

II. ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. AGRADECIMIENTOS	3
II. ÍNDICE DE CONTENIDOS	4
III. ÍNDICE DE TABLAS	6
IV. ÍNDICE DE FIGURAS	7
V. ABREVIATURAS	10
VI. RESUMEN	11
VII. ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1. Proteínas Quinasas	13
1.1.1. Clasificación.....	16
1.2. Quinasas Dependientes de Ciclina (CDK)	17
1.3. Quinasas Dependientes de Ciclina 2 (CDK2)	18
1.3.1. Inhibidores de CDK2.....	20
1.3.2. Interacción de Enlace de Hidrógeno.....	22
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO	25
3. OBJETIVO GENERAL	25
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
5.1. Materiales	26
5.1.1. Estructuras Cristalográficas e inhibidores utilizados	26
5.1.2. Programas	30
5.1.3. Hardware	31
5.2. Métodos	32
5.2.1. Refinamiento de estructuras cristalográficas.....	32
5.2.2. Simulaciones de Dinámica Molecular	34
5.2.3. Selección y <i>Clusterización</i> de Estructuras.....	36

5.2.4.	Obtención de las Energías Libres de Unión (ΔG_{Bind})	36
5.2.5.	Experimentos y Diagrama resumen del Proceso	38
6.	RESULTADOS	41
6.1.	Refinamiento de Estructuras Cristalográficas.....	41
6.2.	Simulaciones de Dinámica Molecular.....	42
6.3.	Experimento 1: <i>Clusterización</i> y determinación de energías libres de unión (ΔG_{Bind})	47
6.4.	Experimento 2: <i>Clusterización</i> y Energías Libres de Unión (ΔG_{Bind}).....	50
7.	DISCUSIÓN	55
8.	CONCLUSIÓN	64
9.	REFERENCIAS.....	66
10.	ANEXO 1.....	70
10.1.	Simulaciones de Dinámica Molecular	70
10.2.	Energía Libre de Unión de Complejos Proteína-Ligando (ΔG_{Bind}):	73
11.	ANEXO 2.....	74
11.1.	Presentación en Congreso.....	74
11.2.	Conformaciones alternativas de ligandos.	75
11.3.	Protocolo de Minimización Desmond para ensamble NPT	76
11.4.	Gráficos de distancias de interacciones de enlace de hidrógeno.....	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1: Expresión, efectos y regulación de complejos CDK/ciclina durante el ciclo celular.....	17
Tabla 1.2: Distancias de enlaces de hidrógeno observadas para algunos sistemas químicos comunes de enlaces de hidrógeno.	23
Tabla 5.1: Inhibidores de CDK2 tipo pirazolopirimidina e imidazopirazina.....	29
Tabla 5.2: Residuos ausentes en cada estructura cristalográfica de los complejos CDK2/ligando.	32
Tabla 6.1: Distancias promedio de enlace de hidrógeno en las DMs de equilibrado.....	44
Tabla 6.2: Clusterización de 20 frames y valores de energía libre de unión y su desviación estándar, para los complejos 2R3F-A y 2R3F-B.....	47
Tabla 6.3: Valores de energía libre de unión de los complejos CDK2/ligando obtenidos por clusterización con un N = 20.	48
Tabla 6.4: Valores de IC50 y ΔG Experimental de cada complejo CDK2/ligando.	49
Tabla 6.5: Coeficientes de correlación para evaluación de conformaciones A y B.	50
Tabla 6.6: Energía libre de unión de los complejos CDK2/ligando (ΔG_{teo}), calculadas con distintos números de conformaciones agrupadas	52
Tabla 6.7: Coeficientes de correlación resultantes para clusterización con diferentes N.	53
Tabla 6.8: Coeficientes de correlación resultantes para clusterización con diferentes N para los sistemas representados en la Figura 6.8	54
Tabla 7.1: Valores ΔG_{teo} de complejos CDK2/inhibidor con conformaciones A y B.	61

III. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Esquema del proceso de fosforilación realizado por una proteína quinasa.	13
Figura 1.2: Estructura terciaria de CDK2 humana unida a ATP.	15
Figura 1.3: Estructura terciaria de CDK2 en representación de cintas	19
Figura 1.4: Estructuras químicas de compuestos inhibidores de CDKs que están actualmente en estudio.	21
Figura 1.5: Representación de la distancia de enlace de hidrógeno.	22
Figura 1.6: Enlaces de hidrógeno formados entre un ligando y el residuo Glu81 (línea segmentada negra) y el residuo Leu83 (líneas segmentadas rojas).	23
Figura 5.1: Estructura química de los núcleos comunes de los inhibidores.	26
Figura 5.2: Modo común de unión a la CDK2 presentado por los inhibidores de núcleo químico pirazolopirimidina e imidazopirazina.	27
Figura 5.3: Estructura secundaria y terciaria de CDK2	33
Figura 5.4: Diagrama de proceso del Experimento 1.	38
Figura 5.5: Diagrama de proceso del Experimento 2.	39
Figura 6.1: Loops 4.	41
Figura 6.2: Loops 4 y 12.	41
Figura 6.3: Gráfico de RMSD de Dinámicas Moleculares de 2 ns de duración de los complejos CDK2-ligando con conformaciones alternativas.	42
Figura 6.4: Gráfico de RMSD de Dinámicas Moleculares de 2 ns de duración de los complejos CDK2-ligando con conformación única	43
Figura 6.5: Gráfico de RMSD de Dinámicas Moleculares de 10 ns de duración de los complejos CDK2-ligando con conformaciones alternativas.	45
Figura 6.6: Gráfico de RMSD de Dinámicas Moleculares de 10 ns de duración de los complejos CDK2-ligando con conformación única.	45
Figura 6.7: Gráficos de distancias de interacciones de hidrógeno en 10 ns de trayectoria de dinámica molecular del complejo 2R3G.	46
Figura 6.8: Gráfico de correlaciones ΔG_{teo} vs ΔG_{exp} de los complejos por cada <i>clusterización</i> con diferentes N.	53
Figura 6.9: Gráfico de correlaciones de los complejos por cada <i>clusterización</i> con diferentes N, exceptuando los puntos críticos 2R3K, 2R3L y 2R3P.	54
Figura 7.1: Estructuras tridimensionales de CDK2 superpuestas.	57

Figura 7.2: Estructura química de inhibidores pertenecientes a los complejos 2R3K (izquierda), 2R3L (centro) y 2R3P (derecha).	63
Figura A.1.1: Representación esquemática de las condiciones periódicas de contorno.....	72
Figura A1.2. Ciclo termodinámico para el cálculo de la energía libre de unión de un complejo proteína-ligando.	73
Figura A2.1: Conformaciones alternativas	75
Figura A2.2A: Gráficos de distancias de interacciones de hidrógeno en 10 ns de trayectoria de dinámica molecular del complejo 2R3F-A.	77
Figura A2.2B: Gráficos de distancias de interacciones de hidrógeno en 10 ns de trayectoria de dinámica molecular del complejo 2R3F-B.	78
Figura A2.2C: Gráficos de distancias de interacciones de hidrógeno en 10 ns de trayectoria de dinámica molecular del complejo 2R3G	78
Figura A2.2D: Gráficos de distancias de interacciones de hidrógeno en 10 ns de trayectoria de dinámica molecular del complejo 2R3H	79
Figura A2.2E: Gráficos de distancias de interacciones de hidrógeno en 10 ns de trayectoria de dinámica molecular del complejo 2R3I-A	79
Figura A2.2F: Gráficos de distancias de interacciones de hidrógeno en 10 ns de trayectoria de dinámica molecular del complejo 2R3I-B	80
Figura A2.2G: Gráficos de distancias de interacciones de hidrógeno en 10 ns de trayectoria de dinámica molecular del complejo 2R3J.	80
Figura A2.2H: Gráficos de distancias de interacciones de hidrógeno en 10 ns de trayectoria de dinámica molecular del complejo 2R3K.....	81
Figura A2.2I: Gráficos de distancias de interacciones de hidrógeno en 10 ns de trayectoria de dinámica molecular del complejo 2R3L.	81
Figura A2.2J: Gráficos de distancias de interacciones de hidrógeno en 10 ns de trayectoria de dinámica molecular del complejo 2R3M.	82
Figura A2.2K: Gráficos de distancias de interacciones de hidrógeno en 10 ns de trayectoria de dinámica molecular del complejo 2R3N.	82
Figura A2.2L: Gráficos de distancias de interacciones de hidrógeno en 10 ns de trayectoria de dinámica molecular del complejo 2R3O	83
Figura A2.2M: Gráficos de distancias de interacciones de hidrógeno en 10 ns de trayectoria de dinámica molecular del complejo 2R3P-A.	83

Figura A2.2N: Gráficos de distancias de interacciones de hidrógeno en 10 ns de trayectoria de dinámica molecular del complejo 2R3P-B 84

IV. ABREVIATURAS

CDK2 = *Cyclin-Dependent Kinase 2*

Ser = Serina

Thr = Treonina

Tyr = Tirosina

Glu = Ácido Glutámico

Leu = Leucina

ATP = Adenosín Trifosfato

ADP = Adenosín Difosfato

Leu83CO...HN = Enlace de hidrógeno formado entre el átomo de Oxígeno (aceptor) del residuo leucina número 83 de la CDK2 y el átomo de Nitrógeno (donor) de un ligando.

Leu83NH...N = Enlace de hidrógeno formado entre el átomo de Nitrógeno (donor) del residuo leucina número 83 de la CDK2 y el átomo de Nitrógeno (aceptor) de un ligando.

Glu81CO...C = Enlace de hidrógeno formado entre el átomo de Oxígeno (aceptor) del residuo ácido glutámico número 81 de la CDK2 y el átomo de Nitrógeno (donor) de un ligando.

DM = Dinámica Molecular

MM-GBSA = *Molecular Mechanics - Generalized Born Surface Area*

N = Número de *frames* o conformaciones