



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA Y ANALÍTICA**

# **Estudio por Modelación Molecular de la interacción del dominio C-terminal de unión a fosfotirosina de FE65 (PTB2) con la región C-terminal de APP (AICD)**

**Profesor Patrocinante:**

Dr. Gerald Zapata Torres  
Depto. Química Inorgánica y  
Analítica.  
Facultad de Ciencias Químicas y  
Farmacéuticas,  
Universidad de Chile

**Directores de tesis:**

Dr. Gerald Zapata Torres  
Dr. Claudio Olea Azar  
Depto. Química Inorgánica y  
Analítica.  
Facultad de Ciencias Químicas y  
Farmacéuticas,  
Universidad de Chile

**Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico**

**SEBASTIÁN ESTEBAN MIRANDA ROJAS**

**Santiago, 2009**

“Hay una fuerza motriz  
más poderosa que el vapor, la  
electricidad y la energía  
atómica: la voluntad.”  
**Albert Einstein**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres y hermanos Miguel y Gustavo, a quienes les debo todo lo que soy el día de hoy. Especialmente a mi *madre* quien llenó los vacíos de mi vida con amor, se encargó día a día de inculcar en mí un espíritu con ansias de perfección, dedicado, disciplinado y analítico, características que me han llevado al camino de la ciencia que sigo en el presente. Y mi *padre* quien me formó toda la vida como una persona de calidad humana, me brindó el apoyo y el cuidado para lograr llegar cada día más lejos, el vigor para jamás quebrarme ante ningún obstáculo y la perseverancia que me trajo al camino que estoy recorriendo.

Gracias a mis tutores a quienes les debo lo que seré el día de mañana. Profesor Claudio Olea, sin el cual no hubiese logrado llegar a cumplir mi sueño de ser modelador molecular, quien desde el comienzo me apadrinó y guió velando por lo mejor para mí como científico y persona. Una persona cuyo apoyo incondicional e invaluable me hizo sentir siempre seguro al momento de enfrentar las rudezas y asperezas del mundo de la ciencia. A mi tutor, Gerald Zapata, una persona muy especial que conocí gracias a este trabajo, un académico y tutor que se transformó en un amigo en el momento en que más necesité uno.

Mis amigos incondicionales Abigail Tapia y Felipe Cartagena, quienes lograron que realmente creyera en mí ya que ellos siempre lo hicieron, personas que me ayudaron a sentir que realmente podía lograr cumplir mis sueños, jamás dejaron de apoyarme y no me permitieron rendirme.

Agradezco a mi compañero de trabajo y ahora gran amigo, Raúl Mera. Una persona con una gran disposición a compartir sus conocimientos, apoyo y preocupación, lo cual ha sido muy valioso en el transcurso de mi formación como científico y persona.

Gracias a Daniel Borquez, con quien fuimos autores intelectuales de este innovador proyecto y a Valentina Parra ya que sin su ayuda en las etapas finales de este trabajo, jamás hubiese logrado concretar este escrito.

## INDICE GENERAL

INDICE GENERAL.....	4
INDICE DE FIGURAS.....	6
INDICE DE TABLAS .....	7
ABREVIATURAS.....	8
RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUCCIÓN .....	11
1.1. Alzheimer.....	11
1.2. Proteína adaptadora FE65 .....	12
1.3. Presentación de la problemática.....	16
1.4 Antecedentes estructurales.....	17
2. HIPÓTESIS.....	19
3. OBJETIVO GENERAL.....	19
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
2. TEORÍA Y METODOLOGÍA.....	21
2.1 AutoDock.....	22
2.2 MMGBSA.....	24
2.3 Modelación por Homología .....	27
2.3.1 Construcción de un modelo por homología del dominio de interacción a fosfotirosina C-terminal de Fe65 (PTB2). .....	27
2.3.2 Construcción de un modelo por homología de un segmento de la región C-terminal de APP (AICD1) correspondiente a la región de interacción con Fe65 (PTB2).....	28
2.3.3 Construcción de un modelo por homología de un monómero de la proteína 14-3-3 $\gamma$ . .....	28
2.3.4 Construcción de un modelo por homología de un segmento de la región C-terminal de APP (AICD2) correspondiente a la región de interacción con 14-3-3 $\gamma$ . .....	29
2.3.5 Construcción de un modelo de la región expuesta al citoplasma de un fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (4,5 PIP).....	29

2.4 Docking .....	30
2.4.1 Predicción del complejo formado por PTB2-AICD1 .....	30
2.4.2 Predicción del complejo formado por PTB2 <sub>C654F</sub> -AICD1 .....	32
2.4.3 Predicción del complejo formado por 14-3-3 $\gamma$ -AICD2 .....	32
2.4.4 Predicción del complejo formado por PTB2-4,5 PIP .....	33
2.5 Alanine Scanning (Barrido de alaninas) .....	34
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	36
3.1 Modelación de dominio C-terminal PTB2 .....	36
3.2 Modelación del dominio AICD1 (secuencia-QNGYENPTYK) .....	40
3.3 Modelación del complejo PTB2/AICD1 .....	41
3.3.1 Alanine Scanning .....	43
3.4. Modelación de proteína adaptadora 14-3-3 $\gamma$ .....	46
3.5 Modelación de AICD2 (secuencia-VTPEERHLS) .....	48
3.6.1 Modelación del complejo 14-3-3 $\gamma$ /AICD2 .....	48
3.6.2 Descripción de la solución 64 .....	50
3.6.3 Descripción de la solución 92 .....	52
3.7 Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (4,5 PIP) .....	54
3.8 PTB2/4,5PIP .....	55
4. CONCLUSIONES .....	57
5. BIBLIOGRAFÍA .....	59

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo del complejo formado entre APP / FE65 / 14-3-3 $\gamma$ .....	15
Figura 2. Gráfico del perfil de potencial estadístico WGU_7, WGU_15, WGU_12.....	38
Figura 3. Alineamiento global de las secuencias del dominio C-terminal de FE65 (PTB2) y la secuencia del dominio PTB de FE65 de ratón. ....	38
Figura 4. Modelo de PTB2 y su gráfico de Ramachandran. ....	39
Figura 5. Modelo de AICD. ....	40
Figura 6. Modelo del complejo entre PTB2 <sub>N</sub> /AICD1 y de PTB2 <sub>Cys<sup>654</sup> Phe</sub> /AICD1.....	43
Figura 7. Gráfico de Ramachandran .....	46
Figura 8. Alineamiento múltiple de todas las isoformas de 14-3-3 humana.....	47
Figura 9. Modelo de 14-3-3 $\gamma$ .....	47
Figura 10. Modelo de AICD2. ....	48
Figura 11. Modelo del complejo entre 14-3-3 $\gamma$ y AICD2.....	50
Figura 12. Modelo detallado de las interacciones entre la solución 64 de AICD2 y 14-3-3 $\gamma$ . ....	52
Figura 13. Modelo detallado de las interacciones entre la solución 92 de AICD2 y 14-3-3.....	54
Figura 14. Esquema del modelo de 4,5PIP. ....	55
Figura 15. Modelo del complejo formado por PTB2/4,5PIP.....	56

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Listado de estructuras con identidad a PTB2.....	36
Tabla 2. Resultados del gráfico de Ramachandran y G-Factor provenientes del ensamble NMR de WGU empleando Procheck.....	37
Tabla 3. Resultados de la energía de <i>docking</i> y energía libre de interacción $\Delta G_b$ para las soluciones seleccionadas del <i>docking</i> entre PTB2 y AICD a partir del cálculo realizado por AutoDock.....	41
Tabla 4. Resultados de la energía de <i>docking</i> y $\Delta G_b$ para las soluciones seleccionadas del <i>docking</i> entre PTB2 <sub>Cys<sup>654</sup>Phe</sub> y AICD a partir del cálculo realizado por AutoDock. ....	42
Tabla 5. Aminoácidos de la superficie de interacción obtenidos a través del análisis de $\Delta$ ASAS, STC.....	44
Tabla 6. Resultados del barrido de alaninas realizado sobre los aminoácidos determinados por STC que forman parte de la interfaz de interacción entre PTB2 y AICD1.....	44
Tabla 7. Resultados de la energía de <i>docking</i> , energía libre de interacción y la energía libre de interacción calculada mediante MMGB para las soluciones seleccionadas del <i>docking</i> entre 14-3-3 $\gamma$ y AICD2 a partir del cálculo realizado por AutoDock3.0.5. ....	49
Tabla 8. Resultados obtenidos del estudio de $\Delta$ ASAS de la solución 64. ....	51
Tabla 9. Resultados obtenidos del estudio de $\Delta$ ASAS de la solución 92. ....	53

## ABREVIATURAS

APP	:	Amyloid Precursor Protein
AICD	:	Amyloid Intracelular Domain
PTB	:	Phosphotyrosine Binding Domain
4,5	:	PIP Phosphatidylinositol 4,5 phosphate
MMGB	:	Molecular Mechanics Generalizad Born
AG	:	Algoritmo Genético
AGL	:	Algoritmo Genético Lamarkiano
MCSA	:	Monte Carlo Simulated Annealing
TIP4P	:	Transferable Intermolecular Potencial 4 Point
Å	:	Angstrom $10^{-10}$ metros.
Ps	:	Picosegundo
Fs	:	Femtosegundo
PDB	:	Protein Databank
RMN	:	Resonancia Magnética Nuclear
RMSD	:	Root Mean Square Deviation.
VDW	:	van der Waals
DOPE	:	Discrete Optimized Protein Energy
PH	:	Plecktrine Homology
$K_d$	:	Constante de disociación
FDP	:	Función de densidad de probabilidad

### Nomenclatura de aminoácidos:

Alanina	:	Ala	(A)
Valina	:	Val	(V)
Leucina	:	Leu	(L)
Aspartato	:	Asp	(D)
Arginina	:	Arg	(R)
Aspargina	:	Asn	(N)
Glutamato	:	Glu	(E)
Glutamina	:	Gln	(Q)
Lisina	:	Lys	(K)
Cisteína	:	Cys	(C)
Metionina	:	Met	(M)
Serina	:	Ser	(S)
Treonina	:	Thr	(T)
Histidina	:	His	(H)
Fenilalanina	:	Phe	(P)
Tirosina	:	Tyr	(Y)



## RESUMEN

FE65 es una proteína adaptadora que actualmente se ha relacionado con la formación del péptido  $\beta$ -amiloide y la hiperfosforilación de tau, procesos que se ven incrementados en pacientes con Alzheimer, probablemente como consecuencia de un aumento en la actividad transcripcional de FE65. Una de las principales interacciones que se asocian con la activación de ésta proteína es la unión de su dominio PTB2 con el dominio citoplasmático de la proteína precursora del amiloide (AICD), interacción que se ve estabilizada por la proteína adaptadora 14-3-3 $\gamma$ .

En esta tesis se llevó a cabo la construcción de un modelo por homología de PTB2 y un segmento de AICD, correspondiente a la secuencia de interacción con FE65. A partir de éstos, mediante técnicas de *docking* se determinó el modo conformacional de interacción más probable para el complejo, cuya interfaz de interacción fue estudiada mediante un análisis de geometrías de interacción, principalmente de formación de puentes de hidrógeno y también mediante el estudio del cambio en el área de superficie accesible a solvente entre los monómeros y el complejo. Una vez determinados los aminoácidos que interaccionan en la interfaz se realizó un estudio de la contribución de éstos en la estabilidad del complejo mediante una técnica conocida como *Alanine Scanning*. Se logró determinar la importancia de cada uno de estos aminoácidos en la formación del complejo, presentando así las bases necesarias para el futuro diseño de ligandos inhibidores de la interacción como estrategia farmacoterapéutica para combatir la patología del Alzheimer.

A su vez se presenta un estudio preliminar de otro complejo involucrado en la interacción de FE65 y AICD, aquel formado entre 14-3-3 $\gamma$  con AICD, pudiendo determinar dos posibles sitios de unión. Por otra parte se realizó un breve estudio de un potencial sitio de unión de PTB2 a fosfoinosítidos de membrana, interacción que se ha señalado como probable, pero cuyo posible papel en los procesos moleculares de FE65 no ha sido determinado aun.

## ABSTRACT

### **Molecular modeling study on the interaction of FE65 phosphotyrosine binding domain (PTB2) and APP intracellular domain (AICD) complex**

FE65 is an adaptor protein related with both  $\beta$ -amyloid peptide formation and hyperphosphorylation of tau protein, processes that known to be increased in Alzheimer's patients, probably as a consequence of an increment of transcriptional activity related with FE65. One of the most important interactions associated with the activation of this protein is the binding of its PTB2 domain with the cytoplasmic domain of amyloid precursor protein (AICD), interaction that is further stabilized by the adaptor protein 14-3-3 $\gamma$ .

In this thesis homology models for PTB2 and a segment for AICD, corresponding to the interaction sequence with FE65 were developed. Using these models and carrying out docking techniques, the conformational mode of interaction was determined for the complex, where the interaction interface was studied using geometric analysis for the interaction, such as hydrogen bond formation patterns and through the study of changes on the accessible solvent surface area between the monomers and the complex. Once the aminoacids that interact in the interface were determined, a study of the contribution to the complex stability was carried out using Alanine Scanning technique. The importance of each aminoacid in the complex formation was also determined, thus introducing the bases for the future design of inhibitors ligands for this interaction, as a pharmacotherapeutic strategy to fight against Alzheimer pathology.

A preliminary study of other complex involved in the interaction between FE65 and AICD is also presented, namely the one formed between 14-3-3 $\gamma$  and AICD, where two possible binding sites were determined. On the other hand a brief study of a potential binding site for PTB2 towards membrane phosphoinositides, interaction that has been pointed out as probable, but where the possible role in the molecular processes of FE65 have not been addressed yet.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Enfermedad de Alzheimer

Las enfermedades neurodegenerativas son en su mayoría patologías invalidantes cuya incidencia está en aumento. Debido a la falta de conocimiento respecto a la etiología y las bases moleculares que las gobiernan, aún no se ha logrado el control de éstas ni el desarrollo de terapias farmacológicas efectivas que realmente detengan o disminuyan la velocidad de progresión de la enfermedad de manera significativa, sino que sólo se ha logrado aminorar la sintomatología y mejorar en parte la calidad de vida de los pacientes con enfermedades neurodegenerativas.

Dentro de estas enfermedades el desorden más común en el mundo entero es la enfermedad de Alzheimer (Nussbaum et al., 2003; Bossy-Wetzler et al., 2004) la cual es un desorden neurodegenerativo progresivo y fatal que se manifiesta por un deterioro de la memoria y de las actividades cognitivas con una disminución continua de las capacidades de realizar las actividades del diario vivir; todo esto acompañado de una variedad de síntomas neuropsiquiátricos y alteraciones en el comportamiento.

Se ha descrito que los pacientes que tienen esta patología sufren de una pérdida selectiva de neuronas del hipocampo y la corteza cerebral, los que manifiestan además dos lesiones características en estas regiones, la presencia intracelular de ovillos neurofibrilares de la proteína *tau* hiperfosforilada, proteína que forma parte del citoesqueleto neuronal, y la acumulación extracelular de placas formadas por un agregado del péptido conocido como  $\beta$  amiloide (Selkoe et al., 2003). Este péptido está constituido por una familia de moléculas que poseen entre 39 y 43 aminoácidos que se origina vía cortes proteolíticos secuenciales mediados por 2 aspartil proteasas ( $\alpha$  o  $\beta$  y  $\gamma$  secretasas) a la proteína precursora del amiloide (APP). El primer corte puede ser llevado a cabo por una  $\beta$  o  $\alpha$  secretasa, siendo el corte hecho por  $\beta$  el que genera el precursor para el péptido  $A\beta$ , el cual es posteriormente cortado por un gran complejo proteico conocido como  $\gamma$  secretasa. El procesamiento por  $\alpha$  y luego por  $\gamma$  secretasa genera un péptido

inocuo denominado p3, de entre 24 a 26 aminoácidos (Bossy-Wetzel et al., 2004; Selkoe et al., 2003).

La APP es una proteína de membrana tipo I formada por 695 aminoácidos que contiene una larga región extracelular, una hélice transmembrana y una corta cola citoplasmática (AICD) (Bossy-Wetzel et al., 2004).

Hoy en día la atención ha sido enfocada en el posible papel que juega el dominio intracelular de APP (AICD) en procesos de señalización intracelular participando en la activación de complejos con actividad transcripcional y en el procesamiento proteolítico de la misma APP. Uno de los complejos de mayor importancia se forma a partir de su interacción con la proteína adaptadora FE65.

## 1.2. Proteína adaptadora FE65

FE65 es una proteína presente casi exclusivamente en el cerebro, identificada inicialmente como un activador transcripcional (Zambrano et al., 1991) y posteriormente por unirse a la región citoplasmática de la proteína precursora del amiloide (APP) (Fiore et al., 1995). En humanos existen dos isoformas de FE65 producto del *splicing* alternativo de un miniexón de 6 nucleótidos. La isoforma que incluye dicho exón se encuentra presente exclusivamente en neuronas (Hu Q et al., 1999), y dentro de sus 710 aminoácidos existen tres dominios de interacción proteína-proteína representados en color verde en la **Figura 1**: un dominio WW (llamado así por dos residuos de triptófanos conservados) situado hacia la región N-terminal y dos dominios de unión a fosfotirosina (PTB1 y PTB2) hacia el C-terminal.

El dominio WW (aa 253-289) representa el centro de su actividad como transactivador de la expresión génica, la cual se pierde al mutar el motivo central YYW por alaninas (Cao X, Südhof TC, 2004). La delección de esta región impide la asociación de FE65 con el factor de ensamble de nucleosomas, SET, el cual es vital para la transcripción basal de *KAI*, uno de los pocos genes blanco identificada para FE65 hasta el momento (Telese et al. 2005).

Los dos dominios PTBs parecen ser reguladores de la actividad del dominio WW, el que en condiciones basales es inhibido por la presencia de dichos dominios en sus formas libres,

posiblemente por una asociación intramolecular, la cual deriva en una conformación cerrada de la proteína dejando inaccesible el sitio de interacción de WW para unirse con SET. La unión de ligandos endógenos a los dominios PTBs puede desplazar dicha asociación hacia una conformación abierta (activa), la que quizás como se ha visto requiere de factores adicionales que la estabilicen (Cao X, Südhof TC, 2004).

La necesidad de moléculas chaperonas adicionales que permitan mantener la conformación activa se debe a que la translocación de AICD al núcleo resulta prescindible para la actividad FE65 (Cao X, Südhof TC, 2004). Un potencial candidato a efectuar dicha función es la proteína 14-3-3 $\gamma$ . Recientemente, se describió que esta isoforma (y en menor medida la 14-3-3 $\eta$ ) es capaz de unir tanto a AICD como a FE65 formando un complejo ternario, tal como se muestra en la **Figura 1**, que facilita en gran medida la actividad transcripcional de FE65, al estabilizar la unión de FE65 a AICD (Sumioka et al., 2005).

El dominio PTB1 (aa 370-509) se une al factor transcripcional CP2, el cual dirige a FE65 al promotor de la glicógeno sintasa quinasa (GSK)-3 $\beta$ , activando su transcripción. La GSK-3 $\beta$  es la principal quinasa que fosforila a la *tau* y a  $\beta$ -catenina, por lo que su activación conduce a la hiperfosforilación de la primera formando los ovillos neurofibrilares, y a la degradación de la segunda, lo que finalmente lleva a la apoptosis neuronal (Kim HS et al., 2003).

También a través de PTB1, y tal vez competitivamente con el anterior, FE65 une a Tip60, una acetiltransferasa de histonas, la cual forma un complejo transcripcionalmente activo con el segmento citoplasmático de la APP (Cao X, Südhof TC, 2001).

El dominio citoplasmático de la APP (AICD) y el de sus homólogos constituyen los principales y hasta hoy, únicos ligandos descritos que interaccionan con el dominio PTB2, el cual está ubicado hacia el C-terminal (aa 542-699) (Fiore et al., 1995). La unión del AICD a FE65 es quizás la principal forma en que FE65 es activada para ejercer su acción a nivel transcripcional. El mecanismo de activación de este complejo transcripcional parece ser el siguiente:

Primero APP recluta al complejo de FE65 y Tip60 (preformado posiblemente en el núcleo) hacia el citoplasma y especialmente a regiones de membrana (Hass MR et al., 2005). Sin embargo,

esta unión no basta para activar al complejo, sino que éste debe ser liberado de la membrana para permitir su retorno al núcleo y llevar a cabo su acción a nivel transcripcional. Para esto existen al menos dos vías:

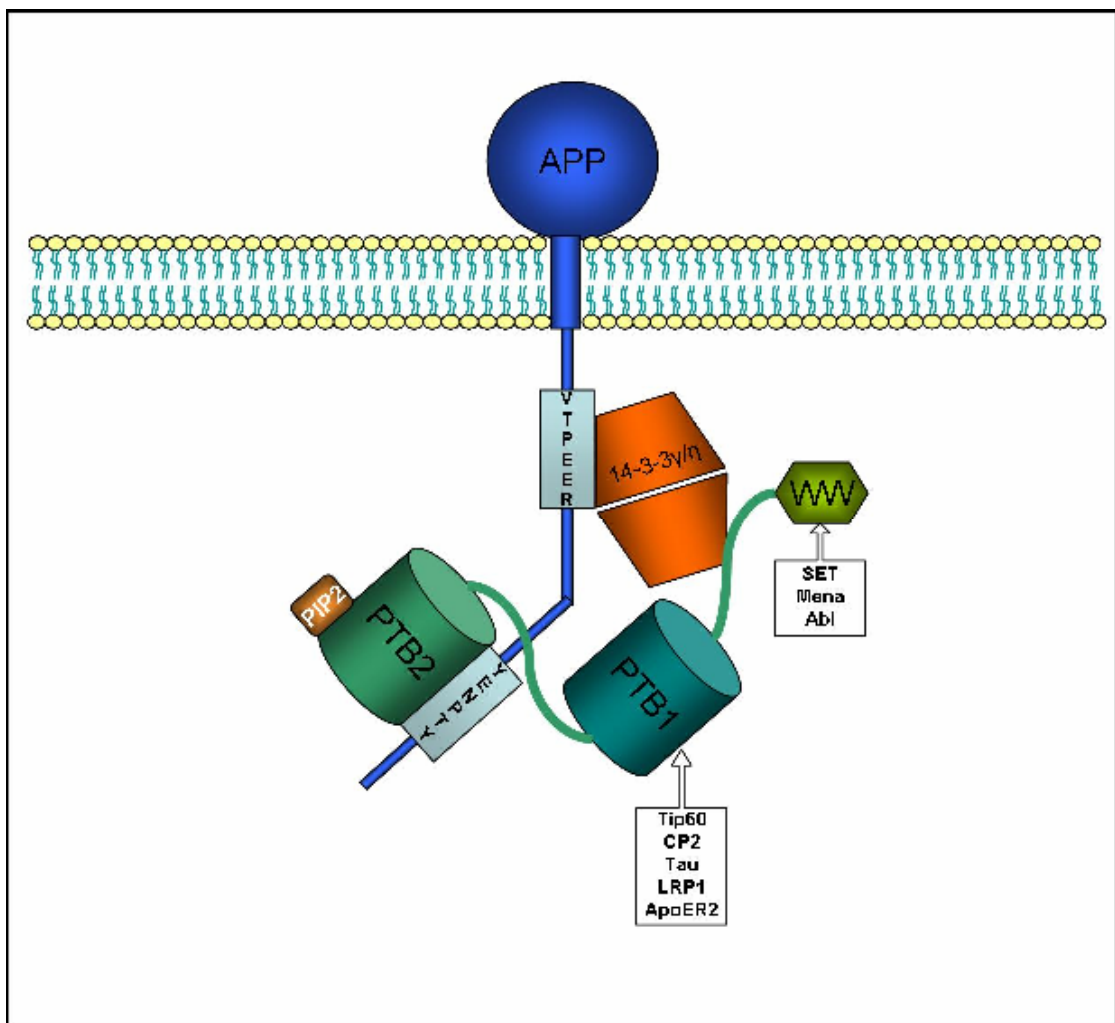
-Una de éstas, es el corte intramembrana de la APP por una  $\gamma$ - o  $\epsilon$ -secretasa, el cual libera a AICD de la membrana y con él al complejo Fe65-Tip60-AICD (Walsh DM et al., 2003; Cao X, Südhof TC, 2004).

-Un segundo posible mecanismo de activación está relacionado a fosforilaciones en el complejo por enzimas asociadas a la membrana o a la propia FE65. Entre ellas se cuentan la quinasa dependiente de ciclina (CDK)-5 que fosforila a Tip60 en la Ser-86 y en la Ser-90 (Hass MR et al., 2005); la tirosina quinasa Abl que fosforila a FE65 en la Tyr-547 (Perkinton MS et al., 2004) y las ERKs que la fosforilan en las Ser-175, Ser-287 y Thr-709 (Standen CL et al., 2003). Interesantemente, las formas fosforiladas de FE65 son más abundantes en las fracciones nucleares. De ellas cobra especial interés la fosforilación en la Ser-287 (en el C-terminal del dominio WW), ya que la región entre WW y PTB1 resulta vital en la transactivación (Telese et al. 2005) y en la destinación nuclear (Zambrano et al., 1998).

Tal vez existe una tercera vía de activación asociada a membrana, dada por la avidéz con que PTB2 une membranas enriquecidas en fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (Cao X, Südhof TC, 2004). Dicho proceso involucraría la liberación del complejo de las membranas por acción de alguna quinasa de lípidos como la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K).

Hasta este punto la interacción entre el dominio PTB2 y AICD parece ser el fenómeno físico capaz de gatillar la secuencia de eventos moleculares que traen como consecuencia un aumento en la fosforilación de Tau mediada por GSK-3 $\beta$  como se mencionó anteriormente, junto con un aumento en la generación del péptido  $\beta$ -amiloide, componente clave de las placas seniles presentes en pacientes con la enfermedad de Alzheimer, asociación recientemente corroborada mediante un estudio en cultivos celulares, donde mediante RNA de interferencia se disminuyeron los niveles de FE65 en presencia de APP, pudiendo observar una clara disminución en la producción del péptido  $\beta$ -amiloide (Zhongcong et al., 2007).

La predicción del modo de interacción entre dos proteínas ha sido durante años un problema cuya solución ha estado en continuo desarrollo. Durante los últimos años se han logrado importantes avances en este campo ligado directamente a un aumento en la comprensión de la teoría involucrada en este importante fenómeno. Una estrategia para estudiar este complejo sistema desde una perspectiva molecular, es a través de la simplificación de éste mediante la selección de la interacción de mayor relevancia a partir de los mecanismos de activación de este sistema propuestos anteriormente.



**Figura 1. Modelo del complejo formado entre APP / FE65 / 14-3-3γ**

En azul está APP unida al dominio PTB2 de FE65 representada por tonos verdes. Las secuencias aminoacídicas de reconocimiento están representadas en celeste. En naranja se observa a 14-3-3γ en complejo con FE65 y APP. En los cuadros están representados los posibles ligandos de PTB1 y WW.

### **1.3. Presentación de la problemática**

A partir de lo anteriormente expuesto, se desprende la importancia del fenómeno relacionado con la unión de PTB2 con AICD, el cual desencadena una cascada de eventos que traen como consecuencia la aparición de aquellas lesiones que caracterizan a la enfermedad del Alzheimer y que se asocian a la progresión de la patología. De esta manera se hace relevante el poder obtener información relacionada con esta interacción constituyendo una base sólida para el posterior desarrollo y estudio de potenciales inhibidores de ésta. Abordar esta problemática desde una perspectiva molecular hace posible determinar aquellos átomos involucrados en la interacción y de esta manera presentar los aminoácidos que servirán como blanco para pequeñas moléculas orgánicas.

La capacidad de determinar el modo de interacción entre las proteínas FE65 y AICD depende principalmente de la exactitud en el desarrollo de herramientas capaces de resolver dos problemas igualmente relevantes en este proceso. El primero consiste en el desarrollo de un método capaz de encontrar una solución cercana a la real a partir de una completa búsqueda en torno a la superficie de la proteína, obteniendo así un número de probables soluciones; lo segundo es encontrar un método a través del cual sea posible discriminar las mejores soluciones, o sea este método debe ser capaz de identificar a partir del grupo de soluciones generadas en la etapa anterior cuáles son cercanas a la solución real y cuáles no (Graham. et al., 2002), por lo cual esta etapa es fundamental y debe entregar un nivel de confiabilidad tal que no queden entre las soluciones conformaciones que correspondan a falsos positivos o falsos negativos, ya que en ese caso el método finalmente nos puede alejar por completo de la solución real.

Para desarrollar lo anteriormente expuesto es necesario conocer la estructura de ambos sistemas a interaccionar, en este caso PTB2 y AICD. La información tridimensional de PTB2 se reduce a un conjunto de 20 estructuras obtenidas mediante técnicas de RMN en un dominio análogo a éste en ratón. Mientras de AICD, se conoce una pequeña región que ha sido cristalizada junto a un dominio PTB que forma parte de X11, una proteína específica de neurona que contiene dos dominios PDZ y uno PTB que es el que se encuentra cristalizado. El segmento cristalizado de AICD comprende entre otros aminoácidos a la región de consenso de interacción, NPTY, identificada en este dominio citoplasmático de APP.



#### 1.4 Antecedentes estructurales

Se han realizado estudios experimentales con el objeto de lograr elucidar qué aminoácidos formarían parte del sitio de interacción junto con otros datos que podrían ser de gran relevancia para el estudio de este sistema. A continuación se presentan algunos datos experimentales que pueden ser relevantes en el estudio tridimensional de este complejo:

1. La mutación de la Cys<sup>654</sup> por Phe o Val en el dominio PTB2 de FE65 impide por completo su asociación con AICD (Borg JP et al., 1996).
2. La zona de interacción de Fe65 sobre AICD está centrada en la secuencia <sup>682</sup>YENPTY<sup>687</sup> (numeradas según la isoforma humana APP<sub>695</sub>). Sólo la mutación Y<sup>682</sup>G es capaz de eliminar la unión de FE65 a la APP, mientras que las mutaciones N<sup>684</sup>A y Y<sup>687</sup>A no tienen ningún efecto (Borg JP et al., 1996), así como la mutación Y<sup>682</sup>F (Perkinton MS et al., 2004; . Scheinfeld MH et al., 2003).
3. La unión de FE65 a AICD es independiente del estado de fosforilación de la Tyr<sup>687</sup>. El complejo presenta una constante de disociación ( $K_d$ ) de 488 nM (Zambrano et al., 1997).
4. La región <sup>667</sup>VTPEER<sup>672</sup> en el AICD parece tener una menor (pero no por ello menos significativa) participación en la alta afinidad con que FE65 une a la APP. La mutación de la Thr<sup>668</sup> por Ala o Glu conduce a que la unión sea más débil, lo que implica que sólo un péptido que incluya dicha región en adición a YENPTY es capaz de competir con APP por la unión a FE65. La fosforilación de la Thr<sup>668</sup> causa un descenso en la afinidad con que AICD une FE65, producto de un cambio estructural que implica una disminución en el porcentaje de  $\alpha$ -hélice (de 33,49% a 18,76%) en el C-terminal del AICD (Ando et al., 2001).
5. Un análisis estructural reciente de FE65 de rata arrojó las siguientes conclusiones: (i) un tratamiento proteolítico limitado, determinó sitios de corte en la Arg<sup>204</sup>, Glu<sup>298</sup>, Phe<sup>544</sup> y Trp<sup>698</sup> (según la secuencia y numeración de la isoforma de rata), es decir en los conectores entre los dominios, lo que se condice con la observación general de que los sitios expuestos a proteólisis de proteínas globulares corresponden a zonas de interdominios. (ii) El análisis por difracción circular muestra que un gran porcentaje de la estructura (50%) carece de estructuras definidas, siendo PTB2 el que presenta mayor porcentaje de estructura secundaria de algún tipo (19% de  $\alpha$ -hélice, 27% de sábana- $\beta$  y 21% de *turns*). (iii) El cambio en la fluorescencia de los triptófanos del dominio PTB2 tras una desnaturalización mostró que estos se encuentran inmersos dentro de los *core* hidrofóbicos del dominio (Lamberti et al., 2005).

6. La 14-3-3 $\gamma$  une al AICD en torno a la región <sup>667</sup>VTPEER<sup>672</sup>, unión que se pierde con la fosforilación en la Thr-668. La unión a FE65 es independiente de la unión al AICD y ocurre en el conector entre WW y PTB1. El efecto de 14-3-3 $\gamma$  depende tanto de su unión a la APP como su capacidad de dimerizar (Sumioka et al., 2005).

7. AICD no posee una estructura plegada definida, aunque existen regiones con estructura transiente. Estas incluyen un *cluster* hidrofóbico entre la Iso<sup>656</sup> y la Val<sup>667</sup>, un *helix capping box* N-terminal en la región <sup>667</sup>VTPEER<sup>672</sup>, un  $\beta$ -*turn* tipo I en los aminoácidos <sup>684</sup>NPTY<sup>687</sup> y hélices nacientes para los residuos <sup>664</sup>DAA<sup>666</sup>, <sup>675</sup>SKMQQNGYE<sup>683</sup> y <sup>688</sup>KFFEQM<sup>693</sup>. Se han identificado puentes de hidrógeno transientes entre el protón de la amida Asp<sup>666</sup> y el carboxilato del Glu<sup>664</sup> y entre el protón de la amida Thr<sup>668</sup> y el carboxilato del Glu<sup>671</sup>. Todas estas características son estructuras relativamente inestables en rápido equilibrio con el estado no plegado. Esto se asemeja mucho a los estados más tempranos del plegamiento de proteínas. El plegamiento final parece ocurrir sólo tras la unión a sus parejas citoplasmáticas, permitiendo las etapas finales del plegamiento, en el que algunas características son mantenidas y estabilizadas por la unión, mientras que otras pueden reordenarse sin un alto costo energético (Ramelot et al., 2000).

8. La fosforilación de la Thr<sup>668</sup> produce un cambio conformacional que cambia los patrones de puentes de hidrógeno presentes en la región del *capping box*. Este cambio estabiliza la conformación *cis* de la Pro<sup>669</sup>, inicialmente toda en *trans*, lo que actuaría como un interruptor para determinar su unión a un grupo u otro de proteínas citoplasmáticas (Kroenke et al., 1997).

De acuerdo con los antecedentes descritos anteriormente la hipótesis de este trabajo de tesis es la siguiente:

## 2. HIPÓTESIS

A partir de la construcción de un modelo del dominio de interacción a fosfotirosina C-terminal de Fe65 (PTB2) humano y el diseño de un segmento de la región C-terminal de APP (AICD) que experimentalmente se ha descrito como indispensable para la interacción con Fe65 (<sup>684</sup>NPTY<sup>687</sup>), es posible describir el mecanismo molecular que determine la selectividad que posee el dominio PTB2 para interaccionar con AICD, y así justificar desde el punto de vista estructural la importancia de los aminoácidos que han sido determinados experimentalmente como relevantes en este mecanismo diferencial de interacción y establecer su importancia en la formación del complejo. Además, se podrá definir el sitio de unión de un segmento de AICD que comprende la secuencia aminoacídica <sup>667</sup>VTPEER<sup>672</sup> en la proteína adaptadora 14-3-3  $\gamma$ , la que parece tener un papel en la alta afinidad con que FE65 une a APP.

## 3. OBJETIVO GENERAL

A partir de la información estructural disponible de este sistema, se propone el diseño por homología de modelos de AICD (secuencia QNGYENPTYK), PTB2, 14-3-3 $\gamma$  y AICD (secuencia VTPEERHLS) humanas, con el objeto de, mediante técnicas de predicción de interacciones proteína-péptido basadas en estudios de *docking*, dilucidar la estructura tridimensional del complejo AICD-PTB2 y de manera similar determinar el sitio de unión de AICD en 14-3-3 $\gamma$ .

#### 4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Construir un modelo por homología del dominio de interacción a fosfotirosina C-terminal de Fe65 (PTB2)
- 2) Refinar el modelo por homología de PTB2
- 3) Construir un modelo por homología de un segmento de la región C-terminal de APP (AICD1) correspondiente a la región de interacción con Fe65 (PTB2)
- 4) Refinar del modelo por homología de AICD1
- 5) Diseñar el complejo formado por PTB2-AICD1
- 6) Realizar simulaciones de Dinámica molecular del complejo formado por PTB2-AICD1
- 7) Describir la superficie de interacción entre PTB2 y AICD
- 8) Construir un modelo por homología de la proteína chaperona 14-3-3  $\gamma$
- 9) Refinar el modelo por homología de 14-3-3  $\gamma$
- 10) Construir un modelo por homología de un segmento de la región C-terminal de APP (AICD2) correspondiente a la región de interacción con 14-3-3  $\gamma$
- 11) Diseñar el complejo formado por 14-3-3  $\gamma$  -AICD2

## 2. TEORÍA Y METODOLOGÍA

Para que el proceso de selección en cualquiera de las aproximaciones al fenómeno de interacción entre dos proteínas sea confiable, es crítico contar con un método de evaluación de todas las soluciones encontradas independiente de la vía utilizada para obtenerlas. El camino lógico a seguir es la evaluación de la estabilidad de la interfaz de interacción mediante modelos físicos y/o empíricos (modelos basados en estudios estadísticos de interfaces Proteína-Proteína) capaces de describirla y determinar de esta manera que complejo es más estable respecto a los demás. Se han definido múltiples modelos capaces de interpretar las distintas interacciones y fenómenos involucrados en el proceso calculando una aproximación de la energía libre de asociación. Debido a la capacidad computacional que existe hoy en día es casi imposible tratar a estos sistemas desde un punto de vista cuántico, dado el gran número de átomos involucrados en estos sistemas, por lo que generalmente se han utilizado modelos mecánico moleculares con este propósito.

Dependiendo del grado de sofisticación deseado se han diseñado distintas funciones de evaluación, de las cuales algunas han sido implementadas en los diversos programas de *docking* existentes. En su gran mayoría los programas de *docking* utilizan estas funciones implementadas como distintos campos de fuerza para describir las interacciones que a priori se entienden como esenciales en una interacción proteína-proteína, ya sean las de tipo electrostática, Van Der Waals, puentes de hidrógeno, hidrofóbicas y el efecto entrópico debido a la desolvatación producto de la interacción. También existen modelos en los cuales se formulan aproximaciones utilizando componentes de tipo experimental, como por ejemplo la función de energía de AutoDock3.0.5 (Morris et al., 1998), la que a partir de un enorme análisis de complejos cristalizados se ha logrado parametrizar una función semiempírica para evaluar las distintas soluciones obtenidas al final de cada simulación de *docking*. Otro ejemplo es la función de evaluación utilizada por HADDOCK (Domínguez et al., 2003) la cual está basada en la función y parámetros del campo de fuerza OPLS - *all atoms*.

AutoDock3.0.5 hasta el momento es uno de los programas de *docking* más utilizados para el diseño de nuevas drogas basadas en estudios estructurales debido a su excelente desempeño en la predicción de modos de interacción. Actualmente se ha ido incrementando el interés en su aplicación en problemáticas de tipo péptido-proteína con resultados que no son despreciables (Friedman et al., 1994; Csaba et al., 2002). A partir de esto se presenta aquí una breve descripción de la teoría implicada en la metodología empleada por AutoDock3.0.5 para predecir modos conformacionales de interacción, programa utilizado en esta tesis.

## 2.1 AutoDock

Este programa de *docking* está basado en un modelo detallado de las interacciones intermoleculares no covalentes presentes en una interacción. Para la resolución del problema de optimización que implica un gran muestreo conformacional cuenta con tres alternativas:

La primera basada en un algoritmo genético (AG) utilizado generalmente para explorar la superficie de la proteína o un gran sitio de interacción, otra en Monte Carlo Simulated-Annealing (MCSA) utilizado para optimizar aquellas soluciones obtenidas luego de una exploración global de la proteína, y el último basado en un algoritmo genético Lamarkiano (AGL) el cual es capaz de desempeñar una búsqueda global seguida de una búsqueda local a modo de optimización de las mejores soluciones encontradas en cada corrida del *docking*. El método implementado en este trabajo fue AGL.

Debido a la dificultad de encontrar una correlación entre la afinidad de un compuesto y la energía libre de interacción determinada por métodos mecánico moleculares, o sea predecir de alguna manera la constante de afinidad de un compuesto, se ha desarrollado una función empírica de evaluación basada en un estudio de múltiples complejos cristalizados cuyas constantes de afinidad han sido determinadas experimentalmente, obteniendo así una relación empírica entre la estructura molecular y la energía libre de interacción.

Esta función tiene como base una expansión de la que es considerada la función principal para modelar la energía libre de interacción al añadir términos entrópicos a la ecuación:

$$\Delta G = \Delta G_{vdw} + \Delta G_{pteh} + \Delta G_{elec} + \Delta G_{conform} + \Delta G_{tor} + \Delta G_{sol}$$

donde los primeros cuatro términos son los típicos términos mecánico moleculares de dispersión/repulsión ( $\Delta G_{vdw}$ ), puente de hidrogeno ( $\Delta G_{pteh}$ ), electrostáticas ( $\Delta G_{elec}$ ) y desviaciones de la geometría covalente ( $\Delta G_{conform}$ ), mientras  $\Delta G_{tor}$  modela la restricción dada por los rotorez internos (enlaces simples entre átomos con hibridación  $sp^3$ ), junto con la rotación y traslación global. El término  $\Delta G_{sol}$  modela la desolvatación luego de la interacción, junto con el efecto hidrofóbico (cambio de la entropía soluto-solvente en la interfaz de interacción).

Tomando como función un modelo más detallado del ciclo termodinámico de Wesson y Eisenberg, fue desarrollada una función de energía a la cual se le incorporó una función para el término de desolvatación basado en la evaluación del volumen ocupado por los átomos de carbono del ligando junto con agregar un término constante a la función de puentes de hidrógeno modelando así la desolvatación de átomos polares. La forma de esta función de energía es la siguiente:

$$\begin{aligned} \Delta G_b = & \Delta G_{vwd} \sum_{i,j} \left( \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) \\ & + \Delta G_{pteh} \sum_{i,j} E(t) \left( \frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} + E_{pteh} \right) \\ & + \Delta G_{elec} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} + \Delta G_{tor} N_{tor} \\ & + \Delta G_{sol} \sum_{i,j} S_i V_j e^{(-r_{ij}^2/2\sigma^2)} \end{aligned}$$

donde los cinco términos  $\Delta G$  son coeficientes determinados empíricamente mediante un análisis por regresión lineal de un grupo de complejos ligando-proteína con constante de unión conocida. Las contribuciones al vacío incluyen 3 términos energéticos: un término 12-6 de dispersión/repulsión de Lennard-Jones, un término direccional 12-10 para los puentes de hidrógeno, en el cual  $E(t)$  corresponde al parámetro direccional dependiente del ángulo  $t$  definido entre el átomo de prueba y el del receptor y un término para describir el potencial electrostático Coulombico.  $N_{tor}$  es un término que intenta describir la pérdida de entropía

conformacional por parte del ligando luego de la interacción. Este término es proporcional al número de enlaces simples que este posee.

Cuando contamos con un número reducido de soluciones y se vuelve difícil discriminar entre éstas, existen métodos cuya sofisticación permite evaluar y obtener información más detallada de la energía libre de interacción entre dos sistemas. Entre éstas existen metodologías tales como LIE (Linear Interaction Energy) (Åqvist et al., 1994) en el que se utiliza una representación explícita del solvente (agua), y por otra parte tenemos aquellas derivadas de los modelos de solvatación implícita como por ejemplo MMPB-SA (Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area) (Kollman et al., 2000) y MMGB-SA (Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area) (Zhang et al., 2001).

En este trabajo, para los casos en que las energías resultantes del Docking con Autodock sean similares para distintos modos conformacionales de interacción, se utilizó MMGB-SA para la determinación de energías libres de interacción, como método auxiliar en la discriminación de las posibles soluciones para los complejos y en el estudio de barrido de Alaninas (descrito más adelante). A continuación se presenta una breve descripción del método MMGB-SA ampliamente utilizados hoy en día debido a la velocidad de cálculo en su ejecución. (Feig et al., 2004)

## 2.2 MMGB-SA

La estimación de la energía libre de un complejo a través de este método está representada en la siguiente ecuación:

$$\Delta\bar{G} = \bar{G}_{\text{complejo}} - \bar{G}_{\text{proteína}} - \bar{G}_{\text{ligando}} \quad (1)$$

donde  $\bar{G}_{\text{complejo}}$  corresponde al promedio de la energía libre calculada a partir de un conjunto de estructuras del complejo obtenidas de una dinámica molecular, de igual manera  $\bar{G}_{\text{proteína}}$  y  $\bar{G}_{\text{ligando}}$  son el promedio de la energía libre de un conjunto de estructuras de la proteína y el ligando libres.



La particularidad de este método trasciende en el cálculo de la energía libre de cada uno de los sistemas (complejo, proteína, ligando) mediante la siguiente ecuación:

$$\bar{G}_x = \bar{E}_{MM} + \bar{G}_{GBSA} - TS_{MM} \quad (2) \quad ; \quad x = \text{complejo, proteína libre, ligando libre}$$

donde  $\bar{E}_{MM}$  corresponde a la energía promedio de cada sistema calculada a través de mecánica molecular la cual dependerá de la función que utilice cada campo de fuerza para representar sus variables,

$$\bar{E}_{MM} = \bar{E}_{enlaces} + \bar{E}_{ángulos} + \bar{E}_{torsiones} + \bar{E}_{vdw} + \bar{E}_{elec} \quad (3)$$

$-TS_{MM}$  es la entropía del soluto la que puede ser calculada a partir de un análisis de los modos normales a partir de la trayectoria.

$\bar{G}_{GBSA}$  Corresponde a la energía libre electrostática de desolvatación, la cual es calculada a partir de la diferencia entre la energía libre electrostática en el vacío y en solución:

$$\Delta G_{solvatación}^{elec} = G_{elec}^{\varepsilon=80} - G_{elec}^{\varepsilon=1} \quad (4)$$

siendo  $\varepsilon$  la constante dieléctrica cuyo valor es 80 en agua y 1 al interior de la proteína (se asume este valor a pesar de que realmente depende del interior de la proteína y puede ir de 1 a 9).

El cálculo de la energía libre electrostática a ambas constantes dieléctricas se obtiene a partir del formalismo generalizado de Born (GB), donde a partir del modelo de solvatación de Born para una carga distribuida en una esfera de radio  $R$ , que se encuentra embebida en un medio con una constante dieléctrica  $\varepsilon$ , dado por la siguiente expresión:

$$\Delta G_{solvatación}^{elec} = -\frac{q^2}{2R} \left( 1 - \frac{1}{\varepsilon} \right) \quad (5)$$

se desarrolla un modelo capaz de calcular la energía libre electrostática de desolvatación para un sistema poliatómico tal como una proteína por ejemplo, dada por la siguiente ecuación:

$$\Delta G_{\text{solvatación}}^{\text{elec}} = -\frac{1}{2} \left(1 - \frac{1}{\epsilon}\right) \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{\sqrt{r_{ij}^2 + \alpha_i \alpha_j} \exp(-r_{ij}^2 / F \alpha_i \alpha_j)} \quad (6)$$

donde  $r_{ij}$  es la distancia entre los átomos  $i$  y  $j$ ,  $q_i$  y  $q_j$  son sus respectivas cargas parciales, y  $\alpha$  es el radio efectivo, conocido también como el radio generalizado de Born el cual corresponde a la distancia entre el átomo correspondiente y el límite dieléctrico.  $F$  es un factor cuyo valor ha sido definido igual a 4. Es importante notar que este modelo no incluye ninguna expresión que represente de manera alguna el efecto iónico debido a la presencia de sales.

En resumen, si calculamos a partir de la ecuación de GB (6) el potencial electrostático de un sistema utilizando como constante dieléctrica un valor de 1 y luego de 80, podremos calcular la energía libre electrostática de este, al vacío y en solvente implícito a partir de la ecuación (6) cuya diferencia nos entregará la energía libre electrostática de desolvatación (4). Si a esta energía le sumamos la calculada a partir de un campo de fuerza (correspondiendo a la energía interna del sistema) representada por la ecuación (3) y la entropía de éste, cuya contribución generalmente es pequeña comparada con la de las otras dos energías, podemos obtener una excelente aproximación de la energía libre del sistema (2). Si seguimos este procedimiento para el cálculo de la energía libre del ligando, la proteína y el complejo seremos capaces de calcular a partir de la ecuación (1) la energía libre de interacción. A modo de obtener una energía representativa de cada sistema y si consideramos que una proteína se ve reflejada por un ensamble de distintas distribuciones conformacionales en el tiempo es prudente realizar el cálculo sobre un conjunto de estructuras tanto para el ligando, la proteína y el complejo, y así obtener una energía libre promedio como la que se aplica en la ecuación (1).

## 2.3 Modelación por Homología

### 2.3.1 Construcción de un modelo por homología del dominio de interacción a fosfotirosina C-terminal de Fe65 (PTB2).

El modelo *in silico* de PTB2 fue diseñado a partir de una extensiva búsqueda de secuencias con una alta identidad respecto a la secuencia a modelar, para esto se utilizó FASTA (Servidor Fasta<sup>(1)</sup>) como servidor y el Protein Data Bank (PDB) (Berman et al., 2000) como base de datos para asegurar la existencia de una estructura tridimensional la que resultaría ser la plantilla para la construcción de PTB2. La estructura seleccionada corresponde a un archivo del dominio C-terminal de APBB2 de ratón resuelto a través de resonancia magnética nuclear (RMN). Debido a que este archivo contiene 20 estructuras, para seleccionar la que será utilizada como templado y la falta de información respecto a la calidad de cada una de éstas, se realizó un estudio de la calidad estereoquímica de cada uno de ellos usando Procheck (Laskowski et al., 2001) el que mediante una distribución de todos los ángulos  $\phi$  y  $\psi$  del modelo dentro de un gráfico permite analizar la aceptabilidad de este respecto a parámetros derivados de estructuras de proteínas de alta resolución; y el método DOPE (Discrete Optimizad Protein Energy) que corresponde a una aplicación de MODELLER8v1 (Sali et al., 2001) el cual a partir de la designación de potenciales estadísticos optimizados a cada aminoácido de un modelo, permite evaluar grupos de estos y comparar aquellas regiones más problemáticas. Otra aplicación a esta metodología es la evaluación de varios modelos de una misma proteína para así discriminar entre ellos desde un punto de vista del potencial estadístico total de éstas. La estructura seleccionada fue alineada usando un algoritmo de alineamiento global a través de un servidor cuyo programa es FASTA (Servidor Fasta<sup>(2)</sup>) el cual genera alineamientos de secuencias de proteínas y ácidos nucleicos de manera rápida a partir de la búsqueda de patrones de aminoácidos conocidos como k-tuples que coincidan entre ambas secuencias, en lugar de comparar residuos de manera individual (Mount, 2001). A partir del alineamiento fueron generados 300 modelos por homología mediante la optimización de un gran número restricciones espaciales internas extraídas del templado y sus bases de datos usando el programa MODELLER8v1, de los cuales fue seleccionado aquel con la función de densidad de probabilidad (FDP) de menor valor, donde esta función objetivo representa a cada restricción espacial optimizada (Sali et al., 1993). Debido a que el modelo de salida de MODELLER8v1 no posee hidrógenos, éstos fueron asignados asumiendo un medio de pH = 7 utilizando el módulo Biopolymer de INSIGHTII (InsightII). La calidad estereoquímica

del modelo con hidrógenos de PTB2 fue analizada con Procheck. El modelo fue sometido a una optimización de las posiciones de los hidrógenos manteniendo el resto del dominio fijo asegurando así una correcta orientación de los hidrógenos. La optimización fue realizada usando el modulo Discover3 de INSIGHTII, donde la energía fue minimizada con gradientes conjugados como método durante 500 pasos.

### **2.3.2 Construcción de un modelo por homología de un segmento de la región C-terminal de APP (AICD1) correspondiente a la región de interacción con Fe65 (PTB2).**

Para el diseño de un modelo de un segmento peptídico de 10 aminoácidos (QNGYENPTYK) de AICD que contiene integrada la secuencia YENPTY descrita como esencial para que ocurra la interacción con PTB2, se utilizó como templado el segmento cristalizado de 12 aminoácidos de AICD humana en complejo a un dominio de tipo PTB que forma parte de la proteína X11 (código PDB = 1x11), la cual cuenta con las características estructurales esenciales descritas para interaccionar con PTB2, entre ellas un  $\beta$ -turn tipo I en los aminoácidos <sup>684</sup>NPTY<sup>687</sup>.

Al igual que en el diseño de un modelo para PTB2, aquí fueron generados con MODELLER8v1 300 estructuras, seleccionando aquella con menor valor de FDP. Los hidrógenos fueron asignados asumiendo un medio de pH = 7 utilizando el modulo Biopolymer de INSIGHTII. Debido a que el modelo obtenido posee las características estructurales necesarias para generar el complejo, la estructura no fue minimizada libremente para no perder la integridad de la estructura secundaria, para lo cual se mantuvo rígido el esqueleto peptídico. Los hidrógenos fueron minimizados para optimizar su geometría utilizando el modulo Discover3 de INSIGHTII usando gradientes conjugados como método, durante 500 pasos.

### **2.3.3 Construcción de un modelo por homología de un monómero de la proteína 14-3-3 $\gamma$ .**

14-3-3 $\gamma$  es un dímero cuya estructura cristalina está resuelta mediante difracción de rayos X con una resolución de 2.55 Å la que se encuentra almacenada en el Protein Data Bank bajo el código pdb 2B05 (humana). Debido a que generalmente las estructuras cristalinas poseen defectos como átomos faltantes, distancias, ángulos y ángulos diedros prohibitivos, se procedió a generar un modelo por homología con MODELLER8v1 de una subunidad de 14-3-3 $\gamma$ , usando

como plantilla aquel monómero (de los 6 presentes en el archivo pdb) con mejor calidad estereoquímica a partir de un análisis con PROCHECK. Se generaron 300 modelos de los cuales fue seleccionado aquel con menor FDP. Los hidrógenos fueron asignados usando en modulo Biopolymer de INSIGHTII asumiendo un pH = 7 y luego estos fueron optimizados manteniendo fijo el resto de la proteína usando el modulo Discover 3 mediante gradientes conjugados durante 500 pasos.

#### **2.3.4 Construcción de un modelo por homología de un segmento de la región C-terminal de APP (AICD2) correspondiente a la región de interacción con 14-3-3 $\gamma$ .**

Debido a que para este pequeño segmento peptídico no existe estructura cristalina ni resuelta por RMN, se utilizó un segmento de 9 aminoácidos de una proteína represora de triptófano, segmento que posee una estructura secundaria definida como *N-Terminal Helix Capping Box*, la cual según un estudio realizado sobre AICD mediante técnicas de resolución RMN multidimensional corresponde a la estructura secundaria de este segmento.

Una vez alineadas las secuencias manualmente se procedió a generar 300 modelos por homología seleccionando aquel con menor FDP. Los hidrógenos fueron agregados asumiendo un medio de pH = 7 mediante el modulo Byopolimer y luego fueron optimizados manteniendo el monómero fijo usando Discover 3 con gradientes conjugados como método por 500 pasos.

#### **2.3.5 Construcción de un modelo de la región expuesta al citoplasma de un fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (4,5 PIP).**

Para el diseño *in silico* de la estructura orgánica de este compuesto se utilizó el programa Gaussview. La optimización geométrica y la determinación de las cargas ESP que serán asignadas para el docking, fueron calculadas usando el programa Gaussian98 (Frisch, 1998) mediante el método semiempírico PM3.

## 2.4 Docking

### 2.4.1 Predicción del complejo formado por PTB2-AICD1.

La búsqueda de un posible sitio de interacción fue realizada mediante una técnica basada en métodos de *docking* conocida como *docking* a Ciegas la cual consiste en la definición de un espacio conformacional de búsqueda que abarca la totalidad de la proteína con el objeto de encontrar una región en la proteína con un mayor número de soluciones que converjan en una menor energía de interacción relativa a la función de evaluación del programa. En este caso el programa de elección para la problemática presentada fue AutoDock3.0.5, debido a su rápida convergencia gracias a la implementación de un algoritmo de búsqueda global, basado en un algoritmo genético conocido por ser una excelente herramienta para la resolución de complejos problemas de optimización de soluciones como es el caso de la predicción de modos de interacción.

Las cargas parciales fueron asignadas al Receptor y Ligando a través de INSIGHTII usando como campo de fuerza CVFF.

Los parámetros definidos para el algoritmo genético en el docking a ciegas fue una población inicial de 50 individuos, un número máximo de evaluaciones de energía de 1000000, un número máximo de generaciones de 27000, número de individuos con mejor perfil energético que sobreviven a la próxima generación sin modificaciones igual a 1, probabilidad de mutación y *crossover* de 0,02 y 0,08, respectivamente. El número de corridas fue de 250.

La grilla es el sistema mediante el cual AutoDock3.0.5 define el espacio de búsqueda de posibles configuraciones espaciales entre el ligando y el receptor. Las dimensiones de la grilla fueron definidas a 120 Å en las tres dimensiones. La grilla fue centrada en el centro de masa del modelo de PTB2.

Una vez definido el sitio de interacción se procedió a realizar una exhaustiva búsqueda de posibles conformaciones en éste, con el propósito de generar un conjunto de modos de interacción mediante un aumento en las exigencias en los criterios de término para el algoritmo genético. Para esto fue se utilizó nuevamente el programa AutoDock3.0.5.

La grilla fue definida en el sitio de interacción centrada en el azufre de la Cys<sup>654</sup>. Las dimensiones de la grilla fueron de 80 Å en todas las dimensiones abarcando en su totalidad el sitio de interacción determinado.

En esta etapa de la predicción, los parámetros definidos para la búsqueda global fue una población inicial de 50 individuos, un número máximo de evaluaciones de energía de 1500000, un número máximo de generaciones de 50000, número de individuos con mejor perfil energético que sobreviven a la próxima generación sin modificaciones igual a 1, probabilidad de mutación y *crossover* de 0,02 y 0,08, respectivamente. Para la búsqueda local la probabilidad fue de 0,06. El número de corridas fue de 100.

Una vez generado el conjunto de conformaciones, fueron agrupadas todas las soluciones de menor energía. El criterio de selección fue tomar la menor energía obtenida y agrupar todas aquellas soluciones cuya energía no fuera mayor a 3 kcal·mol<sup>-1</sup> respecto a ésta, de manera que el promedio de las energías de las soluciones agrupadas no sea superior ni inferior a 1,5 kcal·mol<sup>-1</sup> respecto a la mejor y a la peor energía seleccionada y así establecer que no hayan cambios significativos en lo que sería la afinidad por el receptor de las soluciones seleccionadas. Éste será el criterio de selección en todas las corridas de AutoDock3.0.5. De este grupo de soluciones seleccionadas se eligió aquella cuya conformación permitiera la mayor formación de puentes de hidrógeno.

Finalmente, el complejo seleccionado fue refinado con GROMACS3.3, mediante una leve minimización en solvente explícito (TIP4P), usando como método gradiente conjugado. Luego, el complejo solvatado fue equilibrado manteniendo la proteína armónicamente restringida a partir de una pequeña dinámica de 100 ps, usando como campo de fuerza OPLS *all-atoms* y luego se generaron 250 ps de dinámica sin restricciones usando el mismo campo de fuerza. El propósito de la etapa de refinamiento es la simulación de los pequeños cambios conformacionales locales en el receptor producto de la unión, permitiendo a ligando y receptor completa flexibilidad para acomodar sus cadenas laterales en búsqueda de un mínimo energético representativo del complejo real.

#### **2.4.2 Predicción del complejo formado por PTB2<sub>C654F</sub> -AICD1.**

El modelo de PTB2 con la Cys<sup>654</sup> mutada por una Fenilalanina (PTB2<sub>C654F</sub>) fue generado utilizando el programa YASARA (Krieger et al., 2002) a partir del modelo de PTB2 utilizado a lo largo de este trabajo. Una vez generada la estructura tridimensional, ésta fue minimizada con YASARA mediante la metodología de *Monte Carlo Simulated Annealing* (MCSA) manteniendo fijo el esqueleto peptídico, con el objeto de estabilizar el entorno local de la nueva cadena lateral que se ha visto alterado por la presencia de ésta. El modelo de AICD1 usado es el mismo que fue utilizado para la predicción del complejo anterior.

La predicción del modo conformacional de interacción fue llevada a cabo con AutoDock3.0.5. Los parámetros utilizados para el *docking* fueron los mismos que se utilizaron para el *docking* de PTB2 nativo (sin mutaciones) con AICD1 luego de identificar el sitio de interacción.

#### **2.4.3 Predicción del complejo formado por 14-3-3 $\gamma$ -AICD2.**

Debido a que en este caso se posee una menor cantidad de información estructural respecto al complejo como por ejemplo mutaciones sitio dirigidas que indiquen de manera aproximada la ubicación del sitio de interacción, se utilizó la misma metodología anterior, conocida como *docking* a Ciegas, pero con la problemática de que el tamaño máximo de grilla que permite AutoDock3.0.5 no abarca la totalidad del monómero. Como solución a este obstáculo se generaron tres grillas diferentes las cuales fueron distribuidas de manera que abarquen la totalidad de la superficie de la proteína.

Para cada grilla los parámetros de *docking* fueron los mismos para de esta manera mantener una igualdad de condiciones al momento de analizar las soluciones. Cada grilla posee un tamaño de 126 Å<sup>3</sup>. Los parámetros definidos fueron una población inicial de 50 individuos, un número máximo de evaluaciones de energía de 1500000, un número máximo de generaciones de 50000, número de individuos con mejor perfil energético que sobreviven a la próxima generación sin modificaciones igual a 1, probabilidad de mutación y *crossover* de 0,02 y 0,08 respectivamente. Para la búsqueda local la probabilidad fue de 0,06. El número de corridas fue de 100 por grilla. Para cada grilla las soluciones obtenidas fueron clasificadas según su energía, seleccionando así



aquellas de menor energía respecto a la función de evaluación de Autodock3.0.5, generando de esta manera tres grupos de soluciones, uno por cada grilla.

Debido a la falta de información experimental que permita mejorar el criterio de selección y confirmar de alguna manera el sitio interacción determinado, se procedió a determinar de manera auxiliar las energías de interacción por el método MMGB para todas las soluciones seleccionadas en la etapa anterior. Estas energías de interacción serán interpretadas de manera cualitativa, donde será considerada como mejor solución aquellas que posea la menor energía de interacción según este método.

#### **2.4.4 Predicción del complejo formado por PTB2-4,5 PIP.**

De manera similar a los casos anteriores, especialmente el de 14-3-3 $\gamma$ , no existe información experimental que evidencie un putativo sitio de interacción del fosfoinositido, por lo cual se procede de la misma manera, a través de un *docking* a ciegas.

Las cargas parciales fueron asignadas al Receptor con el programa INSIGHTII usando como campo de fuerza CVFF. Las cargas parciales asignadas al ligando fueron cargas de tipo ESP. Se generó una grilla de 120 Å<sup>3</sup> centrada en el centro de masa de PTB2.

Gracias a que el ligando de esta problemática es pequeño, es posible realizar una búsqueda exhaustiva de un posible modo de interacción utilizando parámetros de término del *docking* más exigentes y así lograr un mejor barrido del espacio conformacional de posibles soluciones. De esta manera fue definida una población inicial de 100 individuos, un número máximo de evaluaciones de energía de 1800000, un número máximo de generaciones de 50000, número de individuos con mejor perfil energético que sobreviven a la próxima generación sin modificaciones igual a 1, probabilidad de mutación y *crossover* de 0,02 y 0,08, respectivamente. Para la búsqueda local la probabilidad definida fue de 0,06. El número de corridas fue de 300.

De las 300 conformaciones fueron seleccionadas sólo aquellas de menor energía. De este grupo se determinó la posible convergencia en un sitio específico de interacción por parte de las

soluciones determinadas, formando un subgrupo con esas soluciones. Finalmente, se tomó aquella solución de menor energía del subgrupo formado anteriormente.

## 2.5 Alanine Scanning (Barrido de alaninas)

A partir de la solución final para el complejo formado por PTB2 y AICD1, se realizó un estudio de barrido de alaninas, el cual consiste en mutar todos aquellos aminoácidos potencialmente importantes para la interacción y analizar su participación en el sitio de unión a partir del estudio de su contribución energética en el sistema, todo esto relativo a la estructura nativa.

La metodología empleada para construir el listado de aminoácidos a mutar se realiza a partir de un análisis de la interfaz de interacción mediante el cálculo de un parámetro de energía libre de interacción ( $\Delta G_b$ ) basado en los cambios del área de la superficie accesible a solvente ( $\Delta ASA$ ) luego de la formación del complejo. Esta idea se basa en el hecho de que todos aquellos aminoácidos que sufren un cambio en su área de accesibilidad a solvente luego de la formación del complejo fueron desolvatados en el proceso y en consecuencia forman parte de la interfaz de interacción. Este hecho no implica que estén directamente involucrados en alguna interacción no covalente importante con el ligando al momento de formar el complejo. Para este cálculo se utilizó el programa *STC (Structural Thermodynamics Calculations)* (Lavigne et al., 2000). Generado el listado de aminoácidos a mutar se procede a modelar el conjunto de estructuras de PTB2 mutantes con la ayuda del programa YASARA. Posteriormente se minimiza cada complejo mutado (el nativo no, ya que ha sido previamente minimizado) para relajar al sistema luego del cambio en su secuencia usando para esto el programa de simulación molecular CHARMM empleando como método gradientes conjugados por 200 pasos. Finalizada la etapa de minimización se continúa con una pequeña dinámica molecular de 10 ps (picosegundos) de cuya trayectoria saldrá el ensamble de estructuras a analizar, todo esto también con CHARMM. Finalmente con la ayuda del paquete de *scripts* MMTSB se procede a analizar la trayectoria mediante la generación de veinte ensambles, de los cuales cada uno contiene las coordenadas de la proteína libre, el ligando libre y el complejo, correspondientes a cada medio ps de la trayectoria (500 fs). Los cálculos de  $\Delta G_b$  para cada ensamble son realizados mediante el método

MMGB, donde las veinte energías obtenidas (una por cada ensamble) serán promediadas obteniendo una energía de interacción final para el sistema respectivo.

El  $\Delta\Delta G_b$  será calculado a partir de la siguiente ecuación:

$$\Delta\Delta G_b = ( \Delta G_{b-NATIVO} - \Delta G_{b-MUTANTE} )$$

donde  $\Delta G_{b-NATIVO}$  es la energía libre de interacción del complejo que no ha sido mutado y  $\Delta G_{b-MUTANTE}$  corresponde a la del complejo con PTB2 mutante. Si el  $\Delta\Delta G_b$  es mayor a cero (positivo) implica que el sistema mutante se ve favorecido termodinámicamente respecto al nativo o sea, el complejo se hace más estable luego del cambio en la secuencia aminoacídica. En caso que  $\Delta\Delta G_b$  es menor a cero (negativo), significa que la estabilidad desde el punto de vista termodinámico del complejo formado por PTB2 y AICD1 se ve disminuida producto de esa mutación en particular.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Modelación de dominio C-terminal PTB2

A partir de la secuencia de FE65 obtenida del Protein Information Resource (<http://pir.georgetown.edu/>) en la cual se identificó el dominio C-terminal de FE65 humana, cuya secuencia fue posteriormente ingresada al servidor FASTA, obteniendo como resultado varias secuencias con estructuras con alta homología a ésta, las que pertenecen a la familia de dominios PTB, correspondiente a la misma familia del dominio que se desea modelar. Los códigos PDB y la descripción del tipo de estructuras encontradas se presentan en la **Tabla 1**.

**Tabla 1. Listado de estructuras con identidad a PTB2.**

Estas fueron encontradas mediante la utilización del servidor FASTA. En color azul se puede observar la estructura con mejor identidad, la que corresponde al dominio PTB2 de FE65 en ratón.

PDB ID	Descripción	Nro. aa	Identidad (%)	Homología (%)
1WGU	Dominio PTB C-terminal de APBB2 de ratón	136	61,0	86,4
1DDM	Dominio PTB de NUMB (drosofila) unido a péptido NAK	135	30,435	55,652
1NMB	Dominio PTB de NUMB (drosofila) unido a fosfotirosina	160	30,435	55,652
1WJ1	Dominio PTB de NUMB (ratón)	156	24,576	57,627

Matriz utilizada	Blosum 50
------------------	-----------

Las cuatro estructuras fueron resueltas mediante Resonancia Magnética Nuclear, por lo que el parámetro de selección se basó finalmente en la identidad, es decir, 1WGU. Ésta consiste de un ensamble de 20 estructuras RMN. Los resultados del estudio con Procheck de cada una de estas se presenta en la **Tabla 2**.

Del análisis de la calidad estereoquímica del ensamble de estructuras NMR, fueron seleccionadas aquellas con un porcentaje de aminoácidos en regiones altamente favorables superior a un 85 %. A partir de este criterio fueron seleccionados tres posibles candidatas, las estructuras 7, 12 y 15.

Para discriminar la estructura que será la plantilla para la generación del modelo se determinó el perfil DOPE de cada una, cuyo gráfico se presenta en la **Figura 2**.

**Tabla 2. Resultados del gráfico de Ramachandran y G-Factor provenientes del ensamble NMR de WGU empleando Procheck.**

Del análisis estereoquímico del ensamble de estas estructuras se seleccionó finalmente la 7, 12, 15.

Estructura NMR	RAMACHANDRAN		Factor G : Angulos dihedro
	Región más permitida	Regiones Desfavorables	Promedio total
WGU_1	84,3% (91)*	0,9% (1)*	0,04
WGU_2	81,5% (88)	<b>0,0%</b>	0,01
WGU_3	82,4% (89)	0,9% (1)	0,01
WGU_4	83,3% (90)	<b>1,9%</b> (2)	0,03
WGU_5	83,3% (90)	<b>1,9%</b> (2)	0,03
WGU_6	83,3% (90)	<b>0,0%</b>	0,00
WGU_7	<b>85,2%</b> (92)	0,9% (1)	0,04
WGU_8	<b>77,8%</b> (84)	0,9% (1)	0,03
WGU_9	80,6% (87)	0,9% (1)	0,03
WGU_10	83,3% (90)	<b>0,0%</b>	0,03
WGU_11	81,5% (88)	<b>0,0%</b>	0,03
WGU_12	<b>88,9%</b> (96)	0,9% (1)	0,03
WGU_13	83,3% (90)	0,9% (1)	0,05
WGU_14	81,5% (88)	0,9% (1)	-0,01
WGU_15	<b>85,2%</b> (92)	<b>0,0%</b>	0,01
WGU_16	84,3% (91)	<b>0,0%</b>	0,02
WGU_17	84,3% (91)	<b>1,9%</b> (2)	0,04
WGU_18	81,5% (88)	0,9% (1)	0,01
WGU_19	84,3% (91)	<b>1,9%</b> (2)	0,02
WGU_20	80,6% (87)	<b>0,0%</b>	0,02

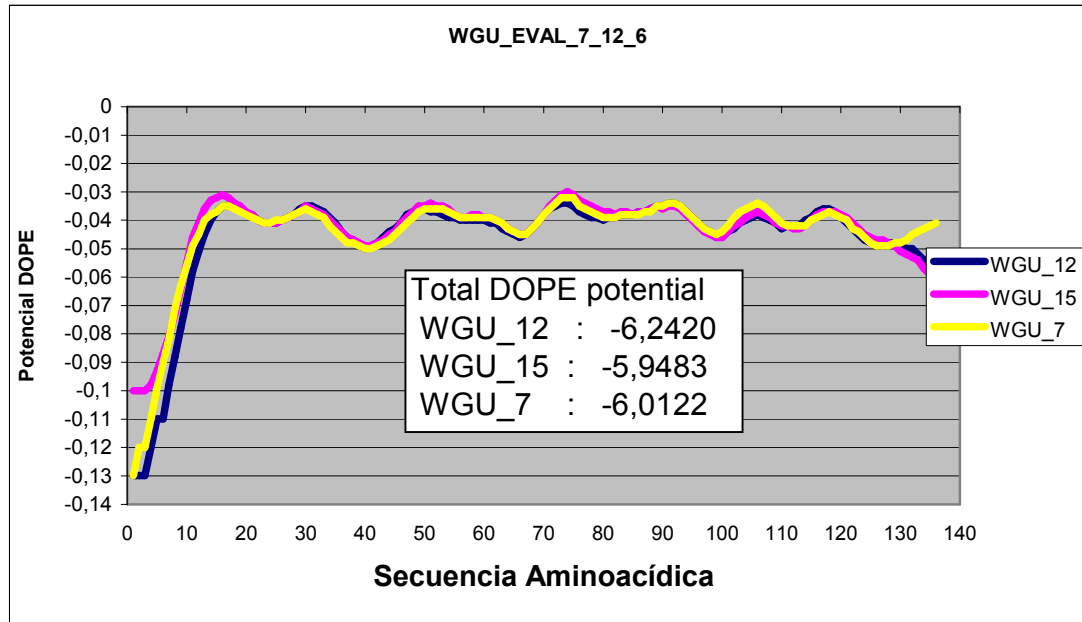
**Azul:** VALOR ACEPTABLE (sobre 85 %)

**Rojo:** VALOR INUSUAL

Para un modelo de buena calidad se espera un porcentaje sobre el 90% dentro de la región más favorecida.

Un valor menor a -0,5 en la distribución de los ángulos diedros es considerado inusual. Menor a -1,0 es considerada altamente inusual.

\* ( ) Número de aminoácidos

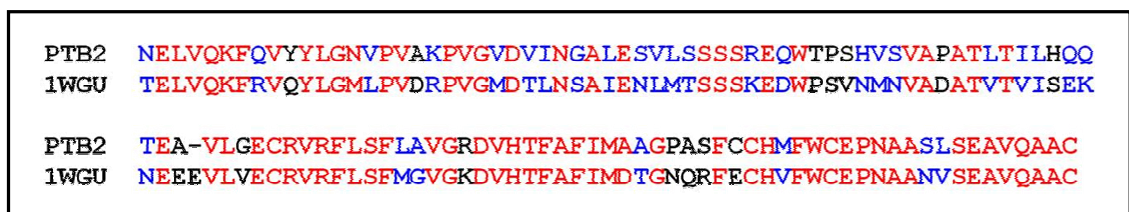


**Figura 2. Gráfico del perfil de potencial estadístico WGU\_7, WGU\_15, WGU\_12.**

Estas estructuras fueron seleccionadas a partir de un estudio de su calidad estereoquímica usando Procheck.

El perfil del potencial estadístico de las tres estructuras resulto ser similar, por lo que finalmente se seleccionó aquella con menor potencial total, la que corresponde a WGU\_12.

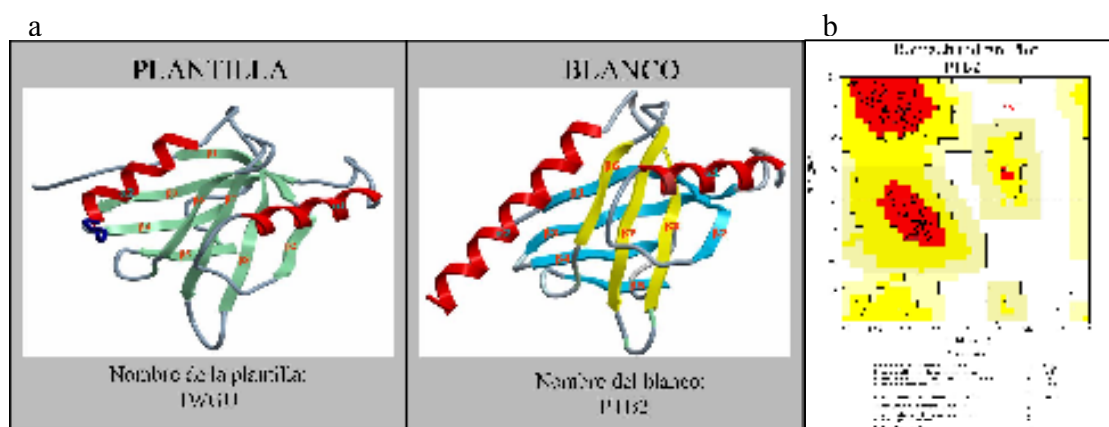
El alineamiento obtenido mediante el servidor de alineamiento global FASTA entre la secuencia de PTB2 humano y PTB2 ratón quedó con una identidad de un 61% y una homología de un 86%. El alineamiento de las secuencias se presenta en la **Figura 3**.



**Figura 3. Alineamiento global de las secuencias del dominio C-terminal de FE65 (PTB2) y la secuencia del dominio PTB de FE65 de ratón.**

Este alineamiento será utilizado para construir el modelo. Los aminoácidos en color rojo son aquellos idénticos entre ambas secuencias y los de color azul son aquellos aminoácidos similares (homólogos) entre ambas secuencias.

A partir del alineamiento de la secuencia y estructura seleccionada se procedió a la construcción de un modelo tridimensional de PTB2, usando el programa MODELLER8v1. El modelo resultante presentó el plegamiento típico de esta superfamilia de estructuras, correspondiente al de tipo PH (primero visto en los dominios con homología a Pleckstrina, “*Plecktrine Homology*”), el cual consiste en una estructura central formada por ocho hebras  $\beta$  distribuidas en dos sábanas  $\beta$  antiparalelas y casi ortogonales entre si, y una  $\alpha$  hélice C-terminal.



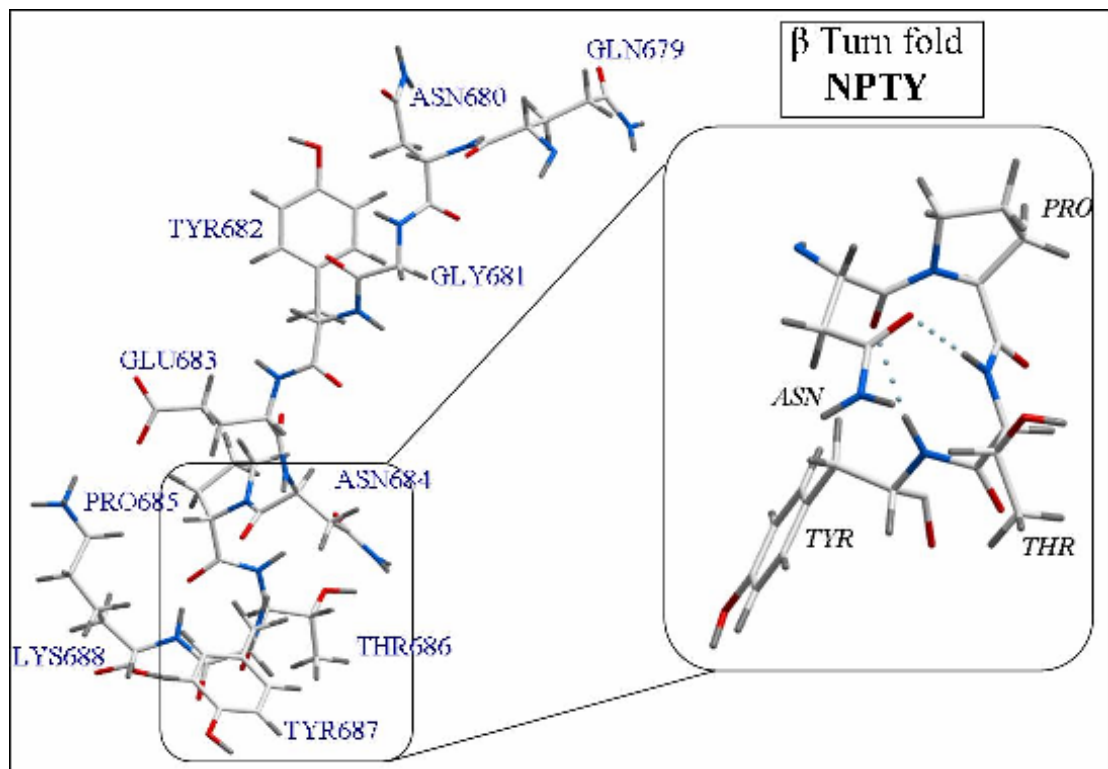
**Figura 4. Modelo de PTB2 y su gráfico de Ramachandran.**

a) Representación de la estructura terciaria de la plantilla y el blanco modelado estructura secundaria es representada por cintas. b) Gráfico de Ramachandran del modelo de PTB2.

Del gráfico de Ramachandran (**Figura 4 b**), obtenido del modelo luego de agregarle los hidrógenos y su optimización, se puede inferir una alta calidad estereoquímica del modelo con un valor de 94% de los aminoácidos dentro de las regiones favorables para los ángulos  $\phi$  y  $\psi$  correspondiendo a una alta calidad por parte del modelo y tan solo un aminoácido en una región no favorable, que según se observa en la Figura corresponde a la Ser<sup>37</sup>, pero afortunadamente ésta no está involucrada en el sitio de interacción con AICD, sino en el loop entre  $\alpha 1$  y  $\beta 2$ . Esta posición le confiere una amplia flexibilidad a los ángulos  $\phi$  y  $\psi$ , llevándolos a un valor aleatorio quizás no favorable estadísticamente respecto a otras estructuras obtenidas por cristalografía.

### 3.2 Modelación del dominio AICD1 (secuencia-QNGYENPTYK)

A partir del segmento cristalizado de la región C Terminal de APP con el dominio PTB de X11, una proteína exclusiva de neuronas, fue posible obtener un modelo usando MODELLER8v1, el cual cuenta con características estructurales tales como los puentes de hidrógeno entre el esqueleto de la Pro<sup>685</sup> (según numeración de APP) y la cadena lateral de la Asn<sup>684</sup>, más aquel formado entre el esqueleto de la Thr<sup>686</sup> y la misma Asn<sup>684</sup> anterior, todas pertenecientes a la región de interacción, secuencia característica de internalización NPTY (NPxY) de AICD. Estos puentes de hidrógeno producen la formación del  $\beta$ -turn siendo la única estructura secundaria definida presente en este segmento (**Figura 5**), la cual se estabiliza al estar complejada con PTB2.



**Figura 5. Modelo de AICD.**

Éste comprende una región de 10 aminoácidos, la que incluye la secuencia de interacción por consenso, NPTY, considerada fundamental para la interacción con PTB2 junto con los dos aminoácidos que la anteceden, Glu<sup>681</sup> y Tyr<sup>680</sup>. A la derecha de la figura se puede apreciar la formación de un  $\beta$  turn, plegamiento formado por los aminoácidos Asn<sup>682</sup>, Pro<sup>683</sup>, Thr<sup>684</sup>, Tyr<sup>685</sup> (NPTY).



### 3.3 Modelación del complejo PTB2/AICD1

Ya construido el modelo de PTB2 y el segmento de 10 aminoácidos de AICD, se procedió a determinar la conformación de interacción más estable entre estos dos sistemas utilizando para ello la energía de *docking* y la energía libre de interacción  $\Delta G_b$ . De los resultados obtenidos fueron seleccionadas aquellas soluciones que se encuentran en un rango de energía final entre -11,0 y -14,0 kcal·mol<sup>-1</sup> y  $\Delta G_b$  entre -7,0 y -10,0 kcal·mol<sup>-1</sup>, como se muestra en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Resultados de la energía de *docking* y energía libre de interacción  $\Delta G_b$  para las soluciones seleccionadas del *docking* entre PTB2 y AICD a partir del cálculo realizado por AutoDock.

Numero de la solución	Energía de Docking (kcal·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G_b$ (kcal·mol <sup>-1</sup> )
6	-13,12	-8,74
25	-13,64	-9,28
36	-11,59	-8,08
38	-11,37	-7,91
53	-12,75	-8,19
63	-13,21	-9,63
96	-11,88	-7,64
136	-11,07	-7,38
178	-11,22	-7,45

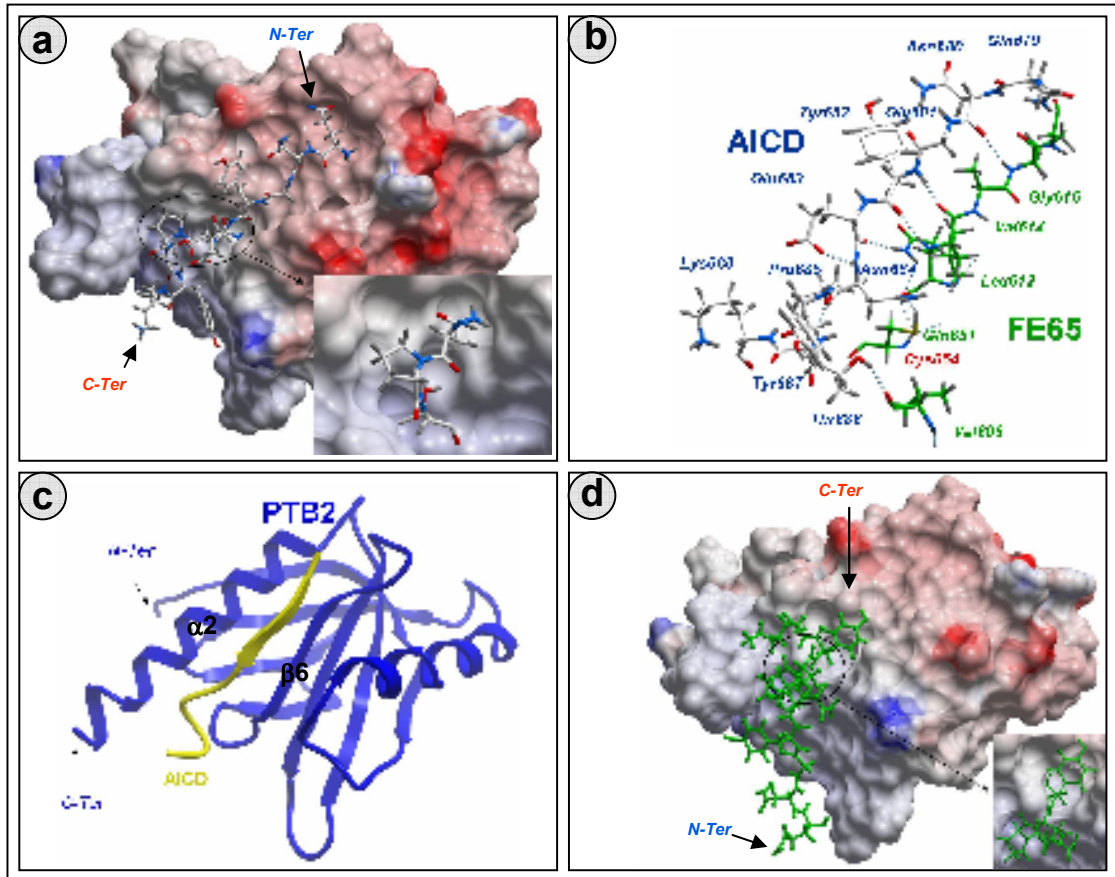
Todas las soluciones seleccionadas mostraron alta convergencia por un sitio formado por la hélice  $\alpha_2$  y la hebra  $\beta_6$  (ver **Figura 6c**). Las conformaciones 6, 25 y 63 corresponden a las de menor energía libre de interacción, las cuales poseen una desviación cuadrática media (RMSD) de 2,156 Å para todos los átomos y 0,1341 Å respecto al esqueleto (soluciones 6 y 25); 1,997 Å,  $6,900 \times 10^{-4}$  Å (soluciones 6 y 63); 1,312 Å, 0,1340 Å (soluciones 25 y 63), y una diferencia energética de no más de 1 kcal·mol<sup>-1</sup>, siendo estas soluciones las más representativas del sistema. Además de este criterio energético de selección, se utilizó la información obtenida de estructuras cristalinas de otros dominios PTB cristalizados junto con un segmento de AICD. Entre estos dominios se encuentra X11 y otro dominio citoplasmático con la secuencia de internalización NPTY (DAB-1 y 2) se pudo usar como criterio para desechar otras conformaciones el hecho de que en estos sistemas el sitio de interacción se encuentra entre una  $\alpha$  hélice y una hebra  $\beta$ , sitio que de manera análoga podemos encontrar en el modelo de PTB2 y así descartar las soluciones que se encuentran apartadas de éste. A partir de estas soluciones seleccionadas se realizaron un análisis visual y de geometría de formación de puentes de hidrógeno, usando ambos finalmente

se escogió la solución 6 debido a su disposición en el sitio de interacción, la cual permite una mayor formación de puentes de hidrógeno en comparación a las otras soluciones. Esta solución fue minimizada utilizando el programa GROMACS 3.1. De aquí, preliminarmente fue posible identificar a partir de un análisis visual, 6 aminoácidos de PTB2 que podrían estar asociados directamente a la interfaz de interacción. Entre éstos se encuentran Val<sup>606</sup>, Leu<sup>612</sup>, Val<sup>614</sup>, Gly<sup>615</sup>, Gln<sup>651</sup> y Cys<sup>654</sup>. De estos aminoácidos, se sabe que la Cys<sup>654</sup> se encuentra altamente conservada en todas las isoformas de FE65. Al mutar este aminoácido por Phe o Tyr, la interacción de FE65 con AICD se suprime completamente, pudiendo así cumplir un papel esencial en la interfaz de interacción con AICD como fue descrito en la introducción. Con el objeto de determinar el posible papel de Cys<sup>654</sup>, la cual forma parte del sitio de interacción se realizó un modelo de FE65 con la mutación Cys<sup>654</sup>Phe, de manera de simular *in silico* la mutagénesis sitio-dirigida realizada en estudios anteriores. Los resultados se presentan en la **Tabla 4**.

**Tabla 4. Resultados de la energía de *docking* y  $\Delta G_b$  para las soluciones seleccionadas del *docking* entre PTB2<sub>Cys<sup>654</sup>Phe</sub> y AICD a partir del cálculo realizado por AutoDock.**

Número de la solución	Energía de Docking (kcal·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G_b$ (kcal·mol <sup>-1</sup> )
20	-9,71	-6,66
28	-9,39	-6,71
64	-9,60	-4,83
73	-9,67	-5,13

De los resultados obtenidos se observa una conformación totalmente distinta a la obtenida con PTB2 nativo (PTB2<sub>N</sub>), las soluciones convergen principalmente en un sitio ubicado por debajo y desplazado del sitio de interacción propuesto para PTB2<sub>N</sub> y cuya orientación es opuesta a la de AICD1 desde N- a C-terminal de éste, ver **Figura 6d**. A partir de esto se realizó un análisis de la complementariedad espacial entre PTB2 y AICD para el sistema nativo y el mutante (PTB2<sub>Cys<sup>654</sup>Phe</sub>), mediante la representación de la superficie de potencial electrostático de ambos. Según este potencial ambas superficies de contacto son relativamente apolares. Sin embargo el resultado más importante aquí es la alta complementariedad de formas entre PTB2<sub>N</sub> y AICD1, siendo una región de AICD1 (correspondiente al  $\beta$ -turn (NPTY)) la que le permitiría a éste ubicarse dentro de un “bolsillo” en PTB2<sub>N</sub>; por el contrario al caso de PTB2<sub>Cys<sup>654</sup>Phe</sub> donde la presencia de Phe impide que AICD1 se ubique dentro del mismo sitio de interacción.



**Figura 6. Modelo del complejo entre PTB2<sub>N</sub>/AICD1 y de PTB2<sub>Cys<sup>654</sup>Phe</sub>/AICD1.**

a) Modelo del complejo entre PTB2 y AICD1 representado por una superficie de potencial electrostático y por palos y esferas respectivamente. b) Esquema detallado de los aminoácidos de interacción entre PTB2 (carbonos coloreados en verde) y AICD1 (carbonos coloreados en blanco). c) Modelo de AICD1 ubicada entre la  $\alpha$  hélice2 y la hebra  $\beta$ 6, constituyentes del sitio de interacción de PTB2. La estructura secundaria de éste se representa mediante cintas. d) Modelo de PTB2<sub>Cys<sup>654</sup>Phe</sub> y AICD1. En este caso en particular AICD1 no puede ingresar al sitio de interacción debido a la presencia de Phe, la cual elimina la complementariedad de forma entre AICD1 y PTB2.

### 3.3.1 Alanine Scanning

Para obtener un estudio más acabado respecto a la interfaz de interacción se realizó un estudio de *Alanine Scanning* (barrido de alanina) de aquellos aminoácidos identificados como participantes de la unión entre PTB2 y AICD1. Como método para determinar que aminoácidos participan de la interfaz de interacción se procede a calcular un parámetro de energía libre de interacción ( $\Delta G_b$ ) basado en los cambios en el área de la superficie accesible a solvente

( $\Delta$ ASAS) usando el programa *Structural Thermodynamics Calculations* (STC), calculada a partir de la diferencia entre el área de los monómeros (PTB2 y AICD1) y luego de la formación del complejo, o sea, si determinamos que aminoácidos sufren un cambio en su área de superficie accesible a solvente debido a la formación de este último, estaremos en presencia de un aminoácido que fue desolvatado en el proceso y en consecuencia, que forma parte de la interfaz de interacción. Los aminoácidos que resultaron formar parte de la zona de interacción se muestran en la **Tabla 5**, de los cuales coinciden todos aquellos determinados mediante el análisis visual realizado con anterioridad. Los resultados de los cambios de energía de interacción producto de las mutaciones son presentados en la **Tabla 6**.

**Tabla 5. Aminoácidos de la superficie de interacción obtenidos a través del análisis de  $\Delta$ ASAS, STC.**

PTB2 AICD COMPLEX			
Aminoácido	$\Delta ASA_{polar}$ ( $\text{\AA}^2$ )	$\Delta ASA_{Nopolar}$ ( $\text{\AA}^2$ )	$\Delta G_b$ (kcal·mol <sup>-1</sup> )
70 VAL	8,5154	0,0000	-0,1995
73 LEU	17,3261	4,8859	-0,5109
74 SER	20,3404	22,4360	-0,4903
76 LEU	4,6949	7,4496	-0,1246
78 VAL	12,7709	31,9704	-0,5433
79 GLY	5,0134	0,0000	-0,0894
111 SER	2,2756	0,2127	0,0337
115 GLN	49,1371	2,3129	-0,7418
118 CYS	3,7071	23,6265	-0,0166

**Tabla 6. Resultados del barrido de alaninas realizado sobre los aminoácidos determinados por STC que forman parte de la interfaz de interacción entre PTB2 y AICD1.**

Rojo indica diferencia en contra de la formación del complejo y azul a favor de la formación del complejo. \* indica la mutación por un aminoácido con características similares pero con una mayor superficie de VDW.

Aminoácido mutado	$\Delta\Delta G_b$ (kcal·mol <sup>-1</sup> )
Val <sup>606</sup> Ala	+5,72
Leu <sup>609</sup> Ala	+6,30
Ser <sup>610</sup> Ala	-5,47
Leu <sup>612</sup> Ala	-16,55
Val <sup>614</sup> Ala	-11,42
Gly <sup>615</sup> Ala	-14,03
Gln <sup>651</sup> Ala	-23,21
Cys <sup>654</sup> Ala	+13,04
*Cys <sup>654</sup> Val	-15,24

Los valores de  $\Delta\Delta G_b$  son sólo energías relativas. Tal como se explica en la metodología, si el  $\Delta\Delta G_b$  es mayor a cero implica que el sistema mutante se ve favorecido termodinámicamente respecto al nativo y si es menor a cero significa que la estabilidad del complejo formado entre PTB2 y AICD1 esta disminuida producto de esa mutación en particular. A partir de esto se puede concluir que:

-El aminoácido más relevante en la formación del complejo es Gln<sup>651</sup>, sin la cual se aprecia una gran disminución en la estabilidad del complejo nativo. Del análisis de la red de puentes de hidrógenos de este complejo se puede observar que la Gln<sup>651</sup> forma uno con la cadena lateral de la Asn<sup>684</sup> y uno con el oxígeno peptídico de Glu<sup>683</sup>. Al parecer esta pequeña red es primordial para la estabilidad del complejo.

-Leu<sup>612</sup> también cumple un papel importante en la estabilidad del complejo ya que al mutarlo se observa una clara disminución del  $\Delta\Delta G_b$ . Esto probablemente se debe a que el oxígeno peptídico forma un puente de hidrógeno con el protón de la amida de Tyr<sup>682</sup>. Al parecer la cadena lateral de la Leu<sup>612</sup> también cumple un papel al acomodar el esqueleto del péptido AICD1.

-Val<sup>614</sup> y Gly<sup>615</sup> también parecen tener importancia en la interacción del complejo ya que ambas mutaciones provocan una disminución de la energía de interacción. Probablemente Val<sup>614</sup> forma un puente de hidrógeno a través de su oxígeno peptídico con el protón del nitrógeno del esqueleto de Asn<sup>680</sup>, y Gly<sup>615</sup> forma un puente de hidrógeno a través de su protón del nitrógeno peptídico con el oxígeno del esqueleto de Gln<sup>679</sup>, y al ser mutados el complejo carece de éstos.

-El cambio de las cadenas laterales de Val<sup>606</sup> y Leu<sup>609</sup> por un metilo parecen mejorar la estabilidad del complejo. En la Figura 6b se puede observar que Val<sup>606</sup> se encuentra ubicada en la parte de inferior del sitio de interacción, lo que indica que la ausencia de su cadena lateral en este sitio permite una mayor estabilidad del complejo.

-El grupo metileno de la cadena lateral de Ser<sup>610</sup> forma una interacción hidrofóbica con el anillo de Tyr<sup>687</sup>, interacción que no es muy fuerte, pero que como se puede ver a partir de este estudio, influye en la formación del complejo.

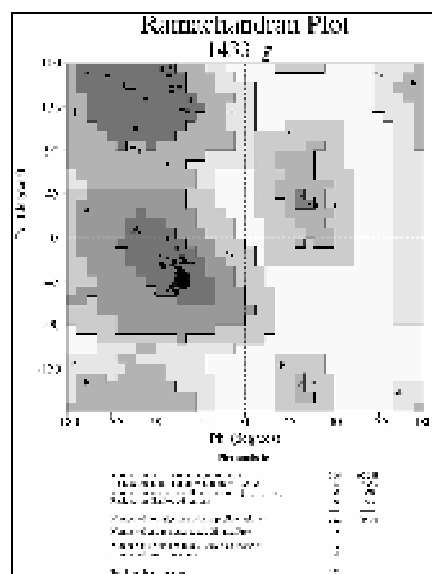
-Finalmente, la mutación de Cys<sup>654</sup>Ala parece no afectar en nada a la formación del complejo, por el contrario parece contribuir a la estabilidad de éste, probablemente debido a que ésta sólo cumple un papel en la complementariedad estérica del sitio de interacción de AICD1 con PTB2. Pareciera que si ocurre la mutación de un aminoácido que no provoque ninguna clase de impedimento, ésta sólo favorecerá la interacción. Para corroborar esta hipótesis se procedió a realizar la mutación Cys<sup>654</sup>Val, tal como se describió en los antecedentes

experimentales para ver el efecto de un aminoácido con características similares a Ala pero con una mayor superficie de VDW, pero sin cambiar las características polares del aminoácido y como se puede ver en los resultados, esta mutación desestabiliza en gran medida al complejo, comprobando la hipótesis anteriormente expuesta.

Cabe destacar la ausencia de puentes salinos como parte de la interfaz de interacción, a partir de esto se propone que la formación de la red de puentes de hidrógeno cumple un importante papel funcional en la formación de este complejo, principalmente el que involucra las Gln<sup>651</sup>. Las interacciones hidrofóbicas como en la que participa Ser<sup>610</sup> con Tyr<sup>687</sup> cumplen un papel a corta distancia probablemente estabilizando al complejo en la última etapa de su formación.

### 3.4. Modelación de proteína adaptadora 14-3-3 $\gamma$

Usando MODELLER8v1 y a partir de la estructura cristalina de la proteína 14-3-3 $\gamma$ , se obtuvo un modelo por homología para una subunidad de 14-3-3 $\gamma$ . El análisis estereoquímico entregado por Procheck arrojó un gráfico de Ramachandran con un 97,3 % de aminoácidos en regiones altamente permitidas y sin aminoácidos en alguna región prohibitiva, resultando ser un modelo aceptable (**Figura 7**).



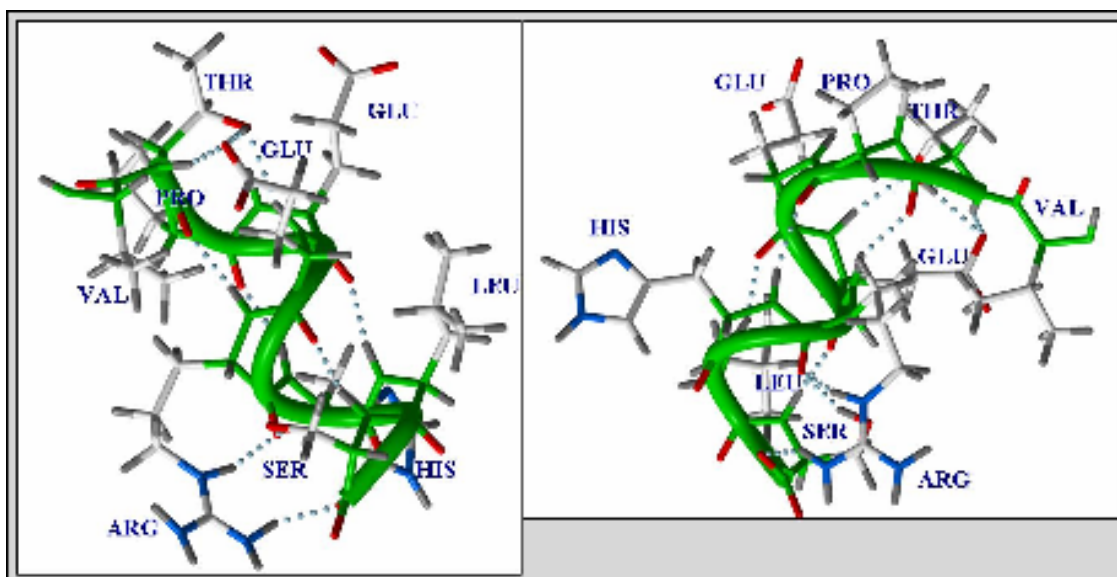
**Figura 7. Gráfico de Ramachandran del modelo de 14-3-3 $\gamma$ .**

Debido a la falta de información experimental preliminar que permita discriminar posibles complejos entre 14-3-3 $\gamma$  y AICD2, se generó un listado de todos aquellos aminoácidos no conservados entre 14-3-3  $\gamma$  y 14-3-3 $\eta$  y las demás isoformas ( $\beta$ ,  $\epsilon$  y  $\theta$  principalmente) que no son capaces de interactuar con AICD2 a partir de la construcción de un alineamiento múltiple usando el software Clustal W (ver **Figura 8**). De este listado se pretende identificar potenciales aminoácidos participantes en la interacción entre 14-3-3 $\gamma$  y AICD2, el cual sería capaz de proporcionarle la selectividad requerida por estas dos isoformas. La **Figura 9** muestra los aminoácidos no conservados.



### 3.5 Modelación de AICD2 (secuencia-VTPEERHLS)

El modelo obtenido con MODELLER a partir de un pequeño segmento de una proteína represora de triptófano usado como plantilla ver **Figura 10**, cumple con las características ya señaladas en antecedentes estructurales, permitiendo así un alto grado de confiabilidad al momento de la predicción de su modo de interacción con 14-3-3  $\gamma$ .



**Figura 10. Modelo de AICD2.**

Éste fue obtenido con MODELLER8v1 usando como plantilla un segmento de la estructura de *N-ter Helix Cappin Box*.

#### 3.6.1 Modelación del complejo 14-3-3 $\gamma$ /AICD2

Los resultados obtenidos fueron clasificados en tres grupos de acuerdo a las grillas (definidas en Teoría y Metodología) con la cual fueron obtenidos, siendo seleccionadas aquellas que se encontraban en un rango de energía de *docking* entre -11,0 y -14,0 kcal·mol<sup>-1</sup> ( $\Delta G_b$  entre -5,00 y -7,00 kcal·mol<sup>-1</sup>). Del análisis del grupo de soluciones seleccionadas (**Tabla 7**) se obtuvo una alta convergencia para dos posibles sitios de interacción (**Figura 11**), uno en una región ubicada en la cara frontal, al medio de la proteína de acuerdo a lo definido en **Figura 9**, poblada por aminoácidos conservados (conformación B), y el otro en una región de residuos no conservados en la parte superior de la proteína (conformación A) enmarcados en azul en **Figura 9**. Las conformaciones A y B se encuentran distribuidas en la mayoría de las soluciones de AutoDock,

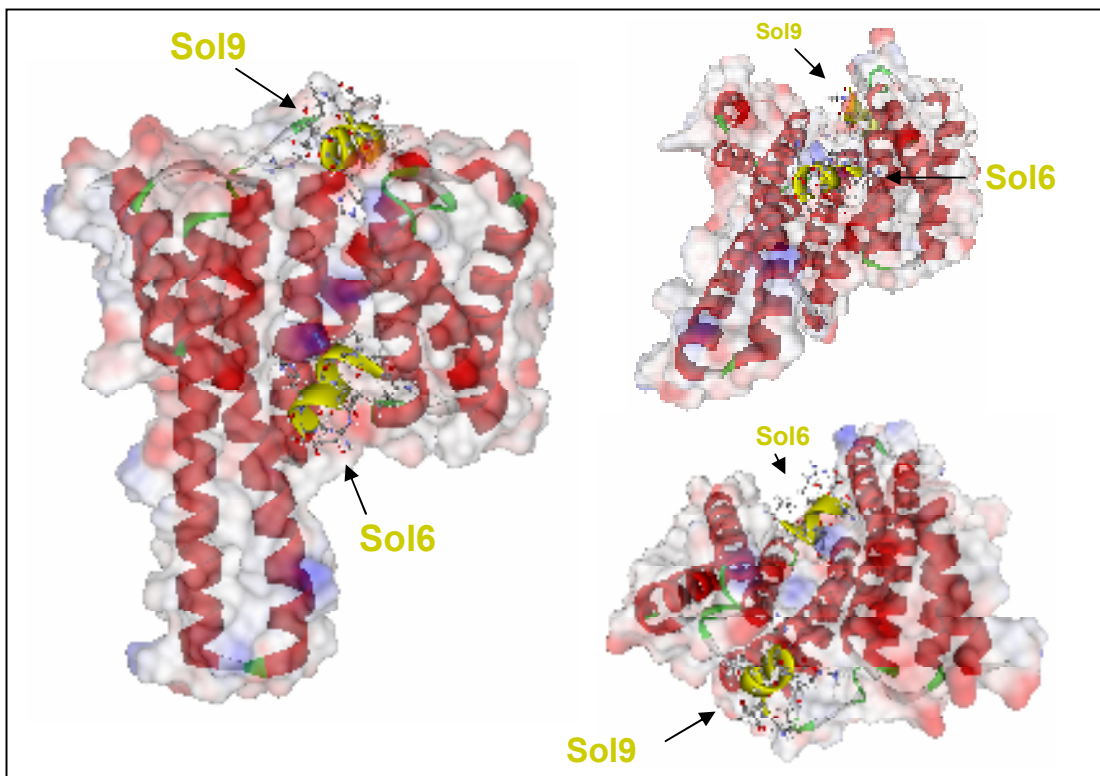


lo que no permite discriminar o elegir un sitio de unión. La necesidad de definir un sitio único llevó a desarrollar un estudio de las energías de interacción mediante la metodología MMGB con el objeto de discriminar entre estas soluciones y así disminuir el número de posibilidades de sitios. Como se describió en teoría y metodología, este tipo de estudios consiste en el análisis de un ensamble de estructuras obtenidas a partir de las mejores soluciones mediante estudios de dinámica molecular, introduciendo de esta manera mayor flexibilidad al sistema y permitiendo a la vez que éstos se relajen. De los resultados obtenidos para las energías de interacción por MMGB de las soluciones seleccionadas posterior al *docking*, los resultados fueron interpretados de una manera cualitativa, donde son consideradas como mejores soluciones todas aquellas que posean una energía negativa de interacción según el método de MMGB. A partir de estos resultados, las soluciones finalmente seleccionadas corresponden a las soluciones 64 y 92. Como se puede ver en la **Tabla 7**, ambas corresponden a conformaciones de interacción diferentes A y B, lo que indica que no se pudo discriminar entre sitios pero si en soluciones, debido a la poca diferencia es sus energías de interacción y esencialmente a la falta de información experimental que permita discriminar entre estos dos sitios de unión representados por estas soluciones. Por esta razón aquí se describen y se proponen ambas soluciones como posibles complejos de interacción, los que sin duda deberán someterse a posteriores estudios experimentales que apoyen o descarten estos posibles sitios.

**Tabla 7. Resultados de la energía de *docking*, energía libre de interacción y la energía libre de interacción calculada mediante MMGB para las soluciones seleccionadas del *docking* entre 14-3-3 $\gamma$  y AICD2 a partir del cálculo realizado por AutoDock3.0.5.**

Nro de Grilla	Nro de la Solución	Sitio de interaccion	Docking Energy (Kcal·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G_b$ AutoDock (Kcal·mol <sup>-1</sup> )	MMGB (Kcal·mol <sup>-1</sup> )
1	34	A	-11,02	-5,61	+1,31
1	35	A	-11,4	-5,11	+0,80
1	64	B	-11,2	-5,14	-5,88
1	68	A	-11,6	-5,23	+5,21
1	69	A	-11,75	-5,33	-1,58
2	90	A	-11,63	-5,34	-2,67
2	92	A	-11,36	-5,23	-4,38
2	94	A	-11,74	-5,08	+3,09
3	3	B	-13,08	-6,68	+23,57
3	34	B	-12,97	-5,83	+13,97
3	56	B	-13,20	-6,93	+22,73

Finalmente, al igual que en el análisis de la interfaz de interacción para PTB2 y AICD2, se determinó la energía libre de interacción ( $\Delta G_b$ ) basado en los cambios del área de la superficie accesible a solvente ( $\Delta ASAS$ ) para ambos complejos, con el objetivo de determinar qué aminoácidos se ven afectados luego de la interacción (**Tabla 8**) y así realizar una descripción de las interfaces de interacción de cada una de éstas.



**Figura 11. Modelo del complejo entre 14-3-3 $\gamma$  y AICD2.**

Mediante representación en forma de cinta de 14-3-3 $\gamma$  podemos apreciar la ubicación de las soluciones 64 y 92, notando que la solución 64 se encuentra en la región media de esta proteína, región poblada por aminoácidos conservados, mientras la solución 92 se encuentra en la parte superior de 14-3-3 $\gamma$ , región que cuenta con la presencia de residuos no conservados entre todas las isoformas.

### 3.6.2 Descripción de la solución 64

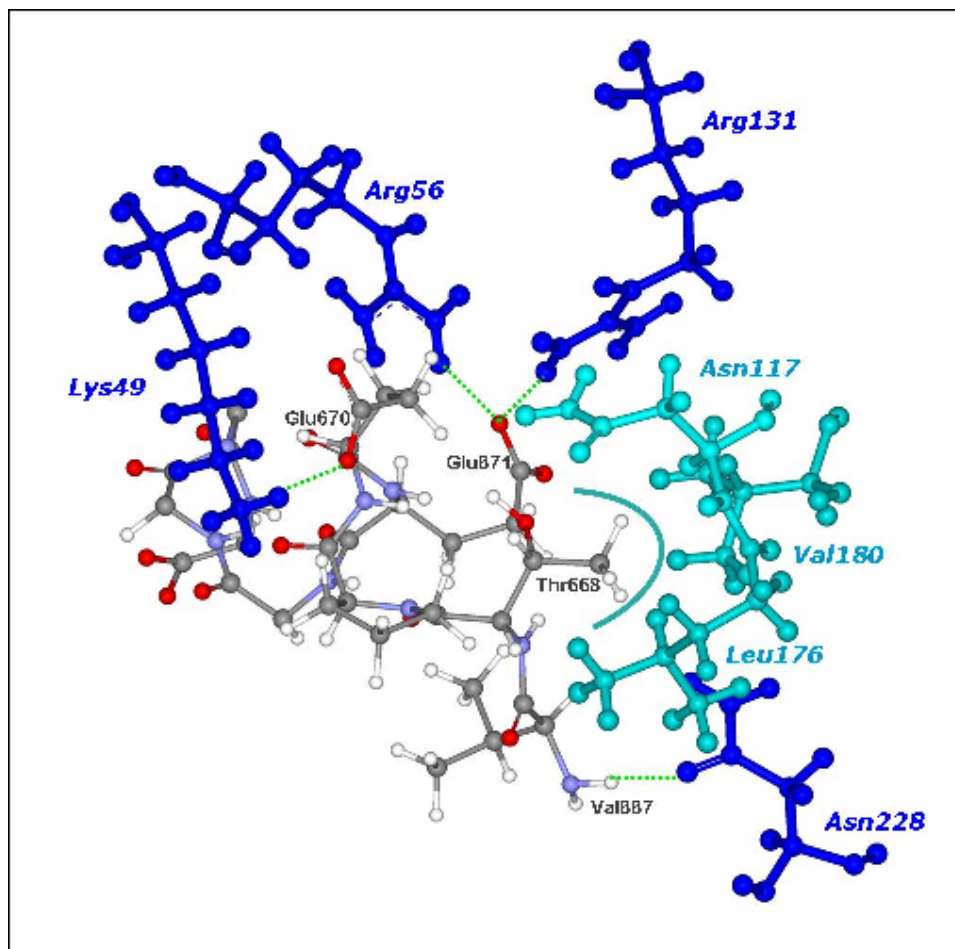
A partir del análisis de la interfaz de interacción del complejo representado por la solución 64 (**Figura 12**), se localizaron tres interacciones formadas por (residuos de 14-3-3 $\gamma$  y AICD2 respectivamente):

- Un puente salino entre el grupo amino que forma parte de la cadena lateral de Lys<sup>49</sup> con uno de los oxígenos carboxílicos de la cadena lateral de Glu<sup>670</sup>.
- Un puente salino entre la cadena lateral protonada de Arg<sup>56</sup> y uno de los oxígenos carboxílicos de Glu<sup>671</sup>.
- Un puente salino de la cadena lateral de Arg<sup>131</sup> y uno de los oxígenos carboxílicos de Glu<sup>671</sup>.
- El oxígeno que forma parte de la amida de la cadena lateral de Asn<sup>228</sup> con el protón del nitrógeno perteneciente al esqueleto peptídico de Val<sup>667</sup>.
- Los aminoácidos Leu<sup>176</sup>, Val<sup>180</sup>, Leu<sup>224</sup> forman un pequeño bolsillo hidrofóbico el cual aloja el grupo metilo de Thr<sup>668</sup>. Los aminoácidos como Tyr<sup>132</sup> forman parte de la interfaz de interacción al encontrarse en medio de la región poblada por aquellos aminoácidos que interactúan directamente con el ligando, de ahí su alta desolvatación posterior a la formación del complejo.

**Tabla 8. Resultados obtenidos del estudio de  $\Delta$ ASAS de la solución 64.**

Se presentan los resultados obtenidos a partir del cálculo de diferencia de área accesible a solvente de las formas libres y del complejo separadas en diferencias para los átomos polares y no polares y el valor de  $\Delta G_b$  calculado a partir de éstas.

SOLUCION 64			
Aminoácido	$\Delta ASA_{polar}$ ( $\text{\AA}^2$ )	$\Delta ASA_{Nopolar}$ ( $\text{\AA}^2$ )	$\Delta G_b$ STC (Kcal·mol <sup>-1</sup> )
Lys <sup>49</sup>	32,6876	62,9816	-0,4114
Asn <sup>50</sup>	18,1468	5,7259	-0,1951
Arg <sup>56</sup>	42,4374	7,0500	-0,8580
Ser <sup>57</sup>	13,9648	23,2849	-0,0138
Arg <sup>60</sup>	9,9812	19,3006	-0,1454
Arg <sup>131</sup>	16,5656	0,0000	-0,2775
Tyr <sup>132</sup>	13,0087	0,3596	-0,2016
Leu <sup>176</sup>	0,0000	24,1358	-0,0613
Asn <sup>177</sup>	26,6605	2,0738	-0,3546
Val <sup>180</sup>	0,0000	25,7366	-0,0839
Leu <sup>224</sup>	0,0044	46,7264	-0,1986
Asn <sup>228</sup>	26,3130	0,0026	-0,3579



**Figura 12. Modelo detallado de las interacciones entre la solución 64 de AICD2 y 14-3-3  $\gamma$ .**  
De la figura se observa la formación de 3 puentes salinos, Glu671 con Arg56 y Arg131 y el formado por Lys<sup>49</sup> con Glu<sup>670</sup>. También se aprecia la formación del puente de hidrogeno formado por Val<sup>667</sup> con Asn<sup>228</sup> y la interacción hidrofóbica de el metilo de la cadena lateral de Thr668 en un bolsillo apolar formado por Asn<sup>117</sup>, Leu<sup>176</sup> y Val<sup>180</sup>.

### 3.6.3 Descripción de la solución 92

Del análisis de este complejo dado por la solución 92 (**Figura 13**) se identificaron cinco interacciones. Estas se encuentran formadas por:

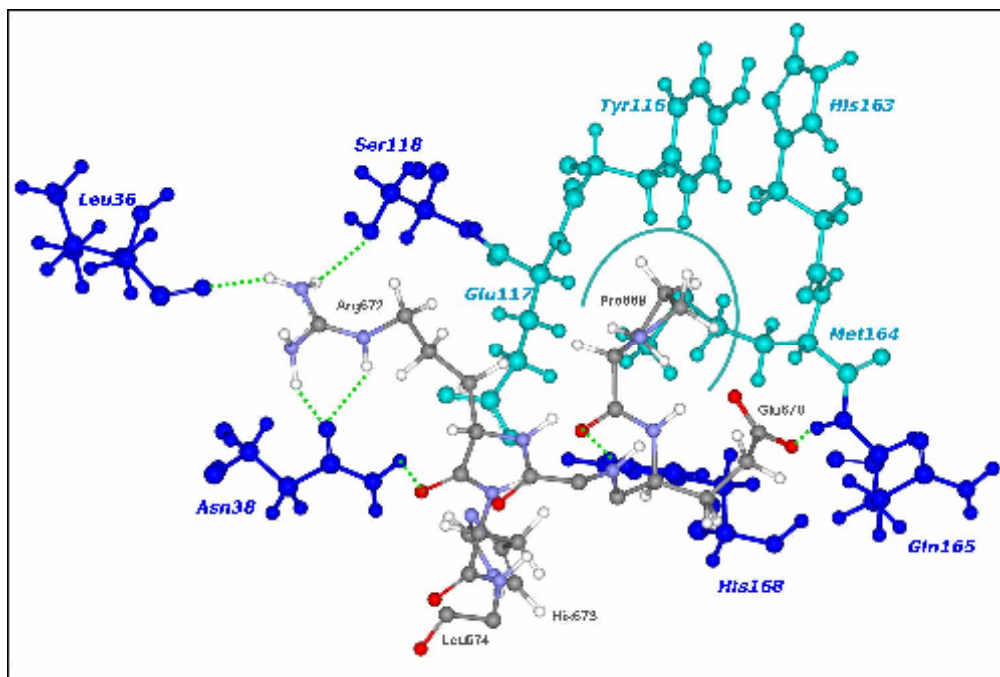
- El oxígeno carbonílico de Leu<sup>36</sup> y el protón de la cadena lateral de Arg<sup>672</sup> (14-3-3 $\gamma$  y AICD2 respectivamente)
- El oxígeno de la amida de la cadena lateral de Asn<sup>38</sup> con un protón de la cadena lateral de Arg<sup>672</sup>.

-El oxígeno del grupo hidroxilo de Ser<sup>118</sup> y un protón de la cadena lateral de Arg<sup>672</sup>.  
 -El protón de nitrógeno del esqueleto peptídico de Gln<sup>165</sup> con un oxígeno carboxílico de la cadena lateral de Glu<sup>670</sup>.  
 -Un protón de la cadena lateral de His<sup>168</sup> con el oxígeno del esqueleto peptídico de Pro<sup>669</sup>.  
 Los aminoácidos Tyr<sup>116</sup>, His<sup>163</sup> y Met<sup>164</sup> forman una pequeña cavidad hidrofóbica en la cual se acomoda Pro<sup>669</sup>. Por otra parte His<sup>673</sup> se encuentra ubicada cerca de la región apolar formada por Pro<sup>169</sup> e Ile<sup>170</sup>, mientras la cadena alifática de Glu<sup>117</sup> se encuentra paralela la porción de la Pro<sup>669</sup> que no está dentro del bolsillo hidrofóbico.

**Tabla 9. Resultados obtenidos del estudio de  $\Delta ASAS$  de la solución 92.**

Se presentan los resultados obtenidos a partir del cálculo de diferencia de área accesible a solvente de las formas libres y del complejo separadas en diferencias para los átomos polares y no polares y el valor de  $\Delta G_b$  calculado a partir de éstas.

SOLUCION 92			
Aminoácido	$\Delta ASA_{polar}$ (Å <sup>2</sup> )	$\Delta ASA_{Nopolar}$ (Å <sup>2</sup> )	$\Delta G_b$ STC (Kcal·mol <sup>-1</sup> )
Leu <sup>36</sup>	11,0272	0,0000	-0,2644
Asn <sup>38</sup>	53,1968	11,1010	-0,7682
Thr <sup>114</sup>	13,2926	16,2725	-0,2764
Gln <sup>115</sup>	6,2531	20,3247	0,0721
Tyr <sup>116</sup>	1,1721	24,8693	0,0266
Glu <sup>117</sup>	22,6470	24,9108	-0,3148
Ser <sup>118</sup>	13,2389	0,0792	-0,1318
His <sup>163</sup>	12,3898	0,0000	-0,3072
Met <sup>164</sup>	0,0000	11,0605	0,0756
Gln <sup>165</sup>	4,8134	15,8446	0,0602
His <sup>168</sup>	19,8265	23,9176	-0,4186
Pro <sup>169</sup>	0,0000	14,0515	-0,0605
Ile <sup>170</sup>	0,0000	12,8148	0,0178
Asn <sup>211</sup>	27,1535	6,5689	-0,3459

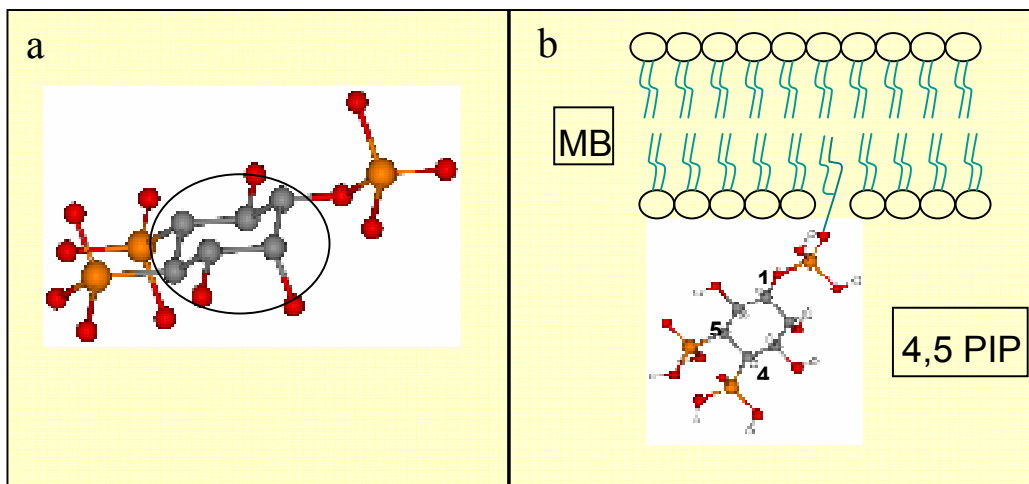


**Figura 13. Modelo detallado de las interacciones entre la solución 92 de AICD2 y 14-3-3.**

De la figura se observa la formación de cinco puentes de hidrógeno entre Arg<sup>670</sup> con Leu<sup>36</sup>, y otro con Asn<sup>38</sup> y Ser<sup>118</sup>. Gln<sup>165</sup> con Glu<sup>670</sup>, His<sup>168</sup> con Pro<sup>669</sup>. Los aminoácidos Tyr<sup>116</sup>, His<sup>163</sup> y Met<sup>164</sup> forman una cavidad apolar donde se ubica la cadena lateral de Pro<sup>669</sup>.

### 3.7 Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (4,5 PIP)

El diseño de este fosfoinositido está basado en el cristal obtenido para la estructura de un dominio de interacción a fosfotirosina de ratón, Dab-1, unido a un fosfoinositido análogo al que se espera sea capaz de interactuar con PTB2. Este cuenta con un ciclohexano en conformación silla (ver **Figura 14a**) unido a dos grupos fosfatos en posición 4 y 5 respecto al éster fosfato. Este es un sistema simplificado ya que *in vivo* el éster fosfato va unido a una larga cadena alifática que llega a la membrana plasmática y lo mantiene unido a ésta (ver **Figura 14b**).



**Figura 14. Esquema del modelo de 4,5PIP.**

a) Se presenta al fosfoinositido destacando la conformación silla que posee el ciclohexano que forma parte de esta estructura. b) Esquema de la unión mediante el éster fosfato del fosfoinositido a membrana *in vivo*, con la respectiva enumeración de sus grupos fosfatos.

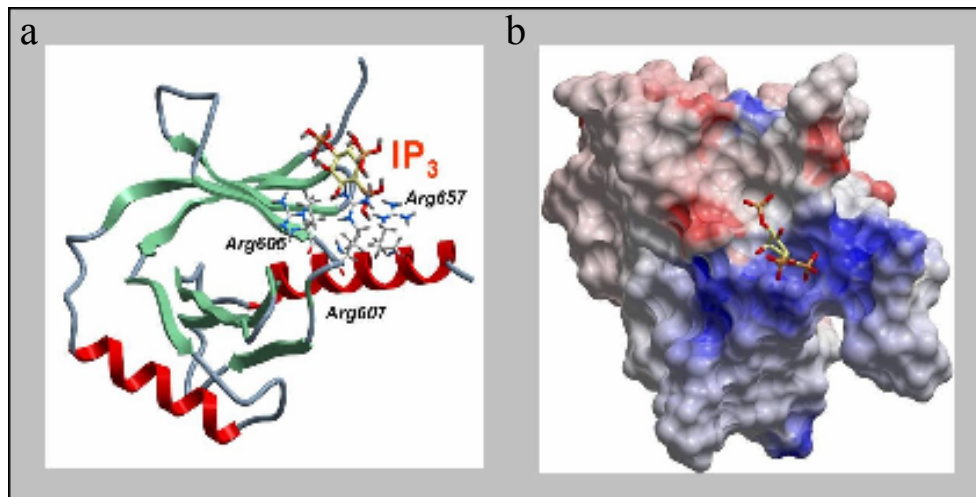
### 3.8 PTB2/4,5PIP

De los resultados obtenidos mediante el *docking* se detectó una alta convergencia de las soluciones obtenidas identificando así un sólo sitio de unión putativo. De todas las soluciones obtenidas fueron seleccionadas aquellas con una energía inferior a  $-9,0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ . A partir de estas soluciones se seleccionó una estructura cuya energía es de  $-9,3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Esta posee una orientación que le permite a los grupos fosfatos 4 y 5 interactuar con 2 Arg (Arg<sup>607</sup>, Arg<sup>657</sup>) que se ubican exactamente en la cara opuesta al sitio de interacción de PTB2 con AICD1, dejando al grupo éster fosfato libre, el cual en el sistema *in vivo* estaría unido a una cadena alifática asociada a la membrana plasmática (**Figura 14b**).

Posteriormente se realizó un estudio de la superficie de potencial electrostático de manera cualitativa de PTB2, confirmando este sitio de unión como el único con un potencial electrostático positivo pudiendo permitir la unión del fosfoinositido de manera estable, análogo a otras estructuras cristalinas de dominios PTB unidos a fosfoinositidos y AICD, como por ejemplo Dab-1 (código pdb : 1OQN ). A diferencia de este sistema en el cual el fosfoinositido interactúa en la parte superior del dominio permitiendo una interacción favorecida espacialmente con AICD, el sitio identificado en PTB2 queda en una región que imposibilita estéricamente la interacción simultánea del fosfoinositido y AICD con éste (**Figura 15**).

A partir del complejo obtenido se pueden elucidar tres posibilidades:

- El fosfoinositido participa en un mecanismo de inactivación de FE65 impidiendo la interacción con AICD
- El fosfoinositido, como se ha descrito en literatura puede estar asociado a otros tipos de membranas, entre éstas al tipo endosomal, pudiendo participar en un sistema de reclutamiento de FE65 a este tipo de organelo, como parte de la vía de internalización de ésta en complejo con APP. A partir de estudios previos se ha identificado que gran proporción de la enzima  $\beta$ -secretasa se encuentra en endosomas, siendo el reclutamiento de FE65 en complejo con APP por fosfoinositidos parte del mecanismo de procesamiento proteolítico de éste mediado por esta enzima.
- Una tercera alternativa puede ser que FE65 no se encuentra asociada a ningún mecanismo que involucre la participación de fosfoinositidos, y la descripción de su posible capacidad de interacción con éstos solo sea artefacto del diseño experimental en el cual se determinó, el cual fue desarrollado en base a fosfoinositidos asociados a sistemas miscelares, caso en el que no presentaría ningún impedimento estérico para interactuar con FE65 junto con no ser un modelo necesariamente representativo del sistema *in vivo*.



**Figura 15. Modelo del complejo formado por PTB2/4,5PIP.**

a) Mediante representación en cintas de la estructura secundaria de PTB2 y palos con esferas para representar a las Arg<sup>605</sup>, Arg<sup>607</sup>, Arg<sup>657</sup> se puede observar la disposición de los grupos fosfatos orientados hacia las cadenas laterales de éstos residuos. b) Superficie de potencial electrostático de PTB2 mediante la cual se puede ver el carácter polar electropositivo de la región en que 4,5PIP interacciona con PTB2.



#### 4. CONCLUSIONES

Del modelo obtenido para el complejo formado PTB2 y AICD1 podemos concluir que:

- La formación del complejo está dominada principalmente por la generación de una red de puentes de hidrógenos, a partir de lo cual se postula que la formación del puente entre Gln<sup>651</sup> con Asn<sup>684</sup> podría ser fundamental como una de las primeras interacciones que llevan a la formación del complejo. Cabe destacar la capacidad de Asn para desolvatar aminoácidos, siendo esto prueba de que puede ser uno de los primeros aminoácidos en interactuar con PTB2 y probablemente el causante de la aproximación entre AICD y PTB2, permitiendo así la posterior formación de los otros puentes de hidrogeno y las interacciones de corta distancia que llevarían a la estabilización final del complejo.
- La alta complementariedad espacial observada entre el sitio de interacción de PTB2 y AICD explicaría en parte la alta afinidad de PTB2 por AICD, donde el  $\beta$ -turn de AICD jugaría un papel fundamental en ésta, él que permitiría acomodarse en el sitio de unión. Esta complementariedad de forma permite una correcta ubicación entre grupos dadores y aceptores de los puentes de hidrogeno, lo cual explicaría de manera tentativa la alta selectividad de este dominio por AICD.
- A partir del estudio *in silico* de la importancia de la Cys<sup>654</sup> en la interfaz de interacción entre PTB2 y AICD, aminoácido cuya mutación suprime la interacción según datos experimentales, se logró determinar que su participación no está vinculada a interacciones con AICD, sino más bien a la complementariedad espacial entre éstos. Este hecho fue comprobado mediante el estudio estructural de cómo afectan estas mutaciones en la formación del complejo, mediante los cuales se logró demostrar que el cambio de la cadena lateral de la Cys<sup>654</sup> por un metilo aumenta la energía de interacción mientras que si mutamos por Val o una Phe disminuye la energía de interacción, e incluso como se vio a partir de la mutación por Phe, AICD no puede ingresar al sitio de interacción.

Del fosfoinositido se logró concluir que parece no estar involucrado en algún mecanismo de activación de Fe65 asociado a su reclutamiento a membrana plasmática induciendo su interacción con AICD.

Del modelo obtenido para el complejo formado por 14-3-3 $\gamma$  y AICD2 podemos concluir que:

- Se identificaron dos posibles sitios de unión en 14-3-3 $\gamma$ . Uno de estos sitios se encuentra ubicado en una región poblada de residuos no conservados, en 14-3-3 $\gamma$  respecto de las otras isoformas, siendo estos aminoácidos no conservados los que probablemente determinen la selectividad que presenta 14-3-3  $\gamma$  por AICD2. Es importante notar que en este complejo el residuo Thr<sup>668</sup> no participa de ninguna interacción importante, por lo que probablemente su fosforilación no afecte la formación del complejo como según se ha descrito en los antecedentes experimentales. El otro sitio de unión está ubicado en una región formada por aminoácidos conservados entre todas las isoformas. A pesar de la falta de información que permita elucidar el posible mecanismo de selectividad de este complejo, cabe notar que en éste la Thr<sup>668</sup> interacciona con un bolsillo hidrofóbico formado por Asn<sup>117</sup>, Leu<sup>176</sup> y Val<sup>180</sup>, al cual no podría ingresar en caso de estar fosforilada, tal como se presenta en los datos estructurales, y como consecuencia impediría la posterior formación de los puentes salinos debido a un cambio en la disposición de espacial de la interacción. De aquí que nace la posibilidad de que exista otro mecanismo de selectividad, probablemente no relacionado con los aminoácidos no conservados. Estos datos estructurales obtenidos mediante herramientas teóricas deberán ser corroborados con la ayuda de datos experimentales.

Finalmente, mediante este trabajo se espera haber logrado sentar nuevas bases moleculares para la comprensión de ciertos aspectos relacionados con la proteína adaptadora FE65, generando así el interés que merece en su posible papel como blanco fármaco terapéutico en la enfermedad de Alzheimer, entregando en la presente investigación el descriptor necesario para el diseño de moléculas inhibitoras de su unión con AICD, basado en la disposición espacial de los aminoácidos determinados como imprescindibles para la interacción, en orden de mayor a menor relevancia:

Gln<sup>651</sup>-Leu<sup>612</sup>-Gly<sup>615</sup>-Val<sup>614</sup>.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

Ando K, Iijima KI, Elliott JI, Kirino Y, Suzuki T. Phosphorylation-dependent regulation of the interaction of amyloid precursor protein with Fe65 affects the production of beta-amyloid. *J. Biol. Chem.*, **276** 40353-40361 (2001).

Åqvist Johan, Carmen Medina, and Jan-Erik Samuelsson. A new method for predicting binding affinity in computer-aided drug design. *Protein Eng.*, **7** 385-391 (1994).

Berman H.M., J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne: The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, **28** 235-241 (2000).

Borg JP, Ooi J, Levy E, Margolis B. The phosphotyrosine interaction domains of X11 and FE65 bind to distinct sites on the YENPTY motif of amyloid precursor protein. *Mol. Cell. Biol.*, **16** 6229-6241 (1996).

Bossy-Wetzel Ella, Robert Schwarzenbacher & Stuart A. Lipton .Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Med. Suppl*, S2-9 (2004).

Cao X, Südhof TC. A transcriptionally active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science*, **293** 115-120 (2001).

Cao X, Südhof TC. Dissection of amyloid- $\beta$  precursor protein-dependent transcriptional transactivation. *J. Biol. Chem.*, **279** 24601-24611 (2004).

Csaba Hetényi and David Van Der Spoel. Efficient docking of peptides to proteins without prior knowledge of the binding site. *Protein Science*, **11** 1729-1737 (2002).

Dominguez C, Boelens R & Bonvin AMJJ (2003). HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *J. Am. Chem. Soc.*, **125** 1731-1737 (2003).

Feig Michael, Alexey Onufriev, Michael S. Lee, Wonpil IM, David A. Case, Charles L. Brooks. Performance Comparison of Generalized Born and Poisson Methods in the Calculation of Electrostatic Solvation Energies for Protein Structures. *J. Comput. Chem.*, **25** 265-284 (2004).

Fiore F, Zambrano N, Minopoli G, Donini V, Duilio A, Russo T. The regions of the Fe65 protein homologous to the phosphotyrosine interaction/phosphotyrosine binding domain of Shc bind the intracellular domain of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.*, **270** 30853-30856 (1995).

Friedman Alan R. , Victoria A. Roberts , John A. Tainer. Predicting molecular interactions and inducible complementarity: Fragment docking of fab-peptide complexes. *Proteins: Structure, Function, and Genetics.*, **20** 15-31 (1994).

Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G.E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.;Montgomery, J. A.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.;Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.;Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi,M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.;Cliford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.;Cui, Q.; Morokuma, K.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.;Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz,J. V.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.;Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin R. L.;; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara,A.; Gonzalez, C.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.;Johnson, B. G.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.;Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; Pople. J. A. Gaussian98 (revision a.7), Gaussian, Inc., Pittsburg, PA, (1998).

Graham R Smith and Michael JE Sternberg. Prediction of protein-protein interactions by docking methods. *Current Opinion in Structural Biology*, **12** 28-35 (2002).

Hass MR, Yankner BA. A  $\gamma$ -secretase-independent mechanism of signal transduction by the amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.*, **280** 36895-36904 (2005).

Hu Q, Hern MG, Jin LW, Bressler SL, Martin GM. Alternative spliced isoforms of Fe65 serve as neuron-specific and non-neuronal markers. *J. Neurosci. Res.*, **58** 632-640 (1999).

InsightII, MSI, San Diego, California.

Kim HS, Kim EM, Lee JP, Park CH, Kim S, Chang KA, Yu E, Jeong SJ, Chong YH, Suh YH. C-terminal fragments of amyloid precursor protein exert neurotoxicity by inducing glycogen kinase-3 $\beta$  expression. *FASEB J.*, **17** 1951-1953 (2003).

Kollman Peter A., Irina Massova, Caroliina Reyes, Bernd Kuhn, Shuanghong, Lillian Chong, Matthew Lee, Taisung Lee, Yong Duan, Wei Wang, Oreola Donini, Piotr Cieplak, Jaysharee Srinivasan, David A. Case and Thomas E. Cheatham. Calculating Structures and Free Energies of Complex Molecules: Combining Molecular Mechanics and Continuum Models. *Acc. Chem. Res.*, **33** 889-897 (2000).

Krieger, E., G. Koraimann, and G. Vriend. Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA: a self-parameterizing forcefield. *Proteins Struct. Funct. Genet.*, **47** 393–402 (2002).

Kroenke Christopher D., Dorota Ziemnicka-Kotula, Jiliu Xu, Leszek Kotula, and Arthur G. Palmer. Solution conformations of a peptide containing the cytoplasmic domain sequence of the  $\beta$  amyloid precursor protein. *J. Biochemistry.*, **36** 8145-8152 (1997).

Lamberti A, Longo O, Vecchio PD, Zambrano N, Barone G, Russo T, Arcari P. Probing the secondary structure of a recombinant neuronal adaptor protein and its phosphotyrosine binding domains. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69** 2395-2400 (2005).

Laskowski R. A., MacArthur M. W., Moss D. S. & Thornton J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, **26** 283-291 (1993).

Lavigne Pierre, John R. Bagu, Robert Boyko, Leigh Willard, Charles F. B. Holmes and Brian Sykes. Structure-based thermodynamic analysis of the dissociation of protein phosphatase-1 catalytic subunit and microcystin-LR docked complexes. *Protein Science*, **9** 252-264 (2000).

Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.*, **19** 1639-1662 (1998).

Mount David W.. *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis*. New York, United States of America, Cold Spring Harbor Laboratory. 2001. 291p

Nussbaum Robert L. and Ellis Christopher E.. Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *The New England Journal of Medicine*. **348** 1356-1364 (2003).

Perkinton MS, Standen CL, Lau KF, Kesavapany S, Byers HL, Ward M, McLoughlin DM, Miller CC. The c-Abl tyrosine kinase phosphorylates the Fe65 adaptor protein to stimulate Fe65/amyloid precursor protein nuclear signaling. *J. Biol. Chem.*, **279** 22084-22091 (2004).

Ramelot Theresa A., Lisa N. Gentile, and Linda K. Nicholson. Transient structure of the amyloid precursor protein cytoplasmic tail indicates preordering of structure for binding to cytosolic factors. *J. Biochemistry*, **39** 2714-2725 (2000).

Sali Andrej and Tom L. Blundell. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. *J. Mol. Biol.*, **234** 779-815 (1993).

Sali Andrej, András Fiser, Roberto Sánchez, Marc A. Marti-Renom, Bozidar Yerkovich, Azat Badretdinov, Francisco Melo, John P. Overington, and Eric Feyfant, "MODELLER: A Program for Protein Structure Modeling" (2001).

Scheinfeld MH, Matsuda S, D'Adamio L. JNK-interacting protein-1 promotes transcription of A beta protein precursor but not A beta precursor-like proteins, mechanistically different than Fe65. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*, **100** 1729-1734 (2003).

Selkoe Dennis J. and Dale Schenk. Alzheimer's Disease: Molecular Understanding Predicts Amyloid-Based Therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **43** 545-584, (2003).

Servidor Fasta<sup>(1)</sup>. Búsqueda de secuencias con homología. <<http://www.ebi.ac.uk/fasta33>>

Servidor Fasta<sup>(2)</sup>. Alineamiento global de secuencias.  
<[http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta\\_www2/fasta\\_www.cgi?rm=compare](http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_www.cgi?rm=compare)>

Standen CL, Perkinton MS, Byers HL, Kesavapany S, Lau KF, Ward M, McLoughlin D, Miller CC. The neuronal adaptor protein Fe65 is phosphorylated by mitogen-activated protein kinase (ERK1/2). *Mol. Cell. Neurosci.*, **24** 851-857 (2003).

Sumioka A, Nagaishi S, Yoshida T, Lin A, Miura M, Suzuki T. Role of 14-3-3 $\gamma$  in FE65-dependent gene transactivation mediated by the amyloid  $\beta$ -protein precursor cytoplasmic fragment. *J. Biol. Chem.*, **280** 42364-42374 (2005).

Telese F, Bruni P, Donizetti A, Gianni D, D'Ambrosio C, Scaloni A, Zambrano N, Rosenfeld MG, Russo T. Transcriptional regulation by the adaptor protein FE65 and the nucleosome assembly factor SET. *EMBO Rep.*, **6** 77-82 (2005).

Walsh DM, Fadeeva JV, LaVoie MJ, Paliga K, Eggert S, Kimberly WT, Wasco W, Selkoe DJ.  $\gamma$ -secretase cleavage and binding to FE65 regulate the nuclear translocation of the intracellular C-terminal domain (ICD) of the APP family of proteins. *Biochemistry*, **42** 6664-6673 (2003).

Zambrano N , Mogavero AR, Ammendola R, Cimino F, Russo T. A rat brain mRNA encoding a transcriptional activator homologous to the DNA binding domain of retroviral integrases. *Nucleic Acids Res.*, **19** 5269-5274 (1991).

Zambrano N, Buxbaum JD, Minopoli G, Fiore F, De Candia P, De Renzis S, Faraonio R, Sabo S, Cheetham J, Sudol M, Russo T. Interaction of the phosphotyrosine interaction/phosphotyrosine binding-related domains of Fe65 with wild-type and mutant Alzheimer's beta-amyloid precursor proteins. *J. Biol. Chem.*, **272** 6399-6405 (1997).

Zambrano N, Minopoli G, de Candia P, Russo T. The Fe65 adaptor protein interacts through its PID1 domain with the transcription factor CP2/LSF/LBP1. *J. Biol. Chem.*, **273** 20128-20133 (1998).

Zhang Linda Yu, Emilio Gallicchio, Richard A. Friesner, Ronald M. Levy. Solvent models for protein-ligand binding: Comparison of implicit solvent poisson and surface generalized born models with explicit solvent simulations. *J. Comput. Chem.* , **22** 591-607 (2001).

Zhongcong Xie, Yuanlin Dong, Uta Maeda, Weiming Xia, Rudolph E. Tanzi. RNA Interference Silencing of the Adaptor Molecules ShcC and Fe65 Differentially Affect Amyloid Precursor Protein Processing and A $\beta$  Generation. *J. Biol. Chem.*, **282** 4318-4325 (2007).