

Ácido 19-*epi*-Okadaiko, un nuevo inhibidor de PP1 y PP2A

Patricia G. Cruz¹, Antonio H. Daranas^{1,2}, Manuel Norte¹
y José J. Fernández¹

(1) Instituto Universitario de Bioquímica "Antonio González", Departamento de Química Orgánica, Universidad de La Laguna, La Laguna 38206, Tenerife

(2) Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica, Universidad de La Laguna, Francisco Sánchez 1, La Laguna 38071, Tenerife

El ácido Okadaico (AO) es un poliéter producido por dinoflagelados del género *Prorocentrum* y *Dinophysis* que ha ocasionado un gran impacto en diferentes aspectos como la salud pública, el control de alimentos, la farmacología o la industria pesquera [1].

Este metabolito se aisló inicialmente de una esponja marina [2] y fue caracterizado como el principal agente responsable del síndrome diarreico DSP (diarrhetic shellfish poisoning) [3] así como de ser un potente promotor de tumores [4]. Posteriormente se descubrió su mecanismo de acción, el cual implicaba una inhibición selectiva de las proteínas fosfatasa (PPs) [5,6]. Este hecho involucró a estas enzimas a numerosas investigaciones celulares y bioquímicas [7], demostrando el importante papel que tienen estas enzimas en la regulación de distintos procesos celulares como el metabolismo, crecimiento celular o apoptosis, entre otros. Estos resultados han llevado a muchos laboratorios a desarrollar la síntesis completa del AO [8]. En estos momentos en que se están llevando a cabo estudios estructurales con PP1 y PP2A, el descubrimiento de nuevos inhibidores y el estudio de sus conformaciones en disolución es una herramienta muy importante para profundizar en el modo de unión proteína-ligando [9]. En este trabajo, nosotros aportamos el aislamiento, estudio conformacional y actividad farmacológica de un nuevo inhibidor de PP1 y PP2A, el ácido 19-*epi*-Okadaico (19-*epi*-AO).

Se realizaron cultivos a gran escala de *P. belizeanum* durante 45 días usando medio Guillard K a 23 °C, con ciclos 16:8 luz:oscuridad en tanques de 80 L. Una vez extraídas las células se sometieron a sucesivas cromatografías hasta aislar 70 mg de AO y 1 mg de la nueva toxina 19-*epi*-AO. La fórmula molecular se determinó de acuerdo a su espectro de masas, que presentó un ion a m/z 827.4576 correspondiente a $[C_{44}H_{68}O_{13}+Na]^+$, idéntica a la del AO. El análisis de los datos de RMN nos llevó a una estructura plana idéntica a la del AO, aunque se podían observar diferencias significativas en los desplazamientos de las señales de 1H y ^{13}C en el fragmento C15-C24. Un análisis cualitativo del experimento ROESY nos indicó que nos encontrábamos ante un epímero del AO en el carbono C19, el ácido 19-*epi*-okadaico [10] (Fig. 1).

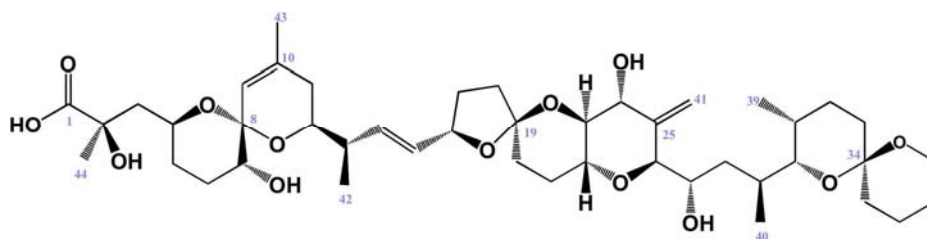


Figura 1. Estructura del ácido 19-*epi*-okadaico.

La conformación del 19-*epi*-AO se determinó en una disolución de MeOD mediante búsquedas conformacionales de MonteCarlo, utilizando las restricciones correspondientes 39 distancias interprotónicas obtenidas de experimentos ROESY, así como 7 ángulos diedros obtenidos a partir de las correspondientes constantes de acoplamiento $^3J_{H-H}$ medidas en un COSY-DQF sensible a la fase. Se realizaron búsquedas conformacionales en cuatro situaciones distintas, utilizando los campos de fuerza MM3* [11] y MMFF94s [12], implementados por MacroMolDel [13], combinados con una constante dieléctrica de 32,7 (equivalente a la del metanol) y con el modelo solvatado GBSA [14]. Los conformeros resultantes se minimizaron con el algoritmo FMNR, salvando las estructuras con una energía de 25 KJ por encima del mínimo global [15]. De este estudio se obtuvo una única familia conformacional, cuya estructura promedio se muestra en la Fig. 2. El resultado obtenido de la búsqueda conformacional se validó con una dinámica molecular, que mostró que aunque la molécula se mantiene dentro de una misma familia conformacional, presenta una ligera flexibilidad en el fragmento C1-C4. Este resultado se puede explicar por la ausencia del puente de hidrógeno característico del AO entre el ácido carboxílico C1 y el hidroxilo en C24, que no se puede formar en el nuevo metabolito ya que debido al cambio configuracional ambos grupo se encuentran en distintas caras de la molécula. La presencia de este puente de hidrógeno se consideraba la clave para que el AO mantuviera su disposición de pseudomacrociclo, sin embargo, en este nuevo compuesto hemos observado que esto no es necesario.

Se ensayó la actividad biológica de este nuevo compuesto frente a fosfatasa del tipo PP1 y PP2A [16,17], y se observó que el 19-*epi*-AO inhibe la PP2A con un $IC_{50} = 0.47 \pm 0.04$ nM, un valor equivalente al del AO. Sin embargo, la actividad inhibitoria del 19-*epi*-AO frente a PP1 presentó un $IC_{50} = 465 \pm 52$ nM, aproximadamente diez veces menos que el AO.

Los resultados obtenidos son importantes desde un punto de vista del análisis de las interacciones entre la proteína y el ligando, ya que se pueden sacar conclusiones estructurales importantes para el diseño de inhibidores específicos de PP1 y PP2A.

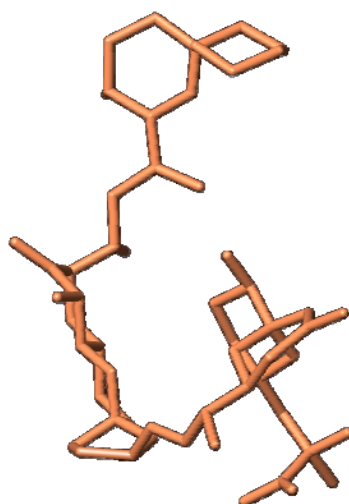


Figura 2. Conformación del ácido 19-*epi*-okadaico en disolución.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero a: MEC (AGL2005-07294-C04-01); MCYT-FSE (Programa Ramón y Cajal, MLS) y ICIC (PGC). La cepa de *P. belizeanum* fue cedida por el IEO (Vigo), cortesía de S. Fraga.

Referencias

- [1] Daranas, A.H., M. Norte, J.J. Fernández. 2001. *Toxicon* 39:1101- 1132.
- [2] Yasumoto, T., M. Murata, M., Y., Oshima, M. Sano, G. K. Matsumoto, J. Clardy. 1985. *Tetrahedron*. 41:1019-1025.
- [3] Suganuma, M., H. Fujiki, H. Suguri, S. Yoshizawa, M. Hirota, M. Nakayasu, M. Ojiva, K. Wakamatsu, K. Yamada, T. Sugimura. 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:1768-1771.
- [4] Biolojan, C., A. Takai. 1988. *Biochem. J.* 256:283-290.
- [5] McCluskey, A., T.R. Sim, J.A. Sakoff. 2002. *J. Med. Chem.* 45:1151-1175.
- [6] Fernández, J.J., M.L. Cadenas, M.L. Souto, M.M. Trujillo, M. Norte. 2002. *Curr. Med. Chem.* 9:229-262.
- [7] Daranas, A.H., J.J. Fernández, M. Norte, J.A. Gavín, B. Suárez-Gómez, M.L. Souto. 2004. *Chem. Rec.* 4:1-9.
- [8] Forsyth, C.J.; Sabes, S. F.; Urbanek, R. A. *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 8381-8382.
- [9] Daranas, A. H.; Fernández, J. J.; Morales, E. Q.; Norte, M.; Gavín, J. A. *J. Med. Chem.* 2004, 47, 10-3.
- [10] Cruz, P. G.; Hernández Daranas, A.; Fernández, J. J.; Norte, M. *Organic Letters* 2007, 9, 3045-048.
- [11] Allinger, N. L.; Yuh, Y. H.; Lii, J. H. *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 8551-8559.
- [12] Halgren, T. A. *J. Comput. Chem.* 1996, 17, 490-519.
- [13] Mohamadi, F.; Richards, N. G. J.; Guida, W. C.; Liskamp, R.; Lipton, M.; Caufield, C.; Chang, G.; Hendrickson, T.; Still, W. C. *J. Comput. Chem.* 1990, 11, 440-467.
- [14] Still, W. C. T.; Tempezyk, A.; Hawley, R. C.; Hendrickson, T. *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 6127-129.
- [15] Thepchattri, P.; Cicero, D. O.; Monteagudo, E.; Ghosh, A. K.; Cornett, B.; Weeks, E. R.; Snyder, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 12838-12846.
- [16] Vieytes, J. M.; Fontal, O. I.; Leira, F.; Baptista de Sousa, J. M. V.; Botana, L. M. *Anal. Biochem.* 1997, 248, 258-264.
- [17] McGovern, S. L.; Caselli, E.; Grigorieff, N.; Shoichet, B. K. *J. Med. Chem.* 2002, 45, 1712-1722.