

Tesis Doctoral

Estudio de la relación estructura-función en Proteínas quinasa

López, Elías Daniel

2017

Este documento forma parte de las colecciones digitales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en bibliotecadigital.exactas.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the digital collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in bibliotecadigital.exactas.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

López, Elías Daniel. (2017). Estudio de la relación estructura-función en Proteínas quinasa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6459_Lopez

Cita tipo Chicago:

López, Elías Daniel. "Estudio de la relación estructura-función en Proteínas quinasa". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017.
https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6459_Lopez

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Estudio de la relación estructura-función en *Proteínas quinasa*

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área Química Biológica

Elías Daniel López

Directores de tesis: Adrián Gustavo Turjanski

Consejero de estudios: Valeria Levi

Lugar de trabajo: Departamento de Química Biológica, FCEN-UBA e INQUIMAE-UBA/CONICET

Buenos Aires, 2017

0.1 Resumen

La fosforilación de proteínas es el tipo de modificación post-traducciona más común, utilizado en los sistemas de transducción de señales. Afecta a diversos procesos celulares básicos, como por ejemplo: metabolismos, crecimiento, división celular, diferenciación, tráfico, transporte de membrana, inmunidad, aprendizaje, por nombrar solo algunos. En este contexto, la regulación aberrante de proteínas quinasas en humanos cobra relevancia puesto que está asociada al desarrollo de cáncer y otros desórdenes proliferativos y en procariotas tiene un rol preponderante en el proceso infectivo y de latencia.

En relación a esto, dos familias de proteínas; MAPKs en humanos y PKNs en *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) resultan interesantes. La MAPKs constituyen vías de transducción de señales, que amplifican y transmiten información para la modulación de la transcripción génica. Estos sistemas altamente conservados con representantes desde plantas hasta mamíferos presentan la particularidad de estar asociados a desórdenes proliferativos, puesto que ellos responden a una gran variedad de factores de crecimiento con proliferación celular. Esto hace de la vía MAPKs una de las principales cascadas de señalización estudiadas en relación a patologías como cáncer, diabetes, etc. Por otra parte, la familia PKNs pertenece a una familia de ser/thr proteínas quinasas similares a las eucariotas que en particular en Mtb controlan procesos metabólicos o infectivos constituyendo importantes factores de virulencia y/o latencia. Cabe destacar, que debido a la alta prevalencia de la tuberculosis a nivel mundial, y puesto que sigue siendo la principal causa de muerte entre los infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV); hace del Mtb, el agente etiológico de la tuberculosis, un importante blanco para terapias anti-tuberculínicas.

En este trabajo hemos abordado aspectos fundamentales de la catálisis de ERK2 humana, pknB y pknG de Mtb, poniendo particular énfasis en: cómo es el mecanismo de activación, el proceso de fosforilación y el reconocimiento de sustratos por parte de la quinasas. En particular avanzamos en la comprensión de la importancia de la formación de un puente salino dentro del sitio activo de ERK2, entre la lys⁵² y el glu⁷¹ importante para modular la actividad quinasas. Como resultado de esto, observamos que agrega restricciones topológicas sobre el ATP, y favorece la unión de un segundo MG⁺² en el sitio activo, estabilizando el estado de transición y por ende, acelerando el proceso de fosforilación. Por otra parte, en la familia "PKNs" de Mtb, entendimos la fosforilación diferencial de residuos treonina de su principal sustrato GarA, como el resultado de diferencias en la topología

del sitio de unión del mismo, descubriendo que pknG cuenta con un bolsillo hidrofóbico para el anclaje del sustrato, mientras que pknB lo ancla mediante interacciones de naturaleza polar. Por último incluimos la descripción atomística de cómo las MAPKs reconocen sus sustratos, estudiando los determinantes estructurales del reconocimiento por parte de ERK2 en un sitio distal al sitio activo, conocido como sitio de "docking". Es importante resaltar que los mecanismos y modelos propuestos pueden ser extendidos a otras familias de proteínas quinasa y el entendimiento de la activación de las mismas, resultan de gran importancia para el desarrollo farmacológico en torno a estos blancos moleculares.

0.2 Abstract

Protein phosphorylation is the most common post-translational modification, used in the signal transduction systems. It affects many basic cellular processes, such as: metabolism, growth, cell division, differentiation, traffic, membrane transport, immunity, learning, to name a few. In this context, aberrant regulation of protein kinase in human becomes important since it is associated with the development of cancer and other proliferative disorders and in prokaryotes plays an important role in the infective process and latency. Accordingly, two families of proteins; MAPKs in humans and PKNS in *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) are interesting. The MAPKs constitute signal transduction pathways that amplify and transmit information to the modulation of gene transcription. These highly conserved systems with representatives from plants to mammals have the peculiarity of being associated with proliferative disorders, since they respond to a variety of growth factors with cell proliferation. This makes a major MAPKs signaling cascades studied in relation to diseases such as cancer, diabetes pathway, etc. Moreover, the PKNS family belongs to a family of Ser/ Thr similar to eukaryotic control Mtb particularly metabolic or infectious processes constitute important virulence factors and / or protein kinase latency. It is noteworthy that due to the high prevalence of tuberculosis worldwide, and since it remains the leading cause of death among those infected with the human immunodeficiency virus (HIV); It makes Mtb, the etiologic agent of tuberculosis, an important target for anti-tuberculin therapies. In this work we have addressed fundamental aspects of catalysis of human ERK2, pknB and pknG Mtb, with particular emphasis on: how is the trigger mechanism, the process of phosphorylation and substrate recognition by the kinase. In particular advance in the understanding of the importance of the formation of a salt bridge within the active site of ERK2, between lys52 and important to modulate the kinase activity glu71. As a result, we note that adds topological constraints on ATP, and promotes the binding of a second MG+2 at the active site, stabilizing the transition state and thus accelerating the process of phosphorylation. Moreover, in the "PKNS" family Mtb, we understood differential phosphorylation of threonine residues of its major substrate GarA, as the result of differences in the topology of the binding site thereof, finding that pknG has a hydrophobic pocket anchoring the substrate while pknB anchors through interactions of polar nature. Finally we include the atomistic description of how MAPKs recognize their substrates, studying the structural determinants of recognition of ERK2 in a site distal to

the active site, site known as "docking". Importantly proposed models and mechanisms can be extended to other families of protein kinases and understanding of the activation of the same, are of great importance for drug development around these molecular targets.

Índice

0.1	Resumen	iii
0.2	Abstract	v
1	Introducción	1
1.1	Protein quinasas en el sistema de transducción de señales.	2
1.2	Regulación de protein quinasas	4
1.3	Mitogen-activated protein kinases (MAPK)	5
1.3.1	Rol de las MAPKs en oncogénesis	7
1.3.2	Aspectos estructurales de la regulación de MAPKs	9
1.4	La familia PKN en <i>M. tuberculosis</i>	12
1.4.1	Proteína quinasa PknG	13
1.4.2	Proteína quinasa PknB.	14
1.4.3	Relación Estructura función en PKNs de <i>Mtb</i>	15
1.5	Descripción general de la Disertación	16
2	La activación de MAPKs es controlada por la conformación del ATP.	27
2.1	Introducción	27
2.2	Resultados	32
2.2.1	Cambios conformacionales asociados a la activación de ERK2	32
2.2.2	Estabilización de la hélice αC por el <i>loop</i> L16	36
2.2.3	La activación promueve la formación del puente salino.	39
2.2.4	El puente salino es importante para la reacción	43
2.3	Conclusiones	45
2.4	Materiales y métodos	46
2.5	Información Suplementaria	51
3	Especificidad y reactividad de la familia PknB y PknG de <i>M. tuberculosis</i>.	59
3.1	Introducción	59

3.1.1	Activación de la familia PKN en <i>Mtb</i>	60
3.1.2	GarA como sustrato de pknG y pknB.	61
3.2	Resultados	62
3.2.1	Determinantes estructurales de la activación de pknB y pknG	62
3.2.2	Dinámica Molecular clásica de pknB y pknG	64
3.2.3	Rol de α C en pknG.	70
3.2.4	Mecanismo de reacción para la familia pknB y pknG	71
3.3	Conclusiones y discusión	74
3.4	Materiales y métodos	76
3.5	Información Suplementaria	79
4	Bases moleculares del reconocimiento proteína-proteína por parte de MAPKs.	87
4.1	Introducción	87
4.1.1	Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs)	88
4.2	Resultados	91
4.2.1	Desempeño del campo de fuerzas <i>FoldX</i> sobre mutantes puntuales. . .	91
4.2.2	Diseño de péptidos inhibidores.	96
4.2.3	Comparación entre las matrices obtenidas a través de cristales vs dinámica.	98
4.3	Conclusiones	100
4.4	Materiales y métodos	101
5	Conclusiones generales y perspectivas.	107
5.1	Conclusiones	107
5.2	Perspectivas	109
6	Métodos computacionales	115
6.1	Dinámica molecular clásica	115
6.1.1	Campos de fuerza clásicos	116
6.1.2	Dinámica molecular	119
6.2	La mecánica cuántica	120
6.2.1	SCC-DFTB	121
6.3	Dinámica molecular híbrida (QM/MM)	123
6.4	Métodos de estimación de energía libre	125
6.4.1	Inigualdad de Jarzynski	126

6.4.2	Determinación del ΔG_U mediante MM/PBSA.	127
6.4.3	RMSD	128
6.4.4	Campo de fuerza <i>FoldX</i>	128
Anexos		135
Publicaciones		137
.1	Publicaciones que surgieron de resultados de este trabajo de Tesis Doctoral. .	137
.2	Publicaciones no relacionadas directamente con este trabajo de Tesis Doctoral.	137

CAPÍTULO 1

Introducción

El objetivo de mi tesis es dilucidar los determinantes estructurales de la regulación de la actividad quinasas. Es decir, como la activación y/o interacción con sustratos la modulan. En particular haré foco en la interacción y/o modulación por sustratos y ATP sobre las proteínas de estudio y el efecto de dicha modulación en el proceso de fosforilación.

Las proteínas quinasas actúan como los procesadores de información celular, y como cabe de esperar deben responder a estímulos externos y de esta manera transmitirlos para que la célula haga uso de dicha información. La manera en que logra esto, es fosforilando otras proteínas post-traduccionalmente marcándolas con un fosfato en un sitio en particular. La regulación espacio-temporal del proceso de fosforilación en residuos serina, treonina, o tirosinas es crucial para el desarrollo y crecimiento celular. El control de procesos celulares radica en la apropiada regulación mediante proteínas quinasas. En efecto, el primer oncogén descubierto, c-Src resulta en una regulación aberrante del sistema de trasducción de señales (Levinson et al., 1978; Eckhart, Hutchinson, & Hunter, 1979). Por consiguiente, la desregulación de dicha actividad está a menudo relacionada con transformación celular y el cáncer.

La importancia de la regulación proteica a través de eventos de fosforilación, se pone de manifiesto en el hecho de que las proteínas quinasas comprenden solo entre ~2-4% (G. M. Rubin et al., 2000) de los genes eucariotas y que éstos, son los responsables de mantener una regulación apropiada del proceso de señalización intracelular, puesto que determinan el destino celular (Santamaría et al., 2007). Estas moléculas funcionan como interruptores moleculares que puede adoptar dos estados posibles, "encendido" donde la actividad quinasas es máxima; y el estado apagado donde la actividad es basal. Todas estas proteínas catalizan la misma reacción, la transferencia de fosfato γ del ATP al grupo oxidrilo de residuos serina, treonina o tirosina. Una vez encendida la actividad quinasas puede alterar

la funcionalidad de otras proteínas ya sea activando o inhibiendo su función. El hecho de que éste "encendido" de la actividad quinasa puede ser regulado, implica la existencia de efectores capaces de ejercer algún tipo de control sobre el mecanismo de fosforilación, y de esta manera modular dicho funcionamiento. Por consiguiente, entender el mecanismo de transferencia de fosfatos, nos permitirá comprender la regulación fina del prendido y apagado de quinasas y la culminación de dicho estudio nos permitirá, en un futuro, rectificar sistemas de transducción de señales con funcionamiento aberrante. Entonces para ello mi trabajo tuvo estos objetivos: 1) Develar los determinantes estructurales que permitan describir el rol de cada residuo en la actividad catalítica. 2) Entender como es que las quinasas reconocen sus sustratos y/o activadores. Para ello debemos tener en cuenta que, por ejemplo, el "kinoma" humano esta comprendido por aproximadamente 518 protein quinasas funcionales y un número importante de pseudoquinas (carentes de actividad quinasa) (Manning et al., 2002). A su vez, estas 518 quinasas están divididas en familias; sin embargo, todas ellas se las pueden clasificar como Ser/Thr quinasas, receptores tirosina-quinasa, y tirosina-quinasa citoplasmáticas. Por otro lado, las protein quinasas juegan un rol importante en la regulación de los procesos celulares en procariontes. Si bien las redes de señalización son sensiblemente diferentes, las serin/treonin y tirosin quinasas conservan las características del dominio quinasa. Este trabajo nos centraremos en las Ser/Thr quinasas, en particular en las familias Mitogen-activated protein kinases (MAPK) humanas y PKNs bacterianas, pero las conclusiones puede ser extendidas a otras quinasas.

1.1 Protein quinasas en el sistema de transducción de señales.

La célula debe responder a estímulos químicos o físicos de su ambiente. Para ello utiliza moléculas pequeñas como hormonas o señales químicas que le dicen a ésta, de cambios en las condiciones extracelulares. Los sistemas de cascadas de transducción de señales sensan y procesan diversos estímulos. Resultados de secuenciación de genomas, muestran que la mitad de las 25 familias mayoritarias de proteínas, están involucradas con procesamiento de información. Estos procesadores de información, pueden pensarse como circuitos moleculares que detectan, amplifican e integran diferentes señales para generar una respuesta a cambios en las variables medidas. (Figura 1.1).

En este sistema puede destacarse el rol protagónico de las proteínas quinasa en el procesamiento de la información. Como describimos anteriormente, las vías de transducción de señales en términos generales se puede ver como un circuito molecular (Figura 1.1). La

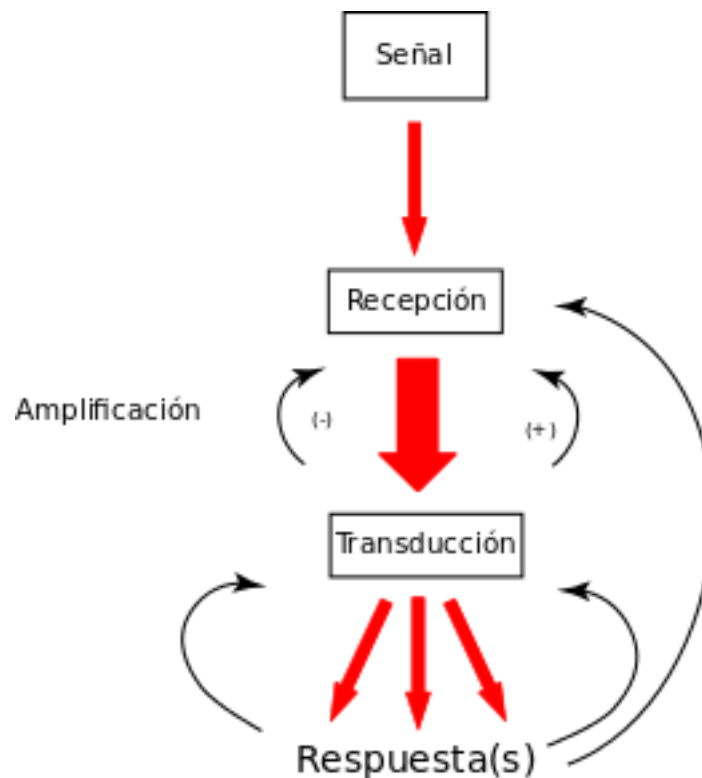


Figura 1.1: Generalización de un sistema de transducción de señales. Una señal externa como una hormona en el contexto tisular o una compuesto químico para una célula aislada es recibida e interactúa con un componente celular, a menudo un receptor de membrana. La información es convertida en otras entidades químicas o transducida. La señal es amplificada antes de evocar una respuesta. Además, vías de retroalimentación regulan todo el proceso de señalización

información es transferida del exterior celular hasta el núcleo donde altera la expresión génica. Para ello, en un primer paso la información debe atravesar la membrana. Por ende, receptores de membrana, integran la información del espacio extracelular, disparando lo que se conoce como cascada de transducción de señales. En el caso canónico en el cual los portadores de información son moléculas pequeñas; la sucesión de eventos es la siguiente:

- (i) La molécula se une a un receptor de membrana, este último altera su estructura terciaria o cuaternaria incluyendo su dominio intracelular propagando la información al interior celular. La información incorporada por la presencia del ligando, a menudo llamado el mensajero primario, debe ser transducida en otras formas que pueden alterar la bioquímica de la célula.
- (ii) La formación del complejo receptor-ligando alteran la concentración de moléculas pequeñas en el espacio citoplasmático, llamados segundos mensajeros, constituyendo el siguiente paso en el circuito de información molecular. Algunos segundos mensajeros incluyen AMP cíclico y GMP cíclico, iones de calcio, inositol 1,4,5 -trifosfato (

IP3) y diacilglicerol. La amplificación de la señal ocurre en esta etapa, puesto que si solo dependiera de algunas moléculas que llegan a la superficie celular, dicha señal sería muy pobre para evocar una respuesta.

- (iii) El cambio de concentraciones de segundos mensajeros causa una respuesta en las proteínas quinasas, que son el link que transduce los cambios en las concentraciones de segundos mensajeros libres, en cambios en la estructuras de otras proteínas mediante modificaciones post-traduccionales, por lo general fosforilaciones en residuos Ser, Thr y Tyr. Esta señal se propaga, mediante una cadena de fosforilaciones que termina en la fosforilación de factores de transcripción de que modula la expresión génica.
- (iv) Cierre de señal. Uno de los mecanismos para la terminación del proceso de señalización, es la desfosforilación de proteínas por fosfatasas. Sin este proceso, la célula perdería la capacidad de responder a nuevos estímulos.

Este trabajo se centra en el mecanismo en el cual la propagación de la información se da por fosforilación de proteínas, mediante proteínas quinasa. En la siguientes secciones se profundizará sobre el rol de las proteínas de estudio sobre el sistema de transducción de señales.

1.2 Regulación de protein quinasas

Aspectos estructurales de la regulación de la activación de proteínas quinasa. La actividad de las proteínas quinasas es regulada de muchas formas diferentes y complejas. Diversas estrategias incluyen la unión de reguladores alostéricos para activar o inactivar las proteínas quinasas, o cambios en la estructura de la misma, promoviendo estos cambios alostéricos (Huse, & Kuriyan, 2002). A modo ilustrativo, por ejemplo, en la familia de quinasas dependiente de ciclinas (CDKs), se encuentran activas, sólo cuando se forma un complejo heterodimérico con su activador alostérico llamado "ciclina" (Andzelm, Lew, & S. Taylor, 1995; Stevenson et al., 2002). Sin embargo el tipo de modificación post-traducciona mas común que promueve un cambio alostérico en dirección a la activación del biopolímero; lo comprenden las fosforilaciones de residuos serina/treonina en el loop de activación. Además de esto, muchas quinasas también tienen sitios de fosforilación alternativo que las inactivan, particularmente en el loop rico en glicinas o cercanos al bolsillo de unión al ATP, o poseen dominios regulatorios, como por ejemplo el dominio SH2 de c-Src.

Estudios recientes, han proporcionado nuevas perspectivas en relación a las bases estructurales para el control intramolecular normal de las protein quinasas (PQ), y se muestra que múltiples "capas" de mecanismos de auto-inhibición operan para salvaguardar la activación espontánea de proteínas con esta función catalítica (Xiao et al., 2014). Estos autores proponen, que en lugar de considerar a los eventos oncogénicos como "acontecimientos activadores" o "éxitos", ya sea debido a mutaciones, sobreexpresión o reajustes estructurales, es más significativo verlos como mecanismos que liberan restricciones topológicas auto-inhibitorias (Xiao et al., 2014).

A menudo, una descripción estructural de estos sistemas lo proveen estudios de cristalografía de rayos X, RMN, etc. Estos exponen que las proteínas quinasas cambian o alternan entre estructuras activas e inactivas como resultado directo de la acción regulatoria celular, sobre el dominio quinasa. A continuación describiremos brevemente los elementos importantes en la regulación en torno a los sistemas elegidos para la presente disertación.

1.3 Mitogen-activated protein kinases (MAPK)

Esta familia de quinasas caracterizada por fosforilar sustratos con Prolina seguido de Treonina/serina, tiene un rol esencial en el sistema de transducción de señales, modulando la transcripción génica en el núcleo en respuesta a cambios en el entorno celular. Las MAPKs son determinantes en el control de funciones celulares como proliferación, diferenciación, migración y apoptosis, y participan en un gran número de desordenes o enfermedades incluidas la inflamación crónica y cáncer (Schaeffer, & Weber, 1999; Davis, 2000; Kyriakis, & Avruch, 2001; Pearson et al., 2001; Zarubin, & Jiahuai, 2005).

En humanos hay al menos 11 miembros de la superfamilia MAPK, la cual puede ser dividida en 6 grandes grupos basados en la similaridad de secuencias: extracellular signal-regulated protein kinases (ERK1 and ERK2); c-Jun N-terminal kinases (JNK1, JNK2, JNK3); p38s (p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ); ERK5 (ERK5); ERK3s (ERK3, p97 MAPK, ERK4) y ERK7s (ERK7, ERK8) (Schaeffer, & Weber, 1999; Pearson et al., 2001). Cada grupo de MAPKs puede ser estimulada individualmente por una cascada de proteínas quinasa diferente; es decir la activación de una MAPK es resultado de la fosforilación de ésta, por una quinasa específica denominada MAPK kinasa (MAPKK) que a su vez es activada por una MAPK kinasa kinasa (MAPKKK) y por último la enzima que activa la doble quinasa es la MAPKKK o triple quinasa (Pearson et al., 2001). Estos sistemas modulares han sido conservados a través de la evolución desde plantas, fungi, nematodos, insectos hasta

mamíferos (Widmann et al., 1999). La vía de ERK es la más estudiada, puesto que responde a una gran variedad de factores de crecimiento, regulando la proliferación celular (Pages et al., 1993), además la sobre-activación de esta vía, es suficiente para transformar células en cultivo (Mansour et al., 1994). De hecho, la gran cantidad de información bioquímica, biofísica y estructural disponible de los mecanismos implicados en la activación de ERK y la naturaleza de las rutas de señalización que intervienen ha permitido incluso el uso de enfoques teóricos y computacionales para estudiar la activación de MAPKs, convirtiéndose así en un prototipo para el campo emergente de la biología de sistemas (Schoeberl et al., 2002; Hornberg et al., 2005; Millán, & Adrián G Turjanski, 2015).

Para una completa activación de la actividad quinasa de las MAPKs, éstas deben ser fosforiladas en dos residuos conservados, una treonina (Thr) y una tirosina (Tyr), que se encuentran en el loop de activación definiendo el motivo Thr-X-Tyr (Canagarajah et al., 1997; Pearson et al., 2001). Históricamente la identidad del residuo que esta entre los dos fosfo-aceptores definía los diferentes grupos de MAPKs. Por ejemplo, la familia ERK (ERK1, ERK2 and ERK5) tiene un residuo glutámico (Thr-(Glu)-Tyr) mientras que; JNKs (JNK1-3) exhibe una prolina Thr-Pro-Tyr; y la familia p38 (p38 α – δ) un residuo pequeño como es la glicina Thr-(Gly)-Tyr (Widmann et al., 1999; Pearson et al., 2001). La habilidad de las MAPKKs en reconocer las diferentes MAPKs radica en parte a este tri-péptido. Por lo tanto, la especificidad y los mecanismos moleculares por los cuales cada familia MAPK puede ser activada asegura que la célula monte una respuesta apropiada a un dado estímulo extracelular. Tras la activación, las MAPKs fosforilan y controlan la actividad de moléculas citoplasmáticas claves y proteínas nucleares, que a su vez pueden regular la expresión génica. En última instancia, el programa de expresión génica resultante dependerá de la integración de las señales proporcionadas por la activación temporal de cada una de las familias de MAPK. En particular, la naturaleza precisa de los estímulos extracelulares y el repertorio de moléculas disponibles en cada tipo de célula puede determinar la localización, el tiempo, la intensidad y duración de la activación de cada miembro de la familia MAPK, influyendo así en los patrones de expresión de genes resultantes y, por tanto, las respuestas biológicas (Sun et al., 2015). Por ejemplo, mitógenos que actúan sobre los receptores del factor de crecimiento de tirosina quinasa y proteínas G acopladas (GPCRs) activan ERK1/2 (Ullrich, & Schlessinger, 1990; J. S. Gutkind, 2000), mientras que JNK y p38 MAPK responden preferentemente a señales de estrés celular (Davis, 2000; Zarubin, & Jiahuai, 2005). Por otra parte ERK5, puede ser activada por ambos estímulos, factores

1.3. MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASES (MAPK)

de crecimiento y señal de estrés (Nishimoto, & Nishida, 2006). Un breve resumen de las vías de señalización se presentan en la figura 1.2.

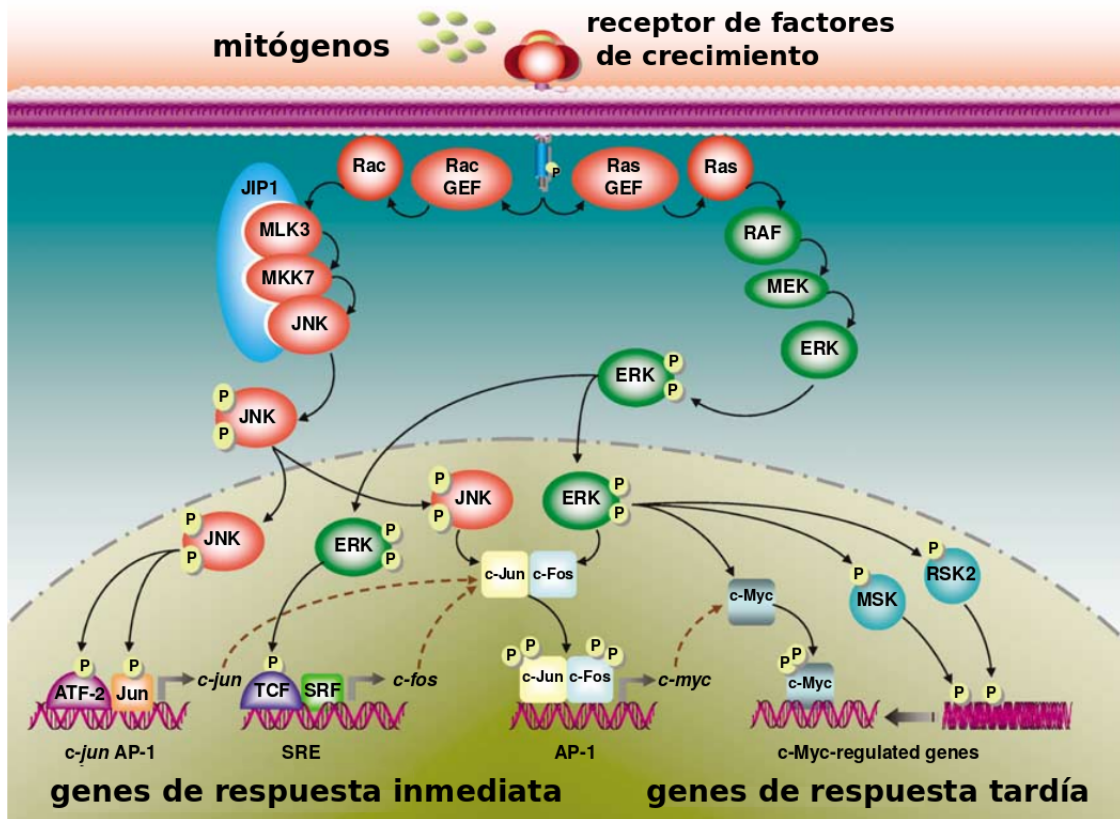


Figura 1.2: Cascada de señalización de las vías MAPKs. Adaptado de A. Turjanski, Vaque, & J. Gutkind, 2007

1.3.1 Rol de las MAPKs en oncogénesis

Las neoplasias benignas o malignas se caracterizan por el crecimiento celular desregulado. Dicho desarrollo celular desmedido de ciertos tejidos, es el resultado de perturbaciones en el sistema de transducción de señales, como fue definido anteriormente como aquellas señales intracelulares que modulan o alteran el comportamiento y/o función celular (Blume-Jensen, & Hunter, 2001). Ciertas rutas de señalización celular se encuentran más frecuentemente mutadas en oncogénesis que otras. Entonces las moléculas que gobiernan el crecimiento celular, diferenciación y desarrollo a menudo están mutadas en cáncer (Hunter, 1998; Hanahan, & Weinberg, 2000). Un ejemplo ilustrativo son los receptores tirosina quinasa (PTQ), una subclase de receptores transmembrana con capacidad quinasa intrínseca ligando-estimulable. Si es mutada o alterada estructuralmente, actúa como un oncogén causando transformación celular. Por eso, es de vital importancia regular el estado de reposo (o estado apagado) de dicha familia de proteínas. El rol preponderante de

las proteínas quinasas sobre la señalización celular y como regulador funcional, se puso de manifiesto cuando se identificó el primer oncogén; la proteína c-Src (Levinson et al., 1978; Eckhart, Hutchinson, & Hunter, 1979). La pérdida de un sitio regulatorio de fosforilación en el C-terminal causado por v-Src, convierte a ésta en constitutivamente activa. Otro ejemplo de actividad desregulada incluyen a la tirosina quinasa Bcr-Abl, sin embargo para este oncogén se ha demostrado que la inhibición de éste, constituye un tratamiento efectivo contra la leucemia mieloide crónica (Druker et al., 2001). Por último, la familia CDK responsable de la regulación del ciclo celular, es una de las proteínas características en muchos tipos de cáncer debido a que la desregulación de ésta, permite el avance o la entrada de la célula al ciclo celular (Malumbres, & Barbacid, 2009).

Debido a la complejidad y la importancia de éstos, los sistemas de transducción de señales por lo general constan de varias capas de regulación con una cascada de señalización que empieza en la superficie de la célula con receptores del tipo tirosina quinasa y termina con la fosforilación de diferentes factores de transcripción fosforilados por las MAPKs.

Sin embargo, en la des-regulación de los mismos; el consenso actual dicta que se requieren de al menos 6 procesos celulares desregulados para que se considere tumorigénico (Johnson et al., 1996), y además las células cancerosas deben adquirir las siguientes características: independencia de las señales de proliferación celular, evasión de la apoptosis y en última instancia la habilidad de invadir otros tejidos (metástasis) y el desarrollo angiogénico para el suministro de oxígeno y nutrientes, al cúmulo de células en desarrollo (Hanahan, & Weinberg, 2000). Estos procesos, si no todos ellos, tienen alguna relación con la vía MAPK puesto que esta vía juega un papel crítico en el desarrollo y progresión del cáncer. La literatura es extensa al respecto y presenta varios *reviews* (Downward, 2003; Wellbrock, Karasarides, & Marais, 2004; Kolch, 2005; Bradham, & McClay, 2006; Galabova-Kovacs et al., 2006; Kohno, & Pouyssegur, 2006; Torii et al., 2006). La vía de señalización Ras-RAF-MEK-ERK es una de las mejor estudiadas puesto que además, se encuentra desregulada en aproximadamente la tercera parte de los casos de cáncer. Cabe destacar que se han identificado mutantes de elementos río arriba de la cascada de señalización como por ejemplo mutantes en Ras y B-RAF, o sobreexpresión de receptores tirosina quinasa. En conclusión, con toda esta evidencia empírica podemos decir, que esta familia de proteínas, presenta un rol preponderante en oncogénesis (Figura 1.3), y son un blanco atractivo para el desarrollo de fármacos (Uehling, & P. A. Harris, 2015).

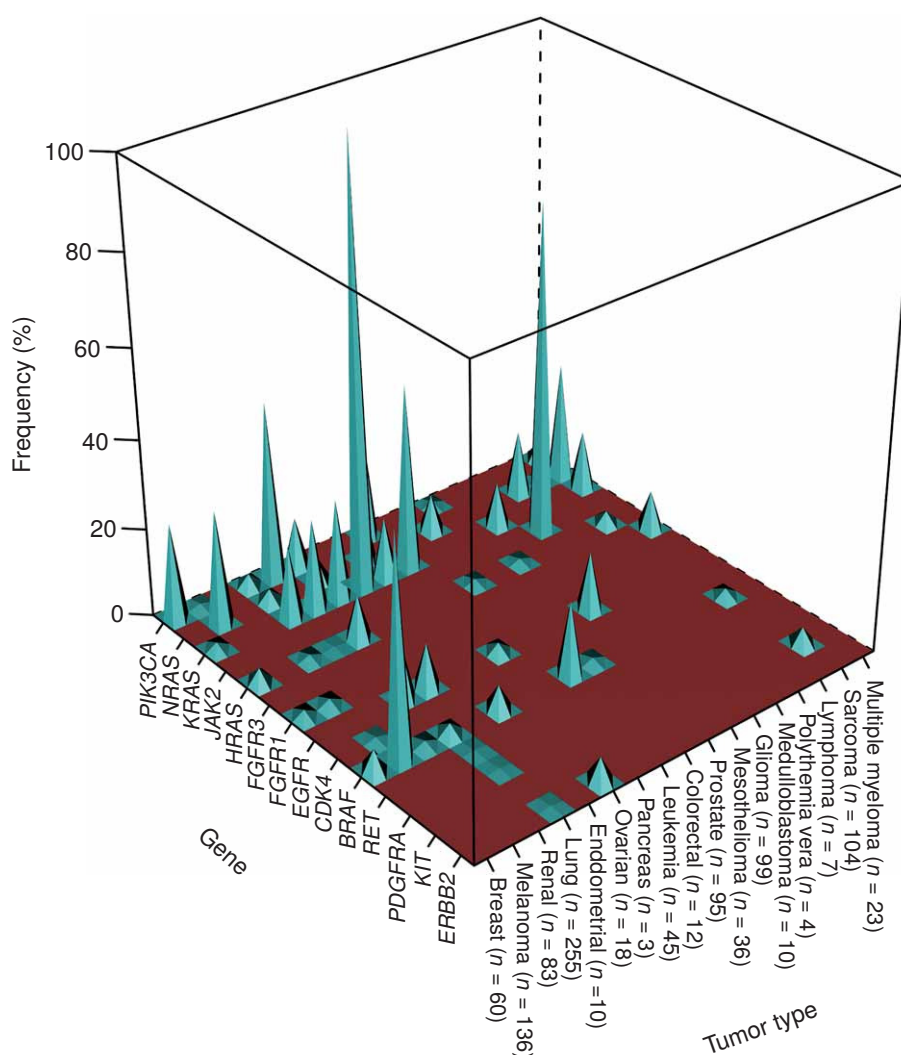


Figura 1.3: Frecuencias de mutaciones oncogénicas a través de diferentes tipos de tumores humanos. Las frecuencias (eje y) se calcularon como porcentajes de muestras tumorales (Eje x) de un tipo dado, que alberga una mutación oncogénica (eje z) comparados con el número total de muestras para ese tipo de tumoral. Tomado de Thomas et al., 2007

1.3.2 Aspectos estructurales de la regulación de MAPKs

El dominio ser/thr quinasas está altamente conservado. Esta comprendido como estructuras bilobulares donde el lóbulo N-terminal (N-lobe) esta compuesto principalmente por hojas Beta, mientras que el C-terminal por estructuras helicoidales. El sitio activo esta intercalado entre ellos y comprende el sitio de unión para el complejo ATP.Mg^{+2} . Existen varios residuos altamente conservados en secuencia y estructura en el sitio activo (Figura 1.4). Utilizando la numeración de ratón de ERK2 podemos describir la presencia del segmento $^{165}\text{DFG}^{167}$ que sería el responsable de la coordinación del Mg^{+2} . El residuo lys^{52} coordina los fosfatos α y β del nucleótido y en la conformación activa interactúa con el residuo glu^{69} . Las posibles implicancias de esta interacción serán discutidas en el capítulo 2. En lo que respecta al proceso de fosforilación el rol funcional como aceptor de protones

lo desempeña el residuo asp¹⁴⁷ (perteneciente al motivo "HRD", Figura 1.4B) ampliamente discutidos en trabajos sobre ERK2, de éste mismo grupo de investigación (Adrian Gustavo Turjanski, Hummer, & J. S. Gutkind, 2009).

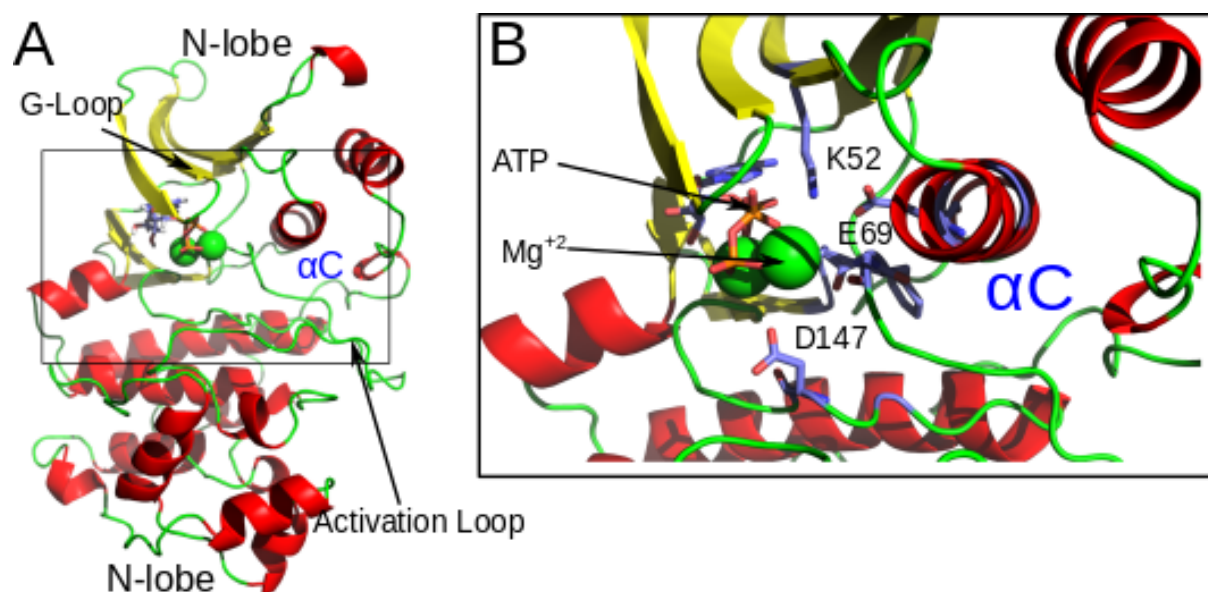


Figura 1.4: Elementos importantes del dominio quinasa. A) vista general del dominio quinasa de ERK2 (modelo 2P-ERK2-ATP.MG basado en pdbid:2ERK). B) del sitio activo resaltando residuos importantes en la coordinación del mismo.

Emplazado en el centro del proteína entre los residuos ~170-190, tenemos al *loop* de activación. La familia MAPK requiere la fosforilación de dos residuos claves en este sitio, para alcanzar la actividad máxima. Una vez fosforilados estos residuos (¹⁸³Thr-X-Tyr¹⁸⁵) la quinasa adopta el estado conformacionalmente activo (Canagarajah et al., 1997). En otras enzimas quinasas; en particular en PKA, estudiadas por el grupo de Taylor y colaboradores, han sugerido la presencia de dos "columnas hidrofóbicas" compuestas por una serie de aminoácidos no-consecutivos que se extienden desde la hélice αF, hasta elementos en el N-terminal que se alinean producto de esta "activación" (Kornev, & S. S. Taylor, 2010). Sin embargo, la contribución de éstos, a la estabilización del estado activo, o el efecto estabilizador/desestabilizador sobre la actividad, aún no han sido bien establecidos.

Una de estas columnas hidrofóbicas contienen residuos que presentan gran importancia en la topología de las MAPKs. El consenso actual inferido a partir de la comparación de conformaciones activas e inactivas, indica que las quinasas presentan variados mecanismos de inactivación. En relación a esto, la columna regulatoria (en inglés *R-spine*) posee el residuo phe¹⁶⁶ del segmento ¹⁶⁵DFG¹⁶⁷, que en p38α (una proteína altamente relacionada dentro del grupo MAPK), presenta un "flip" de este segmento no permitiendo la unión del ATP, inactivando la misma. Dicho cambio conformacional ha sido explotando en numerosas

ocasiones, utilizando ligandos que estabilizan el estado inactivo, llamado "*DFG-out*" puesto que expone el residuo phe hacia el bolsillo del ATP (R. M. Angell et al., 2008). Alternativamente la estrategia utilizada por otras quinasa para el cambio conformacional, es la rotación/cierre de la hélice αC , que entre otros cambios, rompe una interacción importante entre un residuo glu de la αC y la lys de la hoja $\beta 3$ (Andzelm, Lew, & S. Taylor, 1995; Stevenson et al., 2002; Huse, & Kuriyan, 2002).

Sitios de unión proteína-proteína. Por último describiremos que para que el ciclo catalítico de la quinasa se complete, ésta misma deberá interactuar con su proteína blanco. Interacciones proteína-proteína entre MAP quinasas, sustratos, activadores o proteínas de andamiaje, son reguladas por sitios de anclaje (sitios de "*Docking*"). En particular, las MAPKs presentan dos sitios de unión proteína-proteína. El primero de ellos comprendido por el sitio P+1, la hélice αF y el inserto quinasa (MAPK insert) presenta un sitio hidrofóbico, donde proteínas o péptidos con el motivo Phe-X-Phe (DEF) se unen. Sin embargo el primer sitio y el mejor caracterizado por la bibliografía, lo comprenden las hojas $\beta 7$ - $\beta 8$ y las hélices αD - αE que brindan un sitio de unión a péptidos conocidos como DELJ, KIM-motif (kinase interaction motif) o D-sites. (Figura 1.5) Las secuencias polipeptídica que se unen al sitio de docking, contienen el motivo $(R/K_{2-3})-X_{2-6}-\Phi_A-X-\Phi_B$ donde Φ es un residuo hidrofóbico (Lee et al., 2004; Sharrocks, Shen-His Yang, & Galanis, 2000). La mayoría de las proteínas efectoras o regulatorias de MAPKs presentan sitios de docking.

Ejemplos de ello, lo comprenden la familia de MAP2K, como MEK1/2, MKK3/6, MKK4/7, responsables de la activación de ERK, p38 y JNK respectivamente (A. J. Bardwell, Frankson, & L. Bardwell, 2009). Dichas moléculas poseen D-sites de ~10-15 residuos de longitud en el N-terminal, que son los responsables del anclaje y reconocimiento por parte de las MAPK. El proceso de inactivación de las MAPKs a través de desfosforilación mediado por fosfatasas también incluyen el reconocimiento de la mismas, a través de péptidos KIM; ejemplos de esto lo comprenden HePTP (hematopoietic tyrosine phosphatase), STEP (striatum-enriched phosphatase) STEP-like PTP y PTPSL (Zanke et al., 1992; Lombroso, Murdoch, & Lerner, 1991; Hendriks et al., 1995). Proteínas de andamiaje como JIP1,4 (Jnk-Interacting Protein) también han sido identificadas (Whitmarsh et al., 1998; Kelkar, Standen, & Davis, 2005), u otras proteínas blanco, PEA-15 (phosphoprotein enriched in astrocytes), RSK1 (Ribosomal protein S6 kinase alpha-1), MEF2a (myocyte enhancer factor 2A), etc (Hill et al., 2002; J. A. Smith et al., 1999; Shen-Hsi Yang, Galanis, & Sharrocks, 1999). Sin embargo, aún es controversial si los péptidos KIM, son importantes para el bind-

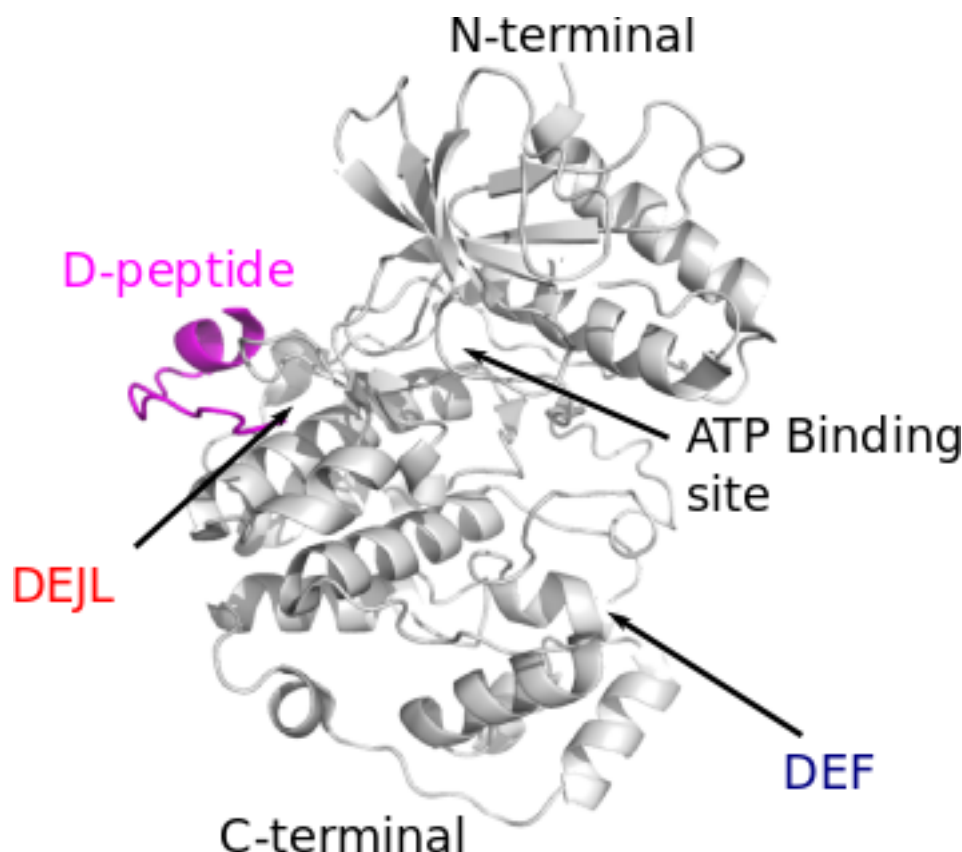


Figura 1.5: Sitios de anclaje proteína-proteína Estructura de la MAPK-ERK2 en el estado inactivo, unida a un péptido perteneciente a la fosfatasa HePTP (PDBid 2GPH). La unión del péptido promueve cambios en sitios distales como por el ejemplo, el loop de activación, haciéndolo accesible para la fosforilación por parte de MAPKK.

ing, para la especificidad o ambas. Sin embargo, existen reportes que señalan la importancia de zonas cercanas a estos, que podrían contribuir a la especificidad y reconocimiento de los mismos (Francis et al., 2011; Tárrega et al., 2002). En el capítulo 4 se profundizó en la descripción de los determinantes estructurales del reconocimiento por parte de las MAPKs de estos péptidos KIM.

1.4 La familia PKN en *M. tuberculosis*

Los mecanismos de fosforilación antes relevados no son exclusivos de eucariotas, sino que también son importantes en procariotas. En bacterias, en general las señales extracelulares son transducidas por sistemas de dos componentes. Sin embargo, datos de secuenciación revelaron la presencia de proteínas quinasas muy similares a las eucariotas (*eucariotic-like*) que tendrían un rol importante en la fisiología y virulencia de diferentes patógenos (Av-Gay, & Everett, 2000). En este sentido, el genoma de *Mycobacterium tuberculosis*, el agente etilógico de la tuberculosis, presenta 11 miembros de proteínas Ser/Thr quinasas (STPKs) nombradas pknA hasta pknL (STea Cole, Brosch, Parkhill, Garnier,

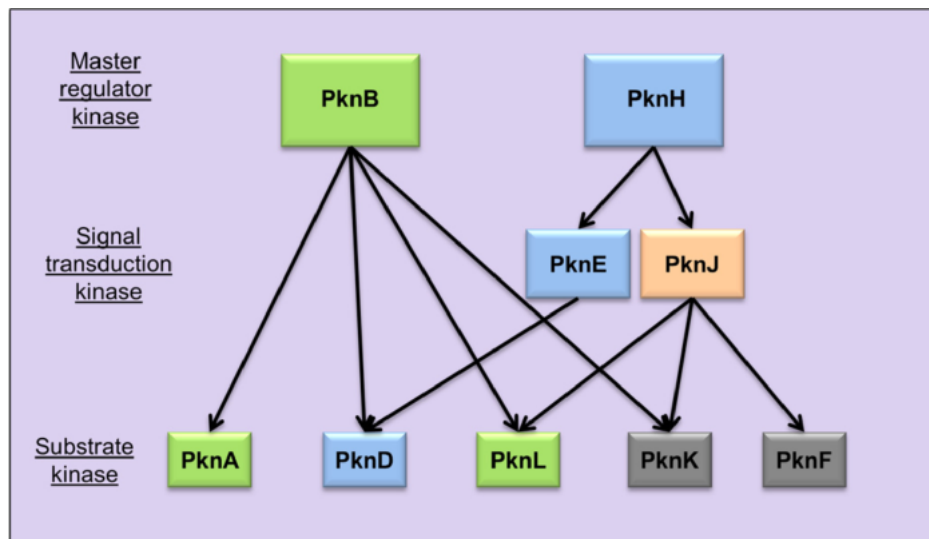


Figura 1.6: Posible red de interacción de STPK *M. tuberculosis*. Las flechas indican fosforilación intermolecular in vitro. PknB fosforila eficientemente a pknA y pknD. Tomado de Baer et al., 2014

Churcher, D. Harris, Gordon, Eiglmeier, Gas, & Barry, 1998). Este patógeno utiliza éstas STPKs no solo para regular procesos metabólicos sino también para interferir con sistemas de señalización del hospedador.

Estudios recientes han comenzado a revelar la participación de la fosforilación de proteínas por las STPKs en la fisiología bacteriana y la relación con la virulencia. Mediante genómica comparativa se sugiere que las STPKs pueden controlar procesos fisiológicos de manera redundante. De hecho, sólo cuatro de los once quinasas de *Mycobacterium tuberculosis* (PknA, PknB, PknG y PknL) se conservan en relación a *Mycobacterium leprae* y *Corynebacterium glutamicum* (ST Cole et al., 2001; Greenstein et al., 2006). De acuerdo con este análisis, sólo pknA, pknB y pknG parecen requerirse para el crecimiento en cultivo (Sasseti, Boyd, & E. J. Rubin, 2003; Sasseti, & E. J. Rubin, 2003).

1.4.1 Proteína quinasa PknG

PknG ha sido descrita como no esencial para el crecimiento, mediante experimentos de inserción de transposones (Sasseti, Boyd, & E. J. Rubin, 2003). Sin embargo, la inactivación de pknG por intercambio alélico en *M. tuberculosis* reportó que disminuye la viabilidad *in vitro* y la carga bacteriana en ratones BALB/c y además, sugieren que está involucrado en la regulación de los niveles intracelulares de glutamato/glutamina (Cowley et al., 2004). Por otra parte, la misma delección en *Mycobacterium bovis* no afecta las concentraciones de glutamina o concentraciones de aminoácidos (Nguyen et al., 2005). Otro reporte en una actinobacteria relacionada (*C. glutamicum*) sugiere un rol de PknG en el metabolismo

catabólico de glutamato (Niebisch et al., 2006).

Sin embargo, aunque el papel fisiológico de PknG dentro de la micobacteria sigue siendo poco clara, la proteína parece jugar un papel clave en la infección y hace de ésta un blanco interesante para el diseño de drogas. Se encontró que la secreción de PknG mejora la supervivencia de micobacterias dentro de los macrófagos infectados, ya que inhibiría la fusión fagosoma-lisosoma (Walburger et al., 2004). En el mismo trabajo y en concordancia con esta idea *M. bovis BCG* que carece de *pknG*, muestra una rápida fusión con el lisosoma eliminando células infectadas. En relación a esto, la utilización de el inhibidor específico de PknG AX20017, incrementa la localización lisosomal de *M. bovis BCG* de manera dosis dependiente (Walburger et al., 2004).

1.4.2 Proteína quinasa PknB.

PknB pertenece a un operón altamente conservados en actinobacterias. Esta unidad genética funcional formada por: dos quinasas PknA, PknB, una Ser/Thr-fosfatasa PstP, y dos genes relacionados al crecimiento y división celular (*rodA* y *pbpA*) subraya la importancia de este *cassette* (STea Cole, Brosch, Parkhill, Garnier, Churcher, D. Harris, Gordon, Eiglmeier, Gas, & II III, 1998; Matsushashi, 1994; Boitel et al., 2003). Por ende, la composición y localización del operón cerca del origen de replicación, sugiere que estos genes podrían estar relacionados a procesos celulares como: división celular y crecimiento (Av-Gay, & Everett, 2000; Pablo Fernandez et al., 2006). Estudios recientes ponen a *pknB* como una molécula central o regulador "master", en la vía de señalización intracelular de *Mtb* junto con *pknH* (figura 1.6) (Baer et al., 2014).

La versatilidad de *pknB* se pone de manifiesto cuando tomamos en cuenta todos los aspectos fisiológicos en los que es partícipe. Ha sido descrita como crítica para el crecimiento *in-vitro* y sobrevivencia del patógeno en el hospedador (Chawla et al., 2014). También como un componente clave en el sistema de transducción de señales siendo su rol el de regular el crecimiento celular, forma, y tasa de división a través de la fosforilación de diferentes blancos que incluyen a GarA, GlmU, PapA5, PbpA, FhaB (Rv0019c), FhaA (Rv0020c), MviN, PstP, EmbR, Rv1422, Rv1747 y RseA (Villarino et al., 2005; Kang et al., 2005; Grundner, Gay, & Alber, 2005; Dasgupta et al., 2006; Sharma et al., 2006; Pablo Fernandez et al., 2006; Parikh et al., 2009; Gupta et al., 2009; Barik et al., 2010; Sajid et al., 2011; Gee et al., 2012). Relacionado a esto último, la transcripción de *pknB* se incrementa durante la fase de crecimiento exponencial o la infección dentro del macrófago (Av-Gay, Jamil, &

Drews, 1999; Kang et al., 2005; Singh et al., 2006). Por el contrario se observó una disminución de la expresión de la misma, en condiciones de estrés de nutrientes o "hambre" en *Mtb*.

Otras de las funciones que se le atribuye es la fosforilación de tres residuos de treonina (T84, T202, and T178) de la subunidad α del proteosoma (PrcA), regulando la actividad proteolítica frente a diferentes blancos moleculares como por ejemplo Ino1 (Anandan et al., 2014). Es el principal interruptor para reactivar las células del estado de hipoxia que se encuentra en el estado de latencia (Ortega et al., 2014). La sobreexpresión de PknB altera la morfología celular y conduce a la muerte celular (Chawla et al., 2014; Ortega et al., 2014).

Debido al rol preponderante de pknB en el control metabólico de *mtb*, demostrado por experimentos de esencialidad, y además tomando en cuenta la gran similaridad con proteínas eucariotas, se evaluó el efecto de inhibidores de quinasas sobre el crecimiento micobacteriano. Diferentes inhibidores competitivos para el ATP, fueron ensayados en el rango micromolar obteniendo resultados prometedores en *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* y *M. aurum* (Annemarie Wehenkel et al., 2006; Pablo Fernandez et al., 2006). En concordancia, la sobreexpresión de pknB en *M. smegmatis* revierte parcialmente el efecto inhibitorio señalando que la inhibición observada está relacionada directamente con la inactivación de pknB (Pablo Fernandez et al., 2006). Toda esta evidencia colectada sugiere a pknB como un blanco prometedor para el desarrollo de drogas antituberculínicas.

1.4.3 Relación Estructura función en PKNs de *Mtb*.

Proteína quinasa pknB

PknB contiene un dominio quinasa hacia el N-terminal intracelular, seguido por un hélice transmembrana, y un dominio de unión de antibióticos β -lactámicos y análogos de peptidoglicano denominado "PASTA". Esta arquitectura se encuentra en el filo Actinobacterias y Firmicutes con homólogos reportados en estreptococos (Echenique et al., 2004), estafilococos (Débarbouillé et al., 2009), bacilos (Shah et al., 2008), y *Corynebacterium* (Fiuza et al., 2008).

Sin embargo, prestaremos particular importancia al dominio quinasa. Esta familia de proteínas perteneciente al metabolismo de ácidos tricarboxílicos de *M. tuberculosis* como principal función entre otras (sección 1.4), presenta un dominio de plegado similar al eucariota. Esta enzima fosforila diferentes blancos moleculares, pero podemos resaltar a garA

como uno de los más importantes, en este contexto podemos señalar que *pknB*, muestra es una fuerte preferencia por fosforilar residuos Thr frente a Ser (Chawla et al., 2014; Ortega et al., 2014). Análogamente a lo descrito para la familia MAPK, el dominio quinasa de *pknB* se fosforila el segmento canónico de activación llamado "loop de activación", en los residuos thr¹⁷¹ y thr¹⁷³. (Lombana et al., 2010; Young et al., 2003; Boitel et al., 2003). El clásico dominio bilobular forma un homodímero con una disposición espacial llamada "back-to-back" a través de una interfaz en el N-terminal (Figura 1.7A). El rol funcional de la interfaz y los cambios estructurales asociados a la formación del dímero fueron descritos por el grupo de Alber (Lombana et al., 2010). Sin embargo, se desconoce cuál es el rol de la fosforilación del loop de activación en el ciclo catalítico y además nunca se había caracterizado el proceso de transferencia de fosfatos en esta familia de proteínas.

Proteína quinasa *pknG*

Como exploramos en el apartado 1.4 entendemos que la vía de señalización que media la infectividad de *pknG* no se ha determinado inequívocamente, sin embargo se conoce que *PknG* fosforila *in-vivo* a el regulador de *Mtb* GarA, al igual que *pknB* (O'Hare et al., 2008). Para ello, *pknG* presenta una organización estructural multidominio, donde el dominio quinasa tiene adyacente un centro hierro-azufre (dominio RdX 1.7B) que regula su actividad (Tiwari et al., 2009). El mecanismo por el cual logra esto todavía es aún materia de debate (Lisa et al., 2015). Por otra parte, el c-terminal contiene motivos repetitivos conocidos como TPR responsables de la dimerización en la estructura cristalina, que se cree que median interacciones proteína-proteína (Scherr et al., 2007). Sin embargo, poco se conoce acerca de cómo es el complejo ternario *pknG*/ATP.Mg/GarA y la razón por el cual *pknG* fosforila sólo el residuo 21, es decir la selectividad frente a este aminoácido, puesto que garA tiene dos residuos thr contiguos. Considerando además, que *pknG* no presenta residuos fosforilables en el loop de activación inferimos que el ciclo catalítico debe estar sujeto a algún otro efector sobre el estado conformacional de la quinasa.

1.5 Descripción general de la Disertación

Siendo uno de los principales procesos celulares involucrados en el sistema de transducción de señales, es de vital importancia entender cómo es que el proceso de transferencia de fosfatos o fosforilación, ocurre. Centrándonos en una descripción termodinámica del proceso subyacente, en el segundo capítulo exploramos el proceso de fosforilación usando como ar-

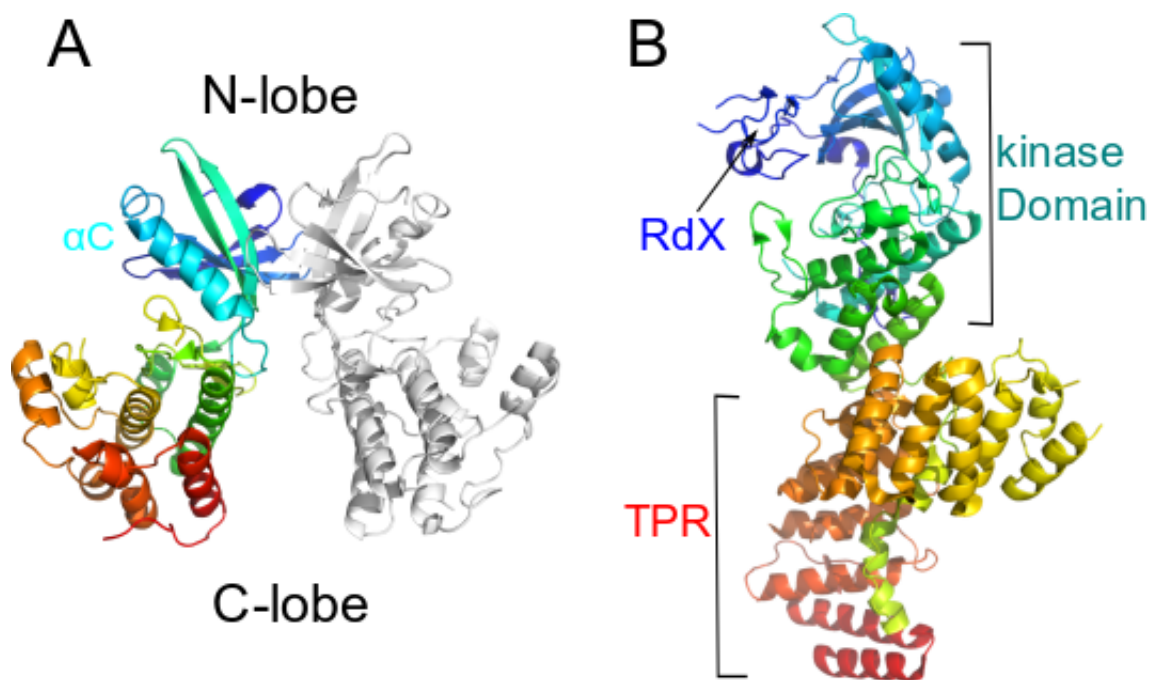


Figura 1.7: Dominio quinasa de pknB y pknG. A) Homodímero pknB. PDBid:1MRU). B) Organización multidominio de pknG. RdX: Dominio rubredoxina, TPR: tetratricopeptide repeat

quetipo la quinasa ERK2, uno de los pilares fundamentales de la vía Ras/RAF/MEK/ERK. Este capítulo además incluye un relevamiento de distintas quinasas en el estado reactivo, infiriendo que dicha estado conformacional es general, y tiene que estar conservado. Por lo tanto, una descripción más completa de las restricciones topológicas y/o químicas sobre la reacción, nos ayudara a entender los mecanismos de activación/desactivación de las quinasas. En particular este dominio presenta un puente salino distintivo, que en el estado reactivo ve favorecido su formación y en dicha sección se explica la posible injerencia del mismo, en el proceso reactivo.

A continuación, siendo que el dominio quinasa un elemento muy conservado, extendimos el análisis a proteínas procariotas que presentan alta similaridad con las eucariotas, siendo además importantes blancos moleculares debido a la relevancia sanitaria del patógeno del cual provienen. Por ende, en el capítulo 3 exploramos la reactividad de pknB, pknG ambas quinasas de *M. tuberculosis*. Es interesante que de dicho análisis se desprenden conclusiones importantes que permiten entender además, la selectividad de ésta familia por sus sustratos. Brevemente la caracterización y/o descripción del sitio de unión del sustratos en zonas cercanas al sitio activo, serían responsables de la fosforilación diferencial de GarA.

Por último, como parte de una descripción holística del ciclo catalítico, describimos brevemente cómo es que las MAPKs reconocen a sus sustratos, para ello, el capítulo 4

introduce cuáles son los residuos clave para esto y esboza una explicación a la selectividad de las mismas.

Bibliografía

- Anandan, Tripti et al. (2014). "Phosphorylation regulates mycobacterial proteasome". In: *Journal of microbiology* 52.9, pp. 743–754.
- Andzelm, E Radzio, J Lew, & S Taylor (1995). "Bound to activate: conformational consequences of cyclin binding to CDK2". In: *Structure* 3.11, pp. 1135–1141.
- Angell, Richard M et al. (2008). "Biphenyl amide p38 kinase inhibitors 4: DFG-in and DFG-out binding modes". In: *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 18.15, pp. 4433–4437.
- Baer, Christina E et al. (2014). "Biochemical and spatial coincidence in the provisional Ser/Thr protein kinase interaction network of *Mycobacterium tuberculosis*". In: *Journal of Biological Chemistry* 289.30, pp. 20422–20433.
- Bardwell, A Jane, Erlynn Frankson, & Lee Bardwell (2009). "Selectivity of docking sites in MAPK kinases". In: *Journal of Biological Chemistry* 284.19, pp. 13165–13173.
- Barik, Subhasis et al. (2010). "RseA, the SigE specific anti-sigma factor of *Mycobacterium tuberculosis*, is inactivated by phosphorylation-dependent ClpC1P2 proteolysis". In: *Molecular microbiology* 75.3, pp. 592–606.
- Blume-Jensen, Peter, & Tony Hunter (2001). "Oncogenic kinase signalling". In: *Nature* 411.6835, pp. 355–365.
- Boitel, Brigitte et al. (2003). "PknB kinase activity is regulated by phosphorylation in two Thr residues and dephosphorylation by PstP, the cognate phospho-Ser/Thr phosphatase, in *Mycobacterium tuberculosis*". In: *Molecular microbiology* 49.6, pp. 1493–1508.
- Bradham, Cynthia, & David R McClay (2006). "p38 MAPK in development and cancer". In: *Cell cycle* 5.8, pp. 824–828.
- Canagarajah, Bertram J et al. (1997). "Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation". In: *Cell* 90.5, pp. 859–869.
- Chawla, Yogesh et al. (2014). "Protein kinase B (PknB) of *Mycobacterium tuberculosis* is essential for growth of the pathogen in vitro as well as for survival within the host". In: *Journal of Biological Chemistry* 289.20, pp. 13858–13875.

- Cole, STea, R Brosch, J Parkhill, T Garnier, C Churcher, D Harris, SV Gordon, K Eiglmeier, S Gas, CE 3rd Barry, et al. (1998). "Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence". In: *Nature* 393.6685, pp. 537–544.
- Cole, STea, R Brosch, J Parkhill, T Garnier, C Churcher, D Harris, SV Gordon, K Eiglmeier, S Gas, CE Barry II III, et al. (1998). "Erratum: Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence". In: *Nature* 396.6707, p. 190.
- Cole, ST et al. (2001). "Massive gene decay in the leprosy bacillus". In: *Nature* 409.6823, pp. 1007–1011.
- Cowley, Siobhan et al. (2004). "The *Mycobacterium tuberculosis* protein serine/threonine kinase PknG is linked to cellular glutamate/glutamine levels and is important for growth in vivo". In: *Molecular microbiology* 52.6, pp. 1691–1702.
- Dasgupta, Arunava et al. (2006). "The serine/threonine kinase PknB of *Mycobacterium tuberculosis* phosphorylates PBPA, a penicillin-binding protein required for cell division". In: *Microbiology* 152.2, pp. 493–504.
- Davis, Roger J (2000). "Signal transduction by the JNK group of MAP kinases". In: *Cell* 103.2, pp. 239–252.
- Débarbouillé, Michel et al. (2009). "Characterization of a serine/threonine kinase involved in virulence of *Staphylococcus aureus*". In: *Journal of bacteriology* 191.13, pp. 4070–4081.
- Downward, Julian (2003). "Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy". In: *Nature Reviews Cancer* 3.1, pp. 11–22.
- Druker, Brian J et al. (2001). "Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia". In: *New England Journal of Medicine* 344.14, pp. 1031–1037.
- Echenique, Jose et al. (2004). "Protein serine/threonine kinase StkP positively controls virulence and competence in *Streptococcus pneumoniae*". In: *Infection and immunity* 72.4, pp. 2434–2437.
- Eckhart, Walter, Mary Anne Hutchinson, & Tony Hunter (1979). "An activity phosphorylating tyrosine in polyoma T antigen immunoprecipitates". In: *Cell* 18.4, pp. 925–933.
- Fernandez, Pablo et al. (2006). "The Ser/Thr protein kinase PknB is essential for sustaining mycobacterial growth". In: *Journal of bacteriology* 188.22, pp. 7778–7784.

- Fiuza, Maria et al. (2008). "From the characterization of the four serine/threonine protein kinases (PknA/B/G/L) of *Corynebacterium glutamicum* toward the role of PknA and PknB in cell division". In: *Journal of Biological Chemistry* 283.26, pp. 18099–18112.
- Francis, Dana M et al. (2011). "Resting and active states of the ERK2: HePTP complex". In: *Journal of the American Chemical Society* 133.43, pp. 17138–17141.
- Galabova-Kovacs, Gergana et al. (2006). "ERK and beyond: insights from B-Raf and Raf-1 conditional knockouts". In: *Cell cycle* 5.14, pp. 1514–1518.
- Av-Gay, Yossef, & Martin Everett (2000). "The eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases of *Mycobacterium tuberculosis*". In: *Trends in microbiology* 8.5, pp. 238–244.
- Av-Gay, Yossef, Sarwat Jamil, & Steven J Drews (1999). "Expression and characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine protein kinase PknB". In: *Infection and immunity* 67.11, pp. 5676–5682.
- Gee, Christine L et al. (2012). "A phosphorylated pseudokinase complex controls cell wall synthesis in mycobacteria". In: *Science signaling* 5.208, ra7.
- Greenstein, Andrew E et al. (2006). "Structure/function studies of Ser/Thr and Tyr protein phosphorylation in *Mycobacterium tuberculosis*". In: *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 9.3-4, pp. 167–181.
- Grundner, Christoph, Laurie M Gay, & Tom Alber (2005). "*Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinases PknB, PknD, PknE, and PknF phosphorylate multiple FHA domains". In: *Protein Science* 14.7, pp. 1918–1921.
- Gupta, Meetu et al. (2009). "Forkhead-associated domain-containing protein Rv0019c and polyketide-associated protein PapA5, from substrates of serine/threonine protein kinase PknB to interacting proteins of *Mycobacterium tuberculosis*". In: *Journal of Biological Chemistry* 284.50, pp. 34723–34734.
- Gutkind, J Silvio (2000). "Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors". In: *Sci. Stke* 2000.40, re1–re1.
- Hanahan, D, & RA Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer Cell 100: 57–70". In: *Find this article online*.
- Hendriks, Wiljan et al. (1995). "A novel receptor-type protein tyrosine phosphatase with a single catalytic domain is specifically expressed in mouse brain". In: *Biochemical Journal* 305.2, pp. 499–504.

- Hill, Justine M et al. (2002). "Recognition of ERK MAP kinase by PEA-15 reveals a common docking site within the death domain and death effector domain". In: *The EMBO journal* 21.23, pp. 6494–6504.
- Hornberg, Jorrit J et al. (2005). "Control of MAPK signalling: from complexity to what really matters". In: *Oncogene* 24.36, pp. 5533–5542.
- Hunter, Tony (1998). "The Croonian Lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease". In: *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 353.1368, pp. 583–605.
- Huse, Morgan, & John Kuriyan (2002). "The conformational plasticity of protein kinases". In: *Cell* 109.3, pp. 275–282.
- Johnson, Randall et al. (1996). "Cellular transformation and malignancy induced by ras require c-jun." In: *Molecular and cellular biology* 16.8, pp. 4504–4511.
- Kang, Choong-Min et al. (2005). "The Mycobacterium tuberculosis serine/threonine kinases PknA and PknB: substrate identification and regulation of cell shape". In: *Genes & development* 19.14, pp. 1692–1704.
- Kelkar, Nyaya, Claire L Standen, & Roger J Davis (2005). "Role of the JIP4 scaffold protein in the regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways". In: *Molecular and cellular biology* 25.7, pp. 2733–2743.
- Kohno, Michiaki, & Jacques Pouyssegur (2006). "Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy". In: *Annals of medicine* 38.3, pp. 200–211.
- Kolch, Walter (2005). "Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors". In: *Nature reviews Molecular cell biology* 6.11, pp. 827–837.
- Kornev, Alexandr P, & Susan S Taylor (2010). "Defining the conserved internal architecture of a protein kinase". In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1804.3, pp. 440–444.
- Kyriakis, John M, & Joseph Avruch (2001). "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation". In: *Physiological reviews* 81.2, pp. 807–869.
- Lee, Thomas et al. (2004). "Docking motif interactions in MAP kinases revealed by hydrogen exchange mass spectrometry". In: *Molecular cell* 14.1, pp. 43–55.
- Levinson, Arthur D et al. (1978). "Evidence that the transforming gene of avian sarcoma virus encodes a protein kinase associated with a phosphoprotein". In: *Cell* 15.2, pp. 561–572.

- Lisa, Maria-Natalia et al. (2015). "Molecular Basis of the Activity and the Regulation of the Eukaryotic-like S/T Protein Kinase PknG from *Mycobacterium tuberculosis*". In: *Structure* 23.6, pp. 1039–1048.
- Lombana, T Noelle et al. (2010). "Allosteric activation mechanism of the *Mycobacterium tuberculosis* receptor Ser/Thr protein kinase, PknB". In: *Structure* 18.12, pp. 1667–1677.
- Lombroso, Paul J, Geoffrey Murdoch, & Michael Lerner (1991). "Molecular characterization of a protein-tyrosine-phosphatase enriched in striatum." In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88.16, pp. 7242–7246.
- Malumbres, Marcos, & Mariano Barbacid (2009). "Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm". In: *Nature Reviews Cancer* 9.3, pp. 153–166.
- Manning, Gerard et al. (2002). "The protein kinase complement of the human genome". In: *Science* 298.5600, pp. 1912–1934.
- Mansour, Sam J et al. (1994). "Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase". In: *Science* 265.5174, pp. 966–970.
- Matsushashi, Michio (1994). "Utilization of lipid-linked precursors and the formation of peptidoglycan in the process of cell growth and division: membrane enzymes involved in the final steps of peptidoglycan synthesis and the mechanism of their regulation". In: *New comprehensive biochemistry* 27, pp. 55–71.
- Millán, Mercedes Pérez, & Adrián G Turjanski (2015). "MAPK's networks and their capacity for multistationarity due to toric steady states". In: *Mathematical biosciences* 262, pp. 125–137.
- Nguyen, Liem et al. (2005). "Role of protein kinase G in growth and glutamine metabolism of *Mycobacterium bovis* BCG". In: *Journal of bacteriology* 187.16, pp. 5852–5856.
- Niebisch, Axel et al. (2006). "Corynebacterial protein kinase G controls 2-oxoglutarate dehydrogenase activity via the phosphorylation status of the OdhI protein". In: *Journal of Biological Chemistry* 281.18, pp. 12300–12307.
- Nishimoto, Satoko, & Eisuke Nishida (2006). "MAPK Signalling: Erk5 versus Erk1/2". In: *EMBO reports* 7.8, pp. 782–786.
- O'Hare, Helen M et al. (2008). "Regulation of glutamate metabolism by protein kinases in mycobacteria". In: *Molecular microbiology* 70.6, pp. 1408–1423.
- Ortega, Corrie et al. (2014). "*Mycobacterium tuberculosis* Ser/Thr protein kinase B mediates an oxygen-dependent replication switch". In: *PLoS Biol* 12.1, e1001746.

- Pages, Gille et al. (1993). "Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90.18, pp. 8319–8323.
- Parikh, Amit et al. (2009). "PknB-mediated phosphorylation of a novel substrate, N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase, modulates its acetyltransferase activity". In: *Journal of molecular biology* 386.2, pp. 451–464.
- Pearson, Gray et al. (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions 1". In: *Endocrine reviews* 22.2, pp. 153–183.
- Rubin, Gerald M et al. (2000). "Comparative genomics of the eukaryotes". In: *Science* 287.5461, pp. 2204–2215.
- Sajid, Andaleeb et al. (2011). "Phosphorylation of Mycobacterium tuberculosis ser/thr phosphatase by PknA and PknB". In: *PLoS One* 6.3, e17871.
- Santamaría, David et al. (2007). "Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle". In: *Nature* 448.7155, pp. 811–815.
- Sassetti, Christopher M, Dana H Boyd, & Eric J Rubin (2003). "Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis". In: *Molecular microbiology* 48.1, pp. 77–84.
- Sassetti, Christopher M, & Eric J Rubin (2003). "Genetic requirements for mycobacterial survival during infection". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100.22, pp. 12989–12994.
- Schaeffer, Hans J, & Michael J Weber (1999). "Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers". In: *Molecular and cellular biology* 19.4, pp. 2435–2444.
- Scherr, Nicole et al. (2007). "Structural basis for the specific inhibition of protein kinase G, a virulence factor of Mycobacterium tuberculosis". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104.29, pp. 12151–12156.
- Schoeberl, Birgit et al. (2002). "Computational modeling of the dynamics of the MAP kinase cascade activated by surface and internalized EGF receptors". In: *Nature biotechnology* 20.4, pp. 370–375.
- Shah, Ishita M et al. (2008). "A eukaryotic-like Ser/Thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments". In: *Cell* 135.3, pp. 486–496.

- Sharma, Kirti et al. (2006). “EmbR, a regulatory protein with ATPase activity, is a substrate of multiple serine/threonine kinases and phosphatase in *Mycobacterium tuberculosis*”. In: *FEBS Journal* 273.12, pp. 2711–2721.
- Sharrocks, Andrew D, Shen-His Yang, & Alex Galanis (2000). “Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases”. In: *Trends in biochemical sciences* 25.9, pp. 448–453.
- Singh, Anubha et al. (2006). “Protein kinase I of *Mycobacterium tuberculosis*: cellular localization and expression during infection of macrophage-like cells”. In: *Tuberculosis* 86.1, pp. 28–33.
- Smith, Jeffrey A et al. (1999). “Identification of an extracellular signal-regulated kinase (ERK) docking site in ribosomal S6 kinase, a sequence critical for activation by ERK in vivo”. In: *Journal of Biological Chemistry* 274.5, pp. 2893–2898.
- Stevenson, Lisa M et al. (2002). “Activation mechanism of CDK2: role of cyclin binding versus phosphorylation”. In: *Biochemistry* 41.26, pp. 8528–8534.
- Sun, Yu et al. (2015). “Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis”. In: *Journal of Receptors and Signal Transduction* 35.6, pp. 600–604.
- Tárrega, Céline et al. (2002). “Two clusters of residues at the docking groove of mitogen-activated protein kinases differentially mediate their functional interaction with the tyrosine phosphatases PTP-SL and STEP”. In: *Journal of Biological Chemistry* 277.4, pp. 2629–2636.
- Thomas, Roman K et al. (2007). “High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer”. In: *Nature genetics* 39.3, pp. 347–351.
- Tiwari, Divya et al. (2009). “Key residues in *Mycobacterium tuberculosis* protein kinase G play a role in regulating kinase activity and survival in the host”. In: *Journal of Biological Chemistry* 284.40, pp. 27467–27479.
- Torii, Satoru et al. (2006). “ERK MAP kinase in G1 cell cycle progression and cancer”. In: *Cancer Science* 97.8, pp. 697–702.
- Turjanski, Adrian Gustavo, Gerhard Hummer, & J Silvio Gutkind (2009). “How mitogen-activated protein kinases recognize and phosphorylate their targets: A QM/MM study”. In: *Journal of the American Chemical Society* 131.17, pp. 6141–6148.
- Turjanski, AG, JP Vaque, & JS Gutkind (2007). “MAP kinases and the control of nuclear events”. In: *Oncogene* 26.22, pp. 3240–3253.

- Uehling, David E, & Philip A Harris (2015). "Recent progress on MAP kinase pathway inhibitors". In: *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 25.19, pp. 4047–4056.
- Ullrich, Axel, & Joseph Schlessinger (1990). "Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity". In: *Cell* 61.2, pp. 203–212.
- Villarino, A et al. (2005). "Proteomic identification of M. tuberculosis protein kinase substrates: PknB recruits GarA, a FHA domain-containing protein, through activation loop-mediated interactions". In: *Journal of molecular biology* 350.5, pp. 953–963.
- Walburger, Anne et al. (2004). "Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages". In: *Science* 304.5678, pp. 1800–1804.
- Wehenkel, Annemarie et al. (2006). "The structure of PknB in complex with mitoxantrone, an ATP-competitive inhibitor, suggests a mode of protein kinase regulation in mycobacteria". In: *FEBS letters* 580.13, pp. 3018–3022.
- Wellbrock, Claudia, Maria Karasarides, & Richard Marais (2004). "The RAF proteins take centre stage". In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5.11, pp. 875–885.
- Whitmarsh, Alan J et al. (1998). "A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation". In: *Science* 281.5383, pp. 1671–1674.
- Widmann, Christian et al. (1999). "Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human". In: *Physiological reviews* 79.1, pp. 143–180.
- Xiao, Yao et al. (2014). "Phosphorylation releases constraints to domain motion in ERK2". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111.7, pp. 2506–2511.
- Yang, Shen-Hsi, Alex Galanis, & Andrew D Sharrocks (1999). "Targeting of p38 mitogen-activated protein kinases to MEF2 transcription factors". In: *Molecular and Cellular Biology* 19.6, pp. 4028–4038.
- Young, Tracy A et al. (2003). "Structure of Mycobacterium tuberculosis PknB supports a universal activation mechanism for Ser/Thr protein kinases". In: *Nature Structural & Molecular Biology* 10.3, pp. 168–174.
- Zanke, Brent et al. (1992). "Cloning and expression of an inducible lymphoid-specific, protein tyrosine phosphatase (HePTPase)". In: *European journal of immunology* 22.1, pp. 235–239.
- Zarubin, Tyler, & HAN Jiahuai (2005). "Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway". In: *Cell research* 15.1, pp. 11–18.

CAPÍTULO 2

La activación de MAPKs es controlada por la conformación del ATP.

2.1 Introducción

Las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) tienen un rol preponderante en el sistema de transducción de señales (Raman, Chen, & M. Cobb, 2007) siendo el nexo entre el espacio extracelular y el núcleo, regulando una vasta variedad de procesos celulares como proliferación, diferenciación y muerte celular programada (Weston, & Davis, 2007; Kyriakis, & Avruch, 2001). La familia denominada ERK por "Extracellular activated protein kinases", cuenta con varios miembros pero las más extensamente estudiadas son las isoformas ERK1 y ERK2 (A. Turjanski, Vaque, & J. Gutkind, 2007). La activación aberrante de esta subfamilia está a menudo asociada con cáncer (Gioeli et al., 1999; Hoshino et al., 1999). Es por esta razón que la cascada de señalización, ERK es un objetivo interesante para terapias antitumorales (Lawrence et al., 2008; Uehling, & Harris, 2015).

Para la completa activación de ERK2 se requiere de una doble fosforilación en dos residuos altamente conservados, thr¹⁸³ y tyr¹⁸⁵ [Figura 2.1] (Robinson et al., 1996; Canagarajah et al., 1997). Otra característica que presentan las MAPKs en general y ERK2 en particular, es su alta especificidad por péptidos/proteínas que poseen el motivo Ser/Thr seguido de prolina (Gonzalez, Raden, & Davis, 1991). Además, estudios bioquímicos y estructurales de la familia, describen que el reconocimiento de la quinasa por su sustrato es mediado por interacciones proteína-proteína en un sitio distal, lejos del sitio de transferencia de fosfato y fuera del sitio de unión de ATP (Remenyi, Good, & Lim, 2006). Los cambios conformacionales que acompañan a la activación de ERK2 han sido documentados por estructuras de rayos X pero, hasta el momento, solo disponemos de las apo-enzimas en la forma inactiva no-fosforilada (0P-ERK2) y en la forma activa, dualmente-fosforilada (2P-

ERK2) (Canagarajah et al., 1997; F. Zhang et al., 1994) pero se carece del complejo enzima sustrato con información estructural en el sitio activo. En ellas se observa, que la doble fosforilación antes mencionada, reorganiza el "loop" de activación, dando lugar a nuevas interacciones. En primer lugar, la pThr¹⁸³ y elementos de la alpha-C forman interacciones de puente salino y en segundo lugar, el residuo pTyr¹⁸⁵ interactúa con residuos básicos de los dominios N- y C-terminal. Otros cambios estructurales tras la activación incluyen el plegado de una hélice 3_{10} en el "loop" L16 que expone un cierre hidrofóbico, que forma la interfaz que permitiría la dimerización (M. H. Cobb, & Goldsmith, 2000). Todo esto resulta en una pequeña rotación de alrededor de 5° del N-terminal sobre el C-terminal (Canagarajah et al., 1997). Además, trabajos recientes proponen que la rotación y concomitante estabilización de la hélice αC , es el nexo para el acoplamiento alostérico, entre el sitio de unión de péptidos y el dominio catalítico. Dicho control en ERK2, se realiza a través del movimiento interdominio posicionando correctamente la hélice αC (Barr et al., 2011; Nguyen et al., 2015). Sin embargo, como discutiremos más adelante el cambio conformacional observado en el dominio C-terminal al activarse ERK2 es sutil. A diferencia de ERK2, otras proteínas quinasa como Src o PKA, presentan un cambio conformacional dramático, y este cierre/rotación permite que residuos importantes se reposicionen. Esto produce un reacomodamiento estructural del sitio activo que es necesario para la catálisis enzimática. La proteína para alcanzar dicho estado requiere un movimiento concertado que involucra la apertura del loop A y el "alineamiento del N-terminal con el C-terminal, acompañado por la rotación de la hélice αC (Banavali, & Roux, 2007; Yang, Banavali, & Roux, 2009). En la Figura 2.2A se observa la superposición de estructuras cristalográficas correspondientes al estado activo e inactivo de 5 proteínas quinasas representativas; empezando en la derecha con el ejemplo paradigmático de activación de quinasas como lo es PKA, exhibiendo el mayor RMSD entre conformeros, seguidos por EGFR, SRC, CDK2 y finalmente ERK2. Curiosamente observamos que en todas, menos ERK2, muestran una significativa rotación de la hélice αC [Figura 2.2C]. Además, ERK2 solo muestra cambios asociados a las porciones antes descritas, que incluyen la reorganización del loop de activación y el L16, representados en la figura 2.2B. El hecho de que el fenómeno estudiado sea tan sutil, y que ambas estructuras cristalinas sean muy similares nos motivo a estudiar cuáles son los elementos importantes que son modulados para poder realizar eficientemente su función, desde el punto de vista catalítico.

Por otra parte, experimentos de RMN, Car-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) descubrieron

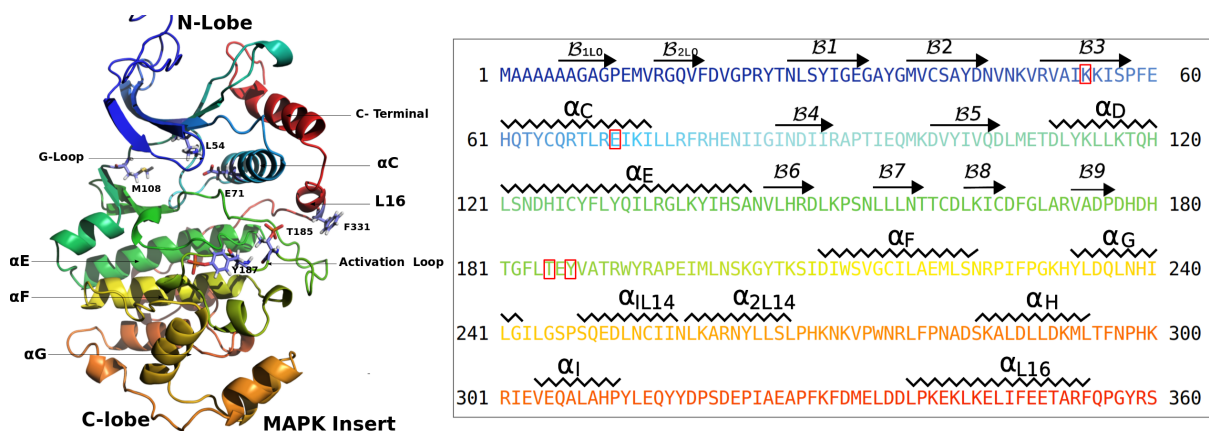


Figura 2.1: Representación de cintas para 2P-ERK2. Se muestran elementos de estructura secundaria relevantes. Residuos importantes para la catálisis están recuadrados en la secuencia

que la doble fosforilación de ERK2 induce cambios en la dinámica de la enzima. Si bien no pudieron elucidar la estructura han propuesto que, mientras la forma no fosforilada de la proteína (0P-ERK2) existe mayoritariamente como el conformero observado en el cristal, la estructura de 2P-ERK2 existiría en dos conformaciones que se intercambian en el tiempo de milisegundos. El conformero minoritario (20%) correspondería a aquel observado en el cristal de 0P-ERK2, mientras que el mayoritario (80%), representa una nueva forma energéticamente inaccesible en 0P-ERK2 y similar al cristal de 2P-ERK2. Por ende, el efecto de la fosforilación es alterar la dinámica de la enzima, disminuyendo la barrera termodinámica que permite la formación de un nuevo conformero, el cual es solo accesible en el estado activo. Es más, el trabajo describe que 0P-ERK2 está restringido conformacionalmente con un $\Delta G^\circ > +3.1$ kcal/mol entre los dos estados, mientras que la fosforilación desplaza el equilibrio hacia la forma 2P-ERK2 con $\Delta G^\circ = -0.8$ kcal/mol. (Xiao et al., 2014). Sin embargo, no es claro cuáles son los determinantes estructurales que permiten la transición ni como es la conformación activa en solución.

En todas las proteínas quinasas luego del proceso de activación, que por lo general consiste en la fosforilación del loop de activación, un residuo Lys conservado en el sitio activo (Lys⁵² numeración ERK2 de ratón) juega un rol crítico en la estabilización del estado de transición, mediante la coordinación de los oxígenos de los fosfatos α y β del ATP (Bao, Jacobsen, & Young, 2011; Akamine, Xuong, & Taylor, 2002). La sustitución de este residuo por arginina o alanina resulta en una gran disminución de la tasa de intercambio y por ende en la actividad, teniendo un efecto menor en la unión de ATP (Robinson et al., 1996; Sours, Xiao, & Ahn, 2014). Podemos agregar que en el cristal de la forma 0P-ERK2 con ATP recientemente reportado, la Lys⁵² no estaría en una única conformación en contacto

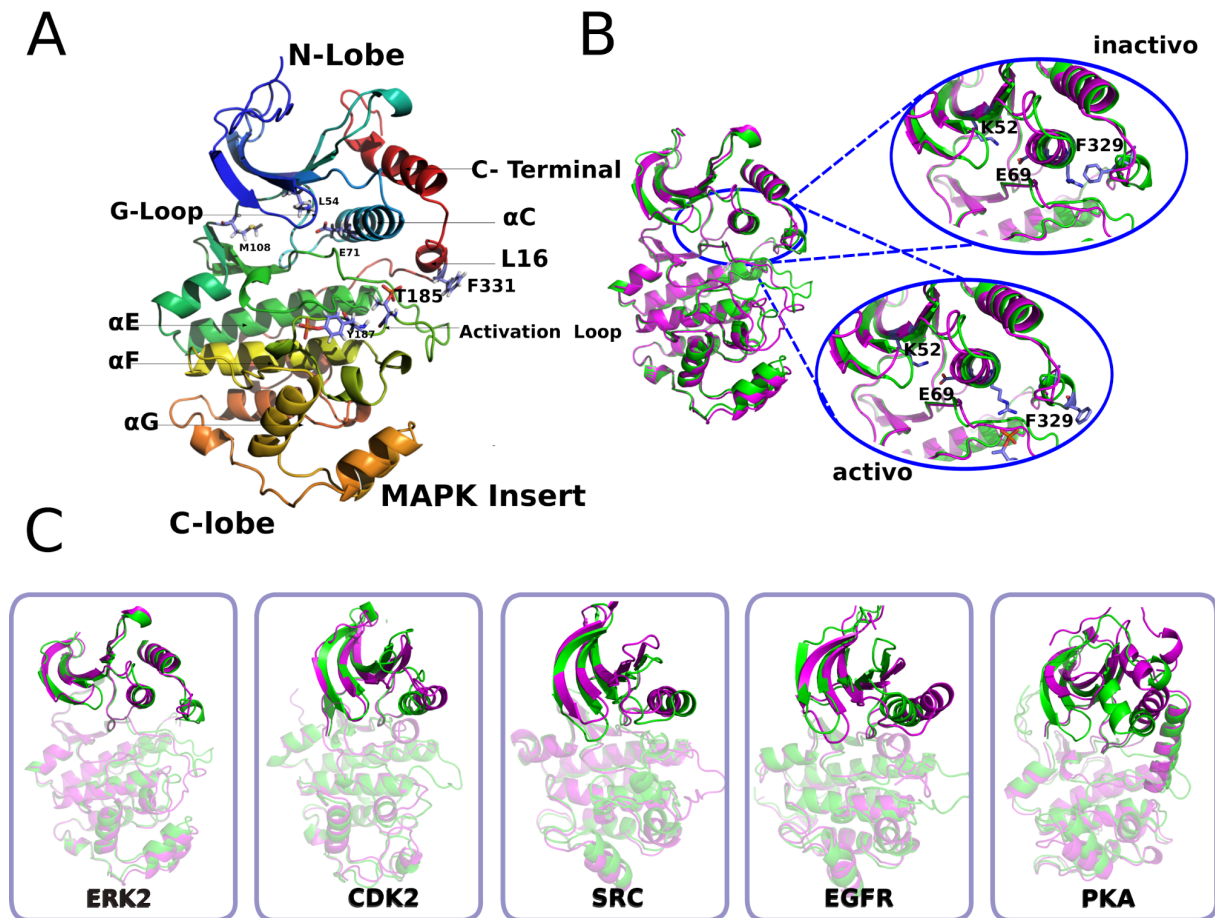


Figura 2.2: Plasticidad de dominio quinasa. A) Estructura cristalográfica de 2P-ERK2. Los colores varían de azul (n-terminal) hasta rojo (C-terminal). Elementos importantes de estructura secundaria del dominio quinasa están marcados en consecuencia. Aminoácidos relevantes se muestran en una representación de bastones (PDBid:2ERK). B) Principales cambios en la activación de ERK2 destacando las interacciones formadas producto de la fosforilación en Thr¹⁸³: pT¹⁸³-R⁶⁸; puente salino K⁵²-E⁶⁹ y residuos relevantes dentro del *loop* L16. Estos cambios conformacionales se encuentran en el replegado del *loop* L16 y rotación del N-terminal. C) 5 representantes de EPKs que ilustran cambios principalmente en el hélice α C y el dominio n-terminal. Estos se encuentran ordenados de izquierda a derecha incrementando la magnitud del cambio conformacional. El código de colores denota inactivo/activo como magenta y verde respectivamente.

con el ATP (F. Zhang et al., 1994 , PDBid 4GT3). Interesantemente, este estado conformacional no fosforilado, muestra una drástica reducción en la cinética de fosforilación de otros blancos (50000x menos) y una pequeña diferencia en la afinidad por el ATP (0.20 ± 0.01 , 0.42 ± 0.06 Kd $\pm$ SD (mM) para 0P-ERK2, 2P-ERK2 respectivamente) (Prowse, & Lew, 2001; Sours, Xiao, & Ahn, 2014).

Cabe destacar que la estructura cristalográfica de 2P-ERK2 no contiene ATP, sin embargo se presume que la activación por doble fosforilación actúa en parte alineando la lys⁵². En concordancia, inhibidores que estabilizan la forma inactiva en estas proteínas mueven

2.1. INTRODUCCIÓN

la hélice α C en el dominio N-terminal y rompen el puente salino entre la lisina catalítica y un glutámico altamente conservado (Hari, Merritt, & Maly, 2014).

Por último, existen varios trabajos que exploran los mecanismos de reacción de transferencia de fosfatos en solución y catalizados por quinasas, utilizando abordajes QM/MM. La hidrólisis de ATP en solución muestra un mecanismo de reacción concertado, hasta alcanzar el estado de transición, y luego presenta un cierto carácter asociativo (C. Wang, Huang, & Liao, 2015). En el mismo sentido, la reacción de fosforilación catalizada por PKA (Pérez-Gallegos et al., 2014) y CDK2 (De Vivo et al., 2007) presentan un estado de transición S_N2 -concertado y con cierto carácter asociativo; donde un residuo Asp sirve como base para activar el nucleófilo. Sin embargo otros trabajos sobre estos mismo biopolímeros sugieren que el correspondiente estado de transición muestra un posible mecanismo disociativo con una estructura símil meta-fosfato (Smith et al., 2011; Valiev et al., 2007). Específicamente en relación con las MAPK, recientemente el origen de la selectividad de éstas, por sustratos que exhiban Pro y su relación con el mecanismo de fosforilación, han sido estudiados por experimentos de "docking" y dinámica molecular, donde se proponen modelos del complejo ERK2 con su sustrato, mientras que en un trabajo de nuestro grupo, el perfil de energía fue determinado con un esquema de minimización de energía, mostrando una barrera moderada para el proceso de fosforilación (17 Kcal/mol para el estado activo) y el rol clave de la lys⁵² para estabilizar fuertemente el estado de transición (A. G. Turjanski, Hummer, & J. S. Gutkind, 2009). A pesar de que los trabajos mencionados claramente ayudaron a nuestra comprensión del mecanismo de la fosforilación de MAPK en particular y de kinasas en general, varias cuestiones importantes siguen siendo materia de debate. Sin embargo, hay solo unos pocos trabajos donde se estudia el mecanismo en kinasas (Smith et al., 2011). En particular, la respuesta definitiva a nivel molecular de cómo la doble fosforilación de ERK2 resulta en la activación y el rol de la dinámica proteica en la catálisis permanece irresoluta.

En este trabajo mostramos que la barrera para la reacción depende fuertemente de la conformación del ATP, la cual es ligeramente regulada por la activación de la quinasa mediante la fosforilación de residuos clave. Esta conformación susceptible para el ataque nucleofílico permite la unión de un segundo magnesio que posiciona el γ -fosfato para la catálisis. Este mecanismo parece estar conservado en las Ser/Thr quinasas, y explicaría porqué a pesar de las pequeñas diferencias en las estructuras activa e inactiva de ERK2, mas allá de la observadas para el loop de activación, muestra un gran incremento en la actividad catalítica (50000x).

2.2 Resultados

2.2.1 Cambios conformacionales asociados a la activación de ERK2

La activación de las proteínas quinasa por fosforilación en el loop de activación, han sido ampliamente estudiadas y varias estructuras se encuentran depositadas en el Protein Data Bank (PDB). Estas muestran que en el sitio activo (en donde se une el ATP), en la así llamada conformación "abierta", sufre un cambio conformacional alcanzando la conformación "cerrada". Los cambios estructurales importantes están localizados principalmente en el dominio N-terminal y usualmente están caracterizados por la rotación de la hélice αC con el movimiento asociado de las hojas beta y el loop rico en glicina (*glycine rich loop*) [Figura 2.2B].

Para una mejor descripción de los cambios asociados a la activación, hemos relevado la conformación o geometría de residuos de naturaleza hidrofóbica, que otros autores plantean como importantes, de las estructuras cristalinas disponibles para ERK2. Se propone que en las quinasas existen dos columnas de residuos en el núcleo proteico, que son responsables del correcto funcionamiento de la actividad quinasa. Una de ellas, es descripta como el pilar o la columna catalítica (C-spine) que contiene los residuos responsables de la catálisis propiamente dicha; mientras que la otra, la columna regulatoria (R-spine) tiene una función más estructural, ya que al establecerse alinearía los residuos catalíticos posicionándolos para la catálisis (Kornev, & Taylor, 2010; Meharena et al., 2013). La figura 2.3E muestra que efectivamente en la quinasa modelo PKA, que la activación promueve el alineamiento de ambas columnas. Para realizar el mismo análisis sobre ERK2, estos mismos segmentos representados por los residuos I⁸⁴, L⁷³, F¹⁶⁶, H¹⁴⁵, D²⁰⁸ para la columna regulatoria (R-spine) y los residuos A⁵⁰, V³⁷, L¹¹⁰, L^{153–155}, I²¹⁵, M²¹⁹, para la columna catalítica (C-spine) fueron evaluados [figura 2.3B]. Producto de la evaluación residuo a residuo, el RMSD entre los estados 0P-ERK2 versus 2P-ERK2 y 0P-ERK2-ATP versus 2P-ERK2 no arroja diferencias significativas en la posición de dichos residuos, que pudieran explicar las diferencias en la actividad antes discutidas. En este sentido entonces pensamos que lo observado previamente en PKA y otras quinasas no se aplicaría al caso de ERK2.

Con la posibilidad de que las diferencias se deban a cambios en la dinámica o poblaciones de ambos estados, 0P-ERK2 y 2P-ERK2, se procedió a realizar un estudio del ensamblaje conformacional para cada uno de ellos. Una comprensión más profunda del ensamblaje conformacional de la proteína se puede obtener mediante simulaciones de dinámica molec-

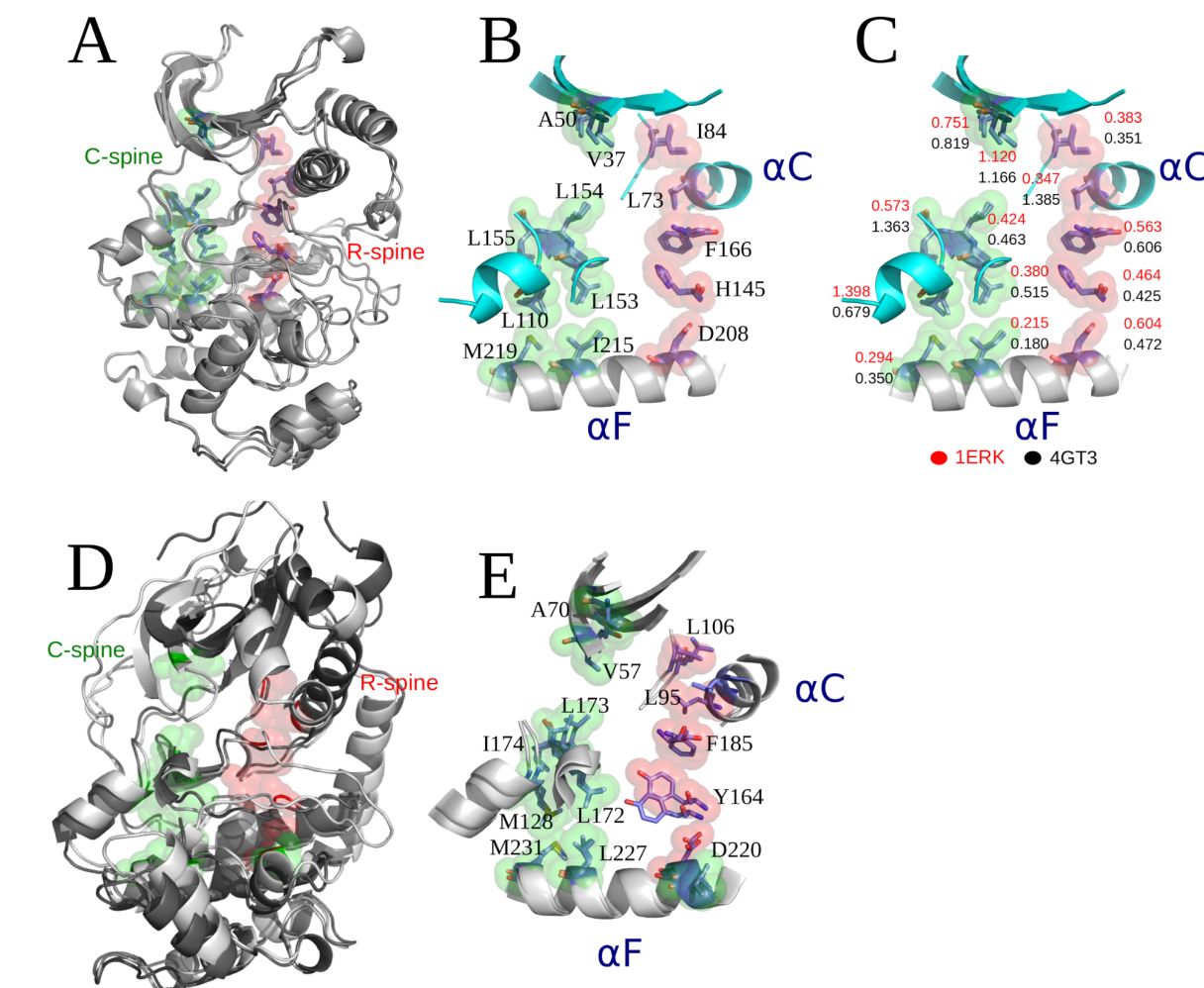


Figura 2.3: Cambios en las espinas C y R. A) ambas columnas hidrofóbicas en el contexto de la proteína. B) alineamiento de 0P-ERK2 y 2P-ERK2 (PDBid 1ERK, 2ERK respectivamente) señalando los elementos importantes de cada "espinas". C) RMSD cada residuo individual, entre la forma no fosforilada (0P-ERK2) y la doblemente fosforilada (2P-ERK2) (etiquetas negras) y 2P-ERK2+ATP (PDBid 4GT3) vs 2P-ERK2 (etiquetas rojas).

ular (MD). Por consiguiente, fueron realizadas varias MD de 100 ns cada una, en ambos estados, activo e inactivo, observándose que oscilan alrededor de las estructuras resueltas por difracción de rayos X, sin cambios significativos aparentes (Figura 2.4). Es más, si en nuestro análisis excluimos los segmentos L16 y el loop de activación, podemos observar que las conformaciones del dominio quinasa se visitan mutuamente. Es decir, simulaciones partiendo de la estructura de 0P-ERK2 visitan en solución estructuras similares a 2P-ERK2 y viceversa, esto incluso en tiempos del orden de nanosegundos. Sin embargo, con el fin de explorar y/o discutir si es que en solución ambos estados presentan un ensamble conformacional distinto y que no se observe debido a un problema de muestreo, realizamos dinámicas moleculares largas, de hasta 2 μ s. En la figura 2.4 observamos una superposición de la estructura cristalina para el conformero inactivo 0P-ERK2 (PDBid 1ERK, F. Zhang et al., 1994), con fotos obtenidas del último μ s de la trayectoria de la forma doble-

mente fosforilada, 2P-ERK2 (PDBid 2ERK, Canagarajah et al., 1997). Se puede observar que las conformaciones visitadas en la dinámica 2P-ERK2 para el dominio quinasa y elementos importantes como la helice αC , incluyen a 0P-ERK2 y viceversa. Sin embargo una

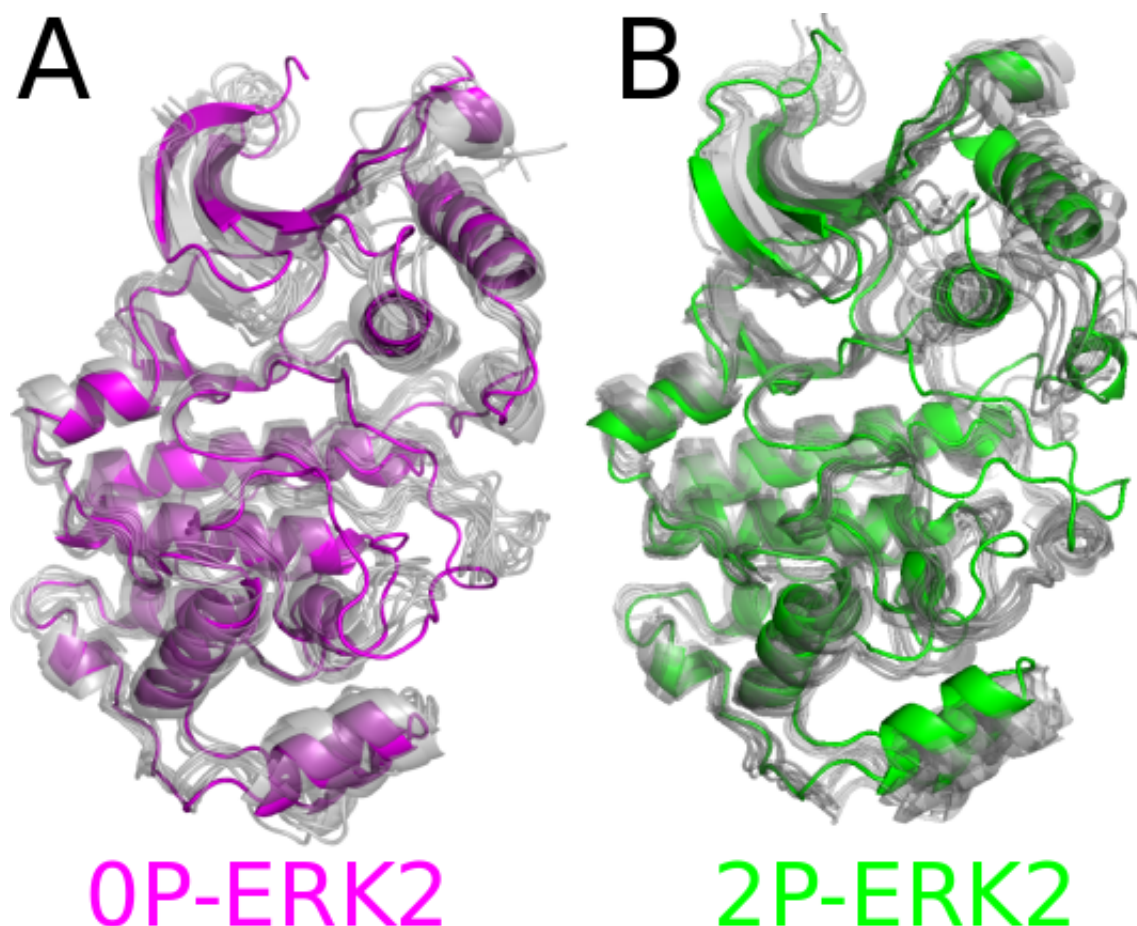


Figura 2.4: Ensamble conformacional de ERK2. Simulaciones de dinámica molecular muestran que ambas se visitan mutuamente en el segmento N-terminal. A) 0P-ERK2 se refiere a la forma no fosforilada de ERK2 en magenta y fotos de la dinámica de 2P-ERK2 en gris. B) idem A para el conformero doblemente fosforilado en verde con la superposición de fotos de dinámica molecular de la forma 0P-ERK2(gris).

forma robusta de analizar los movimientos colectivos relevantes de una proteína, consiste en la extracción de Modos esenciales (ME) a partir de dinámicas moleculares (Detalles de la obtención de los mismos en la sección 2.4). Además, las proyecciones de la trayectoria a lo largo de estos ME arrojan información acerca del espacio conformacional muestreado en la simulación. Lo más relevante con respecto a nuestro interrogante, es que nos permite comparar los principales movimientos colectivos y los espacios conformacionales entre dos estados de manera robusta. En este sentido, hemos computado la proyección del primer modo de transición para la activación, a lo largo de la dinámica, para cada estado conformacional. La confección de un histograma de dichas proyecciones, nos permite evaluar las poblaciones conformacionales y la magnitud de las fluctuaciones de cada estado, para dicha

2.2. RESULTADOS

transición. El histograma de la dinámica proyectada para el primer modo de la transición de "activación", se puede observar en la figura 2.6. Allí simplemente, se observa como ambos histogramas se superponen parcialmente, mostrando así, que para el dominio quinasa las conformaciones se visitan mutuamente.

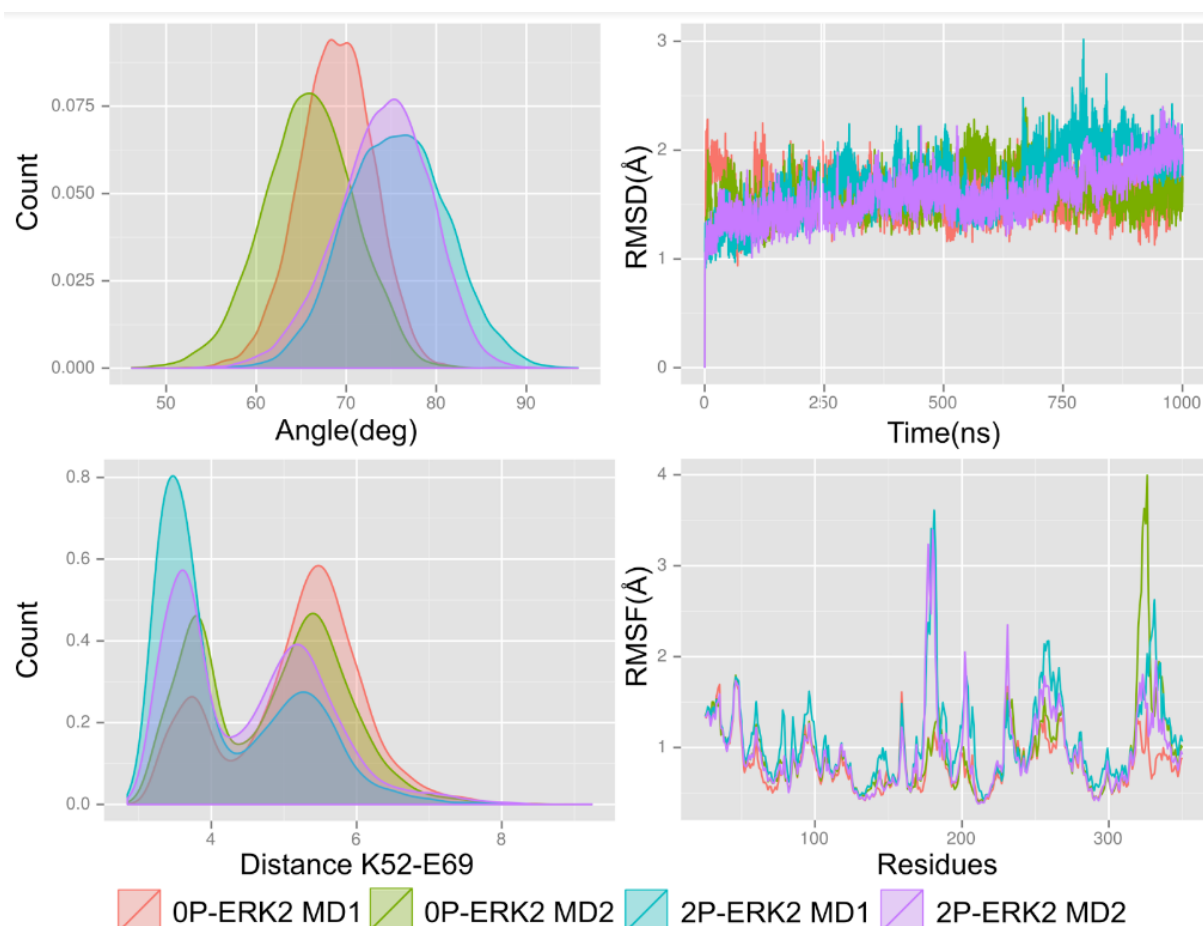


Figura 2.5: RMSD, RMSF, angulo dihedro entre αC y αF para cada una de las dinámicas moleculares (2 μs cada réplica). 0P-ERK2 se refiere a la forma no fosforilada de ERK2 y 2P-ERK2 para el conformero doblemente fosforilado.

Por otra parte, a fin de analizar las fluctuaciones conformacionales, alineamos el C-terminal y se calculó la rotación de la hélice- αC con respecto a la hélice-F del dominio C-terminal. Como se reportó anteriormente, hay un cambio en el ángulo de alrededor de 10° entre los estados activo e inactivos (Barr et al., 2011), pero las distribuciones son lo suficientemente amplias y se superponen en la escala de tiempos en la que fue ensayada la dinámica, del orden de cientos de nanosegundos (Figura 2.5A). Estos resultados, junto con el análisis de modos esenciales, permiten concluir que ambos estados se visitan mutuamente y que las conformaciones son ligeramente diferentes, pero que dichas diferencias, en principio no permitirían explicar los grandes cambios que presenta ERK2, en la actividad.

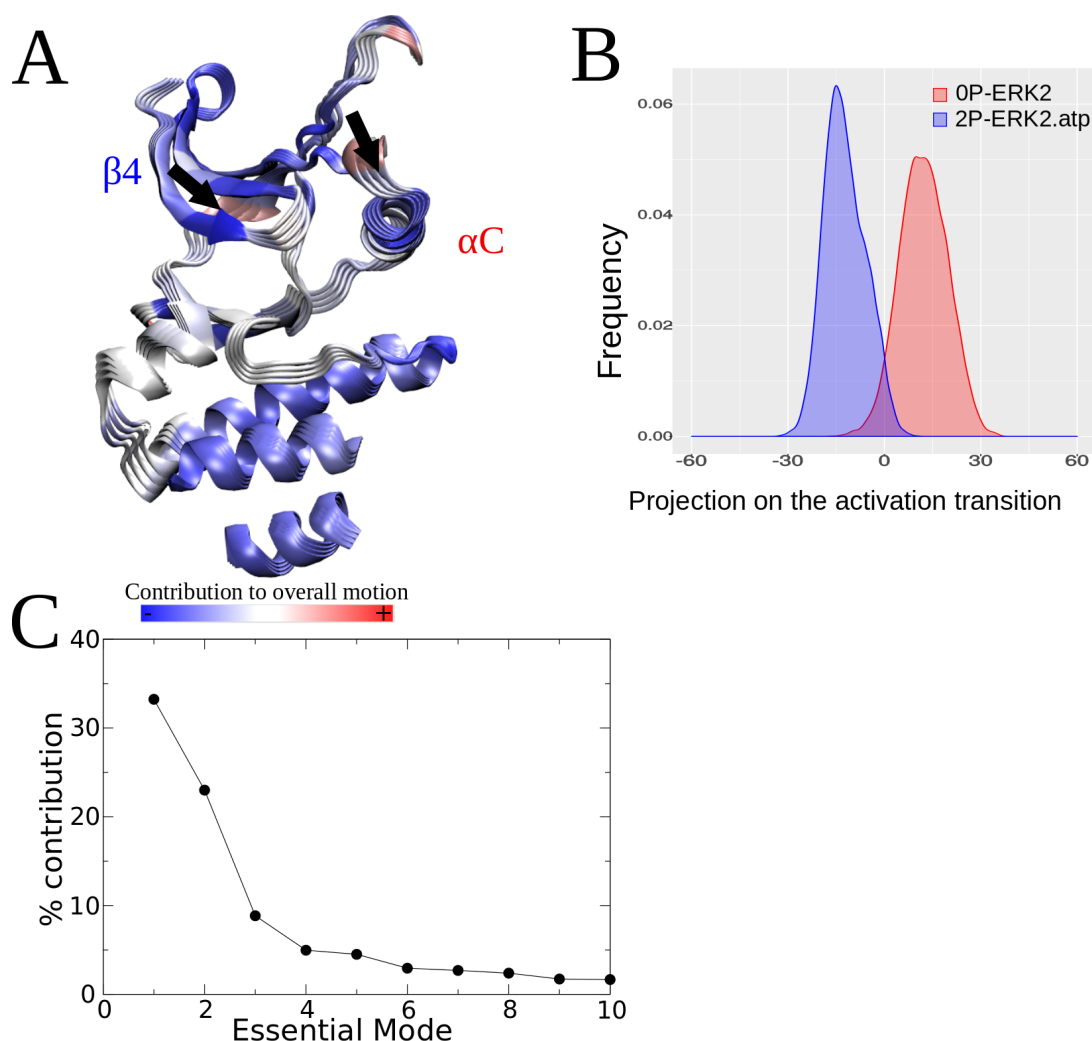


Figura 2.6: Proyección de modos esenciales para cada dinámica molecular. Histograma de la proyección del modo de transición de activación para cada estado conformacional. (A) Proyección del primer modo de transición sobre la estructura 2P-ERK2. Las principales contribuciones de cada residuo están indicados con flechas. B) histograma del primer modo de transición donde 2P-ERK2-atp (azul) y 0P-ERK2 (verde). C) Contribución de cada modo a la movimiento global.

2.2.2 Estabilización de la hélice αC por el *loop* L16

Refiriéndonos nuevamente al trabajo de Ahn y colaboradores, donde monitorean la dinámica proteica de ERK2 en el rango de microsegundos a milisegundos; ellos reportan que esta proteína alterna entre dos estados conformacionales bien definidos (Xiao et al., 2014). Para ello, midieron los metilos (^1H - ^{13}C) de las cadenas laterales de residuos Leu, Ile, y Val (*multiple-quantum CPMG experimentos de relajación de la dispersión*) a partir de los cuales se obtienen constantes de relajación, que permiten calcular constantes de intercambio, ajustando dichos datos a un modelo de dos estados. Como mencionamos anteriormente, 0P-ERK2 exhibe un conformero único en solución en los tiempos evaluados. Sin embargo, las señales de RMN para el estado doblemente fosforilado (2P-ERK2), permiten que 19

residuos del núcleo del dominio quinasa, se ajusten globalmente a un proceso de dos estados (pA y pB) caracterizado por una constante de intercambio entre ellos de $k_{ex} = 300 \pm 10 \text{ s}^{-1}$ y poblaciones del 20% para el estado A y 80% para el estado B ($\pm 0.6\%$). Siendo el estado A el correspondiente al aquel observado en 0P-ERK2, mientras que el B (80%) representa un conformero energicamente inaccesible en 0P-ERK2, que sería el estado biológicamente activo. Por otra parte, el estudio permite observar otros sorprendentes cambios dinámicos producto de la activación por fosforilación. Es decir, el ajuste individual de cada residuo a un modelo de dos estados, muestra grandes variaciones en el rango dinámico de las constantes de intercambio para el estado 0P-ERK2, mientras que el estado 2P-ERK2 muestra un rango mas acotado para dichas constantes, y esto permite concluir que 0P-ERK2 parece un estado mas desacoplado dinamicamente, mientras que 2P-ERK2 esta dominado por un proceso de intercambio conformacional global. De este ajuste individual, podemos agregar que algunos residuos presentan análogamente dos estados discretos. Además estos metilos presentan poblaciones similares a las observadas para el ajuste global, y dichas poblaciones pueden cambiar en función de la temperatura. Como consecuencia de esto, algunos residuos pueden ser utilizados como reporteros del cambio conformacional, entre ellos podemos encontrar la ile⁷² que estructuralmente se encuentra en una posición central en la hélice α C. Para indagar en los motivos subyacentes al cambio observado por RMN para este residuo, observamos las estructuras cristalográficas para ambos estados y los residuos circundantes al mismo. Las diferencias que presentan en el entorno de la ile⁷² son principalmente producto del replegado del loop L16. Brevemente, mientras en la estructura 0P-ERK2 el residuo esta expuesto al solvente (Figura 2.7A); en la estructura activa, el δ -carbono del residuo ile⁷² está en la cercanía de la phe³²⁹. A la conformación del loop que pone en contacto a la ile⁷² y phe³²⁹ la llamamos conformación phe³²⁹ IN, mientras que a la que esta expuesta al solvente, la llamamos phe³²⁹ OUT (Figura 2.7A). A partir de dicha observación, nos preguntamos si existe alguna relación entre el cambio en la señal de RMN para la ile⁷² y el replegado del *loop* L16, denotado por la posición del residuo fenil-alanina.

Para abordar este interrogante, empleamos dinámica molecular clásica (MD) y dinámica molecular guiada (Umbrella sampling) ya que en los tiempos de nanosegundos, asequibles por Md no esperamos observar el cambio conformacional. A partir de MD, seleccionamos fotos del ensamble conformacional para cada estado y calculamos su desplazamiento químico mediante el empleo del programa SHIFT2X (Han et al., 2011). Al analizar los resultados

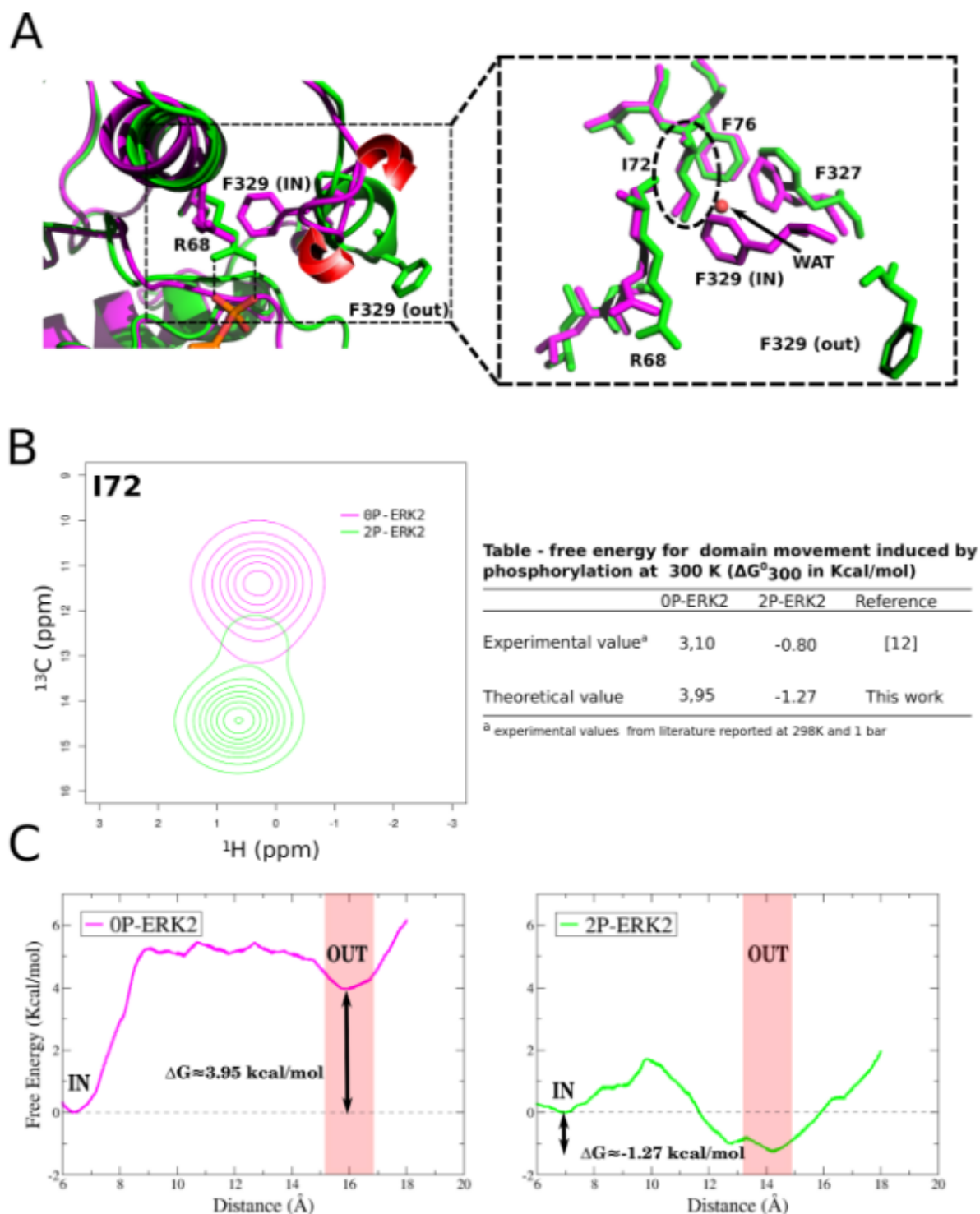


Figura 2.7: F³²⁹ como reportero del cambio conformacional. F³²⁹ out, es el estado conformacional plegado A) residuos circundantes a la I⁷², el principal cambio conformacional involucra la rotación de la F³²⁹. B) señal de HMQC computadas para el estado 0P-ERK2 y 2P-ERK2 a 25 °C muestra dos señales para I⁷², para ello usamos el programa SHIFT2X (Han et al., 2011). C) Perfil de energía libre para el proceso de plegado/desplegado del *loop* L16. Conformeros Inactivo (0P-ERK2) y activo (2P-ERK2) están coloreados magenta y verde respectivamente.

observamos cualitativamente dos poblaciones compatibles con los datos experimentales antes descriptos para el desplazamiento químico de la ile⁷² (Figura 2.7B). Este resultado

nos indica que es probable que se haya observado este cambio conformacional al evaluar la ile⁷². Por otra parte, para la evaluación de las poblaciones relativas de la phe³²⁹, empleamos dinámica molecular guiada con el protocolo descrito en materiales y métodos. Brevemente, tomamos la distancia entre el z-carbono de la phe³²⁹ y el α -carbono de la ile⁷² y obtuvimos los perfiles de energía libre representados en la figura 2.7C como descriptor del proceso de cambio conformacional. Interesantemente, los valores de energía libre obtenidos se encuentran en concordancia con los observados por RMN (Figura 2.7 tabla). La metodología empleada nos permite además, extraer información acerca de la barrera para el cambio conformacional. Al respecto, podemos observar que la forma 2P-ERK2 presenta una pequeña barrera de aproximadamente ~ 2 kcal/mol, encontrándose sin restricciones topológicas para el intercambio entre estados. Mientras que del análisis del perfil de energía libre para el proceso de plegado/desplegado del loop L16 vemos que la enzima en su estado inactivo presenta una barrera de ~ 4.5 kcal/mol. A partir de estos datos podemos concluir que los cambios en las poblaciones relativas de la phe³²⁹ y las señales de RMN para la ile⁷² son parte del mismo fenómeno de plegado/desplegado del *loop* L16 que ocurre en la escala temporal del orden de microsegundos/milisegundos.

2.2.3 La activación promueve la formación del puente salino.

Con el objetivo de estudiar los posibles efectos de los sutiles cambios conformacionales que presenta ERK2, el primer interrogante, es cómo sería la coordinación efectiva de la enzima en la forma holo, es decir, con ATP y cofactores; para que ocurra la catálisis enzimática. Para ello, se realizó un relevamiento de la coordinación del atp, en ser/thr quinasas activas en la base de datos PDB. Para este análisis se consideraron todas aquellas estructuras con dos metales divalentes (Magnesio y Manganeso principalmente) en el sitio activo adyacentes al ATP, y consideramos las métricas relevantes a fin de caracterizar la conformación del estado reactivo (ángulo diedros, distancias, número de coordinantes, etc). Se seleccionaron todas aquellas enzimas con dos magnesios puesto para que ERK2, así como para otras quinasas, se observó que la velocidad depende de la concentración del Mg^{+2} y la relación estequiométrica nos permite deducir que necesita dos magnesios (Waas, & Dalby, 2003). Las distancias relevantes, se resumen en la tabla 2.10. A partir de dicho análisis, el estado reactivo está caracterizado por poseer el ATP, con dos metales divalentes coordinados con una geometría octaédrica. El arquetipo de la correcta conformación del ATP lo brindan, PKA, CDK2 y p38 γ (Zheng et al., 1993; Bellon et al., 1999). Para in-

ferir el modelo del complejo final de ERK2, nuestro objeto de estudio, consideramos a la MAPK p38 γ por encontrarse mas cerca filogenéticamente. Para esta última, el complejo p38 γ /ATP/Mg⁺² describe dos sitios, el sitio I (MSI) y el sitio II (MSII) (Figura 2.8A). En consecuencia, la construcción del complejo final para ERK2 se realizó considerando estas cuestiones geométricas. El sitio I, esta comprendido por el asp¹⁶⁵ del motivo ¹⁶⁵DFG¹⁶⁷ de manera bidentada, los fosfatos β y γ del ATP, y lo completan dos moléculas de agua. Por otro lado, el sitio 2, engloba el residuo asn¹⁵², uno de los oxígenos del asp¹⁶⁵, los fosfatos α y γ del ATP y una molécula de agua (Figura 2.8C). Otra característica importante surge del relevamiento de la base de datos PDB, un puente salino, entre una lisina (lys⁵² numeración ERK2.) de la hoja β 3 y un residuo glutámico(glu⁶⁹) de la α C altamente conservado, que debería estar formado en el estado reactivo (tabla 2.10). Considerando que el cambio más importante en la activación de ERK2 en el sitio activo se produce en la helice α C y que el puente salino entre la lys⁵² y el glu⁶⁹ podría estar regulado por estos cambios decidimos estudiarlo en detalle. Por ende, para evaluar si hay alguna diferencia en la capacidad de formación del puente salino entre los estados 2P-ERK2/ATP/Mg⁺² y 0P-ERK/ATP/Mg⁺² calculamos el perfil de energía libre para la formación del puente salino entre la lys⁵² y el glu⁶⁹. Para ello se empleo una técnica de muestreo sesgada denominada *Umbrella sampling* y como descriptor del proceso, utilizamos la distancia entre ambos residuos. Como resultado obtuvimos que la activación promueve la formación del puente salino con un mínimo a 3.5Å para la forma doblemente fosforilada (Figura 2.8B, curva verde) y una barrera para romper dicha interacción cercana a las ~4 kcal/mol. Por otra parte, la forma inactiva (0P-ERK2) prácticamente no presenta barrera para el proceso, encontrándose dos mínimos energéticos, uno a 3.7Å y otro a 5.2Å (Figura 2.8B, curva magenta). Además si consideramos los cristales disponibles para 0P-ERK2-ATP, dichas estructuras muestran que este puente salino vital, no se encuentra formado (PDBids:4GT3,4S32, Figura 2.8A) permitiéndonos postular que el estado activo presenta la interacción fuertemente formada, mientras que el estado inactivo no.

Esto nos lleva a preguntarnos si estos sutiles cambios alostéricos producto de la activación y consecuente formación del puente salino, están asociados a la incorporación de Mg⁺², en particular el Mg⁺² del sitio I. Para ello, se aplicó un esquema para la evaluación de la energía libre de unión del Mg⁺² denominado *integración termodinámica* (para detalles técnicos referirse a la sección materiales y métodos). Sorprendentemente, la activación y formación del puente salino resulta en un incremento de -8.6 kcal/mol en la afinidad

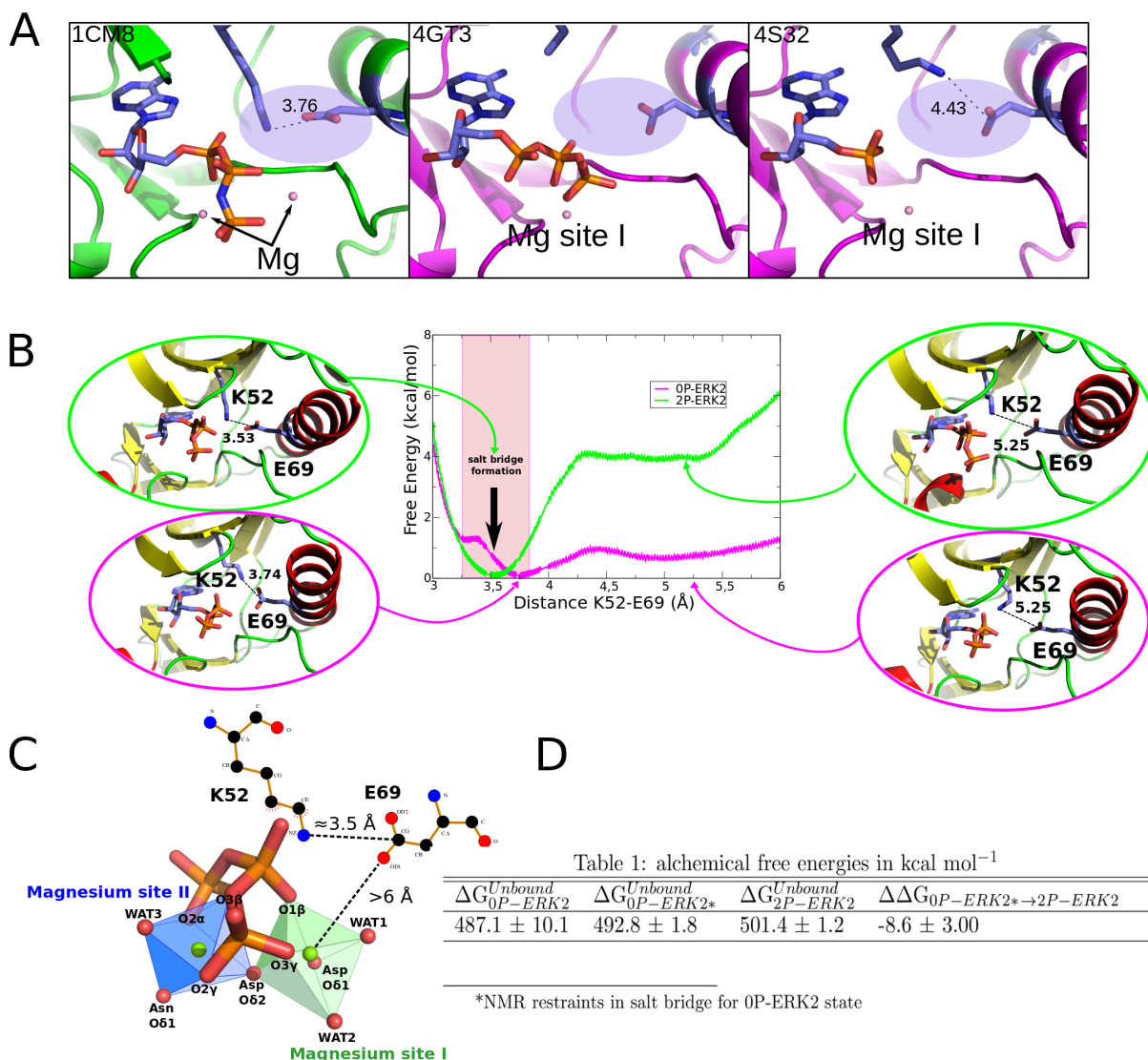


Figura 2.8: Relación entre la formación del puente salino y la coordinación apropiada del ATP. A) Estructuras cristalográficas representativas de MAPK con ATP (o análogo de ATP). 2P-P38 γ (PDBid:1CM8; izq.), 0P-ERK2 (PDBid:4GT3,4S32; centro y derecha) B) Perfil de energía libre de formación del puente salino. 0P-ERK2 y 2P-ERK2 están coloreados magenta y verde respectivamente. C) Esfera de Coordinación del ATP según datos cristalográficos (tabla completa en material suplementario). D) Energía libre de unión al sitio activo de la quinasa, utilizando integración termodinámica.

por el Mg⁺² del sitio I (Figura 2.8D). De manera complementaria a tales resultados, se realizaron dinámicas moleculares de ambos estados, en presencia de ATP y dos magnesios. La geometría inicial de ambos estados conformacionales fue la misma, tomando las consideraciones geométricas antes discutidas y resumidas en la figura 2.8C, e inesperadamente al cabo unos pocos nanosegundos (~30ns) ocurrió una distorsión de la esfera de coordinación del Mg⁺² del sitio I, para el estado 0P-ERK2, mientras que el estado activo no presento cambios en el tiempo ensayado (Figura 2.10). Dicha distorsión, presenta principalmente la rotura del puente salino y como producto de esto, el glu⁶⁹ interacciona con

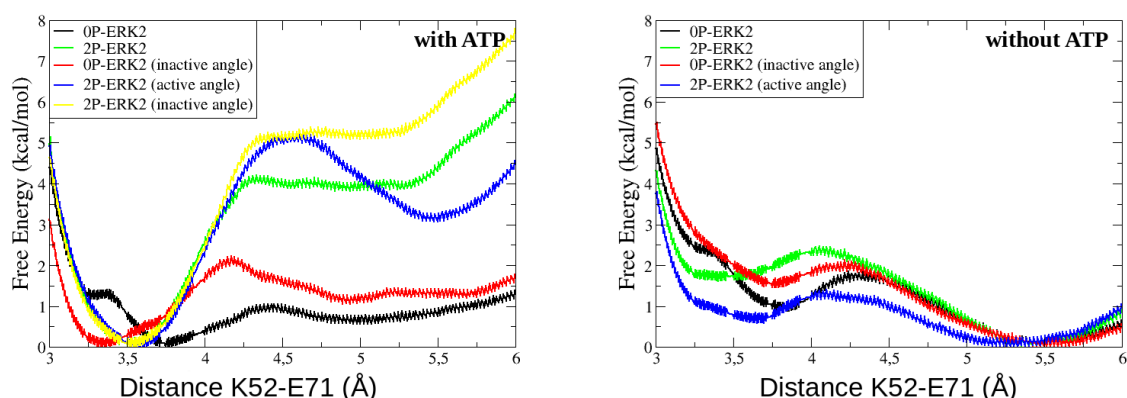


Figura 2.9: PMF para la ruptura del puente salino. La distancia entre K52 y E69 fue utilizada para construir el PMF en presencia y ausencia de ATP.

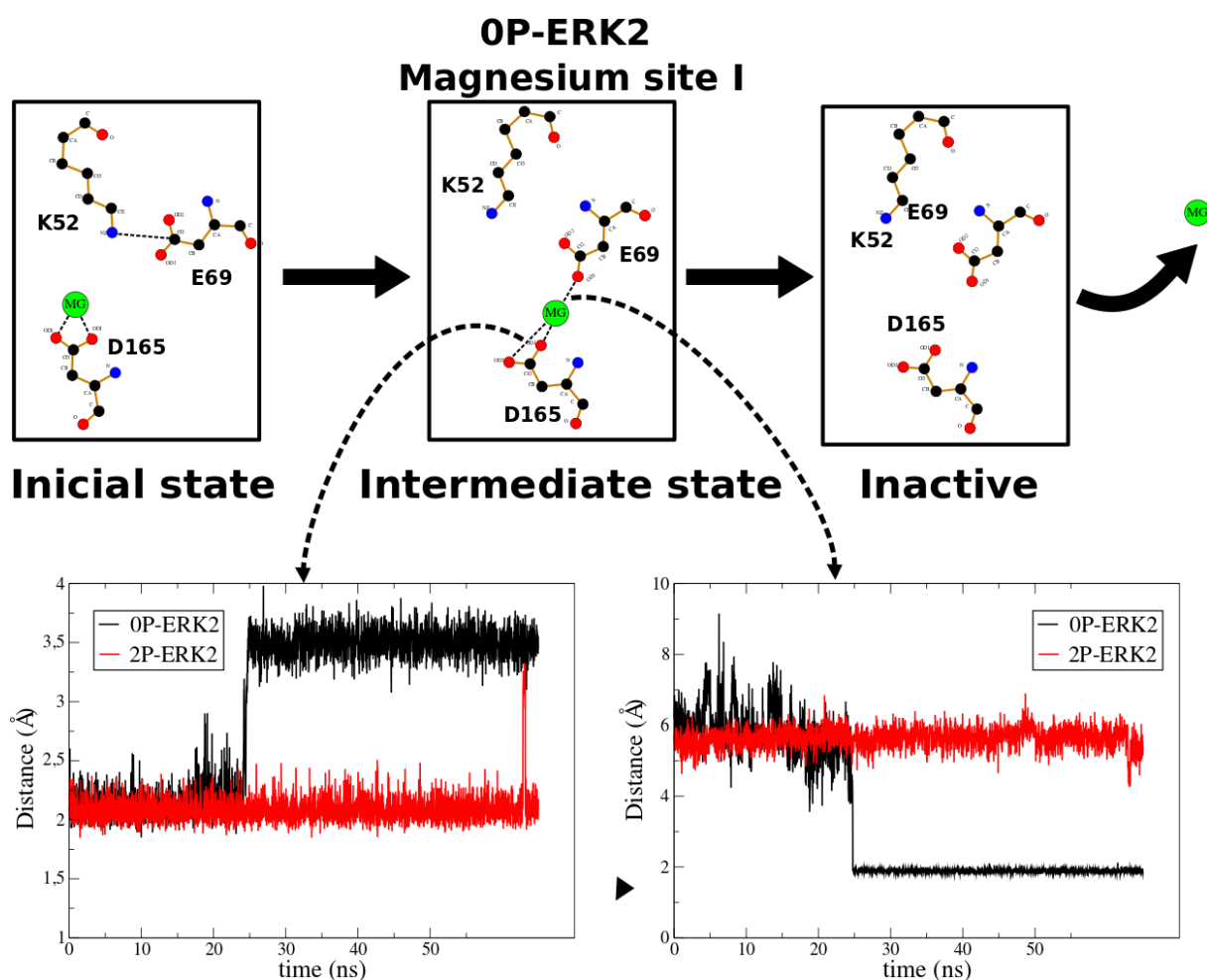


Figura 2.10: OP-ERK2 desestabiliza la entrada del segundo magnesio. Sendas dinámicas moleculares comenzaron del estado correctamente coordinado y luego el sitio I se distorsiona. Distancias seleccionadas se muestran en línea punteada ($D^{165}-Mg^{2+}$ and $E^{69}-Mg^{2+}$)

el Mg^{+2} del sitio I desplazando aguas de su esfera de coordinación, lo que consideramos como desestabilizador para la unión del metal en su sitio. Estos resultados, nos permiten inferir que el estado activo promueve la formación del puente salino y la consecuente es-

tabilización del Mg^{+2} al sitio I, modificando la geometría del ATP, preparándolo para el ataque nucleofílico.

2.2.4 El puente salino es importante para la reacción

Realizamos cálculos QM/MM para explorar posibles cambios en el mecanismo de reacción o estabilización diferencial entre estados, para la reacción de transferencia de fosfatos en ERK2. Construimos el complejo con el sustrato según se explica en materiales y métodos con el péptido fosforilable de ELK1, $^{335}\text{RTP}^{337}$. Para ello, consideramos el sistema QM incluyendo el metil-trifosfato del ATP los dos Mg^{+2} y las cadenas laterales de los residuos asp¹⁴⁷, asn¹⁵², asp¹⁶⁵, 3 moléculas de agua, y la thr fosforilable del sustrato alcanzando los 55 átomos cuánticos.

La descripción del mecanismo de reacción se realizó con una coordenada de reacción compleja de manera análoga a la empleada en el trabajo anterior; descripta como $\xi = d1(\text{O}3\beta_{\text{ATP}}-\text{P}\gamma_{\text{ATP}}) - d2(\text{O}\gamma_{\text{ATP}}-\text{O}\gamma_{\text{sustrato}}) + d3(\text{O}\gamma_{\text{sustrato}}-\text{H}_{\text{sustrato}}) - d4(\text{H}_{\text{sustrato}}-\text{O}\delta_{\text{asp147}})$ donde el asp¹⁴⁷ actúa como aceptor del protón de la treonina del sustrato (A. Turjanski, Vaque, & J. Gutkind, 2007). En el proceso de fosforilación la conformación de los estado de transición observados, reactivos y productos se muestran en la Figura 2.11A.

La energía libre asociada al proceso de transferencia de fosfatos para ERK2 en su conformero activo, se muestra en la figura (Figura 2.11B panel central, curva azul) observándose una barrera de ~ 19 kcal/mol con un estado de transición planar para el γ -fosfato con distancias casi idénticas para $\text{O}3\beta_{\text{ATP}}-\text{P}\gamma_{\text{ATP}}$ y $\text{O}\gamma_{\text{ATP}}-\text{O}\gamma_{\text{sustrato}}$, $\sim 2.4\text{\AA}$ y $2.3\text{\AA}$ respectivamente; lo que sugiere un mecanismo de reacción concertado ((Figura 2.11B panel izquierdo)). Del análisis de los gráficos de asociatividad (Figura 2.11B panel derecho), encontramos que la reacción tiene un cierto carácter asociativo, donde en una primera instancia, se acerca el nucleófilo a la posición reactiva y luego se cliva el enlace $\text{O}3\beta_{\text{ATP}}-\text{P}\gamma_{\text{ATP}}$. Dichos resultados se encuentran en concordancia con trabajos previos y observaciones similares en PKA (Cheng, Y. Zhang, & McCammon, 2005; Pérez-Gallegos et al., 2015) donde además, la transferencia del protón del nucleófilo al aspartato, ocurre al final del proceso de fosforilación.

A continuación, se evaluó el perfil de energía libre para la mutante 2P-ERK2-K52A (Figura 2.11C panel central, curva azul). La importancia de la lys⁵² se pone de manifiesto puesto que los resultados apuntan en la tendencia correcta, evidenciado por un incremento de la barrera de activación (~ 23 kcal/mol), y un incremento de la dispersión de los trabajos

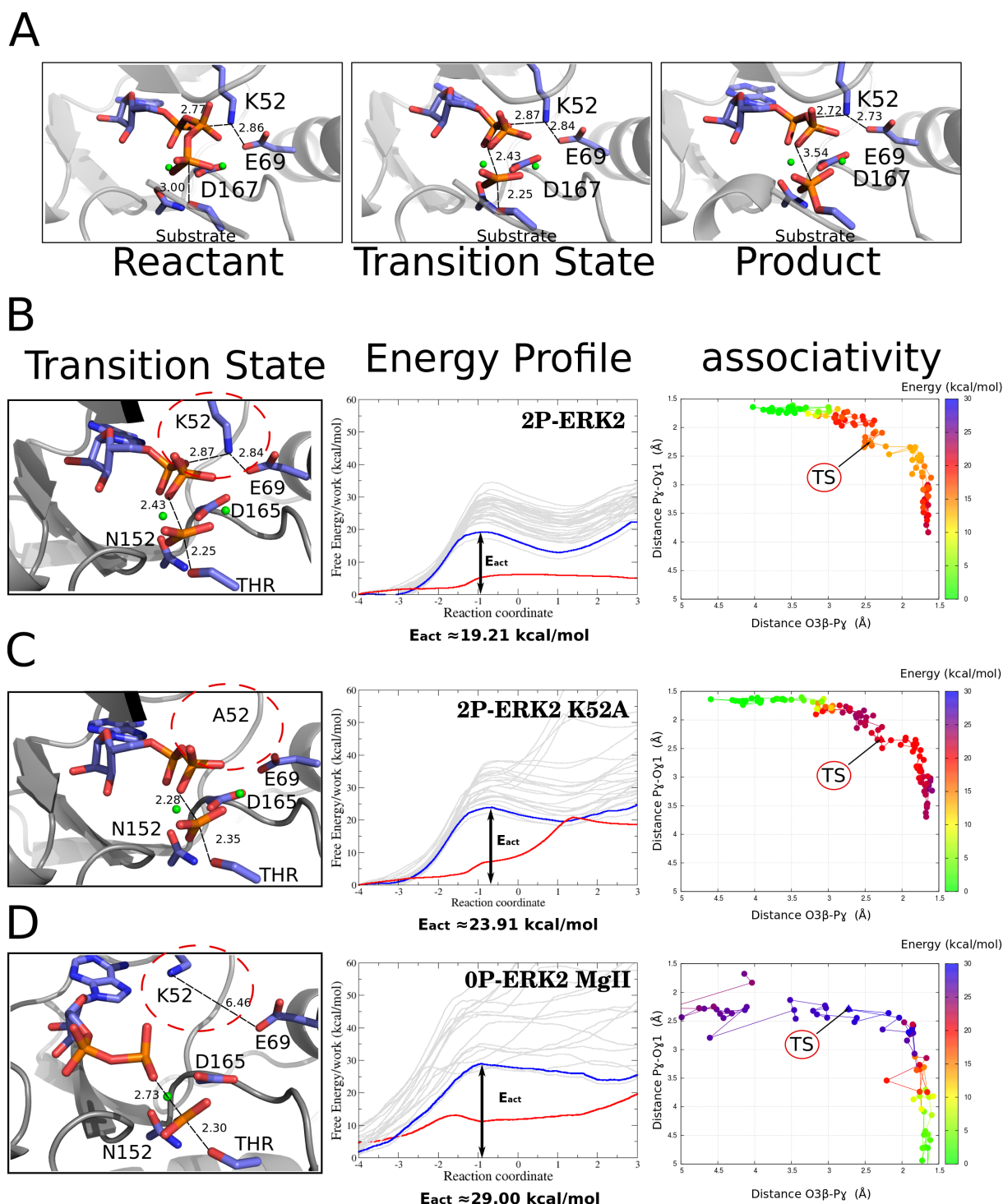


Figura 2.11: Mecanismo de reacción, estudiados mediante un esquema QM-MM.

A) Estructura de los reactivos, estado de transición y productos para la reacción de fosforilación catalizada por ERK2. B) Estado de transición para el estado WT (Izq). trabajo (curvas en gris), energía libre (curvas en azul, Stddev roja). gráficos de asociatividad de la reacción. Distancias entre $P\gamma/O\gamma$ vs $P\gamma/O3\beta$, energía libre en escala de colores. C) Idem B para el estado 2P-ERK2 mutante K52A. D) Idem B para el estado 0P-ERK2.

para los productos (Figura 2.11C panel central, curva roja). Lo que claramente apunta a una desestabilización de los productos.

Para explorar a fondo el papel el efecto del magnesio, utilizamos una conformación

del ATP obtenida por dinámica molecular, para la enzima en su estado inactivo. Esta conformación de 0P-ERK2 se asemeja a la estructura resuelta presentada en la figura 2.8A y contiene sólo el magnesio del sitio II (PDBid:4GT3). La curva de la figura 2.11D muestra mucho mayor dispersión en los trabajos con una barrera significativamente mayor (~29 kcal/mol) que la obtenida para el estado doblemente fosforilado (Figura 2.11B). Estos resultados señalan que la activación, prepararía el sitio activo para incorporar el MSI, a través de la formación del puente salino y de esta manera "focalizar" la proteína en la conformación activa. Podemos agregar que estructuras cristalográficas de CDK2, una ser/thr quinasa, capturan la posible estabilización del estado de transición y describen que la conformación del sitio activo y del ATP se ven dramáticamente alteradas debido a la presencia/ausencia del este segundo magnesio (Bao, Jacobsen, & Young, 2011)

2.3 Conclusiones

La literatura describe elementos del dominio quinasa que subraya como importantes, pero hasta el momento no existía una descripción de cuál sería la relación entre ellos. El paradigma establecido destaca la presencia de dos columnas o espigas centrales, que tendrían un rol fundamental en la actividad (Meharena et al., 2013). Sin embargo, a pesar de dicha descripción, ERK2 presenta sutiles cambios en torno a estos residuos, lo cual nos lleva a pensar que además de los rearrreglos en torno a los segmentos L16 y el loop de activación, otras modificaciones sutiles, tendrían lugar, cambiando la dinámica o las conformaciones de la proteína. En este trabajo, proponemos un modelo que recopila los datos experimentales, de otros trabajos y propios, que nos permitiría confeccionar un modelo (Figura 2.12) en el cual ocurre un primer evento de movimiento interdominio entre el N-terminal y el C-terminal, que por un lado promueve la estabilización de la αC mediante el replegado del *loop* L16 en un ángulo cercano a los 78°. A continuación, producto de esta rotación de aproximadamente 10° (sección 2.2.1) se posicionan y/o reacomodan residuos importantes para la catálisis, así como el cierre del bolsillo de unión del ATP denotado por la bajada de las hojas betas, cerrando el bolsillo que contiene el ATP. En la sección 2.2.3 exploramos que el estado activo promueve la formación de un puente salino que es crucial para la estabilización del sitio de unión para el Mg^{+2} I para finalmente contar con la conformación susceptible para el ataque nucleofílico (Figura 2.8C). Demostramos además que la barrera depende fuertemente de la presencia de este segundo magnesio y éste a su vez depende de que el puente salino este correctamente fijado.

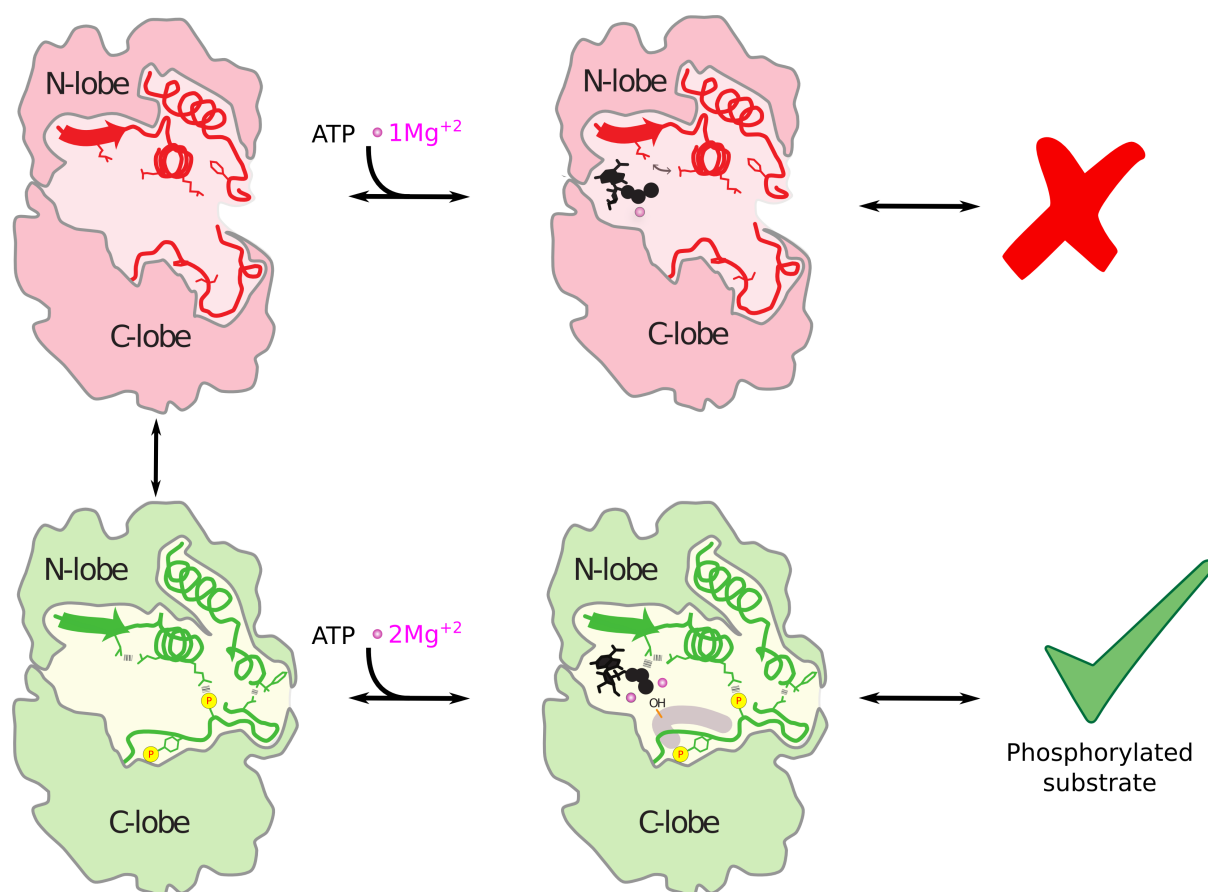


Figura 2.12: Modelo de activación de ERK2. La activación por fosforilación promueve el movimiento interdominio, formación del puente salino, apropiada coordinación del ATP. Magenta y verde para el estado 0P-ERK2 y 2P-ERK2 respectivamente.

2.4 Materiales y métodos

Estructuras Iniciales. Las estructuras iniciales de las formas no fosforilada y doblemente fosforilada se obtuvieron del *Protein Data Bank* (PDBids 1ERK, 2ERK respectivamente) y fueron solvatadas en una caja octaédrica que se extiende $12\text{\AA}$ desde la superficie de la proteína. Debido a que experimentos bioquímicos sugieren que ERK2 puede unir dos magnesios y que actualmente no existe una estructura del complejo ternario en su estado activo se confeccionó este complejo (Waas, & Dalby, 2003). Para ello, para el presente estudio utilizamos las estructuras iniciales utilizadas en trabajos previos de la reactividad de ERK2 empleado un esquema QM/MM (A. Turjanski, Vaque, & J. Gutkind, 2007). Brevemente, primero construimos el complejo ternario ERK2/ATP/ Mg^{2+} usando como referencia, el cristal de la forma doblemente fosforilada de ERK2 (2P-ERK) (Canagarajah et al., 1997) y la estructura de p38 γ con ATP y 2Mg^{2+} , para el correcto posicionamiento y/o coordinación del catión divalente (Bellon et al., 1999).

Además hemos hecho un relevamiento de las geometrías de coordinación a partir de

estructuras de quinasas con dos metales (magnesio o manganeso) para ATP o análogos de este; para asegurarnos acerca de cual es la correcta coordinación de los mismos (para mas información referirse a información suplementaria, tabla S1). Finalmente agregamos el sustrato fosfoaceptor de ELK1, ³³⁵RTP³³⁷ como describimos en un trabajo anterior; brevemente el grupo OH apuntando al γ -fosfato del ATP y la prolina altamente conservada en el bolsillo comprendido por la pTyr¹⁸⁵ adyacente al sitio denominado p+1.

Parámetros de la simulación clásica. Todas las simulaciones clásicas han sido realizadas empleando el paquete AMBER12 (Case, Darden, et al., n.d.). Las estructuras iniciales fueron solvatadas con moléculas TIP3P en una caja octaédrica truncada (Price, & Brooks III, 2004). Los residuos estándar fueron representados usando el campo de fuerza 99SB de amber. Los parámetros para la fosfo-tirosina y fosfo-treonina fueron obtenidos de Craft et al. (Craft Jr, & Legge, 2005) mientras que los parámetros para el ATP y el magnesio de Meagher et al. (Meagher, Redman, & Carlson, 2003) y Allnér et al. (Allnér, Nilsson, & Villa, 2012). En todas las simulaciones el método de Ewald (Götz et al., 2012; Salomon-Ferrer et al., 2013) fue empleado en su implementación para GPU, con una distancia de corte de 12 Å para los términos de no-unión para computar las interacciones electrostáticas, y el termostato de Langevin y barostato de Berendsen para mantener la temperatura y la presión deseada, respectivamente (Sindhikara et al., 2009; Berendsen et al., 1984). Todos los enlaces de hidrógeno se mantuvieron rígidos usando el algoritmo SHAKE y además un esquema de repartición de masas fue empleado. El esquema de reescalado de todas las masas de hidrógeno en un factor de ~ 3 permitió el uso de un paso de integración 4 fs para la integración de las ecuaciones de Newton (Hopkins et al., 2015). Cada sistema se calentó suavemente a 300 K por 200 ps a volumen constante y para ello se uso una restricción armónica suave para todos los α -carbonos (1 kcal/mol Å²). Posteriormente se realizaron simulaciones a temperatura y presión constantes durante 1ns para equilibrar la densidad del sistema sin ningún tipo de restricción adicionales. Las simulaciones de producción consistieron en 1 μ s de simulación computacional de cada apo estado; y de aproximadamente $\sim 2 \mu$ s para el estado 2P-ERK-ATP-2Mg²⁺.

Cálculos híbridos QM/MM. Determinación de la energía libre de la reacción usando un esquema QM(DFTB)/MM y múltiples dinámicas moleculares guiadas (Multiple steered molecular dynamics "MSMD"). Para determinar la energía libre de la reacción, se utilizó el método MSMD (Crespo et al., 2005), que permite vincular el dinámicas de no-equilibrio con propiedades de equilibrio como la energía libre, y han sido ampliamente utilizado en

nuestro grupo para determinar los perfiles de energía libre (Crespo et al., 2005; Capece, Estrin, & Marti, 2008; Forti et al., 2011; Xiong et al., 2006). Brevemente, $H(r, \lambda)$ es el Hamiltoniano de un sistema que esta sujeto a un potencial externo dependiente del tiempo ($\lambda = \lambda(t)$). $\Delta G(\lambda)$ y $W(\lambda)$ son el cambio en la energía libre y el trabajo realizado en el sistema cuanto éste evoluciona de $\lambda = \lambda_0$ a λ . El trabajo externo es aplicado para "guiar" la fuerza. Además, r representa la configuración de todo el sistema, mientras que λ representa la coordenada de reacción. Entonces, $\Delta G(\lambda)$ y $W(\lambda)$ están relacionadas según la siguiente ecuación, conocida como igualdad de Jarzynski (Jarzynski, 1997)

$$e^{-\beta \Delta G(\lambda)} = \langle e^{-\beta w(\lambda)} \rangle \quad (2.1)$$

Los brackets en la ecuación 2.1 representa el promedio sobre el ensamble molecular. Debido a esta relación, para obtener el $\Delta G(\lambda)$, multiples trayectorias deben ser provistas donde el sistema avance desde reactivos a productos a lo largo de λ , utilizando un potencial armónico dependiente del tiempo, obteniendo un trabajo asociado a λ . Una vez obtenidas las correspondientes curvas de trabajo en función de λ el perfil de energía libre puede ser reconstruido como lo describe la ecuación 2.1. Para esto, se tomaron fotos de la dinámica molecular clásica de cada estado proteico del complejo final ERK-ATP-2Mg²⁺-elk1 como sustrato inicial de la reacción. El protocolo de minimización es similar al empleado en MD clásicas. Por consiguiente, se seleccionaron 4 distancias como coordenada de reacción descritas en la la ecuación 3.2:

$$\lambda = d(O3\beta - P\gamma) - d(P\gamma - O\gamma) + d(O\gamma - H\gamma) - d(H\gamma - O\delta 2) \quad (2.2)$$

La coordenada de reacción seleccionada, permite la descripción global del proceso de transferencia de fosfato, caracterizada por la ruptura del enlace γ -fosfato del ATP y concomitante formación del enlace de éste con el O del sustrato. Así como también la transferencia de protón a la base constituida por el asp¹⁴⁷. Para todas las simulaciones se definió la velocidad de tracción como el cociente entre el rango de la coordenada de reacción y el tiempo de simulación total, dicha velocidad se ajusto a 0.07 Å/ps. Velocidades mayores fueron empleadas pero resultaron en perfiles con mayor dispersión para los trabajos $W(r)$, presentando problemas para una buena estimación de FEP. El número de curvas obtenidas para la determinación de FEP están en el rango entre 20 y 30, descrita en el apartado de resultados.

Sistema QM y nivel de teoría. En el presente estudio el sistema QM consistió en metil-trifosfato del ATP, los dos iones magnesio (Mg^{2+}) y los grupos funcionales comprendido por los residuos asn¹⁵², asp¹⁶⁵ y moléculas de agua, la cadena lateral del asp¹⁴⁷, el cual actuó como aceptor de protones, y por último la cadena lateral del residuo thr del péptido ELK1 (el fosfoceptor). En total el sistema QM consistió de 55 átomos. El resto de la proteína y el resto de las moléculas de solvente fueron tratados clásicamente. Todas las simulaciones fueron realizadas en condiciones periódicas de contorno con un paso de integración de 1fs. El nivel de teoría es SCC-DFTB (Self-consistent charge density functional tight-binding) (Cui et al., 2001), ya que ofrece una buena relación entre la precisión y el coste computacional y ha sido empleado exitosamente para describir mecanismos de reacción en reacciones de transferencia de fosfato (Issoglio et al., 2016).

Integración termodinámica (TI). El cambio en la energía libre de unión fue calculada como la diferencia de energía libre durante el proceso de unión para cada conformero (ciclo termodinámico puede observarse en Fig. 2.13). La esquema de integración termodinámica utiliza un factor de acoplamiento escalar para realizar la transformación química para realizar el cambio entre el estado A (ERK-ATP-2MG) gradualmente en el estado B (ERK2-ATP-Mg) mediante un número de pasos discretos. Así el parámetro de acoplamiento λ define un camino que conecta ambos hamiltonianos para permitir la estimación del cambio en la energía libre según la ecuación 2.3 :

$$\Delta G_{iunbound} = G(ERK/ATP/2MG^{+2}) - G(ERK/ATP/MG^{+2}) = \int_0^1 \frac{\partial H}{\partial \lambda} d\lambda \quad (2.3)$$

Variable i refiere al conformero i . En este trabajo variamos el parámetro de acoplamiento λ cada 0.1 unidades y el tiempo de simulación dentro de cada ventana fue de 1 ns. Finalmente restricciones del tipo NMR fueron agregadas entre la lys⁵² y el glu⁶⁹ para evaluar el efecto del puente salino al proceso de unión. Las dinámicas de producción fueron realizadas con el programa PMEMD (Kaus et al., 2013) dentro del paquete AMBER14 (Case, Babin, et al., 2014). El análisis estadístico y la estimación de la energía libre de unión fue realizado con la implementación MBAR en python (<https://pypi.python.org/pypi/pymbar>).

Análisis de modos esenciales. Con el fin de obtener una idea de las propiedades dinámicas de cada estructura, varias dinámicas fueron analizadas para obtener los modos esenciales (ED). Para ello, cada dinámica de producción se analizó con el módulo de cpptraj de AMBER12 (Roe, & T. E. Cheatham III, 2013). Cada ED de cada dinámica de producción (o combinación de estas) es determinada por diagonalización de la matriz de

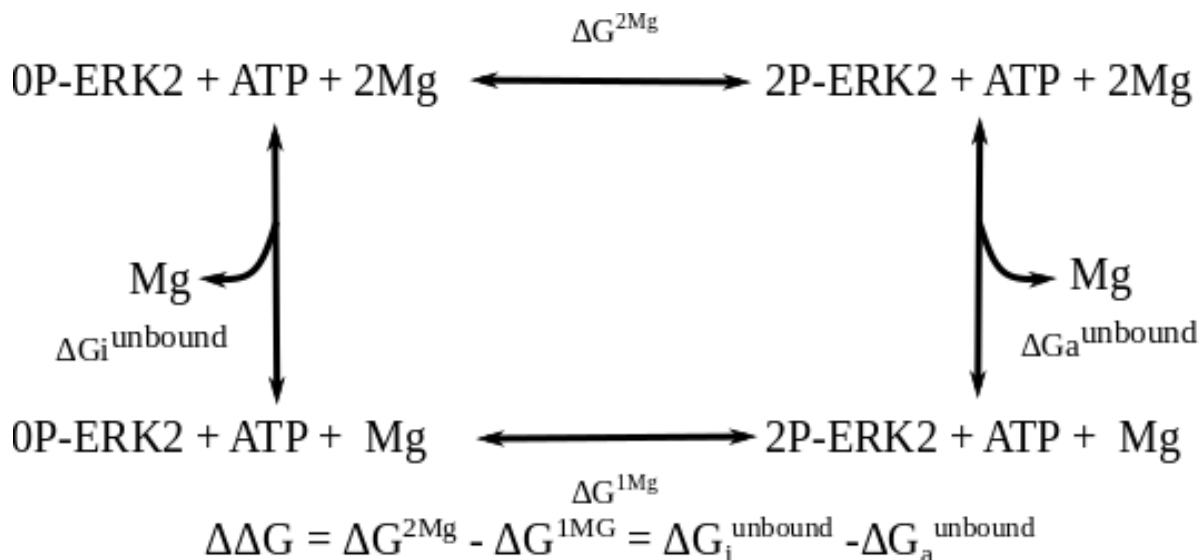


Figura 2.13: Representación del ciclo de integración termodinámica para el cálculo de la diferencia de energía libre de unión para el sitio I de Mg^{2+} .

covarianza (Cov_{ij}) de las posiciones atómicas a lo largo de la trayectoria, obteniendo como resultado los correspondientes eigenvalores y eigenvectores (eq 2.4).

$$Cov_{ij} = \frac{1}{M} \sum_k^M [X_i(K) - \langle X_i \rangle][X_j(K) - \langle X_j \rangle] \quad (2.4)$$

Donde se suman todas las “M” configuraciones o fotos tomadas de la dinámica molecular, $X_i(k)$ corresponde a la i ésima coordenada en el sistema en la foto k , y $\langle X_i \rangle$ el valor medio de X_i a lo largo de la simulación.

Luego de la diagonalización cada eigenvector obtenido (vi) corresponde a un modo esencial (EM) de la proteína. Todos ellos en conjunto describen el movimiento colectivo de la proteína. El eigenvalor (λ_i) obtenido, representa la contribución relativa de cada EM al movimiento total, donde el primer EM es el que más contribuye. El ED fue computado solo para los átomos del esqueleto carbonado (N, C, CA, O). Además análisis de EMs fueron realizados para combinaciones de trayectorias, para conocer acerca de los modos esenciales que caracterizan las transiciones entre estados. Siendo el primer modo EM (V1) capaz de explicar el movimiento concertado correspondiente, entre ambos estados.

La proyección de EMs seleccionados se realizó sobre cada estado conformacional, obteniéndose la proyección del modo esencial “PN(t)” a lo largo de la dinámica. Este análisis permite determinar espacio configuracional explorado a lo largo de la dinámica molecular (ecuación 2.5):

$$P_N = v_N * r(t) \quad (2.5)$$

Donde v_N es el N -ésimo EM y $r(t)$ es la conformación proteica a tiempo t . Las proyecciones están medidas en angstroms, por el cual, el valor obtenido corresponde a la desviación con respecto a la estructura promedio a lo largo de la modo proyectado. A partir de la obtención de estas proyecciones para el modo seleccionado se confeccionaron los histograma correspondientes.

Técnicas de muestreo sesgado (Umbrella sampling). Todas las simulaciones fueron realizadas con un ensamble NPT, usando AMBER12. El protocolo de muestreo fue utilizado para evaluar la "fuerza" del puente de hidrógeno entre la Lys⁵² y el glu⁷¹. Por otra parte, la metodología fue empleada también para estimar la energía libre del proceso de plegado/desplegado del loop L16.

Para la evaluación del puente de hidrógeno, se utilizó como descriptor del cambio configuracional la distancia entre el nitrógeno Z de la Lys⁵² y el C γ del glu⁷¹. Sin embargo el proceso de plegado/desplegado fue descrito a partir del cambio en la distancia entre los carbonos alfa de la ile⁷² y la ³²⁹. Cada ventana de muestreo fue realizada con un espaciamiento de 0.5 Å entre ventanas, y fue explorada por 2 ns de dinámica molecular. La distancia para el puente salino entre los residuos lys⁵² y glu⁷¹ fue evaluado en el rango 3-6Å, mientras que la distancia entre los residuos ile⁷² y la phe³²⁹ fue en el rango entre 6 y 18Å. Cada ventana se comenzó con la estructura equilibrada de la ventana anterior, y cada ventana se le aplicó un potencial cuadrático de 30 kcal/mol/Å².

Desplazamiento químico. A fin de estimar el desplazamiento químico se empleó el programa SHIFTX2 (Han et al., 2011). Se seleccionaron fotos de la dinámica molecular de cada estado para los átomos de interés; en particular se usó el C γ del residuo I72. Un total de 1000 fotos fue utilizada para describir cada estado configuracional.

2.5 Información Suplementaria

A continuación se muestra la información suplementaria asociada al siguiente capítulo

CAPÍTULO 2. LA ACTIVACIÓN DE MAPKS ES CONTROLADA POR LA CONFORMACIÓN DEL ATP.

PDBid	chain	Nucleotide	Magnesium site 1						Magnesium site 1						Kinase Dead LYS NZ – GLU C6
			ASPOδ2	ASPOδ1	ATPOδγ	ATPOδβ	WAT1	WAT2	ASN Oδ1	ATPOδα	ATPOδβ	ATPOδγ	ASPOδ2	WAT3	
1atp	E	ATP	2.19	2.35	2.05	2.18	1.85	2.15	2.09	1.99	3.01	2.21	2.14	2.08	4.43
1cdk	A	ANP	1.99	2.11	1.90	2.40	2.27	2.19	2.06	2.01	2.64	2.63	2.55	2.19	3.73
1cdk	B	ANP	1.97	2.08	1.91	2.12	2.29	2.27	2.11	2.02	2.42	2.00	2.53	2.30	3.69
1cm8	A	ANP	2.84	2.34	2.51	2.60	2.74	2.68	2.11	2.26	2.54	2.11	2.95	2.91	3.77
1cm8	B	ANP	2.81	2.32	2.47	2.65	-	2.62	2.14	2.34	2.58	2.10	3.01	-	3.76
1lp4	A	ANP	2.16	2.14	2.11	2.18	2.05	2.41	2.08	2.11	3.01	2.10	2.12	2.10	3.79
1o6k	A	ANP	2.34	2.28	2.16	2.17	2.18	2.25	2.17	2.04	2.79	2.13	2.26	2.21	3.72
1o6l	A	ANP	2.28	2.26	2.08	2.15	2.18	2.30	2.17	2.06	2.85	2.09	2.24	2.23	3.71
1phK	A	ATP	2.51	2.40	2.48	2.41	2.22	-	2.29	2.37	2.60	2.29	2.43	2.51	3.56
1pyx	A	ANP	2.20	2.23	2.34	2.15	2.36	2.19	2.13	2.08	2.83	1.97	2.25	-	3.60
1pyx	B	ANP	2.23	2.19	2.39	2.08	2.45	2.35	2.12	2.20	2.83	1.94	2.32	-	3.48
2phk	A	ATP	2.32	2.37	2.26	2.26	2.30	2.48	2.27	2.13	2.71	2.02	2.20	2.22	3.76
2qcs	A	ANP	2.32	2.40	2.14	2.07	2.04	2.20	2.20	2.11	2.62	2.22	2.26	2.15	3.61
3phi	A	ANP	2.68	2.06	1.89	2.24	2.21	2.25	2.01	2.13	2.78	2.24	1.78	1.90	3.80
3fjq	E	ATP	2.32	2.40	2.14	2.18	2.14	2.24	2.13	2.08	2.58	2.22	2.23	2.24	3.78
3klb	A	ANP	2.37	2.34	2.05	2.12	2.09	2.16	2.05	2.09	2.76	2.19	2.13	2.29	3.65
3pnb	A	ANP	2.61	2.22	2.02	2.81	-	-	1.77	2.20	2.04	2.49	3.14	-	4.12
3qal	E	ATP	2.21	2.19	1.98	2.07	2.03	2.07	2.04	1.99	2.62	2.14	2.08	2.06	3.60
3qum	E	ATP	2.08	2.19	2.00	2.06	2.18	2.06	2.05	1.98	2.55	2.17	2.10	2.21	3.71
AVERAGE +/- Std			2.34 +/- 0.25	2.26 +/- 0.11	2.15 +/- 0.20	2.26 +/- 0.21	2.21 +/- 0.19	2.29 +/- 0.17	2.10 +/- 0.11	2.12 +/- 0.11	2.67 +/- 0.22	2.14 +/- 0.13	2.35 +/- 0.34	2.24 +/- 0.23	3.75 +/- 0.22

Figura S1: Relevamiento de Esfera de coordinación de ATP (o análogo) y 2 Magnesios/Manganeso para ser/thr quinasa depositadas en el pdb.

Bibliografía

- Akamine, Pearl, Nguyen-Huu Xuong, Susan S Taylor, et al. (2002). “Crystal structure of a transition state mimic of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase”. In: *Nature Structural & Molecular Biology* 9.4, pp. 273–277.
- Allnér, Olof, Lennart Nilsson, & Alessandra Villa (2012). “Magnesium ion–water coordination and exchange in biomolecular simulations”. In: *Journal of Chemical Theory and Computation* 8.4, pp. 1493–1502.
- Banavali, Nilesh K, & Benoit Roux (2007). “Anatomy of a structural pathway for activation of the catalytic domain of Src kinase Hck”. In: *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 67.4, pp. 1096–1112.
- Bao, Zhao Qin, Douglas M Jacobsen, & Matthew A Young (2011). “Briefly bound to activate: transient binding of a second catalytic magnesium activates the structure and dynamics of CDK2 kinase for catalysis”. In: *Structure* 19.5, pp. 675–690.
- Barr, Daniel et al. (2011). “Importance of domain closure for the autoactivation of ERK2”. In: *Biochemistry* 50.37, pp. 8038–8048.
- Bellon, Steve et al. (1999). “The structure of phosphorylated p38 γ is monomeric and reveals a conserved activation-loop conformation”. In: *Structure* 7.9, pp. 1057–1065.
- Berendsen, Herman JC et al. (1984). “Molecular dynamics with coupling to an external bath”. In: *The Journal of chemical physics* 81.8, pp. 3684–3690.
- Canagarajah, Bertram J et al. (1997). “Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation”. In: *Cell* 90.5, pp. 859–869.
- Capece, Luciana, Dario A Estrin, & Marcelo A Marti (2008). “Dynamical characterization of the heme NO oxygen binding (HNOX) domain. Insight into soluble guanylate cyclase allosteric transition†”. In: *Biochemistry* 47.36, pp. 9416–9427.
- Case, DA, V Babin, et al. (2014). “Amber 14”. In:
- Case, DA, TA Darden, et al. “AMBER 12; University of California: San Francisco, 2012”. In: *There is no corresponding record for this reference.*

- Cheng, Yuhui, Yingkai Zhang, & J Andrew McCammon (2005). "How does the cAMP-dependent protein kinase catalyze the phosphorylation reaction: an ab initio QM/MM study". In: *Journal of the American Chemical Society* 127.5, pp. 1553–1562.
- Cobb, Melanie H, & Elizabeth J Goldsmith (2000). "Dimerization in MAP-kinase signaling". In: *Trends in biochemical sciences* 25.1, pp. 7–9.
- Craft Jr, John W, & Glen B Legge (2005). "An AMBER/DYANA/MOLMOL phosphorylated amino acid library set and incorporation into NMR structure calculations". In: *Journal of biomolecular NMR* 33.1, pp. 15–24.
- Crespo, Alejandro et al. (2005). "Multiple-steering QM-MM calculation of the free energy profile in chorismate mutase". In: *Journal of the American Chemical Society* 127.19, pp. 6940–6941.
- Cui, Qiang et al. (2001). "A QM/MM implementation of the self-consistent charge density functional tight binding (SCC-DFTB) method". In: *The Journal of Physical Chemistry B* 105.2, pp. 569–585.
- De Vivo, Marco et al. (2007). "Computational Study of the Phosphoryl Transfer Catalyzed by a Cyclin-Dependent Kinase". In: *Chemistry—A European Journal* 13.30, pp. 8437–8444.
- Forti, Flavio et al. (2011). "Comparing and combining implicit ligand sampling with multiple steered molecular dynamics to study ligand migration processes in heme proteins". In: *Journal of computational chemistry* 32.10, pp. 2219–2231.
- Gioeli, Daniel et al. (1999). "Activation of mitogen-activated protein kinase associated with prostate cancer progression". In: *Cancer research* 59.2, pp. 279–284.
- Gonzalez, Fernando A, David L Raden, & Roger J Davis (1991). "Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases." In: *Journal of Biological Chemistry* 266.33, pp. 22159–22163.
- Götz, Andreas W et al. (2012). "Routine microsecond molecular dynamics simulations with AMBER on GPUs. 1. Generalized born". In: *Journal of chemical theory and computation* 8.5, pp. 1542–1555.
- Han, Beomsoo et al. (2011). "SHIFTX2: significantly improved protein chemical shift prediction". In: *Journal of biomolecular NMR* 50.1, pp. 43–57.
- Hari, Sanjay B, Ethan A Merritt, & Dustin J Maly (2014). "Conformation-selective ATP-competitive inhibitors control regulatory interactions and noncatalytic functions of mitogen-activated protein kinases". In: *Chemistry & biology* 21.5, pp. 628–635.

- Hopkins, Chad W et al. (2015). “Long-time-step molecular dynamics through hydrogen mass repartitioning”. In: *Journal of chemical theory and computation* 11.4, pp. 1864–1874.
- Hoshino, Rika et al. (1999). “Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors”. In: *Oncogene* 18.3, pp. 813–822.
- Issoglio, Federico M et al. (2016). “Exploring the Catalytic Mechanism of Human Glutamine Synthetase by Computer Simulations”. In: *Biochemistry*.
- Jarzynski, Christopher (1997). “Nonequilibrium equality for free energy differences”. In: *Physical Review Letters* 78.14, p. 2690.
- Kaus, Joseph W et al. (2013). “Improving the efficiency of free energy calculations in the Amber molecular dynamics package”. In: *Journal of chemical theory and computation* 9.9, pp. 4131–4139.
- Kornev, Alexandr P, & Susan S Taylor (2010). “Defining the conserved internal architecture of a protein kinase”. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1804.3, pp. 440–444.
- Kyriakis, John M, & Joseph Avruch (2001). “Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation”. In: *Physiological reviews* 81.2, pp. 807–869.
- Lawrence, Michael C et al. (2008). “The roles of MAPKs in disease”. In: *Cell research* 18.4, pp. 436–442.
- Meagher, Kristin L, Luke T Redman, & Heather A Carlson (2003). “Development of polyphosphate parameters for use with the AMBER force field”. In: *Journal of computational chemistry* 24.9, pp. 1016–1025.
- Meharena, Hiruy S et al. (2013). “Deciphering the structural basis of eukaryotic protein kinase regulation”. In: *PLoS Biol* 11.10, e1001680.
- Nguyen, Tuan et al. (2015). “Co-conserved MAPK features couple D-domain docking groove to distal allosteric sites via the C-terminal flanking tail”. In: *PloS one* 10.3, e0119636.
- Pérez-Gallegos, Ayax et al. (2014). “A QM/MM study of the associative mechanism for the phosphorylation reaction catalyzed by protein kinase A and its D166A mutant”. In: *Journal of computer-aided molecular design* 28.11, pp. 1077–1091.
- (2015). “A QM/MM study of Kemptide phosphorylation catalyzed by protein kinase A. The role of Asp166 as a general acid/base catalyst”. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* 17.5, pp. 3497–3511.

- Price, Daniel J, & Charles L Brooks III (2004). "A modified TIP3P water potential for simulation with Ewald summation". In: *The Journal of chemical physics* 121.20, pp. 10096–10103.
- Prowse, Claudine N, & John Lew (2001). "Mechanism of activation of ERK2 by dual phosphorylation". In: *Journal of Biological Chemistry* 276.1, pp. 99–103.
- Raman, M, W Chen, & MH Cobb (2007). "Differential regulation and properties of MAPKs". In: *Oncogene* 26.22, pp. 3100–3112.
- Remenyi, Attila, Matthew C Good, & Wendell A Lim (2006). "Docking interactions in protein kinase and phosphatase networks". In: *Current opinion in structural biology* 16.6, pp. 676–685.
- Robinson, Megan J et al. (1996). "Mutation of position 52 in ERK2 creates a nonproductive binding mode for adenosine 5'-triphosphate". In: *Biochemistry* 35.18, pp. 5641–5646.
- Roe, Daniel R, & Thomas E Cheatham III (2013). "PTRAJ and CPPTRAJ: software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data". In: *Journal of chemical theory and computation* 9.7, pp. 3084–3095.
- Salomon-Ferrer, Romelia et al. (2013). "Routine microsecond molecular dynamics simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit solvent particle mesh Ewald". In: *Journal of chemical theory and computation* 9.9, pp. 3878–3888.
- Sindhikara, Daniel J et al. (2009). "Bad seeds sprout perilous dynamics: Stochastic thermostat induced trajectory synchronization in biomolecules". In: *Journal of Chemical Theory and Computation* 5.6, pp. 1624–1631.
- Smith, Gregory K et al. (2011). "Insights into the phosphoryl transfer mechanism of cyclin-dependent protein kinases from ab initio QM/MM free-energy studies". In: *The Journal of Physical Chemistry B* 115.46, pp. 13713–13722.
- Sours, Kevin M, Yao Xiao, & Natalie G Ahn (2014). "Extracellular-regulated kinase 2 is activated by the enhancement of hinge flexibility". In: *Journal of molecular biology* 426.9, pp. 1925–1935.
- Turjanski, Adrian Gustavo, Gerhard Hummer, & J Silvio Gutkind (2009). "How mitogen-activated protein kinases recognize and phosphorylate their targets: A QM/MM study". In: *Journal of the American Chemical Society* 131.17, pp. 6141–6148.
- Turjanski, AG, JP Vaque, & JS Gutkind (2007). "MAP kinases and the control of nuclear events". In: *Oncogene* 26.22, pp. 3240–3253.

- Uehling, David E, & Philip A Harris (2015). "Recent progress on MAP kinase pathway inhibitors". In: *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 25.19, pp. 4047–4056.
- Valiev, Marat et al. (2007). "Phosphorylation reaction in cAPK protein kinase-free energy quantum mechanical/molecular mechanics simulations". In: *The Journal of Physical Chemistry B* 111.47, pp. 13455–13464.
- Waas, William F, & Kevin N Dalby (2003). "Physiological concentrations of divalent magnesium ion activate the serine/threonine specific protein kinase ERK2". In: *Biochemistry* 42.10, pp. 2960–2970.
- Wang, Cui, Wenting Huang, & Jie-Lou Liao (2015). "QM/MM investigation of ATP hydrolysis in aqueous solution". In: *The Journal of Physical Chemistry B* 119.9, pp. 3720–3726.
- Weston, Claire R, & Roger J Davis (2007). "The JNK signal transduction pathway". In: *Current opinion in cell biology* 19.2, pp. 142–149.
- Xiao, Yao et al. (2014). "Phosphorylation releases constraints to domain motion in ERK2". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111.7, pp. 2506–2511.
- Xiong, Hui et al. (2006). "Free energy calculations with non-equilibrium methods: applications of the Jarzynski relationship". In: *Theoretical Chemistry Accounts* 116.1-3, pp. 338–346.
- Yang, Sichun, Nilesh K Banavali, & Benoit Roux (2009). "Mapping the conformational transition in Src activation by cumulating the information from multiple molecular dynamics trajectories". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.10, pp. 3776–3781.
- Zhang, Faming et al. (1994). "Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 resolution". In:
- Zheng, J et al. (1993). "2.2 Å refined crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MnATP and a peptide inhibitor". In: *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 49.3, pp. 362–365.

CAPÍTULO 3

Especificidad y reactividad de la familia PknB y PknG de *M. tuberculosis*.

3.1 Introducción

La genómica microbiana ha puesto de manifiesto aspectos importantes acerca de los mecanismos de fosforilación en bacterias. Estudios de metagenómica y secuenciación masiva han confirmado la presencia de Ser, Thr, Tyr quinasas y fosfatasas ampliamente distribuidas en proteomas bacterianos, que se creían restringidas en gran medida sólo a genomas eucariotas. Sin embargo, cabe señalar que además, éstas proteínas se encuentran desempeñando un papel fundamental en los procesos de señalización intracelular (Baer et al., 2014). *Mycobacterium tuberculosis* es un patógeno extraordinariamente versátil que puede existir en distintos estados fisiológicos en el huésped. En algunas ocasiones resulta en una infección asintomática, en que bacterias de este género se encuentran en un estado latente y luego pueden activarse desencadenando una infección principalmente pulmonar, conocida como tuberculosis (Woods, & Washington, 1987). Para lograr esto, *Mycobacterium tuberculosis* debe ser versátil y poder adoptar diferentes estados fisiológicos, para el cual, requiere intrincados mecanismos moleculares y de señalización para detectar una amplia gama de señales desde el micro-ambiente en el que se encuentra. Para ello, cuenta con un amplio conjunto de ser/thr proteínas kinasas (STPKs) similares a las eucariotas, de las cuales 11 de ellas han sido identificadas (Cole et al., 1998). Sin embargo, solo algunas de éstas cobran relevancia puesto que son importantes en la regulación de procesos celulares tales como: metabolismo, transcripción de genes, división celular e interacciones hospedador-patógeno. (Wehenkel et al., 2008; Av-Gay and Everett, 2000; Sassetti et al., 2003).

En este contexto dos proteínas quinasas resultan particularmente interesantes, pknB y pknG. La evidencia experimental señala que la STPK pknG es prescindible para el crec-

imiento *in vitro* de *Mtb* (Nguyen, Walburger, et al., 2005; Av-Gay, & Everett, 2000) lo que sugiere que *pknG* se incorporó al genoma de *Mtb* como consecuencia de transferencia horizontal, sin embargo se conserva debido a que es un importante factor de virulencia para que sobreviva dentro de la célula huésped (Leonard, Aravind, & Koonin, 1998). Es más, *pknG* es crucial para la sobrevivencia de *Mtb* puesto que inhibe la fusión fagosoma-lisosoma y por esta razón constituye un blanco interesante para el desarrollo de drogas anti-tuberculínicas (Walburger et al., 2004). Por otra parte, *pknB* es esencial para el crecimiento de *Mtb* (Pablo Fernandez et al., 2006), puesto que fosforila diversos sustratos, incluyendo proteínas involucradas en la síntesis de peptidoglicanos (Parikh et al., 2009), división celular (Dasgupta et al., 2006) respuesta a estrés (Dasgupta et al., 2006), transcripción de genes (Sharma et al., 2006) y control metabólico (O'Hare et al., 2008).

3.1.1 Activación de la familia PKN en *Mtb*

La activación mediante fosforilación del *loop* de activación es el mecanismo predominante en ser/thr quinasas. En particular *M. tuberculosis* presenta varias biomoléculas transmembrana, que contienen un dominio extracelular, un dominio quinasa (similar al eucariota) y un segmento transmembrana. Un ejemplo de ello, lo constituye *pknB*, el *loop* de activación de esta enzima exhibe múltiples sitios de fosforilación (hasta cuatro) y la activación de la misma, se produce principalmente por trans auto-fosforilación en los residuos thr¹⁷¹ y thr¹⁷³ (Figura 3.1) (Boitel et al., 2003; Durán et al., 2005; Young et al., 2003).

PknG carece de residuos fosforilables en el *loop* de activación (Scherr et al., 2007). Sin embargo, posee una organización de dominios única, en la que presenta un n-terminal con múltiples sitios aceptores de fosfato, además 4 cisteínas con el motivo CxxCG comprenden un centro hierro-azufre, más conocido como dominio rubredoxina (Figura 3.1). Debido a que otros dominios rubredoxinas pueden participar en procesos de transferencia de electrones, puede que la posible función de dicho motivo en la quinasa, esté relacionado con el balance redox de la célula (Scherr et al., 2007; Tiwari et al., 2009). Sin embargo, otros autores proponen además, que este dominio modularía la entrada de sustratos al sitio activo (Lisa et al., 2015; Wittwer et al., 2016). El mecanismo propuesto, por el cual regularía la entrada del sustrato al sitio activo, consiste en cambios estructurales locales en el N-terminal, en particular, en un segmento nativamente desestructurado que es modulado por el estado redox y el estado de fosforilación de ese segmento (Wittwer et al., 2016). Por último, el c-terminal contiene motivos repetitivos conocidos como TPR (*tetratricopeptide re-*

peat) responsables de la dimerización en la estructura cristalina, y se postula que median interacciones proteína-proteína (Scherr et al., 2007). A pesar de los avances en la caracterización de estas dos enzimas, hoy se desconoce como es que regulada a nivel estructural la activación y cómo es el mecanismo de catálisis. En este capítulo contribuiremos a resolver ambos interrogantes.

3.1.2 GarA como sustrato de *pknG* y *pknB*.

Como describimos en apartados anteriores *pknG* y *pknB* constituyen blancos atractivos para el desarrollo de drogas anti-tuberculinicas puesto que ejercen algún tipo de control en varios procesos celulares claves para *Mtb*. Sin embargo, en este trabajo nos centraremos en el control que ejercen sobre el ciclo de ácidos tricarboxílicos, y la síntesis de glutamato; regulando los niveles de α -cetoglutarato a través de una proteína que contiene un dominio FHA denominada *garA* (Figura 3.1) (Cowley et al., 2004; Ventura et al., 2013). Es importante remarcar, que el ciclo de ácidos tricarboxílicos es el metabolismo más importante para la generación de energía en organismos aeróbicos, con la α -cetoglutarato deshidrogenasa (KDH) como principal punto de control (Bunik, & Fernie, 2009). Para ello, *garA* actúa como regulador del flujo metabólico, uniéndose a KDH inhibiendo su actividad enzimática (Figura 3.1).

GarA es una pequeña proteína de 162 residuos con un dominio FHA (forkhead associated domain), que media interacciones proteína-proteína, reconociendo específicamente residuos treonina fosforilados (Durocher et al., 1999). Como elemento de regulación, posee en el extremo N-terminal dos treoninas susceptibles de ser fosforiladas; la *thr*²¹ y la *thr*²², que a su vez pueden unirse al FHA en un evento de auto-reconocimiento (Barthe et al., 2009; Patrick England et al., 2009; Ventura et al., 2013) liberando al KDH para ejercer su función (Grundner, Gay, & Alber, 2005) (Figura 3.1). Se ha demostrado que *garA* es fosforilada en la *thr*²¹ por *pknG* (Durán et al., 2005), y en *thr*²² por *pknB*, siendo ambos eventos excluyentes (O'Hare et al., 2008). Sin embargo, hasta la fecha se desconoce el motivo molecular, a nivel atómico de la especificidad de cada quinasa por el sitio de fosforilación y la relevancia funcional de esto. Por ende, en este trabajo utilizando técnicas de modelado molecular, dinámica molecular y técnicas híbridas QM/MM evaluamos la reactividad de estas quinasas y cómo es que éstas, reconocen su sustratos y cuáles son los residuos claves de dicho reconocimiento.

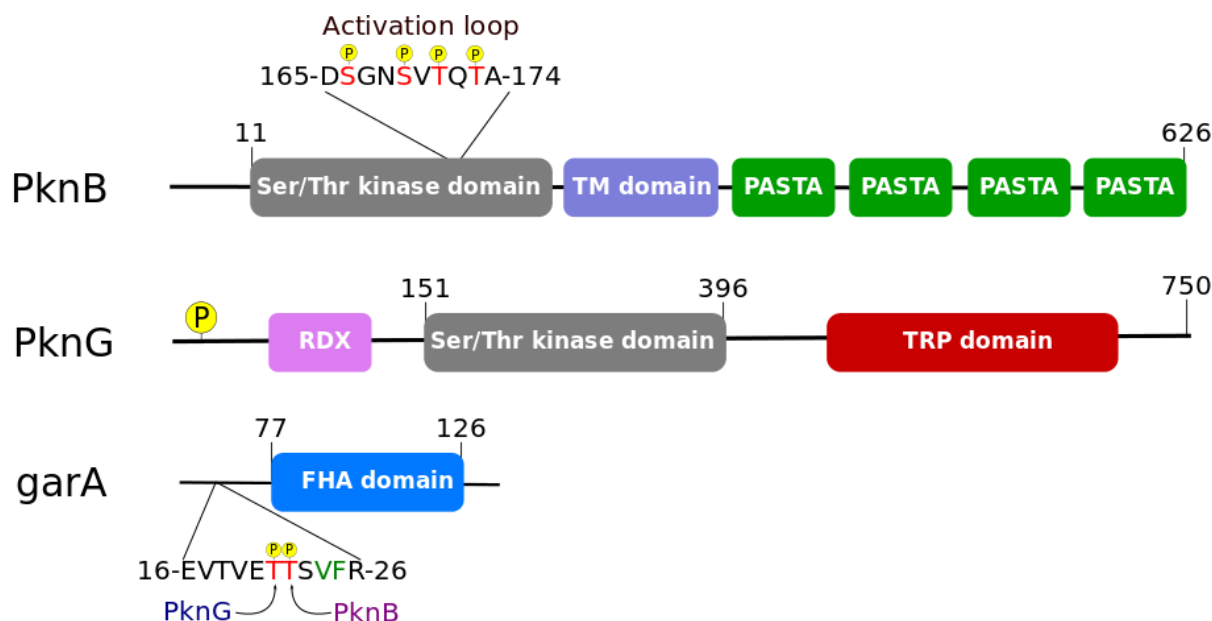


Figura 3.1: Organización de dominios de pknG y pknB. PknB, presenta un extremo amino terminal con el clásico dominio quinasa, un segmento transmembrana (TM) y 4 dominios "PASTA". Los sitios fosforilables del *loop* de activación se observan en la región expandida. PknG en el N-terminal contiene el motivo rubredoxina, el dominio quinasa y hacia el C-terminal incluye la región TPR (Scherr et al., 2007). Un grupo de residuos fosforilables en el N-terminal están representados como un sitio de polifosforilación (amarillo). GarA presenta dos residuos fosforilables, thr²¹ por pknG (Durán et al., 2005), y en thr²² por pknB (O'Hare et al., 2008)

3.2 Resultados

3.2.1 Determinantes estructurales de la activación de pknB y pknG

En una primera etapa realizamos un análisis de las estructuras existentes de ambas quinasas. Debido a la importancia funcional de las quinasas en los sistemas de transducción de señales, es imperioso revelar los mecanismos subyacentes de su activación. Para ello discutiremos cómo es que pknB y pknG alcanzan el estado reactivo. Algunos estudios centrados en torno a pknB, pknE y pknD identificaron una interfaz que permite la dimerización, como fundamental para la trans-autofosforilación y consecuente activación de la actividad quinasa. Estos autores demuestran utilizando mutagénesis dirigida, y cristalografía de rayos X, que la estabilización del estado activo, es a través de una interacción "back-to-back" de los dominios N-terminales (Greenstein et al., 2007; Lombana et al., 2010). Revisitando los cristales de pknB y las mutantes que no permiten su dimerización, observamos que los cambios mas notorios se encuentran relacionados a la posición de la hélice α C, y en la interfaz de la misma con el segmento adyacente conocido como β 4 (Figura 3.2). La importancia de esta estabilización α C- β 4 fue reportada anteriormente en

3.2. RESULTADOS

PKA (Kornev, & S. S. Taylor, 2015). Los paneles B y C de la figura 3.2 muestran una rotación de la hélice αC cuando se pierde la dimerización. Sin embargo, lo llamativo es el desarmado de la conformación helicoidal hacia el final de la hélice en el estado monomérico (PDBid 3ORK, Figura 3.2D, derecha). Este suceso está en estrecha relación al residuo leu⁶⁶, puesto que en el estado dimérico (PDBid 1MRU) interactuó en un núcleo hidrofóbico, comprendido por los residuos phe^{128,157} e ile¹³⁴ (Figura 3.2D, izq.). Debido a la interacción entre ésta interfaz y el residuo phe¹⁵⁷ de la columna regulatoria, inferimos que este estado no une correctamente el ATP, puesto que el segmento DFG en la estructura monomérica (3ORK) se encuentra distorsionado. En particular, el aspártico 156 que coordina el ion magnesio, apunta en una dirección distinta a la esperada.

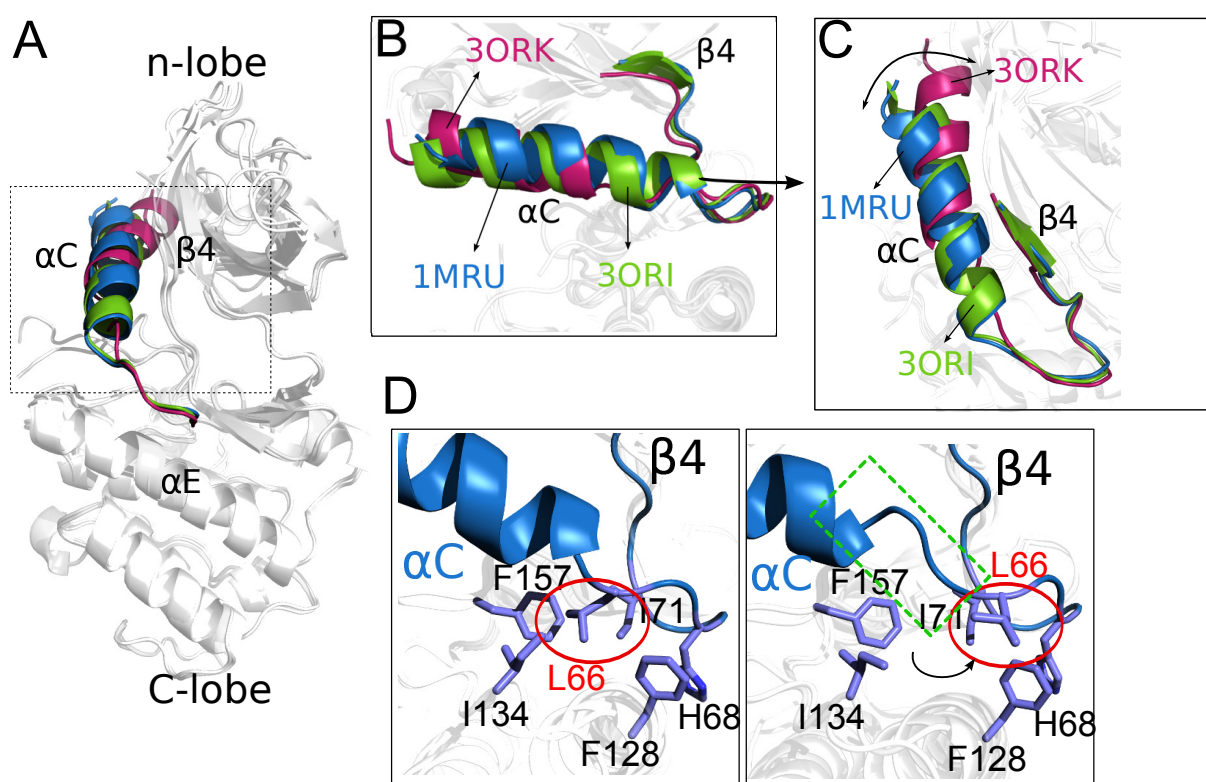


Figura 3.2: Relación entre la αC y la $\beta 4$. A) Superposición del dominio quinasa de pknB para los cristales de la forma dimérica (1MRU, azul), y para la forma monomérica (3ORI verde, 3ORK magenta). Vista desde arriba (B) y desde el lateral (C) de la hélice αC para cada estructura. D) Detalle del entorno la interfaz $\alpha C \beta 4$ para el cristal 1MRU (izq) y para 3ORK (derecha)

Entendemos que los cambios alostéricos en la estructura proteica permiten, en última instancia, el correcto posicionamiento de los residuos del sitio activo para albergar el ATP, demostrados en ERK2, CDK2 y PKA (Robinson et al., 1996; Iyer et al., 2005; Kornev, Haste, et al., 2006). Describimos que la conformación susceptible de ataque nucleofílico es la discutida en el capítulo 2, caracterizada por la correcta coordinación del atp.

Por otra parte, la información existente en la literatura marca no son muy claros los cambios estructurales para que PknG alcance su estado reactivo. Es más, pknG es descrita como una enzima que no necesita modificaciones post-traduccionales en su loop de activación para su correcto funcionamiento y/o activación. Sin embargo, en la estructuras cristalográfica disponible (PDBid 4Y12), pknG muestra una distorsión en la geometría de los sitios de unión a metales y el ATP. Sabemos que dos metales divalentes ocupan sitios predeterminados en la estructura proteica. En particular el sitio MSI (Metal Site I) coordina el fosfato β y γ del ATP junto con el asp²⁹³ (numeración pknG) de manera bidentada, completando la esfera de coordinación con dos aguas. Por otra parte el sitio 2 (MSII) coordina los fosfatos α y γ del ATP junto con la asn²⁸¹ y una molécula agua, completa la geometría molecular octaédrica. En el único cristal disponible de pknG con el análogo de sustrato presenta una coordinación que dista de la establecida en el capítulo anterior. El ASP²⁹³ se coordina de manera bidentada, pero el resto de la esfera de coordinación se completa por 4 moléculas de agua. En relación a esto, el MSII pierde la coordinación con el fosfato γ -ATP y es reemplazada por una molécula de agua. (Lisa et al., 2015). Los cambios observados con respecto a lo que nosotros consideramos una correcta coordinación del ATP, pueden ser explicados en parte, a que el análogo de ATP utilizado en ambos casos, se trata de ATP γ S donde un azufre reemplaza la posición del oxígeno del fosfato γ afectando la geometría molecular producto de la interacción entre el metal y el ATP.

3.2.2 Dinámica Molecular clásica de pknB y pknG

A fin de obtener información de la dinámica proteica y analizar la estructura en solución se procedió a realizar corridas de dinámica molecular clásica. Se simuló cada proteína por separado con ATP, Mg y sustrato garA. La coordinación de las mismas se modificó de modo tal que responda a la geometría de coordinación antes descrita (capítulo 2). Los sistemas fueron sometidos a un protocolo de dinámica molecular clásico tomando en cuenta solo el dominio quinasa en el caso de pknB; y el dominio quinasa y el dominio rubredoxina para pknG. Estos sistemas se mantienen estables en el tiempo simulado, reflejado en el monitoreo de la métricas como RMSD y RMSF para el dominio quinasa (Figura 3.3). Es importante destacar que pknB presenta una marcada fluctuación del segmento de activación comprendido por los residuos ~160-180 a pesar de estar "estabilizado" por el péptido derivado de garA (Figura 3.3B).

Como mencionamos anteriormente se postula que la conformación cristalizada del do-

3.2. RESULTADOS

minio quinasa de pknG, es la forma activa. Analizando el RMSD del dominio quinasa del mismo, observamos que oscila alrededor de un valor de 2 Å y no presenta grandes diferencias en la coordinación del sustrato, ATP y cofactores (datos nos mostrados). Como cabe de esperar, en el dominio rubredoxina de pknG presenta un valor alto de RMSF para el dominio completo, resultado consistente con que éste elemento podría regular la entrada del sustrato al sitio activo. Sin embargo no ahondaremos en este tema en esta tesis y quedará como objetivos futuros.

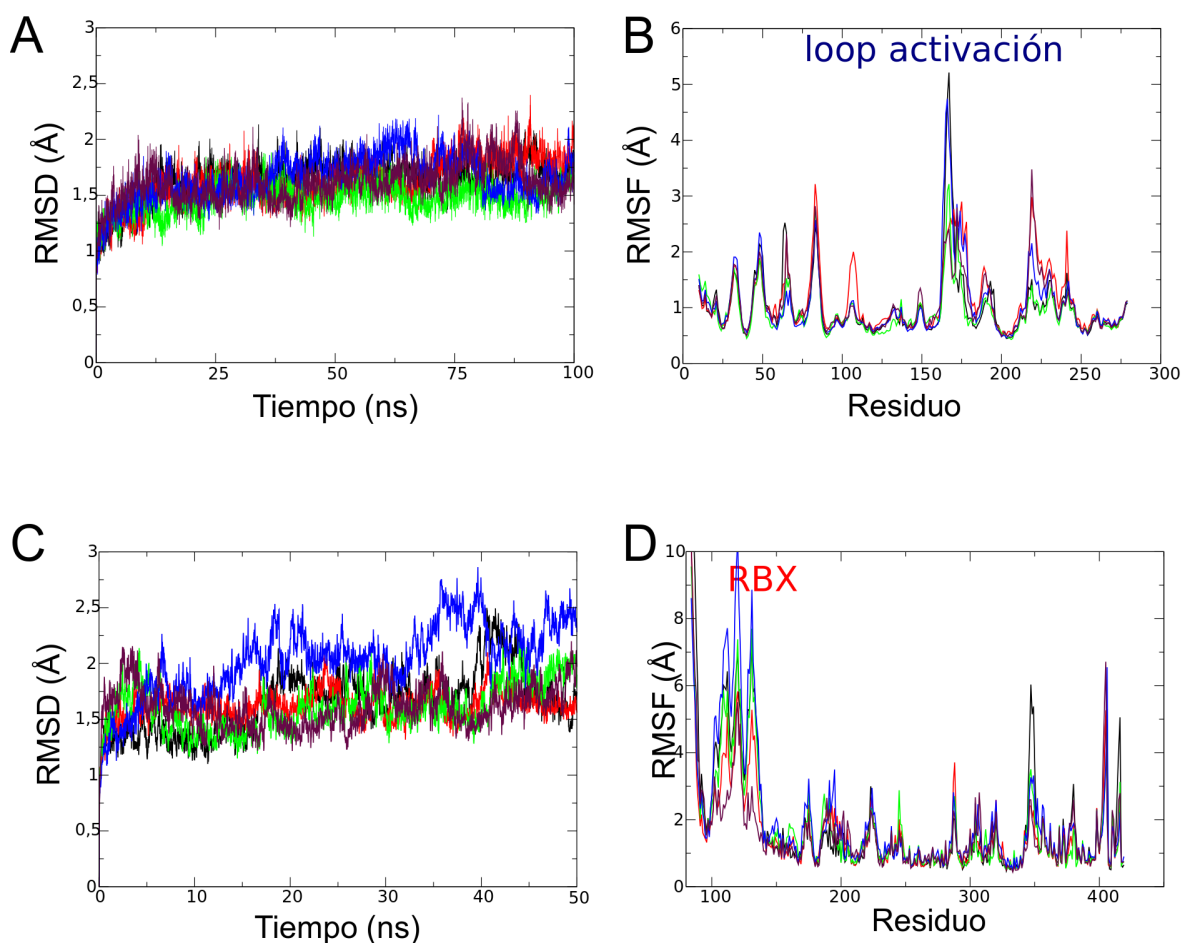


Figura 3.3: Dinámica molecular de pknB y pknG A) RMSD y (B) RMSF para pknB, RMSD (C) y RMSF (D) para pknG. 5 replicas fueron ensayadas con un tiempo de simulación fue 100 ns y 50 ns para pknB y pknG respectivamente. El valor de RMSD informado es para el dominio quinasa, mientras que el RMSF es para el sistema completo.

A continuación, discutiremos la validez cada uno de los modelos de los complejos STPK-garA simulados. En primer lugar validamos el complejo STPK-sustrato identificando residuos que actúan como ancla y explicando la especificidad de cada quinasa por su sustrato, y luego tomamos dichos modelos como punto de partida para la descripción de la reactividad de esta familia de enzimas.

Base moleculares del reconocimiento de Gara por pknB

Los motivos moleculares que explicarían la fosforilación diferencial de los residuos thr de garA aún son poco claros. Sin embargo, experimentos de resonancia de plasmon superficial muestran que para la interacción garA-pknB₁₋₂₇₉ el dominio FHA que une pThr, es esencial para la formación de un complejo estable. Incluso la forma truncada de garA₃₃₋₁₆₂ forma un complejo estable en ausencia de ATP, mientras que la incubación de péptidos con la secuencia consenso de fosforilación no se unen, lo que sugiere que la interacción ocurre principalmente, entre los residuos fosforilados de pknB y el dominio FHA de garA. Además, mutantes puntuales sobre los residuos fosforilables (T171A, T173A) del loop de activación de pknB, señalan que se necesitan ambos residuos fosforilados para la completa activación de la actividad quinasa (Villarino et al., 2005). La necesidad de ambos residuos fosforilados nos lleva a pensar que, una de las pThr es necesaria para la activación enzimática, mientras que la otra fosforilación en pThr sería la responsable de la interacción con garA.

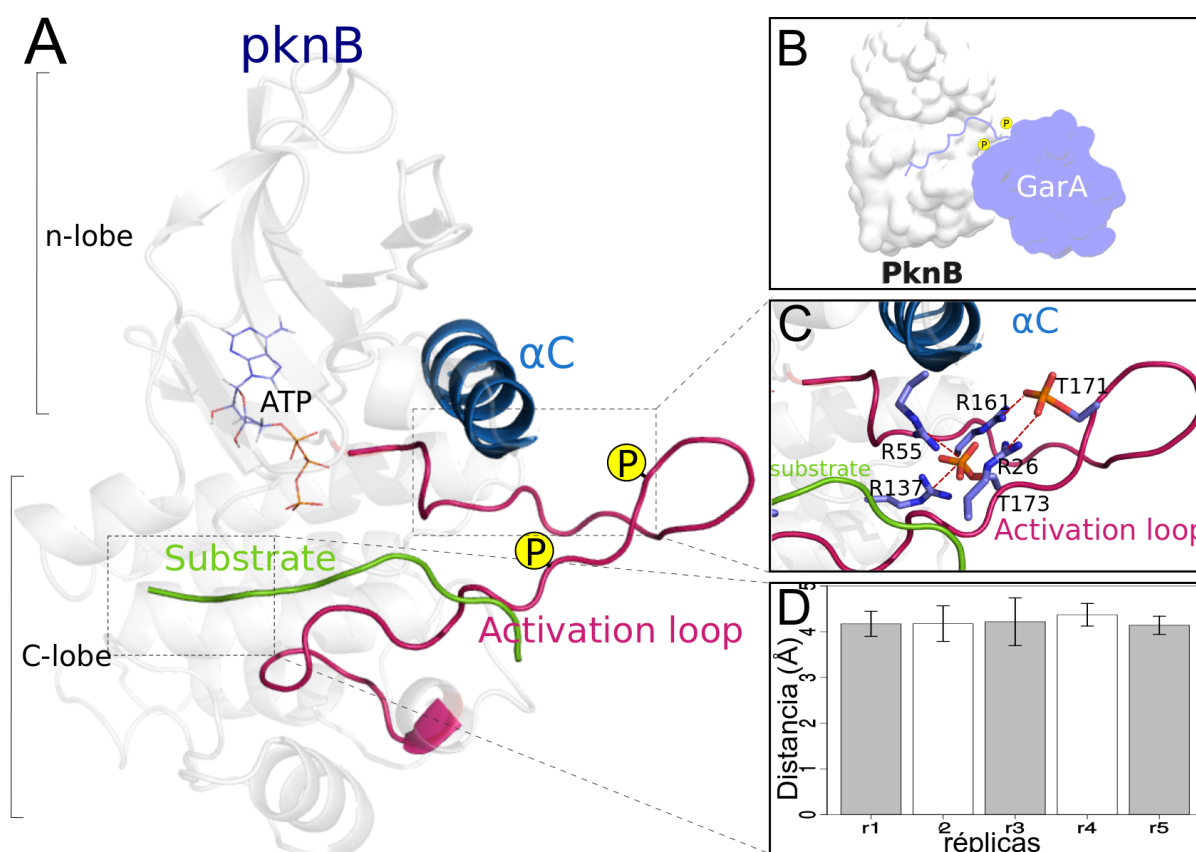


Figura 3.4: Modelo del reconocimiento de GarA por pknB. B) Modelo simplificado de garA-pknB donde el dominio FHA interactuó con el loop de activación. C) Detalle del loop de activación arg²⁶ de garA interactuó con uno de los fosfatos del loop de activación. D) Distancia arg²⁶CZ y el fosfato del p-thr173. 5 réplicas de 100ns.

Debido a que no se dispone de un cristal para el complejo pknB-garA, confeccionamos

un modelo donde primero se armó la estructura de PknB fosforilada y luego se le agregó garA. En el modelo fosforilado de pknB se puede observar que la thr¹⁷³ se ubica en un cluster de interacción con las argininas de pknB arg¹³⁷ y arg⁵⁵ (Figura 3.4) mientras que la thr¹⁷¹ una vez fosforilada interactuó con la arg¹⁶¹ y además queda libre para interactuar con el dominio FHA de garA. Además, algunos autores proponen que la conformación desordenada del loop de activación de pknB en ausencia de sustrato en estructuras cristalográficas, señalan que la estabilización del mismo estaría mediada por interacciones proteína-proteína (Villarino et al., 2005). Por ende, se modeló una conformación extendida del loop de activación, puesto que es una característica del dominio quinasa de ser/thr/tyr quinasas en estado activo, donde los extremos del mismo muestran una notable consistencia de conformacional (Nolen, S. Taylor, & Ghosh, 2004). Una vez definido el modelo de pknB activo, se procedió a incorporar un péptido de GarA de secuencia ¹⁹VETTSVFR²⁶ que ya se ha demostrado que tiene afinidad por ésta, e incluye el residuo a ser fosforilado. Puesto que los datos señalan la fosforilación diferencial de la thr²² pusimos dicho residuo apuntando al fosfato γ del ATP. 5 replicas de dinámica molecular (MD) se realizaron con esta particular configuración inicial. A partir de allí se identificaron algunas interacciones interesantes, entre ellas podemos destacar una entre la arg²⁶ de garA con el residuo fosforilado (pThr¹⁷³) de pknB (Figura 3.4-C).

El modelo propuesto es consistente con las observaciones antes descriptas. El dominio FHA interactuó directamente con el *loop* de activación y deja el N-terminal en las cercanías del ATP, donde luego sufre la modificación post-traducciona en el residuo thr²². La interacción principal encontrada, entre la arg²⁶ de garA y los fosfatos de pknB, permite explicar el correcto posicionamiento de la thr²² a la distancia adecuada para el ataque nucleofílico. La dinámica molecular del complejo muestra que dicha interacción es estable, incluso luego de decenas de nanosegundos (Figura 3.4-D). Cabe destacar que otras enzimas de esta familia, presentan sitios de fosforilación en su *loop* de activación. Distintos reportes que incluyen a PknD, PknE y PknF todas proteínas quinasa de *M. tuberculosis*, podrían compartir el mismo mecanismo de reconocimiento (Villarino et al., 2005). Es más, en 9 constructos del dominio quinasa de las 11 STPKs de *M. tuberculosis* pierden su capacidad catalítica frente a garA, como producto de la sustitución de treoninas del *loop* de activación por alaninas (Baer et al., 2014).

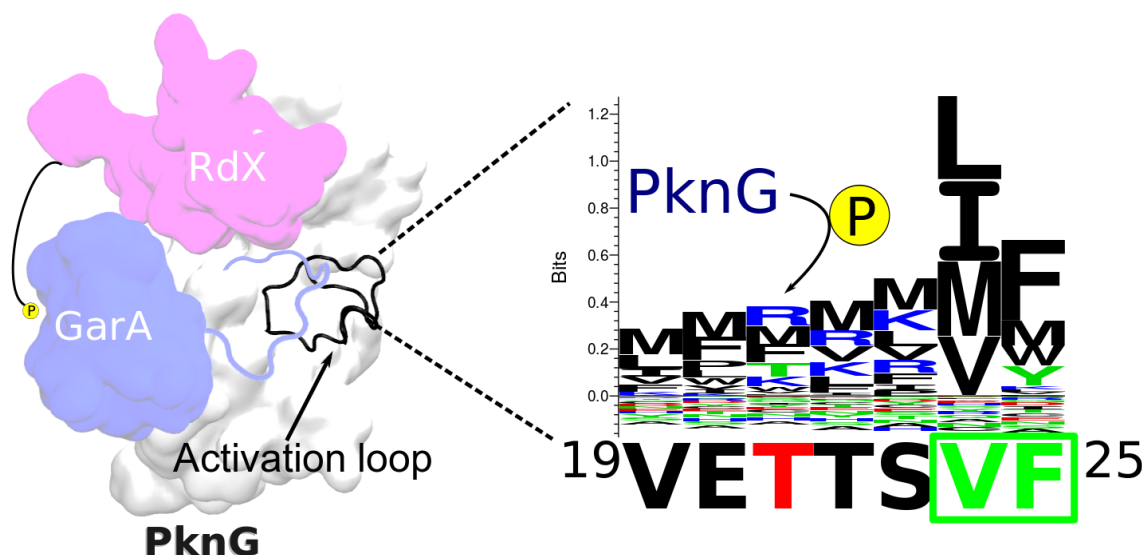


Figura 3.5: pknG presenta un bolsillo hidrofóbico. (Arriba) Logo obtenido a partir de las energías de interacción de mutantes puntuales sobre la secuencia del péptido derivado de garA acomplejado con pknG (ver sección materiales y métodos). (Abajo) secuencia del péptido derivado de garA mostrando el sitio de fosforilación de pknG (rojo) y el motivo hidrofóbico (verde)

Base moleculares del reconocimiento de Gara por pknG

Por otra parte, experimentos sobre *Corynebacterium* pknG muestran que fosforila Odh1 en la thr¹⁴ (correspondiente a thr²¹ en garA), en el motivo ETTS (Niebisch et al., 2006). En trabajos mas reciente con el empleo de espectrometría de masa MS/MS, identificaron que pknG fosforila específicamente el residuo 21 de garA, mientras que la mutante T21A no es sustrato para esta enzima (O'Hare et al., 2008). Puesto que el evento de fosforilación presenta alta especificidad nos embarcamos en identificar el porque de la fosforilación diferencial de pknG frente a garA en el residuo 21. En relación a esto, cabe destacar que pknG no exhibe residuos fosforilables en el loop de activación y la literatura describe a esta enzima como constitutivamente activa en el estado oxidado. Las estructuras cristalográficas disponibles muestran una conformación del loop de activación totalmente extendida. Por consiguiente, construimos el complejo pknG/ATP/Mn/sustrato con la thr²¹ en posición reactiva, y con sendos experimentos de dinámica molecular identificamos un bolsillo hidrofóbico comprendido por los residuos 315-318 adyacentes al tripéptido APE y la leu³⁰⁶ del loop de activación. Las 5 réplicas de dinámica molecular colocan los residuos val²⁴ y phe²⁵ de garA en este bolsillo, alternando la ocupación del mismo por uno de ellos, a lo largo de la trayectoria. En relación a esto, confeccionamos un logo a partir de las "energías" de interacción de mutantes puntuales generadas *in silico* con el programa FoldX (Schymkowitz et al., 2005). Sobre fotos de la dinámica molecular se escaneó la interfaz

3.2. RESULTADOS

de interacción garA-pknG mutante la secuencia de garA, a fin de evaluar la preferencia aminoacídica para la interacción del sustrato con la quinasa. La figura 3.5 muestra una gran preferencia de aminoácidos hidrofóbicos en las posiciones +3, +4 desde el sitio de fosforilación.

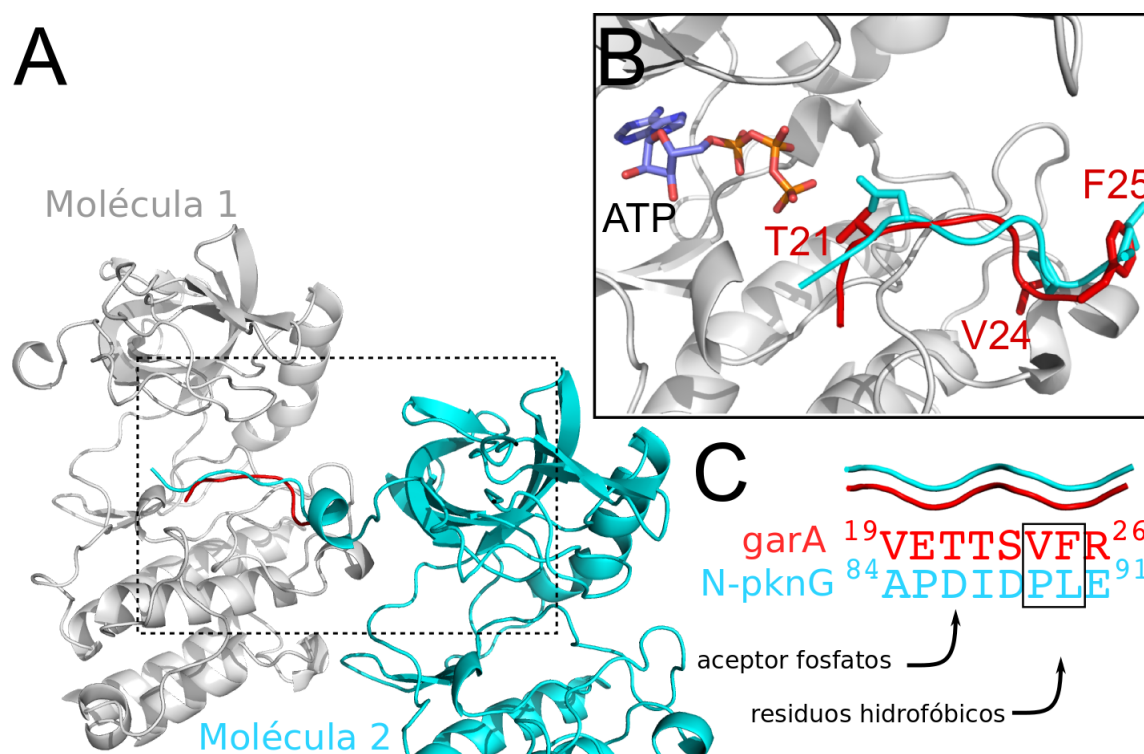


Figura 3.6: Comparación del modelo obtenido frente al cristal de pknG. A) La unidad asimétrica del dímero de pknG coloca el N-terminal en el sitio de unión del sustrato (cian), comparado con el modelo de garA (rojo). B) Ambas estructuras presentan residuos hidrofóbicos en sendas posiciones espaciales. C) Alineamiento de secuencias del motivo fosforilable de garA y el N-terminal de pknG.

La descripción del complejo obtenido muestra algunas interacciones de naturaleza polar; por ejemplo, entre el grupo amida y carbonilo de la gly³⁰⁸ con el esqueleto carbonado del residuo 22 de GarA. El hidroxilo de la cadena lateral del residuo thr³⁰⁹ presenta una interacción de puente de hidrógeno con el residuo glu²⁰ de garA. La importancia de este residuo de pknG, ha sido demostrada en trabajos anteriores, donde la mutante por A, D o E pierde actividad (Tiwari et al., 2009). Sin embargo, a fin de evaluar la validez de dicha estructura, en primer lugar comparamos el modelo confeccionado con el cristal de pknG, en el cual la unidad asimétrica muestra a el segmento N-terminal (⁸³RAPDIDP⁸⁹) posicionado dentro del sitio de unión propuesto, como pseudosustrato (Lisa et al., 2015). Sin embargo, sorprendentemente el modelo propuesto y el segmento N-terminal posicionan residuos hidrofóbicos en la misma región espacial en concordancia con lo antes descrito acerca de la interacción hidrofóbica encontrada. El n-terminal reacomoda las cadenas laterales de los residuos

pro⁸⁹ y leu⁹⁰ dentro del bolsillo hidrofóbico, mientras que garA colocaría los residuos val²⁴ y phe²⁵ (Figura 3.6B).

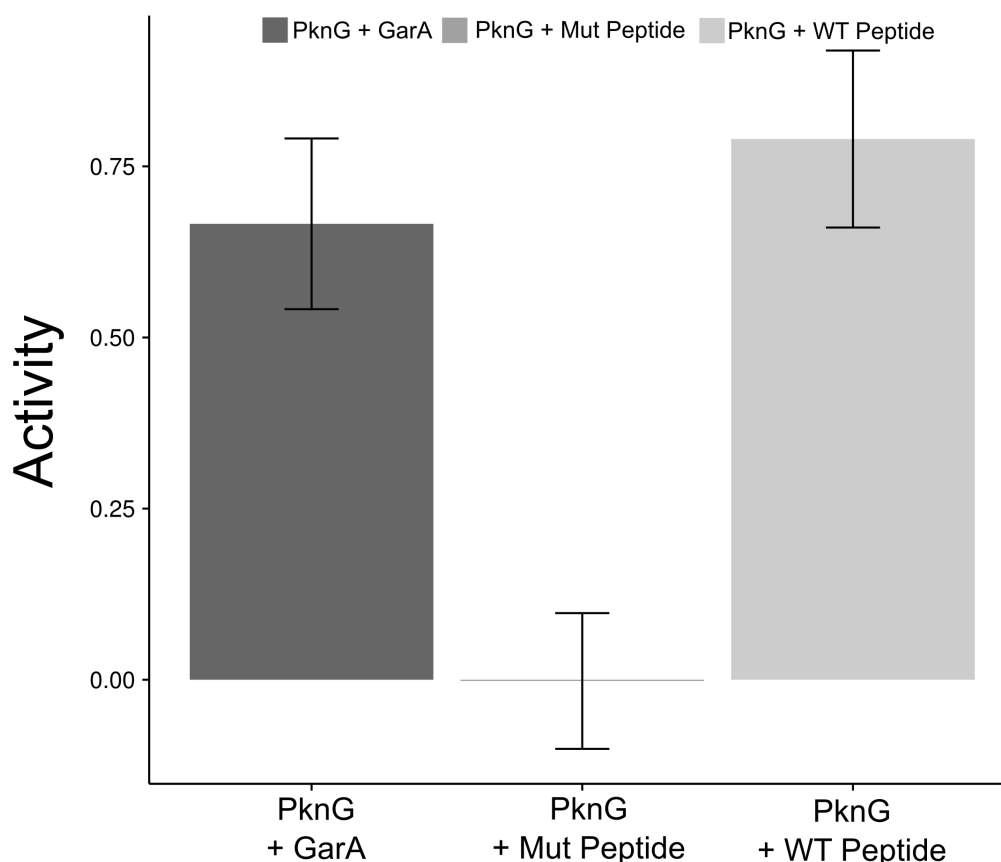


Figura 3.7: Actividad de pknG frente a péptidos derivados de garA. Medidas de actividad ensayado con kit bioluminiscente (Kinase-Glo®) que mide ATP remanente, para péptidos derivados de garA WT (200 μ M) y péptido mutante V24A,F25A (800 μ M). GarA completa fue ensayada a una concentración final de 25 μ M. Para todos los ensayos pknG se mantuvo a 0.8 μ M.

Con el propósito de evaluar la relevancia de esta interacción hidrofóbica, un estudio de actividad fue ensayado. En colaboración con la licenciada Cabrera del mismo grupo de investigación, se puso a punto un ensayo de actividad sobre el sistema en cuestión, que mide ATP remanente (para detalles referirse a la sección Materiales Y Métodos). El mismo muestra que la doble mutante V24A,F25A pierde la capacidad de ser fosforilado (Figura 3.7). Lo que sugiere que estos residuos son importantes para la unión del péptido derivado de garA, sobre la estructura del dominio quinasa de pknG.

3.2.3 Rol de α C en pknG.

Anteriormente discutimos que pknG pertenece a una familia de ser/thr quinasas procariotas, que son muy similares a las eucariotas. Estas presentan el clásico dominio quinasa bilobular, que forma el sitio activo capaz de albergar al ATP. Para este tipo de dominio se

espera que obedezca los mismos mecanismos de activación descritos para biomoléculas de la misma familia (Kornev, & S. S. Taylor, 2010; Huse, & Kuriyan, 2002). En particular, varios trabajos en PKA, ERK2 y CDK2 subrayan la importancia del posicionamiento de la hélice α C para la correcta activación de esta familia enzimática (Meharena et al., 2013; Barr et al., 2011; Hari, Merritt, & Maly, 2014). En relación a esto, en el capítulo (capítulo 2) se mostró que la formación del puente salino K52-E71 producto de la rotación de la hélice α C, es vital para la catálisis en ERK2. Sin embargo, sorprendentemente pknG presenta una conformación de este mismo segmento que dista mucho de la observada para PKA e incluso pknB (Figura 3.8). Además, el cristal de pknG muestra que la distancia entre los residuos del "puente salino" es de mas de 15 Å (lys¹⁸¹, glu¹⁹⁸ numeración pknG). Cabe agregar, que experimentos de mutagénesis dirigida y actividad, sobre el residuo glutámico, muestran que no afectan significativamente la catálisis de esta proteína (Lisa et al., 2015). A fin de explorar, porqué esta interacción tan importante en esta familia de proteínas es dispensable para pknG, se evaluó el perfil de energía libre de la conformación del residuo lys¹⁸¹ adyacente al ATP. En la figura 3.9 se observa el perfil de energía libre en función de la distancia entre el ATP y el residuo lys¹⁸¹. De manera análoga a lo observado para ERK2, el residuo lisina presenta un mínimo energético en torno a los 3.7 Å, en el cual, este residuo se encuentra interactuando directamente con los fosfatos α y β del ATP. Esto muestra como diferentes proteínas adquieren estrategias diferentes para estabilizar a la lys en su sitio, permitiendo en última instancia la entrada del segundo magnesio y la correcta coordinación del ATP.

3.2.4 Mecanismo de reacción para la familia pknB y pknG

A fin de caracterizar los detalles atomísticos del proceso de fosforilación de estas dos enzimas, procedimos a describir el proceso de transferencia de fosfatos, empleando una ordenada de reacción similar a la utilizada para ERK2; que básicamente consiste en una combinación lineal de cuatro distancias. Genéricamente expresada como: $\xi = d1(O3\beta_{ATP}-P\gamma_{ATP}) - d2(O\gamma_{ATP}-O\gamma_{sustrato}) + d3(O\gamma_{sustrato}-H_{sustrato}) - d4(H_{sustrato}-O\delta_{asp})$ donde el asp¹³⁸ y asp²⁷⁶ actúan como aceptor de protones de la treonina del sustrato en pknB y pknG respectivamente. En el proceso de fosforilación la conformación de los estado de transición observados, reactivos y productos se muestran en la Figura 3.10A para pknB y la Figura 3.11A para pknG. En ambos sistemas el tamaño cuántico del sistema alcanzó los 55 átomos.

En primera instancia nos centraremos en describir el sistema pknB-garA. El complejo

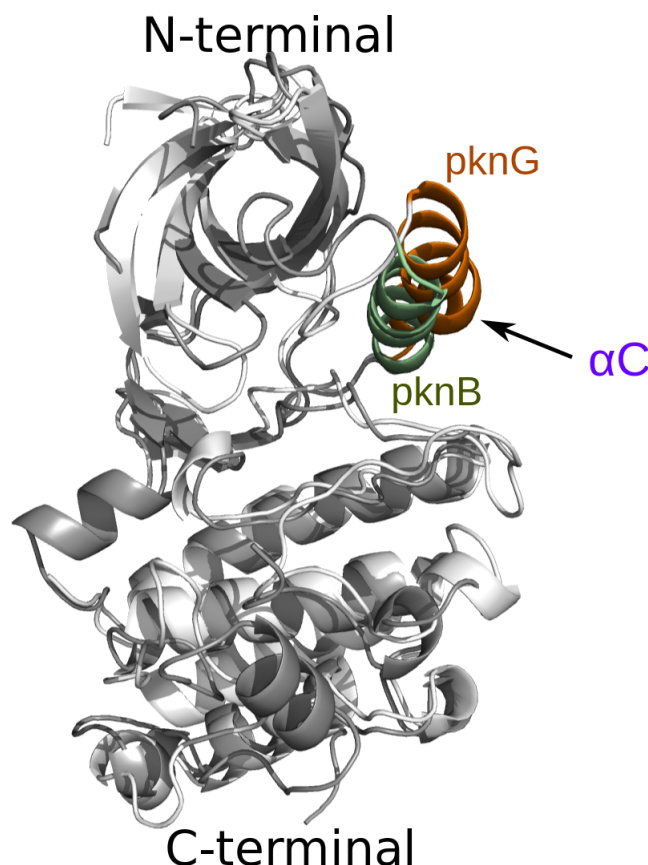


Figura 3.8: El rol de la hélice αC en PknG. pknG presenta una conformación distal de la hélice αC (naranja) comparada con pknB (verde).

reactivo utilizado fue el confeccionado y descrito en la sección 3.2.2. Brevemente, la thr²² del péptido derivado de garA, fue puesta en su posición reactiva, adyacente al ATP junto con el punto de anclaje garA-pknB a través de la arg²⁶. La energía libre asociada al proceso de transferencia de fosfatos para pknB en su conformero activo, se muestra en la figura (Figura 3.10B) observándose una barrera de ~ 17.9 kcal/mol con un estado de transición planar para el γ -fosfato con distancias para $O3\beta_{ATP}-P\gamma_{ATP}$ y $O\gamma_{ATP}-O\gamma_{sustrato}$ de $\sim 2.54\text{\AA}$ y $1.94\text{\AA}$ respectivamente; lo que sugiere un mecanismo de reacción concertado (Figura 3.10B). Los perfiles de trabajo asociados a la curva de energía libre son los mostrados en la figura S1. Sin embargo, al construir el mismo complejo pknB-garA pero utilizando como templado el cristal de la forma monomérica (PDBid:3ORI) de pknB con la distorsión en la interfaz $\beta 4/\alpha C$, observamos que los perfiles de trabajo no convergen y la reacción no es completada satisfactoriamente, en particular, en la formación y/o estabilización a los productos (datos no mostrados). Lo que sugiere que la conformación activa en pknB depende fuertemente de la dimerización y estabilización de la interfaz $\beta 4/\alpha C$, mientras que la fosforilación del *loop* de activación "inmoviliza" dicha conformación y remodela y/o prepara el sitio de unión del sustrato.

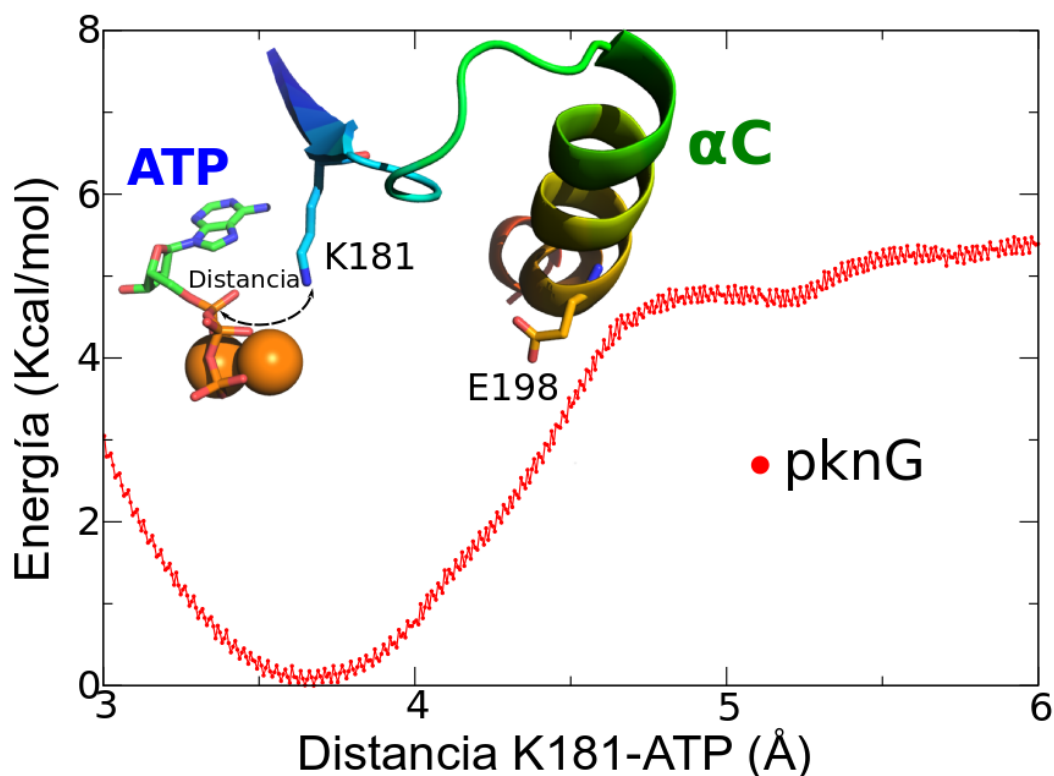


Figura 3.9: Estabilización de la lys¹⁸¹ en pknG. Perfil de energía libre para la distancia lys¹⁸¹-ATP obtenido por *Umbrella sampling* evaluado con WHAM.

El complejo ternario pknG-garA con atp.Mg^{+2} presenta las características antes descritas donde la thr²² ocupa el sitio de fosforilación y dos residuos hidrofóbicos (val²⁴ y phe²⁵) "anclan" el péptido en la posición correcta (sección 3.2.2). Algunas particularidades del sistema pknG son, por ejemplo, que tiene un residuo leucina en el tripéptido ²⁹³DLG²⁹⁵ que usualmente es fenilalanina. Sin embargo, este cambio aminoácido en uno de los elementos de la columna regulatoria no parece tener un efecto drástico en la conformación de este segmento y en la coordinación del ATP. Otra característica importante que ha sido discutida en la sección 3.2.3, es el rol del glutámico 198, puesto que se demostró que no es fundamental en el proceso catalítico (Lisa et al., 2015). Por consiguiente, desde el punto de vista energético, la reacción no presenta grandes diferencias y la barrera del proceso alcanza las 18.5 Kcal/mol (Figura 3.11B) con un estado de transición canónico planar para el γ -fosfato con distancias para $\text{O3}\beta_{\text{ATP}}\text{-P}\gamma_{\text{ATP}}$ y $\text{O}\gamma_{\text{ATP}}\text{-O}\gamma_{\text{sustrato}}$, $\sim 2.70\text{\AA}$ y $2.18\text{\AA}$. Mostrando un enlace levemente mas largo para $\text{O3}\beta_{\text{ATP}}\text{-P}\gamma_{\text{ATP}}$.

Para explorar más a fondo el papel de los diferentes grupos en la reacción, se realizó un análisis cualitativo de las distribuciones de carga de Mulliken en función de la coordenada

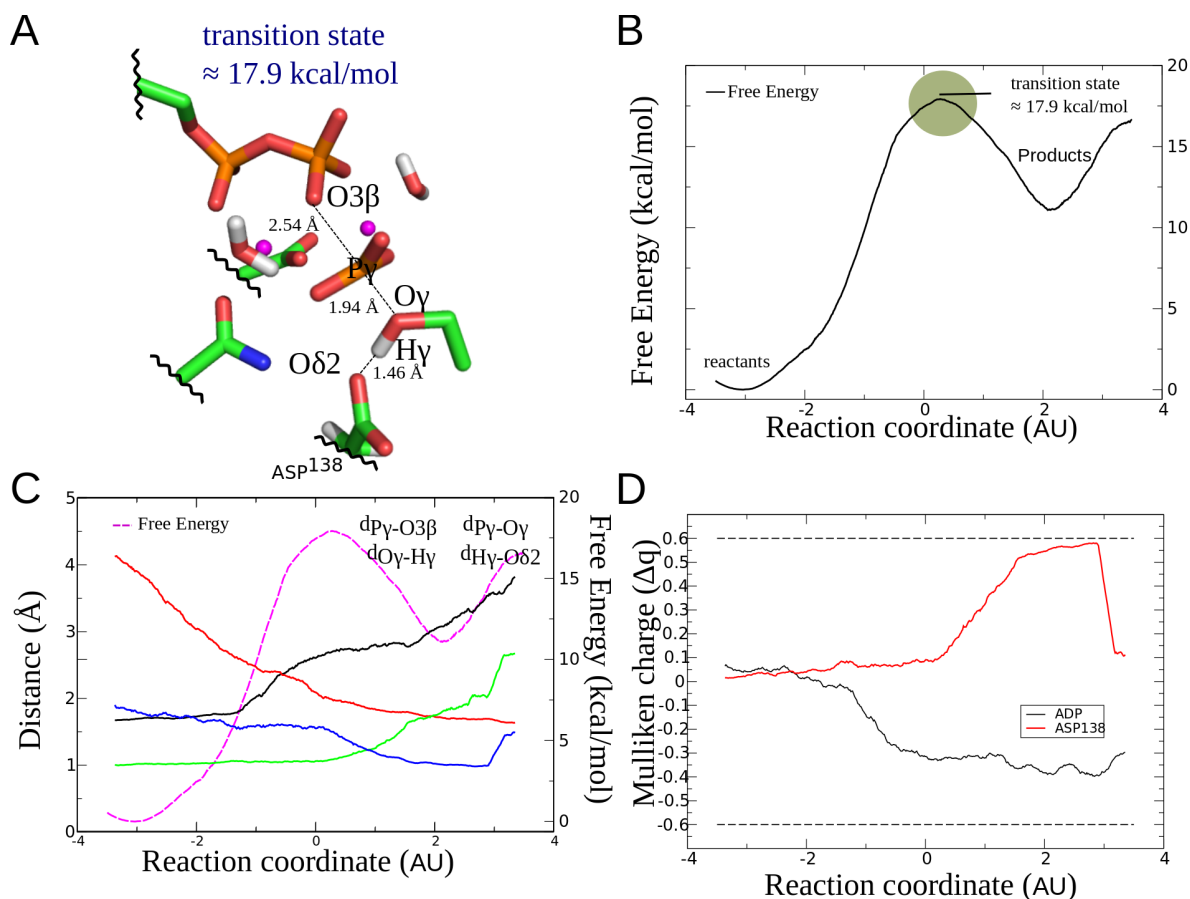


Figura 3.10: Reactividad de PknB.(A) Pequeño subsistema QM utilizado en los cálculos QM/MM y geometría del TS. B) Perfil de energía libre de la reacción de transferencia de fosfatos (C) Promedio de distancias relevantes para la reacción en función de la coordenada de reacción, a lo largo del perfil de energía libre. (D) Cambio en la carga neta de Mulliken de cada motivo seleccionado relativo a los reactivos. Código de color de los átomos: Carbono (verde), Nitrógeno (Azul), Oxígeno (Rojo), Azufre (Naranja) e Hidrógeno (Blanco).

de reacción (Figura 3.11D). Interesantemente, el asp²⁷⁶ incrementa levemente su carga incluso en el estado de transición (Figura 3.11C,D) incluso antes de que ocurra la transferencia desde el sustrato a este último. Como señalan otros trabajos, esto destaca el rol del aspártico como aceptor de cargas (Turjanski, Hummer, & Gutkind, 2009). Sin embargo la distribución de cargas de cada uno de los grupos analizados del sistema, permanece invariante a pesar de que el residuo glu¹⁹⁸ esté en otro mínimo conformacional, lo que indica que el rol de este último ligado a la estabilización del residuo lys, no es tal en pknG.

3.3 Conclusiones y discusión

La explosión de datos genómicos procariotas nos presenta actores muy similares a los que estamos familiarizados en eucariotas. Algunas proteínas quinasa de *Mtb* comparten mucho de los elementos estructurales que conocemos de las proteínas eucariotas. Sin embargo, al

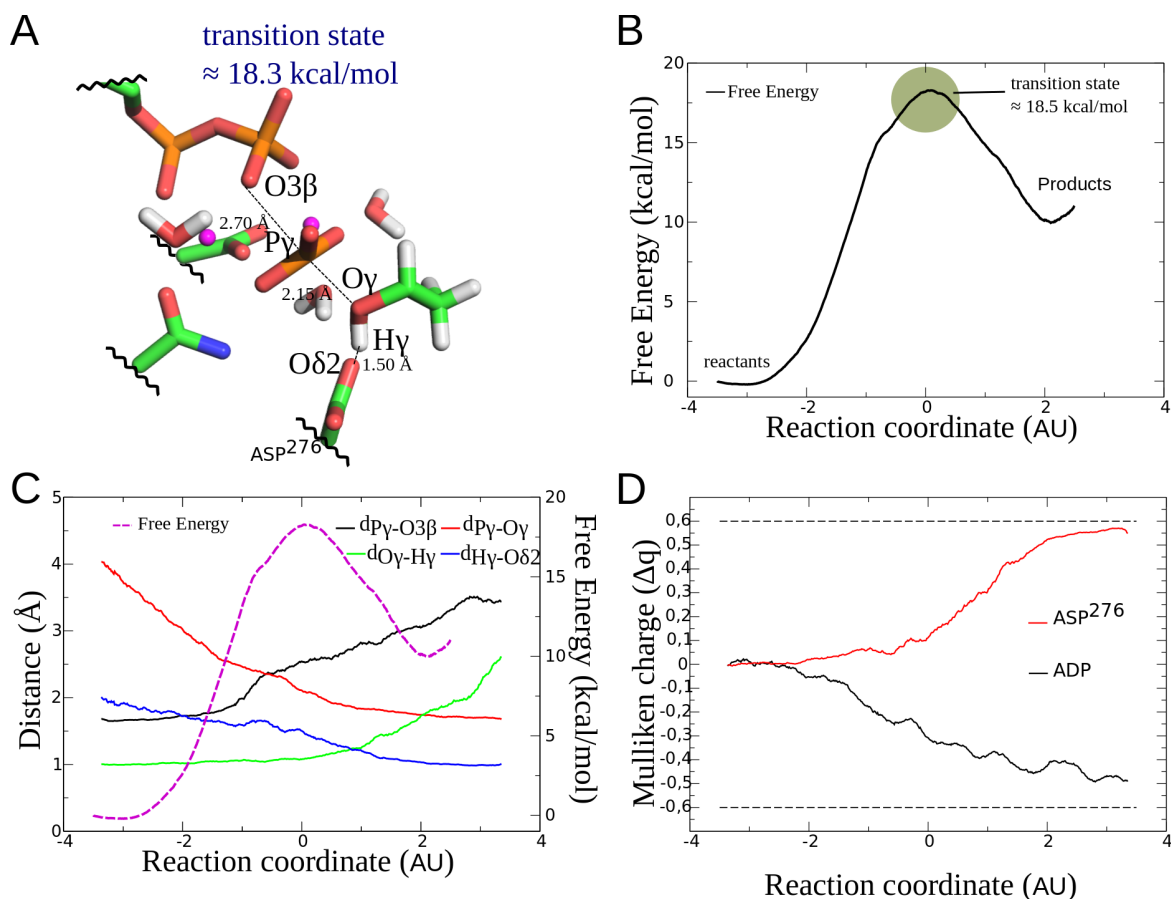


Figura 3.11: Reactividad de PknG. (A) Pequeño subsistema QM utilizado en los cálculos QM/MM y geometría del TS. (B) Perfil de energía libre de la reacción de transferencia de fosfatos (C) Promedio de distancias relevantes para la reacción en función de la coordenada de reacción, a lo largo del perfil de energía libre. (D) Cambio en la carga neta de Mulliken de cada motivo seleccionado relativo a los reactivos. Código de color de los átomos: Carbono (verde), Nitrógeno (Azul), Oxígeno (Rojo), Azufre (Naranja) e Hidrógeno (Blanco).

tratar de entender la activación de las STPKs bacterianas, nos encontramos con algunos elementos de regulación algo particulares. PknG expone una nueva estrategia en torno a la regulación del proceso de transferencia de fosfatos. Interesantemente, no cuenta con algunos de los elementos canónicos del dominio quinasa: por ejemplo, el residuo arginina del *loop* catalítico conocido como motivo RD, no presenta fosforilación de ningún residuo del segmento de activación, y el sitio de polifosfatos donde se une garA, esta distal al sitio activo. A pesar de ello, el mecanismo de reacción está conservado, y para dicho proceso precinde del residuo glu¹⁸¹. Por otra parte, la reacción química catalizada por pknB parece poseer elementos más conservados, pero para alcanzar dicho estado reactivo, este biopolímero necesita dimerizar, como consecuencia estabiliza la interfaz β 4- α C que podría estar relacionado con el armado de la llamada así "columna" regulatoria (Kornev, & S. S. Taylor, 2010; Meharena et al., 2013). Por ende, este mecanismo es totalmente consistente con una enzima partícipe de un sistema de transducción de señales asociada a membrana

que debe actuar como sensor y luego transmitir la información hacia el interior celular.

A continuación, sabemos que un paso importante en el ciclo catalítico de una enzima lo comprende el reconocimiento por su sustrato. En relación a esto, las observaciones del presente trabajo cobran relevancia al observar que el dominio FHA presente en garA, esta fuertemente asociado o ha sido descrito como parte integral de proteínas involucradas en numerosos procesos celulares eucariotas, incluidos los sistemas de transducción de señales, el control de la transcripción, reparación del ADN y progresión del ciclo celular (Ahn et al., 2002; Bashkirov et al., 2003; Xu, Tsvetkov, & Stern, 2002). Si consideremos además que pknG, es activamente secretada (Nguyen, & Pieters, 2005), sugiere que puede existir una interacción directa entre pknG con algunas de las proteínas eucariotas del hospedador, modificando el flujo de información, incluso de la célula huésped. Por otra parte, *Mtb* muestra 6 posibles proteínas con este dominio presente (Villarino et al., 2005) con pocos ejemplos de pares de interacción descritos (Atsushi et al., 1994; Umeyama, Lee, & Hori-nouchi, 2002; Nariya, & Inouye, 2002). Por ende, la caracterización de las interacciones proteína-proteína entre las STPKs y sus sustratos, nos permitirán entender la modulación de los caminos de transducción de señales en procariotas, así como los mecanismos de patogenicidad. Como discutimos en la sección de resultados, otras STPKs podrían utilizar un mecanismo de unión a su sustrato similar al propuesto para pknB. Los recientemente identificados genes maestros pknB y pknH (Baer et al., 2014) mostraron una fuerte dependencia en el reconocimiento de sus sustratos a través de interacciones proteína-proteína con un rol protagónico de los residuos fosforilables del *loop* de activación. No obstante, en este trabajo demostramos la contribución de cada uno de los elementos que conforman garA. Es más, la identidad de los residuos hacia el N-terminal, además del dominio FHA, contribuyen a la unión de gara frente a las STPKs, mostrando la complejidad del sistema y presentando una nueva capa de regulación, en torno a la señalización intracelular.

3.4 Materiales y métodos

Estructuras Iniciales. Para la confección del modelo correspondiente a el estado doblemente fosforilado de pknB (2P-pknB) se tomó el cristal 1MRU. Sin embargo, la estructura cristalina carece del loop de activación, con lo que fue completado empleando el programa MODELLER (Sali, & Blundell, 1994). Teniendo en cuenta las interacciones importantes entre los fosfo-residuos y el cluster de residuos positivos descritos (Nolen, S. Taylor, & Ghosh, 2004). Una vez confeccionado el modelo activo doblemente fosforilado, se agregó

garA (Rv1827) tomando las coordenadas espaciales de los modelos resueltos por RMN (PDBid:2KFU) (Nott et al., 2009). El sistema pknG solvatado fue construido a partir del templado con el análogo de sustrato, depositado bajo el pdbID 4Y12 (Lisa et al., 2015). Las estructuras iniciales para pknB y pknG fueron solvatadas en una caja octaédrica que se extiende 12 Å desde la superficie de la proteína.

Parámetros clásicos Todas las simulaciones clásicas han sido realizadas empleando el paquete AMBER12 (Case et al., n.d.). Las estructuras iniciales fueron solvatadas con moléculas TIP3P en una caja octaédrica truncada (Price, & Brooks III, 2004). Los parámetros para el ATP, MG y fosfo-residuos son idénticos a los utilizados en el capítulo de ERK2 (Craft Jr, & Legge, 2005; Meagher, Redman, & Carlson, 2003; Allnér, Nilsson, & Villa, 2012). En la etapa de dinámica molecular de producción, se realizaron simulaciones a temperatura y presión constantes durante 100ns a 500 ns para cada estado. Los parámetros empleados para el centro hierro-azufre o rubredoxina son los desarrollados por el grupo de Ramos et. al (Carvalho, Teixeira, & Ramos, 2013).

Sistema QM y nivel de teoría. En el presente estudio el sistema QM consistió en metil-trifosfato del ATP, dos iones magnesio (Mg^{2+}) y completando la esfera de coordinación, los grupos funcionales comprendido por los residuos asn¹⁴³, asp^{138,156}, y moléculas de agua para pknB; mientras que para pknG los residuos considerados parte del sistema cuántico lo comprenden los residuos asn²⁸¹, asp^{276,293}. A esto debe agregarse las cadenas laterales de las treoninas 21 y 22 de garA, para pknG y pknB respectivamente. En total, cada sistema QM consistió de 55 átomos. El resto de la proteína y el resto de las moléculas de solvente fueron tratados clásicamente. Todas las simulaciones fueron realizadas en condiciones periódicas de contorno con un paso de integración de 1fs. El nivel de teoría es SCC-DFTB (Self-consistent charge density functional tight-binding) (Cui et al., 2001) de manera análoga a la descrita para ERK2.

Cálculos híbridos QM/MM. Determinación de la energía libre de la reacción usando un esquema QM(DFTB)/MM y múltiples dinámicas moleculares guiadas (Multiple steered molecular dynamics "MSMD"). Para determinar la energía libre de la reacción, se empleó el mismo protocolo descrito para ERK2. Donde se utilizó el método MSMD (Crespo et al., 2005), que permite vincular el dinámicas de no-equilibrio con propiedades de equilibrio como la energía libre (Crespo et al., 2005; Capece, Estrin, & Marti, 2008; Forti et al., 2011; Xiong et al., 2006). De manera análoga, se seleccionaron 4 distancias como coordenada de reacción descritas en la ecuación 3.2:

$$\lambda = d(O3\beta - P\gamma) - d(P\gamma - O\gamma) + d(O\gamma - H\gamma) - d(H\gamma - O\delta 2) \quad (3.1)$$

Para todas las simulaciones se definió la velocidad de tracción como el cociente entre el rango de la coordenada de reacción y el tiempo de simulación total, dicha velocidad se ajusto a 0.07 Å/ps lo que resulta en un tiempo de simulación total para cada curva de trabajo de aproximadamente 100 ps. 100 curvas de trabajo fueron obtenidas para la determinación de la curva de energía libre.

Ensayo quinasa In-Vitro. El ensayo de actividad fue realizado con proteína pknG purificada según el protocolo antes descrito (Lisa et al., 2015). Un kit comercial (Kinase-Glo®) fue empleado para medir la fosforilación de gara y de cada péptido derivado de este sustrato como una medida de ATP remanente. Cada medida de actividad fue realizado en un volumen final de 50 µl conteniendo 0.8µM de pknG, 25uM de garA 200µM de péptido WT y 800 uM péptido doble mutante V24A,F25A de secuencia SDEVTVETTSVFRADFL y SDEVTVETTSAARADFL respectivamente; Tris 50mM pH 7, NaCl 100mM, MgCl2 2mM y ATP 2µM completan la mezcla. Cada replica (tres) se reposo por una hora a 37°C. El tiempo de incubación con el reactivo luminiscente fue de 20 minutos y la lectura con el luminómetro se realizó con un tiempo de integración de 0.5s.

Mutagénesis in silico utilizando el software FoldX De la dinámica de producción correspondiente a pknG con un tiempo de simulación total cercano a los 100 ns, se tomaron 50 fotos equiespaciadas, donde cada foto se mutó con el programa FoldX (Schymkowitz et al., 2005). 5 replicas/foto por mutante fue ensayada. Se estimó la "energía" de unión entre el péptido y la quinasa para los complejos wild type (WT) y los mutantes sobre el péptido derivado de GarA, con la herramienta que calcula la energía de interacción entre elementos de un complejo proteico. El valor informado es el promedio total. El logo se contruyó con el servidor web seq2logo y el tipo de logo es el Kullback-Leibler construido a partir de la matriz de probabilidades (Thomsen, & Nielsen, 2012) Brevemente, los valores de energía se "convierten" a un valor de probabilidad aplicando la relación:

$$p_i = e^{\frac{-\Delta G_i}{R \cdot T}} \quad (3.2)$$

p_i es una probabilidad para el aminoácido i, donde el ΔG es el valor obtenido para este aminoácido. La probabilidad relativa se obtiene simplemente relativizando dicho valor a la suma de todas las "probabilidades" de los 20 residuos para cada posición.

3.5 Información Suplementaria

A continuación se muestra la información suplementaria asociada al capítulo

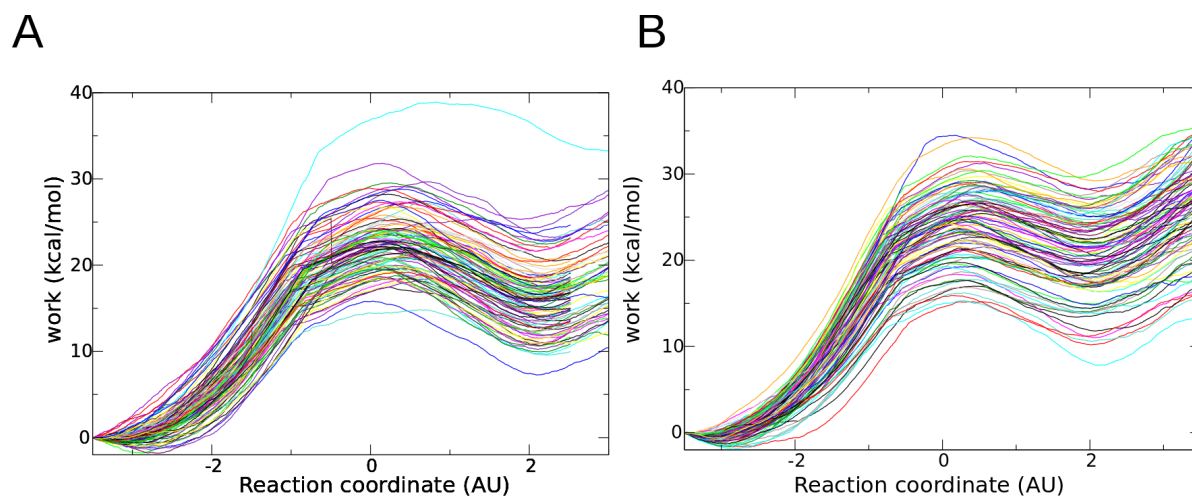


Figura S1: Distribución de trabajos obtenidos a partir del protocolo SMD para ambas reacciones (A) pknG y pknB (B).

Bibliografía

- Ahn, Joon-Young et al. (2002). “Phosphorylation of threonine 68 promotes oligomerization and autophosphorylation of the Chk2 protein kinase via the forkhead-associated domain”. In: *Journal of Biological Chemistry* 277.22, pp. 19389–19395.
- Allnér, Olof, Lennart Nilsson, & Alessandra Villa (2012). “Magnesium ion–water coordination and exchange in biomolecular simulations”. In: *Journal of Chemical Theory and Computation* 8.4, pp. 1493–1502.
- Atsushi, Matsumoto et al. (1994). “Phosphorylation of the AfsR protein involved in secondary metabolism in *Streptomyces* species by a eukaryotic-type protein kinase”. In: *Gene* 146.1, pp. 47–56.
- Baer, Christina E et al. (2014). “Biochemical and spatial coincidence in the provisional Ser/Thr protein kinase interaction network of *Mycobacterium tuberculosis*”. In: *Journal of Biological Chemistry* 289.30, pp. 20422–20433.
- Barr, Daniel et al. (2011). “Importance of domain closure for the autoactivation of ERK2”. In: *Biochemistry* 50.37, pp. 8038–8048.
- Barthe, Philippe et al. (2009). “Dynamic and structural characterization of a bacterial FHA protein reveals a new autoinhibition mechanism”. In: *Structure* 17.4, pp. 568–578.
- Bashkirov, Vladimir I et al. (2003). “Direct kinase-to-kinase signaling mediated by the FHA phosphoprotein recognition domain of the Dun1 DNA damage checkpoint kinase”. In: *Molecular and Cellular Biology* 23.4, pp. 1441–1452.
- Boitel, Brigitte et al. (2003). “PknB kinase activity is regulated by phosphorylation in two Thr residues and dephosphorylation by PstP, the cognate phospho-Ser/Thr phosphatase, in *Mycobacterium tuberculosis*”. In: *Molecular microbiology* 49.6, pp. 1493–1508.
- Bunik, Victoria I, & Alisdair R Fernie (2009). “Metabolic control exerted by the 2-oxoglutarate dehydrogenase reaction: a cross-kingdom comparison of the crossroad between energy production and nitrogen assimilation”. In: *Biochemical Journal* 422.3, pp. 405–421.

- Capece, Luciana, Dario A Estrin, & Marcelo A Marti (2008). "Dynamical characterization of the heme NO oxygen binding (HNOX) domain. Insight into soluble guanylate cyclase allosteric transition†". In: *Biochemistry* 47.36, pp. 9416–9427.
- Carvalho, Alexandra TP, Ana FS Teixeira, & Maria J Ramos (2013). "Parameters for molecular dynamics simulations of iron-sulfur proteins". In: *Journal of computational chemistry* 34.18, pp. 1540–1548.
- Case, DA et al. "AMBER 12; University of California: San Francisco, 2012". In: *There is no corresponding record for this reference*.
- Cowley, Siobhan et al. (2004). "The Mycobacterium tuberculosis protein serine/threonine kinase PknG is linked to cellular glutamate/glutamine levels and is important for growth in vivo". In: *Molecular microbiology* 52.6, pp. 1691–1702.
- Craft Jr, John W, & Glen B Legge (2005). "An AMBER/DYANA/MOLMOL phosphorylated amino acid library set and incorporation into NMR structure calculations". In: *Journal of biomolecular NMR* 33.1, pp. 15–24.
- Crespo, Alejandro et al. (2005). "Multiple-steering QM-MM calculation of the free energy profile in chorismate mutase". In: *Journal of the American Chemical Society* 127.19, pp. 6940–6941.
- Cui, Qiang et al. (2001). "A QM/MM implementation of the self-consistent charge density functional tight binding (SCC-DFTB) method". In: *The Journal of Physical Chemistry B* 105.2, pp. 569–585.
- Dasgupta, Arunava et al. (2006). "The serine/threonine kinase PknB of Mycobacterium tuberculosis phosphorylates PBPA, a penicillin-binding protein required for cell division". In: *Microbiology* 152.2, pp. 493–504.
- Durán, Rosario et al. (2005). "Conserved autophosphorylation pattern in activation loops and juxtamembrane regions of Mycobacterium tuberculosis Ser/Thr protein kinases". In: *Biochemical and biophysical research communications* 333.3, pp. 858–867.
- Durocher, Daniel et al. (1999). "The FHA domain is a modular phosphopeptide recognition motif". In: *Molecular cell* 4.3, pp. 387–394.
- England, Patrick et al. (2009). "The FHA-containing protein GarA acts as a phosphorylation-dependent molecular switch in mycobacterial signaling". In: *FEBS letters* 583.2, pp. 301–307.
- Fernandez, Pablo et al. (2006). "The Ser/Thr protein kinase PknB is essential for sustaining mycobacterial growth". In: *Journal of bacteriology* 188.22, pp. 7778–7784.

- Forti, Flavio et al. (2011). “Comparing and combining implicit ligand sampling with multiple steered molecular dynamics to study ligand migration processes in heme proteins”. In: *Journal of computational chemistry* 32.10, pp. 2219–2231.
- Av-Gay, Yossef, & Martin Everett (2000). “The eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases of *Mycobacterium tuberculosis*”. In: *Trends in microbiology* 8.5, pp. 238–244.
- Greenstein, Andrew E et al. (2007). “Allosteric activation by dimerization of the PknD receptor Ser/Thr protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis*”. In: *Journal of Biological Chemistry* 282.15, pp. 11427–11435.
- Grundner, Christoph, Laurie M Gay, & Tom Alber (2005). “*Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinases PknB, PknD, PknE, and PknF phosphorylate multiple FHA domains”. In: *Protein Science* 14.7, pp. 1918–1921.
- Hari, Sanjay B, Ethan A Merritt, & Dustin J Maly (2014). “Conformation-selective ATP-competitive inhibitors control regulatory interactions and noncatalytic functions of mitogen-activated protein kinases”. In: *Chemistry & biology* 21.5, pp. 628–635.
- Huse, Morgan, & John Kuriyan (2002). “The conformational plasticity of protein kinases”. In: *Cell* 109.3, pp. 275–282.
- Iyer, Ganesh H et al. (2005). “Catalytic independent functions of a protein kinase as revealed by a kinase-dead mutant: study of the Lys72His mutant of cAMP-dependent kinase”. In: *Journal of molecular biology* 351.5, pp. 1110–1122.
- Kornev, Alexandr P, Nina M Haste, et al. (2006). “Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103.47, pp. 17783–17788.
- Kornev, Alexandr P, & Susan S Taylor (2010). “Defining the conserved internal architecture of a protein kinase”. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1804.3, pp. 440–444.
- (2015). “Dynamics-driven allostery in protein kinases”. In: *Trends in biochemical sciences* 40.11, pp. 628–647.
- Leonard, Christopher J, L Aravind, & Eugene V Koonin (1998). “Novel families of putative protein kinases in bacteria and archaea: evolution of the “eukaryotic” protein kinase superfamily”. In: *Genome research* 8.10, pp. 1038–1047.
- Lisa, Maria-Natalia et al. (2015). “Molecular Basis of the Activity and the Regulation of the Eukaryotic-like S/T Protein Kinase PknG from *Mycobacterium tuberculosis*”. In: *Structure* 23.6, pp. 1039–1048.

- Lombana, T Noelle et al. (2010). "Allosteric activation mechanism of the Mycobacterium tuberculosis receptor Ser/Thr protein kinase, PknB". In: *Structure* 18.12, pp. 1667–1677.
- Meagher, Kristin L, Luke T Redman, & Heather A Carlson (2003). "Development of polyphosphate parameters for use with the AMBER force field". In: *Journal of computational chemistry* 24.9, pp. 1016–1025.
- Meharena, Hiruy S et al. (2013). "Deciphering the structural basis of eukaryotic protein kinase regulation". In: *PLoS Biol* 11.10, e1001680.
- Nariya, Hirofumi, & Sumiko Inouye (2002). "Activation of 6-phosphofructokinase via phosphorylation by Pkn4, a protein Ser/Thr kinase of Myxococcus xanthus". In: *Molecular microbiology* 46.5, pp. 1353–1366.
- Nguyen, Liem, & Jean Pieters (2005). "The Trojan horse: survival tactics of pathogenic mycobacteria in macrophages". In: *Trends in cell biology* 15.5, pp. 269–276.
- Nguyen, Liem, Anne Walburger, et al. (2005). "Role of protein kinase G in growth and glutamine metabolism of Mycobacterium bovis BCG". In: *Journal of bacteriology* 187.16, pp. 5852–5856.
- Niebisch, Axel et al. (2006). "Corynebacterial protein kinase G controls 2-oxoglutarate dehydrogenase activity via the phosphorylation status of the OdhI protein". In: *Journal of Biological Chemistry* 281.18, pp. 12300–12307.
- Nolen, Brad, Susan Taylor, & Gourisankar Ghosh (2004). "Regulation of protein kinases: controlling activity through activation segment conformation". In: *Molecular cell* 15.5, pp. 661–675.
- Nott, Timothy J et al. (2009). "An intramolecular switch regulates phosphoindependent FHA domain interactions in Mycobacterium tuberculosis". In: *Sci. Signal.* 2.63, ra12–ra12.
- O'Hare, Helen M et al. (2008). "Regulation of glutamate metabolism by protein kinases in mycobacteria". In: *Molecular microbiology* 70.6, pp. 1408–1423.
- Parikh, Amit et al. (2009). "PknB-mediated phosphorylation of a novel substrate, N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase, modulates its acetyltransferase activity". In: *Journal of molecular biology* 386.2, pp. 451–464.
- Price, Daniel J, & Charles L Brooks III (2004). "A modified TIP3P water potential for simulation with Ewald summation". In: *The Journal of chemical physics* 121.20, pp. 10096–10103.

- Robinson, Megan J et al. (1996). "Mutation of position 52 in ERK2 creates a nonproductive binding mode for adenosine 5'-triphosphate". In: *Biochemistry* 35.18, pp. 5641–5646.
- Sali, Andrej, & Tom Blundell (1994). "Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints". In: *Protein structure by distance analysis* 64, p. C86.
- Scherr, Nicole et al. (2007). "Structural basis for the specific inhibition of protein kinase G, a virulence factor of *Mycobacterium tuberculosis*". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104.29, pp. 12151–12156.
- Schymkowitz, Joost WH et al. (2005). "Prediction of water and metal binding sites and their affinities by using the Fold-X force field". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102.29, pp. 10147–10152.
- Sharma, Kirti et al. (2006). "Transcriptional control of the mycobacterial embCAB operon by PknH through a regulatory protein, EmbR, in vivo". In: *Journal of bacteriology* 188.8, pp. 2936–2944.
- Thomsen, Martin Christen Frølund, & Morten Nielsen (2012). "Seq2Logo: a method for construction and visualization of amino acid binding motifs and sequence profiles including sequence weighting, pseudo counts and two-sided representation of amino acid enrichment and depletion". In: *Nucleic acids research* 40.W1, W281–W287.
- Tiwari, Divya et al. (2009). "Key residues in *Mycobacterium tuberculosis* protein kinase G play a role in regulating kinase activity and survival in the host". In: *Journal of Biological Chemistry* 284.40, pp. 27467–27479.
- Turjanski, Adrian Gustavo, Gerhard Hummer, & J Silvio Gutkind (2009). "How mitogen-activated protein kinases recognize and phosphorylate their targets: A QM/MM study". In: *Journal of the American Chemical Society* 131.17, pp. 6141–6148.
- Umeyama, T, P-C Lee, & S Horinouchi (2002). "Protein serine/threonine kinases in signal transduction for secondary metabolism and morphogenesis in *Streptomyces*". In: *Applied microbiology and biotechnology* 59.4-5, pp. 419–425.
- Ventura, Marcello et al. (2013). "GarA is an essential regulator of metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*". In: *Molecular microbiology* 90.2, pp. 356–366.
- Villarino, A et al. (2005). "Proteomic identification of *M. tuberculosis* protein kinase substrates: PknB recruits GarA, a FHA domain-containing protein, through activation loop-mediated interactions". In: *Journal of molecular biology* 350.5, pp. 953–963.
- Walburger, Anne et al. (2004). "Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages". In: *Science* 304.5678, pp. 1800–1804.

- Wittwer, Matthias et al. (2016). "Oxidative Unfolding of the Rubredoxin Domain and the Natively Disordered N-terminal Region Regulate the Catalytic Activity of Mycobacterium tuberculosis Protein Kinase G". In: *Journal of Biological Chemistry* 291.53, pp. 27062–27072.
- Woods, Gail L, & John A Washington (1987). "Mycobacteria other than Mycobacterium tuberculosis: review of microbiologic and clinical aspects". In: *Review of Infectious Diseases* 9.2, pp. 275–294.
- Xiong, Hui et al. (2006). "Free energy calculations with non-equilibrium methods: applications of the Jarzynski relationship". In: *Theoretical Chemistry Accounts* 116.1-3, pp. 338–346.
- Xu, Xingzhi, Lyuben M Tsvetkov, & David F Stern (2002). "Chk2 activation and phosphorylation-dependent oligomerization". In: *Molecular and cellular biology* 22.12, pp. 4419–4432.
- Young, Tracy A et al. (2003). "Structure of Mycobacterium tuberculosis PknB supports a universal activation mechanism for Ser/Thr protein kinases". In: *Nature Structural & Molecular Biology* 10.3, pp. 168–174.

CAPÍTULO 4

Bases moleculares del reconocimiento proteína-proteína por parte de MAPKs.

4.1 Introducción

El alcance y/o importancia del proceso de señalización ha sido explorado en detalle en los capítulos anteriores. Para que éste suceda, diferentes mecanismos para la propagación de la información son empleados, sin embargo la transmisión de la señal a través de modificaciones pos-traduccionales reversibles es el más común. Por ende, la fosforilación en residuos ser/thr sólo es posible si ambas moléculas entran en "contacto". La fidelidad de la señal por cada camino de transducción de señales depende de interacciones proteína-proteína específicas, que aseguran la modularidad de cada vía de señalización (Figura 4.1) (A. J. Bardwell, Frankson, & L. Bardwell, 2009). En este apartado discutiremos cómo las MAPKs reconocen sus blancos moleculares, puesto que este evento es fundamental para que se complete el ciclo catalítico/enzimático de estas biomoléculas.

Interacciones proteína-proteína entre MAP kinasas (MAPKs), sustratos, activadores o proteínas de andamiaje, son mediadas por sitios de anclaje (sitios de "Docking"). Varios son los sitios que presentan este tipo de interacciones, sin embargo el que discutiremos en este documento es el que está emplazado entre las hojas $\beta 7$ - $\beta 8$ y las hélices αD - αE de las MAPKs. Este brinda un sitio de unión a péptidos conocidos como DELJ, KIM-motif (kinase interaction motif) o D-sites (Figura 4.2A, 4.3). El consenso actual dicta que las secuencias polipeptídica que se unen, contienen el motivo $(R/K_{2-3})-X_{2-6}-\Phi_A-X-\Phi_B$ donde Φ es un residuo hidrofóbico (T. Lee et al., 2004; Sharrocks, Shen-His Yang, & Galanis, 2000). La mayoría de las proteínas efectoras o regulatorias de MAPKs presentan sitios de *docking*.

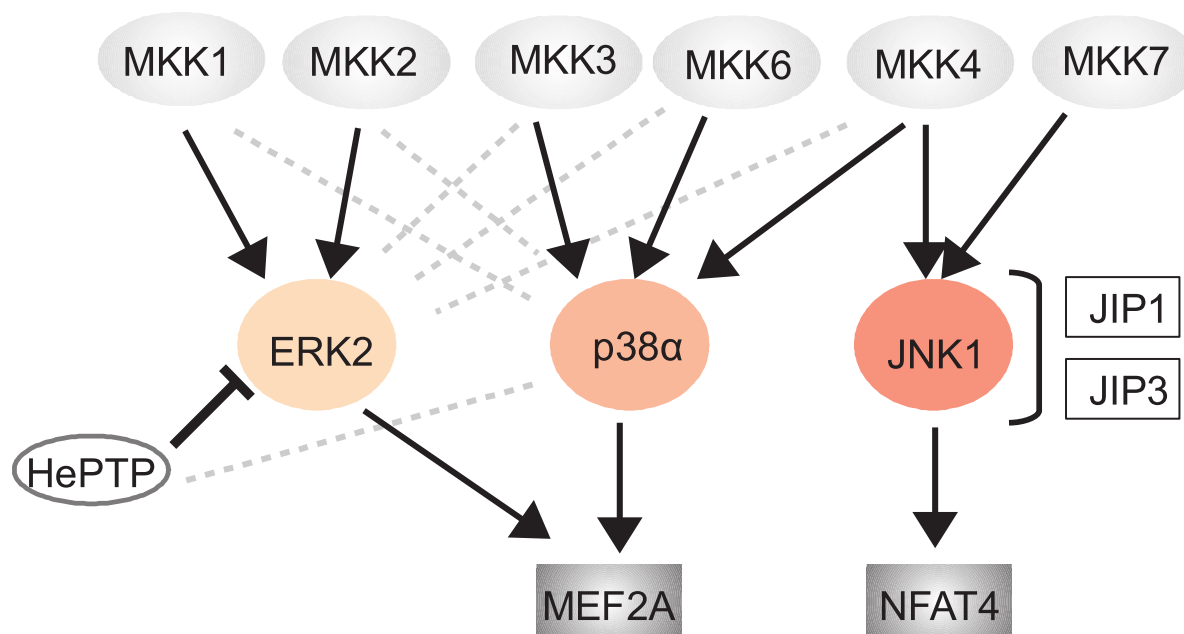


Figura 4.1: Vías de señalización intracelular de MAPKs. Flechas negras indican interacciones fisiológicas relevantes. Posibles interacciones (líneas punteadas). Tomado del trabajo de Garai et al., 2012

4.1.1 Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs)

La familia MAPK presenta 3 módulos independientes que se activan alternativamente frente a diferentes estímulos (Figura 4.1). En humanos, la familia de MAP2K, como MEK1/2, MKK3/6, MKK4/7, son responsables de la activación de ERK, p38 y JNK respectivamente (A. J. Bardwell, Frankson, & L. Bardwell, 2009). Dichas moléculas poseen D-sites de ~10-15 residuos de longitud en el N-terminal, que son los responsables del anclaje y reconocimiento por parte de las MAPKs. El proceso de inactivación de las MAPKs mediante la desfosforilación mediada por fosfatasas, también incluye el reconocimiento de la mismas a través de péptidos KIM; ejemplos de esto lo comprenden HePTP (hematopoietic tyrosine phosphatase), STEP (striatum-enriched phosphatase) STEP-like PTP y PTPSL (Zanke et al., 1992; Lombroso, Murdoch, & Lerner, 1991; Hendriks et al., 1995). También se identificaron péptidos KIM en proteínas de andamiaje como JIP1 y JIP4 (Jnk-Interacting Protein) también han sido identificadas (Whitmarsh et al., 1998; Kelkar, Standen, & Davis, 2005), y en proteínas blanco como: PEA-15 (phosphoprotein enriched in astrocytes), RSK1 (Ribosomal protein S6 kinase alpha-1), MEF2a (myocyte enhancer factor 2A), etc (Hill et al., 2002; Smith et al., 1999; Shen-Hsi Yang, Galanis, & Sharrocks, 1999). Sin embargo, aún es controversial si los péptidos KIM, son importantes sólo para el "binding", sólo para la especificidad o ambas. Además, del sitio canónico existen reportes que señalan la importancia de zonas cercanas a estos, que podrían contribuir a la especificidad y reconocimiento

de los mismos (Francis et al., 2011; Tárrega et al., 2002).

Estudios estructurales de los complejos MAPKs con péptidos derivados de sustratos y moduladores enzimáticos

La caracterización de estos sitios de unión han sido realizada por varios grupos de investigación en los últimos años utilizando diferentes abordajes. A principios del 2000 el primer complejo cristalográfico de p38 α :MEF2A fue descrito por el grupo de Goldsmith (Chang et al., 2002). A partir de allí y hasta el momento, del orden de 30 complejos MAPK:péptido fueron resueltos (Complejos resumidos en la tabla 4.1), para las principales vías de transducción de señales p38 α , JNK(1-3) y ERK(1,2,5), así como también para algunas MAPKs de levaduras como fus3 (Peti, & Page, 2013). El origen biológico de los péptidos cristalizados presentan una diversidad interesante, algunos pertenecen a las MAPKKs (MEK2, MKK5, MKK6, MKK3b, STE7), fosfatasa (HePTP, Msg, DUSP/MKP5), también incluyen sustratos y/o proteínas de andamiaje (DCC, MEF2a, TAB1, JIP1, NFAT2, SAB, AFT2, Far1, PEA15, RSK1, MNK1, MK2). Otro avance importante en la comprensión de este tipo de sistema fue la identificación de péptidos que pueden unirse en la orientación de N→C terminal y viceversa, (tabla 4.1) sobre el sitio de unión de la quinasa (Garai et al., 2012).

El relevamiento de todas las estructuras disponibles, establecen que la hendidura proteica donde se unen los péptidos presenta sitios de unión para 4 residuos hidrofóbicos del ligando: ϕA , ϕB , ϕL (L, "lower" también llamado $\phi A-2$) y ϕU (U, "up" también llamado ϕH) (Garai et al., 2012). Se describieron también interacciones electrostáticas en el sitio de unión. El conjunto de interacciones altamente conservadas se denominó el sitio CD ("Common Docking").

Diversos trabajos estudiaron la afinidad de estas enzimas con sus interactores intentando explicar la selectividad de cada uno de ellos por su MAPKs (A. J. Bardwell, Frankson, & L. Bardwell, 2009). Estudios recientes establecieron que péptidos KIM, JNK-específicos, como por ejemplo JIP1, sólo unían a esta familia de quinasas, mientras que no lo hacían sobre p38 y ERK (Garai et al., 2012). Los motivos estructurales son atribuidos en parte a que JNK carece de un sitio de unión hidrofóbico denominado ϕU , puesto que esta ocluido por el par de interacción E329-K83. (Tárrega et al., 2002; Heo et al., 2004; Laughlin et al., 2012). La hipótesis de que las diferencias en las constantes de unión de cada péptido por su MAPKs explicarían la fidelidad de cada vía de señalización, llevó a se ensayaran experimentos con péptidos derivados de moduladores y/o sustratos de las vías

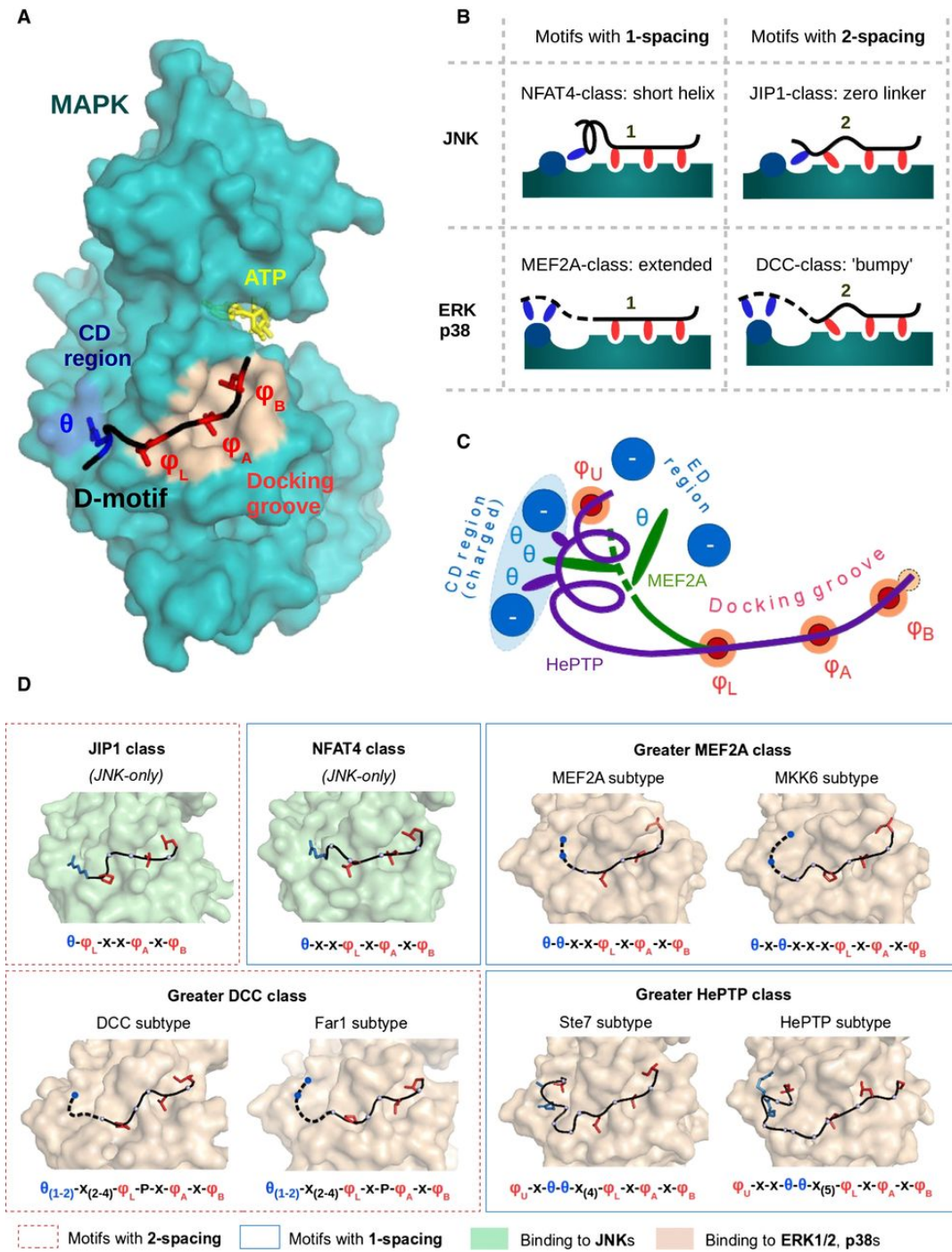


Figura 4.2: Clasificación estructural de motivos de unión a MAPKs A) Vista general del dominio quinasa con su sustrato. El sitio de unión está comprendido por el sitio CD ("common docking") y la región hidrofóbica (coloreada azul y marrón claro, respectivamente), el complejo mostrado es el JNK1-NFAT4 (pdbID 2XRW). B) Tipos de modo de unión de diferentes péptidos. La hendidura permite 3 aminoácidos hidrofóbicos en línea, presentando dos esquemas de espaciamiento. Al mismo tiempo el espaciamiento entre, ϕ - ψ determina la especificidad de las MAPKs. C) Distintos modos de unión y diferentes largos de los D-motifs están disponibles para ERK2 o p38 α . Las secuencias péptidicas que se unen ERK2 y p38 α presentan una gran variedad conformacional, desde totalmente lineal (MEF2A, verde) a helicoidal (HePTP, magenta). D) clasificación en familia de péptidos (ver texto para detalles). Tomado del trabajo de Zeke et al., 2015

p38 α y ERK1/2. Como resultado obtuvieron que algunos de éstos apenas discriminaban entre ambas vías, lo que lleva a postular que la regulación del evento de reconocimiento podría incluir otros segmentos de las proteínas e incluso una regulación espacio-temporal del mismo. Considerando además que algunas moléculas están compartidas en más de una cascada de señalización intracelular, anticipa que éstas podrían tener *crosstalk* con otra vía emparentada y de esta manera responder a una variedad de estímulos de forma coordinada (A. J. Bardwell, Frankson, & L. Bardwell, 2009; Garai et al., 2012).

4.2 Resultados

En primera instancia colectamos las estructuras cristalográficas de péptidos con MAPKs teniendo en cuenta resolución y la diversidad conformacional del ligando. Los cristales utilizados están resumidos en la tabla 4.1. Para cada uno de ellos se evaluó las diferencias en la secuencia a fin de obtener la secuencia *wild type* (WT) depositada en la base de datos uniprot *uniprot*. Cada complejo se relajó y se mutó según el protocolo esquematizado de la figura 4.11. Además se definió el sitio de unión teniendo en cuenta todos los residuos de la proteína circundantes a 10 Å de todo el set de péptidos disponibles para las 3 MAPKs (Figura 4.3). En resumen, se consideraron los *loops* 4, 8 11 y 16 en el análisis. Puesto que las MAPKs cristalizadas (receptores) provienen de diferentes organismos, se realizó un alineamiento de secuencias de MAPKs de rata, ratón y humana a fin de determinar si existen diferencias polimórficas en el sitio activo para la misma MAPKs en diferentes organismos (Figura 4.4).

4.2.1 Desempeño del campo de fuerzas *FoldX* sobre mutantes puntuales.

Contando con toda la información cristalográfica disponible de los complejos MAPK:péptido nos preguntamos si el campo de fuerzas de *FoldX* es capaz de reproducir los resultados experimentales de mutantes puntuales de pares MAPK:sustrato reportados previamente. En una primera etapa pusimos a prueba las capacidades del programa *FoldX* (Schymkowitz et al., 2005) escaneando la secuencia polipeptídica del ligando, cambiando el residuo WT ("*Wild type*") por alaninas en lo que se conoce como un esquema de "*alanine scanning*". El protocolo empleado se detalla en la sección materiales y métodos, pero básicamente mutamos cada posición por el residuo alanina computando el " $\Delta\Delta G$ " del cambio aminoacídico (ecuación 4.1). A continuación para cada valor de "energía" computamos un cociente de afinidad entre el péptido mutante y el péptido WT (ecuación 4.2) a fin de tener una métrica

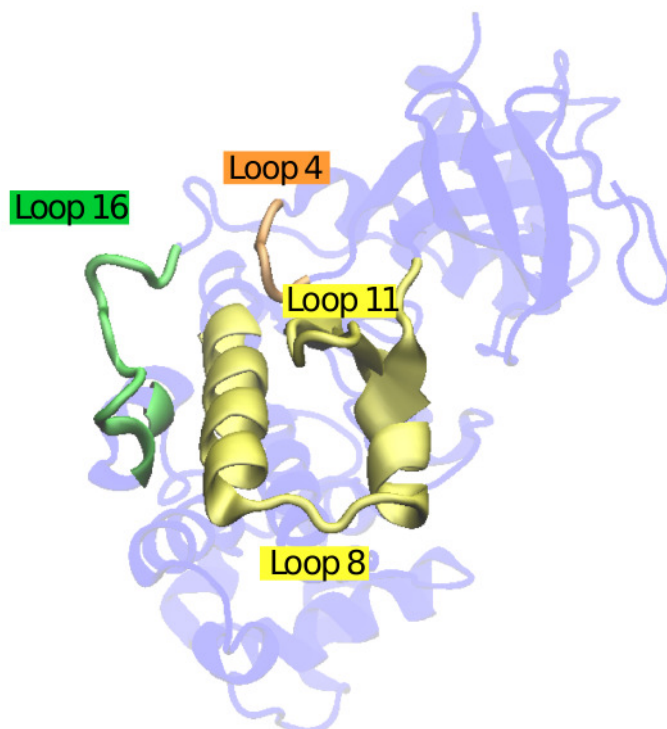


Figura 4.3: Determinación del sitio de unión. Se seleccionaron todos los residuos a 10 Å cercanos al conjunto de péptidos disponibles para las tres MAPKs.

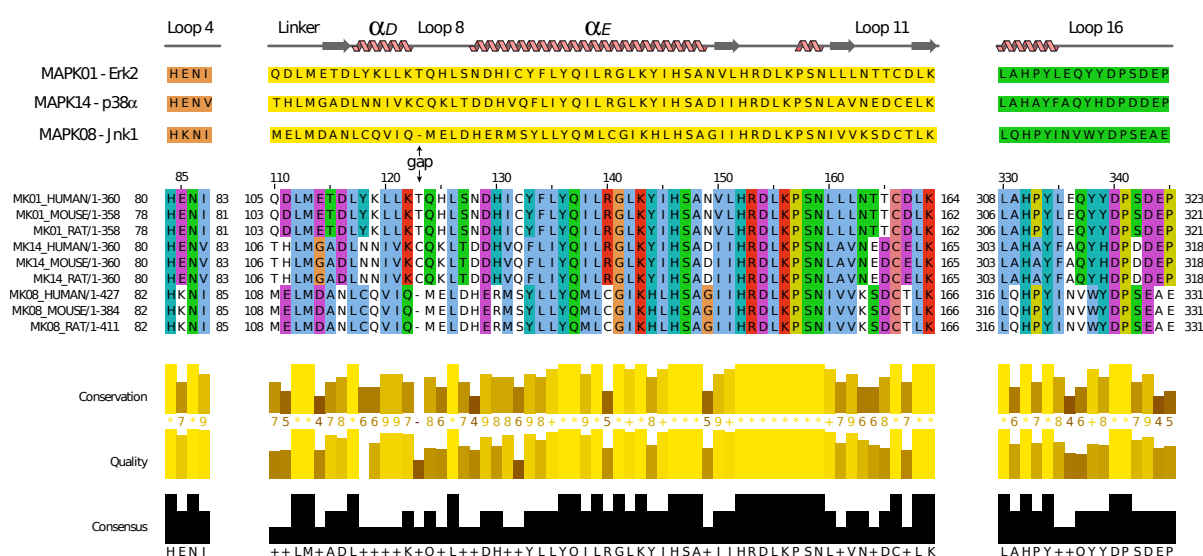


Figura 4.4: Alineamiento de secuencias del sitio de unión de MAPKs. Se alineo secuencias de ratón y humanas del segmento que conforma el sitio de docking para las tres vías de señalización más importante en humanos

que describa cuando afecta la mutante a la unión del mismo a la MAPKs.

Validación del protocolo con datos experimentales

Diversos trabajos entre 2002 y 2003 empezaban a esbozar y explicar los elementos importante para la unión de péptidos sobre MAPKs. La proteína de andamiaje JIP1 (JNK-

Tabla 4.1: Cristales disponibles de complejos MAPK-péptido utilizados

Complejo MAPK	PDBid	Organismo	Orientación	Res Å
ERK2:				
ERK2:MKP3	2FYS	Rata	N→C	2.50
ERK2:HePTP	2GPH	Rata	N→C	1.90
ERK2:DCC	3O71	Rata	N→C	1.95
ERK2:RSK1	3TEI	Humana	C→N	2.40
ERK2:MEK2	4H3Q	Humana	N→C	2.20
ERK2:MNK1	2Y9Q	Humana	C→N	1.55
p38:				
p38 α :MEF2A	1LEW	Ratón	N→C	2.30
p38 α :MKK3b	1LEZ	Ratón	N→C	2.30
p38 α :MK2	2OKR	Humana	C→N	2.00
p38 α :TAB1	4KA3	Ratón	N→C	2.71
JNK:				
JNK1:JIP1	1UKH	Humana	N→C	2.35
JNK1:NFAT4	2XRW	Humana	N→C	1.33
JNK1:NFAT4	2XS0	Humana	N→C	2.60
JNK3:SAB	4H3B	Humana	N→C	2.08

interacting protein-1) fue descubierta, cuando péptidos derivados de su secuencia, presentaban un efecto inhibitorio sobre la actividad quinasa de JNK1 (Dickens et al., 1997). Luego, con el objetivo de determinar las bases estructurales de dicha inhibición, mediante ensayos de *alanine scanning* se midió actividad quinasa (*in-vitro*) sobre todas las mutantes del péptido derivado de JIP1 con el objetivo de determinar los puntos claves responsable del reconocimiento proteína-proteína (Barr, Kendrick, & Bogoyevitch, 2002). La figura 4.5A panel inferior, muestra los datos experimentales que destacan la importancia de 4 residuos R156, P167, L160 y L162 de lo que hoy sabemos son el ψ , ϕ L, ϕ A y ϕ B respectivamente. Por ende, para éste sistema (Heo et al., 2004) se tomó el complejo JNK1:JIP1 y se computó el cociente de afinidad derivado de las energías de interacción, como describe la ecuación 4.2. El panel superior de la figura 4.5A muestra que las "energías" computadas siguen la tendencia correcta, mostrando que dichas posiciones son las importante para el anclado del péptido en su sitio. El ensayo experimental, mide inhibición de actividad enzimática, es decir la unión del péptido mutante se evalúa "indirectamente" por competencia. Sin embargo, consideramos que los resultados *in-silico* señalan satisfactoriamente cuáles son las posiciones clave en el reconocimiento MAPK-péptido.

Con la misma metodología se estudió el complejo p38 α :MEF2A (Figura 4.5B). Se empleó el complejo cristalizado 1LEW (Chang et al., 2002). Los datos provenientes nuevamente de ensayos de actividad quinasa, muestra un residuo "ancla" que tiene un rol fundamental en el *binding* de este tipo de moléculas. El ϕ U, que en este caso, lo constituye el

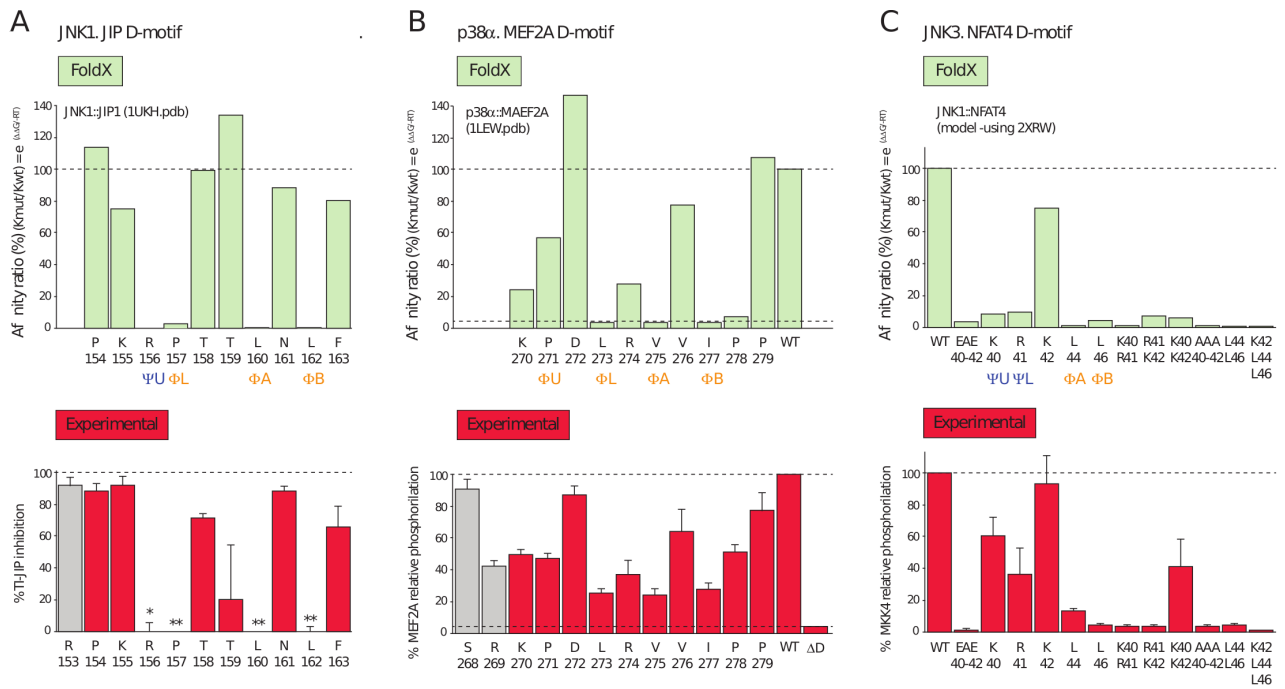


Figura 4.5: Alanine scanning sobre complejos p38α y JNK1,3. Comparación de afinidades relativas computadas utilizando el programa FoldX(verde) y resultados experimentales (rojo) para JNK1 (Barr, Kendrick, & Bogoyevitch, 2002) A), p38α (Barsyte-Lovejoy, Galanis, & Sharrocks, 2002) B) y JNK3 (Ho et al., 2003) C).

residuo P271, resulta importante tanto en los resultados computacionales como en los de actividad quinasa (Figura 4.5B).

En el análisis incluimos diferentes modos de *binding* de los péptidos, en la introducción se menciona la clasificación de los mismos. Los dos casos analizados previamente son péptidos lineales que se unen de manera extendida sobre la superficie del sitio de unión que responde a una familia grande que se denomina clase MEF2A y los péptidos de la clase JIP. Por consiguiente, la inclusión de un modo de *binding* con estructura secundaria, agrega robustez a los resultados. El complejo JNK3:NFAT4 estudiando en detalle experimentalmente y las energías computadas por foldX siguen la misma tendencia para las posiciones aminoacídicas importantes. Estos resultados reflejan que para complejos cristalizados, el campo de fuerzas de *FoldX* representa con precisión las posiciones claves del reconocimiento proteína-proteína.

Predicción del modo de unión para un péptido sin estructura conocida. Caso JNK:MKK4

Los resultados alentadores presentados en la sección previa nos llevó a preguntarnos si el FoldX es capaz de reproducir resultados experimentales cuando no tenemos un templado

4.2. RESULTADOS

para dicho complejo. MKK4 es una doble quinasa (MAP2K) que esta involucrada las vías de señalización de JNK y p38 (Figura 4.1) (Derijard et al., 1995). La promiscuidad de dicha enzima se observa en que péptidos derivados de su segmento de docking, unen con afinidades similares (3.5 y $3.8 \mu\text{M}$) a JNK y p38 α respectivamente (Garai et al., 2012). Desafortunadamente, intentos de cristalización para revelar las causales estructurales de dicha promiscuidad, resultaron negativos. Sin embargo, los autores proponen que el modo de unión a JNK1 es similar al observado para NFAT4 (Garai et al., 2012). Dos configuraciones diferentes de NFAT4 fueron obtenidas para la mismas condiciones de cristalización (Garai et al., 2012). Tomando cada una de ellas y mutando la secuencia por la de MKK4 obtuvimos resultados que son consistentes con datos experimentales ensayados previamente (Figura 4.6) (Ho et al., 2003). Las discrepancias entre los valores experimentales y los computados están principalmente en el residuo R41.

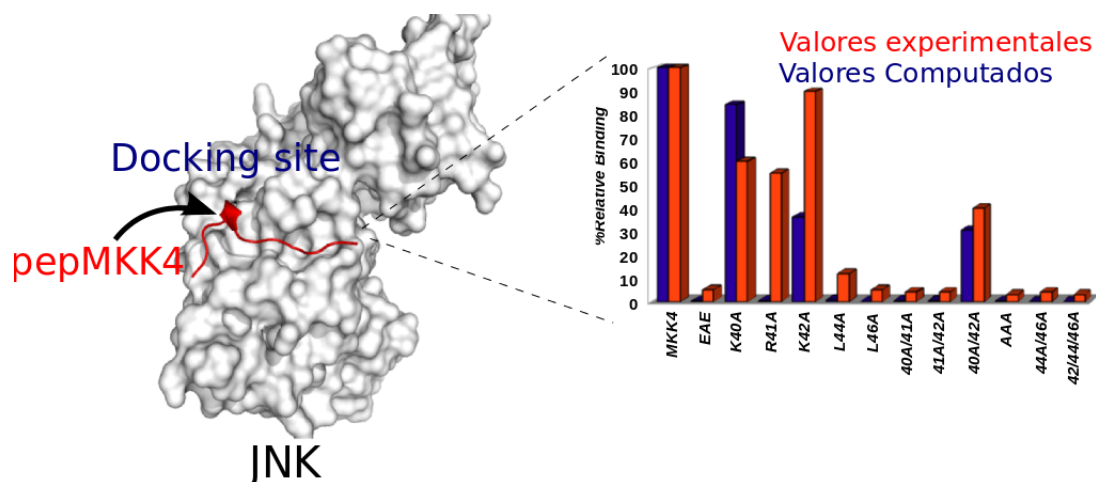


Figura 4.6: MKK4 tiene un modo de unión similar a NFAT4 Usando como templado el cristal 2XRW los valores de unión se corresponden con los obtenidos experimentalmente (Ho et al., 2003)

Φ A es el más importante para el *binding*.

Los experimentos previos nos brindan información valiosa acerca de cuáles son los residuos clave en el reconocimiento de las MAPKs sobre sus sustratos. Sin embargo nada nos dice acerca de cual es la contribución de cada posición a la energía de unión total. A partir de los primeros trabajos pioneros de "alanine scanning" sobre estos familia de péptidos derivados, sólo se había identificado dos residuos hidrofóbicos (ϕ A y ϕ B) y uno de naturaleza polar (residuos ARG o LYS ψ). Con esto en mente, evaluamos cuál es la contribución del ϕ A y ϕ B a la energía total de interacción (tabla 4.2). Observamos que el que más contribuye a la energía de unión es el ϕ A. El conjunto de resultados hasta el momento demuestra que con

Tabla 4.2: Contribución a la energía total de unión del motivo $\phi A, \phi B$ (% porcentaje de unión)

Peptido	ϕA	ϕB
MKK4	34	6
MKK7	28	21
NFAT	26	20
HePTP	35	1
MEK2	36	15
MKK3	45	28
MKK6	35	22
MEF2A	24	21

un abordaje sencillo hemos podido tanto reproducir resultados experimentales complejos como así identificar determinantes moleculares más relevantes para la unión. Finalmente nos permite modelar estructuras que no se pudieron cristalizar y validarlas con resultados experimentales.

4.2.2 Diseño de péptidos inhibidores.

El control de muchos sistemas biológicos radica en la fosforilación de sustratos y activadores por ser/thr quinasas, esto hace de éstas un blanco farmacológico tentador. La inhibición de la actividad quinasa puede ser lograda bloqueando el proceso catalítico, como por ejemplo con un inhibidor competitivo de ATP o impidiendo que el complejo enzima-sustrato se forme. Por ende, dada la buena cantidad de datos en torno unión de péptidos que se une a MAPKs, el desarrollo y el diseño de inhibidores específicos se convirtió en una estrategia novedosa de programas de descubrimiento de fármacos y péptidos inhibidores de la actividad enzimática (Eldar-Finkelman, & Eisenstein, 2009; Kaoud et al., 2011; Kelemen, Hsiao, & Goueli, 2002).

A continuación nos preguntamos si era posible la mejora de la unión de péptidos a las MAPKs. El sistema a evaluar fue p38 α y el péptido derivado de sustrato, MEF2A. Se eligió este sistema, puesto que el péptido adopta una conformación extendida sobre el sitio de unión y había sido caracterizado anteriormente (Barsyte-Lovejoy, Galanis, & Sharrocks, 2002). Evaluamos las 20 posibles mutantes para cada posición a lo largo de la secuencia (Figura 4.7). Y obtuvimos la matriz de 20x10 de las 20 posibles mutantes para las 10 posiciones (Figura 4.8C). La ventaja de este enfoque surge de que rápidamente podemos evaluar 200 cambios aminoacídicos para la secuencia MEF2A.

Figura 4.8C muestra que las posiciones hidrofóbicas reportadas anteriormente presentan una preferencia del aminoácido metionina y leucina para cada ancla por sobre la

4.2. RESULTADOS

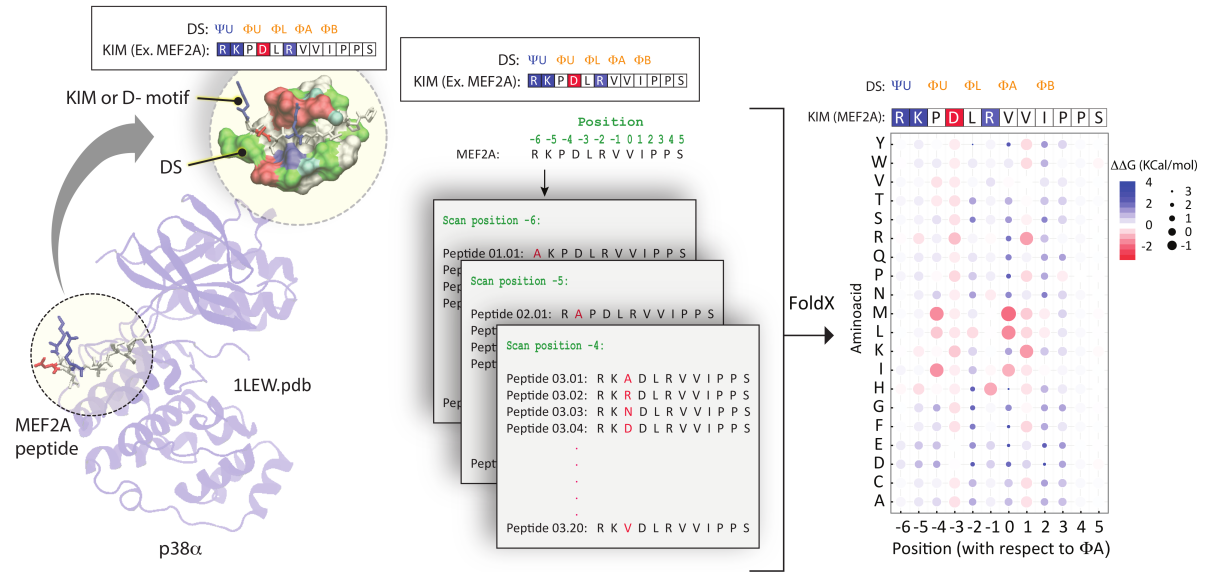


Figura 4.7: Pipeline de mutaciones sobre el complejo MAPK:péptido. Sobre cada posición de la secuencia polipeptídica se mutó por los 20 aminoácidos obteniendo una matriz de 20xN, donde N es el largo de la secuencia polipeptídica. Sobre cada mutante se computó la " $\Delta\Delta G$ " de la energía de interacción con el software *FoldX*.

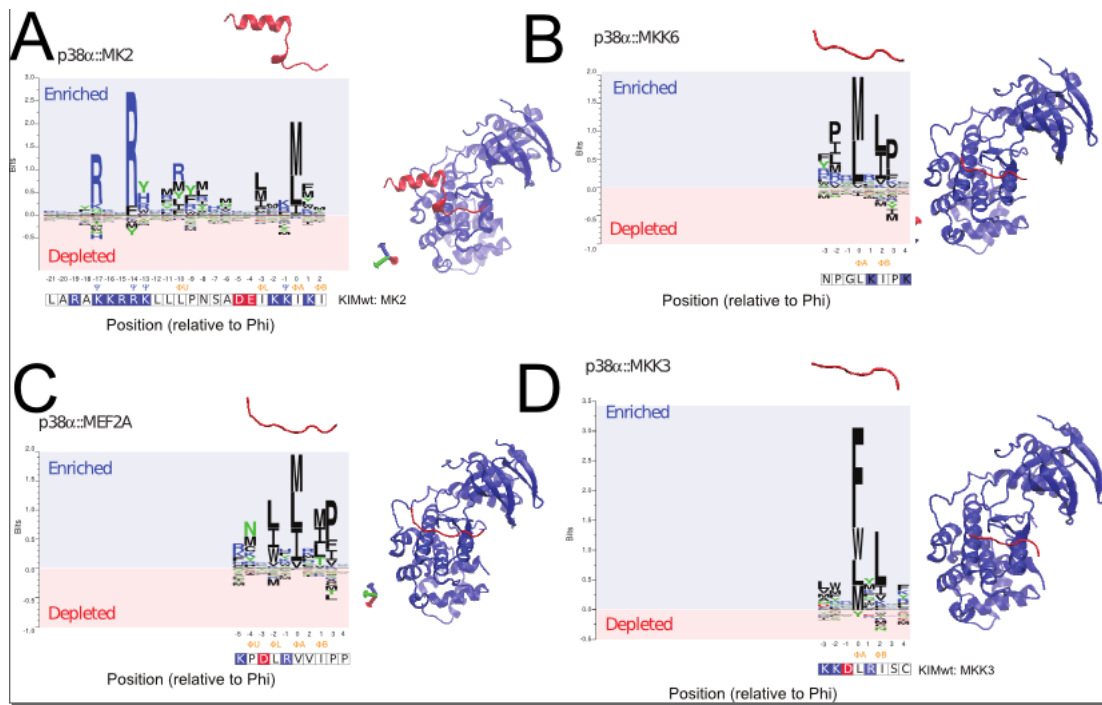


Figura 4.8: Logos p38α La activación por fosforilación promueve el movimiento interdominio, formación del puente salino, apropiada coordinación del ATP. Magenta y verde para el estado 0P-ERK2 y 2P-ERK2 respectivamente.

secuencia original, y además en la posición $\phi A+1$ el residuo prolina. Estos resultados son consistentes con el *logo* (Figura 4.9) obtenido a partir de una matriz PSSM de todos los genes ortólogos de MEF2A de vertebrados (Zeke et al., 2015). Sin embargo, desafortunadamente tanto el *logo* obtenido mediante secuencias alineadas y el *logo* energético no muestran posiciones mas allá de las reportadas anteriormente con vistas a una posible

mejora en la unión de esta familia de péptidos. Extendiendo el análisis a otros complejos que posean otros modos de unión sobre la MAPK p38 α (Figura 4.8A-D) vimos un comportamiento similar. Un análisis más extenso de los resultados y la validación experimental de los mismos, permitirán avanzar en el desarrollo de péptidos inhibidores que presenten una mejor potencia y/o selectividad frente a este blanco molecular.

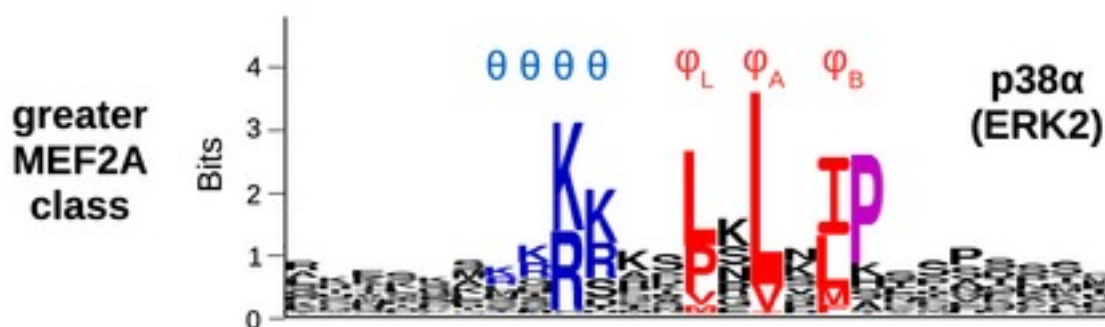


Figura 4.9: Position-specific scoring matrix (PSSM) logos. Logos "evolucionario" PSSM para p38 α :MEF2A. Adaptado de Zeke et al., 2015

4.2.3 Comparación entre las matrices obtenidas a través de cristales vs dinámica.

El campo de fuerzas de FoldX fue entrenado con datos de más de ~1000 mutantes puntuales (Schymkowitz et al., 2005). Sorprendentemente, los resultados expuestos hasta el momento muestran que cuando contamos con información precisa de la posición "correcta" del esqueleto carbonado sobre el receptor, los resultados obtenidos van en la tendencia correcta. En el caso de MKK4 proponemos que el modo de unión de éste péptido con JNK es similar al observado por NFAT4. Sin embargo los mismos autores que intentaron cristalizarlo, proponen además que el péptido derivado de MKK4 acomplejado con p38 α adopta una configuración semejante a MKK6 (Garai et al., 2012).

No siempre podremos contar con la información del modo de unión o la configuración final del complejo. Si bien el sistema de estudio presenta un número acotado de residuos que funcionan como anclas, la variación conformacional observada es grande. Para sobrellevar este inconveniente el modelado comparativo y la utilización de campos de fuerza de grano grueso, podrían ayudar a contar con un complejo de partida. Sin embargo la estructura obtenida por estas herramientas muchas veces dista del que observaríamos en solución o acomplejada. Eso nos llevó a preguntarnos si es posible "relajar" el complejo obtenido con dinámica molecular y si esto podría salvaguardarnos del problema del "complejo ini-

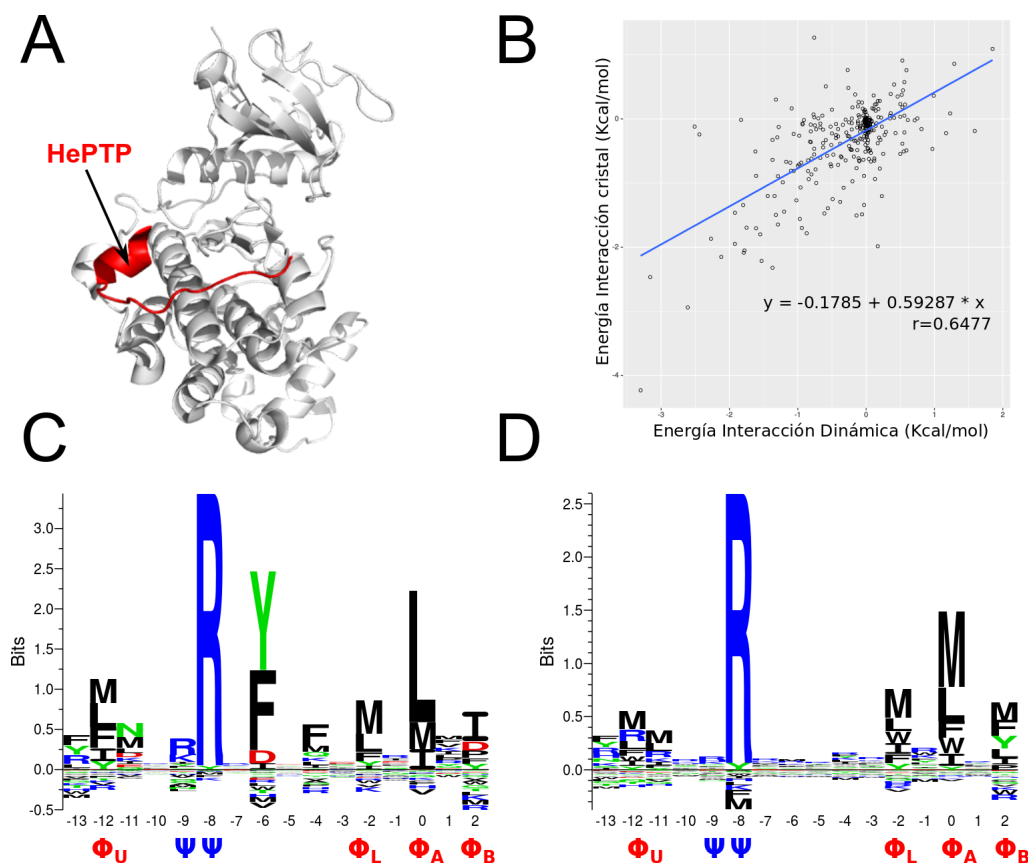


Figura 4.10: La dinámica molecular muestra. A) Vision general del modo de unión de HePTP. B) regresión lineal, energía de interacción para la matriz de mutantes obtenida a partir del cristal vs matriz obtenida por dinámica molecular. C) Logo "energético" para pepHePTP derivado del cristal D) idem C para la matriz obtenida por dinámica molecular

cial", o simplemente obtener, una mejor representación de nuestro sistema. Esto nos llevó a ensayar el desempeño de FoldX pero sobre fotos obtenidas por dinámica molecular. A continuación seleccionamos un modelo que tenga en cuenta todas las anclas conocidas hasta el momento y que la orientación del modo de unión sea N→C. HePTP es una fosfatasa de ERK2 (Figura 4.1) que tiene todos los sitios hidrofóbicos y los polares, además cuenta con una estructura cristalográfica acompañada con ERK2, bajo el pdbID 2GPH. 50 ns de dinámica molecular del complejo, permitieron obtener un ensamble conformacional del mismo. Alrededor de 60 de fotos fueron mutadas por los 20 residuos y se obtuvo el valor promedio de energía para cada posición. Como resultado se observó un coeficiente de correlación ($r=0.64$) entre los datos de energía de interacción de la matriz obtenida a partir del cristal y los datos obtenidos del ensamble conformacional por dinámica molecular (Figura 4.10B). A pesar de ello, el logo "energético" obtenido a partir de energías de interacción del cristal y por dinámica molecular señalan los mismo "hot spots". Es más, el logo obtenido a partir de los datos de dinámica molecular "destacan" las posiciones importantes de la secuencia estudiada. Es decir, teniendo un ensamble de conformacional de nuestro péptido

de interés, el campo de fuerzas de FoldX es capaz de "identificar" los residuos importantes que serian responsables del *binding* del péptido en cuestión, disminuyendo el "ruido" en las posiciones adyacentes. En este sentido la posición -5 desaparece como específica en la dinámica molecular, determinando que si tenemos en cuenta la libertad conformacional podemos tener una mejor estimación de la especificidad por residuo.

4.3 Conclusiones

Uno de los eventos más importantes en el ciclo catalítico de cualquier enzima lo constituye el reconocimiento de su sustrato. Las MAPKs presentan baja selectividad en su sitio activo, esto se debe a que los péptidos que fosforilan, solo necesitan el motivo ser/thr seguido de prolina (Gonzalez, Raden, & Davis, 1991; Alvarez et al., 1991). Por ende, este tipo de moléculas explota sitios distales donde los activadores o sustratos se unen de manera específica alcanzando el complejo ternario necesario para que el proceso de catalítico continúe apropiadamente (Peti, & Page, 2013). El evento de reconocimiento en este sistema se da a partir de motivos nativamente desestructurados (péptidos KIM) que muy a menudo adoptan su estructura secundaria cuando entran en "contacto" con la quinasa. El motivo que contienen es el $(R/K_{2-3})-X_{2-6}-\Phi_A-X-\Phi_B$ donde Φ es un residuo hidrofóbico (T. Lee et al., 2004; Sharrocks, Shen-His Yang, & Galanis, 2000).

En el presente capítulo empleamos una metodología rápida y sencilla a fin de dar una explicación atomística a los motivos estructurales del reconocimiento de MAPKs por sus ligandos. Con los acotados datos experimentales con los que contamos, validamos que FoldX reproduce y destaca las posiciones importantes en el *binding* de las diferentes familias de péptidos. A continuación demostramos para MKK4, que incluso si carecemos de una estructura cristalográfica para hacer la evaluación energética, podemos predecir la configuración espacial del esqueleto carbonado y con este dato determinar los "hot spots" importantes para el proceso de unión. Por ultimo, observamos cuál es la contribución de cada residuo al *binding* y nuestro aporte señala que el diseño de ligandos tipo droga debería dirigirse al bolsillo hidrofóbico denominado ϕA , puesto que este sitio aporta mas del 30% a la energía total de unión. Debido a la limitaciones metodológicas del protocolo empleado, la cadena principal del péptido debe estar correctamente posicionada. Sorprendentemente si utilizamos un ensamble conformacional y lo comparamos a los resultados provenientes de una foto estática del cristal, observamos que el logo derivado de energías de interacción provenientes de dinámica molecular destaca de mejor manera los puntos clave o anclas

que son fundamentales para que el péptido permanezca en su sitio.

Estos resultados resultan alentadores pero cabe destacar que constituyen un análisis preliminar. El motivo de la especificidad de cada vía de señalización aún permanece como materia de debate y la complejidad del sistema aumenta con los grados de libertad aportados por la variación conformacional de los péptidos que se unen a la MAPK. Como discutidos anteriormente tal vez la inclusión de segmentos cercanos a los evaluados en este apartado arrojen luz acerca de la especificidad en el reconocimiento por parte de estas moléculas (Francis et al., 2011)

4.4 Materiales y métodos

Estructuras Iniciales. Las estructuras iniciales de los complejos ensayados (Tabla 4.1) se obtuvieron de la base de datos *Protein Data Bank*. Para cada cristal se definió a la MAPKs como receptor y el péptido como ligando. En ocasiones el complejo puede presentar diferencias con respecto a la secuencia original depositada en Uniprot, esto se debe a que algunas mutantes estabilizan o mejoran las condiciones para la obtención de cristales o aumentan la resolución del mismo. Por ende, para cada receptor se evaluó que el mismo, no presente mutaciones con respecto a la secuencia original, lo mismo se realizó para el ligando o péptido.

Parámetros de la simulación clásica de complejos MAPK-péptido . Todas las simulaciones clásicas han sido realizadas empleando el paquete AMBER12 (Case et al., n.d.) y de manera análoga a lo descrito en capítulos anteriores y en la sección materiales y métodos. Los complejos iniciales fueron solvatados con moléculas TIP3P en una caja octaédrica truncada hasta 12 Å desde el borde de la misma (Price, & Brooks III, 2004). Los residuos estándar fueron representados usando el campo de fuerza 99SB de amber. La dinámica de producción alcanzó los 50ns para cada complejo.

Protocolo de FoldX. En la sección general de Materiales y métodos se explica los detalles de la implementación del campo de fuerzas de FoldX. Sin embargo, en este apartado explicaremos los parametros empleados para la evaluación de los complejos de MAPKs (Diagrama de flujo 4.11). Brevemente, para cada complejo evaluado se obtuvo el complejo minimizado según el campo de fuerzas de *FoldX* con el empleo de la rutina *Repair-PDB*. A continuación cada complejo y en particular cada péptido se mutó cada posición aminoacídica a los 20 aminoácidos posibles con el módulo denominado *BuildModel*. A fin de evitar caer en un mínimo local en el esquema de minimización, en la construcción de

los modelos, 5 *runs* fueron ensayados para cada mutante. Por último se estimó la "energía" de unión entre el péptido y la MAPK para los complejos wild type (WT) y los mutantes con la herramienta que calcula la energía de interacción entre elementos de un complejo proteico. El valor informado es el promedio para los 5 replicas.

Ecuaciones y relaciones utilizadas en el presente trabajo: El cambio en la energía de interacción para una mutante se computó como:

$$\Delta\Delta G = \Delta G_{mut} - \Delta G_{wt} \quad (4.1)$$

donde mut es la mutante y wt: es la secuencia original o *wild type*

El cociente de afinidades entre un péptido mutante y uno WT se computó como:

$$AffinityRatio(K_{mut}/K_{wt}) = e^{-\frac{\Delta\Delta G}{RT}} \quad (4.2)$$

donde R = cte universal de los gases y T la temperatura en K.

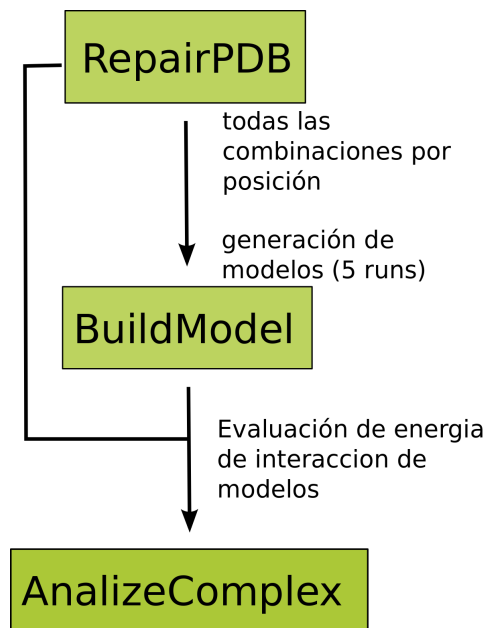


Figura 4.11: Diagrama de flujo del uso de los diferentes comandos de FoldX

Los *logos* fueron obtenidos con el servidor Seq2Logo-2.0 (Thomsen, & Nielsen, 2012) a partir de las matrices de probabilidad derivadas de energías de interacción. La probabilidad sobre cada posición *i*, para cada mutante *m*, fue calculada como:

$$p_{i,m} = \frac{e^{-\frac{\Delta\Delta G_{i,m}}{RT}}}{\sum_{m=1}^{20} p_{i,m}} \quad (4.3)$$

Bibliografía

- Alvarez, Elvira et al. (1991). "Pro-Leu-Ser/Thr-Pro is a consensus primary sequence for substrate protein phosphorylation. Characterization of the phosphorylation of c-myc and c-jun proteins by an epidermal growth factor receptor threonine 669 protein kinase." In: *Journal of Biological Chemistry* 266.23, pp. 15277–15285.
- Bardwell, A Jane, Erlynn Frankson, & Lee Bardwell (2009). "Selectivity of docking sites in MAPK kinases". In: *Journal of Biological Chemistry* 284.19, pp. 13165–13173.
- Barr, Renae K, Tulene S Kendrick, & Marie A Bogoyevitch (2002). "Identification of the critical features of a small peptide inhibitor of JNK activity". In: *Journal of Biological Chemistry* 277.13, pp. 10987–10997.
- Barsyte-Lovejoy, Dalia, Alex Galanis, & Andrew D Sharrocks (2002). "Specificity determinants in MAPK signaling to transcription factors". In: *Journal of Biological Chemistry* 277.12, pp. 9896–9903.
- Case, DA et al. "AMBER 12; University of California: San Francisco, 2012". In: *There is no corresponding record for this reference*.
- Chang, Chung-I et al. (2002). "Crystal structures of MAP kinase p38 complexed to the docking sites on its nuclear substrate MEF2A and activator MKK3b". In: *Molecular cell* 9.6, pp. 1241–1249.
- Derijard, Benoit et al. (1995). "Independent human MAP kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms". In: *Science* 267.5198, p. 682.
- Dickens, Martin et al. (1997). "A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway". In: *Science* 277.5326, pp. 693–696.
- Eldar-Finkelman, Hagit, & Miriam Eisenstein (2009). "Peptide inhibitors targeting protein kinases". In: *Current pharmaceutical design* 15.21, pp. 2463–2470.
- Francis, Dana M et al. (2011). "Resting and active states of the ERK2: HePTP complex". In: *Journal of the American Chemical Society* 133.43, pp. 17138–17141.
- Garai, Ágnes et al. (2012). "Specificity of linear motifs that bind to a common mitogen-activated protein kinase docking groove". In: *Science signaling* 5.245, ra74.

- Gonzalez, Fernando A, David L Raden, & Roger J Davis (1991). "Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases." In: *Journal of Biological Chemistry* 266.33, pp. 22159–22163.
- Hendriks, Wiljan et al. (1995). "A novel receptor-type protein tyrosine phosphatase with a single catalytic domain is specifically expressed in mouse brain". In: *Biochemical Journal* 305.2, pp. 499–504.
- Heo, Yong-Seok et al. (2004). "Structural basis for the selective inhibition of JNK1 by the scaffolding protein JIP1 and SP600125". In: *The EMBO journal* 23.11, pp. 2185–2195.
- Hill, Justine M et al. (2002). "Recognition of ERK MAP kinase by PEA-15 reveals a common docking site within the death domain and death effector domain". In: *The EMBO journal* 21.23, pp. 6494–6504.
- Ho, David T et al. (2003). "A docking site in MKK4 mediates high affinity binding to JNK MAPKs and competes with similar docking sites in JNK substrates". In: *Journal of Biological Chemistry* 278.35, pp. 32662–32672.
- Kaoud, Tamer S et al. (2011). "Development of JNK2-selective peptide inhibitors that inhibit breast cancer cell migration". In: *ACS chemical biology* 6.6, pp. 658–666.
- Kelemen, Bradley R, Kevin Hsiao, & Said A Goueli (2002). "Selective in vivo inhibition of mitogen-activated protein kinase activation using cell-permeable peptides". In: *Journal of Biological Chemistry* 277.10, pp. 8741–8748.
- Kelkar, Nyaya, Claire L Standen, & Roger J Davis (2005). "Role of the JIP4 scaffold protein in the regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways". In: *Molecular and cellular biology* 25.7, pp. 2733–2743.
- Laughlin, John D et al. (2012). "Structural mechanisms of allostery and autoinhibition in JNK family kinases". In: *Structure* 20.12, pp. 2174–2184.
- Lee, Thomas et al. (2004). "Docking motif interactions in MAP kinases revealed by hydrogen exchange mass spectrometry". In: *Molecular cell* 14.1, pp. 43–55.
- Lombroso, Paul J, Geoffrey Murdoch, & Michael Lerner (1991). "Molecular characterization of a protein-tyrosine-phosphatase enriched in striatum." In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88.16, pp. 7242–7246.
- Peti, Wolfgang, & Rebecca Page (2013). "Molecular basis of MAP kinase regulation". In: *Protein science* 22.12, pp. 1698–1710.

- Price, Daniel J, & Charles L Brooks III (2004). "A modified TIP3P water potential for simulation with Ewald summation". In: *The Journal of chemical physics* 121.20, pp. 10096–10103.
- Schymkowitz, Joost WH et al. (2005). "Prediction of water and metal binding sites and their affinities by using the Fold-X force field". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102.29, pp. 10147–10152.
- Sharrocks, Andrew D, Shen-His Yang, & Alex Galanis (2000). "Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases". In: *Trends in biochemical sciences* 25.9, pp. 448–453.
- Smith, Jeffrey A et al. (1999). "Identification of an extracellular signal-regulated kinase (ERK) docking site in ribosomal S6 kinase, a sequence critical for activation by ERK in vivo". In: *Journal of Biological Chemistry* 274.5, pp. 2893–2898.
- Tárrega, Céline et al. (2002). "Two clusters of residues at the docking groove of mitogen-activated protein kinases differentially mediate their functional interaction with the tyrosine phosphatases PTP-SL and STEP". In: *Journal of Biological Chemistry* 277.4, pp. 2629–2636.
- Thomsen, Martin Christen Frølund, & Morten Nielsen (2012). "Seq2Logo: a method for construction and visualization of amino acid binding motifs and sequence profiles including sequence weighting, pseudo counts and two-sided representation of amino acid enrichment and depletion". In: *Nucleic acids research* 40.W1, W281–W287.
- Whitmarsh, Alan J et al. (1998). "A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation". In: *Science* 281.5383, pp. 1671–1674.
- Yang, Shen-Hsi, Alex Galanis, & Andrew D Sharrocks (1999). "Targeting of p38 mitogen-activated protein kinases to MEF2 transcription factors". In: *Molecular and Cellular Biology* 19.6, pp. 4028–4038.
- Zanke, Brent et al. (1992). "Cloning and expression of an inducible lymphoid-specific, protein tyrosine phosphatase (HePTPase)". In: *European journal of immunology* 22.1, pp. 235–239.
- Zeke, András et al. (2015). "Systematic discovery of linear binding motifs targeting an ancient protein interaction surface on MAP kinases". In: *Molecular systems biology* 11.11, p. 837.

CAPÍTULO 5

Conclusiones generales y perspectivas.

5.1 Conclusiones

Los objetivos señalados en la introducción de la presente tesis, incluyen la comprensión de la activación de proteínas quinasa, componentes fundamentales del proceso de señalización intracelular. La estrategia utilizada incluyó un abordaje bioinformático estructural a fin de describir los elementos importantes en el proceso de activación. El primer objetivo propuesto, donde buscábamos una descripción atomística del proceso de activación, se realizó en dos sistemas distintos: quinasas humanas (MAPKs) y quinasas procariotas pertenecientes a *Mycobacterium tuberculosis*. Para ello, se hizo un amplio uso de las herramientas de bioinformática estructural disponibles, como dinámica molecular, *docking*, mutagénesis *in-silico*, etc. La selección de ambas enzimas responde a que dichas moléculas son muy importantes en el contexto celular en el que se encuentran. En el caso de las MAPKs son importantes elementos del sistema de transducción de señales humano y están asociadas a diversas patologías como cáncer, diabetes, etc (Schaeffer, & Weber, 1999; Davis, 2000; Kyriakis, & Avruch, 2001; Pearson et al., 2001; Zarubin, & Jiahuai, 2005). Mientras que *Mycobacterium tuberculosis* es un microorganismo de gran importancia sanitaria puesto que es agente etiológico de la tuberculosis, entonces entender los mecanismos de la regulación de proteínas que permiten la sobrevivencia de *Mtb* dentro del hospedador son de vital importancia (Woods, & Washington, 1987; Leonard, Aravind, & Koonin, 1998). A pesar de todo el esfuerzo empleado por la comunidad científica por comprender a este tipo de moléculas, aún hoy en día es poco claro, cómo las ser/thr quinasas se activan por señales externas a nivel atomístico.

Comenzamos la disertación describiendo la activación de la MAPK ERK2. Encontramos que los cambios conformacionales que sufre en el proceso de activación son sutiles. En

dicha descripción destacamos el rol del puente salino entre la lys⁵² y el glu⁶⁹ que está descrito en decenas de trabajos como esencial, y que hasta el momento carecía de una explicación atomística de cuál sería el aporte de la formación del mismo, en torno al proceso catalítico. El movimiento interdominio de rotación entre el N-terminal y el C-terminal de ERK2 producto de la activación, promueve la estabilización de la α C posicionando y/o reacomodando residuos claves para la catálisis, así como el cierre del bolsillo de unión a ATP. Mediante técnicas de simulación computacional exploramos que el estado activo promueve la formación del puente salino, y éste resulta ser crucial para la estabilización del sitio de unión para el Mg⁺². I. Empleando un esquema QM-MM demostramos que la coordinación susceptible para el ataque nucleofílico es que la contiene 2 iones Mg⁺² y entonces la barrera depende fuertemente de la presencia de este segundo magnesio. En conclusión, para la MAPK ERK2 observamos una estrecha relación entre la presencia de un segundo ion magnesio en el sitio activo, y la formación del puente salino, para que el proceso de transferencia de fosfatos se lleve a cabo correctamente. En este sentido la fosforilación en el loop de activación produce un cambio sutil en la conformación del dominio quinasa que estabiliza la formación de un puente salino que regula la actividad catalítica de ERK2.

El capítulo 4 estudiamos dos ser/thr quinasas de *Mycobacterium tuberculosis*. PknB y pknG son dos quinasas procariotas que tienen diferentes mecanismos de activación. A pesar de su origen, desde el punto de vista estructural son muy parecidas a las eucariotas estudiadas anteriormente. Sin embargo presentan algunas particularidades, pknG no se fosforila en el *loop* de activación y carece del residuo arginina del *loop* catalítico conocido como motivo RD. A pesar de ello, el mecanismo de reacción está conservado, y para dicho proceso prescinde del residuo glu¹⁸¹ emplazado en la α C. Este resultado sugiere que el residuo realmente importante es la arg del puente salino, ya que éste regula la posición del ATP, y que pknG utiliza otra alternativa para estabilizar el mismo en su sitio. Por otra parte, pknB para alcanzar el estado reactivo necesita dimerizar y estabilizar la interfaz β 4- α C, creemos que este evento podría estar relacionado con el armado de la "columna" regulatoria, descrita en PKA (Kornev, & Taylor, 2010; Meharena et al., 2013). Una vez alcanzada la conformación "activa" para ambas proteínas evaluamos el perfil de energía, mostrando que ambas poseen un mecanismo canónico con cierto carácter asociativo.

Para concluir y abordar todos los aspectos de ciclo catalítico enzimático de esta familia de proteínas, estudiamos cómo es que reconocen a sus sustratos. En primer lugar explicamos la selectividad diferencial por parte de pknG y pknB del sitio de fosforilación de

su sustrato garA. En el capítulo 3 demostramos con métodos computacionales y experimentos, que el N-terminal tiene un rol importante en la selectividad. Desde el punto de vista de la quinasa, pknG no se fosforila en el *loop* de activación pero presenta un "bolsillo" hidrofóbico que ancla residuos de la misma naturaleza química pertenecientes a garA (val²⁴ y phe²⁵). Por otra parte pknB explota los residuos fosforilables del segmento de activación (pthr) para interactuar con el residuo arg²⁶ de garA. Estos resultados demuestran porqué pknG fosforila el residuo 21, mientras que pknB lo hace en el 22. Finalmente en el capítulo 4, estudiamos los sitios de unión proteína-proteína de la familia MAPK. El motivo que se une a este sitio distal de la proteína es (R/K₂₋₃)-X₂₋₆-Φ_A-X-Φ_B donde Φ es un residuo hidrofóbico (Lee et al., 2004; Sharrocks, Yang, & Galanis, 2000). La mayoría de las proteínas efectoras o regulatorias de MAPKs presentan sitios de *docking*. En este apartado vimos como empleando una metodología sencilla de mutantes puntuales *in silico* podemos describir cuales son los residuos importantes para la unión de estos péptidos desestructurados. Entre otras cosas podemos agregar que, la metodología reproduce a grandes rasgos resultados experimentales si podemos inferir su modo de unión. La robustez del método subyace en que incluso utilizando fotos de una dinámica molecular del complejo, el programa es capaz de identificar los puntos de anclaje importantes. Finalizando, del análisis se observa y se propone al Φ_A como uno de los sitios que más aporta al *binding*, y lo sugieren como un buen sitio para el desarrollo farmacológico. Cabe destacar que trabajos pioneros comenzaron desarrollos de inhibidores para este sitio en particular (Willemsen et al., 2014).

5.2 Perspectivas

Si bien hemos avanzado en la comprensión de los mecanismos de activación de un conjunto de proteínas quinasa, esta tesis deja abiertos nuevos interrogantes en torno a estas biomoléculas. Para cada una de las enzimas analizadas, podemos proponer ideas a ser evaluadas en un futuro próximo. En la tesis mostramos que para la MAPK ERK2 el puente salino es esencial para la estabilización del estado reactivo. Cabe destacar, que a pesar de la centena de trabajos en torno a esta enzima, cambios sutiles gobiernan el prendido y apagado de esta enzima, por consiguiente mutar el glutámico del famoso puente salino, es interesante a fin de apoyar o refutar nuestra hipótesis de trabajo. Sin embargo, dado la característica sutil del cambio no encontramos una mutación que pueda regenerar un estado constitutivamente activo.

Con respecto a la activación, a lo largo de la tesis señalamos que el fin ulterior del

cambio conformacional, es preparar el sitio activo para albergar el ATP en la configuración correcta, puesto que la fosforilación de sustratos es la actividad principal de este grupo enzimático. La utilización de motivos, dominios y/o fosforilaciones accesorias utilizadas por las quinasas, contribuyen a la regulación fina del proceso de activación. Además agregan complejidad al sistema, al presentar nuevos interactores y/o moduladores del mismo (Huse, & Kuriyan, 2002). Por ende, *pknG* surge como un sistema muy interesante, puesto que contiene un dominio rubredoxina adyacente al dominio quinasa (Figura 5.1), pero en este trabajo no evaluamos su injerencia en el proceso catalítico. La descripción de cómo un centro redox tiene efecto sobre la actividad quinasa contribuye a la descripción y pone de manifiesto la riqueza y diversidad disponible en este tipo de sistemas y hemos encarado su estudio en el grupo de investigación. Otro dominio del mismo gen del cual poco sabemos y al que se le atribuye la capacidad de mediar interacciones proteína-proteína es conocido como *TPR* (Figura 5.1). Diseñar inhibidores que actúen sobre la interfaz de interacciones proteína-proteína de este dominio, abre un nuevo abanico de compuestos líderes que podrían tener efecto bactericida/bacteriostático en *Mycobacterium tuberculosis*. El interrogante acerca de la selectividad de *pknG* y *pknB* frente a *garA* fue respondido parcialmente. Experimentos futuros incluirían mutantes y ensayos sobre *pknB* el cual ahora mismo no pudimos evaluar. En conclusión, esta tesis en la que se evaluaron 3 proteínas quinasas distintas, contribuye al entendimiento de cómo estos interruptores moleculares alcanzan su estado "activo"; y una vez allí, cómo es que reconocen y fosforilan a sus sustratos.

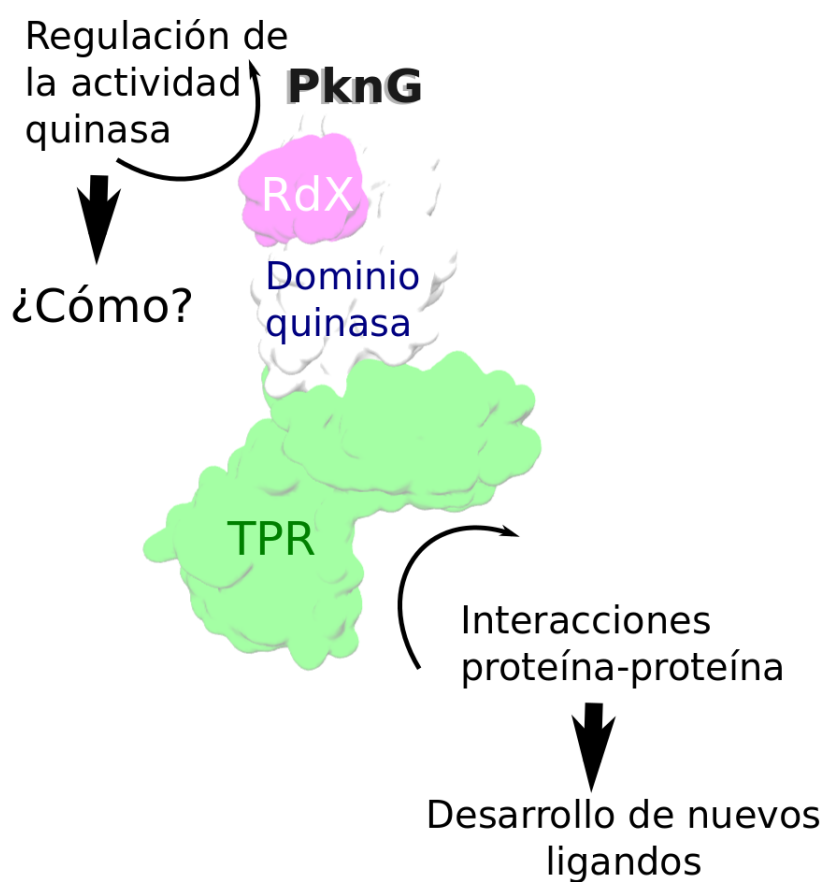


Figura 5.1: Disposición espacial/modular de dominios de pknG. PknG presenta un dominio rubredoxina (RBX, magenta) y otro TPR (tetratricopeptide repeat, verde) responsable de interacciones proteína-proteína.

Bibliografía

- Davis, Roger J (2000). "Signal transduction by the JNK group of MAP kinases". In: *Cell* 103.2, pp. 239–252.
- Huse, Morgan, & John Kuriyan (2002). "The conformational plasticity of protein kinases". In: *Cell* 109.3, pp. 275–282.
- Kornev, Alexandr P, & Susan S Taylor (2010). "Defining the conserved internal architecture of a protein kinase". In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1804.3, pp. 440–444.
- Kyriakis, John M, & Joseph Avruch (2001). "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation". In: *Physiological reviews* 81.2, pp. 807–869.
- Lee, Thomas et al. (2004). "Docking motif interactions in MAP kinases revealed by hydrogen exchange mass spectrometry". In: *Molecular cell* 14.1, pp. 43–55.
- Leonard, Christopher J, L Aravind, & Eugene V Koonin (1998). "Novel families of putative protein kinases in bacteria and archaea: evolution of the "eukaryotic" protein kinase superfamily". In: *Genome research* 8.10, pp. 1038–1047.
- Meharena, Hiruy S et al. (2013). "Deciphering the structural basis of eukaryotic protein kinase regulation". In: *PLoS Biol* 11.10, e1001680.
- Pearson, Gray et al. (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions 1". In: *Endocrine reviews* 22.2, pp. 153–183.
- Schaeffer, Hans J, & Michael J Weber (1999). "Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers". In: *Molecular and cellular biology* 19.4, pp. 2435–2444.
- Sharrocks, Andrew D, Shen-His Yang, & Alex Galanis (2000). "Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases". In: *Trends in biochemical sciences* 25.9, pp. 448–453.

- Willemsen, Hanneke LDM et al. (2014). "A novel p38 MAPK docking-groove-targeted compound is a potent inhibitor of inflammatory hyperalgesia". In: *Biochemical Journal* 459.3, pp. 427–439.
- Woods, Gail L, & John A Washington (1987). "Mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis*: review of microbiologic and clinical aspects". In: *Review of Infectious Diseases* 9.2, pp. 275–294.
- Zarubin, Tyler, & HAN Jiahuai (2005). "Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway". In: *Cell research* 15.1, pp. 11–18.

CAPÍTULO 6

Métodos computacionales

En esta capítulo se describirá brevemente los fundamentos teóricos a los métodos de Química Computacional utilizados en el presente documento. En cada capítulo se comentará en detalle los protocolos empleados para realizar las simulaciones. Pero a grandes rasgos se realizaron tres tipos de simulaciones: i) Dinámica molecular clásica , ii) Dinámica molecular híbrida (QM-MM) y iii) Evaluación de la "Energía" de unión proteína-proteína empleando el campo de fuerzas de *FoldX*. La dinámica molecular clásica se utilizó con dos propósitos: como herramienta para evaluar el ensamble conformacional de biomoléculas y a partir de dicho análisis, como base para los cálculos híbridos QM/MM. Por esta razón comenzaremos explicando esta familia de técnicas. Luego comentaremos los métodos cuánticos, en particular el hamiltoniano semi-empírico DFTB (Density Fuctional Tight Binding) que fue muy útil debido que posee una buena relación entre tiempo de computo empleado y *performance*. Por consiguiente, introduciremos las metodologías híbridas (QM-MM) que nos permitieron describir los mecanismos de reacción en grandes biomoléculas. Por último, brindaremos una descripción de los fundamentos del calculo de energía libre de unión del campo de fuerzas empírico de *Foldx*, que explicaremos en detalle en la última sección.

6.1 Dinámica molecular clásica

Muchos sistemas de interés en química y biología requieren del estudio molecular de sistemas de gran cantidad de átomos, como por ejemplo las proteínas. Para este tipo de sistemas resulta, aún con el poder computacional existente hoy en día, prácticamente imposible su tratamiento completo con mecánica cuántica. Es por esto que en gran cantidad de problemas en los que no se requiere un detalle de la distribución electrónica, se utilizan métodos basados en la mecánica clásica, lo que se denomina mecánica molecular (MM).

En estos métodos se ignora el movimiento de los electrones, y se calcula la energía exclusivamente en función de las posiciones de los núcleos. Sin embargo, la mecánica cuántica se utiliza para el desarrollo de los distintos parámetros requeridos para el cálculo, que se explicarán en la próxima sección.

6.1.1 Campos de fuerza clásicos

En los métodos de mecánica molecular, la energía potencial viene dada por lo que se denomina campo de fuerza, que no es más que una expresión de la energía potencial dependiente de las coordenadas de los núcleos y una serie de parámetros. La expresión del campo de fuerza AMBER 99SB (Hornak et al., 2006) - el cual fue utilizado para los cálculos realizados en este trabajo - contiene dos clases de contribuciones, las contribuciones de unión y las de no unión. Las de unión, se calculan para átomos formando un enlace o como máximo a 2 átomos de distancia, e incluyen penalidades para las desviaciones respecto de su valor de equilibrio de distancias de enlace, ángulos y ángulos diedros. Mientras que las dos primeras se representan a través de un potencial armónico centrado en la distancia de equilibrio, los ángulos diedros o torsiones están descriptos con una función periódica. Las contribuciones de no unión, se computan entre átomos que están en diferentes moléculas o a más de 4 enlaces de distancia, y se dividen en interacciones electrostáticas basadas en la ley de Coulomb, por un lado, y un potencial de Lennard-Jones, que describe en forma aproximada las interacciones dispersivas y la repulsión originada por el principio de exclusión de Pauli a distancias muy cortas. La expresión de la energía potencial resulta en el caso del campo de fuerzas AMBER utilizado en esta tesis en:

$$\begin{aligned}
 E(r^N) = & \sum_{\text{enlaces}} \frac{k_{b,i}}{2} (r_i - r_{i0}) + \sum_{\text{angulos}} \frac{k_{\theta,i}}{2} (\theta_i - \theta_{i0}) + \sum_{\text{torsiones}} \frac{V_n}{2} \cos(n\varpi - \gamma) + \\
 & \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N \left\{ \varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right\}
 \end{aligned} \tag{6.1}$$

Comprendamos en detalle cada una de las contribuciones al campo de fuerza clásico. El primer término modela la contribución de estiramiento de los enlaces, el cual se describe a través de un potencial armónico. En éste, $k_{b,i}$ corresponde a la constante de fuerza asociada a la unión i y r_{i0} a la distancia de equilibrio de la misma unión. Si bien una mejor descripción de un enlace químico se obtendría con un potencial como por ejemplo el sugerido por Morse, este contiene un parámetro adicional y no es tan comúnmente utilizado

en cálculos MM debido a su costo adicional. Por otra parte, el potencial armónico resulta una buena y sencilla aproximación al potencial real en la zona cercana al mínimo, donde no hay ruptura de enlaces. El segundo término corresponde a las contribuciones dadas por las flexiones angulares. Estas también se representan con un potencial armónico de constante $k_{\theta,i}$ y valor de equilibrio θ_0 . Normalmente, la energía requerida para modificar un ángulo es menor a la requerida para variar la distancia entre dos átomos, por lo que los valores de $k_{\theta,i}$ suelen ser menores que los de las constantes $k_{b,i}$. El término asociado a las torsiones o ángulos diedros presenta tres parámetros: V_n corresponde a la barrera energética asociada a la rotación entre dos mínimos sucesivos, n representa la multiplicidad del potencial, es decir indica el número de mínimos encontrados entre 0° y 360° , y por último γ , que corresponde a la fase de la función sinusoidal.

El último término de la ecuación 6.1 contiene las contribuciones de no unión, y depende de la distancia entre pares de átomos, r_{ij} . La primera parte, corresponde al potencial de Van der Waals, y contiene los parámetros ϵ_{ij} , asociado a la profundidad del pozo de energía, y σ_{ij} , correspondiente a la distancia entre los átomos correspondiente al mínimo de energía. La parte electrostática contiene como parámetros las cargas sobre los átomos q_i y q_j . En el campo de fuerzas de AMBER, la distribución de cargas es representada a través de cargas puntuales ubicadas en el centro de las coordenadas de cada átomo. Estas cargas se obtienen de manera de reproducir el potencial electrostático de la molécula, a partir de cálculos cuánticos. Los valores de las cargas parciales se realiza a través del computo de una grilla de potencial electrostático determinada utilizando un hamiltoniano cuántico (sea este Hartree-Fock/6-31G* o AM1-bcc) ajustando los valores de las cargas puntuales en dos pasos, obteniendo primero los valores de los heteroátomos y, restringiendo el valor de los heteroátomos al obtenido en el paso anterior, de los hidrógenos. (Bayly et al., 1993; Cieplak et al., 1995)

Para disminuir el costo computacional asociado a los términos de no unión, se utiliza un radio de corte, tal que para los átomos que se encuentran a una distancia mayor que este radio de corte estas interacciones no se computan. En el caso de las interacciones de Lennard-Jones, al ser de corto alcance, esto no genera un problema siempre que el radio de corte sea lo suficientemente grande. En el caso de las interacciones coulombicas, de mayor alcance, en los casos en que se utilizan condiciones periódicas de contorno en la simulación se utiliza una metodología denominada sumas de Ewald, un método originalmente desarrollado para el estudio de cristales iónicos, en su implementación denominada

Particle Mesh Ewald (PME)(Darden, York, & Pedersen, 1993; Salomon-Ferrer et al., 2013). Esta metodología se utiliza para calcular las interacciones electrostáticas totales entre los átomos presentes en cada celda unidad, de forma muy eficiente. La energía electrostática se calcula en dos partes: la primera parte, en la cual a las interacciones electrostáticas de corto alcance se calculan en el espacio real mientras que la segunda parte (en el espacio recíproco) se calcula utilizando la transformada de Fourier. Este procedimiento tiene como ventaja una convergencia mucha más rápida que utilizando cálculos de interacciones directas. De esta manera se logra tener en cuenta las interacciones electrostáticas de largo alcance más allá del radio de corte de las interacciones de no unión, en forma altamente eficiente.

Finalmente, puede observarse que la mera expresión de la energía potencial no es suficiente para definir un campo de fuerza. El campo de fuerzas es constituido además por la gran cantidad de parámetros asociados a cada uno de los sumandos en la energía potencial. Para el caso de simulación de proteínas, el campo de fuerza de AMBER contiene los parámetros asociados a los aminoácidos naturales presentes en la mayoría de las proteínas, en sus distintos estados de oxidación o protonación, cuando corresponda. En este contexto, puede hablarse de la transferibilidad del campo de fuerza. Es decir, el hecho de que el mismo conjunto de parámetros puede utilizarse para moléculas asociadas. Por ejemplo, los parámetros para un residuo de triptofano serán los mismos en todas las proteínas estudiadas, y no será necesaria su parametrización en cada proteína que se desee estudiar. En el campo de fuerza de AMBER, los átomos dentro de cada residuo reciben un nombre de átomo y un tipo de átomo. Los tipos de átomo permiten que no sea necesario incluir parámetros para cada átomo incluido en cada uno de los aminoácidos. Distintas especies pueden poseer el mismo tipo de átomo, y los parámetros asociados a las uniones, los ángulos y los diedros (los denominados parámetros de unión) se dan por tipo de átomo, en lugar de para cada átomo de cada residuo en particular. Si bien en el campo de fuerza se incluyen parámetros específicos para todos los aminoácidos naturales y otras moléculas comúnmente encontradas en los sistemas biológicos, para incluir modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, será necesario obtener los parámetros necesarios para realizar la simulación. El concepto de transferibilidad del campo de fuerza se utiliza a la hora de simular compuestos tipo droga y no tener que obtener de cero los parámetros de enlace (distancias de enlace, ángulos, diedros y ángulos impropios). En este trabajo utilizamos la estrategia desarrollada en el *Generalized AMBER Force Field* (GAFF).

Por último, cabe realizar un comentario especial referido a la forma de representación de las moléculas de agua en el campo de fuerza. La manera de describir las moléculas de agua representa un factor importante en el cálculo, dada la gran cantidad de moléculas de agua normalmente presentes en el sistema. En los cálculos realizados en este trabajo, se utilizó un modelo de agua simple denominado TIP3P. En los modelos de agua simples, cada molécula de agua se mantiene en una geometría rígida, y la interacción entre moléculas de agua se describe a través de interacciones Coulómbicas y de Lennard-Jones. En el modelo TIP3P se ubican tres cargas puntuales, una sobre cada átomo de la molécula. La carga negativa ubicada en el átomo de oxígeno es compensada por las cargas positivas en los átomos de hidrógeno. La distancia entre el oxígeno y los átomos de hidrógeno, así como el ángulo H-O-H se mantienen fijos (mediante el uso del algoritmo de SHAKE (SETTLE, 1992). Otros modelos de agua simples usualmente utilizados son por ejemplo el modelo SPC/2 o su actualización SPC/2, y el modelo TIP4P, que utiliza cuatro puntos en vez de tres para describir la distribución de cargas. Los valores de los parámetros asociados a los modelos de agua simples se desarrollan de forma de reproducir las propiedades del agua medidas experimentalmente como la densidad, la función de distribución radial, y otras propiedades fisicoquímicas. Como se tratan de modelos sencillos, existen gran cantidad de propiedades que no pueden ser descriptas. Existen modelos más complejos, como así también más costosos, que incluyen efectos de polarización, lo que resulta de importancia en sistemas donde se espera que el solvente experimente un efecto de polarización significativo por parte del resto del sistema.

6.1.2 Dinámica molecular

Hasta ahora hemos explicado como se construye el potencial clásico pero no como se calcula el movimiento ni que otros elementos son necesarios para realizar las simulaciones en fase condensada. Para realizar los movimientos en cada paso de integración (en nuestro caso 2 femtosegundos para dinámicas clásicas y 1 -0.5 fs. para los cálculos QM-MM) se utiliza un algoritmo conocida como Velocity Verlet (Grubmüller et al., 1991) que fue desarrollado para resolver las ecuaciones de movimiento de Newton de forma eficiente permitiendo calcular las velocidades (necesarias para determinar la energía cinética y, por lo tanto la temperatura) y posición de los átomos en el mismo paso de integración. Otro elemento relevante para realizar las simulaciones en un ensamble Isotérmico-Isobárico (NPT), relevante para sistemas de interés biológico es tener tanto un termostato como un barostato para man-

tener estas propiedades oscilando en torno a un valor (300K y 1 bar). El termostato utilizado para las simulaciones de este trabajo fue el termostato de Berendsen (Berendsen et al., 1984). Dicho termostato utiliza un decaimiento exponencial de las fluctuaciones de la energía cinética (a una temperatura T_0 con una constante de tiempo (τ)). (Ver ecuación 6.2)

$$\frac{dT}{dt} = \frac{T_0 - T}{\tau} \quad (6.2)$$

Lo mismo sucede con la presión, dado que los sistemas biológicos se encuentran a presión constante es necesario conservar esta propiedad oscilando en un valor. Para ello se utilizó la misma estrategia realizando las simulaciones en presencia del barostato de Berendsen.

6.2 La mecánica cuántica

No fue posible hasta el desarrollo de la mecánica cuántica la obtención de parámetros precisos para poder modelar adecuadamente el comportamiento de átomos y moléculas. El trabajo de Max Planck al introducir por primera vez la noción de que la energía (o el espectro de emisión de un sólido) no tiene que ser necesariamente continua como sostenía la física clásica newtoniana sentó las bases para las posteriores formulaciones de De Broglie, Heissenberg y Schrödinger. A partir de allí, sería la ecuación de Schrödinger la que describiría el comportamiento de átomos y moléculas y daría origen a la mecánica cuántica:

$$-\hbar \frac{\partial}{\partial t} \Psi = \hat{H} \Psi \quad (6.3)$$

En el desarrollo de este trabajo de tesis fue necesario utilizar resultados derivados de la resolución aproximada de la Ecuación de Schrödinger utilizando la teoría del funcional de la densidad (DFT, por sus siglas en inglés) y su aproximación, DFTB (Density Functional Tight Binding) como así también Hartree-Fock (HF).

La teoría del funcional de la densidad permite, mediante el uso de funcionales (funciones de funciones), calcular las propiedades electrónicas de un sistema, que dependen espacialmente de la densidad electrónica. La energía total de un sistema en DFT se descompone en varias componentes:

$$E[n(r)] = T_s + E_{ext} + E_H + E_{ex} + E_{II} \quad (6.4)$$

donde T_s representa la energía cinética de no interacción, E_{ext} es la energía externa de interacción (entre los electrones y los núcleos), E_{II} es la energía de interacción entre los núcleos, E_H es la energía de Hartree y E_{ex} es la energía de intercambio y correlación donde quedan ocultos todos los efectos de muchos cuerpos difíciles de computar. La dificultad de resolver la estructura electrónica radica en el término de intercambio y correlación.

6.2.1 SCC-DFTB

El Self-Consistent Charge, Density Functional Tight-Binding (SCC-DFTB) es una aproximación metodológica basada en la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT), se trata de un método comúnmente enmarcado de la familia de los hamiltonianos semiempíricos, que tienen una porción parametrizada sobre datos experimentales (que acelera mucho el cómputo) y otra que se calcula *ab initio* a partir de aproximaciones. En la aproximación SCC-DFTB la densidad electrónica de la teoría DFT es sustituida por una densidad de referencia más las fluctuaciones de la misma $\rho = \rho_0(r) + \delta\rho(r)$. La energía total de DFT es expandida hasta un segundo orden para las fluctuaciones de la densidad de carga. Luego de una serie de aproximaciones la energía puede ser escrita de la siguiente forma (Marcus Elstner et al., 1998):

$$E^{SCC-DFTB} = \sum_i^{OCC} \langle \psi_i | \hat{H}_0 | \psi_i \rangle + E_{rep} + \frac{1}{2} \sum_{\alpha\beta} \Delta q_\alpha \Delta q_\beta \gamma_{\alpha\beta} \quad (6.5)$$

Los primeros dos términos de la ecuación 6.5 son computados en la densidad de referencia ρ_0 y forman la aproximación original de DFTB. (Porezag et al., 1995) El primer término es el "término de la estructura de banda" (esta terminología deriva de la ciencia de materiales de donde la aproximación DFTB se origina), y se refiere al elemento *leading* del hamiltoniano, H_0 . Los orbitales moleculares de Kohn-Sham ϕ_i son expandidos en unas bases mínimas confinadas a orbitales atómicos del tipo Slater por ejemplo: $\phi_i = \sum_V C_{VI} \phi_V$ como fue descrito por (Eschrig, & Bergert, 1978) que es determinada resolviendo el problema atómico de Kohn-Sham en presencia de un potencial de confinamiento (Porezag et al., 1995). Estos orbitales atómicos (ω_V) son luego usados para calcular los elementos de matriz del Hamiltoniano como:

$$H_{\mu\nu}^0 = \begin{cases} \varepsilon_{\mu}^{free\ atom}, & \text{if } \phi_{\mu} = \phi_{\nu}; \\ \langle \phi_{\mu} | \hat{H}(\rho_{\alpha}^0 + \rho_{\beta}^0) | \phi_{\nu} \rangle, & \phi_{\mu} \in \alpha \text{ y } \phi_{\nu} \in \beta; \\ 0, & \text{en todos los otros casos} \end{cases} \quad (6.6)$$

En la ecuación 6.6 $\varepsilon_{\mu}^{free\ atom}$ es el autovalor de Kohn-Sham para el orbital ρ_{μ} en el átomo sin confinamiento, y los tres términos del centro han sido descartados. El Hamiltoniano y el solapamiento de los elementos de la matriz son entonces pre-calculados en esta aproximación de dos centros para las distancias interatómicas en una escala relevante y tabuladas (Porezag et al., 1995; Zhechkov et al., 2005) y elementos a distancias arbitrarias se obtienen al interpolar sobre los valores tabulados. El segundo término es el de interacción repulsiva de a pares, aproximada como la suma del potencial de dos cuerpos:

$$E_{rep} = \sum_{\alpha\beta} U_{\alpha\beta} \quad (6.7)$$

En la práctica, este termino es ajustado (utilizando una función tipo *spline*) a la diferencia de la energía total de un cálculo completo de DFT con una base mínima y la parte electrónica de un cálculo de DFTB (es decir, todos los términos salvo la E_{rep}) con respecto al largo del enlace de interés en una molécula de interés relevante. (M Elstner, 2006) El último término de la ecuación 6.5 define la aproximación de SCC de segundo orden. Introduce un término correctivo para las interacciones Coulombicas de larga distancia a la energía total, debido a las fluctuaciones en las cargas $\delta q_{\alpha} = q_{\alpha} - q_{\alpha}^0$ centradas en los átomos. El $\gamma_{\alpha\beta}$ es un función analítica que brinda un comportamiento correcto en los casos límite: para $R_{\alpha} = R_{\beta}$, $\gamma_{\alpha\beta}$ brinda la contribución por la autointeracción de α , que evalúa al parámetro de Hubbard del átomo $\alpha (U_{\alpha})$ y en el límite de las largas distancias la interacción Coulombica entre dos esferas con una distribución de carga centrada en R_{α} y R_{β} .

Aplicando el principio variacional, que implica hallar mediante densidades de prueba la densidad electrónica de más baja energía y es el mismo que el utilizado en HF o DFT, la ecuación de Kohn-Sham final puede ser escrita como el siguiente sistema de ecuaciones algebraicas:

$$H_{\mu\nu} = \langle \phi_{\mu} | \hat{H}_0 | \phi_{\nu} \rangle + \frac{1}{2} S_{\mu\nu} \sum_{\zeta}^N (\gamma_{\alpha\zeta} + \gamma_{\beta\zeta}) \Delta q_{\zeta} \hat{H}_{\mu\nu}^0 + \hat{H}_{\mu\nu}^1; \quad \forall \mu \in \alpha, \nu \in \beta \quad (6.8)$$

Donde:

$$H_{\mu\nu} = \langle \phi_\mu | \hat{H}_0 | \phi_\nu \rangle; S_{\mu\nu} = \langle \phi_\mu | \phi_\nu \rangle; \forall \mu \in \alpha, \nu \in \beta \quad (6.9)$$

Por lo tanto, la corrección de segundo orden debido a la fluctuación de las cargas es representada por los elementos no diagonales $H_{\mu\nu}^1$, que dependen de la carga atómica. Estas cargas son calculadas por un análisis de Mulliken, y dependen del coeficiente $c_{\mu i}$ de los orbitales de Kohn-Sham. Entonces, el proceso debe ser iterado hasta que se adquiriera una autoconsistencia. Como no es necesario calcular ninguna integral de solapamiento porque se encuentran pre-calculadas, el costo computacional esta dominado por la solución del problema de los autovalores de la ecuación 6.8.

Finalmente, una simple expresión analítica para las fuerzas interatómicas puede ser derivada tomando la derivada de la energía de SCC-DFTB respecto a las coordenadas nucleares para brindar:

$$F_\alpha = - \sum_i^{occ} n_i \sum_{\mu\nu} c_{\mu i} c_{\nu i} \left(\frac{\partial H_{\mu\nu}^0}{\partial R_\alpha} - \left(\epsilon_i - \frac{H_{\mu\nu}^1}{S_{\mu\nu}} \right) \frac{\partial S_{\mu\nu}}{\partial R_\alpha} \right) - \Delta q_\alpha \sum_\zeta^Q \frac{\partial \gamma_{\alpha\zeta}}{\partial R_\alpha} \Delta q_\zeta - \frac{\partial E_{rep}}{\partial R_\alpha} \quad (6.10)$$

Las derivadas para el Hamiltoniano y el solapamiento son calculadas si son necesarias a partir de los valores tabulados a través de diferencias finitas, mientras que fórmulas analíticas simples pueden obtenerse para los términos restantes.

6.3 Dinámica molecular híbrida (QM/MM)

Los métodos basados en la mecánica cuántica presentan información de la distribución electrónica del sistema y son imprescindibles cuando se desea estudiar procesos reactivos, pero traen aparejado un gran costo computacional. Por otro lado, los métodos llamados de mecánica molecular clásica (basados en campos de fuerza) presentan un costo computacional mucho menor, y permiten estudiar fenómenos estructurales asociados a moléculas de gran cantidad de átomos, procesos con movimientos característicos en la escala de los nanosegundos a diferencia de las técnicas cuánticas que se restringen a fenómenos que ocurren en la escala de los picosegundos. Se puede pensar que pueden combinarse ambas metodologías para el estudio de un sistema en el que sea necesaria una descripción de la densidad electrónica de una cierta región, que se debe describir con mecánica cuántica, y el resto del sistema puede tratarse con mecánica clásica. Un ejemplo de aplicación de este tipo de metodologías es el estudio de reacciones enzimáticas. (Defelipe et al., 2015; Crespo, Scherlis, et al., 2003; Crespo, Martí, et al., 2005; Turjanski, Hummer, & Gutkind, 2009;

Dumas et al., 2014; Arcon et al., 2015).

En ellas, el sitio reactivo debe tratarse necesariamente con mecánica cuántica, pero el resto de la enzima puede tratarse con mecánica clásica. Esto constituye un avance significativo respecto de la utilización de sistemas modelo para tratar este tipo de problemáticas, en los que solo se incluía el sitio activo y algunos grupos pequeños relevantes. En las metodologías híbridas efecto tanto de la polarización electrostática como estérico del entorno proteico es considerado explícitamente en la mayoría de los casos crucial en el desarrollo del fenómeno reactivo. Para aplicar una metodología QM-MM, en primer lugar es necesario definir el sector del sistema que se tratará con mecánica cuántica, que llamaremos subsistema QM. El resto del sistema subsistema MM se tratará con un campo de fuerza clásico. Para la elección, debe tenerse en cuenta que cuanto mayor sea el subsistema QM, mayor calidad tendrá el cálculo, pero también su costo se incrementará significativamente. En el caso de que la simulación a realizar consista en el estudio de una molécula inmersa en un solvente, resulta natural elegir como subsistema QM a la molécula a estudiar y tratar al solvente clásicamente. En el caso del estudio de una reacción enzimática, la elección es más compleja. Resulta imprescindible incluir en el subsistema QM todos los átomos que incluyan enlaces que puedan romperse o formarse durante el proceso de interés. Sin embargo, para obtener una buena representación del problema de estudio, normalmente se requiere incluir una mayor cantidad de átomos que simplemente los involucrados en la reacción propiamente dicha.

Dentro de los métodos QM-MM, pueden distinguirse dos clases de metodologías: los esquemas aditivos y los esquemas sustractivos. La metodología utilizada en este trabajo corresponde a un esquema aditivo, por lo que nos concentraremos en este tipo de esquemas. En los métodos QM-MM aditivos, el Hamiltoniano consiste en la suma de la contribución del subsistema QM (H_{QM}), el subsistema MM (H_{MM}) y un término de acoplamiento QM-MM (H_{QM-MM}): -

$$H = H_{QM} + H_{MM} + H_{QM-MM} \quad (6.11)$$

Para el cálculo de la energía E_{QM} asociada al H_{QM} , debe seleccionarse un método cuántico. Los cálculos presentados en este trabajo están realizados a nivel de DFTB (Density Functional based Tight Binding), un Hamiltoniano semiempírico. En el Hamiltoniano cuántico no solo se tienen en cuenta las cargas de los núcleos cuánticos, sino que se realiza el cálculo teniendo en cuenta además el potencial electrostático generado por las cargas clásicas. La

energía E_{MM} se calcula a través del uso de un campo de fuerza. En el caso de este trabajo, el campo de fuerza utilizado fue el campo de fuerza AMBER99SB (Hornak et al., 2006), explicado en la sección anterior. El término clave en el cálculo QM-MM es el término de interacción H_{QM-MM} . La forma en que se define éste, da cuenta del método QM-MM particular. En forma general, podemos decir que incluye las interacciones electrostáticas, de van der Waals y de unión de los átomos en la frontera, entre los átomos QM y los MM. En el método utilizado en los cálculos realizados en este trabajo, el término de acoplamiento QM-MM consiste en el descrito en la expresión 6.12 para un sistema de A átomos MM y B átomos QM:

$$E_{QM-MM} = \sum_{i=1}^A q_i \int \frac{\rho(r)}{|r - \tau_i|} dr + \sum_{i=1}^A \sum_{j=1}^B \frac{q_i Z_j}{|R_j - \tau_i|} + \sum_{i=1}^A \sum_{j=1}^B 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{\tau_i - R_j} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{\tau_i - R_j} \right)^6 \right] \quad (6.12)$$

En la ecuación 6.12 τ_i corresponde a las posiciones de los núcleos MM, R_j a las coordenadas de los núcleos QM. El primer sumando da cuenta de la interacción electrostática entre la densidad electrónica del subsistema cuántico y las cargas sobre los átomos MM (q_i). El segundo término describe la interacción electrostática entre los núcleos QM, de carga Z_j , y los átomos MM. El tercer término describe las interacciones de van der Waals, en la misma forma que lo realiza en campo de fuerza clásico, descrito en la sección anterior. Este último término implica que sea requerido obtener los parámetros asociados al potencial de Lennard-Jones ϵ y σ para los átomos del subsistema QM, los que normalmente son obtenidos del campo de fuerza utilizado para representar el subsistema MM.

6.4 Métodos de estimación de energía libre

Dado que para estimar la energía libre de un proceso se requiere de múltiples observaciones de dicho fenómeno (la ruptura y formación de enlaces, un cambio conformacional) a lo largo de una coordenada de reacción que describe el proceso (una distancia, un ángulo, una combinación lineal de distancias, etc). Si la barrera a atravesar es grande (mayor a k_B , será difícil observar siquiera una vez el proceso. Por esta razón para estudiar este tipo de fenómenos se recurren a métodos de muestreo sesgado.

6.4.1 Inigualdad de Jarzynski

El método de Dinámica Molecular Dirigida (MSMD, Multiple Steered Molecular Dynamics, por sus siglas en inglés) está basado en la igualdad demostrada por Jarzynski en 1997. (Jarzynski, 1997). De la termodinámica básica, sabemos que en un sistema cerrado conectado a un reservorio térmico, el trabajo que se realice o sea entregado por el sistema para realizar un proceso que lo lleva de un estado inicial A a un estado final B, es mayor o igual al cambio en energía libre del sistema, cumpliéndose la igualdad solamente en el caso de que el trabajo sea realizado en forma reversible. Jarzynski demostró que la energía libre del proceso A B, puede obtenerse del promedio exponencial realizado sobre el ensamble formado por infinitas determinaciones de trabajo irreversible asociadas a caminos que conectan los estados A y B. La ecuación 6.13 muestra esta relación:

$$\langle e^{-\beta W} \rangle_{A \rightarrow B} \geq e^{\frac{-\Delta G}{k_B T}} \quad (6.13)$$

donde W, el trabajo para llevar al sistema del estado A al B, es tomado de medidas realizadas desde las condiciones iniciales para el sistema en el estado A generadas en el ensamble canónico a una temperatura T.

La aplicación de esta ecuación al cálculo de perfiles de energía libre se realiza, al igual que con otros métodos como *Umbrella Sampling*, a través del agregado de un término armónico a la energía potencial. (Martí et al., 2008). Pero, al contrario de este método, el mínimo de este potencial se mueve a lo largo de la coordenada de reacción durante la SMD como:

$$E(r) = E(r) + k[\zeta - (\zeta_0 + v\Delta t)]^2 \quad (6.14)$$

donde v corresponde a la velocidad a la que se mueve la coordenada asociada al perfil que se desea calcular. En la práctica deben realizarse en primer lugar simulaciones de dinámica molecular de cada uno de los estados que se desean conectar a través del perfil de energía libre. Luego de asegurarse que se ha realizado una exploración eficiente de cada uno de los estados (estados inicial y final), se obtienen las estructuras iniciales para el cálculo de MSMD. Se realizan un número de simulaciones (30-40) partiendo del estado inicial al final eligiendo cuidadosamente la velocidad guía v , dado que si se utiliza un valor muy alto se corre el riesgo de sobre calentar el sistema pero si se realiza de forma muy lenta se estará utilizando recursos computacionales de forma poco eficiente. En cada

una de las simulaciones se registra el trabajo en función de la coordenada y al finalizar se realiza el promedio exponencial para obtener la energía libre. Dado que la ecuación de Jarzynski es válida solamente si se realiza un número infinito de simulaciones y que esto resulta impracticable, debe realizarse una cantidad suficiente de simulaciones en las que pueda considerarse que se ha logrado la convergencia del sistema, es decir, que la realización de nuevas simulaciones no modifica significativamente el perfil de energía libre final. El método de MSMD se encuentra implementado en AMBER utilizado para realizar los cálculos de dinámica molecular clásica y QM-MM (Crespo, Marti, et al., 2005)

6.4.2 Determinación del ΔG_U mediante MM/PBSA.

Debido a las aproximaciones que realizan las heurísticas de *docking* al estimar la energía libre de unión es razonable realizar estimaciones de ΔG_U con métodos de mayor calidad. Si bien los valores absolutos están muy alejados de valores obtenidos experimentalmente si permiten realizar comparaciones entre compuestos (el $\Delta\Delta G$) (Miller III et al., 2012) Brevemente, el método de MM/PBSA se basa en la descomposición de la energía libre de unión en cuatro componentes:

$$\Delta G_{union,solv}^0 = \Delta G_{union,vacio}^0 + \Delta G_{solv,complejo}^0 - (\Delta G_{solv,receptor}^0 + \Delta G_{solv,ligando}^0) \quad (6.15)$$

donde la contribución de solvatación de cada componente se calcula de la siguiente forma utilizando la ecuación de Poisson-Boltzmann linealizada para cada estado (el componente electrostático) agregando un término empírico para la contribución hidrofóbica.

$$\Delta G_{solv}^0 = G_{electroestatico,\epsilon=80}^0 - G_{electroestatico,\epsilon=1}^0 + \Delta G_{hidrofobico}^0 \quad (6.16)$$

Mientras que el componente en vacío se calcula tomando un promedio de las interacciones entre el receptor y el ligando (ΔE_{MM}^0) y el cambio entrópico por la unión si es necesario:

$$\Delta G_{vacio}^0 = \Delta E_{MM}^0 - T\Delta S_{modosnormales}^0 \quad (6.17)$$

Mediante el uso de esta técnica de post procesamiento se obtiene un mejor estimador del ΔG_U de las distintas drogas salidas del análisis de *Docking*.

6.4.3 RMSD

Existen diversas métricas para la evaluación de un sistema desde el punto de vista estructural a lo largo de una trayectoria. La más utilizada se trata del desvío cuadrático medio que se encuentra definido como:

$$RMSD_j = \sqrt{1/N \sum_{i=1}^N (x_{j,i} - x_{ref,i})^2} \quad (6.18)$$

donde N es el número de átomos del sistema, $x_{j,i}$ es la posición del átomo i en la foto j; $x_{ref,i}$ es la posición del átomo i en la foto de referencia. Se pueden realizar cálculos de RMSD a lo largo de una dinámica molecular para observar, de forma global, que le sucede al sistema respecto a la referencia.

6.4.4 Campo de fuerza *FoldX*

La ventaja del empleo de este tipo de campos de fuerzas empírico, se debe, a con ellos se puede evaluar rápida y cuantitativamente las interacciones importantes que contribuyen principalmente a la estabilidad de proteínas y complejos proteicos. De esta manera muy sencilla puede evaluarse el efecto de miles de mutantes sobre una cadena polipéptica. FoldX utiliza una descripción atomística de la estructura proteica y para la evaluación toma en cuenta varios términos "energéticos" que fueron ajustados y/o repesados utilizando datos experimentales de mas de 1088 mutantes puntuales (Schymkowitz et al., 2005).

La función de puntuación "energética" de FoldX incluye términos que se han encontrado como importantes descriptores para la estabilidad proteica. La energía libre de "desplegado" (ΔG) de la molécula de interés es calculada utilizando la siguiente ecuación :

$$\Delta G = W_{vdw} \cdot \Delta G_{vdw} + W_{solH} \cdot \Delta G_{solvH} + W_{solP} \cdot \Delta G_{solvP} + W_{wb} \cdot \Delta G_{hbond} + \Delta G_{el} + \Delta G_{kon} + W_{mc} \cdot T \cdot \Delta S_{mc} + W_{sc} \cdot T \cdot \Delta S_{sc} \quad (6.19)$$

Donde ΔG_{vdw} es la suma de todas las contribuciones de van der Waals de todos los átomos con respecto a las mismas interacciones con el solvente. ΔG_{solvH} y ΔG_{solvP} corresponden a la energía de desolvatación durante el proceso de plegado, para grupos apolares y polares respectivamente. ΔG_{hbond} es la energía libre asociada a la formación de interacciones de puente de hidrógeno intra-moleculares comparadas con la formación de interacciones inter-moleculares con el solvente. ΔG_{wb} es un término extra que tiene en cuenta la

energía de estabilización por parte de un molécula de agua sobre la estructura puesto que interactuá en mas de un punto y que dicho efecto no puede ser compensado con aproximaciones implícitas (Petukhov et al., 1999). ΔG_{el} es la contribución electrostática de grupos cargados, incluyendo el dipolo de hélices. ΔS_{mc} es el costo entrópico de fijar el esqueleto carbonado o *backbone* en el estado plegado; este término es dependiente de la tendencia natural de un aminoácido en particular a adoptar un dado ángulo diedro (Munoz, & Serrano, 1994). Finalmente ΔS_{sc} es el costo entrópico de fijar una cadena lateral en una dada conformación (Abagyan, & Totrov, 1994).

En la estimación sobre proteínas oligoméricas o complejos proteicos, dos términos extras son tenidos en cuenta; por un lado ΔG_{kon} , que refleja el efecto de las interacciones electrostáticas en la constante de asociación *Kon* (Vijayakumar et al., 1998) y por otro lado el cambio en la entropía traslacional y rotacional ΔS_{tr} como consecuencia de la formación del complejo. Este último término se anula cuando se observa el efecto de mutantes puntuales en complejos.

Los valores de energía de ΔG_{vdw} , ΔG_{solvH} , ΔG_{solvP} y ΔG_{hbond} atribuidos a cada tipo de átomo, fueron derivados de un conjunto de datos experimentales, mientras que el ΔS_{mc} and ΔS_{sc} han sido estimados teóricamente. Los factores de ponderación o repesado mostrados en la ecuación 6.19, W_{vdw} , W_{solvH} , W_{solvP} , W_{mc} y W_{sc} son iguales a 1 salvo para la contribución de van der Walls que es igual a 0.33.

Bibliografía

- Abagyan, Ruben, & Maxim Totrov (1994). “Biased probability Monte Carlo conformational searches and electrostatic calculations for peptides and proteins”. In: *Journal of molecular biology* 235.3, pp. 983–1002.
- Arcon, Juan Pablo et al. (2015). “Molecular Mechanism of Myoglobin Autoxidation: Insights from Computer Simulations”. In: *The Journal of Physical Chemistry B* 119.5, pp. 1802–1813.
- Bayly, Christopher I et al. (1993). “A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model”. In: *The Journal of Physical Chemistry* 97.40, pp. 10269–10280.
- Berendsen, Herman JC et al. (1984). “Molecular dynamics with coupling to an external bath”. In: *The Journal of chemical physics* 81.8, pp. 3684–3690.
- Cieplak, Piotr et al. (1995). “Application of the multimolecule and multiconformational RESP methodology to biopolymers: Charge derivation for DNA, RNA, and proteins”. In: *Journal of Computational Chemistry* 16.11, pp. 1357–1377.
- Crespo, Alejandro, Marcelo A Marti, et al. (2005). “Multiple-steering QM-MM calculation of the free energy profile in chorismate mutase”. In: *Journal of the American Chemical Society* 127.19, pp. 6940–6941.
- Crespo, Alejandro, Marcelo A Martí, et al. (2005). “Theoretical study of the truncated hemoglobin HbN: exploring the molecular basis of the NO detoxification mechanism”. In: *Journal of the American Chemical Society* 127.12, pp. 4433–4444.
- Crespo, Alejandro, Damián A Scherlis, et al. (2003). “A DFT-based QM-MM approach designed for the treatment of large molecular systems: Application to chorismate mutase”. In: *The Journal of Physical Chemistry B* 107.49, pp. 13728–13736.
- Darden, Tom, Darrin York, & Lee Pedersen (1993). “Particle mesh Ewald: An $N \log(N)$ method for Ewald sums in large systems”. In: *The Journal of chemical physics* 98.12, pp. 10089–10092.

- Defelipe, Lucas A et al. (2015). "Protein Topology Determines Cysteine Oxidation Fate: The Case of Sulfenyl Amide Formation among Protein Families". In: *PLoS computational biology* 11.3, e1004051–e1004051.
- Dumas, Victoria G et al. (2014). "QM/MM study of the C—C coupling reaction mechanism of CYP121, an essential cytochrome p450 of Mycobacterium tuberculosis". In: *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 82.6, pp. 1004–1021.
- Elstner, M (2006). "The SCC-DFTB method and its application to biological systems". In: *Theoretical Chemistry Accounts* 116.1-3, pp. 316–325.
- Elstner, Marcus et al. (1998). "Self-consistent-charge density-functional tight-binding method for simulations of complex materials properties". In: *Physical Review B* 58.11, p. 7260.
- Eschrig, H, & I Bergert (1978). "An optimized LCAO version for band structure calculations application to copper". In: *physica status solidi (b)* 90.2, pp. 621–628.
- Grubmüller, Helmut et al. (1991). "Generalized Verlet algorithm for efficient molecular dynamics simulations with long-range interactions". In: *Molecular Simulation* 6.1-3, pp. 121–142.
- Hornak, Viktor et al. (2006). "Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters". In: *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 65.3, pp. 712–725.
- Jarzynski, Christopher (1997). "Nonequilibrium equality for free energy differences". In: *Physical Review Letters* 78.14, p. 2690.
- Martí, Marcelo A et al. (2008). "Mechanism of product release in NO detoxification from Mycobacterium tuberculosis truncated hemoglobin N". In: *Journal of the American Chemical Society* 130.5, pp. 1688–1693.
- Miller III, Bill R et al. (2012). "MMPBSA. py: an efficient program for end-state free energy calculations". In: *Journal of Chemical Theory and Computation* 8.9, pp. 3314–3321.
- Munoz, Victor, & Luis Serrano (1994). "Intrinsic secondary structure propensities of the amino acids, using statistical ϕ – ψ matrices: Comparison with experimental scales". In: *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 20.4, pp. 301–311.
- Petukhov, Michael et al. (1999). "Local water bridges and protein conformational stability". In: *Protein Science* 8.10, pp. 1982–1989.
- Porezag, Dirk et al. (1995). "Construction of tight-binding-like potentials on the basis of density-functional theory: Application to carbon". In: *Physical Review B* 51.19, p. 12947.

- Salomon-Ferrer, Romelia et al. (2013). "Routine microsecond molecular dynamics simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit solvent particle mesh Ewald". In: *Journal of chemical theory and computation* 9.9, pp. 3878–3888.
- Schymkowitz, Joost WH et al. (2005). "Prediction of water and metal binding sites and their affinities by using the Fold-X force field". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102.29, pp. 10147–10152.
- SETTLE, Miyamoto S Kollman PA (1992). "An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water molecules". In: *J. Comput. Chem* 13, pp. 952–962.
- Turjanski, Adrian Gustavo, Gerhard Hummer, & J Silvio Gutkind (2009). "How mitogen-activated protein kinases recognize and phosphorylate their targets: A QM/MM study". In: *Journal of the American Chemical Society* 131.17, pp. 6141–6148.
- Vijayakumar, M et al. (1998). "Electrostatic enhancement of diffusion-controlled protein-protein association: comparison of theory and experiment on barnase and barstar". In: *Journal of molecular biology* 278.5, pp. 1015–1024.
- Zhechkov, Lyuben et al. (2005). "An efficient a posteriori treatment for dispersion interaction in density-functional-based tight binding". In: *Journal of Chemical Theory and Computation* 1.5, pp. 841–847.

Anexos

.1 Publicaciones que surgieron de resultados de este trabajo de Tesis Doctoral.

- **López, E. D.**, Jara G. E., Pardi, A., Marti M. A., Ahn, N. G., Turjanski, A. G.; (2017). Activation of MAPK is controlled by ATP conformation. (enviado)

Existe una publicación en redacción que contiene los resultados presentados en el capítulo 3.

.2 Publicaciones no relacionadas directamente con este trabajo de Tesis Doctoral.

- **López, E. D.**, Arcon, J. P., Gauto, D. F., Petruk, A. A., Modenutti, C. P., Dumas, V. G., ... & Turjanski, A. G. (2015). WATCLUST: a tool for improving the design of drugs based on protein-water interactions. *Bioinformatics*, btv411.
- McReynolds, A. C., Karra, A. S., Li, Y., **Lopez, E. D.**, Turjanski, A. G., Dioum, E., ... & Earnest, S. (2016). Phosphorylation or mutation of the ERK2 activation loop alters oligonucleotide binding. *Biochemistry*, 55(12), 1909-1917.
- Arcon, J. P., Defelipe, L. A., Modenutti, C. P., **López, E. D.**, Alvarez-Garcia, D., Barriol, X., ... & Martí, M. A. (2017). Molecular Dynamics in Mixed Solvents Reveals Protein–Ligand Interactions, Improves Docking, and Allows Accurate Binding Free Energy Predictions. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 57(4), 846-863.

Figuras

1.1	Generalización de un sistema de transducción de señales. Una señal externa como una hormona en el contexto tisular o una compuesto químico para una célula aislada es recibida e interactuá con un componente celular, a menudo un receptor de membrana. La información es convertida en otras entidades químicas o transducida. La señal es amplificada antes de evocar una respuesta. Además, vías de retroalimentación regulan todo el proceso de señalización	3
1.2	Cascada de señalizacion de las vías MAPKs. Adaptado de A. Turjanski, Vaque, & J. Gutkind, 2007	7
1.3	Frecuencias de mutaciones oncogénicas a través de diferentes tipos de tumores humanos. Las frecuencias (eje y) se calcularon como porcentajes de muestras tumorales (Eje x) de un tipo dado, que alberga una mutación oncogénica (eje z) comparados con el número total de muestras para ese tipo de tumoral. Tomado de Thomas et al., 2007	9
1.4	Elementos importantes del dominio quinasa. A) vista general del dominio quinasa de ERK2 (modelo 2P-ERK2-ATP.MG basado en pdbid:2ERK). B) del sitio activo resaltando residuos importantes en la coordinación del mismo.	10
1.5	Sitios de anclaje proteína-proteína Estructura de la MAPK-ERK2 en el estado inactivo, unida a un péptido perteneciente a la fosfatasa HePTP (PDBid 2GPH). La unión del péptido promueve cambios en sitios distales como por el ejemplo, el loop de activación, haciendolo accesible para la fosforilación por parte de MAPKK.	12
1.6	Posible red de interaccion de STPK <i>M. tuberculosis</i>. Las flechas indican fosforilación intermolecular in vitro. PknB fosforila eficientemente a pknA y pknD. Tomado de Baer et al., 2014	13

1.7	Dominio quinasa de pknB y pknG. A) Homodímero pknB. PDBid:1MRU). B) Organización multidominio de pknG. RdX: Dominio rubredoxina, TPR: tetratricopeptide repeat	17
2.1	Representación de cintas para 2P-ERK2. Se muestran elementos de estructura secundaria relevantes. Residuos importantes para la catálisis están recuadrados en la secuencia	29
2.2	Plasticidad de dominio quinasa. A) Estructura cristalográfica de 2P-ERK2. Los colores varían de azul (n-terminal) hasta rojo (C-terminal). Elementos importantes de estructura secundaria del dominio quinasa están marcados en consecuencia. Aminoácidos relevantes se muestran en una representación de bastones (PDBid:2ERK). B) Principales cambios en la activación de ERK2 destacando las interacciones formadas producto de la fosforilación en Thr ¹⁸³ : pT ¹⁸³ -R ⁶⁸ ; puente salino K ⁵² -E ⁶⁹ y residuos relevantes dentro del <i>loop</i> L16. Estos cambios conformacionales se encuentran en el replegado del <i>loop</i> L16 y rotación del N-terminal. C) 5 representantes de EPKs que ilustran cambios principalmente en el hélice α C y el dominio n-terminal. Estos se encuentran ordenados de izquierda a derecha incrementando la magnitud del cambio conformacional. El código de colores denota inactivo/activo como magenta y verde respectivamente.	30
2.3	Cambios en las espigas C y R. A) ambas columnas hidrofóbicas en el contexto de la proteína. B)alineamiento de 0P-ERK2 y 2P-ERK2 (PDBid 1ERK, 2ERK respectivamente) señalando los elementos importantes de cada "espina". C) RMSD cada residuo individual, entre la forma no fosforilada (0P-ERK2) y la doblemente fosforilada (2P-ERK2) (etiquetas negras) y 2P-ERK2+ATP (PDBid 4GT3) vs 2P-ERK2 (etiquetas rojas).	33
2.4	Ensamble conformacional de ERK2. Simulaciones de dinámica molecular muestran que ambas se visitan mutuamente en el segmento N-terminal. A) 0P-ERK2 se refiere a la forma no fosforilada de ERK2 en magenta y fotos de la dinámica de 2P-ERK2 en gris. B) idem A para el conformero doblemente fosforilado en verde con la superposición de fotos de dinámica molecular de la forma 0P-ERK2(gris).	34

2.5	RMSD, RMSF, angulo dihedro entre α C y α F para cada una de las dinámicas moleculares (2 μ s cada réplica). 0P-ERK2 se refiere a la forma no fosforilada de ERK2 y 2P-ERK2 para el conformero doblemente fosforilado.	35
2.6	Proyección de modos esenciales para cada dinámica molecular. Histograma de la proyección del modo de transición de activación para cada estado conformacional. (A) Proyección del primer modo de transición sobre la estructura 2P-ERK2. Las principales contribuciones de cada residuo están indicados con flechas. B) histograma del primer modo de transición donde 2P-ERK2-atp (azul) y 0P-ERK2 (verde). C) Contribución de cada modo a la movimiento global.	36
2.7	F³²⁹ como reportero del cambio conformacional. F ³²⁹ out, es el estado conformacional plegado A) residuos circundantes a la I ⁷² , el principal cambio conformacional involucra la rotación de la F ³²⁹ . B) señal de HMQC computadas para el estado 0P-ERK2 y 2P-ERK2 a 25 °C muestra dos señales para I ⁷² , para ello usamos el programa SHIFT2X (Han et al., 2011). C) Perfil de energía libre para el proceso de plegado/desplegado del <i>loop</i> L16. Conformeros Inactivo (0P-ERK2) y activo (2P-ERK2) estan coloreados magenta y verde respectivamente.	38
2.8	Relación entra la formación del puente salino y la coordinación apropiada del ATP. A) Estructuras cristalográficas representativas de MAPK con ATP (o análogo de ATP). 2P-P38 γ (PDBid:1CM8; izq.), 0P-ERK2 (PDBid:4GT3,4S32; centro y derecha) B) Perfil de energía libre de formación del puente salino. 0P-ERK2 y 2P-ERK2 están coloreados magenta y verde respectivamente. C) Esfera de Coordinación del ATP según datos cristalográficos (tabla completa en material suplementario). D) Energía libre de unión al sitio activo de la quinasa, utilizando integración termodinámica.	41
2.9	PMF para la ruptura del puente salino. La distancia entre K52 y E69 fue utilizada para construir el PMF en presencia y ausencia de ATP.	42
2.10	0P-ERK2 desestabiliza la entrada del segundo magnesio. Sendas dinámicas moleculares comenzaron del estado correctamente coordinado y luego el sitio I se distorsiona. Distancias seleccionadas se muestran en linea punteada (D ¹⁶⁵ -Mg ²⁺ and E ⁶⁹ -Mg ²⁺)	42

2.11 Mecanismo de reacción, estudiados mediante un esquema QM-MM.

A) Estructura de los reactivos, estado de transición y productos para la reacción de fosforilación catalizada por ERK2. B) Estado de transición para el estado WT (Izq). trabajo (curvas en gris), energía libre (curvas en azul, Std-dev roja). gráficos de asociatividad de la reacción. Distancias entre $P\gamma/O\gamma$ vs $P\gamma/O3\beta$, energía libre en escala de colores. C) Idem B para el estado 2P-ERK2 mutante K52A. D) Idem B para el estado 0P-ERK2. 44

2.12 **Modelo de activación de ERK2.** La activación por fosforilación promueve el movimiento interdominio, formación del puente salino, apropiada coordinación del ATP. Magenta y verde para el estado 0P-ERK2 y 2P-ERK2 respectivamente. 46

2.13 Representación del ciclo de integración termodinámica para el cálculo de la diferencia de energía libre de unión para el sitio I de Mg^{2+} 50

S1 Relevamiento de Esfera de coordinación de ATP (o análogo) y 2 Magnesios/Manganeso para ser/thr quinasa depositadas en el pdb. 52

3.1 **Organización de dominios de pknG y pknB.** PknB, presenta un extremo amino terminal con el clásico dominio quinasa, un segmento transmembrana (TM) y 4 dominios "PASTA". Los sitios fosforilables del *loop* de activación se observan en la región expandida. PknG en el N-terminal contiene el motivo rubredoxina, el dominio quinasa y hacia el C-terminal incluye la región TPR (Scherr et al., 2007). Un grupo de residuos fosforilables en el N-terminal están representados como un sitio de polifosforilación (amarillo). GarA presenta dos residuos fosforilables, thr²¹ por pknG (Durán et al., 2005), y en thr²² por pknB (O'Hare et al., 2008). 62

3.2 **Relación entre la αC y la $\beta 4$.** A) Superposición del dominio quinasa de pknB para los cristales de la forma dimérica (1MRU, azul), y para la forma monomérica (3ORI verde, 3ORK magenta). Vista desde arriba (B) y desde el lateral (C) de la hélice αC para cada estructura. D) Detalle del entorno la interfaz $\alpha C \beta 4$ para el cristal 1MRU (izq) y para 3ORK (derecha) 63

- 3.3 Dinámica molecular de *pknB* y *pknG*** A) RMSD y (B) RMSF para *pknB*, RMSD (C) y RMSF (D) para *pknG*. 5 replicas fueron ensayadas con un tiempo de simulación fue 100 ns y 50 ns para *pknB* y *pknG* respectivamente. El valor de RMSD informado es para el dominio quinasa, mientras que el RMSF es para el sistema completo. 65
- 3.4 Modelo del reconocimiento de *GarA* por *pknB***. B)Modelo simplificado de *garA*-*pknB* donde el dominio FHA interactuá con el loop de activación.C) Detalle del loop de activación arg^{26} de *garA* interactuá con uno de los fosfatos del loop de activación.D) Distancia arg^{26}CZ y el fosfato del p-thr173. 5 réplicas de 100ns. 66
- 3.5 *pknG* presenta un bolsillo hidrofóbico**. (Arriba) Logo obtenido a partir de las energías de interacción de mutantes puntuales sobre la secuencia del péptido derivado de *garA* acomplejado con *pknG* (ver sección materiales y métodos). (Abajo) secuencia del péptido derivado de *garA* mostrando el sitio de fosforilación de *pknG* (rojo) y el motivo hidrofóbico (verde) 68
- 3.6 Comparación del modelo obtenido frente al cristal de *pknG***. A) La unidad asimétrica del dímero de *pknG* coloca el N-terminal en el sitio de unión del sustrato (cian), comparado con el modelo de *garA* (rojo). B) Ambas estructuras presentan residuos hidrofóbicos en sendas posiciones espaciales . C) Alineamiento de secuencias del motivo fosforilable de *garA* y el N-terminal de *pknG*. 69
- 3.7 Actividad de *pknG* frente a péptidos derivados de *garA***. Medidas de actividad ensayado con kit biolumincente (Kinase-Glo®) que mide ATP remanente, para péptidos derivados de *garA* WT (200 μM) y péptido mutante V24A,F25A (800 μM). *GarA* completa fue ensayada a una concentración final de 25 μM . Para todos los ensayos *pknG* se mantuvo a 0.8 μM 70
- 3.8 El rol de la hélice αC en *PknG***. *pknG* presenta una conformación distal de la hélice αC (naranja) comparada con *pknB* (verde). 72
- 3.9 Estabilización de la lys^{181} en *pknG***. Perfil de energía libre para la distancia $\text{lys}^{181}\text{-ATP}$ obtenido por *Umbrella sampling* evaluado con WHAM. 73

3.10	Reactividad de PknB. (A) Pequeño subsistema QM utilizado en los cálculos QM/MM y geometría del TS. B) Perfil de energía libre de la reacción de transferencia de fosfatos (C) Promedio de distancias relevantes para la reacción en función de la coordenada de reacción, a lo largo del perfil de energía libre. (D) Cambio en la carga neta de Mulliken de cada motivo seleccionado relativo a los reactivos. Código de color de los átomos: Carbono (verde), Nitrógeno (Azul), Oxígeno (Rojo), Azufre (Naranja) e Hidrógeno (Blanco).	74
3.11	Reactividad de PknG. (A) Pequeño subsistema QM utilizado en los cálculos QM/MM y geometría del TS. B) Perfil de energía libre de la reacción de transferencia de fosfatos (C) Promedio de distancias relevantes para la reacción en función de la coordenada de reacción, a lo largo del perfil de energía libre. (D) Cambio en la carga neta de Mulliken de cada motivo seleccionado relativo a los reactivos. Código de color de los átomos: Carbono (verde), Nitrógeno (Azul), Oxígeno (Rojo), Azufre (Naranja) e Hidrógeno (Blanco).	75
S1	Distribución de trabajos obtenidos a partir del protocolo SMD para ambas reacciones (A) pknG y pknB (B).	79
4.1	Vías de señalización intracelular de MAPKs. Flechas negras indican interacciones fisiológicas relevantes. Posibles interacciones (líneas punteadas). Tomado del trabajo de Garai et al., 2012	88
4.2	Clasificación estructural de motivos de unión a MAPKs A) Vista general del dominio quinasa con su sustrato. El sitio de unión está comprendido por el sitio CD (" <i>common docking</i> ") y la región hidrofóbica (coloreada azul y marrón claro, respectivamente), el complejo mostrado es el JNK1-NFAT4 (pdbID 2XRW). B) Tipos de modo de unión de diferentes péptidos. La hendidura permite 3 aminoácidos hidrofóbicos en línea, presentando dos esquemas de espaciamiento. Al mismo tiempo el espaciamiento entre, ϕ - ψ determina la especificidad de las MAPKs. C) Distintos modos de unión y diferentes largos de los D-motifs están disponibles para ERK2 o p38 α . Las secuencias péptidicas que se unen ERK2 y p38 α presentan una gran variedad conformacional, desde totalmente lineal (MEF2A, verde) a helicoidal (HePTP, magenta). D) clasificación en familia de péptidos (ver texto para detalles). Tomado del trabajo de Zeke et al., 2015	90

4.3	Determinación del sitio de unión. Se seleccionaron todos los residuos a 10 Å cercanos al conjunto de péptidos disponibles para las tres MAPKs. . . .	92
4.4	Alineamiento de secuencias del sitio de unión de MAPKs. Se alineo secuencias de ratón y humanas del segmento que conforma el sitio de docking para las tres vías de señalización más importante en humanos	92
4.5	Alanine scanning sobre complejos p38α y JNK1,3. Comparación de afinidades relativas computadas utilizando el programa FoldX(verde) y resultados experimentales (rojo) para JNK1 (Barr, Kendrick, & Bogoyevitch, 2002) A), p38 α (Barsyte-Lovejoy, Galanis, & Sharrocks, 2002) B) y JNK3 (Ho et al., 2003)	94
4.6	MKK4 tiene un modo de unión similar a NFAT4 Usando como templatado el cristal 2XRW los valores de unión se corresponden con los obtenidos experimentalmente (Ho et al., 2003)	95
4.7	Pipeline de mutaciones sobre el complejo MAPK:péptido. Sobre cada posición de la secuencia polipeptídica se mutó por los 20 aminoácidos obteniendo una matriz de 20xN, donde N es el largo de la secuencia polipeptídica. Sobre cada mutante se computó la "ΔΔG" de la energía de interacción con el software <i>FoldX</i>	97
4.8	Logos p38α La activación por fosforilación promueve el movimiento interdominio, formación del puente salino, apropiada coordinación del ATP. Magenta y verde para el estado 0P-ERK2 y 2P-ERK2 respectivamente.	97
4.9	Position-specific scoring matrix (PSSM) logos. Logos "evolucionario" PSSM para p38 α :MEF2A. Adaptado de Zeke et al., 2015	98
4.10	La dinámica molecular muestra. A) Vision general del modo de unión de HePTP. B) regresión lineal, energía de interacción para la matriz de mutantes obtenida a partir del cristal vs matriz obtenida por dinámica molecular. C) Logo "energético" para pepHePTP derivado del cristal D) idem C para la matriz obtenida por dinámica molecular	99
4.11	Diagrama de flujo del uso de los diferentes comandos de FoldX	102
5.1	Disposición espacial/modular de dominios de pknG. PknG presenta un dominio rubredoxina (RBX, magenta) y otro TPR (tetratricopeptide repeat, verde) responsable de interacciones proteína-proteína.	111

Tablas

4.1	Cristales disponibles de complejos MAPK-péptido utilizados	93
4.2	Contribución a la energía total de unión del motivo $\phi A, \phi B$ (% porcentaje de unión)	96