



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL Y ESTUDIOS DE INTERACCIÓN
LIGANDO-PROTEÍNA DE INHIBIDORES SELECTOS DE LA CALMODULINA
OBTENIDOS DE LAS ESPECIES FÚNGICAS *MALBRANCHEA AURANTIACA* Y
*EMERICELLA 25379***

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. EN C. MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDÍVAR



TUTORA: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado

Presidente:	Dr. Joaquín Tamariz Mascarúa
Primer vocal:	Dr. Vladimir Basiuk Evdokimenko
Segundo vocal:	Dr. Gabriel Eduardo Cuevas González Bravo
Tercer vocal:	Dr. Rogelio Pereda Miranda
Secretario:	Dr. Enrique Ángeles Anguiano

Lugar donde se realizó el presente trabajo de investigación:

Laboratorio 124, Conjunto E, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Tutora:

Dra. Rachel Mata Essayag

Sustentante:

M. en C. Mario Alberto Figueroa Saldívar

Agradecimientos

Mi más profundo agradecimiento a mi asesora, la Dra. Rachel Mata Essayag, por su valiosa dirección, enseñanzas, confianza y paciencia otorgadas para la realización de este proyecto, así como por sus admirables consejos de vida. Gracias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para realizar mis estudios de doctorado, así como al proyecto CONACyT 45814-Q, a cargo de la Dra. Rachel Mata, por el financiamiento parcial de esta investigación.

A los Dres. Vladimir Basiuk y Rogelio Rodríguez, miembros del Comité Tutelar, y los Dres. Enrique Ángeles y Alfredo Ortega, miembros del Comité Tutelar Ampliado, por sus valiosos comentarios y observaciones.

A los Dres. Joaquín Tamariz, Vladimir Basiuk, Gabriel Cuevas, Rogelio Pereda y Enrique Ángeles, miembros del Jurado, quienes revisaron y enriquecieron el contenido de este manuscrito.

A la Dra. María del Carmen González, por proporcionar e identificar los organismos fúngicos utilizados en el presente estudio.

A los Dres. Carlos Cerda, Fabián López y Rogelio Rodríguez, por su valiosa asesoría durante la realización de los estudios de modelado molecular.

A los Dres. Rogelio Rodríguez, Alejandro Sosa, Federico del Río y Martín González, por su apoyo para la realización de los ensayos enzimáticos, de fluorescencia y RMN.

Mi más sincera gratitud a la Maestra Isabel Rivero, por su constante apoyo incondicional durante la realización de este trabajo de investigación y, sobre todo, por su sincera y bonita amistad.

Finalmente, el más grande de mis agradecimientos a mi familia, por su cariño, comprensión, apoyo y, en especial, por su amor que siempre me han brindado y sin merecerlo. Gracias familia.

Dedicatorias

Índice

Resumen	i
Abstract	v
1. Introducción	
1.1 Búsqueda de principios biodinámicos a partir de fuentes naturales para el desarrollo de nuevos fármacos: una reseña histórica	1
2. Antecedentes	
2.1 Regulación de la función celular mediada por calcio	11
2.2 Proteína calmodulina	13
2.3 Técnicas experimentales utilizadas para la caracterización ligando-CaM	17
2.4 Inhibidores sintéticos de la CaM	21
2.5 Productos naturales inhibidores de la CaM	22
2.6 Antecedentes de la especie fúngica <i>Malbranchea aurantiaca</i> Sigler & Carmich (Myxotrichaceae)	34
2.7 Antecedentes de la especie fúngica <i>Emericella 25379</i> (Trichocomaceae)	35
3. Justificación y objetivos	39
4. Parte experimental	
4.1 Material fúngico	41
4.2 Análisis cromatográficos	41
4.3 Caracterización de los productos naturales y sus derivados	43
4.4 Fermentación de los microorganismos fúngicos objeto de estudio	44
4.5 Estudio químico de la especie <i>Emericella 25379</i>	45
4.6 Estudio químico de la especie <i>Malbranchea aurantiaca</i>	48
4.7 Ensayos biológicos	50
4.8 Cálculos de modelado molecular	53
4.9 Evaluación de la interacción Ca ²⁺ -CaM-malbranqueamida (8) por RMN	57
5. Resultados y discusión	
5.1 Selección primaria y obtención de los extractos orgánicos de las especies fúngicas	59
5.2 Obtención de los metabolitos bioactivos de <i>Emericella 25379</i>	61
5.3 Aislamiento y caracterización de los análogos de la malbranqueamida (8) presentes en la especie fúngica <i>Malbranchea aurantiaca</i>	77
5.4 Caracterización de la interacción ligando-CaM de los metabolitos	82

aislados de <i>Emericella</i> 25379	
5.5 Caracterización de la interacción ligando-CaM de los metabolitos aislados de <i>M. aurantiaca</i>	91
6. Conclusiones	101
7. Referencias bibliográficas	104
Anexo	
Espectros	
Publicaciones	
Congresos internacionales	

Lista de tablas

Tabla 1. Fármacos incorporados en los sistemas de salud de numerosos países desde el año 2005.	3
Tabla 2. Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN del hidrato de 15(<i>S</i>)-cloro-tajixantona (1).	65
Tabla 3. Datos espectroscópicos de RMN de la 14-metoxi-tajixantona (2), el éster (<i>S</i>)-MTPA de 2 (2s), el éster (<i>R</i>)-MTPA de 2 (2r) y los valores de $\Delta\delta$ ($\delta_{2s}-\delta_{2r}$) en δ (ppm).	70
Tabla 4. Datos de energías libres (ΔG), ^a población al equilibrio (<i>P</i>), ^b constantes de acoplamiento (<i>J</i>) ^c y rotaciones ópticas específicas $[\alpha]_D^d$ de los conformeros 1-28 de [(14 <i>S</i> ,15 <i>S</i> ,20 <i>S</i> ,25 <i>R</i>)-] 2 .	75
Tabla 5. Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN para la shamixantona (3), el hidrato de tajixantona (4) y la emericelina (5) aisladas de <i>Emericella</i> 25379.	76
Tabla 6. Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN para las malbranqueamidas aisladas de <i>M. aurantiaca</i> .	79
Tabla 7. Datos enzimáticos de los inhibidores de la CaM 1-5 aislados de la especie fúngica <i>Emericella</i> 25379.	84
Tabla 8. Comparación de los resultados experimentales y de AM de los inhibidores de la CaM 1-5 aislados de la especie fúngica <i>Emericella</i> 25379.	90
Tabla 9. Inhibición de la activación del complejo Ca^{2+} -CaM-PDE1 mostrada por la malbranqueamida (8) y una serie de análogos sintéticos.	92
Tabla 10. Aminoácidos involucrados en el sitio de unión de la malbranqueamida (8) con la CaM identificados por AM flexible y RMN.	95
Tabla 11. Residuos de aminoácidos involucrados en el sitio de unión de la malbranqueamida (8) con la CaM identificados por RMN.	99

Lista de figuras

Figura 1. Productos naturales o sus derivados actualmente en fase clínica III de su desarrollo farmacéutico (hasta Marzo de 2008). NP, producto natural; NPD, derivado de producto natural con modificaciones semisintéticas; NPS, compuesto sintético desarrollado con base en un producto natural.	6
Figura 2. Esquema general de la regulación celular de los niveles del ión Ca^{2+} .	12
Figura 3. Estructura de la CaM: a) en su forma libre sin Ca^{2+} (apo-CaM); b) unida a cuatro átomos de Ca^{2+} (Ca^{2+} -CaM); y acomplejada con el péptido MLCK (Ca^{2+} -CaM-MLCK) (códigos pdb 1cfd, 1c1l y 2k0f, respectivamente).	14
Figura 4. Diferentes conformaciones de unión a péptidos blanco de la CaM.	16
Figura 5. Localización y función de las principales proteínas CaMBPs en la célula.	17
Figura 6. Secuencia de hidrólisis del AMPc por las enzimas PDE1 y 5'-nucleotidasa.	18
Figura 7. Esquematación de la transferencia de la energía de resonancia de fluorescencia del 2,6-ANS al fluoróforo MDCC ubicado en el C-dominio terminal al interaccionar con la CaM.	20
Figura 8. <i>Emericella</i> 25379 (Trichocomaceae).	42
Figura 9. <i>Malbranchea aurantiaca</i> (Myxotrichaceae).	42
Figura 10. Metabolitos fúngicos aislados de <i>Emericella</i> 25379.	62
Figura 11. Espectros de DC del a) hidrato de 15(<i>S</i>)-cloro-tajixantona (1) y del b) hidrato de taxijantona (4).	64
Figura 12. Espectro de ^1H -RMN NOESY del hidrato de 15(<i>S</i>)-cloro-tajixantona (1) mostrando las correlaciones señaladas en la estructura.	66
Figura 13. Espectro ^1H -RMN NOESY de la 14-metoxi-tajixantona (2) mostrando las correlaciones señaladas en la estructura.	68
Figura 14. Espectro ^{13}C -RMN HMBC de la 14-metoxi-tajixantona (2) mostrando las correlaciones señaladas en la estructura.	69
Figura 15. Modelo para determinar la estereoquímica absoluta en alcoholes secundarios (Ohtani <i>et al.</i> , 1991).	71
Figura 16. Superposición de los 28 confórmeros de mínima energía obtenidos del análisis Monte Carlo para el estereoisómero 2b .	73
Figura 17. Diferencia absoluta entre los valores de rotación óptica experimental y calculada (DFT B3LYP/DGDZVP) para los estereoisómeros 2a-2b del compuesto 2 .	73
Figura 18. Conformaciones más relevantes del compuesto 2 que corresponden al 90% de la población conformacional.	74
Figura 19. Metabolitos secundarios fúngicos obtenidos de <i>M. aurantiaca</i> .	77
Figura 20. a) Cromatograma por CLAE de la fracción primaria F_{14} : 7 (t_{R} 5.0 min); 6 y 9 (5.5 min) y 8 (t_{R} 6.1 min). b) Cromatograma por CLAE de la mezcla obtenida a partir de la fracción primaria F_{14} : 6 (t_{R} 4.9 min) y 9	78

(5.3 min).	
Figura 21. Vista parcial de la región aromática (δ_H 6-8 ppm) de los espectros de 1H -RMN de los compuestos 6-9 .	80
Figura 22. Análisis conformacional y optimización geométrica mediante DFT de los compuestos 6-9 aislados de <i>M. aurantiaca</i> .	83
Figura 23. Gráfica de Dixon del compuesto 4 en presencia de diferentes concentraciones de la CaM.	85
Figura 24. Electroforetograma PAGE de la CaM con diferentes tratamientos de los compuestos 1-4 .	86
Figura 25. Fluorescencia intrínseca de la CaM-WT [$\lambda_{exi} = 282$ nm, $\lambda_{emi} = 300-340$ nm, en AcOK 5 mM, pH 5.1] en presencia de los compuestos aislados a partir de <i>Emericella 25379</i> .	87
Figura 26. Validación de modelo de AM.	89
Figura 27. Modelo propuesto por la técnica de AM mediante el programa AutoDock para la interacción de los compuestos 2 y 4 con la CaM.	90
Figura 28. Fluorescencia intrínseca de la CaM-WT [$\lambda_{exi} = 282$ nm, $\lambda_{emi} = 300-340$ nm, en AcOK 5 mM, pH 5.1] en presencia de los compuestos aislados a partir de <i>M. aurantiaca</i> .	94
Figura 29. Modelo propuesto por AM con residuos flexibles para la interacción del compuesto 8 con la CaM, mostrando a las Met de la proteína y los cambios conformacionales observados en éstos residuos en presencia del inhibidor.	95
Figura 30. Vista parcial del espectro de ^{13}C - 1H -RMN [δ_H/δ_C 0.6-2.4/15.6-18.4] modalidad HSQC de la titulación de la CaM con el compuesto 8 .	98
Figura 31. Dinámica molecular de la interacción malbranqueamida 8 -CaM.	100

Lista de abreviaturas

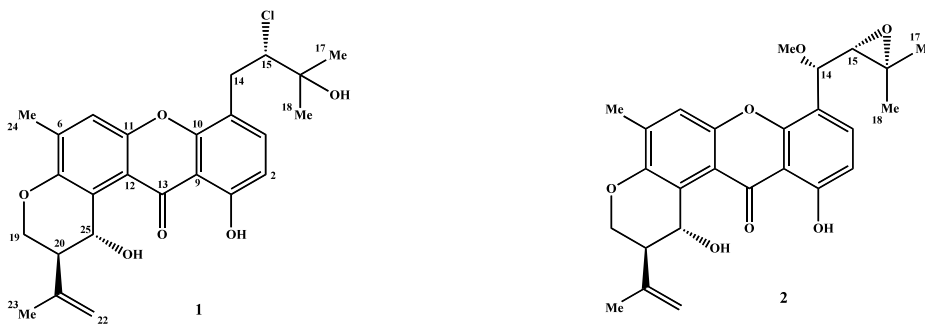
Å	Ångström
$[\alpha]_D$	rotación óptica específica en la línea D de sodio
AcOK	acetato de potasio
AcOEt	acetato de etilo
ACN	acetonitrilo
ΔG	energía libre de Gibbs
AM	acoplamiento molecular
AMPc	3',5'-monofosfato cíclico de adenosina
atm	atmósfera
°C	grado Celsius
C₅H₅N	piridina
(CH₃CO)₂O	anhídrido acético
Ca²⁺	calcio catión
CaCl₂	cloruro de calcio
CaM	calmodulina
CCA	cromatografía en columna abierta
CCF	cromatografía en capa fina
CCFP	cromatografía en capa fina preparativa
CDCl₃	cloroformo deuterado
CH₂Cl₂	diclorometano
CD₃OD	metanol deuterado
CI₅₀	concentración inhibitoria media
CPZ	clorpromazina
DFT	teoría funcional de la densidad
DMSO	dimetilsulfóxido
δ_H	desplazamiento químico de hidrógeno
δ_C	desplazamiento químico de carbono
EGTA	ácido tetraacético de etilenglicol
EMHR-FAB⁺	espectrometría de masas de alta resolución modalidad bombardeo rápido de átomos
g	gramo
Hex	hexano
HMBC	resonancia magnética bidimensional de correlación heteronuclear múltiple
HSQC	resonancia magnética bidimensional de correlación heteronuclear simple
IR	espectroscopía en el infrarrojo
<i>J</i>	constante de acoplamiento
K⁺	potasio catión
<i>K_d</i>	constante de afinidad
<i>K_i</i>	constante de inhibición
KBr	bromuro de potasio
kcal	kilocaloría
λ_{max}	longitud de onda máxima
λ_{exc}	longitud de onda de excitación

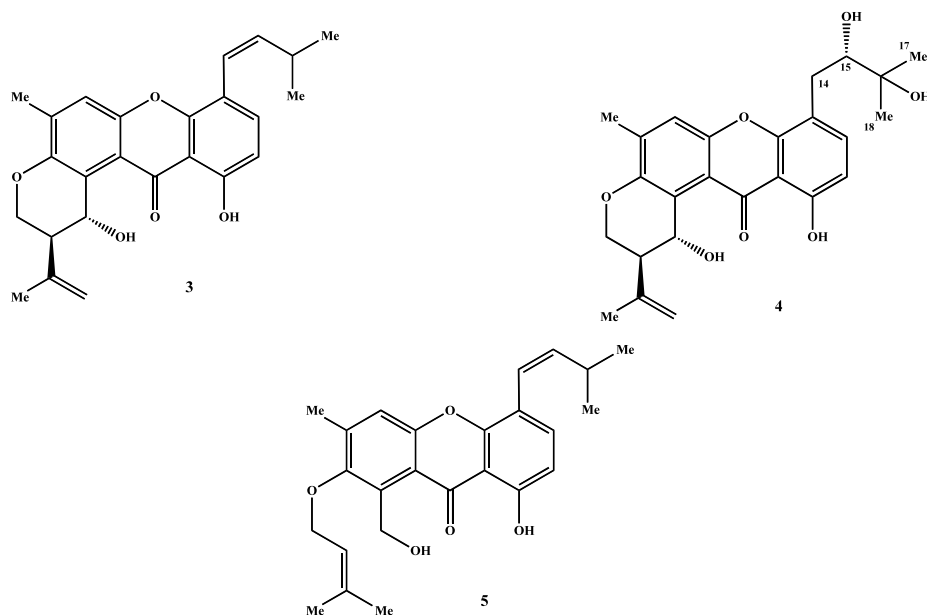
λ_{emi}	longitud de onda de emisión
L	litro
[M]⁺	ión molecular
MeOH	metanol
Met	metionina
mg	miligramo
μg	microgramo
min	minuto
MHz	megahertz
μm	micrometro
μM	micromolar
mm	milimetro
mL	mililitro
μL	microlitro
m/z	relación masa-carga
Na⁺	sodio catión
NaCl	cloruro de sodio
Na₂SO₄	sulfato de sodio anhidro
nm	nanometro
nM	nanomolar
NOESY	resonancia magnética protónica bidimensional del efecto nuclear de Overhauser
ns	nanosegundo
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PDA	agar papa dextrosa
PDB	medio de cultivo papa dextrosa
PDE1	fosfodiesterasa de cerebro de bovino dependiente de calmodulina
p.f.	punto de fusión
Pi	fosfato inorgánico
ppm	partes por millón
RMN	resonancia magnética nuclear
¹H-RMN	resonancia magnética nuclear protónica
¹³C-RMN	resonancia magnética nuclear de carbono 13
R-MTPA	ácido (<i>R</i>)-(-)-α-metoxi-α-trifluorometil-fenilacético
S-MTPA	ácido (<i>S</i>)-(-)-α-metoxi-α-trifluorometil-fenilacético
TFP	trifluoropiperazina
t_R	tiempo de retención
TMS	tetrametilsilano
uma	unidades de masa atómica
UV	espectroscopía en el Ultravioleta
ν_{max}	frecuencia máxima de absorción

Resumen

El presente trabajo describe la investigación de los productos naturales derivados de las especies fúngicas *Emericella* 25379 (Trichocomaceae) y *Malbranchea aurantiaca* Sigler & Carmich (Myxotrichaceae) como fuentes potenciales de agentes inhibidores de la proteína calmodulina (CaM). Para el desarrollo de este proyecto se propuso una estrategia metodológica que se inició con el cultivo de las especies fúngicas y culminó con la caracterización química de los metabolitos de interés y el estudio *in vitro* e *in silico* de la interacción de los productos activos con la proteína CaM.

El análisis químico del extracto orgánico preparado a partir del medio de cultivo y del micelio de *Emericella* 25379, permitió el aislamiento y la caracterización de dos xantonas novedosas denominadas con los nombres triviales de hidrato de 15(S)-cloro-tajixantona (**1**) y 14-metoxi-tajixantona (**2**). De manera adicional, se aislaron y caracterizaron los metabolitos conocidos shamixantona (**3**), hidrato de tajixantona (**4**) y emericelina (**5**). La elucidación estructural de los productos novedosos aislados se realizó por medio de métodos espectroscópicos, espectrométricos y quiroópticos, así como mediante cálculos de mecánica molecular. Estos últimos permitieron corroborar las configuraciones absolutas de los centros quirales del compuesto **2**, así como el arreglo conformacional de la cadena isoprenilo en C-4.





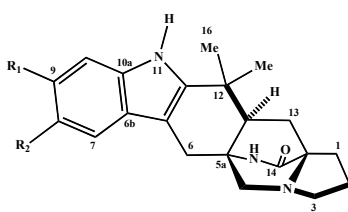
Con el propósito de obtener información acerca de la posible interacción de los metabolitos fúngicos **1-5** aislados de la especie *Emericella* 25379 sobre el complejo Ca^{2+} -CaM se realizaron cuatro experimentos que incluyeron: a) la valoración en el cambio de la movilidad electroforética de la proteína; b) la evaluación enzimática sobre el complejo Ca^{2+} -CaM-PDE1; c) la medición del apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la proteína y; d) estudios de acoplamiento molecular.

La evaluación del efecto de las xantonas **1-5** sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc dependiente de la calmodulina (PDE1) indicó que los compuestos **2** y **4** inhiben la activación de la PDE1 de manera dependiente de la concentración. Los valores de CI_{50} calculados fueron 5.62 ± 1.25 y 5.54 ± 1.28 μM , respectivamente. Posteriormente, para determinar si el mecanismo de esta inhibición es de tipo competitivo o no competitivo se realizó un análisis cinético conducente a determinar la constante de inhibición (K_i). El resultado de este experimento indicó que ambos compuestos actúan como antagonistas competitivos de la CaM, con valores de K_i de 13.92 ± 2.29 y 25.38 ± 2.26 μM , respectivamente, compitiendo con ésta enzima por la formación del complejo activo Ca^{2+} -CaM-PDE1. Por otra parte, se evaluó el efecto de los productos **1-4** sobre la movilidad electroforética de la proteína en presencia de Ca^{2+} , mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturizante (PAGE). Los

resultados obtenidos permiten concluir que los compuestos **2** y **4** retardan la movilidad electroforética de la CaM y se encuentran en armonía con los obtenidos en el ensayo enzimático funcional.

Con la finalidad de explorar con detalle la interacción proteína-ligando de los compuestos **1-5**, se analizó su efecto sobre la fluorescencia intrínseca de la CaM y se realizaron también estudios de acoplamiento molecular (AM). Estos resultados permitieron proponer un modelo de unión de los ligandos **2** y **4** a la CaM, en donde se observa que adoptaron una conformación específica dentro del mismo sitio de unión de las fenotiazinas clorpromazina (CPZ) y trifluoropiperazina (TFP) utilizadas como controles.

La reinvestigación química de la especie *M. aurantiaca* permitió el aislamiento y la caracterización de dos metabolitos secundarios novedosos. Estos compuestos son análogos de la malbranqueamida y se designaron con los nombres triviales de malbranqueamida B (**6**) y premalbranqueamida (**7**). De manera adicional, se aislaron los compuestos conocidos malbranqueamida (**8**) e isomalbranqueamida B (**9**).



	R ₁	R ₂
6	Cl	H
7	H	H
8	Cl	Cl
9	H	Cl

El análisis conformacional de los productos **6**, **7** y **9**, mediante modelado molecular, permitió corroborar que el anillo E presenta una conformación en forma de sobre idéntica a la previamente descrita para el compuesto **8**, con los átomos N4-C13a-C1-C2 localizados en el mismo plano mientras que el átomo C3 se localiza fuera de éste.

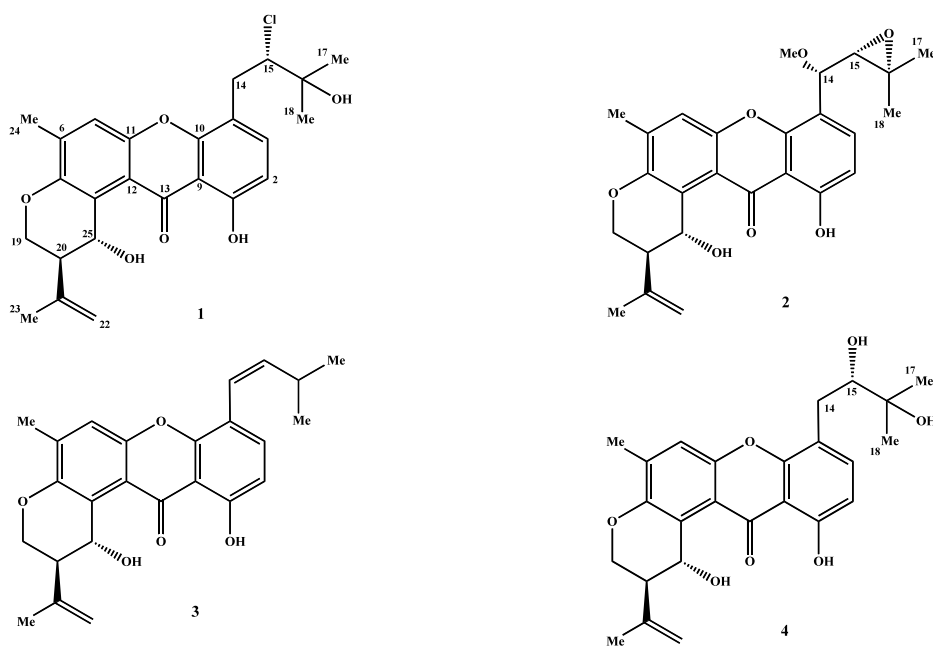
Los resultados obtenidos del ensayo con CaM-PDE1 y de apagamiento de la fluorescencia permitieron establecer que el compuesto **8** es el más activo de la serie de las malbranqueamidas. Este compuesto provoca la inactivación del complejo Ca²⁺-CaM-PDE1 (CI₅₀ 19.33 ± 1.40 µM) y un apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la CaM

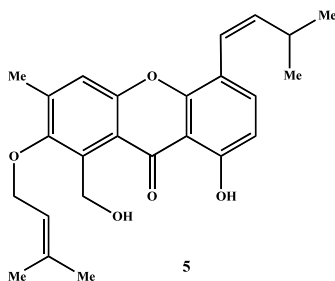
(K_d $0.4082 \pm 0.0592 \mu\text{M}$) de manera dependiente de la concentración. Con base en estos resultados se decidió explorar la interacción del compuesto **8** con la CaM mediante experimentos de AM y RMN. Los resultados obtenidos permitieron proponer un modelo de unión del producto natural a la proteína. Así, la conformación del sitio de unión es diferente al de las fenotiazinas utilizadas como controles. Por otra parte, se determinó que en la unión de **8** con la CaM, a 4 Å de distancia del centro de la molécula y en el modo de interacción más favorable, están involucrados los residuos Leu 18, 32, 39, 112; Glu 11, 14, 114; Phe 12, 16, 19, 68, 92, 141; Met 71, 72, 109, 124, 144, 145; Val 35; Ala 15, 88 y Ile 27. Finalmente, con el propósito de establecer la estabilidad termodinámica del complejo proteína-ligando en solución se realizaron estudios de dinámica molecular (DM). Los resultados más relevantes de estos estudios son los siguientes: se propone que el compuesto **8** interacciona con la CaM en un sitio de unión de alta afinidad, con una relación estequiométrica de 1:1 y con una buena estabilidad termodinámica en solución. Estos resultados fueron consistentes con los obtenidos en los experimentos de RMN y AM.

Abstract

This dissertation describes the study of the fungi *Emericella* 25379 (Trichocomaceae) and *Malbranchea aurantiaca* Sigler & Carmich (Myxotrichaceae) as sources of new potential natural products with calmodulin (CaM) inhibitor properties. The work comprises the fungi fermentation, secondary metabolite isolation and identification as well as the assessment of their CaM inhibitor properties.

Fractionation of the organic extract of *Emericella* 25379 led to the isolation of two new xanthenes designated with the trivial names of 15(*S*)-chloro-tajixanthone hydrate (**1**) and 14-methoxy-tajixantone (**2**), along with the known compounds shamixanthone (**3**), tajixanthone hydrate (**4**), and emericellin (**5**). Structure elucidation of the novel compounds was established on the basis of spectroscopic and spectrometric methods. The absolute configuration of **2** and the conformational behavior of its C-4 isoprenyl chain were determined using molecular mechanics calculations.



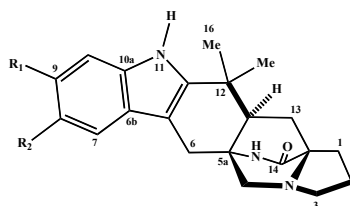


In an attempt to discover new CaM inhibitors, compounds **1-5** were evaluated for their ability to bind human Ca^{2+} -CaM complex using four experiments: a) a functional enzymatic assay using human CaM-sensitive *c*AMP phosphodiesterase (PDE1) as monitoring enzyme; b) an electrophoretic mobility of CaM assay; c) a fluorescence intrinsic quenching of CaM experiment, and; d) molecular docking analyses.

First, the evaluation of compounds on Ca^{2+} -CaM-PDE1 enzymatic assay showed that only compounds **2** and **4** inhibited the activation of PDE1 in a concentration-dependent manner. The IC_{50} values were 5.62 ± 1.25 and 5.54 ± 1.28 μM , respectively, and were comparable to that of chlorpromazine (CPZ), a well characterized CaM antagonist. In order to obtain further evidence of the involvement of CaM in the inhibition of CaM-PDE1, a kinetic analysis of the activity of PDE1 was assessed using different amounts of CaM in the presence of different concentrations of compounds **2** or **4**. The results of this experiments (K_i 13.92 ± 2.29 and 25.38 ± 2.26 μM , respectively) indicated that both compounds acted as competitive antagonist of CaM, thus competing with the formation of the CaM-PDE1 active complex. Then, the interaction of compounds **1-4** with Ca^{2+} -CaM was determined using a polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) experiment. The results showed that compounds **2** and **4** (0.033 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) retarded the electrophoretic mobility of CaM. These results are in agreements with those observed in the CaM-PDE1 assay. Finally, the ligand-CaM interactions observed by fluorescence quenching and molecular docking analyses revealed that these compounds also interact with CaM in the same binding pocket than the classical phenothiazines, CPZ and trifluoropiperazine (TFP), used as positive controls.

Chemical reinvestigation of *M. aurantiaca* led to the isolation of the minor alkaloids presents in the organic extract. The compounds were designated with the trivial names of

malbrancheamide B (**6**) and premalbrancheamide (**7**), and are monochlorinated and nonchlorinated analogs of malbrancheamide (**8**). In addition, compound **8** and isomalbrancheamide B (**9**) were isolated.



	R ₁	R ₂
6	Cl	H
7	H	H
8	Cl	Cl
9	H	Cl

In order to gain a better understanding about the conformational behavior of compounds **6**, **7** y **9**, a high level density functional theory (DFT) investigation was performed. In the DFT (B3LYP/DGDZVP) optimized minimum energy conformers of all compounds ($E = -9.51 \times 10^5$ (**6**), -6.62×10^5 (**7**), -1.24×10^6 (**8**), and -9.51×10^5 (**9**) kcal/mol), ring E displays an envelope conformation and the atoms N4-C13a-C1-C2 are located in the plane while C3 is out-of the ring-plane. These results are in agreements with those previously reported for compound **8**.

The anti-CaM properties of compounds **6-8** was accomplished using functional (CaM-PDE1) and fluorescence quenching experiments. The results revealed that compound **8** is the most active alkaloid from the malbrancheamide series. This compound inhibits the formation of the CaM-PDE1 complex ($IC_{50} 19.33 \pm 1.40 \mu\text{M}$) and quenched the CaM intrinsic fluorescence ($K_d 0.4082 \pm 0.0592 \mu\text{M}$) in a concentration-dependent manner. Then, a molecular docking analysis and a NMR titration of compound **8** into CaM were performed. The results of these experiments allow us to propose a new binding mode of compound **8** to CaM, with a different conformation as of the one as the phenothiazines and other CaM inhibitors previously reported. The amino acid residues involved in the binding site are Leu 18, 32, 39, 112; Glu 11, 14, 114; Phe 12, 16, 19, 68, 92, 141; Met 71, 72, 109, 124, 144, 145; Val 35; Ala 15, 88; and Ile 27. Finally, the thermodynamic stability of the complex **8**-CaM in solution was observed using molecular dynamics (MD) simulations. These results showed a more detailed binding site for compound **8** into the CaM as well as a good thermodynamic stability of the complex in the highly affinity binding site.

1. Introducción

1.1 Búsqueda de principios biodinámicos a partir de fuentes naturales para el desarrollo de nuevos fármacos: una reseña histórica

Por muchos siglos, los productos naturales y sus derivados han jugado un papel muy importante en el tratamiento y prevención de diversos padecimientos. Estos productos han sido obtenidos de diversas fuentes biológicas, que incluyen plantas, animales y microorganismos que habitan en distintos ecosistemas, tanto terrestres como marinos. La importancia de estos recursos naturales en las prácticas médicas a través del tiempo ha sido objeto de numerosas revisiones bibliográficas, algunas muy recientes (Harvey, 2000; Newman *et al.*, 2003; Koehn y Carter, 2005; Blunt *et al.*, 2006; Füllbeck *et al.*, 2006; Gullo *et al.*, 2006; König *et al.*, 2006; Chin *et al.*, 2006; Hoffmeister y Keller, 2007; Newman y Cragg, 2007; Dixon *et al.*, 2007; Butler, 2008). En algunos de estos reportes, se estima que se conocen alrededor de 200,000 productos naturales, la mayoría de los cuales presenta alguna propiedad biológica. Así mismo, sólo un 10% del total de las 250,000 especies vegetales que existen alrededor del mundo han sido investigadas desde el punto de vista químico y/o farmacológico, con la finalidad de caracterizar a sus componentes biodinámicos. Por último, es importante destacar que no obstante la gran biodiversidad del reino vegetal y fúngico, los actinomicetos constituyen las fuentes naturales más exploradas para el descubrimiento de nuevos fármacos (Butler y Newman, 2008; Butler, 2008).

La importancia de los productos naturales radica en que constituyen una fuente valiosa para la obtención de nuevas entidades químicas (NEQs), con una gran diversidad estructural y que han servido como moléculas prototipo para el desarrollo, síntesis o semisíntesis de nuevos fármacos, más eficaces, o bien, con menores efectos tóxicos adversos. Por otro lado, el uso de estos productos en la terapéutica moderna, para el tratamiento y prevención de múltiples enfermedades, ha sido notable (Chin *et al.*, 2006).

Numerosas investigaciones realizadas durante las últimas décadas acerca del origen de los fármacos utilizados en la terapéutica convencional revelaron que, alrededor del 52% de las NEQs presentes en el mercado, son productos naturales, derivados semisintéticos o sustancias sintéticas desarrolladas a partir de productos naturales (Newman *et al.*, 2003; Newman y Cragg, 2007; Füllbeck *et al.*, 2006; Gullo *et al.*, 2006; Chin *et al.*, 2006; Harvey, 2000; Koehn y Carter, 2005; Blunt *et al.*, 2006). Así por ejemplo, los metabolitos secundarios morfina, codeína, papaverina y noscapina, obtenidos a partir de la especie *Papaver somniferum* han permitido el desarrollo de análogos sintéticos y semisintéticos que actualmente se utilizan en la clínica. El hemisuccinato sódico de carbenoxolona, derivado semisintético del ácido glicerretínico presente en el regaliz, se prescribe para el tratamiento de úlceras gástricas y duodenales en varios países (Dewick, 2009; Chin *et al.*, 2006). Finalmente, la aplicación de los métodos modernos de extracción, separación y fraccionamiento, evaluación biológica e identificación y caracterización química, para el descubrimiento de NEQs, ha conllevado al descubrimiento de agentes anticancerígenos novedosos de gran aplicación en la terapéutica moderna, como el paclitaxel, obtenido a partir de *Taxus brevifolia*, y la camptotecina de *Camptotheca acuminata* (Kinghorn, 1994).

La frecuencia de uso de los productos naturales para el tratamiento o prevención de enfermedades se estima con base en el número y/o valor económico de las prescripciones médicas que se realizan en la terapéutica convencional. A partir de estos datos, también es posible estimar la preferencia y efectividad de estos productos. Con base en los parámetros antes descritos, Grifo y colaboradores (1997) refieren que tan sólo en los Estados Unidos de América, el 55% de los fármacos indicados para el tratamiento de diversas patologías como agentes antialérgicos, analgésicos, antiinfecciosos, cardiovasculares y para el tratamiento de algunos padecimientos pulmonares y respiratorios, pertenecen a la categoría de los productos naturales o remedios herbolarios relacionados (Grifo *et al.*, 1997). Otros estudios relacionados indican que los productos naturales y algunos derivados sintéticos contribuyeron con el 40, 24 y 26% de las ventas totales de los 35 fármacos más utilizados en el mundo durante los años 2000, 2001 y 2002, respectivamente. Un ejemplo específico lo constituye el paclitaxel, cuyas ventas mundiales tan sólo en el año 2000 fueron superiores a los 1.6 billones de dólares, y que conjuntamente con su derivado semisintético,

el docetaxel, así como los derivados semisintéticos de la camptotecina, el irinotecan y el topotecan, generaron ventas cercanas a los 3 billones de dólares (Thayer, 2003; Oberlies y Kroll, 2004; Chin *et al.*, 2006).

Algunos estudios realizados durante el periodo comprendido entre los años 1981 y 2001 indicaron que los productos naturales y sus derivados, constituyen el 87% de los fármacos utilizados en la terapéutica moderna como agentes antimicrobianos, anticancerígenos, anticoagulantes, antiparasitarios e inmunosupresores (Newman *et al.*, 2003; Lam, 2007). Finalmente, entre los años 2005 a 2007, 13 nuevos fármacos derivados de productos naturales fueron introducidos exitosamente para el tratamiento de infecciones (bacterianas, fúngicas o parasitosis), cáncer, diabetes, dolor, deficiencias cardiacas y desórdenes psiquiátricos (Butler, 2008) [Tabla 1].

Tabla 1. Fármacos incorporados en los sistemas de salud de numerosos países a partir del año 2005.

Año	Nombre genérico/Marca registrada	Compuesto prototipo	Clasificación	Tratamiento
2005	dronabinol/canabinol (Sativex®)	dronabinol/canabinol	NP	dolor
2005	fumagilina (Flisint®)	fumagilina	NP	parasitosis
2005	doripenem (Finibax®/Doribax™)	tienamicina	NPS	infecciones bacterianas
2005	tigeciclina (Tygacil®)	tetraciclina	NPD	infecciones bacterianas
2005	ziconotide (Prialt®)	ziconotide	NP	dolor
2005	zotarolimus (Endeavor™ stent)	sirolimus	NPD	deficiencias cardiovasculares
2006	anidulafungin (Eraxis™/Ecalta™)	equinocandina B	NPD	micosis
2006	exenatide (Byetta™)	exenatida-4	NP	diabetes
2006	lisdexamfetamina (Vyvanse™)	anfetamina	NPS	desórdenes psiquiátricos
2007	retapamulin (Altabax™/Altagro™)	pleuronutilina	NPD	infecciones bacterianas tópicas
2007	temsirolimus (Torisel™)	sirolimus	NPD	cáncer
2007	trabectedin (Yodndelis™)	trabectedina	NP	cáncer
2007	ixabepilone (Ixemptra™)	epotilona	NPD	cáncer

NP, producto natural; NPD, derivado de producto natural con modificaciones semisintéticas; NPS, compuesto sintético desarrollado con base en un producto natural.

A pesar del éxito económico de los productos naturales en las últimas décadas, la mayoría de las compañías farmacéuticas han disminuido o, en algunos casos, concluido sus programas de investigación enfocados al descubrimiento de NEQs. Si bien no hay datos

concluyentes al respecto, es posible que esta circunstancia provoque una disminución significativa en el número de NEQs. Sin embargo, la constante competencia entre las compañías farmacéuticas por la búsqueda de nuevas moléculas prototipo ha permitido, en los últimos, un resurgimiento en el desarrollo e implementación de técnicas novedosas, sensibles y eficientes que permitan la obtención de nuevas drogas. En este contexto, la química combinatoria y las técnicas de búsqueda de alto rendimiento (HTS por sus siglas en inglés) han sido las herramientas más utilizadas para el descubrimiento de nuevos fármacos.

A pesar de la posición de las industrias farmacéuticas en EE.UU., numerosos grupos de investigación multidisciplinaria han decidido continuar con la búsqueda de NEQs a partir de fuentes naturales y para ello, han desarrollado una serie de aplicaciones tecnológicas, de impacto inmediato, para el descubrimiento de nuevos fármacos. Estos desarrollos novedosos incluyen la mejora y optimización de los procesos de búsqueda de productos naturales, técnicas de aislamiento y fermentación de microorganismos, avances importantes en las metodologías de síntesis orgánica, biosíntesis combinatorial y genómica microbiana (Lam, 2007).

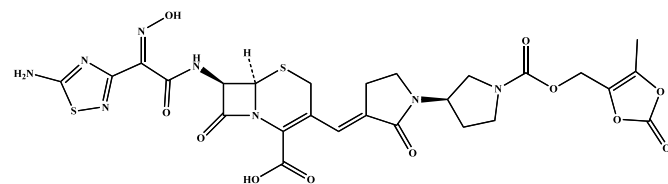
Las plantas terrestres poseen una larga historia y tradición de su uso para el tratamiento de diversas enfermedades humanas, por lo tanto, son numerosas las NEQs de origen vegetal. Especies bien conocidas como el regaliz (*Glycyrrhiza glabra*), la mirra (*Commiphora abyssinica*) y el látex de la amapola (*P. somniferum*) fueron descritas por primera vez desde la época de la Mesopotamia, aproximadamente 2600 A.C. Hoy en día, estas plantas siguen empleándose para el control de algunas enfermedades bajo distintas formas, incluyendo los principios activos puros y sus derivados o en preparados fitofarmacéuticos (Newman *et al.*, 2000).

Por razones históricas, los primeros productos naturales utilizados por el hombre fueron obtenidos a partir de plantas y/o animales. Posteriormente, los compuestos de origen microbiano fueron los que llamaron la atención de la comunidad científica en general, debido al desarrollo de la penicilina, antibiótico útil para el tratamiento de diversas

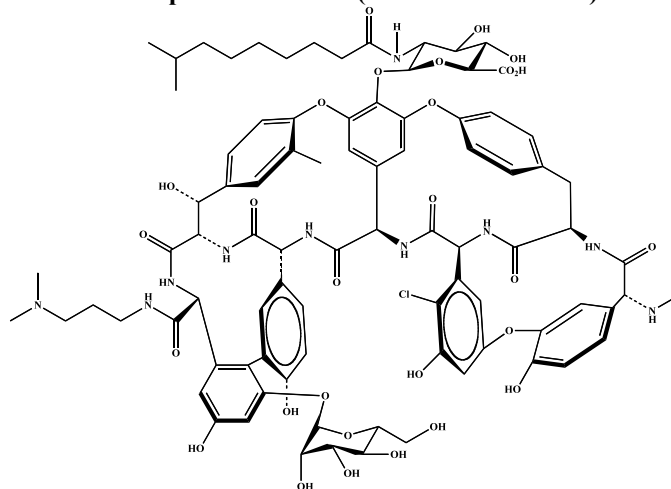
infecciones. Este hallazgo favoreció de manera importante el descubrimiento de nuevos fármacos a partir de microorganismos; entre estos destacan importantes agentes antibacterianos (penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos y tetraciclinas), inmunosupresores (ciclosporina y rapamicina), hipocolesterolemiantes (lovastatina y mevastatina), antihelmínticos (ivermectina), antidiabéticos (acarbose) y anticancerígenos (pentostatina, pelomicina y epirubicina) (Chin *et al.*, 2006; Hoffmeister y Keller, 2007; Butler y Newman, 2008).

Estimaciones recientes han demostrado que aproximadamente el 90% de las formas de vida presentes en la tierra habitan en los océanos, siendo esta la principal razón por la que numerosos grupos de investigación alrededor del mundo han centrado gran parte de sus esfuerzos en la búsqueda de compuestos novedosos a partir de organismos marinos. La gran diversidad biológica encontrada en la mayoría de los ecosistemas marinos (corales, arrecifes, tierras de mar profundo, etc.) se considera más numerosa, compleja e inexplorada que la de los bosques tropicales. Asimismo, es importante señalar que la mayoría de los productos marinos al ser liberados al medio tienden a diluirse rápidamente, por lo que sus efectos suelen presentarse a concentraciones muy pequeñas, y debido a estas características, muchos compuestos de origen marino se encuentran en investigación clínica para el tratamiento de diversos padecimientos que incluyen el cáncer, el dolor crónico, alergias y enfermedades cognitivas, por mencionar algunos (Harvey, 2000; Blunt *et al.*, 2006; Chin *et al.*, 2006; König *et al.*, 2006; Füllbeck *et al.*, 2006). Un grupo destacado de productos marinos lo constituyen los C-nucleósidos esponjouridina y esponjotimidina, metabolitos de la esponja *Cryptotheca crypta*, recolectada en el mar del Caribe. Estos compuestos fueron recientemente aprobados como agentes anticancerígenos (arabinósido de citosina, Ara-C) y antivirales (arabinósido de adenina, Ara-A), años después de su descubrimiento en la década de los 50's (Chin *et al.*, 2006). Este hallazgo ha generado un renovado y creciente interés por explorar el metabolismo secundario de los organismos marinos con la finalidad de obtener NEQs en las últimas décadas.

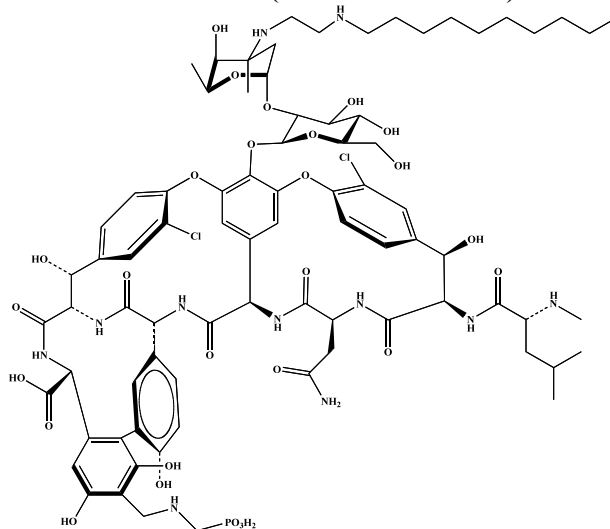
Algunos ejemplos de derivados de productos naturales desarrollados entre los años 2005 y 2008 y que actualmente se encuentran en la fase clínica III de su desarrollo farmacéutico, se muestran en la **Figura 1** (Butler, 2008).



ceftobiprol medocarilo (NPS/antibacteriano)

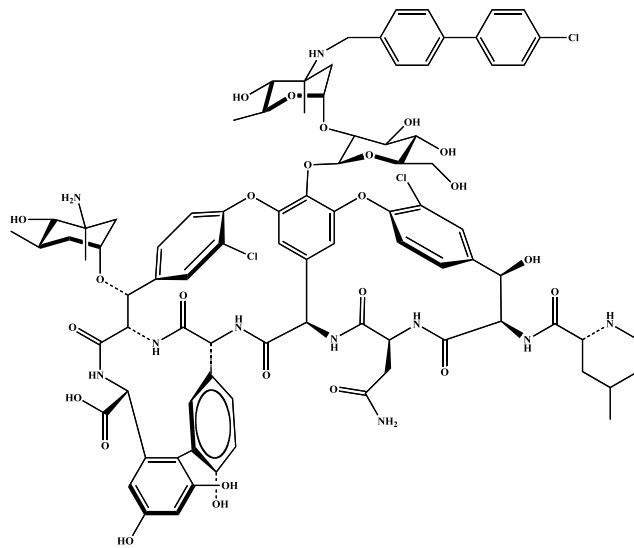


dalbavancina (NPD/antibacteriano)

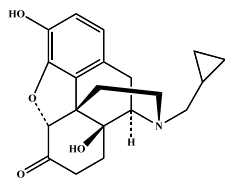


telavancina (NPD/antibacteriano)

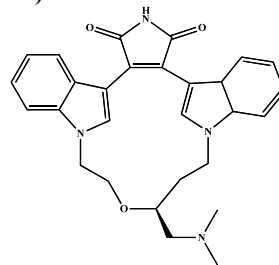
Figura 1. Productos naturales o sus derivados actualmente en fase clínica III de su desarrollo farmacéutico (hasta Marzo de 2008). NP, producto natural; NPD, derivado de producto natural con modificaciones semisintéticas; NPS, compuesto sintético desarrollado con base en un producto natural.



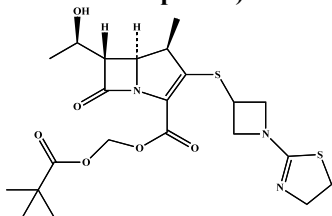
oritavancina (NPD/antibacteriano)



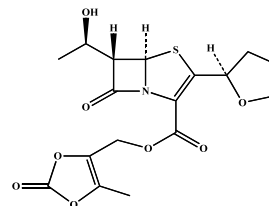
metilnaltrexona (NPS/inductor opioide, dolor y constipación)



ruboxistaurina (NPS/retinopatía [diabetes])



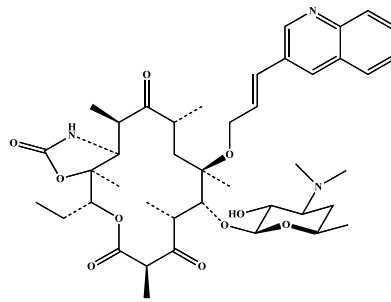
tebipenemo de pivoxilo (NPS/antibacteriano)



daloxato de faropenemo (NPS/antibacteriano)

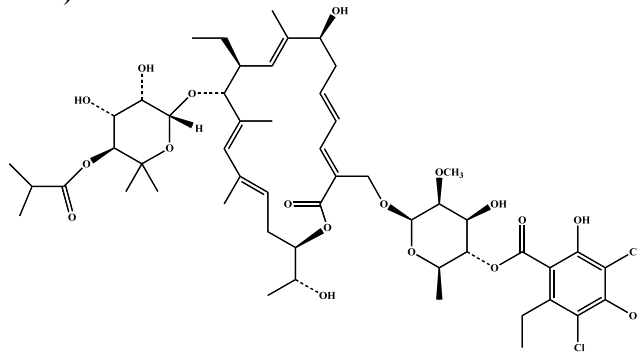
Figura 1 (continuación). Productos naturales o sus derivados actualmente en fase clínica III de su desarrollo farmacéutico (hasta Marzo de 2008). NP, producto natural; NPD, derivado de producto natural con modificaciones semisintéticas; NPS, compuesto sintético desarrollado con base en un producto natural.

ILRWPWWPWRRK-NH₂

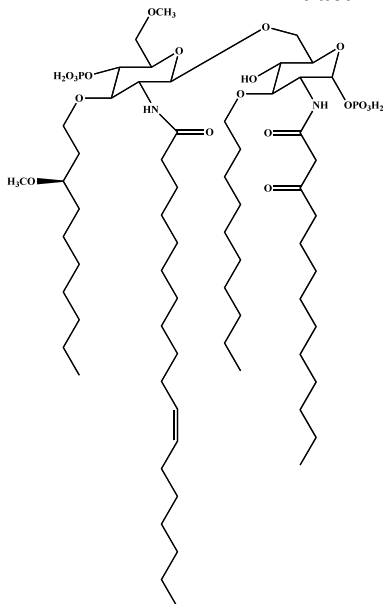


omiganan (NPS/antibacteriano de catéteres y rosácea)

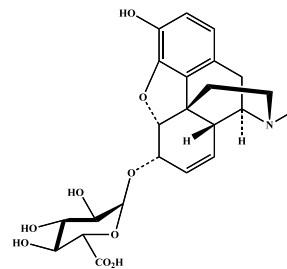
cetromicina (NPD/antibacteriano)



tiacumicina B (NP/antibacteriano)

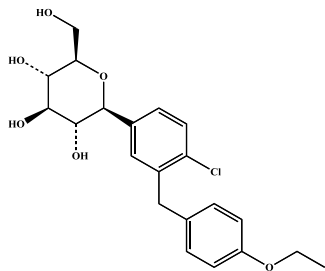


eritoran (NPS/antibacteriano [sepsis])

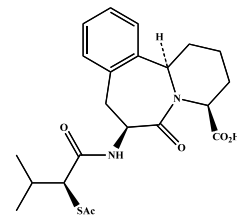


6-glucorónido de la morfina (NPD/dolor)

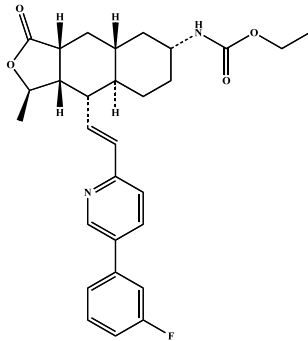
Figura 1 (continuación). Productos naturales o sus derivados actualmente en fase clínica III de su desarrollo farmacéutico (hasta Marzo de 2008). NP, producto natural; NPD, derivado de producto natural con modificaciones semisintéticas; NPS, compuesto sintético desarrollado con base en un producto natural.



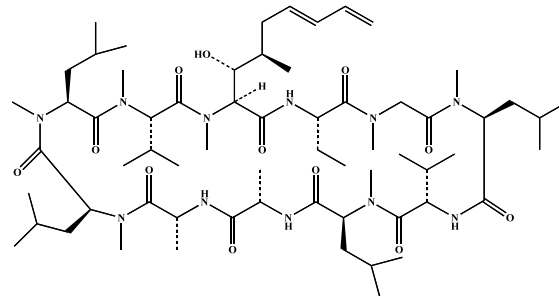
dapagliflozina (NPS/diabetes tipo II)



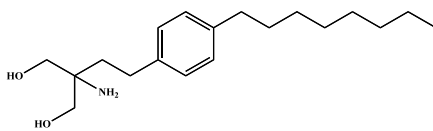
ilepatril (NPS/hipertensión y enfermedades renales)



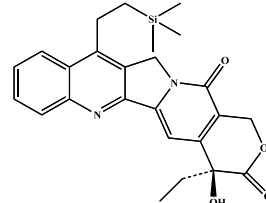
SCH 530348 (NPS/enfermedades cardiovasculares)



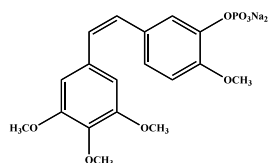
voclosporina (NPD/esclerosis múltiples e inmunosupresor)



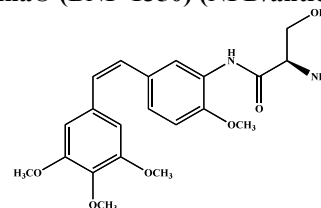
fingolimode (NPS/esclerosis multiples)



Karenitecina® (BNP-1350) (NPD/anticancerígeno)

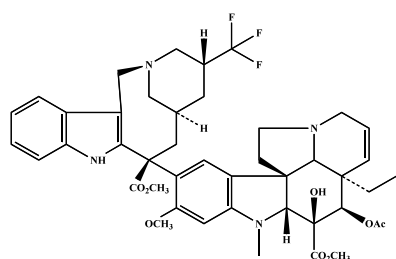


fosfato de combretastatina A-4 (NPD/anticancerígeno)

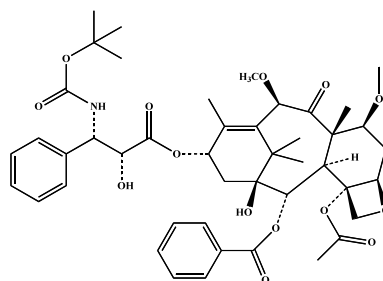


AVE-8062 (NPS/anticancerígeno)

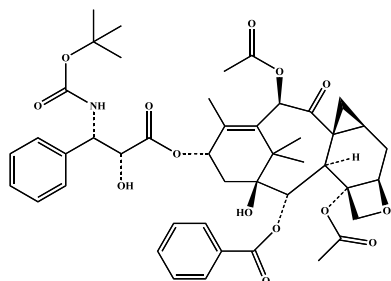
Figura 1 (continuación). Productos naturales o sus derivados actualmente en fase clínica III de su desarrollo farmacéutico (hasta Marzo de 2008). NP, producto natural; NPD, derivado de producto natural con modificaciones semisintéticas; NPS, compuesto sintético desarrollado con base en un producto natural.



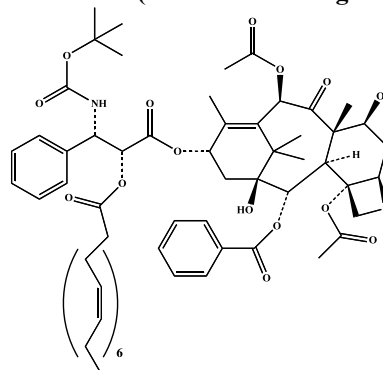
vinflunina (NPD/anticancerígeno)



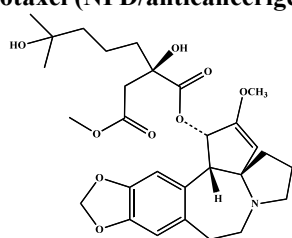
cabazitaxel (NPD/anticancerígeno)



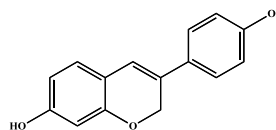
larotaxel (NPD/anticancerígeno)



DHA-paclitaxel (NPD/anticancerígeno)



homoharringtonina (NP/anticancerígeno)



fenoxodiol (NPS/anticancerígeno)

Figura 1 (continuación). Productos naturales o sus derivados actualmente en fase clínica III de su desarrollo farmacéutico (hasta Marzo de 2008). NP, producto natural; NPD, derivado de producto natural con modificaciones semisintéticas; NPS, compuesto sintético desarrollado con base en un producto natural.

Por todo ello, en la presente disertación se consideró importante realizar el estudio de dos organismos fúngicos, uno marino y el otro coprófilo, con la finalidad de contribuir al descubrimiento de NEQs. Este tipo de organismos han sido poco explorados en México a pesar del gran potencial que ofrecen para el desarrollo de nuevos fármacos. Dado que la especie de hongo marino que se analizó en este trabajo es novedosa, se partió de la premisa que los resultados en cuanto al descubrimiento de NEQs podrían ser también inéditos.

2. Antecedentes

2.1 Regulación de la función celular mediada por calcio

El ión calcio (Ca^{2+}) es el principal mensajero intracelular que participa de manera importante en numerosos procesos bioquímicos, tanto en el interior como en el exterior de las células. Así, el incremento en la concentración citosólica de este ión es responsable de la señalización de diversos procesos celulares como son la secreción de sustancias al exterior de las células, contracción del músculo liso, transcripción génica, metabolismo y proliferación celular, por mencionar algunos. Sin embargo, aunque todas estas actividades celulares requieren de Ca^{2+} , no son necesariamente activadas por las mismas cascadas de señales (Hofer, 2005).

Los mecanismos responsables de la regulación del incremento o disminución del Ca^{2+} citosólico se ilustran en la **Figura 2**. De manera general, la entrada de este ión a las células está mediada por el efecto de estímulos externos (estrés osmótico, mecánico u oxidativo, hormonas, mensajeros primarios, temperatura, luz, humedad, ataque de patógenos, fármacos, etc.). Estos estímulos activan a los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje (VOC), los específicos (ROC), los de acción mecánica y, por último los de almacenamiento (SMOC) (Catterall *et al.*, 2003; Maroto *et al.*, 2005; Barritt, 1999; Parekh y Putney, 2005). La liberación del Ca^{2+} , almacenado principalmente en el retículo endoplásmico o sarcoplásmico (ER/SR), se lleva a cabo también mediante la activación de otros canales iónicos y receptores muy específicos, como son el receptor del 1,4,5-trifosfato de inositol (InsP_3R), altamente expresado en todas las células de mamíferos; el de rianodina (RyR), expresado principalmente en neuronas y tejido muscular; y la proteína mediadora de la liberación de Ca^{2+} a través de esfingolípidos (SCaMPER), expresada en algunos tejidos como el músculo cardíaco, páncreas e hígado y cuya función fisiológica aún no es conocida con claridad (Taylor *et al.*, 1999; Fill y Copello, 2002). Por último, existen una serie de mensajeros intracelulares que promueven también la rápida liberación de Ca^{2+} al

citoplasma de las células, como son el 1,4,5-trifosfato de inositol (InsP_3), el difosfato cíclico de la ribosil-adenosina (ADPRc), el difosfato cíclico del ácido nicotínico y la adenosina (NAADPc) y algunos esfingolípidos como el SPC y el S-1-P. Se conocen también una serie de mecanismos por los cuales las células eliminan el Ca^{2+} del citoplasma, estos mecanismos pueden ser mediados por enzimas como las Ca^{2+} -ATPasas presentes en la membrana plasmática (PMCA) y del ER/SR (SERCA) y, los intercambiadores iónicos de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; estos últimos emplean la energía derivada de los gradientes electroquímicos celulares para el transporte de Ca^{2+} al exterior de las células y hacia algunos organelos, como las mitocondrias, que participan en el proceso de homeostasis celular mediante la rápida recaptura de este ión y su subsecuente liberación lenta hacia el citoplasma (Rizzuto *et al.*, 2004). Finalmente, la información contenida en las señales mediadas por Ca^{2+} están moduladas por una serie de sensores o proteínas específicas de unión al catión (CaBPs).

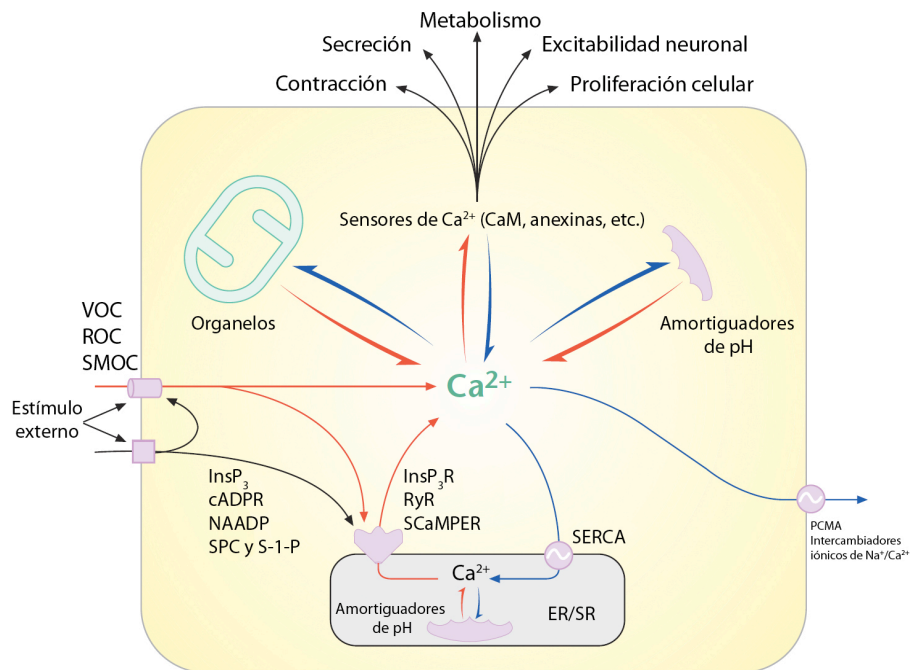


Figura 2. Esquema general de la regulación celular de los niveles del ión Ca^{2+} .

Las CaBPs se clasifican, con base en la homología de sus secuencias y estructura terciaria, en cinco familias principales que incluyen a las anexinas, las de dominio C-2, las pentraxinas, las dependientes de vitamina K y las de dominios EF (α -hélice-asa- α -hélice). Ésta última familia de proteínas tiene un especial interés debido a que participa en la

modulación de la señalización del ión Ca^{2+} en diversos procesos de transcripción, así como en la activación de varias enzimas dependientes de Ca^{2+} . La proteína más relevante, y por lo tanto la que ha sido objeto de numerosos estudios sobre su estructura, regulación e implicaciones farmacológicas es la calmodulina (CaM) (Schwaller, 2005).

2.2 Proteína calmodulina

La CaM es una proteína multifuncional ubicua de unión a Ca^{2+} y el principal sensor biológico de este ión en las células eucariontes. Aunque carece de actividad enzimática, actúa como mediadora en el proceso de señalización regulado por Ca^{2+} hacia muchas otras proteínas presentes en las células. Se estima que la CaM puede interactuar con cerca de 100 diferentes enzimas, para así regular numerosas funciones celulares como son la secreción o liberación de sustancias, metabolismo, motilidad, transducción de señales, crecimiento y división celular, entre otras (Chin y Means, 2000; Schwaller, 2005). Todo ello convierte a la CaM en una proteína esencial para la sobrevivencia de las células; sus niveles de expresión pueden variar considerablemente dependiendo del proceso en los que se encuentre involucrada. En los vertebrados, la codificación de esta proteína se realiza mediante tres genes muy divergentes entre sí, aunque la expresión de la proteína se mantenga idéntica, razón por la cual se le considera también como la proteína presente en organismos multicelulares más conservada y sin mutaciones detectadas hasta el momento (Chin y Means, 2000).

La CaM es una proteína pequeña (17 kDa), compuesta por 148 residuos de aminoácidos (AA), estructuralmente organizados en dos dominios globulares C- y N-terminales que se unen a través de una región relativamente flexible. Cuando la CaM interactúa con el Ca^{2+} (dos átomos por glóbulo), generalmente, su estructura cuaternaria cambia a un estado conformacional en donde expone sus sitios más hidrofóbicos, ricos en metioninas (Met), en la superficie interior de cada uno de sus dominios globulares EF. Así, en presencia de uno de sus blancos moleculares, la CaM adopta una nueva conformación en donde la región flexible entre los dos dominios globulares se encuentra parcialmente desenrollada, completamente doblada y envolviendo al péptido (Kuboniwa *et al.*, 1995; Chattopadhyaya

et al., 1992; Gsponer *et al.*, 2008) [Figura 3]. Cabe destacar que algunos grupos de investigación han reportado que en el proceso de activación del canal de Ca^{2+} por el potasio, la CaM incorpora sólo dos átomos de Ca^{2+} en uno de los dominios EF (Schumacher *et al.*, 2001; Drum *et al.*, 2002).

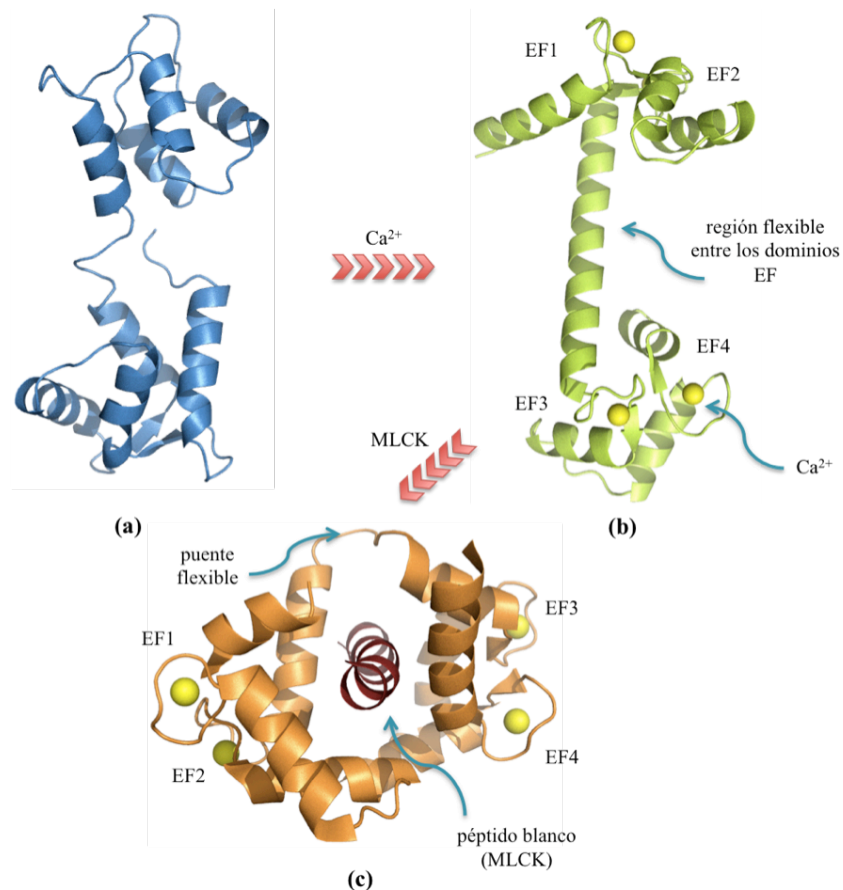


Figura 3. Estructura de la CaM: a) en su forma libre sin Ca^{2+} (apo-CaM); b) unida a cuatro átomos de Ca^{2+} (Ca^{2+} -CaM); y acomplejada con el péptido MLCK (Ca^{2+} -CaM-MLCK) (códigos pdb 1cfd, 1c1l y 2k0f, respectivamente).

Estudios recientes por RMN y cristalografía por difracción de rayos X han permitido establecer que la interacción CaM-péptido puede proceder de distintas formas. Así, en la interacción con el péptido de unión al canal de Ca^{2+} activado por K^{+} , la CaM adopta una conformación extendida sólo por el lóbulo C-terminal (Elshorst *et al.*, 1999; Schumacher *et al.*, 2001; Drum *et al.*, 2002). En el complejo resultante de la unión de esta proteína con el principal sustrato de la proteína cinasa C, un péptido rico en residuos de alanina acilada con ácido mirístico (MARCKS), la CaM adopta una conformación flexible en la que no

participa el lóbulo N-terminal. Cabe mencionar que el MARCKS es un péptido membranal de gran importancia para el desarrollo del SNC (Yamauchi *et al.*, 2003). Al activar a la óxido nítrico sintetasa (NOS) endotelial, la región flexible que une a los dominios globulares adopta una conformación de asa diferente a la convencional (Aoyagi *et al.*, 2003). Frecuentemente, el acoplamiento CaM-péptido se realiza mediante interacciones de tipo hidrofóbicas que involucran a los AA de ambas proteínas, sin embargo, en ocasiones la interacción implica a distintos grupos de AA del péptido blanco. Tal es el caso de un sustrato de la proteína cinasa C (CAP-22/NAP-22) cuyos residuos miristoilos son fundamentales para la unión con la CaM (Matsubara *et al.*, 2004). Otro evento poco común en la interacción de la CaM con sus blancos moleculares es la participación de dos moléculas de CaM. Así, durante la activación de la calcineurina (CNA) en cerebro, además del complejo Ca^{2+} -CaM-CNA clásico, se genera un complejo inusual constituido por la CNA y dos moléculas de CaM con una conformación extendida (Ca^{2+} -2CaM-CNA); las implicaciones fisiológicas de este dímero aún no se conocen (Schumacher *et al.*, 2001; Ye *et al.*, 2006) [Figura 4].

A la fecha se han identificado varias proteínas de unión a CaM (CaMBPs) en el interior de las diversas estructuras celulares y de acuerdo a la afinidad que presentan hacia el ión Ca^{2+} se clasifican en tres grupos generales: enzimas Ca^{2+} dependientes, Ca^{2+} independientes y las inactivadas por este ión que son las menos conocidas. Algunos ejemplos de las CaMBPs dependientes de Ca^{2+} incluyen a las enzimas CNA, NOS, adenilato ciclasa y la cinasa de la miosina de cadena ligera del músculo esquelético (MLCK) localizadas principalmente en el citosol y citoesqueleto. Las CaMBPs no dependientes de Ca^{2+} comprenden un número limitado de proteínas entre las que destacan las miosinas de cadena ligera de tipo II, que se localizan en el citoesqueleto, las neuromodulinas y las neurograninas (O'Day, 2003).

Otra clasificación de las CaMBPs establecida por Chin y colaboradores (2000) las agrupa en seis categorías diferentes con base en su regulación dependiente de la concentración de Ca^{2+} intracelular [Figura 5].

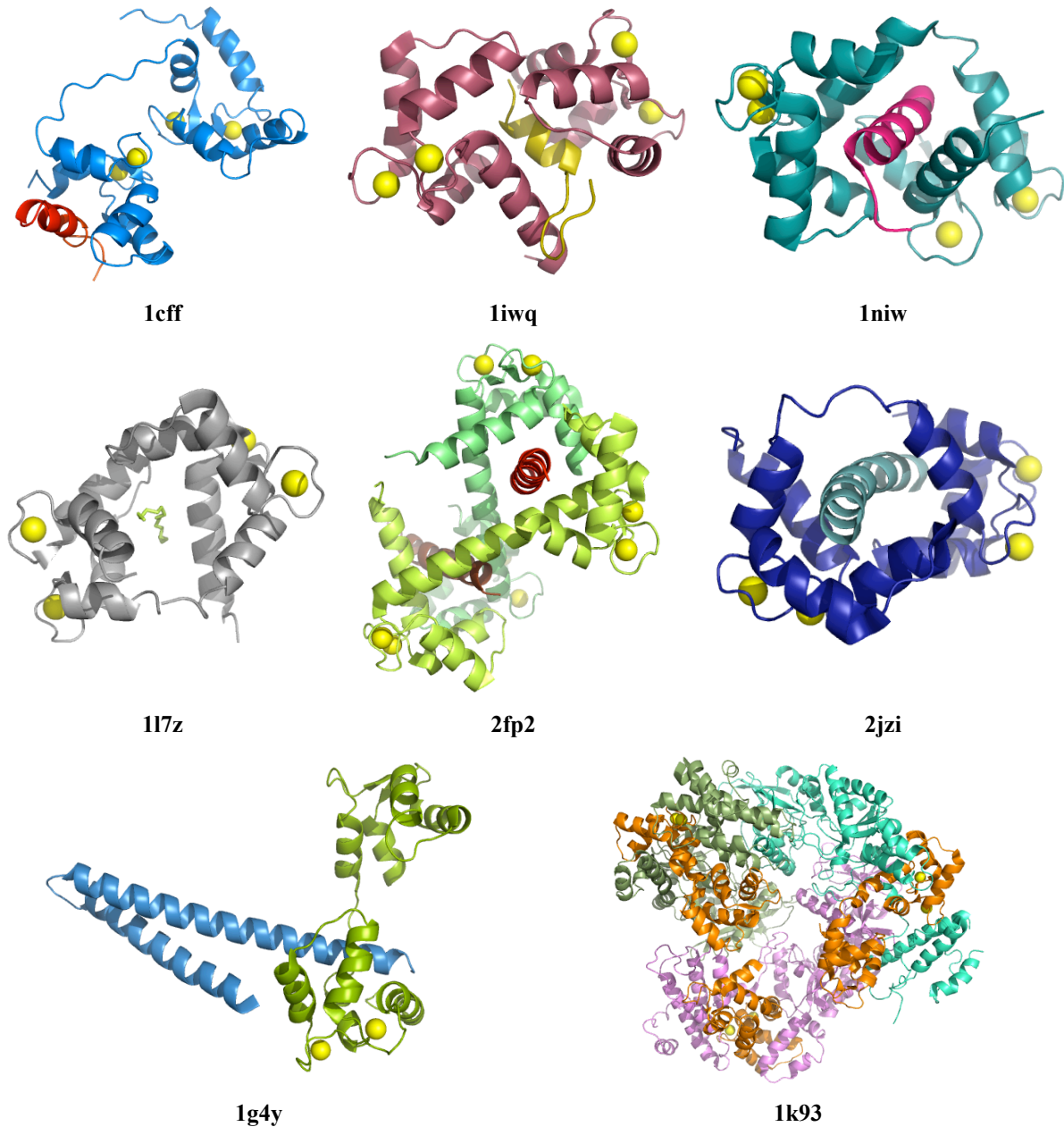


Figura 4. Diferentes conformaciones de unión a péptidos blanco de la CaM.

Estos grupos incluyen a las CaMBPs que participan en la regulación de los receptores acoplados a proteínas G [e.g. receptor metabotrópico de la glutamina 7 (mGluR7); receptores de angiotensina II], y cinasas de la tirosina [e.g. receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)], presentes en la membrana celular; y los de rianodina e InsP₃ presentes en el retículo sarcoplásmico. El segundo conjunto de enzimas son citosólicas y tienen un papel muy relevante en las vías de señalización celular; algunos

ejemplos son la CNA, las cinasas dependientes de CaM (CaMKI-V), las sintetasas del óxido nítrico I y III (NOSI, III) y las fosfodiesterasas 1 y 2 (PDE1, 2), entre otros. El tercer grupo incluye proteínas moduladoras de la motilidad y forma celular como la α -actinina, caldesmona, calponina, la miosina y la MLCK. Los canales iónicos membranales representan el cuarto grupo de proteínas reguladas por CaM e incluye los canales de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . El quinto conjunto incluye a las proteínas involucradas en el metabolismo (Ca²⁺-ATPasas, fosfofructocinasas y NAD cinasas) transcripción (SEF-1, CaMKII, etc.), replicación del ADN (p68) y otros eventos nucleares (p62). Finalmente, se encuentran aquellas proteínas que se asocian a membranas y que participan en funciones como la exocitosis (Rab3 y GTPasa monomérica) y el desarrollo de las células (IQGAP, espectrina y MARCKS).

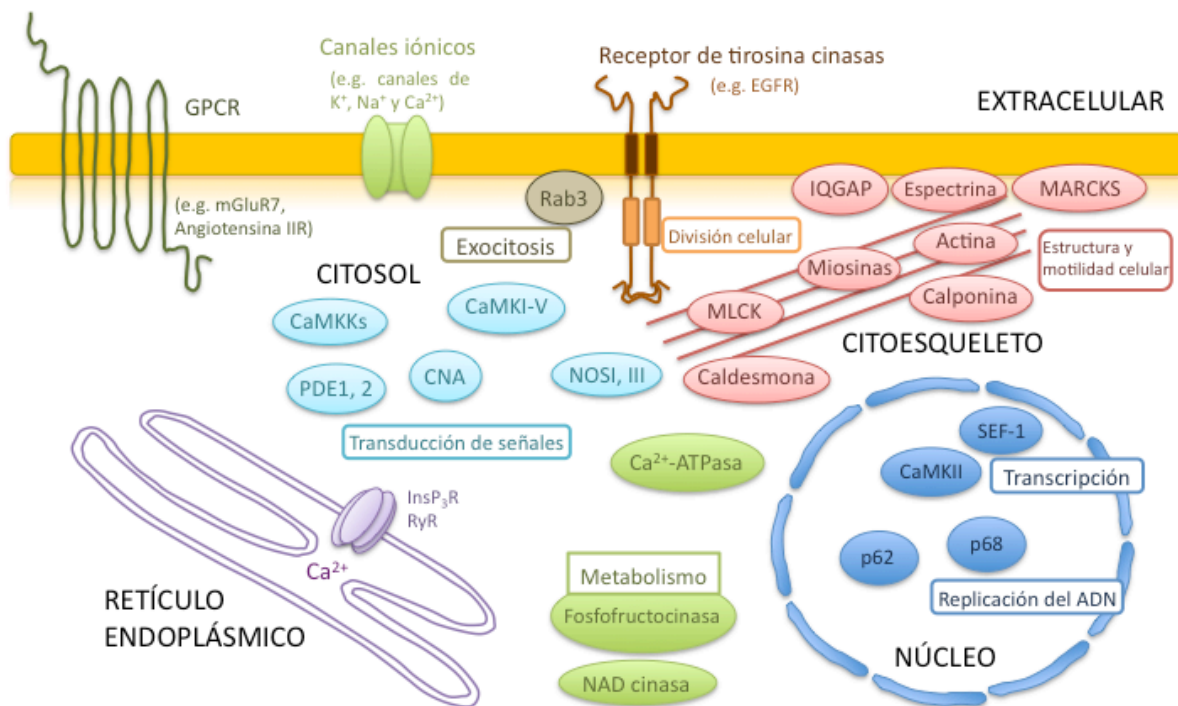


Figura 5. Localización y función de las principales proteínas CaMBPs en la célula.

2.3 Técnicas experimentales utilizadas para la caracterización ligando-CaM

Algunos grupos de investigación han logrado caracterizar la interacción de una serie de compuestos, naturales o sintéticos, con la CaM. Para realizar la evaluación de esta

interacción se han utilizado diversos métodos *in vitro* que incluyen a la cromatografía de afinidad (Molnar *et al.*, 1995; Ovadi, 1989), la proteólisis limitada (Ovadi, 1989), la espectroscopía en el UV y el dicroísmo circular (DC) (Molnar *et al.*, 1995; Harmat *et al.*, 2000; Vertessy *et al.*, 1998), la electroforesis en gel (Leung *et al.*, 1984), la fluorescencia de energía de resonancia (Au *et al.*, 2000; Molnar *et al.*, 1995; Sharma *et al.*, 2005), la resonancia magnética nuclear (RMN) (Zhou *et al.*, 1994; Craven *et al.*, 1996), la difracción por rayos X (Vertessy *et al.*, 1998; Harmat *et al.*, 2000), la mutagénesis dirigida (Odom *et al.*, 1997), estudios teóricos computacionales de modelado molecular (Li *et al.*, 2007) y los ensayos enzimáticos funcionales utilizando diferentes enzimas sensibles a la CaM (Orosz *et al.*, 1988, 1990; Ovadi, 1989; Molnar *et al.*, 1995; Sharma *et al.*, 1997). La enzima dependiente de CaM más utilizada en los ensayos enzimáticos funcionales es la fosfodiesterasa del AMPc (PDE1) aislada a partir de cerebro o de corazón de bovino. La actividad de la enzima PDE1 puede medirse mediante diversos procedimientos que incluyen radioinmunoensayos y técnicas espectrofotométricas. En ambos ensayos la actividad de la enzima se correlaciona con la cantidad de fosfato inorgánico (Pi) generado por la hidrólisis del AMPc en presencia de una nucleotidasa (Sharma y Wang, 1979) [Figura 6].

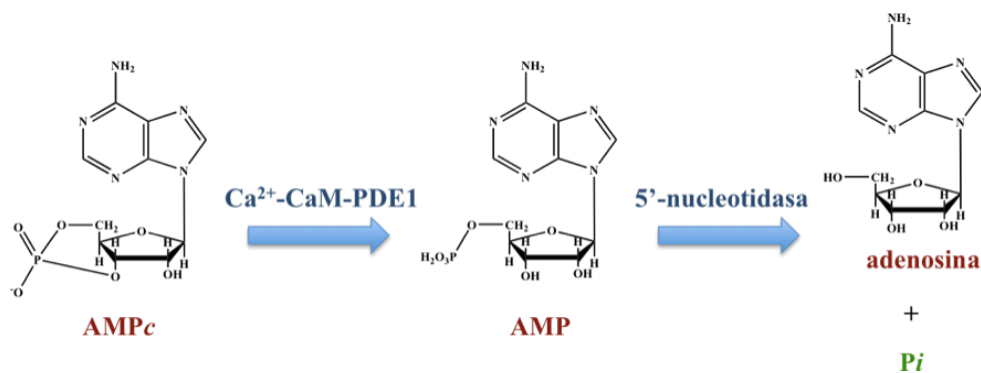


Figura 6. Secuencia de hidrólisis del AMPc por las enzimas PDE1 y 5'-nucleotidasa.

La técnica que involucra a la RMN proporciona información sobre el grado y el tipo de interacción entre un ligando y la proteína, así como la conformación bioactiva del ligando. La utilidad de la técnica se basa en el hecho de que diversos parámetros de la RMN se modifican de manera importante cuando el ligando interacciona con la proteína. Y el estudio comparativo de los espectros de resonancia de las proteínas libres, los ligandos

libres y los complejos formados nos permite obtener la información deseada. Así podemos conocer la estructura molecular, la conformación y la posición dinámica de las proteínas, además, de la estequiometría con la que cada ligando se une a la proteína de interés. El primer paso para cualquier estudio de RMN es la asignación de las señales a cada átomo y este suele ser el paso limitante de toda la operación. La sustitución selectiva de protones, carbonos y nitrógenos por ^2H , ^{13}C y ^{15}N , respectivamente, facilita este proceso. Es muy importante también el estudio de las conectividades espaciales mediante los experimentos NOESY (Nuclear Overhauser Spectroscopy) y ROESY (Rotating-frame Overhauser Spectroscopy), ya que la mayor parte de la información sobre la estructura en disolución viene del análisis de las distancias internucleares NOESY (Zhang *et al.*, 1993; Reid *et al.*, 1990; Ikura *et al.*, 1991; Turjanski *et al.*, 2004; Chou *et al.*, 2001; Osawa *et al.*, 1998).

Los métodos de difracción de rayos X, indudablemente los mejores, permiten determinar la estructura tridimensional de macromoléculas biológicas con resolución atómica (Vertessy *et al.*, 1998; Harmat *et al.*, 2000).

La aplicación de los métodos teóricos al estudio de la interacción de ligandos con proteínas se conoce como modelado molecular, que ha alcanzado en la actualidad su máxima utilidad debido en gran parte a los avances de los programas computacionales. Estos métodos proporcionan energías de interacción ligando-proteína, modo de interacción, cambios conformacionales evidenciados por el ligando o la proteína, así como la formación o destrucción de enlaces de hidrógeno. Entre los métodos teóricos utilizados hoy en día para el estudio de interacciones ligando-proteína se incluyen las minimizaciones de energía, las simulaciones de dinámica y acoplamiento molecular, y las simulaciones de Monte Carlo. Todas estas técnicas ofrecen en última instancia la posibilidad de comprender la interacción entre las proteínas y moléculas orgánicas en términos de fuerzas moleculares (Li *et al.*, 2007).

Las técnicas basadas en la energía de resonancia de fluorescencia son otras de las herramientas analíticas ampliamente utilizadas en la evaluación de la interacción proteína-ligando en solución mediante el uso de compuestos fluorescentes [**Figura 7**], que tienen la

capacidad de unirse específicamente mediante interacciones de tipo no-covalente a la proteína, produciendo una señal de emisión de energía en el espectro de fluorescencia diagnóstica para el complejo proteína-fluoróforos. Posteriormente, la interacción de este complejo con un compuesto antagonista produce una competencia por los mismos sitios de unión, ocasionando así, un cambio en la señal de emisión como consecuencia de la alteración de la energía de fluorescencia del complejo aceptor. Este tipo de experimentos han permitido la caracterización de la imipramina, tioridazina, clozapina, haloperidol, CPZ y TFP como antagonistas de la CaM (Au *et al.*, 2000; Molnar *et al.*, 1995; Sharma *et al.*, 2005).

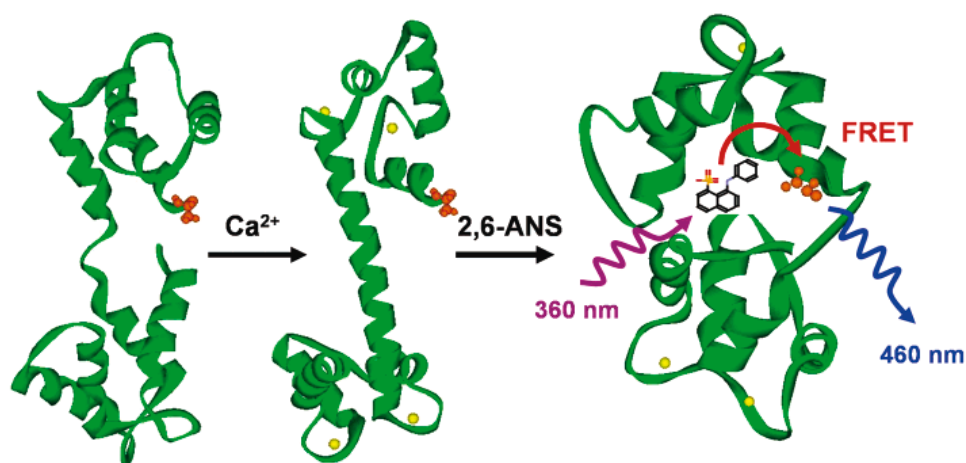


Figura 7. Esquemización de la transferencia de la energía de resonancia de fluorescencia del 2,6-ANS al fluoróforo MDCC ubicado en el C-dominio terminal al interactuar con la CaM.

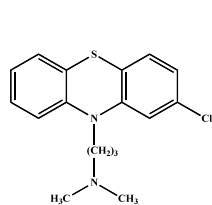
El dicroísmo circular (DC) ha sido de utilidad en el análisis de la interacción ligando-proteína. Los primeros estudios realizados con esta técnica con la fenotiazina TFP permitieron establecer la estequiometría con la que el fármaco se une a la CaM en sus dominios hidrofóbicos. Estos resultados fueron muy similares a los encontrados para el complejo W7-CaM. Otros estudios mediante DC han permitido establecer que la CaM tiene la capacidad de interactuar simultáneamente hasta con dos antagonistas que presenten estructuras químicas diferentes como en el caso de los compuestos TFP y KAR-2 (Molnar *et al.*, 1995; Harmat *et al.*, 2000; Vertessy *et al.*, 1998; Orosz *et al.*, 1999; Horváth *et al.*, 2005; Osawa *et al.*, 1998).

Por último, las técnicas de mutagénesis dirigida representan una herramienta adicional y de particular interés en el conocimiento de los residuos de AA ubicados en los sitios de unión o próximos a éste, y que son esenciales para la activación o la inactivación de la CaM. Así, algunos de los residuos ubicados en las formas helicoidales 2 y 6 han sido establecidos como esenciales para la activación de las enzimas dependientes de CaM. Otros estudios realizados sobre algunos de los residuos de lisina en la proteína, han permitido establecer que las posiciones 75, 77 y 148 de la CaM de cerebro de bovino son los sitios de interacción para antagonistas como la ofiobolina A y algunos de sus derivados (Au *et al.*, 2000; Au y Leung, 1998; Leung *et al.*, 1984 y 1985).

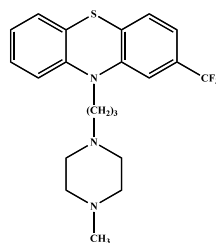
2.4 Inhibidores sintéticos de la CaM

Los productos inhibidores de la CaM de origen sintético pertenecen a las categorías de las fenotiazinas, arilacrilamidas, naftalensulfonamidas y felodipinas, principalmente. Con excepción de los fármacos calmidazolium, 48/80 y la acrilamida AAA, todos los antagonistas se unen a la CaM con una constante de afinidad menor (K_d micromolar) que la observada para la interacción de la CaM con algunos de sus péptidos blanco a nivel molecular (K_d nanomolar). Mediante el empleo de las técnicas de RMN y cristalografía de rayos X se ha logrado la resolución de una serie de complejos ligando- Ca^{2+} -CaM. Algunos inhibidores cocrystalizados con la proteína son la CPZ, TFP, W7, J8, AAA y, más recientemente, un derivado semisintético de la vinblastina, designado con la clave KAR-2. En todos los casos, se ha observado que la región más hidrofóbica de la proteína es el sitio de unión primario y preferido para estos compuestos. Además, se ha determinado que se unen a la CaM con diferente estequiometría, así por ejemplo, cuatro moléculas de TFP, dos W7 y una de KAR-2 pueden cocrystalizarse con la proteína. En el caso de los complejos con TFP, la unión de la segunda, tercera y cuarta molécula del inhibidor ocurre únicamente cuando la proteína ha adoptado una conformación específica inducida por la interacción de la primera molécula en la región más hidrofóbica de la proteína en el dominio C-terminal. Todos estos compuestos inhiben la activación de las enzimas dependientes de CaM de manera dependiente de la concentración y son ampliamente utilizados como herramientas de investigación en los procesos en los que participa la CaM (Craven *et al.*, 1996; Molnar *et*

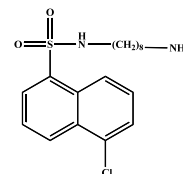
al., 1995; Harmat *et al.*, 2000; Vertessy *et al.*, 1998; Orosz *et al.*, 1999; Horváth *et al.*, 2005; Osawa *et al.*, 1998).



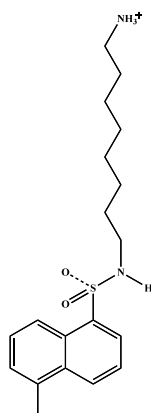
clorpromazina



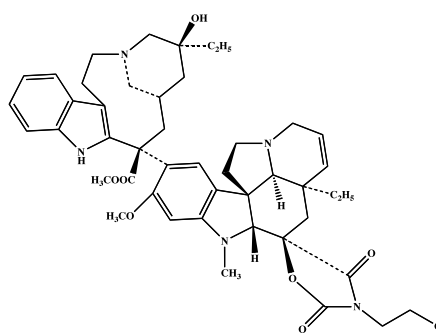
trifluoropiperazina



W7



J8



KAR-2

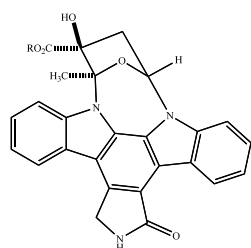
2.5 Productos naturales inhibidores de la CaM

En la literatura científica se describen numerosos compuestos inhibidores de la CaM aislados a partir de diversas fuentes naturales que incluyen plantas, animales y microorganismos (Martínez-Luis *et al.*, 2007). Estos metabolitos presentan una gran diversidad estructural y pertenecen a diferentes categorías de metabolitos secundarios. Los más importantes son alcaloides, terpenoides, cumarinas, antraciclina, antraquinonas, lignanos, estilbenoides, así como flavonoides y otros compuestos fenólicos. Algunos ejemplos selectos de estos compuestos se describen a continuación:

2.5.1 Alcaloides

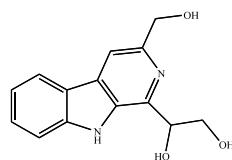
Los alcaloides representan una clase de compuestos con propiedades inhibitoras de la CaM biológicamente importante; estos metabolitos se han aislado a partir de algunos

organismos fúngicos terrestres, organismos marinos de la más diversa naturaleza, actinomicetos y plantas. Los alcaloides antagonistas de la CaM pertenecen a distintas categorías estructurales incluyendo los indol monoterpénoides, indol carbazoles, derivados de β -carbolinas, péptidos, entre otros (Kase *et al.*, 1986; Nakanishi *et al.*, 1986; Matsuda *et al.*, 1988; Kobayashi *et al.*, 1986, 1990a, 1990b y 1991; Abe *et al.*, 1997; Yamada *et al.*, 2002; Pala *et al.*, 1999; Ronca-Testoni *et al.*, 1985; Molnar *et al.*, 1995; Martínez-Luis *et al.*, 2006).

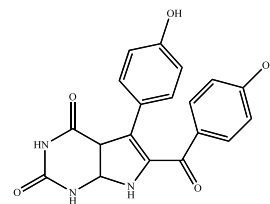


K252-A **R = CH₃**

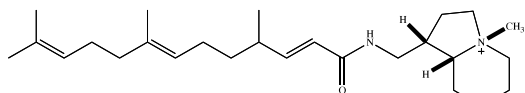
K252-B **R = H**



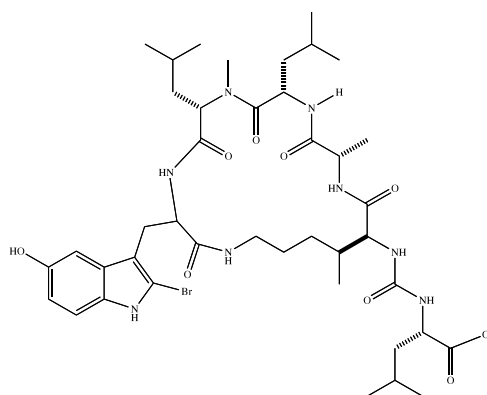
piridindolol



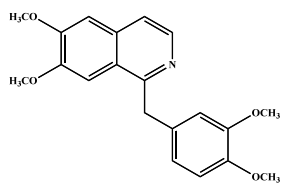
rigidina



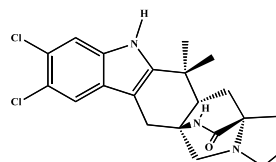
estelatamida A



konbamida



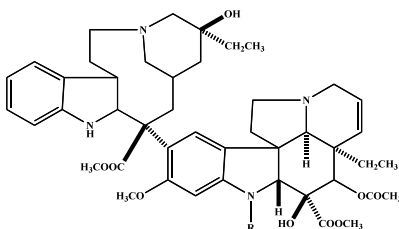
papaverina



malbranqueamida

De estos productos, merecen especial atención por su relevancia en la terapéutica y su potencia como inhibidores de la CaM, los alcaloides vincristina y vinblastina, importantes agentes antitumorales de uso terapéutico aislados a partir de la especie *Catharanthus roseus* y que antagonizan a la CaM de manera dependiente de la concentración del ión Ca^{2+} . La K_d

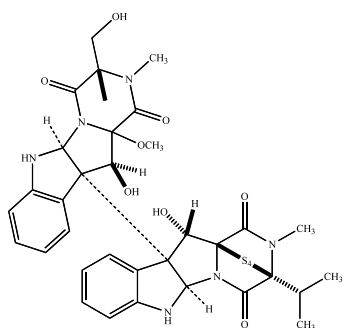
calculada para el complejo CaM-vinblastina es del orden de 3 μM , valor que revela que la afinidad del alcaloide por la CaM es similar a la que muestra por la tubulina (Molnar *et al.*, 1995).



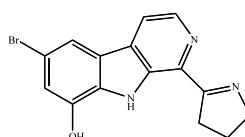
vinblastina R = CH₃

vincristina R = CHO

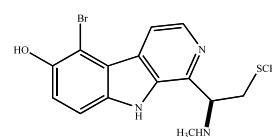
Las β -carbolinas eudistomidinas A y C fueron los primeros antagonistas de la CaM aislados de organismos marinos; presentan una actividad específica sobre la proteína PDE1 aislada de cerebro de bovino y fueron más potentes como inhibidores de la CaM que el antagonista W7 (CI₅₀ 300 μM) (Kobayashi *et al.*, 1986 y 1990a). La leptosina M, producida por la especie fúngica *Leptosphaeria* sp., inhibe entre un 40 y un 70% la actividad de la enzima cinasa III dependiente de CaM (CaMKIII) a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ (Yamada *et al.*, 2002).



leptosina M

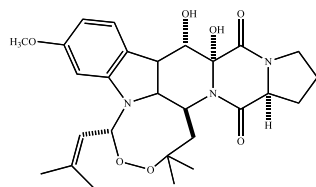


eudistomidina A



eudistomidina B

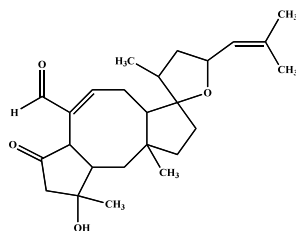
El verruculógeno altera la activación de varias enzimas dependientes de CaM. La interacción directa del compuesto con la CaM se demostró mediante técnicas fluorimétricas comprobándose que el producto provoca el apagamiento de la fluorescencia del complejo N-fenil-1-naftilamina (NPN)-CaM (Pala *et al.*, 1999).



verruculógeno

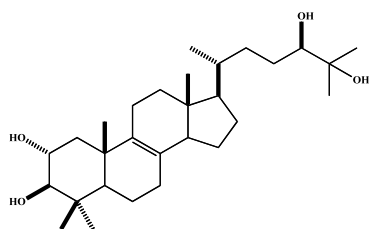
2.5.2 Terpenoides

De algunas especies pertenecientes a los géneros fúngicos *Bipolaris* y *Naematoloma*, así como del género de actinomicetos *Streptomyces* se han aislado varios terpenoides que pertenecen a las categorías de los sesquiterpenoides, sesterterpenoides y triterpenoides principalmente. La ofiobolina A, los ácidos fascicúlicos A-C y el compuesto KS505-A son los más notables. El sesterterpenoide ofiobolina A, es sin duda alguna el producto natural inhibidor de la CaM que más ampliamente ha sido estudiado a la fecha (Leung *et al.*, 1984 y 1985; Au y Leung, 1998). Este metabolito inhibe la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, la actividad de la enzima β -1,3-D-glucano sintetasa y es un antagonista de las calmodulinas de maíz y de cerebro de bovino. La interacción de la ofiobolina A con la CaM se demostró inicialmente a través de experimentos de electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y de inhibición de la actividad de la enzima PDE1 con un valor de CI_{50} de 9 μ M (Leung *et al.*, 1984). Posteriormente se comprobó el efecto anti-CaM mediante el apagamiento de la fluorescencia intrínseca a la tirosina, espectroscopía en el ultravioleta (UV) y experimentos de mutagénesis dirigida sobre los residuos de lisina en las posiciones 75, 77 y 148 de la CaM de cerebro de bovino. Estos experimentos permitieron también comprobar que la interacción proteína-ligando es de tipo covalente y que la estequiometría es 2:1, es decir, dos moléculas de ofiobolina A se unen a cada molécula de CaM a través de los residuos de lisina 75 y 148 (Au y Leung, 1998; Au *et al.*, 2000). Finalmente, en experimentos *in vivo* con plantas de maíz se estableció que el efecto fitotóxico de la ofiobolina A está relacionado, al menos parcialmente, con su actividad anti-CaM, y que ambos efectos son dependientes del tiempo y de tipo irreversible (Evidente *et al.*, 2006).

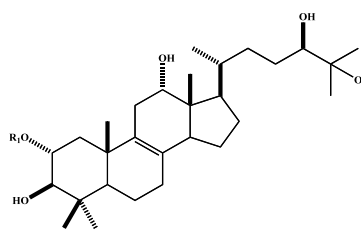


ofiobolina A

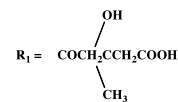
Los ácidos fascicólicos A-C (CI_{50} entre 6.0 y 100.0 μM) aislados a partir de la especie *Naematoloma fasciculare*, fueron caracterizados como potentes inhibidores del complejo CaM-PDE1 (Kubo *et al.*, 1985; Takahashi *et al.*, 1989).



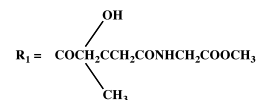
ácido fascicólico A



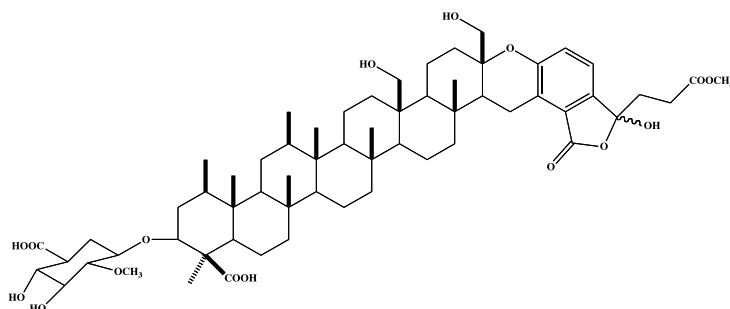
ácido fascicólico B



ácido fascicólico C

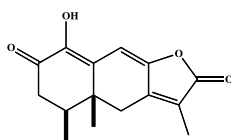


El compuesto KS505-A aislado de la especie *Streptomyces argenteolus* A-2, es un terpenoide con estructura inusual, ya que presenta una unidad del ácido 2-O-metilglucurónido, un esqueleto isoprenoide decacíclico y una función hidroxi- γ -lactona fusionada a un anillo aromático. Este compuesto es un potente inhibidor de los complejos CaM (cerebro y corazón de bovino)-PDE1 con valores de CI_{50} de 0.065 y 1.4 μM , respectivamente. Esta actividad fue comparable a la del calmidazolol (CI_{50} 0.12 μM). De manera adicional, un análisis cinético indicó que KS505-A es un antagonista competitivo de la CaM (K_i 0.089 μM) (Nakanishi *et al.*, 1992; Ichimura *et al.*, 1996).



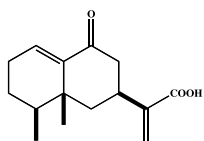
KS505-A

A partir del hongo coprófilo *Malbranchea aurantiaca* se aisló un derivado con núcleo eremofilano que inhibe la activación de la PDE1 con un valor de CI_{50} de $10.2 \mu\text{M}$ (Martínez-Luis *et al.*, 2005). Este compuesto también presentó una actividad inhibitoria significativa sobre el crecimiento y la germinación de la especie *Amaranthus hypochondriacus*. Este efecto fue similar al del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y comparable con la de otros derivados de tipo eremofilano aislados a partir de la especie vegetal *Flourensia cernua*.

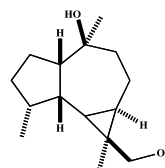


eremofilano

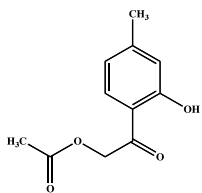
A partir de las plantas *Flourensia cernua* y *Hofmeisteria schaffneri*, fueron aislados los metabolitos ácido dehidroflourénsico y flourensadiol y dos derivados del timol, la hofmeisterina y el acetato de 2'-(2"-hidroxi-4"-metilfenil)-2'-oxoetilo, respectivamente, los cuáles fueron caracterizados como inhibidores de la activación de la enzima PDE1, con valores de CI_{50} de 23.2, 5.2, 4.4 y $4.2 \mu\text{M}$, respectivamente. Estos metabolitos también afectan de manera significativa la movilidad electroforética de la CaM en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Mata *et al.*, 2003a; Pérez-Vásquez *et al.*, 2005).



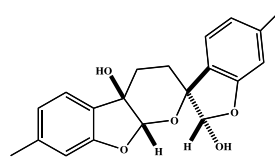
ácido dehidroflourénsico



flourensadiol

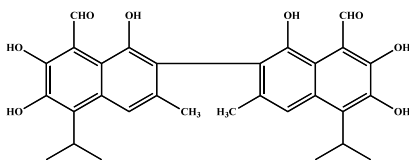


acetato de 2'-(2''-hidroxi-4''-metilfenil)-2'-oxoetilo

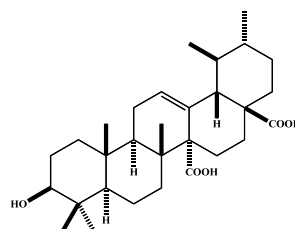


hofmeisterina

Otros terpenoides de interés aislados a partir de plantas son el sesquiterpenoide gospol, así como el ácido quinóvico y su correspondiente derivado glucosídico. Estos metabolitos fueron aislados a partir de las especies *Gossypium* spp. y *Mitragyna stipulosa*, respectivamente. El gospol inhibe a las enzimas Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática de espermatozoides humanos y Ser/Thr fosfatasa dependiente de Ca^{2+} -CaM; esta última enzima es clave en la modulación de varios efectos mediados por la ciclosporina A (CsA) y el tacrolimus (FK506) (Roufogalis *et al.*, 1999). El ácido quinóvico y su glucósido son potentes inhibidores de la PDE1, con valores de CI_{50} de 0.166 y 0.374 μM , respectivamente (Fatima *et al.*, 2002).



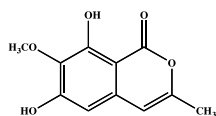
gospol



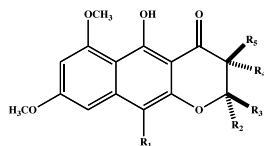
ácido quinóvico

2.5.3 Cumarinas y derivados de γ -pironas

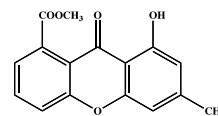
De los hongos *Streptoverticillium album* K251 y *Guanomyces polythrix* fueron aislados los metabolitos reticulol y una serie de γ -pironas (naftopironas y una xantona), respectivamente. Todos estos metabolitos fueron caracterizados como potentes inhibidores del complejo CaM-PDE1 mediante ensayos enzimáticos y experimentos de electroforesis. Estudios por cromatografía de afinidad de los metabolitos aislados de *G. polythrix* permitieron establecer la naturaleza irreversible de la interacción con la CaM (Macías *et al.*, 2000 y 2001; Mata *et al.*, 2003b).



reticulol

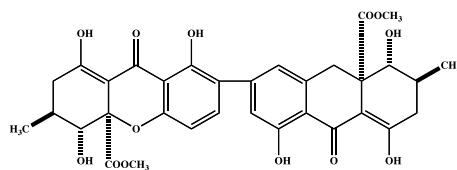


naftopironas



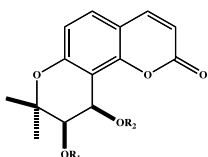
xantona

El ácido secalónico, aislado de la especie *Penicillium oxalicum*, es otra xantona que inhibe la activación de la PDE1 de manera dependiente de la concentración con un valor de CI_{50} de 45.0 μM (Pala *et al.*, 1999).

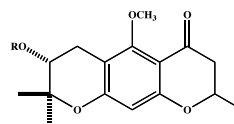


ácido secalónico

Finalmente, de la especie *Prionosciadium watsoni* se aislaron una serie de piranocumarinas y γ -pironas que presentaron una actividad fitotóxica significativa contra las especies arvenses *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crus-galli* y *Lemna paucicostata*. Estos productos también retardan la movilidad electroforética de las CaMs de espinaca y de cerebro de bovino (Valencia *et al.*, 2002).



piranocumarinas

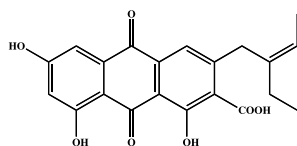


γ -pironas

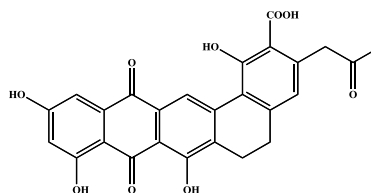
2.5.4 Antraciclinas y antraquinonas

A partir de un aislamiento de las especies *Micromonospora olivasterospora* y *Streptomyces californicus* se obtuvieron las antraquinonas K259-2 y KS619-1, respectivamente. Estos metabolitos son inhibidores inespecíficos de la activación de las PDE1s de cerebro y de corazón de bovino. Los valores de CI_{50} para el compuesto K259-2 fueron de 6.6 y 2.9 μM , respectivamente. En el caso del compuesto KS619-1 estos valores

fueron de 2.0 y 1.5 μM , respectivamente (Yasuzawa *et al.*, 1987; Matsuda y Kase, 1987; Matsuda *et al.*, 1990).

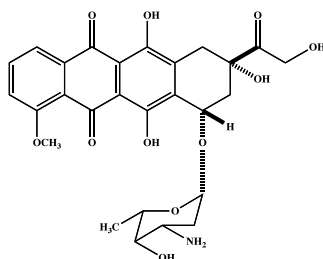


K259-2



KS619-1

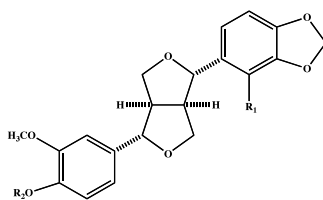
La adriamicina, una antraciclina utilizada en la terapéutica del cáncer, obtenida de algunas especies del género *Streptomyces*, es un inhibidor débil de la CaM; su glicósido se une a la región hidrofóbica de la proteína (Matsuda y Kase, 1987).



adriamicina

2.5.5 Lignanós

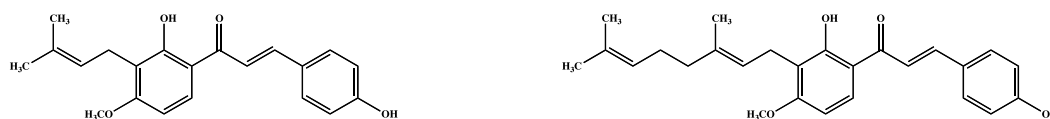
Los lignanos del tipo furofurano de *Leucophyllum ambiguum* inhiben la activación de la enzima PDE1, con valores de CI_{50} entre 5.6 y 14.4 μM . De manera adicional, la interacción de estos compuestos con la CaM se determinó mediante experimentos de electroforesis. Los resultados obtenidos en estos experimentos permitieron establecer que los lignanos estudiados retardan de manera significativa la movilidad electroforética de la CaM (Rojas *et al.*, 2003).



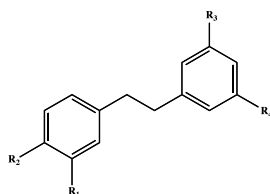
lignanos del tipo furofurano

2.5.6 Estilbenoides y derivados

Los estilbenoides (bibencilos, fenantrenos y estilbenos) que inhiben a la CaM, se han obtenido de la briofita *Radula kojana* (Azakawa *et al.*, 1991) y de varias especies de orquídeas mexicanas que incluyen *Epidendrum rigidum*, *Scaphyglottis livida* y *Nidema boothii*. Los productos de las orquídeas son además relajantes de la musculatura lisa y potentes agentes fitotóxicos. En un estudio realizado por Hernández-Romero y colaboradores (2004) se comprobó que el bibencilo gigantol potencia el efecto relajante de la musculatura lisa provocado por la CPZ. Este efecto sinérgico permitió proponer que uno de los blancos de acción del efecto espasmolítico ejercido por los bibencilos es la CaM, debido a que esta proteína participa en distintas etapas del proceso de contracción-relajación del músculo liso.



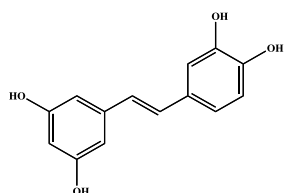
estilbenoides de *Radula kojana*



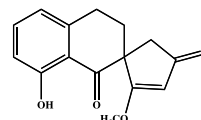
bibencilos

Otros estilbenoides que inhiben a la CaM son la nidemona aislada de la orquídea *N. boothii* y el piceatanol, ampliamente distribuido en el reino vegetal. Estos compuestos inhiben la activación de la PDE1 sin afectar la actividad basal de la enzima. Cabe mencionar que el

piceatanol también es un importante inhibidor de las enzimas MLCK y CDPK (Hernández-Romero *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 1998).



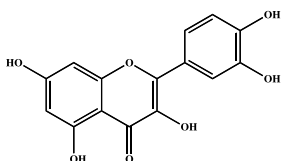
piceatanol



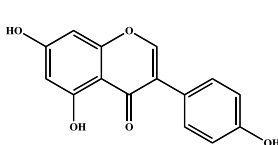
nidemona

2.5.7 Flavonoides y otros compuestos aromáticos

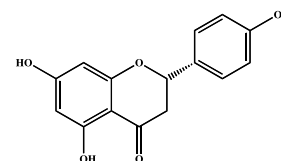
Los flavonoides quercetina, genisteína, naringenina y un glucósido derivado de la rutina son inhibidores de la actividad de la PDE1 de cerebro de bovino de una manera dependiente de la concentración. De manera adicional, se demostró que la quercetina produce un apagamiento de casi el 100% de la fluorescencia intrínseca de la CaM inducida por la NPN, a una concentración de 50 μM . Por otra parte, experimentos realizados con la quercetina marcada isotópicamente con ^{14}C han podido confirmar el sitio de unión del compuesto al complejo Ca^{2+} -CaM (Nishino *et al.*, 1984).



quercetina



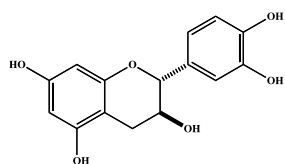
genisteína



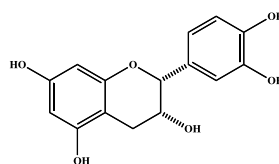
naringenina

Los flavan-3-oles catequina y *epi*-catequina, las isoflavonas tectorigenina y daidzeina, las chalconas 4-hidroxicloridrina y el xantangelol, así como el ácido caféico inhiben las propiedades moduladoras de la CaM ya que el tratamiento del complejo CaM-PDE1 con diferentes concentraciones de los productos provocó la inhibición de la hidrólisis del AMPc (Paliyath y Poovaiah, 1985; Goto *et al.*, 1987). De estos metabolitos, la 4-hidroxicloridrina y el xantangelol de *Angelica keiskei* resultaron los más potentes, con valores de CI_{50} de 1.0 y 0.5 μM , respectivamente. Posteriormente, la interacción de estos compuestos con la CaM se comprobó mediante el empleo de técnicas de fluorescencia (Okuyama *et al.*, 1991). Cabe

mencionar que los flavan-3-oles descritos son inhibidores inespecíficos de la CaM ya que afectan de manera significativa la actividad basal de la enzima PDE1.

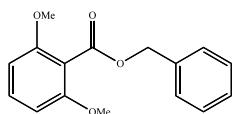


catequina

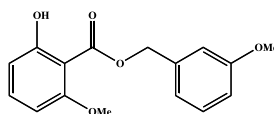


epi-catequina

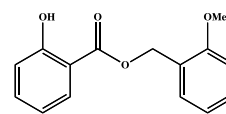
Otro grupo de compuestos que inhiben la activación de la PDE1 de manera dependiente de la concentración son los benzoatos de bencilo 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo, 2-hidroxi-6-metoxibenzoato de 3'-metoxibencilo y 2-hidroxi-benzoato de 2'-metoxi-bencilo de *Brickellia veronicifolia*. Estos metabolitos presentaron valores de CI_{50} de 10.6, 12.3 y 14.6 μM , respectivamente (Rivero-Cruz *et al.*, 2006 y 2007).



2,6-dimetoxibenzoato de bencilo



2-hidroxi-6-metoxibenzoato de 3'-metoxibencilo

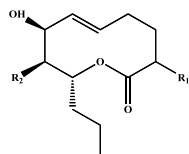


2-hidroxi-benzoato de 2'-metoxi-bencilo

Otros compuestos aromáticos simples como los ácidos clorogénico, vainillico, ferúlico, gentísico, *trans*-cinámico, fenilacético y *o*-cumárico, sin embargo, son inactivos; los valores de sus CI_{50} son mayores a 500 μM en el ensayo de la PDE1 (Paliyath y Poovaiah, 1985).

2.5.8 Compuestos varios

Las herbaruminas I y II, nonenólidas fitotóxicas aisladas del hongo *Phoma herbarum* interactúan con la CaM de cerebro de bovino alterando no solo la movilidad electroforética de la proteína, sino también la actividad de la PDE1 con valores de CI_{50} de 14.2 y 6.6 μM , respectivamente (Rivero-Cruz *et al.*, 2003).



herbarumina I $R_1=H, R_2=OH$

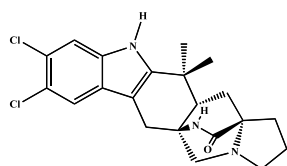
herbarumina II $R_1=OH, R_2=OH$

2.6 Antecedentes de la especie fúngica *Malbranchea aurantiaca* Sigler & Carmich (Myxotrichaceae)

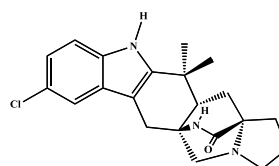
Malbranchea aurantiaca es un hongo coprófilo que pertenece a la familia Myxotrichaceae. La especie está ampliamente distribuida y se ha aislado a partir del suelo o excremento de animales en la India, Centro América, Australia, Estados Unidos de Norteamérica y Bélgica. Tres de las especies del género *Malbranchea*, han sido investigadas desde el punto de vista químico: *M. cinnamomea*, *M. filamentosa* y *M. pulchella*. Estos estudios han permitido el aislamiento y la caracterización de varios compuestos pertenecientes a las categorías de las benzoquinonas, hidroquinonas, benzofuranos y otros compuestos aromáticos (Saito *et al.*, 1979; Chiung *et al.*, 1994; Schlegel *et al.*, 2003a y b; Hosoe *et al.*, 2005).

La especie *M. aurantiaca* ha sido objeto de dos estudios previos realizados en nuestro grupo de trabajo. Estos análisis condujeron al aislamiento y purificación de siete metabolitos secundarios caracterizados como el ergosterol, los ácidos penicílico, linoleico y oleico, la 1-hidroxi-2-oxoeremofil-1(10),7(11),8(9)-trien-12(8)-ólida y los alcaloides indolmonoterpenoides malbranqueamida e isomalbranqueamida B. Estos alcaloides presentan una potente actividad inhibidora de la germinación y el crecimiento radicular de semillas de *A. hypochondriacus*. De manera adicional, estos compuestos inhiben la activación de la enzima PDE1 de manera dependiente de la concentración. Un análisis cinético de la inhibición de la actividad de la PDE1 indicó que la malbranqueamida es un antagonista competitivo de la proteína, y que actúa compitiendo con la formación del complejo activo Ca^{2+} -CaM-PDE1. Por último, este compuesto también presentó un efecto antibrasinoesteroide significativo al inhibir de manera competitiva el efecto de los

brasinoesteroides en las hojas de trigo (Martínez-Luis *et al.*, 2005 y 2006; Madariaga-Mazón, 2007).



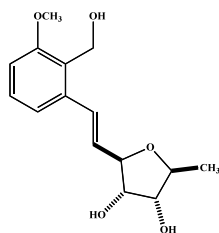
malbranqueamida



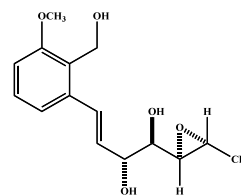
isomalbranqueamida B

2.7 Antecedentes de la especie fúngica *Emericella* 25379 (Trichocomaceae)

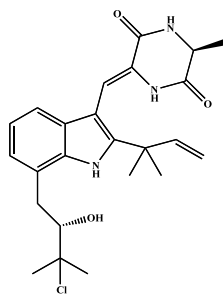
El género *Emericella* representa el estado de reproducción sexual del género *Aspergillus* (Pitt *et al.*, 2000). Los estudios químicos realizados sobre varias especies del género han permitido el aislamiento de una gran cantidad de metabolitos secundarios, con una amplia variedad de estructuras químicas y actividades biológicas que representan cabezas de serie para la síntesis y el desarrollo de nuevos principios biodinámicos. La especie *E. varicolor* es la que ha recibido una mayor atención desde el punto de vista químico. Así, los estudios de diferentes aislamientos de este hongo han permitido la obtención y la caracterización de una serie de compuestos citotóxicos derivados de la varicolorquinona (Malmstrom *et al.*, 2002). Otros compuestos aislados y caracterizados a partir de esta especie son las varicolorinas A-L, alcaloides con núcleo isoequinulina, que presentan una actividad antioxidante significativa como captadores de radicales libres (Wang *et al.*, 2007), sesterterpenos derivados de la ofiobolina, numerosas xantonas y meroterpenoides con propiedades citotóxicas (Wei *et al.*, 2004; Pornpakakul *et al.*, 2006).



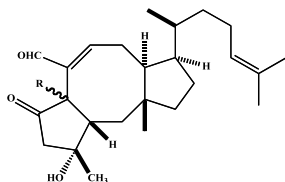
varitriol



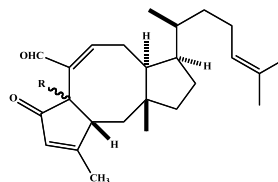
varioxirano



varicolorina F

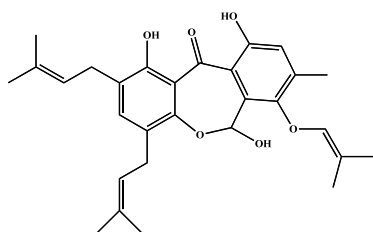


6-epi-ofiobolina C

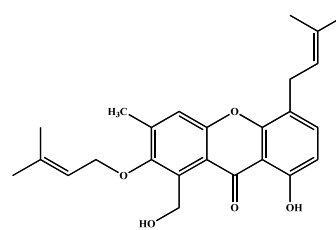


6-epi-ofiobolina G

De *E. nidulans*, se aislaron una serie de compuestos citotóxicos, las arugosinas (A-H). De manera adicional, algunos derivados de xantonas y alcaloides de tipo indólicos han sido caracterizados de esta especie (Kralj *et al.*, 2006).

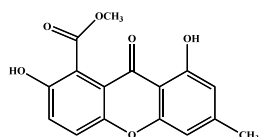


arugosina G

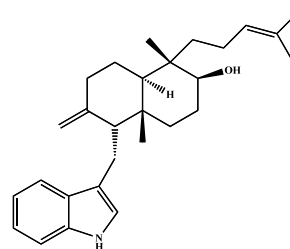


emerlicina

De la especie *E. cuadrilineata* se obtuvieron algunos derivados de xantonas y alcaloides con propiedades inmunoestimulantes y tremorgénicas, respectivamente (Fujimoto *et al.*, 2006).

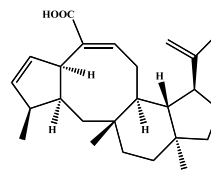
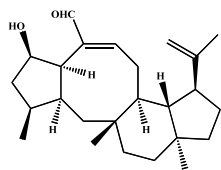


derivados de xantonas



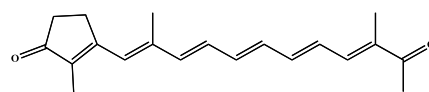
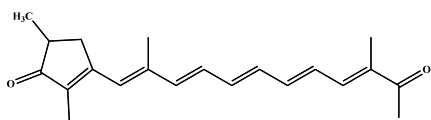
derivados de alcaloides

De *E. aurantiobrunnea* se identificaron algunos derivados de la variecolina. Estos metabolitos se unen a los receptores CCR5 que representan blancos de acción novedosos para el tratamiento de pacientes con VIH (Yoganathan *et al.*, 2004).



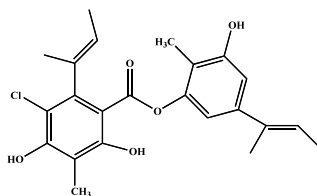
derivados de variecolina

De los aislamientos de *E. falconensis* y *E. fruticulosa* se obtuvieron los policétidos falconenonas que son potentes agentes antioxidantes y citotóxicos (Takahashi *et al.*, 2000).



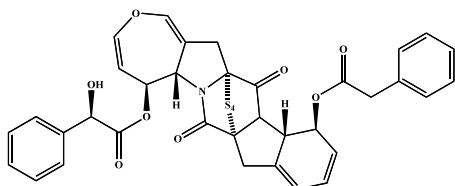
policétidos falconenonas

E. unguis biosintetiza una serie de dépsidos y depsidonas incluyendo el guisinol y las emeguisinas (A-C). Otro grupo de compuestos aislados y caracterizados de esta especie son una serie de ftálicas con actividad antibacteriana significativa (Nielsen *et al.*, 1999).

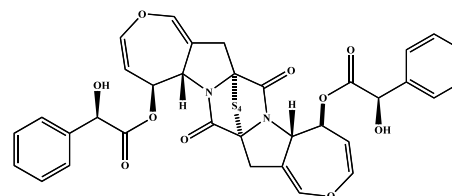


guisinol

E. heterothallica y *E. striata* producen las epipolítiodioxopiperazinas emetalicinas (B-D). Estos metabolitos son importantes agentes antihistamínicos que inhiben de manera significativa la liberación de histamina (Kawahara *et al.*, 1990).

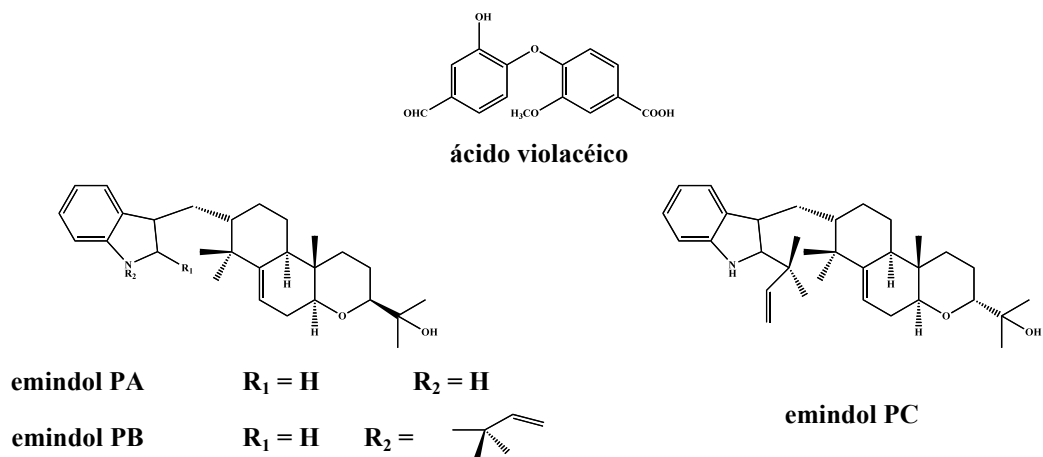


emetalicina B



emetalicina D

Los estudios químicos de *E. violacea* y *E. purpurea*, condujeron al aislamiento de una serie de bifenilos derivados del ácido violacéico y los alcaloides emindoles (PA-PC) (Yamazaki y Maebayashi, 1982; Hosoe *et al.*, 2006).



Otras especies estudiadas son *E. rugulosa*, *E. astellata*, *E. nidulans* y *E. venezuelensis*, únicas del género que biosintetizan aflatoxinas (Frisvad y Samson, 2004).

La especie *Emericella 25379*, objeto de estudio del presente trabajo es una especie fúngica de origen marino novedosa cuya clasificación taxonómica se encuentra en proceso. La especie se considera novedosa porque la secuencia de nucleótidos de su región 16S ribosomal es distinta a la de todas las otras especies del género descritas a la fecha. Obviamente, desde el punto de vista químico la especie no ha sido objeto de estudio alguno.

3. Justificación y objetivos

Actualmente, la búsqueda de productos naturales novedosos con actividad inhibitoria sobre la CaM ha cobrado un renovado interés debido a las implicaciones farmacológicas derivadas de los distintos procesos que regula la proteína como son la secreción de sustancias al exterior de las células, contracción del músculo liso, transcripción génica, metabolismo y proliferación celular, por mencionar algunos. De tal forma que algunos inhibidores de la CaM son fármacos de uso terapéutico como es el caso de las fenotiazinas o los alcaloides del cataranto. Otros, como la ofobiolina, son inhibidores del crecimiento vegetal, y por lo tanto agentes herbicidas potenciales. Así mismo, los inhibidores de la CaM constituyen también importantes herramientas de investigación, como en el caso del W-7 y la ofobiolina, que permiten el estudio de las funciones biológicas y fisiológicas reguladas por CaM y contribuyen al conocimiento de las interacciones CaM-ligando desde el punto de vista funcional y conformacional.

La gran biodiversidad de hongos en México, prácticamente inexplorada como fuentes de agentes biodinámicos, constituye un punto de partida valioso para el descubrimiento de nuevos inhibidores de la proteína reguladora CaM. Las investigaciones químicas y biológicas conducidas sobre varias especies fúngicas en nuestro grupo de trabajo han permitido evidenciar que los hongos microscópicos constituyen una fuente inestimable de productos naturales con un efecto inhibitorio importante sobre la CaM. Los metabolitos aislados incluyen un número considerable de compuestos con propiedades anti-CaM entre los que destacan los policétidos de tipo nonenólida aislados de la especie *Phoma herbarum*, las γ -pironas de *Guanomyces polythrix* y el alcaloide malbranqueamida de *Malbranchea aurantiaca*. Los compuestos antes mencionados son NEQs, lo cual podría incidir de manera favorable en el hallazgo de nuevos fármacos o pesticidas cuyo blanco de acción sea la proteína CaM.

Cabe destacar que durante el estudio de *M. aurantiaca* se detectaron otros alcaloides minoritarios, posiblemente análogos estructurales considerando el metabolismo tipo

rejilla tan frecuente en los organismos fúngicos, y que potencialmente son inhibidores de la CaM.

Con base en las consideraciones anteriores el objetivo primordial del presente trabajo es caracterizar nuevos inhibidores de la CaM a partir de las especies fúngicas *Malbranchea aurantiaca* y *Emericella 25379* con la finalidad de contribuir al descubrimiento de nuevos fármacos, pesticidas y/o herramientas de investigación potenciales.

Para el cumplimiento del objetivo principal propuesto, se formularon los siguientes objetivos específicos:

- a) Establecer las mejores condiciones para la fermentación de los organismos fúngicos que permitan la obtención de los compuestos de interés.
- b) Obtener los productos naturales bioactivos a partir de los medios de fermentación mediante la aplicación de los procedimientos convencionales.
- c) Evaluar el efecto de los productos naturales y, en lo posible, de análogos sintéticos sobre las propiedades moduladoras de la CaM, utilizando un ensayo enzimático funcional que emplea como enzima monitora a la PDE1.
- d) Determinar la estructura molecular de los compuestos activos mediante el uso de técnicas espectroscópicas, espectrométricas, quiroópticas, y de modelado molecular.
- e) Corroborar la interacción de los metabolitos con la CaM mediante el empleo de las técnicas de RMN y fluorescencia.
- f) Establecer el sitio de unión del ligando mediante la evaluación de las interacciones ligando-receptor utilizando técnicas *in silico* que incluyen métodos de acoplamiento molecular y dinámica molecular.

4. Parte experimental

4.1 Material fúngico

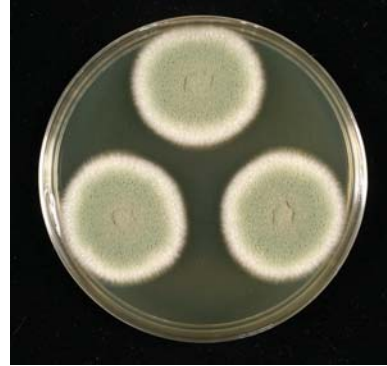
El hongo *Emericella* 25379 (Trichocomaceae) se aisló a partir de la superficie de un coral blando (*Pacifigorgia rutilia*) recolectado en las Islas Marietas, localizadas en Puerto Vallarta, estado de Jalisco, México, en el año 2006 [Figura 8]. La especie fúngica *Malbranchea aurantiaca* (Myxotrichaceae) se aisló a partir de guano de murciélago en las Cuevas de Juxtlahuaca, localizadas en el Ramal del Infierno, estado de Guerrero, México, en el año 1998 [Figura 9]. La identidad y clasificación de ambas especies fue establecida por la Dra. María del Carmen González (Instituto de Biología, UNAM). Cultivos de referencia de ambas especies se mantienen en la colección de Micopatología, Instituto de Biología, UNAM (vouchers: 25379 y 24428, respectivamente).

4.2 Análisis cromatográficos

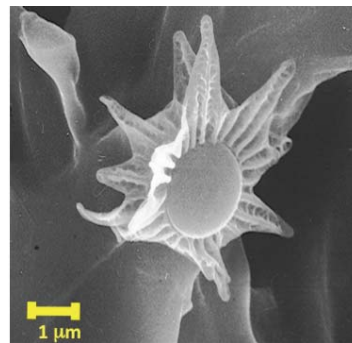
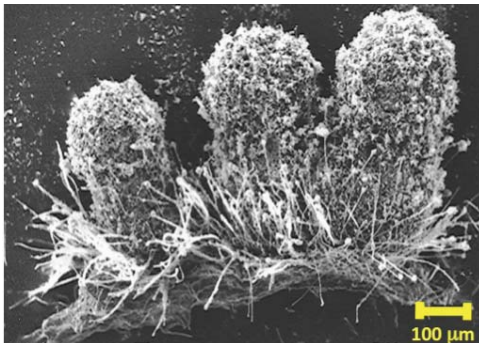
La cromatografía por adsorción en columna abierta (CCA) se realizó utilizando como soportes gel de sílice (Kieselgel 60 Merck, tamaño de partícula 0.063-0.200 μm , malla de 70-230 mm ASTM) o Sephadex® (LH20, Pharmacia). Los análisis cromatográficos cualitativos en capa fina (CCF) y de tipo preparativo (CCFP) se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales utilizando placas de aluminio y/o vidrio de 0.25 mm de grosor recubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck, malla de 3.5-7.0 mm ASTM) de diferentes dimensiones, empleando diversos sistemas de elución (Ettre y Kalasz, 2001). Como agentes cromógenos se emplearon soluciones de sulfato cérico amoniacal, vainillina sulfúrica, Dragendorff y Ehrlich.



coral blando *Pacifigorgia rutilia*



Emericella 25379



ascosporas estrelladas de *Emericella* 25379

Figura 8. *Emericella* 25379 (Trichocomaceae).

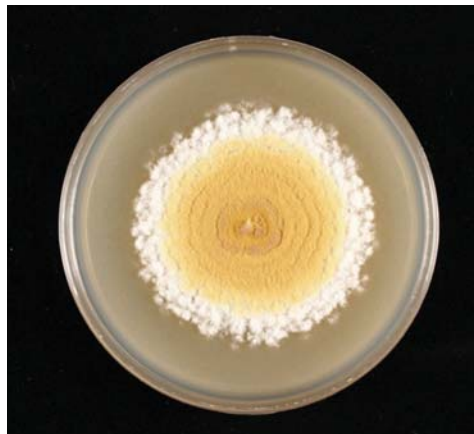


Figura 9. *Malbranchea aurantiaca* (Myxotrichaceae).

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) se realizó en un cromatógrafo Waters® (Millipore Corp., Waters Chromatography Division Milford, MA, USA) equipado con un detector UV Dual (2487). El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y manipulación de la información se realizaron utilizando el programa Empower® versión 2.0 (Waters). Los análisis se realizaron en columnas empacadas con dimetiloctadecilsilil (HCR-C₁₈) SymmetryPrep™ 7µm (Waters®) [7.8 × 300 mm, 2.0 mL/min], Symmetry® 5 µm (Waters®) [4.6 × 250 mm, 0.6 mL/min] o Nucleosil™ 5µm (Phenomenex®) [10 × 250 mm, 3.5 mL/min]. Todos los análisis se realizaron a temperatura ambiente. La longitud de onda (λ) utilizada para la detección de los compuestos fue de 235 nm.

4.3 Caracterización de los productos naturales y sus derivados

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y se reportan sin corregir. Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro digital JASCO DIP 360. Los espectros en el IR se midieron en un espectrómetro de rejilla Perkin-Elmer modelo 599B, utilizando las técnicas de película o pastilla en KBr. Los espectros de dicroísmo circular (DC) se registraron en un espectropolarímetro digital JASCO 720 a 25 °C en CHCl₃. Los espectros en el UV se analizaron utilizando un espectrómetro Shimadzu modelo 160 UV en CHCl₃. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de 500 MHz (¹H)/125 MHz (¹³C) ó 400 MHz (¹H)/100 MHz (¹³C) se registraron en los equipos Bruker DHX500, Varian Unity Plus 500 o Varian Innova 500. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm con referencia al tetrametilsilano (TMS) utilizado como estándar interno. En todos los casos se utilizó CD₃OD o CDCl₃ como disolventes.

Los espectros de masas por la técnica de impacto electrónico (EM-IE) se generaron mediante la introducción directa a 70 eV y un barrido de 33 a 700 unidades de masa-carga (m/z) por segundo, en un espectrómetro de masas JEOL JMSAX505HA. Los espectros de masas modalidad FAB positiva (EM-FAB⁺) se registraron en un espectrómetro modelo JEOL DX300 utilizando una matriz de alcohol nitrobenílico.

El registro de los espectros de RMN, EM, DC, IR y UV se efectuó en la Facultad de Química y el Instituto de Química de la UNAM, así como en la Unidad de Resonancia Magnética Nuclear de la Universidad Autónoma Metropolitana campo Iztapalapa (UAM-Iztapalapa).

4.4 Fermentación de los microorganismos fúngicos objeto de estudio

La fermentación en pequeña escala de la especie fúngica *Emericella 25379* se realizó utilizando condiciones estáticas, diferentes medios de cultivo (caldo papa dextrosa [PDB] natural, PDB comercial, V8 y Czapek) y períodos de fermentación, a temperatura ambiente. Para realizar las fermentaciones se utilizaron matraces Fernbach de 2.8 L conteniendo un litro de medio de cultivo. El inóculo consistió en dos cuadros de agar de un cm² de un cultivo de microorganismos en medio sólido agar papa dextrosa comercial (PDA). Al término del crecimiento se filtró el medio de cultivo para separar el micelio. A continuación se prepararon los extractos del micelio y medio de fermentación. El micelio obtenido se sometió a un proceso de maceración durante tres días con CH₂Cl₂. E proceso se repitió tres veces. Al término de la maceración, los extractos resultantes se filtraron y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentraron al vacío. Los extractos del medio de cultivo se obtuvieron mediante sucesivas particiones empleando CH₂Cl₂ como disolvente de extracción. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró a vacío. Cada uno de los extractos obtenidos a partir del micelio y del medio de cultivo fue analizado por cromatografía en capa delgada, con la finalidad de reunirlos de acuerdo a su similitud cromatográfica.

La fermentación en mediana escala (20 L) de la especie *Emericella 25379* se realizó bajo las condiciones siguientes:

- Medio de cultivo: Czapek
- Condiciones de agitación: cultivo estático
- Tiempo de fermentación: 30 días
- Temperatura de cultivo: ambiente

Al término de la fermentación se prepararon los extractos tanto del micelio como del medio de cultivo. El primero se elaboró mediante un proceso de maceración y el segundo mediante particiones sucesivas utilizando CH_2Cl_2 como disolvente. Posteriormente, se realizó la reunión de ambos extractos con base en su similitud cromatográfica obteniéndose 5.0 g de un residuo café oscuro.

El cultivo de *M. aurantiaca* se realizó en medio PDB comercial utilizando las mismas condiciones experimentales previamente establecidas por Martínez-Luis (2007) y Madariaga-Mazón (2008). El medio de cultivo se inóculo con dos cuadros de agar de un cm^2 de un cultivo de microorganismos en medio sólido de agar papa dextrosa comercial (PDA). La incubación se realizó a temperatura ambiente durante 30 días y en condiciones estáticas. Al término de la fermentación (20 L), se prepararon los extractos tanto del micelio como del medio de cultivo utilizando como disolvente CH_2Cl_2 obteniéndose 6.0 g de extracto seco combinado.

4.5 Estudio químico de la especie *Emericella* 25379

4.5.1 Fraccionamiento del extracto orgánico

El extracto orgánico total (5.0 g) se sometió a un proceso de fraccionamiento utilizando una CCA sobre gel de sílice (300 g) y como fase móvil mezclas en orden creciente de polaridad entre hexano- CH_2Cl_2 -AcOEt. Este proceso generó once fracciones primarias (F_1 - F_{11}).

4.5.2 Aislamiento, purificación e identificación del hidrato de 15(S)-clorotajixantona (1) y de la 14-metoxitajixantona (2) a partir de la fracción primaria F_4

El fraccionamiento secundario de la fracción primaria F_4 [370 mg; hexano- CH_2Cl_2 -AcOEt (7:2:1)], mediante una CCA de sephadex (25 g; MeOH) condujo a la obtención de siete fracciones secundarias, F_{4-I} - F_{4-VII} . El análisis cromatográfico por CLAE utilizando

una columna Symmetry® C₁₈ (0.6 mL/min, ACN) de la fracción secundaria F_{4-VII} permitió el aislamiento y la purificación de dos sólidos cristalinos amarillos identificados como el hidrato de 15-(S)-clorotajixantona (**1**; 8 mg; p. f. 180-181 °C; t_R 7.70 min) y la 14-metoxitajixantona (**2**; 5 mg; p. f. 200-201 °C; t_R 6.81 min).

Hidrato de 15-(S)-clorotajixantona (1): [α]_D -4° (c 0.1, CHCl₃); IR (KBr) ν_{max} 3486, 3073, 2925, 2849, 1736, 1644, 1567, 1240, 1022 y 920 cm⁻¹; EMIE [M]⁺ m/z 458.1504 (calc. C₂₅H₂₇O₆Cl 458.1496); DC (CHCl₃) (0.057 mg/mL) Δε (nm) -2.27 × 10⁴ (249), -2.08 × 10⁴ (261), 1.48 × 10⁴ (285), -1.30 × 10⁴ (336); UV λ_{max} (CHCl₃) log ε (nm) 3.60 (388), 3.25 (339), 3.76 (301), 3.72 (292), 4.07 (277), 3.96 (258), 3.92 (249), 3.94 (244).

14-Metoxitajixantona (2): [α]_D -38° (c 0.1, CHCl₃); IR (KBr) ν_{max} 3450, 3078, 2592, 2887, 1795 y 920 cm⁻¹; EM-FAB⁺ [M+1] m/z 453.2074 (calc. C₂₆H₂₉O₇ 453.2066); DC (CHCl₃) (0.069 mg/mL) Δε (nm) -5.27 × 10⁴ (247), -2.69 × 10⁴ (260), -2.62 × 10² (295), -9.70 × 10³ (301), 1.97 × 10² (317), -1.16 × 10⁴ (335); UV λ_{max} (CHCl₃) log ε (nm) 3.23 (395), 2.59 (346), 2.48 (299), 3.42 (290), 3.85 (277), 3.74 (261), 3.78 (254), 3.77 (248.5), 3.77 (245).

4.5.3 Aislamiento de la shamixantona (3) a partir de la fracción primaria F₂

Con la finalidad de aislar los compuestos presentes en la fracción primaria F₂ [2.0 g; hexano-CH₂Cl₂-AcOEt (7:2:1)], se realizó un análisis cromatográfico por CCA sobre gel de sílice (45 g) utilizando como fase móvil hexano y mezclas de hexano-AcOEt, incrementando gradualmente la polaridad. Esta metodología generó cuatro fracciones secundarias, F_{2-I}-F_{2-IV}. La resolución de la fracción secundaria F_{2-II} (70 mg) mediante CCFP, utilizando como sistema de elución CH₂Cl₂, permitió el aislamiento de 15 mg de un sólido amarillo con p. f. 141-143°C, identificado como la shamixantona (**3**).

Shamixantona (3): [α]_D +34° (c 0.1, CHCl₃) [lit. +16.0 (c 0.1, CHCl₃)]; DC (CHCl₃) (0.033 mg/mL) Δε (nm) -2.79 × 10⁴ (263), 2.71 × 10⁴ (295), -1.92 × 10⁴ (336), 1.16 × 10⁴ (446); UV λ_{max} (CHCl₃) log ε (nm) 3.50 (395), 2.90 (346), 3.77 (299), 3.76 (293), 4.24 (276), 4.05 (250), 4.07 (244). Datos espectroscópicos de ¹H y ¹³C-RMN idénticos a los reportados en la literatura (Pornpakakul *et al.*, 2006).

4.5.4 Aislamiento e identificación del hidrato de tajixantona (4) a partir de la fracción primaria F₉

De la fracción primaria F₉ [90 mg; hexano-CH₂Cl₂-AcOEt (4:3.5:2.5)], cristalizaron de manera espontánea 18 mg de un sólido amarillo, con p. f. 182-184 °C, identificado como el hidrato de tajixantona (4).

Hidrato de tajixantona (4): $[\alpha]_D^{-74^\circ}$ (*c* 0.1, CHCl₃) [lit. -76.0 (*c* 0.23, CHCl₃)]; DC (CHCl₃) (0.025 mg/mL) $\Delta\epsilon$ (nm) -1.24×10^5 (245), -8.62×10^4 (260), 3.21×10^4 (292), -4.36×10^4 (336); UV λ_{\max} (CHCl₃) log ϵ (nm) 3.72 (397), 3.14 (347), 3.92 (299), 3.91 (294), 4.42 (278), 4.25 (261), 4.25 (257), 4.21 (249), 4.24 (244). Datos espectroscópicos de ¹H y ¹³C-RMN idénticos a los reportados en la literatura (Pornpakakul *et al.*, 2006).

4.5.5 Aislamiento y purificación de la emericelina (5) a partir de la fracción primaria F₁

La separación de los constituyentes presentes en la fracción primaria F₁ [20 mg; hexano-CH₂Cl₂-AcOEt (7:2:1)], se realizó mediante un análisis cromatográfico por CCFP [hexano-AcOEt (7:3)]. Este procedimiento permitió el aislamiento y la purificación de la emericelina (5; 10 mg).

Emericelina (5): ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H (ppm): 1.71 (3H, s, CH₃-23), 1.74 (6H, s, CH₃-17, CH₃-18), 1.81 (1H, s, CH₃-22), 2.41 (3H, s, CH₃-24), 3.39 (2H, d, *J* = 7.2 Hz, H-14), 4.45 (2H, dd, *J* = 7.5 Hz, H-19), 4.50 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, 25-OH), 5.09 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-25), 5.34 (1H, dd, *J* = 7.5, 1.5 Hz, H-15), 5.61 (1H, dd, *J* = 7.2, 1.5 Hz, H-20), 6.85 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-2), 7.28 (1H, d, *J* = 0.6 Hz, H-5), 7.48 (1H, dd, *J* = 8.4, 0.45 Hz, H-3), 12.92 (1H, d, *J* = 0.3 Hz, 1-OH); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ_C (ppm): 184.5 (C-13), 159.7 (C-1), 152.8 (C-10), 152.3 (C-11), 149.4 (C-7), 142.6 (C-21), 138.4 (C-6), 136.6 (C-3), 133.3 (C-16), 123.9 (C-8), 122.1 (C-15), 119.5 (C-20), 119.4 (C-5), 118.8 (C-9), 118.7 (C-12), 109.8 (C-4), 106.2 (C-2), 71.6 (C-19), 56.2 (C-25), 27.1 (C-14), 25.8 (C-22), 25.3 (C-17), 18.4 (C-18), 18.2 (C-23), 17.9 (C-24). Datos espectroscópicos idénticos a los reportados en la literatura (Ishida *et al.*, 1975; Kawahara *et al.*, 1988).

4.5.6 Obtención de los ésteres de Mosher de la 14-metoxitajixantona (2)

A una solución de 2.0 mg del compuesto **2** en 800 μL de CDCl_3 se adicionaron 100 μL de piridina- d_5 y 25 mg del cloruro del ácido (*R*)-(-)- α -metoxi- α -trifluorometil-fenilacético. La mezcla resultante se dejó reposar a temperatura ambiente durante 24 horas bajo una atmosfera de nitrógeno para obtener el éster de Mosher **2-S-MTPA**. Así, el tratamiento del mismo compuesto **2** con el cloruro del ácido (*S*)-(-)- α -metoxi- α -trifluorometil-fenilacético, como se describió anteriormente, permitió la obtención del éster de Mosher **2-R-MTPA** (Ohtani *et al.*, 1991; Oh *et al.*, 2007).

4.6 Estudio químico de la especie *Malbranchea aurantiaca*

4.6.1 Fraccionamiento del extracto orgánico

El extracto orgánico total (6.0 g) se sometió a un proceso de fraccionamiento utilizando una CCA sobre gel de sílice (600 g). El proceso de elución se realizó con un gradiente de polaridad entre hexano- CH_2Cl_2 -MeOH. Este proceso generó un total de 19 fracciones primarias (**F₁-F₁₉**). La fracción **F₁₄** contenía a la malbranqueamida (**8**) y otros alcaloides.

4.6.2 Aislamiento e identificación de la malbranqueamida **B** (**6**), premalbranqueamida (**7**), malbranqueamida (**8**) e isomalbranqueamida **B** (**9**) a partir de la fracción primaria **F₁₄**

La resolución de la fracción **F₁₄** [402 mg; CH_2Cl_2 -MeOH (99:1)] mediante la aplicación de la CLAE utilizando una columna SymmetryPrepTM C_{18} (2.0 mL/min, ACN), permitió el aislamiento y la purificación de los metabolitos secundarios **8** (93.4 mg; t_R 6.1 min), **7** (8.0 mg; p. f. 296-299 °C; t_R 5.0 min) y una mezcla (47.6 mg; t_R 5.5 min) de los compuestos **6** y **9**. La purificación de los constituyentes individuales presentes en la mezcla se realizó mediante la reinyección de la misma en una columna NucleosilTM C_{18} (3.5

mL/min, MeOH). La purificación de los residuos correspondientes a los picos mayoritarios permitió el aislamiento y la purificación de **6** (30.0 mg; t_R 4.9 min) y **9** (5.0 mg; p. f. 319-321 °C; t_R 5.3 min;).

Malbranqueamida B (6): $[\alpha]_D^{+50}$ (c 1, MeOH); IR (KBr) ν_{\max} 3300, 1740, 1670, 1461, 1315 y 1250 cm^{-1} ; UV λ_{\max} (MeOH) $\log \epsilon$ (nm) 231 (3.95), 292 (4.80) nm; DC (MeOH) $\Delta\epsilon$ (nm) 244 (2×10^6), 217 (1.3×10^6), 226 (1.2×10^6), 296 (1.5×10^5) nm; EMIE m/z (rel. int.) 369 (7.5), 371 (2.00), 365 (6.5), 325 (100), 311 (27.1), 228 (39.1), 206 (17.3), 163 (31.8), 164 (97.3), 163 (25), 135(17.3), 120 (10), 96 (8.2); EMIE m/z 369.1589 (calc. $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{ON}_3\text{Cl}$: 369.1608).

Premalbranqueamida (7): IR (KBr) ν_{\max} 3296, 2954, 2920, 1737, 1657, 1460, 1313 y 1240 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CD_3OD) δ_{H} (ppm): 7.35 (1H, ddd, $J = 7.6, 1.8, 1.0$ Hz, H-7), 7.26 (1H, ddd, $J = 8.0, 1.6, 0.8$ Hz, H-10), 7.04 (1H, dd, $J = 8.4, 1.0$ Hz, H-9), 6.97 (1H, dd, $J = 7.5, 1.0$ Hz, H-8), 3.36 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-5_B), 3.07 (1H, m, H-3_A), 2.96 (1H, m, H-6_A), 2.80 (1H, m, H-6_B), 2.43 (1H, m, H-1_A), 2.28 (1H, dd, $J = 10.0, 2.0$ Hz, H-5_A), 2.13 (1H, q, $J = 5.0, 2.0$ Hz, H-3_B), 2.09 (1H, m, H-12_A), 1.99 (1H, m, H-13_A), 1.98 (1H, m, H-13_B), 1.90 (2H, m, H-2), 1.49 (1H, m, H-1_B), 1.46 (3H, s, H-17), 1.32 (3H, s, H-16). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz; CD_3OD) δ_{C} (ppm): 176.7 (C-14), 146.7 (C-11a), 138.4 (C-10a), 128.2 (C-9), 122.0 (C-8), 119.4 (C-6b), 118.3 (C-7), 119.4 (C-10), 104.5 (C-6a), 66.2 (C-13a), 59.5 (C-5), 57.7 (C-5a), 55.4 (C-3), 49.6 (C-12a), 35.4 (C-12), 32.5 (C-13), 30.9 (C-16), 30.4 (C-6), 28.2 (C-1), 24.4 (C-17), 23.5 (C-2). EM-FAB⁺ m/z 335.2072 (calc. $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{ON}_3$ 335.1998).

Isomalbranqueamida B (9): IR (KBr) ν_{\max} 3296, 2954, 2920, 1737, 1657, 1460, 1313 y 1240 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CD_3OD) δ_{H} (ppm): 7.32 (1H, d, $J = 2$ Hz, H-7), 7.22 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-10), 7.00 (1H, dd, $J = 8.6, 2.6$ Hz, H-9), 3.42 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-5_B), 3.05 (1H, m, H-3_A), 2.86 (1H, m, H-6_A), 2.85 (1H, m, H-6_B), 2.51 (1H, m, H-1_A), 2.26 (1H, dd, $J = 10.0, 2.0$ Hz, H-5_A), 2.15 (1H, q, $J = 5.0, 2.0$ Hz, H-3_B), 2.14 (1H, m, H-12_A), 1.99 (1H, m, H-13_A), 1.94 (1H, m, H-13_B), 1.86 (2H, m, H-2), 1.46 (1H, m, H-1_B), 1.42 (3H, s, H-17), 1.32 (3H, s, H-16). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz; CD_3OD) δ_{C} (ppm): 176.7 (C-14), 146.7 (C-11a), 135.6 (C-10a), 125.3 (C-9), 123.0 (C-8), 120.0 (C-6b), 117.9 (C-7), 111.6 (C-10), 104.9 (C-6a), 66.1 (C-13a), 59.5 (C-5), 55.3 (C-5a), 52.9 (C-3), 49.8 (C-12a), 32.6 (C-12), 30.8 (C-13), 30.3 (C-16), 28.2 (C-6), 27.8 (C-1), 24.2 (C-17), 23.6 (C-2). EM-FAB⁺ m/z 369.1589 (calc. $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{OCl}$ 369.1608).

4.7 Ensayos biológicos

4.7.1 Determinación del efecto de los compuestos puros sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc dependiente de la CaM

4.7.1.1 Obtención de la CaM humana recombinante

Los ensayos correspondientes se llevaron a cabo utilizando una CaM humana recombinante (*hCaM*) expresada en la bacteria *E. coli*. Este proceso de expresión fue realizado en colaboración con el Dr. Alejandro Sosa Peinado (Facultad de Medicina, UNAM) y se describe a continuación: En primer lugar, la amplificación del vector de expresión se realizó utilizando el gen *CALMI* (proteína cinasa humana delta) mediante la técnica de PCR a partir de ADNc pCMV6-XL5 obtenido comercialmente (Origene Technology, Inc, Rockville, MD). Posteriormente, el producto de la amplificación se clonó como un fragmento NdeI/BamHI, dentro del sitio de clonación múltiple del vector pGEM-T (System I, Promega Corporation). Para realizar la expresión de la proteína CaM recombinante, el plásmido resultante pET12-*CALMI* se transformó en la cepa de *E. coli* BL21-A1 (One shot[®], Invitrogen Corp. Carlsbad, CA). La proteína recombinante se purificó mediante una columna cromatográfica de fenil-sefarosa CL4B[™] a partir de un cultivo de células con 12 horas de crecimiento en medio Luria (LB). Finalmente, la pureza de la proteína se verificó mediante un proceso de electroforesis en gel de poliacrilamida de acuerdo con los protocolos descritos en la literatura (González-Andrade *et al.*, 2009).

4.7.1.2 Bioensayo

La actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc dependiente de la CaM (PDE1) en presencia de CaM se realizó a través de la cuantificación de la cantidad de fosfato inorgánico (Pi) producido como resultado de la reacción de hidrólisis del AMPc catalizada por la enzima, de acuerdo con la metodología descrita por Rivero y colaboradores (2007) con algunas modificaciones (Ovadi, 1989; Mata *et al.*, 2003b; Martínez-Luis *et al.*, 2007).

Preparación de la mezcla de reacción: una disolución que contiene 0.015 unidades de PDE1 (Sigma), 0.08 µg de CaM, 0.063 unidades de 5'-nucleotidasa de veneno de *Crotalus atrox* (Sigma) y 10 µM de la proteína albúmina sérica bovina (ASB, Boehringer Mannheim), en 1 mL de buffer TRIS-HCl constituido por TRIS-HCl 45 mM, acetato de magnesio 5.6 mM, imidazol 45 mM y CaCl₂ 2.5 mM, a pH de 7.0, se incubó durante 30 min a 30 °C.

Realización del ensayo: en una placa de ELISA con 96 pozos (con una capacidad de 250 µL por pozo) se adicionaron 10 µL del compuesto a evaluar [disuelto en una mezcla binaria de ACN-H₂O (1:1)] a las concentraciones finales de 0.5, 1, 2, 3, 4, 7, 13, 20, 32, 50 y 65 µM. Posteriormente se adicionaron 40 µL de la mezcla de reacción y la placa se incubó durante 30 min a 30 °C. Al término de este período de incubación, a cada pozo se adicionaron 10 µL de AMPc 10.8 mM cada 10 segundos y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Transcurrido este tiempo, se adicionó a cada pozo 190 µL de una solución de verde de malaquita y molibdato de amonio, con la finalidad de estimar el contenido de Pi de manera espectrocolorimétrica. Como control positivo se utilizó a la CPZ. Los valores de absorbancia obtenidos fueron interpolados en una curva estándar de fosfato monobásico de potasio (Sigma), tomando las alícuotas necesarias para obtener once concentraciones diferentes en un intervalo entre 0.1 y 3 nM. La absorbancia de las muestras se determinó a 655 nm utilizando un lector de placas de ELISA, marca BIO-RAD modelo 680.

4.7.2 Determinación de la interacción de los compuestos puros con la CaM mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida

La posible interacción de los compuestos puros se determinó también valorando el cambio de la movilidad electroforética de la proteína en presencia de Ca²⁺ y los compuestos de prueba. Para ello, se utilizó una electroforesis vertical descendente PAGE (12%) (Leung *et al.*, 1984) como se describe a continuación. En primer lugar, se prepararon mezclas que contenían 0.033 µg del compuesto de prueba (10 µL de una disolución de 3.3 µg/mL en DMSO), 2 µg de CaM y 3 µL de una disolución de CaCl₂ o EGTA 1 mM. La mezcla anterior se llevó a un volumen final de 30 µL con agua desionizada. Posteriormente, las

mezclas se incubaron durante 90 min a 30 °C. Al término del proceso de incubación, las mezclas se enfriaron a temperatura ambiente y se les adicionó 10 µL del buffer de carga. Finalmente, se llevo a cabo el experimento para determinar si la proteína tratada experimentaba algún cambio en su movilidad electroforética. La CPZ se utilizó de nueva cuenta como control positivo. Cada determinación se realizó por triplicado.

4.7.3 Determinación de la interacción ligando-CaM mediante un método espectrofluorimétrico

La fluorescencia intrínseca de la CaM en presencia de los ligandos se determinó en un espectrofluorómetro ISS-PC1 (ISS Inc., Champaign, IL), bajo las siguientes condiciones experimentales: temperatura de análisis: 30 °C; concentración de la proteína: 5 µM en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5; longitud de onda de excitación: 282 nm. Para la realización de los ensayos de titulación se prepararon diferentes disoluciones en MeOH que contenían entre 1.2 y 60.0 µM del ligando a evaluar. Los espectros de fluorescencia de cada uno de los experimentos de titulación con los ligandos se registraron en el intervalo comprendido entre 300 y 340 nm. Posteriormente, los datos obtenidos fueron ajustados para calcular la K_d del complejo proteína-ligando, utilizando la siguiente expresión matemática de equilibrio generalizada (Miller *et al.*, 1983):

$$v_0 = \frac{(1 + k_d / P_0 + L_0 / P_0) - \sqrt{(1 + k_d / P_0 + L_0 / P_0)^2 - 4L_0 / P_0}}{2}$$

en donde P_0 y L_0 es la concentración de la proteína y el ligando, respectivamente, y K_d es la constante de disociación.

4.8 Cálculos de modelado molecular

4.8.1 Preparación de las estructuras para los cálculos

Las moléculas se construyeron con los programas Hyperchem 7.5 (HyperCube Inc., FL) o Spartan 04 (Wavefunction Inc. Irvine, CA). La visualización de las estructuras se realizó mediante el uso de alguno o varios de los siguientes programas: Hyperchem 7.5, Spartan 04, VMD 1.8 (www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/), Pymol (DeLano Scientific LLC, CA), GaussView 3.0 (Gaussian Inc., Pittsburg, PA) y AutoDock Tools (ADT; www.autodock.scripps.edu).

4.8.2 Análisis conformacional, optimización geométrica y cálculos de las propiedades fisicoquímicas

Las estructuras de mínima energía para cada uno de los compuestos analizados se generaron utilizando un protocolo Monte Carlo (Chang *et al.*, 1989). Este procedimiento se efectuó utilizando el programa Spartan 04, con un campo de fuerza de mecánica molecular MMFF94. Las estructuras de mínima energía obtenidas se revisaron cuidadosamente para eliminar los duplicados, además de que se estableció un corte energético de 3 kcal/mol. Para cada uno de los estereoisómeros del compuesto **2** (**2a-2d**), el análisis se realizó explorando los grados de libertad de la torsión interna de los ángulos dihedros del fragmento C14-C15-C16 rotando el ángulo de torsión 30°. Posteriormente, cada conformero fue optimizado geoméricamente mediante funcionales de la densidad (DFT) al nivel de teoría B3LYP/DGDZVP utilizando el programa Gaussian W03 (Gaussian Inc., Pittsburg, PA) (Becke, 1988; Godbout *et al.*, 1992; Stephens *et al.*, 2008). Para cada una de éstas estructuras, se realizó el cálculo de los parámetros fisicoquímicos, frecuencias en el IR y de los valores de rotación óptica y constantes de acoplamiento $^1\text{H}-^1\text{H}$ ($J_{\text{H-H}}$) vecinales teóricos a 298 K y 1 atm. Estos dos últimos conjuntos de parámetros fueron analizados mediante una distribución de Boltzmann asignándoles su correspondiente valor poblacional. El efecto del disolvente no fue incluido en los cálculos.

En el caso de los derivados de las malbranqueamidas (**6-9**), el análisis conformacional se realizó explorando los grados de libertad de la torsión interna de los ángulos dihedros del fragmento C12a-C13-C13a, C13a-C1-C2, C1-C2-C3, C2-C3-N4, N4-C5-C5a y rotando el ángulo de torsión 30° (Chang *et al.*, 1989). Posteriormente, cada conformero fue optimizado geoméricamente mediante DFT al nivel de teoría B3LYP/6-31+G(d) utilizando el programa Gaussian W03 (Gaussian Inc., Pittsburg, PA) (Becke, 1988; Godbout *et al.*, 1992; Martínez-Luis *et al.*, 2006; Stephens *et al.*, 2008). También, para cada una de estas estructuras, se realizó el cálculo de los parámetros fisicoquímicos y frecuencias en el IR a 298 K y 1 atm. El efecto del disolvente no fue incluido en los cálculos.

4.8.3 Acoplamiento molecular

Todos los cálculos de acoplamiento molecular (AM) se realizaron utilizando el programa AutoDock 4.0 (www.autodock.scripps.edu; Morris *et al.*, 1998). La estructura cristalográfica de la proteína se obtuvo del Protein Data Bank (RCSB; código pdb: 1LIN). Todas las moléculas de agua presentes en el archivo original de la proteína fueron removidas con el programa VMD y posteriormente, la proteína se verificó, refinó y reempacó utilizando el programa Rosetta⁺⁺ (Kuhlman y Baker, 2000). La adición de los átomos de hidrógenos polares a la proteína, las cargas de Kollman y los parámetros de solvatación y volúmenes fraccionarios, se realizó utilizando ADT (AutoDock Tools). A cada ligando se le asignaron las cargas parciales de Gasteiger-Marsili, se removieron los hidrógenos no polares y se permitió la rotación de todos los ángulos de torsión permisibles (Morris *et al.*, 1998).

Para la validación del protocolo de AM, en primer lugar, se removieron los cuatro ligandos de TFP cocrystalizados dentro la proteína CaM. Posteriormente se realizó un estudio de acoplamiento molecular con cada uno de estos ligandos y se analizó la variación de los valores de la desviación estándar media cuadrática (RMSD) entre el estado inicial y el obtenido del AM. El mismo protocolo de validación se realizó para el análogo de la TFP, la CPZ, empleada como control positivo en los ensayos biológicos.

Los mapas de afinidad para cada tipo de átomo presente en el ligando y la proteína, así como los mapas de potencial electrostático se calcularon usando la herramienta AutoGrid (www.autodock.scripps.edu), incluida en el programa de simulación empleado. En cada uno de los análisis de AM dentro del sitio de unión rígido de la proteína, las dimensiones de las rejillas fueron de $120 \times 120 \times 120$ puntos con un espacio de 0.375 Å. Estas dimensiones fueron lo suficientemente grandes para cubrir la superficie completa de la proteína. La búsqueda de las posiciones de menor energía de la interacción ligando-proteína se realizó utilizando un algoritmo genético Lamarkiano (LGA) (Morris *et al.*, 1998), con una población inicial de 150 individuos, 2,500,000 de evaluaciones de energía y 100 repeticiones independientes, para cada uno de los ligandos evaluados. En el caso de los análisis de AM con residuos flexibles (Huey *et al.*, 2007) se seleccionaron todas las metioninas presentes en la proteína (Met 36, 52, 71, 72, 76, 109, 124, 144 y 145), permitiéndose un total de 27 torsiones para éstos residuos. Las dimensiones de los mapas para realizar estos últimos estudios de AM fueron de $60 \times 60 \times 60$ puntos, con un espacio de 0.375 Å y corresponden al centro o núcleo hidrofóbico de la proteína. Los parámetros restantes se seleccionaron de la misma forma que los análisis de AM con la proteína rígida. Posterior a la etapa de búsqueda y evaluación de la energía de las diferentes posiciones y conformaciones de los ligandos, las 150 evaluaciones fueron organizadas en grupos con RMSD inferiores a 2 Å. En cada grupo, las diferentes soluciones se acomodaron por orden creciente de energía y se compararon los valores de las constantes de inhibición experimentales con las obtenidas del AM.

4.8.4 Dinámica Molecular

Los estudios de dinámica molecular (DM) del complejo propuesto Ca^{2+} -CaM-malbranqueamida (**8**) se realizaron con el programa GROMACS (Brendsen *et al.*, 1995; Lindahl *et al.*, 2001). Para estos estudios se utilizó la misma estructura cristalográfica de la CaM analizada en los experimentos de AM. En primer lugar, la proteína se solvató en una caja periódica de agua con 0.1 mM de NaCl. Esta caja de agua tiene las dimensiones siguientes: $3.6 \times 4.2 \times 4.5$ nm y aproximadamente 9200 moléculas de agua; éstas dimensiones son suficientes para separar a la proteína 1.2 nm de las paredes de la caja,

aislando las interacciones de la proteína con sus imágenes periódicas. Posteriormente, se generaron los archivos de topología tanto de la proteína (GROMACS), como del compuesto **8** y del inhibidor KAR-2 (Dundee PRODRG2, <http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/prodrg/>), dichas topologías se editaron para hacer coincidir las cargas sobre los átomos con las calculadas por métodos DFT [B3LYP/6-31+G(d)]. Una vez generados esta serie de archivos, se estableció la caja de agua, se fijó la proteína y se realizó una minimización de energía de la caja de agua con la proteína fija, utilizando el método de Steepest Decendent. Los parámetros de simulación se resumen a continuación:

- Algoritmo de restricción: LINCS (expansión de orden: 4)
- Condiciones de periodicidad: xyz [entramado: reticular (rejilla)]
- Distancia para incluir vecinos: 1
- Interacciones coulombicas: cut-off (umbral de corte: 1.0 nm)
- Cálculo de fuerzas Leonard-Jones (VDW): cut-off (umbral de corte: 1.0 nm)
- Termostato: Berendsen [tiempo de relajación: 0.1 (uniforme) y referencia: 303° K]
- Barostato: Berendsen (tiempo de relajación: 0.5; compresibilidad: 4.5×10^{-5} y referencia: 1.0 bar)
- Integrador: LeapFrog (Intervalos: periodo de integración: 0.002 ps; remoción de la deriva del centro de masa: 0.002 ps; frecuencia de actualización de la lista de vecinos: 10 (0.02 ps); simulación con posiciones restringidas: simulación productiva)
- Eventos integrados: 7500000 (15 ns) [proteína-ligando]; 125000 (0.25 ns) [ligando-caja de agua]
- Muestreo de cuadros: 5000 (10 ps) [proteína-ligando]; 2000 (4 ps) [ligando-caja de agua]
- Muestreo de energías: 250 (0.5 ps) [proteína-ligando]; 100 (0.2 ps) [ligando-caja de agua]

Adicionalmente, se realizaron simulaciones de DM (250 ps) de los ligandos aislados en cajas de agua más pequeñas. En estos casos, la separación a los bordes de la réplica periódica fue de 1.2 nm, por lo que, en ausencia de la proteína, la caja se reduce y también el número de moléculas de agua necesarias. Estas últimas simulaciones son necesarias para estimar la interacción del ligando en la solución de NaCl 0.1 mM, lo que permite determinar, en las simulaciones con la proteína, el valor de la energía de interacción proteína-ligando mediante el método de Interacción Lineal de Energía (ILE) (Aquist *et al.*,

1994). En este método, la energía de interacción se calcula a partir de los valores de los términos de energía de las interacciones Coulómbicas y del potencial de Lenand-Jones (VDW), utilizando la siguiente ecuación:

$$\Delta G = \beta \left(\langle V_{\text{ligando-proteína}}^{el} \rangle - \langle V_{\text{ligando-solución}}^{el} \rangle \right) + \alpha \left(\langle V_{\text{ligando-proteína}}^{vwd} \rangle - \langle V_{\text{ligando-solución}}^{vwd} \rangle \right)$$

en donde V^{el} y V^{vwd} , representan los componentes de potencial eléctrico y de Van der Waals, para las interacciones ligando-proteína y ligando-solución; las diferencias encerradas entre paréntesis en ángulo representan los promedios sobre ensambles de cuadros capturados a lo largo de la dinámica. Los valores de α y β , calculados a partir de la teoría y de los datos experimentales son 0.5 y 0.2, respectivamente.

Una consideración importante durante las simulaciones de DM es que el complejo ligando-CaM debe de permanecer relativamente estable por lo menos durante 250 ps durante la simulación. Este factor adicional nos asegura tener resultados confiables y que representen con mayor precisión los fenómenos naturales. Finalmente se determinan las constantes de formación al equilibrio (K_{EQ}), para cada complejo, a partir de la siguiente ecuación:

$$K_{EQrel} = e^{-\frac{\Delta G}{RT}}$$

4.9 Evaluación de la interacción Ca^{2+} -CaM-malbranqueamida (8) por RMN

Preparación de la muestra. La proteína CaM marcada isotópicamente con ^{15}N - ^{13}C se preparó en medio M9, constituido por $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (0.5 g/L) y $^{13}\text{C}_6$ -glucosa (3 g/L). La expresión y purificación de la proteína uniformemente marcada se realizó siguiendo la metodología experimental previamente descrita en esta sección experimental. La CaM utilizada en el experimento se disolvió en una solución que contenía 95% de un buffer constituido por TRIS-HCl 50 mM, KCl 0.1 mM y CaCl_2 10.6 mM y 5% de $^2\text{H}_2\text{O}$. El compuesto evaluado se preparó en una mezcla binaria de MeOH- H_2O (1:1) a una concentración de 7.5 mM.

Realización del experimento. Todos los experimentos fueron realizados a 35 °C y se registraron a 500 MHz en un espectrómetro Varian Innova 500. Para el ensayo se realizó la adición de diferentes equivalentes del ligando entre 0 y 1.44 a una solución que contenía 1.44 equivalentes del complejo Ca²⁺-CaM en diferentes tiempos (7, 22, 52, 112, 202, 292, 382, 472, 592 y 712 minutos), posterior a cada adición se realizó el registro de los experimentos uni y bidimensionales (NOE, ¹⁵N-¹H HSQC y ¹³C-¹H CT-HSQC). Las asignaciones esteroespecíficas de los grupos metilo de cada una de las metioninas (Met) involucradas en el sitio de unión del compuesto **8** con la proteína, el procesamiento y manipulación de la información se realizaron utilizando el programa vNMRj del equipo (Varian).

5. Resultados y discusión

5.1 Selección primaria y obtención de los extractos orgánicos de las especies fúngicas

La presente investigación se desarrolló como parte de un proyecto multidisciplinario enfocado al descubrimiento y aislamiento de nuevos inhibidores de la proteína CaM a partir especies fúngicas selectas de la biodiversidad de México.

La selección de la especie *Emericella* 25379 se realizó, por una parte, considerando la importancia que tienen numerosas especies de este género en la producción de metabolitos con aplicación farmacéutica. Por otro lado, la notable complejidad metabólica de los extractos del medio de cultivo y micelio del hongo y, el hecho de que la especie *Emericella* 25379 es novedosa, garantizaban *a priori* obtener resultados inéditos, incluyendo la posibilidad de descubrir nuevos inhibidores de la CaM.

En el caso de *Malbranchea aurantiaca* la selección se basó en el hecho de que la especie contenía alcaloides minoritarios, no identificados en los estudios previos, y que posiblemente eran análogos de la malbranqueamida y, por lo tanto inhibidores, de la CaM.

La estrategia metodológica general utilizada para la realización de este estudio se resume a continuación. Una vez que se efectuó la selección primaria, se realizó la fermentación de los hongos en pequeña escala bajo diferentes condiciones de cultivo, esto con la finalidad de establecer las condiciones de crecimiento de los microorganismos que mejor permitan la biosíntesis de metabolitos secundarios bioactivos. Una vez cultivados los microorganismos se prepararon los extractos orgánicos tanto del micelio como del medio de cultivo. De acuerdo a los resultados obtenidos en estos análisis preliminares se estableció que las mejores condiciones para el crecimiento de *Emericella* 25379 fueron las siguientes: medio de cultivo Czapek, fermentación por 30 días, condiciones estáticas y temperatura ambiente. Los extractos obtenidos en estas condiciones presentaron perfiles cromatográficos

adecuados y sus rendimientos fueron los mejores. Por otra parte, las mejores condiciones de crecimiento para la especie *Malbranchea aurantiaca* incluyeron el uso de medio PDB comercial, reportado en los estudios previos realizados por Martínez-Luis y colaboradores (2007) y una fermentación de 30 días a temperatura ambiente en condiciones estáticas. En este caso las mejores condiciones se establecieron con base en el rendimiento de los extractos y la producción de alcaloides. Los cromatofolios de las fermentaciones con una duración de 30 días presentaban un mayor número de productos que reaccionaban positivamente frente a los reactivos de Dragendorff y Ehrlich.

A continuación se realizó la fermentación de las especies fúngicas seleccionadas en mediana escala. Para este propósito, se prepararon 20 L de medio de cultivo Czapek y 20 L de medio PDB comercial, los cuales se inocularon con las especies fúngicas *Emericella* 25379 y *M. aurantiaca*, respectivamente. Una vez transcurrido los tiempos adecuados de fermentación, se separó el medio de cultivo del micelio y se prepararon los extractos orgánicos correspondientes. Los extractos de los medios de crecimiento de las fermentaciones de los aislamientos fúngicos se prepararon mediante sucesivas particiones con CH_2Cl_2 . El micelio de ambas fermentaciones se extrajo mediante maceración utilizando CH_2Cl_2 como disolvente de extracción. Posteriormente, para verificar la similitud de los extractos orgánicos derivados del medio de cultivo y del micelio en mediana escala de ambos hongos se realizó el perfil cromatográfico por CCF. Los resultados obtenidos de estos análisis permitieron reunir los extractos obtenidos a partir de cada fermentación. Por último, cada extracto combinado se sometió a un estudio convencional, aplicando distintas técnicas cromatográficas, que permitió la obtención de los metabolitos secundarios bioactivos. Estos productos se caracterizaron estructuralmente por métodos espectroscópicos, químicos y computacionales; y, como inhibidores de la CaM a través de una serie de estudios enzimáticos y de interacción ligando-CaM, tanto *in silico* como en solución (RMN y resonancia de la fluorescencia).

Durante la realización de este proyecto, el Dr. Williams y colaboradores (2008) de la Universidad Estatal de Colorado, reportaron la síntesis biomimética de la malbranqueamida, malbranqueamida B, isomalbranqueamida B y premalbranqueamida. En

los dos primeros casos se sintetizaron los enantiómeros naturales y la mezcla racémica. Los otros dos se obtuvieron como racematos. Esta circunstancia nos permitió contar con una serie de análogos de la malbrancheamida para el análisis de su efecto sobre el complejo CaM-PDE1 y así iniciar los estudios preliminares de estructura química-actividad biológica.

Los resultados obtenidos en esta investigación se encuentran integrados en dos partes. La primera abarca todos los aspectos relacionados con la investigación química de las dos especies objeto de este estudio. En la segunda parte, se describe la evaluación de la interacción ligando-proteína de los compuestos aislados sobre la CaM, mismos que permitieron la integración de cuatro manuscritos que fueron publicados en las revistas *Natural Product Research*, 22, 709-714 (2008), *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18, 6479-6481 (2008), *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 2167-2174 (2009) y *Analytical Biochemistry*, 387, 64-70 (2009). De manera adicional, dos artículos más se encuentran en proceso escritura para su posible publicación en las revistas *Bioorganic & Biomolecular Chemistry* y *Natural Product Research*.

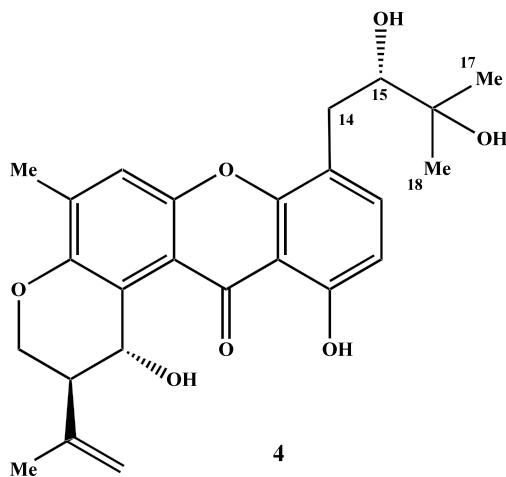
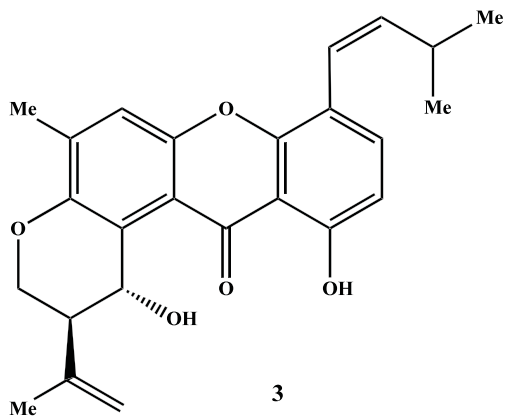
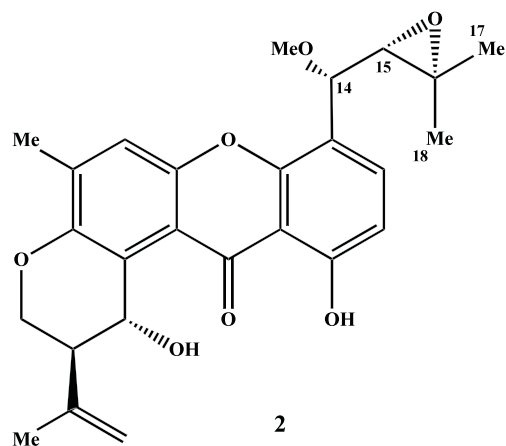
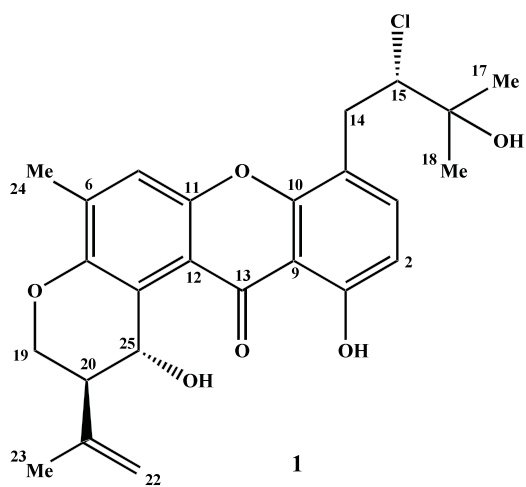
5.2 Obtención de los metabolitos bioactivos de *Emericella* 25379

El fraccionamiento preliminar del extracto orgánico (5.0 g) del medio de cultivo y micelio, utilizando las técnicas cromatográficas en CCA, CCD a nivel preparativo y CLAE, condujo al aislamiento y la purificación de dos metabolitos secundarios novedosos caracterizados como el hidrato de 15(*S*)-cloro-tajixantona (**1**) y la 14-metoxi-tajixantona (**2**). De manera adicional, se aislaron y caracterizaron la shamixantona (**3**), el hidrato de tajixantona (**4**) y la emericelina (**5**) [Figura 10].

5.2.1 Caracterización de los metabolitos secundarios novedosos aislados de *Emericella* 25379

La caracterización de los metabolitos aislados se realizó mediante la aplicación de los métodos modernos de espectroscopía (IR, UV, DC, ¹H y ¹³C RMN mono y

bidimensional, etc.) y de espectrometría de masas (EM-IE y FAB⁺). Los datos espectroscópicos (IR, RMN, EM) de los productos 3-5 se encuentran en perfecta armonía con los descritos previamente en la literatura (Pornpakakul *et al.*, 2006). Como las xantonas 1 y 2 constituyen metabolitos secundarios novedosos en esta sección se discutirá en detalle la caracterización de estos productos.



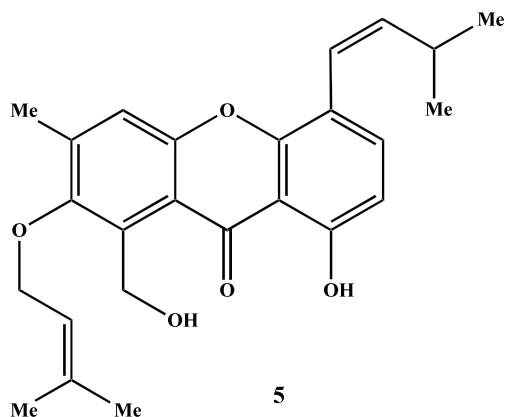


Figura 10. Metabolitos fúngicos aislados de *Emericella* 25379.

5.2.2 Elucidación estructural del hidrato de 15(*S*)-cloro-tajixantona (**1**)

El compuesto **1** se aisló como un sólido cristalino amarillo (8 mg; p. f. 180-181 °C), ópticamente activo. El espectro de masas de alta resolución permitió establecer su fórmula molecular como $C_{25}H_{27}O_6Cl$ y un índice de deficiencia de hidrógenos de doce. La presencia de un átomo de cloro en la molécula fue consistente con la abundancia relativa del pico $[M+2]^+$ con respecto al ion molecular $[M]^+$ observado en el espectro de masas en una relación masa/carga (m/z) de 458 uma, la relación $[M]^+/[M+2]^+$ es de aproximadamente (100/35).

El análisis detallado de los espectros de RMN unidimensionales y bidimensionales [Tabla 2] permitió establecer que **1** presentaba un núcleo similar al hidrato de tajixantona (**4**), compuesto aislado por Pornpakakul y colaboradores (2006) a partir de la especie relacionada *Emericella varicolor*. La principal diferencia observada en el espectro del compuesto **1** respecto al de **4** radica en las absorciones de los hidrógenos H-14 y H-15 presentes en la cadena isoprenilo que se observan en δ_H/δ_C 3.05, 3.13/28.6 y 3.03/63.4, respectivamente. En el caso del compuesto **4** estas absorciones se observan en δ_H/δ_C 2.63, 3.16/32.0 y 5.31/77.7. El desplazamiento químico observado para la señal de H-15 permite proponer la ubicación del átomo de cloro sobre el carbono C-15 de la cadena isoprenilo. De manera adicional, el análisis detallado de los espectros bidimensionales HMBC y NOESY

permitió corroborar de manera inequívoca la ubicación correcta de los sustituyentes en los núcleos de tetrahidropirano y xantona.

El siguiente paso en la elucidación estructural del compuesto **1**, fue la determinación de la configuración absoluta de los centros estereogénicos presentes en C-15, C-20 y C-25 con base en el análisis de los datos de dicroísmo circular de **1** y **4**. Al registrar los espectros de dicroísmo circular [DC, **Figura 11**] de los productos **1** y **4** éstos presentan cuatro efectos Cotton entre 240 y 340 nm. De esta manera, el espectro de DC del compuesto **1** desplegó un efecto Cotton (+) en 285 nm [1.48×10^4 (285)] y tres efectos Cotton (-) en 249, 261 y 336 nm [$\Delta\epsilon$ (nm) -2.27×10^4 (249), -2.08×10^4 (261) y -1.30×10^4 (336)] efectos muy similares a los observados para el producto **4** [$(\Delta\epsilon$ (nm) -1.24×10^5 (245), -8.62×10^4 (263), 3.21×10^4 (295), -4.36×10^4 (336)]. Este análisis permitió proponer una configuración absoluta *S* en C-15. Por otra parte, el análisis de los espectros NOESY de ambos productos permitió evidenciar las correlaciones que se resumen en la **Figura 12**. Estas correlaciones aunadas a consideraciones de tipo biogénico permitieron establecer la configuración absoluta en los centros C-15, C-20 y C-25 como *S*, *S* y *R*, respectivamente en ambos productos. Con base en las evidencias antes descritas la estructura del compuesto novedoso **1** se asignó con el nombre trivial de hidrato de 15(*S*)-cloro-tajixantona (**1**).

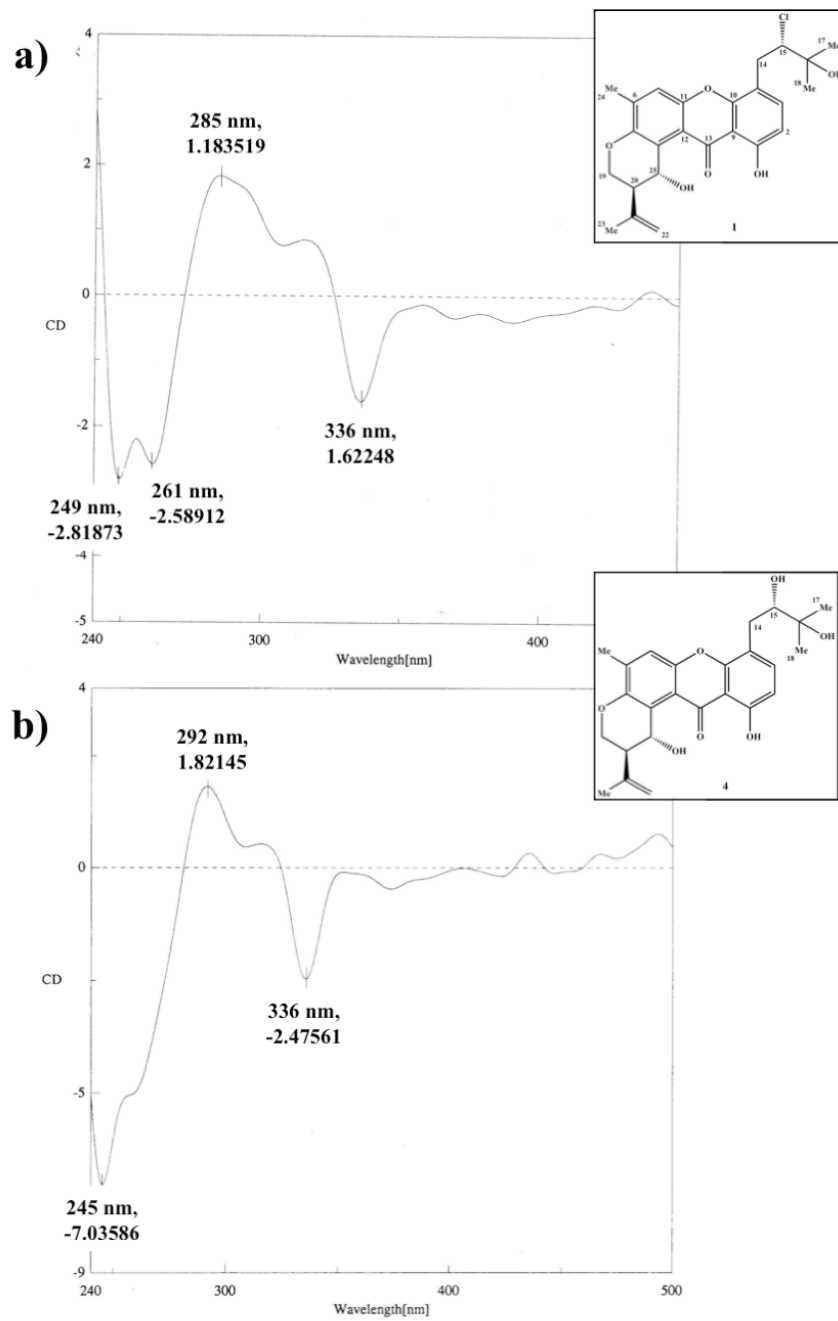


Figura 11. Espectros de DC del **a)** hidrato de 15(*S*)-cloro-tajixantona (**1**) y del **b)** hidrato de taxijantona (**4**).

Tabla 2. Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN del hidrato de 15(*S*)-cloro-tajixantona (**1**).

Posición	Compuesto 1			
	δ_C	δ_H , mult. (<i>J</i> in Hz)	HMBC	NOESY
1	160.5		H-2, H-3	
2	137.1	7.53 d (8.0)	H-14a, H-14b	H-14a, H-14b
3	119.3	6.80 d (8.0)	H-2	
4	115.2		H-3, H-14a, H-14b, H-15	
5	109.3	7.33 d (1.0)		H-24
6	138.6		H-24	
7	149.6		H-5, H-19a, H-19b, H-24, H-25	
8	119.3		H-24	
9	109.3		H-2	
10	152.1		H-14a, H-14b, H-15	
11	152.0		H-5	
12	121.1		H-20, H-25	
13	184.4			
14	28.6	a 3.05 d (16.6) b 3.13 dd (8.0, 16.3)	H-2	H-2, H-17, H-18
15	63.4	3.03 dd (2.0, 10.5)	H-14a, H-14b, H-17, H-18	H-2, H-18
16	116.9		H-14a, H-14b, H-15	
17	24.8	1.34 s	H-18	H-14
18	19.0	1.46 s	H-17	H-14, H-15
19	64.6	a 4.44 ddd (1.0, 3.5, 11.0) b 4.37 dd (3.0, 11.0)	H-25	H-19b H-20 H-19a, H-20, H-23
20	44.9	2.74 ddd (3.0, 3.0, 3.5)	H-19a, H-19b, H-22a, H-22b, H-23, H-25, OH-25	H-23
21	142.6		H-19a, H-19b, H-25	
22	112.3	a 4.82 ddd (0.5, 1.5, 2.5) b 4.60 dd (1.5, 2.5)	H-23	H-22b, H-25 H-22a, H-23
23	22.5	1.87 t (0.5)	H-22a, H-22b	H-20
24	17.4	2.37 d (1.0)	H-5	
25	63.2	5.43 ddd (1.0, 3.0, 3.5)	H-19a, H-19b, OH-25	H-20, H-23, H-22b, OH-25
OH-1		12.66 d (0.5)		
OH-16		2.47 s		
OH-25		5.03 d (4.0)		

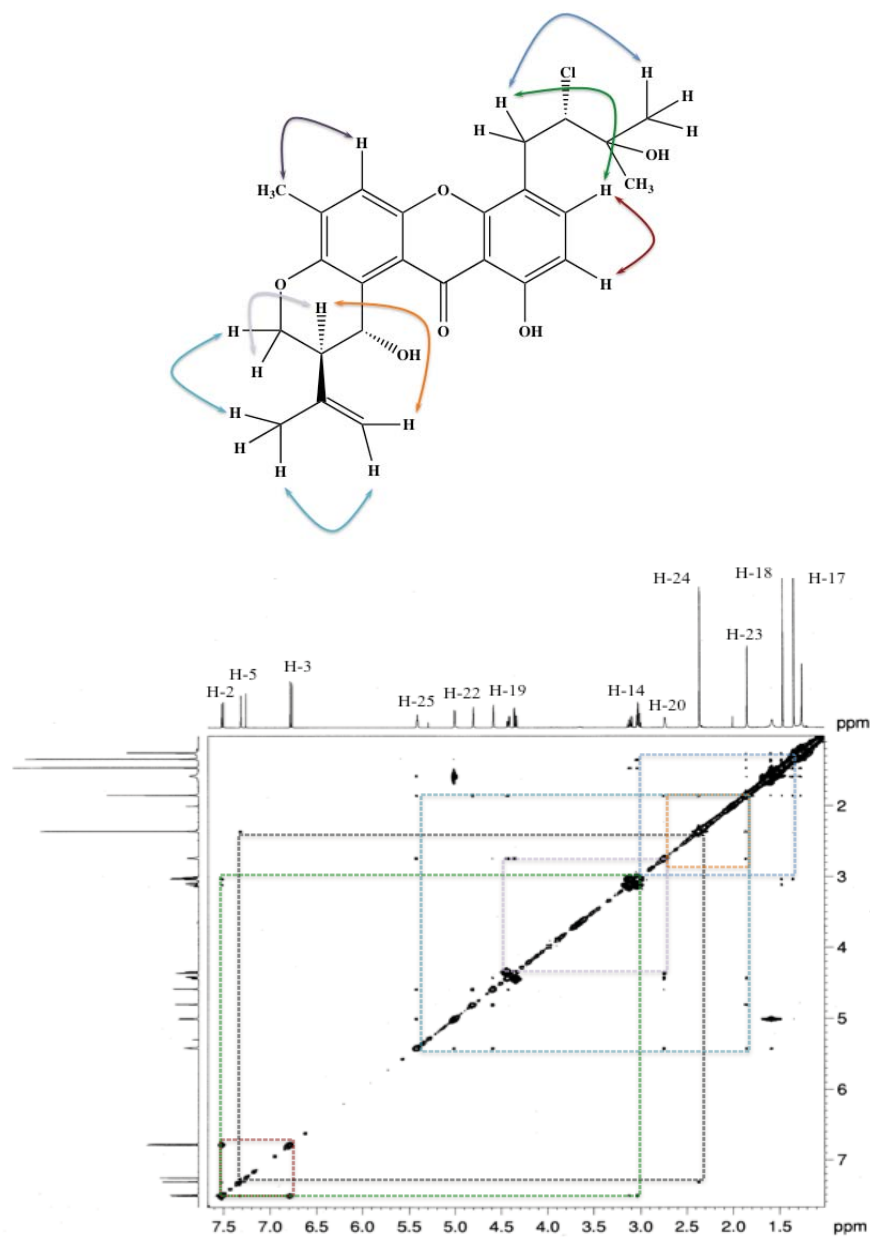


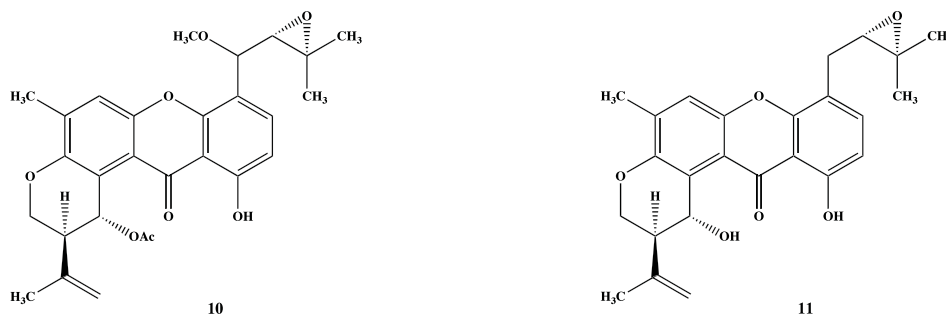
Figura 12. Espectro de ^1H -RMN NOESY del hidrato de 15(*S*)-cloro-tajixantona (**1**) mostrando las correlaciones señaladas en la estructura.

5.2.3 Elucidación estructural de la 14-metoxi-tajixantona (**2**)

El compuesto **2** se aisló como un sólido cristalino amarillo (5 mg; p. f. 200-201 °C) ópticamente activo, a partir de la fracción secundaria $\text{F}_{4\text{-VII}}$. La fórmula molecular del compuesto se estableció como $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_7$ mediante EM modalidad FAB⁺. Este compuesto difiere del 25-acetato de la 14-metoxi-tajixantona (**10**), compuesto aislado de la especie relacionada *E*.

varicolor, por 42 uma (Pornpakakul *et al.*, 2006). El análisis detallado de los espectros de RMN unidimensionales y bidimensionales [Tabla 3] del compuesto **2** mostró las señales características de la tajixantona (**11**) y permitió evidenciar que **2** era el derivado desacetilado de **10**. Por otra parte, la acetilación del producto **2** con $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}/\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ permitió la obtención de un derivado acetilado idéntico en todas sus propiedades (IR, UV, RMN, $[\alpha]_D$) al producto natural **10**, corroborando así, químicamente, la presencia del grupo hidroxilo en C-25.

La diferencia más obvia entre los espectros de ^1H -RMN de los dos compuestos fue la señal del grupo metino en C-25 desplazada diamagnéticamente en **2** [δ_{H} 5.43 (d, $J= 2.1$ Hz)] en lugar de la señal en δ_{H} 6.90 (s) observada en **10**. La ubicación de los sustituyentes en la molécula se realizó con base en las correlaciones observadas en los espectros NOESY y HMBC [Figuras 13 y 14]. El registro y análisis del espectro de DC de **2** [$\Delta\epsilon$ (nm) -5.27×10^4 (247), -2.69×10^4 (260), -2.62×10^2 (295), -9.70×10^3 (301), 1.97×10^2 (317), -1.16×10^4 (335)] permitió evidenciar algunas diferencias importantes con respecto a los productos **1** y **4** debido a la presencia de un nuevo centro quiral en C-14.



Con la finalidad de determinar la configuración absoluta de los centros estereogénicos presentes en el compuesto novedoso **2** se aplicaron técnicas avanzadas de modelado molecular y el método de Mosher. Así, la determinación de la configuración absoluta en C-20 y C-25 se realizó mediante la reacción de esterificación de Mosher siguiendo la metodología descrita por Othani y colaboradores (Ohtani *et al.*, 1991; Fujimoto *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2007). Para ello, se generaron los ésteres de los ácidos quirales (*S*)- y (*R*)-(-)- α -metoxi- α -trifluorometil-fenilacético. Posteriormente, se analizaron las diferencias de los desplazamientos químicos en los espectros de ^1H -RMN de los ésteres (*S*)- y (*R*)-MTPA con la finalidad de establecer el efecto protector inducido por el anillo aromático y el efecto desprotector inducido por el grupo metoxilo del

MTPA sobre los hidrógenos cercanos al centro quiral. La comparación de los desplazamientos químicos en los espectros de ^1H -RMN de los ésteres de Mosher (*S*)- y (*R*)-MTPA del compuesto **2** [Tabla 3], permitió realizar las siguientes observaciones y conclusiones: la diferencia positiva $\Delta\delta_{\text{H}}$ (*S*-*R*) observada para los protones H-19a [+0.0037], H-19b [+0.0025] y H-20 [+0.0040] permitió establecer la configuración absoluta de los centros estereogénicos C-20 y C-25 como *S* y *R*, respectivamente [Figura 15].

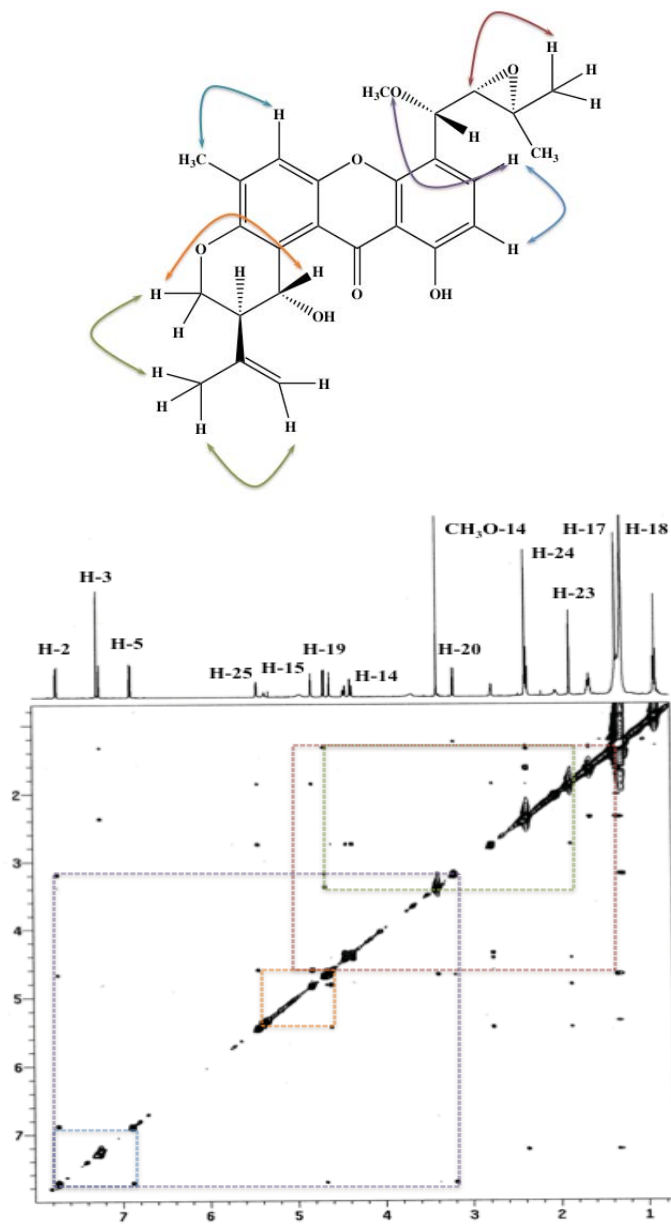


Figura 13. Espectro ^1H -RMN NOESY de la 14-metoxi-tajixantona (**2**) mostrando las correlaciones señaladas en la estructura.

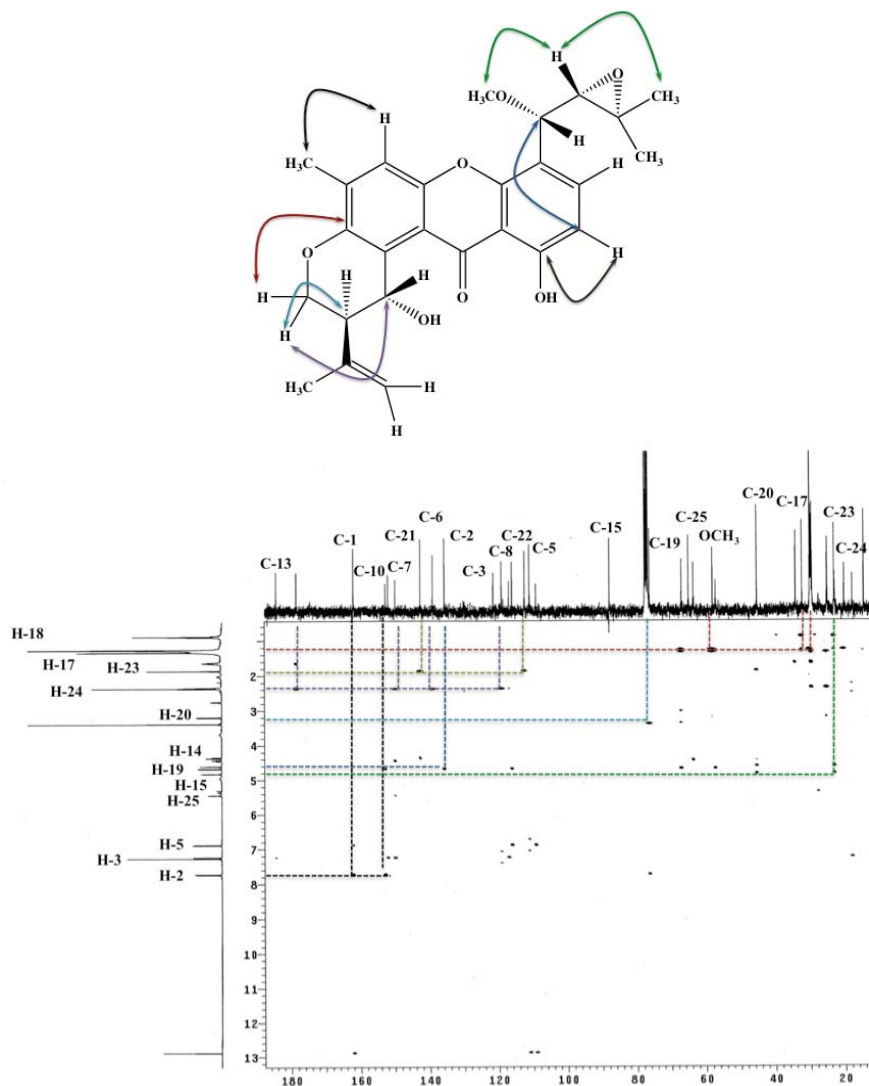


Figura 14. Espectro ^{13}C -RMN HMBC de la 14-metoxi-tajixantona (**2**) mostrando las correlaciones señaladas en la estructura.

Posteriormente, se procedió a determinar la estereoquímica del centro quiral C-14 mediante el análisis conformacional de **2** aplicando como herramienta cálculos de modelado molecular. Debido al libre giro del enlace C14-C15, se decidió realizar una búsqueda conformacional de los cuatro estereoisómeros posibles de **2** (**2a-2d**) utilizando un protocolo Monte Carlo. Este procedimiento se efectuó en el programa Spartan 04, utilizando el campo de fuerza de mecánica molecular MMFF94.

Tabla 3. Datos espectroscópicos de RMN de la 14-metoxi-tajixantona (**2**), el éster (*S*)-MTPA de **2** (**2s**), el éster (*R*)-MTPA de **2** (**2r**) y los valores de $\Delta\delta$ ($\delta_{2s}-\delta_{2r}$) en δ (ppm).

Posición	Compuesto 2				2s	2r	$\Delta\delta$
	δ_C	δ_H , mult. (<i>J</i> in Hz)	HMBC	NOESY	δ_H	δ_H	($\delta_{2s}-\delta_{2r}$)
1	162.2		H-2, H-3, OH-1,				
2	135.6	7.72 d (8.5)	H-14, H-15	H-14, H-15			
3	119.0	6.88 d (8.5)	H-2				
4	109.0		H-3, H-14				
5	110.9	7.23 d (1.0)		H-24			
6	138.9		H-24				
7	149.8		H-19a, H-19b, H-24				
8	119.1						
9	116.8		H-3				
10	152.7		H-2				
11	151.9		H-5				
12	115.9						
13	184.4						
14	66.7	3.18 d (8.0)	H-15	H-2, H-17, H-18			
15	76.1	4.67 d (8.0)	H-2, CH ₃ O-14, H-14, H-17, H-18	H-2, H-18, CH ₃ O-14			
16	56.9		H-15, H-17, H-18,				
17	24.7	1.25 s	H-18		1.7952	1.7897	+0.0055
18	19.8	1.32 s	H-17	H-14, H-15	1.7523	1.7558	+0.0035
19	64.7	a 4.43 dd (3.6, 10.8) b 4.35 dd (3.0, 10.8)	H-20, H-25	H-25	4.4275	4.4238	+0.0037
20	45.0	2.74 ddd (2.1, 3.0, 3.6)	H-19b, H-23, H-22a, H-22b	H-23	4.3790	4.3765	+0.0025
21	142.5		H-19b, H-23	H-25	2.7350	2.6950	+0.0040
22	112.3	a 4.81 d (2.5) b 4.60 d (1.0)	H-23	H-22b, H-25	4.8060	4.8045	+0.0015
23	22.7	1.85 s	H-22a, H-22b	H-22a, H-23	4.6160	4.6145	+0.0015
24	17.5	2.36 s	H-5	H-20	1.8391	1.9111	-0.0720
25	63.3	5.43 d (2.1)	H-19a, H-19b		2.3490	2.2860	+0.0063
OH-1		12.86 s		H-20, H-22b, H-23	5.5025	5.4905	+0.012
CH₃O-14	57.8						
OH-25		4.94 sa					

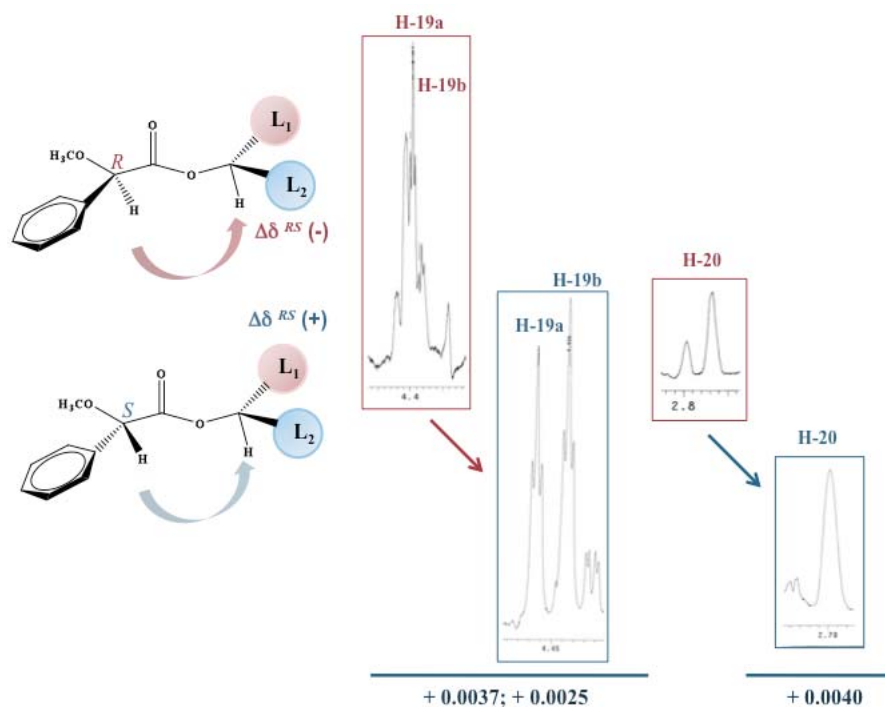


Figura 15. Modelo para determinar la estereoquímica absoluta en alcoholes secundarios (Ohtani *et al.*, 1991).

Para cada una de las estructuras analizadas **2a-2d** se obtuvieron 30, 28, 25 y 22 conformeros de mínima energía, respectivamente. El análisis detallado de cada una de las estructuras de mínima energía obtenidas permitió descartar a todas aquellas que estuvieran duplicadas y a las que presentaron un valor energético en el rango entre 0 y 3 kcal/mol. La **Figura 16** ilustra la superposición de los 28 conformeros seleccionados para el estereoisómero **2b** que presentan en todos los casos, una relación *anti* de los sustituyentes presentes en el anillo tetrahidropirano y la misma orientación para la cadena de isoprenilo en C-4. Posteriormente, cada conformero fue optimizado geoméricamente mediante DFT al nivel de teoría B3LYP/DGDZVP (Chang *et al.*, 1989; Godbout *et al.*, 1992) utilizando el programa Gaussian W03; para cada una de las estructuras analizadas se obtuvieron los valores teóricos de energía libre (ΔG), poblacionales (P), frecuencias en el IR (ν), rotación óptica específica $[\alpha]_D^d$ y constantes de acoplamiento (J) entre los protones vecinales $^1\text{H}-^1\text{H}$ ($J_{19a,20}$, $J_{19b,20}$, $J_{20,25}$ y $J_{14,15}$). Estos dos últimos conjuntos de parámetros fueron analizados mediante una distribución de Boltzmann asignándoles su correspondiente valor poblacional (fracción mol) a 298 K y 1 atm. Los resultados obtenidos para cada uno de los conformeros minimizados se resumen en la **Tabla 4**. Estos resultados muestran

una diferencia significativa entre los valores de rotación óptica experimentales y el valor calculado de **2** ($[\alpha]_D = -38$) para los diastereoisómeros **2a**, **2c** y **2d**, permitiendo establecer que el estereoisómero **2b** es el que presenta la menor diferencia, casi cercana a cero. Por lo tanto, este conformero es el que representa la mejor estructura para **2**, en consecuencia la configuración en C-14 se estableció como *S* y la de los otros centros quirales se corroboró como 1*S*,2*S*,2*S*,5*R* [Figura 17].

Al mismo tiempo, el análisis comparativo de los valores de las constantes de acoplamiento teóricas, calculadas como la sumatoria de los valores para cada conformero en función de la fracción molar, y los valores experimentales indicó que la mejor correlación existía con el conformero **2b**. Todo este análisis permitió confirmar la relación *trans* entre los sustituyentes en C-20 y C-25 y que las constantes de acoplamiento teóricas del producto con una configuración *S* en C-20 y *R* en C-25 mostraban la mejor correspondencia con aquellas encontradas experimentalmente para el producto **2**. Finalmente, el análisis conformacional del conformero **2b** mediante cálculos de mecánica molecular reveló seis conformaciones de mínima energía, las cuales se ilustran en la Figura 18 e incluyen su mínimo global (**2b-1**). En los conformeros de mayor estabilidad **2b-1**, **2b-2** y **2b-5** los sustituyentes presentes en el anillo tetrahidropirano presentan un arreglo *pseudo*-axial, en tanto que en los conformeros **2b-3**, **2b-4** y **2b-6** estos adoptan un arreglo *pseudo*-ecuatorial. En todos los casos el arreglo de la cadena isoprenilo en C-4 permanece idéntico, permitiendo sustentar la propuesta configuracional encontrada experimentalmente para el producto natural **2**. Con base en los análisis detallados anteriormente el compuesto novedoso **2** se caracterizó como la (1*R*,2*S*)-8-[(*S*)-(*S*)-3,3-dimetiloxiran-2-il)-(metoxi)-metil]-1,11-dihidroxi-5-metil-2-(prop-1-en-2-il)-2,3-dihidropirano-[3,2-*a*]-xanten-12(1*H*)-ona y se designó con el nombre trivial de 14-metoxi-tajixantona (**2**).

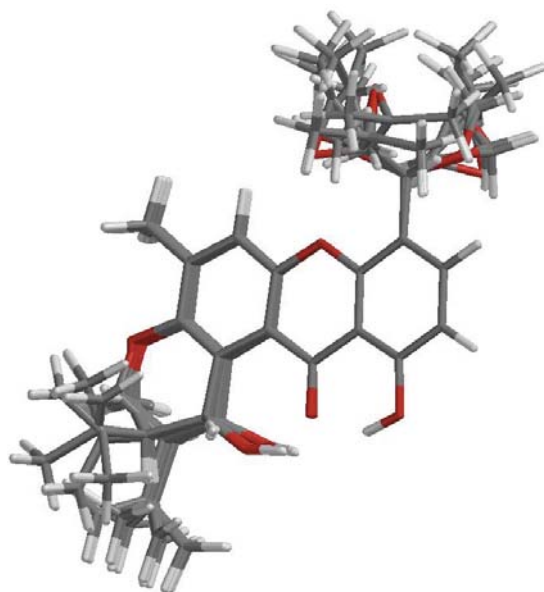


Figura 16. Superposición de los 28 conformeros de mínima energía obtenidos del análisis Monte Carlo para el estereoisómero **2b**.

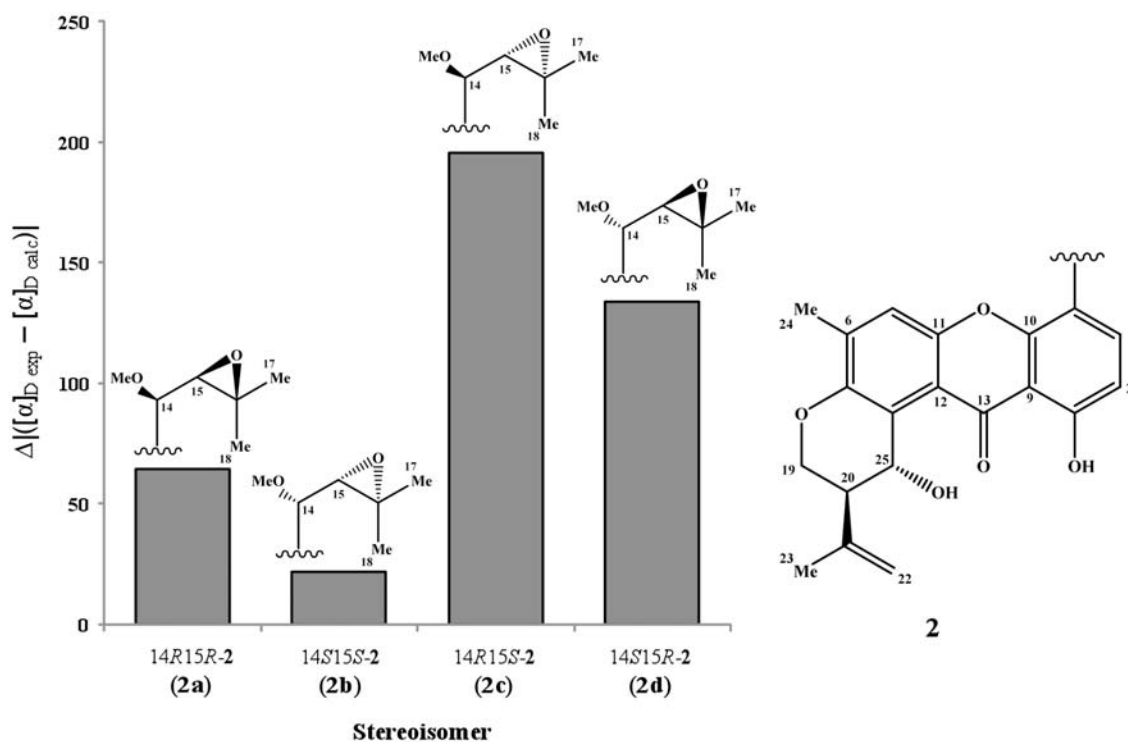


Figura 17. Diferencia absoluta entre los valores de rotación óptica experimental y calculada (DFT B3LYP/DGDZVP) para los estereoisómeros **2a-2b** del compuesto **2**.

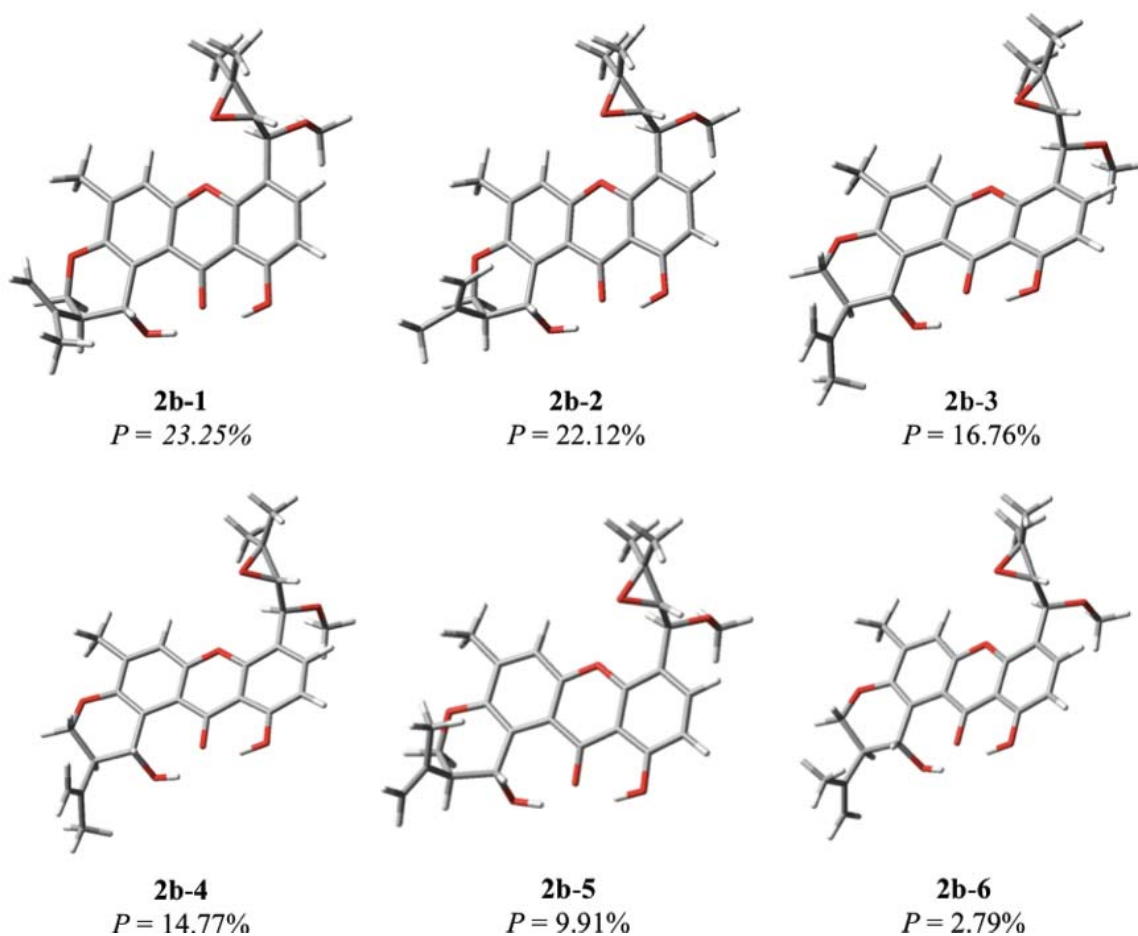


Figura 18. Conformaciones más relevantes del compuesto **2** que corresponden al 90% de la población conformacional.

En la **Tabla 5** se incluyen los datos espectroscópicos del resto de las xantonas (**3-5**) aisladas de *Emericella 25379*, de tal forma que los datos generados en esta investigación puedan ser utilizados para fines comparativos.

Tabla 4. Datos de energías libres (ΔG),^a población al equilibrio (P),^b constantes de acoplamiento (J)^c y rotaciones ópticas específicas $[\alpha]_D$ ^d de los conformeros **1-28** de [(14*S*,15*S*,20*S*,25*R*)-] **2**.

conformero	ΔG	P	$J_{19a,20}$	$J_{19b,20}$	$J_{20,25}$	$J_{14,15}$	$[\alpha]_D$
1	0.00	23.25	1.13	2.98	0.87	9.71	28.34
2	0.03	22.12	1.37	2.44	0.96	9.71	174.63
3	0.19	16.76	11.05	3.39	9.53	9.71	-179.00
4	0.27	14.77	11.05	3.40	9.53	9.71	-176.04
5	0.51	9.91	1.11	3.03	0.77	9.72	28.50
6	1.26	2.79	11.15	3.57	9.03	9.71	-220.72
7	1.47	1.95	1.36	2.46	0.95	9.60	21.38
8	1.71	1.30	1.13	2.98	0.89	9.60	-134.48
9	1.99	0.81	1.13	2.98	0.87	9.53	47.19
10	2.08	0.70	11.07	3.42	9.47	9.58	-307.80
11	2.08	0.70	11.07	3.42	9.46	9.58	-307.77
12	2.08	0.69	1.38	2.44	0.97	9.54	190.90
13	2.09	0.68	1.13	2.97	0.89	1.96	234.91
14	2.28	0.49	1.10	3.05	0.77	9.61	-116.56
15	2.35	0.44	1.36	2.45	0.97	3.59	317.61
16	2.35	0.44	11.05	3.39	9.54	9.56	-165.28
17	2.38	0.42	11.05	3.40	9.54	9.56	-163.95
18	2.51	0.34	1.11	3.04	0.77	9.53	40.98
19	2.57	0.30	1.14	2.96	0.90	3.55	184.51
20	2.57	0.30	1.10	3.07	0.78	1.97	221.75
21	2.63	0.27	1.10	3.06	0.78	3.58	165.93
22	2.94	0.16	11.17	3.60	8.99	9.59	-343.44
23	3.11	0.12	11.15	3.57	9.05	9.55	-204.17
24	3.21	0.10	11.06	3.41	9.50	3.60	-57.10
25	3.55	0.06	1.35	2.48	0.94	9.56	-55.13
26	3.55	0.06	1.13	2.99	0.87	9.57	-212.54
27	3.66	0.05	11.04	3.39	9.49	9.59	-387.57
28	4.08	0.02	1.10	3.06	0.76	9.57	-189.25
Promedio conformacional^e			4.86	3.01	4.06	9.54	-16.11
Valores experimentales			3.60	3.00	2.75	8.00	-38.00

^a B3LYP/DGDZVP en kcal/mol. ^b en porcentaje a partir de los valores de ΔG a 298 K y 1 atm. ^c constantes de acoplamiento en Hz calculadas a partir de los ángulos dihedros B3LYP/DGDZVP utilizando la ecuación de Altona. ^d B3LYP/DGDZVP, rotación específica en grados $\times [\text{dm} \times \text{g}/\text{cm}^3]^{-1}$. ^e $\sum_i [\alpha]_D^i, J-J_{19a,20}^i, J-J_{19b,20}^i, J-J_{20,25}^i$ o $J-J_{14,15}^i \times P^i$, donde $[\alpha]_D^i, J-J_{19a,20}^i, J-J_{19b,20}^i, J-J_{20,25}^i$ o $J-J_{14,15}^i \times P^i$ son valores de $[\alpha]_D, J-J_{19a,20}, J-J_{19b,20}, J-J_{20,25}$ o $J-J_{14,15}$ y la población en porcentaje para los i conformeros.

Tabla 5. Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN para la shamixantona (3), el hidrato de tajixantona (4) y la emericelina (5) aisladas de *Emericella 25379*.

Posición	shamixantona (3)	hidrato de tajixantona (4)	emicelina (5)
	δ_C/δ_H , mult. (J en Hz)	δ_C/δ_H , mult. (J en Hz)	δ_C/δ_H , mult. (J en Hz)
1	159.7	160.3	159.7
2	109.8/6.74 d (8.4)	109.9/6.72 d (8.4)	106.2/6.85 d (8.4)
3	136.6/7.44 d (8.4)	138.3/7.49 d (8.4)	136.6/7.48 dd (0.45, 8.4)
4	109.2	109.2	109.8
5	119.4/7.30 s	119.1/7.19 s	119.4/7.28 d (0.6)
6	138.4	138.5	138.4
7	149.4	149.5	149.4
8	120.9	120.8	123.9
9	118.9	116.3	118.8
10	152.8	153.1	152.8
11	152.3	151.9	152.3
12	116.7	116.8	118.7
13	184.5	184.3	184.5
14	27.5/a 3.49 d (5.5); b 3.50 d (6.0)	32.0/a 3.16 dd (1.2, 14.0); b 2.63 dd (10.8, 14.0)	27.1/ 3.39 d (7.2)
15	121.7/5.31 dd (7.2, 7.6)	77.7/5.31 dd (7.2, 7.6)	122.1/5.34 dd (1.5, 7.5)
16	133.3	72.9	133.3
17	25.8/1.75 s	26.5/1.34 s	25.3/1.74 s
18	17.9/1.79 s	23.6/1.39 s	18.4/1.74 s
19	64.6/ a 4.43 dd (2.8, 11.2); b 4.34 dd (2.8, 10.8)	64.5/ a 4.41 dd (2.0, 10.8); b 4.31 dd (2.8, 10.8)	71.6/ 4.45 dd (7.5)
20	44.9/2.73 s	44.8/2.69 s	119.5/5.61 dd (1.5, 7.2)
21	142.6	142.5	142.6
22	112.3/a 4.80 s; b 4.58 s	112.3/a 4.77 s; b 4.53 s	25.8/1.81 s
23	22.5/1.85 s	22.6/1.82 s	18.2/1.71 s
24	17.5/2.36 s	17.4/2.28 s	17.9/2.41 s
25	63.2/5.41 s	63.2/5.34 s	56.2/5.41 s
OH-1	12.60 s	12.54 s	12.92 d (0.3)
OH-15		2.44 s	
OH-16		2.37 s	
OH-25	5.09 s	4.98 d (4.0)	4.50 d (8.1)

5.3 Aislamiento y caracterización de los análogos de la malbrancheamida (8) presentes en la especie fúngica *Malbranchea aurantiaca*

La reinvestigación química de la especie *M. aurantiaca*, con la finalidad de obtener los compuestos minoritarios análogos de la malbrancheamida, permitió el aislamiento y la caracterización de dos metabolitos secundarios novedosos. Estos compuestos fueron designados con los nombres triviales de malbrancheamida B (6) y premalbrancheamida (7). De manera adicional, se aislaron los compuestos conocidos malbrancheamida (8) e isomalbrancheamida B (9) [Figura 19].

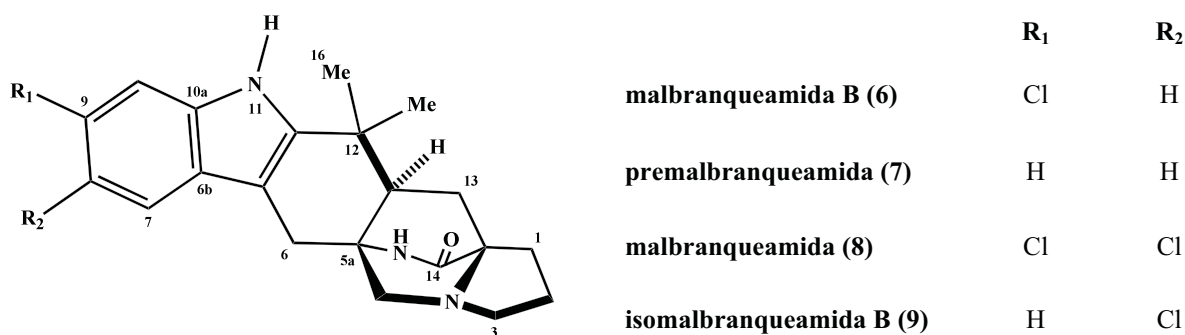


Figura 19. Metabolitos secundarios fúngicos obtenidos de *M. aurantiaca*.

5.3.1 Caracterización estructural de la malbrancheamida B (6) y la premalbrancheamida (7)

Los productos 6 y 7 se obtuvieron como sólidos blancos amorfos, ópticamente activos y solubles en MeOH [Figura 20]. Los productos reaccionaron positivamente frente a los reactivos de Dragendorff y Ehrlich. Sus fórmulas moleculares se establecieron mediante espectrometría de masas modalidad FAB⁺ como C₂₁H₂₅ON₃ y C₂₁H₂₄ON₃Cl, respectivamente. La presencia de un átomo de cloro en 6 se determinó mediante el análisis del conjunto isotópico observado en [M+2] y [M+4] a partir del ión molecular [M]⁺ en *m/z* 369.1589. Los espectros en el UV contienen bandas de absorción máxima en 231 y 292 nm. Los espectros de RMN fueron muy similares a los de la malbrancheamida (8), difiriendo exclusivamente en los desplazamientos químicos y apariencia de las señales en la región aromática atribuibles al anillo carbocíclico del grupo indol.

Estas observaciones preliminares permitieron sugerir *a priori* que los compuestos **6** y **7** podían ser los derivados monohalogenado y no halogenado, respectivamente de **8**.

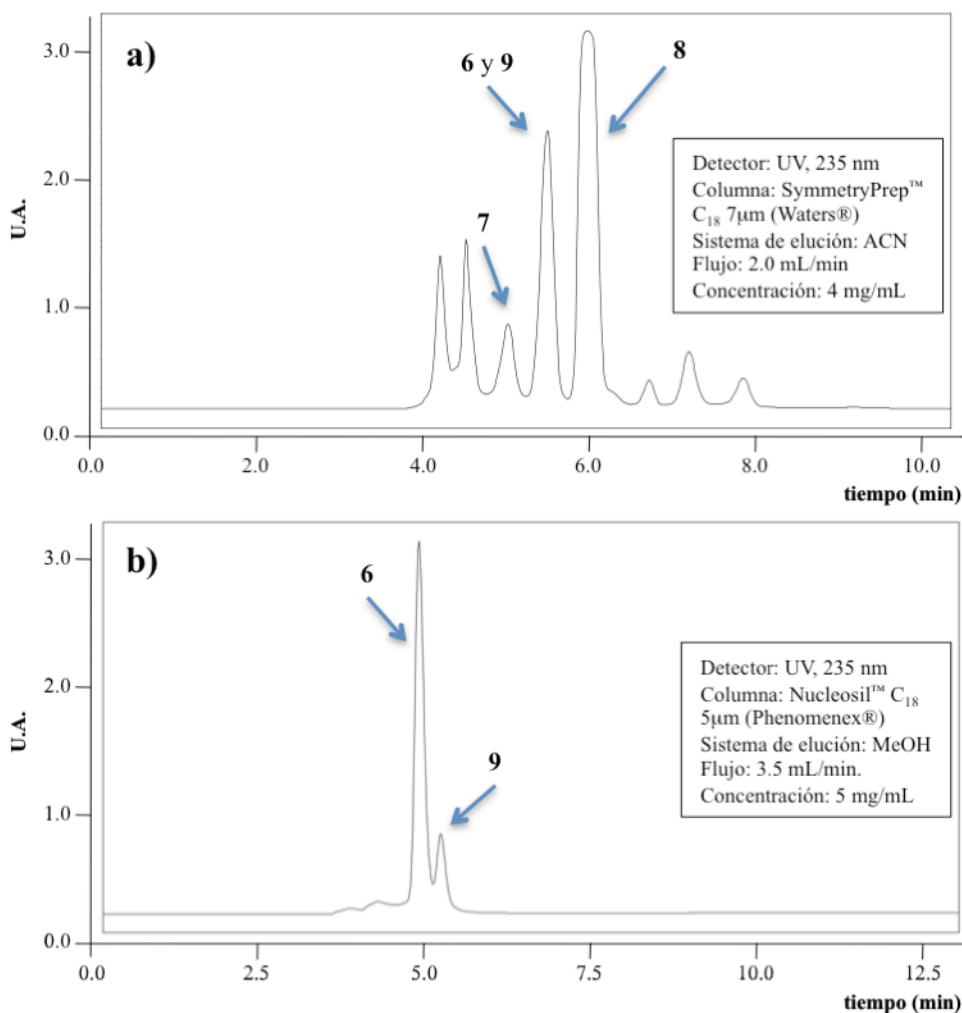


Figura 20. **a)** Cromatograma por CLAE de la fracción primaria **F**₁₄: **7** (t_R 5.0 min); **6** y **9** (5.5 min) y **8** (t_R 6.1 min). **b)** Cromatograma por CLAE de la mezcla obtenida a partir de la fracción primaria **F**₁₄: **6** (t_R 4.9 min) y **9** (5.3 min).

En el espectro de ¹H-RMN de **6** [Tabla 6 y Figura 21] se observó un sistema ABX [δ_H 7.31 (d, J = 8.7 Hz, H-7), 6.94 (dd, J = 1.8, 8.4 Hz, H-8) y 7.26 (d, J = 1.7 Hz, H-10)] en lugar de los singletes de los hidrógenos H-7 (δ_H 7.47) y H-10 (δ_H 7.39) presentes en el espectro de **8**. En el caso de **7**, los hidrógenos H-7-H-10 se aprecian como un sistema ABCD [δ_H 7.35 (ddd, J = 1.0, 1.8, 7.6 Hz, H-7), 6.97 (dd, J = 1.0, 7.5 Hz, H-8), 6.97 (dd, J = 1.0, 7.5 Hz, H-9) y 7.26 (ddd, J = 0.8, 1.6, 8.0 Hz, H-10)] característico de un indol no sustituido en la porción carbocíclica.

Tabla 6. Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN para las malbranqueamidas aisladas de *M. aurantiaca*.

Posición	isomalbranqueamida B (9)	premalbranqueamida (7)	malbranqueamida (8)	malbranqueamida B (6)
	δ_C/δ_H mult. (J en Hz)	δ_C/δ_H mult. (J en Hz)	δ_C/δ_H mult. (J en Hz)	δ_C/δ_H mult. (J en Hz)
1	28.2/a 2.51 m; b 1.46 m	28.2/a 2.43 m; b 1.49 m	28.1/a 2.452 m; b 1.46 m	28.5/a 2.42 m; b 1.34 m
2	23.6/1.86 m	23.5/1.90 m	23.6/1.87 m	22.4/1.72 m
3	52.9/a 3.03 m; b 2.15 q (2.0, 5.0)	55.4/a 3.07 m; b 2.13 q (2.0, 5.0)	55.3/a 3.05 m; b 2.15 q (2.0, 5.0)	55.2/a 2.93 ddd (2.1, 6.0, 9.6); b 2.41 ddd (2.1, 6.0, 9.6)
5	59.5/a 2.26 dd (2.0, 10.0); b 3.42 d (10.0)	59.5/a 2.28 dd (2.0, 10.0); b 3.36 d (10.0)	59.4/a 2.25 dd (2.0, 10.0); b 3.42 d (10.0)	59.5/a 2.13 d (9.9); b 3.25 d (9.9)
5a	55.3	57.7	57.5	58.5
6	30.3/a 2.86 m; b 2.85 m	30.4/a 2.96 m; b 2.80 m	30.0/a 2.86 m; b 2.85 m	29.9/a 2.79 d (15.9); b 2.72 d (15.9)
6a	104.9	104.5	104.8	103.7
6b	123.0	122.0	123.3	122.7
7	120.0/7.32 d (2.0)	122.0/7.35 ddd (1.0, 1.8, 7.6)	119.6/7.47 s	120.7/7.31 d (8.7)
8	123.3	119.4/6.97 dd (1.0, 7.5)	125.4	120.6/6.94 dd (1.8, 8.4)
9	125.3/7.00 dd (2.6, 8.6)	119.5/6.97 dd (1.0, 7.5)	128.2	126.6
10	111.6/7.22 d (8.6)	128.2/7.26 ddd (0.8, 1.6, 8.0)	113.1/7.39 s	112.1/7.26 d (1.7)
10a	135.6	138.4	137.3	135.4
11			11.04 s	
11a	146.7	146.7	145.2	144.4
12	32.6	35.4	35.5	34.1
12a	49.8/2.14 m	49.6/2.09 m	48.5/2.14 m	46.9/2.07 m
13	32.6/a 1.99 m; b 1.94 m	32.5/ a 1.99 m; b 1.98 m	32.5/ a 1.99 m; b 1.94 m	33.9/ a 1.98 m; b 1.91 m
13a	66.1	66.2	66.1	64.1
14	176.7	176.7	176.7	173.1
15			8.37 s	
16	30.8/1.32 s	30.9/1.32 s	30.6/1.32 s	31.1/1.26 s
17	24.2/1.42 s	24.4/1.46 s	24.2/1.42 s	26.6/1.31 s

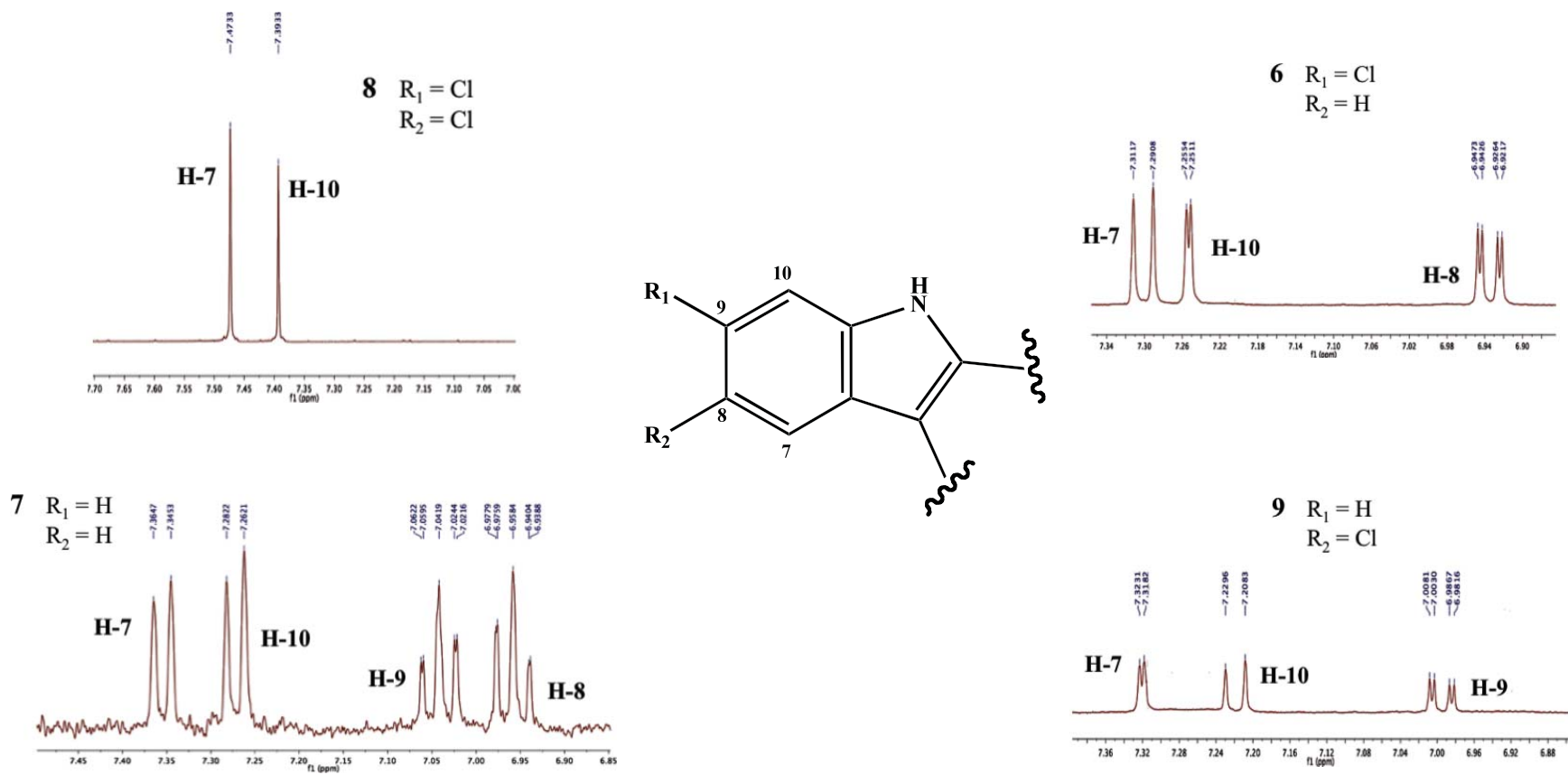


Figura 21. Vista parcial de la región aromática (δ_H 6-8 ppm) de los espectros de 1H -RMN de los compuestos 6-9.

En los espectros de ^{13}C -RMN y HSQC de los compuestos **6** y **7**, al igual que en el caso de **8**, se aprecian señales para 21 átomos de carbono y corroboran la presencia del grupo lactama, y de la porción biciclo[2.2.2]diazaoctano.

La ubicación del cloro en C-9 en el caso del alcaloide **6** se realizó con base en las correlaciones observadas en el espectro HMBC entre C-10a/H-7, C-6b/H-10, C-6a/H-6, H-7, C-5a/H-12a, C-12a/H-6, H-16, H-17 y C-11a/H-6, H-16, H-17. Así mismo las correlaciones H-10/H-11 y H-7/H-6, observadas en el espectro NOESY, aportaron una evidencia adicional para ubicar al átomo de Cl en C-9.

Las demás correlaciones observadas en los diferentes espectros de RMN bidimensionales (COSY, HMBC, HSQC y NOESY) permitieron corroborar que el resto de la molécula en los dos productos era igual a aquella de la malbranqueamida (**8**). La estereoquímica relativa de los centros quirales presentes en **6** y **7** se realizó con base en el análisis comparativo de sus espectros de DC [λ_{max} ($\Delta\epsilon$): ~ 244 (2×10^6), ~ 217 (1.3×10^6), ~ 226 (1.2×10^6), ~ 296 (1.5×10^5) nm] con el de **8**, los cuales resultaron prácticamente superponibles. Con base en las evidencias presentadas, los productos **6** y **7** se caracterizaron como la (5a*S*,12a*S*,13a*S*)-9-cloro-12,12-dimetil-2,3,11,12,12a,13-hexahidro-1*H*,6*H*-5a,13a-(epiminometano)indolizino[7,6b]carbazol-14-ona (**6**) y la (5a*S*,12a*S*,13a*S*)-12,12-dimetil-2,3,11,12,12a,13-hexahidro-1*H*,6*H*-5a,13a-(epiminometano)indolizino[7,6b]carbazol-14-ona (**7**), respectivamente y se designaron con los nombres triviales de premalbranqueamida y malbranqueamida B, respectivamente.

Los espectros (RMN, IR y EM) de los productos de síntesis de Williams y colaboradores (2008) resultaron idénticos a los correspondientes de los productos naturales. Esto permitió la caracterización inequívoca de los derivados naturales de la malbranqueamida (**8**).

Finalmente, como parte de la elucidación estructural de los compuestos novedosos **6**, **7** y **9** y con la propósito de entender el comportamiento en el espacio de los mismos, se realizó un análisis conformacional mediante modelado molecular utilizando un protocolo Monte Carlo implementado en el programa Spartan 04 con el campo de fuerza de mecánica molecular MMFF94. De manera adicional, se incluyó en todos estos nuevos cálculos al compuesto **8** para

poder realizar la comparación energética y estructural adecuada. Este estudio conformacional permitió la obtención de 15, 13, 15 y 12 conformeros para los metabolitos **6-9**, respectivamente. Posteriormente, se realizó la optimización mediante DFT utilizando el programa Gaussian W03 al nivel de teoría B3LYP/6-31+G(d) de cada uno de los conformeros; los resultados generados mediante la minimización energética de los de mayor estabilidad permitió establecer el mínimo energético para cada uno. Finalmente, estos estudios indicaron que, en las estructuras optimizadas para los compuestos **6**, **7** y **9** el anillo E despliega una conformación de sobre idéntica a la previamente descrita para el compuesto **8**, con los átomos N4-C13a-C1-C2 localizados en el mismo plano mientras que el átomo C3 se localiza fuera de éste [**Figura 22**].

5.4 Caracterización de la interacción ligando-CaM de los metabolitos aislados de *Emericella* 25379

De acuerdo a la estrategia diseñada en la presente investigación y con la finalidad de evaluar la interacción de los productos **1-5** aislados de *Emericella* 25379 con la CaM, se realizaron los siguientes estudios: a) estimación del efecto del inhibidor potencial sobre la actividad fosfodiesterasa del complejo Ca²⁺-CaM-PDE1; b) medición del apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la CaM; c) estudios de acoplamiento molecular y d) la valoración en el cambio de la movilidad electroforética de la proteína.

5.4.1 Evaluación del efecto *in vitro* de los metabolitos 1-5 aislados de la especie fúngica *Emericella* 25379 sobre el complejo Ca²⁺-CaM-PDE1

Con la finalidad de demostrar si la interacción de los compuestos **1-5** con la CaM modifica sus propiedades moduladoras de sus enzimas blanco se aplicó un método enzimático *in vitro*; como enzima monitora se utilizó a la PDE1 de cerebro de bovino. Esta enzima regula la concentración intracelular del AMPc segundo mensajero que participa en una amplia gama de procesos celulares, degradándolo a través de una reacción de hidrólisis en AMP.

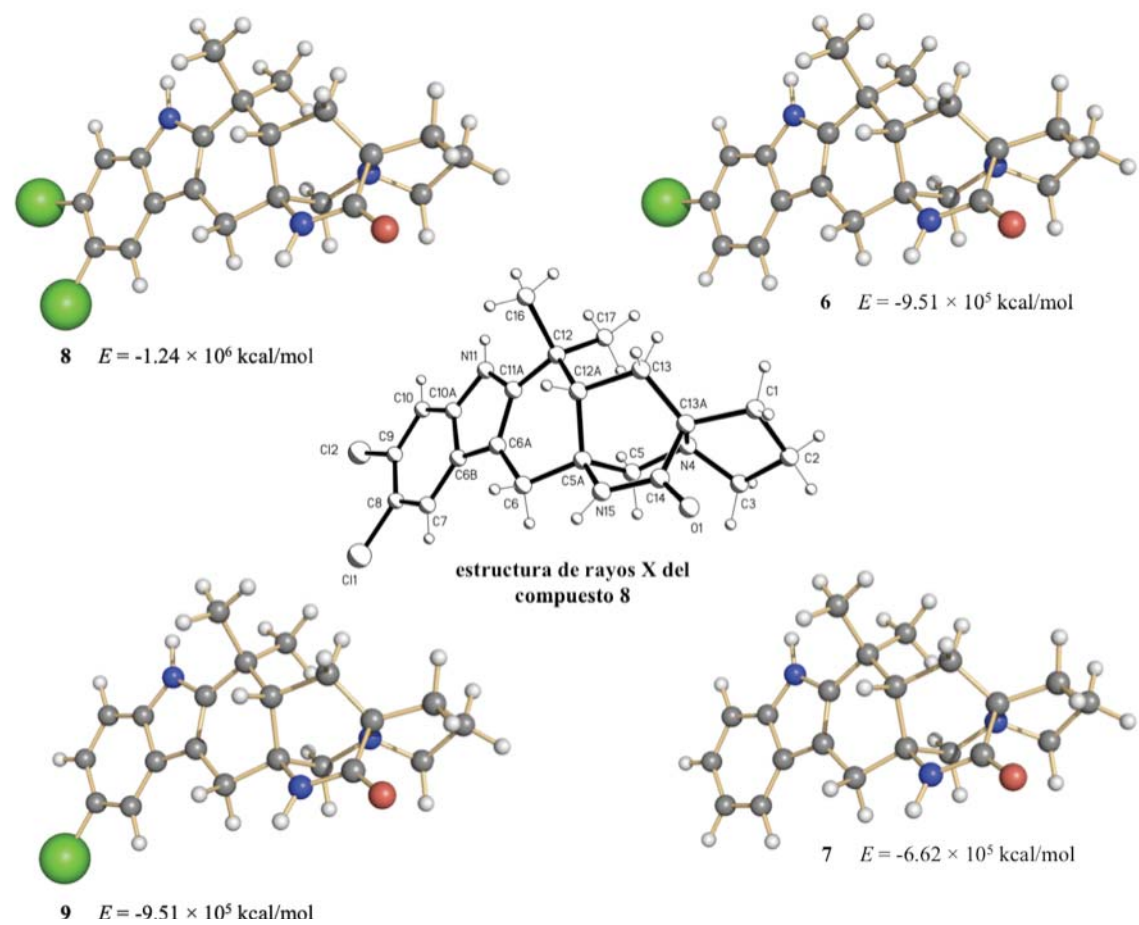


Figura 22. Análisis conformacional y optimización geométrica mediante DFT de los compuestos 6-9 aislados de *M. aurantiaca*.

La actividad de la PDE1 en presencia de CaM y los compuestos de prueba se estableció mediante una reacción enzimática acoplada a una 5'-nucleotidasa que hidroliza al AMP a Pi y ADP. El Pi se cuantifica espectrofotocolorimétricamente de acuerdo con la metodología descrita por Sharma y Wang (1979) y la cantidad de Pi generada se correlaciona con la actividad de la enzima.

Los resultados obtenidos de la evaluación indicaron que los compuestos **2** y **4** inhiben la activación del complejo Ca²⁺-CaM-PDE1 de manera dependiente de la concentración y con una potencia relativa mayor al de la CPZ, un antagonista bien caracterizado de la CaM. Estos resultados se indican en la **Tabla 7**. Posteriormente, con la finalidad de determinar si el mecanismo de esta inhibición de los compuestos es de tipo competitivo o no competitivo se realizó un experimento cinético conducente a determinar la K_i (Dixon, 2007). Para ello se utilizaron diferentes concentraciones de CaM, en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos a evaluar. El resultado de este experimento indicó que ambos compuestos actúan como antagonistas competitivos de la CaM, compitiendo con ésta enzima por la formación del complejo activo Ca²⁺-CaM-PDE1 [**Figura 23**]. Los valores de K_i obtenidos para los compuestos **2** y **4** fueron de 13.92 ± 2.29 y 25.38 ± 2.26 μM, respectivamente.

Tabla 7. Datos enzimáticos de los inhibidores de la CaM **1-5** aislados de la especie fúngica *Emericella* 25379.

compuesto	inhibición del complejo Ca ²⁺ -CaM-PDE1		
	CI ₅₀ μM	potencia relativa	K _i μM
1	9.59 ± 2.65	0.76	ND
2	5.62 ± 1.25	1.30	13.92 ± 2.29
3	29.16 ± 6.39	0.25	ND
4	5.54 ± 1.28	1.31	25.38 ± 2.26
5	68.17 ± 9.33	0.11	ND
CPZ	7.26 ± 1.60	1	19.28 ± 2.54

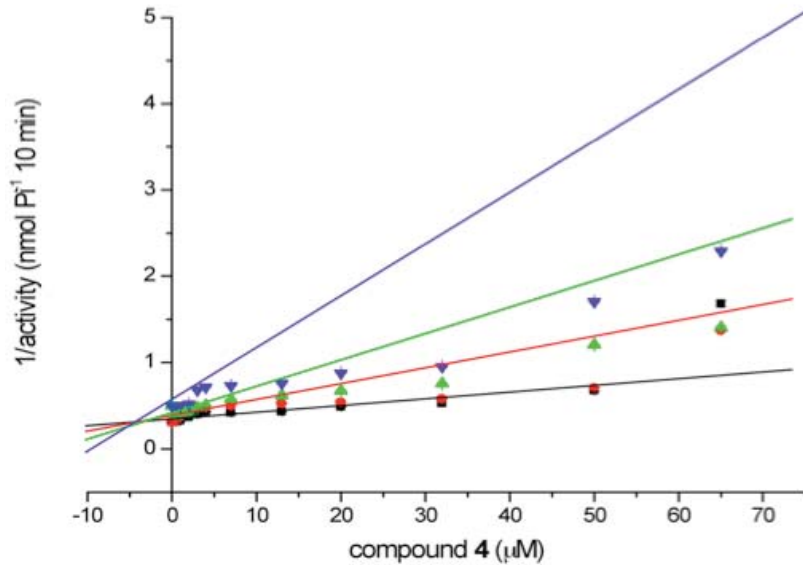


Figura 23. Gráfica de Dixon del compuesto 4 en presencia de diferentes concentraciones de la CaM (--- 25 nM; --- 50 nM; --- 100 nM; y --- 200 nM).

5.4.2 Evaluación de los metabolitos 1-4 aislados sobre la movilidad electroforética de la CaM

La interacción de los compuestos aislados a partir del cultivo de *Emericella 25379* con la CaM se determinó mediante la evaluación del efecto de **1-4** sobre la movilidad electroforética de la proteína en presencia de Ca^{2+} , utilizando una electroforesis vertical descendente en gel de poliacrilamida (PAGE). Bajo estas condiciones la interacción de cualquier compuesto con esta proteína ocasiona alteraciones en su conformación estructural, mismas que se ven reflejadas en cambios en su movilidad electroforética. En la **Figura 24** se observan los resultados sobre el retardo en la movilidad electroforética de la CaM tratada con CaCl_2 (1 mM) y las xantonas **1-4** (0.033 mg/mL). Los efectos observados en ésta evaluación permiten concluir que los compuestos **2** y **4** interactúan con la CaM y posiblemente modifican sus propiedades reguladoras enzimáticas. El retardo en la movilidad electroforética provocado por los compuestos **2** y **4** es similar al de la CPZ utilizada como control positivo. Estos resultados se encuentran en armonía con los obtenidos en el ensayo enzimático y que fueron descritos en el inciso anterior.

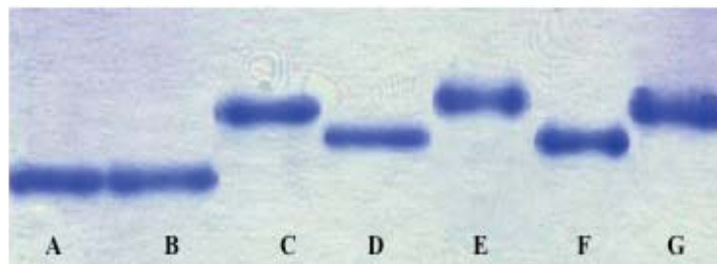


Figura 24. Electroforetograma PAGE de la CaM con diferentes tratamientos de los compuestos **1-4**. Electroforesis de 2 μg de CaM en presencia de 1 mM de CaCl_2 . Las muestras se incubaron durante 1.5 h a 30 $^\circ\text{C}$. (A) CaM sin ligando; (B) CaM con DMSO; (C) control positivo (CaM con CPZ en DMSO); (D) **1**; (E) **2**; (F) **3**; y (G) **4**. En todos los casos se adicionaron 0.033 mg/mL del compuesto de prueba.

5.4.3 Evaluación de la interacción ligando-CaM de los compuestos 1-4 mediante experimentos de fluorescencia

Una vez establecida la interacción de los compuestos **1-4** aislados de *Emericella* 25379 con la CaM, mediante el empleo de métodos electroforéticos y análisis enzimáticos funcionales, se decidió realizar una serie de estudios adicionales con la finalidad de explorar a detalle la interacción proteína-ligando, mediante el empleo de métodos analíticos menos convencionales que incluyen a la fluorescencia.

En general, los métodos que involucran a la energía de resonancia de fluorescencia consisten en el monitoreo de los cambios en la fluorescencia intrínseca de la proteína en presencia de los diferentes ligandos. En el presente trabajo, se determinó el efecto de las fitotoxinas **1-4** mediante experimentos de fluorescencia de acuerdo con la metodología descrita por González-Andrade y colaboradores (2009). Los resultados obtenidos de esta evaluación se ilustran en la **Figura 25**. Como se desprende de esta información los compuestos **1-4** provocan un apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la CaM de diferente orden para cada compuesto y de manera dependiente de la concentración. Cabe destacar que los resultados de estas determinaciones indican que los compuestos **2** y **4** son los que ocasionan el apagamiento más significativo de la fluorescencia intrínseca de la CaM. Los valores de K_d para estos compuestos son: 0.6502 ± 0.0116 y 0.0334 ± 0.0065 , respectivamente, mientras que para la CPZ de 0.3423 ± 0.0324 μM . Estos resultados también muestran una clara correlación con aquellos derivados de los otros experimentos utilizados para medir la interacción de los metabolitos secundarios con la CaM.

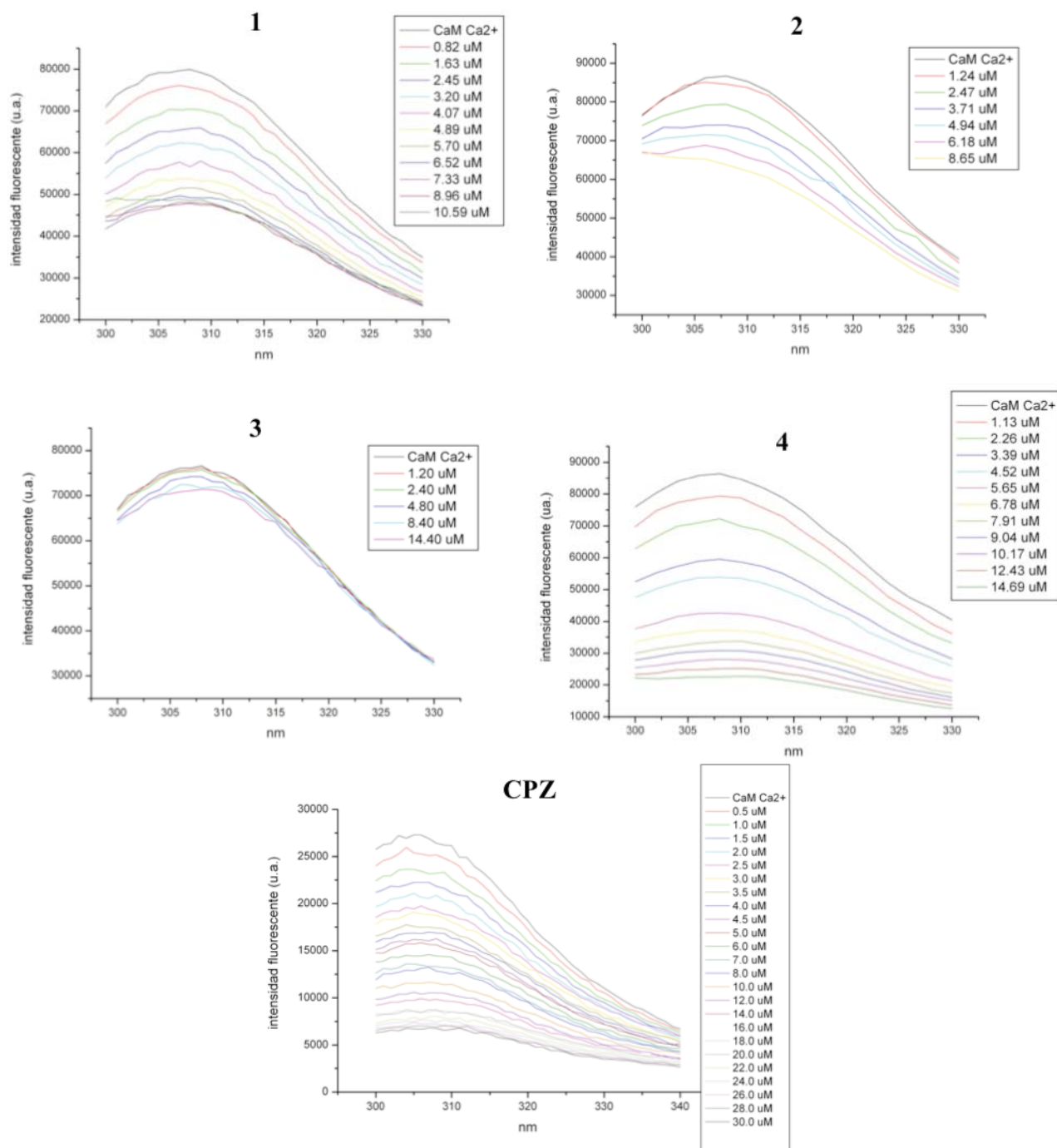


Figura 25. Fluorescencia intrínseca de la CaM-WT [$\lambda_{\text{exi}} = 282 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emi}} = 300\text{-}340 \text{ nm}$, en AcOK 5 mM, pH 5.1] en presencia de los compuestos aislados a partir de *Emericella* 25379.

5.4.4 Evaluación de la interacción ligando-CaM de los compuestos 1-5 mediante estudios de acoplamiento molecular

En los últimos años, el creciente interés en la investigación computacional que a su vez, se ha desarrollado conjuntamente con la cristalografía de rayos X, es un hecho bien documentado y que ha llevado a la posibilidad de utilizar un diseño racional basado en las interacciones ligando-receptor para el desarrollo de nuevos principios biodinámicos con posible aplicación tanto en la terapéutica como en la industria agroquímica (Stephens *et al.*, 2008).

Una aproximación real a todo este desarrollo ha sido posible debido al descubrimiento de nuevos productos naturales con estructuras químicas novedosas, a la síntesis orgánica de moléculas prototipo y a la subsecuente cocrystalización de éstas moléculas con una proteína de interés. De tal forma que la información estructural obtenida es invaluable en el descubrimiento de nuevas moléculas, o bien, en la modificación de moléculas conocidas con efectos adversos indeseables. Sin embargo, cuando la cristalización de éstas moléculas con su ligando es particularmente difícil, una contribución significativa para predecir y establecer la naturaleza de las interacciones proteína-ligando es posible mediante métodos de acoplamiento molecular (AM). Esta técnica involucra el uso de uno o más algoritmos de búsqueda específica, basados en simulaciones moleculares complejas para obtener la conformación optimizada de la proteína con su ligando que presente la menor energía libre total.

En este contexto, se realizó la evaluación de los ligandos **1-5** mediante un estudio de acoplamiento molecular con el programa AutoDock 4.0. Este experimento permite a su vez confirmar si estos compuestos interaccionan en el mismo sitio de unión que las fenotiazinas TFP y CPZ y poder catalogarlos como nuevos prototipos estructurales para el desarrollo de novedosos inhibidores de la CaM.

Los experimentos de AM se realizaron utilizando la estructura cristalográfica de la CaM. Para ello, en primer lugar se realizó la validación del protocolo mediante la formación de los complejos con los inhibidores CPZ y TFP, a partir de la estructura de la CaM (código pdb 1LIN), para después realizar un análisis detallado de la geometría de unión de estas fenotiazinas con la

estructura del receptor [Figura 26]. Posteriormente, se realizó el acoplamiento de los compuestos de interés mediante la predicción de la orientación y conformación de cada uno de los ligandos 1-5 en la estructura cristalográfica seleccionada. El análisis de la diferencia encontrada entre los valores de las desviaciones estándar cuadráticas medias (RMSD) de las coordenadas de los átomos previstas por el programa AutoDock con respecto a las coordenadas calculadas a partir de la estructura cristalográfica, permitieron concluir que el programa de modelado molecular predijo de manera satisfactoria los sitios de unión de las xantonas 2 y 4 con la CaM, con valores de RMSD inferiores o cercanos a 1.0 Å. Por otra parte, los resultados obtenidos permitieron evidenciar que los compuestos 2 y 4 se unen a la CaM en los mismos sitios de unión de la CPZ y TFP encontrándose una excelente correspondencia entre el carácter hidrofóbico del sitio de unión y la actividad biológica evaluada [Tabla 8]. Finalmente, el modelo de unión propuesto para los ligandos 2 y 4 de *Emericella 25379* con la CaM se ilustra en la Figura 27 en donde se puede observar que todos los análogos evaluados adoptan la misma conformación y pueden superponerse con las fenotiazinas utilizadas como controles.

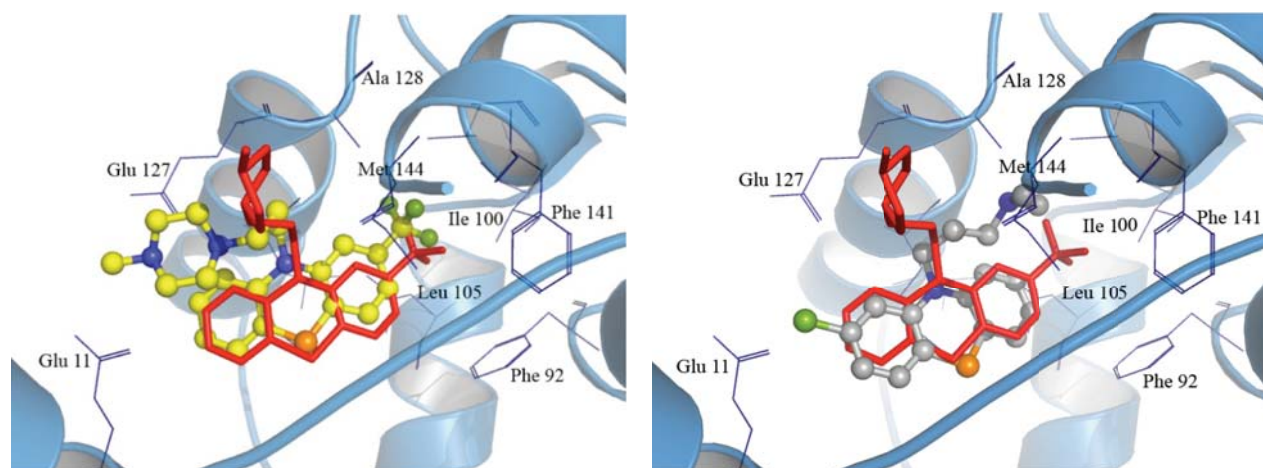


Figura 26. Validación de modelo de AM. Estructura cristalina de la CaM formando el complejo con la TFP (barras rojas; código pdb 1LIN). La TFP cocrystalizada muestra el sitio de unión del inhibidor, mientras que en barras y esferas se observa el AM de la TFP (amarillo; RMSD 1.837 Å) y la CPZ (gris; RMSD 1.931 Å).

Tabla 8. Comparación de los resultados experimentales y de AM de los inhibidores de la CaM **1-5** aislados de la especie fúngica *Emericella* 25379.

compuesto	inhibición del complejo Ca ²⁺ -CaM-PDE1			acoplamiento molecular		
	CI ₅₀ μM	potencia relativa	K _i μM	K _i μM (calculada)	Energía de unión (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)
1	9.59 ± 2.65	0.76	ND	10.80	-4.81	-5.14
2	5.62 ± 1.25	1.30	13.92 ± 2.29	14.36	-5.08	-4.54
3	29.16 ± 6.39	0.25	ND	5.77	-5.11	-5.63
4	5.54 ± 1.28	1.31	25.38 ± 2.26	20.34	-8.15	-8.38
5	68.17 ± 9.33	0.11	ND	17.65	-3.46	-3.01
CPZ	7.26 ± 1.60	1	19.28 ± 2.54	8.76	-6.85	-6.90
TFP	ND	ND	ND	8.36	-10.06	-10.49

ND, no determinado

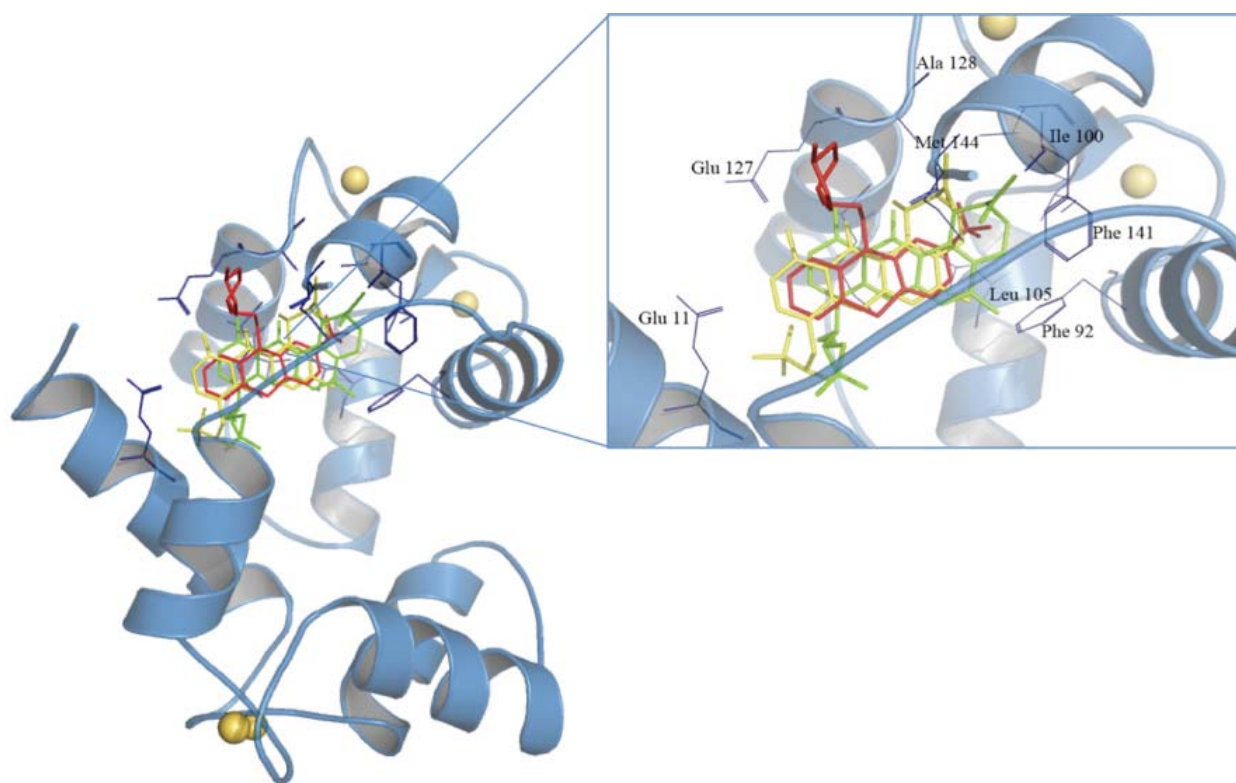


Figura 27. Modelo propuesto por la técnica de AM mediante el programa AutoDock para la interacción de los compuestos **2** y **4** con la CaM. TFP cocrystalizada: barras rojas; **2**: barras verdes; **4**: barras amarillas.

5.5 Caracterización de la interacción ligando-CaM de los metabolitos aislados de *M. aurantiaca*

Con la finalidad de evaluar la interacción de las fitotoxinas **6-9** aisladas a partir de la especie fúngica *M. aurantiaca* con la CaM, se realizaron los mismos experimentos que en el caso de los metabolitos de *Emericella*. De manera adicional se realizaron estudios de RMN utilizando a la CaM marcada isotópicamente con ^{13}C y ^{15}N , y simulaciones de dinámica molecular. Los resultados derivados de estas evaluaciones se detallan a continuación:

5.5.1 Evaluación del efecto *in vitro* de los productos **6-9** aislados de la especie fúngica *M. aurantiaca* sobre el complejo Ca^{2+} -CaM-PDE1

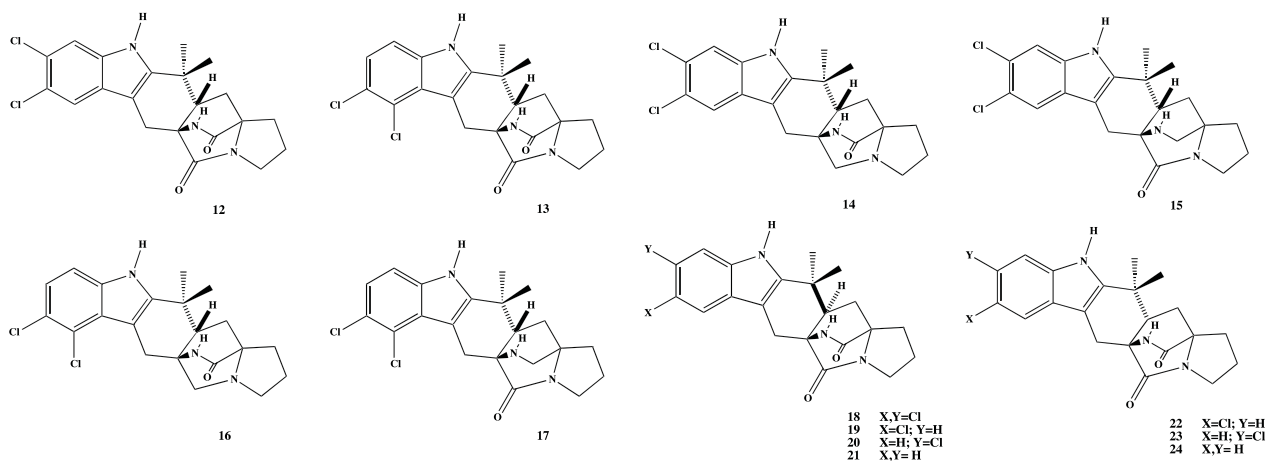
La evaluación de los compuestos **6-9** y los de una serie de análogos sintéticos [**12-24**] del compuesto **8** proporcionados por el Dr. Robert Williams se realizó de acuerdo al mismo procedimiento descrito para los productos **1-5** aislados de *Emericella* 25379. Los resultados del efecto de los productos sobre la actividad enzimática de la PDE1 activada por CaM de la malbranqueamida (**8**) y sus análogos [**Tabla 9**] proporcionaron información valiosa acerca de la influencia de la presencia de los átomos de cloro en el anillo carbocíclico del indol, la configuración relativa en C-12a y el grado de oxidación del núcleo biciclo[2.2.2]diazaoctano. Así, la mejor actividad inhibitoria del complejo Ca^{2+} -CaM-PDE1 se observó en los compuestos con dos átomos de cloro en el anillo carbocíclico del indol como en el caso de la malbranqueamida (**8**) y la mezcla racémica del producto obtenido por síntesis (**8a**). El efecto inhibitor sobre la activación del complejo evaluado de los productos que no presentan átomos de cloro, como en el caso del derivado natural **7** y los análogos sintéticos **12**, **13** y **22-24**, es mucho menor, siendo el producto **24** el derivado más activo de la serie de estos análogos con un valor de potencia relativa de 0.7. En el caso de los isómeros estructurales **6**, **6a**, **9** y **9a** que presentan un solo átomo de cloro en su estructura la actividad inhibitoria sobre el complejo CaM-PDE1 también disminuye de manera significativa, obteniéndose valores de potencias relativas menores a 0.5. Por otro lado, es importante destacar que en todos los casos la potencia relativa de los racematos **8a** y **6a**, obtenidos, por síntesis fue mayor a la presentada por el correspondiente enantiómero natural. Estos resultados parecen indicar que los enantiómeros levorrotatorios son

más activos que los dextrógiros naturales. Los derivados del análogo *epi*-malbranqueamida (**14**) fueron esencialmente inactivos, indicando la importancia de la configuración el centro quiral 12a, siendo la única excepción el compuesto **15** que presenta un grupo carbonilo en la posición C-5. Por último, la falta de actividad de los compuestos **14** y **16** indica que además de la estereoquímica en 12a, la presencia de los residuos amida en C-5 y C-14 son importantes para una mejor actividad.

Tabla 9. Inhibición de la activación del complejo Ca^{2+} -CaM-PDE1 mostrada por la malbranqueamida (**8**) y una serie de análogos sintéticos.

compuesto	CI ₅₀ μM	CPZ	Potencia relativa
12	33.92 ± 4.64	16.78 ± 3.99	0.5
13	45.41 ± 2.39	10.76 ± 0.41	0.2
14	134.47 ± 12.63	10.76 ± 0.41	0.1
15	11.95 ± 1.05	10.76 ± 0.41	0.9
16	81.24 ± 4.46	10.76 ± 0.41	0.1
17	27.51 ± 3.13	10.76 ± 0.41	0.4
18	18.57 ± 2.87	16.78 ± 3.99	0.9
19	31.49 ± 2.52	14.11 ± 1.75	0.4
20	61.79 ± 5.48	14.11 ± 1.75	0.2
21	150.66 ± 26.79	16.78 ± 3.99	0.1
22	62.34 ± 4.58	14.11 ± 1.75	0.2
23	42.77 ± 1.66	14.11 ± 1.75	0.3
24	23.61 ± 4.21	16.78 ± 3.99	0.7
8a	15.99 ± 0.87	16.78 ± 3.99	1.0
8	19.33 ± 1.40	16.78 ± 3.99	0.9
9a	60.33 ± 6.84	14.11 ± 1.75	0.2
9	41.56 ± 4.64	14.11 ± 1.75	0.3
6	183.28 ± 37.58	14.11 ± 1.75	0.1
6a	42.85 ± 4.22	14.11 ± 1.75	0.3
7a	35.73 ± 3.01	16.78 ± 3.99	0.5
7	19.36 ± 3.80	16.78 ± 3.99	0.8

La potencia relativa fue obtenida mediante la fórmula: $\text{CI}_{50}(\text{clorpromazina})/\text{CI}_{50}(\text{compuesto evaluado})$ tomando el valor de 1.00 para la clorpromazina. **a)** derivado sintético.



5.5.2 Evaluación de la interacción ligando-CaM de los compuestos 6-9 mediante experimentos de fluorescencia

La evaluación de la interacción de **6-9** con la CaM se determinó mediante experimentos de fluorescencia utilizando el método descrito por González-Andrade y colaboradores (2009). Los resultados de este experimento se muestran en la **Figura 28** y, como se puede observar, sólo el compuesto **8** (K_d 0.4082 ± 0.0592 μM) provoca un apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la CaM de manera dependiente de la concentración y es comparable a la obtenida para el control positivo CPZ (K_d 0.3423 ± 0.0324 μM). Los compuestos **6**, **7** y **9** no afectaron de manera significativa la fluorescencia de la proteína. En todos los casos el efecto inhibitorio fue dependiente de la concentración. Estos resultados son congruentes con los derivados del experimento enzimático funcional.

5.5.3 Evaluación de la interacción CaM-ligando de los compuestos 6-9 mediante acoplamiento molecular

Los productos **6-9** fueron analizados con el programa AutoDock 4.0 con el objetivo de establecer su sitio de unión a la CaM, siguiendo la misma estrategia metodológica descrita previamente para las xantonas **1-5**. Los resultados preliminares indicaron que el compuesto **8** interactúa con la CaM con una energía de unión menor que la de los compuestos **6**, **7** y **9**, y en un sitio diferente al observado para los controles positivos CPZ y TFP. Por lo tanto, con el propósito de refinar éste análisis de AM se realizó, en primer lugar, la corrección y reempacamiento de la estructura cristalográfica de la CaM (código pdb 1LIN) con el programa Rosetta++, siguiendo la metodología descrita por Kuhlman y Baker (2000). Esta nueva estructura posee las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos 75 al 81 en la posición y orientación más favorecida, y no determinadas en la estructura original. Posteriormente, se realizó un nuevo estudio de AM con residuos flexibles del compuesto **8** con la CaM, observándose cambios importantes en la posición de numerosos residuos cercanos al sitio de unión. Los residuos Met 36, 51, 71, 72, 76, 109, 124, 144 y 145 presentaron una variación de su estado original y éste cambio fue medido con base en el valor de sus RMSD utilizando el programa VMD 1.8.6 [**Tabla 10**]. Los resultados globales permitieron proponer que los residuos de AA involucrados en el sitio de unión de **8** con la CaM,

a 4 Å de distancia del centro de la molécula son: Leu 18, 32, 39, 112; Glu 11, 14, 114; Phe 12, 16, 19, 68, 92, 141; Met 71, 72, 109, 124, 144, 145; Val 35; Ala 15, 88 y Ile 27 [Figura 29], en donde se observa que la conformación que adopta el ligando en el sitio de unión es diferente a la de las fenotiazinas utilizadas como controles.

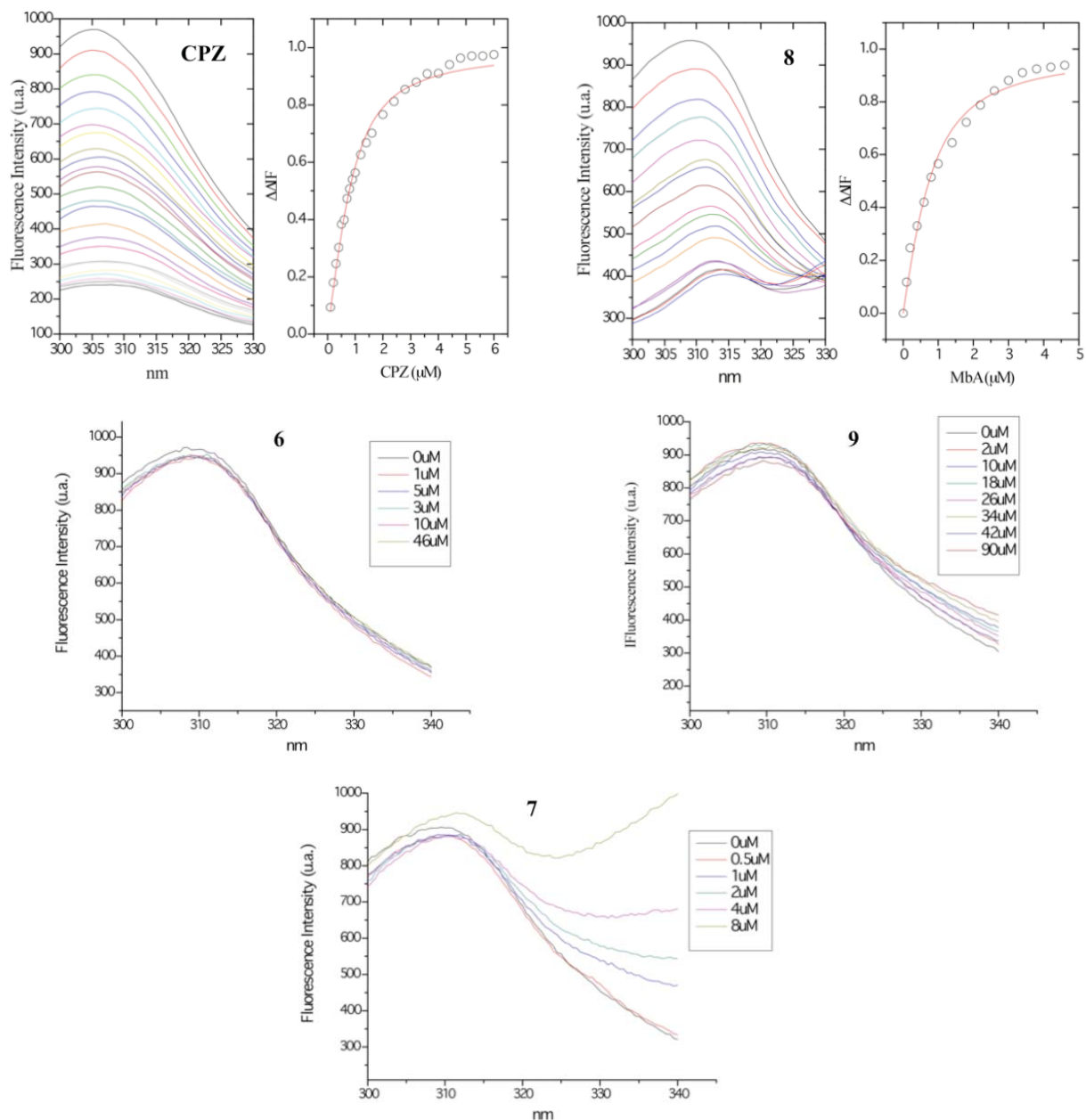


Figura 28. Fluorescencia intrínseca de la CaM-WT [$\lambda_{\text{exi}} = 282 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emi}} = 300\text{-}340 \text{ nm}$, en AcOK 5 mM, pH 5.1] en presencia de los compuestos aislados a partir de *M. aurantiaca*.

Tabla 10. Aminoácidos involucrados en el sitio de unión de la malbranqueamida (**8**) con la CaM identificados por AM con residuos flexibles.

residuo	RMSD Autodock (Å)
Met 36	2.058
Met 51	1.514
Met 71	3.211
Met 72	1.327
Met 76	1.461
Met 109	1.593
Met 124	1.529
Met 144	3.277
Met 145	1.725

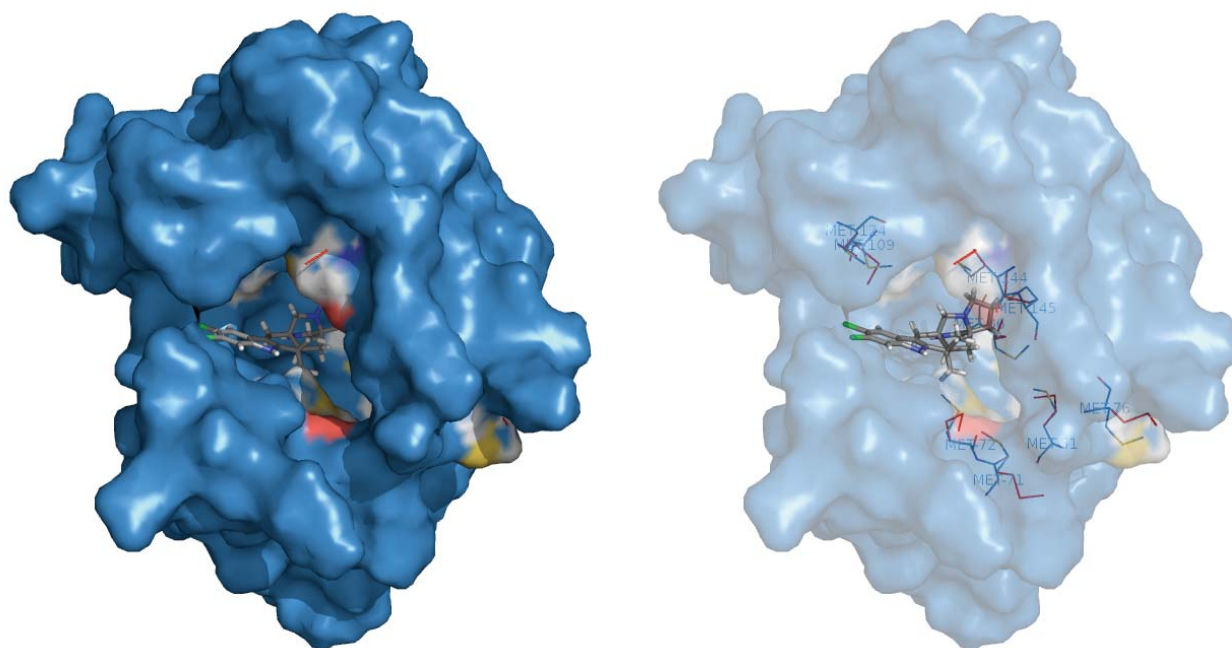


Figura 29. Modelo propuesto por AM con residuos flexibles para la interacción del compuesto **8** con la CaM, mostrando a las Met de la proteína y los cambios conformacionales observados en éstos residuos en presencia del inhibidor.

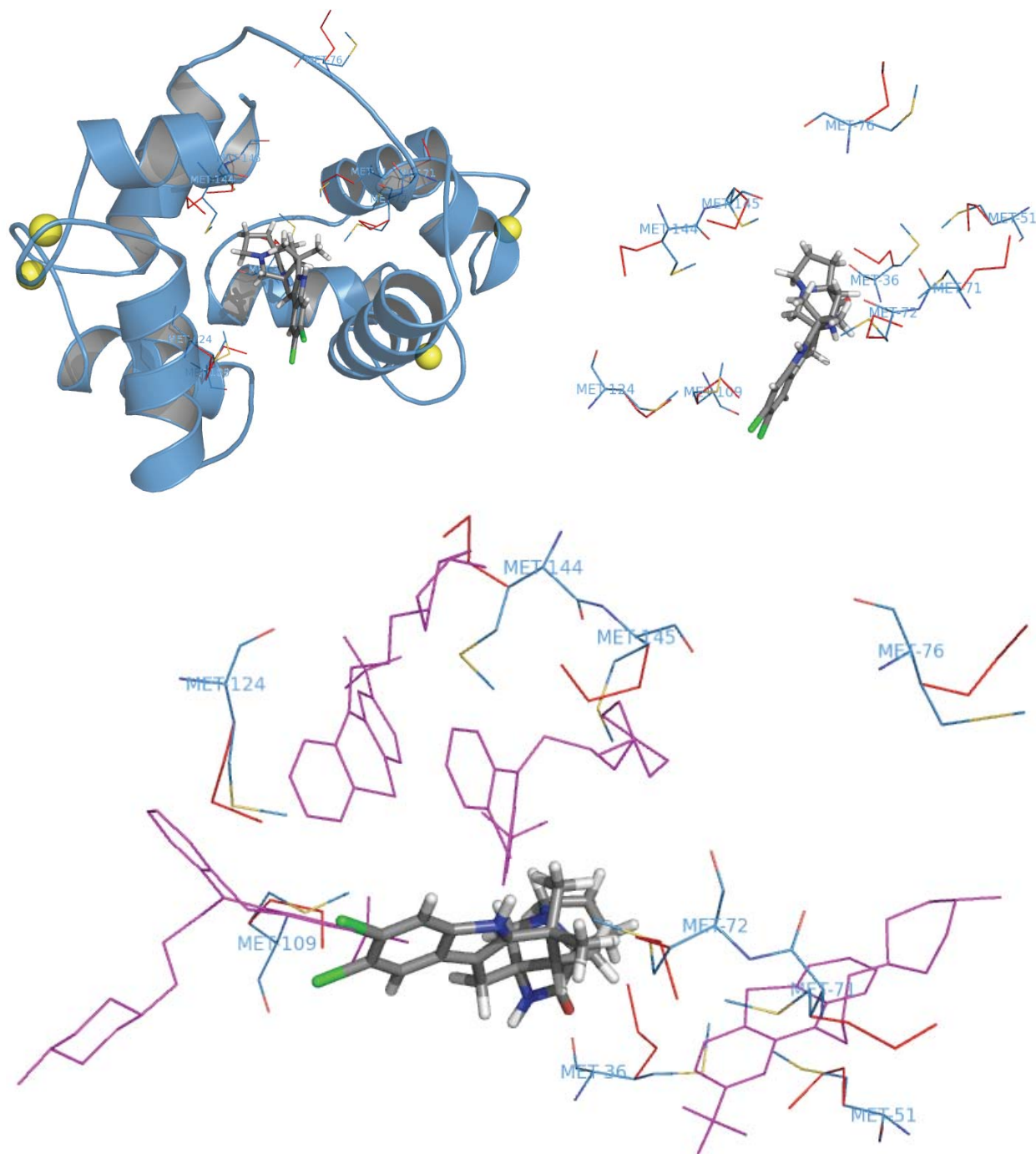


Figura 29 (continuación). Modelo propuesto por AM con residuos flexibles para la interacción del compuesto **8** con la CaM, mostrando a las Met de la proteína y los cambios conformacionales observados en éstos residuos en presencia del inhibidor.

5.5.4 Evaluación de la interacción CaM-ligando del compuesto **8** mediante experimentos de RMN

Con base en los resultados obtenidos previamente en los estudios enzimáticos y de fluorescencia se decidió explorar la interacción del compuesto **8** con la CaM mediante experimentos de RMN. La RMN (^1H , ^{13}C y ^{15}N) es un método analítico utilizado con bastante éxito en los últimos años, para caracterizar la interacción proteína-ligando. Estos estudios han permitido establecer por una parte, los cambios conformacionales inducidos por el ligando en la estructura secundaria de las proteínas (sin ligando), y por la otra, proporcionar información valiosa acerca de los sitios de unión del ligando. Con estos antecedentes, se elaboró un protocolo de experimentación para confirmar los sitios de unión entre la malbranqueamida (**8**) y la CaM. Para los experimentos se utilizó a la CaM enriquecida isotópicamente con ^{13}C y ^{15}N . En todos los casos, el análisis de los espectros de RMN modalidad COSY, TOCSY y HSQC, en el intervalo comprendido entre $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 0.6-2.4/15.6-18.4 [**Figura 30** y **Tabla 11**], para la proteína enriquecida y titulada con diferentes concentraciones del ligando **8**, permitió evidenciar cambios importantes en los desplazamientos químicos de los protones y carbonos de los metilos de algunas de las Met que se encuentran en una de las regiones más hidrofóbicas de la CaM y cercanas al sitio de unión de los antidepresivos CPZ y TFP. Los cambios en éstos desplazamientos se compararon con los valores de RMSD obtenidos a partir del análisis detallado del complejo proteína-ligando realizado por AM (ver inciso anterior). Las variaciones en los desplazamientos químicos de los metilos de los nueve residuos de Met son consistentes con las conclusiones obtenidas en los estudios de AM y permiten proponer con mayor confiabilidad el sitio de unión de la malbranqueamida (**8**). Por lo tanto, una vez establecida la estequiometría 1:1 de la interacción **8**-CaM, se puede concluir que el sitio de unión del alcaloide a la proteína involucra los residuos de Met 36, 51, 71, 72, 76, 109, 124, 144 y 145. Todos estos residuos participan también en la interacción CPZ-, TFP- y KAR-2-CaM, sin embargo, la estequiometría 1:4 proteína-ligando en el caso de las fenotiazinas hace que la conformación del complejo sea distinta en comparación con la del alcaloide KAR-2, el cual presenta la misma estequiometría y una conformación de similar que la observada para el complejo **8**-CaM.

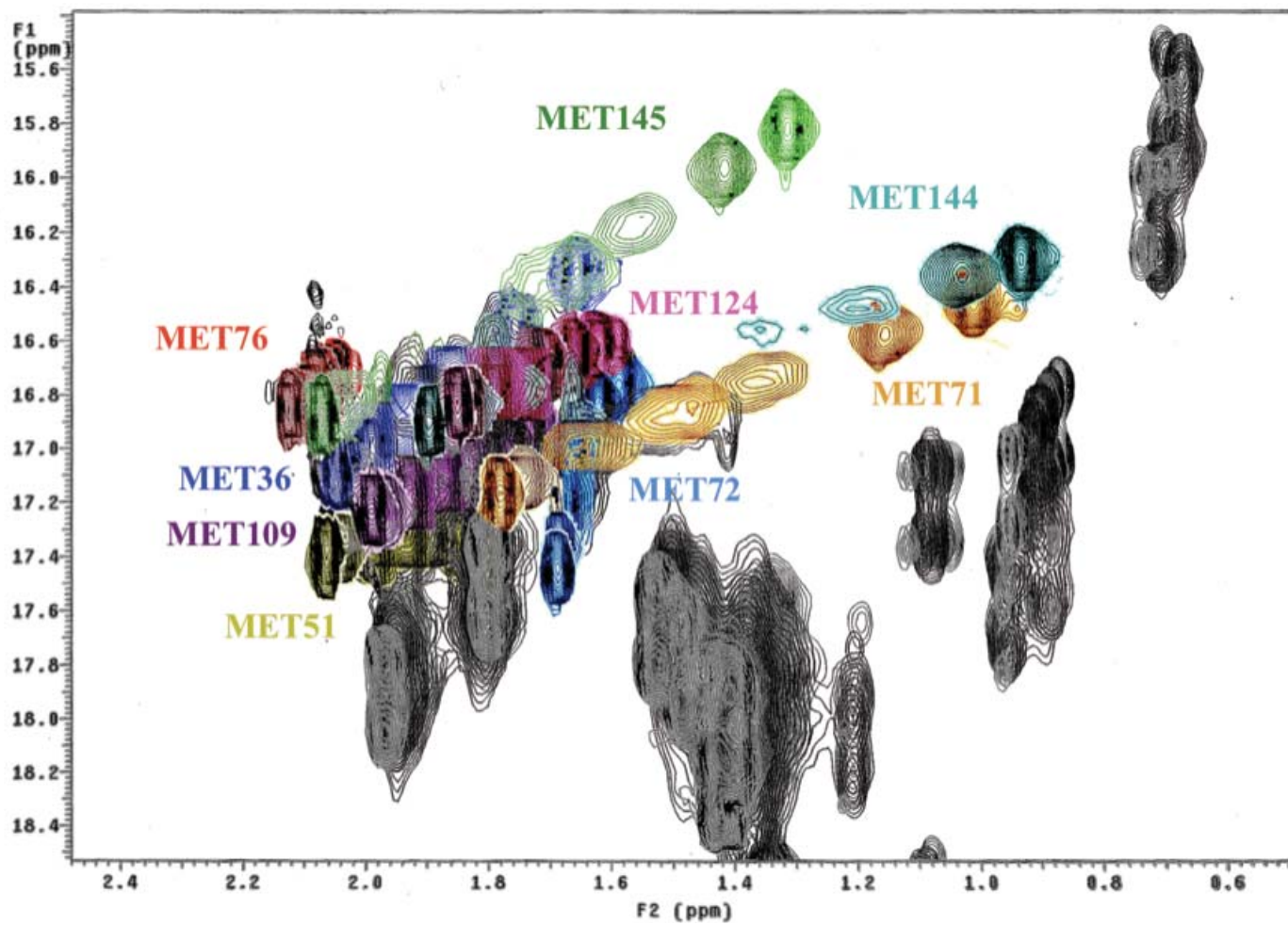


Figura 30. Vista parcial del espectro de ^{13}C - ^1H -RMN [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 0.6-2.4/15.6-18.4] modalidad HSQC de la titulación de la CaM con el compuesto 8.

Tabla 11. Residuos de aminoácidos involucrados en el sitio de unión de la malbranqueamida (**8**) con la CaM identificados por RMN y AM.

residuo	RMN $^1\text{H } \Delta\delta / ^{13}\text{C } \Delta\delta$ (ppm)	RMSD Autodock (\AA)
Met 36	0.294/0.547	2.058
Met 51	0.215/0.070	1.514
Met 71	0.625/0.599	3.211
Met 72	0.068/0.598	1.327
Met 76	0.065/0.117	1.461
Met 109	0.222/0.249	1.593
Met 124	0.195/0.192	1.529
Met 144	0.868/0.565	3.277
Met 145	0.653/0.718	1.725

5.5.5 Evaluación de la interacción CaM-ligando del compuesto **8** mediante estudios de dinámica molecular

Con la finalidad de establecer la estabilidad termodinámica del complejo proteína-ligando en solución se realizaron estudios de DM utilizando el programa GROMACS. Esta técnica involucra la simulación en el tiempo y el análisis conformacional de un complejo proteína-ligando. Con base en lo antes descrito, se realizó la simulación durante 15 ns del complejo CaM-malbranqueamida (**8**). Para estos estudios, se utilizó la misma estructura de la CaM obtenida a partir de los análisis de AM y RMN. Los resultados obtenidos revelaron que la CaM mantiene una conformación relativamente estable en solución, por tiempos de simulación superiores a los 5 ns iniciales, lo que sugiere *a priori*, que el complejo **8**-CaM, en el sitio de unión propuesto con base en los estudios de AM y RMN, es estable termodinámicamente [**Figura 31**]. Durante los primeros 500 ps de simulación el complejo inicial sufre cambios conformacionales mínimos. Posteriormente, se genera un nuevo conformero estable, mismo que se mantiene por unos nanosegundos más hasta la aparición de otros conformeros al término de la simulación. En cualquier caso, el ligando permaneció unido a la proteína a lo largo de toda la simulación.

Una característica importante de esta simulación es la gran variabilidad en las energías de contacto instantáneas calculadas mediante la técnica LIE. Esto posiblemente debido a que la CaM es una proteína con gran movilidad y que por lo tanto puede adoptar numerosas conformaciones

de unión; esta versatilidad conformacional no se ha observado con otros complejos enzima-ligando o receptor-ligando estudiados mediante esta técnica (Wassenaar *et al.*, 2008; Marrink *et al.*, 2008). La comparación del comportamiento de la CaM con un segundo ligando se obtuvo a partir de otra simulación de DM del complejo KAR-2-CaM. Esta simulación presentó características muy similares a la de **8**-CaM, mostrando además variaciones más significativas de la energía de interacción. En este caso, hacia el final de la simulación, el cambio de la conformación del complejo KAR-2-CaM fue evidente, ya que el ligando cambió su orientación en el sitio activo de la proteína en un rotación de casi 180° , no obstante, la energía de interacción entre la CaM y el KAR-2 fue mayor (más negativa) que en el caso del complejo **8**-CaM.

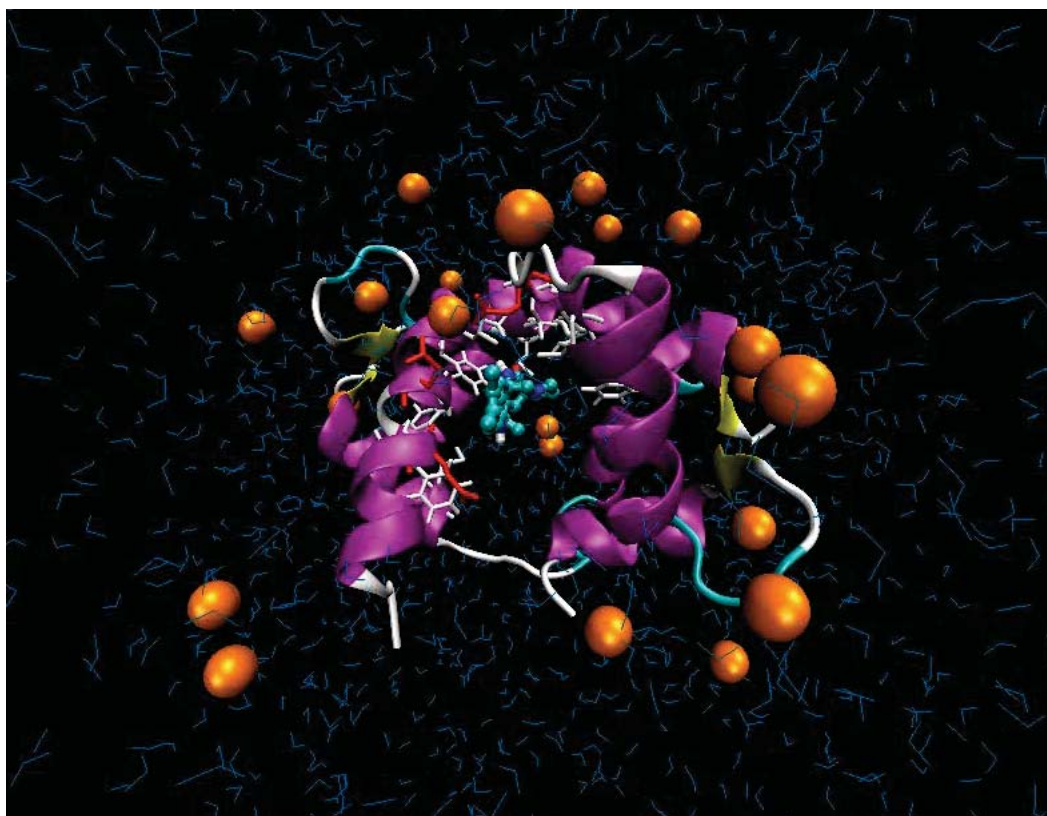


Figura 31. Dinámica molecular de la interacción malbranqueamida **8**-CaM.

6. Conclusiones

a) La especie novedosa *Emericella* 25379, biosintetiza γ -pironas del tipo xantona. El estudio químico de un aislamiento de esta especie permitió la obtención de dos derivados novedosos de la tajixantona, caracterizados como el hidrato de 15-(*S*)cloro-tajixantona (**1**) y la 14-metoxi-tajixantona (**2**). También se aislaron y caracterizaron los productos shamixantona (**3**), hidrato de tajixantona (**4**) y emericelina (**5**). Estos resultados permiten corroborar que el metabolismo de las especies terrestres de *Emericella* es similar al de las especies marinas ya que ambos tipos biosintetizan policétidos del tipo xantona. Cabe destacar que *Emericella* 25379, a diferencia de las otras especies marinas *E. nidulans* y *E. venezuelensis*, no biosintetiza aflatoxinas.

b) La reinvestigación química de la especie *M. aurantiaca* permitió el aislamiento y la caracterización de dos metabolitos secundarios novedosos designados con los nombres triviales de malbranqueamida B (**6**) y premalbranqueamida (**7**). De manera adicional, se aislaron los compuestos conocidos malbranqueamida (**8**) e isomalbranqueamida B (**9**). La coexistencia de los metabolitos **6-9** permite proponer que la malbranqueamida (**8**) se genera a partir del producto **7** vía la malbranqueamida B (**6**) o isomalbranqueamida B (**9**), o vía las dos. En cualquier caso, el producto **8** debe halogenarse de manera consecutiva por acción de una o dos haloperoxidasas.

c) La presente investigación permitió la estandarización de un procedimiento para cuantificar la interacción de los metabolitos aislados con la CaM, utilizando un ensayo enzimático funcional con la enzima PDE1. Los compuestos **2**, **4** y **8** inhiben la activación del complejo Ca^{2+} -CaM-PDE1 de manera dependiente de la concentración. Este efecto se comprobó mediante el análisis cinético conducente a determinar la constante de inhibición (K_i). Los valores de K_i obtenidos fueron 13.92 ± 2.29 , 25.38 ± 2.26 y 47.40 ± 5.63 μM , respectivamente. Estos resultados permitieron comprobar también que los compuestos son antagonistas competitivos de la CaM, que actúan compitiendo con ésta

enzima por la formación del complejo activo Ca^{2+} -CaM-PDE1. Los compuestos **2** y **4** modifican la movilidad electroforética PAGE de la proteína en presencia de calcio.

d) La evaluación enzimática de los análogos de la malbrancheamida (**8**) aislados, así como la de una serie de derivados sintéticos permitió también establecer la influencia de la presencia de los átomos de cloro en el anillo carbocíclico del indol, la configuración relativa en C-12a y el grado de oxidación del núcleo biciclo[2.2.2]diazaoctano sobre la inhibición de la actividad enzimática de la PDE1 activada por CaM. El efecto inhibitor sobre la activación del complejo evaluado de los productos que no presentan átomos de cloro, como en el caso del derivado natural **7** y los análogos sintéticos **12**, **13** y **22-24**, es mucho menor, siendo el producto **24** el derivado más activo de la serie de estos análogos con un valor de potencia relativa de 0.7. En el caso de los isómeros estructurales **6**, **6a**, **9** y **9a** que presentan un solo átomo de cloro en su estructura la actividad inhibitoria sobre el complejo CaM-PDE1 también disminuye de manera significativa, obteniéndose valores de potencias relativas menores a 0.5. Por otro lado, es importante destacar que en todos los casos la potencia relativa de los racematos **8a** y **6a**, obtenidos, por síntesis fue mayor a la presentada por el correspondiente enantiómero natural. Estos resultados parecen indicar que los enantiómeros levorotatorios son más activos que los dextrógiros naturales. Los derivados del análogo *epi*-malbrancheamida (**14**) fueron esencialmente inactivos, indicando la importancia de la configuración el centro quiral 12a, siendo la única excepción el compuesto **15** que presenta un grupo carbonilo en la posición C-5. Por último, la falta de actividad de los compuestos **14** y **16** indica que además de la estereoquímica en 12a, la presencia de los residuos amida en C-5 y C-14 es importante para una mejor actividad.

e) La interacción de los productos **2**, **4** y **8** con la CaM se confirmó, en primer lugar, mediante experimentos de energía de resonancia de fluorescencia. Los productos **2**, **4** y **8** provocan un apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la CaM de diferente orden para cada compuesto y de manera dependiente de la concentración. En este sentido cabe mencionar que la actividad presentada por estos productos naturales es similar a la reportada para los antidepresivos y antagonistas de la CaM, CPZ y TFP.

f) Los estudios *in silico* mediante métodos de AM realizados para predecir la naturaleza de la interacción proteína-ligando, permitieron establecer que los compuestos **2** y **4** interactúan con la proteína CaM en el mismo sitio que las fenotiazinas clásicas CPZ y TFP. Por otra parte, el análisis de acoplamiento molecular del compuesto **8** reveló que este metabolito se une a la CaM en un sitio de unión diferente al de las fenotiazinas evaluadas, observándose variaciones importantes en la posición de numerosos residuos de metioninas (Met) próximos al sitio de unión. Estos residuos fueron 36, 51, 71, 72, 76, 109, 124, 144 y 145.

g) Los resultados derivados de los experimentos de RMN de la CaM en presencia del producto **8**, permitieron proponer un modelo de unión para la interacción proteína-ligando que involucra a los residuos de aminoácidos Leu 18, 32, 39, 112; Glu 11, 14, 114; Phe 12, 16, 19, 68, 92, 141; Met 71, 72, 109, 124, 144, 145; Val 35; Ala 15, 88 y Ile 27.

h) El descubrimiento y análisis de la interacción CaM-ligando de los compuestos **2**, **4** y **8** utilizando diferentes procedimientos permitió el descubrimiento de tres antagonistas novedosos de la CaM, cumpliendo así con el objetivo primordial del presente proyecto de tesis.

i) Finalmente, el presente trabajo doctoral constituye una aportación original al conocimiento químico de las especies de hongos de los géneros *Emericella* y *Malbranchea* organismos fúngicos de México, escasamente estudiados a la fecha.

7. Referencias bibliográficas

- Abe, Y., Saito, S-Y., Hori, M., Ozaki, H., Fusetani, N., Karaki, H. Stelletamide-A, a novel inhibitor of calmodulin, isolated from a marine sponge. *Br. J. Pharmacol.*, **1997**, *121*, 1309-1314.
- Aoyagi, M., Arvai, A.S., Tainer, J.A., Getzoff, E.D. Structural basis for endothelial nitric oxide synthase binding to calmodulin, *EMBO J.*, **2003**, *22*, 766-775.
- Aquist, J., Medina, C., Samuelsson, J.E. A new method for predicting binding affinity in computer-aided drug design. *Prot. Eng.* **1994**, *7*, 385-391.
- Asakawa, Y., Kondo, K., Takikawa, N.K., Tori, M., Hashimoto, T., Ogawa, S. Prenyl bibenzyls from the liverwort *Radula kojana*. *Phytochemistry*, **1991**, *30*, 219-234.
- Au, T.K. y Leung, P.C. Identification of the binding and inhibition sites in the calmodulin molecule for ophiobolin A by site-directed mutagenesis. *Plant Physiol.*, **1998**, *118*, 965-973.
- Au, T.K., Chick, W.S.H., Leung, P.C. The biology of ophiobolins. *Life Sci.*, **2000**, *67*, 733-742.
- Barritt, G.J. Receptor-activated Ca^{2+} inflow in animal cells: a variety of pathways tailored to meet different intracellular Ca^{2+} signaling requirements. *The Biochemical Journal*, **1999**, *337*, 153-169.
- Becke, A. D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys. Rev. A.*, **1988**, *38*, 3098-3100.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Murray, H.G., Munro, P.T. Northcote and Michèle R. Prinsep. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, **2006**, *23*, 26-78.
- Brendsen, H.J.C., van Der Spoel, D. van Drunen, R. GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comp. Phys. Comm.*, **1995**, *91*, 43-56.
- Butler, M.S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. *Nat. Prod. Rep.*, **2008**, *25*, 475-516.
- Butler, M.S. Natural products to drugs: natural products derived compounds in clinical trials. *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22*, 162-195.
- Butler, M.S. y Newman, D.J. Mother Nature's gifts to diseases of man: the impact of natural products on anti-infective, anticholesteremics and anticancer drug discovery. *Progress in Drug Research*, **2008**, *65*, 2-44.
- Catterall, W.A., Striessnig, J., Snutch, T.P., Perez-Reyes, E. International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltagegated ion channels: calcium channels. *Pharmacological Reviews*, **2003**, *55*, 579-581.
- Chang, G., Guida, W.C., Still, W.C. An internal-coordinate Monte Carlo method for searching conformational space. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 4379-4386.
- Chattopadhyaya, R., Meador, W.E., Means, A.R., Quijoch, F.A. Calmodulin structure refined at 1.7 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **1992**, *228*, 1177-1192.
- Chin, D. y Means, A.R. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends in Cell Biology*, **2000**, *10*, 322-328.
- Chin, Y.W., Balunas, M.J., Chai, H.B., Kinghorn, A.D. Drug Discovery From Natural Sources. *The AAPS Journal.*, **2006**, *8*, E239-E253.
- Chiung, Y.M., Fujita, T., Nakagawa, M., Nozaki, H., chen, G.Y., Chen, Z.C., Nakayama, M. A Novel Quinone Antibiotic from *Malbranchea cinnamomea* TAIM 13T54. *J. Antibiotics*, **1994**, *46*, 1819-1826.
- Chou, J.J., Li, S., Klee, C.B., Bax, A. Solution structure of Ca^{2+} -calmodulin reveals flexible hand-like properties of its domains. *Nature Structural Biology*, **2001**, *8*, 990-997.

- Craven, C.J., Whitehead, B., Jones, S.K.A., Thulin E., Blackburn, G.M., Waltho, J.P. Complexes formed between calmodulin and the antagonist J-8 and TFP in solution. *Biochemistry*, **1996**, *35*, 10287-10299.
- Dewick P.M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. 3ra. Ed., Chichester, UK, John Wiley & Sons, **2009**.
- Dixon, N., Wong, L.S., Torsten H. Geerlings and Jason Micklefield. Cellular targets of natural products. *Nat. Prod. Rep.*, **2007**, *24*, 1288-1310.
- Drum, C. L., Yan, S. Z., Bard, J., Shen, Y. Q., Lu, D., Soelaiman, S., Grabarek, Z., Bohm, A., and Tang, W. J. Structural basis for the activation of anthrax adenyl cyclase exotoxin by calmodulin. *Nature*, **2002**, *415*, 396-402.
- Elshorst, B., Hennig, M., Forsterling, H., Diener, A., Maurer, M., Schulte, P., Schwalbe, H., Griesinger, C., Krebs, J., Schmid, H., Vorherr, T., Carafoli, E. NMR solution structure of a complex of calmodulin with a binding peptide of the Ca²⁺ pump. *Biochemistry*, **1999**, *38*, 12320-12332.
- Ettre, L. y Kalasz, H. The story of Thin-Layer Chromatography. *LCGC North America*, **2001**, *19*, 712-721.
- Evidente, A., Andolfi, A., Cimmino, A., Vurro, M., Fracchiolla, M., Charudattan, R. Herbicidal potential of ophiobolins produced by *Drechslera gigantea*. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, *54*, 1779-1783.
- Fabricant, D.S. y Farnsworth, N.R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Perspect.*, **2001**, *109*, 69-75.
- Fatima, N., Tapondjou, L.A., Lontsi, D., Sondengam, B.L., Choudhary, M.I. Quinovic acid glycosides from *Mitragyna stipulosa* first examples of natural inhibitors of snake venom phosphodiesterase I. *Nat. Prod. Lett.*, **2002**, *16*, 389-393.
- Fill, M. y Copello, J.A. Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiology Reviews*, **2002**, *82*, 893-922.
- Frisvad, J.C. y Samson, R.A. *Emericella venezuelensis*, a new species with stellate ascospores producing sterigmatocystin and aflatoxin B₁. *System. Appl. Microbiol.*, **2004**, *27*, 672-680.
- Fujimoto, H., Asai, T., Kim, Y. y Ishibashi, M. Nine constituents including six xanthone-related compounds isolated from two Ascomycetes, *Gelasinospora santi-florii* and *Emericella quadrilineata*, found in a screening study focused on immunomodulatory activity. *Chem. Pharm. Bull.*, **2006**, *54*, 550-553.
- Füllbeck, M., Michalsky, E., Dunkel, M., Preissner, R. Natural products: sources and databases. *Nat. Prod. Rep.*, **2006**, *23*, 347-356.
- Godbout, N., Salahub, D., Andzelm, J., Wimmer, E. Optimization of Gaussian-type basis sets for local spin density functional calculations. Part I. Boron through neon, optimization technique and validation. *Can. J. Chem.*, **1992**, *70*, 560-571.
- González-Andrade, M., Figueroa, M., Rodríguez-Sotres, R., Mata, R., Sosa-Peinado, A. An alternative assay to discover potential calmodulin inhibitors using a human fluorophore labeled-CaM proteína. *Analytical Biochemistry*, **2009**, *387*, 64-70.
- Goto, J., Matsuda, Y., Asano, K., Kawamoto, I., Yasuzawa, T., Shirahata, K., Sano, H., Kase, H. K-254-I (genistein), a new inhibitor of Ca²⁺ and calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase from *Streptosporangium vulgare*. *Agric. Biol. Chem.*, **1987**, *51*, 3003-3009.
- Grifo, F., Newman, D., Fairfield, A., Bhattacharya, B., Grunehoff, J. The origins of prescription drugs. En: Grifo, F. y Rosenthal, J. Eds. *Biodiversity and Human Health*. Washington, DC : Island Press, **1997**, 131-163.
- Gsponer, J., Christodoulou, J., Cavalli, A., Bui, J.M., Richter, B., Dobson, C.M., Vendruscolo, M. A coupled equilibrium shift mechanism in calmodulin-mediated signal transduction. *Structure*, **2008**, *16*, 736-746
- Gullo, V.P., McAlpine, J., Lam, K.S., Baker, D., Petersen, F. Drug discovery from natural products. *J Ind Microbiol Biotechnol.*, **2006**, *33*, 523-531.

- Harmat, V., Bocskei, Z., Naray-Szabo, G., Bata, I., Csutor, A.S., Hermeecz, I., Aranyi, P., Szabo, B., Liliom, K., Vertessy, B.G., Ovadi, J. A new potent calmodulin antagonist with arylalkylamine structure: crystallographic, spectroscopic and functional studies. *J. Mol. Biol.* **2000**, 297, 747-755.
- Harvey, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *D.D.T.*, **2000**, 5, 294-300.
- Hernández-Romero, Y., Rojas, J.I., Castillo, R., Rojas, A., Mata, R. Spasmolytic effects, mode of action, and structure-activity relationships of stilbenoids from *Nidema boothii*. *J. Nat. Prod.*, **2004**, 67, 160-167.
- Hernández-Romero, Y., Acevedo, L., Sánchez, M.D., Shier, W.T., Abbas, H.K., Mata, R. Phytotoxic activity of bibenzyl derivatives from the orchid *Epidendrum rigidum*. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 6276-6280.
- Hofer, A.M. Another dimension to calcium signaling: a look at extracellular calcium. *Journal of Cell Science*, **2005**, 118, 855-862.
- Hoffmeister, D. y Keller, P.N. Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Nat. Prod. Rep.*, **2007**, 24, 393-416.
- Horváth, I., Harmat, V., Perczel, A., Pálfı, V., Nyitray, L., Nagy, A., Hlavanda, E., Náray-Szabó, G., Ovádi, J. The Structure of the Complex of Calmodulin with KAR-2. A novel mode of binding explains the unique pharmacology of the drug. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280, 8266-8274.
- Hosoe, T., Iizuka, T., Komai, S., Wakana, D., Itabashi, T., Nozawa, K., Fukushima, K., Kawai, K. 4-Benzyl-3-phenyl-5H-furan-2-one, a vasodilator isolated from *Malbranchea filamentosa* IFM 41300. *Phytochemistry*, **2005**, 66, 2776-2779.
- Hosoe, T., Itabashi, T., Kobayashi, N., Udagawa, S. y Kawai, K. Three new types of indoloditerpenes, Emindole PA-PC, from *Emericella purpurea*. Revision of the Structure of Emindole PA. *Chem. Pharm. Bull.*, **2006**, 54, 185-187.
- <http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/prodrg/>
- Huey, R., Morris, G. M., Olson, A. J., Goodsell, D. S. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *J. Computational Chemistry*, **2007**, 28, 1145-1152.
- Ichimura, M., Eiki, R., Osawa, K., Nakanishi, S., Kase, H. KS-505a, an isoform-selective inhibitor of calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem.*, **1996**, 316, 311-316.
- Ikura, M., Kay, L.E., Krinks, M., Bax, A. Triple-Resonance Multidimensional NMR Study of Calmodulin Complexed with the Binding Domain of Skeletal Muscle Myosin Light-Chain Kinase: Indication of a Conformational Change in the Central Helix. *Biochemistry*, **1991**, 30, 5498-5504.
- Ishida, M., Hamasaki, T., Hatsuda, Y. The structure of two new metabolites, emerin and emericellin, from *Aspergillus nidulans*. *Agr. Biol. Chem.*, **1975**, 39, 2181-2184.
- Kase, H., Iwahashi, K., Matsuda, Y. K-252a, a potent inhibitor of protein kinase C from microbial origin. *J. Antibiot.*, **1986**, 39, 1059-1065.
- Kawahara, N., Nozawa, K., Nakajima, S., Kawai, K. Isolation and structure determination of arugosin E from *Aspergillus silvaticus* and cycloisoemicellin from *Emericella striata*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.*, **1988**, 907-911.
- Kawahara, N., Nozawa, K., Yamazaki, M., Nakajima, S., Kawai, K. Structures of novel epipolythiodioxopiperazines, Emethallicins B, C, and D, potent inhibitors of Histamine release, from *Emericella heterothallica*. *Chem. Pharm. Bull.*, **1990**, 38, 73-78.
- Kin S.L. New aspects of natural products in drug discovery. *Trends in Microbiology*, **2007**, 15, 279-289.
- Kinghorn, A.D. The discovery of drugs from higher plants. In: G ullo VP , ed. *The Discovery of Natural Products with Therapeutic Potential* . Boston, MA, Butterworth-Heinemann, **1994**, 81-108.
- Kobayashi, J., Cheng, J.F., Kikuchi, Y., Ishibashi, M., Yamamura, S., Ohizumi, Y., Ohta, T., Nozoe, S. Rigidin, a novel alkaloid with calmodulin antagonistic activity from the Okinawan marine tunicate *Eudistoma cf. rigida*. *Tetrahedron Lett.*, **1990b**, 31, 4617-4620.

- Kobayashi, J., Cheng, J.F., Ohta, T., Nozoe, S., Ohizumi, Y., Sasaki, T. Eudistomidins B, C, and D: novel antileukemic alkaloids from the Okinawan marine tunicate *Eudistoma glaucus*. *J. Org. Chem.*, **1990a**, *55*, 3666-3670.
- Kobayashi, J., Nakamura, H., Ohizumi, Y., Hirata, Y. Eudistomidin-A, a novel calmodulin antagonist from the Okinawan tunicate *Eudistoma glaucus*. *Tetrahedron Lett.*, **1986**, *27*, 1191-1194.
- Kobayashi, J., Sato, M., Murayama, T., Ishibashi, M., Walchi, M.R., Kanai, M., Shoji, J., Ohizumi, Y. Konbamide, a novel peptide with calmodulin antagonistic activity from the Okinawan marine sponge *Theonella* sp. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1991**, *15*, 1050-1052.
- Koehn, F.E. y Carter, T.G. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews: Drug Discovery*, **2005**, *4*, 206-220.
- König, G.M., Kehraus, S., Seibert, S.F., Abdel-Lateff, A., Müller, D. Natural Products from Marine Organisms and Their Associated Microbes. *Chem. Bio. Chem.*, **2006**, *7*, 229-238.
- Kralj, A., Kehraus, S., Krick, A., Eguereva, E., Kelter, G., Maurer, M., Wortmann, A., Fiebig, H., König, G. Arugosins G and H: prenylated polyketides from the marine-derived fungus *Emericella nidulans* var. *acristata*. *J. Nat. Prod.*, **2006**, *69*, 995-1000.
- Kubo, I., Matsumoto, A., Kozuka, M., Wood, W.F. Calmodulin inhibitors from the bitter mushroom *Naematoloma fasciculare* (Fr.) Karst. (Strophariaceae) and absolute configuration of fasciculols. *Chem. Pharm. Bull.*, **1985**, *33*, 3821-3825.
- Kuboniwa, H., Tjandra, N., Grzesiek, S., Ren, H., Klee, C.B., Bax, A. Solution structure of calcium-free calmodulin. *Nat. Struct. Biol.*, **1995**, *2*, 768-776.
- Kuhlman, B. y Baker, D. Native protein sequences are close to optimal for their structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2000**, *97*, 10383-10388.
- Lam, K.S. New aspects of natural products in drug discovery. *Trends in Microbiology*, **2007**, *15*, 279-289.
- Leung, P.C., Taylor, W.A., Wang, J.H., Tipton, C.L. Ophiobolin A. A natural product inhibitor of calmodulin. *J. Biol. Chem.*, **1984**, *259*, 2742-2747.
- Leung, P.C., Taylor, W.A., Wang, J.H., Tipton, C.L. Role of calmodulin inhibition in the mode of action of ophiobolin A. *Plant Physiol.*, **1985**, *77*, 303-308.
- Li, L., Wei, D.Q., Wang, J.F., Chou, K.Ch. Computational studies of the binding mechanism of calmodulin with chrysin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2007**, *358*, 1102-1107.
- Lindahl, E., Hess, B., van der Spoel, D., GROMACS 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis. *J. Mol. Mod.*, **2001**, *7*, 306-317.
- Macías, M., Ulloa, M., Gamboa, A., Mata, R. Phytotoxic compounds from the new coprophilous fungus *Guanomyces polythrix*. *J. Nat. Prod.*, **2000**, *63*, 757-761.
- Macías, M., Ulloa, M., Gamboa, A., Toscano, R.A., Mata, R. Phytotoxic naphthopyranone derivatives from the coprophilous fungus *Guanomyces polythrix*. *Phytochemistry*, **2001**, *58*, 751-758.
- Madariaga M. A. Malbranqueamida C, un nuevo alcaloide de *Malbranchea aurantiaca* Sigler & Carmich. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, **2008**.
- Malmstrom, J., Christophersen, C., Barrero, A.F., Oltra, J.E., Justicia, J., Rosales, A. Bioactive Metabolites from a Marine-Derived Strain of the Fungus *Emericella varicolor*. *J. Nat. Prod.*, **2002**, *65*, 364-367.
- Maroto, R., Raso, A., Wood, T.G. TRPC1 forms the stretchactivated cation channel in vertebrate cells. *Nature Cell Biology*, **2005**, *7*, 179-185.
- Marrink, S.J., Vries, A.H. de, Harroun, T.A., Katsaras, J., Wassall, S.R. Cholesterol shows preference for the interior of polyunsaturated lipid membranes. *JACS*, **2008**, *130*, 10-11.
- Martínez-Luis, S., González, M.C., Ulloa, M., Mata, R. Phytotoxins from the fungus *Malbranchea aurantiaca*. *Phytochemistry*, **2005**, *66*, 1012-1016.
- Martínez-Luis, S., Pérez-Vásquez, A., Mata, R. Natural products with calmodulin inhibitor properties. *Phytochemistry*, **2007**, *68*, 1882-1903.

- Martínez-Luis, S., Rodríguez, R., Acevedo, L., González, M.C., Lira-Rocha, A. y Mata, R. Malbrancheamide, a new calmodulin inhibitor from the fungus *Malbranchea aurantiaca*. *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 1817-1822.
- Martínez, L.S. *Malbranchea aurantiaca* Sigler & Carmich, una fuente novedosa de fitotoxinas antagonistas de la proteína calmodulina. Tesis Doctorado, Facultad de Química, UNAM, **2007**.
- Mata, R., Bye, R., Linares, E., Macías, M., Rivero-Cruz, I., Pérez, O., Timmermann, B. Phytotoxic compounds from *Flourensia cernua*. *Phytochemistry*, **2003**, *64*, 285-291.
- Mata, R., Gamboa, A., Macias, M., Santillan, S., Ulloa, M., González, M. C. Effect of selected phytotoxins from *Guanomyces polythrix* on the calmodulin-dependent activity of the enzymes cAMP phosphodiesterase and NAD-Kinase. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, *51*, 4559-4562.
- Matsubara, M., Nakatsu, T., Kato, H., Taniguchi, H. Crystal structure of a myristoylated CAP-23/NAP-22 N-terminal domain complexed with Ca²⁺/calmodulin, *EMBO J.*, **2004**, *23*, 712-718.
- Matsuda, Y. y Kase, H. KS-619-1, a new inhibitor of calcium and calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase from *Streptomyces californicus*. *J. Antibiot.*, **1987**, *40*, 1104-1110.
- Matsuda, Y., Asano, K., Kawamoto, I. K-259-2, a new inhibitor of Ca²⁺ and calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase from *Micromonospora olivasterospora*. *J. Antibiot.*, **1987**, *40*, 1092-1100.
- Matsuda, Y., Asano, K., Kawamoto, I., Yasuzawa, T., Shirahata, K., Sano, H., Kase, H. K-251 compounds, inhibitors of Ca²⁺ and calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase from *Streptoverticillium album*. *Agric. Biol. Chem.*, **1988**, *52*, 3211-3213.
- Matsuda, Y., Nakanishi, S., Nagasawa, K., Kase, H. Inhibition by new anthraquinone compounds, K-259-2 and KS-619-1 of calmodulin dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem. Pharmacol.*, **1990**, *39*, 841-849.
- Miller, D.M, Olson, J.S, Pflugrath, J.W, Quijcho, F.A. Rates of ligand binding to periplasmic proteins involved in bacterial transport and chemotaxis. *J Biol Chem.*, **1983**, *258*, 13665-13672.
- Molnar, A., Liliom, K., Orosz, F., Vertessy, B.G., Ovadi, J. Anticalmodulin potency of indole alkaloids in *in-vitro* systems. *Eur. J. Pharmacol.*, **1995**, *291*, 73-82.
- Morris, G.M., Goodsell, R.S., Halliday, R., Huey, W.E., Hart, R.K., Belew, A.O. Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and Empirical Binding Free Energy Function *J. Comp. Chem.*, **1998**, *19*, 1639-1662.
- Nakanishi, S., Matsuda, Y., Iwahashi, K., Kase, H. K-252b, c and d, potent inhibitors of protein kinase C from microbial origin. *J. Antibiot.*, **1986**, *39*, 1066-1071.
- Nakanishi, S., Osawa, K., Saito, Y., Kawamoto, I., Kuroda, K., Kase, H. KS-505a, a novel inhibitor of bovine brain Ca²⁺ and calmodulin dependent cyclic-nucleotide phosphodiesterase from *Streptomyces argenteolus*. *J. Antibiot.*, **1992**, *45*, 341-346.
- Newman, D.J. y Cragg, G.M. Natural products as sources of new drugs over the Last 25 years. *J. Nat. Prod.*, **2007**, *70*, 461-477.
- Newman, D.J., Cragg, G.M, Snader, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.*, **2003**, *66*, 1022-1037.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat Prod Rep.*, **2000**, *17*, 215-234.
- Nielsen, J., Nielsen, P., Frisva, J.C. Fungal depside, guisinol, from a marine derived strain of *Emericella unguis*. *Phytochemistry*, **1999**, *50*, 263-265.
- Nishino, H., Naitoh, E., Iwashima, A., Umezawa, K. Quercetin interacts with calmodulin, a calcium regulatory protein. *Experientia*, **1984**, *40*, 184-185.
- O'Day, D.H. CaMBOT: profiling and characterizing calmodulin-binding proteins. *Cellular Signalling*, **2003**, *15*, 347-354.
- Oberlies, N.H. y Kroll, D.J. Camptothecin and taxol: historic achievements in natural products research. *J Nat Prod.*, **2004**, *67*, 129-135.
- Odom, A., Del Poeta-Pala, I., Srinivasan, A., Vig, P.V.S., Desaiyah, D. Modulation of calmodulin and protein kinase C activities by *Penicillium* mycotoxins. *Int. J. Toxicol.*, **1999**, *18*, 91-96.

- Odom, A., Del Poeta, M., Perfect, J., Heitman, J. The immunosuppressant FK506 and its nonimmunosuppressive analog L-685, 818 are toxic to *Cryptococcus neoformans* by inhibition of a common target protein. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1997**, *41*, 156-161.
- Oh, D.Ch., Kauffman, C.A., Jensen, P.R., Fenical, W. Induced Production of Emericellamides A and B from the Marine-Derived Fungus *Emericella* sp. in Competing Co-culture. *J. Nat. Prod.*, **2007**, *70*, 515-520.
- Ohtani, I., Kusumi, T., Kashman, Y., Kakisawa, H. High-field FT NMR application of Mosher's method. The absolute configurations of marine terpenoids. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4092-4096.
- Okuyama, T., Takata, M., Takayasu, J., Hasegawa, T., Tokuda, H., Nishino, A., Nishino, H. Antitumor promotion by principles obtained from *Angelica keiskei*. *Planta Med.*, **1991**, *57*, 242-246.
- Orosz, F., Christova, T.V., Ovadi, J. Functional in vitro test of calmodulin antagonism: Effect of drugs on interaction between calmodulin and glycolytic enzymes. *Mol. Pharmacol.*, **1988**, *33*, 678-682.
- Orosz, F., Comin, B., Raïs, B., Puigjaner, J., Kovács, J., Tárkányi, G., Ács, T., Keve, T., Cascante, M., Ovádi, J. New semisynthetic vinca alkaloids: chemical, biochemical and cellular studies. *British Journal of Cancer*, **1999**, *79*, 1356-1365.
- Orosz, F., Telegdi, M., Liliom, K., Solti, M., Korbonits, D., Ovadi, J. Dissimilar mechanisms of action of anticalmodulin drugs: quantitative analysis. *Mol. Pharmacol.*, **1990**, *38*, 910-916.
- Osawa, M., Swindells, M.B., Tanikawa, J., Tanaka, T., Mase, T., Furuya, T., Ikura, M. Solution Structure of Calmodulin-W-7 Complex: The Basis of Diversity in Molecular Recognition. *J. Mol. Biol.*, **1998**, *276*, 165-176.
- Ovadi, J. Effect of drugs on calmodulin-mediated enzymatic actions. En: *Progress in Drug Research*; Jucker, E., Eds., Birkhauser Verlag: Basel, **1989**; vol. 33, 353-395.
- Pak, C., Leung, L., Lee, M., Graves, M., Tipton, C.L. Characterization of the Interaction of Ophiobolin A and Calmodulin. *Int. J. Biochem.*, **1998**, *20*, 1351-1359.
- Pak, C., Leung, L., William, A. Taylor, J., Wang, H., Tipton, C.L. Role of Calmodulin Inhibition in the Mode of Action of Ophiobolin A. *Plant Physiol.*, **1985**, *77*, 303-308.
- Pala, I., Srinivasan, A., Vig, P.V.S., Desai, D. Modulation of calmodulin and protein kinase C activities by *Penicillium* mycotoxins. *Int. J. Toxicol.*, **1999**, *18*, 91-96.
- Paliyath, G. y Poovaiah, B.W. Identification of naturally occurring calmodulin inhibitors in plants and their effects on calcium- and calmodulin-promoted protein phosphorylation. *Plant Cell Physiol.*, **1985**, *26*, 201-209.
- Parekh, A.B. y Putney, J.W. Store-operated calcium channels. *Physiological Reviews*, **2005**, *85*, 757-810.
- Pérez-Vásquez, A., Reyes, A., Linares, E., Bye, R., Mata, R. Phytotoxins from *Hofmeisteria schaffneri*: isolation and synthesis of 2'-(2"-hydroxy-4"-methylphenyl)-2'-oxoethyl acetate. *J. Nat. Prod.*, **2005**, *68*, 959-962.
- Pitt, J.I., Samson, R.A. Frisvad, J.C. Types of *Aspergillus* and *Penicillium* and their teleomorphs in current use. En: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. En: Robert A. Samson, John I. Pitt Eds., Editorial CRC Press, **2000**.
- Pornpakakul, S., Liangsakul, J., Ngamrojanavanich, N., Roengsumran, S., Sihanonth, P., Piapukiew, J., Sangvichien, E., Puthong, S. Petsom, A. Cytotoxic activity of four xanthenes from *Emericella varicolor*, an endophytic fungus isolated from *Croton oblongifolius*. *Arch. Pharm. Res.*, **2006**, *29*, 140-144.
- Reid, D.G., MacLachlan, L.K., Gajjars, K., Voyle, M., King, R.J., England, P.J. A proton nuclear magnetic resonance and molecular modeling study of calmidazolium (R24571) binding to calmodulin and skeletal muscle troponin C. *The Journal of Biological Chemistry*, **1990**, *265*, 9744-9753.
- Rivero-Cruz, B. Compuestos espasmolíticos de *Brickellia veronicifolia* (Kunth) Gray (Asteraceae). Una contribución para determinar la identidad, composición y eficacia de la droga cruda. Tesis de Doctorado. Facultad de Química. UNAM, **2006**.

- Rivero-Cruz, B., Rivero-Cruz, I., Rodríguez-Sotres, R. y Mata, R. Effect of natural and synthetic benzyl benzoates on calmodulin. *Phytochemistry*, **2007**, *68*, 1147-1155.
- Rivero-Cruz, J. Análisis conformacional y esteroquímica absoluta de las nonenólidas fitotóxicas del hongo *Phoma herbarum*. Tesis de Doctorado. Facultad de Química. UNAM, **2001**.
- Rizzuto, R., Duchen, M.R., Pozzan, T. Flirting in little space: the ER/mitochondria Ca^{2+} liaison. *Science STKE*, **2004**, *215*, re1.
- Rojas, S., Acevedo, L., Macias, M., Toscano, R.A., Bye, R., Timmermann, B., Mata, R. Calmodulin inhibitors from *Leucophyllum ambiguum*. *J. Nat. Prod.*, **2003**, *66*, 221-224.
- Ronca-Testoni, S., Hrelia, S., Hakim, G., Rossi, C.A. Interaction of smooth muscle relaxant drugs with calmodulin and cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Experientia*, **1985**, *41*, 75-76.
- Roufogalis, B.D., Li, Q., Tran, V.H., Kable, E.P.W., Duke, C.C. Investigation of plant-derived phenolic compounds as plasma membrane Ca^{2+} -ATPase inhibitors with potential cardiovascular activity. *Drug Dev. Res.*, **1999**, *46*, 235-249.
- Saito, M., Matsuura, I., Okazaki, H. Tf-26Vx, an antibiotic produced by a thermophilic fungus. *Journal of Antibiotics*, **1979**, *32*, 1210-1212.
- Schlegel, B., Hänel, F., Gollmick, F.A., Saluz, H.P., Gräfe, U. New quinones and hydroquinones from *Malbranchea cinnamomea* HKI 286 and HKI 296 and interaction with Tax/CREB expression system in yeast. *J. Antibiot.*, **2003a**, *56*, 917-922.
- Schlegel, B., Hänel, F., Gollmick, F.A., Gräfe, U. 7-methoxy-2,3-dimethylbenzofuran-5-ol, a new antioxidant from *Malbranchea cinnamomea* HKI 0286. *J. Antibiot.*, **2003b**, *56*, 792-794.
- Schumacher, M.A., Rivard, A.F., Bachinger, H.P., and Adelman, J.P. Structure of the gating domain of a Ca^{2+} -activated K^{+} channel complexed with Ca^{2+} /calmodulin. *Nature*, **2001**, *410*, 1120-1124.
- Schwaller, B. Encyclopedia of Life Sciences, Editorial John Wiley and Sons, **2005**.
- Sharma, R.K. y Wang, J.H. Preparation and assay of the Ca^{2+} -dependent modulator protein. En: Greengard, P., Robinson, G.A. Eds., En: *Advances in Cyclic Nucleotide Research*, vol. 10. Raven Press, New York, **1979**, 187-198.
- Sharma, R.K., Wang, J.H., Wu, Z. Mechanisms of inhibition of calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase by dihydropyridine calcium antagonists. *J. Neurochem.*, **1997**, *69*, 845-850.
- Sharma, B., Deo, S.K., Bachas, L.G., Daunert, S. Competitive binding assay using fluorescence resonance energy transfer for the identification of calmodulin antagonist. *Bioconjugate Chem.*, **2005**, *16*, 1257-1263.
- Stephens, P., Pan, J., Devlin, F., Cheeseman, J. Determination of the absolute configurations of natural products using TDDFT Optical Rotation calculations: The iridoid oruwacin. *J. Nat. Prod.*, **2008**, *71*, 285-288.
- Takahashi, A., Kusano, G., Ohta, T., Ohizumi, Y., Nozoe, S. Fasciculic acids A, B and C as calmodulin antagonists from the mushroom *Naematoloma fasciculare*. *Chem. Pharm. Bull.*, **1989**, *37*, 3247-3250.
- Takahashi, N., Tamagawa, K., Kawai, K., Fukui, T. Antioxidant properties of a new type of polyene, Falconensone A and its derivatives. *Biol. Pharm. Bull.*, **2000**, *23*, 989-994.
- Taylor, C.W., Genazzani, A.A., Morris, S.A. Expression of inositol trisphosphate receptors. *Cell Calcium*, **1999**, *26*, 237-251.
- Thayer, A. Bristol-Myers to settle suits. *Chem Eng News*, **2003**, *81*, 6.
- Turjanski, A.G., Estrin, D.A., Rosenstein, R.E., McCormick, J.E., Martin, S.R., Pastore, A., Biekofsky, R.R., Martorana, V. NMR and molecular dynamics studies of the interaction of melatonin with calmodulin. *Protein Science*, **2004**, *13*, 2925-2938.
- Valencia-Islas, N., Abbas, H., Bye, R., Toscano, R.A, Mata, R. Phytotoxic compounds from *Prionosciadium watsoni*. *J. Nat. Prod.*, **2002**, *65*, 828-834.
- Vertessy, B.G., Ramat, V., Böcskei, Z., Naáray-Szabó, G., Orosz, F., Ovádi, J. Simultaneous binding of drugs with different chemical structures to Ca^{2+} -calmodulin: crystallographic and

- spectroscopic studies. *Biochemistry*, **1998**, *37*, 15300-15310.
- Wang, V.H., Lu, Z.X., Polya, G.M. Inhibition of eukaryote serine/threonine-specific protein kinases by piceatannol. *Planta Med.*, **1998**, *64*, 195-199.
 - Wang, W.L., Lu, Z.L., Tao, H.W., Zhu, T.J., Fang, Y., Gu Q. y Zhu, W.M. Isoechinulin-type Alkaloids, Variecolorins A-L, from Halotolerant *Aspergillus varicolor*. *J. Nat. Prod.*, **2007**, *70*, 1558-1564.
 - Wassenaar, T.A., Quax, W.J., Mark, A.E. The conformation of the extracellular binding domain of Death Receptor 5 in the presence and absence of the activating ligand TRAIL: A molecular dynamics study. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*, **2008**, *70*, 333-343.
 - Wei, H., Itoh, T., Kinoshita, M., Nakai, Y., Kurotakib, M. y Kobayashia, M. Cytotoxic sesterterpenes, 6-epi-ophiobolin G and 6-epi-ophiobolin N, from marine derived fungus *Emericella varicolor* GF10. *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 6015-6019.
 - Wong, C.C., Cheng, K.W., He, Q.Y., Chen, F. Unraveling the molecular targets of natural products: Insights from genomic and proteomic analyses. *Proteomics Clin. Appl.* **2008**, *2*, 338-354.
 - www.autodock.scripps.edu
 - www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/
 - Yamada, T., Iwamoto, C., Yamagaki, N., Yamanouchi, T., Minoura, K., Yamori, T., Uehara, Y., Andoh, T., Umemura, K., Numata, A., Nasahara, T. Leptosins M-N1, cytotoxic metabolites from a *Leptosphaeria* species separated from a marine alga. Structure determination and biological activities. *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 479-487.
 - Yamauchi, E., Nakatsu, T., Matsubara, M., Kato, H., Taniguchi, H. Crystal structure of a MARCKS peptide containing the calmodulin-binding domain in complex with Ca²⁺-calmodulin, *Nat. Struct. Biol.*, **2003**, *10*, 226-231.
 - Yamazaki, M. y Maebayashi, Y. Isolation and structure determination of violaceic acid, A new biphenyl ether type metabolite from *Emericella violaceae*. *Chem., Pharm. Bull.*, **1982**, *30*, 509-513.
 - Yasuzawa, T., Yoshida, M., Shirahata, K., Sano, H. Structure of a novel calcium and calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitor KS-619-1. *J. Antibiot.*, **1987**, *40*, 1111-1114.
 - Ye, Q., Li, X., Wong, A., Wei, Q., Jia, Z. Structure of Calmodulin Bound to a Calcineurin Peptide: A New Way of Making an Old Binding Mode. *Biochemistry*, **2006**, *45*, 738-745.
 - Yoganathan, K., Rossant, C., Robert P. Glover, R.P., Cao, S., Vittal, J.J., Ng, S., Huang, Y., Buss, A., Butler, M. Inhibition of the human chemokine receptor CCR5 by variecolin and variecolol and isolation of four new variecolin analogues, Emericolins A-D, from *Emericella aurantiobrunnea*. *J. Nat. Prod.*, **2004**, *67*, 1681-1684.
 - Zhang, M., Yuan, T., Vogel, H.J. A peptide analog of the calmodulin-binding domain of myosin light chain kinase adopts an {alpha}-helical structure in aqueous trifluoroethanol. *Protein Sci.*, **1993**, *2*, 1931-1937.
 - Zhou, Y., Li, Y., Wang, Z., Ou, Y., Zhou, X. ¹H-NMR and spin-labeled EPR studies on the interaction of calmodulin with jujuboside A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1994**, *202*, 148-154.

Espectros

- Espectro de ^1H -RMN del hidrato de 15(*S*)-cloro-tajixantona (1)
- Espectro de ^{13}C -RMN del hidrato de 15(*S*)-cloro-tajixantona (1)
- Espectro ^1H - ^1H modalidad COSY del hidrato de 15(*S*)-cloro-tajixantona (1)
- Espectro ^1H - ^1H modalidad NOESY del hidrato de 15(*S*)-cloro-tajixantona (1)
- Espectro ^1H - ^{13}C modalidad HSQC del hidrato de 15(*S*)-cloro-tajixantona (1)
- Espectro ^1H - ^{13}C modalidad HMBC del hidrato de 15(*S*)-cloro-tajixantona (1)

- Espectro de ^1H -RMN de la 14-metoxi-tajixantona (2)
- Espectro de ^{13}C -RMN de la 14-metoxi-tajixantona (2)
- Espectro ^1H - ^1H modalidad COSY de la 14-metoxi-tajixantona (2)
- Espectro ^1H - ^1H modalidad NOESY de la 14-metoxi-tajixantona (2)
- Espectro ^1H - ^{13}C modalidad HSQC de la 14-metoxi-tajixantona (2)
- Espectro ^1H - ^{13}C modalidad HMBC de la 14-metoxi-tajixantona (2)

- Espectro ^1H -RMN de la shamixantona (3)
- Espectro ^{13}C -RMN de la shamixantona (3)

- Espectro ^1H -RMN del hidrato de tajixantona (4)
- Espectro ^{13}C -RMN del hidrato de tajixantona (4)

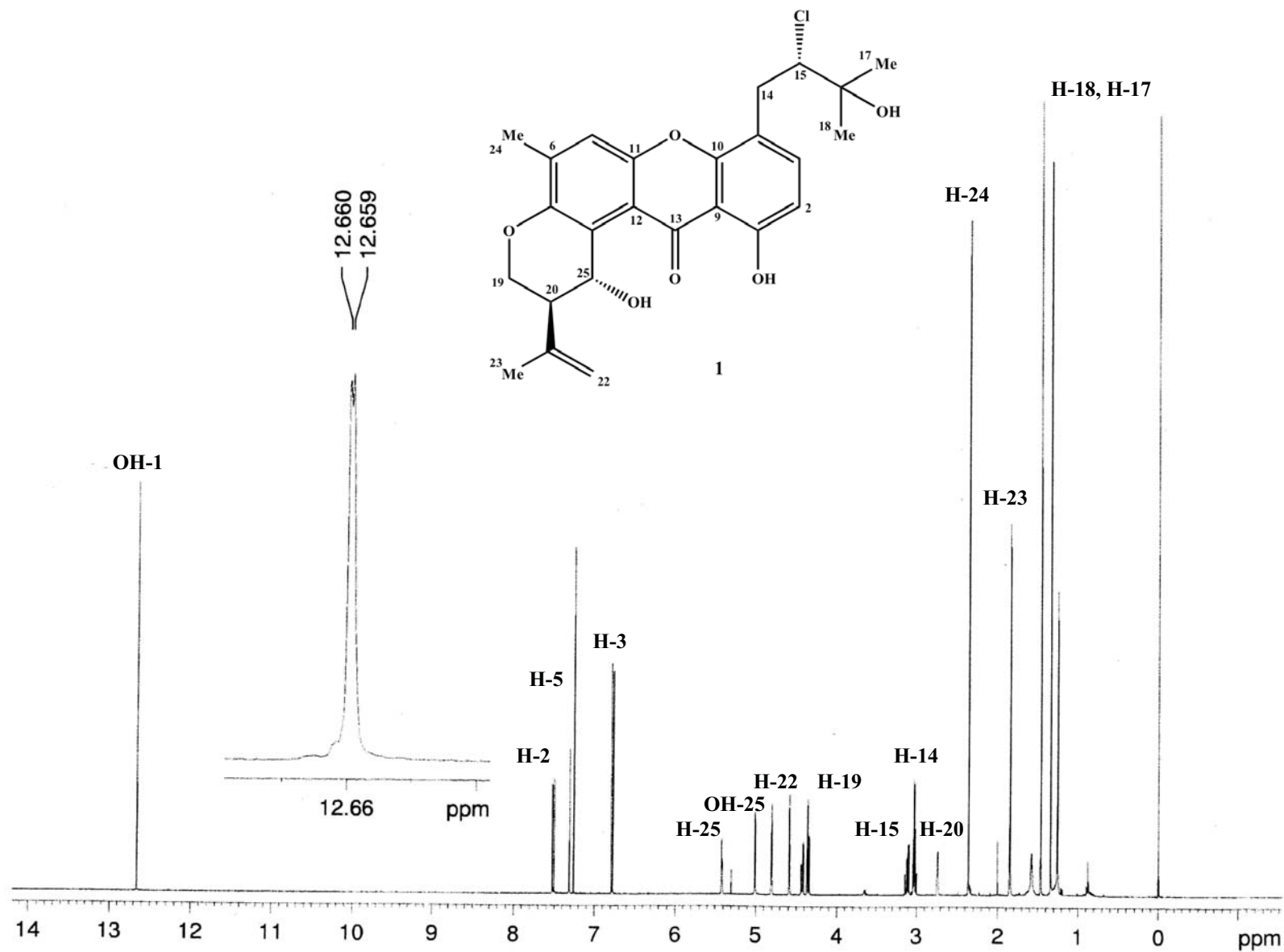
- Espectro ^1H -RMN de la emericelina (5)
- Espectro ^{13}C -RMN de la emericelina (5)

- Espectro de ^1H -RMN de la malbranqueamida B (6)

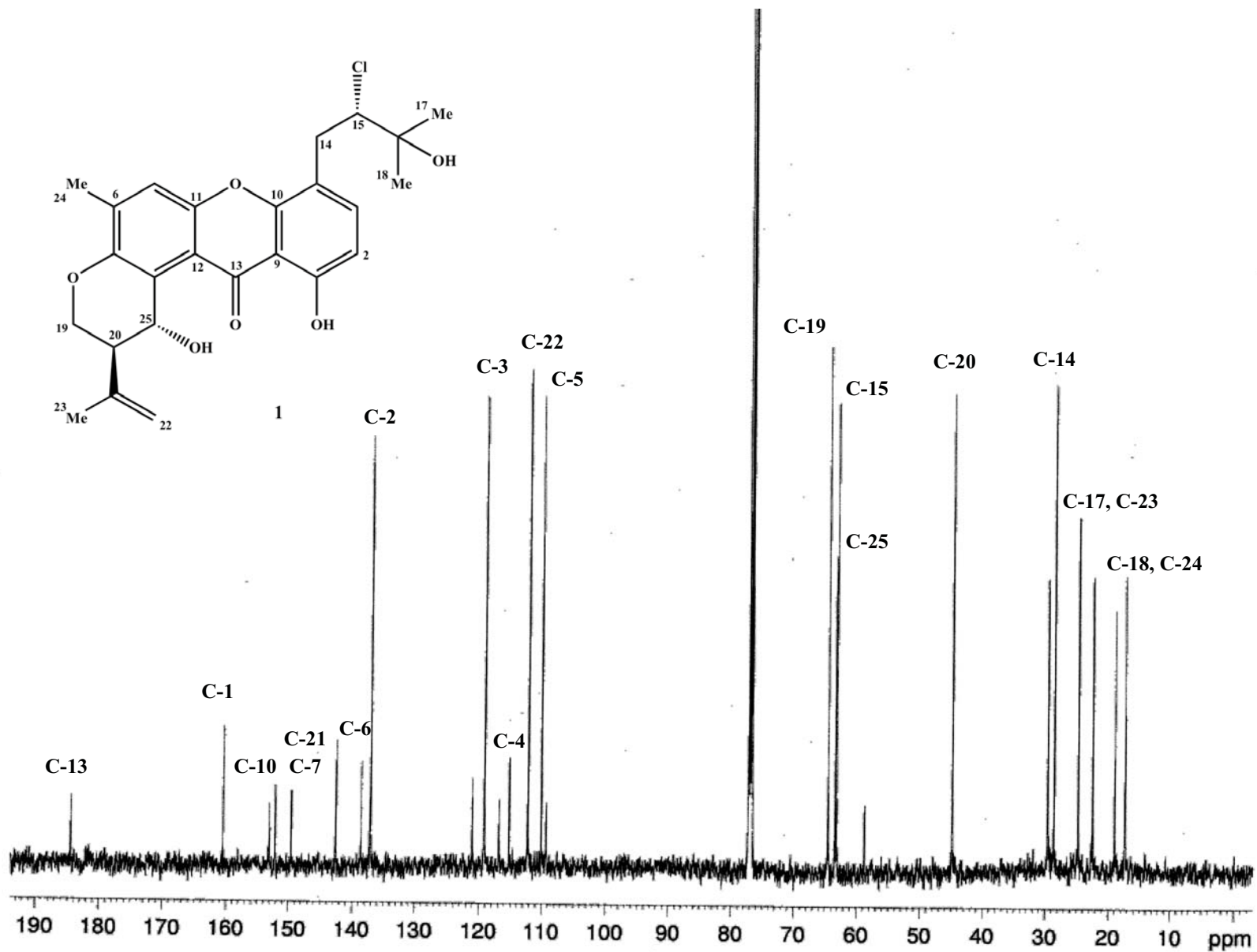
- Espectro de ^1H -RMN de la premalbranqueamida (7)

- Espectro de ^1H -RMN de la malbranqueamida (8)

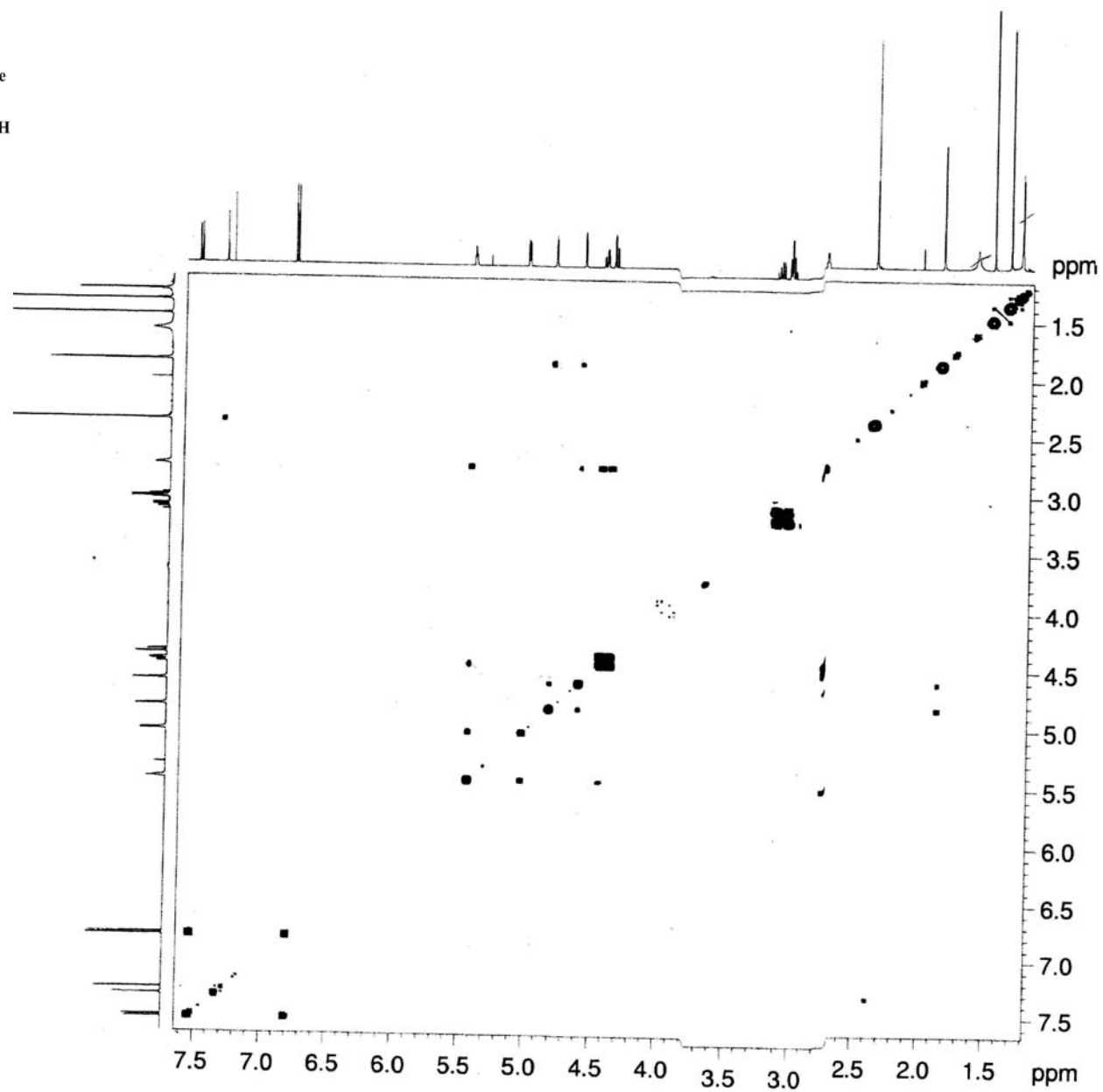
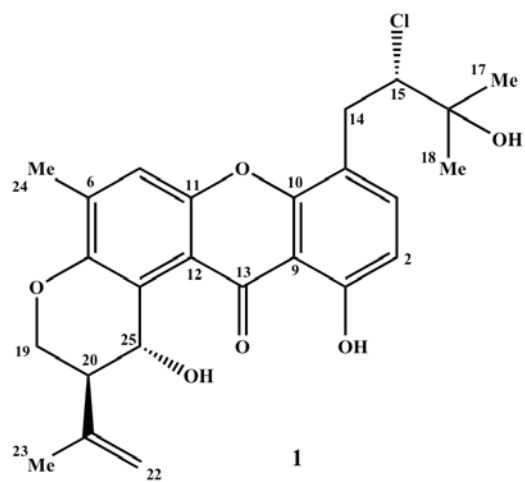
- Espectro de ^1H -RMN de la isomalbranqueamida B (9)



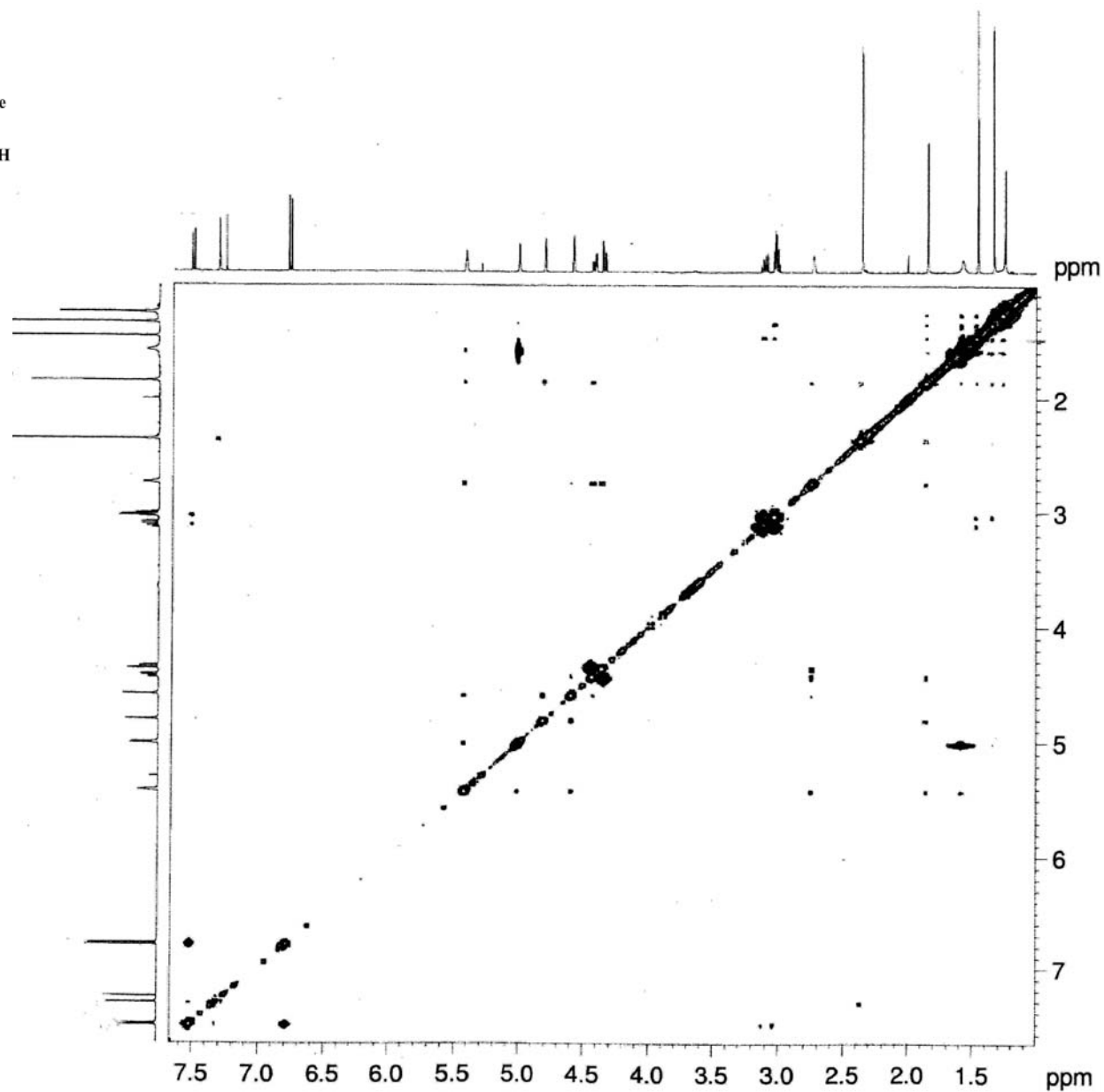
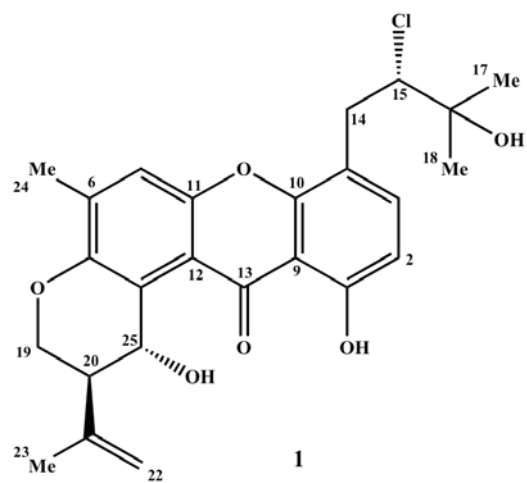
Espectro de ¹H-RMN del hidrato de 15(*S*)-cloro-tajixantona (1)



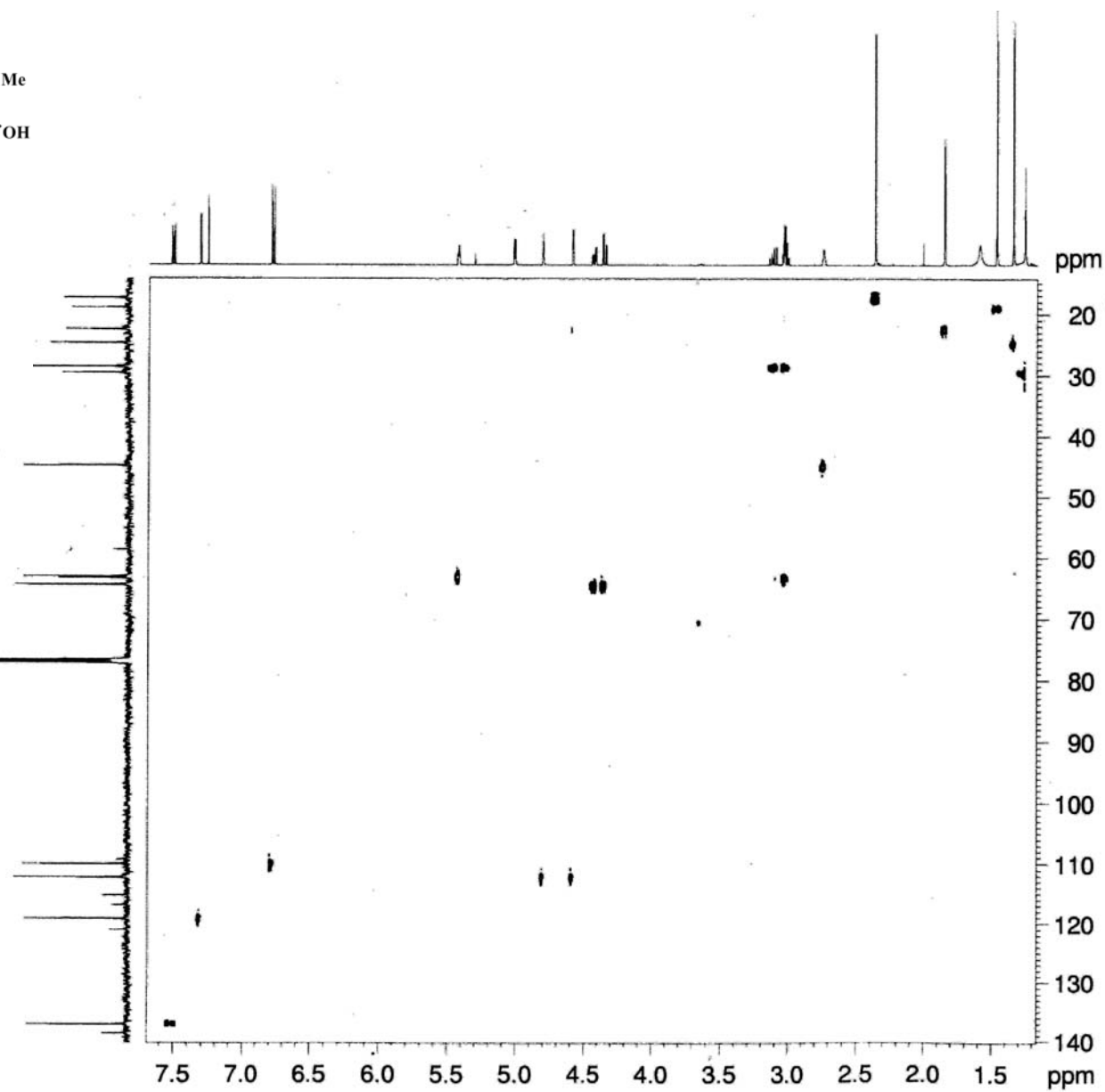
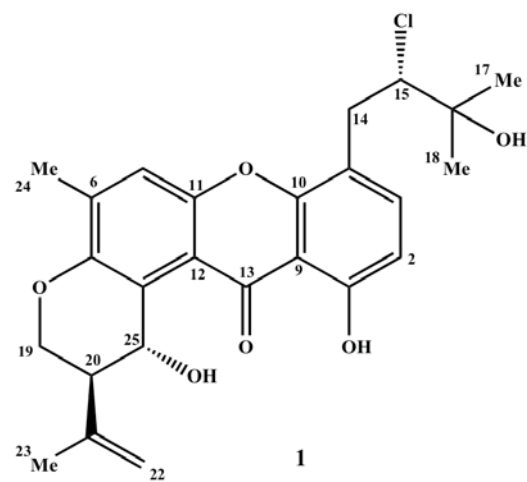
Espectro de ^{13}C -RMN del hidrato de 15(S)-cloro-tajixantona (1)



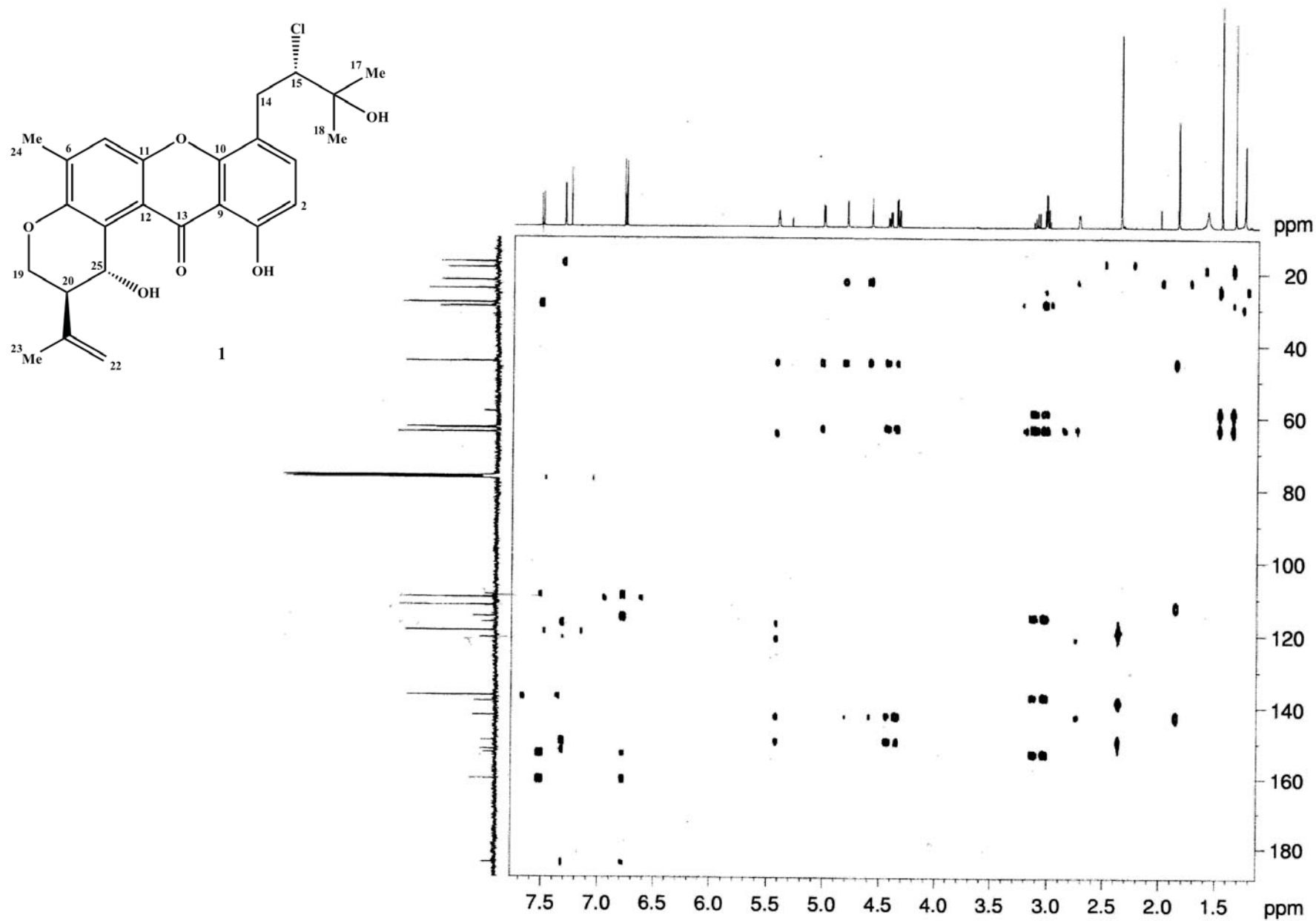
Espectro ^1H - ^1H modalidad COSY del hidrato de 15(S)-cloro-tajixantona (1)



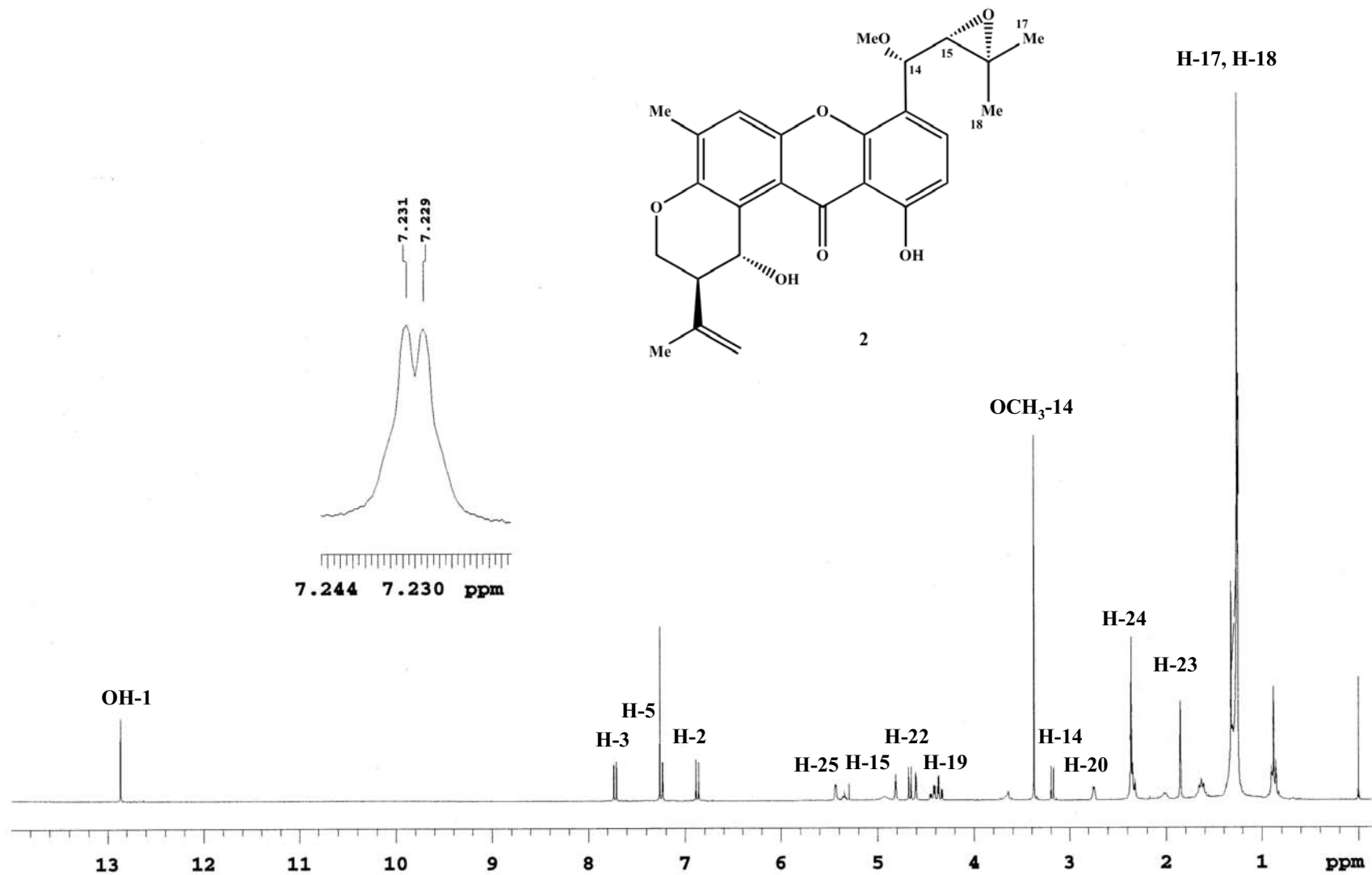
Espectro ^1H - ^1H modalidad NOESY del hidrato de 15(S)-cloro-tajixantona (1)



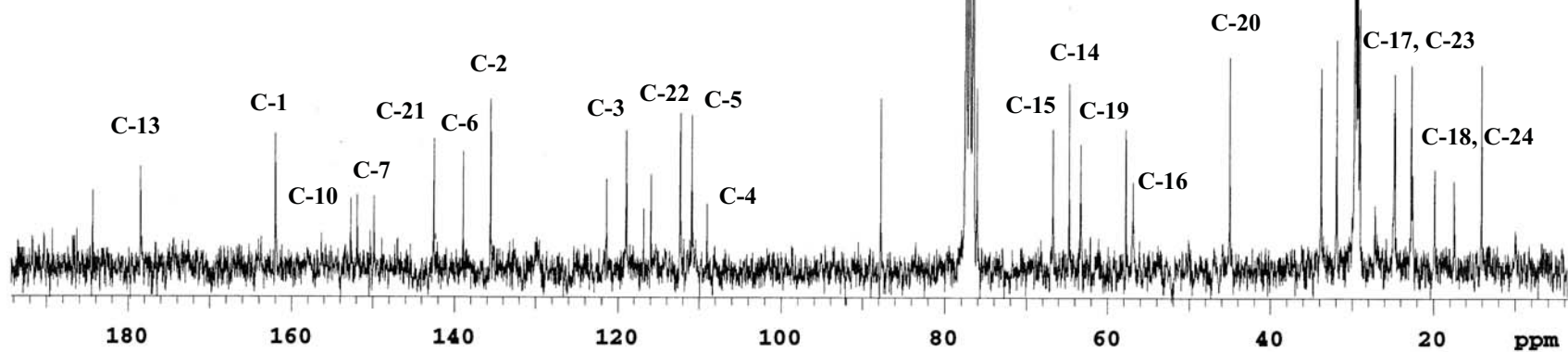
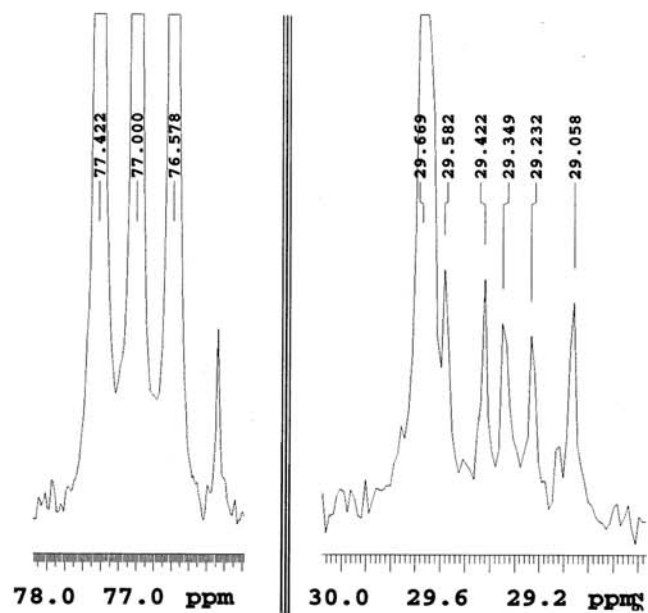
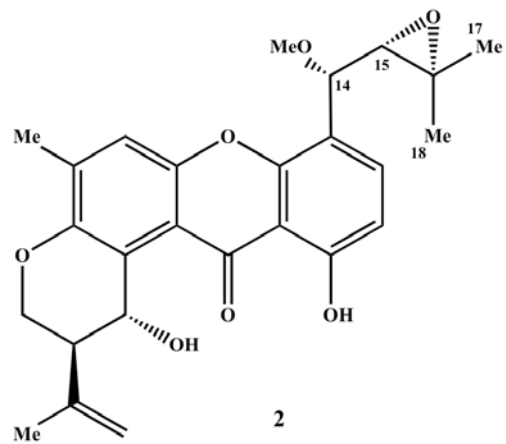
Espectro ^1H - ^{13}C modalidad HSQC del hidrato de 15(S)-cloro-tajixantona (1)



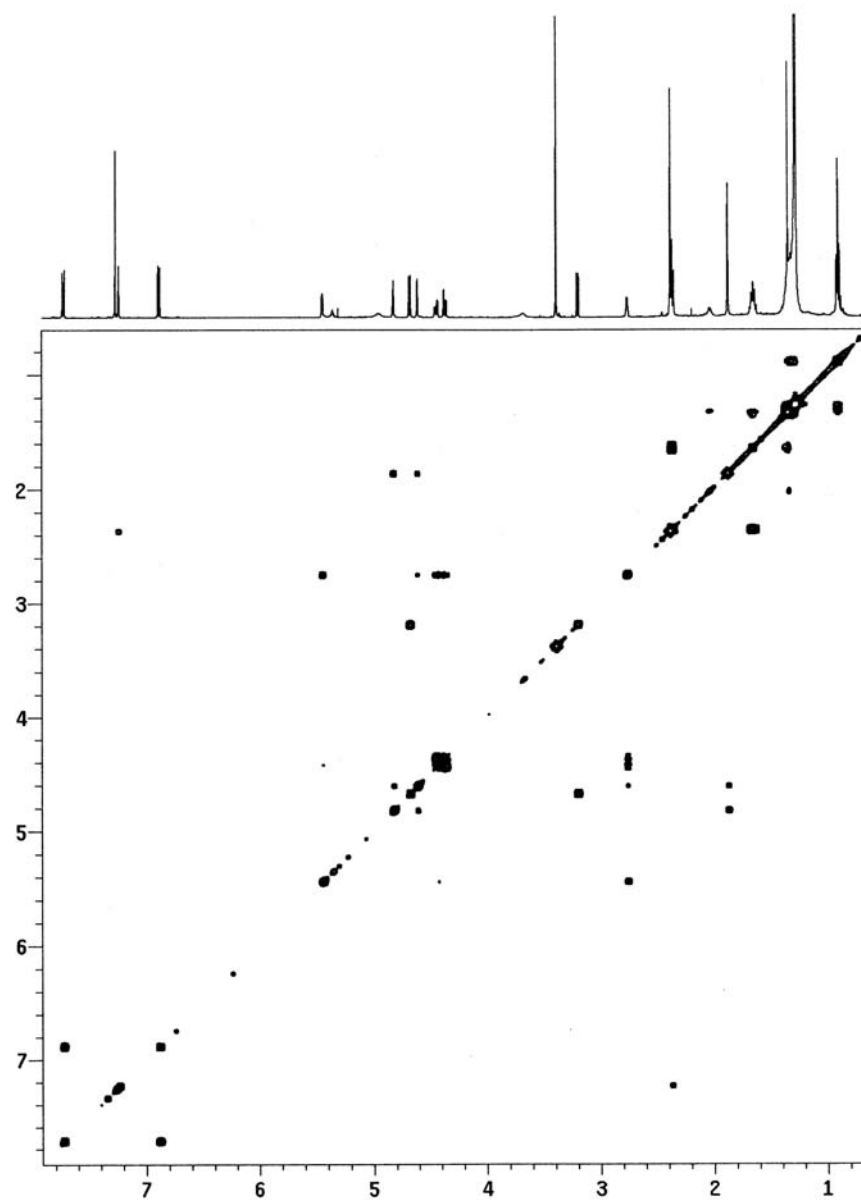
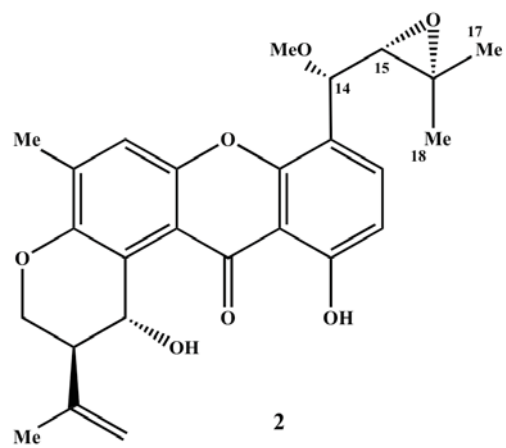
Espectro ^1H - ^{13}C modalidad HMBC del hidrato de 15(*S*)-cloro-tajixantona (1)



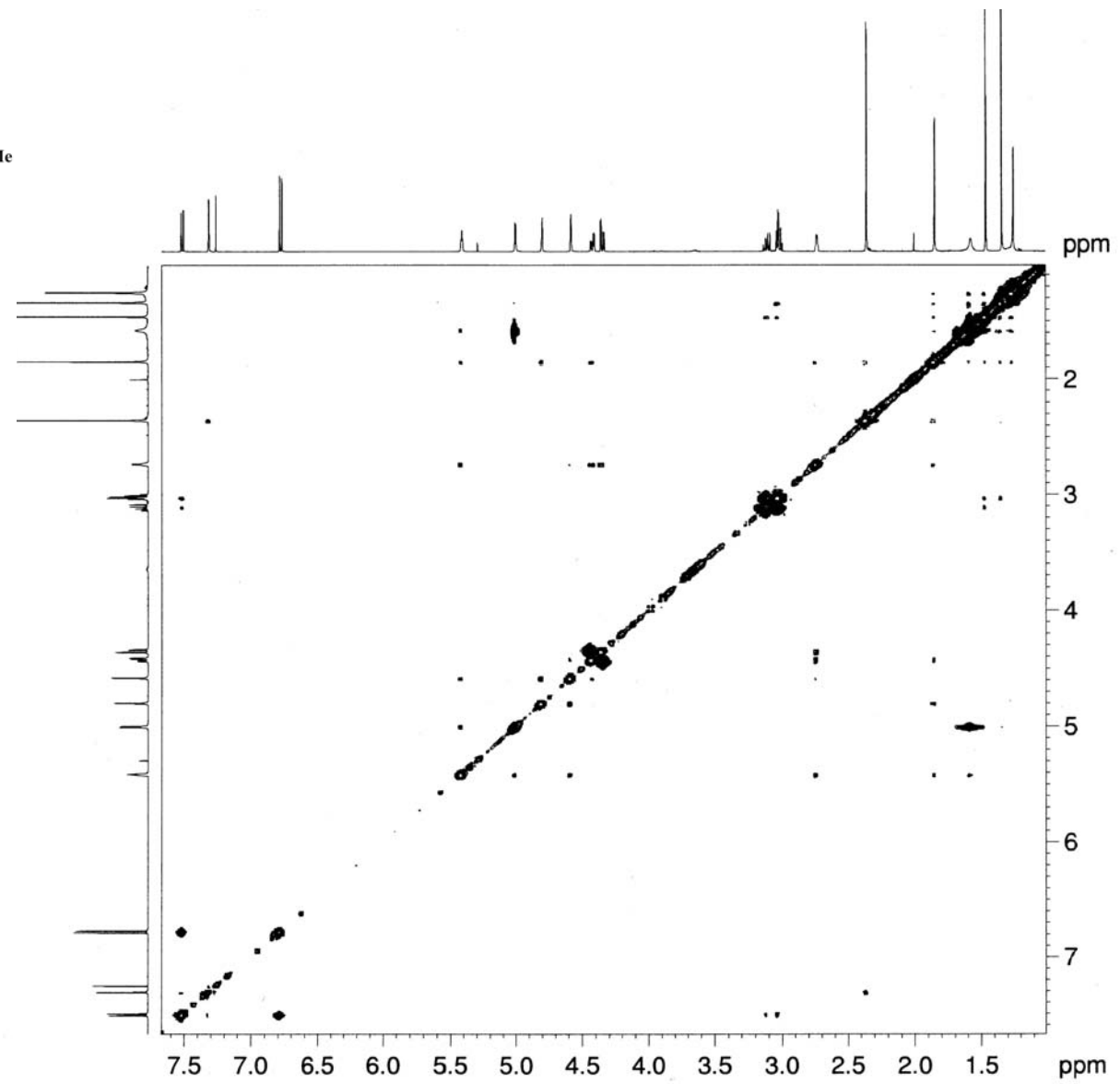
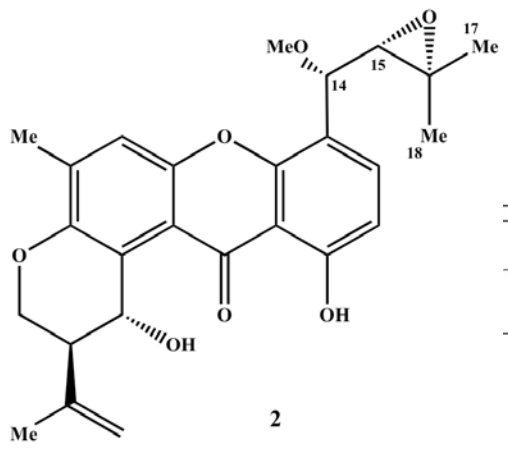
Espectro de ¹H-RMN de la 14-metoxi-tajixantona (2)



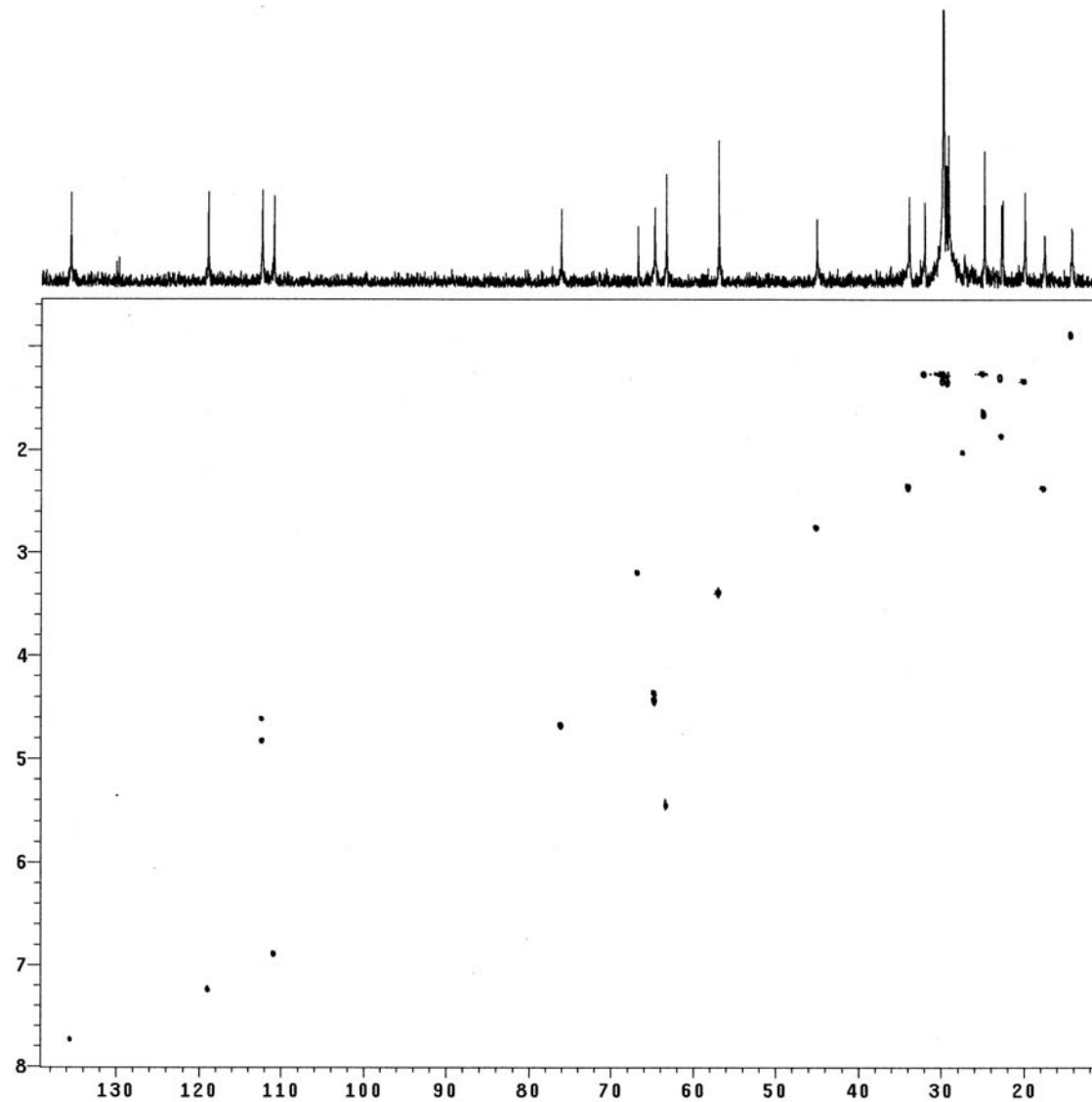
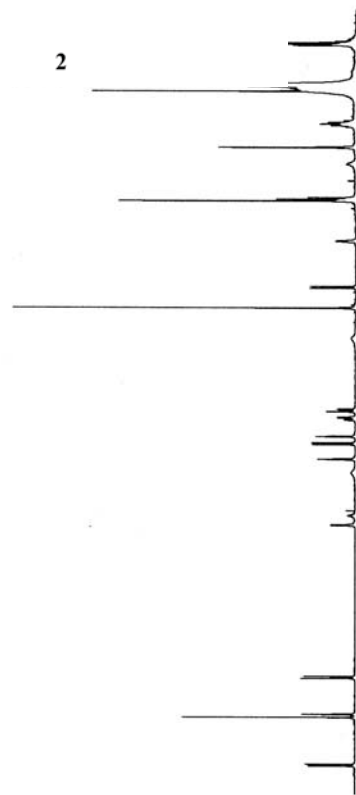
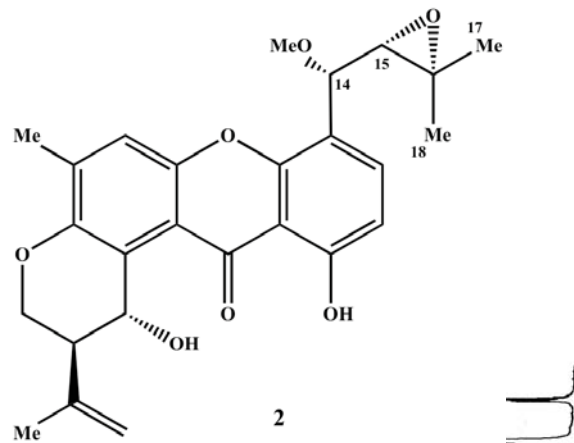
Espectro de ^{13}C -RMN de la 14-metoxi-tajixantona (2)



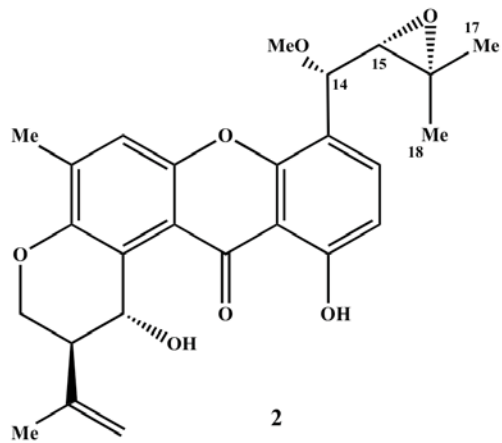
Espectro ^1H - ^1H modalidad COSY de la 14-metoxi-tajixantona (2)



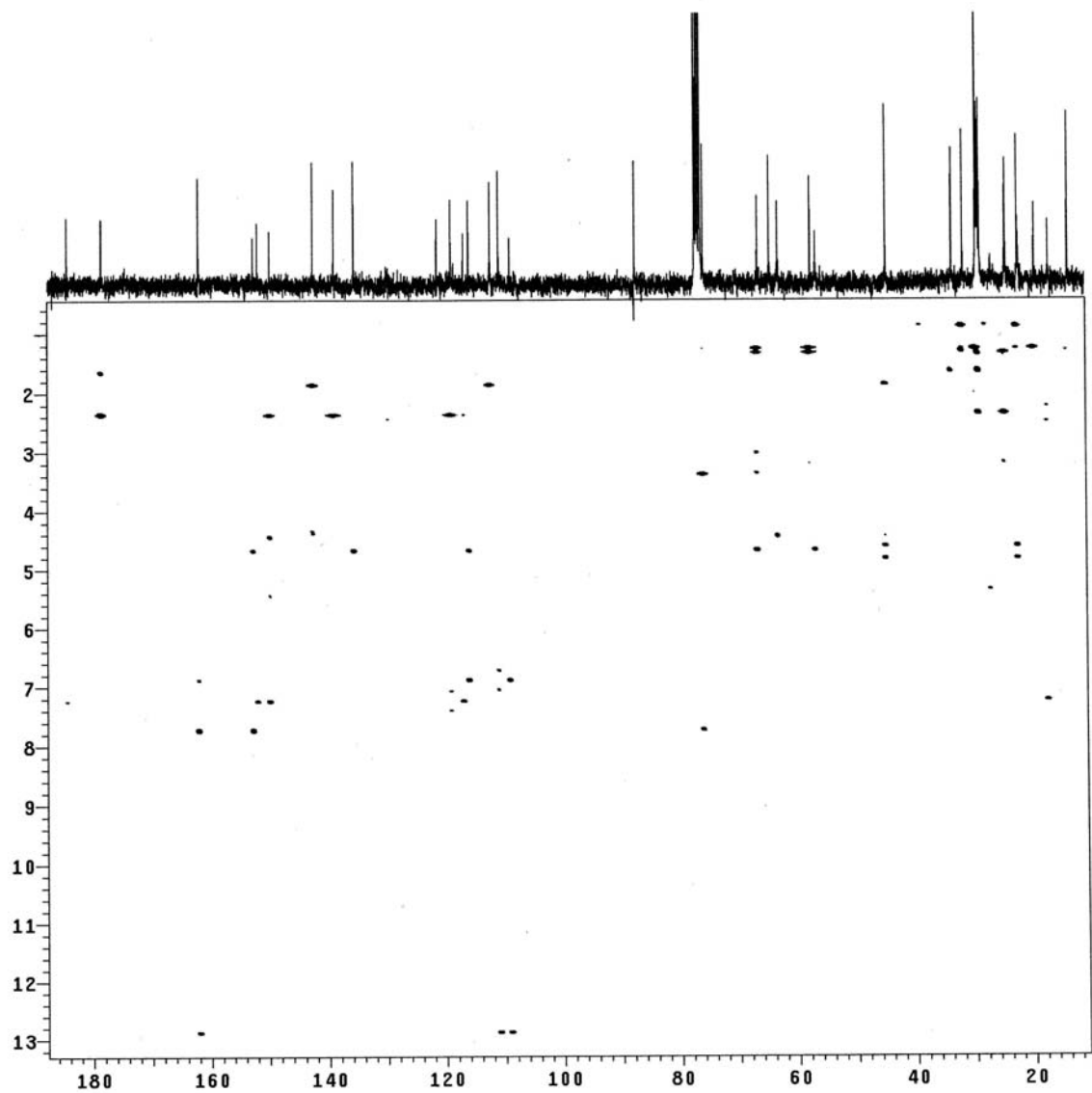
Espectro ^1H - ^1H modalidad NOESY de la 14-metoxi-tajixantona (2)



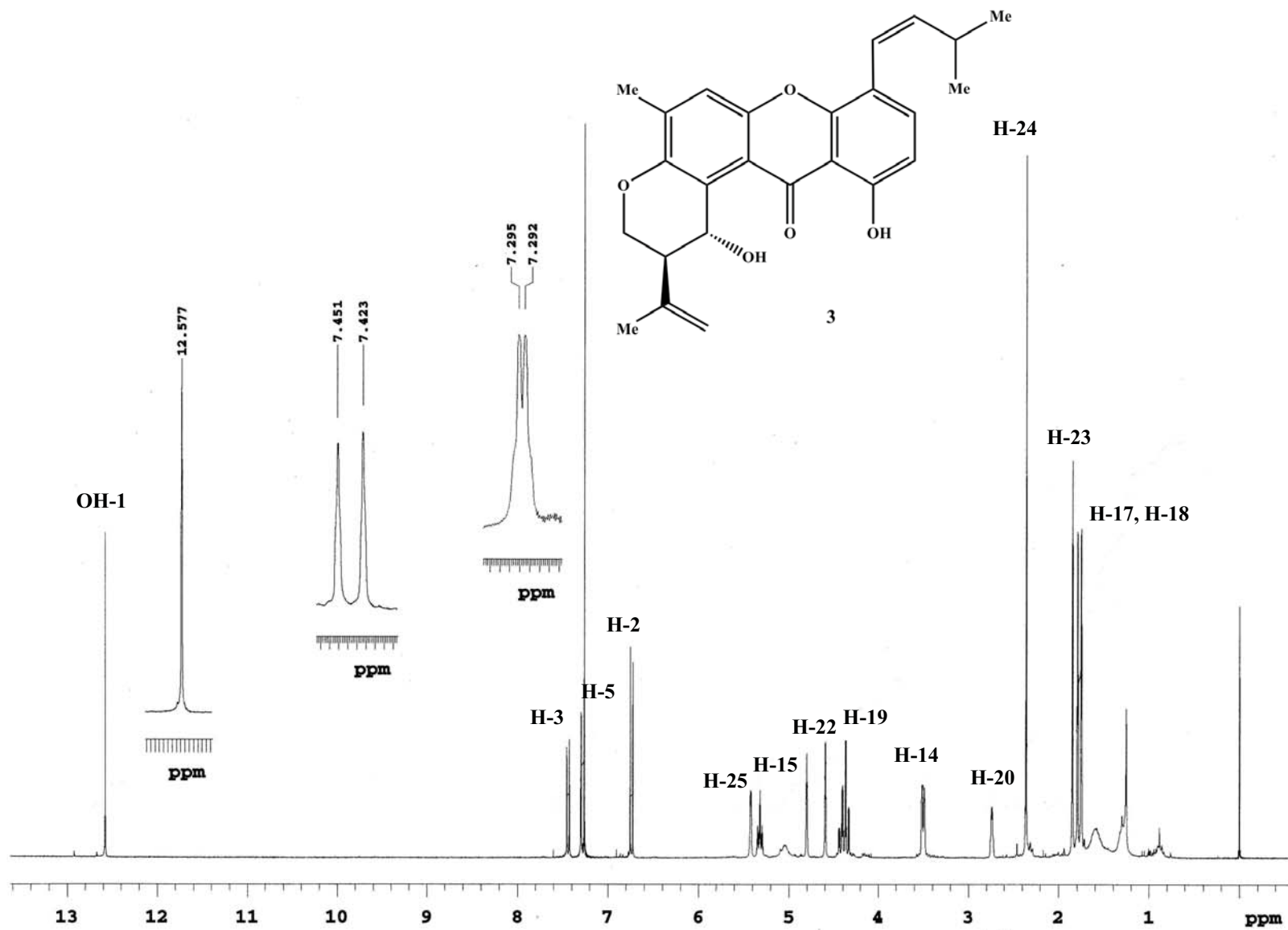
Espectro ^1H - ^{13}C modalidad HSQC de la 14-metoxi-tajixantona (2)



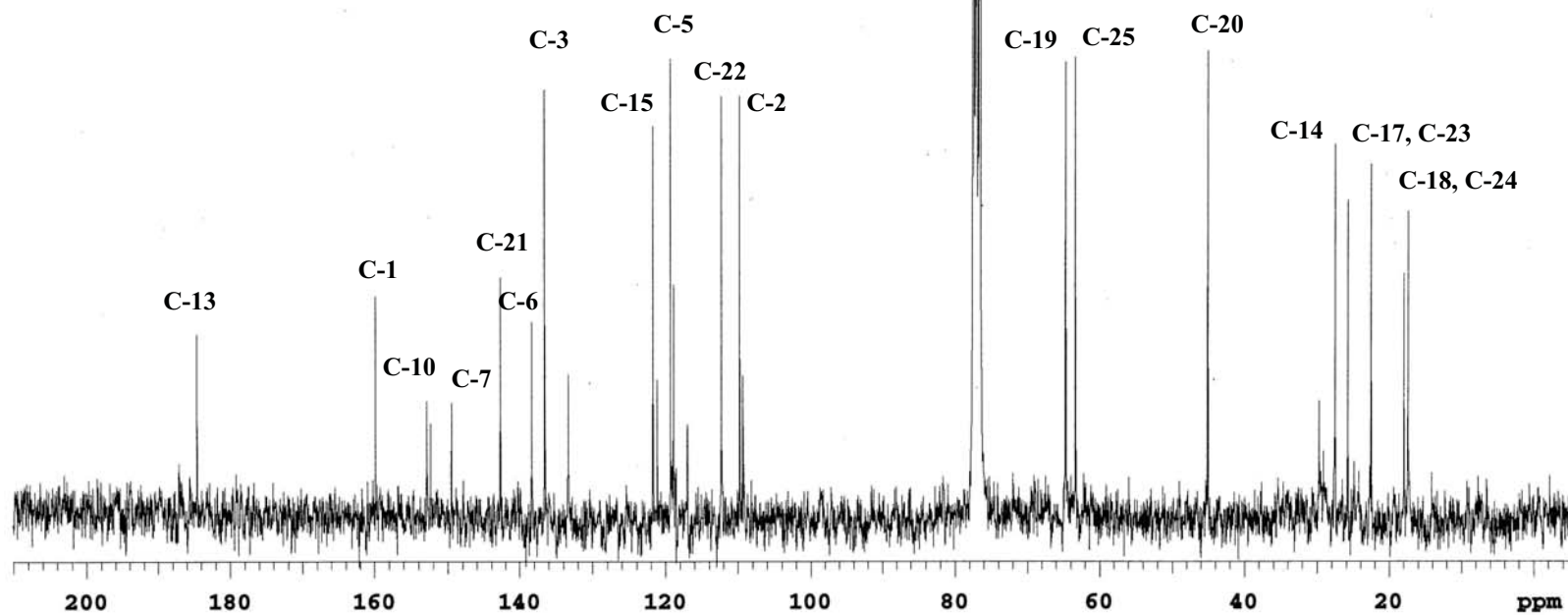
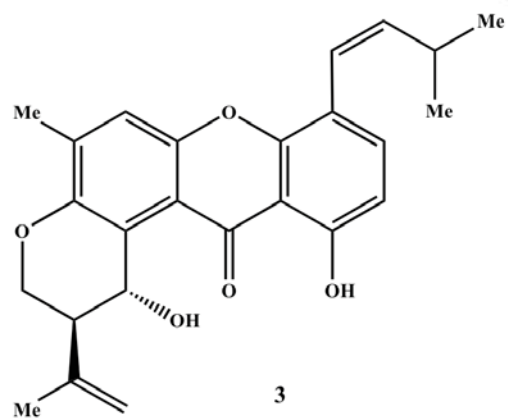
2



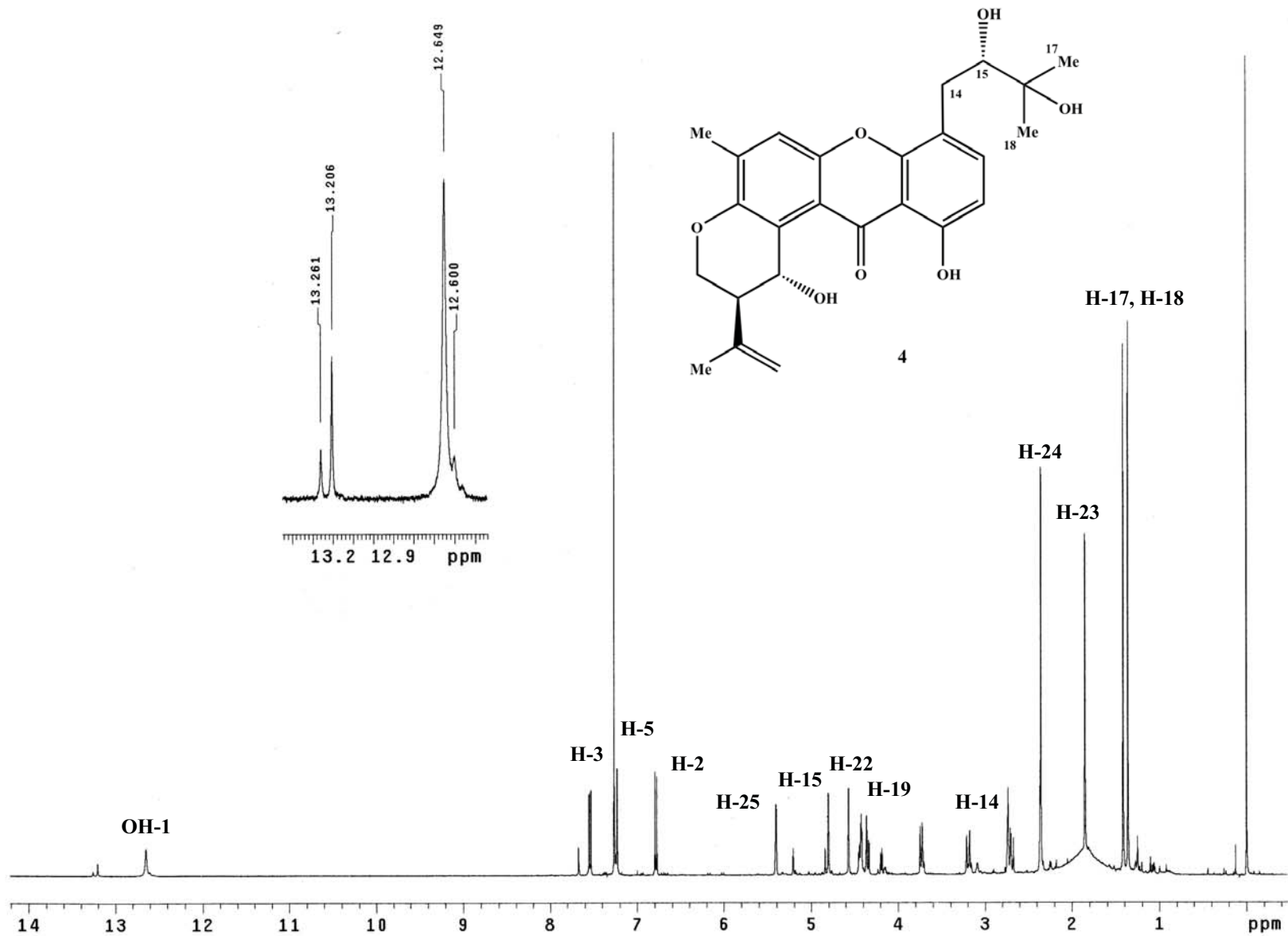
Espectro ^1H - ^{13}C modalidad HMBC de la 14-metoxi-tajixantona (2)



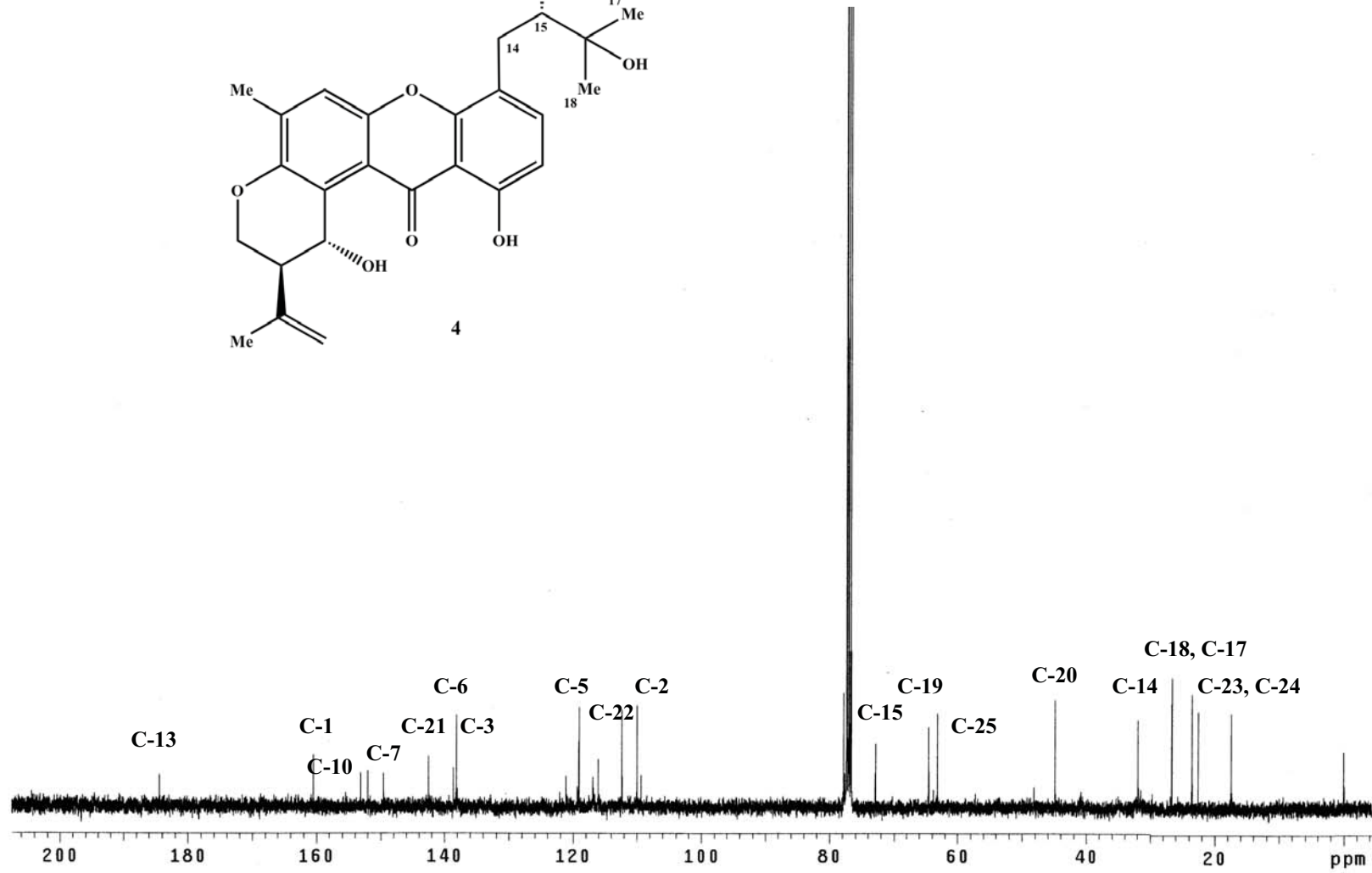
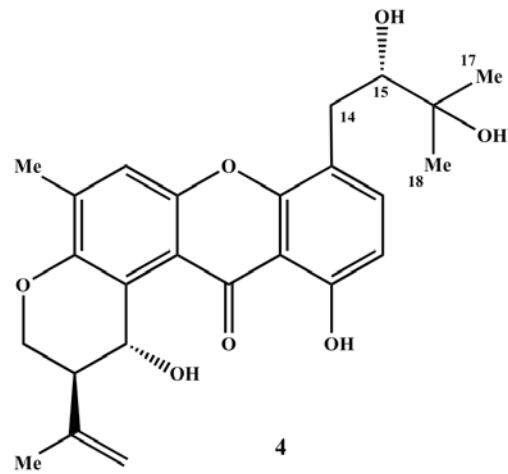
Espectro ¹H-RMN de la shamixantona (3)



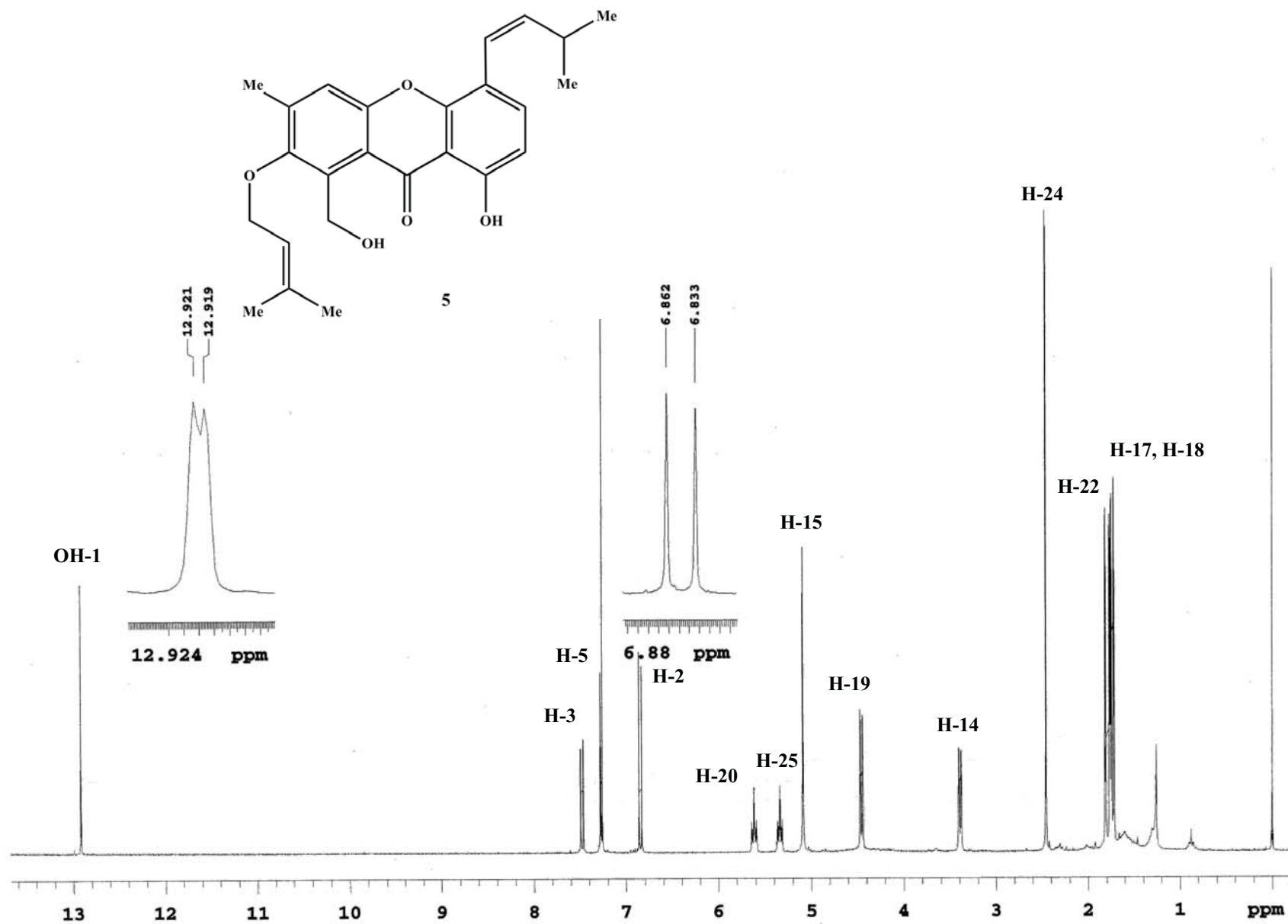
Espectro ^{13}C -RMN de la shamixantona (3)



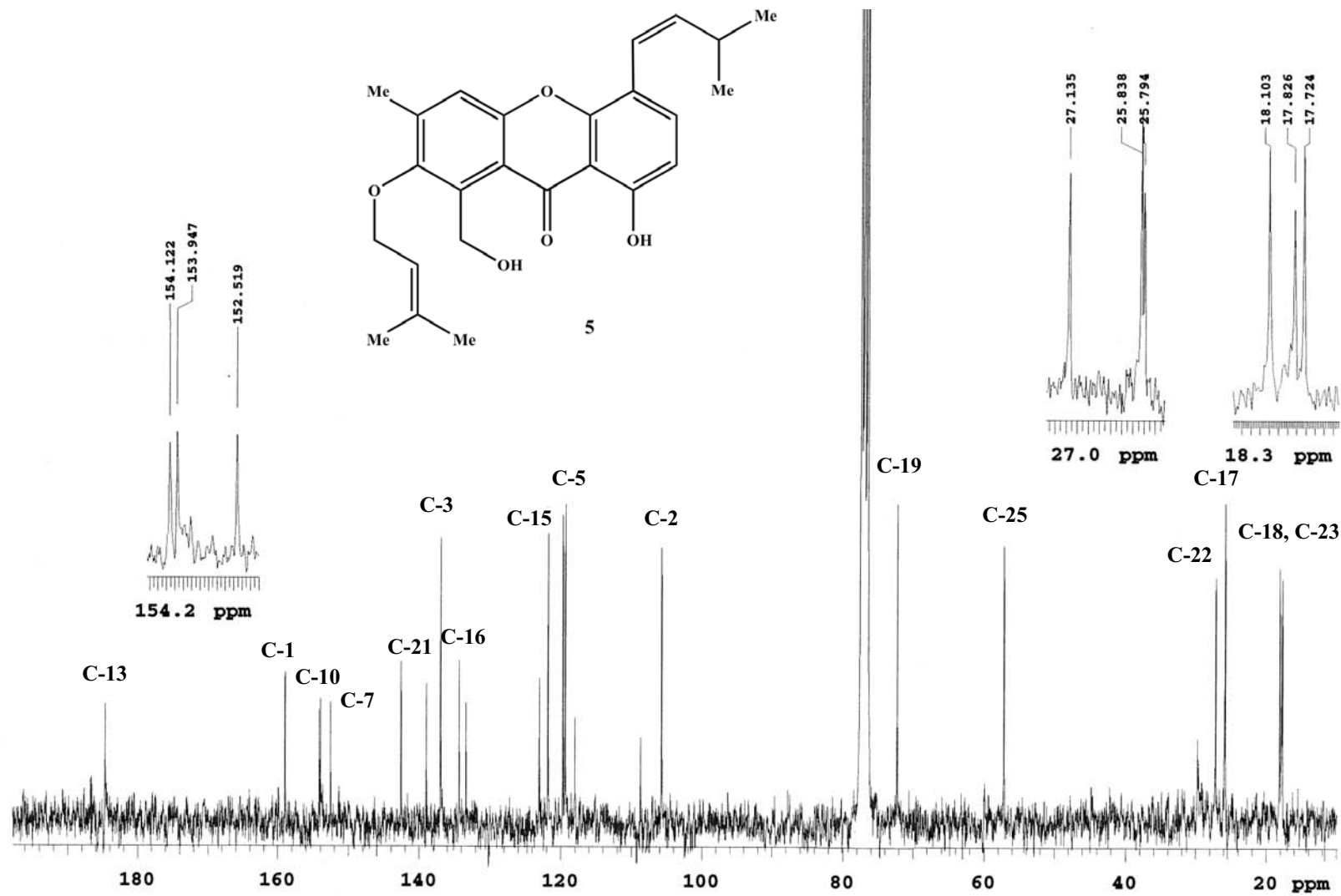
Espectro ¹H-RMN del hidrato de tajixantona (4)



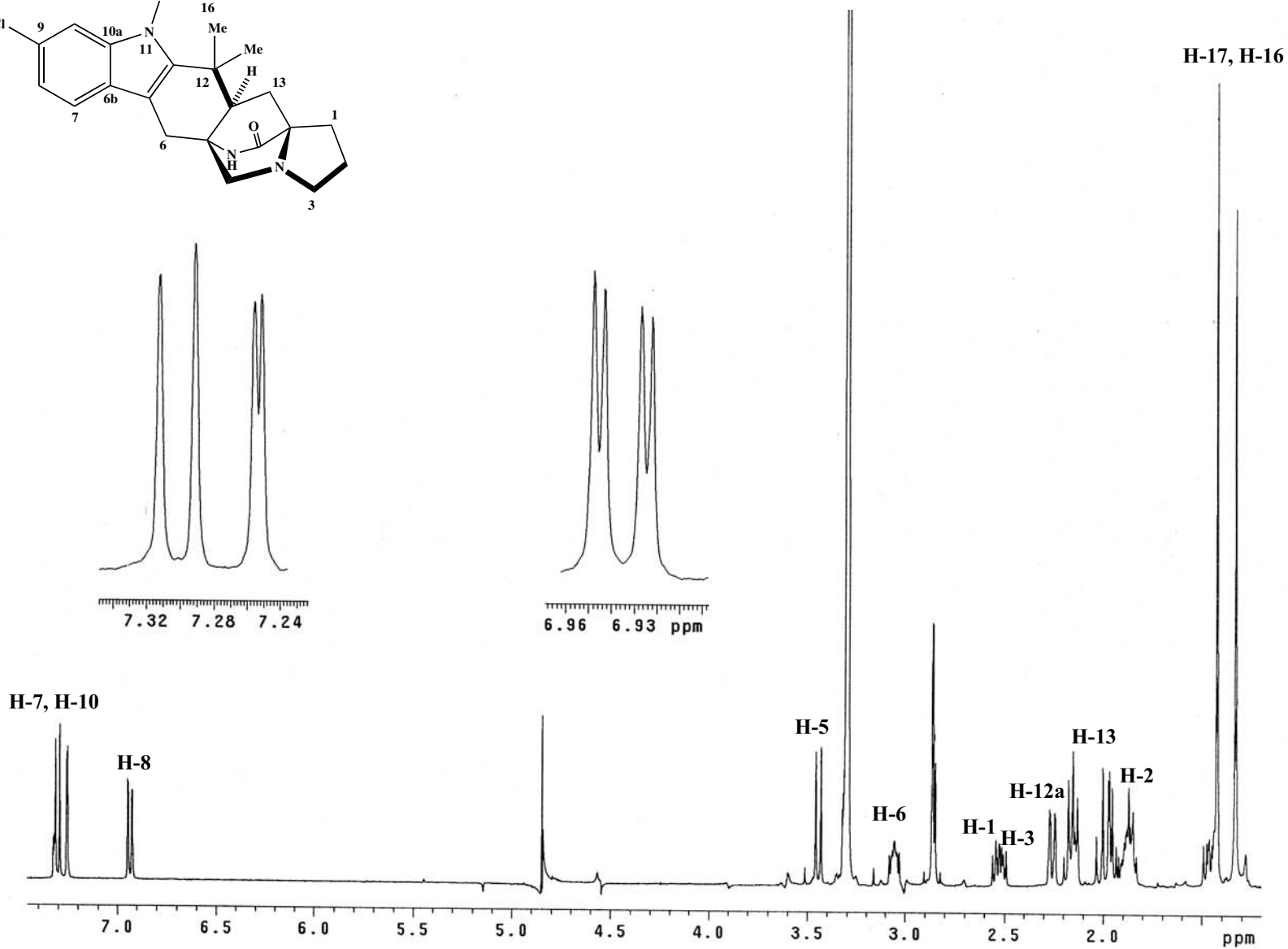
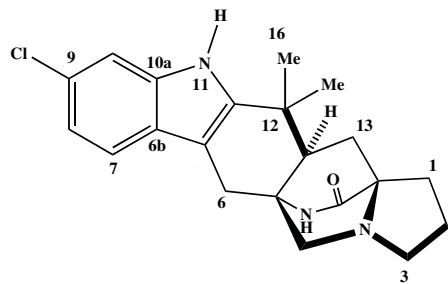
Espectro ^{13}C -RMN del hidrato de tajixantona (4)



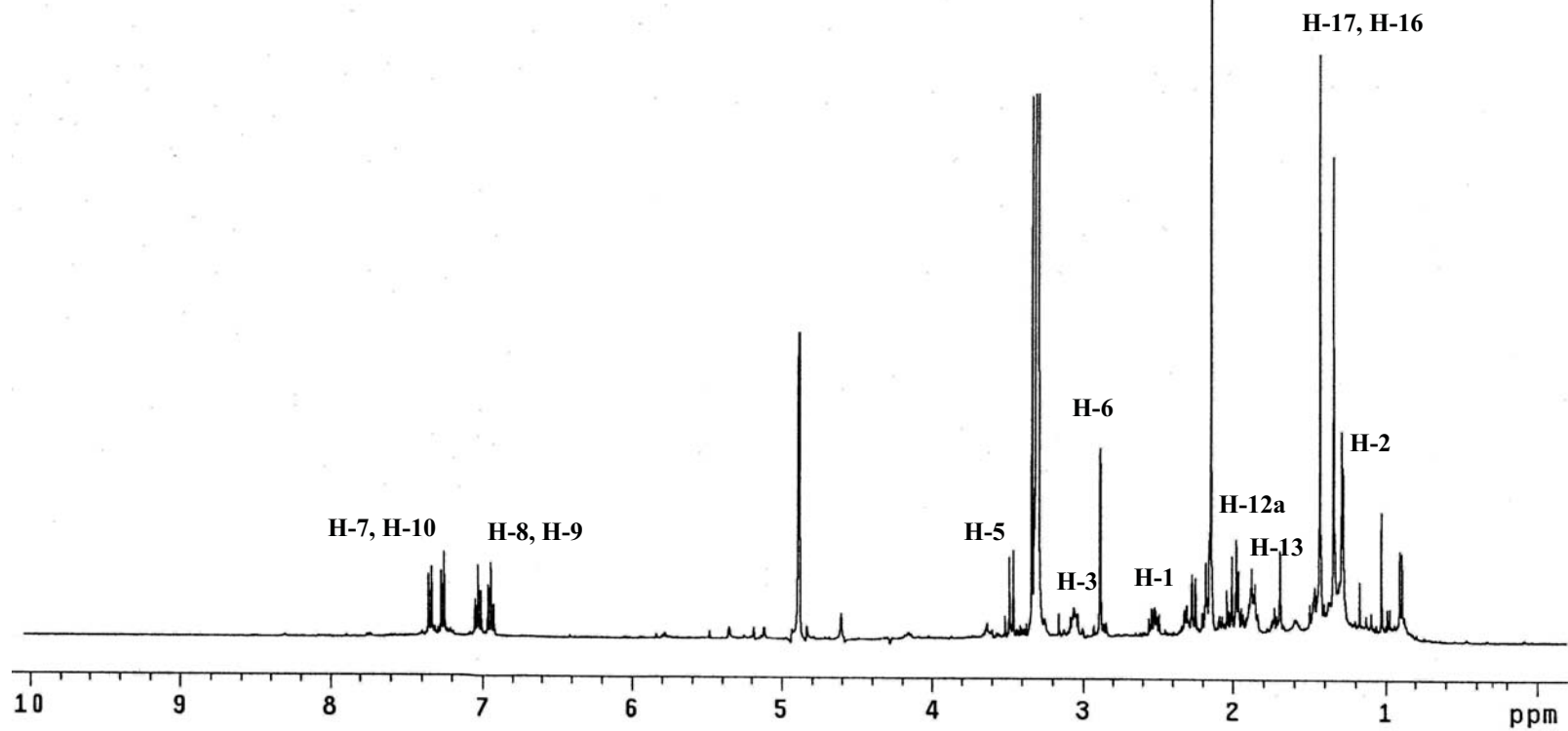
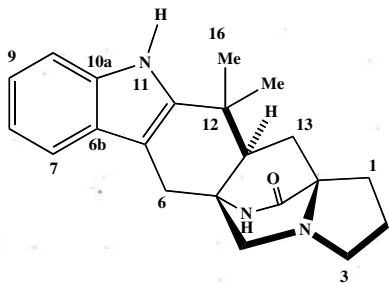
Espectro ¹H-RMN de la emericelina (5)



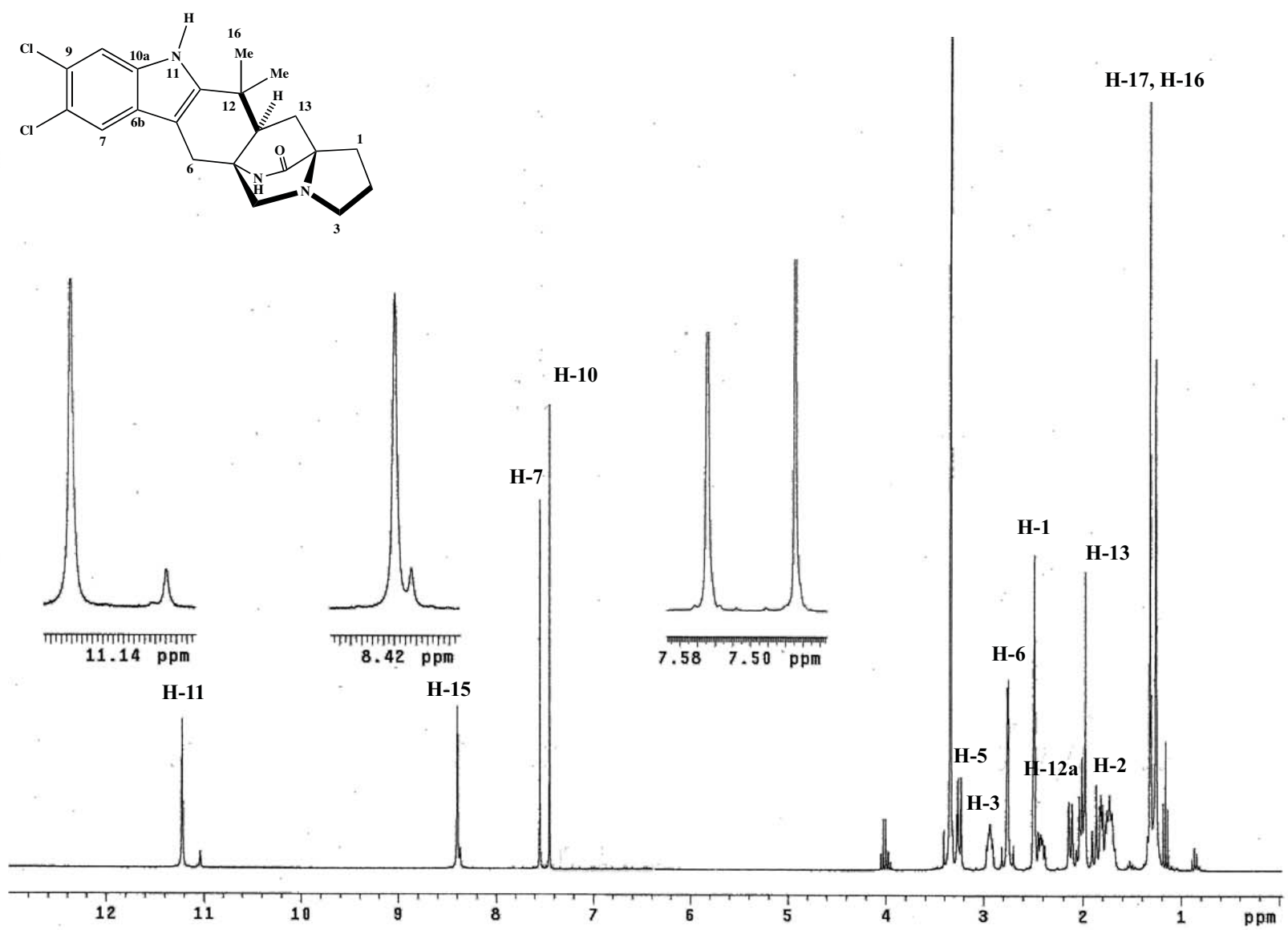
Espectro ¹³C-RMN de la emericelina (5)



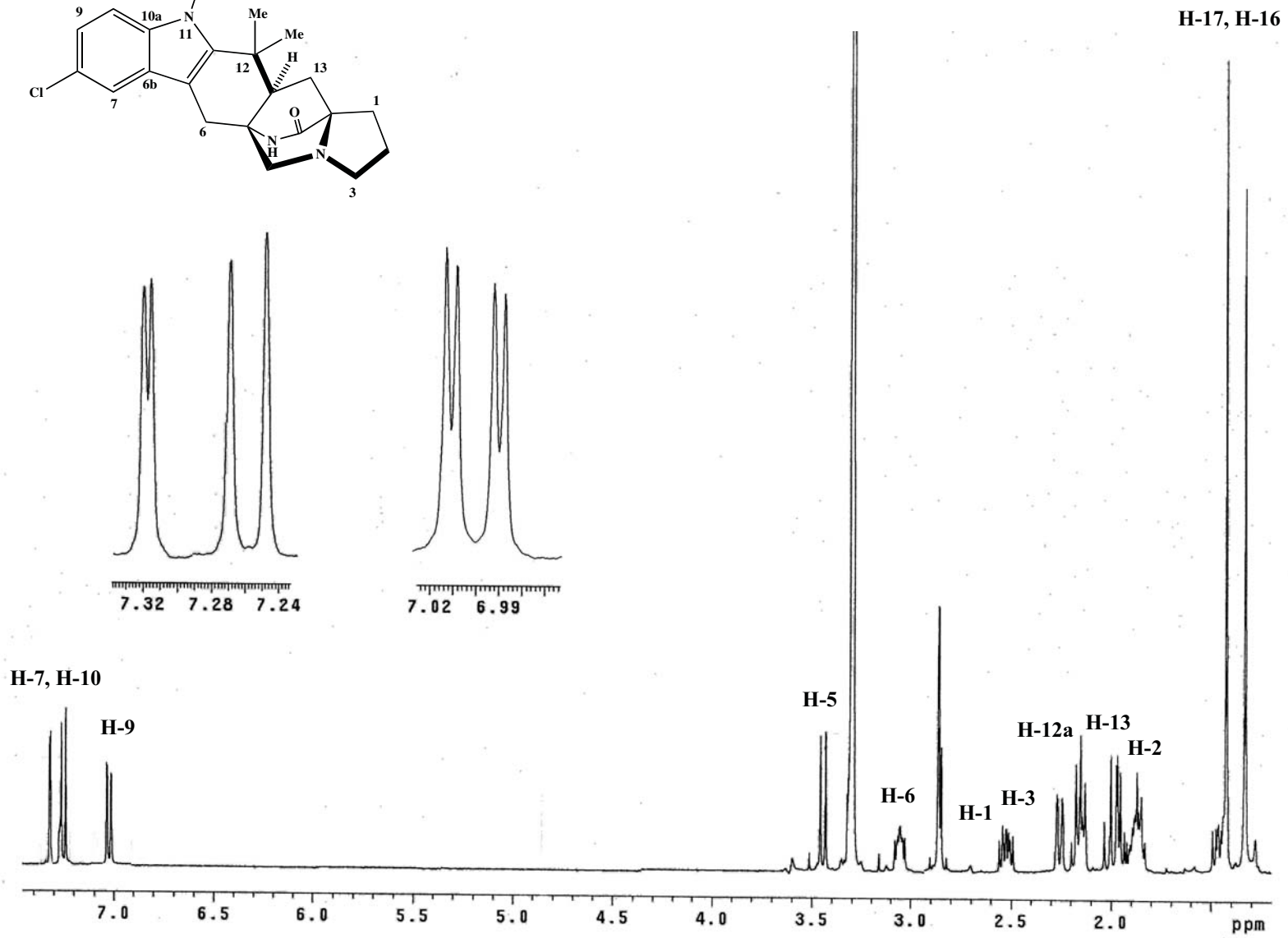
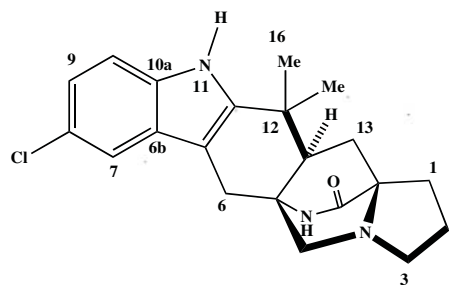
Espectro de ^1H -RMN de la malbranqueamida B (6)



Espectro de ¹H-RMN de la premalbranqueamida (7)



Espectro de ¹H-RMN de la malbranqueamida (8)



Espectro de ^1H -RMN de la isomalbranqueamida B (9)

Publicaciones

- **Mario Figueroa**, María del Carmen González, Rachel Mata. Malbrancheamide B, a novel compound from the fungus *Malbranchea aurantiaca*. *Natural Product Research*, **2008**, *22*, 709-714.

- **Mario Figueroa**, María del Carmen González, Rogelio Rodríguez-Sotres, Alejandro Sosa-Peinado, Martín González-Andrade, Carlos M. Cerda-García-Rojas, Rachel Mata. Calmodulin inhibitors from the fungus *Emericella sp.* *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2009**, *17*, 2167-2174.

- Kenneth A. Miller, **Mario Figueroa**, Meriah W.N. Valente, Thomas J. Greshock, Rachel Mata, Robert M. Williams. Calmodulin inhibitory activity of the malbrancheamides and various analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, 6479-6481.

Martín González-Andrade, **Mario Figueroa**, Rogelio Rodríguez-Sotres, Rachel Mata, Alejandro Sosa-Peinado. An alternative assay to discover potential calmodulin inhibitors using a human fluorophore-labeled CaM protein. *Analytical Biochemistry*, **2009**, *387*, 64-70.

This article was downloaded by:[Figuroa, Mario]
On: 27 May 2008
Access Details: [subscription number 793479809]
Publisher: Taylor & Francis
Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954
Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Natural Product Research Formerly Natural Product Letters

Publication details, including instructions for authors and subscription information:
<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713398545>

Malbrancheamide B, a novel compound from the fungus **Malbranchea aurantiaca**

Mario Figuroa^a, María Del Carmen González^b, Rachel Mata^a

^a Facultad de Química, Departamento de Farmacia,

^b Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City
04510, Mexico

Online Publication Date: 01 May 2008

To cite this Article: Figuroa, Mario, González, María Del Carmen and Mata, Rachel (2008) 'Malbrancheamide B, a novel compound from the fungus

Malbranchea aurantiaca', Natural Product Research, 22:8, 709 — 714

To link to this article: DOI: 10.1080/14786410802012361

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/14786410802012361>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article maybe used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

Malbrancheamide B, a novel compound from the fungus *Malbranchea aurantiaca*¹

MARIO FIGUEROA†, MARÍA DEL CARMEN GONZÁLEZ‡ and
RACHEL MATA*†

†Facultad de Química, Departamento de Farmacia,

‡Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México,
Mexico City 04510, Mexico

(Received 23 November 2007; in final form 23 February 2008)

A new indole alkaloid, namely malbrancheamide B (**2**), was isolated from the culture medium and mycelia of the ascomycete *Malbranchea aurantiaca* along with malbrancheamide (**1**). Structural elucidation of **2** was carried out by a combination of mass spectrometry (MS) and ¹H and ¹³C NMR spectroscopy analyses, as well as by comparison of the NMR data with those of **1**. According to the conformational studies using molecular mechanics analyses, compound **2** exists in one preferred conformation, which was optimised by density functional theory (DFT) calculations. Compound **2** is the second chlorinated indole alkaloid possessing a bicyclo [2.2.2] ring with an unusual relative configuration at C12a in the bicyclo [2.2.2] diazaoctane ring system. So far, these structural features seem to be unique for the alkaloids biosynthesised by the fungus *M. aurantiaca*.

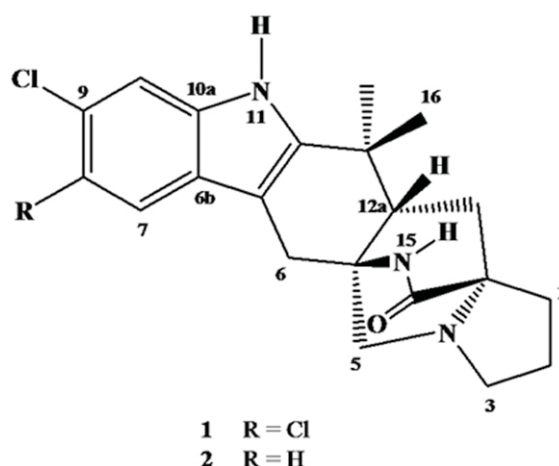
Keywords: *Malbranchea aurantiaca*; Malbrancheamide; Malbrancheamide B

1. Introduction

Recently we reported the isolation and structural elucidation of malbrancheamide (**1**) (figure 1), an indole alkaloid possessing an unusual bicyclo [2.2.2] diazaoctane ring system [1]. This compound is related to the brevianamides, aspergamides, macfortines, paraherquamides, sclerotamides, and stephacidins [2,3,4]. These natural products have been isolated periodically from different strains of fungi of the genera *Aspergillus* and *Penicillium* since their discovery in 1969 [3–7]. However, compound **1** was isolated from the culture of the ascomycete *Malbranchea aurantiaca* Singler and Carmich (Myxotrichaceae) [1]. Compound **1** is the first chlorinated indole alkaloid possessing the bicyclo [2.2.2] diazaoctane ring system. On the other hand, the relative configuration at C12a in the bicyclo [2.2.2] diazaoctane ring system is different to that of previous reported analogs. Altogether, these features make malbrancheamide (**1**) unique among these of complex indole alkaloid derivatives. Compound **1** caused

*Corresponding author. Email: rachel@servidor.unam.mx

¹Taken in part from the PhD thesis of M. Figueroa.

Figure 1. Structures of alkaloids **1** and **2**.

moderate inhibition of radicle growth of seedlings of *Amaranthus hypochondriacus* and inhibited the activation of the calmodulin (CaM)-dependent enzyme PDE1 [1]. The latter effect was comparable to that of chlorpromazine, a well-characterised CaM antagonist. The inhibition mechanism of **1** was competitive with respect to CaM according to a kinetic analysis. 1-Hydroxy-2-oxoeremophil-1(10), 7(11), 8(9)-trien-12(18)-olide and penicillic acid were also isolated from this species [8]. The present work was undertaken to isolate additional phytotoxic agents from *M. aurantiaca* resulting in the isolation of malbrancheamide B (**2**) (figure 1), a new chlorinated compound related to **1**.

2. Results and discussion

Compound **2** (figure 1) gave a positive colour with Dragendorff's and Ehrlich's reagents and exhibited UV absorptions at 231 and 292 nm. Structure elucidation of **2** was carried out by a combination of mass spectrometry (MS) and ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy analyses, as well as by comparison of the NMR data with those of **1**. Thus, HREIMS gave a molecular ion $[\text{M}]^+$ at m/z 369.1589 (Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{ON}_3\text{Cl}$ 369.1608), 35 uma less than compound **1**. The ^1H NMR spectrum of **2** (table 1) was almost identical to that of **1** except that the aromatic signals were observed as an ABX system [δ_{H} 7.31 (d, $J=8.7$ Hz), 6.94 (dd, $J=1.8, 8.4$ Hz) and 7.26 (d, $J=1.7$ Hz)] rather than the two singlets at δ_{H} 7.47 and 7.39 observed in the spectrum of **1** [1]. The ^{13}C NMR spectrum (table 1) combined with the HSQC experiment revealed 21 carbon resonances and supported the presence of a lactam functionality and a mono-halogenated indole moiety. Altogether, this information suggested that **2** was a mono-chlorinated indole alkaloid similar to malbrancheamide (**1**). Detailed 2D-NMR spectral analyses (COSY, HETCOR, HMBC, and NOESY) led to the establishment of the connectivity of functional groups and, in turn, of the molecular structure. The position of the functional groups along the hexacyclic core was corroborated by an HMBC experiment (table 1). Thus, the correlations C-10a/H-7, C-6b/H-10, C-6a/H-6, H-7, C-5a/H-12a,

Table 1. ^{13}C and ^1H NMR data of malbrancheamide B (**2**).

No.	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (J Hz)	HMBC
1	28.5	A 2.42 m B 1.34 m	H ₂ , H ₃ , H ₁₃
2	22.4	1.72 m	H ₁ , H ₃
3	55.2	A 2.93 ddd (9.6; 6.0, 2.1) B 2.41 ddd (9.6; 6.0, 2.1)	H ₁ , H ₂ , H ₅
5	59.5	A 2.13 d (9.9) B 3.25 d (9.9)	H ₃ , H ₆ , H _{12a}
5a	58.5	–	H ₅ , H ₆ , H _{12a} , H ₁₃ , H ₁₆
6	29.9	A 2.79 d (15.9) B 2.72 d (15.9)	H ₅ , H _{12a}
6a	103.7	–	H ₆ , H ₇
6b	122.7	–	H ₇ , H ₈ , H ₁₀
7	120.7	7.31 d (8.7)	H ₈ , H ₁₀
8	125.6	6.94 dd (1.8, 8.4)	H ₇ , H ₁₀
9	126.6	–	H ₇ , H ₈ , H ₁₀
10	112.1	7.26 d (1.7)	H ₇ , H ₈
10a	135.4	–	H ₇ , H ₁₀
11	–	11.04 s	–
11a	144.4	–	H ₆ , H ₁₆ , H ₁₇
12	34.1	–	H _{12a} , H ₁₃ , H ₁₆ , H ₁₇
12a	46.9	2.07 m	H ₅ , H ₆ , H ₁₃ , H ₁₆ , H ₁₇
13	33.9	A 1.98 m B 1.91 m	H ₁ , H ₂
13a	64.1	–	H ₁ , H ₃ , H ₅ , H _{12a} , H ₁₃
14	173.1	–	H ₁ , H ₁₃
15	–	8.37 s	–
16	31.1	1.26 s	H _{12a} , H ₁₇
17	26.6	1.31 s	H _{12a} , H ₁₆

C-12a/H-6, H-16, H-17, and C-11a/H-6, H-16, H-17 supported the position of the chlorine atom and the fusion of the indole nucleus to the dimethyl cyclohexane ring throughout C-6a and C-11a. On the other hand, the cross peaks C-5a/H-6, H-12a, H-13, H-5; C-12a/H-5 and C-13a/H-13, H-1, H-3, H-5 indicated that the bicyclo [2.2.2] diazaoctane ring system has the same arrangement that of **1**. The location of the chlorine atom at C-9 was corroborated by a NOESY experiment which showed the correlations H-10/H-11 and H-7/H-6A, H-6B. The relative stereochemistry at the chiral centers was elucidated as depicted on the basis of some key correlations observed in the NOESY spectrum which are summarised in figure 2. Biogenetic considerations as well as the Cotton effects observed in the CD spectrum of **2**, almost indistinguishable to that of **1**, tend to support that both compounds possess the same absolute configuration at the stereogenic centers.

As part of the structural characterisation, a conformational analysis of the new compound **2** using molecular modelling techniques was carried out. The initial structure was built from standard fragments and minimised using molecular mechanics analysis as implemented in the HyperChem[®] 7 program. A preliminary searching protocol using the Monte Carlo method [9] was performed revealing a minimum energy conformer ($E = 51.86 \text{ kcal mol}^{-1}$); this conformer was fully optimized by density functional theory (DFT) at the B3LYP/G31G* level theory [10]. In the DFT optimised structure ($E = -5200.84 \text{ kcal mol}^{-1}$) ring *F* displays the same envelope conformation previously described for **1** with the atoms N4-C13a-C1-C2 located in the plane while C3 is out of

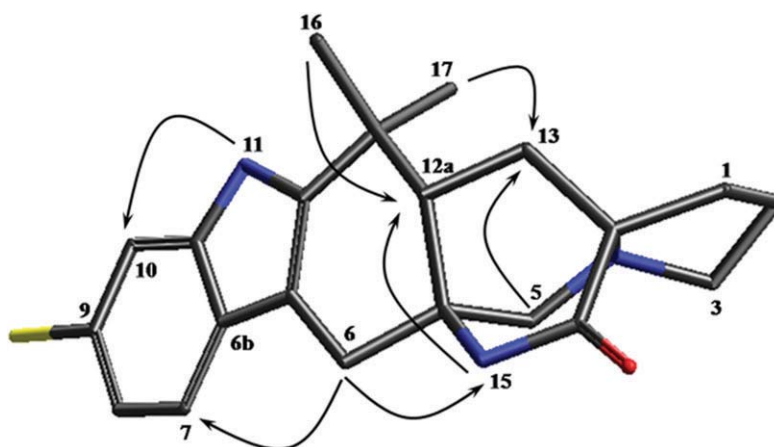


Figure 2. Optimized structure of compound **2** obtained by DFT analysis showing key NOESY correlations.

the ring plane (figure 2). Due to the scarcity of the sample, the phytotoxic potential of **2** could not be established in the present investigation.

In conclusion, malbrancheamide B (**2**) is the second chlorinated indole alkaloid possessing a bicyclo [2.2.2] ring with an unusual relative configuration at C12a in the bicyclo [2.2.2] diazaoctane ring system. So far, these structural features seem to be unique for the alkaloids biosynthesised by the fungus *M. aurantiaca*.

3. Experimental section

3.1. General experimental procedures

The UV spectrum was recorded on a Shimadzu 160 UV spectrometer in MeOH solution. The CD spectrum was registered on a JASCO 720 spectropolarimeter at 25°C in MeOH solution. NMR spectra including COSY, NOESY, HMBC, and HSQC experiments were recorded in DMSO- d_6 on a Varian spectrometer at 300 MHz (^1H) or 75 MHz (^{13}C) NMR, using tetramethylsilane (TMS) as internal standard. HREIMS was obtained on a JEOL JMS-AX505HA mass spectrometer. Column chromatography: silica gel 60 (70–230 mesh, Merck). TLC was performed on precoated silica gel 60 F254 plates (Merck).

3.2. Fungal material

The isolate of *M. aurantiaca* was obtained from bat guano collected at the Juxtlahuaca cave located in Ramal del Infierno, State of Guerrero, Mexico, in 1998. A voucher specimen (24428) is deposited in the National Herbarium (MEXU), Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City. Three 2-L Erlenmeyer flasks, each containing 2 L of PDB (Difco), were individually inoculated with one 1-cm² agar plug taken from a stock culture of *M. aurantiaca* maintained at 4°C on potato dextrose agar (PDA). Flask cultures were incubated at environmental temperature and aerated by agitation on an orbital shaker at 200 rpm for 15 days.

3.3. Extraction and isolation

After incubation, all flask contents were combined and filtered. The combined culture filtrate (6 L) was extracted exhaustively with EtOAc (3×6 L). The combined organic phase was filtered over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated in vacuo to give a dark brown solid (1.5 g). The mycelium was macerated with EtOAc (3×2 L). After evaporating the solvent *in vacuo*, the combined mycelial and culture extract (2.0 g) was subjected to silica gel (200 g) open column chromatography eluting with a gradient of CH_2Cl_2 -EtOAc (10:0/0:10) and EtOAc:MeOH (10:0/0:10) to yield nine major primary fractions (FI-FIX). Bioactivity in the bioautographic bioassay showed one active pool: FIV (100 mg), eluted with EtOAc-MeOH (9:1). Fraction IV (100 mg) was submitted to prepare TLC on Silica gel eluted with EtOAc-MeOH (9:1); after usual work up **1** (15 mg) and **2** (3 mg) were obtained.

3.4. Molecular modeling calculations

Minimum energy structures were generated using the MMF94 (Monte Carlo Protocol) as implemented in the HyperChem 7 Program (Hypercube Inc., Gainesville, Florida). The conformational search was carried out by exploring torsional internal degrees of freedom of dihedral angles selected by the automatic set up procedure. The torsional angles considered were: C12a-C13-C13a, C13a-C1-C2, C1-C2-C-3, C2-C3-N4, N4-C5-C5a. The rotation angle was 30° . The minimum energy conformer was fully optimised by DFT at the B3LYP/G31G* level.

Malbrancheamide B (2). Glassy solid. $[\alpha]_{\text{D}} + 50^\circ$ (c1, MeOH). IR (KBr) ν_{max} : 3300, 1740, 1670, 1461, 1315, 1250 cm^{-1} . UV λ_{max} (MeOH) ($\log \epsilon$): 231 (3.95), 292 (4.80) nm; CD (MeOH) λ_{max} ($\Delta \epsilon$): 244 (2×10^6), 217 (1.3×10^6), 226 (1.2×10^6), 296 (1.5×10^5) nm; ^1H and ^{13}C NMR data, see table 1. EIMS m/z (rel. int.) 369 (7.5), 371 (2.00), 365 (6.5), 325 (100), 311 (27.1), 228 (39.1), 206 (17.3), 163 (31.8), 164 (97.3), 163 (25), 135 (17.3), 120 (10), 96 (8.2); HREIMS: m/z 369.1589, calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{ON}_3\text{Cl}$: 369.1608.

Acknowledgements

This work was supported by grants of Facultad de Química and CONACyT 45814-Q. We are also grateful to the following people: Rosa Isela del Villar, Marisela Gutierrez, and Georgina Duarte for recording NMR, UV, IR, and mass spectra; and Isabel Rivero-Cruz and Laura Acevedo for technical assistance.

References

- [1] S. Martínez-Luis, R. Rodríguez, L. Acevedo, M.C. González, A. Lira-Rocha, R. Mata. *Tetrahedron*, **62**, 1817 (2006).
- [2] W. Fenical, P.R. Jensen, X.C. Cheng. *Chem. Abstr.*, **132**, 346709 (2000).
- [3] E.M. Stocking, R.W. Willians. *Angew. Chem. Intl. Edn.*, **42**, 3078 (2003).

- [4] R.M. Williams, R.J. Cox. *Acc. Chem. Res.*, **36**, 127 (2003).
- [5] A.J. Birch, J.J. Wright. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **644b** (1969).
- [6] A.J. Birch, J.J. Wright. *Tetrahedron*, **26**, 2329 (1970).
- [7] A.J. Birch, R.A. Russell. *Tetrahedron*, **28**, 2999 (1972).
- [8] S. Martínez-Luis, M.C. González, M. Ulloa, R. Mata. *Phytochemistry*, **66**, 1012 (2005).
- [9] G. Chang, W.C. Guida, W.C. Still. *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 4379 (1989).
- [10] G-Y. Lee, M-S. Jun. *Bull. Korean Chem. Soc.*, **22**, 11 (2001).



Calmodulin inhibitors from the fungus *Emericella* sp. [☆]

Mario Figueroa ^a, María del Carmen González ^b, Rogelio Rodríguez-Sotres ^a, Alejandro Sosa-Peinado ^c, Martín González-Andrade ^c, Carlos M. Cerda-García-Rojas ^d, Rachel Mata ^{a,*}

^a Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, Mexico

^b Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, Mexico

^c Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, Mexico

^d Departamento de Química, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México DF 07000, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 March 2008

Revised 2 September 2008

Accepted 31 October 2008

Available online 5 November 2008

Keywords:

Emericella

15-Chlorotajixanthone hydrate

14-Methoxytajixanthone

Shamixanthone

Tajixanthone hydrate

Calmodulin

Docking

ABSTRACT

Two new xanthenes identified as 15-chlorotajixanthone hydrate (**1**) and 14-methoxytajixanthone (**2**) were isolated from an *Emericella* sp. strain 25379 along with shamixanthone (**3**) and tajixanthone hydrate (**4**). The stereostructures of **1** and **2** were elucidated by spectroscopic and molecular modeling methods. The absolute configuration at the stereogenic centers of **1** was established according to CD measurements. In the case of **2**, however, the absolute configuration at C-20 and C-25 was designated as *S* and *R*, respectively, by Mosher ester methodology. Thereafter, the configuration at C-14 and C-15 of **2** was established as *S* and *S*, respectively by comparing the optical rotation and ¹H–¹H coupling constant experimental values with those obtained through molecular modeling calculations at DFT B3LYP/DGDZVP level of theory for diastereoisomers **2a–2d**. The activation of the calmodulin-sensitive cAMP phosphodiesterase (PDE1) was inhibited in the presence of **1–4** in a concentration-dependent manner. The effect of compounds **2** (IC₅₀ = 5.54 μM) and **4** (IC₅₀ = 5.62 μM) was comparable with that of chlorpromazine (CPZ; IC₅₀ = 7.26 μM), a well known CaM inhibitor used as a positive control. The inhibition mechanism of both compounds was competitive with respect to CaM according to a kinetic study. A docking analysis with **2** and **4** using the AutoDock 4.0 program revealed that they interacted with CaM in the same pocket as trifluoropiperazine (TFP).

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The genus *Emericella*, one of the anamorphus of *Aspergillus*,² biosynthesizes a remarkable diversity of secondary metabolites with interesting biological properties thus representing potential leads for the developing of new pharmaceutical agents. For example, *E. nidulans* produces antitumor indole alkaloids, prenylated polyketides, benzophenones and xanthenes.³ *E. varicolor* makes simple cytotoxic quinones,⁴ indole alkaloids with radical scavenging activity,⁵ neurotoxic and antimicrobial polyketides,⁶ sesterterpenes,⁷ as well as cytotoxic and antimicrobial xanthenes.^{8,9} *E. quadrilineata* has yielded some immunostimulant xanthenes¹⁰ and tremorgenic alkaloids, while *E. aurantiobrunnea* some varicocolin analogues which compete with macrophage inflammatory protein (MIP)-1α for binding to human CCR5 in a scintillation proximity assay.¹¹ *E. falconensis* and *E. fruticulosa* produce polyketides that inhibit growth of HL60 human leukemia cells and possess antioxidant properties.^{12–15} *E. unguis* generates depsides, depsidones and phtha-

lides.¹⁶ *E. heterothallica*^{17,18} and *E. striata*¹⁹ produce pitetrathiodioxopiperazines which inhibit histamine release and consequently show a remarkable potential as antiallergic agents. *E. violacea* produces biphenyl ether type metabolites²⁰ and *E. purpurea* indole alkaloids,²¹ with *E. rugulosa*, *E. nidulans*, *E. astellata* and *E. venezuelensis* the only species that biosynthesize aflatoxins.²²

Within the scope of a program aiming at the discovery of novel calmodulin (CaM)-inhibitors useful as pesticide or drug leads,^{23–25} herein we report the structure elucidation and CaM-inhibitor properties of two new tajixanthenes analogs from a *Emericella* strain isolated from a coral species collected on the Mexican Pacific coast. In addition, to assess their putative binding mode with CaM, a docking analysis was performed. Calmodulin was selected as a molecular target considering its involvement in a variety of cell functions through the regulation of several CaM-dependent enzymes. Modulation of physiological targets of CaM by natural or synthetic compounds offers great possibilities for the discovery of new leads for the development of herbicide or therapeutically useful agents. Indeed certain anti-psychotic, smooth muscle relaxants, α-adrenergic blocking, immunostimulant and cytoprotective drugs, among others, inhibit CaM.²⁵

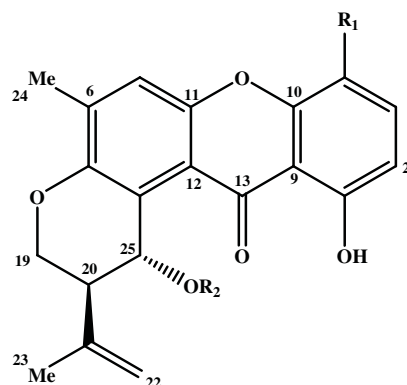
[☆] see Ref. 1.

* Corresponding author. Tel.: +52 5 55 622 5289; fax: +52 5 55 622 5329.

E-mail address: rachel@servidor.unam.mx (R. Mata).

2. Results and discussion

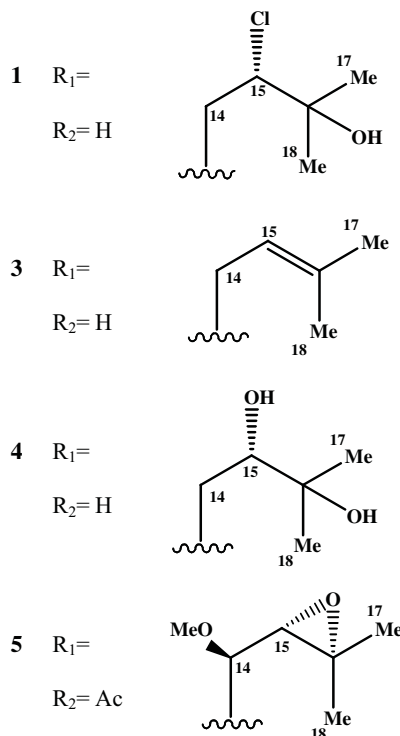
Two new xanthenes, namely, 15-chlorotajixanthone hydrate (**1**) and 14-methoxytajixanthone (**2**) were isolated from an *Emericella* sp. strain 25379 along with the known compounds shamixanthone (**3**) and tajixanthone hydrate (**4**).⁹ The four natural products were obtained as yellow powders and exhibited UV absorptions at 317, 292, 261 and 249 nm suggesting a hydroxyxanthone chromophore.⁹



Compound **1** had the molecular formula C₂₅H₂₇O₆Cl which was deduced from the molecular ion in the HREIMS (458.1504, calcd 458.1496). The isotopic pattern in the mass spectrum, with a typical *M/M* + 2 ratio of approximately 100:35, revealed the presence of one chlorine atom in the molecule. The ¹H and ¹³C NMR (Table 1) confirmed the tajixanthone type skeleton⁹ and were almost identical to those of compound **4**, differing only in the chemical shifts of the signals of the isoprenyl side chain at C-4. Thus, the spectra of **1** exhibited signals for H-14a, H-14b/C-14 and H-15/C-15 at $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 3.05, 3.13/28.6 and 3.03/63.4, respectively, rather than $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 2.63, 3.02/32.0 and 3.70/77.7 suggesting that the hydroxyl group at C-15 in **4** was replaced by a chlorine atom in **1**. The substitution pattern along the xanthone and dihydropyran residues was corroborated by detailed analysis of the HMBC and NOESY spectra (Table 1). Biogenetic considerations, consistent NOESY correlations, and the close correspondence between the Cotton effects of **1** [$\Delta\epsilon$ (nm) -2.27×10^4 (249), -2.08×10^4 (261), 1.48×10^4 (285), -1.30×10^4 (336)] and those of **4** [$\Delta\epsilon$ (nm) -1.24×10^5 (245), -8.62×10^4 (260), 3.21×10^4 (292), -4.36×10^4 (336 nm)] strongly supported that the absolute configuration at the stereogenic centers at C-15, C-20 and C-25 was identical in both compounds.

The HRFABMS analysis of **2** gave the molecular formula C₂₆H₂₈O₇. The NMR data of **2** (Table 2) indicated that it differed from 14-methoxytajixanthone-25-acetate (**5**) in the presence of a hydroxyl group at C-25 instead of an acetoxy group.⁹ Thus compared to **5**, the methine signal for H-25 (δ_{H} 6.90, s) was diamagnetically shifted to δ_{H} 5.43 (d, *J* = 2.1 Hz) in the ¹H NMR spectrum of **2**.

The position of the substituents in the molecule was also substantiated by careful examination of the HMBC and NOESY spectra (Table 2). The CD spectrum of **2**, however, revealed some significant differences with respect to those of **1** and **4**, which were attributed to the presence of the new chiral center at C-14. In order to establish the absolute configuration at the stereogenic centers in **2**, a combination of molecular modeling calculations and advanced Mosher's methodology was employed.²⁶ Thus, analysis of the ¹H NMR data (Table 2) of the (*S*)- and (*R*)-MTPA esters derivatives **2s**



and **2r** prepared from **2**, showed that $\Delta\delta_{\text{H}}$ (*S*-*R*) for H-19a, H-19b and H-20 were +0.0037, +0.0025, and +0.0040, respectively. Therefore, the absolute configuration at C-20 and C-25 were established as *S* and *R*, respectively; this finding was in agreement with the stereochemistry at these centers for compounds **1**, **3**, **4** and other related xanthenes.⁹ The configuration at C-14 and C-15 of **2** was next established by comparing the optical rotation and ¹H-¹H coupling constant experimental values with those obtained through molecular modeling calculations²⁷⁻²⁹ at DFT B3LYP/DGDZVP level of theory for diastereoisomers **2a**-**2d**. Figure 1 displays the remarkable differences between the experimental optical rotation of **2** ($[\alpha]_{\text{D}} = -38$) and the calculated²⁹ values for **2a**, **2c** and **2d**, revealing that the (1*S*,15*S*,20*S*,25*R*)-stereoisomer (**2b**) represents the correct stereochemistry for 14-methoxytajixanthone (**2**). The six more relevant conformers of this substance, including the global minimum **2b-1**, are depicted in Figure 2. The free energies, equilibrium populations, coupling constants and $[\alpha]_{\text{D}}$ values for the 28 more populated conformations of **2b** are indicated in Table 3. Moreover, the agreement between the calculated and observed coupling constants *J*_{19a,20}, *J*_{19b,20} and *J*_{20,25} confirmed the *trans*-relationship between the substituents at C-20 and C-25 in the dihydropyran ring.

The effect of **1-4** on CaM was initially assessed with the CaM-sensitive cAMP phosphodiesterase (PDE1) assay which is commonly employed to detect CaM antagonists;^{23,25,30} a human recombinant-CaM was employed as the activator. The results showed that the activation of PDE1 was inhibited in the presence of **2** and **4** in a concentration-dependent manner. The effect of

Table 1
NMR data of 15-chlorotajixanthone hydrate (**1**)

Position	Compound 1			
	δ_C	δ_H , mult (J in Hz)	HMBC	NOESY
1	160.5		H-2, H-3	
2	137.1	7.53 d (8.0)	H-14a, H-14b	H-14a, H-14b
3	119.3	6.80 d (8.0)	H-2	
4	115.23		H-3, H-14a, H-14b, H-15	
5	109.3	7.33 d (1.0)		H-24
6	138.6		H-24	
7	149.6		H-5, H-19a, H-19b, H-25, H-24	
8	119.3		H-24	
9	109.3		H-2	
10	152.1		H-15, H-14a, H-14b	
11	152.0		H-5	
12	121.1		H-25, H-20	
13	184.4			
14	28.6	a 3.05 brd (16.6) b 3.13 dd (8.0, 16.3)	H-2	H-2, H-17, H-18
15	63.4	3.03 dd (2.0, 10.5)	H-14a, H-14b, H-18, H-17	H-2, H-18
16	116.9		H-14a, H-14b, H-15	
17	24.8	1.34 s	H-18	H-14
18	19.0	1.46 s	H-17	H-15, H-14
19	64.6	a 4.44 ddd (1.0, 3.5, 11.0) b 4.37 dd (3.0, 11.0)	H-25	H-19b, H-20 H-19a, H-20, H-23
20	44.9	2.74 ddd (3.0, 3.0, 3.5)	H-23, H-25, OH-25, H-19a, H-19b, H-22a, H-22b	H-2
21	142.6		H-19a, H-19b, H-25	
22	112.3	a 4.82 ddd (0.5, 1.5, 2.5) b 4.60 dd (1.5, 2.5)	H-23	H-22b, H-25 H-22a, H-23
23	22.5	1.87 t (0.5)	H-22a, H-22b	H-20
24	17.4	2.37 d (1.0)	H-5	
25	63.2	5.43 ddd (1.0, 3.0, 3.5)	OH-25, H-19a, H-19b	H-20, H-23, OH-25, H-22b
OH-1		12.66 d (0.5)		
OH-16		2.47 s		
OH-25		5.03 d (4.0)		

Table 2
NMR data of 14-methoxy-tajixanthone (**2**), (S)-MTPA ester of **2** (**2s**), (R)-MTPA ester of **2** (**2r**), and $\Delta\delta$ value ($\delta_{2s} - \delta_{2r}$) in δ (ppm)

Position	Compound 2				2s δ_H	2r δ_H	$\Delta\delta$ value ($\delta_{2s} - \delta_{2r}$)
	δ_C	δ_H , mult (J in Hz)	HMBC	NOESY			
1	162.2		H-2, H-3, OH-1,				
2	135.6	7.72 d (8.5)	H-14a, H-14b, H-15	H-14a, H-14b, H-15			
3	119.0	6.88 d (8.5)	H-2				
4	109.0		H-3, H-14				
5	110.9	7.23 d (1.0)		H-24			
6	138.9		H-24				
7	149.8		H-19a, H-19b, H-24				
8	119.1						
9	116.8		H-3				
10	152.7		H-2				
11	151.9		H-5				
12	115.9						
13	184.4						
14	66.7	3.18 d (8.0)	H-15	H-2, H-17, H-18			
15	76.1	4.67 d (8.0)	H-2, H-14a, H-14b, H-17, H-18, CH ₃ O-14	H-2, H-18, CH ₃ O-14			
16	56.9		H-15, H-17, H-18,				
17	24.7	1.25 s	H-18		1.7952	1.7897	+0.0055
18	19.8	1.32 s	H-17	H-15, H-14	1.7523	1.7558	+0.0035
19	64.7	a 4.43 dd (3.6, 10.8) b 4.35 dd (3.0, 10.8)		H-25, H-23	4.4275	4.4238	+0.0037
20	45.0	2.74 ddd (2.1, 3.0, 3.6)	H-19b, H-23, H-22a, H-22b	H-25	4.3790	4.3765	+0.0025
21	142.5		H-19b, H-23		2.7350	2.6950	+0.004
22	112.3	a 4.81 d (2.5) b 4.60 d (1.0)	H-23	H-22b, H-25 H-22a, H-23	4.8060	4.8045	+0.0015
23	22.7	1.85 s	H-22a, H-22b	H-20	4.6160	4.6145	+0.0015
24	17.5	2.36 s	H-5		1.8391	1.9111	0.072
25	63.3	5.43 d (2.1)	H-19a, H-19b	H-20, H-23, H-22b	2.3490	2.2860	+0.0063
OH-1		12.86 s			5.5025	5.4905	+0.012
CH ₃ O-14	57.8						
OH-25		4.94 brs					

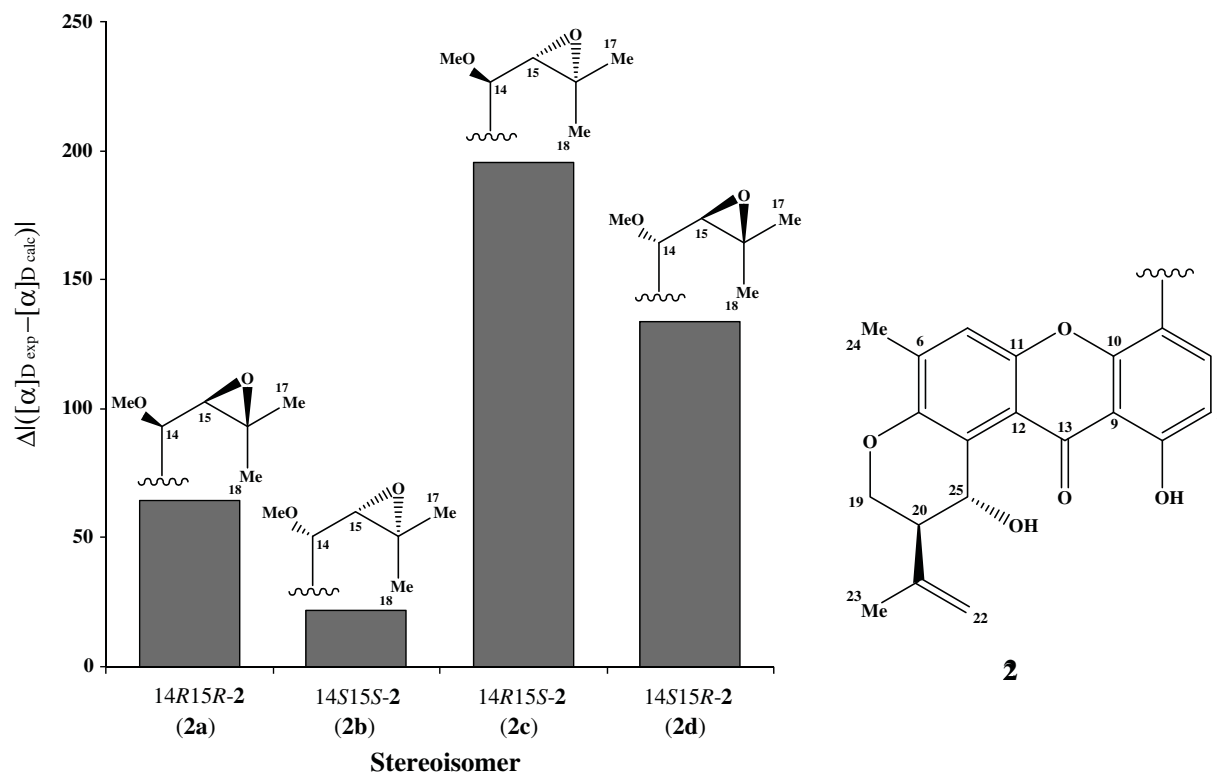


Figure 1. Absolute differences between the experimental optical rotation of 14-methoxytjixanthone (**2**) and the DFT B3LYP/DGDZVP calculated values for stereoisomers **2a–2d**. The small difference for (14*S*,15*S*)-**2b** allows the stereochemical assignment of **2**.

compounds **2** ($IC_{50} = 5.54 \pm 1.28 \mu\text{M}$) and **4** ($IC_{50} = 5.62 \pm 1.25 \mu\text{M}$) was comparable to that of chlorpromazine (CPZ; $IC_{50} = 7.26 \pm 1.60 \mu\text{M}$), a well known CaM inhibitor used as a positive control. A kinetic analysis³¹ using different amounts of CaM in the presence of different concentrations of **2** and **4** indicated that both xanthenes acted as competitive antagonists of CaM, thus interfering with the formation of the CaM-PDE1 active complex. The estimated K_i (inhibition constant) values were 25.38 ± 2.26 and $13.92 \pm 2.29 \mu\text{M}$, respectively.

The change of the electrophoretic behavior of CaM treated with the xanthenes **1–4**, as detected in a PAGE electrophoresis,³² provided an additional evidence of its interaction with the natural products. According to Figure 3, CaM treated with xanthenes **1–4** has a lower electrophoretic mobility than the untreated protein. The best effect was observed with compounds **2** and **4**. Upon conducting the same assay in the presence of EGTA, a calcium chelating agent, the mobility of CaM is not retarded indicating that the binding is Ca^{2+} -dependent.

To assess the putative binding mode of compounds **1–4** with CaM, a docking analysis into the preferred CaM-binding pocket of trifluoropiperazine (TFP) was performed using the advanced docking program AutoDock 4.0.³³ The docking protocol was validated for the CaM crystal structure (pdb code: 1a29) predicting the binding mode of TFP which was removed from the active site and docked back into pocket in the conformation found in its crystal structure.³⁴ AutoDock successfully predicted the binding mode of TFP with a RMSD (root mean square deviation) of 1.837 Å (Fig. 4). Since CPZ was used as positive control in the assays, the procedure was also validated for this compound (RMSD = 1.931 Å; Fig. 4). The results of molecular docking study revealed that **1–4** interacted to the same pocket of TFP and CPZ (Table 4 and Fig. 4). Furthermore, the overall correlation between the K_i and binding affinities predicted by AutoDock was good, in particular for compounds **2** and **4**. The correlation coefficient ($R^2 = 0.971$)

between the K_i values of **2**, **4** and CPZ and their AutoDock binding free energy values were excellent.

In conclusion, the results of the present investigation indicated that *Emericella* sp. contains novel type of competitive CaM-inhibitors. According to AutoDock predictions these compounds interact with the protein at the same binding site of TFP, a well known CaM inhibitor. The CaM antagonist effect of **4** might be related with its mild cytotoxic⁹ action and other pharmacological properties yet to be discovered. As with *E. varicolor* and *E. nidulans*, the *Emericella* sp. strain 25379 biosynthesizes tjixanthones type of compounds.

3. Experimental

3.1. General experimental procedures

Optical rotations were obtained on a JASCO DIP 360 digital polarimeter. IR spectra were obtained using KBr disks on a Perkin-Elmer 599B spectrophotometer. The CD spectra of **1–4** were obtained on a JASCO 720 spectropolarimeter at 25 °C in CHCl_3 solution. UV spectra were recorded on a Shimadzu 160 UV spectrometer in CHCl_3 solution. ^1H , ^{13}C and DEPT spectra including 2D NMR were recorded on a Varian Unity Plus 500 or on a Bruker DHX500 in CDCl_3 spectrometers at 500 MHz (^1H) or 125 MHz (^{13}C) using tetramethylsilane (TMS) as an internal standard; chemical shifts were recorded as δ values. HREIMS was measured on a JEOL JMS-AX505HA mass spectrometer. Melting point determinations were determined using a Fisher-Johns apparatus and are uncorrected. Preparative HPLC was performed using a Symmetry[®] C₁₈ column [silica gel, 4.6 × 250 mm, 5 μm, 0.6 mL/min]. Control of the equipment, data acquisition, processing, and management of chromatographic were performed by the Empower[®] 2 software program (Waters). Open column chromatography: silica gel 60 (0.063–0.200 mm), 70–230 Mesh (Merck).

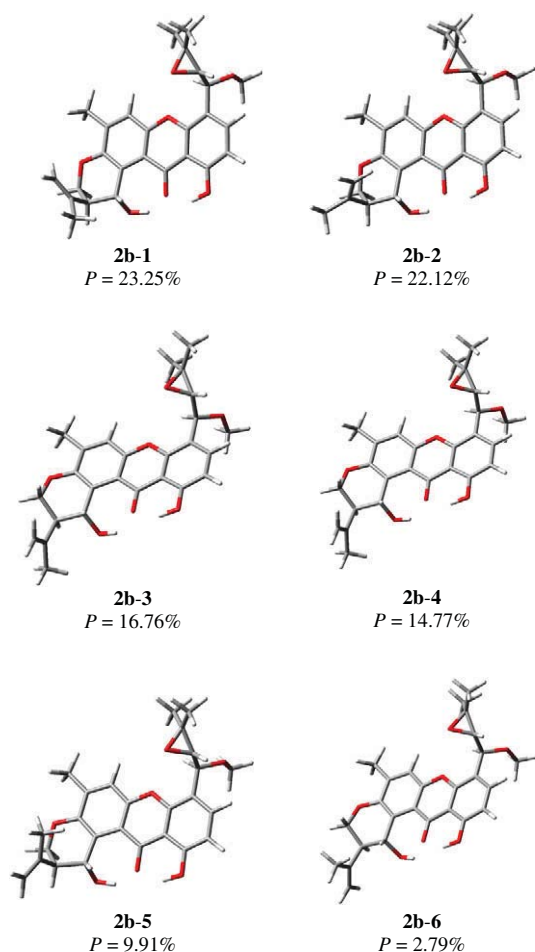


Figure 2. The six more relevant conformations of 14-methoxytajibixanthone (**2**) accounting for ca. 90% of the conformational population. Substituents at the dihydropyran ring are *pseudo*-axial in structures **2b-1**, **2b-2** and **2b-5** and *pseudo*-equatorial in **2b-3**, **2b-4** and **2b-6**. The conformational arrangement of the isoprene-derived chain remains essentially identical in these structures.

3.2. Fungal material

Emericella sp. strain 25379 was isolated from the surface of a Coral collected at Marietas Islands in Puerto Vallarta, Jalisco, México, in 2006. Cultures of the fungus are maintained in the mycological collection of the Laboratorio de Micopatología, Instituto de Biología, UNAM. Stock cultures of the fungus were stored at 4 °C on agar plates of potato dextrose agar (PDA). In addition, subcultures were obtained in several culture media, such as PDA, PDA commercial, Czapek Yeast, among others.

3.3. Fermentation and extraction

Ten Fernbach flasks, each containing the liquid medium (2 L/flask) composed of Czapek concentrate (10 mL/L), K_2HPO_4 (1 g/L), powdered yeast extract (5 g/L) and sucrose (30 g/L) were individually inoculated with 1 cm² agar plug taken from a stock culture. Flasks were cultured under static conditions at environmental temperature for 30 days. After incubation, the fermented whole broth (20 L) was filtered through cheese cloth to separate into supernatant and mycelia. The former was extracted exhaustively with CH_2Cl_2 , and the CH_2Cl_2 solution was concentrated under reduced pressure to give a crude extract (1.5 g). The mycelium was macerated with CH_2Cl_2 (3 × 2 L). The combined organic phase was filtered over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated in vacuo to give a dark brown solid (4.0 g).

3.4. Isolation

After evaporating the solvent in vacuo, the combined mycelia and culture (5.0 g) was fractionated by Si gel open CC with a hexane– CH_2Cl_2 –EtOAc gradient, to yield 11 primary fractions (F_I – F_{XI}). From fraction F_{IX} (90 mg), eluted with hexane– CH_2Cl_2 –EtOAc (4:3.5:2.5), crystallized 18 mg of **4** as a yellow solid. Fraction F_{II} (2 g), eluted with hexane– CH_2Cl_2 –EtOAc (7:2:1), was subjected to Si gel CC (45 g) and eluted with a hexane–EtOAc gradient (1:0 → 0:1) to afford four fractions (F_{II-1} – F_{II-4}). Fraction F_{II-2} (70 mg) was further purified by TLC (CH_2Cl_2) to give **3** (15 mg). Fraction F_{IV} (370 mg) was further fractionated on a Sephadex LH-20 (Pharmacia) CC (MeOH) to yield seven secondary fractions (F_{IV-1} – F_{IV-7}). Sephadex fraction F_{IV-7} was resolved on a reverse phase HPLC column, eluting with ACN to yield compounds **1** (8 mg) and **2** (5 mg).

3.4.1. 15-Chlorotajibixanthone hydrate (**1**)

Yellow needles, mp 180–181 °C; $[\alpha]_D -4.0$ (c 0.1, $CHCl_3$); IR (KBr) ν_{max} 3486, 3073, 2925, 2849, 1736, 1644, 1567, 1240, 1022, and 920 cm^{-1} ; 1H , ^{13}C , and 2D NMR data, see Table 1; HREIMS $[M]^+$ m/z 458.1504 (calcd for $C_{25}H_{27}O_6Cl$ 458.1496); CD ($CHCl_3$) (0.057 mg/mL) $\Delta\epsilon$ (nm) -2.27×10^4 (249), -2.08×10^4 (261), 1.48×10^4 (285), -1.30×10^4 (336); UV λ_{max} ($CHCl_3$) log ϵ (nm) 3.60 (388), 3.25 (339), 3.76 (301), 3.72 (292), 4.07 (277), 3.96 (258), 3.92 (249), 3.94 (244).

3.4.2. 14-Methoxytajibixanthone (**2**)

Yellow needles, mp 200–201 °C; $[\alpha]_D -38.0$ (c 0.1, $CHCl_3$); IR (KBr) ν_{max} 3450, 3078, 2592, 2887, 1795, and 920 cm^{-1} ; 1H , ^{13}C , and 2D NMR data, see Table 2; HRFABMS $[M+1]^+$ m/z 453.2074 (calcd for $C_{26}H_{28}O_7$ 453.2066); CD ($CHCl_3$) (0.069 mg/mL) $\Delta\epsilon$ (nm) -5.27×10^4 (247), -2.69×10^4 (260), -2.62×10^2 (295), -9.70×10^3 (301), 1.97×10^2 (317), -1.16×10^4 (335); UV λ_{max} ($CHCl_3$) log ϵ (nm) 3.23 (395), 2.59 (346), 2.48 (299), 3.42 (290), 3.85 (277), 3.74 (261), 3.78 (254), 3.77 (248.5), 3.77 (245).

3.4.3. Shamixanthone (**3**)

Yellow needles, mp 141–143 °C; $[\alpha]_D +34.1$ (c 0.1, $CHCl_3$) [lit. +16.0 (c 0.1, $CHCl_3$)]; NMR spectral data were in agreement with those previously described in the literature;⁹ CD ($CHCl_3$) (0.033 mg/mL) $\Delta\epsilon$ (nm) -2.79×10^4 (263), 2.71×10^4 (295), -1.92×10^4 (336), 1.16×10^4 (446); UV λ_{max} ($CHCl_3$) log ϵ (nm) 3.50 (395), 2.90 (346), 3.77 (299), 3.76 (293), 4.24 (276), 4.05 (250), 4.07 (244).

3.4.4. Tajibixanthone hydrate (**4**)

Yellow needles, mp 182–184 °C; $[\alpha]_D -74.0$ (c 0.1, $CHCl_3$) [lit. -76.0 (c 0.23, $CHCl_3$)]; NMR spectral data were in agreement with those previously described in the literature;⁹ CD ($CHCl_3$) (0.025 mg/mL) $\Delta\epsilon$ (nm) -1.24×10^5 (245), -8.62×10^4 (260), 3.21×10^4 (292), -4.36×10^4 (336); UV λ_{max} ($CHCl_3$) log ϵ (nm) 3.72 (397), 3.14 (347), 3.92 (299), 3.91 (294), 4.42 (278), 4.25 (261), 4.25 (257), 4.21 (249), 4.24 (244).

3.5. Phosphodiesterase activity

The CaM used in this test was recombinant protein over-expressed following *E. coli* BL21-A1™ One shot® vendor procedure (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA). Cells BL21-A1 were transformed with plasmids pET12-CALM1. Vector construction details will be published elsewhere. Briefly, the expression vector was constructed by amplifying *CALM1* (human phosphorylase kinase, delta) gene by PCR from a cDNA clone pCMV6-XL5, obtained from OriGene (Origene Technology, Inc, Rockville, MD), and subcloned into vector pET12b Novagen (EMD Chemicals Inc.,

Table 3

Free energies,^a equilibrium populations,^b coupling constants,^c and specific rotation values^d for conformers 1–28 of (14*S*,15*S*,20*S*,25*R*)-**2**

Conformer	ΔG	P	$J_{19a,20}$	$J_{19b,20}$	$J_{20,25}$	$J_{14,15}$	$[\alpha]_D$
1	0.00	23.25	1.13	2.98	0.87	9.71	28.34
2	0.03	22.12	1.37	2.44	0.96	9.71	174.63
3	0.19	16.76	11.05	3.39	9.53	9.71	-179.00
4	0.27	14.77	11.05	3.40	9.53	9.71	-176.04
5	0.51	9.91	1.11	3.03	0.77	9.72	28.50
6	1.26	2.79	11.15	3.57	9.03	9.71	-220.72
7	1.47	1.95	1.36	2.46	0.95	9.60	21.38
8	1.71	1.30	1.13	2.98	0.89	9.60	-134.48
9	1.99	0.81	1.13	2.98	0.87	9.53	47.19
10	2.08	0.70	11.07	3.42	9.47	9.58	-307.80
11	2.08	0.70	11.07	3.42	9.46	9.58	-307.77
12	2.08	0.69	1.38	2.44	0.97	9.54	190.90
13	2.09	0.68	1.13	2.97	0.89	1.96	234.91
14	2.28	0.49	1.10	3.05	0.77	9.61	-116.56
15	2.35	0.44	1.36	2.45	0.97	3.59	317.61
16	2.35	0.44	11.05	3.39	9.54	9.56	-165.28
17	2.38	0.42	11.05	3.40	9.54	9.56	-163.95
18	2.51	0.34	1.11	3.04	0.77	9.53	40.98
19	2.57	0.30	1.14	2.96	0.90	3.55	184.51
20	2.57	0.30	1.10	3.07	0.78	1.97	221.75
21	2.63	0.27	1.10	3.06	0.78	3.58	165.93
22	2.94	0.16	11.17	3.60	8.99	9.59	-343.44
23	3.11	0.12	11.15	3.57	9.05	9.55	-204.17
24	3.21	0.10	11.06	3.41	9.50	3.60	-57.10
25	3.55	0.06	1.35	2.48	0.94	9.56	-55.13
26	3.55	0.06	1.13	2.99	0.87	9.57	-212.54
27	3.66	0.05	11.04	3.39	9.49	9.59	-387.57
28	4.08	0.02	1.10	3.06	0.76	9.57	-189.25
Conformational average ^e			4.86	3.01	4.06	9.54	-16.11
Experimental			3.60	3.00	2.75	8.00	-38.00

^a B3LYP/DGDZVP, in kcal/mol.

^b Population percentages based on ΔG , assuming Boltzman statistics at $T = 298.15$ K and 1 atm.

^c Coupling constants in Hz calculated from B3LYP/DGDZVP dihedral angles using the Altona equation.

^d B3LYP/DGDZVP, specific rotation in degrees $\times [\text{dm} \times \text{g}/\text{cm}^3]^{-1}$.

^e $\sum_i [\alpha]_D^i, J-J_{19a,20}^i, J-J_{19b,20}^i, J-J_{20,25}^i$ or $J-J_{14,15}^i \times P^i$, where $[\alpha]_D^i, J-J_{19a,20}^i, J-J_{19b,20}^i, J-J_{20,25}^i, J-J_{14,15}^i$ and P^i are values of $[\alpha]_D, J-J_{19a,20}, J-J_{19b,20}, J-J_{20,25}, J-J_{14,15}$ and population in percent for the i th conformation.

Darmstadt, Germany). After growth for 12 h, cells were harvested by centrifugation and subjected to CaM purification using phenyl-Sepharose CL4B as previously reported.^{35–37} Phosphodiesterase activity was measured according to the method described by Rivero et al.²⁴ with some modifications. CaM (0.08 μg) was incubated with 0.015 units of PDE1 from bovine brain during 30 min in 40 μL of assay solution containing 0.063 units of 5'-nucleotidase (*Crotalus atrox* venom from Sigma), 45 mM Tris-HCl, 5.6 mM magnesium acetate, 45 mM imidazole, 2.5 mM calcium chloride and 10 μM BSA, pH 7.0. Test compounds were then added to the assay medium at 0.5, 1, 2, 3, 4, 7, 13, 20, 32, 50, and 65 μM in ACN-water (1:1), and the samples incubated during 30 min; thereafter 10 μL of 10.8 mM cAMP was added to start the assay. After 15 min, the assay was stopped by the addition of 190 μL of malachite green solution. The amount of inorganic phosphate released, measured spectrophotometrically at 700 nm, correlated with the activity of the PDE1. The experiments to determine K_i values were performed as described above but in the presence of four different concentrations of CaM (25, 50, 100 and 200 ng/mL) and 10 μM BSA. All the results are expressed as the mean of at least six experiments \pm SEM. The IC_{50} (concentration inhibiting by 50% the activity of the enzyme) values were determined by non-linear regression analysis by fitting to hyperbolic inhibition (Dixon plot³¹). The K_i was calculated from a global fit of data against inhibitor and CaM concentration using the simple competitive inhibition equation:

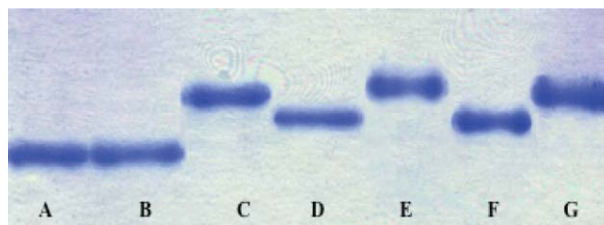


Figure 3. PAGE CaM after treatment with compounds **1–4**. Electrophoresis of 2 μg samples of CaM in the presence of 1 mM CaCl_2 . Pretreatment of the CaM samples, for 1.5 h at 30 $^\circ\text{C}$: (A) no additions; (B) DMSO; (C) 0.033 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of CPZ; (D) **1**; (E) **2**; (F) **3**; and (G) **4** isolates. In all cases 0.033 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of **1–4** in DMSO were applied.

$$v = V_m \frac{\frac{[S]}{K_m} + \text{BSA}}{1 + \frac{[I]}{K_i} + \frac{[S]}{K_m} + \text{BSA}}$$

where V_m = activity at saturating CaM concentration; K_m = dissociation constant of CaM–PDE1 complex; I = concentration of the inhibitor and S = concentration of CaM; BSA = Bovine serum albumine. Non-linear regression was performed with the program Origin 7.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA).

3.6. PAGE of compounds **1–4** with CaM

The interaction of the isolated compounds with CaM was performed using nondenaturing homogeneous electrophoresis (PAGE). PAGE was performed according to previously described procedures using 12% polyacrylamide gels.³² Interaction of **1–4** with CaM was determined by observing the difference in electrophoretic mobility in two different conditions, in the presence of Ca^{2+} and in the presence of EGTA. The experimental conditions are described briefly in the legend of Figure 3. In each case the electrophoresis run was done in triplicate. CPZ was used as the positive control.

3.7. Molecular modeling calculations

A Monte Carlo conformational search²⁷ for the structures **2a–2d** was achieved by molecular mechanics using the MMFF94 force-field as implemented in the Spartan 04 program (Wavefunction Inc. Irvine, CA). In each case, the minimum energy structures were filtered, checked for duplicity and selected within an energy range between 0 and 3 kcal/mol to yield 30, 28, 25, and 22 conformers for **2a–2d**, respectively. Each conformer was optimized by DFT at the B3LYP/DGDZVP level of theory²⁸ using Gaussian W03 (Gaussian Inc., Pittsburg, PA). The fully optimized structures were used to calculate the thermochemical parameters and the frequencies at 298 K and 1 atm. Calculations of the optical rotations²⁹ were achieved at the same level of theory as well as the ^1H – ^1H vicinal coupling constants. Both properties were Boltzmann-weighted taking into account the DFT conformational population. No solvent effects were included in the calculations.

3.8. Preparation of inhibitor structures

The 3D structures of the studied compounds were constructed using Hyperchem 7.5 (HyperCube Inc., FL). Hydrogen atoms were added to the inhibitor structures. A geometry optimization was performed by applying the PM3 force field in Hyperchem 7.5. For all ligands, random starting positions, random orientations and torsions were used. This allowed searching for flexible conformations of the compounds during the docking process.

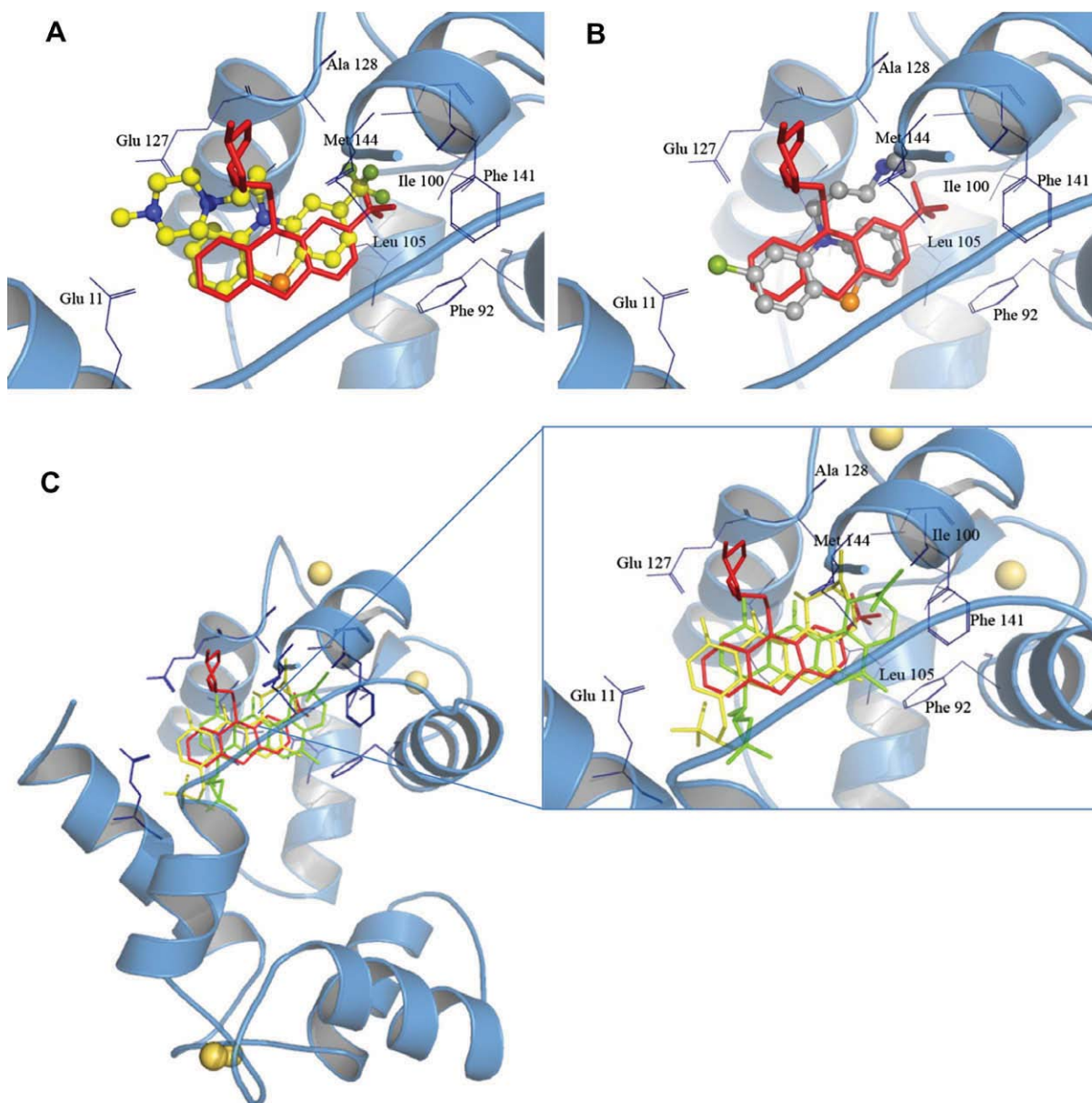


Figure 4. Docking results obtained using AutoDock 4.0 inside the active site of CaM (blue, cartoons). (A) The docked TFP (yellow, ball and stick) and (B) CPZ ligands (grey, ball and stick) into CaM appear superimposed on the cocrystallized TFP (red, sticks). (C) Top ranked binding mode of the most populated cluster of **2** (green, sticks) and **4** (yellow, sticks) into the binding site. Compounds **2** and **4** attach to CaM at the same position than TFP (red, sticks). The metal atoms (Ca^{2+}) are shown as pale-yellow color balls. Hydrogens are omitted for clarity.

Table 4

AutoDock estimated docked energies, binding free energies (ΔG_s), calculated and experimental inhibition constants (K_i), and experimental inhibitory concentrations (IC_{50}) of compounds **1–4**, CPZ and TFP

Compound	Docked energy (kcal/mol)	ΔG_s (kcal/mol)	K_i (μM) (calculated)	K_i (μM) (experimental)	IC_{50} (μM)
1	−4.81	−5.14	10.80	ND ^a	9.59 ± 2.65
2	−8.15	−8.38	20.34	25.38 ± 2.26	5.54 ± 1.28
3	−5.11	−5.63	5.77	ND ^a	29.16 ± 6.39
4	−5.08	−4.54	14.36	13.92 ± 2.29	5.62 ± 1.25
CPZ	−6.85	−6.90	8.76	19.28 ± 2.54	7.26 ± 1.60
TFP	−10.06	−10.49	8.36	ND ^a	ND ^a

^a Not calculated.

3.9. Molecular docking

The docking program AutoDock 4.0 was used to perform the automated molecular docking.³³ The Lamarckian genetic algorithm

(LGA) was applied to deal with the inhibitor–enzyme interactions. The grid map with $60 \times 60 \times 60$ points spaced equally at 0.375 Å was generated using the AutoGrid program to evaluate the binding energies between the compounds and the protein. Docking param-

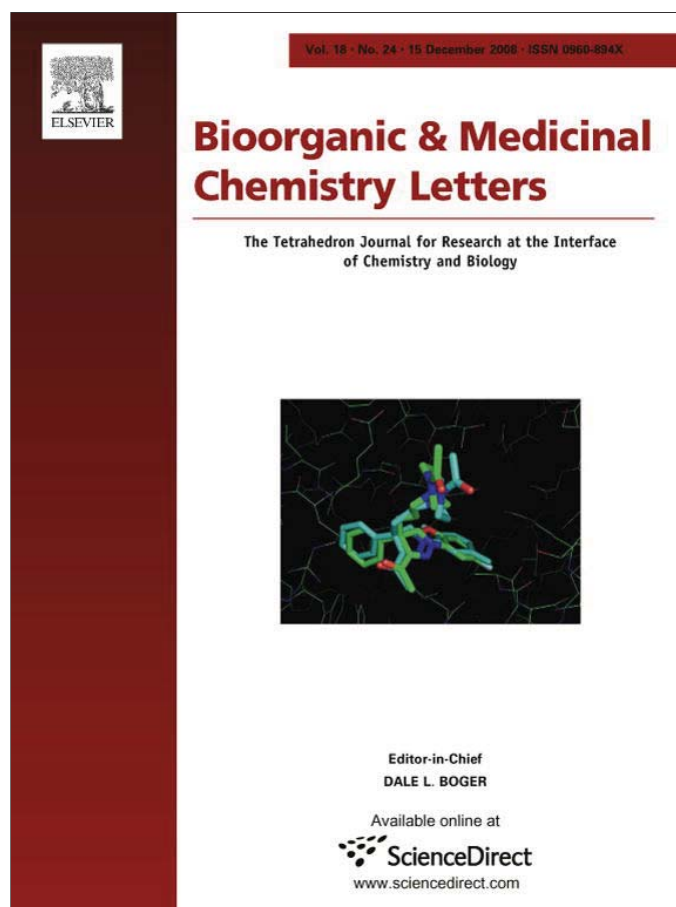
eters were set to default values except for the number of GA runs (100), the energy evaluations (25,000,000), the maximum number of top individuals that automatically survive (0.1) and the step size for translation (0.2 Å). The docked inhibitor–enzyme complexes were ranked according to the predicted binding energies and to the conformity to ideal geometry of the docked structures.

Acknowledgments

This work was supported by grants of Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, Proyecto 45814-Q). The authors acknowledge Dr. Fabián López-Vallejo for valuable discussion. The technical assistance of Isabel Rivero-Cruz, Antonio Hernández, Marisela Gutiérrez and Georgina Duarte is also recognized. The authors are very grateful to Dr. A. Olson and his colleagues at the Scripps Research Institute for providing AutoDock. We are indebted to Dirección General de Servicios de Cómputo Académico (DGSCA), UNAM, for providing the resources to carry out computational calculations through KanBalam System. M.F. acknowledges fellowship and the Grant “Apoyo de Tesis Doctoral” from CONACyT.

References and notes

1. Taken in part from the Ph.D. thesis of M. Figueroa.
2. Samson, R. A.; Hong, S.; Frisvad, J. C. *Med. Mycol.* **2006**, *44*, S133.
3. Kralj, A.; Kehraus, S.; Krick, A.; Eguereva, E.; Kelter, G.; Maurer, M.; Wortmann, A.; Fiebig, H.; Koenig, G. M. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 995.
4. Wang, W.; Zhu, T.; Tao, H.; Lu, Z.; Fang, Y.; Gu, Q.; Zhu, W. *J. Antibiot.* **2007**, *60*, 603.
5. Wang, W.; Lu, Z.; Tao, H.; Zhu, T.; Fang, Y.; Gu, Q.; Zhu, W. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1558.
6. Wei, H.; Itoh, T.; Kotoku, N.; Kobayashi, M. *Heterocycles* **2006**, *68*, 111.
7. Wei, H.; Itoh, T.; Kinoshita, M.; Nakai, Y.; Kurotaki, M.; Kobayashi, M. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 6015.
8. Malmstrom, J.; Christophersen, C.; Barrero, A. F.; Oltra, J. E.; Justicia, J.; Rosales, A. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 364.
9. Pornpakakul, S.; Liangsakul, J.; Ngamrojanavanich, N.; Roengsumran, S.; Sihanonth, P.; Piapukiew, J.; Sangvichien, E.; Puthong, S.; Petsom, A. *Arch. Pharm. Res.* **2006**, *29*, 140. and references cited therein.
10. Fujimoto, H.; Asai, T.; Kim, Y.; Ishibashi, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2006**, *54*, 550.
11. Yoganathan, K.; Rossant, C.; Glover, R. P.; Cao, S.; Vittal, J. J.; Ng, S.; Huang, Y.; Buss, A. D.; Butler, M. S. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1681.
12. Takahashi, N.; Tamagawa, K.; Kawai, K.; Fukui, T. *Biol. Pharm. Bull.* **2000**, *23*, 989.
13. Itabashi, T.; Nozawa, K.; Nakajima, S.; Kawai, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, *41*, 2040.
14. Itabashi, T.; Nozawa, K.; Miyaji, M.; Udagawa, S.; Nakajima, S.; Kawai, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 3142.
15. (a) Takahashi, N.; Iwahori, A.; Kawai, K.; Fukui, T. *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *360*, 113; (b) Nielsen, J.; Nielsen, P. H.; Frisvad, J. C. *Phytochemistry* **1998**, *50*, 263.
16. Kawahara, N.; Nakajima, S.; Satoh, Y.; Yamazaki, M.; Kawai, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 1970.
17. Kawahara, N.; Nozawa, K.; Yamazaki, M.; Nakajima, S.; Kawai, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 73.
18. Kawahara, N.; Nozawa, K.; Nakajima, S.; Yamazaki, M.; Kawai, K. *Heterocycles* **1989**, *29*, 397. and references cited therein.
19. Nozawa, K.; Udagawa, S.; Nakajima, S.; Kawai, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 3460.
20. Yamazaki, M.; Maebayashi, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1982**, *30*, 509.
21. Hosoe, T.; Itabashi, T.; Kobayashi, N.; Udagawa, S.-I.; Kawai, K.-I. *Chem. Pharm. Bull.* **2006**, *54*, 185.
22. Frisvad, J. C.; Samson, R. A. *Syst. Appl. Microbiol.* **2004**, *27*, 672.
23. Mata, R.; Gamboa, A.; Macias, M.; Santillán, S.; Ulloa, M.; González, M. C. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4559.
24. Rivero-Cruz, B.; Rivero-Cruz, I.; Rodríguez-Sotres, R.; Mata, R. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1147.
25. Martínez-Luis, S.; Pérez-Vásquez, A.; Mata, R. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1882.
26. Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4092.
27. Chang, G.; Guida, W. C.; Still, W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4379.
28. Godbout, N.; Salahub, D.; Andzelm, J.; Wimmer, E. *Can. J. Chem.* **1992**, *70*, 560.
29. Stephens, P.; Pan, J.; Devlin, F.; Cheeseman, J. J. *Nat. Prod.* **2008**, *71*, 285.
30. Ovadi, J. In *Progress in Drug Research*; Jucker, E., Ed.; Birkhauser: Basel, 1989; p 353. Vol. 33.
31. Dixon, M. *Biochem. J.* **1953**, *55*, 170–171.
32. Leung, P.; Taylor, W.; Wang, J.; Tripton, C. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 2742.
33. Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. *J. Comp. Chem.* **1998**, *19*, 1639.
34. Paul, M. K.; Mukhopadhyay, A. K. *Int. J. Med. Sci.* **2004**, *1*, 101.
35. Hayashi, N.; Matsubara, M.; Takasaki, A.; Titani, K.; Taniguchi, H. *Protein Expr. Purif.* **1998**, *12*, 25–28.
36. Persechini, A.; Blumenthal, D. K.; Jarrett, H. W.; Klee, C. B.; Hardy, D. O.; Kretsinger, R. H. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 8052–8058.
37. Ye, Q.; Li, X.; Wong, A.; Wei, Q.; Jia, Z. *Biochemistry* **2006**, *45*, 738.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

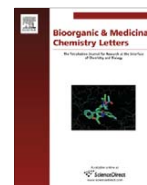
In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcl

Calmodulin inhibitory activity of the malbrancheamides and various analogs

Kenneth A. Miller^a, Mario Figueroa^c, Meriah W. N. Valente^a, Thomas J. Greshock^a, Rachel Mata^c, Robert M. Williams^{a,b,*}

^a Department of Chemistry, Colorado State University, 1301 Center Avenue, Fort Collins, CO 80523-1872, USA

^b University of Colorado Cancer Center, Aurora, CO 80045, USA

^c Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 September 2008

Revised 10 October 2008

Accepted 13 October 2008

Available online 17 October 2008

Keywords:

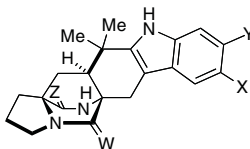
Calmodulin inhibition

Malbrancheamide

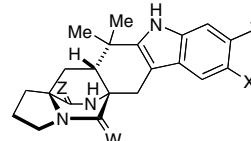
Prenylated indole alkaloid

ABSTRACT

The preparation and biological activity of various structural analogs of the malbrancheamides are disclosed. The impact of indole chlorination, C-12a relative stereochemistry, and bicyclo[2.2.2]diazaoctane core oxidation state on the ability of these analogs to inhibit calmodulin dependent phosphodiesterase (PDE1) was studied, and a number of potent compounds were identified.



X = Y = Cl, W = Z = O: IC₅₀ = 18.57 μM



X, Y = Cl; Z = H₂; W = O: IC₅₀ = 11.95 μM

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

The synthesis, biosynthetic investigations, and biological activities of a number of unique prenylated indole alkaloids containing a characteristic bicyclo[2.2.2]diazaoctane core has been the focus of vigorous research in our laboratory¹ and that of other research groups² for a number of years. This class of highly biologically active fungal metabolites includes the paraherquamides,³ brevianamides,⁴ notamidines,⁵ stephacidins,⁶ and malbrancheamides⁷ (Fig. 1) among others, and the range of biological activities exhibited by a number of representative members of this class is quite striking. We have previously disclosed that malbrancheamide is a calmodulin (CaM) antagonist that inhibits the activity of CaM-dependent phosphodiesterase (PDE1) in a concentration-dependent manner.⁷

Calmodulin is an important drug target for the development of naturally and synthetic therapeutically useful agents due to its involvement in a variety of cell functions throughout the regulation of more than 50 enzymes and ion channels. Such proteins include several kinases, PDE1, calcineurin, the nitric oxide synthases, adenylate cyclases 1 and 8, several ion channels, caldesmon, spectrin, and adducin, among others. Indeed, certain anti-psychotic, anti-tumoral, smooth muscle relaxants, α-adrenergic blocking,

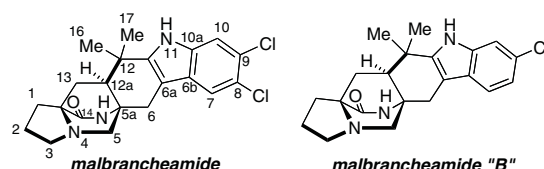
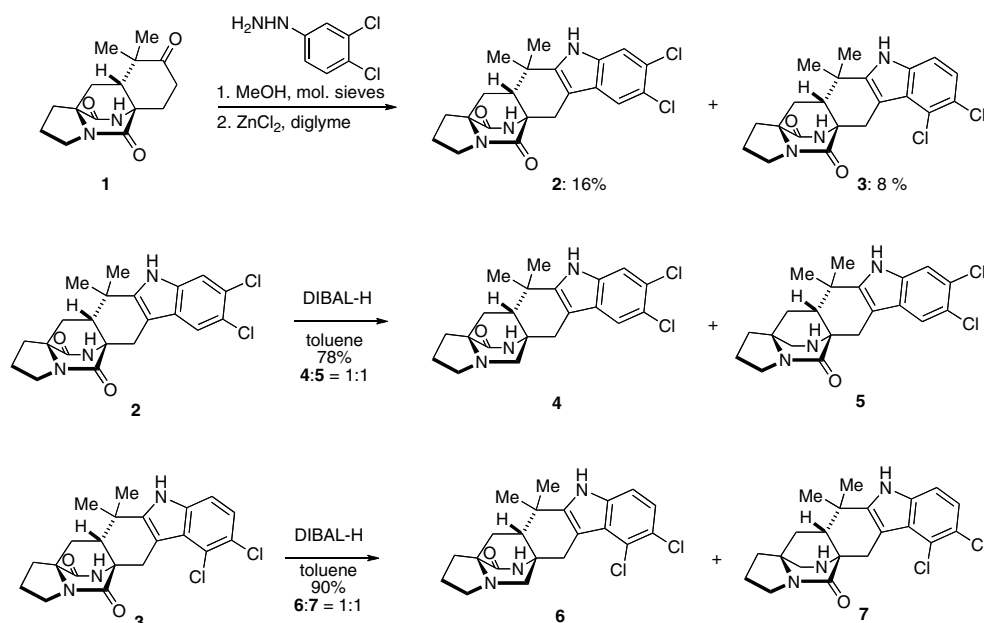


Figure 1. Structures of malbrancheamide and malbrancheamide B.

immunostimulant and cytoprotective drugs exert their therapeutic action by inhibiting CaM.⁸

The bicyclo[2.2.2]diazaoctane core common to these natural products is proposed to arise biosynthetically by an intramolecular hetero-Diels-Alder reaction of a 5-hydroxypyrazin-2(1H)-one,² and work from this laboratory has provided a provocative body of experimental evidence to support such a hypothesis.¹ Indeed, we have applied biomimetic hetero-Diels-Alder cycloaddition strategies to prepare several prenylated indole alkaloids, including stephacidin A,⁹ brevianamide B,¹⁰ marcfortine C,¹¹ notoamide B,^{9b} VM55599,¹² and most recently, malbrancheamide and malbrancheamide B.¹³ Due to the significant biological activity of both malbrancheamide and malbrancheamide B, a program aimed at determining the effect of various structural features of the malbrancheamides on their biological activities was initiated.

* Corresponding author. Tel.: +1 970 491 6747; fax: +1 970 491 3948.
E-mail address: rmw@lamar.colostate.edu (R.M. Williams).



Scheme 1. Fischer indole synthesis.

Specifically, we endeavored to explore how indole chlorination, relative stereochemistry, and bicyclo[2.2.2]diazaoctane core oxidation state altered the ability of these analogs to inhibit CaM throughout the analysis of their effect on PDE1 activity. We chose these structural parameters since the malbrancheamides were the first members of this family of alkaloids to be identified with a halogenated indole ring. The brevity and high overall yield of our synthetic approach to these substances has allowed us to readily access a number of malbrancheamide analogs with the desired structural and stereochemical variability.

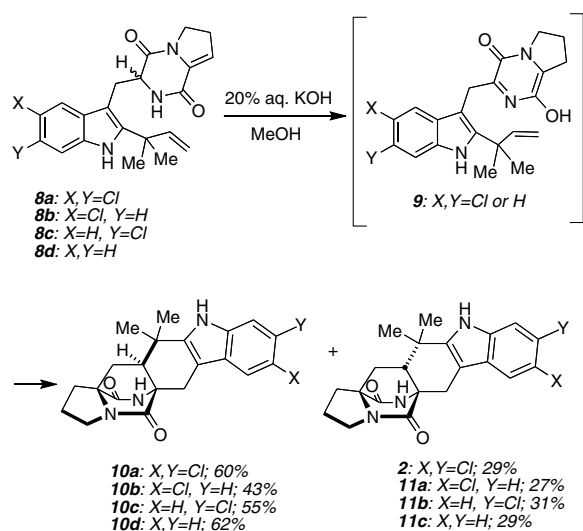
A Fischer indole strategy was first devised to prepare a number of malbrancheamide analogs containing the unnatural relative stereochemistry at C-12a.¹⁴ Ketone **1** was condensed with 3,4-dichlorophenylhydrazine followed by Fischer indole synthesis to give a mixture of regioisomers **2** and **3** in modest yield (Scheme 1). Treat-

ment of **2** or **3** with DIBAL-H led to a 1:1 mixture of the reduced tertiary lactam, **4** or **5**, respectively, and the reduced secondary lactam, **6** or **7**, respectively, in good yield. While this route proved useful in generating an array of structural diversity, the low yield of the Fischer indole sequence prompted investigation of other synthetic strategies.

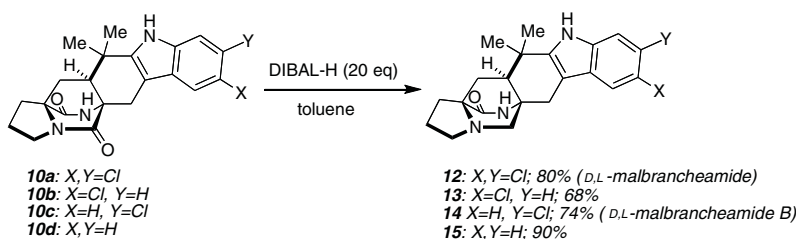
A more efficient synthetic strategy involved a biomimetic hetero-Diels-Alder reaction as the key step (Scheme 2).¹³ Enamides **8a–8d** could be easily prepared,¹³ and treatment with basic methanol resulted in tautomerization followed by cycloaddition to give a mixture of diastereomeric cycloadducts **10a–d** as well as **2** and **11a–c** with the *syn*-products **10a–d** predominating. The ready availability of the Diels-Alder precursors **8a–d** allowed the preparation of analogs **10a–c**, **2**, and **11a–d** with a variety of chlorination substitution patterns.

Next, the effect of the bicyclo[2.2.2]diazaoctane core oxidation state was interrogated. Thus, treatment of **10a–d** with DIBAL-H led to selective reduction of the tertiary amide functionality to provide the tertiary amines **12–15** in good yields (Scheme 3).

Anti-CaM activity was measured as previously described by an enzymatic functional assay using PDE1 as monitoring enzyme,¹⁵ and the data are summarized in Table 1. Upon examination, some surprising results are apparent. Indole chlorine substitution does have a distinct effect on PDE1 activity, however an overall structure–activity relationship with regard to chlorine substitution is mostly absent. For example, the *syn*-dioxopiperazines **10a–d** exhibit potencies from 0.9 to 0.1, with the dichloro substituted species **10a** displaying the highest potency (0.9) and the monochloro substituted analogs **10b** and **10c** displaying roughly equivalent potencies (0.4 and 0.2, respectively). Compound **10d**, which lacks chlorine substitution, was virtually inactive. Comparison of these results with the potencies of the *anti*-dioxopiperazines **2**, **3**, and **11a–c** revealed that compound **11c**, which completely lacks chlorine substitution, was the most active substance of this group studied, with a potency 0.7 times that of the positive control. The analogs **11a**, **11b**, **2**, and **3** exhibited moderate potencies. Among the monooxopiperazines **4–7** and **12–15**, synthetic *D,L*-malbrancheamide (**12**) and **5** were the most potent whereas C-12a-*epi*-malbrancheamides (**4** and **6**) were the least potent. It is particularly



Scheme 2. Hetero-IMDA reactions.



Scheme 3. Amide reductions.

Table 1
Inhibition of CaM-PDE1 by compounds 2–7 and 10–15.

Compound	IC ₅₀ (μM)	Chlorpromazine	Potency
2	33.92 ± 4.64	16.78 ± 3.99	0.5
3	45.41 ± 2.39	10.76 ± 0.41	0.2
4	134.47 ± 12.63	10.76 ± 0.41	0.1
5	11.95 ± 1.05	10.76 ± 0.41	0.9
6	81.24 ± 4.46	10.76 ± 0.41	0.1
7	27.51 ± 3.13	10.76 ± 0.41	0.4
10a	18.57 ± 2.87	16.78 ± 3.99	0.9
10b	31.49 ± 2.52	14.11 ± 1.75	0.4
10c	61.79 ± 5.48	14.11 ± 1.75	0.2
10d	150.66 ± 26.79	16.78 ± 3.99	0.1
11a	62.34 ± 4.58	14.11 ± 1.75	0.2
11b	42.77 ± 1.66	14.11 ± 1.75	0.3
11c	23.61 ± 4.21	16.78 ± 3.99	0.7
12	15.99 ± 0.87	16.78 ± 3.99	1.1
nat. 12	19.33 ± 1.40	16.78 ± 3.99	0.9
13	60.33 ± 6.84	14.11 ± 1.75	0.2
14	42.85 ± 4.22	14.11 ± 1.75	0.3
nat. 14	183.28 ± 37.58	14.11 ± 1.75	0.1
15	35.73 ± 3.01	16.78 ± 3.99	0.5

Potency was obtained by the formula: IC₅₀ (chlorpromazine)/IC₅₀ (compound), assuming a value of 1.00 for chlorpromazine.

striking that the monooxopiperazine compound **4** (C12a-*epi*-malbrancheamide) was essentially inactive (potency of 0.1) whereas the corresponding C5-oxo-isomer **5** was very potent (0.9). The relative lack of activity of compounds **4** and **6** reveals that the relative stereochemistry at C-12a is quite important and also reveals the significance of the C5 and C14 amide carbonyl residues. Varying indole chlorine substitution on the 7-, 8-, and 9-positions led to potencies ranging from 0.1 to 0.9. The relative potencies of synthetic, racemic malbrancheamide (**12**) and malbrancheamide B (**14**) are particularly notable, as it appears to be slightly more active than naturals, optically pure (+)-malbrancheamide and malbrancheamide B relative to chlorpromazine, the control inhibitor.

In conclusion, a number of malbrancheamide analogs have been prepared with differing indole chlorine substitution, C-12a relative stereochemistry, and bicyclo[2.2.2]diazoctane core oxidation level. Phosphodiesterase activity for each analog was measured alongside chlorpromazine, and a number of active compounds were identified (**5**, **10a**, **11c**, and **12**). The overall results revealed that natural malbrancheamide, either the natural (+)-enantiomer or as a racemate, are the most active CaM-PDE1 complex inhibitors. The unnatural enantiomers of malbrancheamide (**12**) and malbrancheamide B (**14**) must be more active than the naturally occurring enantiomers. Considering the increased relative potency of racemic malbrancheamides compared to that of the natural enantiomerically pure substances, efforts are underway to prepare their enantiomerically pure versions to interrogate the absolute stereochemical issue in more detail. The broad synthetic technology platform our laboratory has developed to synthesize both racemic as well as optically pure versions of this family of prenylated indole alkaloids is being exploited to prepare a number of additional analogs of the malbrancheamides for biological evaluation.

Acknowledgments

Financial support from the National Institutes of Health (CA70375 to R.M.W.) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 45814-Q) is gratefully acknowledged. M.F. acknowledges fellowship from CONACyT. Mass spectra were obtained on instruments supported by the NIH Shared Instrumentation Grant GM49631 at Colorado State University.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bmcl.2008.10.057.

References and notes

- (a) Williams, R. M.; Cox, R. J. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 127; (b) Williams, R. M. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 711; (c) Williams, R. M.; Stocking, E. M.; Sanz-Cervera, J. F. *Topics Curr. Chem.* **2000**, *209*, 98.
- (a) Porter, A. E. A.; Sammes, P. G. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1970**, 1103; (b) Baldas, J.; Birch, A. J.; Russell, R. A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1974**, 50.
- (a) Yamazaki, M.; Okuyama, E. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 135; (b) Ondeyka, J. G.; Goegelman, R. T.; Schaeffer, J. M.; Kelemen, L.; Zitano, L. *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 1375; (c) Liesch, J. M.; Wichmann, C. F. *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 1380; (d) Banks, R. M.; Blanchflower, S. E.; Everett, J. R.; Manfer, B. R.; Reading, C. J. *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 840.
- (a) Birch, A. J.; Wright, J. J. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1969**, 644; (b) Birch, A. J.; Wright, J. J. *Tetrahedron* **1970**, *26*, 2329; (c) Birch, A. J.; Russell, R. A. *Tetrahedron* **1972**, *28*, 2999.
- Kato, H.; Yoshida, T.; Tokue, T.; Nojiri, Y.; Hirota, H.; Ohta, T.; Williams, R. M.; Tsukamoto, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2254.
- (a) Qian-Cutrone, J.; Huang, S.; Shu, Y.-Z.; Vyas, D.; Fairchild, C.; Menendez, A.; Krampitz, K.; Dalterio, R.; Klohr, S. E.; Gao, Q. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14556; (b) Qian-Cutrone, J.; Krampitz, K.; Shu, Y.-Z.; Chang, L. P. U.S. Patent 6,291,461, 2001.
- (a) Martínez-Luis, S.; Rodríguez, R.; Acevedo, L.; González, M. D. C.; Lira-Rocha, A.; Mata, R. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 1817; (b) Figueroa, M.; González, M. D. C.; Mata, R. *Nat. Prod. Res.* **2008**, *22*, 709.
- (a) Orosz, F.; Horvath, I.; Ovadi, J. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2006**, *6*, 1145; (b) Horvath, I.; Harmat, V.; Perczel, A.; Palfi, V.; Nyitray, L.; Nagy, A.; Hlavanda, E.; Naray-Szabo, G.; Ovadi, J. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 8266; (c) Urcelay, E.; Ibarreta, D.; Parrilla, R.; Ayuso, M. S.; Martín-Requero, A. *Neurobiol. Dis.* **2001**, *8*, 289; (d) Seales, E. C.; Micoli, K. J.; McDonald, J. M. *J. Cell. Biochem.* **2006**, *97*, 45; (e) Du, J.; Szabo, S. T.; Gray, N. A.; Manji, H. K. *Int. J. Neuropsychoph.* **2004**, *7*, 243; (f) Kortvely, E.; Gulya, K. *Life Sci.* **2004**, *74*, 1065; (g) Somlyo, A. P.; Somlyo, A. V. *Physiol. Rev.* **2003**, *83*, 1325.
- (a) Greshock, T. J.; Williams, R. W. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4255; (b) Greshock, T. J.; Grubbs, A. W.; Tsukamoto, S.; Williams, R. W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2262.
- (a) Williams, R. M.; Sanz-Cervera, J. F.; Sancenón, F.; Marco, J. A.; Halligan, K. J. *Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1090; (b) Williams, R. M.; Sanz-Cervera, J. F.; Sancenón, F.; Marco, J. A.; Halligan, K. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1233; (c) Sanz-Cervera, J. F.; Williams, R. M.; Marco, J. A.; López-Sánchez, J. M.; González, F.; Martínez, M. E.; Sancenón, F. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 6345; (d) Adams, L. A.; Valente, M. W. N.; Williams, R. M. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 5195.
- Greshock, T. J.; Grubbs, A. W.; Williams, R. M. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 6124.
- (a) Stocking, E. M.; Sanz-Cervera, J. F.; Williams, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1675; (b) Sanz-Cervera, J. F.; Williams, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2556.
- Miller, K. A.; Welch, T. R.; Greshock, T. J.; Ding, Y.; Sherman, D. H.; Williams, R. M. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3116.
- Valente, M. W. N.; Williams, R. M. *Heterocycles* **2006**, *70*, 249.
- Rivero-Cruz, B.; Rivero-Cruz, I.; Rodríguez-Sotres, R.; Mata, R. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1147.



An alternative assay to discover potential calmodulin inhibitors using a human fluorophore-labeled CaM protein

Martín González-Andrade^a, Mario Figueroa^b, Rogelio Rodríguez-Sotres^b, Rachel Mata^b, Alejandro Sosa-Peinado^{a,*}

^aFacultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, Mexico

^bFacultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 September 2008

Available online 13 January 2009

Keywords:

Calmodulin

Fluorophore-labeled CaM protein

Fluorescence assay

CaM inhibitors

ABSTRACT

This article describes the development of a new fluorescent-engineered *human* calmodulin, *hCaM* M124C–mBBr, useful in the identification of potential calmodulin (CaM) inhibitors. An *hCaM* mutant containing a unique cysteine residue at position 124 on the protein was expressed, purified, and chemically modified with the fluorophore monobromobimane (mBBr). The fluorophore-labeled protein exhibited stability and functionality to the activation of calmodulin-sensitive cAMP phosphodiesterase (PDE1) similar to wild-type *hCaM*. The *hCaM* M124C–mBBr is highly sensitive to detecting inhibitor interaction given that it showed a quantum efficiency of 0.494, approximately 20 times more than the value for wild-type *hCaM*, and a large spectral change (~80% quenching) when the protein is in the presence of saturating inhibitor concentrations. Two natural products previously shown to act as CaM inhibitors, malbrancheamide (**1**) and tajixanthone hydrate (**2**), and the well-known CaM inhibitor chlorpromazine (**CPZ**) were found to quench the *hCaM* M124C–mBBr fluorescence, and the IC₅₀ values were comparable to those obtained for the wild-type protein. These results support the use of *hCaM* M124C–mBBr as a fluorescence biosensor and a powerful analytical tool in the high-throughput screening demanded by the pharmaceutical and biotechnology industries.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Calmodulin (CaM)¹ is a small Ca²⁺-modulated protein of 148 amino acids (16,706 Da) considered as the primary transducer of Ca²⁺-mediated signals in eukaryotes. It has four motifs called EF hands (each bind a single Ca²⁺ ion) that are composed of two α -helices linked by a 12-residue loop. CaM amino acid sequence is highly conserved in animal and plants, although the latter organisms express several CaM isoforms.

CaM acts on many cellular targets, including soluble enzymes, ion channels, and primary pumps, resulting in a variety of essential downstream cellular effects [1–6]. Accordingly, this protein influences a number of important physiological processes representing

an important drug target [7]. Indeed, many CaM inhibitors are well-known antipsychotic smooth muscle relaxants, antitumoral and α -adrenergic blocking agents, among others. The interaction of CaM with its physiological targets depends on the exposure of two hydrophobic pockets (Fig. 1) following the conformational change elicited by Ca²⁺ binding to the protein.

Many compounds, including drugs, pesticides, and research tools, interact with CaM at the same hydrophobic sites also provoking conformational changes in the protein. Many of these substances behave as CaM antagonists, the best-known structural examples of these interactions are the antipsychotic analogs of trifluoroperazine (TFP) (Fig. 1) [8]. Such interactions can be detected using several analytical methods, including affinity chromatography, ultraviolet (UV), circular dichroism (CD) spectroscopy [9], gel electrophoresis [10,11], nuclear magnetic resonance (NMR) [12,13], X-ray diffraction [8,14–16], functional enzymatic assays [17–19], and fluorescence-based technologies such as fluorescence resonance energy [20–23]. The fluorescence-based methods are highly specific, low cost, selective, and they have rapid reaction time, although sometimes the preparation of the sensing element can be laborious. Among the fluorescence-based methods, the use of site-selective fluorescently labeled CaM has become popular

* Corresponding author. Fax: +52 5 55 623 2419.

E-mail address: asosa@bq.unam.mx (A. Sosa-Peinado).

¹ Abbreviations used: CaM, calmodulin; TFP, trifluoroperazine; UV, ultraviolet; CD, circular dichroism; NMR, nuclear magnetic resonance; *hCaM*, *human* CaM; mBBr, monobromobimane; *hCaM* M124C–mBBr, *hCaM* labeled with mBBr at position 124; PDE1, calmodulin-sensitive cAMP phosphodiesterase; **1**, malbrancheamide; **2**, tajixanthone hydrate; **CPZ**, chlorpromazine; PCR, polymerase chain reaction; cDNA, complementary DNA; LB, Luria–Bertani; OD, optical density; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; DTT, dithiothreitol; DMSO, dimethyl sulfoxide; DTNB, 5-5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid); TNB, 2-nitrobenzoate; BSA, bovine serum albumin; ACN, acetonitrile; SEM, standard error of the mean.

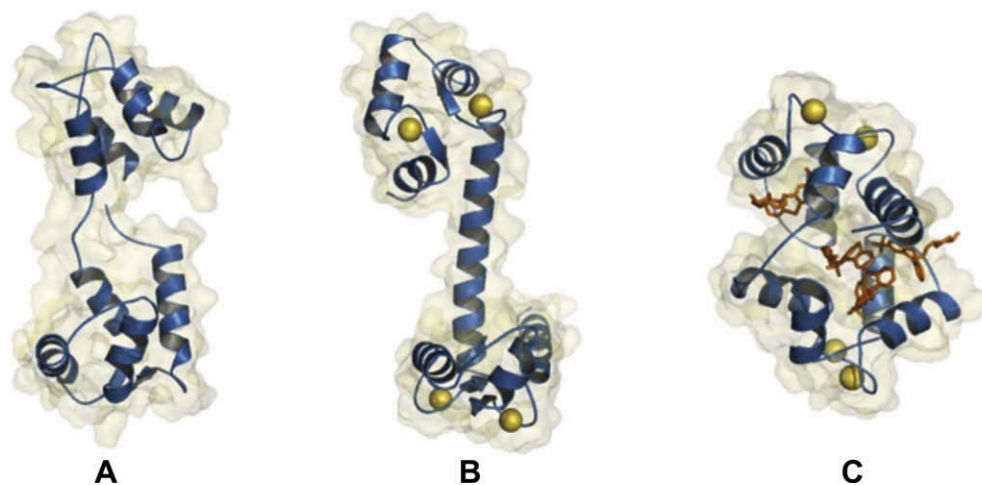


Fig. 1. Three-dimensional structures of CaM in its different conformations: (A) calcium free (Protein Data Bank [PDB] code: 1CFD); (B) with calcium (PDB code: 1CLL); (C) with TFP (PDB code: 1LIN). The structures were drawn using the PyMOL program [38].

recently. In addition, these methods have been demonstrated to be a powerful biosensing system for screening certain classes of drugs such as tricyclic antidepressants [24]. One of the most widely used procedures involves the covalent attachment to CaM of a thiol-reactive fluorophore strategically located using site-directed cysteine mutagenesis. With such a molecular probe, it is possible to correlate the conformational changes with ligand binding by the changes in the emission properties of the labeled proteins.

In previous investigations, it has been determined that the attachment of different fluorophores at the cysteine residue located at position 109 produced better extrinsic fluorescence enhancement on ligand binding [25]. Here we describe the development of a fluorescence-based assay useful for detecting potential CaM inhibitors using a fluorescent human CaM (*hCaM*). The protein was engineered by rational design, replacing Met124 by cysteine using site-directed mutagenesis; the resulting protein, *hCaM* M124C, was purified by hydrophobic exchange chromatography and monobromobimane (mBBr) was attached covalently to Cys124 as fluorescent probe. The fluorophore mBBr was selected because of its high sensitivity. Such sensitivity has been successfully exploited in the elucidation of the secondary structure of T4 lysozyme [26]. The stability and functionality of *hCaM* M124C–mBBr (*hCaM* labeled with mBBr at position 124) were determined by CD measurement and functional enzymatic assay using calmodulin-sensitive cAMP phosphodiesterase (PDE1) as a monitor enzyme. Furthermore, the usefulness of *hCaM* M124C–mBBr was demonstrated by testing the ability of the known CaM inhibitors malbrancheamide (**1**), tajixanthone hydrate (**2**) [27,28], and chlorpromazine (**CPZ**) (Fig. 2) to quench the fluorescence of the engineered protein and to inhibit CaM–PDE1 complex.

Materials and methods

Reagents

CALM1 (human phosphorylase kinase, delta) gene was purchased from Origene Technology (Rockville, MD, USA). pGEM-T Easy Vector System I was purchased from Promega (Madison, WI, USA). pET12b vector was obtained from Novagen (Darmstadt, Germany). Pfu DNA polymerase was purchased from Stratagene (La Jolla, CA, USA). *NdeI* and *BamHI* were obtained from New England Biolabs (Ipswich, MA, USA). Primers for polymerase chain reaction (PCR) mutagenesis and *Escherichia coli* BL21-AI One Shot were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). mBBr was purchased

from Toronto Chemical Research (Toronto, Canada). All other reagents were of analytical reagent grade and were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Subcloning of gene encoding for *hCaM* and site-directed mutagenesis

CALM1 gene encoding *hCaM* was amplified using PCR from the complementary DNA (cDNA) clone pCMV6-XL5 (Origene Technology) along with the primers (5'-CATATGGCTGATCAGCTGACCG-3' and 5'-CCTAGGAGTAAAACGTCAGTAGT AGAC-3') to insert restriction sites *NdeI* and *BamHI* at the start and end of the gene. Amplified products were cloned into a vector (pGEM-T Easy Vector System I) and further subcloned into the protein expression vector pET12b Novagen (EMD Chemicals, Darmstadt, Germany). Single amino acid substitutions were generated by overlapping PCR mutagenesis using the Quick Change Kit (Stratagene). All clones and mutations were confirmed by nucleotide sequencing with an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). In all cases, the single methionine at position 124 in the wild-type sequences was replaced by cysteine to facilitate conjugation of the reporter group to this thiol. Plasmids were transformed into *E. coli* BL21-AI One Shot following the specifications of the kit's manufacturer.

Protein purification of *hCaM* and the mutant *hCaM* M124C

A single colony of *E. coli* strain BL21-AI/pET12b was grown in Luria–Bertani (LB) medium containing 100 mg/ml of ampicillin overnight with shaking at 37 °C and was inoculated into 500 ml of LB medium containing 100 mg/ml of ampicillin until the optical density (OD) of the culture at 550 nm reached between 0.8 and 1.0. Expression was induced by the addition of L-(+)-arabinose (0.2%, w/v) overnight with shaking at 37 °C. The cells were harvested by centrifugation (10 min, 4000g), resuspended in 50 mM Tris–HCl, 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1 mM dithiothreitol (DTT), and 200 mg/ml of egg white lysozyme at pH 7.5 and were chilled on ice for 30 min. Resuspended cells were lysed by sonication, and cellular debris was removed by centrifugation for 15 min at 15,000g. The supernatant was collected, and CaCl₂ and NaCl were added to final concentrations of 5 and 500 mM, respectively. The protein was purified using a Phenyl Sepharose CL-4B chromatographic column. Briefly, the supernatant was applied to the column preequilibrated with 50 mM Tris–HCl, 0.5 mM DTT, 0.1 mM CaCl₂, and 500 mM NaCl at pH 7.5. The col-

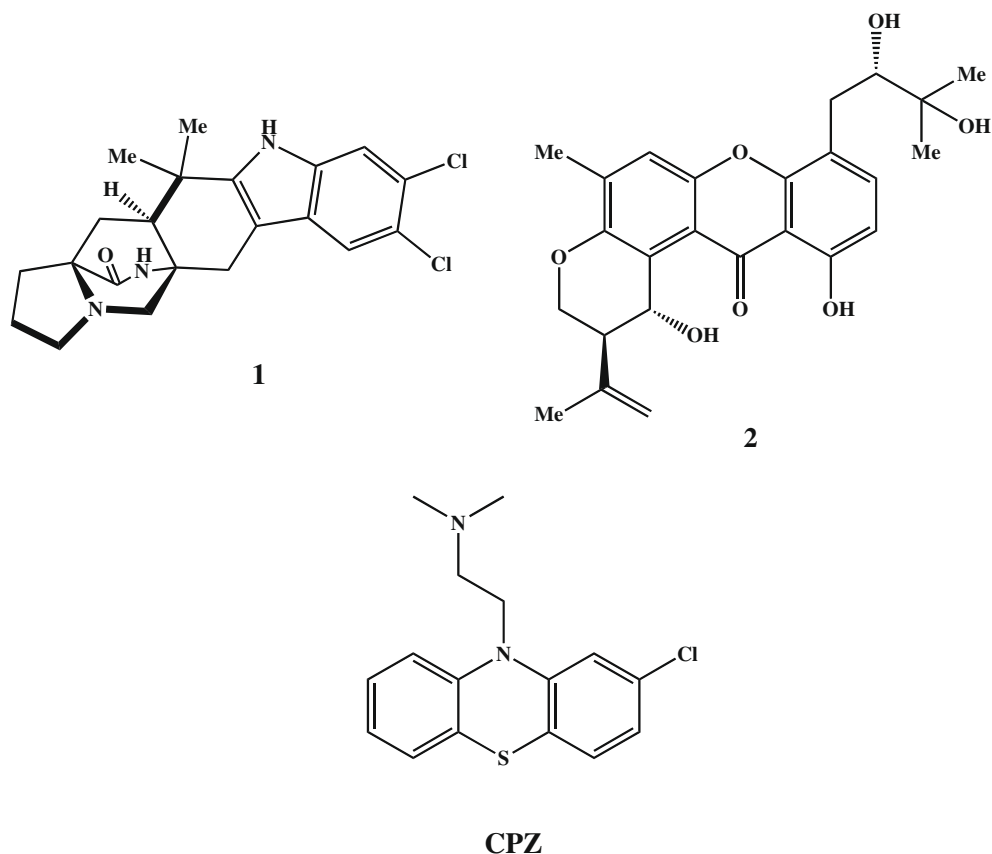


Fig. 2. Structures of compounds **1**, **2**, and **CPZ**. The structures were drawn with ChemBioDraw software (version 11.0, CambridgeSoft, <http://www.cambridgesoft.com>).

umn was washed with loading buffer, followed by the same with 1 mM EDTA and 150 mM NaCl. Finally, the protein was loaded on a cationic exchange column (Source Q, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) at pH 8.8 and was eluted by a linear gradient of 40 min (0–100%) with 500 mM NaCl. Protein was collected in fractions and assessed for purity by gel electrophoresis. All preparations were at least 98% pure by this criterion (Fig. 3).

Chemical modification of unique reactive cysteine of hCaM M124C protein with mBBR

All fluorophore conjugations steps were typically carried out at room temperature. To a protein at a concentration of 5 to 10 mg/ml, 5 mM was added and incubated for 3 h to reduce intramolecular disulfide bonds, and then it was washed on a gel filtration HR-

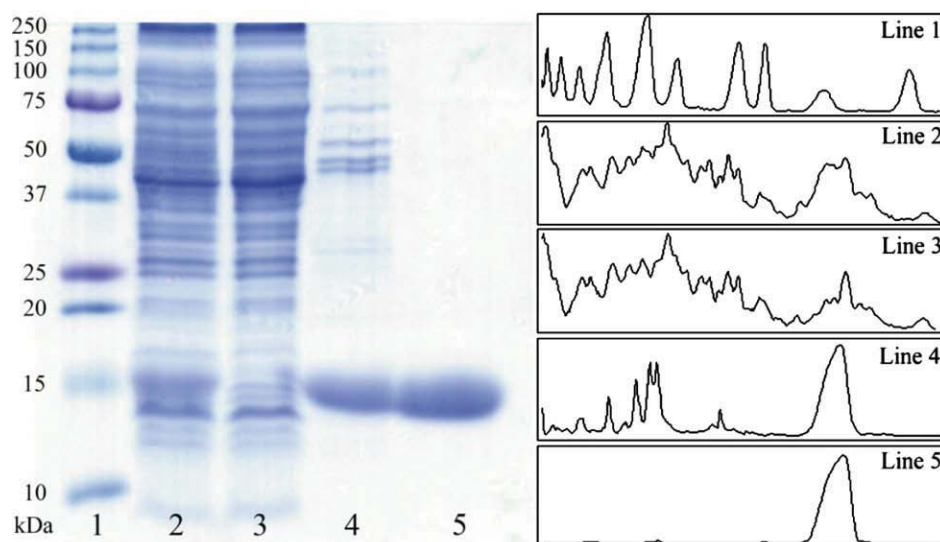


Fig. 3. Purification of hCaM M124C by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) and line profiles. Line 1: molecular weight standard proteins; line 2: supernatant of lysate; line 3: fraction nonbound at Phenyl Sepharose CL-4B column; line 4: fraction bound at Phenyl Sepharose CL-4B column; line 5: hCaM after cationic exchange column. The densitometric profiles were obtained using ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

100 column (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). A thiol-reactive fluorophore (20% in dimethyl sulfoxide [DMSO]) was added in small aliquots to reach a final concentration of 10 molar excess and DMSO of approximately 5%. Conjugation proceeded in the dark overnight at 4 °C. Separation of protein from unreacted fluorophore was achieved by size exclusion chromatography (Superdex 75). The efficiency of report group attachment was assessed by reactivity of the protein against 5-5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic) acid (DTNB), measuring the release of 2-nitrobenzoate (TNB). Next, protein concentrations of both wild-type and labeled hCaM were determined with the bicinchoninic acid method [29].

Circular dichroism

CD wavelength scans and thermal melting data were recorded on a JASCO J-715 spectropolarimeter under an N₂ atmosphere with an attached thermal Peltier temperature control module. Thermal denaturation of hCaM wild-type and hCaM M124C-mBBr was monitored at 222 nm with a resolution step of 0.5 °C, a bandwidth of 1.0 nm, and a response time of 16 s. The concentration of protein used was 5 μM in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 5.1). The sample was heated at a rate of 60 °C/h from 20 to 90 °C. Data were analyzed using the spectra manager software (version 1.50.00) supplied with the instrument and using a nonlinear regression analysis to a two-state model with the Origin 7.0 program (Origin-Lab, Northampton, MA, USA):

$$\theta = \frac{(\theta_N + m_N[T]) + (\theta_U + m_U[T])e^{-(\Delta H_m/RT + \Delta H_m/RT_m)}}{1 + e^{-(\Delta H_m/RT + \Delta H_m/RT_m)}}, \quad (1)$$

where θ_N and θ_U represent the molar ellipticity in the native and unfolded states, respectively; m_N and m_U represent the temperature dependence of the molar ellipticity in the native and unfolded states, respectively; T represents temperature (K); R represents ideal gas constant (kcal mol⁻¹ K⁻¹); ΔH represents change in enthalpy (kcal mol⁻¹ K⁻¹); and T_m represents melting temperature (K).

Steady-state fluorescence

All measurements were conducted with an ISS-PC1 spectrofluorometer (ISS, Champaign, IL, USA) with sample stirring at 37 °C. The protein hCaM M124C-mBBr (5 μM) was incubated in buffer (100 mM phosphate [pH 5.1] and 10 mM CaCl₂). Fluorescence emission spectra were acquired with excitation and emission slit widths of 4 and 8 nm, respectively. The excitation wavelength was 381 nm, and emission wavelengths of 420 to 640 nm were measured. The fractional degree of saturated hCaM M124C-mBBr with ligand (y) was calculated by changes in fluorescence on ligand binding according to $y = (F - F_0) / (F_\infty - F_0)$, where F_∞ represents the fluorescence intensity at saturation of the ligand, y is plotted as a function of the inhibitor concentration, and the apparent dissociation constants (K_d) were obtained by fitting to Eq. (2):

$$y = \frac{(1 + K_d/P_0 + L_0/P_0) - \sqrt{(1 + K_d/P_0 + L_0/P_0)^2 - 4L_0/P_0}}{2}, \quad (2)$$

where y represents the fractional degree of fluorescence intensity at 470 nm, K_d is the apparent dissociation constant for the ligands, and P_0 and L_0 are the total concentrations of the protein and ligand, respectively. The data were analyzed using the Origin 7.0 program.

hCaM-PDE1 bioassay

hCaM-PDE1 assay was performed in a 96-well plate as described previously [30] with some modifications. Briefly, wild-type hCaM or hCaM M124C-mBBr (0.08 μg) was incubated with 0.015 units of CaM-deficient/CaM-dependent cAMP phosphodiesterase

from bovine brain for 30 min in 40 μl of assay solution containing 0.063 units of 5'-nucleotidase, 45 mM Tris-HCl, 5.6 mM magnesium acetate, 45 mM imidazole, 2.5 mM calcium chloride, and 10 μM bovine serum albumin (BSA) at pH 7.0. Test compounds were then added to the assay medium at 0.5, 1, 2, 3, 4, 7, 13, 20, 32, 50, and 65 μM in acetonitrile (ACN)/water (1:1), and the samples were incubated for 30 min. After that, 10 μl of 10.8 mM cAMP was added to start the assay. After 15 min, the assay was stopped by the addition of 190 μl of Malachite green solution. The phosphodiesterase reaction was coupled to the 5'-nucleotidase (*Crotalus atrox* venom from Sigma) reaction; the amount of inorganic phosphate released, measured spectrophotometrically at 700 nm, was correlated with the activity of the PDE1. All of the results are expressed as the mean of at least six experiments ± standard error of the mean (SEM). The IC₅₀ values were determined by nonlinear regression analysis performed with the Origin 7.0 program as reported previously [28].

Results and discussion

Design of a suitable site for hCaM mutagenesis

The specificity of the interaction of CaM with its molecular targets and its role in the regulation of several biochemical processes make this protein a powerful research tool to explore its physiological role and a target for drug discovery. Therefore, we have specifically labeled a cysteine residue at 124 with mBBr, a sensitive fluorescent probe, to yield a new hCaM variant (Fig. 4) following a rational approach with the goal of preserving the structural and functional properties of the native protein. The cysteine residue was introduced exchanging Met124 by site-directed mutagenesis. This position was selected for the following reasons. First, X-ray analyses of cocrystallized CaM-Ca²⁺-TFP complex indicated the participation of 14 side chains in the binding site [25], including Met124; specifically, this position interacts with two molecules of TFP (Fig. 4). Furthermore, when TFP binds to CaM-Ca²⁺, residue Met124 moves from being totally exposed to a buried position near the hydrophobic pocket (Fig. 4). Second, Met124 is located in a relative rigid α-helical region; therefore, disruption in the native fold

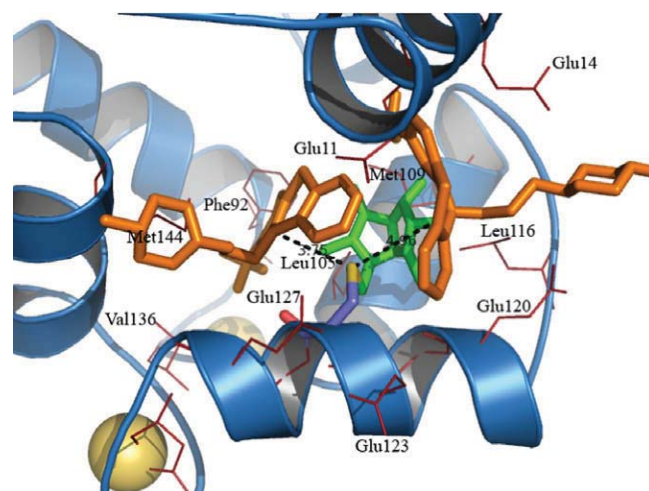


Fig. 4. In silico model of the mutation of cysteine residue and bimane attachment (hCaM M124C-mBBr) created using HyperChem software (version 7.5, HyperCube, <http://www.hyper.com>), by a geometric optimization using the AMBER force field, reaching a minimum gradient of 0.01 kcal Å⁻¹ mol⁻¹. Red lines show amino acid of the site binding in the CaM-TFP complex, green sticks show mBBr, orange sticks show TFP, and pale yellow balls show Ca²⁺. Hydrogens are omitted for clarity. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

of the protein for the formation of disulfide-linked aggregates is unlikely. This position also shows a large chemical shift change in the ^1H and ^{13}C NMR spectra when the protein is titrated with the inhibitor W-7 [31]. Therefore, the microenvironment surrounding position 124 is very susceptible to CaM inhibitors. Accordingly, attachment of a fluorophore at this position should report any conformational change on the inhibitor binding. Third, we carried out *in silico* studies of the modified protein using the HyperChem 7.5 program. When the structure was minimized to a 0.09 kcal/mol gradient with the AMBER94 force field, the linear distances from the thiol group of Cys124 (Cys124 SG) to N1 of each TFP molecule present in the Ca^{2+} -CaM-TFP complex were 3.75 and 4.96 Å, respectively. These distances were small enough to allow fluorescent quenching by the inhibitors but large enough to pose no severe steric hindrance on binding of a medium-sized ligand. Fourth, the solvent accessibility of hCaM M124C calculated by the Lee-Richards algorithm implemented in NACCESS 2.1.1 software [32] was 60.5 \AA^2 ; thus, the inclusion of a small fluorophore such as mBBr should not affect its stability [26]. In summary, modification at position 124 was in agreement with previous work described in the literature [26,33].

The hCaM M124C was generated as described in Materials and methods and was chemically modified to give the corresponding hCaM M124C-mBBr.

Stability and functionality of hCaM M124C-mBBr

The folding, stability, and functionality of both the wild-type and mutant hCaM M124C-mBBr were studied by monitoring structural changes in the overall conformation using physical methods [34,35] (far-UV CD) and an enzymatic assay. The percentages of secondary structure elements calculated from the far-UV CD spectra of both wild-type and hCaM M124C-mBBr do not show significant variations (84.27% α -helix and 1.24% β -structure) (Fig. 5A). The T_m values of wild-type hCaM and hCaM M124C-mBBr were 61 and 57 °C, respectively, suggesting thermal stability in both cases (Fig. 5B). The modified protein also displayed a significant activation of the PDE1. The IC_{50} values obtained for CPZ by PDE1 assays are consistent with those reported previously in the literature [9,36,37] (Table 1).

Titration of hCaM M124C-mBBr with compounds 1, 2, and CPZ

The modified protein showed a quantum efficiency of 0.494, approximately 20 times more than the value for wild-type hCaM

Table 1

Experimental IC_{50} values and apparent K_d values of compounds 1, 2, and CPZ determined by PDE1 and fluorescent assays.

Compound	hCaM WT	hCaM M124C-mBBr	
	IC_{50} (μM) ^a	IC_{50} (μM) ^a	K_d (μM) ^b
1	3.65 ± 0.74	3.04 ± 0.11	0.261 ± 0.023
2	5.62 ± 1.25	5.58 ± 0.20	0.033 ± 0.006
CPZ	21.98 ± 1.94	19.20 ± 0.36	1.714 ± 0.184

^a Determined by PDE1 assay.

^b Determined by fluorescent assay.

($\phi = 0.025$). hCaM M124C-mBBr displayed the largest fluorescence response at 470 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 381$ nm), thereby avoiding any interference due to UV absorption of most common ligands.

Fig. 6 and Table 1 summarize the concentration-dependent effect of compounds 1, 2, and CPZ on the fluorescence response of hCaM M124C-mBBr. The addition of compound 2 and CPZ quenched the fluorescence of the engineered protein in approximately 84%, whereas compound 1 showed a slightly smaller response (78%). In all cases, the effect correlated with the structural changes of the protein on binding of the inhibitor (Figs. 4 and 6).

The signal changes maximal in fluorescence (470 nm) was plotted versus the inhibitor/protein total ratio, and the fitting curves provided an apparent K_d (see Materials and methods). The K_d of CPZ was similar to that reported previously for antagonists of the CaM [40]. The IC_{50} values calculated for CPZ, 1, and 2 were consistent with those previously reported [9,27,36] and those found in the current study with native hCaM (Table 1), providing an important evidence of the specificity of hCaM M124C-mBBr.

Conclusions

A new fluorescent-engineered hCaM, hCaM M124C-mBBr, has been designed by a combination of site-directed mutagenesis and covalent attachment of a fluorophore probe. The protein is stable and functional for activation of PDE1 and shows promise for detecting new CaM inhibitors in a reliable, quick, and sensitive manner. The fluorophore-labeled protein detects classic CaM inhibitors such as CPZ and was used strategically for reevaluating two natural products. Its efficacy was demonstrated by means of a functional enzymatic assay and by fluorescence spectroscopy. Finally, hCaM M124C-mBBr can be used as an important tool for identifying new CaM inhibitors that will be useful as potential

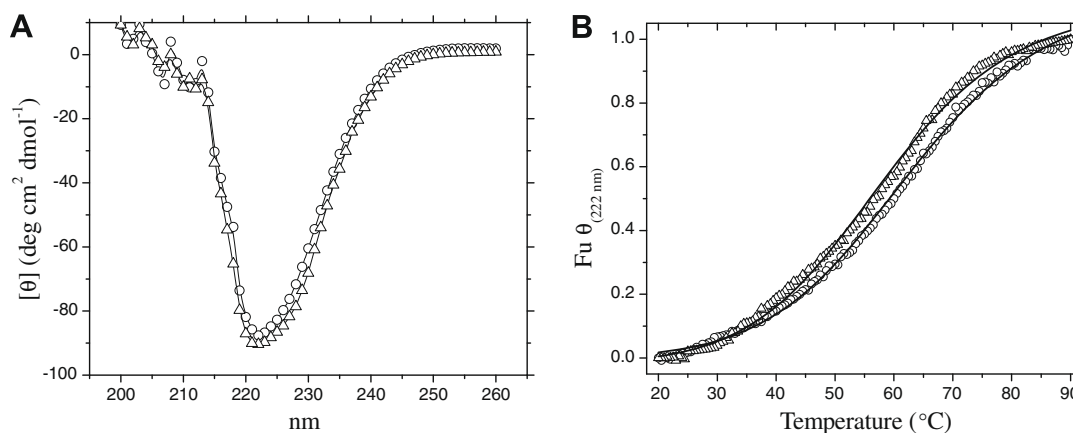


Fig. 5. Far-UV CD spectra (A) and molar ellipticity at 222 nm (B) for Apo-hCaM WT (○) and hCaM M124C-mBBr (Δ). The secondary structures in the presence of Ca^{2+} were determined from CD spectra using K2D2 program [39]. Thermal denaturation for both proteins were monitored by the changes in molar ellipticity as a function of the temperature, from 20 to 90 °C. The buffer was 100 mM sodium phosphate (pH 5.1). The solid lines are the best fits using Eq. (1) (see Materials and methods).

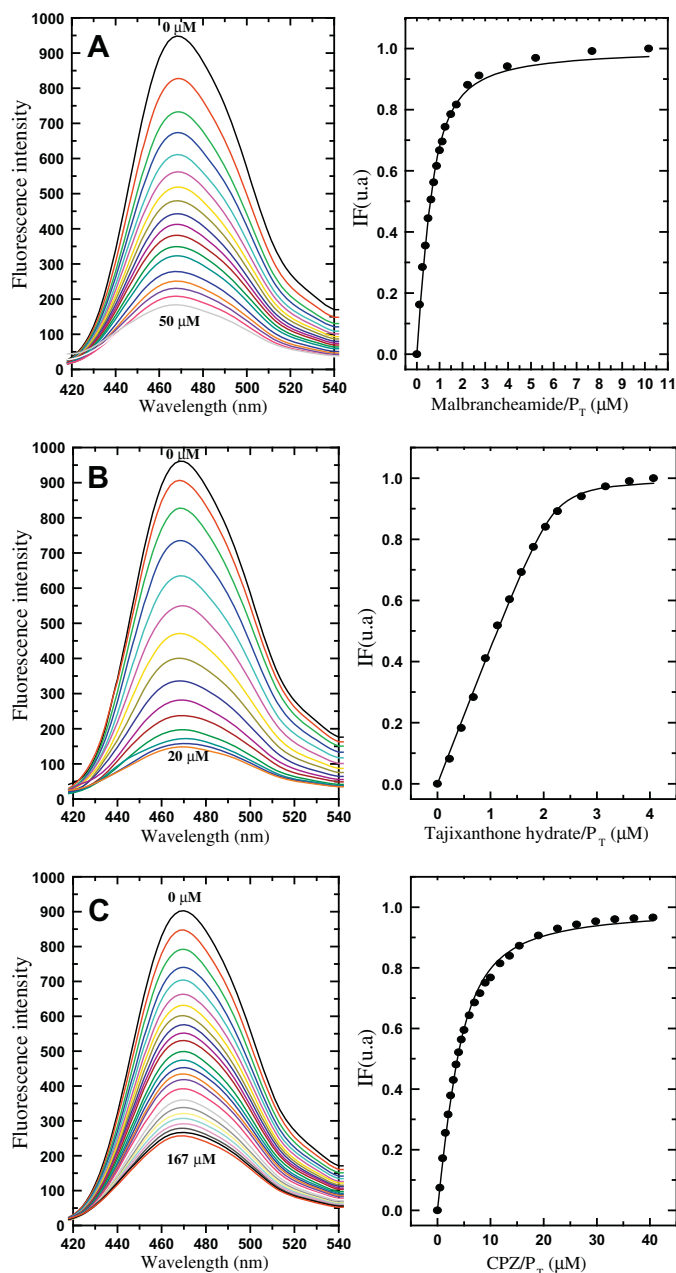


Fig. 6. Titration by fluorescence of engineered *hCaM* with compounds **1** (A), **2** (B), and **CPZ** (C) (left panels). Buffer was 5 mM KAc (pH 5.1) at 37 °C and 1 mM CaCl₂, and excitation was at 381 nm. The absolute changes of fluorescence emission at 470 nm (ΔF) were plotted against the ratio inhibitor/protein and fitted to the binding equation model to obtain the fractional degree of saturated *hCaM* M124C-mBBR (right panels).

drugs or pesticides. Another possibility not tested in this work is to use *hCaM* M124C-mBBR to detect new potential protein–protein interactions given that this protein conserved functionality to interact with PDE1.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, IN216207) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, 53633 and 41328Q). The technical assistance of Isabel Rivero-Cruz is also recognized. M.G.A. acknowledges a fellowship for Ph.D. studies from CONACyT.

References

- [1] E. Carafoli, C.B. Klee, Calcium as a Cellular Regulator, Oxford University Press, New York, 1999.
- [2] M. Zhang, T. Yuan, Molecular mechanisms of calmodulin's functional versatility, *Biochem. Cell Biol.* 76 (1998) 313–323.
- [3] H. Weinstein, E.L. Mehler, Ca²⁺-binding and structural dynamics in the functions of calmodulin, *Annu. Rev. Physiol.* 56 (1994) 213–236.
- [4] R.E. Zielinski, Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49 (1998) 697–725.
- [5] K.T. O'Neil, W.F. DeGrado, How calmodulin binds its targets: sequence independent recognition of amphiphilic α -helices, *Trends Biochem. Sci.* 15 (1990) 59–64.
- [6] M.J. Berridge, M.D. Bootman, H.L. Roderick, Calcium signalling: dynamics, homeostasis, and remodelling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 (2003) 517–529.
- [7] R. Dagher, C. Pigault, D. Bonnet, D. Boeglin, C. Pourbaix, M.C. Kilhoffer, P. Villa, C.G. Wermuth, M. Hibert, J. Haiech, Use of a fluorescent polarization based high throughput assay to identify new calmodulin ligands, *Biochim. Biophys. Acta* 1763 (2006) 1250–1255.
- [8] B.G. Vertessy, V. Harmat, Z. Bocskei, G. Naray-Szabo, F. Orosz, J. Ovadi, Simultaneous binding of drugs with different chemical structures to Ca²⁺-calmodulin: crystallographic and spectroscopic studies, *Biochemistry* 37 (1998) 15300–15310.
- [9] S. Martinez-Luis, A. Perez-Vasquez, R. Mata, Natural products with calmodulin inhibitor properties, *Phytochemistry* 68 (2007) 1882–1903.
- [10] M. Charpentreau, K. Jaworski, B.C. Ramirez, A. Tretyr, N. Ranjeva, B. Ranty, A receptor-like kinase from *Arabidopsis thaliana* is a calmodulin-binding protein, *Biochem. J.* 379 (2004) 841–848.
- [11] B. Liao, M.C. Gawienowski, R.E. Zielinski, Differential stimulation of NAD kinase and binding of peptide substrates by wild-type and mutant plant calmodulin isoforms, *Arch. Biochem. Biophys.* 327 (1996) 53–60.
- [12] J.J. Chou, S. Li, A. Bax, Study of conformational rearrangement and refinement of structural homology models by the use of heteronuclear dipolar couplings, *J. Biomol. NMR* 18 (2000) 217–227.
- [13] D.J. Lalor, T. Schnyder, V. Saridakis, D.E. Pilloff, A. Dong, H. Tang, T.S. Leyh, E.F. Pai, Structural and functional analysis of a truncated form of *Saccharomyces cerevisiae* ATP sulfurylase: C-terminal domain essential for oligomer formation but not for activity, *Protein Eng.* 16 (2003) 1071–1079.
- [14] R. Chattopadhyaya, W.E. Meador, A.R. Means, F.A. Quiocho, Calmodulin structure refined at 1.7 Å resolution, *J. Mol. Biol.* 228 (1992) 1177–1192.
- [15] H. Kuboniwa, N. Tjandra, S. Grzesiek, H. Ren, C.B. Klee, A. Bax, Solution structure of calcium-free calmodulin, *Nat. Struct. Biol.* 2 (1995) 768–776.
- [16] T. Okubo, S. Okada, Kinetic analyses of colloidal crystallization in alcoholic organic solvents and their aqueous mixtures as studied by reflection spectroscopy, *J. Colloid Interface Sci.* 204 (1998) 198–204.
- [17] S.P. Chock, C.Y. Huang, An optimized continuous assay for cAMP phosphodiesterase and calmodulin, *Anal. Biochem.* 138 (1984) 34–43.
- [18] A.C. Harmon, H.W. Jarrett, M.J. Cormier, An enzymatic assay for calmodulins based on plant NAD kinase activity, *Anal. Biochem.* 141 (1984) 168–178.
- [19] R.K. Sharma, J.H. Wang, Preparation and assay of the Ca²⁺-dependent modulator protein, *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 10 (1979) 187–198.
- [20] M.W. Allen, R.J. Urbauer, A. Zaidi, T.D. Williams, J.L. Urbauer, C.K. Johnson, Fluorescence labeling, purification, and immobilization of a double cysteine mutant calmodulin fusion protein for single-molecule experiments, *Anal. Biochem.* 325 (2004) 273–284.
- [21] B. Sharma, S.K. Deo, L.G. Bachas, S. Daunert, Competitive binding assay using fluorescence resonance energy transfer for the identification of calmodulin antagonists, *Bioconj. Chem.* 16 (2005) 1257–1263.
- [22] E. Dikici, S.K. Deo, S. Daunert, A whole-cell assay for the high throughput screening of calmodulin antagonists, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 2073–2079.
- [23] J.P. Gangopadhyay, Z. Grabarek, N. Ikemoto, Fluorescence probe study of Ca²⁺-dependent interactions of calmodulin with calmodulin-binding peptides of the ryanodine receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323 (2004) 760–768.
- [24] P.M. Douglass, L.L. Salins, E. Dikici, S. Daunert, Class-selective drug detection: fluorescently-labeled calmodulin as the biorecognition element for phenothiazines and tricyclic antidepressants, *Bioconj. Chem.* 13 (2002) 1186–1192.
- [25] L.C. Vesna Schauer-Vukasinovic, S. Daunert, Rational design of a calcium sensing system based on induced conformational change of calmodulin, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 11102–11103.
- [26] S.E. Mansoor, H.S. McHaourab, D.L. Farrens, Determination of protein secondary structure and solvent accessibility using site-directed fluorescence labeling: studies of T4 lysozyme using the fluorescent probe monobromobimane, *Biochemistry* 38 (1999) 16383–16393.
- [27] M. Figueroa, M.C. González, R. Rodríguez-Sotres, A. Sosa-Peinado, M. González-Andrade, C.M. Cerda-García-Rojas, R. Mata, Calmodulin inhibitors from the fungus *Emericella* sp., *Bioorg. Med. Chem.* (in press), doi:10.1016/j.bmc.2008.10.079.
- [28] S. Martínez-Luis, L. Acevedo, M.C. González, R. Rodríguez-Sotres, A. Lira-Rocha, R. Mata, Malbrancheamide, a new calmodulin inhibitor from the fungus *Malbranchea aurantiaca*, *Tetrahedron* 62 (2006) 1817–1822.
- [29] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* 150 (1985) 76–85.

- [30] B. Rivero-Cruz, I. Rivero-Cruz, R. Rodríguez-Sotres, R. Mata, Effect of natural and synthetic benzyl benzoates on calmodulin, *Phytochemistry* 68 (2007) 1147–1155.
- [31] M. Osawa, M.B. Swindells, J. Tanikawa, T. Tanaka, T. Mase, T. Furuya, M. Ikura, Solution structure of calmodulin–W-7 complex: the basis of diversity in molecular recognition, *J. Mol. Biol.* 276 (1998) 165–176.
- [32] B. Lee, F.M. Richards, The interpretation of protein structures: Estimation of static accessibility, *J. Mol. Biol.* 55 (1971) 379–400.
- [33] R.M. de Lorimier, J.J. Smith, M.A. Dwyer, L.L. Looger, K.M. Sali, C.D. Paavola, S.S. Rizk, S. Sadigov, D.W. Conrad, L. Loew, H.W. Hellinga, Construction of a fluorescent biosensor family, *Protein Sci.* 11 (2002) 2655–2675.
- [34] R.R. Biekofsky, S.R. Martin, J.E. McCormick, L. Masino, S. Fefeu, P.M. Bayley, J. Feeney, Thermal stability of calmodulin and mutants studied by ^1H – ^{15}N HSQC NMR measurements of selectively labeled $[^{15}\text{N}]$ Ile proteins, *Biochemistry* 41 (2002) 6850–6859.
- [35] L. Masino, S.R. Martin, P.M. Bayley, Ligand binding and thermodynamic stability of a multidomain protein, calmodulin, *Protein Sci.* 9 (2000) 1519–1529.
- [36] S.Z. Khan, C.L. Longland, F. Michelangeli, The effects of phenothiazines and other calmodulin antagonists on the sarcoplasmic and endoplasmic reticulum Ca^{2+} pumps, *Biochem. Pharmacol.* 60 (2000) 1797–1806.
- [37] M. Figueroa, M.C. González, R. Mata, Malbrancheamide B, a novel compound from the fungus *Malbranchea aurantiaca*, *Nat. Prod. Res.* 22 (2008) 709–714.
- [38] J.D. Johnson, L.A. Wittenauer, A fluorescent calmodulin that reports the binding of hydrophobic inhibitory ligands, *Biochem. J.* 211 (1983) 473–479.
- [39] W.L. DeLano, Use of PYMOL as a communications tool for molecular science, *Abstracts Papers Am. Chem. Soc.* 228 (2004) U313–U314.
- [40] M.A. Andrade, P. Chacon, J.J. Merelo, F. Moran, Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network, *Protein Eng.* 6 (1993) 383–390.

Congresos internacionales

- Póster 086S. **Mario Figueroa**, María del Carmen González, Rachel Mata. Phytotoxic compounds from a new *Emericella* species. 48th American Society of Pharmacognosy, Portland ME, US, **2007**.

- Póster PHP-2. **Mario Figueroa**, María del Carmen González, Rachel Mata. Phytotoxic compounds from a new *Emericella* species. 2007 Phytochemical Society of North America Annual Meeting, Saint Louis, MO, US, **2007**.

- Póster PB91. Tajixanthones analogs from a new *Emericella* sp. strain 25379. **Figueroa M**, Cerda-García-Rojas C, Mata R. 7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF on Natural products with pharmaceutical, nutraceutical, cosmetic and agrochemical interest, Atenas, Grecia, **2008**. Premio ASP Lynn Brady Travel Awards.

- Póster PB146. Calmodulin-inhibitor activity of tajixanthone analogues from the fungus *Emericella* sp. strain 25379. **Figueroa M**, González M, Rodríguez-Sotres R, Mata R. 7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF on Natural products with pharmaceutical, nutraceutical, cosmetic and agrochemical interest, Atenas, Grecia, **2008**. Premio ASP Lynn Brady Travel Awards.

- Póster PB92. Malbrancheamides B and C, novel alkaloids from the fungus *Malbranchea aurantiaca*. **Figueroa M**, González M, Mata R. 7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF on Natural products with pharmaceutical, nutraceutical, cosmetic and agrochemical interest, Atenas, Grecia, **2008**. Premio ASP Lynn Brady Travel Awards.