



**“Estudio teórico – experimental de estrategias para la inhibición de cdk5, quinasa implicada en los procesos moleculares de la enfermedad de Alzheimer”**

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

**LUIS FELIPE OPAZO DAVILA**

Dr. Ricardo Maccioni Baraona  
**Director de Memoria de Título**

Una firma manuscrita en tinta azul que se extiende sobre una línea horizontal y hacia abajo.

**Comisión de Evaluación de la Memoria de Título**

Dr. Julio Alcayaga Urbina  
**Presidente Comisión**

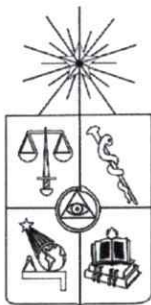
Una firma manuscrita en tinta azul que se extiende sobre una línea horizontal y hacia abajo.

Dr. Jorge Babul Cattán

Una firma manuscrita en tinta azul que se extiende sobre una línea horizontal y hacia abajo.

UCH-Fc  
Biotecnología

D 61  
C. 1



# Universidad de Chile

## Facultad de Ciencias

---

### Estudio teórico-experimental de estrategias para la inhibición de cdk5, quinasa implicada en los procesos moleculares de la enfermedad de Alzheimer

Memoria para optar al Título Profesional de  
Ingeniero en Biotecnología Molecular

**Luis Felipe Opazo Dávila**



Profesor Guía: Dr. Ricardo B. Maccioni

---

Santiago, Chile 2004

*“A mis padres... quienes me apoyaron en todo sentido durante mis estudios y la realización de esta tesis”*

## **Agradecimientos:**

**Quisiera agradecer a todo el Laboratorio de Biología Celular y Molecular, en donde se realizó esta tesis. En especial a su director Dr. Ricardo B. Maccioni por patrocinar y apoyarme en esta tesis.**

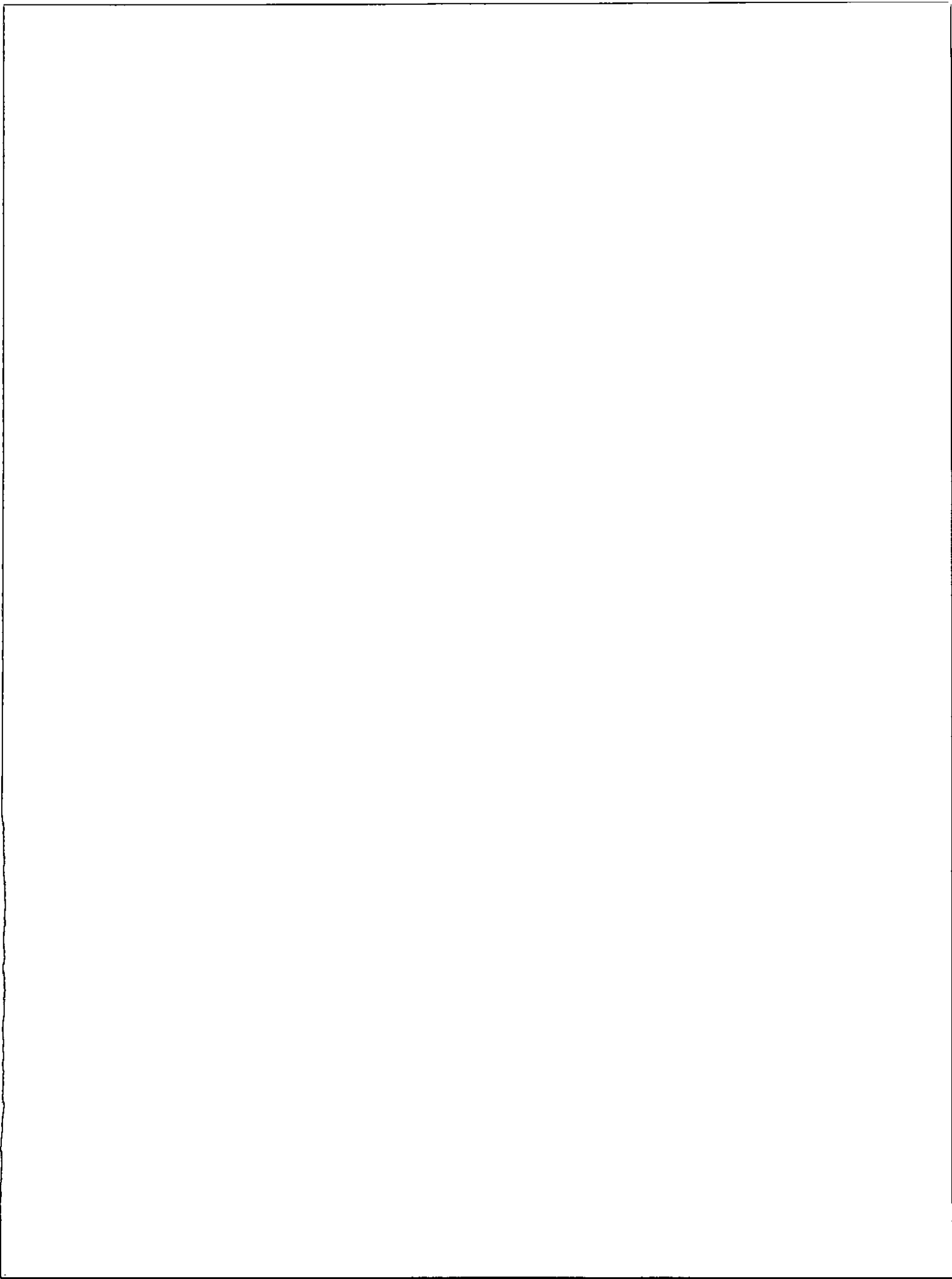
**Quiero agradecer también profundamente al Dr. Bruce Cassels por sus consejos y ayuda a la realización de esta tesis.**

**Quisiera Agradecer además a dos personas en especial:**

**Dr. Gerald Zapata-Torres por toda su ayuda incondicional e invaluable, todo el tiempo dedicado y por todo lo que me enseñó durante este periodo.**

**Dr. Luis Serrano por sus grandes ideas y contribuciones a esta tesis y darme la oportunidad de trabajar con él en uno de los centros más importantes de la bioinformática de hoy.**

**Por último quiero agradecer a todos los académicos de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile quienes me dieron la formación científica que me está permitiendo alcanzar otras aspiraciones y logros.**



## Índice de Contenidos

	Página
1. <u>Resumen</u> .....	1
2. <u>Introducción</u> .....	3
3. <u>Hipótesis</u> .....	8
4. <u>Objetivos Generales</u> .....	8
4.1. <u>Objetivos Específicos</u> .....	9
5. <u>Materiales y Métodos</u> .....	10
5.1. <u>Materiales</u> .....	10
5.2. <u>Métodos</u> .....	12
5.2.1. <u>Métodos Computacionales</u> .....	12
5.2.1.1. Creación del modelo por homología de cdk5.....	12
5.2.1.2. Mejoramiento de la estructura de cdk5.....	12
5.2.1.3. Experimento de Docking.....	13
5.2.1.4. Análisis de la superficie de interacción entre cdk5 y p25.....	14
5.2.1.5. Generación del cierre de leucinas con posibles interacciones con p25.....	14
5.2.2. <u>Métodos Experimentales</u> .....	14
5.2.2.1. Electroforesis de proteínas bajo condiciones desnaturalantes (SDS-PAGE).....	14
5.2.2.2. Técnicas de inmunodetección ( <i>Western blots</i> ).....	15
5.2.2.3. Ensayo de Expresión.....	16
5.2.2.4. Purificación de proteínas por columna de afinidad.....	16
5.2.2.5. Columna de afinidad de GST-Agarosa.....	17
5.2.2.6. Ensayo de la actividad quinasa.....	17
5.2.2.7. Cuantificación de Proteínas.....	17
5.2.2.8. Síntesis de Péptidos.....	18
5.2.2.9. Dicroísmo Circular.....	18

	<b>Página</b>
<b>6. Resultados</b> .....	<b>19</b>
<b>6.1. Capítulo I</b>	
6.1.1. Generación de un modelo molecular de cdk5.....	<b>19</b>
6.1.2. Medición de IC <sub>50</sub> .....	<b>24</b>
6.1.3. Docking de flavonas y flavonoides.....	<b>27</b>
<b>6.2. Capítulo II</b>	
6.2.1. Estudios de inhibición de cdk5 mediante los péptidos sintéticos P1, P2 y P3, diseñados para interferir con la interacción cdk5/p35.....	<b>31</b>
6.2.2. Estudio de la Interacción cdk5/p25 por co- Inmunoprecipitación.....	<b>34</b>
6.2.3. Estudio teórico de docking del péptido P1 con el complejo cdk5/p25.....	<b>36</b>
<b>6.3. Capítulo III</b>	
6.3.1. Diseño teórico de un cierre de leucinas.....	<b>37</b>
<b>7. Discusión</b> .....	<b>45</b>
<b>8. Conclusiones</b> .....	<b>57</b>
<b>9. Bibliografía</b> .....	<b>58</b>
<b>10. Apéndices</b> .....	<b>61</b>
10.1. <b>A1</b> .....	<b>61</b>
10.2. <b>A2</b> .....	<b>63</b>
10.3. <b>A3</b> .....	<b>64</b>

## Índice de Tablas y Figuras

	Página
1. <b>Resumen</b> .....	1
2. <b>Introducción</b> .....	3
2.1. <b>Figura. 1:</b> Esquema simplificado de la actividad del peptido beta amiloide en la desregulación de la actividad de cdk5.....	4
3. <b>Hipótesis</b> .....	8
4. <b>Objetivos Generales</b> .....	8
5. <b>Materiales y Métodos</b> .....	10
6. <b>Resultados</b> .....	19
<b>6.1. Capitulo I</b>	
<b>6.1.1.</b>	
6.1.1.1. <b>Figura. 2:</b> Estructuras de cdk2 y cdk6.....	20
6.1.1.2. <b>Figura. 3:</b> El primer modelo de cdk5 hecho mediante Modeller.....	22
6.1.1.3. <b>Figura. 4:</b> Comparación de la estructura de cdk5-Swiss.pdb y su molde cristalografico 1H4L.pdb.....	23
<b>6.1.2.</b>	
6.1.2.1. <b>Figura. 5:</b> Flavopiridol y estructura general de las flavonas que utilizamos.....	24
6.1.2.2. <b>Figura. 6: A:</b> Western blot del ensayo <i>in vitro</i> de la actividad quinasa de cdk5 en presencia de concentraciones crecientes del inhibidor 6-metoxiapigenina.....	25
6.1.2.3. <b>Tabla 2.</b> Valores estimados de $IC_{50}$ y <i>GOLD fitness score</i> .....	26
<b>6.1.3.</b>	
6.1.3.1. <b>Figura. 7:</b> Detalles de la interacción en el sitio activo entre la molécula de ATP, cdk2 y cdk5.....	28
6.1.3.2. <b>Figura. 8:</b> Análisis de la desviación cuadrática media (RMSd en Å) entre cdk5 y cdk2 por aminoácido.....	29
6.1.3.3. <b>Figura. 9:</b> Caja periódica, donde se analiza la superficie de la proteína.....	30



<b>6.2. Capitulo II</b>	<b>Página</b>
<b>6.2.1.</b>	
6.2.1.1. <b>Figura. 10:</b> Dicroísmo circular en el intervalo del UV-lejano del P1 a una concentración de 100 $\mu$ M.....	32
6.2.1.2. <b>Figura. 11:</b> Actividad de cdk5 en presencia del péptido P1.....	33
<b>6.2.2.</b>	
6.2.2.1. <b>Figura 12. A:</b> Estudios de inmunoprecipitación en presencia de los péptidos sintéticos.....	35
<b>6.2.3.</b>	
6.2.3.1. <b>Tabla. 3:</b> Comparación de las energías arrojadas por AutoDock y InsightII.....	36
<b>6.3. Capitulo III</b>	
<b>6.3.1.</b>	
6.3.1.1. <b>Tabla. 4:</b> Interacciones entre cdk5 y p25 en la estructura cristalina.....	38
6.3.1.2. <b>Tabla. 5:</b> Alineamiento estructural entre la hélice alfa PSSALRE de cdk5 y GCN4.....	39
6.3.1.3. <b>Figura. 13:</b> Vistas lateral y frontal de la estructura del GCN4.....	39
6.3.1.4. <b>Figura. 14:</b> Superposición del cierre de leucinas con PSSALRE en presencia de p25.....	40
6.3.1.5. <b>Tabla. 6:</b> Resumen de las mutaciones generadas por PERLA.....	41
6.3.1.6. <b>Tabla. 7:</b> Análisis por aminoácidos de las 15 mutaciones mejor evaluadas energéticamente por FoldX, para cada tarea.....	42
6.3.1.7. <b>Tabla. 8:</b> Resumen final de las estructuras seleccionadas.....	45
<b>7. <u>Discusión</u></b> .....	44
<b>8. <u>Conclusiónes</u></b> .....	57
<b>9. <u>Bibliografía</u></b> .....	58

## **Lista de Abreviaturas**

- *ATP: Adenosina tri-fosfato*
- *BSA: Seroalbúmina de bovino*
- *Cdk's: quinasas dependientes de ciclinas.*
- *Cdk5: quinasa dependiente de ciclinas número 5*
- *DC: Dicroísmo Circular (Circular Dicroism)*
- *IC<sub>50</sub>: Es la concentración del inhibidor, a la cual la actividad es el 50% de la actividad máxima de la enzima.*
- *kDa: Kilo Dalton*
- *K.O: Knok Out*
- *L13A: Mutación puntual de la Leucina (L) 13 por una Alanina (A).*
- *MAPs: proteínas asociadas a microtubulos*
- *PAGE: electroresis en geles de poliacrilamida*
- *PBS: Amortiguador fosfato*
- *PDB: Protein Data Bank*
- *PSSALRE: Cadena peptídica compuesta por Prolina (P), Serina (S), Serina (S), Alanina (A), Leucina (L), Arginina (R), Ácido Glutámico (E).*
- *RMSd: Desviación cuadrática media*
- *SDS: Dodecil sulfato de Sodio*
- *SPDBV: Swiss PDB viewer*
- *VdW: Van der Walls*
- *WT: tipo silvestre*

Tabla con las abreviaturas para los distintos aminoácidos.

<b>Nombre</b>	<b>Símbolos</b>	
<b>Alanina</b>	<b>Ala</b>	<b>A</b>
<b>Arginina</b>	<b>Arg</b>	<b>R</b>
<b>Asparagina</b>	<b>Asn</b>	<b>N</b>
<b>Aspártico</b>	<b>Asp</b>	<b>D</b>
<b>Cisteína</b>	<b>Cys</b>	<b>C</b>
<b>Fenilalanina</b>	<b>Phe</b>	<b>F</b>
<b>Glicina</b>	<b>Gly</b>	<b>G</b>
<b>Glutámico</b>	<b>Glu</b>	<b>E</b>
<b>Glutamina</b>	<b>Gln</b>	<b>Q</b>
<b>Histidina</b>	<b>His</b>	<b>H</b>
<b>Isoleucina</b>	<b>Ile</b>	<b>I</b>
<b>Leucina</b>	<b>Leu</b>	<b>L</b>
<b>Lisina</b>	<b>Lys</b>	<b>K</b>
<b>Metionina</b>	<b>Met</b>	<b>M</b>
<b>Prolina</b>	<b>Pro</b>	<b>P</b>
<b>Tirosina</b>	<b>Tyr</b>	<b>Y</b>
<b>Treonina</b>	<b>Thr</b>	<b>T</b>
<b>Triptófano</b>	<b>Trp</b>	<b>W</b>
<b>Serina</b>	<b>Ser</b>	<b>S</b>
<b>Valina</b>	<b>Val</b>	<b>V</b>

## 1. Resumen

La quinasa dependiente de ciclina cdk5 es un miembro atípico de la familia de las cdk, ya que no está involucrada en los procesos que controlan el ciclo celular, pero juega un papel fundamental en el desarrollo del sistema nervioso central (SNC). Además, sus activadores no son ciclinas sino otras proteínas entre las que se destaca la p25 y p39. La cdk5 está involucrada en procesos de apoptosis, migración neuronal y formación de uniones neuromusculares. Las alteraciones de ésta, están involucradas en ciertas enfermedades neurodegenerativas. La desregulación de cdk5 constituye un elemento clave en la hiperfosforilación de la proteína tau la cual, hiperfosforilada, se agrega formando estructuras conocidas como ovillos neurofibrilares. De acuerdo a investigaciones desarrolladas en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular (LBCM), esto conlleva a una degeneración neuronal en el SNC, lo que hoy se cree sería una de las principales causas de la enfermedad de Alzheimer. Muchos científicos están tras la búsqueda de nuevos compuestos que inhiban ésta y otras quinastas implicadas en la etiopatogénesis de la enfermedad de Alzheimer para fines terapéuticos. A través de modelación por homología, en esta tesis creamos un modelo a nivel atómico de cdk5 para analizar la inhibición de esta enzima y los factores que modulan su actividad. Se utilizaron dos estrategias: (i) Un estudio de "docking" molecular con el programa GOLD v3.0, probando variados ligandos derivados de las flavonas que compitan con el ATP por el sitio activo de la quinasa. (ii) Luego, en busca de una mayor especificidad de los inhibidores de cdk5, se utilizaron péptidos que interfirieran en la interacción de cdk5 con su activador p25. Los primeros péptidos utilizados son derivados del T-loop de cdk5. Posteriormente, fueron diseñados y optimizados computacionalmente otros péptidos para imitar la superficie de la alfa hélice PSSALRE de cdk5. El programa PERLA, utilizado para este propósito, crea

combinaciones de mutaciones puntuales en conjunto con el programa *FoldX*, que analiza las energías asociadas a cada combinación de mutaciones obtenidas. Esto permitió predecir un conjunto de péptidos que tuvieran una mayor afinidad por p25 que la propia alfa hélice PSSALRE de cdk5.

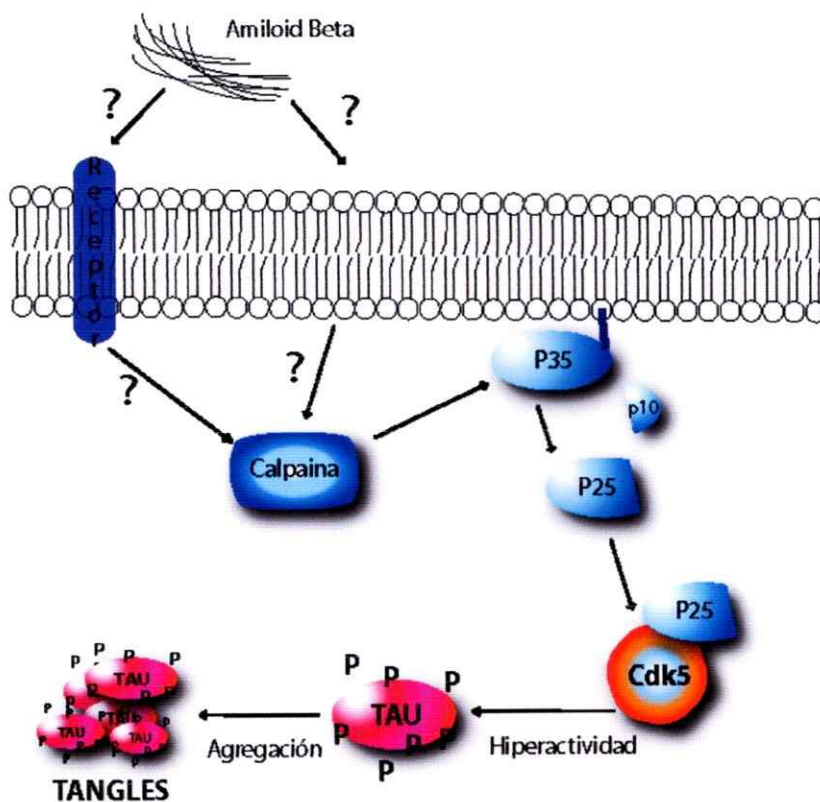
## 2. Introducción

Dentro de una célula existen muchos factores que regulan sus procesos. La gran mayoría de éstos están controlados por cambios al nivel de las proteínas, ya sea por modificaciones estructurales o por cambios en su capacidad para interactuar con otras moléculas.

Las proteínas quinasas dependientes de ciclina (cdks), son enzimas que están involucradas en el control del ciclo celular y presentan una alta identidad de secuencia entre ellas. Estas proteínas sincronizan el ciclo que las células tienen para dividirse, interactuando cíclicamente para formar complejos con un determinado sustrato. La actividad de esta familia de quinasas está finamente regulada por otras proteínas denominadas ciclinas, las que se encuentran en niveles variables durante todo el ciclo celular y se unen en forma selectiva a distintas cdks [1].

Cdk5 se diferencia de las otras quinasas dependientes de ciclina por varios aspectos: no constituye un elemento clave en el ciclo celular; pero tiene un importante papel en células nerviosas post-mitóticas. Se ha demostrado que cdk5 se expresa constitutivamente en todas las células, pero sólo posee actividad en el proceso de diferenciación celular tal como en la formación de músculo y neuronas [1]. Su actividad es clave en el cerebro pues es allí donde se encuentran los mayores niveles de su activador denominado p35 [2]. La actividad de cdk5 se demostró principalmente en el sistema nervioso central (SNC) [3-5], en donde se encuentra asociada a dos activadores, p35 y p39, que tienen expresión regulada en el SNC. Recientemente se ha encontrado que p35 también se puede encontrar en las uniones neuromusculares [6]. Esta tesis deriva fundamentalmente de los hallazgos originales del Laboratorio de Biología Celular y Molecular (LBCM) en relación a que las alteraciones en los patrones de regulación del sistema cdk5/p35 constituirían un evento central en la patogénesis de

la enfermedad de Alzheimer [7,8]. Se conoce además que p35 sufre un corte proteolítico mediado por una proteasa dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  llamada calpaina [9,10], que origina la formación de dos polipéptidos: uno de 10 kDa y otro de 25 kDa (Figura 1), donde este último, según varios autores, [9-12] sería un activador preferencial de cdk5 en condiciones de estrés o de patologías neurodegenerativas.



**Figura 1:** Esquema simplificado de la actividad del péptido beta amiloide en la desregulación de la actividad de cdk5 y la formación de ovillos neurofibrilares o tangles. Las vías que aparecen con signos "?" no están bien caracterizadas al igual que el o los posibles receptores que podrían estar implicados.

Cdk5 en asociación con sus activadores presenta una gran variedad de funciones en la diferenciación neuronal y la dinámica del citoesqueleto. Algunos autores creen que también participa en la degeneración neuronal y muerte celular [13-17]. A pesar de la baja identidad de secuencia entre p35 y las ciclinas, se ha propuesto [18-21] que p35 tiene una estructura similar a estas últimas, y que la región mínima

requerida para la unión a cdk5 es la zona que p35 tiene en común con p25. Esto quedó demostrado cuando se publicó recientemente la estructura cristalina de cdk5 acomplejada con su activador p25 [22].

Los patrones espaciales y temporales de cdk5 coinciden con los de sus activadores p35 y p39, los que son expresados principalmente en neuronas post-mitóticas en el SNC. Una delección en locus claves de cdk5 en ratones produce una letalidad prenatal de las crías, las cuales presentan severos defectos en la laminación de la corteza cerebral, hipocampo y cerebelo [23]. A su vez, una delección del activador p35 resulta en un fenotipo no tan drástico como el del ratón "knockout" para cdk5, lo que demuestra que existe una redundancia funcional entre los activadores de cdk5. En los ratones que no expresan p35 se observa una inversión de la laminación en las neuronas de la corteza cerebral y defectos en la fasciculación de las fibras del axón [24,25]. El ratón deficiente de p35 y p39 presenta un fenotipo prácticamente indistinguible al del ratón "knockout" para cdk5, lo que significa que en conjunto p35 y p39 son necesarias y suficientes para la función de cdk5 durante el desarrollo del sistema nervioso [26]. Algunos estudios en neuronas aisladas apoyan fuertemente el papel de cdk5 en guiar el desarrollo axonal y la formación de los conos de crecimiento [27]. Todas estas observaciones apuntan a que cdk5 cumple un papel fundamental en la migración y posicionamiento neuronal durante el desarrollo del SNC.

Algunos de los sustratos de cdk5 que se encuentran específicamente en neuronas son en su mayoría proteínas que constituyen el citoesqueleto, como los neurofilamentos *High* y *Middle* (NF-H y NF-M) [28,29] y las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs). En esta tesis nos interesa una de ellas, la proteína tau [30-32]. También se ha demostrado que cdk5 fosforila a proteínas que tienen funciones en



cerebros maduros, por ejemplo DARPP32, una proteína específica del cuerpo estriado que está implicada en la regulación de las vías dopaminérgicas [33].

Una observación notable ha sido el hallazgo que cdk5 está involucrada en procesos neurodegenerativos [7]. Aparentemente, la desregulación de cdk5 en estos trastornos estaría guiada por la conversión de p35 a p25. La proteína p25 corresponde a la zona carboxilo-terminal del producto proteolítico de p35, y se ha visto que existe una correlación entre el aumento o acumulación de p25 en tejidos de cerebros humanos y la enfermedad de Alzheimer [34]. La conversión de p35 a p25 puede ser inducida por una gran variedad de condiciones neurotóxicas incluyendo inflamación, estrés oxidativo, isquemia, citotoxicidad, y depósitos del péptido beta amiloide entre otros [35,36]. Además de que p35 y p25 activan eficientemente a la cdk5, p25 desempeñaría un papel distinto al de p35, básicamente debido a que p35 es una proteína inestable con una vida media de 20 a 30 minutos [37], mientras que p25 ha mostrado una vida media considerablemente mayor. Además, p35 se localiza en las membranas celulares debido al motivo de miristoilación que presenta en la zona amino terminal [34]. En cambio p25 carece de este motivo, por lo que se encuentra libre en el citoplasma y se ha localizado también dentro del núcleo. Estos hechos, i.e. una mayor vida media y que p25 se encuentre libre en el citoplasma, sugieren que probabilísticamente éste, en comparación con p35, tendría un mayor número de colisiones intermoleculares con cdk5 en un tiempo determinado, generando una desregulación de la cdk5. Esto causa una hiperactividad de cdk5 y en consecuencia una hiperfosforilación de la proteína tau y su final agregación como ovillos neurofibrilares (38). Ésta es una de las principales características en cortes de tejido cerebral humano de personas que sufrieron del mal de Alzheimer. También se han observado niveles altos de p25 en ratones que son modelos de la esclerosis lateral

amiotrófica [39]. Por lo tanto es posible pensar que el sistema cdk5/p25 es un factor que está presente en varias enfermedades neurodegenerativas.

De acuerdo a la discusión anterior, es importante encontrar compuestos que puedan inhibir parcialmente la actividad de cdk5, de manera de controlar la hiperfosforilación de tau, su resultante agregación y finalmente la formación de los ovillos neurofibrilares. Para ello, en esta tesis hemos seguido dos estrategias dirigidas a la inhibición de cdk5: (i) La primera consiste en buscar, mediante modificación química estructural, ligandos análogos a la base nitrogenada del ATP con los cuales se pueda efectuar estudios de "docking" molecular, con la asistencia de programas desarrollados para este tipos de estudios como lo son *GOLD* y *AutoDock* [40], y así intentar desplazar el equilibrio cdk5/ATP de manera más específica que con los inhibidores actualmente conocidos. (ii) La segunda estrategia está enfocada en buscar una gran selectividad en la inhibición de cdk5, secuestrando específicamente su activador p25 mediante el diseño de péptidos que imiten parte de la superficie de interacción entre cdk5 y p25. Como se había detallado, previo a la aparición de la estructura cristalina de cdk5-p25, se entendía que el *T-loop* de cdk5 jugaba un rol en la interacción con p25. Se creía también que este lazo le confería la especificidad a cdk5 por sus activadores. Por estas razones se decidió intentar inhibir la actividad de cdk5 de este modo.

### **3. Hipótesis**

Las dos hipótesis de trabajo que dan origen a este estudio son:

- Inhibidores con mayor afinidad que compitan con el ATP por el sitio activo en cdk5 darían como resultado una disminución en la fosforilación de la proteína tau.
- El desplazamiento del equilibrio de la interacción proteína-proteína entre cdk5 y su activador p25, mediante un péptido que imite parte de la superficie de interacción de ambos, inhibiría parcialmente la actividad de cdk5, lo que se traduciría en una baja en la fosforilación de tau.

### **4. Objetivos Generales**

En esta tesis nos hemos planteados tres objetivos generales:

- Estudiar los mecanismos y estrategias para la inhibición de la quinasa dependiente de ciclina número 5 (cdk5).
- Desarrollar inhibidores con potenciales fines terapéuticos.
- Validar uno de los modelos moleculares de la enfermedad de Alzheimer.

#### **4.1. Objetivos Específicos**

Para llevar a cabo los objetivos generales planteados en el punto anterior nos hemos propuesto los siguientes objetivos específicos.

- Construir un modelo molecular de cdk5, que permita poner a prueba las dos hipótesis de trabajo.
- Diseñar y evaluar moléculas del tipo de las flavonas que interactúen en el sitio de unión de ATP de cdk5, con el objeto de evaluar la primera hipótesis de trabajo.
- Diseñar y construir péptidos que imiten la superficie de interacción de cdk5 con p25, específicamente los residuos correspondientes al *T-loop* y la hélice PSSALRE en forma de un cierre de leucinas, para así poder evaluar la segunda hipótesis de trabajo.

## 5. Materiales y Métodos

### 5.1. Materiales

<b>Enzimas</b>
----------------

Lisozima; Calbiochem
----------------------

<b>Inhibidores de proteasa y fosfatasas</b>
---

PMSF; Sigma
-------------

Leupeptina; Sigma
-------------------

<b>Anticuerpos:</b>
---------------------

C8(monoclonal) anti-cdk5; Santa Cruz Biotechnology
--

J3(policonal) Anti-cdk5; Santa Cruz Biotechnology
---

C19(monoclonal) anti-p25 y anti-p35; Santa Cruz Biotechnology
---

N20(monoclonal) anti-p35; Santa Cruz Biotechnology
--

Anticuerpo anti-HisTag;
-------------------------

Anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a Peroxidasa HRP; Amersham Life
--

Anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a Peroxidasa HRP; Amersham Life
---

Aprotinina; Sigma
-------------------

Pepstatina; Sigma
-------------------

Ortovanadato de Sodio; Sigma
------------------------------

Fluoruro Sódico; Sigma
------------------------

<b>PAGEs</b>
--------------

SDS; Sigma
------------

Tris-base; Sigma
------------------

Temed; Merk
-------------

Persulfato de amonio (APS); Sigma
-----------------------------------

Acrilamida; Merck
-------------------

Bis-acrilamida; Sigma
-----------------------

<b>OTROS REACTIVOS</b>
DNTP's
Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> ); Sigma
Ditiotreitol (DTT);
Cloruro de manganeso (MnCl <sub>2</sub> ); Sigma
Cloruro de magnesio (MgCl <sub>2</sub> ); Merck
HEPES; Calbiochem
Glicina; Calbiochem
Tween 20; Sigma
EDTA; Biorad
Albúmina de suero de bovino (BSA); Winkler Ltda.
Membrana de nitrocelulosa; Amersham Pharmacia Biotech
Rojo Ponceau; Sigma
Glutación reducido;
Azul de Coomassie; Sigma
Azul de bromofenol; Sigma
Glicerol; Winkler Ltda.
Reactivo Bradford; Biorad
Películas radiográficas;
IPTG; Calbiochem
Imidazol; USBiologicals
Resina NTA-Ni; QIAGEN
Resina de GST; Novagen
ATP; Sigma
ATP $\gamma$ - <sup>32</sup> P radioactivo; Perkin-Elmer
Histona H1 de timo de ternero; Calbiochem

## **5.2. Métodos**

### **5.2.1. Métodos computacionales**

#### **5.2.1.1. Creación de un modelo de cdk5 por homología.**

Se obtuvo la secuencia proteica de cdk5 humana de la base de datos *REFSEQ*. Luego mediante un *BLAST* de proteínas se buscaron las proteínas homólogas con el más alto porcentaje de identidad y a partir de estos datos se buscaron las secuencias que poseían estructuras cristalinas en la base de datos *Swissprot*. Se encontraron dos estructuras homólogas correspondientes a cdk-2 y cdk-6 con identidades del 60 y 48% respectivamente. Posteriormente, utilizando el programa *MODELLER 6.0*, se generaron 100 estructuras derivadas de las estructuras cristalinas de cdk-2 y cdk-6. *MODELLER* entrega una función de pseudo energía, la cual se usa como criterio para elegir las 5 mejores estructuras, las cuales son luego revisadas por dos programas desarrollados para encontrar posibles fallas estructurales como lo son *Verify 3D* [41] y *prosaII* [42]. En un último paso el modelo obtenido fue sometido a un alineamiento estructural utilizando *spdbv* el cual nos entregó la desviación cuadrática media (RMSd) con respecto a las estructuras originales.

#### **5.2.1.2. Mejoramiento de la estructura de cdk5**

Las coordenadas de la estructura de cdk5 se obtuvieron del *Protein Data Bank (PDB)* archivada con el nombre 1H4L. La estructura se refinó enviándola al servicio *Expassy* para generar los fragmentos que no habían podido ser resueltos mediante cristalografía de rayos X.

### 5.2.1.3. Experimentos de Docking

Las estructuras cristalinas de cdk2 y la cdk5 fueron extraídas del *Protein Data Bank* (PDBs: 1FIN y 1HL4 respectivamente) [21,22]. Todos los ligandos fueron contruidos usando *InsightII* [44] a partir de la librería de fragmentos usando el módulo *Builder* y fueron optimizados con el campo de fuerza *CVFF* [45] implementado en el programa *Discover* [44]. Se insertaron modelos de ATP y de otras 20 estructuras en la estructura cristalográfica optimizada y minimizada de cdk5. El programa de *Docking GOLD* v.3.0 se utilizó para posicionar los ligandos en el sitio activo de la quinasa. *GOLD* emplea una base de algoritmos genéticos y ha demostrado ser muy efectivo y rápido en posicionar ligandos correctamente [46].

EL *docking* del péptido P1 (ver 5.2.2.8) con el complejo cdk5/p25 se efectuó usando *Autodock* v3.05. Para esto se superpuso el esqueleto aminoacídico de la *cdk5-Swiss* con el del complejo cdk5/p25 cristalográfico y posteriormente se eliminó la *cdk5* cristalográfica para dejar la estructura que llamamos complejo.pdb.

Se usó un *Script*<sup>1</sup> para poder dividir el volumen total del complejo en 12 volúmenes menores (grillas) y que estos se solaparan entre ellos para que no existiera una discontinuidad en el cálculo. El programa se configuró para que hiciera en cada una de las grillas 30 corridas (*runs* o cálculos de *docking*) y probara en cada una de ellas 150 conformaciones estructurales del péptido. En el apéndice A2 se pueden apreciar los mejores valores de cada ensayo.

---

<sup>1</sup> Script desarrollado en el laboratorio de Biología Estructural y Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, por José Jaime Arbildúa.



#### **5.2.1.4. Análisis de la superficie de interacción entre cdk5 y p25**

Esto se hizo manualmente con los programas *Swiss PDB viewer* [47] (*spdbv*) y *WebLab Lite*, buscando aminoácidos que estuvieran hasta a 4.5Å de distancia de la interfaz entre cdk5 y p25.

#### **5.2.1.5. Generación del cierre de leucinas con posible interacción con p25**

Se obtuvo la estructura de un cierre de leucina (GCN4) [48] en la base de datos *PDB*. Se utilizó el programa *spdbv* para superponer el esqueleto aminoacídico del cierre de leucina con el de la alfa hélice PSSALRE de cdk5, hasta encontrar la menor *RMSd*. Primero se mutaron puntualmente los aminoácidos de la superficie de GCN4 que están dispuestos hacia p25 con *spdbv* por sus equivalentes en cdk5 y luego se utilizó el programa PERLA para introducir una combinación de mutaciones en GCN4 con el fin de optimizar las interacciones con p25. Finalmente se usó FoldX [49] para analizar las energías de interacción y las posibles colisiones de cada coordenada que PERLA entrega como salida.

### **5.2.2. Métodos Experimentales**

#### **5.2.2.1. Electroforesis de proteínas bajo condiciones desnaturalantes (SDS-PAGE)**

A las muestras de proteínas se les agregó un tampón de carga (Tris 125 mM, SDS 2%, β-mercaptoetanol 1%, glicerol 5%, azul de bromofenol 0,003%, a pH 6,8) y luego se hirvieron por 5 minutos. En seguida se cargaron estas muestras en un gel de poliacrilamida-SDS al 12 ó al 15% (Laemmli, 1970), de *Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell* (Bio-Rad). Como estándares de peso molecular, se usaron marcadores de pesos moleculares *Precision Plus Protein Standards* (Bio-Rad). El gel

se corrió a 100 Volts durante 1,5 a 3 horas en una solución de corrida (glicina 192 mM, Tris 25 mM, SDS 0,1%, a pH 8,3).

#### **5.2.2.2. Técnicas de inmunodetección (*Western blots*)**

Las proteínas separadas en los geles (en condiciones desnaturalantes), fueron electrotransferidas a membrana de nitrocelulosa en solución de electrotransferencia (glicina 0,2 M, Tris 25 mM pH 8,3, metanol 20%, SDS 0,01%), en un *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad) a 100 volts por 1 h. Una vez transferidas las proteínas, la membrana fue incubada en solución de bloqueo de electro-transferencia (leche descremada 5 %, en solución PBS por 1 h a 4°C). Luego se agregó el anticuerpo primario en las diluciones que recomienda el fabricante y se dejó incubando toda la noche a 4°C. Posteriormente se hicieron 3 lavados de 10 min cada uno con PBS-Tween (Tween 20 al 0,2 % en solución amortiguadora PBS). Finalmente se incubó la membrana con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa obtenida de rábano, diluido 1:10.000 en solución de bloqueo de electrotransferencia por 1,5 h a temperatura ambiente. Finalmente la membrana se lavó 3 veces con PBS-T e incubó con las soluciones del *kit* de quimioluminiscencia (*Western Lightning Chemoluminescence Reagent Plus, PerkinElmer Life Science Products*) en oscuridad y luego fue expuesta a una película fotográfica (*Fuji Medical Xray Film*). Para el revelado y fijación de la película se usaron soluciones comerciales (revelador radiográfico G150 y fijador radiográfico G334, AGFA).



### **5.2.2.3. Ensayo de expresión.**

Se crecieron los clones en 25mL de LBamp en tubos falcons de 50 mL, por 3 horas aproximadamente o hasta que la densidad óptica se aproximó a 0,4 OD<sub>600</sub>, una vez alcanzada esa densidad bacteriana, se agrega el inductor IPTG a una concentración final de 0,2mM. Simultáneamente se toma una alícuota del cultivo de unos 500 µL, luego se toman alícuotas pasadas 1,5 h, 3 h, 5 h y 12 h después de haber agregado IPTG. Cada alícuota tomada es centrifugada, se descarta el líquido sobrenadante y se agrega sobre el *pellet* el tampón de carga, luego se resuspende el *pellet* bacteriano y se somete por 5 min a 97°C, para posteriormente ser cargado y corrido en un *PAGE*.

### **5.2.2.4. Purificación de proteínas por columna de afinidad**

Se crecen 2 L a 37°C el clon en LBamp, una vez alcanzada una densidad óptica de 0,4 OD<sub>600</sub> se induce con IPTG y se deja por 3 h más como lo señala el ensayo de expresión a 30°C. Las bacterias se centrifugaron a 5000 RPM. Se resuspenden con PBS en un volumen final no mayor a 40 mL. Se agrega lisozima a una concentración de 3 mg/mL por 30 min y una mezcla de inhibidores de proteasas (PMSF 100µg/mL, aprotinina 2µg/mL, leupeptina 2µM y pepstatina 1µg/mL). A temperatura ambiente, luego se somete a sonicación 3 veces por 10 s, con los intervalos en hielo. Se agrega DNAsa 0,25µL/mL, se deja agitando suavemente por 20 min. Luego eso se centrifuga a 25000 RPM por 45 min a 4°C y se rescata el líquido sobrenadante en hielo. Si el sobrenadante está aún muy viscoso se agrega nuevamente DNAsa. Posteriormente se incuba por 1 o 2 h a 4°C con la resina de GST-Agarosa (Pharmacia) en agitación suave.

#### **5.2.2.5. Columna de afinidad de GST-Agarosa**

El flujo de la columna funcionaba por gravedad. Se hicieron 3 lavados con PBS y luego se eluyó con una alta concentración de glutatión reducido. Finalmente, para concentrar la proteína, el eluido se puso en una bolsa de diálisis y se dejó en azúcar, casi hasta la deshidratación total. Luego se realizaron diálisis inversa con grandes volúmenes de PBS. Todos estos procesos se llevaron a cabo a 4°C.

#### **5.2.2.6. Ensayo de la actividad quinasa**

Se incubaron en tampón-quinasa (Hepes 50 mM a pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MnCl<sub>2</sub> 2 mM, DTT 1 mM, ortovanadato 100 µM, NaF 1 mM), por 30 min en hielo, p25 recombinante, ATP frío y en los casos apropiados el péptido inhibitorio. Transcurrido este tiempo se agregó cdk5 recombinante y se incubó por otros 30 min en hielo, para agregar finalmente 2 µg de histona H1 y 2 µCi por reacción de [<sup>32</sup>P] ATP. La reacción se llevó a cabo a 30°C por 30 min. La reacción se detuvo agregando buffer de carga Laemmli 4X y se calentó a 100°C por 5-10 min. Luego las muestras se cargaron en un PAGE al 12% y posteriormente se electrotransferieron a una membrana de nitrocelulosa. La histona-[<sup>32</sup>P] se cuantificó con el programa de imágenes FX (Bio-Rad).

#### **5.2.2.7. Cuantificación de proteínas**

Primeramente se hizo una curva estándar con concentraciones crecientes de BSA, usando el método de *Bradford*. Luego se diluyó la muestra en 800 µL de agua y se agregó 200 µL del reactivo de Bradford (Bio-Rad), se dejó a temperatura ambiente por 15 min y se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de Elisa o espectrofotómetro adecuado, para finalmente interpolar la cantidad de proteína

presente en la muestra comparando con el estándar de BSA que se había preparado con anterioridad.

#### **5.2.2.8. Síntesis de péptidos**

Se enviaron a sintetizar 3 péptidos a "*Res Gen, Invitrogen Corporation*" con secuencias correspondientes a secciones del *T-loop* de *cdk5*. El *T-loop* está compuesto por 20 residuos aminoacídicos (desde la fenilalanina 145 a la leucina 165).

Los péptidos sintetizados, denominados P1, P2 y P3, fueron los siguientes:

- **A148RAFGIPVRCYSAEV162 (P1; 15 residuos; PM: 1638.9).**
- **A148RAFGIP154 (P2; 7 residuos; PM: 730.85).**
- **P154VRCYSAEV162 (P3; 9 residuos; PM: 1023.16).**

#### **5.2.2.9. Dicroísmo circular (DC)**

Para analizar la estructura secundaria en disolución de los péptidos P1; P2 y P3, éstos se sometieron a estudios de DC. Los péptidos se disolvieron en PBS a dos concentraciones, 100  $\mu\text{M}$  y 400  $\mu\text{M}$ , para hacer los ensayos de UV-cercano (250-320 nm) y UV-lejano (190-250 nm). Se ocuparon cubetas de distintos caminos ópticos (de 1, 2, 5 y 10 mm de espesor). Cada lectura constó de 30 barridos por todo el espectro pedido, para mejorar así la relación señal/ruido. Además, para cada barrido de muestra se midió un blanco, el cual se sustrajo del espectro obtenido con la muestra.

## **6. Resultados**

### **6.1. Capítulo I**

#### **6.1.1. Generación de un modelo molecular de cdk5.**

El método empleado para obtener una aproximación a la estructura tridimensional de cdk5 fue el método de modelación por homología. Debían cumplirse dos condiciones para lograr construir el modelo. Primero, encontrar una proteína con un grado de identidad aminoacídica superior al 25%, y segundo, que esta proteína homóloga tuviera una estructura cristalina determinada y con una buena resolución.

Para cdk5 esto no es un problema mayor, puesto que, como describimos anteriormente, las enzimas de la familia de las cdk5 tienen una alta identidad entre ellas. Por esta razón se utilizaron dos de sus homólogas como proteínas molde, cdk2 y cdk6, de las cuales existen a disposición varias estructuras cristalinas con 60% y 48% de identidad respectivamente (Figura 2).

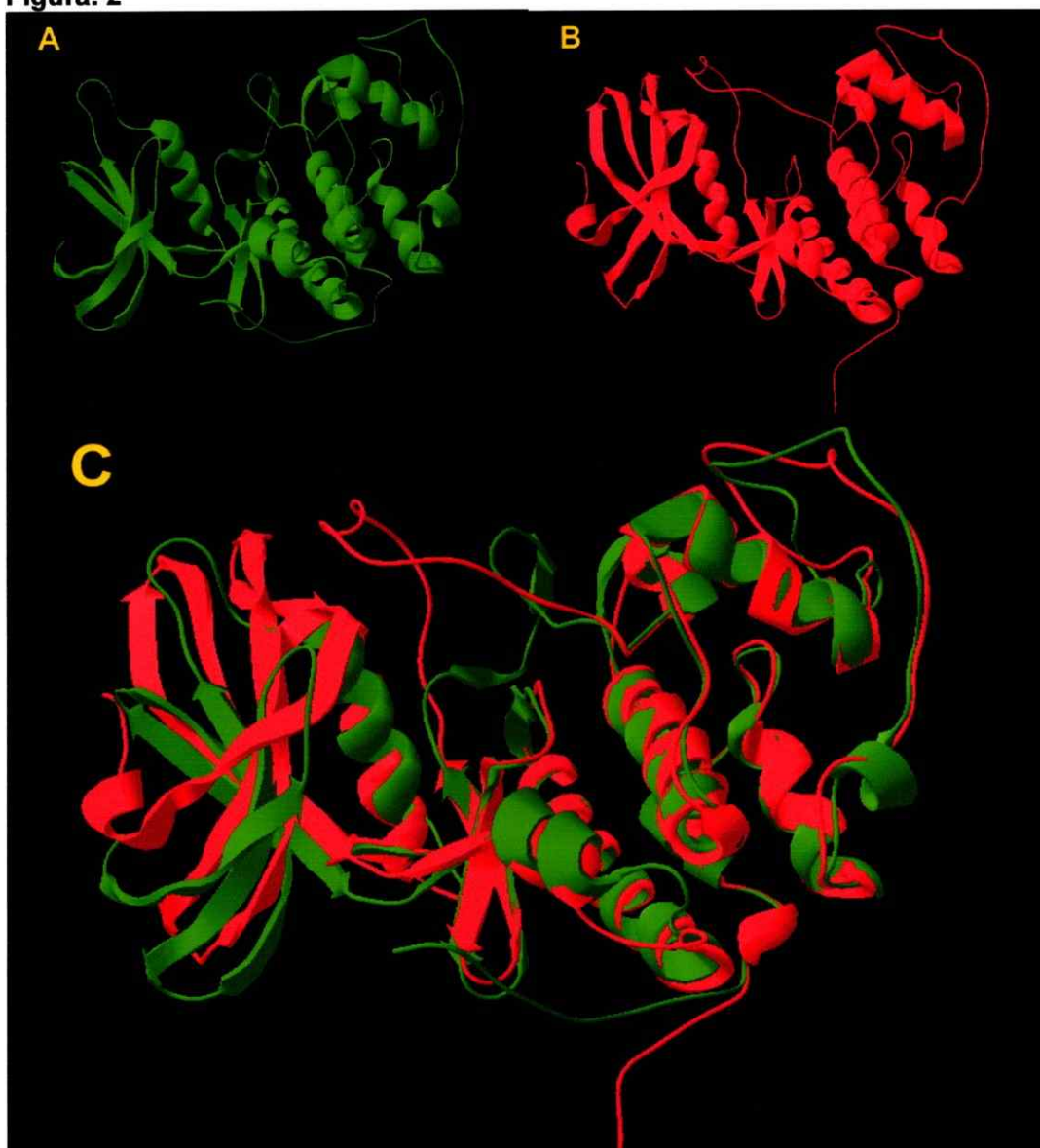
El método de modelación por homología consta de cuatro pasos esenciales:

- Identificación de la(s) estructura(s) molde.
- Alineamiento entre las secuencias aminoacídicas.
- Construcción del modelo con las restricciones espaciales que da la estructura cristalina.
- Evaluación del modelo generado.

En esta tesis la identificación de las secuencias se hizo con la herramienta *Psi-Blast* que se encuentra en <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>. Luego las estructuras cristalinas se buscaron en la base de datos *Protein Data Bank*. Una vez conseguido esto, se usó el programa *Modeller 6.0* de la Universidad de *Rockefeller* de *New York*

[50]. Este programa genera 100 modelos que deben cumplir con las restricciones de distancias y espaciales que imponen las estructuras molde. Para cada uno de los modelos generados, el programa estima una pseudo-energía relativa.

**Figura. 2**



**Figura. 2:** Estructuras de cdk2 y cdk6, obtenidas del *Protein Data Bank*. A: cdk2, archivo 1FIN.pdb. B: cdk6 archivo 1BLX.pdb. C: alineamiento estructural entre cdk2 y cdk6 hecho con spdbv v3.7.

Se seleccionaron las 5 estructuras mejor evaluadas por *Modeller* y luego éstas se sometieron a una nueva evaluación utilizando *ProsaII* [42] y *Verify 3D* [41]. Estos dos programas verifican ángulos, distancias de enlace, colisiones, etc, comparándolos con una librería de datos de estructuras cristalinas, para comprobar que la estructura generada por homología no esté fuera de la media estadística en disposiciones espaciales básicas. Luego de esto, se eligió la estructura modelada que presente la mejor evaluación (Figura 3).

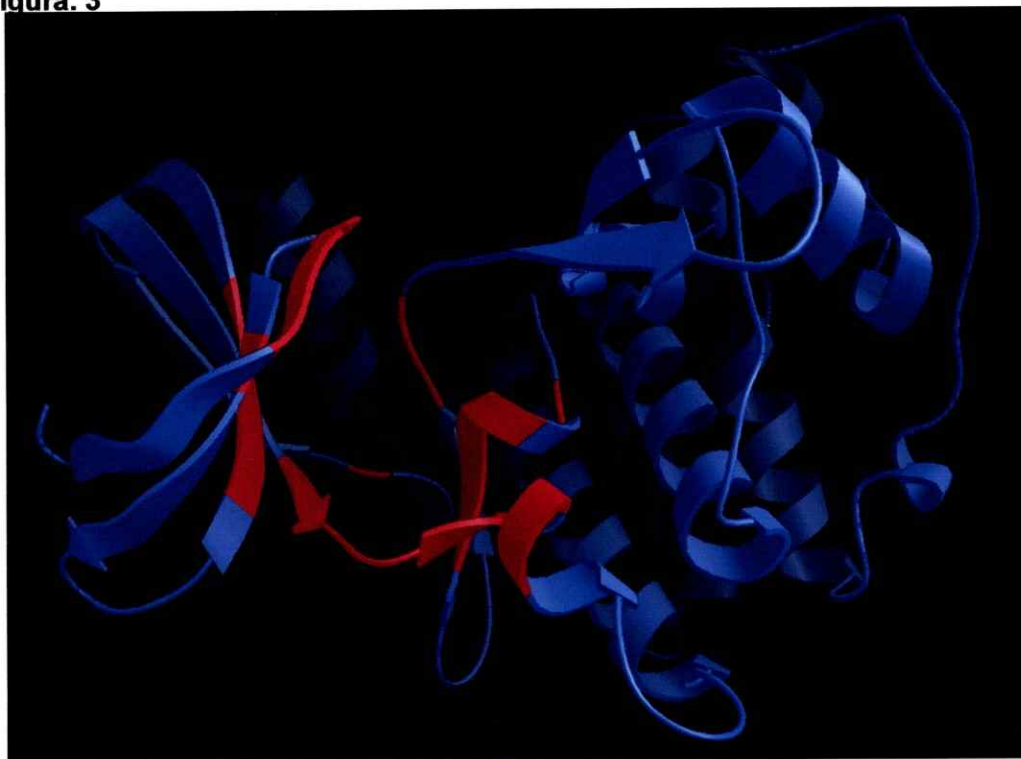
Durante el desarrollo de esta tesis, y posterior a la obtención del modelo computacional de cdk5, apareció publicada con una resolución de 2.6 Å la estructura cristalina del complejo cdk5-p25 [22]. Sin embargo existen importantes segmentos que no fueron resueltos cristalográficamente para el complejo. Debido a que las zonas no resueltas están implicadas en la unión del ATP e interacción con p25, consideramos de gran importancia generar otra estructura tridimensional de cdk5 que compense este problema. Para esto usamos como molde la estructura recientemente publicada de cdk5. Para la creación del nuevo modelo, se usó el servicio de modelamiento de proteínas de *SWISS-MODEL* [51]. Este servicio automatizado usa dos programas, *Modeller* y *ProMod* [47] el último además escoge las 5 estructuras que presenten el mejor alineamiento de secuencias con la secuencia de la proteína que queremos modelar. En nuestro caso, *ProMod* seleccionó la misma cdk5-p25 (1HL4.pdb) como era de esperar y las otras 4 fueron distintas estructuras de cdk2.

La estructura generada por el servicio *SwissModel* fue comparada con la estructura cristalina de cdk5, realizando un alineamiento estructural entre los esqueletos aminoacídicos de las dos proteínas dando como resultado un RMSd de 0,45 Å (1108 átomos del esqueleto fueron utilizados), lo cual indica que la nueva estructura generada por el servicio automatizado presenta una mínima desviación



espacial promedio respecto del cristal. La ventaja que tiene el nuevo modelo es que a diferencia de la estructura cristalina, este contiene los fragmentos que no fueron resueltos por la difracción de rayos X, los cuales son muy importantes para el estudio de posibles inhibidores que compitan con ATP por el sitio activo.

**Figura. 3**

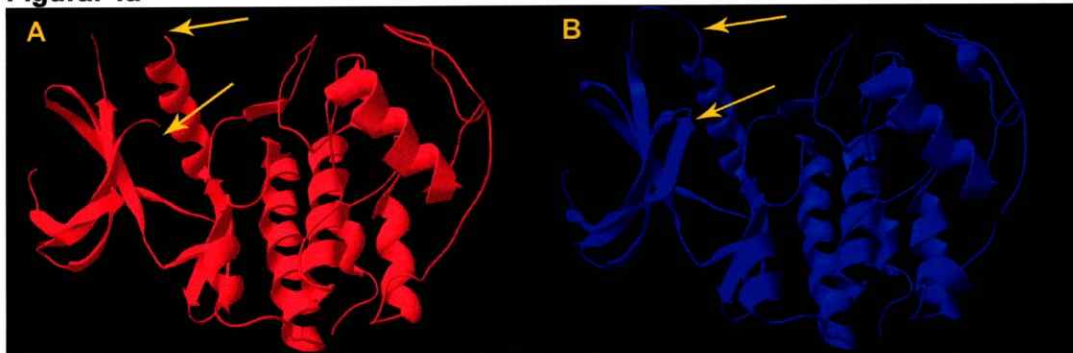


**Figura. 3:** El primer modelo de cdk5 hecho por Modeller, elegido después de pasar por ProsaII y Verify3D. En rojo se ven los aminoácidos importantes del sitio de unión al ATP (Figura generada con AutoDock v3.05).

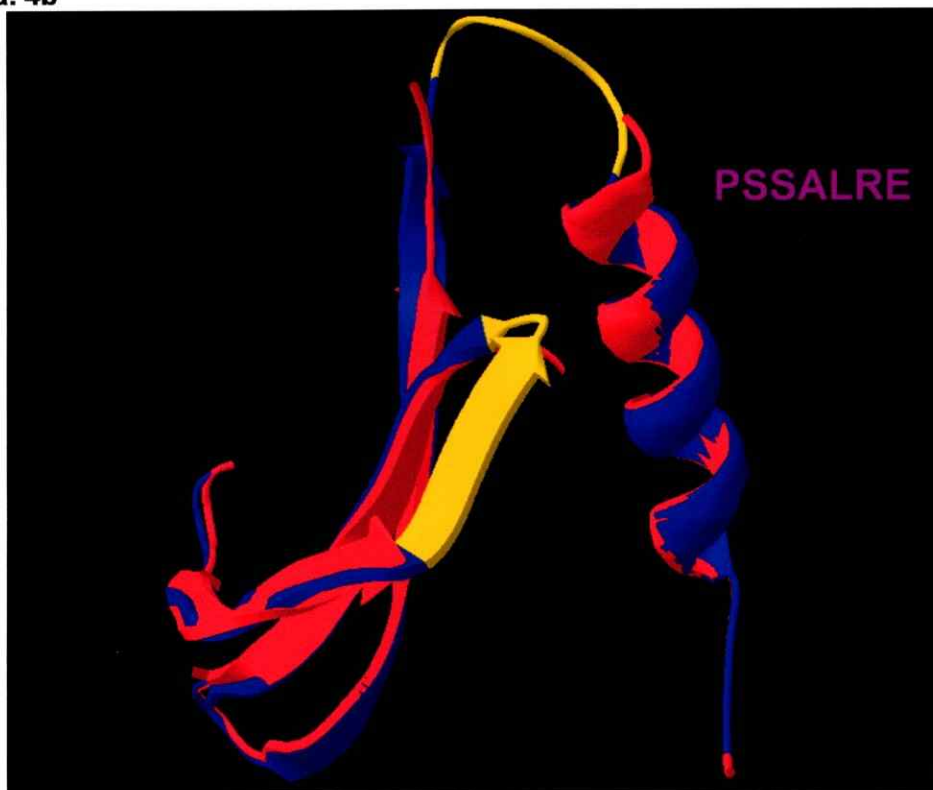
Adicionalmente, estos fragmentos no resueltos en la estructura cristalina, son en parte los responsables de aumentar la pequeña desviación que existe, cuando se calcula el RMSd, sugiriendo que la estructura generada por el servidor *SwissProt* tiene una desviación aún menor que la calculada originalmente si se tiene en consideración el punto anterior. Por lo tanto, el resto del trabajo desarrollado en esta tesis se realizó

con la estructura de cdk5 generada por el servicio de modelamiento de *SwissModel*, a la cual llamamos cdk5-Swiss.pdb (Figura 4).

**Figura. 4a**



**Figura. 4b**



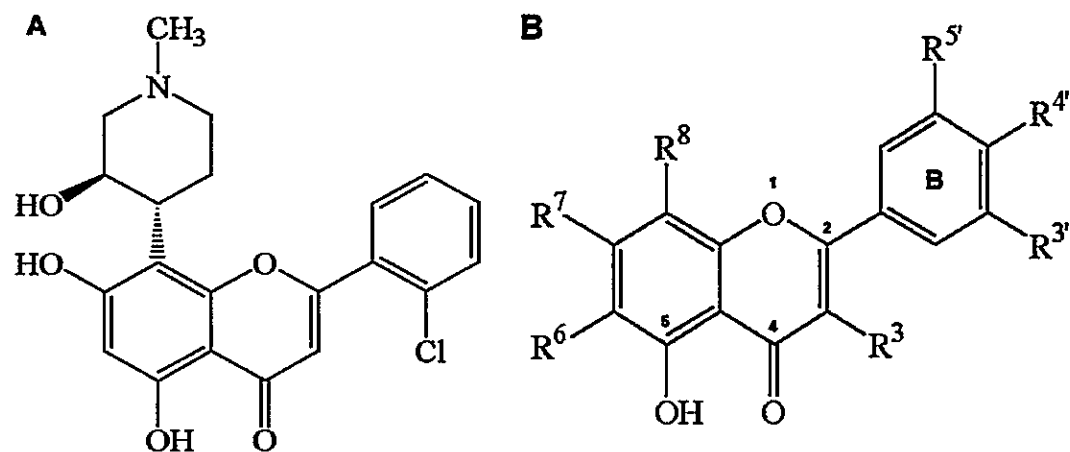
**Figura. 4a:** (A) Estructura de cdk5 obtenida del *Protein Data Bank* (1HL4.pdb). (B) Estructura de cdk5 generada por el servicio de modelación *Swiss-Model*. **Figura 4b:** Acercamiento de la zona no resuelta en la estructura cristalina, la cual está corregida en el nuevo modelo coloreado en amarillo.

Antes de proceder con los estudios teóricos de docking realizados, analizaremos los resultados de los estudios experimentales que efectuamos con distintos potenciales inhibidores de cdk5.

### 6.1.2. Medición de IC<sub>50</sub>

Para llevar a cabo este estudio generamos estructuras derivadas de las flavonas, las cuales son muy conocidas por sus características antioxidantes y por su potencial uso en la inhibición de proteínas quinasas. Uno de los inhibidores mas selectivos y afines es el flavopiridol (Figura 5) [52]. Particularmente flavonas naturales como la apigenina y el kaempferol han demostrado ser capaces de inhibir cdk1, mientras que luteolina y quercetina han mostrado capacidades para inhibir cdk2 [53].

Figura. 5



**Figura. 5:** A: Flavopiridol, inhibidor conocido de las cdk's. B: Flavonas sustituidas: sus variantes se pueden ver en el apéndice A1.

La estrategia usada para medir el efecto de 12 flavonas naturales en la actividad de cdk5, consistió en utilizar cdk5 inmunoprecipitada de extractos de cerebros fetales. Posteriormente se midió la actividad de quinasa en presencia de concentraciones crecientes (de 1  $\mu$ M a 250  $\mu$ M) de cada flavonoide usando histona H1

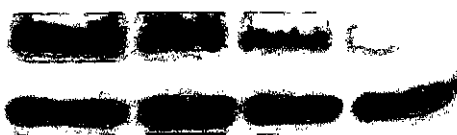
como sustrato de la proteína quinasa. Empleando un método densitométrico se analizaron los niveles de histona H1 fosforilada (Figura 6A), y se asignaron valores de  $IC_{50}$  estimados, obtenidos de los gráficos realizados para cada inhibidor, como el de la Figura 6B.

**Figura. 6A**

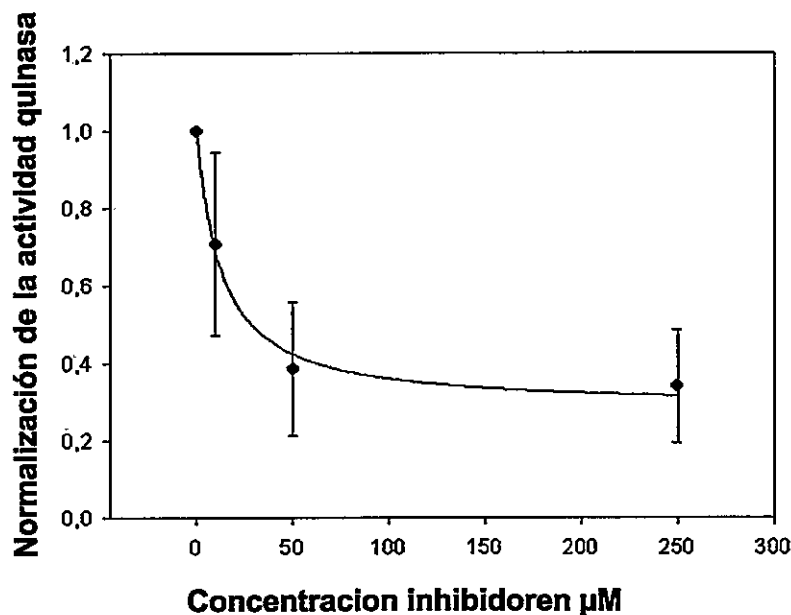
Histona H1

cdk5

6-metoxiapigenina 0 $\mu$ M 10 $\mu$ M 50 $\mu$ M 250 $\mu$ M



**Figura. 6B**



**Figura. 6:** A: Western blot del ensayo *in vitro* de la actividad quinasa de cdk5 en presencia de concentraciones crecientes del inhibidor 6-metoxiapigenina utilizando histona H1 como sustrato de cdk5. Se controlaron los niveles de cdk5 los cuales se mantienen constantes para cada ensayo. B: Grafico de las intensidades de las bandas, relativas al control sin inhibidor, medidas por densitometría. Las barras de dispersión son la Desviación Standard (DS) que se obtiene al repetir el ensayo 3 veces.

La mayoría de los 12 compuestos probados no mostraron una inhibición significativa de cdk5 ( $IC_{50} > 250 \mu M$ ), aunque ciertas moléculas sí mostraron tener alguna actividad inhibitoria tales como la 6-metoxiapigenina y la 6-metoxiluteolina siendo éstas las más potentes del conjunto de moléculas ensayadas. Estos datos están tabulados en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Valores estimados de  $IC_{50}$  y *GOLD fitness score*.

Compuesto	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )	<i>GOLD fitness score</i>
<b>Flavonas</b>		
Crisina	N.R.	44,51
Baicaleína	N.R.	44,50
Apigenina	> 250	50,94
Luteolina	> 250	49,84
6-Hidroxiapigenina	N.D.	51,95
6-Hidroxiluteolina	N.D.	49,86
6-Metoxiapigenina	19,1 $\pm$ 3,7	51,40
6-Metoxiluteolina	40,0 $\pm$ 25,1	53,23
5,7-Dimetoxi-hidroxi-flavona	> 250	48,43
<b>Flavon-3-oles</b>		
Kaempferol	66,1 $\pm$ 25,1	51,39
Quercetina	63,4 $\pm$ 29,4	51,77
6-Hidroxikaempferol	N.D.	51,05
6-Hidroxiquercetina	N.D.	51,13
6-Metoxikaempferol	N.D.	54,21
6-Metoxiquercetina	N.D.	53,75
Miricetina	71,1 $\pm$ 19,3	47,39

Los resultados obtenidos para los  $IC_{50}$  fueron obtenidos densitométricamente y los valores de dispersión son la desviación estándar (con  $n = 3$ ), al igual que en la Figura 6.  
N.R.: No reproducible; N.D.: No determinado.

Hay que ser preciso y cuidadoso en las relaciones que son posibles de hacer con los resultados entregados por GOLD, debido a que no son valores simplemente comparables cuando la estructura de los ligandos difieren mucho, así por ejemplo, únicamente se podría argumentar que la introducción de un grupo metoxilo (CH<sub>3</sub>) en el carbono 6 de la apigenina, correlaciona su aumento del score entregado por GOLD y su actividad evaluada entre apigenina y 6-metoxiapigenina (Tabla 2). Esto nos valida la idea de buscar y hacer modificaciones mínimas a compuestos *in silico*, para encontrar una mejoría en la potencia de ligandos o posibles drogas.

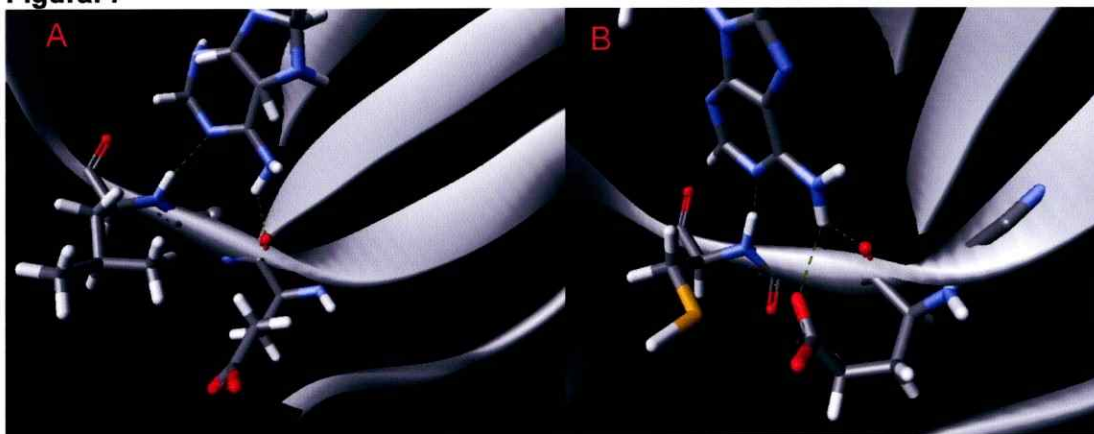
### 6.1.3. *Docking* de flavonas y flavonoides

Una manera de interpretar los resultados experimentales obtenidos, es estudiando y comparando las posibles diferencias estructurales entre los sitios activos del ATP de las quinasas dependientes de ciclina número 2 (cdk2) y 5 (cdk5), y así poder evaluar la posibilidad de encontrar ligandos más selectivos. Otra manera, consiste en hacer estudios de *docking* de ligandos con cdk5.

Para estudiar las diferencias estructurales, comenzamos haciendo un alineamiento estructural entre cdk2 (1FIN.pdb) y cdk5-Swiss.pdb. Este alineamiento consistió en la superposición de los esqueletos aminoacídicos de cada proteína, conteniendo 1052 átomos y entregando un RMSd de 0,81Å (fueron utilizados 1052 átomos del esqueleto para el cálculo de RMSd), sugiriendo que las estructuras tridimensionales de las proteínas están suficientemente bien conservadas. Posteriormente, se creó una esfera abarcando todo el sitio activo de las dos quinasas (radio de la esfera 10Å). El punto central de esta esfera se tomó como uno de los átomos de oxígeno carboxílicos del Asp144 en cdk5, residuo que está conservado en su posición, pero que corresponde al Asp145 en la secuencia de cdk2 [54]. Esto fue

muy útil para determinar residuos comunes a las dos enzimas que están conservados y que podrían desempeñar un papel importante en la interacción con el ATP. En la esfera generada, todos los residuos están conservados en cdk2 con la excepción de la Cys83 de cdk5 que corresponde a una leucina en cdk2 (Figura 7).

**Figura. 7**

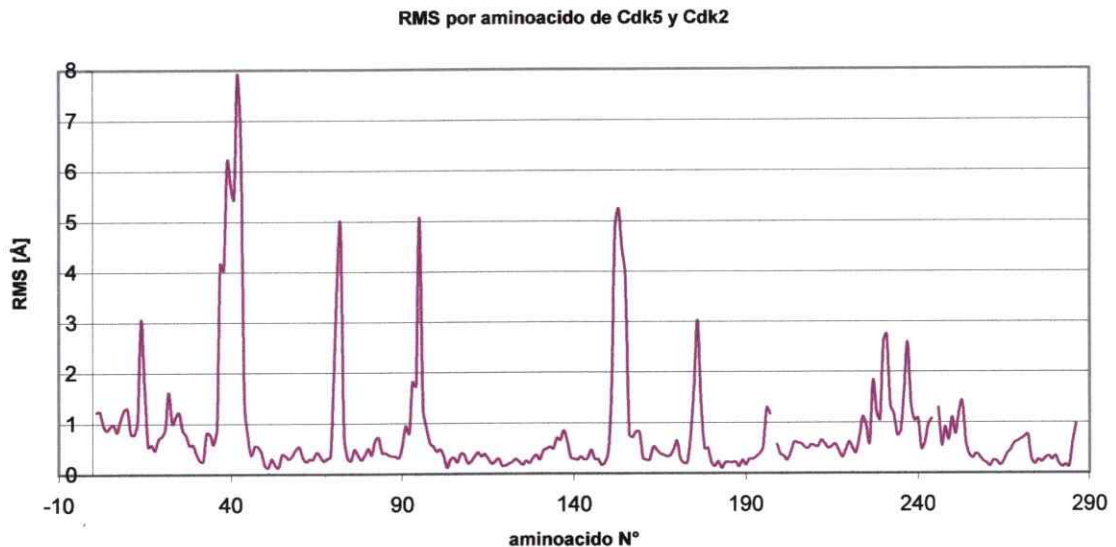


**Figura. 7:** A: La estructura cristalina de cdk2/ATP y las interacciones por puentes de hidrógeno se ven con líneas punteadas en verde. B: El modelo de cdk5 Swiss con el ATP obtenido de la estructura del complejo cdk2/ATP. Se observa que después de someter la estructura a minimización, ésta mantiene los puentes de hidrógeno sin importar la cadena lateral que presente el residuo 83 (Leu en cdk2 y Cys en cdk5).

Se observó un alto porcentaje de similitud tanto en secuencia como en estructura del sitio activo de estas enzimas. Para demostrar esta similitud se calculó el RMSd sólo de los átomos que se encuentran dentro de la esfera de 10 Å que definimos anteriormente, la que abarca principalmente el sitio de unión del ATP. Este cálculo dio una RMSd de 0,36 Å (utilizando 112 átomos correspondientes al esqueleto de los átomos comprendidos en la esfera), proponiendo que la desviación de 0,81 Å que calculamos anteriormente para la proteína completa se debe principalmente a otras zonas que deben estar menos conservadas, sugiriendo que éstas tendrían una menor relevancia para la función de la enzima, o bien que simplemente correspondan a lazos,

que no tienen necesariamente distribuciones espaciales similares aunque se conserven en secuencia. Esto también hace aumentar la desviación global (Figura 8).

**Figura. 8**



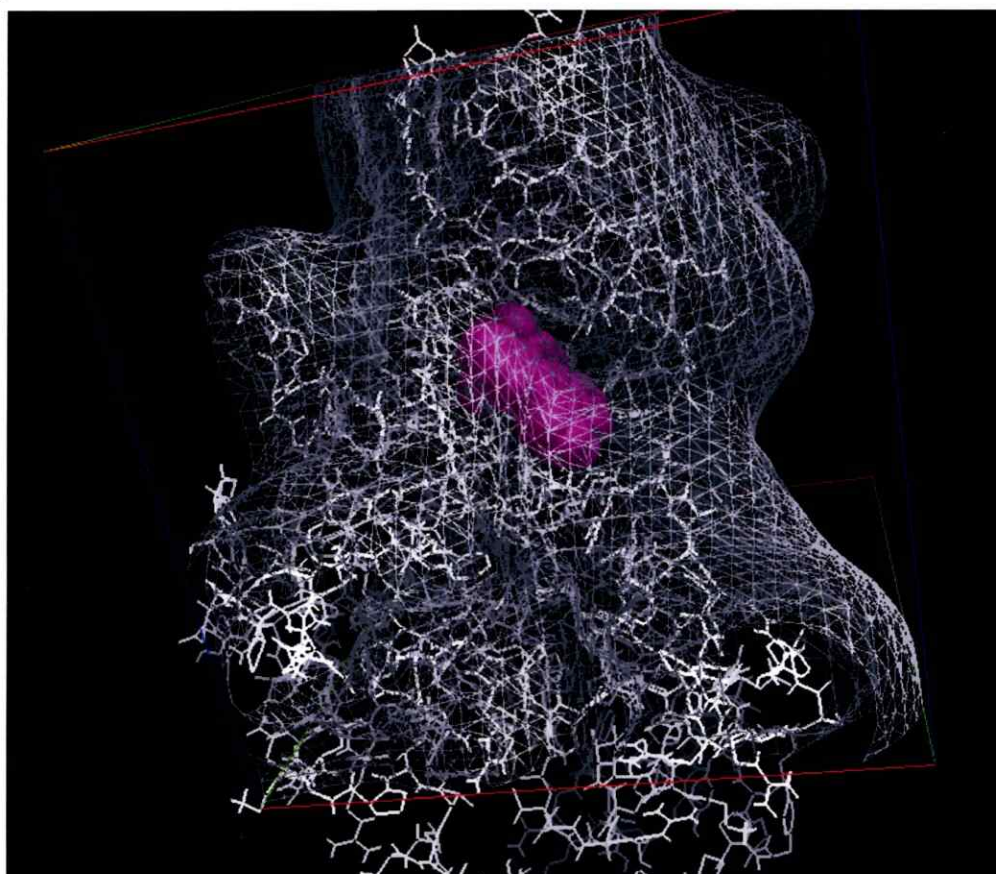
**Figura 8.** Análisis de la desviación cuadrática media (RMSd en Å) entre cdk5 y cdk2 por aminoácido. Los distintos picos corresponden a lazos que no mantienen una posición fija, y a la zona carboxilo terminal. Desde el aminoácido 200 se observa una pérdida de conservación estructural. Esto podría explicarse a que esa zona habría sido sometida a una selección evolutiva menos estricta, permitiendo la variabilidad secuencial y/o estructural sin afectar la función.

Bajo la idea que desarrollamos y comentamos recientemente sobre la alta identidad de los sitios activos de cdk2 y cdk5 y que aún no se conoce una estructura cristalina de cdk5 en presencia de la molécula de ATP en su sitio activo, decidimos usar la estructura cristalográfica del ATP proveniente de la una de las estructuras de cdk2 (la 1QMZ.pdb) superponiendo las dos estructuras y luego eliminando a cdk2 (Figura 7). Así se construyó un modelo del complejo cdk5/p25 con la molécula de ATP en su sitio activo. Posteriormente, esta estructura fue sometida a minimización, dejando rígido el esqueleto de la proteína. Dando como resultado que cdk5 mantiene los mismos contactos que cdk2 tiene con el ATP en su sitio activo.



Sobre esta base se hicieron los distintos *docking* de flavonoides con cdk5 usando el algoritmo genético que utiliza el programa GOLD v3.0 (Figura 9) los cuales se muestran en la Tabla 2 en forma de “*GOLD fitness score*”, una función de energía calculada por el mismo programa que evalúa las interacciones. Esta función de energía entrega un valor arbitrario para cada interacción calculada, en donde un valor mayor representa una menor energía de interacción, por lo tanto mayor afinidad entre el ligando y el sitio de la macromolécula con la cual interactúa.

**Figura 9.**



**Figura 9.** Caja periódica, donde se analiza la superficie de la proteína con una grilla electrostática y se delimita el volumen en donde el ligando (en morado) va a buscar la conformación e interacción más favorable energéticamente.

## 6.2. Capitulo II

### 6.2.1 Estudios de inhibición de cdk5 mediante los péptidos sintéticos P1, P2 y P3, diseñados para interferir con la interacción cdk5/p35.

La inhibición específica de alguna de las cdk5 y en particular de cdk5 es una tarea difícil de llevar a cabo por la gran identidad que las distintas cdk5 presentan tanto en sus secuencias como en sus estructuras. Por lo tanto, intentando conseguir una inhibición específica esta tesis se orientó a buscar la forma de inhibir cdk5 con un péptido que imite la zona del *T-loop* (Pro145-Leu165) de cdk5. Bajo esta estrategia esperamos que dicho péptido presente una suficiente afinidad por p35/p25, impidiendo la activación de cdk5, al secuestrar el activador o mejor expresado como cambiar el equilibrio de interacción entre cdk5 y p25.

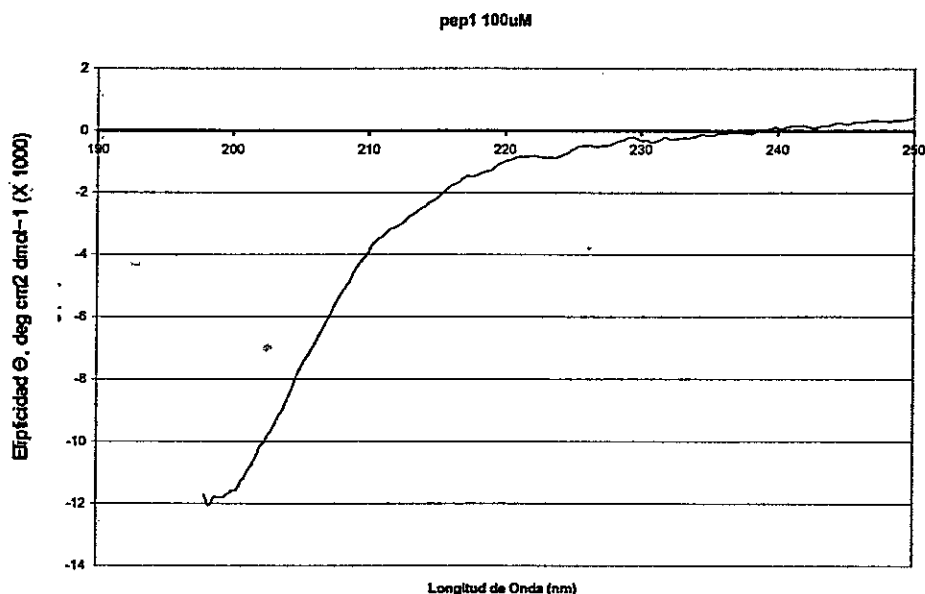
Se diseñaron tres péptidos, P1, P2 y P3 derivados del lazo conocido como el *T-loop* en cdk5 (ver 5.2.2.8) los péptidos son fragmentos sintetizados, que contenían los aminoácidos más reactivos del *T-loop*.

Antes de hacer los ensayos de inhibición de cdk5 con estos péptidos, decidimos analizar la estructura secundaria que presentan estos péptidos a pH 7,4, valor relevante puesto que es al cual se hacen los ensayos de actividad quinasa posteriormente.

Los resultados de dicroísmo circular (DC) mostraron, de acuerdo a la Figura 10, que ninguno de los 3 péptidos tiene una estructura secundaria definida, lo que se conoce como *random coil*. Esto indica que la secuencia aminoacídica presenta muchos grados de libertad en sus enlaces para moverse, lo que significa que no es posible predecir o definir su estructura en solución.

Esto era de esperar porque se trata de fragmentos de un lazo que se encuentra en la superficie de cdk5 y que tienen muy pocos residuos para lograr un plegamiento con algún tipo de estructura secundaria.

**Figura. 10**



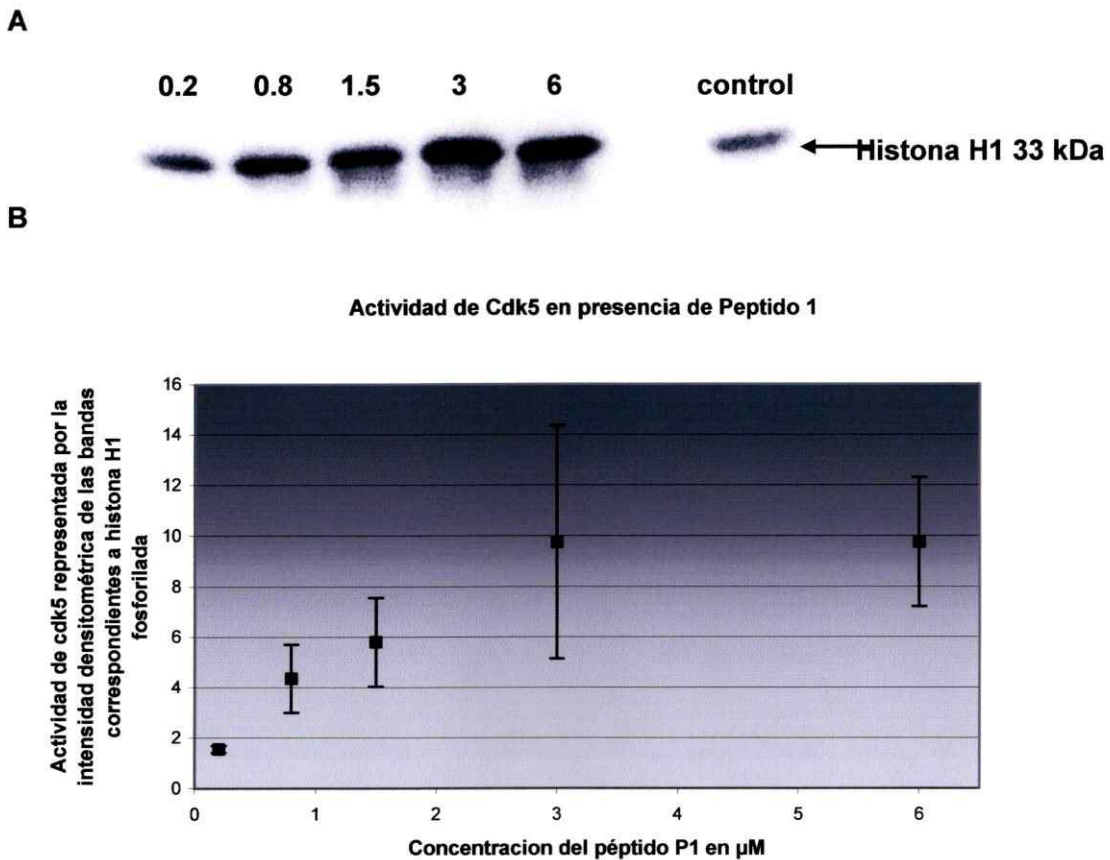
**Figura 10.** Dicroísmo circular en el intervalo del UV-lejano del P1 a una concentración de 100  $\mu$ M en una cubeta de cuarzo de 2 mm de paso óptico. Los tres péptidos mostraron una curva similar. Ninguno de ellos presenta alguna estructura secundaria definida.

La razón de conocer la estructura, fue principalmente para poder posteriormente modelar convenientemente estos péptidos y estudiar sus interacciones con p25.

Una vez determinado que los péptidos no presentan estructura secundaria definida, se hicieron los ensayos de actividad quinasa con cdk5 y p25 recombinante en presencia de los diferentes péptidos. Este ensayo se hizo esperando observar una disminución en la actividad de cdk5. Los ensayos se hicieron a concentraciones

crecientes de péptidos entre 0,2  $\mu\text{M}$  y 12  $\mu\text{M}$ . El único péptido que mostró algún cambio en el patrón de actividad de la cdk5 fue el P1 (Figura 11). Los péptidos P2 y P3 no mostraron algún cambio en relación al control sin péptido.

**Figura. 11**



**Figura 11.** A: Ensayo de actividad quínica; histona H1 fosforilada; de izquierda a derecha. 0,2  $\mu\text{M}$ , 0,8  $\mu\text{M}$ , 1,5  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 6  $\mu\text{M}$  de P1. El control corresponde al ensayo de actividad sin péptido P1. B: En el gráfico es la cuantificación por densitometría de los ensayos realizados a las distintas concentraciones (con  $n = 4$ ) el punto elegido es el promedio aritmético de las intensidades menos la intensidad del control. Las barras de dispersión corresponden al error estándar asociado a los cuatro ensayos. El valor P para el ensayo es considerado significativo ( $P = 0,0042$ ), aunque los únicos puntos considerados estadísticamente significativos son el control contra el ensayo con 6  $\mu\text{M}$  de péptido P1. Estadística hecha con un prueba de Kruskal-Wallis (ANOVA no paramétrica).

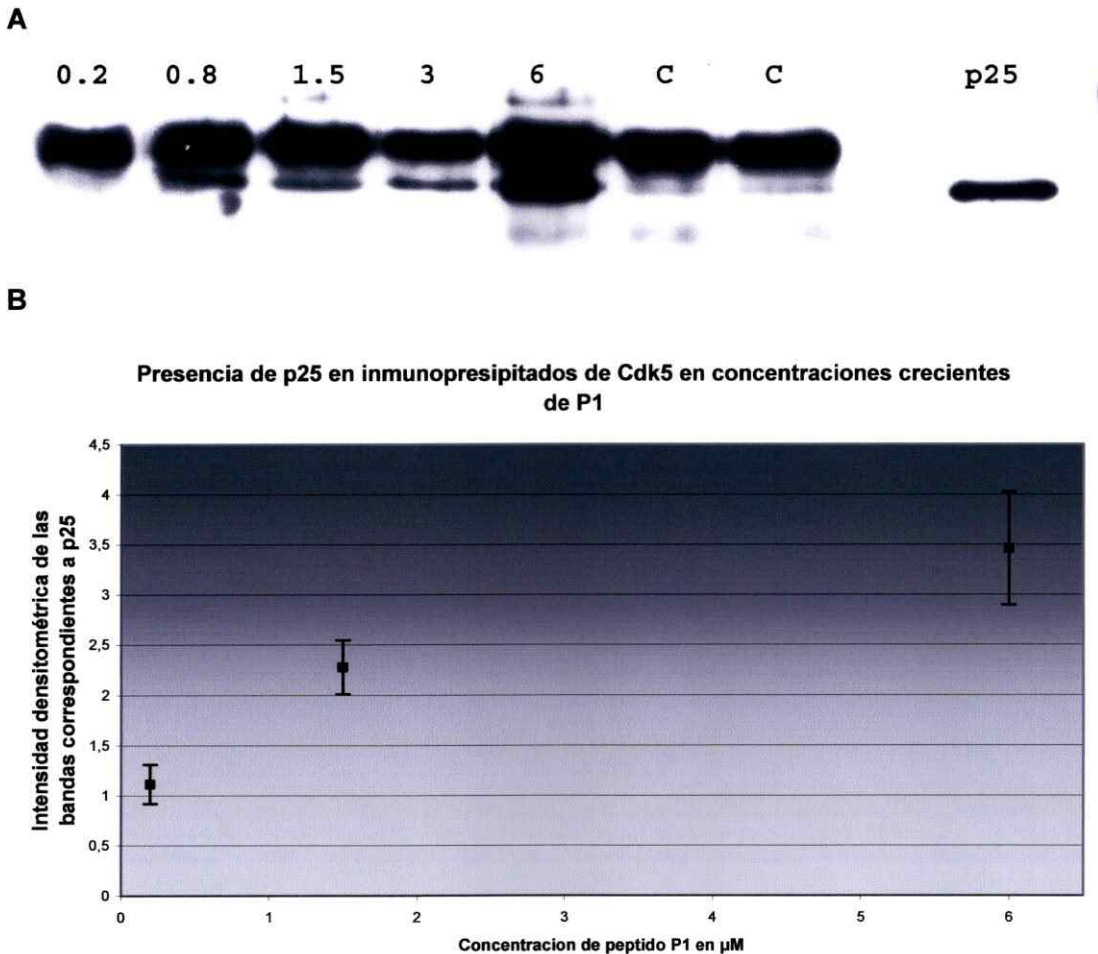
Sorpresivamente, se observó un efecto contrario al esperado, puesto que se aprecia un incremento de hasta 9 veces en la actividad de la quinasa al normalizarla con el control hecho en ausencia de péptido (Figura 11). Nos planteamos una posible explicación sugiriendo que el péptido, al carecer de estructura definida, tendría la capacidad de unirse inespecíficamente a distintas proteínas. De esta forma, en vez de inhibir la unión de p25, estaría estabilizando el complejo cdk5/p25.

### **6.2.2. Estudio de la Interacción cdk5/p25 por co-inmunoprecipitación**

Para analizar esta alternativa, se dispuso probar la interacción de p25 con cdk5 en presencia de P1 usando las mismas concentraciones crecientes que en el ensayo anterior. Para ello, se evaluó la cantidad relativa de p25 unida a la enzima, a través de inmunoprecipitación de cdk5 y la posterior detección de p25 unida a la proteína inmunoprecipitada.

En la Figura 12A se muestran los resultados de dos controles negativos sin péptido (C) y uno positivo con p25 recombinante purificada. Las bandas que se aprecian en cada carril por encima del peso molecular de p25 se deben a una reacción cruzada entre el anti-p25 y el anticuerpo policlonal usado para inmunoprecipitar cdk5. A mayores concentraciones de P1, co-inmunoprecipita más p25, como se ve en la figura 12A. A una concentración 6  $\mu\text{M}$  de P1 hay una gran cantidad de p25 comparada con bajas concentraciones de este mismo péptido (0,2  $\mu\text{M}$ ).

Figura. 12



**Figura 12. A:** Estudios de inmunoprecipitación en presencia del péptido sintético P1. De izquierda a derecha: 0,2  $\mu\text{M}$ , 0,8  $\mu\text{M}$ , 1,5  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$  y 6  $\mu\text{M}$  de P1, luego dos controles (C) sin péptido y finalmente el control positivo de p25 purificada (la misma que se utiliza para los ensayos de actividad quinásica). **B:** Se repitieron sólo los puntos de 0,2, 1,5 y 6  $\mu\text{M}$  de péptido P1 ( $n = 3$ ). El punto obtenido en el grafico es el promedio aritmético de las intensidades normalizadas con el control. Las barras de dispersión corresponden al error estándar asociado a los tres ensayos. Los niveles de cdk5 fueron los mismos en todos los ensayos (*Western blots* no mostrados). El ensayo es estadísticamente significativo con un  $P = 0,0457$  con una prueba de ANOVA, al igual que la intensidad del control comparada con el ensayo de 6  $\mu\text{M}$  de P1. Estadística hecha con un prueba de Kruskal-Wallis (ANOVA no paramétrica).

### 6.2.3. Estudio teórico de docking del péptido P1 con el complejo cdk5/p25

Considerando los resultados obtenidos, se propuso simular la interacción del péptido P1 con el complejo cdk5/p25. Las estructuras energéticamente más favorables deberían encontrarse en la interfase entre cdk5 y p25. De acuerdo a los resultados entregados por *AutoDock* y a lo esperado, se obtuvieron estructuras de menor energía en la zona de interfase entre cdk5 y p25, que corresponden a las grillas 5 a 8. Esto se puede apreciar en el Apéndice A2.

Posteriormente decidimos obtener valores energéticos provenientes del programa *Delphi* que está implementado en *InsightII*. Para esto tomamos las mejores 3 energías que obtuvimos con *AutoDock* y las sometimos a 500 pasos de minimización dejando rígidas las cadenas peptídicas del complejo y del péptido, para luego hacer la evaluación energética de cada uno de los péptidos con *Delphi*. Los valores obtenidos para las 3 estructuras elegidas se ven en la Tabla 3

Tabla 3.

Nombre	Ubicación Apen. A2		AutoDock kcal/mol	InsightII # Puentes de H	Delphi [kcal/mol]		
	Grilla	Run			VdW	Elect.	Total
Mejor_17	6	17	-7,95	4	-63,4406	-883,221	-946,661
Mejor_18	8	18	-9,2	8	-36,4096	-1068,57	-1104,98
Mejor_26	6	26	-9,05	2	-34,8503	-819,992	-854,733
Control	6	1	-3,21	2	-47,737	133,222	85,485

### 6.3. Diseño teórico de un cierre de leucinas.

Una vez hecho el estudio de inhibición del complejo con los péptidos derivados del *T-loop* de cdk5 (P1, P2, P3), quedó en evidencia la necesidad de contar con un inhibidor que tuviera una estructura secundaria estable en el tiempo, ya que la condición de *random coil* de los péptidos usados anteriormente los hace muy inespecíficos y difícil predecir su selectividad. De hecho el péptido P1 fue capaz de estabilizar el complejo, contrariamente a los fines buscados.

Se decidió diseñar péptidos que presenten una hélice alfa estable imitando el segmento PSSALRE, el cual también se ubica en la zona de interacción con p25. La solución al diseño se obtuvo utilizando la estructura cristalina de un cierre de leucinas.

A partir de la estructura cristalina de cdk5/p25 (1H4L.pdb), se identificaron las interacciones de tipo Van der Waals, los puentes de hidrógeno y las interacciones entre cargas que presenta PSSALRE con p25.

Se buscaron las interacciones entre cdk5 y p25 entre 3 y 3,5 Å en la estructura cristalina de cdk5-p25. Los residuos que se encuentran en rojo en la Tabla 4 son parte de la hélice PSSALRE de cdk5 y se puede observar que éstos son mayoritariamente polares o cargados. Además, existen al menos 6 interacciones de puente de hidrógeno entre cdk5 y p25 y de éstos al menos 4 corresponden a la interacción de PSSALRE con p25.

Esto evidencia que una estructura que imite la hélice alfa PSSALRE podría ser un buen candidato a inhibidor de cdk5. Existe la descripción cristalográfica de un cierre de leucinas denominado GCN4 pero cuya identificación es 2ZTA.pdb [48] en el *Protein Data Bank*, que se encuentra como homodímero [Figura 13]. Una vez obtenida esta estructura se procedió a hacer las superposiciones del cierre de leucina con la hélice alfa PSSALRE.



Tabla. 4 Interacciones entre cdk5 y p25 en la estructura cristalina\*

Interacción a 3,0 Å		
cdk5	P25	Enlaces de hidrógeno
<b>ARG50</b>	SER235	<b>GLU57</b> -SER269
<b>GLU57</b>	MET237	ARG149-MET237
<b>LYS56</b>	ASN239	<b>ARG50</b> -SER235
ARG149	ASN266	
GLY152	SER269	
CYS157	ASN276	
Interacción a 3,5 Å		
cdk5	P25	Enlaces de hidrógeno
<b>GLY43</b>	ALA199	<b>HIST71</b> -ASP259
<b>SER46</b>	TYR231	SER46-TYR243
<b>LYS56</b>	TYR236	<b>GLU57</b> -SER270
HIS71	ILE241	
ASN121	SER242	
ALA150	TYR243	
ILE153	GLU255	
SER159	TRP258	
	ASP259	
	SER270	
	ALA277	

\*Estudio global de las interacciones entre cdk5 y p25 en la estructura cristalina del complejo (1H4L.pdb). En rojo se muestran los aminoácidos que son parte de la alfa hélice PSSALRE de cdk5.

Una vez realizada la superposición de estas estructuras con el cierre de leucina, procedimos a calcular la RMSd de la estructura cristalina del cierre de leucinas con respecto a la alfa hélice PSSALRE de cada una de las estructuras de cdk5. La mejor superposición se logro con la cadena B de cdk5 en 1HL4.pdb y con la cadena B del cierre de leucina, que también es un homodímero, generando finalmente un RMSd de

0,36 Å [figura 14]. En la superposición estos fragmentos quedaron alineados como lo muestra la Tabla 5.

Tabla. 5. Alineamiento estructural entre la alfa hélice PSSALRE de cdk5 y GCN4.

Estructura	Aminoácidos alineados estructuralmente													
2ZTA_B	L12	L13	S14	K15	N16	Y17	H18	L19	E20	N21	E22	V23	A24	R25
1HL4_B	V44	P45	S46	S47	A48	L49	R50	E51	I52	C53	L54	L55	K56	E57

En rojo se indican las mutaciones necesarias para hacer que el cierre de leucina (GCN4) quede imitando la superficie de interacción del motivo PSSALRE de cdk5 con p25. Adicionalmente a las mutaciones indicadas en rojo, se debió acortar la cadena lateral del residuo leucina 13 de GCN4 cambiándola por una alanina, para evitar choques de VdW con p25. La secuencia que contiene todas las modificaciones anteriormente descritas, incluyendo la mutación L13A, se denominó Z3WT.

Figura. 13

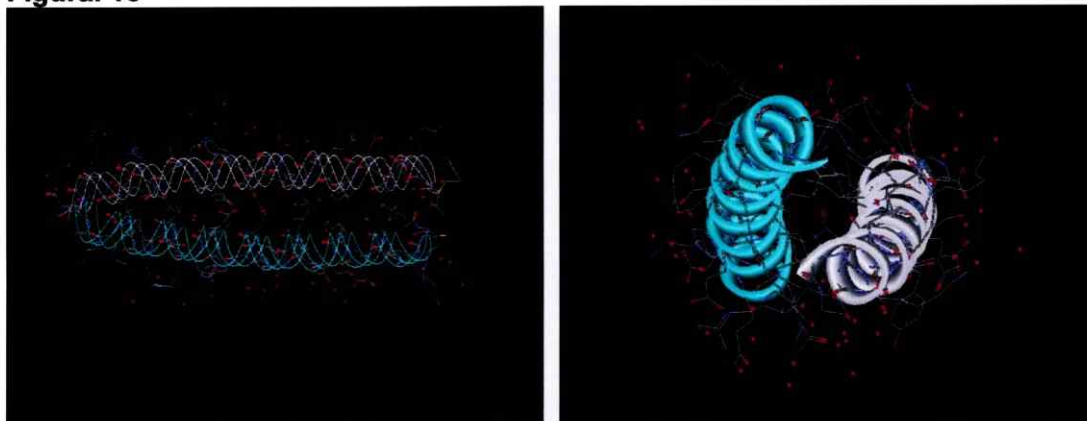


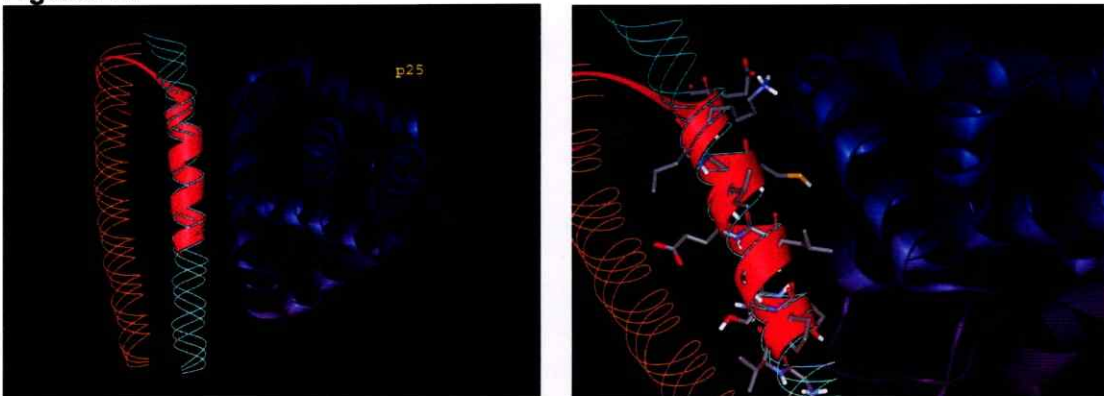
Figura. 13. Vistas lateral y frontal de la estructura del GCN4 con el nombre en la base de datos 2ZTA.pdb.

Las mutaciones se introdujeron manualmente en la estructura, utilizando SPDBV, debido a que la librería de rotámeros no es lo suficientemente completa en este programa, se usó posteriormente un programa diseñado en el *EMBL-Heidelberg* llamado *PERLA*, el cual hace una búsqueda exhaustiva de todos los rotámeros,

minimiza y crea un archivo pdb (con nuevas coordenadas) para cada una de las nuevas estructuras.

Adicionalmente, en la posición 20 de GCN4 no quedaba clara la necesidad de conservar el ácido glutámico o sustituir éste por algún residuo hidrofóbico, ya que al estudiar las estructuras visualmente se observó en p25 un pequeño racimo de residuos hidrofóbicos y también una carga en las proximidades del glutámico 20 de GCN4, según el análisis electrostático al cual se sometió p25. Es por esto que se instruyó al programa PERLA para que generara todas las mutaciones que se muestran en rojo en la tabla 5, más la mutación de L13A para evitar los choques y el posible cambio en la posición 20 del GCN4, en donde se probó tanto un residuo de ácido glutámico como una isoleucina.

**Figura. 14**



**Figura. 14.** En cintas rojas se muestra la estructura cristalina de la alfa hélice PSSALRE de cdk5 y en azul su activador p25. Las distancias entre cdk5 y p25 son las que vienen en las coordenadas 1HL4.pdb. Aquí se aprecia la mejor de las superposiciones entre PSSALRE y la cadena B (en calipso) del GCN4 (RMSd 0,36 Å).

Una vez hecho esto, se evaluaron las energías y choques de cada estructura. Para esto utilizamos el programa *FoldX* también desarrollado en el *EMBL*. Finalmente se eligió la estructura Z3WT-2\_min.pdb [Apéndice A3], la cual fue optimizada por PERLA dejando finalmente una isoleucina en la posición 20, una alanina en la posición

de la leucina 13 y las mutaciones que se muestran en rojo en la Tabla 5. Esta estructura “nativa” es la que se denominó WT, puesto que imita la superficie original de la alfa hélice PSSALRE de cdk5.

A partir de esta estructura se generó una batería de mutantes de la estructura nativa (WT) en busca de mejorar la interacción de la alfa hélice con p25. Esta tarea fue realizada utilizando el programa PERLA, el cual generó un gran número de mutaciones. Este programa entregó para cada mutación el mejor rotámero que encontró en su base de datos y además creó un archivo con las coordenadas de cada combinación de mutaciones (Tabla 6).

**Tabla. 6. Resumen de las mutaciones generadas por PERLA, sobre el WT para obtener una batería de mutantes.**

# Residuo (del GCN4)	Mutaciones	# de posibles Combinaciones	Tarea #
3	E; Q; D; K	480	1
10	E; Q; D; S; N; L; I		
11	D; Q; N; S; E		
14	T; D; S		
15	K; N; S; D; T	180	2
20	Y; F; I; L; W; E		
21	D; V; L; I; C; M;		
24	K; D; S; Q; D; Y; M; L	96	3
25	R; E; D; N		
28	K; E; Y		

Como el número de combinaciones posibles es enorme y eso significa un costo computacional altísimo, se dividió el trabajo en 3 tareas como lo indica la Tabla 6. Una vez que PERLA había generado todas las combinaciones de cada tarea (un archivo de



coordinadas por cada combinación), cada una de las estructuras fue sometida a tres minimizaciones de 25 ciclos cada una. Luego se introdujeron todas estas estructuras en *FoldX* para hacer el análisis energético de cada una, tal como se hizo para la estructura WT que se mostró en el apéndice A3.

Se eligieron las 15 combinaciones de estructuras energéticamente mejor evaluadas y se analizaron las proporciones de aminoácidos en cada posición para la cual se le solicitó a PERLA que generase las mutaciones. El resumen de cada tarea se puede ver en la Tabla 7.

**Tabla 7. Análisis por aminoácidos de las 15 mutaciones mejor evaluadas energéticamente por FoldX, para cada tarea.**

<b>Tarea #1</b>	<b>Veces que fue remplazado por:</b>
Lys3	7E; 4Q; 2K; 2D
Glu10	15S
Glu11	9E; 4Q; 2S
Ser14	12S; 3T

<b>Tarea #2</b>	<b>Veces que fue remplazado por:</b>
Lys15	11K; 2S; 2D
Glu20	11I; 3L; 1F
Cys21	8V; 5I; 2L

<b>Tarea #3</b>	<b>Veces que fue remplazado por:</b>
Lys24	6K; 3Q; 3S; 2L; 1M
Glu25	13N; 2D
Lys28	13K; 1Y; 1E

Después de comprobar que las mutaciones sugeridas por PERLA no crearan interacciones desfavorables con otros aminoácidos y además estuviesen favoreciendo la interacción con p25 y no una intrainteracción, se puede decir que;

- 1.- Tendría un efecto favorable mutar la Lys3 por un ácido glutámico.
- 2.- El Glu10 tendría que mutarse por una serina.
- 3.- El Glu11 no debería modificarse.
- 4.- La Ser14 y la Lys15 deberían conservarse.
- 5.- El Glu20 debería ser mutado por un aminoácido hidrofóbico como la isoleucina.
- 6.- La Cys21 debería mutarse por una valina o una isoleucina.
- 7.- La Lys24 habría que mutarla por una glutamina o dejarla como Lys.
- 8.- El Glu25 se debería mutar por algún aminoácido hidrofóbico.
- 9.- La Lys28 no debería modificarse.

Luego de obtener todos estos datos de mutaciones y verificar las estructuras visualmente, decidimos ensayar en la posición del Asp7 una mutación por una arginina o lisina en la siguiente iteración.

Con todas estas mutaciones se acotó la búsqueda de posibilidades y se hizo nuevamente una iteración, incluyendo la información proporcionada por *FoldX*, como agregar aminoácidos hidrofóbicos en la posición 25 y las posibles mutaciones del Asp7 además de las otras sugerencias.

Tabla. 8. Resumen final de las estructuras seleccionadas.

WT	K3	D7	E10	E11	S14	K15	I20	C21	K24	E25	K28
<b>Mut-1</b>	K3E	D7L	E10S	E11S	S14	K15	I20	C21V	K24Q	E25N	K28
<b>Mut-2</b>	K3E	D7K	E10S	E11S	S14	K15	I20	C21V	K24Q	E25V	K28
<b>Mut-3</b>	K3E	D7I	E10S	E11S	S14	K15	I20	C21V	K24S	E25N	K28

Finalmente las tres mejores energías evaluadas por *FoldX* para los mutantes junto a la combinación que se decidió anteriormente para el péptido WT, se resumen en la Tabla 8.

## 7. Discusión

La búsqueda de inhibidores específicos dentro de la familia de las cdk5 se ha tornado en un tema de suma importancia últimamente, puesto que estas quinasas están implicadas en un gran número de eventos dentro de las células. Así es que la comprensión de sus mecanismos de regulación en el contexto del ciclo celular son de importancia para comprender la patogénesis del cáncer y poder diseñar terapias que controlen este conjunto de enfermedades. En nuestro estudio ha sido crucial el intentar comprender la regulación de una de estas cdk5, la cdk5, a la luz de los descubrimientos realizados en nuestro laboratorio, con el fin de poder aportar información que ayude a entender y así también controlar la enfermedad de Alzheimer.

Para nuestro estudio en busca de inhibidores de la cdk5, era necesario saber algo más de la estructura tridimensional de la proteína. Por esto fue necesario orientar una parte del estudio a analizar el modelo por homología que generamos para cdk5. Para empezar el estudio, nos encontramos con que cdk2 presentaba un 60% de identidad con la secuencia de cdk5 y además tiene más de una estructura cristalina conocida. Así generamos el modelo con la ayuda de *MODELLER* y otras herramientas informáticas. Recientemente se publicó la estructura cristalina del complejo cdk5/p25, lo que nos ayudó a ser más precisos en nuestra búsqueda de inhibidores, puesto que trabajar con la estructura cristalina permite acercarnos a una situación real en relación al modelo que se infiere de la estructura de otras cdk5. Sin embargo esta estructura cristalina tiene una serie de dominios que no han podido ser resueltos por difracción de rayos X y lamentablemente son dominios de gran importancia para los estudios de *docking* que queríamos efectuar. Para suplir esta deficiencia decidimos enviar la secuencia de cdk5 al servicio en línea *Swiss-Model*. La estructura que generó el



servicio, presentó los sectores que estaban defectuosos en la estructura cristalina, manteniendo el cuerpo de la proteína prácticamente igual al que tiene en el cristal como se observa en la Figura 4. Una vez que tuvimos la estructura completa y optimizada de cdk5/p25, fue posible hacer los estudios de *docking* molecular. Es importante destacar que la RMSd entre la cdk5 cristalina y el modelo obtenido por *Swiss-Model* es de 0,45 Å, lo que es una desviación muy pequeña para una proteína del peso molecular de cdk5.

En el estudio de *docking* que llevamos a cabo utilizamos algunas flavonas ya conocidas por su poder inhibitorio sobre otras cdks [52], como es el caso de apigenina y el kaempferol frente a cdk1 y luteolina y quercetina frente a cdk2 [53]. Algunos de los otros compuestos no habían sido probados como inhibidores, mientras que otros solo fueron analizados computacionalmente

Entre los doce compuestos ensayados hay algunos que no mostraron una inhibición significativa de cdk5 ( $IC_{50} > 250 \mu M$ ). Otros sí mostraron tener alguna actividad inhibitoria [Tabla 2]. Tal es el caso de la 6-metoxiapigenina y la 6-metoxiluteolina, ya que éstos fueron los inhibidores más potentes de cdk5 que ensayamos experimentalmente. Aunque ellos tienen una potencia considerablemente menor que el Flavopiridol ( $0,17 \mu M$ ) [55] (Figura 5A), la capacidad inhibitoria de estos compuestos es similar a la informada para otros inhibidores descritos en otras publicaciones [56, 57]. Las variaciones en la capacidad inhibitoria de los compuestos ensayados guardaron relación con las diferentes sustituciones en los anillos aromáticos de las flavonas. Es así que el kaempferol y la quercetina fueron significativamente más potentes que la apigenina y la luteolina. Estas últimas se diferencian de los primeros en que no presentan el grupo hidroxilo en la posición C(3) [Figura 5B].

Para la interpretación de los datos adquiridos mediante los estudios de *docking*, especialmente sobre la disposición espacial de los ligandos, fue necesario compararlos de alguna forma con el posicionamiento de otros ligandos. Por esto hicimos un alineamiento estructural entre cdk2 (1FIN.pdb) y cdk5-*Swiss.pdb*. El RMSd de 0,81 Å que se obtuvo, se explica en el gráfico de la Figura 8, en donde se aprecian grandes señales que se deben a los distintos *loops* que hay en estas proteínas. Las estructuras secundarias se mantienen suficientemente bien conservadas entre cdk2 y cdk5, y es importante destacar que hacia la zona del carboxilo terminal (>200) de las proteínas la RMSd promedio aumenta. Esto se puede deber a que esa zona de la proteína, tanto en cdk2 como en cdk5, no tiene una mayor importancia funcional, lo que nos hace pensar que la variabilidad en esta zona es mayor, ya que se encuentra con menor presión evolutiva debido a que no juega un papel en la función de la proteína.

Por otra parte sugiere que la geometría de las proteínas está suficientemente bien conservada. Luego de ver la similitud estructural global entre cdk2 y cdk5, analizamos el sitio activo de cada una de ellas y definimos un radio que incluyese tal sitio activo de ambas proteínas. En este radio que elegimos arbitrariamente, la identidad tanto de la secuencia entre las dos proteínas y en su estructura es muy alta. Solo encontramos un residuo que no es igual entre cdk2 y cdk5. Este es la Cys83 en cdk5 (Leu83 en cdk2). Sin embargo, no resulta claro que dicho cambio en la secuencia aminoacídica tenga una mayor relevancia, debido específicamente a que la base nitrogenada del nucleótido ATP no interactúa con la cadena lateral de este residuo sino con sus grupos NH y CO de la cadena peptídica [Figura 7], actuando como dador y aceptor en enlaces por puentes de hidrógeno respectivamente. Es importante mencionar que los contactos que tiene el ATP en cdk2 son representados en su

totalidad por nuestro modelo de cdk5. Este hecho nos permite juzgar los cálculos de *docking* que realizamos con nuestros ligandos a continuación.

Como mencionamos recientemente, la gran similitud que mostraron los sitios activos no fue solo estructural, con una RMSd de 0,36 Å, sino también en su secuencia, lo que explica la falta de selectividad de los inhibidores conocidos para las distintas cdk. Luego de hacer los cálculos, todas las flavonas quedan posicionadas en la misma zona que la adenina y la ribosa del ATP. Curiosamente todas las flavonas que presentan algún grupo hidroxilo en el anillo B [Figura 5B], al interactuar con cdk5, están rotadas en 180° alrededor del eje que definen C(4) y O(1) [Figura 5B], respecto a las estructuras cristalinas de cdk2/ flavopiridol y des-cloroflavopiridol [58, 59] además de las otras estructuras implicadas en el *docking* como la crisina y la baicaleína.

En el flavopiridol, el oxígeno de la cromona se une por un puente de hidrógeno al grupo amino (NH) de la Cys83 y el hidroxilo en el C(5) dona su hidrógeno para formar otro puente con el grupo carbonilo del Glu81, al igual que la crisina, la baicaleína y el des-cloroflavopiridol que no presentan ningún tipo de sustituyentes en el anillo B. En todas las demás flavonas y flavonoides los ligandos están rotados, con lo cual el oxígeno de la cromona también se une al grupo NH pero el hidroxilo del C(5) interactúa con el carbonilo de la Cys83. Es muy interesante observar una similar inversión en la orientación entre la adenina del ATP y otros importantes inhibidores, como la iso-penteniladenina y la olomoucina cuyas estructuras cristalográficas en complejos con cdk2 han sido publicadas [54]. La diferencias en la orientación de estos ligandos derivados de las purinas se deben a que tanto la olomoucina como la iso-penteniladenina tienen que acomodar unos abultados sustituyentes hidrofóbicos, pero en el caso de los compuestos que probamos, la inversión que se observa sería

consecuencia de atracciones del tipo enlace de hidrógeno, lo que hace más favorables las nuevas orientaciones.

Además de las interacciones que todos los compuestos probados dan con la Cys83 en su grupo amida (NH) y en el carbonilo (CO), existe además un tercer enlace de hidrógeno entre el hidroxilo que está en la posición C(7) con el Asp86 en todos los compuestos, excepto con la crisina y la baicaleína.

Los grupos hidroxilos que se encuentran en el anillo B de los distintos flavonoides, todos forman puentes de hidrógeno con la Lys33 y el Glu51 y en el caso de la miricetina, la cual está sustituida con tres grupos OH en el anillo B, se forma además un puente de hidrogeno con el Asp144.

El programa que utilizamos para posicionar los ligandos y evaluar sus energías relativas fue GOLD, el cual desglosa las energías en cuatro categorías, a) Energías de puentes de hidrogeno entre la proteína y el ligando; b) Energías de Van der Waals (VdW) entre la proteína y el ligando (VdW externas); c) Energías de VdW internas del ligando y finalmente; d) Energías de torsión interna del ligando. Por lo tanto, cuantas más interacciones de tipo puente de hidrógeno se encuentren entre la proteína y el ligando, el valor que calcula GOLD como *Fitness Score*, incrementa. Este incremento en el valor que calculó GOLD para los ligandos ensayados pareciera ser el motivo que determinan las orientaciones "invertida" en el sitio del ATP, en relación con los compuestos que no presentan grupos polares (OH) en el anillo B.

Vale la pena destacar que los programas de posicionamientos de ligandos o *docking* no son capaces de calcular buenas estimaciones de las interacciones hidrofóbicas presentes en un estudio de *docking*. En el caso de GOLD, este hace una corrección al valor final del *Fitness Score* multiplicando por un factor de 1,375 la variable de las energías de VdW externas, como dato empírico que mitigaría el error

de no tener un cálculo directo de los parámetros hidrofóbicos que están envueltos en el problema.

GOLD en el momento de ejecutar el cálculo de "docking" les atribuye cierta movilidad a las cadenas laterales de la macromolécula, pero su mayor limitación (entre otras), es no permitir una flexibilidad total, tanto en la macromolécula como en el ligando [60]. Sin embargo los resultados obtenidos con GOLD (Tabla 2) reflejan razonablemente bien los resultados experimentales, esto puede deberse a que el programa además usa para calcular la función de *Fitness Score*, parámetros empíricos como energías de puentes de hidrógenos, radios atómicos, potenciales torsiones y ángulos posibles para enlaces de hidrogeno.

Así, tanto la crisina como la baicaleína, que no dieron una inhibición reproducible con los inmunoprecipitados del complejo de cdk5 activo, tienen los más bajos valores en la función de *Fitness Score* dada por GOLD. Dentro del grupo de las flavonas que no tienen el grupo hidroxilo en posición C(3) las relativamente potentes 6-metoxiapigenina y 6-metoxiluteolina presentaron un mejor *score* que sus análogos apigenina y luteolina. Además ensayamos teóricamente la 6-hidroxiapigenina y la 6-hidroxiuteolina, las que dieron *scores* aun mejores, pero lamentablemente no pudimos ver su efecto experimentalmente, puesto que solamente habíamos creado estos compuestos con el modulo "Builder" de "InsightII" y no intentamos sintetizarlos en el laboratorio para su ensayo bioquímico. Además generamos modelos de kaempferol y quercetina introduciendo sustituyentes 6-hidroxi y 6-metoxi (Tabla 2).

Pretendiendo hacer nuestro estudio más preciso, intentamos inhibir cdk5 utilizando otra estrategia. Para ello usamos parte de la cdk5 misma, la zona del *T-loop*, la cual esperábamos que se uniría a su o sus activadores p35/p25. Concientes de que en la generación de este tipo de péptidos, derivados de un lazo, es difícil esperar

alguna estructura secundaria definida en el péptido, lo cual hace de este "ligando" un ligando con una escasa especificidad por algún sitio en particular o mas bien lo convierte en un ligando con una alta afinidad por prácticamente cualquier sitio.

La característica de péptido sin estructura se hizo manifiesta cuando se les sometió a un estudio por dicroísmo circular. Todos ellos presentaron la estructura de *random coil* como muestra la Figura 10. Este resultado esperado nos aseguro que esta nueva estrategia sería algo inespecífica, puesto que un péptido de 15 aminoácidos tiene una gran cantidad de grados de libertad en su movimiento, lo que se traduce en que podría presentar comportamientos promiscuos en términos de unirse a diferentes dominios de p25 o bien hasta de otra proteína. .

Los resultados de los ensayos de actividad quinasa en presencia del péptido, fueron opuestos a lo que esperábamos, y resultó difícil encontrar una explicación para el aumento en la tasa de fosforilación de la histona H1 a concentraciones crecientes del péptido P1. Una vez que corroboramos que realmente existió un aumento en la actividad de cdk5 en presencia del péptido, decidimos hacer el ensayo de co-inmunoprecipitación de cdk5 (Figura 12). Los resultados sugieren que el péptido podría estar estabilizando la interacción cdk5 con p25. En la Figura 12A podemos apreciar que las intensidades de las bandas de inmunoreactividad no se correlacionan linealmente con el incremento en las concentraciones de péptido P1, quizás sólo un experimento de co-inmunoprecipitación no demuestra cuantitativamente el fenómeno, pero en forma cualitativa se observa que en presencia del péptido hay una mayor co-inmunoprecipitación de p25 en el sistema *in vitro*.

Para completar el análisis estadístico de este experimento decidimos solo repetir los ensayos con las concentraciones 0,2, 0,8 y 1,5  $\mu\text{M}$  de P1, para así tener una representación de concentraciones bajas, medias y altas del péptido, este resultado

nos propone que P1 podría estar efectivamente estabilizando el complejo enzima-activador. Es importante destacar que el error estándar que se aprecia en el gráfico de la Figura 12B es muy pequeño revelándonos que el resultado es reproducible, aunque sabemos que no cuantificable.

Para el ensayo de co-inmunoprecipitación sería importante contar con controles usando péptidos de composición aminoacídica similar a P1, pero con secuencias al azar o el mismo P1 *con* su secuencia de aminoácidos en distintas combinaciones (*randomizado*), así descartar la posibilidad de que el P1 estuviera azarosamente generando su acción como lo podría hacer cualquier péptido de características similares. Es por esto que también quisimos llevar el estudio más allá e intentar simular el comportamiento del péptido P1 en presencia del complejo cdk5/p25.

Este paso lo enfrentamos con otra herramienta de *docking* molecular, la cual fue AutoDock. Este programa permite una flexibilidad de hasta 32 enlaces en el ligando (algoritmo; Monte Carlo) pero mantiene rígida la proteína. El sistema de estudio fue el complejo cdk5-Swiss y su activador p25, la ubicación espacial de cdk5-Swiss respecto a p25 es la misma que tiene la cdk5 original del archivo obtenido del *Protein Data Bank* (1H4L).

Como el cálculo del *docking* generado por *AutoDock* está basado en que el ligando se mueva azarosamente mediante el algoritmo conocido por "Monte Carlo", lo mejor es hacer cálculos largos, esperando que el espacio conformacional abarcado por el ligando sea el máximo posible. Para esto usamos el *Script* detallado en la sección de Métodos, el cual nos permitió multiplicar nuestra búsqueda por mejores conformaciones favorables energéticamente, puesto que en cada una de las 12 grillas en que se dividió el complejo cdk5-p25, se calculó la función de Score de *AutoDock* para 4500 conformaciones distintas del ligando (P1). Esto hace que con un costo

computacional relativamente bajo, sea posible buscar exhaustivamente en la superficie total de un complejo proteico de gran tamaño. En nuestro caso se intentaron 12 grillas que abarcaban el volumen total del complejo cdk5-Swiss-p25 y si se tiene en consideración que en cada una se examinaron 4500 conformaciones, esto hace un total de 54 mil estructuras analizadas.

Luego realizamos tal experimento 3 veces y los valores absolutos de la función de *score* para cada conformación probada no siempre eran los mismos. Esto se debe a que cada vez que se comienza el cálculo la conformación estructural inicial es diferente y el algoritmo ordena mover el péptido aleatoriamente, haciendo que cada vez que se hace correr el experimento las conformaciones serán diferentes al experimento anterior y es por esto mismo que es necesario ejecutar el algoritmo por periodos prolongados de tiempo e intentar cubrir la mayor cantidad de conformaciones o estados posibles.

A pesar de esto se observa un patrón en el comportamiento, ya que la mayor población de buenas interacciones siempre se encuentra entre las grillas 5 y 8 (Apéndice A2), las que corresponden a los volúmenes de búsqueda o grillas donde se encuentra representada la totalidad de la superficie de interacción entre cdk5-Swiss y p25.

Es mejor hablar de población, ya que el péptido en solución esta en constante movimiento y seguramente en dinámico equilibrio entre; péptido unido y péptido soluble, por lo tanto se puede especular que en la zona de interacción podría estar actuando mas de un péptido a la vez. Así, al aumentar la concentración del péptido estamos aumentando la probabilidad de interacciones que aumentarían la estabilidad del complejo, como se muestra en la Figura 12A.

Luego de elegir las tres mejores energías de distintos *runs* y grillas (Tabla 3), y una energía con un valor alto como control, sometimos estas estructuras a un cálculo



de energías hecho por el programa *Ludi* en *InsightII*, el cual usa parámetros empíricos para las energías y los valores obtenidos por este programa se acercan mas a valores reales, no así las energías entregadas por *AutoDock*, el cual es un buen posicionador de ligandos.

A pesar de la minimización realizada a las estructuras, las diferencias energéticas generadas por *Ludi* se mantienen en sus magnitudes, pero ahora las energías están desglosadas y se aprecia claramente (Tabla 3) que el compuesto "Mejor\_18" presenta una gran estabilización electroestática dada por 8 interacciones de puentes de hidrogeno.

Así también el compuesto control tiene una buena contribución energética dada por interacciones del tipo VdW, pero la energía electroestática es suficientemente "mala" para creer que esa molécula no está cómoda o energéticamente favorecida en esa conformación espacial.

Continuando con nuestra búsqueda de algún método para inhibir específicamente *cdk5*, se genero la idea de generar un péptido que imitara realmente parte de la estructura de *cdk5* así poder "secuestrar" p25. Una solución seria poder generar una alfa hélice que imitara a la alfa hélice PSSALRE o mejor aun poder optimizar los contactos que tiene PSSALRE y p25.

El gran problema es lograr mantener una estructura secundaria de una alfa hélice estable en solución. Pero en la naturaleza existe algo similar y es conocido como un sierre de leucinas que se compone de dos alfa hélices que tienen parte de su superficie cubierta por leucinas, permitiendo un cluster hidrofóbico entre sus cadenas laterales estabilizándose mutuamente y permitiendo mantener su estructura secundaria en un solvente polar. El encontrar a GCN4 en la base de datos de estructuras cristalinas, facilitó parte del diseño de una alfa hélice. La superposición de GCN4 con la

alfa hélice PSSALRE resulto tener una desviación muy pequeña de 0,36Å. Hay que destacar que la alfa hélice PSSALRE esta compuesta por 14 residuos aminoacidicos y que el motivo consenso con otras cdks es el motivo PSSALRE. Ahora bien, esta similitud estructural permitía poder modificar la estructura de GCN4 con menos riesgo de estar modificando las características propias del cierre de leucina y además poder imitar con más precisión la superficie de PSSALRE.

Luego de analizar el número y la calidad de las interacciones entre PSSALRE y p25, verificamos los aminoácidos que deberíamos mutar en GCN4 para obtener la misma superficie que interacciona con p25. Como los aminoácidos que debíamos mutar están en la superficie hidrofílica de GCN4, no presentan ningún peligro para la formación apropiada del cierre de leucina, que es esencial para poder mantener la estructura secundaria y en consecuencia la especificidad de la interacción que deseamos lograr.

La estructura del GCN4 que finalmente llamamos "WT" o "Z3WT" por que imita la zona del PSSALRE original, posee además dos cambios, el primero es el de una alanina por una leucina (A13L). Con este cambio evitamos un choque de VdW entre el péptido y p25 acortando la cadena lateral del aminoácido pero manteniendo su hidrofobicidad. En esa posición esta la prolina de PSSALRE en cdk5 y no mantiene ningún contacto importante con p25, no generando ningún peligro para la estabilidad de la estructura de GCN4. El segundo cambio fue un ácido glutámico de GCN4 que interactuaba parcialmente con p25 al superponer Z3WT en el complejo cdk5/p25. Los análisis energéticos evidenciaron que era preferible dejar en esa posición la isoleucina que presenta cdk5 en esa posición, por lo que la estructura final de lo que llamamos Z3WT tenia una A13L que no corresponde a la alfa hélice PSSALRE y una I20E que es

parte del esqueleto de PSALRE pero no genera mayores contactos, tampoco este cambio afecta la estructura del cierre de leucinas.

EL siguiente paso fue el de optimizar las interacciones así tener un péptido que se uniera específicamente a p25 y además con una mayor afinidad que la propia cdk5.

La generación de mutaciones se hicieron en base a interacciones visuales que apreciábamos en la estructura, pero luego fueron automatizadas y estandarizadas por el programa PERLA, el cual hace un estudio energético de cada una de las mutaciones que se solicitan. No solo eso, sino que además posee una de las librerías de rotámeros más extensa entre los demás programas de su tipo, así realmente no solo busca la mejor combinación de residuos sino que en cada residuo busca por el mejor rotámero.

Luego se analizó el uso de la herramienta de *Foldx*; un programa que es capaz de analizar energías de interacción y entalpías del propio sistema. Este programa fue el utilizado como el criterio para seleccionar un péptido mutado frente a otro después de haber pasado por la selección de PERLA.

Así se llegó a definir 3 péptidos mutados del Z3WT que teóricamente presentan una mayor afinidad por p25 que la propia alfa hélice PSSALRE. Básicamente estos péptidos están optimizados para generar más contactos del tipo puentes de hidrógeno.

Como mencionamos anteriormente ésta es la debilidad de todos los métodos computacionales de *docking* e interacciones entre proteínas, dejando afuera otro tipo de interacciones (principalmente hidrofóbicas).

Ahora los experimentos que deberían continuar con este estudio son la clonación de estos cierres de leucinas modificados, expresarlos en un sistema, bacteriano o en levaduras y purificarlos, para así medir su capacidad inhibitoria *in vitro* y en un paso final transfectar líneas celulares o cultivos primarios de neuronas y ver su efecto *in vivo*.



## 8. Conclusiones

De este estudio integrado basado en experimentos de inhibición de la actividad quinasa de cdk5 en conjunto con estudios de modelamiento molecular y de la búsqueda de posibles inhibidores peptídicos para bloquear la interacción entre cdk5 y p35, podemos concluir que aquellos compuestos que presentaron un mejor comportamiento como inhibidores de la enzima cdk5 en los ensayos *in vitro* fueron los análogos metoxilados en posición C(6) de la apigenina y la luteolina. Estos también tuvieron un "score" calculado por el programa GOLD más alto, apoyando la validez del método para estos fines. A este respecto es interesante señalar que según los criterios de GOLD, los compuestos para los que se predice una mayor potencia serían los 6-metoxi-flavon-3-oles, los que son los más atractivos para ensayar experimentalmente la inhibición del sistema cdk5/p25 en el futuro. Ello permitiría enfocar la búsqueda de potenciales compuestos que controlen la neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer, sobre la base del papel crítico del sistema cdk5 en la patogénesis de esta enfermedad.

Además encontramos un péptido derivado de cdk5, el cual llamamos P1 y se compone de una secuencia de 15 residuos extraídos del dominio T-loop de la quinasa y es capaz de estabilizar el complejo cdk5/p25, contrario a nuestra búsqueda de inhibidores. Este péptido puede tener un valor funcional generando un posible modelo para el estudio morfológico y bioquímico a nivel de señalización intracelular en la enfermedad de Alzheimer.

Finalmente dejamos el estudio teórico del diseño de los cierres de leucina modificados que podrían actuar específicamente en la interacción del complejo cdk5/p25, variando su equilibrio y reduciendo finalmente la hiperactividad de cdk5 en su estado patogénico.

## 9. Bibliografía

1. Morgan D. O. (1997) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 261-291
2. Maccioni, R. B., Concha, O., y col (2001) *Eur. J. Biochem.* 268(6), 1518-27.
3. Lew, J., Huang, Q. Q., y col. (1994) *Nature.* 371, 423-426.
4. Tang, D., Yeung, J., y col. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 26897-26903.
5. Tsai, L. H., Delalle, I., y col. (1994) *Nature.* 371, 419-423.
6. Fu, A. K., Fu, W. Y., y col. (2001) *Nat. Neurosci.* 4, 374-381.
7. Alvarez, A., Muñoz, J. P., y col (2001) *Exp. Cell Res.* 264(2), 266-74.
8. Alvarez, A., Toro, R., y col (1999) *FEBS Lett.* 459(3), 421-6.
9. Kusakawa, G., Saito, T., y col. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 17166-17172.
10. Lee, M. S., Kwon, Y. T., y col. (2000) *Nature.* 405, 360-364.
11. Saito, T., Onuki, R., y col (2003) *J. Neurosci.* 23; 1189-97.
12. Li, G., Faibushevich, A., y col. (2003) *J. Neurochem.* 84; 347-62
13. Smith, D. S., Greer, P. L., y col. (2001) *Cell Growth Differ.* 12, 277-283.
14. Grant, P., Sharma, P., y col. (2001) *Eur. J. Biochem.* 268, 1534-1546.
15. Paglini, G., & Caceres, A. (2001) *Eur. J. Biochem.* 268, 1528-1533.
16. Maccioni, R. B., Otth, C., y col. (2001) *Eur. J. Biochem.* 268, 1518-1527.
17. Homayouni, R., & Curran, T. (2000) *Curr. Biol.* 10, R331-R334.
18. Chou, K. C., Watenpaugh, K. D., y col. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259, 420-428.
19. Lim, H. Y., Seow, K. T., y col. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 77-83.
20. Tang, D., Chun, A. S., y col. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 12318-12327.
21. Poon, R. Y., Lew, J., y col. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 5703-5708.
22. Tarricone, C., Dhavan, R., y col. (2001) *Molecular Cell.* 8, 657-669.

23. Ohshima, T., Ward, J. M., y col. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 11173-11178.
24. Chae, T., Kwon, Y. T., y col. (1997) *Neuron*. 18, 29-42.
25. Kwon, Y. T., & Tsai, L. H. (1998) *J. Comp. Chem.* 275, 17166-17172.
26. Ko, J., Humbert, S., y col. (2001) *J. Neurosci.* 21, 6758-6771.
27. Paglini, G., Pigino, G., y col (1998) *J Neurosci.* 18(23), 9858-69.
28. Hellmich, M. R., Pant, H. C., y col. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89; 10867-71.
29. Veeranna., Shetty, K.T., y col (1995) *Neurochem.* 64; 2681-90.
30. Baumann, K., Mandelkow, E. M., y col. (1993) *FEBS Lett.* 336, 417-424.
31. Ishiguro, K., Takamatsu, M., y col. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 15056-15060
32. Lew, J., Winkfein, R. J., y col. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 25922-25926.
33. Bibb, J. A., Snyder, G. L., y col. (1999) *Nature.* 402, 669-671.
34. Patrik, G. N., Zukerberg, L., y col. (1999) *Nature.* 402, 615-622
35. Lee, M. S., Kwon, Y. T., y col. (2000) *Nature.* 405, 360-364.
36. Alvarez, A., Muñoz J. P., y col. (2001) *Exp. Cell Res.* 239, 243-253
37. Patrik, G. N., Zhou, P., y col. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 24057-24064.
38. Maccioni, R.B., Munoz, J.P., y col (2001). *Arch. Med. Res.*, 32(5), 367-81.
39. Nguyen, M. D., Lariviere, R. C., y col. (2001) *Neuron.* 30, 135-147
40. Morris, G. M., Goodsell, D. S., y col. (1998) *J. Computat. Chem.* 19, 1639-1662.
41. Eisenberg, D., Luthy, R., y col. (1997) *Methods Enzymol.* 277, 396-404
42. Sippl, M. J., (1993) *Proteins* 17(4), 355-62.
43. Jeffrey, P. D., Russo A. A., y col. (1995) *Nature* 376, 313-318
44. Accelrys, Inc., San Diego, CA, 2001-2003.
45. Hagler, A. T., Huler, E., y col. (1974) *J. Am. Chem. Soc.* 96, 5319-5327.
46. Jones, G., Willet, P., y col. (1997) *J. Mol. Biol.*, 267, 727-748.

47. Guex, N., Peitsch, M. C. (1997) *Electrophoresis* 18, 2714-2723.
48. O'Shea, E. K., Klemm, J. D., y col. (1991) *Science* 254, 539-544.
49. Guerois, R., Nielsen, J. E. (2002) *J. Mol. Biol.* 320(2), 369-387
50. Sali, A., Blundell T. L. (1993) *J. Mol. Biol.* 234(3), 779-815.
51. Guex, N. Diemand, A., y col. (1999) *Trends Biochem. Sci.* 24(9), 364-367
52. Hagiwara, M., Inoue, S., y col. (1988) *Biochem. Pharmacol.* 37, 2987-2992
53. Casagrande, F., Darbon, J.-M. (2001) *Biochem. Pharmacol.* 61, 1205-1215.
54. Gray, N., Détivaud, L., y col. (1999) *Curr. Med. Chem.* 6, 859-876.
55. Leclerc, S., Garnier, M., y col. (2001) *J. Apend. Chem.* 276, 251-260.
56. Knockaert, M. Greengard, P. y col. (2002) *Trends Pharm. Sci.* 23 (9) 417-425.
57. Perez-Roger, I. Ivorra, C. y col. (2000) *Curr. Pharm. Biotech.* 1, 107-116.
58. Kim, K. S., Sack, J. S., (2000) *J. Med. Chem.* 43, 4126-4134.
59. De Azevedo, W. F., Jr, Mueller-Dieckmann, H. J., y col. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 2735-2740.
60. Jones, G., Willet, P., y col. (1997) *J. Mol. Apend.* 267, 727-748.

## 10. Apéndices

### 10.1. A1.

#### Radicales de las estructura de las flavonas mencionadas (Figura. 4)

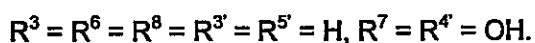
##### Chrysin:



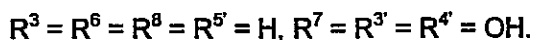
##### Baicalein:



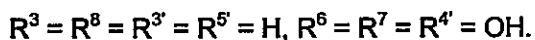
##### Apigenin:



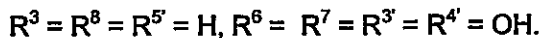
##### Luteolin:



##### 6-Hydroxyapigenin:



##### 6-Hydroxyluteolin:



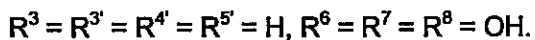
##### 6-Methoxyapigenin:



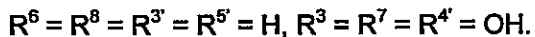
##### 6-Methoxyluteolin:



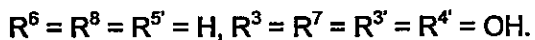
##### Baicalein:



##### Kaempferol:

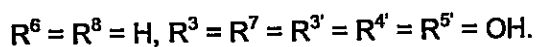


##### Quercetin:

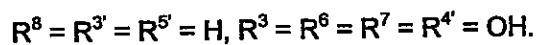




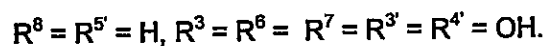
**Myricetin:**



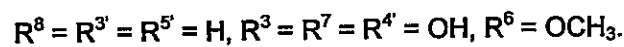
**6-Hydroxykaempferol:**



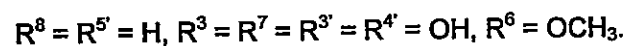
**6-Hydroxyquercetin:**



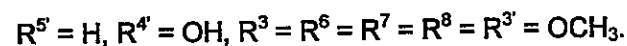
**6-Methoxykaempferol:**



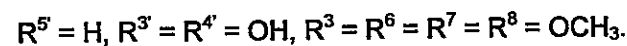
**6-Methoxyquercetin:**



**5,4'-Dihydroxy-3,6,7,8,3'-pentamethoxyflavone:**



**5,4',5'-Trihydroxy-3,6,7,8-tetramethoxyflavone:**



## 10.2 A2.

Tabla que muestra las energías de interacción P1-Complejo Cdk5/p25 en kcal/mol por corrida (Run) y por grilla. Las celdas en rojo corresponden a las mejores energías totales del barrido de superficie del complejo.

Run	Grilla 1	Grilla 2	Grilla 3	Grilla 4	Grilla 5	Grilla 6	Grilla 7	Grilla 8	Grilla 9	Grilla 10	Grilla 11	Grilla 12
1	-2,80	-5,17	-3,52	-1,87	-5,57	-3,21	-4,10	-2,70	-1,40	-4,05	-1,46	-1,68
2	-5,76	-3,02	-1,72	-3,49	-1,26	-0,59	+0,37	-0,72	-2,24	-3,98	-2,80	-5,22
3	-5,39	-2,82	-1,16	-3,12	-2,43	-2,72	-1,54	-3,36	-5,60	-1,82	-1,65	-2,14
4	-1,25	-4,04	-5,10	-5,82	-3,21	-0,50	-1,36	-1,50	-2,00	-2,61	-1,88	-4,69
5	-1,49	-3,44	-5,74	-0,85	-5,49	-4,05	-6,91	-1,47	-2,85	-3,59	-2,26	-0,99
6	-5,03	-4,49	-1,84	-1,73	-3,34	-1,90	-4,24	-3,07	-3,48	-3,52	-1,18	-0,44
7	-0,96	-1,99	-3,71	-4,28	-2,19	-3,09	-1,57	-1,36	-2,97	-7,01	-2,51	-1,98
8	-3,33	-1,80	-4,74	-4,59	-2,78	-1,41	-4,18	-3,35	-3,94	-1,38	-0,88	-2,76
9	-2,01	-2,66	-1,85	-2,69	-7,62	-3,43	-3,17	-2,65	-1,98	-4,10	-3,01	-3,86
10	-5,90	-3,91	-3,17	-1,55	-2,21	-3,45	-4,56	-2,44	-0,83	-4,52	-3,05	-3,07
11	-5,04	-3,62	-0,01	-2,98	-2,78	-5,06	-1,12	-5,11	-1,83	-1,45	-2,12	-3,50
12	-0,59	-5,40	-2,84	-4,92	-2,26	-3,69	-1,06	-4,95	-1,23	-1,25	-1,70	-1,90
13	-1,80	-0,96	-3,87	-2,10	-3,71	-5,57	-2,03	-2,06	-0,33	-2,06	-1,23	-2,54
14	-3,15	-0,71	-2,64	-3,08	-0,46	-3,57	-3,00	-3,62	-5,01	-2,84	-4,49	-1,63
15	-3,33	-4,04	-2,13	-6,78	-5,66	-2,31	-5,59	-6,73	-4,08	-4,29	-2,71	-1,69
16	-3,18	-3,55	-2,29	-3,67	-0,69	-2,31	-1,07	-3,68	-1,84	-3,78	-0,54	-6,57
17	-2,46	-5,24	-1,01	-1,97	-3,68	-7,95	-2,18	-3,16	-5,86	-3,54	-1,30	-1,21
18	-3,88	-3,17	-2,08	-2,66	-4,52	-2,52	-2,95	-9,20	-2,69	-1,71	-4,91	-3,56
19	-1,52	-2,66	-1,83	-1,88	-2,45	-2,54	-4,45	-4,58	-4,29	-5,76	-0,70	-1,81
20	-2,03	-0,32	-4,41	-2,99	-1,49	-1,34	-1,77	-1,67	-3,57	-3,87	-2,29	-4,28
21	-2,67	-2,92	-1,48	-1,63	-1,91	-4,62	-6,96	-1,77	-4,77	-2,83	-2,67	-3,47
22	-3,57	-4,92	+0,61	-1,87	-2,30	-1,26	-4,95	-2,05	-0,74	-2,79	-3,37	-2,55
23	-1,29	-6,97	-6,03	-4,20	-3,91	-2,37	-3,57	-2,40	-5,65	-3,05	-2,04	-3,07
24	-1,71	-3,39	-2,72	-3,34	-3,67	-6,64	+0,09	-1,67	-3,34	-3,49	-1,31	-1,77
25	-2,21	-2,25	-2,26	-3,19	-3,41	-6,42	-3,70	-1,58	-1,61	-0,74	-0,61	+0,21
26	-2,82	-2,91	-1,38	-1,75	-5,43	-9,05	-1,37	-4,53	-3,27	-0,71	-2,24	-5,06
27	-4,76	-0,90	-1,23	-4,70	-1,66	-4,58	-1,16	-5,51	-4,08	-2,16	-4,72	-0,66
28	-1,21	-1,39	-2,91	-3,31	-2,66	-3,45	-1,79	-5,46	-0,71	-2,21	-1,20	-3,96
29	-0,23	-2,43	-6,18	-1,53	-5,52	-2,16	-2,50	-4,00	-2,47	-1,74	-1,54	-7,37
30	-3,29	-2,49	-2,73	-1,85	-2,06	-4,48	-4,20	-4,08	-2,16	-1,01	-1,19	-2,84

10.3 A3.

Nombre	sc_entropy	VdW	Hbond	Solv_polar	Wat_bridg	bb_entropy	Solv_hydrophob
p25z2.pdb	73,616371	-214,402512	-207,050354	342,320221	-4,208814	377,774597	-381,662292
p25z2_min.pdb	72,449867	-211,032196	-208,450348	340,372925	-5,886732	353,000153	-375,259552
p25z3.pdb	71,651878	-213,776321	-206,700317	345,091705	-1,855622	363,647186	-378,492157
p25z3_min.pdb	71,033791	-210,716614	-211,250351	343,699097	-4,096953	347,072784	-372,95578
Z2WT.pdb	74,364243	-212,493439	-212,350357	341,818817	-3,989419	378,102509	-376,815674
Z2WT_min.pdb	73,32885	-209,044586	-215,800364	340,27475	-5,246226	355,39621	-370,455566
Z3WT.pdb	75,118309	-212,432236	-214,200333	346,100708	-2,240308	364,969757	-374,777618
Z3WT_min.pdb	74,898987	-209,637802	-221,350372	345,925598	-5,833975	348,764709	-369,75061
Z2WT-1.pdb	72,659775	-210,86557	-208,950363	337,435425	-3,375493	376,342773	-374,27066
Z2WT-2.pdb	72,776558	-211,448792	-208,950363	337,106476	-3,365434	376,891418	-375,829681
Z3WT-1.pdb	72,673203	-210,970901	-209,700333	341,649506	-1,938076	363,5336	-372,445129
Z3WT-2.pdb	72,887199	-211,61438	-209,700333	341,186584	-1,933525	364,163727	-374,186096
Z2WT-1_min.pdb	71,657104	-207,636032	-210,90036	335,683167	-4,813977	351,546295	-368,229828
Z2WT-2_min.pdb	72,486984	-210,836517	-208,950363	336,676849	-3,377261	375,158325	-374,529787
Z3WT-1_min.pdb	71,120102	-208,146988	-211,650345	340,162109	-4,039559	347,050262	-367,355865
Z3WT-2_min.pdb	71,261971	-208,83049	-211,650345	339,770447	-4,031936	347,641602	-369,139893

La tabla continúa en la página siguiente.

A3 (continuación)

Nombre	Electro	Helix_dipole	Vdw_Clash	Tors_Clash	Transl_entrop	sum
p25z2.pdb	-8,36575	0,027119	36,240402	3,578164	4,753696	22,620838
p25z2_min.pdb	-7,09968	0,576088	19,091171	2,627168	4,753696	-14,857453
p25z3.pdb	-4,827116	-1,372179	38,245064	3,189646	4,753696	19,555445
p25z3_min.pdb	-4,242741	-1,42228	13,579017	2,525793	4,753696	-22,020504
Z2WT.pdb	-7,212694	-0,507331	31,992399	3,907226	4,753696	21,570024
Z2WT_min.pdb	-5,95541	0,037561	14,517349	2,793664	4,753696	-15,400044
Z3WT.pdb	-4,940001	-1,824431	29,108204	3,510041	4,753696	13,145805
Z3WT_min.pdb	-4,368818	-1,543001	9,814374	2,446789	4,753696	-25,88044
Z2WT-1.pdb	-6,506664	-0,960561	30,460442	3,494309	4,753696	20,217127
Z2WT-2.pdb	-6,035897	-2,110353	30,869604	3,508084	4,753696	18,165325
Z3WT-1.pdb	-4,878803	-1,832321	27,526091	3,141293	4,753696	11,511829
Z3WT-2.pdb	-4,357374	-2,181727	27,917944	3,150872	4,753696	10,086587
Z2WT-1_min.pdb	-5,361072	-0,492677	15,671544	2,665888	4,753696	-15,456251
Z2WT-2_min.pdb	-6,019149	-2,128566	29,751253	3,35963	4,753696	16,349075
Z3WT-1_min.pdb	-4,344966	-1,604954	10,218254	2,505943	4,753696	-21,332291
Z3WT-2_min.pdb	-3,785379	-1,930081	10,215199	2,50191	4,753696	-23,223318

La diferencia entre las estructuras Z2 y Z3 es la Isoleucina en la posición 20 del GCN4. El termino “\_min” significa que la estructura paso por 3 minimización del tipo Stepest Decent de 30 ciclos cada una. La estructura p25Z(x) es p25 con la estructura de Z(x) en la posición donde debería ir PSSALRE, por lo tanto es el estudio energético del complejo p25/inhibidor. La estructura finalmente seleccionada fue Z3WT-2\_min.pdb esta estructura contiene el cambio A13L y E20L. La sumatoria (sum) de las energías (Kcal/mol) es la menor de todas las demás que se intentaron ya sea el cierre de leucina solo o acompañado con p25 (p25z3\_min.pdb).