, 10- y 12-LNO₂ y Rosiglitazona (Avandia®)⁵¹.

| Ligando | OANO ₂ | | LNO ₂ | Rosiglitazona |
|-----------------------------|-------------------|------|------------------|---------------|
| REGIOISÓMERO | 9 | 10 | 12 | -- |
| IC ₅₀ (μ M) | 0.98 | 1.61 | 0.41 | 0.25 |

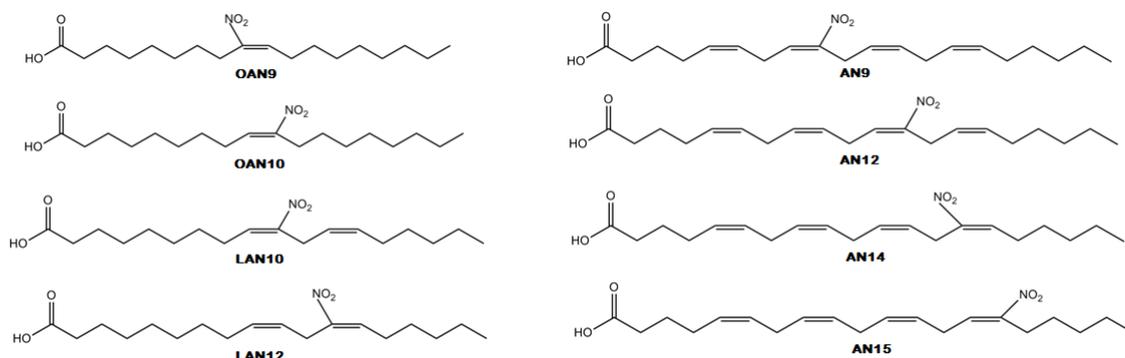


Figura 7: Estructura 2D de los distintos regioisómeros de los ácidos oleico, linoleico y araquidónico nitrados incorporados en este estudio (respectivamente OAN9/-10, LAN10/-12 y AN9/-12/-14/-15).

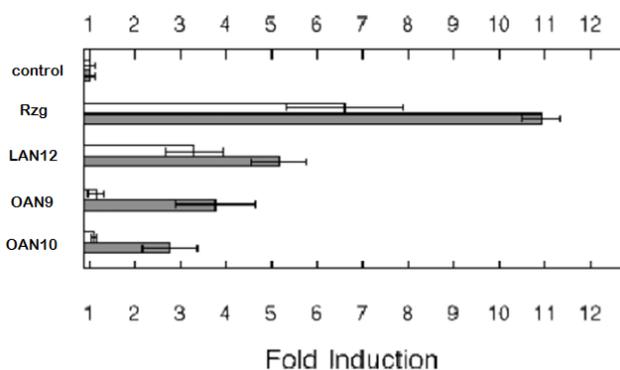


Figura 8: Activación de PPAR γ por parte de LAN12 y OAN9/-10 en comparación con la inducción por Rosiglitazona (RZG) o vehículo (control). Las inducciones fueron realizada con 0.1 μ M de ligando (barras blancas) o 3 μ M de ligando (barras grises). Tomado y modificado de Gorczynski *et al* ⁵¹.

Freeman y colaboradores estudiaron los efectos del ácido oleico y OANO₂ sobre un modelo murino de IBDS, comparándolos con los ejercidos por 5-ASA ⁵³. La administración del nitroalqueno provocó un incremento en la expresión de genes blanco de PPAR γ en colon a niveles comparables con 5-ASA, en tanto el ácido graso oleico no nitrado no tuvo efecto alguno. Estos resultados experimentales muestran que la capacidad activadora de OANO₂ puede ser utilizada para el tratamiento farmacológico con la ventaja de utilizar como ligando endógeno en cuanto a evitar la generación de efectos adversos secundarios característicos de los fármacos sintéticos.

Otra característica sobresaliente de los nitroalquenos es la alta electronegatividad del grupo NO₂ unido a uno de los átomos de carbono alquénlicos en ácidos grasos, que le confiere naturaleza electrofílica al átomo C β favoreciendo que actúe como blanco de reacciones de adición de Michael con nucleófilos del medio (por ej. residuos proteicos de His y Cys ⁵⁴). Estudios recientes revelan que la activación de PPAR γ mediante LNO₂ es inducida por la nitroalquilación covalente de la Cys285 del bolsillo de unión al ligando (**Figura 6c**), de modo que esta susceptibilidad a la nitroalquilación depende del pKa de la Cys que actúa como nucleófilo la cual será responsable de promover la reactividad nucleofílica y la consecuente susceptibilidad a la nitroalquilación ⁵⁵. La formación de aductos entre ácidos grasos modificados con la Cys285 estabiliza a la estructura del LBD siendo mejores inductores de la actividad de PPAR γ respecto a ligandos que no forman aductos ⁵⁶.

Recientemente se ha propuesto que en el proceso de activación de PPAR γ mediado por ligandos que forman aductos con Cys285, existirían dos pasos bien diferenciados denominados anclaje y bloqueo. El primero consiste en la entrada de la molécula al bolsillo de unión al ligando para formar un complejo intermediario no covalente. El segundo comprende a la subsecuente formación del enlace covalente con el tiolato de Cys285 a través de una reacción de adición de Michael ⁵⁷.

Actualmente, se cuenta con una estructura cristalográfica del complejo de PPAR γ con dos regioisómeros de LNO₂ (10 y 12) (PDBID:3CWD) ⁵⁸ (**Figura 9**). A partir de la misma los autores plantean la existencia de EdHs entre el grupo nitro de estas especies y los residuos Arg288/Glu343, proponiendo que estas interacciones confieren selectividad de unión a estos ligandos, aspecto corroborado por experimentos de mutagénesis

dirigida. Estos autores también sugieren que la mayor actividad de LAN12 puede deberse en parte a la formación de un enlace de hidrógeno con el residuo Glu343, haciendo de éste un residuo clave a la hora de estudiar futuras interacciones entre otros ligandos y PPAR γ . Este patrón de interacción también fue observado al analizar las posiciones adquiridas por los grupos hidroxilo presentes en regioisómeros oxidados del ácido linoleico 9-HODE y 13-HODE en complejo con PPAR γ ⁵⁶. Todos estos datos correlacionan con la capacidad activadora observada de ácidos linoleicos nitrados y oxidados. El ácido linoleico sin modificar tiene la capacidad de formar enlaces de hidrógeno entre su grupo carboxilo y residuos polares pertenecientes al Arm 3 e interacciones hidrofóbicas que involucran a su cola alifática y residuos de estas mismas características presentes tanto en Arm1 como en Arm2 ⁵⁹. A partir de la caracterización del complejo LNO₂-PPAR γ se mostró como las posiciones de los residuos Glu343 y Phe287 varían significativamente al comparar los complejos con los nitrolípidos y con la Rosiglitazona de forma de optimizar interacciones de enlace de hidrógeno (con el grupo nitro) e hidrofóbicas (con el extremo no polar del ácido graso) siendo específicas de cada agonista.

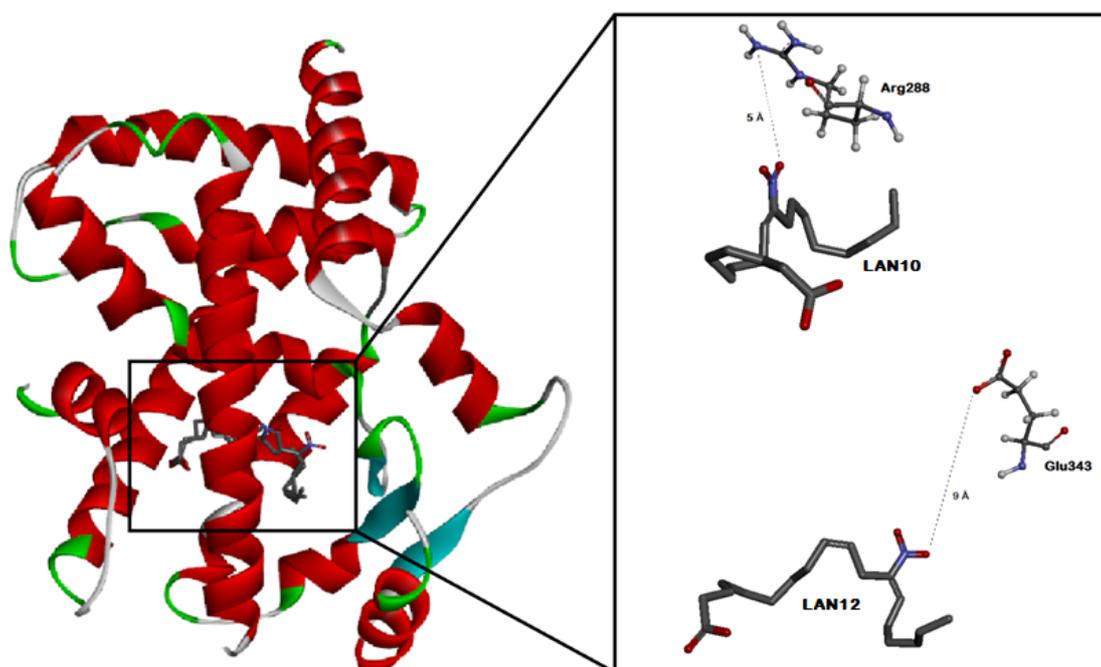


Figura 9: Estructura del complejo PPAR γ con los regioisómeros 10 y 12 de LNO₂ obtenido a partir de la estructura cristalográfica con PDBID:3CWD. Se detallan las distancias entre los grupos nitro de estos ligandos y los residuos Arg288 y Glu343. Si bien los autores de esta cristalografía plantean la formación de EdH entre los grupos nitro y estos dos residuos, las distancias aquí reportadas no concuerdan con la posibilidad de formación de este tipo de interacción.

Más recientemente se ha sintetizado y caracterizado el ácido nitroaraquidónico ⁶⁰, otro nitroalqueno que resulta interesante de estudiar debido a su posible formación durante eventos inflamatorios. Es posible que durante la activación inflamatoria de macrófagos, la acción de fosfolipasas sobre los fosfolípidos de membrana libere el ácido araquidónico, y éste resulte nitrado por mecanismos que involucran la formación del radical $\cdot\text{NO}_2$ como consecuencia de la generación de óxido nítrico en estas células. La vida media en solución acuosa del AANO₂ es del orden de 60 minutos ⁶⁰, siendo doblemente más estable que el LNO₂ (30 minutos) pero menos estable que OANO₂ (2 horas). Mediante aproximaciones experimentales que involucran cultivos celulares, se ha descubierto que el AANO₂ tiene un papel como agente anti-inflamatorio a través de

la capacidad de inhibir la síntesis de NOS2 y la consecuente generación de NO, así como también la activación de la NADPH oxidasa durante la activación de macrófagos ⁶¹. Además, el AANO₂ ha mostrado capacidad para inhibir la actividad POX de PGHS-1 y -2 mientras que OANO₂ y LNO₂ son incapaces de hacerlo ⁶². No se ha analizado hasta ahora si el AANO₂, al igual que los derivados nitrados del ácido oleico y linoleico, tiene la capacidad de activar PPAR γ y en caso afirmativo como se comparan su actividad con la de los nitroalquenos ya caracterizados. En caso de presentar la capacidad de activar PPAR γ , se vuelve necesario el estudio de esta propiedad para cada regioisómero por separado ya que la posición de nitración puede dar origen a regioisómeros que tengan capacidades diferenciales tal cual ocurre en los casos de nitroalquenos estudiados por Gorczynski *et al* ⁵¹. En este caso no debemos de perder de vista que el ácido araquidónico posee cuatro dobles enlaces y que la síntesis de los productos nitrados genera cuatro (AN9/-12/-14/-15) de los ocho isómeros posibles (**Figura 7**). Estos isómeros se encuentran actualmente en estudio experimental en cuanto a sus propiedades biológicas en el grupo de investigación del Prof. Homero Rubbo en el Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO) de la Facultad de Medicina, Universidad de la República en Uruguay.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

El objetivo general de este trabajo consiste en analizar detalladamente la estructura y estabilidad de complejos establecidos entre el LBD del receptor PPAR γ y una selección de ocho nitroalquenos (OAN9/-10, LAN10/-12 y AN9/-12/-14/-15) con el propósito de identificar a nivel molecular patrones vinculados con la capacidad activadora ya determinada experimentalmente para el OANO $_2$ y el LNO $_2$. En forma comparativa se analizarán también las interacciones con la Rosiglitazona (Rgz), por ser éste un activador total de PPAR γ . Se espera que la información generada sea útil para anticipar el potencial activador de PPAR γ de los distintos regioisómeros del AANO $_2$, los cuales podrían tener valor para el diseño de nuevas terapias para patologías humanas asociadas a la pérdida de control de la inflamación. El estudio se aborda *in silico*, empleando un conjunto amplio de herramientas de la *Química Teórica y Computacional* (métodos clásicos, cuánticos y QM/MM ONIOM), simulaciones de Dinámica Molecular y de la Bioinformática Estructural (*docking* ligando-proteína).

2.2 Objetivos específicos

- a) Determinar si existen diferencias significativas entre distintas estructuras cristalográficas del sitio de unión al receptor (1FM6 y 3CWD) en el cristal y en solución (simulando con métodos clásicos condiciones similares a aquellas en que se encuentra el receptor en el organismo).
- b) Explorar con *docking ligando-proteína* si las diferencias encontradas en a) inciden en forma importante sobre la naturaleza de las interacciones establecidas en los complejos ligando-receptor.
- c) Caracterizar la estructura de los complejos ligando- PPAR γ en solución empleando técnicas clásicas (*campo de fuerza AMBER ff03 en una caja de aguas TIP3P y contraiones*) y realizar el análisis comparado con especial énfasis en la formación de enlaces de hidrógeno (EdH), la estabilidad de los complejos y el efecto de cambiar de nitroalqueno y de regioisómero para cada tipo diferente de nitroalqueno.
- d) Complementar los estudios de c) con *cálculos mixtos ONIOM QM/MM (DFT:AMBER)* para obtener información sobre la factibilidad de que ocurran procesos de transferencia de carga (densidad electrónica y protones) entre los residuos del LBD.
- e) Analizar con métodos mixtos ONIOM (DFT:AMBER) la factibilidad de la formación de aductos nitroalqueno-LBD con el residuo Cys285 del receptor.
- f) Caracterizar mediante simulación de dinámica molecular la flexibilidad del LBD de PPAR γ en solución acuosa en ausencia y presencia de uno de los ligandos de la serie AANO $_2$ y detectar moléculas de agua que puedan estar mediando la interacción ligando- PPAR γ .

3. METODOLOGIA

3.1 Modelado de la estructura de los ligandos en solución acuosa

La estructura en solución acuosa de los ligandos Rzg (activador total de PPAR γ de referencia, cuya fórmula 2D se aprecia en la **Figura 2**), oleato, linoleato y araquidonato y una serie de sus derivados nitrados (regioisómeros OAN9/-10, regioisómeros LAN10/-12 y regioisómeros AN9/-12/-14/-15, ver **Figura 7**) se caracterizaron usando métodos computacionales de la teoría de los funcionales de la densidad (DFT ⁶³) al nivel M06 ⁶⁴/6-31+G(d,p) ⁶⁵ acoplados a un modelo del continuo IEF-PCM ^{66,67} utilizando cavidades de forma molecular creados usando radios de Bondi ⁶⁸ y evaluación de las componentes no electrostáticas, como se hallan implementados en el paquete Gaussian 09 ⁶⁹. Se verificó en cada caso la naturaleza del punto estacionario analizando los valores propios del Hessiano analítico determinado al mismo nivel.

3.2 Preparación de estructuras de los LBD de PPAR γ

A lo largo de este estudio se trabajó con dos estructuras del LBD de PPAR γ obtenidas a partir de las estructuras cristalográficas de esta proteína en complejo con Rzg (PDBID 1FM6) y con los nitroalquenos LAN10/-12 (PDBID 3CWD), como base para modelar la formación de los complejos con los distintos ligandos considerados, extrayendo de las mismas el punto de partida para la representación tridimensional del LBD de la proteína.

Se minimizó la energía de estas estructuras utilizando métodos clásicos con el campo de fuerza AMBER *ff03.r1* ⁷⁰ implementado en el programa AMBER 12 ⁷¹. Este campo de fuerza deriva del *ff99*, con dos diferencias principales: a) las cargas atómicas son derivadas a partir de cálculos cuánticos que usan un dieléctrico continuo para simular la polarización del solvente y b) incluye modificaciones de las torsiones ϕ y ψ del backbone proteico que reducen el sesgo hacia la conformación helicoidal y nuevas bibliotecas para la descripción de los aminoácidos terminales. Esto lo hace un campo de fuerza más recomendable para simulaciones de proteínas. Se agregaron los átomos de H faltantes en la cristalografía, manteniendo los residuos Lys, Arg, Tyr y Cys protonados, Glu y Asp desprotonados y las Histidinas protonadas en el nitrógeno ϵ . Posteriormente se solvataron con una caja de agua octaédrica TIP3P ⁷² y se les agregaron contraiones K⁺ hasta neutralidad. El protocolo de optimización seguido fue por etapas, minimizando la energía de aguas y contraiones con la proteína fija en la primer etapa (500 pasos con el algoritmo *steepest descent* –SD– y 1500 con el algoritmo de *gradiente conjugado* –CG– para 3CWD y 1FM6) y liberando en la segunda etapa todo el sistema (90.000 y 140.000 pasos con el algoritmo SD para 3CWD y 1FM6, respectivamente, y 10.000 pasos con el algoritmo CG en ambos casos).

Se verificó la calidad de las estructuras obtenidas analizando el gráfico de Ramachandran a través del servidor Procheck ⁷³. De esta forma se detectaron aquellos residuos que no se encontraban en orientaciones favorables y se los ubicó dentro de la proteína para ver si se localizaban dentro del bolsillo de unión al ligando. Se evaluaron las diferencias globales entre las estructuras 1FM6 y 3CWD en solución en base al RMSD entre su esqueleto carbonado (C α), calculado utilizando el servidor SuperPose ⁷⁴ y a partir de la superposición de las dos estructuras se comparó la orientación de las cadenas laterales de los residuos del bolsillo.

3.3 Estructura y estabilidad de los complejos ligando-PPAR γ por docking

Para obtener las estructuras de los complejos de los distintos ligandos con PPAR γ se utilizó en primer instancia la herramienta de *docking* molecular ligando-proteína. En todos los casos se partió de las estructuras clásicas optimizadas en solución según el protocolo descrito en 3.2 de los dos LBD y los ligandos fueron anclados utilizando el programa Autodock 4.2⁷⁵. Las condiciones utilizadas fueron ajustadas a estos sistemas siguiendo el trabajo realizado por Kumar *et al*⁷⁶. Se utilizó en todos los casos una grilla que abarcara todo el bolsillo de unión al ligando (60x66x84 y 54x80x54 para 1FM6 y 3CWD, respectivamente). Se realizaron 50 corridas con la función de *score* del algoritmo genético Lamarckiano y un espaciado de 0.375 Å, un tamaño de paso para la traslación y rotación de 0.2 y 14.0 Å, respectivamente. En el caso de los complejos PPAR γ -LNO₂ (de los que se dispone de estructuras determinadas por cristalografía, cadena A del dímero de PPAR γ de PDB ID 3CWD) las mismas fueron utilizadas como referencia para validar las condiciones de *docking* seleccionadas para generar toda la serie de complejos a comparar en busca de patrones estructurales que correlacionen con la capacidad activadora de PPAR γ para los casos en que ésta es conocida (ver detalles en la información suplementaria, **Tabla S1** y **Figura S1**). En el caso de los nitroalquenos se seleccionaron aquéllas orientaciones que fueran similares a la de los nitrolinoleicos en la cristalografía 3CWD, estando el grupo carboxilo posicionado en el *Arm3* y el grupo nitro en el *Arm1* (ver **Figura 5**). Las energías de unión de los complejos son evaluadas utilizando un campo de fuerza de energía libre semiempírico el cual fue parametrizado utilizando un amplio número de complejos proteína-inhibidor cuyas estructuras y constantes de inhibición eran conocidas. En un primer paso, se estima la energía intramolecular para la transición de la forma no unida de ligando y proteína hacia la conformación del complejo ligando-proteína. Luego se evalúa la energía intermolecular de la combinación del ligando y la proteína en su conformación unida. A partir de los valores de energía de unión, se determina además una constante de disociación K_d (μM) de los complejos ligando-receptor obtenidos, que se calcula a partir de la energía libre de unión ($\Delta G_{\text{unión}}$) en Autodock como

$$K_d = \exp(\Delta G_{\text{unión}}/RT) \quad (\text{ecuación 1})$$

con $T = 298.15$ K y R la constante universal de los gases en las unidades correspondientes (1.98719 cal/mol.K).

3.4 Estructura de los complejos ligando-PPAR γ por minimización clásica

A efectos de tener en cuenta la adaptación que puede sufrir la estructura del receptor (mantenida rígida en los estudios de *docking*) en presencia de los distintos ligandos y en solución, se realizó la minimización de energía con métodos clásicos de las dos series de complejos ligando-LBD obtenidos utilizando el mismo procedimiento general descrito para los LBDs en 3.2. Los ligandos fueron parametrizados utilizando el campo de fuerza *gaff*⁷⁷ de AMBER12 y se generaron las cargas RESP⁷⁸. La protonación de los residuos proteicos fueron tratados de la misma forma que en las estructuras de los LBDs sin ligando. Las moléculas de agua representadas en forma discreta con el campo TIP3P y los contraiones K^+ fueron minimizados utilizando las mismas condiciones que en 3.2 y la proteína con 90.000 pasos con el algoritmo steepest descent y 10.000 con el algoritmo gradiente conjugado.

3.5 Caracterización de la red de EdH en los complejos ligando-PPAR γ

La caracterización de la red de EdH para cada par LBD-ligando, se realizó en base a parámetros geométricos (distancias entre los átomos H...aceptor(A) y dador(D)...A, ángulos D-H...A) medidos en las estructuras de los complejos resultantes de las optimizaciones clásicas llevadas a cabo con AMBER en solución según se describe en 3.4 para las dos series de LBDs (3CWD y 1FM6).

A nivel electrónico la caracterización de EdH se completó con la determinación de los órdenes de enlace de Wiberg correspondientes, evaluados mediante cálculos *single point* a nivel IEF-PCM/M06/6-31+G(d,p)^{64,65} utilizando un dieléctrico de 4.7 para simular el entorno proteico sobre recortes del complejo clásico que incluyen al ligando completo y los residuos que se encuentran a menos de 3 Å del mismo en cada caso (ver **Tabla S2** y **Figura S2** en la información suplementaria) y se completaron con átomos de H en los enlaces terminales de la estructura.

3.6 Determinación de la estabilidad y tendencia a formar aductos con Cys285 a nivel ONIOM para los complejos ligando-PPAR γ 3CWD

Se calcularon a nivel ONIOM QM/MM (DFT:AMBER) las energías de formación de los complejos establecidos entre los nitroalquenos/ácidos grasos con el LBD 3CWD, a fin de contar con una evaluación más precisa de su estabilidad, que pueda correlacionarse más correctamente con la capacidad activadora diferencial de PPAR γ por parte de cada uno de estos ligandos.

La fórmula usada para evaluar esta magnitud es la que sigue:

$$E_{\text{formación}} = E_{\text{LBD-lig-ONIOM}} - (E_{\text{LBD-ONIOM}} + E_{\text{lig-PCM-DFT}}) \quad (\text{ecuación 2})$$

donde $E_{\text{LBD-lig}}$ se obtuvo mediante cálculos *single-point* ONIOM sobre la estructura obtenida por minimización clásica de los complejos en solución según 3.4, combinando los niveles M06/6-31+G(d,p)^{64,65} y el campo de fuerza AMBER *parm96*⁷⁹ tal como se halla implementado en el paquete Gaussian09⁶⁹. La zona cuántica abarcó en cada caso al ligando completo y los residuos Cys285, Gln286, Arg288, Ser289, Tyr327, Lys367, His449 y Tyr473. Se utilizó el esquema de *embedding* electrostático y los ligandos fueron parametrizados con el campo de fuerza *gaff*⁷⁷. E_{LBD} se obtuvo mediante cálculos *single-point* ONIOM con la misma combinación de niveles QM/MM y definición de la región cuántica usadas para obtener $E_{\text{LBD-lig}}$, en este caso en ausencia de ligando, sobre la estructura del LBD de PPAR γ , obtenida según el protocolo indicado en 3.2. E_{lig} se obtuvo a nivel IEF-PCM/M06/6-31+G(d,p) en solución acuosa para las estructuras aniónicas de los ligandos obtenidas según especificado en 3.1.

A fin de evaluar en forma comparada la tendencia de los distintos ligandos a formar aductos covalentes por reacción de Michael con el residuo de Cys285 (**Figura 6c**) tal como se ha reportado en la literatura para el caso de los derivados nitrolinoleicos⁵⁶

$$\text{GAP}_{\text{H-Cys285-L-lig}} = E_{\text{LUMO-lig-ONIOM}} - E_{\text{HOMO-Cys285-3CWD-ONIOM}} \quad (\text{ecuación 3})$$

se determinó el valor del gap de energía HOMO-LUMO cruzada entre Cys285 y cada ligando a partir de los complejos LBD 3CWD-ligando, utilizando dos cálculos *single*

point independientes ONIOM (M06/6-31+G(d,p):AMBER) por cada par ligando-LBD utilizando *embedding* mecánico.

El primero de estos cálculos ONIOM se realizó ubicando al residuo Cys285 desprotonado (forma en que debería hallarse para realizar directamente un ataque nucleofílico) en la zona cuántica para obtener el valor de $E_{\text{HOMO-Cys285-3CWD-ONIOM}}$; el segundo se realiza ubicando al ligando en la zona cuántica para obtener el valor de $E_{\text{LUMO-lig-ONIOM}}$.

3.7 Evaluación del efecto de la reorganización de carga ligando-LBD sobre la estructura de los complejos (cálculos cuánticos y QM/MM ONIOM)

A efectos de evaluar si se dan fenómenos de reorganización de carga importantes en la interacción nitroalqueno-receptor (transferencias protónicas y/o electrónicas no descritas en la representación clásica de cada complejo utilizada en la mayor parte de este estudio) se optimizó la estructura de los complejos de OAN9 y AN15 con 1FM6, eligiéndose estas especies por ser aquéllas que presentan mayor modificación en su orientación luego de la minimización clásica del complejo con 1FM6 obtenido por *docking*. Se utilizó el método ONIOM(DFT:AMBER) con *embedding* mecánico, describiendo cada ligando y los residuos del LBD con los que pueden estar formando EdH al nivel M06/6-31+G(d,p)^{64,65} y al resto de la proteína con el campo de fuerza AMBER *parm96*⁷⁹ tal como se halla implementado en el paquete Gaussian09⁶⁹ usando la misma parametrización para los ligandos que para los cálculos ONIOM descriptos en 3.6. En la optimización del complejo OAN9-1FM6 la región cuántica incluyó al ligando y a los residuos Arg288, Tyr327, Lys367 e His449, mientras que en el complejo AN15-1FM6 la misma comprendió al ligando y los residuos Arg288 y Ser289. En ambos casos se dejaron móviles los residuos de la región clásica a distancia menor de 6 Å de la región cuántica, de tal forma de permitir que esta región tuviera libertad conformacional. Para las optimizaciones se utilizó un algoritmo cuadrático acoplado en combinación con Hessiano aproximado en la exploración de la superficie de energía potencial inicial y posteriormente una combinación de algoritmo iterativo con Hessiano analítico permitiendo la verificación de la naturaleza de los puntos estacionarios.

La comparación de las estructuras así obtenidas con las caracterizadas en 3.4 por minimización clásica AMBER (tomadas como punto de partida para estas minimizaciones ONIOM QM/MM considerablemente más costosas) permite determinar si ocurren transferencias protónicas y/o electrónicas significativas entre cada par ligando-LBD. A tal fin se comparan parámetros geométricos (superposición de la estructura del LBD en ambas descripciones y las distancias y ángulos de enlace de hidrógeno en la región cuántica) y electrónicos (órdenes de enlace de Wiberg, calculados de la misma forma que se indicara en 3.5, a nivel M06⁶⁴/6-31+G(d,p)⁶⁵).

3.8 Análisis de la flexibilidad del LBD de PPAR γ (1FM6 y 3CWD) en ausencia y presencia del ligando AN15(1FM6)

Partiendo de las estructuras clásicas en solución acuosa obtenidas según 3.2 y 3.4 se realizaron simulaciones de dinámica molecular clásica del LBD de PPAR γ correspondiente a las cristalografías 1FM6 y 3CWD en ausencia de ligando y en presencia del nitroalqueno AN15 en complejo con 1FM6 por las razones planteadas en el punto 3.7 y con el fin de comparar los resultados obtenidos con la simulación de dinámica molecular del complejo Rzg-1FM6 realizado por *Gani et al*⁴⁶.

Se utilizó el campo de fuerza AMBER *ff03.r1*⁷⁰ para la descripción de las proteínas y el campo de fuerza *gaff*⁷⁷ y cargas RESP⁷⁸ para la descripción del ligando AN15. Las simulaciones fueron realizadas en solvente explícito, utilizando una caja de aguas discretas descritas con el modelo TIP3P⁷². Se utilizaron condiciones periódicas de contorno con un *cutoff* de 10 Å para las interacciones de largo alcance y se restringieron aquéllos enlaces que involucran átomos de hidrógeno aplicando el algoritmo Shake⁸⁰ reduciendo de esta forma la evaluación del *stretching* de los enlaces. En cada caso se realizó un calentamiento a volumen constante de 0 a 300 K por 200 ps utilizando el termostato de Langevin⁸¹ con una frecuencia de colisión de 1.0 ps⁻¹. Se realizaron dinámicas de producción de 2 ns a presión constante utilizando el baróstato de Berendsen⁸² con un escalado de posicionamiento isotrópico de 1 y a 300 K utilizando el termostato de Langevin con un paso de integración de 2 fs.

Se analizó globalmente la estabilidad (RMSD del *backbone* respecto a la estructura inicial) y las fluctuaciones experimentadas (RMSF) por las estructuras del LBD a lo largo de cada simulación con el fin de evaluar la flexibilidad de residuos aminoacídicos y ligando y la ocupación de los EdHs formados, definidos en base a parámetros estructurales, aplicando los siguientes criterios: distancias de 3.5 Å y ángulos de 120°.

Buscando un mayor nivel de detalle en la descripción de efectos dinámicos, se realizó el seguimiento de la evolución temporal de la distancia entre dos residuos tirosina representativos (**Figura 10**) de la ubicación de las hélices H12 (Tyr473) y H5 (Tyr327) para monitorear el comportamiento de la hélice H12 (cuya posición evidencia las posibles conformaciones activas e inactivas del LBD, estando en el primer caso empaquetada en la interface de las hélices H3, H4 y H10/11⁴⁶) a lo largo de la simulación en ausencia y presencia del ligando y se identificaron moléculas de agua capaces de mediar por EdH las interacciones entre los residuos de estas estructuras.

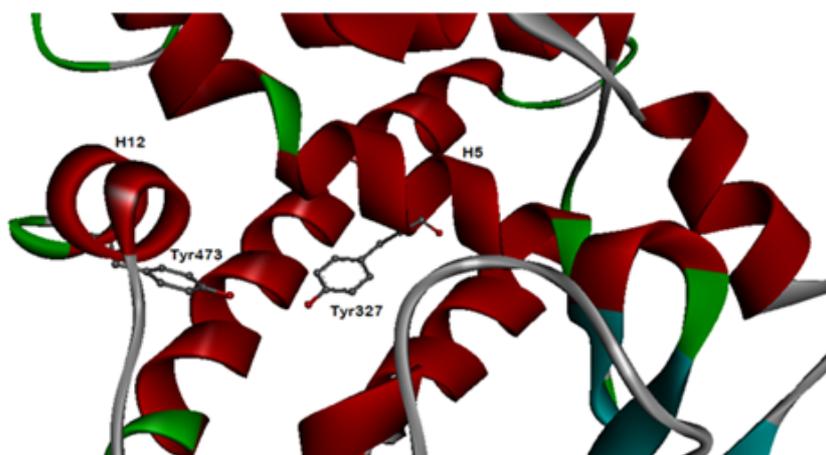


Figura 10: Localización de los residuos Tyr473 y Tyr327 en las hélices H12 y H5, respectivamente.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Influencia de la estructura cristalográfica del LBD de PPAR γ

En la **Figura 11** se aprecia el resultado del análisis de la calidad estereoquímica de las estructuras del LBD representado mediante los gráficos de Ramachandran correspondientes.

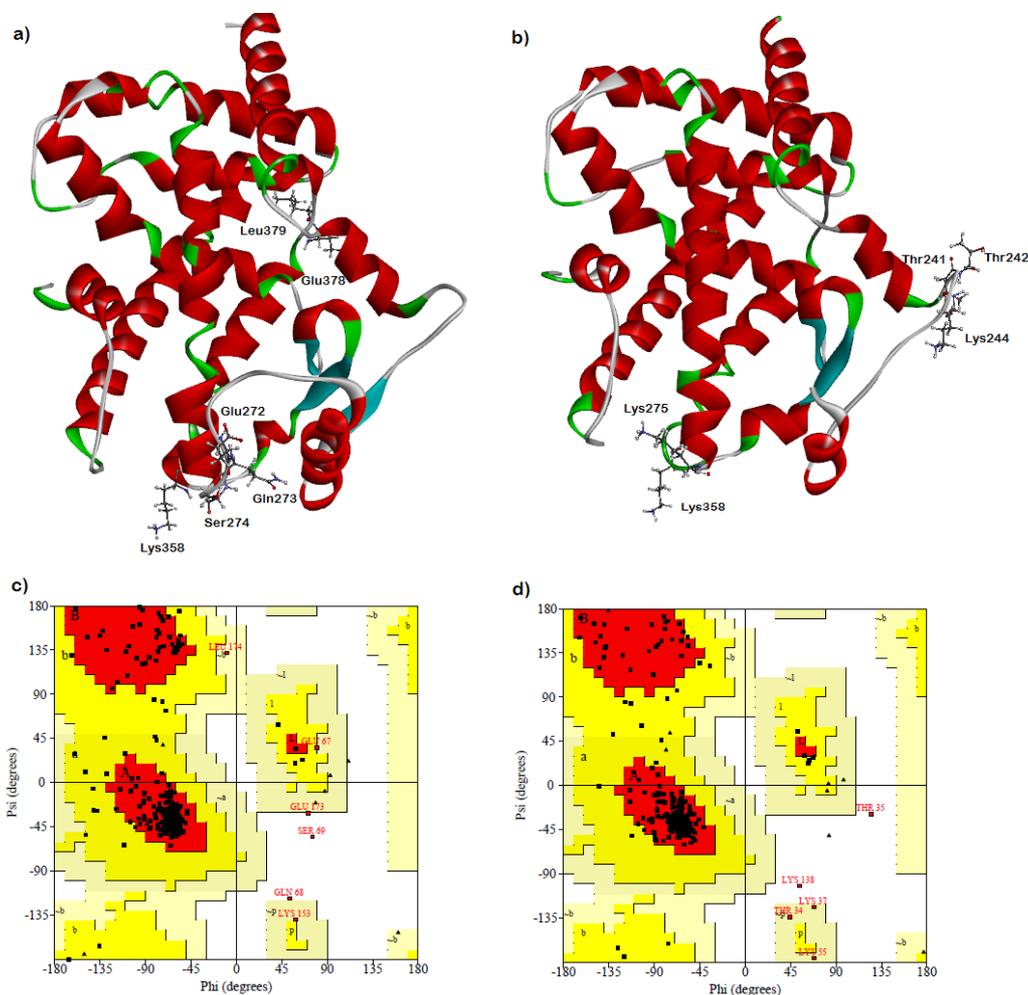


Figura 11: Posición de los residuos que presentan orientaciones desfavorables en el LBD provenientes de las cristalografías con PDBID 1FM6 (a) y 3CWD (b) y los gráficos de Ramachandran correspondientes en (c) y (d).

Se aprecia en los dos casos que el porcentaje de residuos ubicados en orientaciones favorables se halla entre 83% y 91% (valores inicial y final para 1FM6 de 83% y 88% y de 91% y 89% para 3CWD). En el caso de 1FM6, la optimización en solución se traduce en la mejora en la calidad estereoquímica de la estructura, mientras que para 3CWD se da una disminución de la misma en un 2% (valor que no justifica descartar su utilización). El análisis más detallado muestra que los residuos que adoptan orientaciones no favorables pertenecen a *loops* flexibles (evidenciados en la **Figura 11**, (a) y (b)) sin una estructura definida, lo cual permite concluir que se justifica continuar con el análisis estructural comparado entre ambos LBDs, siendo adecuadas las orientaciones de los residuos pertenecientes al bolsillo de unión al ligando.

El RMSD calculado en base a las posiciones de los carbonos C α de 1FM6 y 3CWD es de 1.2 Å. Este indicador global que muestra a ambas estructuras como muy similares entre sí, no permite sin embargo describir cambios en la orientación de los residuos de

ambos LBDs que pueden afectar la formación de los complejos con los distintos ligandos. En la **Figura 12** se aprecia la superposición de ambas estructuras evidenciando aquéllos residuos que presentan variaciones significativas en su orientación, a saber: Gln283 (H3), Cys285 (H3), Gln286 (H3), Glu343 (hojas β), Phe363 (H7) y Met463 (*loop* H12-H10/11).

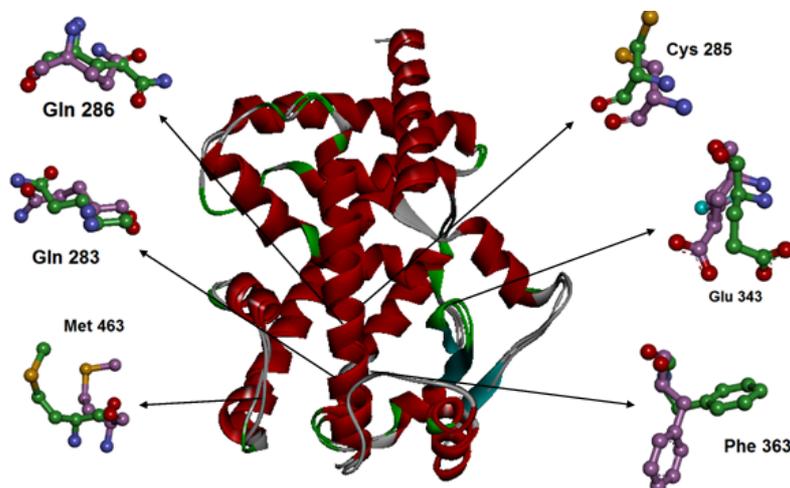


Figura 12: Superposición de la estructura clásica en solución de los LBD de PPAR γ provenientes de las estructuras cristalográficas con PDBID1FM6 y 3CWD. Se evidencian los residuos que presentan diferencias importantes en su orientación entre ambas estructuras.

A partir del análisis del gráfico de RMSD correspondiente a 1FM6 y 3CWD (**Figura 13b**) se observa que ambas estructuras se encuentran estabilizadas en forma global luego de 1.25 ns de simulación, experimentando variaciones promedio de 2.0 y 1.6 Å, respectivamente. En la misma figura se aprecia el detalle de los residuos que experimentan mayores cambios en cada LBD a partir de la superposición de las estructuras inicial y promedio de cada simulación en las regiones de RMSD estabilizado (**Figuras 13e** y **13f**, respectivamente) y la superposición de las estructuras promedio obtenidas para ambas estructuras de LBD (**Figura 13a**) que difieren en un RMSD de 2.1 Å.

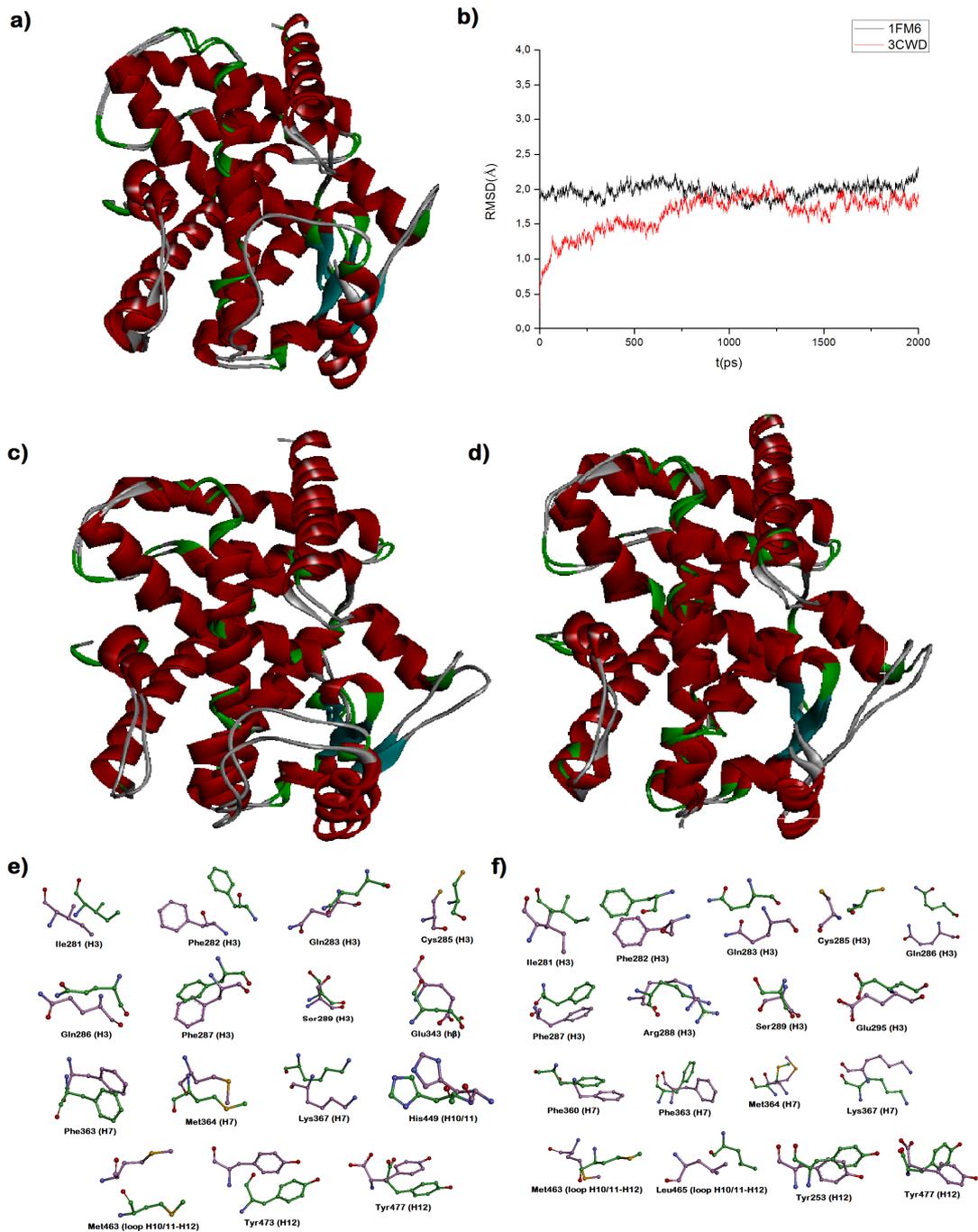


Figura 13. Comparación de la evolución de las estructuras de los LBD 1FM6 y 3CWD en ausencia de ligando luego de 2 ns de simulación MD. (a) superposición de las estructuras promedio de ambos LBDs. (b) RMSD de los C_{α} respecto a la estructura inicial. (c) superposición de la estructura inicial y promedio de la simulación para 1FM6. (d) idem para 3CWD. (e) residuos que presentan mayores variaciones en su orientación correspondiente a la superposición de 1FM6. (f) idem para 3CWD.

A partir del gráfico de RMSF mostrado en la **Figura 14a**, se aprecia que entre las regiones que experimentan mayor variación en la orientación de sus residuos se incluyen las correspondientes al *loop* ubicado entre las hélices H9 y H10/11 en 1FM6 y a la región cercana a las hojas β en 3CWD. También se observa que en la comparación 1FM6-3CWD los residuos del LBD con mayor diferencia en su orientación, aparecen como mucho más flexibles en la estructura 3CWD, en particular los residuos Cys285, Gln286, Arg288 y Ser289 ubicados en la zona de la hélice H3 que forman el brazo polar del bolsillo del ligando, particularmente relevantes en la unión a ligandos de la familia de los nitroalquenos. Luego de la dinámica molecular, se observa que se vuelven más notorias las diferencias en la orientación de los residuos que mostraban mayores variaciones entre las estructuras 1FM6 y 3CWD luego de la minimización energética (ver **Figura 12** y **Figura 14b**).

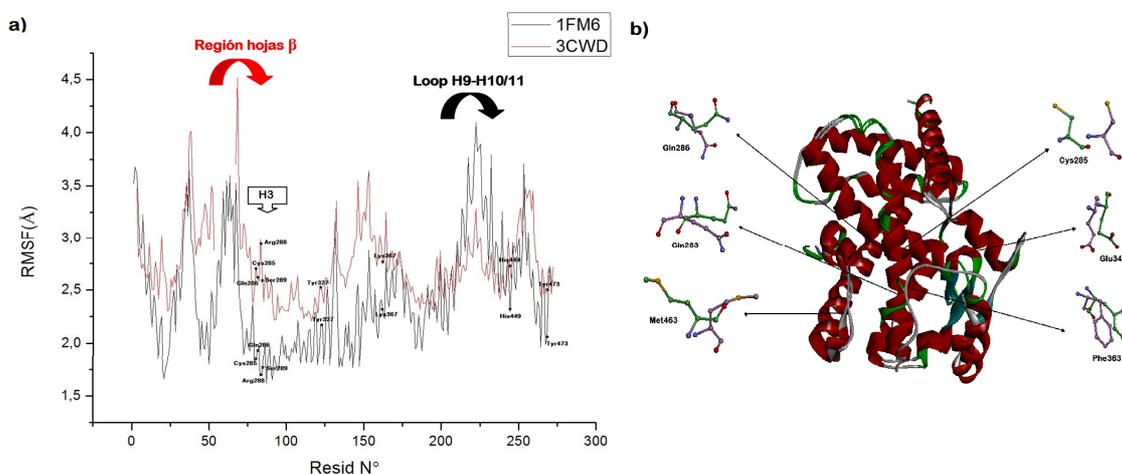


Figura 14. (a) Comparación de la flexibilidad por residuo en la estructura del LBD a través del RMSF calculado en el tramo de 1 a 2 ns de producción de MD. Se destacan los residuos relevantes para la unión de los distintos tipos de ligandos (1FM6 en negro y 3CWD en rojo) y en particular los correspondientes a la hélice H3 donde se detectan las mayores diferencias entre ambas estructuras y se ubica el residuo de Cys285 que se maneja forma una unión covalente con algunos nitroalquenos. (b) Superposición de las estructuras 1FM6 y 3CWD promedio de la dinámica molecular luego de la estabilización de las mismas con los residuos que presentaban mayores variaciones en sus orientaciones en las estructuras luego de la minimización energética.

Finalmente, cabe señalar que a lo largo de las simulaciones se detectó la presencia de moléculas de agua que formarían EdHs con los residuos Ser289 en el LBD 1FM6 His449 (2 moléculas de agua involucradas, con distancias promedio de 2.8 y 3.1 Å, respectivamente) y con Tyr327 en el LBD 3CWD (1 molécula de agua involucrada, distancia promedio de 2.9 Å) (ver **Figura 15**). En base a estos resultados, de cara a futuros estudios de complejos con estos LBD sería necesario considerar la presencia de moléculas de agua en las estructuras de partida, en tanto pueden interferir con la ubicación de ligandos y la formación de EdHs ligando-PPAR γ .

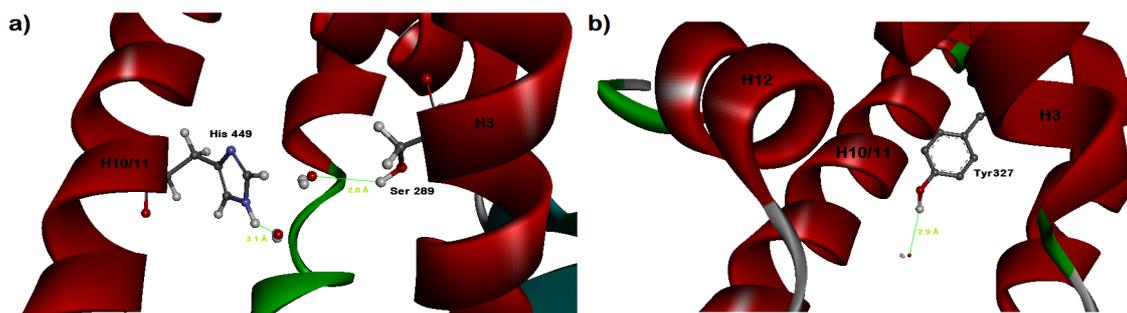


Figura 15: Moléculas de agua que establecerían EdH con residuos del bolsillo de unión a lo largo de las dinámicas moleculares de (a) 1FM6 y (b) 3CWD.

En forma preliminar, se puede concluir que la estructura de partida usada para el estudio de la interacción ligando-LBD puede llegar a incidir significativamente en su descripción, en virtud de los cambios estructurales inducidos por la presencia de diferentes ligandos (nitrolinoleatos para 3CWD y Rzg para 1FM6), que afectan tanto la orientación predominante de los residuos relevantes del LBD, como su flexibilidad. De allí que se definiera continuar en la siguiente etapa de este estudio (caracterización de las interacciones con técnicas de *docking* molecular) con ambas estructuras de referencia, teniendo especialmente en cuenta que a la hora de caracterizar una posible formación de aductos con el residuo Cys285, la estructura 3CWD parece ser más apropiada para abordarlo en tanto muestra mayor flexibilidad en la orientación del mismo.

4.2 Comparación por *docking* de la interacción de los ligandos con el LBD (3CWD y 1FM6) de PPAR γ

Como ya se mencionó en la sección 3.3, para validar las condiciones de *docking* utilizadas a lo largo de ambas series de complejos con los dos LBDs se trabajó con los derivados nitrolinoleicos, buscando hacer coincidir la mejor pose con la disposición observada en la cristalografía 3CWD. Cabe señalar aquí que en tanto este objetivo se logró para el ligando LAN10 (ver **Figura S1** en información suplementaria), en el caso del ligando LAN12 (presente superpuesto en la cristalografía 3CWD) no se logró reproducir por *docking* ninguna disposición similar a la observada en la estructura cristalográfica.

Los *clusters* (agrupamientos por semejanza de las distintas poses obtenidas por *docking* con Autodock) resultantes aplicando las condiciones validadas para LAN10 a todos los sistemas ligando-LBD presentan diferencias notorias en la orientación del ligando. Estas variaciones no están asociadas a energías de unión significativamente diferentes (caen en todos los casos por debajo del error del método, estimado en 2 kcal/mol). Por tanto no se encontró un criterio energético claro para la selección de una orientación específica de los ligandos dentro de cada bolsillo de unión en el receptor. De allí que se definió un criterio estructural, consistente en extraer para la comparación detallada aquellas estructuras donde la orientación del nitroalqueno es la más similar a la que se observa en la cristalografía 3CWD, esto es, con el grupo carboxilo orientado hacia la región de la hélice H12 y el grupo nitro hacia la hélice H5.

Como se aprecia en la parte inferior de la **Figura 16**, las diferencias en los valores de energía libre de unión ($\Delta G_{\text{unión}}$) obtenidos para las dos series de complejos ligando-

receptor establecidos con los LBD provenientes de 1FM6 y 3CWD se encuentran dentro del error del método (2 Kcal/mol). Los valores de esta magnitud no parecen correlacionar con los patrones conocidos de capacidad activadora de los derivados nitro-oleatos (se ha reportado que OAN9 ejercería una mayor activación respecto al regioisómero OAN10 en complejo con el mismo LBD, sea éste 1FM6 o 3CWD) y nitrolinoleicos (de los cuales LAN12 sería el que exhibe mayor capacidad activadora ⁵², siendo a su vez más potente que cualquiera de los OANO₂).

En cuanto a los valores de K_d , al comparar los datos mostrados en la **Figura 16** (e incluidos con su detalle numérico en la información suplementaria como **Tabla S3**) para el par de complejos formados por cada ligando con los LBDs 1FM6 y 3CWD, se observa que esta última serie presenta por lo general un menor valor de K_d . En las series OA y LA, los ácidos grasos oleico y linoleico sin nitrar muestran valores de K_d superiores a los correspondientes a sus derivados nitrados, mientras que en la serie del araquidónico AA, no se cumple este patrón. Para los complejos con Rzg se observa menor K_d respecto a las especies restantes, comportamiento que es de esperar debido a su mayor capacidad activadora. Al evaluar el uso de las K_d como potencial predictor de la mayor capacidad activadora conocida de los ligandos nitrados OAN9 y LAN12 dentro de su serie y entre ellos, en ninguna de las dos series con los LBDs 3CWD y 1FM6 se logra describir correctamente las observaciones, algo que podría atribuirse a la incapacidad de estos estudios (que se basan en una descripción rígida del LBD) de reflejar las flexibilidad del sitio de unión al ligando y la eventual formación de aductos con Cys285 reportada *in vitro* ⁵⁶.

Es por esto que los resultados obtenidos de energía libre de unión y K_d a partir del *docking* molecular de los complejos no permiten una predicción confiable de la capacidad activadora diferencial de los ligandos en estudio, para lo cual se requiere entonces una descripción más sofisticada de los sistemas la cual será presentada en las siguientes secciones.

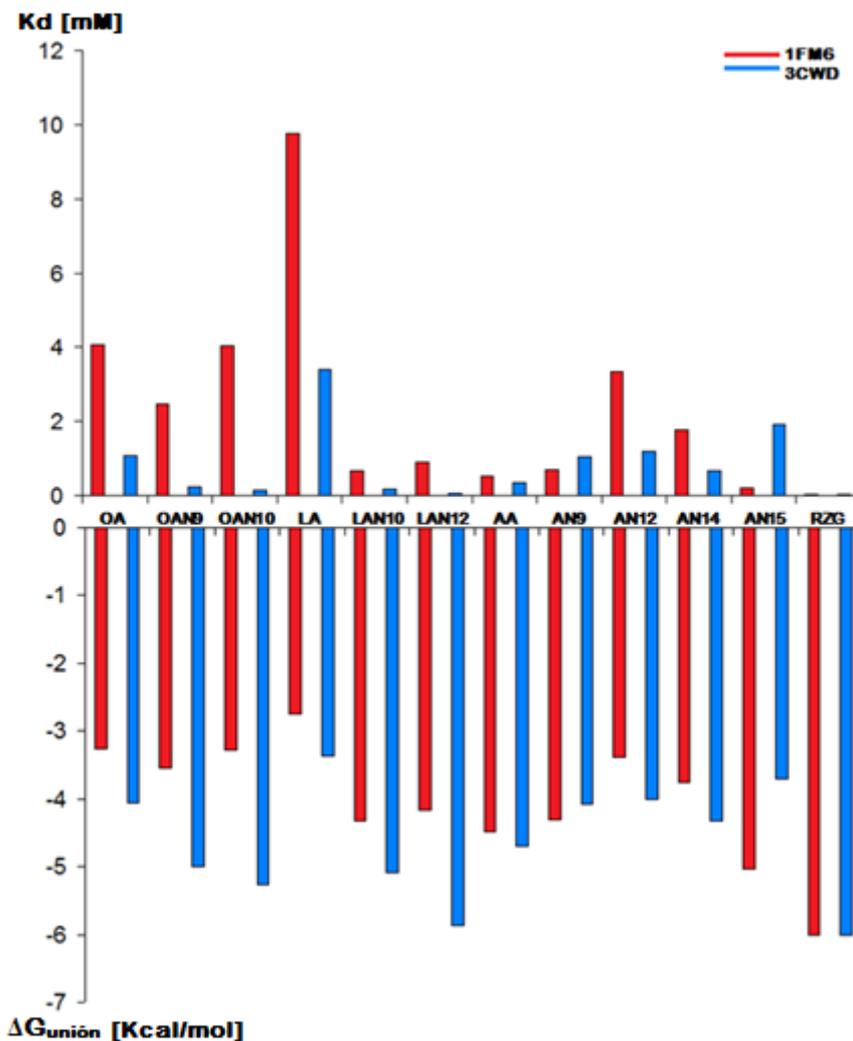


Figura 16: Energías libres de unión (ΔG_{uni3n} en kcal/mol) y K_d (mM) obtenidas con Autodock 4.2 a partir del *docking* ligando-receptor de OA, LA, AA, OANO₂, LNO₂, AANO₂ y Rosiglitazona (Rzg) en 1FM6 (resultados en rojo) y 3CWD (resultado en azul).

4.3 Análisis de los complejos ligando-LBD clásicos: estructura, red de EdH y estabilidad

De la minimización clásica de los complejos ligando-receptor obtenidos por *docking* molecular surge en primer lugar que no se aprecian variaciones globales significativas en el receptor, lo cual es evidenciado por el valor del RMSD calculado en base a las posiciones de los carbonos C α para las nuevas estructuras respecto a las de partida, experimentando cambios < 2 Å (ver **Tabla S4**). Sin embargo, al examinar la situación en mayor detalle, se aprecian variaciones en la orientación de los ligandos en los LBDs, que para la mayoría de los ácidos grasos y derivados nitrados, son mucho más notorias en la región del grupo carboxilato y su entorno (ver **Figura 17**).

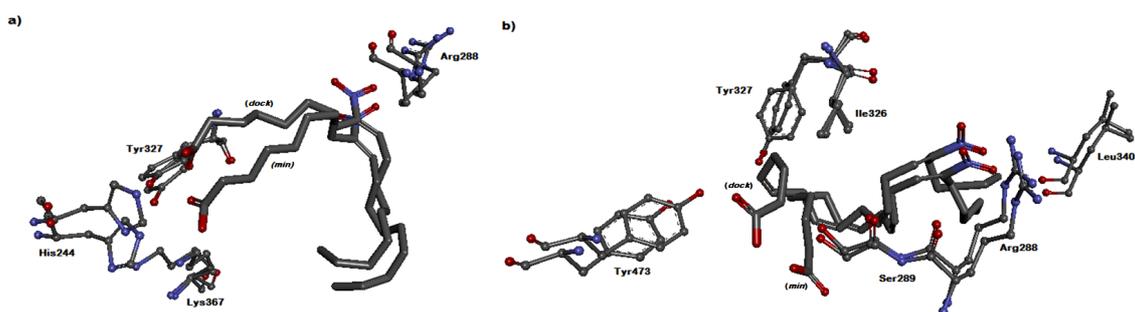


Figura 17: Comparación de la orientación de ligandos (a) OAN9 y (b) AN15 en 1FM6 tomados como representativos de la variación estructural en complejos modelados por docking ligando-receptor (dock) y minimización clásica (min).

La orientación que adquieren los ácidos grasos sin nitrar en 3CWD es muy similar (ver **Figura 18a**), ocupando sus cabezas polares la región de Arm 3 y sus cadenas hidrocarbonadas la correspondiente a Arm 1, siendo esta orientación consistente con las características polares de ambas regiones (ver **Figura 5**). Al comparar las orientaciones de Rzg en 3CWD y la proveniente de la cristalografía con 1FM6 (ver **Figura 18b**) se observan diferencias en cuanto a la orientación de la región que contiene al grupo piridina, mientras que el anillo tiazolidina se aloja en la región correspondiente al Arm 3 en ambos casos. En las **Figuras 19 y 20** se aprecia la disposición de los distintos nitroalquenos en las estructuras de los complejos clásicos formados con los LBDs 3CWD y 1FM6. En tanto la disposición de los ligandos nitrados miembros de las series OA y LA en el LBD más flexible de 3CWD es semejante dentro de cada serie (**Figura 19**) se aprecian mayores diferencias entre ellos en sus interacciones con el LBD de 1FM6, que tiene menor posibilidad de adaptarse al ligando dada su mayor rigidez (**Figura 20**). En base a la disposición de los nitroalquenos en los complejos con 3CWD, podría aventurarse que la disposición de los derivados nitroaraquidónicos asemeja a la característica de los activadores parciales, ocupando la región entre la hélice H3 y las hojas beta.

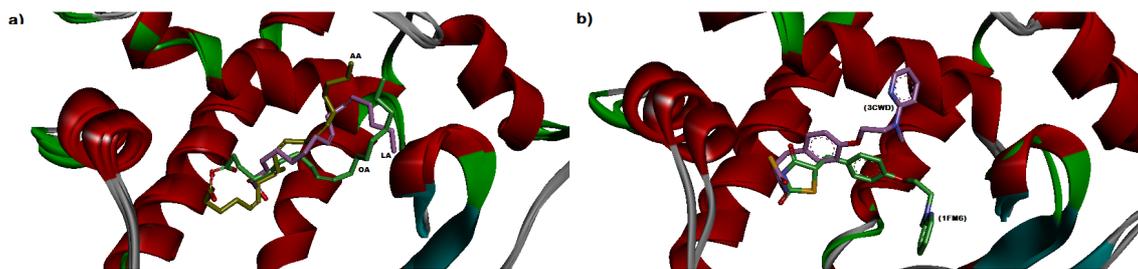


Figura 18: Orientación de los ácidos grasos sin nitrar en PDBID:3CWD (a) y de Rzg en 3CWD y en el complejo obtenido por cristalografía con 1FM6.

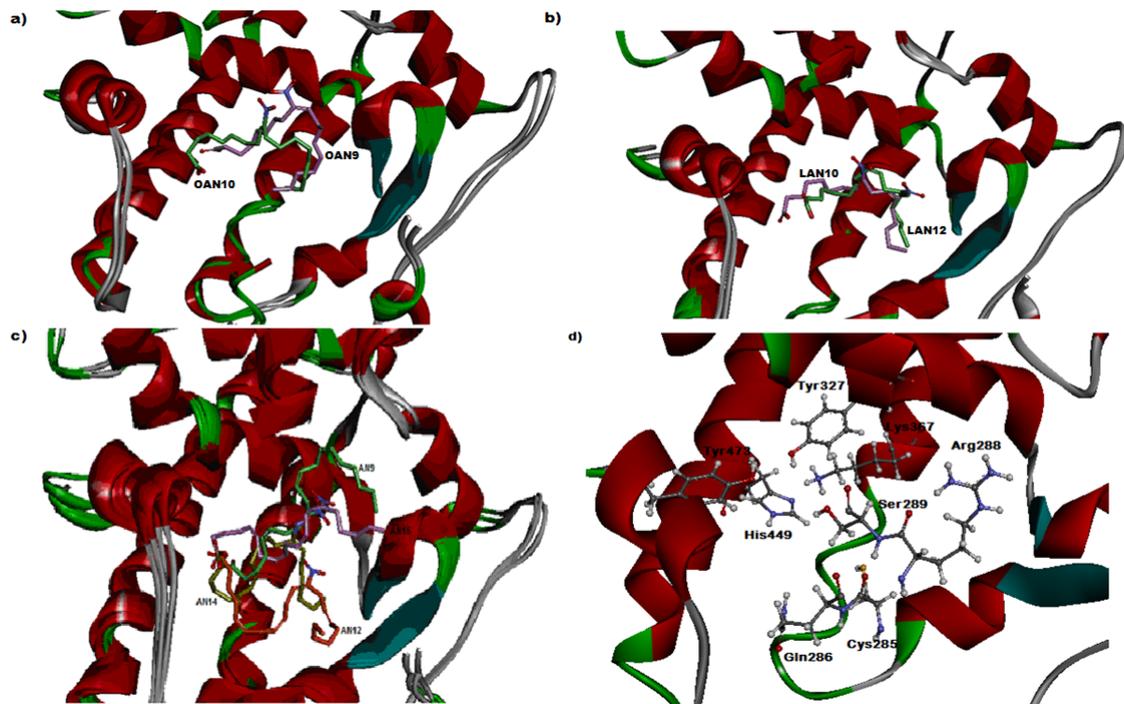


Figura 19: Orientación de ligandos y residuos proteicos del bolsillo correspondiente en los complejos con el LBD de PPAR γ 3CWD. (a) OAN9 y OAN10 respectivamente en lila y verde; (b) LAN10 y LAN12, respectivamente en lila y verde; (c) AN9, AN12, AN14 y AN15, respectivamente en verde, naranja, amarillo y lila; (d) disposición de los residuos de H12, H5 y H3 que establecen EdH con los nitroalquenos en 3CWD.

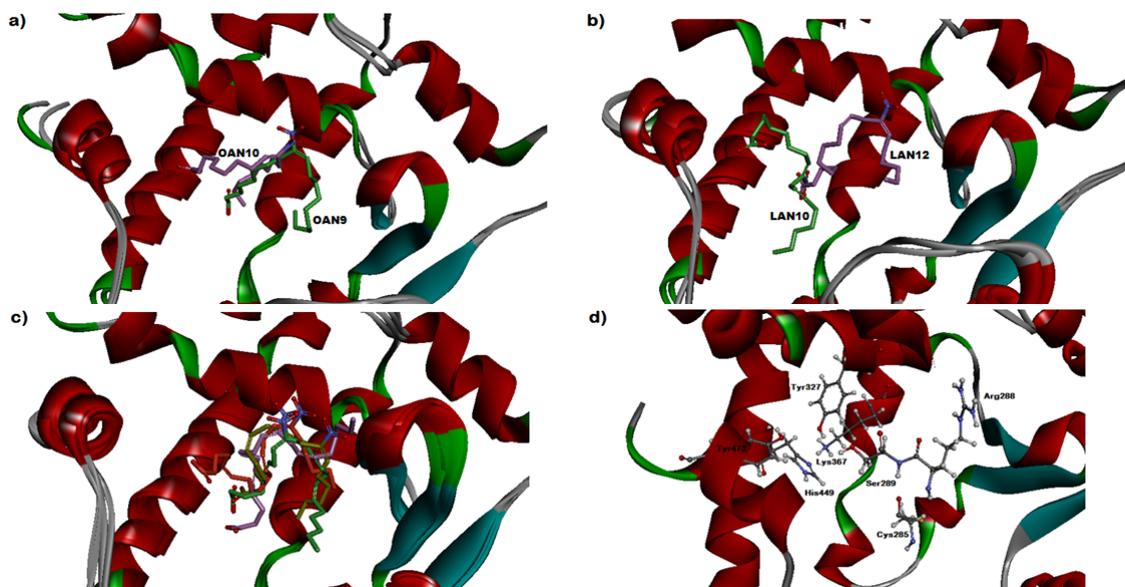


Figura 20: Orientación de ligandos y residuos proteicos del bolsillo correspondiente en los complejos con el LBD de PPAR γ 1FM6. (a) OAN9 y OAN10 respectivamente en verde y lila; (b) LAN10 y LAN12, respectivamente en verde y lila; (c) AN9, AN12, AN14 y AN15, respectivamente en verde, lila, amarillo y naranja; (d) disposición de residuos de H12, H5 y H3 que establecen EdH con los nitroalquenos en 1FM6.

En las **Figuras 21-23** se muestra el análisis comparado de la naturaleza y fuerza de la red de EdH establecida entre miembros de cada familia de ácidos grasos y PPAR γ (1FM6 y 3CWD). La fuerza de estas interacciones se caracterizó en base a los órdenes de enlace de Wiberg (expresados en u.a.) obtenidos a nivel IEF-PCM/M06/6-31+G(d,p) sobre recortes del sitio de interacción como los mostrados en la **Figura S2** (ver datos numéricos en **Tablas S5-S7**).

Una propiedad de la red de EdH ligando-receptor que difiere de manera casi uniforme según la estructura del LBD es el valor de máximo orden de enlace (OE) en los EdHs. Este valor es también modulado por la posición del grupo nitro y la longitud de la cadena hidrofóbica del ácido graso insaturado, en consistencia con los datos experimentales disponibles ⁵². En términos generales los ligandos establecen EdHs más fuertes con el LBD 1FM6 que con 3CWD en los complejos clásicos, alcanzando máximos de OE en el rango 0.08-0.11 u.a. en el primer caso (máximo de 0.05 u.a. de referencia para Rzg-1FM6, ver **Figuras 21-23**) y de 0.06-0.10 u.a. en los complejos ligando-3CWD (máximo de 0.04 u.a. para Rzg-3CWD, ver **Figuras 21-23**). Se observaron sólo tres excepciones a este comportamiento correspondientes a LAN12, AA y AN14, cuyos máximos OE en los EdHs formados con 3CWD superan las 0.10 u.a. y son mayores que en la correspondiente interacción con 1FM6. En cualquier caso, no parece ser éste el elemento diferencial capaz de explicar la actividad relativa conocida de varios de estos compuestos como activadores de PPAR γ .

En cuanto al número de EdHs, en la **Figura 21** se observa que OAN9, el regioisómero de OANO₂ con mayor capacidad activadora de PPAR γ dentro de esta serie ⁵¹, establece un mayor número de EdHs con residuos de las α -hélices H3 (R288-NO₂), H5 (Y327-CO₂), H7 (K367-CO₂) y H10/11 (H449-CO₂) para ambos LBDs. A su vez, es este regioisómero el único que establece EdH entre su grupo nitro y el residuo Arg288 en ambos casos.

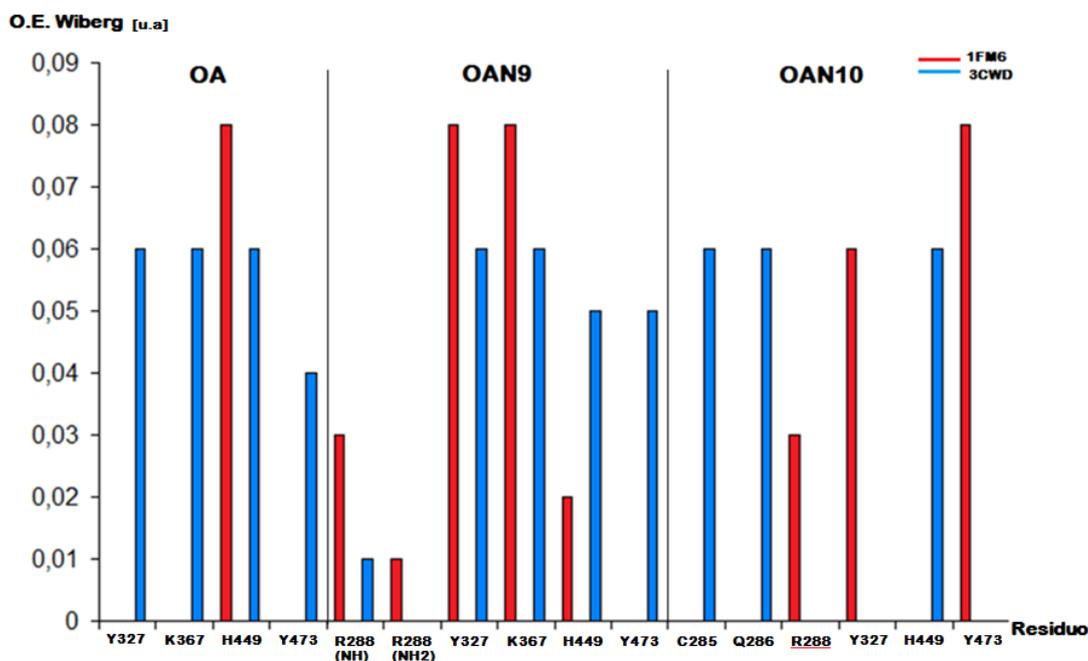


Figura 21: Cantidad y fuerza de EdHs (en términos de órdenes de enlace) en la interacción entre OA/OAN9/OAN10 y residuos del sitio de unión en 1FM6 (rojo)/3CWD (azul). En el eje horizontal se señalan subrayados en rojo los residuos que corresponden a interacciones de EdH con el grupo nitro.

En forma similar, en la **Figura 22** se observa que LAN12, el regioisómero de la serie LANO₂ con mayor capacidad activadora de PPAR γ , es quien establece mayor número de EdHs con residuos del LBD. En el caso de 1FM6, los EdHs involucran a residuos en las α -hélices H3 (R288-NO₂), H5 (Y327-NO₂), H7 (K367-CO₂) y H10/11 (H449-CO₂), mientras que en el caso de 3CWD, involucran a residuos en H3 (C285-CO₂, Q286-CO₂, S289-CO₂) e interacciones entre el grupo nitro y el *backbone* de Ser122 (perteneciente a las hojas β). En contraste con la comparación interna a la serie OA, la máxima fuerza de los EdHs aparece aquí como un elemento diferencial distintivo de LAN12-3CWD (reforzado por la formación de EdH con Cys285-3CWD). La intensidad del EdH formado con el residuo Ser289 es superior en relación a la serie OA-3CWD. Esto también se aprecia para el complejo LAN10-1FM6. Esto refleja el comportamiento descrito sobre la capacidad activadora relativa de OAN9, OAN10 y LAN12.

Finalmente, dentro de la serie AA (**Figura 23**), AN12 es la especie con mayor cantidad de EdHs en los complejos con 3CWD (AN9 ocupa esa posición en los complejos con 1FM6) siendo el compuesto con disposición más cercana a la región de hojas β , característica típica del mecanismo de acción de los activadores parciales. AA, AN14 y AN15 presentan, en orden de fuerza decreciente, los EdHs más fuertes de esta serie. AA establece solo dos EdH en 3CWD de fuerza importante con Gln286 y Ser289.

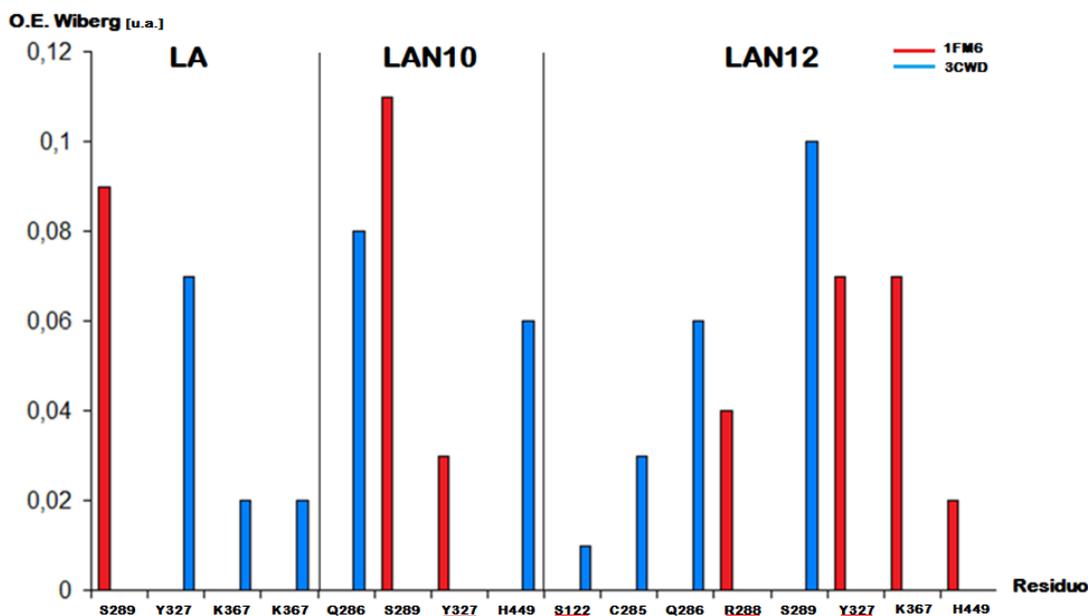


Figura 22: Cantidad y fuerza de EdHs (en términos de órdenes de enlace) en la interacción entre LA/ LAN10/LAN12 y residuos del sitio de unión en 1FM6 (rojo)/3CWD (azul). En el eje horizontal se señalan subrayados en rojo los residuos que corresponden a interacciones de EdH con el grupo nitro.

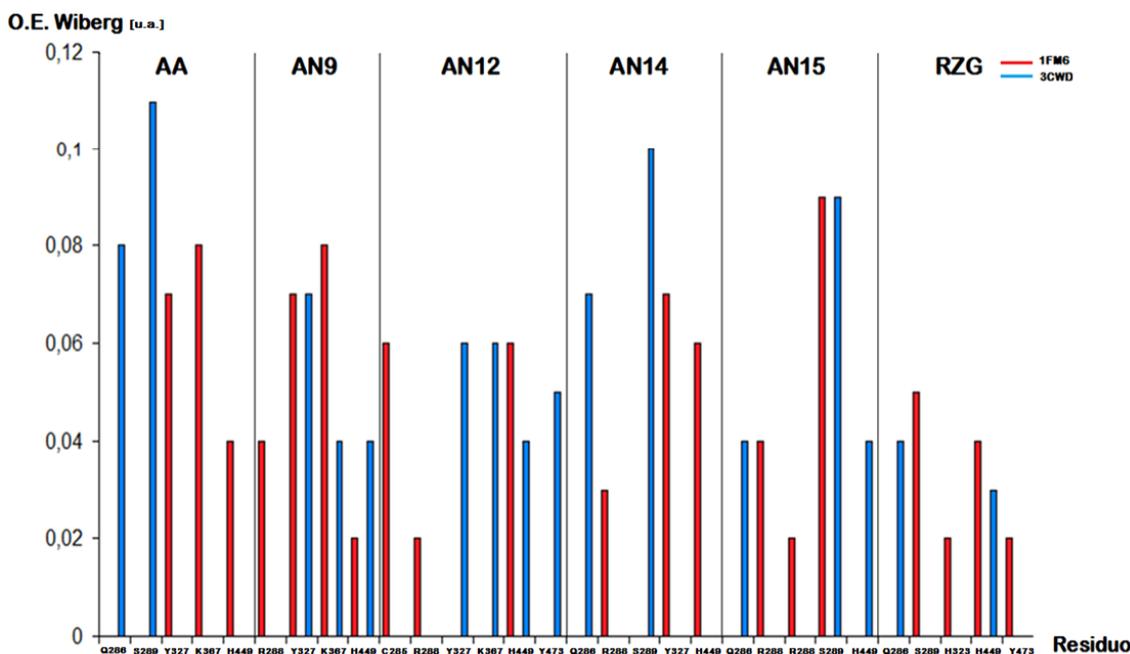


Figura 23: Cantidad y fuerza de EdHs (en términos de órdenes de enlace) en la interacción entre AA/ AN9/AN12/AN14/AN15/RZG y residuos del sitio de unión en 1FM6 (rojo)/3CWD (azul). En el eje horizontal se señalan subrayados en rojo los residuos que corresponden a interacciones de EdH con el grupo nitro.

En lo que respecta a los ácidos grasos sin nitrar, OA y LA establecen menos EdH que sus derivados nitrados en los complejos con 1FM6 y 3CWD. Sin embargo, este comportamiento no es el mismo para AA, ya que si bien establece menos EdH con 1FM6 que los derivados nitroaraquidónicos las fuerzas de los mismos son importantes (0.07 y 0.11 u.a. con Tyr327 y Ser289, respectivamente).

En cuanto a la Rzg, de acuerdo a los modelos empleados la misma forma una red más amplia de EdHs en complejo con 1FM6, sin ser de fuerza mayor al resto, como se esperaría en caso de ser éste el factor determinante de la capacidad activadora que se destaca sobre los restantes ligandos en las que ha sido determinada experimentalmente⁵². Un elemento en común entre los complejos de 1FM6 con Rzg y los dos nitroalquenos de mayor capacidad activadora (OAN9 y LAN12) es la formación de un EdH con His449. Esta interacción también se encuentra en los complejos de AN9, AN12 y AN14 con 1FM6.

Una forma más completa de evaluar la estabilización que confiere la interacción de cada ligando con todos los residuos implicados del LBD consiste en determinar las energías de formación de los complejos de acuerdo al protocolo establecido en la sección 3.6. En este caso no solamente se contempla el efecto de la formación de EdHs con grupos polares, sino también el resultado de interacciones iónicas e hidrofóbicas estabilizantes que suelen darse en los brazos cortos del bolsillo del ligando. Dado el mayor costo de estos estudios (basados en el uso de la estrategia ONIOM QM/MM) y que el LBD 3CWD muestra una flexibilidad mayor para acomodar a los distintos nitroalquenos en una forma que correlaciona mejor con la actividad conocida para algunos de ellos, los cálculos fueron aplicados únicamente al LBD 3CWD y los resultados se recogen en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Energías de formación de los complejos a nivel ONIOM(M06:AMBER)

| | OA | OAN9 | OAN10 | LA | LAN10 | LAN12 | AA | AN9 | AN12 | AN14 | AN15 | Rzg |
|--------------------------------------|-----|-------------|------------|-----|-------|------------|------|-----|------|------|------|-------------|
| $E_{\text{formación}}$ [Kcal/mol] | -62 | -138 | -29 | -95 | -10 | -30 | -173 | -98 | -159 | -31 | -164 | -265 |

*En rojo se destacan los valores correspondientes a las series donde se cuenta con información experimental de la capacidad activadora.

Como se puede apreciar, el activador total Rzg presenta el valor absoluto mayor para esta propiedad y el ordenamiento interno en estabilidad dentro de las familias de OANO₂ y LANO₂ también correlaciona correctamente con la actividad relativa reportada para los miembros de cada familia. No obstante ello, un aspecto que no se contempla en estas energías de formación para las interacciones ligando-receptor, es la eventual transformación química por formación de aductos con Cys285, aspecto que ha sido reportado para los derivados nitrolinoleicos⁵⁶ y que se explora con los resultados expuestos en la siguiente sección pudiendo ser el elemento que explicaría porqué no se describe correctamente la capacidad activadora relativa entre las series OANO₂ y LANO₂ reportado en la bibliografía y de las series OANO₂ y AANO₂ según resultados aún no publicados desarrollados en la Cátedra de Inmunología, F. Ciencias, U. de la R. utilizando la medición de la expresión de CD36 como reportero de PPAR en monocitos THP-1*. Por otra parte, la potencia activadora de los ácidos grasos sin nitrar de cada serie no es tampoco correctamente descrita con esta propiedad.

4.4 Evaluación de la tendencia de los nitroalquenos a formar aductos con Cys285

En la **Tabla 3** se aprecia el valor de la distancia entre el átomo S de Cys285-3CWD y C_β al grupo -NO₂ en cada nitroalqueno.

Tabla 3: Parámetros geométricos ($D_{\text{Cys285}-\text{C}_\beta\text{-Nitroalqueno}}$) y Gap Homo-Lumo cruzado Cys285-ligando en los complejos en el LBD 3CWD

| | $D_{[\text{S}(\text{Cys285})-\text{C}_\beta(\text{nitroalqueno})]}$ [Å] | $\text{GAP}_{\text{HOMO-Cys285-LUMO-lig}}$ [u.a.] |
|--------------|---|---|
| OAN9 | 5.4 | 0.0465 |
| OAN10 | 4.7 | 0.0309 |
| LAN10 | 4.3 | 0.0381 |
| LAN12 | 2.0* | 0.0167 |
| AN9 | 5.6 | 0.0421 |
| AN12 | 4.2 | 0.0428 |
| AN14 | 4.9 | 0.0427 |
| AN15 | 6.8 | 0.0441 |

*Se establece EdH entre CO₂ y Cys285

En ningún caso parecería que estos átomos se hallen a distancia suficientemente cercana para que se de un ataque nucleofílico del tiolato sobre C_β (todos los valores son mayores de 4 Å) por lo que para poder darse la reacción el sitio de unión debería experimentar algún cambio a nivel local (o más amplio) que permitiera un acercamiento entre los grupos reactivos.

* a) Comunicación personal de María Lamas, Cátedra de Inmunología, F. de Ciencias, U. de la R. b) V. Veroli, M. Lamas, A. Ferreira, E. L. Coitiño. "Modelos de la interacción nitrolípidos-PPARγ: aportes para la comprensión y predicción de su capacidad agonista". II Jornadas de +Biofísica, F. de Ciencias, U. de la R., 21-23 de noviembre de 2013.

Por otro lado, en cuanto al indicador de reactividad se observa un menor gap H-L cruzado para el LNO₂ de mejor capacidad activadora dentro de la familia LA, tendencia que no se cumple en el caso de la serie OA, donde el OAN10 aparece como mucho más reactivo frente a la posible formación del aducto. En cuanto a la serie de nitroaraquidónicos, los mismos aparecen como menos reactivos frente a este tipo de reacción por ataque nucleofílico, siendo el regioisómero AN9 el que muestra mayor tendencia a formar aductos covalentes entre los casos estudiados. Esto induciría a pensar que la formación de aductos covalentes en estos complejos de la serie AA no sería un elemento central impulsor de su capacidad activadora, que probablemente se asocie con las interacciones establecidas con la hélice H3 y los residuos de la hoja β.

4.5 Efectos de reorganización de carga en los complejos OAN9-/AN15-1FM6

Se ha reportado que la polarización de las cargas atómicas del receptor tiene un papel central en la correcta descripción de la fuerza de la red de EdH en complejos entre 1FM6 y Rzg⁴⁹. Como se mostró en la sección 4.3, es en los complejos obtenidos por minimización clásica con AMBER ff03 en solución con este LBD donde aparecen los EdH más fuertes. Aquí se pretende explorar si ante una optimización de geometría QM/MM que contempla la reorganización de carga electrónica y nuclear, la descripción estructural cambia en forma significativa o se mantiene. Visto el costo mayor de estos estudios, se seleccionaron dos casos representativos con EdHs fuertes: los complejos con OAN9 y AN15.

A partir de la comparación de distancias, ángulos y órdenes de enlace de Wiberg obtenidos para los EdH entre OAN9 y AN15 con 1FM6, se observa en la **Tabla 4** que la optimización de geometría QM/MM se traduce en cambios localizados en algunos de ellos. En el complejo con OAN9 el resultado más destacado es la reorientación en el entorno de la cabeza polar carboxilato, que refuerza la interacción con Lys367 (el EdH se acorta 0.2 Å, con incremento notorio en el orden de enlace) y la pérdida del EdH con His449. Se observa además que las distancias y fuerza de EdH permanecen esencialmente incambiadas y un ángulo de la interacción del grupo nitro con Arg288 se cierra significativamente.

Tabla 4: Parámetros geométricos y órdenes de enlace en los complejos entre OAN9/AN15 y 1FM6 antes y después de la optimización de geometría ONIOM.

| Ligando | EdH | Distancia EdH [Å] | | Ángulo EdH [°] | | Orden de enlace Wiberg [a.u.] | |
|---------|--------------------------------|-------------------|-------|----------------|-------|-------------------------------|-------|
| | | AMBER | ONIOM | AMBER | ONIOM | AMBER | ONIOM |
| OAN9 | Arg288-NH1 ⁺ ...ONO | 1.9 | 1.9 | 162 | 160 | 0.04 | 0.05 |
| | Arg288-NH2 ⁺ ...ONO | 2.3 | 2.3 | 141 | 127 | 0.01 | 0.01 |
| | Tyr327-OH ⁺ ...OCO | 1.7 | 1.7 | 169 | 167 | 0.08 | 0.08 |
| | Lys367-NH ⁺ ...OCO | 1.8 | 1.6 | 169 | 169 | 0.09 | 0.14 |
| | His449-NH ⁺ ...OCO | 2.1 | Nf | 127 | Nf | 0.02 | Nf |
| AN15 | Arg288-NH1 ⁺ ...ONO | 1.9 | 1.9 | 174 | 164 | 0.04 | 0.06 |
| | Arg288-NH2 ⁺ ...ONO | 2.3 | 2.6 | 144 | 142 | 0.02 | 0.01 |
| | Ser289-OH ⁺ ...OCO | 1.6 | 1.8 | 161 | 156 | 0.08 | 0.06 |

Nf: no establece EdH

En el complejo con AN15, los cambios pasan por la reducción de los ángulos de EdH y un debilitamiento de la interacción de ambos grupos polares con Arg288 y Ser289. Esta comparación se ve con mayor claridad en términos gráficos en la **Figura 24**.

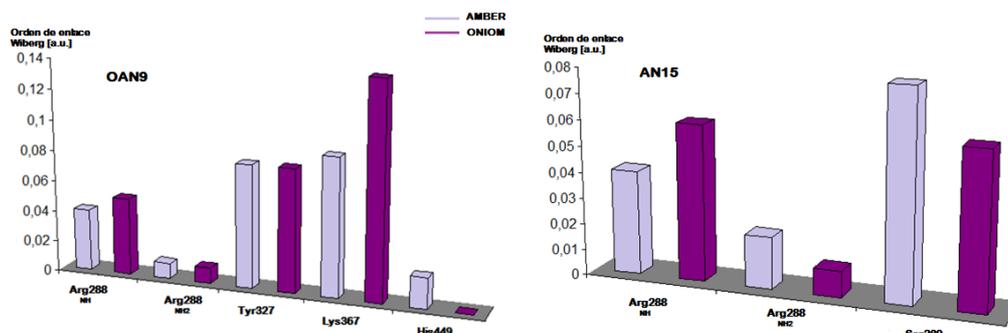


Figura 24: Órdenes de enlace de Wiberg para los EdHs en las estructuras de los complejos de OAN9 y AN15 con 1FM6 antes (AMBER) y después (ONIOM) de la optimización de geometría QM/MM.

En resumen, se puede concluir a partir de esta pequeña muestra, que no se verificaría transferencia protónica entre receptor y ligando. Además, si bien una descripción minuciosa de la red de EdH requeriría un tratamiento QM/MM de la estructura, la caracterización global de dicha red a efectos de buscar patrones que correlacionen con la capacidad activadora de los ligandos no se ve alterada significativamente respecto a la descripción lograda a partir de las estructuras clásicas obtenidas con el campo de fuerza AMBER *ff03*.

4.6 Dinámica molecular del complejo AN15-PPAR γ

Al evaluar el efecto que tiene la presencia de AN15 en la estructura del LBD 1FM6, se observa como el RMSD (calculado en términos de C_{α} respecto a la estructura de partida en la simulación) se estabiliza rápidamente y no experimenta variaciones significativas. Por otro lado, como consecuencia de la presencia del ligando los residuos del receptor experimentan más fluctuaciones en sus orientaciones (**Figura 25**), comportamiento que fue a su vez observado por *Gani et al.* ⁴⁶ en la evolución del RMSF de 1FM6 en presencia de Rgz luego de 20 ns de simulación.

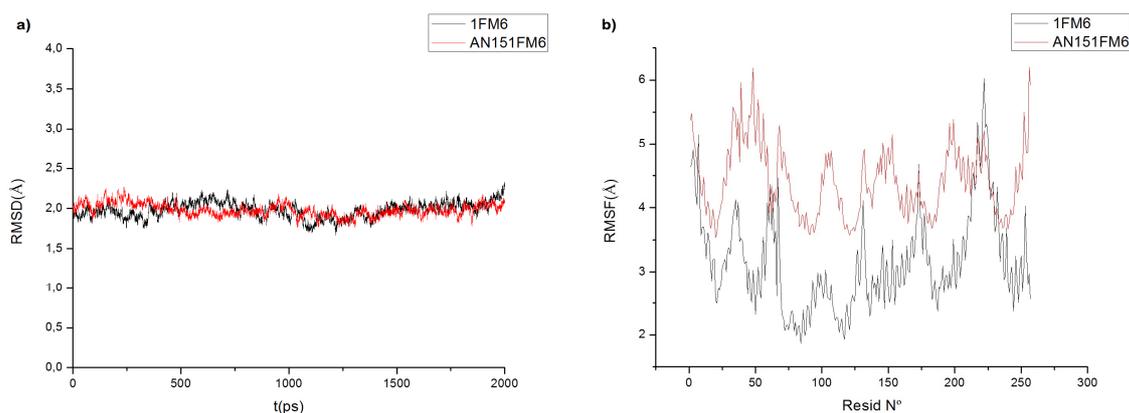


Figura 25: Gráficos de evolución a lo largo de la dinámica de (a) RMSD de C α respecto a la estructura inicial de la dinámica y (b) RMSF C α correspondientes a las dinámicas de 1FM6 en presencia (rojo) y ausencia (negro) de AN15.

En cuanto al comportamiento de la hélice H12 en ausencia y presencia de AN15, la misma no varía notoriamente su posición respecto al bolsillo de unión al ligando, estando en ambos casos a una distancia promedio que ronda los 6Å (**Figura 26**). Estos resultados se encuentran en concordancia con las observaciones de *Gani et al.*⁴⁶ que establecen que tanto en estructuras cristalográficas del LBD de PPAR γ provenientes de complejos con agonistas totales como parciales, se observa que la hélice H12 se encuentra en la disposición correpondiente a la conformación activa (empaquetada en la interfase de las hélices H3, H4 y H10/11). A lo largo de la simulación, el grupo carboxilo del ligando experimenta un acercamiento hacia esta hélice que ronda en los 3.7 Å y un alejamiento de su grupo nitro respecto a la Arg288 de 1.4 Å. Este fenómeno de acercamiento de la cabeza polar del ligando hacia la hélice H12 es también observado en las simulaciones del complejo con Rzg en 1FM6⁴⁶.

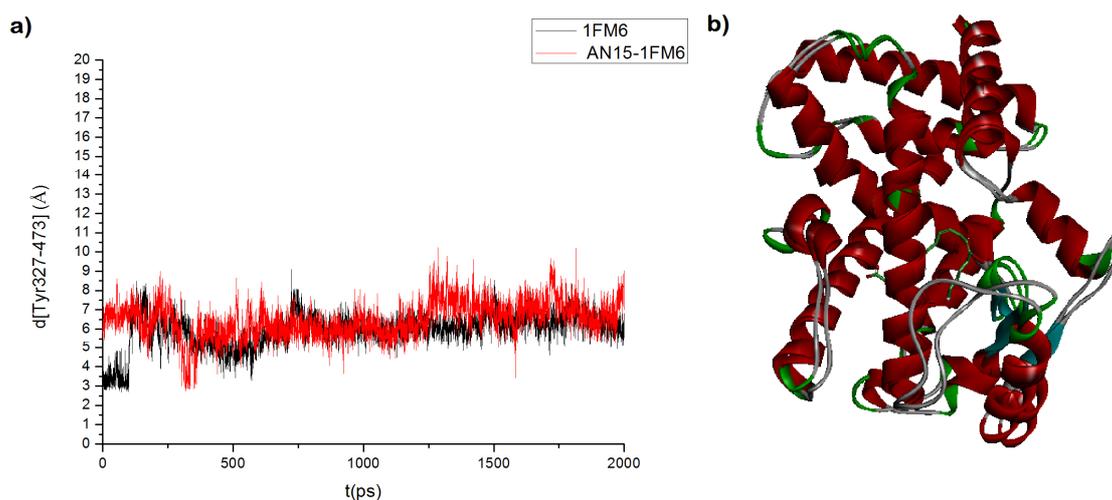


Figura 26: (a) Evolución temporal de la distancia de la hélice H12 respecto al bolsillo de unión al ligando a lo largo del tiempo de simulación de 2 ns. (b) Superposición de las estructuras promedio obtenidas de la simulación de 1FM6 y AN15-1FM6.

En la estructura promedio de la simulación del complejo AN15-1FM6 se observa la presencia de una molécula de agua que participa en lo que es la formación de la red de

EdHs que circundan al grupo carboxílico de AN15 (ver **Figura 27**). Es esta misma agua, la que se encontraría estableciendo un EdH con la cabeza polar del ligando mientras que a su vez se encuentra en una orientación adecuada para establecer otro EdH con Gln286. Por lo tanto, al comparar esta estructura con la obtenida para el LBD sin ligando (ver **Figura 15**), se aprecia que como consecuencia de la entrada del ligando ocurriría un desplazamiento de una de las moléculas de agua que se encontraba en la región del Arm 3 (estableciendo EdH con Ser289) y un desplazamiento de la otra (estableciendo EdH con His449) que es ubicada en las proximidades de Gln286.

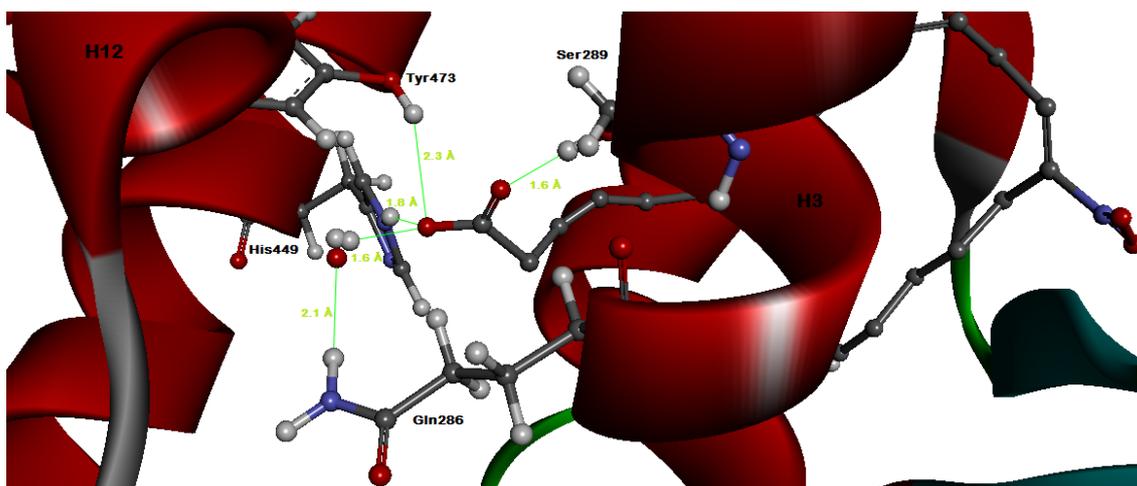


Figura 27: Localización de la molécula de agua presente en la estructura promedio obtenida a partir de la simulación de dinámica molecular del complejo AN15-1FM6 y residuos de bolsillo de unión que se encuentran en las cercanías de la misma y de AN15.

5. CONCLUSIONES

El estudio de los LBD 1FM6 y 3CWD de PPAR γ mostró que si bien en términos globales estas estructuras son muy similares, difieren en la orientación y flexibilidad de los residuos del bolsillo de unión al ligando. Estas diferencias pueden influenciar la orientación que adquieren los ligandos en el LBD, presentando en 3CWD mayor flexibilidad que en 1FM6. A su vez, según la estructura de la proteína considerada, se detectan moléculas de agua que pueden estar participando en la formación de EdH entre distintos residuos (Ser289 e His449 con 1FM6 y Tyr327 con 3CWD) relevantes para la interacción con el ligando. Esto permite concluir que la estructura del LBD tomada como modelo puede condicionar los resultados obtenidos y que la consideración de moléculas de agua en el LBD parece ser necesaria para lograr una buena descripción del sistema. En el único caso en que se exploró la dinámica y flexibilidad del complejo (AN15-1FM6) se concluye que la flexibilidad de los residuos del LBD aumenta en presencia del ligando, el cual se acerca hacia la región de la hélice H12 sin alterar significativamente la posición de la misma y cuya cabeza polar forma EdH con una molécula de agua presente en el LBD.

En cuanto a los valores de energía libre de unión y de K_d obtenidos por *docking* molecular para los complejos formados con 1FM6 y 3CWD, se concluye que a partir de ellos no es posible diferenciar el comportamiento de los distintos ligandos en conexión con su capacidad activadora conocida. Por su parte, la energía de formación de los complejos con 3CWD evaluados a nivel ONIOM-EE sí parece ser un buen predictor de la capacidad activadora relativa dentro de cada serie de derivados nitrados en tanto los nitroalquenos de mayor capacidad conocida presentan valores menores de energía de formación y la Rosiglitazona presenta por lejos la menor energía de formación respecto a todos los restantes ligandos considerados. Sin embargo, los valores obtenidos para LAN12 y OAN9 no permiten explicar la superioridad activadora observada para el primero, debilitando la posibilidad de comparar casos entre series con este predictor, algo que vuelve a reflejarse en la comparación OANO₂ vs. AANO₂. Adicionalmente, la obtención de complejos más estables para OA y LA respecto a algunos de los derivados nitrados de sus respectivas series tampoco es reflejada adecuadamente. En conclusión este predictor debería ser usado con cautela, principalmente para comparar regioisómeros dentro de una misma serie. Dentro de la serie AANO₂ se esperaría entonces el siguiente orden de potencia activadora: AN15 \geq AN12 \gg AN9 \gg AN14.

La orientación adquirida por los nitroalquenos en los bolsillos de 1FM6 y 3CWD corresponde en los resultados obtenidos por minimización clásica al tipo de interacción característica de los activadores parciales, donde el ligando interactúa con los residuos pertenecientes a la hélice H3 y la hoja β . En los complejos con 3CWD todos los nitroalquenos se orientan en el LBD en forma similar dentro de su misma serie. Si bien con el LBD más rígido de 1FM6 este comportamiento se da con los complejos de la serie AANO₂ y no se cumple para los complejos de las otras dos series

La mayor capacidad activadora observada de OAN9 y LAN12 dentro de sus series se pudo correlacionar con la presencia de una red más extendida de EdH ligando-receptor. En forma general, se establecen EdHs más fuertes con 1FM6 respecto a 3CWD. Dentro de la serie de nitroaraquidónicos para los que no está aún determinada con claridad su potencia activadora relativa, AN12 resultaría ser el regioisómero que establece un mayor número de EdHs con 3CWD, mientras que con 1FM6 esto se verifica para el regioisómero AN9. Para la Rgz estudiada como caso claro de referencia de un activador total de PPAR, en tanto la fuerza de los EdHs establecidos no resulta correlacionar con

su potencia, el número de EdHs si lo hace, siendo en su complejo con 1FM6 mayor que en el formado con 3CWD. De aquí que la extensión de la red de EdH parezca ser el elemento estructural ligado a la potencia en términos generales. Estos resultados no parecen modificarse al considerar los efectos de reorganización de carga para los complejos OAN9-/AN15-1FM6 cuya estructura se estudió con modelos QM/MM que permiten considerar eventuales transferencias protónicas ligando-receptor para las que no se halló evidencia. Si bien en las estructuras clásicas minimizadas ninguno de los nitroalquenos considerados se encontraría en una orientación tal que posibilite la formación de aductos covalentes con Cys285, LAN12 seguido de OAN10 serían los dos casos con mayor tendencia a reaccionar, mientras que los derivados AANO₂ serían los menos propensos a ello. Esto indicaría como muy poco probable la activación del receptor por parte de los AANO₂ a través de la formación de aductos covalentes.

En suma, por una parte el análisis de la red de EdH de los complejos obtenidos a nivel clásico parece correlacionar con los datos experimentales tanto en 1FM6 como en 3CWD (explicando a este nivel la mayor capacidad activadora de OAN9 y LAN12). Por otra, las energías de formación de los complejos obtenidas al nivel ONIOM-EE pueden ser utilizadas para anticipar el potencial activador relativo dentro de una misma serie de derivados nitrados de ácidos grasos y eventualmente distinguir entre activadores parciales y totales. No obstante ello, no logran reproducir el ordenamiento entre series diferentes, ni la comparación entre el precursor sin nitrar y sus derivados. A partir de este trabajo ha quedado evidenciada la importancia de la flexibilidad de los residuos del bolsillo de unión a ligandos de PPAR a la hora de evaluar las interacciones con distintos regioisómeros. Esto da una pauta sobre el camino a seguir para modelar adecuadamente este tipo de problemas, el cual debería en los aspectos estructurales incluir el estudio de los complejos a nivel clásico seguido de simulaciones de dinámica molecular que permitan tener en cuenta la flexibilidad a lo largo del tiempo de estos residuos así como también de los ligandos dentro de cada bolsillo y la posibilidad de que las moléculas de agua presentes en el LBD participen en el establecimiento de la red de EdH que se ha mostrado tiene un papel determinante en la capacidad activadora del ligando.

6. REFERENCIAS

- 1-S. Kersten, J. Seydoux, J. M. Peters, F. J. Gonzalez, B. Desvergne, W. Wahli. Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates the adaptive response to fasting. *J. Clin. Invest.*, 103(11):1489-1498, 1999.
- 2-S. Kersten, S. Mandard, P. Escher, F. J. Gonzalez, S. Tafuri, B. Desvergne, W. Wahli. The peroxisome proliferator-activated receptor α regulates amino acid metabolism. *FASEB J.*, 15(11):1971-1978, 2001.
- 3-Y. X. Wang, C. H. Lee, S. Tiep, R. T. Yu, J. Ham, H. Kang, R. M. Evans. Peroxisome proliferator-activated receptor δ activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell*, 113(2):159-170, 2003.
- 4-K. Nadra, S. I. Anghel, E. Joye, N. S. Tan, S. Basu-Modak, D. Trono, W. Wahli, B. Desvergne. Differentiation of trophoblast giant cells and their metabolic functions are dependent on peroxisome proliferator-activated receptor β/δ . *Mol. Cell Biol.*, 26(8):3266-3281, 2006.
- 5-N. S. Tan, L. Michalik, N. Noy, R. Yasmin, C. Pacot, M. Heim, B. Fluhmann, B. Desvergne, W. Wahli. Critical roles of PPAR β/δ in keratinocyte response to inflammation. *Genes Dev.*, 15(24):3263-3277, 2001.
- 6-T. Imai, R. Takakuwa, S. Marchand, E. Dentz, J. M. Bornert, N. Messaddeg, O. Wendling, M. Mark, B. Desvergne, W. Wahli, P. Chambon, D. Metzger. Peroxisome proliferator-activated receptor γ is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(13):4543-4547, 2004.
- 7-E. D. Rosen, P. Sarraf, A. E. Troy, G. Bradwin, K. Moore, D. S. Milstone, B. M. Spiegelman, R. M. Mortensen. PPAR γ is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol. Cell*, 4(4):611-617, 1999.
- 8-D. B. Savage, G. D. Tan, C. L. Acerini, S. A. Jebb, M. Agostini, M. Gurnell, R. L. Williams, A. M. Uempleby, E. L. Thomas, J. D. Bell, A. K. Dixon, F. Dunne, R. Boiani, S. Cinti, A. Vidal-Puig, F. Karpe, V. K. Chatterjee, S. O'Rahilly. Human metabolic syndrome, resulting from dominant-negative mutations in the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Diabetes*, 52(4):910-917, 2003.
- 9-I. Issemann, S. Green. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, 347(6294):645-650, 1990.
- 10-C. Dreyer, G. Krey, H. Keller, F. Givel, G. Helftenbein, W. Wahli. Control of the peroxisomal β -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*, 68(5):879-887, 1992.
- 11-Y. Zhu, K. Alvares, Q. Huang, M. S. Rao, J. K. Reddy. Cloning of a new member of peroxisome proliferator-activated receptor gene family from mouse liver. *J. Biol. Chem.*, 268(36):26817-26820, 1993.
- 12-T. Sher, H. F. Yi, W. McBride, F. J. Gonzalez. cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry*, 32(21):5598-5604, 1993.
- 13-S. A. Kliewer, B. M. Forman, B. Blumberg, E. S. Ong, U. Borgmeyer, D. J. Mangelsdorf, K. Umesono, R. M. Evans. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(15):7355-7359, 1994.
- 14-Y. Guan. Peroxisome proliferator-activated receptor family and its relationship to renal complications of the metabolic syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 15(11):2801-2815, 2004.
- 15-Y. Zhu, C. Qi, J. R. Korenberg, X. N. Chen, D. Noya, S. Rao, J. K. Reddy. Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor γ (mPPAR γ) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR γ isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(17):7921-7925, 1995.
- 16-H. P. Koeffler. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cancers. *Clin. Cancer Res.*, 9(1):1-9, 2003.
- 17-T. Varga, Z. Czimmerer, L. Nagy. PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1812(8):1007-1022, 2011.

- 18-S.** Tyagi, P. Gupta, A. S. Saini, C. Kaushal, S. Sharma. The peroxisome proliferator-activated receptor: a family of nuclear receptors role in various diseases. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.*, 2(4):236-240, 2011.
- 19-Y.** Yu, P. H. Correll, J. P. Vanden Heuvel. Conjugated linoleic acid decreases production of pro-inflammatory products in macrophages: evidence for a PPAR γ -dependent mechanism. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1581(3):89-99, 2002.
- 20-H.** Wang, H. Liu, Z. Jia, G. Guan, T. Yang. Effects of endogenous PPAR agonist nitro-oleic acid on metabolic syndrome in obese Zucker rats. *PPAR Res.*, 2010:1-7, 2010.
- 21-K.** W. Nettles. Insights into PPAR γ from structures with endogenous and covalently bound ligands. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 15(9):893-895, 2008.
- 22-L.** Nagy, P. Tontonoz, J. G. A. Alvarez, H. Chen, R. M. Evans. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR γ . *Cell*, 93(2):229-240, 1998.
- 23-A.** Furukawa, T. Arita, S. Satoh, K. Wakabayashi, S. Hayashi, Y. Matsui, K. Araki, M. Kuroha, J. Ohsumi. Discovery of a novel selective PPAR γ modulator from (-)-Cercosporamide derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20(7):2095-2098, 2010.
- 24-R.** R. V. Malapaka, S. Khoo, J. Zhang, J. H. Choi, X. E. Zhou, Y. Xu, Y. Gong, J. Li, E. Yong, M. J. Chalmers, L. Chang, J. H. Resau, P. R. Griffin, Y. E. Chen, H. E. Xu. Identification and mechanism of 10-carbon fatty acid as modulating ligand of peroxisome proliferator-activated receptors. *J. Biol. Chem.*, 287(1) :183-195, 2012.
- 25-L.** Dubuquoy, C. Rousseaux, X. Thuru, L. Peyrin-Biroulet, O. Romano, P. Chavatte, M. Chamailard, P. Desreumaux. PPAR γ as a new therapeutic target in inflammatory bowel diseases. *Gut*, 55(9) :1341-1349, 2006.
- 26-M.** Ricote, J. Huang, L. Fajas, A. Li, J. Welch, J. Najib, J. L. Witztum, J. Auwerx, W. Palinski, C. K. Glass. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95(13):7614-7619, 1998.
- 27-D.** G. Alleva, E. B. Johnson, F. M. Lio, S. A. Boehme, P. J. Conlon. Regulation of murine macrophage proinflammatory and anti-inflammatory cytokines by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor- γ : counter-regulatory activity by IFN- γ . *J. Leukoc. Biol.*, 71(4):677-685, 2002.
- 28-A.** C. Nicholson. Expression of CD36 in macrophages and atherosclerosis the role of lipid regulation of PPAR γ signaling. *Trends. Cardiovasc. Med.*, 14(1):8-12, 2004.
- 29-A.** Bernardes, F. A. H. Batista, M. Neto, A. C. M. Figueira, P. Webb, D. Saidenberg, M. S. Palma, I. Polikarpov. Low resolution molecular models reveal the oligomeric state of the PPAR and the conformational organization of its domains in solution. *PLoS ONE*, 7(2):1-15, 2012.
- 30-R.** T. Gampe Jr., V. G. Montana, M. H. Lambert, A. B. Miller, R. K. Bledsoe, M. V. Milburn, S. A. Kliewer, T. M. Willson, H. E. Xu. Asymmetry in the PPAR γ /RXR α crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors. *Mol. Cell*, 5(3):545-555, 2000.
- 31-W.** Yang, C. Rachez, L. P. Freedman. Discrete roles for peroxisome proliferator-activated receptor γ and retinoid X receptor in recruiting nuclear receptor coactivators. *Mol. Cell Biol.*, 20(21):8008-8017, 2000.
- 32-J.** L. Oberfield, J. L. Collins, C. P. Holmes, D. M. Goreham, J. P. Cooper, J. E. Cobb, J. M. Lenhard, E. A. Hull-Ryde, C. P. Mohr, S. G. Blanchard, D. J. Parks, L. B. Moore, J. M. Lehmann, K. Plunket, A. B. Miller, M. V. Milburn, S. A. Kliewer, T. M. Willson. A peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand inhibits adipocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96(11):6102-6206, 1999.
- 33-N.** Kuwabara, T. Oyama, D. Tomioka, M. Ohashi, J. Yanagisawa, T. Shimizu, H. Miyachi. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) have multiple binding points that accommodate ligands in various conformations: phenylpropanoic acid-type PPAR ligands bind to PPAR in different conformations, depending on the subtype. *J. Med. Chem.*, 55(2):893-902, 2012.

- 34-R.** T. Nolte, G. B. Wisely, S. Westin, J. E. Cobb, M. H. Lambert, R. Kurokawa, M. G. Rosenfeld, T. M. Willson, C. K. Glass, M. V. Milburn. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Nature*, 395(6698):137-143, 1998.
- 35-M.** Gurnell. 'Striking the right balance' in targeting PPAR γ in the metabolic syndrome: novel insights from human genetic studies. *PPAR Res.*, 2007:1-11, 2007.
- 36-E.** Compe, P. Drané, C. Laurent, K. Diderich, C. Braun, J. H. Hoeijmakers, J. M. Egly. Dysregulation of the peroxisome proliferator-activated receptor target genes by XPD mutations. *Mol. Cell Biol.*, 25(14):6065-6076, 2005.
- 37-I.** Iankova, R. K. Petersen, J. S. Annicotte, C. Chavey, J. B. Hansen, I. Kratchmarova, D. Sarruf, M. Benkirane, K. Kristiansen, L. Fajas. Peroxisome proliferator-activated receptor γ recruits the positive transcription elongation factor b complex to activate transcription and promote adipogenesis. *Mol. Endocrinol.*, 20(7):1494-1505, 2006.
- 38-P.** Cronet, J. F. W. Petersen, R. Folmer, N. Blomberg, K. Sjöblom, U. Karlsson, E. Lindstedt, K. Bamberg. Structure of the PPAR α and - γ ligand binding domain in complex with AZ 242; ligand selectivity and agonist activation in the PPAR family. *Structure*, 9(8):699-706, 2001.
- 39-V.** Chandra, P. Huang, Y. Hamuro, S. Raghuram, Y. Wang, T. P. Burris, F. Rastinejad. Structure of the intact PPAR- γ -RXR- α nuclear receptor complex on DNA. *Nature*, 456(7220):350-356, 2008.
- 40-A.** L. B. Ambrosio, S. M. G. Dias, I. Polikarpov, R. B. Zurier, S. H. Burstein, R. C. Garratt. Ajulemic acid, a synthetic nonpsychoactive cannabinoid acid, bound to the ligand binding domain of the human peroxisome proliferator-activated receptor γ . *J. Biol. Chem.*, 282(25) :18625-18633, 2007.
- 41-M.** V. Liberato, A. S. Nascimento, S. D. Ayers, J. Z. Lin, A. Cvoró, R. L. Silveira, L. Martínez, P. C. T. Souza, D. Saidemberg, T. Deng, A. A. Amato, M. Togashi, W. A. Hsueh, K. Phillips, M. S. Palma, F. A. R. Neves, M. S. Skaf, P. Webb, I. Polikarpov. Medium chain fatty acids are selective peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) γ activators and pan-PPAR partial agonists. *PLoS ONE*, 7(5):1-10, 2012.
- 42-X.** Y. Xu, F. Cheng, J. H. Shen, X. M. Luo, L. L. Chen, L. D. Yue, Y. Du, F. Ye, S. H. Jiang, D. Y. Zhu, H. L. Jiang, K. X. Chen. Agonist-PPAR γ interactions: molecular modeling study with docking approach. *Int. J. Quantum Chem.*, 93(6):405-410, 2003.
- 43-B.** R. P. Kumar, S. Sopna, J. Verghese, B. Desai, M. J. Nanjan. Rigid and flexible Docking Studies on PPAR- γ agonists: key interactions for a better antihyperglycemic activity and in silico pharmacodynamic activity versus experimental in vivo activity. *Med. Chem. Res.*, 21(5):624-633, 2012.
- 44-D.** Vidovic, S. A. Busby, P. R. Griffin, S. C. Schürer. A combined ligand- and structure-based virtual screening protocol identifies submicromolar PPAR γ partial agonists. *Chem. Med. Chem.*, 6(1):94-103, 2011.
- 45-N.** Mahindroo, C. Wang, C. Liao, C. Huang, I. Lu, T. Lien, Y. Peng, W. Huang, Y. Lin, M. Hsu, C. Lin, C. Tsai, J. T. A. Hsu, X. Chen, P. Lyu, Y. Chao, S. Wu, H. Hsieh. Indol-1-yl acetic acids as peroxisome proliferator-activated receptor agonists: design, synthesis, structural biology, and molecular docking studies. *J. Med. Chem.*, 49(3):1212-1216, 2006.
- 46-O.** A. B. S. M. Gani, I. Sylte. Ligand-induced stabilization and activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Chem. Biol. Drug. Des.*, 72(1):50-57, 2008.
- 47-J.** B. Bruning, M. J. Chalmers, S. Prasad, S. A. Busby, T. M. Kamenecka, Y. He, K. W. Nettles, P. R. Griffin. Partial agonists activate PPAR γ using a helix 12 independent mechanism. *Structure*, 15(10):1258-1271, 2007.
- 48-D.** Genest, N. Garnier, A. Arrault, C. Marot, L. Morin-Allory, M. Genest. Ligand-escape pathways from the ligand-binding domain of PPAR γ receptor as probed by molecular dynamics simulations. *Eur. Biophys. J.*, 37(4):369-379, 2008.
- 49-C.** G. Ji, J. Z. H. Zhang. Protein polarization is critical to stabilizing AF-2 and helix-2' domains in ligand binding to PPAR γ . *J. Am. Chem. Soc.*, 130(50):17129-17133, 2008.

- 50-F.** J. Schopfer, Y. Lin, P. R. R. Baker, T. Cui, M. Garcia-Barrio, J. Zhang, K. Chen, Y. E. Chen, B. A. Freeman. Nitrolinoleic acid: an endogenous peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102(7):2340-2345, 2005.
- 51-M.** J. Gorczynski, P. K. Smitherman, T. E. Akiyama, H. B. Wood, J. P. Berger, S. B. King, C. S. Morrow. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ by nitroalkene fatty acids: importance of nitration position and degree of unsaturation. *J. Med. Chem.*, 52(15):4631-4639, 2009.
- 52-R.** L. Alexander, M. W. Wright, M. J. Gorczynski, P. K. Smitherman, T. E. Akiyama, H. B. Wood, J. P. Berger, S. B. King, C. S. Morrow. Differential potencies of naturally occurring regioisomers of nitrolinoleic acid in PPAR γ activation. *Biochemistry*, 48(2):492-498, 2009.
- 53-S.** Borniquel, E. A. Jansson, M. P. Cole, B. A. Freeman, J. O. Lundberg. Nitrated oleic acid up-regulates PPAR γ and attenuates experimental inflammatory bowel disease. *Free. Radic. Biol. Med.*, 48(4):499-505, 2010.
- 54-H.** Rubbo, R. Radi. Protein and lipid nitration: role in redox signaling and injury. *Biochim. Biophys. Acta*, 1780(11):1318-1324, 2008.
- 55-** F. J. Schopfer, P. R. S. Baker, G. Giles, P. Chumley, C. Batthyany, J. Crawford, R. P. Patel, N. Hogg, B. P. Branchaud, J. R. Lancaster Jr., B. A. Freeman. Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: nitrolinoleic acid is a hydrophobically stabilized nitric oxide donor. *J. Biol. Chem.*, 280(19):19289-19297, 2005.
- 56-T.** Itoh, L. Fairall, K. Amin, Y. Inaba, A. Szanto, B. L. Balint, L. Nagy, K. Yamamoto, J. W. R. Schwabe. Structural basis for the activation of PPAR γ by oxidized fatty acids. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 15(9):924-931, 2008.
- 57-T.** Waku, T. Shiraki, T. Oyama, Y. Fujimoto, K. Maebara, N. Kamiya, H. Jingami, K. Morikawa. Structural insight into PPAR γ activation through covalent modification with endogenous fatty acids. *J. Mol. Biol.*, 385(1):188-199, 2009.
- 58-Y.** Li, J. Zhang, F. J. Schopfer, D. Martynowski, M. T. Garcia-Barrio, A. Kovach, K. Suino-Powell, P. R. S. Baker, B. A. Freeman, Y. E. Chen, H. E. Xu. Molecular recognition of nitrated fatty acids by PPAR γ . *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 15(8):865-867, 2008.
- 59-X.** Y. Xu, F. Cheng, J. H. Shen, X. M. Luo, L. L. Chen, L. D. Yue, Y. Du, F. Ye, S. H. Jiang, D. Y. Zhu, H. L. Jiang, K. X. Chen. Agonist-PPAR γ interactions: molecular modeling study with docking approach. *Int. J. Quantum Chem.*, 93(6):405-410, 2003.
- 60-A.** Trostchansky, J. M. Souza, A. Ferreira, M. Ferrari, F. Blanco, M. Trujillo, D. Castro, H. Cerecetto, P. R. S. Baker, V. B. O'Donnell, H. Rubbo. Synthesis, isomer characterization, and anti-inflammatory properties of nitroarachidonate. *Biochemistry*, 46(15):4645-4653, 2007.
- 61-L.** González. M. N. Álvarez, C. Prolo, R. Radi, H. Rubbo, A. Trostchansky. Nitroarachidonic acid prevents NADPH oxidase assembly and superoxide radical production in activated macrophages. *Free Radic. Biol Med.*, 58:126-133, 2013.
- 62-A.** Trostchansky, L. Bonilla, C. P. Thomas, V. B. O'Donnell, L. J. Marnett, R. Radi, H. Rubbo. Nitroarachidonic acid, a novel peroxidase inhibitor of prostaglandin endoperoxide H synthases 1 and 2. *J. Biol. Chem.*, 286(15):12891-12900, 2011.
- 63-P.** Hohenberg, W. Kohn. Inhomogeneous Electron Gas. *Phys. Rev.*, 136(3B):B864-B871, 1964.
- 64-Y.** Zhao, D. G. Truhlar. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theor. Chem. Acc.*, 120:215-241, 2008.
- 65-W.** L. Hehre, R. Ditchfield, J. A. Pople. Self-Consistent molecular orbital methods. XII. Further extensions of Gaussian-Type basis sets for use in molecular orbital studies of organic molecules. *J. Chem. Phys.* 56:2257-2261, 1972.
- 66-E.** Cancès, B. Mennucci, J. Tomasi. A new integral equation formalism for the polarizable continuum model: theoretical background and applications to isotropic and anisotropic dielectrics. *J. Chem. Phys.*, 107(8):3032-3041, 1997.
- 67-J.** Tomasi, B. Mennucci, E. Cancès. The IEF version of the PCM solvation method: an overview of a new method addressed to study molecular solutes at the QM ab initio level. *J. Mol. Struct. (Theochem.)*, 464(1-3):211-226, 1999.

- 68**-A. Bondi. Van der Waals volumes and radii. *J. Phys. Chem.*, 68(3):441-452, 1964.
- 69**-Gaussian 09, R. A., Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, Jr., J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, N. J.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
- 70**-Y. Duan, C. Wu, S. Chowdhury, M. C. Lee, G. Xiong, W. Zhang, R. Yang, P. Cieplak, R. Luo, T. Lee, J. Caldwell, J. Wang, P. Kollman. A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *J. Comput. Chem.*, 24(16):1999-2012, 2003.
- 71**-D.A. Case, T.A. Darden, T.E. Cheatham, III, C.L. Simmerling, J. Wang, R.E. Duke, R. Luo, R.C. Walker, W. Zhang, K.M. Merz, B. Roberts, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, J. Swails, A.W. Götz, I. Kolossváry, K.F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, R.M. Wolf, J. Liu, X. Wu, S.R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, Q. Cai, X. Ye, J. Wang, M.-J. Hsieh, G. Cui, D.R. Roe, D.H. Mathews, M.G. Seetin, R. Salomon-Ferrer, C. Sagui, V. Babin, T. Luchko, S. Gusarov, A. Kovalenko, and P.A. Kollman (2012), AMBER 12, University of California, San Francisco.
- 72**-W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, M. L. Klein. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.*, 79(2):926-935, 1983.
- 73**-R. A. Laskowski, M. W. MacArthur, D. S. Moss, J. M. Thornton. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 26:283-291, 1993.
- 74**-R. Maiti, G. H. Van Domselaar, H. Zhang, D. S. Wishart. SuperPose: a simple server for sophisticated structural superposition. *Nucleic Acids Res.*, 32:W590-W594, 2004.
- 75**-G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, A. J. Olson. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comp. Chem.*, 16:2785-91, 2009.
- 76**-B. R. P. Kumar, S. Sopna, J. Verghese, B. Desai, M. J. Nanjan. Rigid and flexible docking studies on PPAR γ agonists: key interactions for a better antihyperglycemic activity and in silico pharmacodynamic activity versus experimental in vivo activity. *Med. Chem. Res.*, 21(5):624-633, 2012.
- 77**-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.*, 25(9):1157-1174, 2004.
- 78**-C. M. Breneman, K. B. Wiberg. Determining atom-centered monopoles from molecular electrostatic potentials—the need for high sampling density in formamide conformational analysis. *J. Comput. Chem.*, 11(3):361-373, 1990.
- 79**-W. D. Cornell, P. Cieplak, C. I. Bayly, I. R. Gould, K. M. Merz Jr., D. M. Ferguson, D. C. Spellmeyer, T. Fox, J. W. Caldwell, and P. A. Kollman. A second generation force-field for the simulation of proteins, nucleic-acids, and organic-molecules. *J. Am. Chem. Soc.*, 117(19):5179-5197, 1995.
- 80**-J. P. Ryckaert, G. Ciccotti, H. J. C. Berendsen. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comp. Phys.*, 23(3):327-341, 1977.
- 81**-M. P. Allen, D. J. Tildesley. *Computer simulation of liquids*. Oxford University Press. New York, 1991.
- 82**-H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. Van Gunsteren, A. DiNola, J. R. Haak. *J. Chem. Phys.*, 81(8):3684-3690, 1984.

7. INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

S1: Tablas suplementarias

Tabla S1 – (ver página sucesiva)

Se evaluaron distintas condiciones de *docking* utilizando los complejos LAN10/-12-PPAR γ obtenidos de la cristalografía con PDBID 3CWD. Se variaron número de corridas, tamaño poblacional, número de evaluaciones energéticas, número de generaciones y tamaño de paso de traslación y rotación. Se calcularon los RMSD de la topscore de los ligandos respecto a la orientación presente en la estructura cristalográfica. Se partió de una grilla de 50X50X56 que abarcaba toda la región del bolsillo de unión al ligando, un espaciado de 0.375, 50 corridas, un tamaño de población de 150, 2.500.000 de evaluaciones energéticas, 27.000 generaciones, un tamaño de paso de traslación de 0,2 Å y de rotación de 5 Å.

Se obtuvieron valores de RMSD menores a 2.0 Å al utilizar un tamaño de paso de rotación de 13 y 14 Å solamente para el complejo LAN10- PPAR γ . Al no encontrarse condiciones de *docking* que arrojaran valores de RMSD menores al límite previamente mencionado, se decidió trabajar con aquellas estructuras provenientes de clusters que tuvieran una orientación similar a la de los nitrolinoleicos en la cristalografía 3CWD.

Tabla S2: Carga y multiplicidad correspondientes a los *single-point* de los ligandos y aquellos residuos que se encuentran a menos de 3 Å.

| | 1FM6 | 3CWD |
|--------------|----------------------------|----------------------------|
| | carga/multiplicidad | carga/multiplicidad |
| OA | 0/1 | 0/1 |
| OAN9 | 1/1 | 1/1 |
| OAN10 | 1/1 | -1/1 |
| LA | 0/1 | 0/1 |
| LAN10 | 0/1 | 0/1 |
| LAN12 | 1/1 | -1/1 |
| AA | 0/1 | 0/1 |
| AN9 | 1/1 | -1/1 |
| AN12 | 0/1 | 0/1 |
| AN14 | 1/1 | 1/1 |
| AN15 | 0/1 | 0/1 |
| Rzg | 0/1 | 1/1 |

Tabla S3: Valores de Kd y energía libre de unión obtenidos por *docking*.

| | $\Delta G_{\text{unión}}$ [Kcal/mol] | | K_i [mM] | |
|--------------|--------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | 1FM6 | 3CWD | 1FM6 | 3CWD |
| OA | -3.26 | -4.05 | 4.07 | 1.07 |
| OAN9 | -3.55 | -4.99 | 2.48 | 0.22 |
| OAN10 | -3.27 | -5.27 | 4.04 | 0.14 |
| LA | -2.74 | -3.37 | 9.77 | 3.39 |
| LAN10 | -4.33 | -5.09 | 0.67 | 0.18 |
| LAN12 | -4.16 | -5.86 | 0.89 | 0.05 |
| AA | -4.49 | -4.69 | 0.51 | 0.36 |
| AN9 | -4.30 | -4.07 | 0.70 | 1.04 |
| AN12 | -3.38 | -4.00 | 3.33 | 1.18 |
| AN14 | -3.76 | -4.32 | 1.76 | 0.68 |
| AN15 | -5.04 | -3.71 | 0.20 | 1.92 |
| RZG | -6.00 | -6.00 | 0.04 | 0.04 |

Tabla S1: Parámetros de docking modificados para los complejos LAN10/-12 en PPAR γ y sus respectivos RMSD del top score respecto a la eestructura critalográfica.

| N° Corrida | RMSD top score LAN10/LAN12 | Eval Energéticas | RMSD top score LAN10/LAN12 | Traslación | RMSD top score LAN10/LAN12 | Rotación | RMSD top score LAN10/LAN12 |
|---------------------|---------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|-------------------|---------------------------------------|------------------|---------------------------------------|
| 10 | 8.9/6.5 | 1.500.000 | 7.9/5.8 | 0.1 | 2.3/7.5 | 1 | 2.8/6.4 |
| 20 | 9.4/7.9 | 2.000.000 | 8.2/8.0 | 0.3 | 7.6/10.0 | 2 | 3.4/8.5 |
| 30 | 9.0/8.1 | 3.000.000 | 8.5/9.2 | 0.4 | 7.1/7.8 | 3 | 2.6/3.1 |
| 40 | 7.0/4.7 | 3.500.000 | 4.5/5.7 | 0.5 | 2.6/3.8 | 4 | 2.3/2.9 |
| 60 | 2.7/3.2 | 4.000.000 | 7.0/8.7 | 0.6 | 2.3/3.4 | 6 | 3.2/10.0 |
| 70 | 6.3/2.7 | 4.500.000 | 2.5/3.0 | 0.7 | 3.4/9.0 | 7 | 6.9/3.9 |
| 80 | 2.5/8.4 | 5.000.000 | 7.6/6.2 | 0.8 | 2.5/6.6 | 8 | 6.4/2.8 |
| 90 | 2.2/7.3 | 5.500.000 | 3.1/2.8 | 0.9 | 2.0/2.9 | 9 | 5.9/9.3 |
| 100 | 6.3/3.4 | 6.000.000 | 6.1/7.8 | 1.0 | 3.1/3.7 | 10 | 6.1/8.5 |
| 150 | 6.1/7.6 | 6.500.000 | 3.7/8.8 | 1.1 | 5.6/8.4 | 11 | 7.6/8.3 |
| | | 7.000.000 | 10.0/7.6 | 1.2 | 8.4/9.8 | 12 | 2.2/3.6 |
| | | 7.500.000 | 2.6/3.1 | 1.3 | 6.4/6.8 | 13 | 1.8/3.2 |
| Generaciones | RMSD top score LAN10/LAN12 | 8.000.000 | 9.6/5.9 | 1.4 | 6.2/3.4 | 14 | 1.7/3.3 |
| 5.000 | 2.3/5.9 | 8.500.000 | 6.1/7.1 | 1.5 | 2.4/8.9 | 15 | 2.9/9.1 |
| 10.000 | 7.3/3.2 | 9.000.000 | 7.3/3.8 | 1.6 | 7.4/3.4 | | |
| 15.000 | 7.4/3.3 | 9.500.000 | 2.5/9.1 | 1.7 | 2.7/3.6 | | |
| 20.000 | 2.8/9.9 | 10.000.000 | 2.3/6.0 | 1.8 | 2.0/5.8 | Población | RMSD top score LAN10/LAN12 |
| 25.000 | 7.1/8.5 | 15.000.000 | 6.1/6.1 | 1.9 | 7.0/9.1 | 50 | 6.5/8.9 |
| 30.000 | 6.8/3.2 | 20.000.000 | 7.8/8.5 | 2.0 | 9.0/2.9 | 100 | 5.4/8.7 |
| 35.000 | 8.9/8.7 | 25.000.000 | 2.2/8.3 | | | 200 | 8.8/3.0 |
| 40.000 | 6.5/6.5 | 50.000.000 | 2.2/8.6 | | | 250 | 2.2/9.0 |
| 45.000 | 3.2/3.1 | | | | | 300 | 3.0/3.4 |

Tabla S4: RMSD de los complejos obtenidos por docking respecto a las estructuras minimizadas. Los complejos de los ácidos grasos sin nitrar con 1FM6 no fueron generados ya que el estudio de los mismos se centró en la estructura con 3CWD.

| | RMSD <i>dock-min</i> | |
|--------------|----------------------|-------|
| | 1FM6 | 3CWD |
| OA | Nd | 0.88 |
| OAN9 | 0.86 | 0.89 |
| OAN10 | 0.84 | 0.72 |
| LA | Nd | 0.82 |
| LAN10 | 0.80 | 0.71* |
| LAN12 | 0.77 | 0.82* |
| AA | Nd | 0.96 |
| AN9 | 0.86 | 0.88 |
| AN12 | 0.83 | 0.94 |
| AN14 | 0.89 | 0.84 |
| AN15 | 0.79 | 0.89 |

*Los complejos de partida corresponden a las estructuras cristalográficas.

Tabla S5: Red de EdH establecidas entre OA, OAN9 y OAN10 con 1FM6 y 3CWD.

| Ligando | Residuo | Distancia EdH [Å] | | Ángulo EdH [°] | | Orden de enlace Wiberg (m06) | |
|--------------|------------------------|-------------------|-----------|----------------|-----------|------------------------------|-----------------|
| | | 1FM6/3CWD | 1FM6/3CWD | 1FM6/3CWD | 1FM6/3CWD | [u.a.]1FM6/3CWD | [u.a.]1FM6/3CWD |
| OA | Tyr327 (..OH-O=C=O..) | Nf/1.8 | Nf/160 | Nf/160 | Nf/160 | Nf/0.06 | Nf/0.06 |
| | Lys367 (..NH3-O=C=O..) | Nf/1.8 | Nf/160 | Nf/160 | Nf/160 | Nf/0.06 | Nf/0.06 |
| | His449 (..NH-O=C=O..) | 1.8/1.8 | 172/151 | 172/151 | 172/151 | 0.08/0.06 | 0.08/0.06 |
| | Tyr473 (..OH-O=C=O..) | Nf/1.9 | Nf/151 | Nf/151 | Nf/151 | Nf/0.04 | Nf/0.04 |
| OAN9 | Arg288 (..NH-O=N=O..) | 1.9/2.4 | 162/166 | 162/166 | 162/166 | 0.03/0.01 | 0.03/0.01 |
| | Arg288 (..NH2-O=N=O..) | 2.3/Nf | 141/Nf | 141/Nf | 141/Nf | 0.01/Nf | 0.01/Nf |
| | Tyr327 (..OH-O=C=O..) | 1.7/1.8 | 169/158 | 169/158 | 169/158 | 0.08/0.06 | 0.08/0.06 |
| | Lys367 (..NH3-O=C=O..) | 1.8/1.8 | 169/163 | 169/163 | 169/163 | 0.08/0.06 | 0.08/0.06 |
| | His449 (..NH-O=C=O..) | 2.1/1.9 | 127/156 | 127/156 | 127/156 | 0.02/0.05 | 0.02/0.05 |
| | Tyr473 (..OH-O=C=O..) | Nf/1.8 | Nf/156 | Nf/156 | Nf/156 | Nf/0.05 | Nf/0.05 |
| OAN10 | Cys285 (..SH-O=C=O..) | Nf/1.9 | Nf/178 | Nf/178 | Nf/178 | Nf/0.06 | Nf/0.06 |
| | Gln286 (..NH-O=C=O..) | Nf/1.7 | Nf/173 | Nf/173 | Nf/173 | Nf/0.06 | Nf/0.06 |
| | Arg288 (..NH-O=N=O..) | 1.9/Nf | 161/Nf | 161/Nf | 161/Nf | 0.03/Nf | 0.03/Nf |
| | Tyr327 (..OH-O=C=O..) | 1.7/Nf | 179/Nf | 179/Nf | 179/Nf | 0.06/Nf | 0.06/Nf |
| | His449 (..NH-O=C=O..) | Nf/1.8 | Nf/160 | Nf/160 | Nf/160 | Nf/0.06 | Nf/0.06 |
| | Tyr473 (..OH-O=C=O..) | 1.7/Nf | 160/Nf | 160/Nf | 160/Nf | 0.08/Nf | 0.08/Nf |

Nf: no establece EdH.

Tabla S6: Red de EdH establecidas entre LA, LAN10 y LAN12 con 1FM6 y 3CWD.

| Ligando | Residuo | Distancia | Ángulo EdH | Orden de enlace |
|--------------|-----------------------------|----------------------|------------------|---------------------------------|
| | | EdH [Å] 1FM6/3CWD | [°] 1FM6/3CWD | Wiberg (m06) [u.a.]1FM6/3CWD |
| LA | Ser289 (..OH-O=C=O..) | 1.6/Nf | 164/Nf | 0.09/Nf |
| | Tyr327 (..OH-O=C=O..) | Nf/1.7 | Nf/169 | Nf/0.07 |
| | Lys367 (..NH3-O=C=O..) | Nf/2.1 | Nf/122 | Nf/0.02 |
| | Lys367 (..NH3-O=C=O..) | Nf/2.2 | Nf/125 | Nf/0.02 |
| LAN10 | Gln286 (..NH-O=C=O..) | Nf/1.7 | Nf/176 | Nf/0.08 |
| | Ser289 (..OH-O=C=O..) | 1.5/Nf | 178/Nf | 0.11/Nf |
| | Tyr327 (..OH-O=N=O..) | 1.9/Nf | 152/Nf | 0.03/Nf |
| | His449 (..NH-O=C=O..) | Nf/1.8 | Nf/158 | Nf/0.06 |
| LAN12 | Ser122 (..NH(back)-O=N=O..) | Nf/2.2 | Nf/153 | Nf/0.01 |
| | Cys285 (..SH-O=C=O..) | Nf/2.0 | Nf/169 | Nf/0.03 |
| | Gln286 (..NH-O=C=O..) | Nf/1.8 | Nf/174 | Nf/0.06 |
| | Arg288 (..NH-O=N=O..) | 1.8/Nf | 174/Nf | 0.04/Nf |
| | Ser289 (..OH-O=C=O..) | Nf/1.6 | Nf/165 | Nf/0.10 |
| | Tyr327 (..OH-O=N=O..) | 1.7/Nf | 164/Nf | 0.07/Nf |
| | Lys367 (..NH3-O=C=O..) | 1.8/Nf | 151/Nf | 0.07/Nf |
| | His449 (..NH-O=C=O..) | 2.1/Nf | 135/Nf | 0.02/Nf |

Nf: no establece EdH.

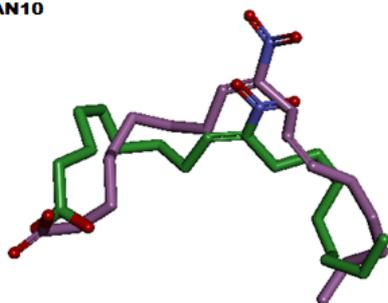
Tabla S7: Red de EdH establecidas entre AA, AN9, AN12, AN14, AN15 y Rosiglitazona (Rzg) con 1FM6 y 3CWD.

| Ligando | Residuo | Distancia | Ángulo EdH | Orden de enlace |
|-------------|-----------------------------|----------------------|------------------|---------------------------------|
| | | EdH [Å] 1FM6/3CWD | [°] 1FM6/3CWD | Wiberg (m06) [u.a.]1FM6/3CWD |
| AA | Gln286 (..NH-O=C=O..) | Nf/1.7 | Nf/173 | Nf/0.08 |
| | Ser289 (..OH-O=C=O..) | Nf/1.6 | Nf/172 | Nf/0.11 |
| | Tyr327 (..OH-O=C=O..) | 1.7/Nf | 165/Nf | 0.07/Nf |
| | Lys367 (..NH3-O=C=O..) | 1.8/Nf | 167/Nf | 0.08/Nf |
| | His449 (..NH-O=C=O..) | 1.9/Nf | 138/Nf | 0.04/Nf |
| AN9 | Arg288 (..NH-O=N=O..) | 1.9/Nf | 167/Nf | 0.04/Nf |
| | Tyr327 (..OH-O=C=O..) | 1.7/1.7 | 167/161 | 0.07/0.07 |
| | Lys367 (..NH3-O=C=O..) | 1.8/1.9 | 170/138 | 0.08/0.04 |
| | His449 (..NH-O=C=O..) | 2.1/1.9 | 125/139 | 0.02/0.04 |
| AN12 | Cys285 (..SH-O=C=O..) | 1.9/Nf | 171/Nf | 0.06/Nf |
| | Arg288 (..NH-O=N=O..) | 2.0/Nf | 169/Nf | 0.02/Nf |
| | Tyr327 (..OH-O=C=O..) | Nf/1.8 | Nf/155 | Nf/0.06 |
| | Lys367 (..NH3-O=C=O..) | Nf/1.8 | Nf/153 | Nf/0.06 |
| | His449 (..NH-O=C=O..) | 1.8/1.9 | 165/144 | 0.06/0.04 |
| | Tyr473 (..OH-O=C=O..) | Nf/1.8 | Nf/157 | Nf/0.05 |
| AN14 | Gln286 (..NH-O=C=O..) | Nf/1.7 | Nf/177 | Nf/0.07 |
| | Arg288 (..NH-O=N=O..) | 2.0/Nf | 166/Nf | 0.03/Nf |
| | Ser289 (..OH-O=C=O..) | Nf/1.6 | Nf/169 | Nf/0.10 |
| | Tyr327 (..OH-O=C=O..) | 1.7/Nf | 166/Nf | 0.07/Nf |
| | His449 (..NH-O=C=O..) | 1.8/Nf | 148/Nf | 0.06/Nf |
| AN15 | Gln286 (..NH-O=C=O..) | Nf/2.0 | Nf/172 | Nf/0.04 |
| | Arg288 (..NH-O=N=O..) | 1.9/Nf | 174/Nf | 0.04/Nf |
| | Arg288 (..NH2-O=N=O..) | 2.3/Nf | 144/Nf | 0.02/Nf |
| | Ser289 (..OH-O=C=O..) | 1.6/1.7 | 161/170 | 0.09/0.09 |
| | His449 (..NH-O=C=O..) | Nf/2.0 | Nf/147 | Nf/0.04 |
| Rzg | Gln286 (..OH-O(C3NHO2S)..) | Nf/1.9 | Nf/163 | Nf/0.04 |
| | Ser289 (..OH-O(C3NHO2S)..) | 1.7/Nf | 163/Nf | 0.05/Nf |
| | His323 (..OH-O(C3NHO2S)..) | 2.1/Nf | 143/Nf | 0.02/Nf |
| | His449 (..OH-O(C3NHO2S)..) | 1.9/1.9 | 156/155 | 0.04/0.03 |
| | Tyr473 (..OH-NH(C3NHO2S)..) | 2.1/Nf | 137/Nf | 0.02/Nf |

Nf: no establece EdH.

S2: Figuras suplementarias.

a)-LAN10



b)-LAN12



Figura S1: Superposición de la disposición de los ligandos LAN10 y LAN12 en la mejor pose obtenida por *docking* con Autodock (lila) y la cristalografía 3CWD (verde) usada como referencia.

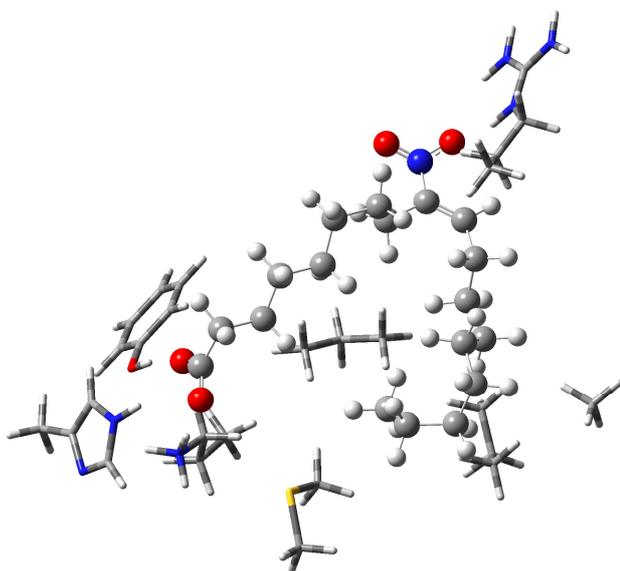


Figura S2: Ejemplificación de uno de los recortes de los complejos clásicos (correspondiente al complejo OAN9-1FM6) utilizado para la determinación de los órdenes de enlace de Wiberg.