



UNIVERSIDAD DE
TALCA

Facultad de Ingeniería
Escuela de Ingeniería Civil en Bioinformática

Estudio molecular del complejo CDK4/Ciclina D/Retinoblastoma.

Poliana Gabriela Povea Rojas.

Profesor Tutor: Jans Alzate-Morales, Ph.D.

Profesor Co-Tutores: José Luis Velázquez, Ph.D. y Mauricio Bedoya-Tabares. Ph.D.

Profesor Informante: Julio Caballero, Ph.D.

Memoria para optar al título de Ingeniero Civil en Bioinformática

Talca-Chile

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2022

RESUMEN:

Las proteínas quinasas son enzimas con la capacidad de modificar la función de otras proteínas mediante reacciones de fosforilación que las activan/desactivan a modo de interruptor. Hay 11 grandes divisiones de quinasas, las cuales a su vez se subdividen en familias y subfamilias. Dentro de estas divisiones se encuentra el grupo CMGC, donde se encuentra la familia de CDKs (del inglés *Cyclin-Dependent Kinases*). Se conocen cerca de 21 tipos de CDKs, pero hasta el momento no todas se encuentran correctamente caracterizadas.

La CDK más estudiada es CDK2, de la cual se tiene amplia evidencia y conocimiento de su importancia en el ciclo celular. Sin embargo, no es la única CDK que participa en este proceso debido a que trabaja en conjunto con CDK1, CDK4 y CDK6, siendo estas dos últimas las menos estudiadas. CDK4 y CDK6 están involucradas en la transición desde la fase G1 a fase S en el ciclo celular, y hay evidencia que sugiere que desregulaciones en estas quinasas estarían directamente relacionadas con proliferación celular cancerígena. El ejemplo más representativo de esto sería un tipo de cáncer denominado retinoblastoma, el cual consiste en tumores oculares visibles causados por el mal funcionamiento de la proteína Rb. Esta proteína es fosforilada de forma específica por CDK4, siendo el aminoácido Serina-780 de la proteína Rb el que participa en la reacción catalítica, pero aún no se ha reportado un estudio detallado de cómo se llevaría a cabo esta reacción desde el punto de vista estructural y energético. En base al estado del arte, los sitios activos y sitios de fosforilación de CDK2 y CDK4 son homólogos y coinciden en su forma estructural tridimensional. Así se podría obtener un modelo por homología de CDK4 para poder estudiarla mediante métodos de simulaciones de dinámica molecular.

Por lo anterior, se realizó un estudio del complejo CDK4/Ciclina-D/Rb, usando herramientas de modelamiento comparativo por homología y simulaciones de dinámica molecular (DM). Para la obtención del modelo por homología se utilizó el complejo CDK2/Ciclina-A (PDB ID: 1QMZ) y los cristales de CDK4/Ciclina-D (PDB ID: 3G33, 2W96) como plantillas. A partir de los mejores modelos por homología obtenidos se realizaron simulaciones de DM, con y sin restricciones. Esto permitió caracterizar las conformaciones reactivas y la estabilidad del complejo ternario y que contribuirán al estudio de los mecanismos de reacción de fosforilación reportados. Además, se caracterizaron estructuralmente las interacciones entre el péptido de Rb con CDK4/CiclinaD, lo cual es un aporte para futuras investigaciones de reactividad enzimática en el complejo estudiado.

ABSTRACT

Protein kinases are enzymes with the ability to modify the function of other proteins through phosphorylation reactions that activate/deactivate them as a switch. There are 11 major divisions of kinases, which in turn are subdivided into families and subfamilies. Within these divisions is the CMGC group, which includes the CDKs (Cyclin Dependent Kinases) family. 21 types of CDKs are known, but currently not all of them have been correctly characterized.

The most studied CDK is CDK2, for which there is extensive evidence and knowledge of its importance in the cell cycle. However, it is not the only CDK that participates in this process because it works along CDK1, CDK4 and CDK6, with the last 2 being the less studied. CDK4 and CDK6 are involved in the transition from G1 to S phase in the cell cycle, and there is evidence suggesting that dysregulation of these kinases would be directly related to cancer cell proliferation. The most representative example of this would be a type of cancer called retinoblastoma, which consists of visible eye tumors caused by the malfunction of the Rb protein. This protein is phosphorylated in a specific way by CDK4, being the amino acid Serine-780 of the Rb protein which participates in the catalytic reaction, but a detailed study of how this reaction proceed in this catalytic system has not yet been reported. Based on the state of the art, the active sites and phosphorylation sites of CDK2 and CDK4 are homologous and match in their tree-dimensional structure. Thus, a homology model of CDK4 could be obtained in order to study it through molecular dynamics simulations methods.

Considering all of the above evidence, a study of CDK4/Cyclin-D/Rb complex was carried out, using homology comparative modelling tools and molecular dynamics simulations (MD). To obtain the homology model, the CDK2/Cyclin-A complex (PDB ID: 1QMZ) and CDK4/Cyclin-D crystal (PDB ID: 3G33. 2W96) were used as templates. From the best homology models obtained, DM simulations were performed, with and without restraints. This allowed the characterization of reactive conformations and stability of the tertiary complex and that will contribute to the study the reported phosphorylation reaction mechanisms. Also, interactions between Rb peptide and CDK4/Cyclin-D were characterized, which is a contribution to future investigations of the catalytic reactivity in the studied complexes.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Resumen	2
Abstract	3
Índice de Contenidos	4
Índice de Figuras	6
Índice de Tablas	8
1 Introducción	9
1.1 Proteínas Quinasas dependientes de Ciclina	10
1.2 Retinoblastoma	12
1.3 Regulación de las CDKs	15
1.4 Transferencia de fosfato de CDKs	16
2 Hipótesis	19
3 Objetivos.....	19
3.1 Objetivos Generales.....	19
3.2 Objetivos Especificos	19
4 Metodología.....	20
4.1 Comparación de secuencia primaria y estructura terciaria.....	20
4.2 Obtención del complejo CDK4/Ciclina-D/Rb.....	21
4.2.1 Modelado por homología:.....	21
4.2.2 Modeller.....	22
4.2.3 Obtención y evaluación estructural de los modelos.....	23
4.3 Dinámicas Moleculares.....	24
4.3.1 Análisis de Dinámicas Moleculares	27
5 Resultados y Discusión	29
5.1 Elección de base.....	29
5.2 Elección de mejores modelos	31
5.3 Modelos 3D	32
5.4 Dinámicas Moleculares.....	37
6 Conclusiones	58
7 Bibliografía	60
8 Material Suplementario	66
Material Suplementario 1. Lista de DOPE score.....	66

Material Suplementario 2: Análisis de distancia 1 y 2 del modelo 1,2 y 3 respecto al restraint 1 y 2	68
Material Suplementario 3: Listas de interacciones proteína-péptido por tipo de enlace.	69
Material Suplementario 4: Gráficos de interacción	88
Material Suplementario 5: Distancias en coordinación del ion magnesio en sitio activo	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fases del ciclo celular y participación de distintas CDKs.....	10
Figura 2. Mecanismos de activación e inhibición de CDKs.....	14
Figura 3. Comparación estructural de CDK4 (izquierda) y CDK2 (derecha).	15
Figura 4. Coordinación octaédrica del Mg ²⁺ en el sitio activo de CDK2.	17
Figura 5. Pasos para la obtención de un modelo mediante modelado comparativo con Modeller.	22
Figura 6. Ejemplo de formato PIR	23
Figura 7. Diagrama con la organización de simulaciones de dinámica molecular y condiciones de restricción.	27
Figura 8. Alineamiento global entre las secuencias de las proteínas CDK2 y CDK4	30
Figura 9. Alineamiento de estructura terciaria entre el cristal 1QMZ correspondiente a CDK2 (azul) y el cristal 3G33 de CDK4 (verde). Molécula de ATP de 1QZM se observa en rojo y su péptido en morado	31
Figura 10. Gráfico Ramachandran de modelos escogidos.	34
Figura 11. Gráficos de Z- score global para modelo 1 (A), modelo 2(B) y modelo 3(C).....	35
Figura 12. Perfil de energías por residuos de los modelos 1(A), modelo 2(B) y modelo 3(C)	36
Figura 13. RMSD modelo 1 para las tres condiciones evaluadas, libre (azul), restricción 1 (rojo) y restricción 2 (verde).	38
Figura 14. RMSD correspondiente al modelo 2 en sus 3 condiciones, libre (azul), restricción 1 (rojo) y restricción 2 (verde).	38
Figura 15. RMSD correspondiente al modelo 3 en sus tres condiciones de restricción, libre (azul), restricción 1 (rojo) y restricción 2 (verde).....	39
Figura 16. Distancia 1 sin restricción en el tiempo de dinámica. La línea en color azul representa al Modelo 1. La línea en color rojo representa al Modelo 2. Línea verde representa al Modelo 3.	40
Figura 17. Distancia 2 sin restricción en el tiempo de dinámica. La línea en color azul representa al Modelo 1. La línea en color rojo representa al Modelo 2. Línea verde representa al Modelo 3.	40
Figura 18. Distancia 1 con restricción 1 en el tiempo de dinámica. La línea en color azul representa al Modelo 1. La línea en color rojo representa al Modelo 2. Línea verde representa al Modelo 3	41
Figura 19. RMSF de la cadena A (CDK4) del modelo 1, en sus 3 condiciones de restricción. En azul se muestra la Restricción 1, en rojo el Restricción 2 y en verde la condición libre.	42
Figura 20. RMSF correspondiente a la cadena B (Ciclina-D) del modelo 1 en las 3 condiciones de restricción. En azul se muestra la Restricción 1, en rojo la Restricción 2 y en verde la condición libre.....	43
Figura 21. RMSF correspondiente a la cadena C (péptido de Rb) del modelo 1 en las 3 condiciones de restricción. En azul se muestra la Restricción 1, en rojo la Restricción 2 y en verde la condición libre.....	43
Figura 22. RMSF de la cadena A (CDK4) del modelo 2. En azul se muestra la Restricción 1, en rojo la Restricción 2 y en verde la condición libre.	44

Figura 23. RMSF de la cadena B (Ciclina-D) del modelo 2. En azul se muestra la Restricción 1, en rojo la Restricción 2 y en verde la condición libre.....	45
Figura 24. RMSF correspondiente a la cadena C (péptido Rb) del modelo 2. En azul se muestra la Restricción 1, en rojo la Restricción 2 y en verde la condición libre.	45
Figura 25. RMSF correspondiente a la cadena A (CDK4) del Modelo 3. En azul se muestra la Restricción 1, en rojo la Restricción 2 y en verde la condición libre.	46
Figura 26. RMSF cadena B (Ciclina-D) del Modelo 3. En azul se muestra la Restricción 1, en rojo la Restricción 2 y en verde la condición libre.....	47
Figura 27. RMSF de la cadena C del Modelo 3. En azul se muestra la Restricción 1, en rojo la Restricción 2 y en verde la condición libre	47
Figura 28. Porcentaje de superficie de contacto sin restricción representado para los modelos 1(azul), modelo 2 (rojo) y modelo 3(verde).	49
Figura 29. Porcentaje de superficie de contacto de los modelos 1(azul), 2(rojo) y 3(verde) bajo condiciones de Restraint1	50
Figura 30. Porcentaje de superficie de contacto de los modelos 1(azul), 2(rojo) y 3(verde) bajo condiciones de Restraint2.....	50
Figura 31. Porcentaje de interacciones proteína-péptido entre CDK4 y Rb por residuo en el Modelo 1 sin restricciones (Libre)	53
Figura 32. Representación estructural de interacciones notorias en el Modelo 1 libre, en las 3 figuras el péptido Rb se colorea de turquesa. A) Interacción de Arg787 del Rb con Ser52 y Glu56 (en azul). B) Interacción estabilizadora de Asp140 y Lys142 (en naranja) con Ser780 y ATP. C) Interacción de TPO172 (en rosa) con Arg775 de Rb.....	54
Figura 33. Porcentaje de interacciones proteína-péptido entre CDK4 y Rb por residuo en el Modelo 1 con la Restricción 1.	54
Figura 34. Representación estructural de interacciones notorias en el Modelo 1 con restricción 1. Péptido Rb en las 2 figuras se colorea de turquesa. A) Interacción de residuos de CDK4 con el extremo Arg787 del péptido. B) Interacción de Glu219 con Arg775.....	55
Figura 35. Porcentaje de interacciones proteína-péptido entre CDK4 y Rb por residuo en el Modelo 1 con la Restricción 2.	55
Figura 36. Representación estructural de los residuos con mayor porcentaje de interacción en Modelo 1 con restricción 2. Péptido Rb en las 3 figuras se colorea de turquesa. A) Interacciones de los residuos Ser52, Thr53 y Glu56 (coloreados en gris) con el residuo Arg787 del péptido Rb. B) Interacciones de residuos TPO172 y Val174 (coloreados en verde) con el péptido Rb. C) No hay contacto entre el ATP y Ser780 del péptido.	56
Figura 37. Coordinación octaédrica del Mg ²⁺ en el sitio activo de CDK4.....	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Clasificación y descripción de CDKs conocidas.....	11
Tabla 2.- Puntajes DOPE resultantes de modeler.....	31

1 INTRODUCCIÓN

Las proteínas quinasas (PQs) son enzimas que pueden ejercer acciones bioquímicas sobre otras proteínas y enzimas. Estas actividades consisten en la catálisis de reacciones de fosforilación, proceso que regula una amplia gama de eventos biológicos como lo son el metabolismo de carbohidratos y lípidos, biosíntesis de neurotransmisores, transcripción y replicación de ADN, tráfico de orgánulos, contracción del músculo liso, diferenciación celular, entre otros¹. La fosforilación también juega un rol importante en la comunicación intercelular durante el desarrollo, en las respuestas fisiológicas y homeostasis, además del funcionamiento del sistema nervioso e inmune, siendo un mecanismo reversible que consiste en la adición de un grupo fosfato (PO_4^{3-}) al grupo R-polar de un aminoácido².

Las PQs se encuentran entre las familias más grandes de genes en organismos eucariotas, y se han estudiado y clasificado de acuerdo con su localización celular y función, destacando la presencia de PQs en arqueobacterias y virus. Por esto, se ha estimado que hay al menos 1000 PQs en organismos vertebrados, dentro de las cuales 518 se han identificado en el humano como producto de la secuenciación de su genoma en el marco del *The Human Genome Project*³. Este valor es considerablemente alto al constituir aproximadamente el 1,7% de todos los genes humanos⁴.

Debido a la gran variedad de PQs descubiertas, estas se han agrupado en “quinomas” por organismo, siendo un quinoma el conjunto completo de proteínas quinasas codificadas en el genoma de un determinado. Así, la primera clasificación realizada de las PQs de humano consistió en 5 grupos con 90 familias y 145 subfamilias⁵. Esta clasificación se realizó mediante la comparación de las secuencias del dominio catalítico. Junto con este conocimiento sobre la similitud de las secuencias y la estructura del dominio fuera de los sitios catalíticos, se obtuvo información sobre el funcionamiento biológico y se realizaron clasificaciones similares para los quinomas de organismos como levaduras, gusano y mosca. Esta clasificación aumentó el número de componentes a 9 grupos; luego se identificaron más PQs eucarióticas (ePQs) por lo que no tardó en aumentar a 11 grupos⁶.

Entre las funciones de las PQs, se ha visto que juegan un rol importante en el control del ciclo celular y, por lo tanto, su sobreexpresión se ha asociado con varios tipos de cáncer. En particular, las mutaciones y el mal funcionamiento en las reacciones bioquímicas de las PQs pueden causar problemas de salud de alto impacto económico y social. Esto incluye la resistencia a antibióticos⁷, desarrollo de cáncer⁸ y recientemente se ha descubierto que se pueden vincular a brotes de virus⁹.

1.1 Proteínas Quinasas dependientes de Ciclina:

El ciclo celular básico está dividido en 4 fases: G1, S, G2 y M. La fase G1 es aquella en que la célula se prepara para la división. A continuación, en la fase S la célula sintetiza una copia de su ADN. Cuando la copia está lista, habiendo material genético completo extra, la célula entra en la fase G2, condensando y organizando el material genético para la división celular. Luego pasa a fase M donde tiene origen la mitosis y, al finalizar esta fase, se obtienen dos células donde originalmente había una (Figura 1).

El grupo CMGC de las PQs está compuesto por las siguientes subfamilias: **CDK** (*Cyclin Dependent Kinases*), **MAPK** (*Mitogenic-activated Protein Kinase*), **GSK** (*Glycogen Synthase Kinase*) y **CLK**, y las PQs de este grupo son reguladores importantes del ciclo celular de organismos eucariota (Figura 1). Actualmente hay evidencia que indica que tienen roles como reguladores de la transcripción, así como en metabolismo y diferenciación celular¹⁰. Dentro de las subfamilias mencionadas anteriormente, se ha visto que mutaciones asociadas a tumores con frecuencia están relacionadas con complejos de CDK/Ciclina desregulados¹¹. Por esto, las CDKs se han considerado como atractivos objetivos terapéuticos para tratamiento del cáncer¹². Sin embargo, la implementación clínica de inhibidores de CDK no selectivos de primera generación se ha visto altamente obstaculizada debido a su poca eficacia y alto riesgo de toxicidad a pesar de haber sido diseñados para inhibir la proliferación celular¹³.

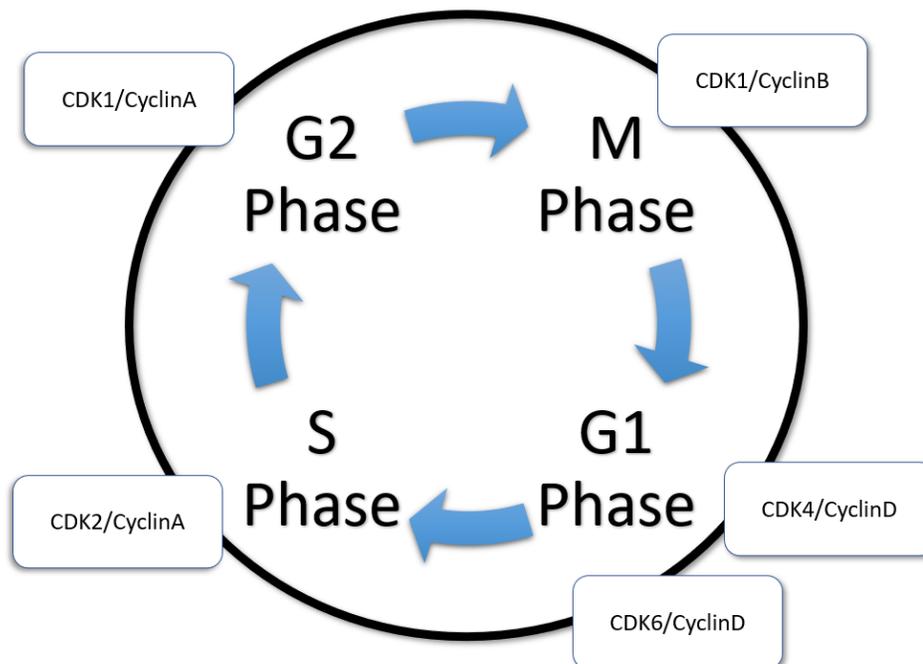


Figura 1. Fases del ciclo celular y participación de distintas CDKs.

Es importante entender biológicamente las CDKs para comprender el resultado de su inhibición por moléculas bioactivas (inhibidores). Las CDKs son subfamilia de PQs heterodiméricas Ser/Thr, cada una de las cuales consta de una subunidad CDK catalítica y una subunidad de ciclina activadora ¹⁴. A pesar de que no todas las CDKs han sido estudiadas al mismo nivel, para gran parte de ellas se conoce su función a nivel molecular. Dentro de estas funciones, se puede destacar la regulación de las diferentes fases del ciclo celular y regulación de la transcripción mediante fosforilación de la RNA polimerasa en el dominio C-terminal (CTD), entre otras ¹⁵ señaladas en la Tabla 1. Las CDKs pueden estar principalmente en dos estados: activadas o inactivadas. Para estar activadas, es necesario que estén unidas a una ciclina (Figura 2), pero se ha encontrado evidencia reciente de que la activación de CDK4 sigue una regla diferente, ya que para su activación es necesario que forme complejo con la Ciclina-D y con el inhibidor p27, además de la fosforilación de este último¹⁶. Las CDKs coordinan el ciclo celular actuando como un interruptor: cuando una CDK está activada, el ciclo celular avanza hasta donde esta misma CDK lo controla, mientras que cuando la CDK se inactiva, el ciclo celular se detiene completando la etapa controlada por esta CDK.

Tabla 1. Clasificación y descripción de las CDKs más conocidas

Tipo	CDK	Descripción
CDKs del ciclo celular	CDK1 (CDC2)	Ciclo celular primario en todas las células eucariotas.
	CDK2	Variante de CDK1 específica para animales.
	CDK4	CDK específica para animales, interactúa junto a Ciclina-D. CDK4/Ciclina-D es un integrador importante de señales mitogénicas y antimitogénicas.
CTD CDK	CDK7	Se une a Ciclina-H y MAT1 para formar un factor de transcripción (TFIIH). Cumple también una función activadora (CAK).
	CDK8	Forma parte del complejo de transcripción mediador, se une a Ciclina-H e interactúa con CDK7.
	CDK9	Forma un complejo con Ciclina-T o K. Cumple función en la elongación transcripcional.
Otras	CDK5	No pertenece al ciclo celular. Específica del cerebro de animales.

	CDK10	Activa en la fase G2/M del ciclo celular. Modula la actividad del factor de transcripción Ets2.
	CDK11	Involucrado en apoptosis.
	CDK14	Asociado a Ciclina-Y. Mediador en la interacción del ciclo celular con la señalización Wnt.
	CDK16	Involucrada en el tráfico y secreción de proteínas.
	CDK20	Involucrada en la biología de los cilios. Es similar a CDK7 y un posible CAK.

La activación de CDK6 se reportó en tumores mesenquimales como sarcomas y leucemias, mientras que la hiperactividad en CDK4 ha sido reportada principalmente en neoplasias epiteliales malignas en tejidos endocrinos y mucosos ¹¹. La no inhibición de CDK4 por INK4 puede resultar en consecuencias negativas. Uno de los mejores ejemplos de esto es que una mutación en CDK4 resulta en la insensibilidad a los inhibidores de la familia INK4, lo que fue reportado por primera vez en pacientes con melanomas familiares ¹⁷.

Además de lo anterior, el complejo activo de CDK4-6/Ciclina-D fosforila a la proteína de retinoblastoma (Rb1) y a p107 y p130. Rb1 en estado hipofosforilado reprime la transcripción de genes necesarios para el progreso del ciclo celular al unirse al dominio de transactivación de la familia de proteínas de factor de transcripción E2F, por lo que el aumento de la fosforilación de Rb1 a causa de CDK4/Ciclina-D reduce el control inhibitorio de la familia E2F por Rb1. Las alteraciones genéticas en la expresión de Ciclina-D han sido descritas en diversos tumores: su sobreexpresión se asocia a carcinomas en cabeza, cuello, tumores pituitarios, carcinoma de células escamosas de esófago y cáncer de mama¹³.

Algunos tipos de cáncer parecen ser resistentes o adquieren una resistencia rápida a los efectos de la inhibición de CDK4 y CDK6. Un ejemplo de esto es que la supresión de estas quinasas posee un bajo efecto clínico en el cáncer colorrectal, cáncer de mama y melanomas. Es probable, por lo tanto, que otras CDKs compensen la inhibición selectiva de CDK4 y CDK6, pero aun así los factores que determinarían esta compensación son poco conocidos ¹⁸.

1.2 Retinoblastoma:

El gen retinoblastoma (Rb1) fue identificado por primera vez en una rara condición en el ojo llamada retinoblastoma, la cual se presentaba debido a mutaciones en su locus¹⁹. También se descubrió que algunos virus como el del papiloma humano E7, virus Tag y adenovirus E1A tenían como objetivo el gen Rb1 para desactivarlo durante la

transformación celular²⁰. Basado en la similitud de las secuencias e interacciones análogas con las proteínas virales, se identificaron dos nuevos miembros de la familia de Retinoblastoma (Rb), *retinoblastoma-like 1* (RBL1) y *retinoblastoma-like 2* (RBL2) que codifican a las proteínas p107 y p130, respectivamente. Las proteínas de la familia Rb son conocidas como proteínas “pocket” ya que poseen un dominio conservado correspondiente a una especie de bolsillo con el que pueden interaccionar las proteínas virales mencionadas anteriormente. Se ha especulado que las proteínas p107 y p130 son fundamentales para la regulación de proliferación celular en diferentes organismos. Por otra parte, Rb1 suele encontrarse desactivada producto de alteraciones en la regulación de las CDKs en la mayoría de los tipos de cáncer, lo que sugiere que la familia Rb tendría un rol importante en el control del ciclo celular y la supresión de tumores²¹.

Principalmente CDK4, CDK6 y CDK2 están presentes para llevar a la célula desde la fase G1 a la fase S (Figura 1). CDK4 y CDK6 se encuentran involucradas en la etapa temprana de G1, donde en unión con la Ciclina-D toman el rol importante de iniciar la fosforilación de la proteína retinoblastoma (Rb1). Mientras tanto, CDK2 en el complejo CDK2/Ciclina-E completa la fosforilación de Rb, siendo así requerida para finalizar la fase G1. Producto de esto, se activa el rol transcripcional de la familia E2F comenzando la fase S. Junto con lo anterior, la actividad del complejo CDK2/Ciclina-E es requerida para las proteínas MCM (*mini-chromosome maintenance*), esenciales para iniciar la replicación. Cuando la fase S está finalizando, las ciclinas tipo A se asocian con CDK2 o CDK1 para fosforilar sus sustratos, esto incluye a las MCMs o a la ribonucleótido reductasa R2 para controlar la transición del ciclo de S a G2. Durante todo este proceso, Rb1 permanece hiperfosforilado y vuelve a su estado hipofosforilado solo después de la mitosis.

El mecanismo de interacción del complejo CDK4/Ciclina D/Rb no ha sido muy estudiado, a diferencia de otras quinasas como PKA (*Protein Kinase A*) y CDK2. CDK4, como se mencionó anteriormente, pertenece a la misma familia que CDK2. Sin embargo, solo poseen un 48% de identidad a nivel de secuencia, mientras que CDK4 con PKA solo posee un 15% de identidad a nivel de secuencia. Las 3 PQs mencionadas poseen un sitio activo conservado y también un sitio de unión conservado, con la excepción de que CDK2 posee 2 sitios de unión extra que la diferencian de CDK4 y PKA.

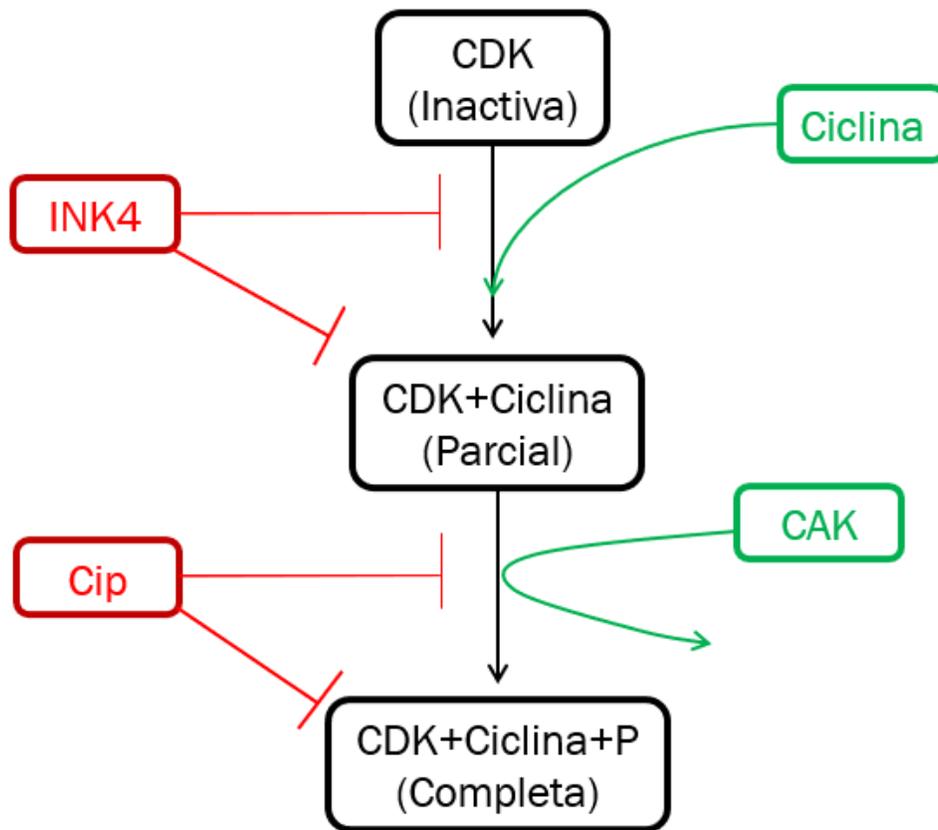


Figura 2. Mecanismos de activación e inhibición de CDKs

En términos de sus estructuras terciarias, CDK2 y CDK4 son mucho más parecidas (Figura 3). La cantidad de registros de estructuras cristalográficas de CDK4 disponibles en PDB actualmente es de 13, pero muchos de estos corresponden a variaciones mutantes que se trabajaron para comparar un modelo principal en estados determinados. Por esto, dicha cantidad se puede acotar a 4 registros únicos, cuyas estructuras tridimensionales se encuentran en conformaciones incompletas y en ningún caso conformando un complejo CDK4/Ciclina-D/Rb.

Dentro de los registros únicos, se encuentra cristalizado el complejo CDK4/Ciclina-D (PDB ID: 3G33), donde la enzima se encuentra en un estado inactivo, ya que está en presencia de un inhibidor. Por otro lado, la estructura cristalográfica de PDB 6PG8 se encuentra en una conformación activa, pero no se encuentra completo al no poderse determinar la estructura de algunos lazos. Esta información estructural disponible en PDB presenta una oportunidad para poder modelar un complejo de CDK4/CiclinaD/Rb completo y activo, y así caracterizar su estabilidad estructural y la probabilidad de obtener estados reactivos para futuros estudios de la reacción de fosforilación. Además, el estudio

molecular detallado de este complejo ternario permitirá el potencial diseño de compuestos activos como inhibidores de estado de transición o covalentes.

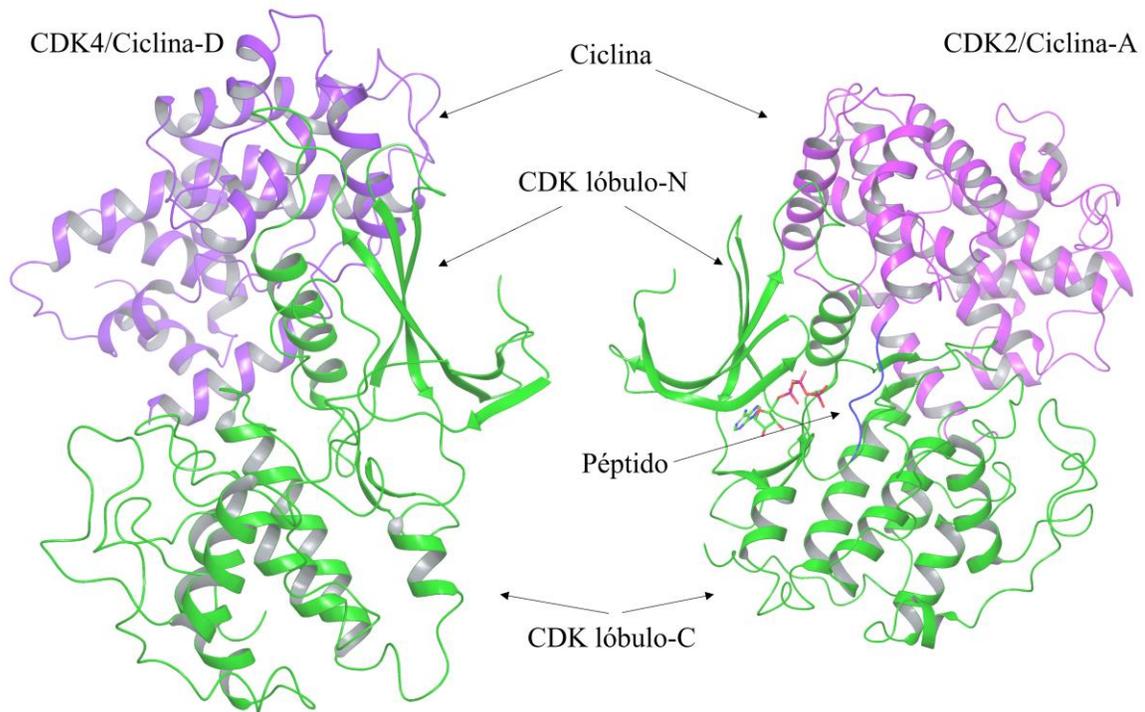


Figura 3. Comparación estructural de CDK4 (izquierda) y CDK2 (derecha).

1.3 Regulación de las CDKs:

Las *Cyclin-dependent kinase inhibitor/kinase inhibitor Protein* (Cip/Kip) son una familia de proteínas que puede formar complejos para bloquear la actividad de CDK2/Ciclina-E y CDK2/Ciclina-A. Específicamente puede hacerlo p21Cip1 y p27Kip1 (pertenecientes a Cip/Kip); pero CDK2 es capaz de fosforilar directamente a p27 e inducir a su degradación, de modo que este proceso puede facilitar el funcionamiento completo de CDK2²². Sin embargo, CDK4 es más susceptible a la inhibición por p27¹⁶. La familia de inhibidores Cip/Kip está compuesta de 3 proteínas ubicuamente expresadas: p27, p21 y p57, y solo esta última es expresada en tejidos específicos. Entre los primeros 2 tipos de inhibidores mencionados, p16 tiene la capacidad de unirse directamente a CDK4 e inhibir su actividad catalítica.

Las CDKs son reguladas mediante fosforilación. Así, el mecanismo de transferencia de fosfato a CDKs, y el subsecuente mecanismo de transferencia de fosfato de CDK a su respectivo sustrato **son eventos moleculares cruciales para su correcto funcionamiento**. Siendo uno de sus residuos de treonina/serina el que debe fosforilarse (T172 en CDK4 y T160 en CDK2). Estos residuos se encuentran en el *T-Loop* de la proteína. Las proteínas INK4 pueden debilitar la unión de las ciclinas D con CDK4 y CDK6, además de que

pueden interactuar con el dominio catalítico de estas CDKs para suprimir su actividad¹⁸. Se han encontrado alteraciones en las regulaciones de la vía de CDK4-6/Ciclina-D-INK4-Rb en la mayoría de los tumores expresados en humanos; en muchos tipos de cáncer la hiperactivación de CDK4/6 ha resultado en una sobreexpresión de reguladores positivos como la Ciclina-D, inactivación de INK4 e inhibidores de Cip/Kip, o delección y/o alteraciones epigenéticas del sustrato Rb²³.

Dentro de los inhibidores de CDK4, el grupo INK4 consiste en 4 proteínas relacionadas estructuralmente: p16, p15, p18 y p19, las cuales se unen específicamente a CDK4 y CDK6, y con una afinidad limitada con el resto de CDKs. De este grupo de inhibidores, p16 es el que más se ha estudiado. Su expresión es inducida por procesos como la señalización oncogénica, senescencia, señalización del factor de crecimiento β y la inhibición por contacto. Por lo anterior, el aumento de la expresión de p16 es un evento característico en tumores en los cuales se ha perdido la función de la proteína Rb1.

1.4 Transferencia de fosfato de CDKs:

Como se mencionó anteriormente, la transferencia de fosfato de las CDKs a su respectivo sustrato es un evento importante. Las reacciones de transferencia de fosfato se expresan en todos los tejidos en todos los sistemas biológicos, además de que permiten regulaciones conllevando a cascadas de señalización. La reacción de transferencia de fosfato que catalizan las PQs es ayudada por residuos específicos y cofactores de Mg^{2+} , los que permiten el posicionamiento adecuado de los sustratos y estabilizan las cargas negativas en el sitio activo¹.

Las CDKs fosforilan sustratos peptídicos en residuos de serina o treonina usando ATP (adenosín trifosfato) como fuente de fosfato, obteniendo así un sustrato fosforilado y una molécula de ADP. Las CDKs dependen de su unión a una proteína ciclina para estar en su estado activado completo y, para esto necesita la fosforilación de un residuo en específico, en el caso de la CDK2, por ejemplo, se fosforila el residuo Thr160²⁴ y en CDK4 se fosforila el residuo Thr172²⁵.

Además, los iones Mg^{2+} son cofactores esenciales para el correcto funcionamiento de las PQs. Las PQs catalizan la reacción de transferencia de fosfato desde una molécula de ATP que se coordina siempre con un ion de Mg^{2+} (ATP-Mg). Este ion corresponde al Mg2 en el sitio activo de acuerdo a la nomenclatura usada en las PQs y, en CDK2²⁶, se encuentra coordinado por dos átomos de oxígeno desde el α - y γ -fosfato del ATP, un oxígeno en unión β - γ , Asn132, Asp145 y una molécula de agua, completando así una coordinación octaédrica (Figura 4). Se espera que en CDK4 la coordinación de ATP- Mg^{2+} sea similar. En algunas PQs se pueden encontrar 2 iones Mg para catalizar esta reacción, lo que provocaría un aumento en la velocidad de catálisis²⁷.

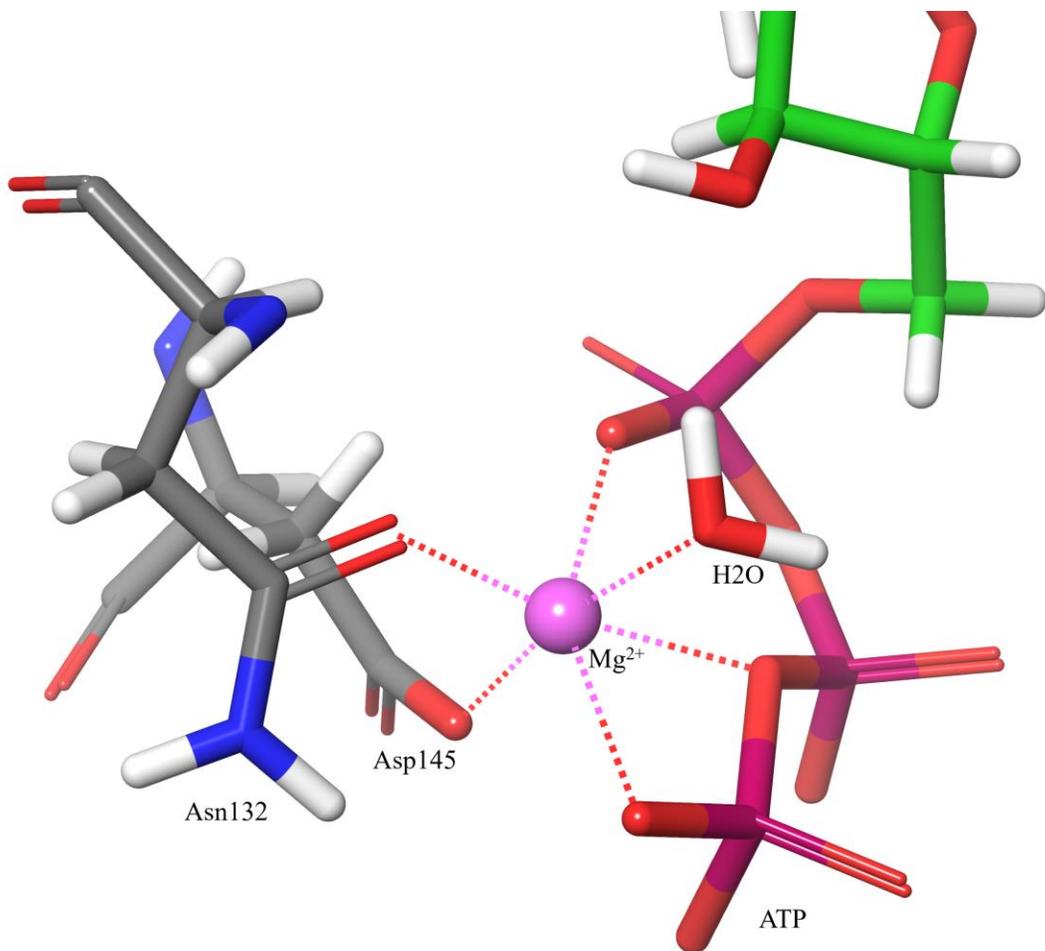


Figura 4. Coordinación octaédrica del Mg^{2+} en el sitio activo de CDK2.

Respecto a la reacción de transferencia de fosfato, se hipotetizan 3 formas en las cuales puede ocurrir la reacción. En la primera forma, la reacción pasa por un mecanismo disociativo que involucraría un metafosfato intermedio estable, caracterizado por una disociación avanzada entre el oxígeno saliente y el átomo de fósforo en el fosfato- γ . Un segundo mecanismo es el asociativo, que involucra un fosforano pentavalente como intermediario, donde la formación de enlaces con el oxígeno entrante es más avanzada que la disociación con el oxígeno saliente. La última vía se especula que es un mecanismo concertado, con un solo estado de transición²⁸.

La mayor parte de la información disponible con respecto al mecanismo de activación de CDK4 está incompleta y solo ha sido actualizada recientemente con la publicación del cristal de CDK4 en complejo con ciclina-D y el péptido p27^{16,29}. Adicionalmente, las

situaciones donde CDK4 y CDK6 estén inhibidas están siendo recientemente exploradas debido a que actualmente no es posible encontrar información detallada de los determinantes moleculares y energéticos de la reacción de transferencia de fosfato en la cual estas proteínas participan.

Por otro lado, Rb es capaz de unirse por separado con cada una de las PQs: CDK4, CDK6 y con CDK2 para formar el complejo molecular, pero las interacciones entre el complejo CDK4/Ciclina-D/Rb y CDK2/Rb/Ciclina-E no serían iguales debido a que existiría una interacción selectiva entre Rb y las PQs mencionadas. Esta selectividad sería evaluada modificando el motivo C-terminal de la proteína Rb completa en la que, al modificarse los residuos específicos “RLF” por “AAA”, la fosforilación podría no ocurrir. Así, la evidencia sugiere que la interacción selectiva con las CDKs mencionadas, puede tener distintos efectos en la función de Rb³⁰.

No obstante, a la fecha **no se han encontrado trabajos** que aborden un estudio completo y sistemático de la caracterización estructural del complejo ternario CDK4/Ciclina-D/Rb.

Contar con modelos moleculares completos del complejo CDK4/Ciclina-D/Rb que ayuden a caracterizar estructuralmente y comprender la estabilidad de las interacciones proteína-proteína con el péptido modelo de Rb, es un paso inicial para estudiar el funcionamiento de esta proteína a nivel molecular. Esto permitirá proponer estudios futuros relacionados a la catálisis enzimática del complejo mediante métodos computacionales multi-escala, como es el caso de los métodos QM/MM (*quantum mechanics/molecular mechanics*).

2 HIPÓTESIS

El estudio molecular del complejo CDK4/Ciclina-D/Retinoblastoma nos permitirá evaluar la estabilidad del complejo ternario para que se favorezca alguno de los mecanismos propuestos para la reactividad enzimática en que participan estas enzimas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general:

Estudiar las estructuras ternarias, CDK4/Ciclina-D/Rb, que contribuyen al mecanismo de transferencia de fosfato de Rb por CDK4

3.2 Objetivos específicos

- 1.- Obtener un modelo de la estructura de CDK4 en su estado activo por medio de modelamiento por homología.
- 2.- Estudiar el complejo molecular CDK4/Ciclina-D/Rb por medio de técnicas de simulaciones de dinámica molecular.
- 3.- Analizar los resultados de dinámica molecular para verificar la probabilidad del mecanismo catalítico de CDK4/Ciclina-D sobre Rb.

4 METODOLOGÍA

4.1 Comparación de secuencia primaria y estructura terciaria:

Para realizar comparaciones de distintas secuencias entre las quinasas de interés se comenzó con una búsqueda exhaustiva de estructuras cristalográficas de CDK2 y CDK4, tomando como prioridad las estructuras que estuviesen lo más completas posibles, además de buscar también la secuencia canónica de CDK2 y CDK4. Se consideraron como principales bases de datos a UniProt³¹ (*Universal Protein Resource*) y PDB³² (*Protein Data Base*).

En cuanto a estas bases de datos podemos destacar que UniProt es una colaboración entre el European Bioinformatics Institute (EBI), el Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) y el Protein Information Resources (PIR). Esta plataforma consiste en una metabase de datos donde se encuentran almacenados todos los datos de anotación y secuencia de diferentes proteínas, compuesta a grandes rasgos por las bases de datos “UniProt Knowledgebase” (UniProtKB), “UniProt Reference Clusters” (UniRef), y “UniProt Archive” (UniParc).

PDB por su parte, es la primera base de datos digital de acceso libre, siendo una de las herramientas fundamentales en la actualidad para todo tipo de investigaciones, principalmente enfocados en biología y medicina, esto debido a que almacena datos de estructuras 3D de moléculas biológicas (proteínas, ADN y ARN) las cuales pueden ser descargadas por todo tipo de usuario. Esta base de datos no está limitada a solo almacenar información, también posee vinculación con bases de datos de secuencias y herramientas de análisis y visualización estructural.

Actualmente Uniprot posee varias herramientas de búsqueda y alineamiento, las cuales se pueden usar de manera *online* con la secuencia en formato FASTA o con el ID Uniprot de la proteína de interés. Para realizar la primera comparación entre ambas quinasas se buscaron mediante la barra de búsqueda de Uniprot seleccionando las pertenecientes a humano, luego se descargaron las secuencias en forma canónica de ambas PQ. En la misma página web está disponible “Align”, la cual es una herramienta de alineamiento en la que se pueden alinear secuencias tanto en formato FASTA como con el ID de Uniprot de la proteína, en este caso se alinearon las secuencias canónicas de CDK2 y CDK4.

Desde Uniprot y PDB se eligió al cristal 1QMZ como representante de CDK2. Este cristal consiste en un hetero tetrámero del complejo activado CDK2/Ciclina-A, péptido sustrato y cofactores (ATP y Mg²⁺). Para CDK4 se eligieron 2 cristales: 3G33 y 2W96. El primero está compuesto por un hetero tetrámero del complejo CDK4/Ciclina-D, donde la ciclina y la quinasa se encuentran casi completas, no posee cofactores, por lo que se encuentra en una conformación inactiva, lo que se evidencia en su lazo cerrado. En cuanto a 2W96,

consiste en un hetero dímero en su forma inactiva y completa, además posee un cofactor. El cristal 3G33 fue utilizado como referencia estructural, mientras que 2W96 como una referencia de la interacción de la Ciclina-D1 con CDK4. Además, se analizaron las diferencias y similitudes estructurales de las 3 estructuras cristalográficas obtenidas desde PDB por medio de alineamientos de estructura terciaria, lo cual se llevó a cabo con el software Maestro³³. Este software está diseñado para la visualización, modelamiento y análisis de sistemas biológicos, recibiendo *inputs* en múltiples formatos dentro de los cuales podemos encontrar: ‘mae’, ‘mol2’, ‘cif’, ‘cms’ y ‘PDB’.

Realizar esta comparación entre los cristales seleccionados es importante para la identificación de residuos diferenciales, principalmente en el sitio activo y para la identificación de posibles diferencias en la unión de sustrato y cofactores (ATP-Mg²⁺), los cuales son una pieza fundamental en el proceso de transferencia de fosfato en el modelo a estudiar.

4.2 Obtención del complejo CDK4/Ciclina-D/Rb:

Luego de realizadas las comparaciones entre las estructuras cristalográficas experimentales y las secuencias, se seleccionaron tres registros desde PDB como plantillas para la construcción de modelos estructurales para el complejo CDK4/Ciclina-D/Rb/(cofactores): 1QMZ, 3G33 y 2W96. Las regiones seleccionadas de cada cristal serán mencionadas en el apartado 4.2.1. Este proceso de construcción estructural en el que se usan moldes similares a la estructura final que se desea modelar es denominado “modelado por homología”.

4.2.1 Modelado por homología:

El proceso de modelado por homología consiste en la construcción de una aproximación de la estructura atómica de una cadena polipeptídica basándose en estructuras conocidas de proteínas similares, las cuales en la mayoría de los casos son consideradas proteínas homólogas y que en el modelado son llamadas “molde” o “plantilla”.

Este tipo de modelado posee varias aplicaciones, dentro de las cuales se encuentran la predicción de ligandos, catálisis enzimática y posibles mutaciones. En este caso, a la palabra “modelar” se le otorga un significado de realizar una predicción de cómo disponer los átomos de una proteína de la cual se tiene una estructura terciaria (o cuaternaria) desconocida como información. Esta secuencia se puede modelar si dicha secuencia posee una estructura homóloga (usualmente una proteína perteneciente a la misma familia) con alta similitud, la cual se pueda usar a modo de referencia con el fin de construir el modelo de interés y conocer su función molecular de la forma más completa posible³⁴. Además, permite el muestreo de ligandos y su afinidad e interacción con estos, de modo que este proceso ayude a responder la mayor cantidad de interrogantes que puedan existir en relación con el sistema de interés.

El proceso de modelado puede ser complejo debido a que los pasos para realizar el modelado y posterior validación del modelo se deben realizar por etapas o aproximaciones sucesivas. Actualmente existen varios softwares para realizar modelos comparativos por homología, dentro de los cuales uno de los más conocidos es *MODELLER*³⁵, el que será utilizado para realizar modelado por homología.

4.2.2 Modeller:

*Modeller*³⁵ consiste en un paquete de software programado en Fortran con interfaz de Python. Es una herramienta de libre acceso y posee una compatibilidad multiplataforma, lo que le entrega gran versatilidad en tareas como la búsqueda automatizada de estructuras homólogas a la secuencia de interés, alineamientos múltiples, modelado *de novo* para estructuras tipo lazo de proteínas, modelamiento comparativo por satisfacción de restricciones espaciales y evaluación de los modelos mediante *DOPE score* (Energía Proteica Discreta Optimizada)³⁶. Este valor consiste en un potencial estadístico dependiente de la distancia atómica a partir de estructuras proteicas nativas conocidas basado en la teoría de la probabilidad y sin recurrir a la mecánica estadística. Además, este potencial fue relacionado con un potencial de fuerza media basado en diversas suposiciones habituales³⁶.

Para realizar un modelamiento comparativo, se debe comenzar por identificar las secuencias relacionadas a la estructura objetivo, seleccionar las estructuras tridimensionales similares que se usarán como molde, las cuales se deben alinear con la secuencia de la estructura objetivo. Con la información del alineamiento y las estructuras de los moldes se construyen los modelos que, una vez listos se procede a evaluar mediante *DOPE score* como se muestra en la Figura 5.

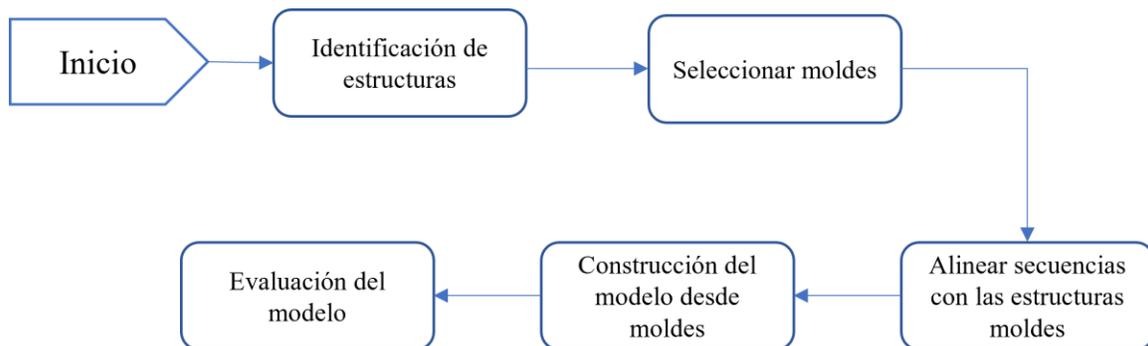


Figura 5. Pasos para la obtención de un modelo mediante modelado comparativo con *Modeller*.

Como *input*, *Modeller*³⁵ recibe las estructuras tridimensionales en formato PDB de los moldes y un archivo en formato PIR (*Protein Information Resource*). El formato PIR es un

alineamiento múltiple de las secuencias de las estructuras que se usarán como plantilla y la proteína de interés y está conformado de un encabezado formado por líneas principales. La primera comienza por un signo ‘mayor que’ (>), seguido de un código de 2 letras, usualmente usado ‘P1’, un punto y coma (;) y un identificador de la secuencia; en la segunda fila va una descripción de la secuencia; desde la tercera fila en adelante corresponde a la secuencia y el fin de esta se indica con un asterisco (*) como se puede apreciar en la Figura 6.

```
>P1;5fd1
structureX:5fd1:1      :A:106  :A:ferredoxin:Azotobacter vinelandii: 1.90: 0.19
AFVVTDNCKYKCYTDCVEVCPVDCFYEGPNFLVIHPDECIDCALCEPECPAQAIIFSEDEVPEDMQEFIQLNAELA
EVWPNITEKKDPLPDAEDWDGKGLQHLER*

>P1;1fdx
sequence:1fdx:1      : :54   : :ferredoxin:Peptococcus aerogenes: 2.00:-1.00
AYVINDSC--IACGACKPECPVNIIQGS--IYAIADADSCIDCGSCASVCPVGAPNPED-----
-----*
```

Figura 6. Ejemplo de formato PIR

4.2.3 Obtención y evaluación estructural de los modelos:

La construcción del alineamiento en formato PIR para el modelado del complejo CDK4(ATP-Mg)/CiclinaD/Rb se realizó de forma manual en base a la selección de las estructuras relacionadas al complejo reactivo de CDK4 con las estructuras cristalográficas experimentales de PDB: 1QMZ, 3G33 y 2W96. De estos, 1QMZ se utilizó como modelo para las interacciones del sitio activo de CDK4 con el sustrato (péptido de Retinoblastoma) y la coordinación de sus cofactores (ATP, agua, Mg²⁺). Desde la estructura tridimensional de 3G33 se obtuvieron las distancias de equilibrio para las restricciones estructurales que se usaron en la etapa de refinación de los dominios de la estructura secundaria de CDK4. Finalmente, 2W96 fue utilizado como molde para el modelamiento de la interacción proteína-proteína del complejo CDK4/Ciclina-D.

El modelado por homología se realizó en varias etapas, para añadir todas las características reportadas para el complejo en su forma activa. Como primera etapa, se modeló el dominio de CDK4, incluyendo el complejo ATP-Mg²⁺ en su sitio catalítico. Para ello, se incluyeron las restricciones espaciales de 1QMZ y 3G33. Luego, se añadieron las restricciones espaciales desde 2W96, de forma específica las interacciones proteína-proteína. Finalmente, se completó el complejo reactivo con la inclusión de las restricciones espaciales correspondientes a la interacción del péptido Rb1 con el dominio de CDK4, El péptido modelo de Rb que se utilizó, consta de 13 aminoácidos (secuencia 775-787: “RPPTLSPIPHIPR”) que se ha reportado como sustrato en experimentos de fosforilación de Rb por CDK4³⁷.

Para la construcción del modelo se implementó un script en Python basado en aquellos ya disponibles en el sitio web de *Modeller*³⁵, importando las librerías correspondientes a ‘modeller’, ‘automodel’, ‘parallel.job’ y ‘parallel’, estas dos últimas para poder paralelizar los cálculos respectivos. Al ser basado en los scripts entregados por *Modeller*³⁵ se mantiene que solo se necesita como entrada el archivo de alineamiento ‘.ali’ creado al principio y los archivos PDB de los cristales que se usaron en el mismo directorio de trabajo. Como salida resultante, el script escribió 100 archivos PDB con los modelos creados a un nivel de refinación rápida. Para la evaluación de los modelos se compararon los DOPE score³⁶ de cada modelo previamente ordenados de menor a mayor puntaje, siendo seleccionados 10 de los modelos con el puntaje más idóneo (más negativos).

Para la validación estructural de los modelos se emplearon varias métricas implementadas en herramientas disponibles en servidores en la web. La compatibilidad estructura-secuencia se evaluó con VERIFY-3D³⁸. Para la inspección de las conformaciones de *backbone* mediante gráficos de Ramachandran se empleó el análisis de PROCHECK^{39,40}. Para probar la calidad del empaquetamiento del modelo 3D se calculó el valor del puntaje Z (Z-score) en WHATCHECK⁴¹. Por último, se utilizó el servidor ProSA⁴² para obtener el puntaje Z de la calidad global de los modelos.

Luego de las comprobaciones estructurales, se utilizó *Maestro*³³ de la suite de Schrödinger para preparar los modelos con el módulo *Protein Preparation Wizard*⁴³ desde la misma interfaz de *Maestro*³³. Con este módulo se pueden realizar correcciones estructurales robustas como la adición de átomos de hidrogeno, adición de ordenes de enlace, corregir los enlaces de coordinación de metales y la carga de estos, remover moléculas de aguas, determinar los estados de protonación óptimos a residuos de protonables (histidina, ácido glutámico, ácido aspártico), entre otras funcionalidades.

Con *Protein Preparation Wizard*⁴³ se realizó una verificación de la completitud de la estructura de las proteínas, añadiendo átomos de hidrógeno faltantes. También se evaluaron los estados de protonación con el software *Propka*⁴⁴, donde se utilizó un pH de 7.4 en base a la investigación de Topacio *et al.*³⁷ y, además, se optimizaron los enlaces de hidrógeno intramoleculares existentes en los modelos en la sección de refinamiento del módulo *Protein Preparation Wizard*.

4.3 Dinámicas Moleculares:

Desde un punto de vista general, las observaciones experimentales producidas en laboratorio generan información que puede ser empleada en construir modelos microscópicos complejos. Luego, mediante el uso de simulaciones de dinámicas moleculares (DMs) esto permite la predicción y la explicación de propiedades observables

a través del tiempo. Por ello, para evaluar la estabilidad estructural y energética en el tiempo de los sistemas construidos, se realizaron simulaciones de dinámica molecular clásicas.

Empleando *Modeller*³⁵, se generaron 100 modelos, de los cuales fueron seleccionados 3 en base a su *DOPE score*³⁶ y a la adecuada coordinación del cofactor Mg^{2+} . Luego, estos modelos fueron refinados en Maestro³³, para realizar simulaciones de dinámica molecular clásicas utilizando el software Desmond⁴⁵ de la suite Schrödinger³³.

En base a menciones en el estudio CDK2 de Recabarren *et al.*²⁶ y a la similitud entre CDK2 y CDK4, podemos inferir que las distancias de reacción podrían ser similares. Por lo tanto, las distancias a tener en cuenta para que la reactividad se lleve a cabo en el modelo son en promedio 3.7Å para la distancia entre el fosfato gamma del ATP y el oxígeno de la Serina-780 del Rb (en adelante referenciado como “D1” o “distancia 1”), y 4.3Å para la distancia entre la Serina-780 del Rb y el oxígeno del Aspartato-140 de la CDK4 (En adelante referenciado como “D2” o “distancia 2”).

Como se ha mencionado anteriormente, existen 2 vías de reactividad para el complejo de CDK4/CiclinaD/Rb: un mecanismo de transferencia de fosfato asistido por base y uno asistido por sustrato. Para evaluar estas condiciones se realizaron DMs para observar la estabilidad del péptido Rb y la interacción con el ATP o el Asp140, es decir, para evaluar si prevalecía la estabilidad del sistema en el tiempo respecto a la distancia 1 o a la distancia 2. Se realizaron 3 DMs de 300ns para cada modelo seleccionado previamente bajo 3 condiciones diferentes: una simulación se realizó sin aplicar ningún tipo de restricción, otra simulación se realizó aplicando restricciones en la distancia 1 (ATP-P γ ---O-Ser780) manteniéndolo en 3.7Å y una tercera simulación con restricción en la distancia 2 (Ser780-O --- O-.Asp140) manteniéndola a una distancia de 4.3Å.

Los parámetros que la interfaz de Desmond⁴⁵ ofrece son rígidos y poco personalizables. Por lo que, para obtener y replicar las dinámicas con los parámetros de restricciones y fuerzas óptimos para el sistema se utilizó la herramienta externa Desmond Builder⁴⁶. La cual consiste en un pipeline desarrollado en Python el cual permite la preparación de un sistema para simulaciones moleculares a partir de un archivo en formato ‘mae’. Esta herramienta permite aumentar la cantidad de etapas de equilibrado y su duración, cambiar el valor de las fuerzas entre etapas de equilibrado, agregar restricciones posicionales (1 átomo), de distancia (2 átomos), de ángulo (3 átomos) e impropio (4 átomos). De este modo, al ejecutarse una dinámica con restricciones, se puedan aplicar relajaciones al sistema con una disminución de las fuerzas de forma gradual. Usando el protocolo de relajación por defecto de Desmond en Maestro, las fuerzas disminuyen de forma muy abrupta y los sistemas más sensibles pueden verse afectados.

Para la preparación del sistema se utilizó una caja ortorrómbica y se calculó el tamaño de esta con método 'buffer' con distancias de $13 \times 13 \times 13 \text{ \AA}$, se agregaron contraiones para neutralizar las cargas del sistema, no se adicionó concentración salina y se utilizó el modelo de agua 'SPC'. El protocolo de relajación inicial se realizó en 5 etapas, y se aplicaron restricciones posicionales en el backbone de la proteína con una fuerza de $10 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{\AA}^{-2}$ en las 5 etapas. Dichos ajustes son equivalentes al protocolo de relajación por defecto de Maestro, excepto por la última etapa en la que Maestro elimina todas las restricciones. Luego se añadieron 8 etapas de equilibrado NPT de 1000ps de duración a 300 K. Durante las 4 primeras etapas se mantuvo la restricción posicional sobre el backbone de la proteína, y se fueron disminuyendo las fuerzas aplicadas en cada etapa; $5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{\AA}^{-2}$, $2.5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{\AA}^{-2}$, $1.25 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{\AA}^{-2}$ y $1.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{\AA}^{-2}$. Adicionalmente, durante estas últimas 8 etapas adicionales de equilibrado se mantuvieron las restricciones de distancia entre los átomos de la distancia 1 y los átomos de la distancia 2 con una fuerza de $5 \text{ kcal/mol} \cdot \text{\AA}^2$. Estas restricciones se aplicaron en todos los modelos para asegurar una mayor estabilidad entre la proteína y los átomos de interés.

Una vez completado el equilibrado, se ejecutó la etapa de producción, con un tiempo de simulación de 300ns. Los 3 modelos se sometieron a DMs en 3 condiciones: 'Libres' y con restricciones, estas últimas para evaluar la estabilidad del sistema forzando la cercanía de los átomos en la distancia 1 y distancia 2. La primera restricción (Restricción 1) fue entre los átomos $\text{P}\gamma\text{-ATP}$ y el $\text{O}\gamma\text{-Ser780}$. La segunda restricción (Restricción 2) fue entre el $\text{O}\gamma\text{-Ser780}$ y OD2-Asp140 ; ambas restricciones con una fuerza de $2.5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{\AA}^{-2}$, entregando un total de 9 dinámicas moleculares, equivalentes a 3 tipos de condiciones por cada uno de los 3 modelos, como se muestra en la Figura 7.

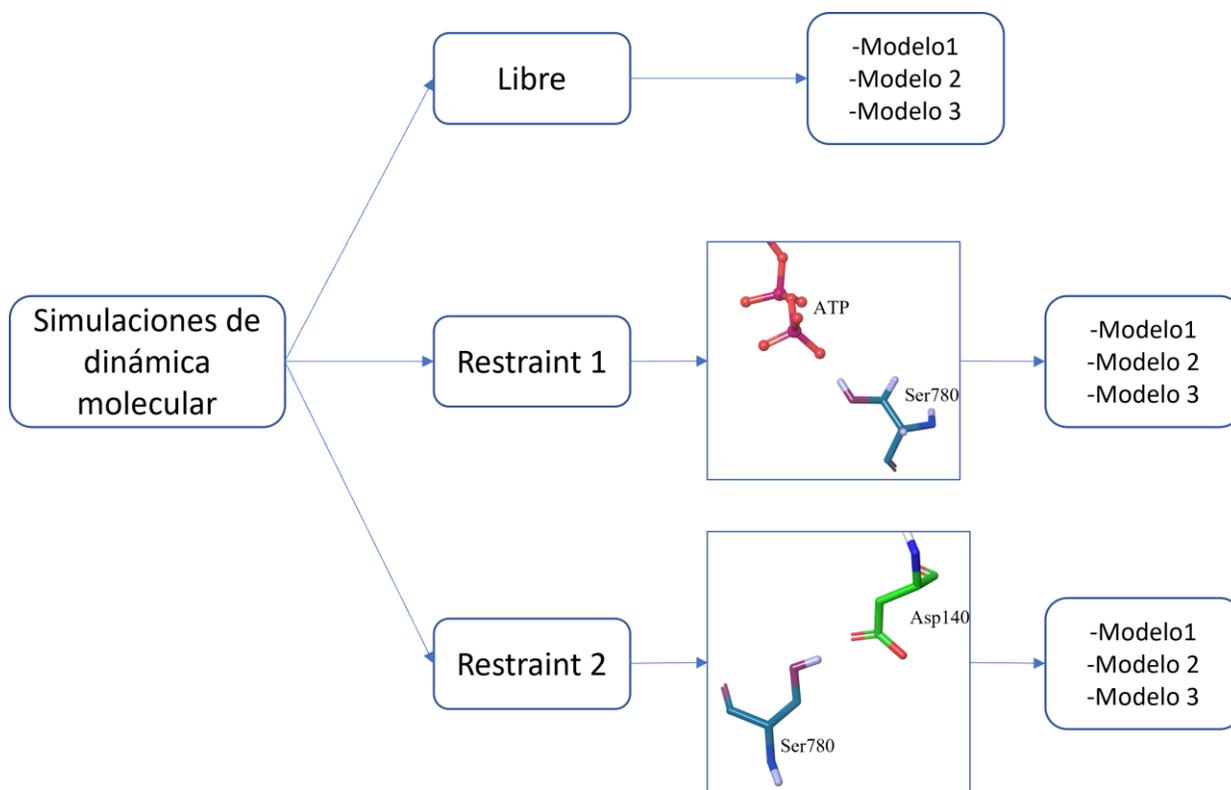


Figura 7. Diagrama con la organización de simulaciones de dinámica molecular y condiciones de restricción.

4.3.1 Análisis de Dinámicas Moleculares:

Se estudiaron los resultados de las dinámicas moleculares realizando varios análisis con la herramienta *Simulation Interaction Diagram*⁴⁵ de la suite de Schrödinger³³. Este análisis entrega una salida robusta con datos sin procesar, a partir del cual se obtuvieron los datos de interacción de proteína-péptido para conocer los residuos de la proteína que interactúan con el péptido de Rb durante la duración de la simulación. Con la herramienta *Simulation Event Analysis*⁴⁵ de la suite de Schrödinger³³ se obtuvieron datos como el RMSD (Root Mean Square Deviation) y los valores de las distancias 1 y distancia 2 durante la duración de la dinámica, así como también las distancias de la coordinación del átomo de Magnesio del sitio activo durante toda la trayectoria.

Se realizó un análisis de RMSF (Root Mean Square Fluctuation) para conocer el movimiento de los residuos durante la dinámica. Esto permitió evaluar la estabilidad o anclaje de los residuos en base a su valor de RMSF, lo que se realizó mediante la ejecución en VMD⁴⁷ de un script programado en *Tcl*.

Se utilizó la herramienta *Contact Surface Analyzer*⁴⁸, la cual consiste en un script basado en Python para calcular el área de superficie de contacto en trayectorias de dinámicas

moleculares, y así conocer que porcentaje del péptido Rb se encuentra en contacto directo con la proteína (CDK4). Todos los gráficos se realizaron con la herramienta de análisis estadístico R⁴⁹.

5 Resultados y Discusión:

Para el estudio posterior de la transferencia del fosfato- γ catalizada por CDK4, es esencial el análisis de su estructura cristalizada para comprender los mecanismos de su funcionamiento. Al realizar la búsqueda de cristales de rayos-X de CDK4 se notó la cantidad limitada de información existente de esta proteína en las bases de datos, ya que la mayoría de los cristales encontrados no estaban completos o se encontraban en conformaciones inactivas. Esto puede deberse a que la obtención de estructuras de proteínas por medios experimentales suele ser compleja a causa de la imposibilidad de obtener cantidades óptimas de proteína purificada, y también por dificultades en el proceso de cristalización, siendo esta la razón por la cual es necesaria la construcción de un modelo representativo para analizar el complejo y reacción de interés. A pesar de que CDK2 y CDK4 pertenecen a la misma familia, la disponibilidad de información cristalográfica de CDK2 es mucho mayor. De esta PQ hay varios modelos experimentales donde se representa casi la totalidad de su secuencia de aminoácidos en la estructura tridimensional, inclusive en unión con ligandos.

Por lo anterior, el paso inicial en la investigación fue realizar una comparación estructural detallada de la estructura primaria y terciaria de CDK2 y CDK4, para estudiar el grado de similitud que ambas PQs poseen. Además, se identificaron los residuos importantes que comparten de forma homóloga, y que harían parte de la catálisis enzimática, siendo de este modo posible el establecimiento de un modelo completo de CDK4 con su estructura en la forma activa.

5.1 Elección de molde base:

La estructura secundaria de las proteínas se conserva mejor que su secuencia, esto debido a la versátil propiedad de la codificación del código genético en la cual un aminoácido puede ser codificado por más de un codón⁵⁰. En base a esto es que, al tener como mínimo un 30% de identidad entre una proteína conocida y una desconocida, es más que suficiente para que la proteína conocida pueda considerarse un molde para la obtención de un modelo 3D aceptable.

Al realizar un alineamiento global mediante BLAST⁵¹ entre las secuencias canónicas de CDK2 y CDK4 (Figura 8), se obtuvo como resultado una identidad del 44%, con 137 aminoácidos en posiciones idénticas, lo cual es un porcentaje de identidad bastante aceptable considerando además que ambas PQs pertenecen a una misma familia.

NW Score	Identities	Positives	Gaps
592	137/312(44%)	193/312(61%)	23/312(7%)
Query 1	M--ENFQKVEKIGEGTYGVVYKARNKLTGEVVALKKIRLDTETEG--VPSTAIRESILL		55
Sbjct 1	M ++ V +IG G YG VYKAR+ +G VALK +R+ G +P + +RE++LL		60
Query 56	KELN---HPNIVKLLDVIHT-----ENKLYLVFEFLHQDLKKFMDASALTGIPLPLIKSY		107
Sbjct 61	+ L HPN+V+L+DV T E K+ LVFE + QDL+ ++D + G+P IK		120
Query 108	LFQLLQGLAFCHSHRVLHRDLKPNLLINTEGAIKLADFLARAFGVVVRTYTHEVVTLW		167
Sbjct 121	+ Q L+GL F H++ ++HRDLKP+N+L+ + G +KLADFLAR + + T VVTLW		179
Query 168	YRAPEILLGCKYYSTAVDIWSLGCIFAEMVTRRALFPGDSEIDQLFRIFRTLGTPDEVVW		227
Sbjct 180	YRAPE+LL Y +T VD+WS+GCIFAEM R+ LF G+SE DQL +IF +G P E W		238
Query 228	PGVTSMPDYKPSFPKWARQDFSKVVPPLDEDGRSLLSQMLHYDPNKRISAKAALAHFFF-		286
Sbjct 239	P S+P + +FP + VVP ++E G LL +ML ++P+KRISA AL H +		296
Query 287	QDVTKPVPHLRL	298	
Sbjct 297	+D P		
	KDEGNPE	303	

Figura 8. Alineamiento global entre las secuencias de las proteínas CDK2 y CDK4

Esto se puede apreciar de mejor manera en la Figura 9, en la cual se muestra un alineamiento de estructura terciaria donde ambas estructuras coinciden en gran parte de su backbone y sitio activo. Además, se pueden observar las principales diferencias que se deseaban modelar por homología, como el lazo en color naranja (aminoácidos 161 – 171) cerca del sitio activo en la estructura de CDK4, el cual está en una conformación cerrada, que impediría que se uniera un péptido en el sitio activo. Esto se puede inferir debido a que la estructura de CDK2 posee un péptido cercano a su sitio activo, el cual en la Figura 9 se representa de color morado y al realizar la superposición de ambas estructuras PQs es evidente que se encuentran en coordenadas espaciales cercanas. De este modo, el lazo de CDK4 se debe remodelar para que la estructura quede en una conformación abierta o “activa” para que el péptido modelo de Rb se pueda modelar cercano al sitio activo.

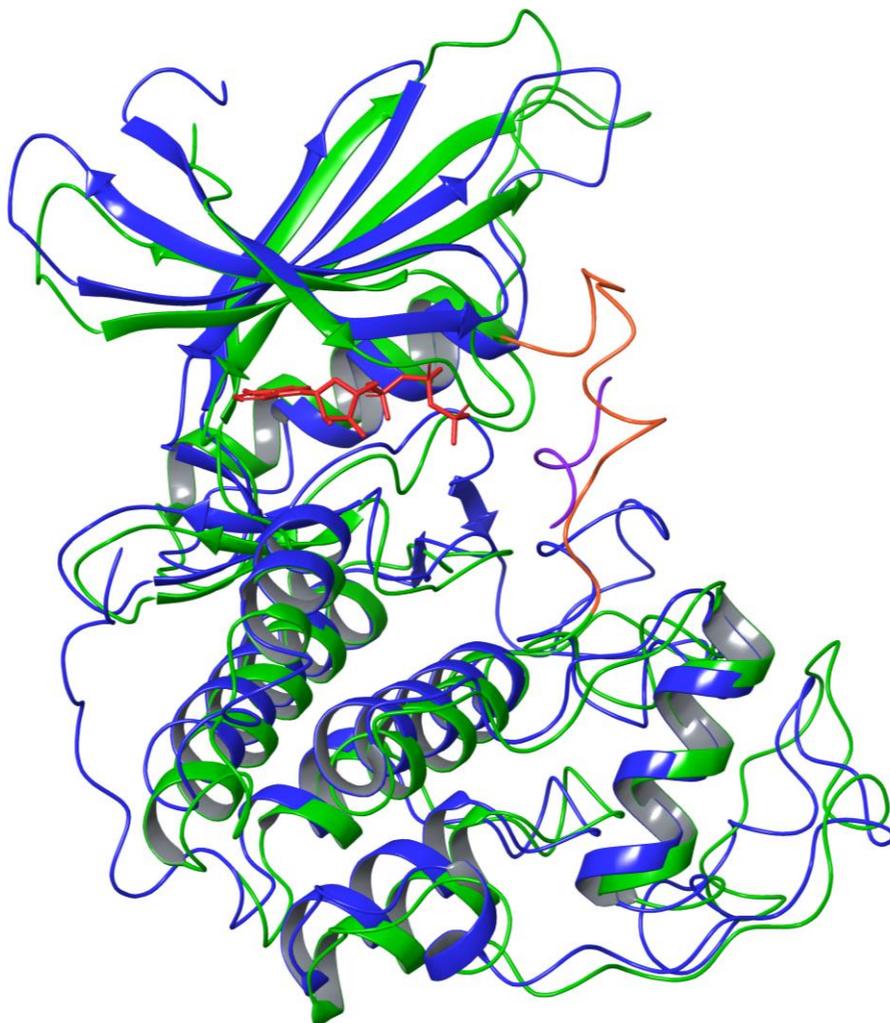


Figura 9. Alineamiento de estructura terciaria entre el cristal 1QMZ correspondiente a CDK2 (azul) y el cristal 3G33 de CDK4 (verde). Molécula de ATP de 1QZM se observa en rojo y su péptido en morado

5.2 Elección de mejores modelos:

Luego de realizar el modelado por homología completando todos los pasos mencionados en la metodología, se realizó la evaluación de los modelos producidos mediante el *DOPE score* como primer filtro (Tabla 2). Como se mencionó anteriormente, la lista de *DOPE score* se ordena de manera ascendente (de más negativo a menos negativo). La lista completa de los puntajes *DOPE* para los 100 modelos generados se encuentra en el *Material Suplementario 1*.

Tabla 2.- Tabla de DOPE score de los modelos en el último paso de modelado por homología con Modeller³⁵

Nombre	DOPE (kJ • mol ⁻¹)
seq.B99990031.pdb	-5844464062
seq.B99990095.pdb	-5802959766
seq.B99990096.pdb	-5784933984
seq.B99990083.pdb	-5752686719
seq.B99990003.pdb	-5751504688
seq.B99990064.pdb	-5750928125
seq.B99990086.pdb	-5736653906
seq.B99990069.pdb	-5731382812
seq.B99990039.pdb	-5728765234
seq.B99990078.pdb	-5726855859
seq.B99990041.pdb	-5723746094
seq.B99990014.pdb	-5718965625
seq.B99990022.pdb	-5703895703
seq.B99990091.pdb	-5703121094
seq.B99990016.pdb	-5702588672

Varios de los modelos que encabezan la lista, a pesar de tener un puntaje adecuado para ser seleccionados, fueron omitidos. Esto debido a que durante el análisis de las estructuras se estimó que algunas no eran adecuadas, debido principalmente a problemas estructurales en la coordinación del Mg²⁺ en el sitio activo y cambios en los centros quirales. De la lista fueron seleccionados 3 modelos: “seq.B99990003.pdb”, “seq.B99990083.pdb” y “seq.B99990086.pdb”, en Tabla 2. Los modelos seleccionados serán nombrados de ahora en adelante como “Modelo 1”, “Modelo 2” y “Modelo 3” respectivamente.

5.3 Modelos 3D:

Como primera evaluación para los modelos seleccionados, se realizaron gráficos de Ramachandran con la herramienta web PROCHECK^{39,40}, para así verificar *a priori* cuáles de los aminoácidos de las estructuras se encuentran en conformaciones favorables de acuerdo con los ángulos phi (ϕ) y psi (ψ). Esto debido a que, por efectos estéricos, no todos los ángulos son posibles en todos los aminoácidos y que existan muchos aminoácidos en regiones prohibidas no es favorable para la estructura. En la Figura 10 se muestran los gráficos de Ramachandran resultantes de los 3 modelos mencionados anteriormente obtenidos con Modeller³⁵. Para los tres modelos más del 90% de sus residuos se encuentran en zonas favorables.

Para el reconocimiento de errores en los modelos se utilizó el servidor ProSa-web. Esta herramienta calcula puntajes de calidad global para la estructura que reciba como entrada, entregando como salida un gráfico de Z-score de la calidad global y otro gráfico de puntaje de residuos, en el cual se observan las variaciones energéticas por cada residuo.

El Z-score obtenido para los modelos en la Figura 11 entrega un valor de calidad general, que para el modelo 1 (Figura 11A) corresponde a -8.13, el modelo 2 (Figura 11) posee un Z-score de -8.43, mientras que el modelo 3 (Figura 11C) posee un Z-score de -7.75. Estos valores indican una buena calidad ya que se encuentran dentro del rango de calidad de proteínas cristalizadas por rayos X o NMR, mostrando que los modelos poseen calidad de conformación nativa.

Como segunda salida, ProSA-web entrega un perfil energético basado en la posición de cada aminoácido, el cual fue aplicado a los 3 modelos (Figura 12), donde se observan regiones de residuos con valores positivos. Zonas de alta energía podrían indicar inconvenientes en la estructura que deben refinarse.

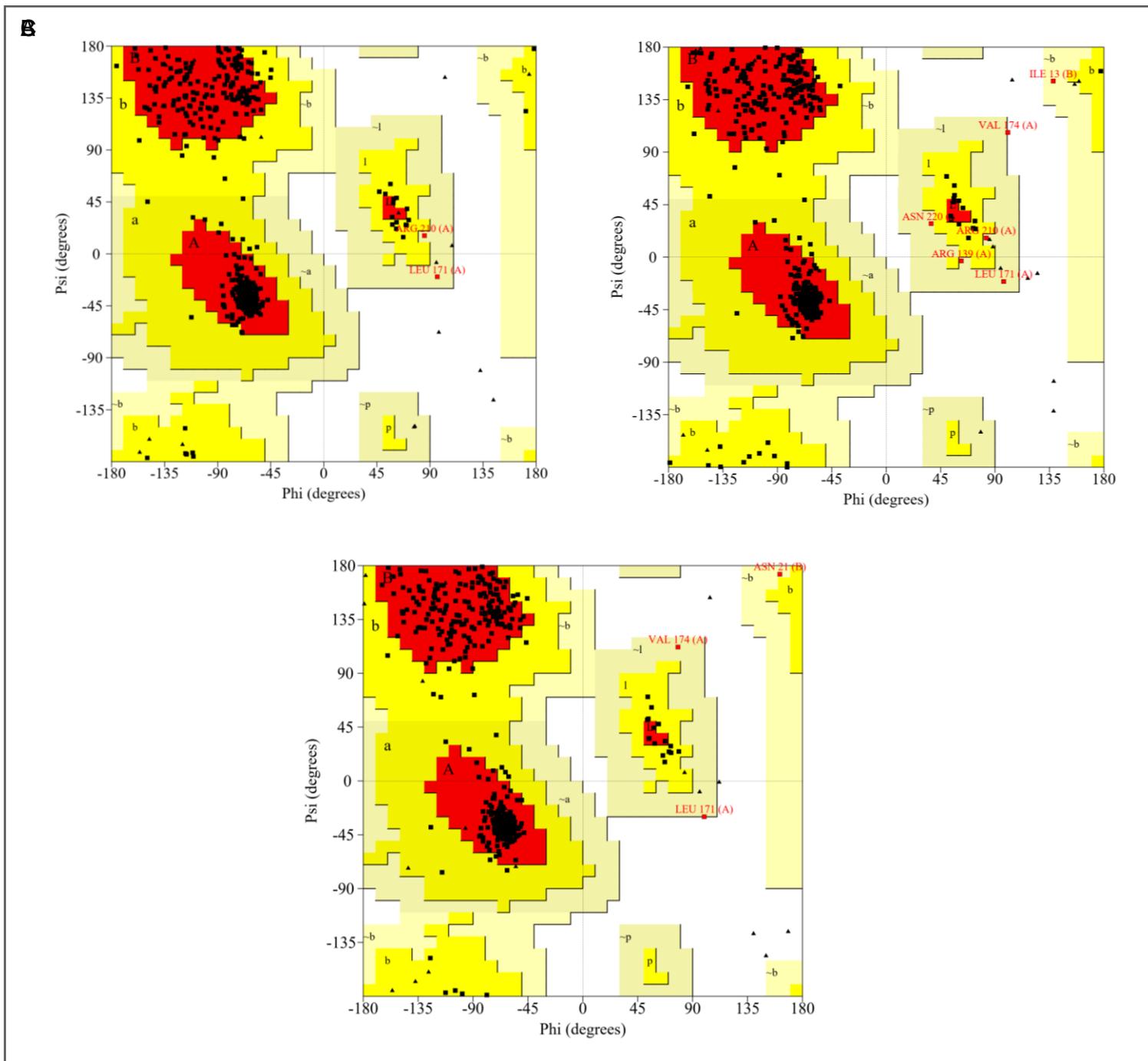


Figura 10. Gráfico Ramachandran de modelos escogidos.

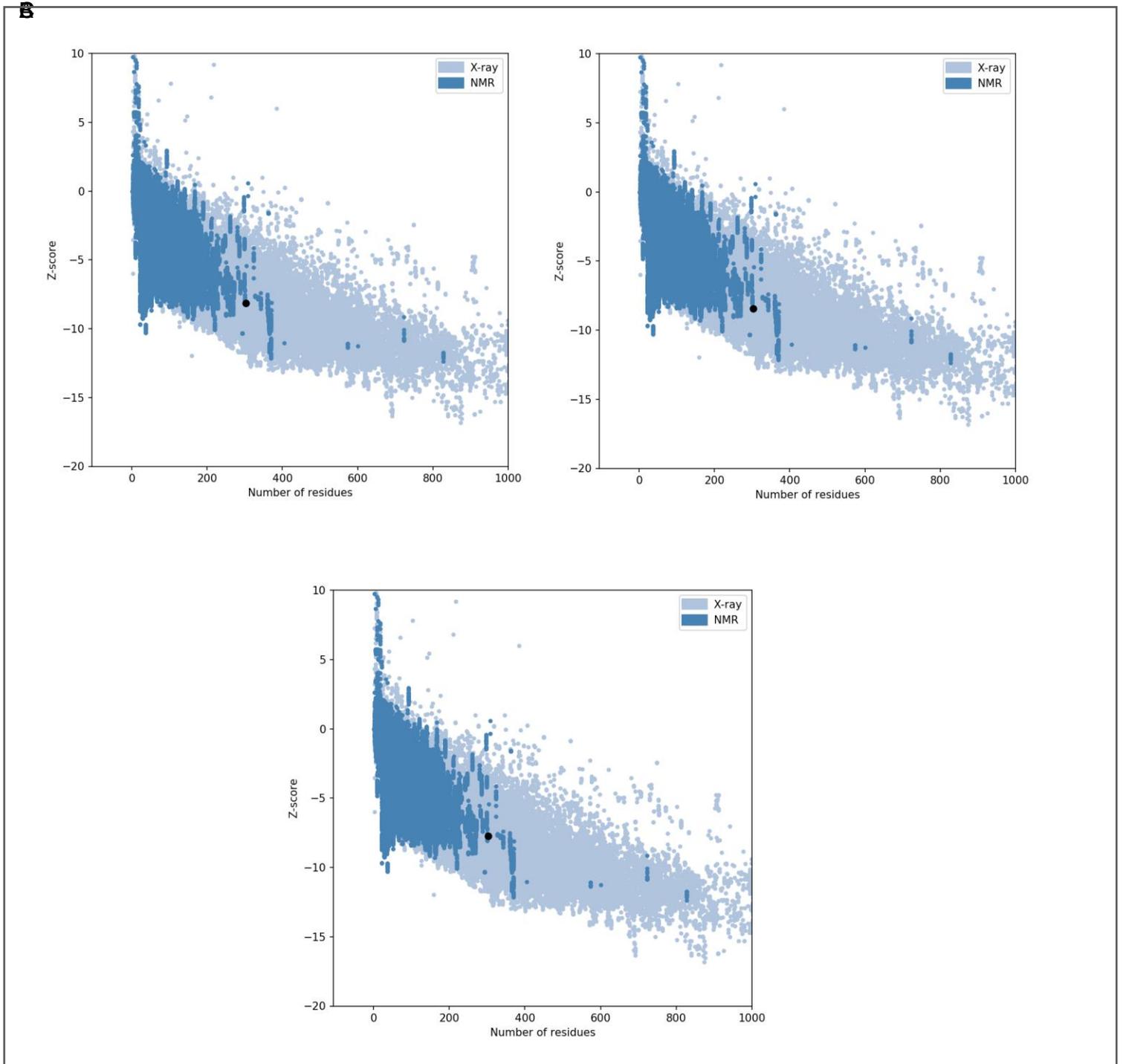


Figura 11. Gráficos de Z- score global para modelo 1 (A), modelo 2(B) y modelo 3(C).

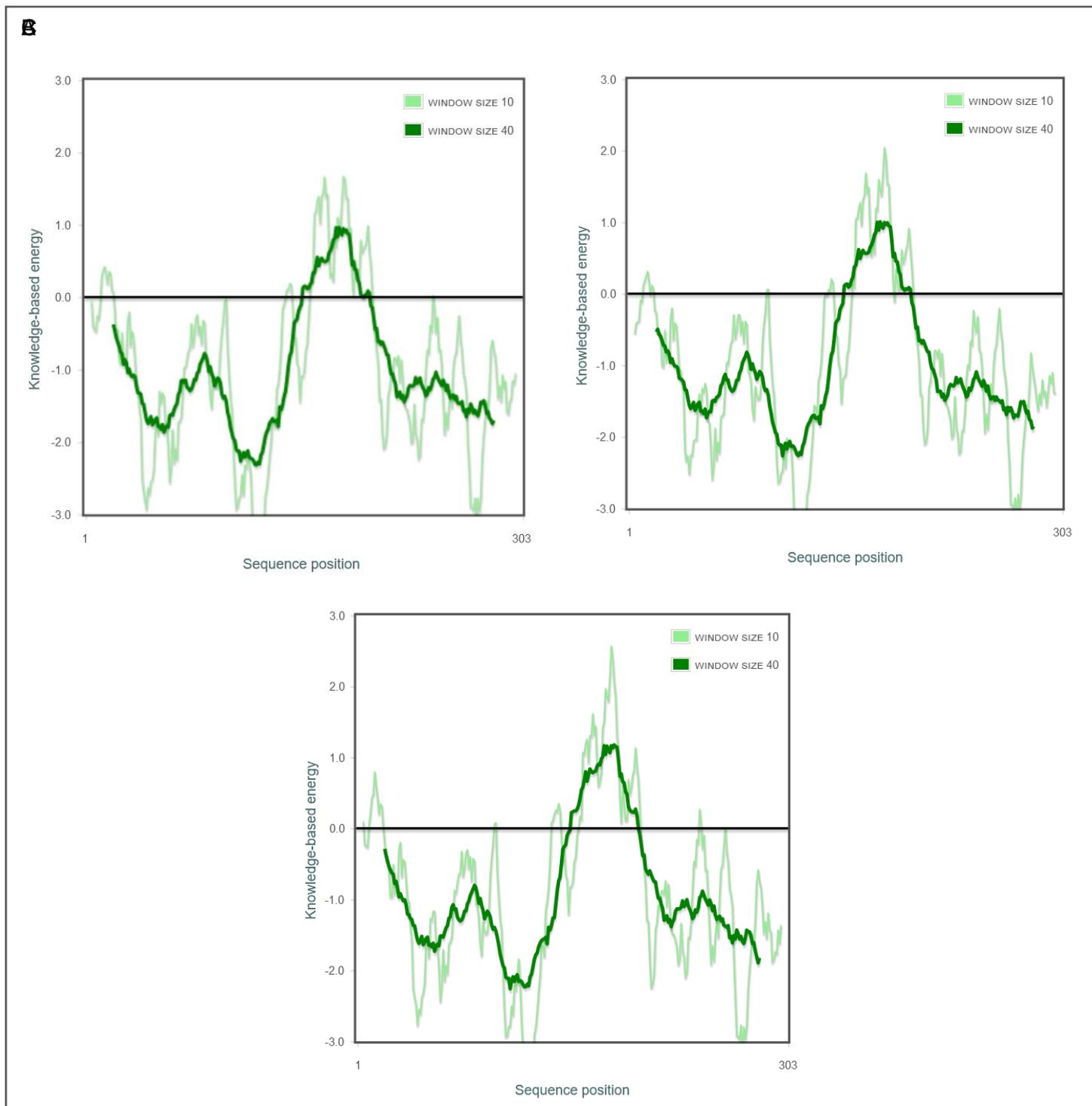


Figura 12. Perfil de energías por residuos de los modelos 1(A), modelo 2(B) y modelo 3(C)

5.4 Dinámicas Moleculares:

Luego de finalizadas las DMs, se realizaron diversos análisis con el objetivo de comprobar la estabilidad obtenida en los modelos. Además, se evaluó si las condiciones estructurales esperadas se cumplieron, tales como que se mantengan las distancias entre los aminoácidos de interés para la viabilidad de la reacción de transferencia de fosfato al sustrato Rb catalizada por la CDK4-CiclinaD, y la coordinación del cofactor magnesio en el sitio activo.

Como se mencionó anteriormente, se realizaron DMs de los 3 modelos seleccionados obtenidos desde el modelado por homología, bajo 3 condiciones diferentes: 'Libre', 'Restricción 1' (restricción de distancia entre 'P γ -ATP' y 'O γ -Ser780') y 'Restricción 2' (restricción de distancia entre 'O γ -Ser780' y 'Od2-Asp140') para cada modelo, resultando en un total de 9 simulaciones. En cada caso, se realizó un análisis de RMSD ('Root Mean Square Deviation') para los 3 modelos en las 3 condiciones a lo largo de toda la simulación para evaluar la estabilidad de las proteínas. En las Figura 13, Figura 14 y Figura 15 se muestra el RMSD de los modelos 1, 2 y 3, respectivamente, en las 3 condiciones de DMs usadas: Libre (celeste), Restricción 1 (rojo) y Restricción 2 (verde).

En la Figura 13, se puede observar que el Modelo 1 llegó a un estado estacionario de forma rápida, pero siendo el Modelo 1-Libre el que mayores variaciones en el tiempo presenta, aunque se mantiene dentro de un margen de estabilidad de aproximadamente 1Å. Es de notar también que el Modelo 1 evaluado con la Restricción 1 (Figura 13) posee una mayor estabilidad en el tiempo que en las otras dos condiciones. En cuanto al Modelo 2 (Figura 14), en las 3 condiciones se observa una variación mayor en los valores de RMSD dentro de los primeros 100 nanosegundos de la simulación, notándose con un RMSD menos estable que el Modelo 1 (Figura 13). El Modelo 3 (Figura 15) muestra un RMSD similar al Modelo 1, donde en la condición sin restricción tiende a aumentar paulatinamente el valor del RMSD, superando los 5Å, mientras que en las dos condiciones de Restricción se estabilizan a lo largo de la dinámica, siendo la condición de restricción 2 la que mantiene un RMSD más equilibrado en el tiempo.

En resumen, estos resultados indicaron que el Modelo 1 (Figura 13) mostró ser el más estable en las condiciones de las simulaciones realizadas, debido a que se presenta un comportamiento más estable en las 3 condiciones, sobre todo con el Restricción 1, donde alcanza un estado estacionario durante los primeros 20ns de la dinámica.

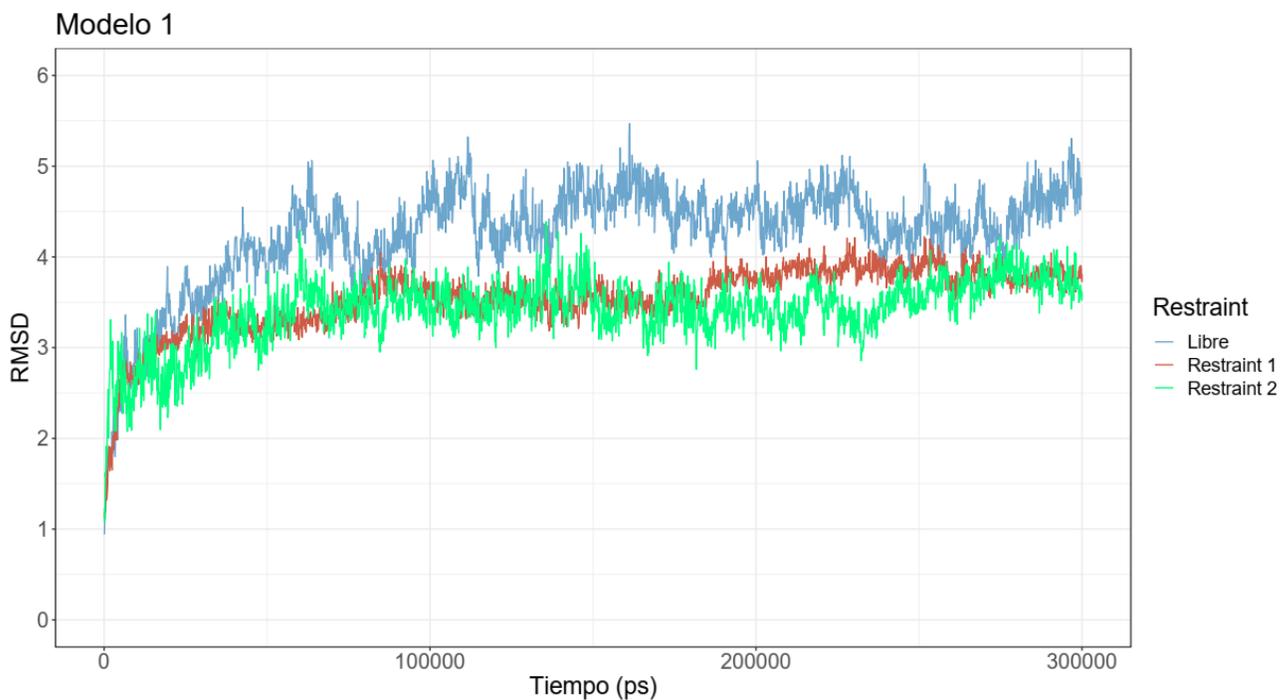


Figura 13. RMSD modelo 1 para las tres condiciones evaluadas, libre (azul), restricción 1 (rojo) y restricción 2 (verde).

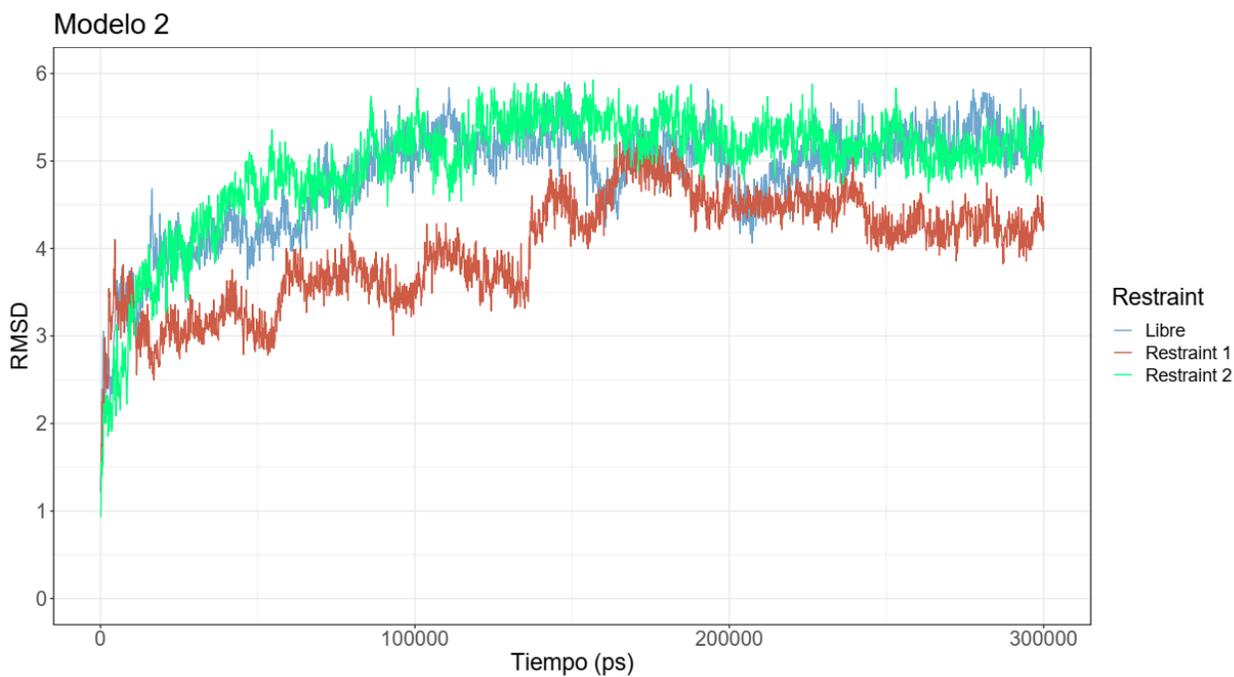


Figura 14. RMSD correspondiente al modelo 2 en sus 3 condiciones, libre (azul), restricción 1 (rojo) y restricción 2 (verde).

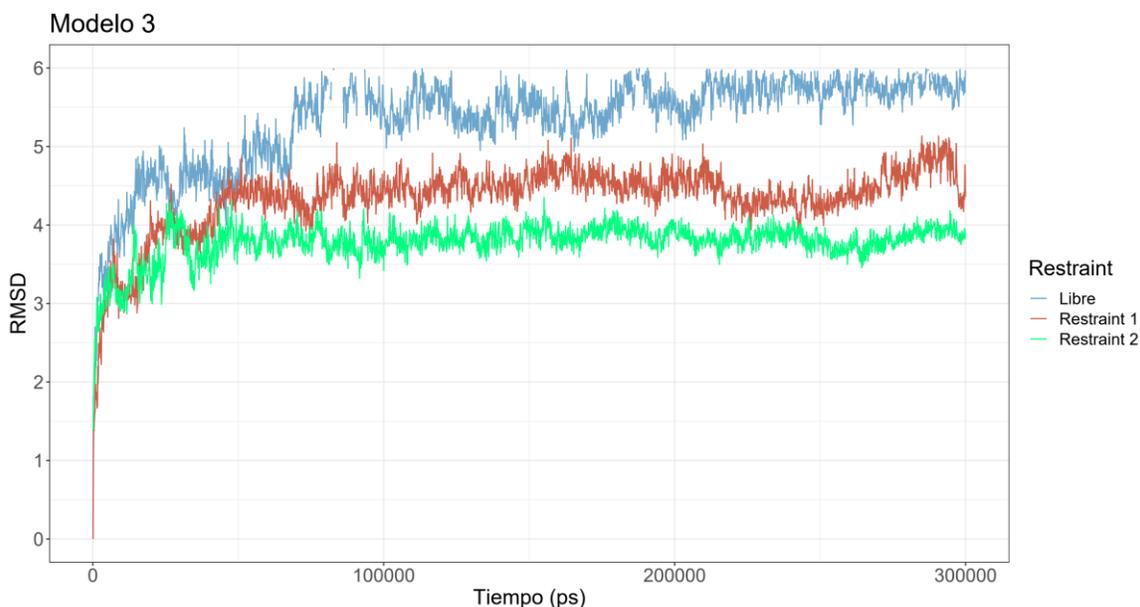


Figura 15. RMSD correspondiente al modelo 3 en sus tres condiciones de restricción, libre (azul), restricción 1 (rojo) y restricción 2 (verde).

Como siguiente análisis, se evaluaron los valores de las distancias 1 y 2, las cuales se agruparon por modelos en gráficos respecto al tipo de condición de DM (libre, restricción 1 y restricción 2). En la Figura 16 se observa la distancia 1 en los modelos 1 (azul), 2 (rojo) y 3 (verde), sin restricción en la etapa de producción, y en la Figura 17, la distancia 2 sin restricciones en producción, utilizando el mismo esquema de colores.

Tanto en la Figura 16 como en la Figura 17, se puede observar que las distancias que se muestran con mayor estabilidad en el tiempo son las correspondientes al Modelo 1 (marcada en color azul para ambas gráficas de distancias), mientras que en los Modelos 2 y 3 las distancias 1 y 2 aumentan (principalmente el Modelo 2) al inicio de las DMs. Indicando así que las interacciones entre los átomos de las distancias 1 y 2 no se mantienen estables con los residuos de interés en los Modelos 2 y 3, llegando a alejarse más de 10\AA . A pesar de este aumento en las distancias, el péptido no se aleja hacia el solvente, sino que se mantiene anclado a la CDK4 por medio de otras interacciones intermoleculares.

El valor de referencia de la distancia 1 (ATP-P γ --- O γ -Ser780) en el Modelo 1 es alrededor de 4\AA , el cual se mantiene en valores cercanos al de referencia durante aproximadamente 250ns de un total de 300ns de tiempo de simulación, disminuyendo hasta 3.3\AA por 20ns (hasta 270ns). Mientras tanto, en la gráfica que representa la distancia 2 (Ser780-O γ --- Od2-Asp140) (Figura 17), se puede observar que su estabilidad, con valores cercanos a 4.3\AA , se mantiene hasta los 250ns para luego alejarse.

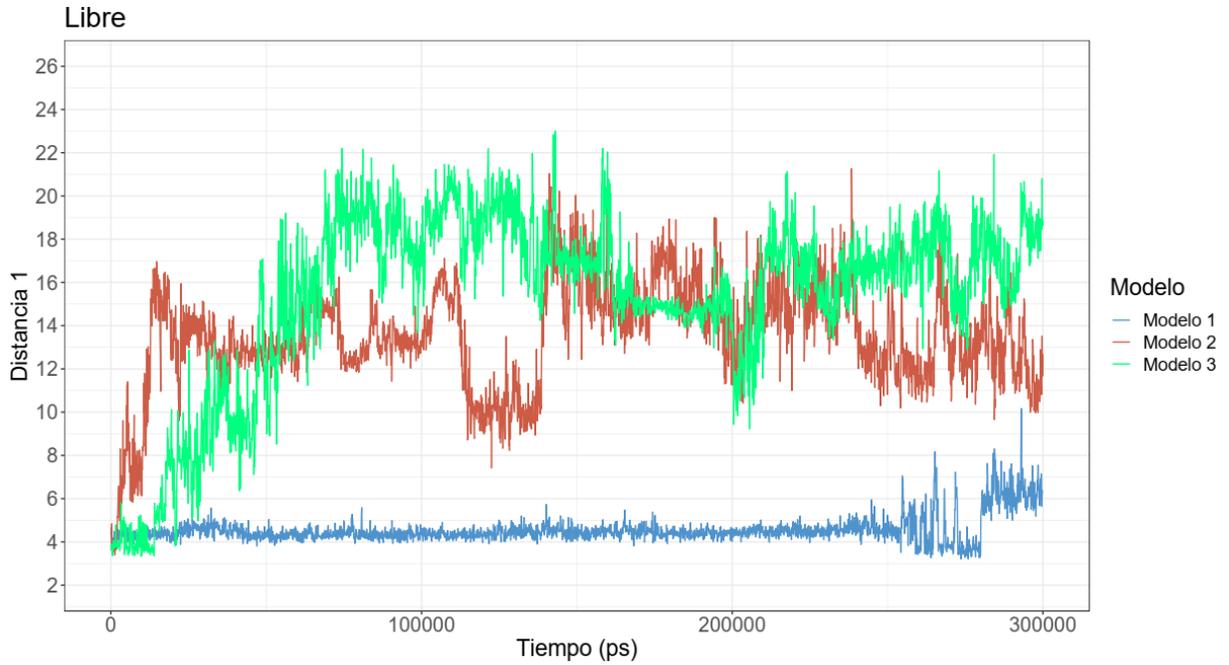


Figura 16. Distancia 1 sin restricción en el tiempo de dinámica. La línea en color azul representa al Modelo 1. La línea en color rojo representa al Modelo 2. Línea verde representa al Modelo 3.

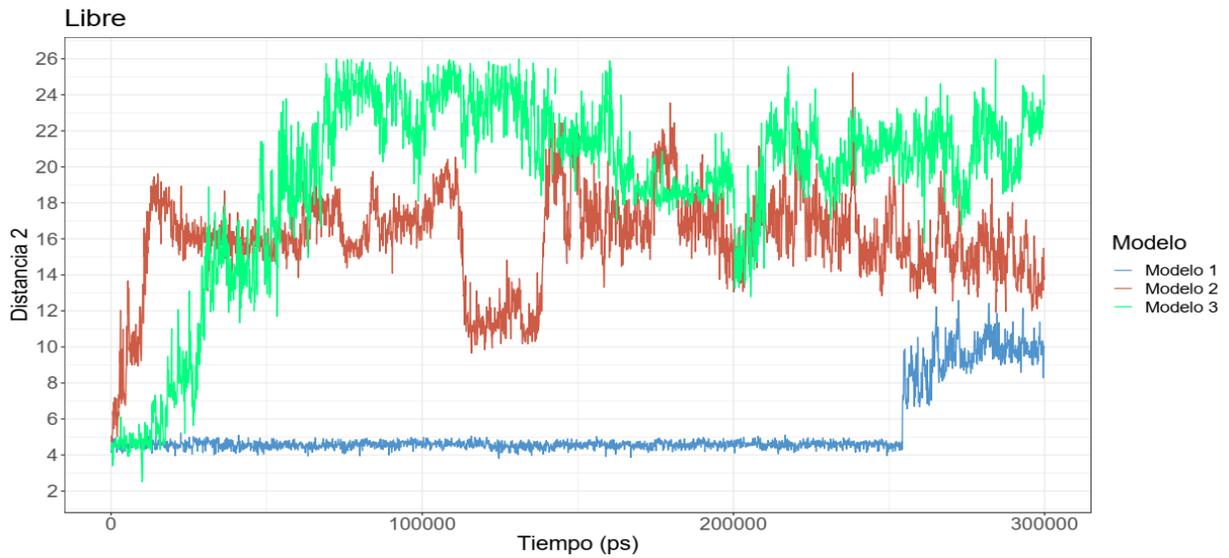


Figura 17. Distancia 2 sin restricción en el tiempo de dinámica. La línea en color azul representa al Modelo 1. La línea en color rojo representa al Modelo 2. Línea verde representa al Modelo 3.

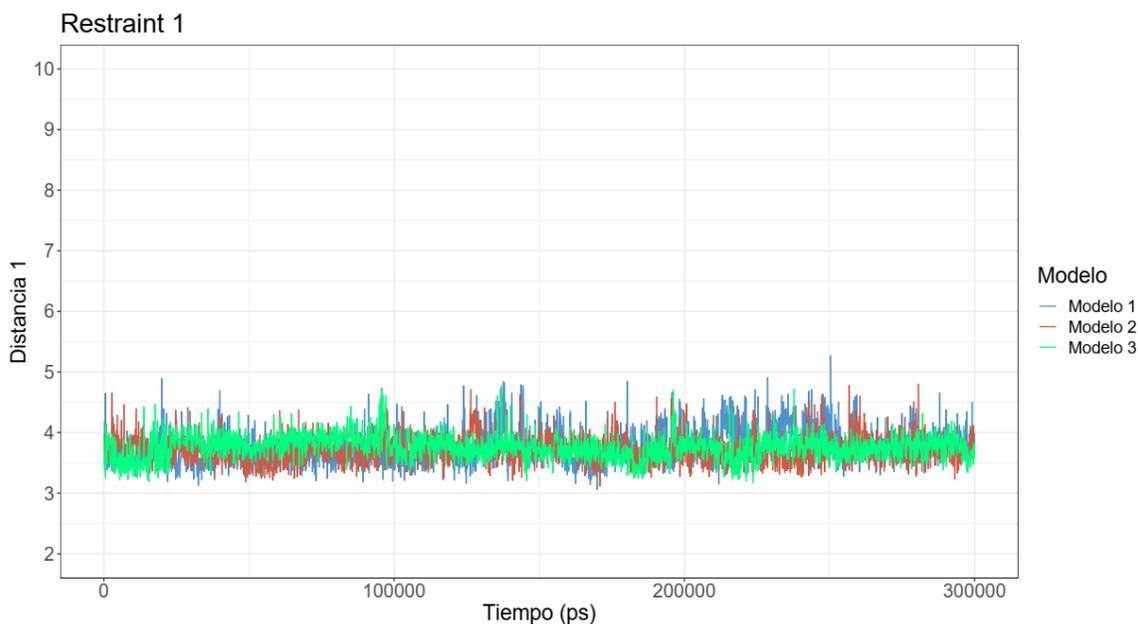


Figura 18. Distancia 1 con restricción 1 en el tiempo de dinámica. La línea en color azul representa al Modelo 1. La línea en color rojo representa al Modelo 2. Línea verde representa al Modelo 3

Por otro lado, para los modelos 2 y 3 se puede observar que las distancias aumentan durante los primeros nanosegundos de simulación. En la distancia 2 particularmente, el modelo 3 no logra mantenerse estable debido a que los átomos implicados en la reacción de transferencia de fosfato (ATP-P γ ---O γ -Ser780 y Ser780-O γ --- Od2-Asp140) se alejan llegando a distanciarse 26Å generando una condición no óptima para la catálisis. Sin embargo, el péptido sustrato Rb se mantiene anclado a la superficie de la proteína estableciendo interacciones intermoleculares entre las superficies de ambas estructuras (véase *Material Suplementario 4*). Esto hace inferir que en este modelo de forma libre no se logra coordinar el sitio reactivo de forma favorable. En cuanto al modelo 2, en ambas situaciones se puede observar que al iniciar la simulación las distancias aumentan rápidamente debido a la inestabilidad del modelo, haciendo que el modelo no represente un complejo reactivo.

En cuanto al análisis de las distancias con restricciones, en la Figura 18 muestra que las distancias se conservaron dentro de los valores esperados durante la duración de toda la DM, esto debido a que se está forzando al sistema para mantener los valores de cercanía entre los átomos ATP-P γ ---O γ -Ser780. Mientras que el resto de las gráficas con restricciones también muestran un comportamiento esperado. Estas se encuentran en *Material Suplementario (Véase Material Suplementario 2)*.

Se realizó también un análisis de RMSF (Figura 19 - Figura 27) de cada modelo por cadena, evaluando en cada cadena las diferentes condiciones ('Libre', 'Restricción 1', 'Restricción

2'). En estos resultados se pueden observar los sectores de residuos con mayor movimiento, así también evaluar en que condición poseen una mayor variación posicional. Cabe destacar que los valores de RMSF siempre serán altos en los residuos extremos debido a que dichos extremos se encuentran libres en el solvente y son generalmente estructuras tipo lazo.

Para el Modelo 1, en su cadena A los valores de RMSF son aceptables (considerando un valor aceptable de alrededor de $1\text{\AA}\pm 0.5$), indicando además que en regiones cercanas a los residuos de anclaje del péptido de Rb y del sitio activo (Figura 19) existe estabilidad en el posicionamiento de los residuos. Entre los residuos 201-250 se pueden notar varios peaks consecutivos donde el valor del RMSF aumenta, siendo además la condición Libre la que posee mayor variación estructural en esta región.

Al observar la cadena B (Figura 20) correspondiente a la Ciclina-D, la mayor parte del RMSF es bajo, lo cual indicaría que la cantidad de movimiento de los residuos es poco, entendiéndose así que la cadena se encuentra en equilibrio. En la cadena C (Figura 21) se observa que el péptido Rb mantiene un bajo RMSF en el residuo 780 en todas las condiciones, este residuo es parte importante de la reacción de transferencia de fosfato.

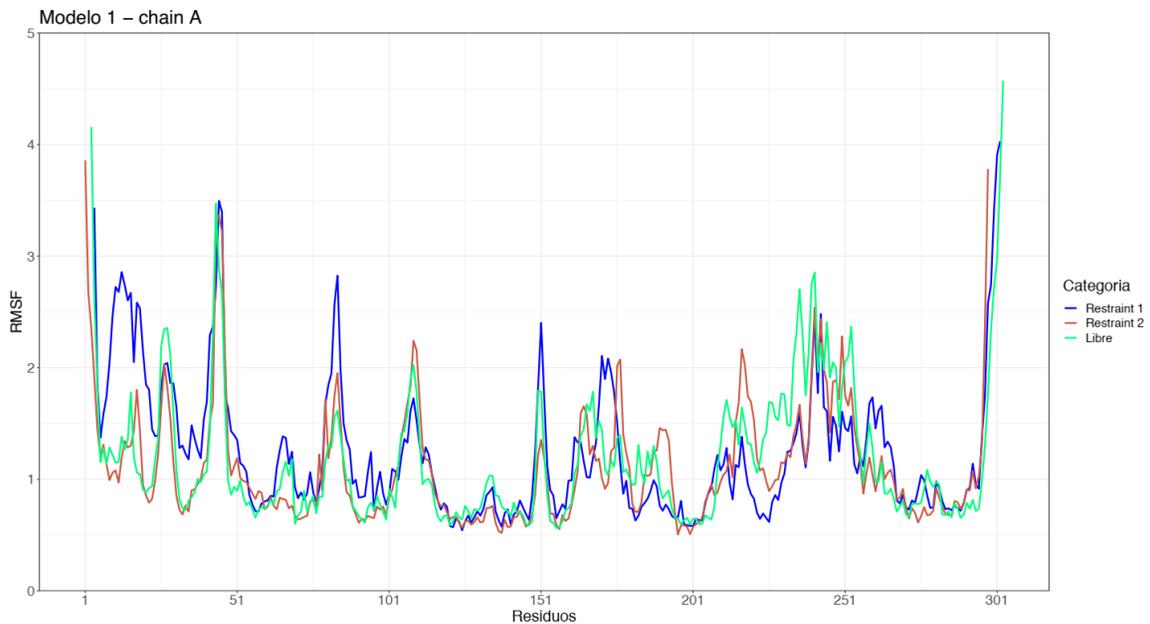


Figura 19. RMSF de la cadena A (CDK4) del modelo 1, en sus 3 condiciones de restricción. En azul se muestra la Restricción 1, en rojo el Restricción 2 y en verde la condición libre.

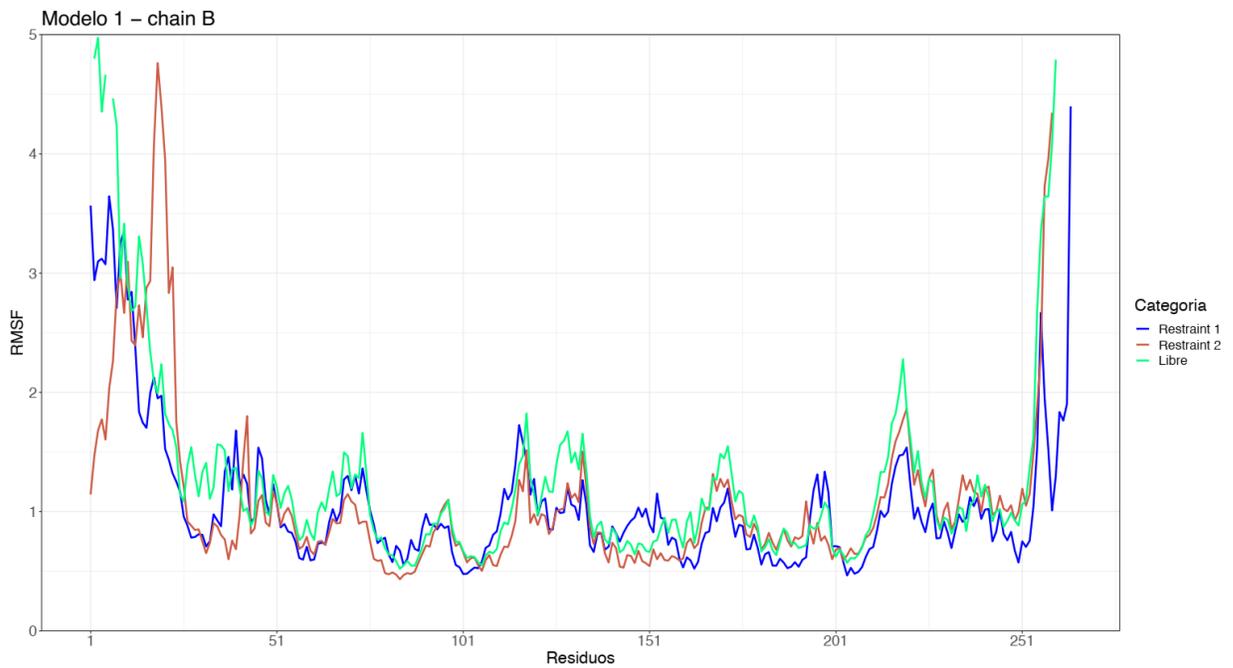


Figura 20. RMSF correspondiente a la cadena B (Ciclina-D) del modelo 1 en las 3 condiciones de restricción. En azul se muestra la Restricción 1, en rojo la Restricción 2 y en verde la condición libre.

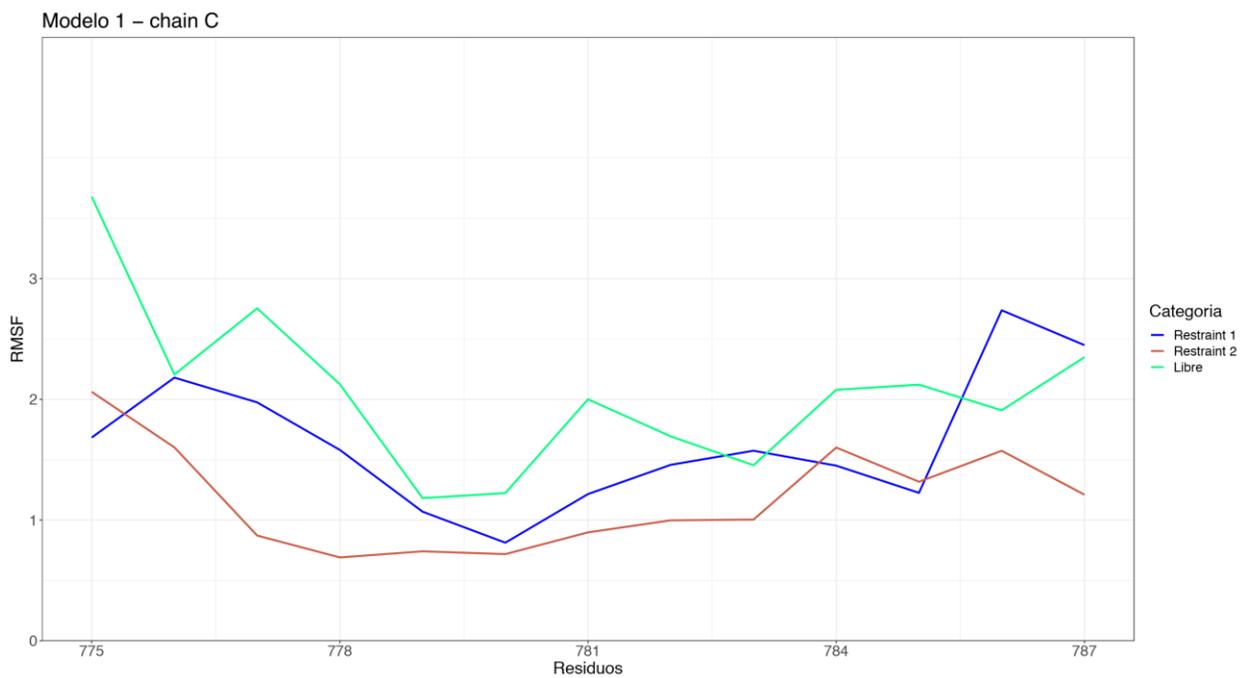


Figura 21. RMSF correspondiente a la cadena C (péptido de Rb) del modelo 1 en las 3 condiciones de restricción. En azul se muestra la Restricción 1, en rojo la Restricción 2 y en verde la condición libre.

Al evaluar la cadena A del modelo 2 (Figura 22) se puede observar que en la condición Libre el RMSF es más bajo que en las otras dos condiciones evaluadas, siendo la condición de Restraint 2 la que tiene mayor RMSF. Considerando esto, las 3 condiciones mantienen valores generales de RMSF de entre $0.5 - 1.5 \text{ \AA}$, lo que son valores aceptables al inferirse que existe una baja variabilidad posicional entre los residuos. En la cadena B del Modelo 2 (Figura 23) se observan valores de RMSF menores en la condición Libre respecto al resto de condiciones. Observando la cadena C del Modelo 2 (Figura 24), se puede concluir que su RMSF en la condición de Restraint 1 es bastante baja y estable en todos los residuos, lo que indica que los residuos en este modelo tienen poco movimiento, mientras que en la condición de Restraint 2 y Libre, los valores son variables y altos, infiriéndose así que en la cadena C sus residuos no se encontrarían en un equilibrio apto para mantener una variabilidad posicional baja.

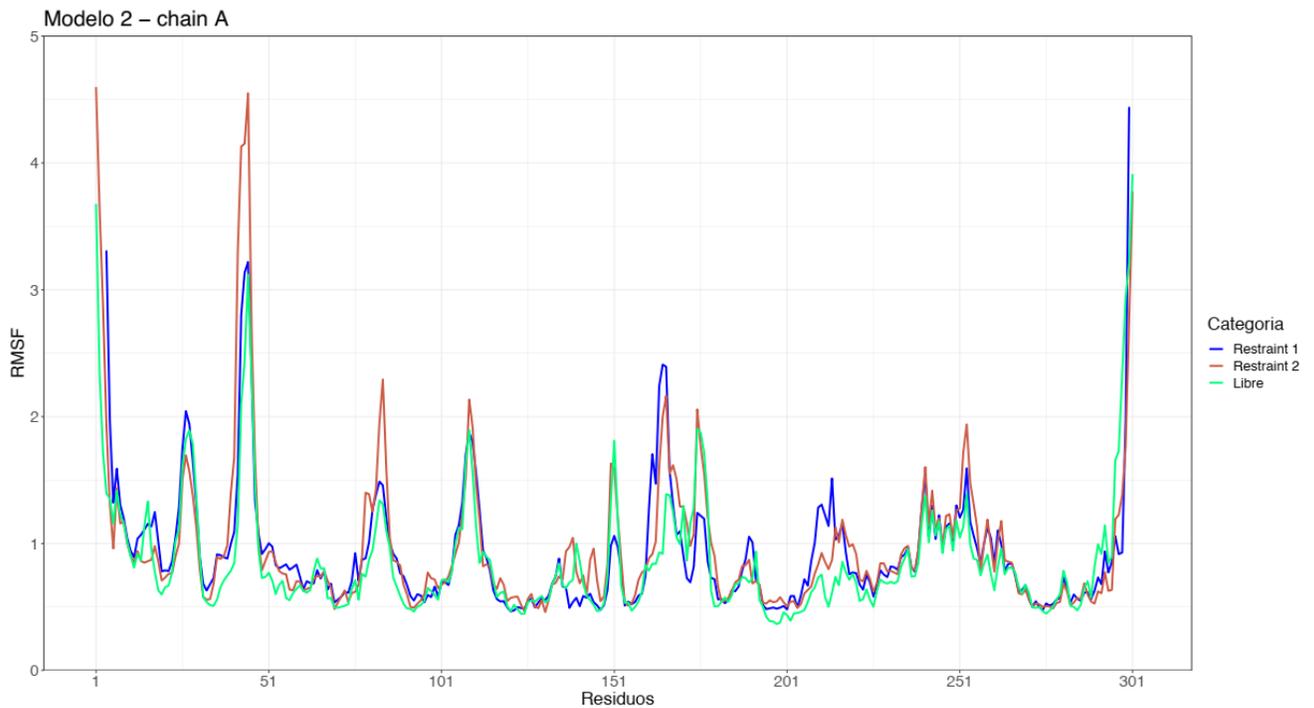


Figura 22. RMSF de la cadena A (CDK4) del modelo 2. En azul se muestra la Restricción 1, en rojo la Restricción 2 y en verde la condición libre.

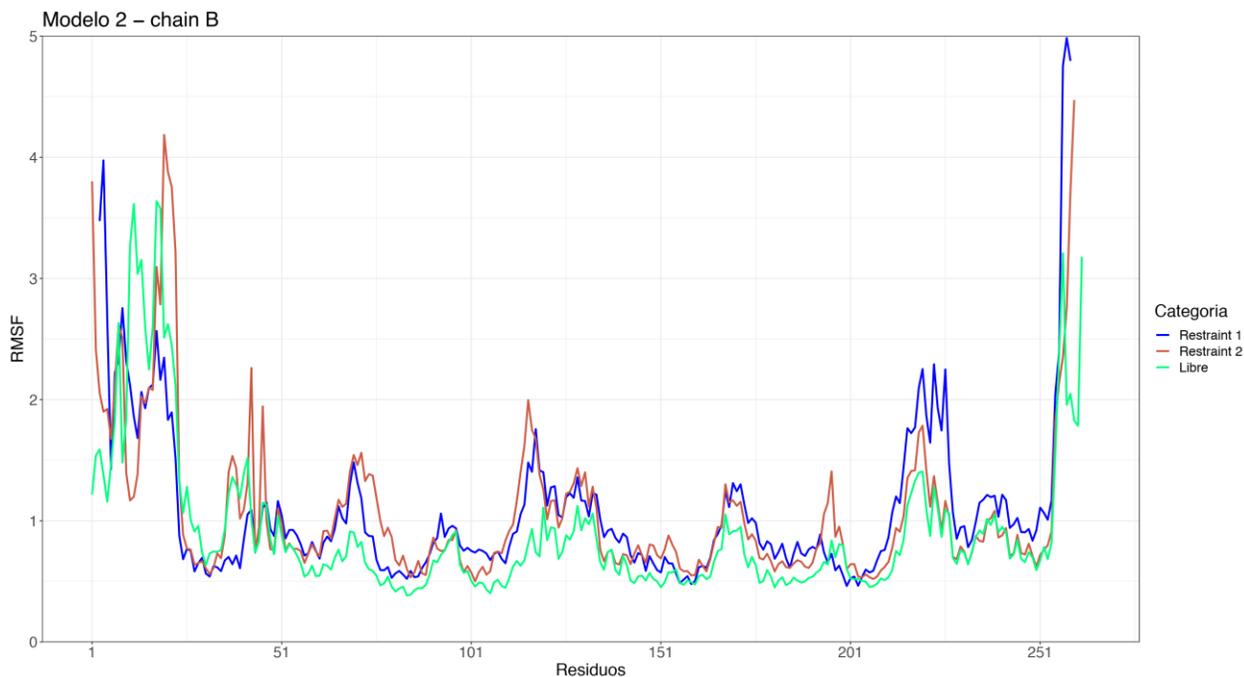


Figura 23. RMSF de la cadena B (Ciclina-D) del modelo 2. En azul se muestra la Restricción 1, en rojo la Restricción 2 y en verde la condición libre.

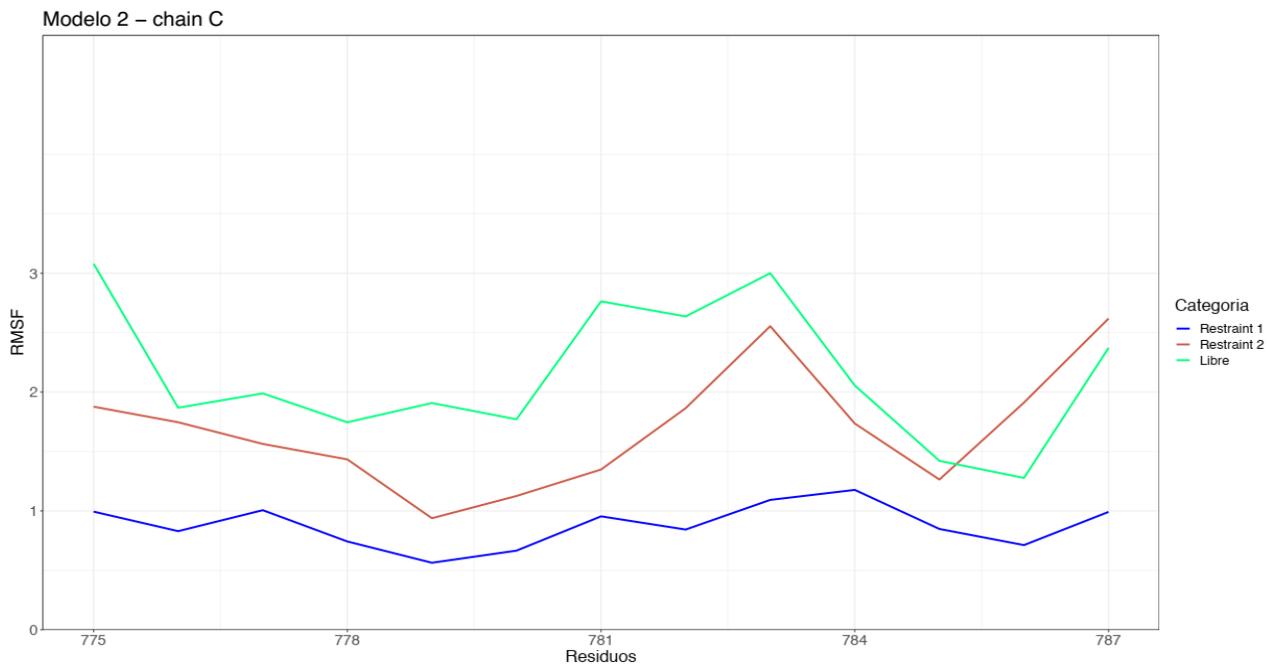


Figura 24. RMSF correspondiente a la cadena C (péptido Rb) del modelo 2. En azul se muestra la Restricción 1, en rojo la Restricción 2 y en verde la condición libre.

Al observar el Modelo 3 (Figura 25 - Figura 27) se puede apreciar que las 3 cadenas poseen mayores valores de RMSF, haciendo que en las tres condiciones (Libre, Restraint 1 y Restraint 2) se infieran menos estables que en los dos modelos anteriores. En la cadena A del Modelo 3 (Figura 25) se pueden observar picos constantes en la línea azul correspondiente al Restraint 1, seguido por la condición Libre, condición que también se nota con mucha movilidad entre sus residuos, la condición de Restraint 2 se mantiene con menor movimiento que las dos anteriores. Respecto a la cadena B del Modelo 3 (Figura 26) los residuos mantienen una mayor movilidad cuando están sometidas a los Restraint 1 y Restraint 2, sin embargo, en la condición Libre los valores del RMSF mantienen la misma tendencia que las otras dos condiciones. En la cadena C, se puede observar que los residuos en la condición Libre poseen el RMSF más alto, pero se mantiene mayormente entre los valores de 2.5 y 3.3, mientras que las condiciones de Restraint 1 y Restraint 2 se establecen entre 1.5 y 2.5. Al comparar las cadenas C de los Modelos 1 y 2, con la del Modelo 3, se aprecia que en el Modelo 3 existe una menor estabilidad al poseer valores más altos, indicando que los residuos poseen movimiento, el cual puede no ser favorable.

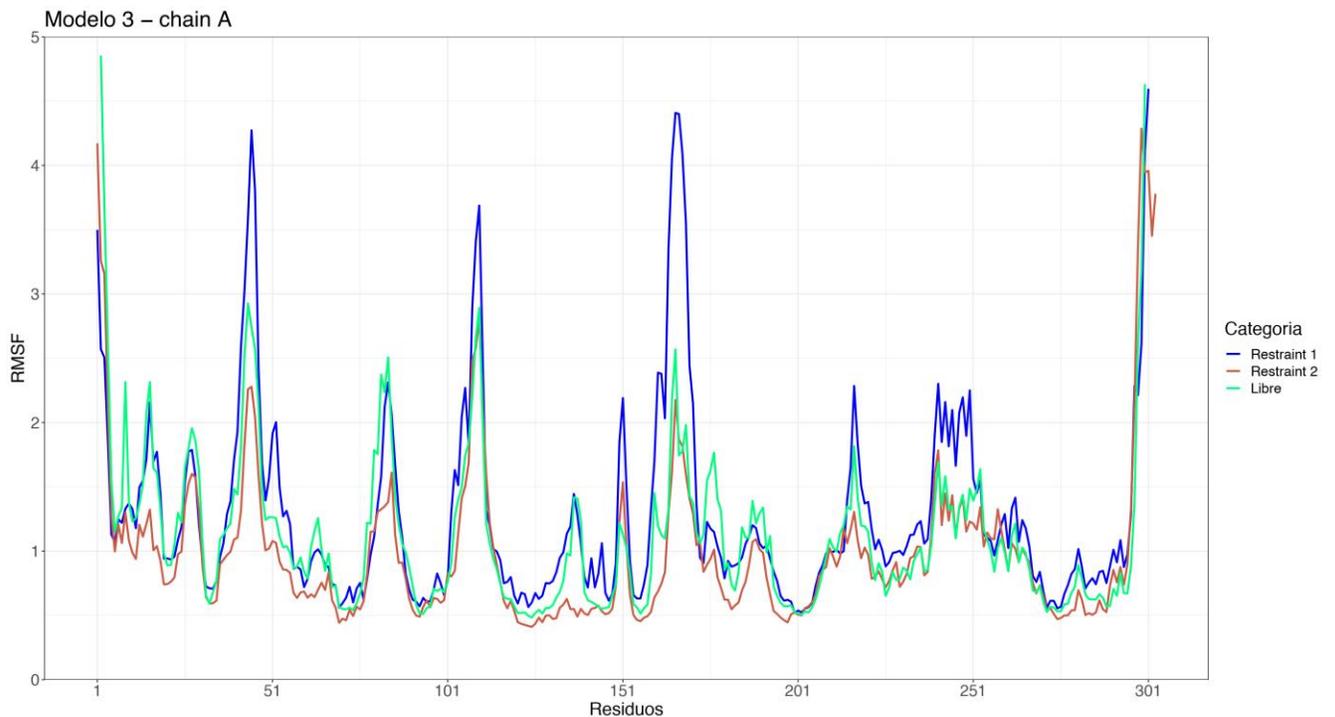


Figura 25. RMSF correspondiente a la cadena A (CDK4) del Modelo 3. En azul se muestra la Restricción 1, en rojo la Restricción 2 y en verde la condición libre.

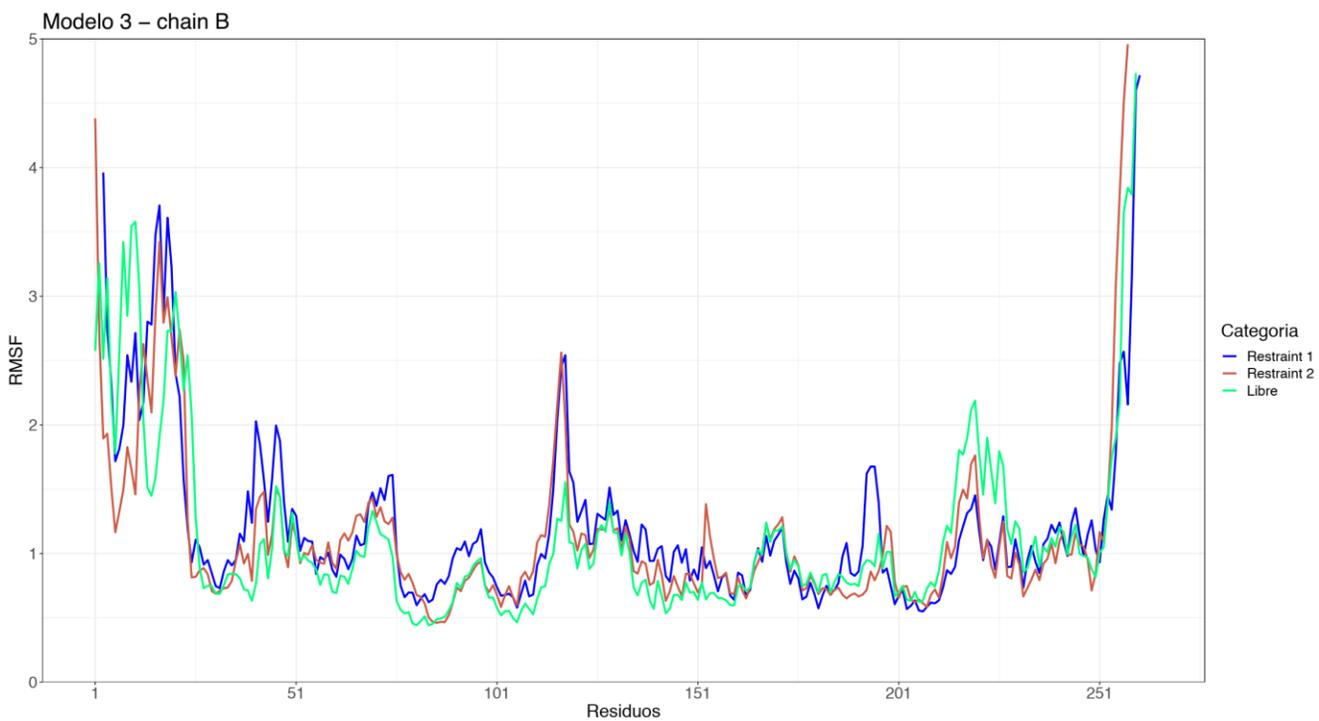


Figura 26. RMSF cadena B (Ciclina-D) del Modelo 3. En azul se muestra la Restricción 1, en rojo la Restricción 2 y en verde la condición libre

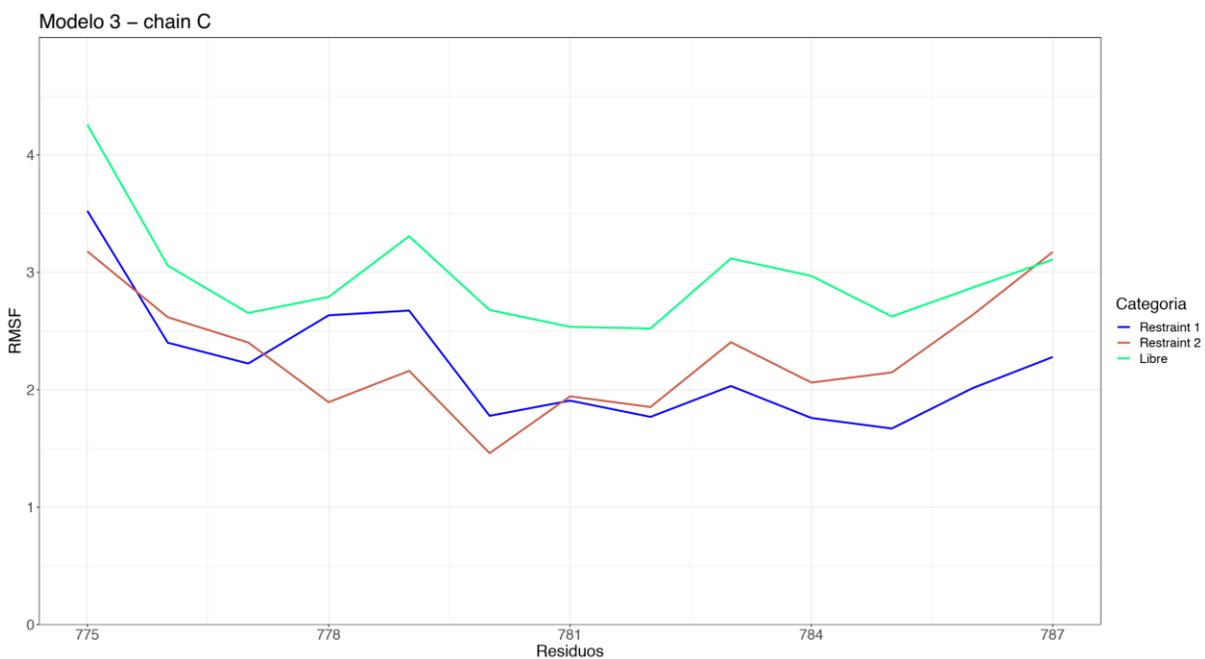


Figura 27. RMSF de la cadena C del Modelo 3. En azul se muestra la Restricción 1, en rojo la Restricción 2 y en verde la condición libre

Mediante el análisis de RMSF es posible establecer que el Modelo 3 posee los valores más altos, lo que puede indicar que los residuos de este modelo no se encuentran en una conformación adecuada, generando mayor movimiento y haciendo que el modelo no se comporte de forma estable. Con respecto a los Modelos 1 y 2, en cuanto a la cadena A se puede concluir que el Modelo 1 posee de forma general mayor cantidad de movimiento en el sector de los residuos 201-251, pero en cuanto a la cadena C, es observable que el residuo 780 (serina que interactúa directamente con el ATP para la reacción catalítica) mantiene un bajo valor de movimiento, por lo que se infiere que el Modelo 1 se mantiene con mayor estabilidad que el Modelo 2.

Otra métrica que se utilizó para evaluar la afinidad del péptido Rb con el complejo CDK4/Ciclina-D corresponde al área de superficie de contacto (CSA, por sus siglas en inglés '*Contact Surface area*'). El CSA entre dos átomos A y B se define como el área de una esfera cuyo centro es el centro del átomo A y cuyo radio es igual a la suma de los radios de Van der Waals del átomo A y una molécula de solvente⁵². Esta área consta de los puntos donde una molécula de solvente, si se ubica ahí, se superpondría con la esfera de Van der Waals del átomo B, si una molécula de solvente no se puede colocar en algún punto en particular porque penetrará varios átomos vecinos, se estipula que este punto pertenece al área de contacto del átomo A y el más cercano de los átomos vecinos⁵³. Las áreas de CSA se pueden estimar mediante cálculos de las diferencias en las áreas de superficie accesibles por solvente (SASA)⁵⁴. Así, luego del análisis anterior, se procedió a calcular el porcentaje del área de contacto con la herramienta *Contact Surface analyzer*⁴⁸, el cual consiste en un script desarrollado en Python para obtener el cálculo del CSA entre dos estructuras. En el caso de este estudio, fue utilizado entre proteína-péptido en trayectorias de DMs, dando a conocer el porcentaje del péptido (Rb) que se encuentra en contacto con la proteína (CDK4). Este análisis se hizo para todos los modelos, y se agrupó según la presencia y tipo restricción (Figura 28, Figura 29, Figura 30).

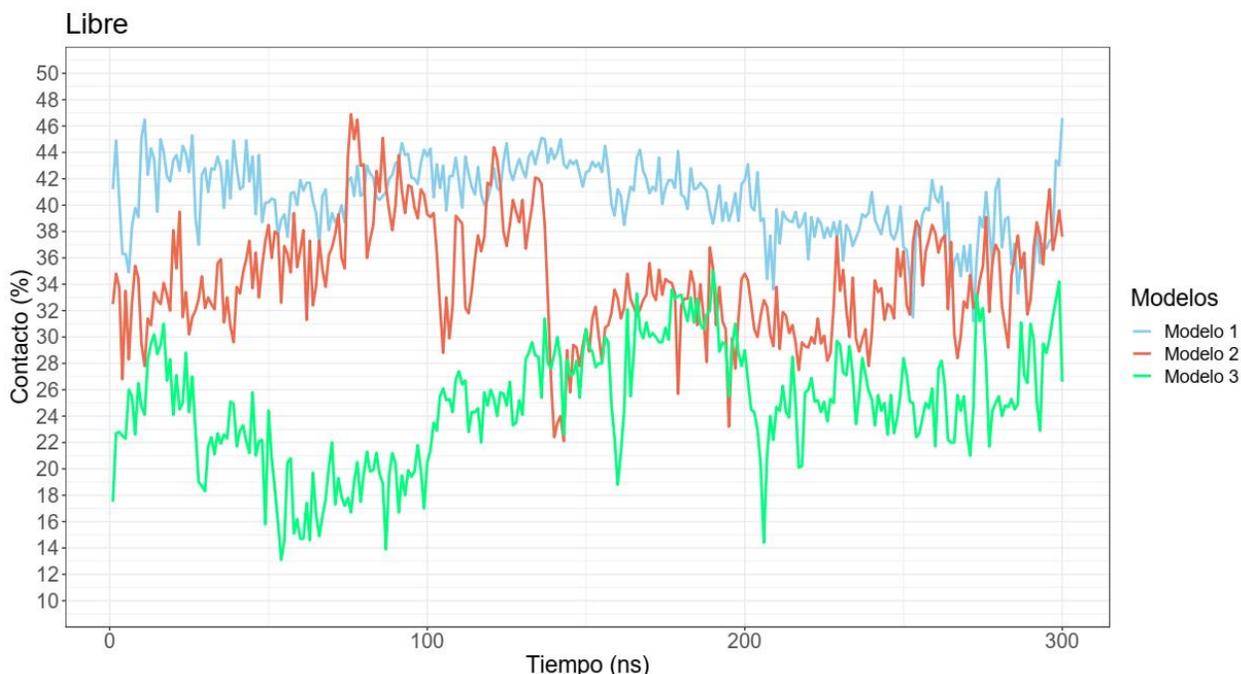


Figura 28. Porcentaje de superficie de contacto sin restricción representado para los modelos 1(azul), modelo 2 (rojo) y modelo 3(verde).

En la Figura 28, se representa el porcentaje de la superficie de contacto en las simulaciones sin restricción (Libre) en etapa de producción. En esta gráfica se puede observar que el modelo que mayor porcentaje de contacto posee es el Modelo 1, representado en color azul, mientras que el modelo 2 (en rojo), a pesar de mantener un porcentaje relativamente alto se muestra con variaciones bruscas, lo que indica que no es totalmente estable. Esto se puede deber a que el péptido de Rb pierde contacto con el ATP y el residuo Asp140 de la CDK4, siendo estos puntos de anclaje del péptido importantes para que se genere una conformación adecuada para una catálisis enzimática. En cuanto al modelo 3 (en verde), su porcentaje de contacto es bajo, manteniéndose la mayor parte del tiempo de simulación bajo el 30% de contacto.

Al observar la Figura 29, correspondiente al porcentaje de contacto entre proteína péptido bajo la condición de Restraint 1, el Modelo 1 inicia con un 32% de contacto y durante la dinámica aumenta el porcentaje de manera paulatina. El Modelo 2 inicia también con un 32% de contacto, aumentando durante la dinámica hasta casi 50%, por lo que el Modelo 2 posee mayor porcentaje de superficie de contacto que el Modelo 1. En cuanto al Modelo 3 se mantiene con un menor porcentaje de superficie de contacto que el Modelo 1 y el Modelo 2, así también al realizar una comparación con la Figura 28, se puede notar que el porcentaje de superficie de contacto también es bajo.

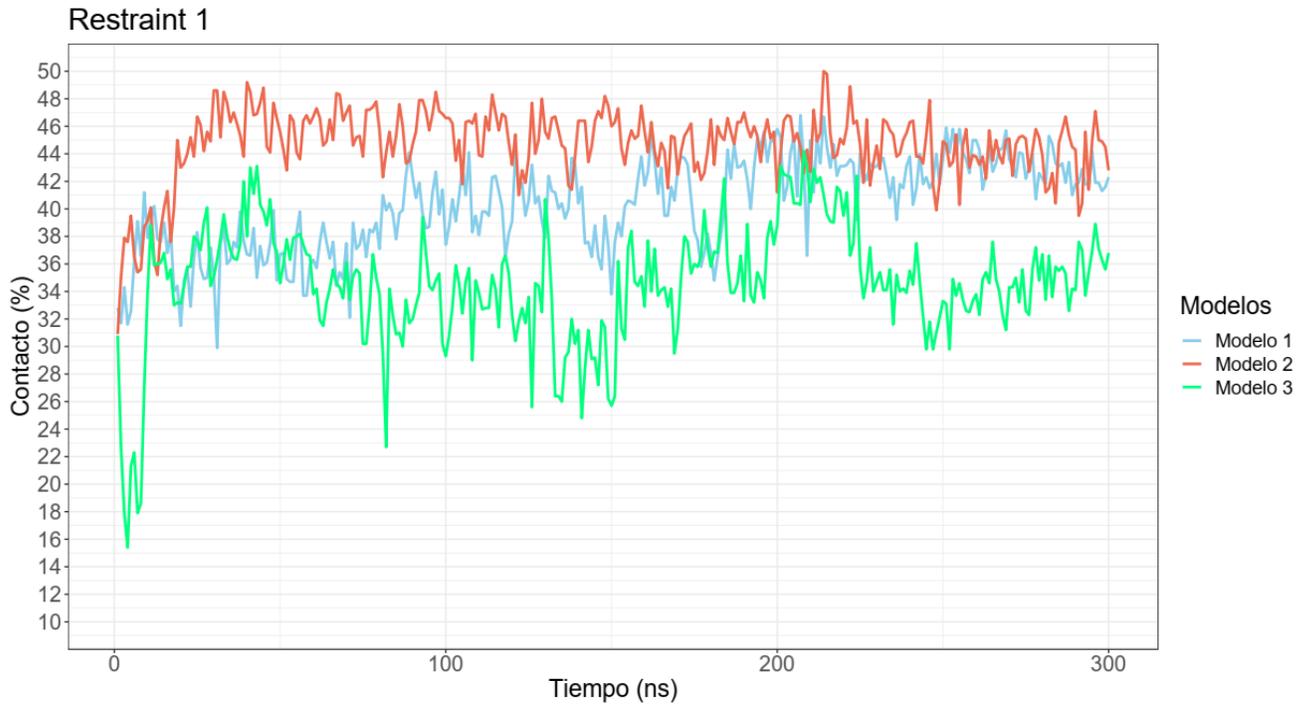


Figura 29. Porcentaje de superficie de contacto de los modelos 1(azul), 2(rojo) y 3(verde) bajo condiciones de Restraint1

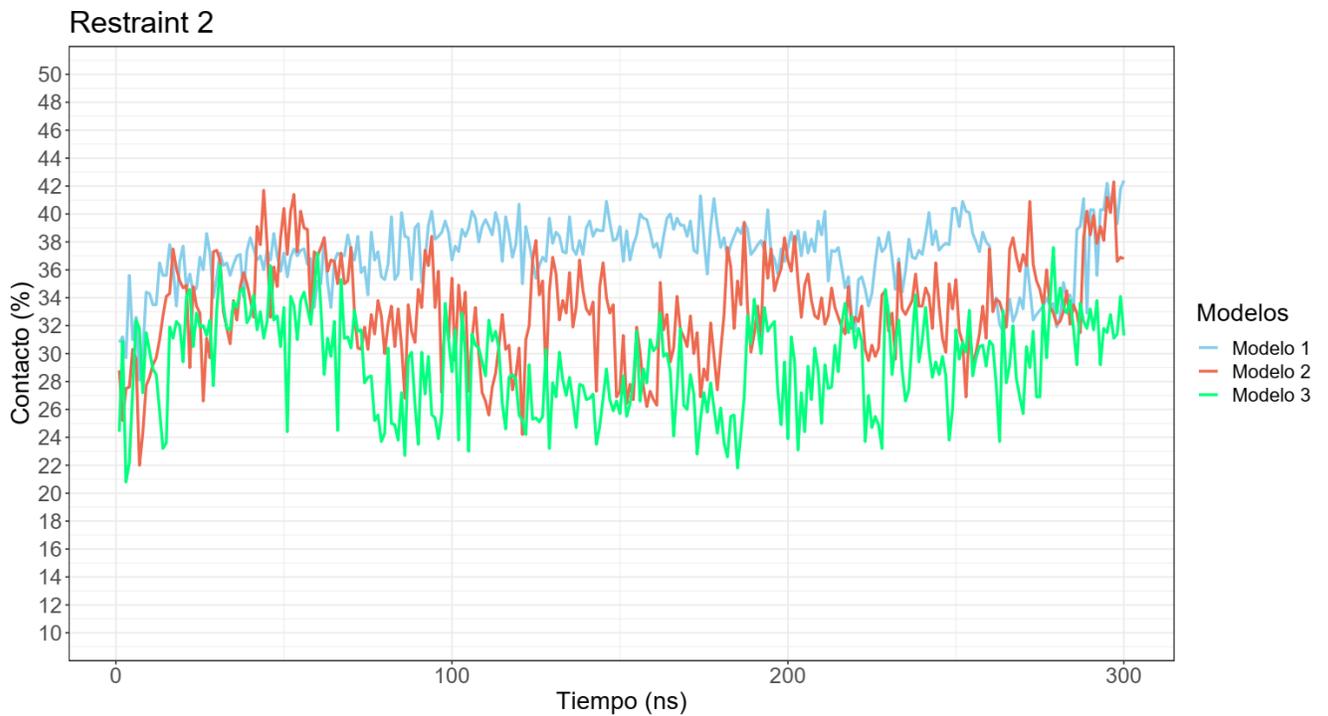


Figura 30. Porcentaje de superficie de contacto de los modelos 1(azul), 2(rojo) y 3(verde) bajo condiciones de Restraint2.

En la Figura 30, se muestra la variación de los porcentajes de superficie de contacto para los Modelo 1, Modelo 2 y Modelo 3 bajo la Restricción 2. Se puede observar que el Modelo 1 es el que se mantiene más estable con menor variación, además de ser el modelo que mantiene un porcentaje de contacto más alto con 38%. Mientras tanto, el Modelo 3 es el que mayor variación presenta en el porcentaje de CSA, sin embargo, es el modelo con menor porcentaje de contacto. Por otro lado, el Modelo 2 tiene un comportamiento intermedio, manteniendo un porcentaje variable pero relativamente alto, a diferencia del Modelo 3. En general los tres modelos en esta condición mantienen porcentajes de contacto variables entre 24% y 40%, lo cual hace que los modelos durante esta restricción sean los que presentan porcentajes de superficie de contacto menores entre proteína-péptido al comparar las 3 condiciones evaluadas.

Considerando de forma general los resultados anteriores, el CSA a lo largo de los 300ns de la dinámica nos dice que los Modelos 1 y 2 son los que presentan de forma general un mejor porcentaje de contacto entre proteína-péptido. Sin embargo, al analizar estos resultados en la condición Libre, el Modelo 1 es el que mejor muestra una estabilidad del péptido sustrato Rb en la superficie de la CDK4-CiclinaD, manteniendo en promedio un 42% de contacto. El Modelo 2 se nota estable respecto al porcentaje de contacto que muestra con la Restricción 1, alcanzando un *plateau* dentro de los primeros 20ns de la dinámica, luego, a medida que la trayectoria avanza se mantiene por sobre el 40% de contacto con la superficie.

Para ahondar más al respecto de los contactos que se podrían establecer entre la proteína y el ligando, se realizó un análisis mediante la herramienta de *Simulation Interactions Diagram (SEA)* de Desmond^{33,45}, en el cual se obtuvieron datos que muestran las interacciones entre los aminoácidos del péptido (Rb) y los aminoácidos de la proteína a lo largo de la simulación. Estas interacciones son clasificadas en 4 tipos (paréntesis indican su nombre en las figuras resultantes): enlaces de hidrogeno (*HBond*), hidrofóbicos (*Hydrophobic*), Iónicos (*Ionic*) y puentes de agua (*Water Bridges*). Para evaluar estos datos, se realizó un preprocesamiento mediante la herramienta AWK y luego se obtuvieron las gráficas con el software de análisis estadísticos R⁴⁹, realizando una normalización a lo largo de la trayectoria. El motivo de esto es debido a que la salida de *SEA* muestra todas las interacciones, por lo que es normal que en un determinado cuadro de la dinámica un residuo tenga más de 2 interacciones. Así, se procesó para considerar una interacción por cuadro y representarlas en formato de porcentaje. A modo de ejemplo, si un residuo posee 25% de interacción Hbond, significa que esta interacción se mantiene durante el 25% de la simulación. Las listas completas de interacciones se encuentran en *Material Suplementario 3*.

Considerando todos los resultados anteriores, se seleccionó el Modelo 1 como el mejor de todos los modelos trabajados. Así, los siguientes análisis se muestran solo para el Modelo 1, y los pertinentes a los otros modelos (Modelo 2 y 3) se muestran en *Material Suplementario*. Con el objetivo de obtener información adicional de los tipos y cantidad de interacciones proteína-péptido durante la DMs, se realizó un análisis para obtener el porcentaje de interacciones en el modelo Libre (Figura 31), Restraint 1 (Figura 33) y Restraint 2 (Figura 35). Cada tipo de enlace se encuentra representado con un color diferente: enlaces de hidrogeno (*Hbond*) en rojo, enlaces hidrofóbicos (*hydrophobic*) en verde, iónico (*ionic*) en amarillo y puentes de agua (*water bridges*) en celeste. Las barras más altas representan a los residuos que más interacciones poseen a lo largo de la dinámica.

En el caso del Modelo 1 en condición Libre (Figura 31) las interacciones a destacar corresponden a los residuos Ser52 y Glu56 con interacciones de puentes de agua, estos dos aminoácidos interactúan con la Arg787 (Figura 32A), el cual es un residuo extremo del péptido Rb, entregando la estabilidad para el anclaje del péptido a la CDK4 durante la DM. Los residuos Asp140 y Lys142 ambas con interacciones de enlaces de hidrogeno con la Ser780 del péptido Rb, se puede inferir que estas interacciones podrían servir como estabilizadores para la Ser780 (Figura 32B). Al comparar esta última interacción con el complejo homólogo CDK2/Ciclina-A, investigado por Recabarren *et. al*²⁶, se puede observar un complejo con un péptido que posee un residuo Ser para ser fosforilado, y que en el caso de CDK2 los residuos Asp127 y Lys129 cumplirían un rol de estabilizadores para la Ser con el objetivo de facilitar la catálisis. El residuo fosforilado TPO172 posee una cantidad similar de interacciones de tipo enlaces de hidrogeno y puentes de agua interactúa con el residuo Arg775 de péptido, el cual también es una arginina terminal (Figura 32C). Y finalmente el ATP con más del 75% de interacciones del tipo puentes de agua hacia la Ser780 del Rb. Estos residuos están directamente relacionados en el anclaje del péptido Rb a la proteína para mantener su cercanía y la representación estructural de sus interacciones se puede observar en la Figura 32.

Al realizar una comparación de las interacciones proteína-péptido entre el Modelo 1 libre (Figura 31) y las interacciones del Modelo 3 en la misma condición (*Véase Material Suplementario 4*), se evidencia que los residuos de la proteína que interactúan con el Rb no coinciden, lo que explicaría además de porque en la Figura 28 el Modelo 3 es el que menor porcentaje de interacción entre proteína-péptido tiene.

En la Figura 33, correspondiente al Modelo 1 con Restraint 1, se pueden observar una mayor cantidad de residuos, pero con una proporción de interacciones un poco menor que en el Modelo 1 Libre, con énfasis en los residuos Pro40, Ser52, Thr53, Glu56, los cuales mantienen enlaces de hidrógeno y puentes de agua con la Arg787 del Rb durante toda la DM (Figura 34A), sirviendo de anclaje para el péptido Rb. A medida que el tiempo de

simulación avanza, el péptido se mueve haciendo que la interacción entre Ser780 del Rb y ATP se altere un poco sin perder el contacto, haciendo que se favorezca la interacción de TPO172 con el residuo Arg787 (Figura 34A). Desde los 55ns de DM, el residuo Pro40 de la CDK4 interactúa con el residuo Pro783 del péptido Rb, aumentando más así el anclaje del péptido. El residuo Glu219 posee interacción con el residuo Arg775 del péptido, por lo que al ser una interacción que se mantiene durante toda DM se infiere que su función es de anclaje (Figura 34B). Todas estas interacciones se pueden observar de forma gráfica en la Figura 34. El ATP mantiene interacción con el residuo Ser780 del péptido, pero este último residuo de Ser no mantiene ninguna otra interacción con posibles residuos estabilizadores, como se mencionó en el caso del modelo libre.

En el caso del Modelo 1 con Restricción 2 (Figura 35), se observa también un alto porcentaje de interacción de los residuos Ser52, Thr53, Glu56 con enlaces de hidrógeno y puentes de agua, con el residuo Arg787 del péptido, cumpliendo así un rol de ancla para el péptido (Figura 36A). Los otros residuos que también destacan por su porcentaje de interacción son el TPO172 interactuando con el residuo Arg775, y Val174 que interactúa con la Arg775, Pro776 generando así que este extremo del péptido se aleje de la zona del sitio activo y se enrolle alrededor de la Val174 (Figura 36B) y así las distancias entre el ATP y la Ser780 aumentan lo suficiente como para que no sea una ubicación cómoda del péptido para una futura catálisis (Figura 36C).

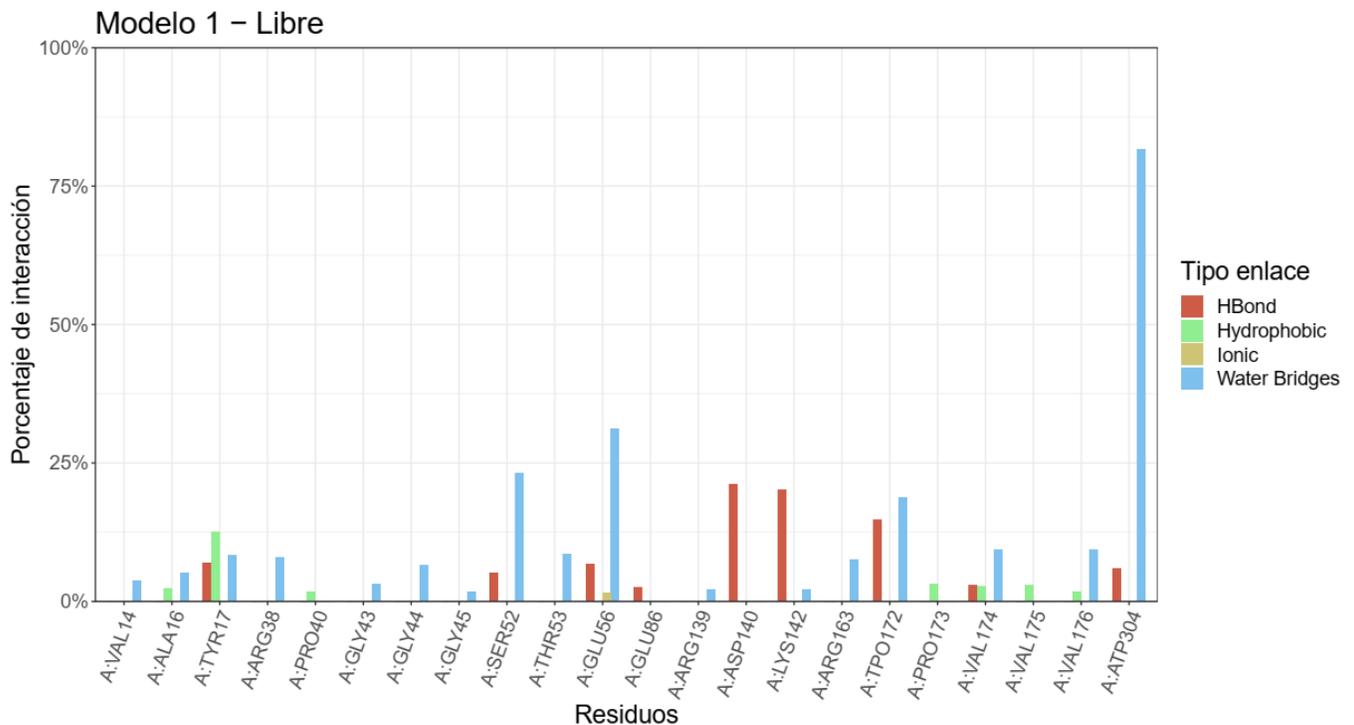


Figura 31. Porcentaje de interacciones proteína-péptido entre CDK4 y Rb por residuo en el Modelo 1 sin restricciones (Libre)

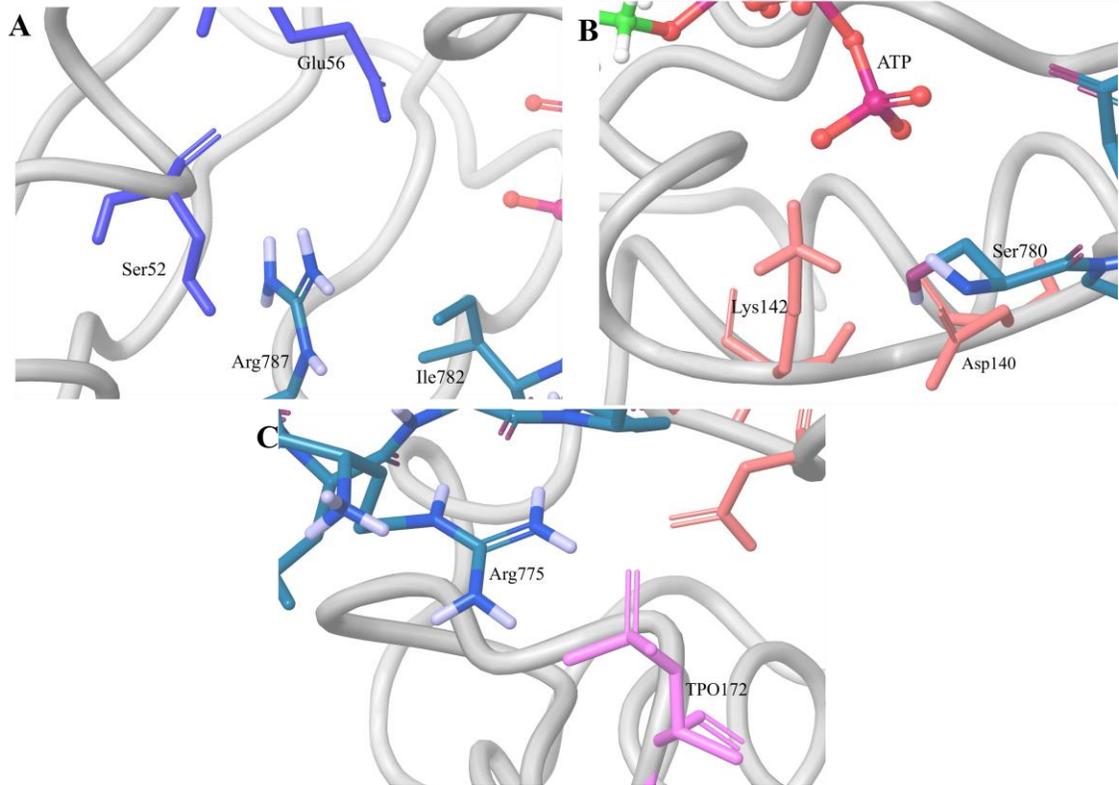


Figura 32. Representación estructural de interacciones notorias en el Modelo 1 libre, en las 3 figuras el péptido Rb se colorea de turquesa. **A)** Interacción de Arg787 del Rb con Ser52 y Glu56 (en azul). **B)** Interacción estabilizadora de Asp140 y Lys142 (en naranja) con Ser780 y ATP. **C)** Interacción de TPO172 (en rosa) con Arg775 de Rb.

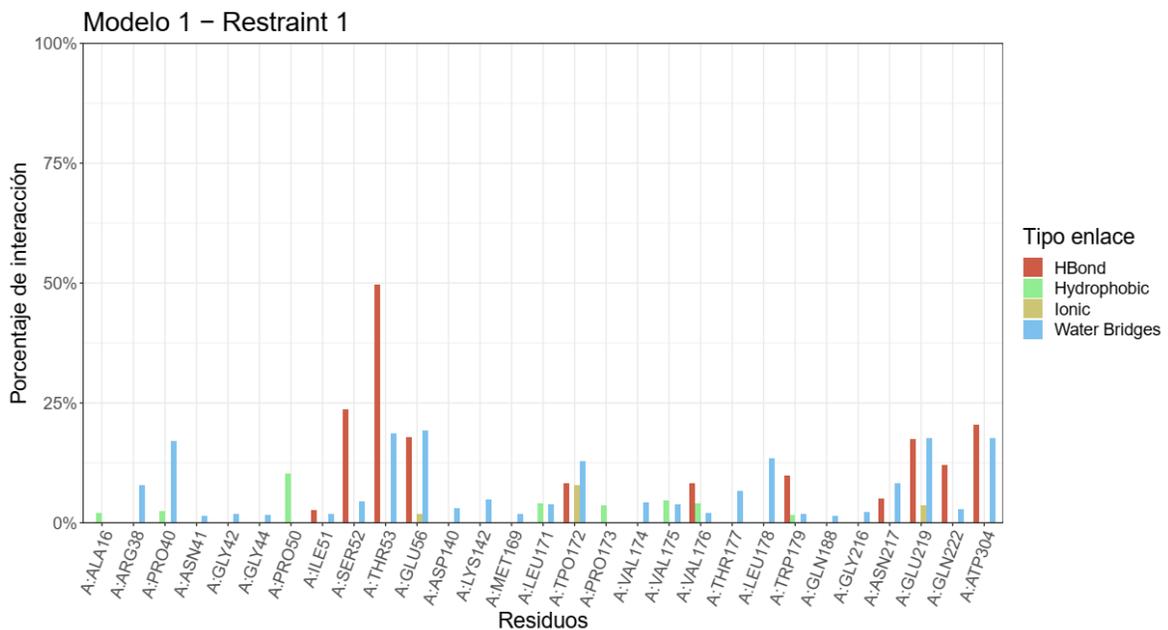


Figura 33. Porcentaje de interacciones proteína-péptido entre CDK4 y Rb por residuo en el Modelo 1 con la Restricción 1.

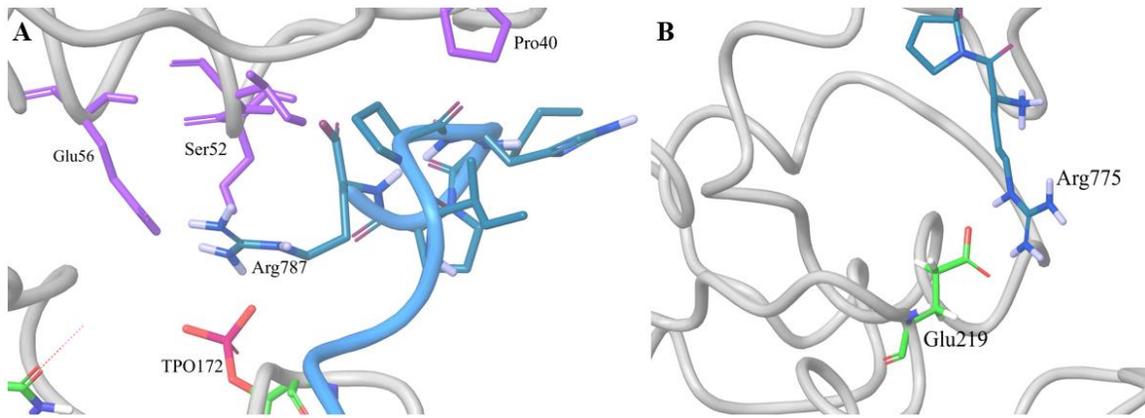


Figura 34. Representación estructural de interacciones notorias en el Modelo 1 con restricción 1. Péptido Rb en las 2 figuras se colorea de turquesa. **A)** Interacción de residuos de CDK4 con el extremo Arg787 del péptido. **B)** Interacción de Glu219 con Arg775.

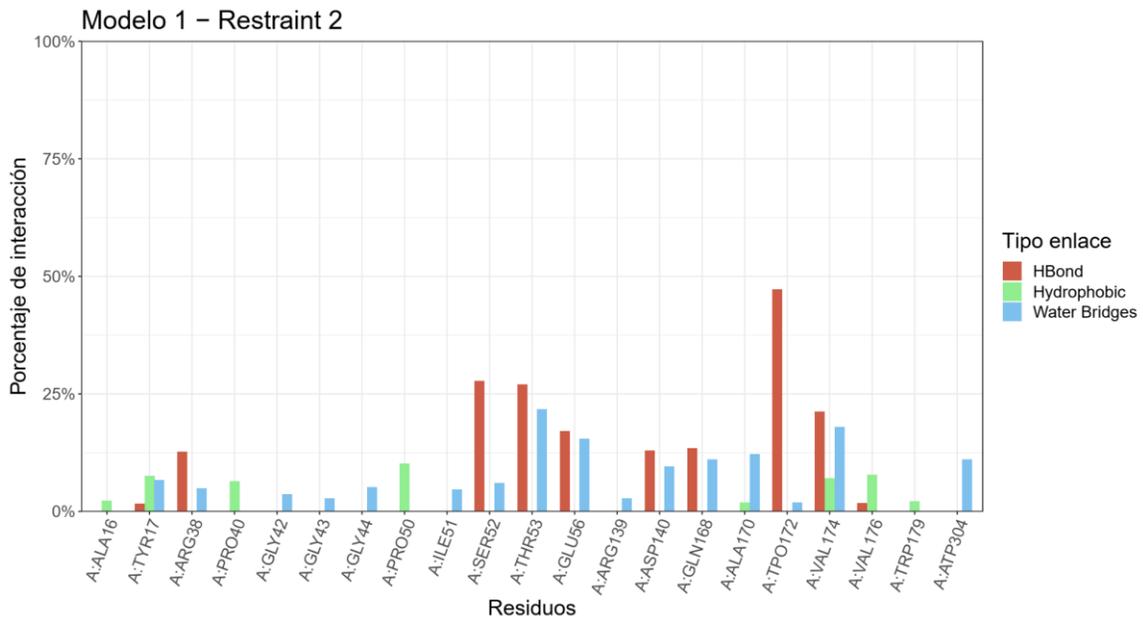


Figura 35. Porcentaje de interacciones proteína-péptido entre CDK4 y Rb por residuo en el Modelo 1 con la Restricción 2.

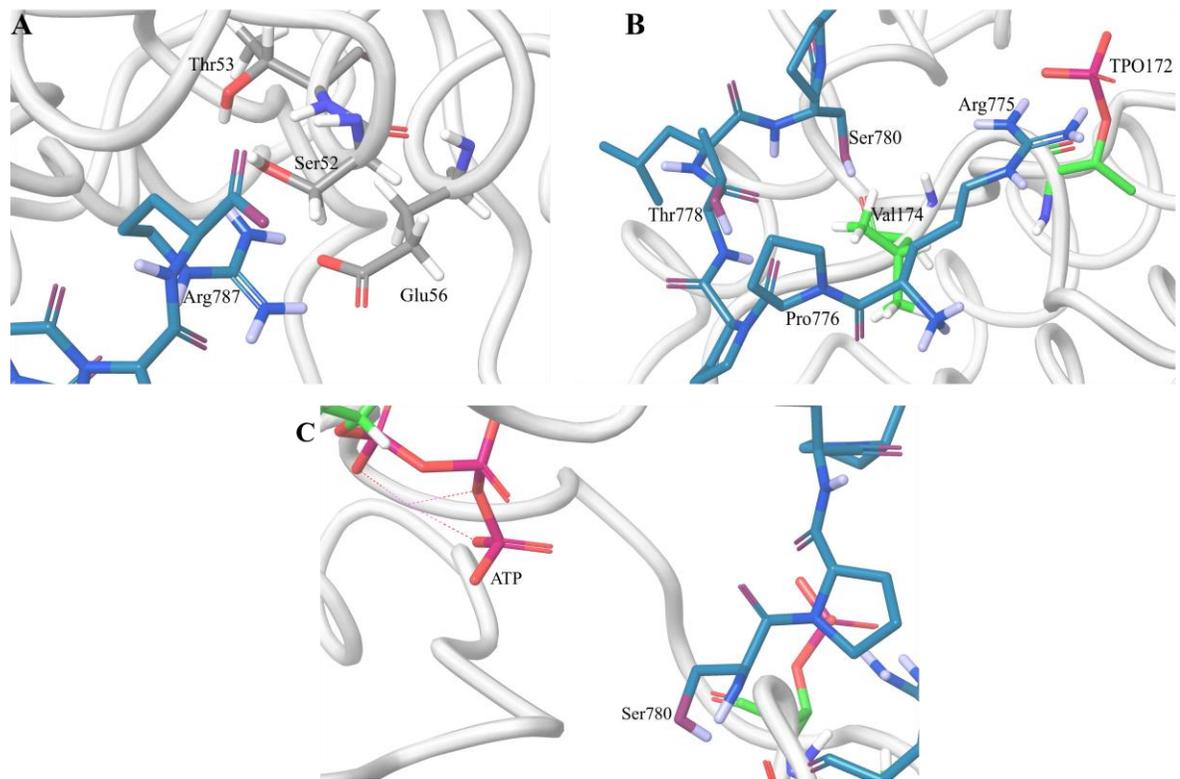


Figura 36. Representación estructural de los residuos con mayor porcentaje de interacción en Modelo 1 con restricción 2. Péptido Rb en las 3 figuras se colorea de turquesa. A) Interacciones de los residuos Ser52, Thr53 y Glu56 (coloreados en gris) con el residuo Arg787 del péptido Rb. B) Interacciones de residuos TPO172 y Val174 (coloreados en verde) con el péptido Rb. C) No hay contacto entre el ATP y Ser780 del péptido.

Finalmente, mediante la herramienta de *Simulation event analysis*, se verificó que se mantuviera la coordinación del Mg^{2+} en el sitio activo. La particularidad de esta coordinación consiste en que el ion Mg establece 6 enlaces (coordinación octaédrica²⁶): 3 enlaces hacia el ATP (O2A, O2G, O3B), 1 enlace hacia una molécula de H_2O , 1 enlace con oxígeno del residuo Asn145 y un enlace con el oxígeno del residuo Asp158 (Figura 37). Para realizar este análisis se obtuvieron todas las distancias entre los átomos mencionados en el tiempo de la dinámica, obteniendo como resultado que todas las distancias se mantuvieron estables en todos los modelos, tomando como referencia el estudio de Recabarren et al.²⁶ donde menciona que estas distancias deben estar en un rango de entre 2 -2,6 Å (Véase Material Suplementario 5).

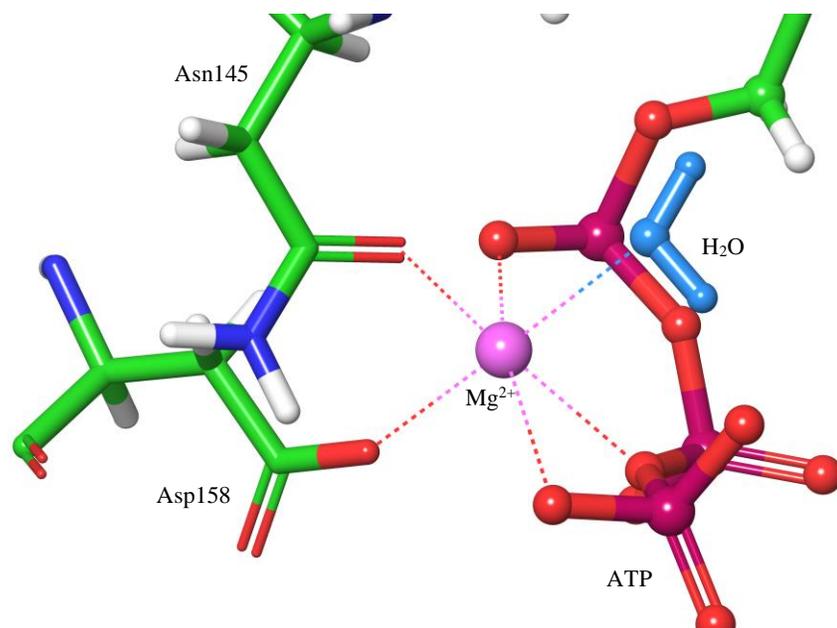


Figura 37. Coordinación octaédrica del Mg^{2+} en el sitio activo de CDK4

6 CONCLUSIONES:

Dentro de los objetivos más importantes a destacar fue la obtención de un modelo de CDK4 en su estado completo y activado, denominado como el complejo CDK4/Ciclina-D/Rb/(ATP+Mg²⁺). La obtención de este complejo fue posible debido a la gran similitud que CDK4 comparte con CDK2, la cual es una proteína que ha sido ampliamente estudiada, convirtiéndose una “proteína modelo”. Dentro de las similitudes principales entre CDK2 y CDK4 se destaca que sus estructuras terciarias son muy similares en cuanto al plegamiento (como se muestra en Figura 9), y sus sitios activos coinciden de forma estructural, por lo que representó una buena base para ser utilizada como molde para realizar modelamiento por homología para completar el complejo de CDK4 con el péptido sustrato Rb.

Luego de la obtención de los modelos resultantes del proceso de modelado por homología con *Modeller*³⁵, se verificó la calidad de los modelos mediante servidores web, obteniendo el Z-score, gráficos de Ramachandran y perfiles de energía por residuo. Estas comprobaciones entregaron como resultado que los modelos escogidos cumplieron con las condiciones mínimas de calidad estructural (Figura 10, Figura 11, Figura 12). Por ello, estos modelos fueron seleccionados para realizar las simulaciones de dinámicas moleculares clásicas.

En un principio, se tuvo en cuenta realizar un acoplamiento molecular con el software *Glide*⁵⁵ entre el péptido modelo del Rb y el complejo CDK4/Ciclina-D, buscando luego poder evaluar el anclaje entre el Rb y la CDK4 mediante DMs clásicas. Esto no arrojó resultados satisfactorios, por lo cual los experimentos de acoplamiento molecular con este software fueron descartados debido a que el péptido modelo de Rb era demasiado largo para ser soportado por *Glide*⁵⁵. Luego, se decidió emplear el servidor web Haddock⁵⁶. Este servidor también fue descartado tras varias pruebas, debido a problemas de parametrización del residuo TPO172 de la CDK4, haciendo que este y el ATP se salieran de su posición, aunque se adicionaran restricciones de posición. Finalmente, el péptido de Rb se ubicó en base a las restricciones espaciales obtenidas de las coordenadas del molde de CDK2 (PDB ID: 1QMZ), el cual también presentaba información estructural relevante para ubicar los residuos del Rb dentro el sitio de unión catalítico.

Como primer software de simulación para los modelos obtenidos desde *Modeller*³⁵ se había seleccionado *PMEMD* de la suite AMBER20⁵⁷, pero su uso fue descartado. Esto debido a que este software no poseía los parámetros de mecánica molecular adecuados para describir la esfera de coordinación del Mg con el ATP, por lo que la conformación del Mg en el sitio activo no se mantenía estable. De modo que, se decidió realizar dinámicas con el software Desmond⁴⁵ de Schrödinger³³ mediante el uso de la herramienta Desmond builder⁵⁸. Esta herramienta consiste en un pipeline de preparación de sistemas previo a comenzar una DM

y está desarrollada para usarse de forma exclusiva con Desmond⁴⁵. Flexibilizando en gran medida el proceso de agregar restricciones de posición, distancia, cambiar fuerzas o añadir etapas de relajación. Para obtener un mayor equilibrio en los modelos se aumentaron las etapas de relajación y el tiempo de estas etapas para equilibrar de forma gradual los sistemas.

El modelo que más estabilidad demostró a lo largo del tiempo de simulación (300ns) fue el modelo 1, el cual mantuvo estabilidad en la mayor parte del tiempo de dinámica (270ns) sin restricciones en etapa de producción. Lo que se demuestra principalmente en que fue el único modelo que conservó la distancia 1 (ATP-P γ - O γ -Ser780) y distancia 2 (O γ -Ser780 y OD2-Asp140), como se puede observar en la Figura 16 y Figura 17 sin que el péptido Rb perdiera contacto con la CDK4.

De acuerdo con lo que se puede observar de los porcentajes de interacción entre proteína-péptido en la Figura 31, los aminoácidos de CDK4 que más interacciones establecen con el péptido Rb son: Ser52, Glu56, Asp140, TPO172, y además el cofactor ATP. Cumpliendo los primeros 2 residuos mencionados un rol de anclaje para el péptido, interactuando con la Arg787, manteniendo así al péptido en cercanía al sitio activo y evitando se pierdan los contactos del ATP y Asp140 con el residuo de Ser780 de Rb, los cuales ayudan a mantener distancias e interacciones que podrían favorecer a la catálisis enzimática según la evidencia entregada por la investigación de Recabarren *et.al*²⁶.

7 BIBLIOGRAFÍA:

1. Adams, J. A. Kinetic and Catalytic Mechanisms of Protein Kinases. *Chem. Rev.* **101**, 2271–2290 (2001).
2. Ardito, F., Giuliani, M., Perrone, D., Troiano, G. & Muzio, L. L. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *Int. J. Mol. Med.* **40**, 271–280 (2017).
3. The Human Genome Project. *Genome.gov* <https://www.genome.gov/human-genome-project>.
4. Manning, G. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* **298**, 1912–1934 (2002).
5. Hanks, S. K. & Hunter, T. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification1. *FASEB J.* **9**, 576–596 (1995).
6. WikiKinome. http://kinase.com/wiki/index.php/Main_Page.
7. Barra, A. L. C. *et al.* Essential Metabolic Routes as a Way to ESKAPE From Antibiotic Resistance. *Front. Public Health* **8**, 26 (2020).
8. Cheng, W. *et al.* Recent development of CDK inhibitors: An overview of CDK/inhibitor co-crystal structures. *Eur. J. Med. Chem.* **164**, 615–639 (2019).
9. Grimes, J. M. & Grimes, K. V. p38 MAPK inhibition: A promising therapeutic approach for COVID-19. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **144**, 63–65 (2020).
10. Wood, D. J. & Endicott, J. A. Structural insights into the functional diversity of the CDK–cyclin family. *Open Biol.* **8**, 180112 (2018).
11. Malumbres, M. & Barbacid, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 153–166 (2009).
12. Lapenna, S. & Giordano, A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 547–566 (2009).

13. O'Leary, B., Finn, R. S. & Turner, N. C. Treating cancer with selective CDK4/6 inhibitors. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **13**, 417–430 (2016).
14. Pavletich, N. P. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of cdks, their cyclin activators, and cip and INK4 inhibitors. *J. Mol. Biol.* **287**, 821–828 (1999).
15. Kinase Family CDK - WikiKinome.
http://kinase.com/wiki/index.php/Kinase_Family_CDK.
16. Takaki, T. *et al.* The structure of CDK4/cyclin D3 has implications for models of CDK activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 4171–4176 (2009).
17. Wolfel, T. *et al.* A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* **269**, 1281–1284 (1995).
18. Asghar, U., Witkiewicz, A. K., Turner, N. C. & Knudsen, E. S. The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 130–146 (2015).
19. Friend, S. H. *et al.* A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* **323**, 643–646 (1986).
20. Dyson, N., Howley, P., Munger, K. & Harlow, E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* **243**, 934–937 (1989).
21. Henley, S. A. & Dick, F. A. The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle. *Cell Div.* **7**, 10 (2012).
22. Peng, C. *et al.* Cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) is a key mediator for EGF-induced cell transformation mediated through the ELK4/c-Fos signaling pathway. *Oncogene* **35**, 1170–1179 (2016).
23. Baker, S. J. & Reddy, E. P. CDK4: A Key Player in the Cell Cycle, Development, and Cancer. *Genes Cancer* **3**, 658–669 (2012).

24. Morgan, D. O. Principles of CDK regulation. *Nature* **374**, 131–134 (1995).
25. Bockstaele, L. *et al.* Regulated Activating Thr172 Phosphorylation of Cyclin-Dependent Kinase 4(CDK4): Its Relationship with Cyclins and CDK “Inhibitors”. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 5070–5085 (2006).
26. Recabarren, R., Osorio, E. H., Caballero, J., Tuñón, I. & Alzate-Morales, J. H. Mechanistic insights into the phosphoryl transfer reaction in cyclin-dependent kinase 2: A QM/MM study. *PLOS ONE* **14**, e0215793 (2019).
27. Recabarren, R., Zinovjev, K., Tuñón, I. & Alzate-Morales, J. How a Second Mg²⁺ Ion Affects the Phosphoryl Transfer Mechanism in a Protein Kinase: A Computational Study. (2020) doi:10.26434/chemrxiv.12560153.v1.
28. Lassila, J. K., Zalatan, J. G. & Herschlag, D. Biological Phosphoryl-Transfer Reactions: Understanding Mechanism and Catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 669–702 (2011).
29. Guiley, K. Z. *et al.* p27 allosterically activates cyclin-dependent kinase 4 and antagonizes palbociclib inhibition. *Science* **366**, eaaw2106 (2019).
30. Connell-Crowley, L., Harper, J. W. & Goodrich, D. W. Cyclin D1/Cdk4 Regulates Retinoblastoma Protein- mediated Cell Cycle Arrest by Site-specific Phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* **8**, 15 (1997).
31. The UniProt Consortium *et al.* UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.* **49**, D480–D489 (2021).
32. Berman, H. M. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235–242 (2000).
33. *Schrödinger Release2021-2: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021.*
34. Krieger, E., Nabuurs, S. B. & Vriend, G. Homology Modeling. in *Methods of Biochemical Analysis* (eds. Bourne, P. E. & Weissig, H.) 509–523 (John Wiley & Sons, Inc., 2005). doi:10.1002/0471721204.ch25.

35. Webb, B. & Sali, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Curr. Protoc. Bioinforma.* **54**, (2016).
36. Shen, M. & Sali, A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Sci.* **15**, 2507–2524 (2006).
37. Topacio, B. R. *et al.* Cyclin D-Cdk4,6 Drives Cell-Cycle Progression via the Retinoblastoma Protein's C-Terminal Helix. *Mol. Cell* **74**, 758-770.e4 (2019).
38. Eisenberg, D., Lüthy, R. & Bowie, J. U. [20] VERIFY3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles. in *Macromolecular Crystallography Part B* vol. 277 396–404 (Academic Press, 1997).
39. Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 283–291 (1993).
40. Laskowski, R. A., Rullmann, J. A. C., MacArthur, M. W., Kaptein, R. & Thornton, J. M. AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J. Biomol. NMR* **8**, 477–486 (1996).
41. Hoof, R. W. W., Vriend, G., Sander, C. & Abola, E. E. Errors in protein structures. *Nature* **381**, 272–272 (1996).
42. Wiederstein, M. & Sippl, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* **35**, W407–W410 (2007).
43. Madhavi Sastry, G., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R. & Sherman, W. Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **27**, 221–234 (2013).
44. Olsson, M. H. M., Søndergaard, C. R., Rostkowski, M. & Jensen, J. H. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pK_a Predictions. *J. Chem. Theory Comput.* **7**, 525–537 (2011).

45. SC '06: *Proceedings of the 2006 ACM/IEEE Conference on Supercomputing*. (Association for Computing Machinery, 2006).
46. Bedoya, M. *maurobedoya/desmond_builder: v1.0*. (Zenodo, 2022).
doi:10.5281/zenodo.6551870.
47. Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. VMD – Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**, 33–38 (1996).
48. Bedoya, M. & Adasme, F. *Contact surface analyzer: v1.0*. (Zenodo, 2020).
doi:10.5281/zenodo.4088995.
49. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. (R Foundation for Statistical Computing, 2021).
50. genetic code | Learn Science at Scitable.
<https://www.nature.com/scitable/definition/genetic-code-13/>.
51. Altschul, S. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402 (1997).
52. Sobolev, V. & Edelman, M. Modeling the quinone-B binding site of the photosystem-II reaction center using notions of complementarity and contact-surface between atoms. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **21**, 214–225 (1995).
53. Sobolev, V., Sorokine, A., Prilusky, J., Abola, E. & Edelman, M. Automated analysis of interatomic contacts in proteins. *Bioinformatics* **15**, 327–332 (1999).
54. Ribeiro, J., Ríos-Vera, C., Melo, F. & Schüller, A. Calculation of accurate interatomic contact surface areas for the quantitative analysis of non-bonded molecular interactions. *Bioinformatics* **35**, 3499–3501 (2019).
55. Friesner, R. A. *et al.* Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein–Ligand Complexes. *J. Med. Chem.* **49**, 6177–6196 (2006).

56. Zundert, G. C. P. van *et al.* The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. *J. Mol. Biol.* **428**, 720–725 (2016).
57. D.A. Case, K. Belfon, I.Y. Ben-Shalom, S.R. Brozell, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, V.W.D. Cruzeiro, T.A. Darden, R.E. Duke, G. Giambasu, M.K. Gilson, H. Gohlke, A.W. Goetz, R. Harris, S. Izadi, S.A. Izmailov, K. Kasavajhala, A. Kovalenko, R. Krasny, T. Kurtzman, T.S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, J. Liu, T. Luchko, R. Luo, V. Man, K.M. Merz, Y. Miao, O. Mikhailovskii, G. Monard, H. Nguyen, A. Onufriev, F. Pan, S. Pantano, R. Qi, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, S. Schott-Verdugo, J. Shen, C.L. Simmerling, N.R. Skrynnikov, J. Smith, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, L. Wilson, R.M. Wolf, X. Wu, Y. Xiong, Y. Xue, D.M. York and P.A. Kollman. AMBER 2020. (2020).
58. Bedoya, M. *Desmond Builder*. (2021).

8 Material Suplementario:

Material Suplementario 1: Lista de DOPE score

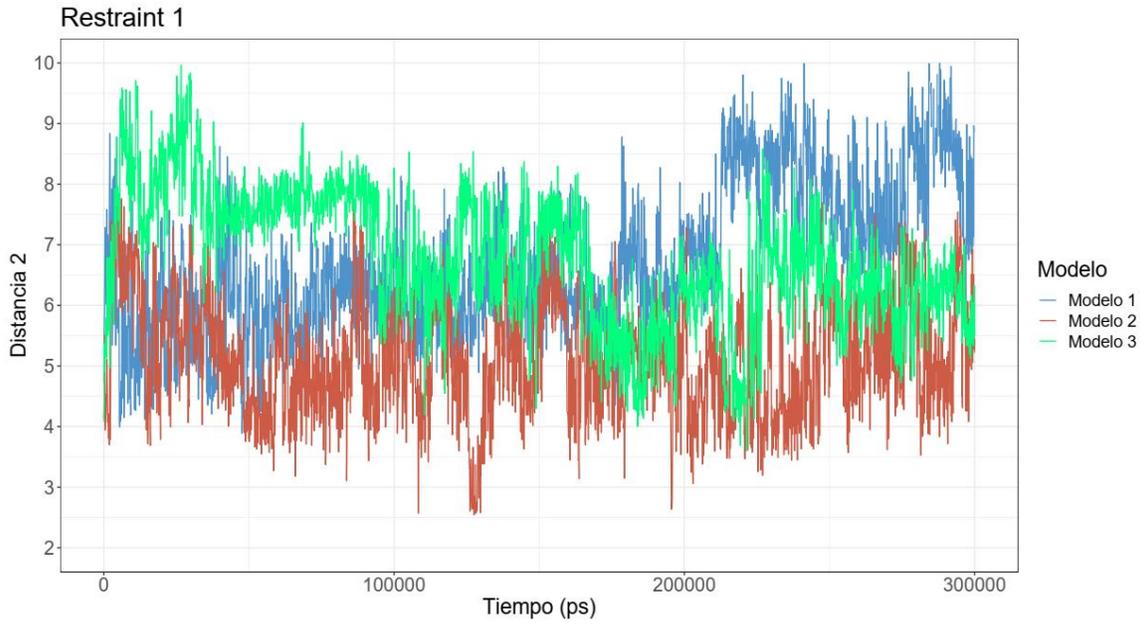
Nombre	DOPE
seq.B99990031.pdb	-5844464062
seq.B99990095.pdb	-5802959766
seq.B99990096.pdb	-5784933984
seq.B99990083.pdb	-5752686719
seq.B99990003.pdb	-5751504688
seq.B99990064.pdb	-5750928125
seq.B99990086.pdb	-5736653906
seq.B99990069.pdb	-5731382812
seq.B99990039.pdb	-5728765234
seq.B99990078.pdb	-5726855859
seq.B99990041.pdb	-5723746094
seq.B99990014.pdb	-5718965625
seq.B99990022.pdb	-5703895703
seq.B99990091.pdb	-5703121094
seq.B99990016.pdb	-5702588672
seq.B99990043.pdb	-5691633984
seq.B99990029.pdb	-5684762891
seq.B99990019.pdb	-5684564062
seq.B99990070.pdb	-5671169922
seq.B99990084.pdb	-5655110547
seq.B99990059.pdb	-5652389453
seq.B99990060.pdb	-5652364453
seq.B99990097.pdb	-5646908594
seq.B99990011.pdb	-5646901953
seq.B99990066.pdb	-5642966016
seq.B99990051.pdb	-5633353125
seq.B99990055.pdb	-5631129688
seq.B99990040.pdb	-5629802734
seq.B99990002.pdb	-5622642578
seq.B99990033.pdb	-5622299219
seq.B99990082.pdb	-5606837891
seq.B99990025.pdb	-5600560938
seq.B99990013.pdb	-5598435156
seq.B99990068.pdb	-5593566406
seq.B99990036.pdb	-5592434375

seq.B99990074.pdb	-5564510547
seq.B99990094.pdb	-5524208984
seq.B99990092.pdb	-5514826172
seq.B99990012.pdb	-5494496484
seq.B99990079.pdb	-5452245312
seq.B99990088.pdb	-5444975391
seq.B99990098.pdb	-5437736719
seq.B99990077.pdb	-5429476172
seq.B99990063.pdb	-5415672656
seq.B99990053.pdb	-5414063672
seq.B99990049.pdb	-5412750391
seq.B99990093.pdb	-5411765625
seq.B99990045.pdb	-5399355469
seq.B99990010.pdb	-5397173438
seq.B99990062.pdb	-5376610156
seq.B99990028.pdb	-5376466797
seq.B99990048.pdb	-5374697656
seq.B99990044.pdb	-5373304297
seq.B99990018.pdb	-5372666406
seq.B99990073.pdb	-5372522266
seq.B99990038.pdb	-5370883203
seq.B99990027.pdb	-5366001562
seq.B99990057.pdb	-5353195312
seq.B99990071.pdb	-5347101562
seq.B99990004.pdb	-5346267188
seq.B99990067.pdb	-5344463281
seq.B99990075.pdb	-5338047656
seq.B99990037.pdb	-5336482422
seq.B99990081.pdb	-5335985938
seq.B99990007.pdb	-5331992578
seq.B99990034.pdb	-5331058594
seq.B99990020.pdb	-5313778516
seq.B99990009.pdb	-5313448828
seq.B99990087.pdb	-5309649609
seq.B99990032.pdb	-5306528906
seq.B99990006.pdb	-5306148828
seq.B99990024.pdb	-5305253906
seq.B99990076.pdb	-5304026172
seq.B99990021.pdb	-5301243750
seq.B99990056.pdb	-5301075781
seq.B99990042.pdb	-5298725781

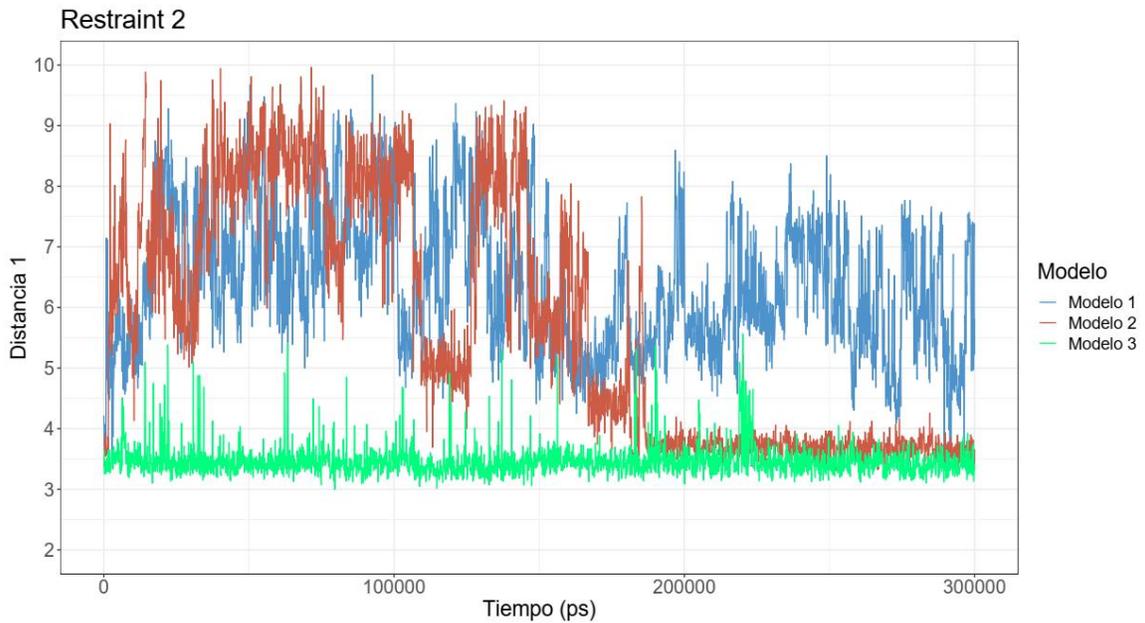
seq.B99990061.pdb	-5296719531
seq.B99990080.pdb	-5293818359
seq.B99990005.pdb	-5291416016
seq.B99990100.pdb	-5278977734
seq.B99990052.pdb	-5277141406
seq.B99990046.pdb	-5276194531
seq.B99990090.pdb	-5274775391
seq.B99990085.pdb	-5265392578
seq.B99990026.pdb	-5260048828
seq.B99990035.pdb	-5257607031
seq.B99990047.pdb	-5254860938
seq.B99990008.pdb	-5248716406
seq.B99990030.pdb	-5243795703
seq.B99990023.pdb	-5234591797
seq.B99990054.pdb	-5230905469
seq.B99990099.pdb	-5227683203
seq.B99990017.pdb	-5206381250
seq.B99990065.pdb	-5200062500
seq.B99990072.pdb	-5197386328
seq.B99990058.pdb	-5181906641

seq.B99990015.pdb	-5179555859
seq.B99990050.pdb	-5152956250
seq.B99990089.pdb	-5119554688

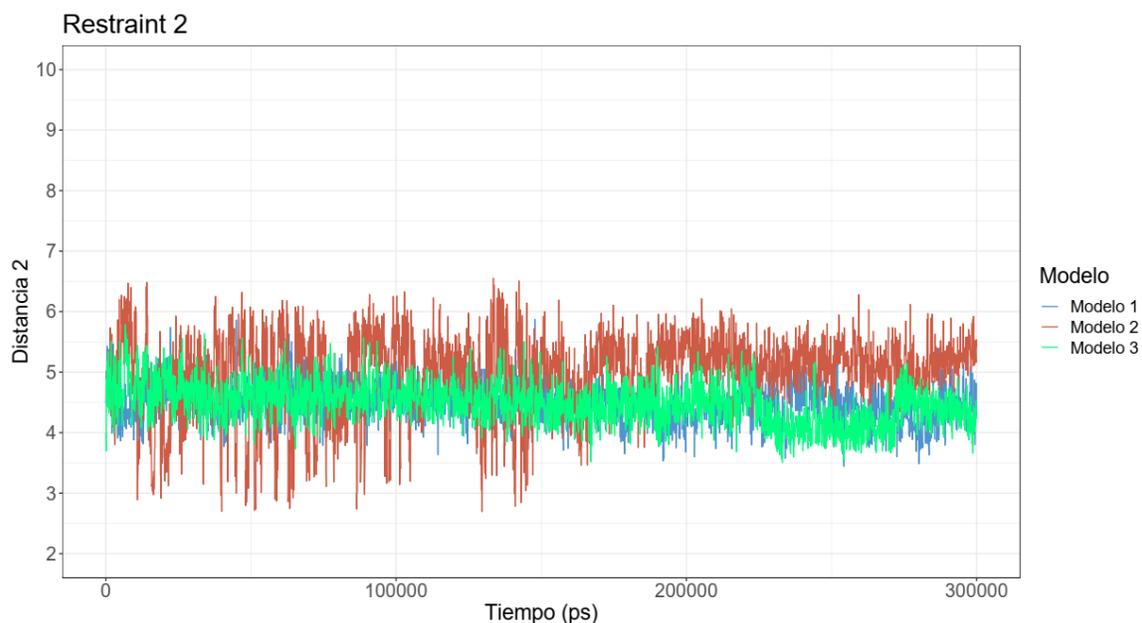
Material Suplementario 2: Análisis de distancia 1 y 2 del modelo 1,2 y 3 respecto al restricción 1 y 2:



Distancia 2 con Restrict 1 en Modelos 1, 2 y 3.



Distancia 1 con Restrict 2 en Modelos 1, 2 y 3.



Distancia 2 con Restrict 2 en Modelos 1, 2 y 3.

Material Suplementario 3: Listas de interacciones proteína-péptido por tipo de enlace:

Interacción proteína-péptido en Modelo 1-Libre:

Res_chain	Resid	Resinfo	Type	Interaction
VAL_A	14	A:VAL14	HBond	14
GLY_A	15	A:GLY15	HBond	7
ALA_A	16	A:ALA16	HBond	23
TYR_A	17	A:TYR17	HBond	826
ARG_A	38	A:ARG38	HBond	2
GLY_A	43	A:GLY43	HBond	66
GLY_A	44	A:GLY44	HBond	79
SER_A	52	A:SER52	HBond	612
THR_A	53	A:THR53	HBond	31
GLU_A	56	A:GLU56	HBond	807
GLU_A	86	A:GLU86	HBond	310
ASP_A	140	A:ASP140	HBond	2544
LYS_A	142	A:LYS142	HBond	2413
ARG_A	163	A:ARG163	HBond	53
GLN_A	168	A:GLN168	HBond	10

TPO_A	172	A:TPO172	HBond	1769
VAL_A	174	A:VAL174	HBond	352
VAL_A	176	A:VAL176	HBond	95
TRP_A	179	A:TRP179	HBond	20
ASN_A	217	A:ASN217	HBond	3
GLU_A	219	A:GLU219	HBond	25
ATP_A	304	A:ATP304	HBond	720
VAL_A	14	A:VAL14	Hydrophobic	49
ALA_A	16	A:ALA16	Hydrophobic	279
TYR_A	17	A:TYR17	Hydrophobic	1507
VAL_A	37	A:VAL37	Hydrophobic	7
VAL_A	39	A:VAL39	Hydrophobic	7
PRO_A	40	A:PRO40	Hydrophobic	212
PRO_A	50	A:PRO50	Hydrophobic	3
ALA_A	170	A:ALA170	Hydrophobic	33
PRO_A	173	A:PRO173	Hydrophobic	374
VAL_A	174	A:VAL174	Hydrophobic	315
VAL_A	175	A:VAL175	Hydrophobic	341
VAL_A	176	A:VAL176	Hydrophobic	203
TRP_A	179	A:TRP179	Hydrophobic	81
GLU_A	56	A:GLU56	Ionic	176
ARG_A	163	A:ARG163	Ionic	3
TPO_A	172	A:TPO172	Ionic	16
ASP_A	221	A:ASP221	Ionic	1
ATP_A	304	A:ATP304	Ionic	29
VAL_A	14	A:VAL14	Water Bridges	456
GLY_A	15	A:GLY15	Water Bridges	133
ALA_A	16	A:ALA16	Water Bridges	616
TYR_A	17	A:TYR17	Water Bridges	1008
ARG_A	38	A:ARG38	Water Bridges	945
PRO_A	40	A:PRO40	Water Bridges	26
ASN_A	41	A:ASN41	Water Bridges	3
GLY_A	42	A:GLY42	Water Bridges	69
GLY_A	43	A:GLY43	Water Bridges	374
GLY_A	44	A:GLY44	Water Bridges	787
GLY_A	45	A:GLY45	Water Bridges	211
ILE_A	51	A:ILE51	Water Bridges	17
SER_A	52	A:SER52	Water Bridges	2774
THR_A	53	A:THR53	Water Bridges	1015
ARG_A	55	A:ARG55	Water Bridges	2
GLU_A	56	A:GLU56	Water Bridges	3726

ARG_A	85	A:ARG85	Water Bridges	19
GLU_A	86	A:GLU86	Water Bridges	75
ARG_A	139	A:ARG139	Water Bridges	262
ASP_A	140	A:ASP140	Water Bridges	25
LYS_A	142	A:LYS142	Water Bridges	253
GLU_A	144	A:GLU144	Water Bridges	24
ASN_A	145	A:ASN145	Water Bridges	6
LEU_A	161	A:LEU161	Water Bridges	20
ARG_A	163	A:ARG163	Water Bridges	902
TYR_A	167	A:TYR167	Water Bridges	3
GLN_A	168	A:GLN168	Water Bridges	97
LEU_A	171	A:LEU171	Water Bridges	11
TPO_A	172	A:TPO172	Water Bridges	2249
VAL_A	174	A:VAL174	Water Bridges	1121
VAL_A	175	A:VAL175	Water Bridges	18
VAL_A	176	A:VAL176	Water Bridges	1120
THR_A	177	A:THR177	Water Bridges	5
TRP_A	179	A:TRP179	Water Bridges	31
TYR_A	180	A:TYR180	Water Bridges	1
ASN_A	217	A:ASN217	Water Bridges	20
SER_A	218	A:SER218	Water Bridges	4
GLU_A	219	A:GLU219	Water Bridges	19
ASP_A	221	A:ASP221	Water Bridges	9
ATP_A	304	A:ATP304	Water Bridges	9799

Interacción proteína-péptido en Modelo 1 - Restraint 1:

Res_chain	resid	resinfo	type	Interaction
ARG_A	38	A:ARG38	HBond	51
PRO_A	40	A:PRO40	HBond	6
ASN_A	41	A:ASN41	HBond	5
GLY_A	42	A:GLY42	HBond	117
GLY_A	43	A:GLY43	HBond	1
ILE_A	51	A:ILE51	HBond	305
SER_A	52	A:SER52	HBond	2847
THR_A	53	A:THR53	HBond	5953
GLU_A	56	A:GLU56	HBond	2149
LYS_A	142	A:LYS142	HBond	25
TPO_A	172	A:TPO172	HBond	978
VAL_A	174	A:VAL174	HBond	1

VAL_A	175	A:VAL175	HBond	3
VAL_A	176	A:VAL176	HBond	980
THR_A	177	A:THR177	HBond	100
TRP_A	179	A:TRP179	HBond	1176
GLN_A	188	A:GLN188	HBond	11
GLY_A	216	A:GLY216	HBond	3
ASN_A	217	A:ASN217	HBond	614
SER_A	218	A:SER218	HBond	9
GLU_A	219	A:GLU219	HBond	2096
GLN_A	222	A:GLN222	HBond	1447
ATP_A	304	A:ATP304	HBond	2450
ALA_A	16	A:ALA16	Hydrophobic	241
TYR_A	17	A:TYR17	Hydrophobic	17
VAL_A	37	A:VAL37	Hydrophobic	4
VAL_A	39	A:VAL39	Hydrophobic	145
PRO_A	40	A:PRO40	Hydrophobic	296
PRO_A	50	A:PRO50	Hydrophobic	1228
MET_A	169	A:MET169	Hydrophobic	14
ALA_A	170	A:ALA170	Hydrophobic	1
LEU_A	171	A:LEU171	Hydrophobic	473
PRO_A	173	A:PRO173	Hydrophobic	427
VAL_A	174	A:VAL174	Hydrophobic	36
VAL_A	175	A:VAL175	Hydrophobic	553
VAL_A	176	A:VAL176	Hydrophobic	483
TRP_A	179	A:TRP179	Hydrophobic	198
LEU_A	186	A:LEU186	Hydrophobic	43
GLU_A	56	A:GLU56	Ionic	227
TPO_A	172	A:TPO172	Ionic	932
GLU_A	219	A:GLU219	Ionic	426
VAL_A	14	A:VAL14	Water Bridges	1
ALA_A	16	A:ALA16	Water Bridges	63
TYR_A	17	A:TYR17	Water Bridges	18
ARG_A	38	A:ARG38	Water Bridges	946
PRO_A	40	A:PRO40	Water Bridges	2056
ASN_A	41	A:ASN41	Water Bridges	169
GLY_A	42	A:GLY42	Water Bridges	228
GLY_A	43	A:GLY43	Water Bridges	33
GLY_A	44	A:GLY44	Water Bridges	188
GLY_A	46	A:GLY46	Water Bridges	1
ILE_A	51	A:ILE51	Water Bridges	220
SER_A	52	A:SER52	Water Bridges	539

THR_A	53	A:THR53	Water Bridges	2247
ARG_A	55	A:ARG55	Water Bridges	2
GLU_A	56	A:GLU56	Water Bridges	2321
ARG_A	85	A:ARG85	Water Bridges	15
GLU_A	86	A:GLU86	Water Bridges	2
THR_B	116	B:THR116	Water Bridges	1
ARG_A	139	A:ARG139	Water Bridges	19
ASP_A	140	A:ASP140	Water Bridges	359
LYS_A	142	A:LYS142	Water Bridges	590
GLU_A	144	A:GLU144	Water Bridges	52
ASP_A	158	A:ASP158	Water Bridges	47
GLN_A	168	A:GLN168	Water Bridges	6
MET_A	169	A:MET169	Water Bridges	221
ALA_A	170	A:ALA170	Water Bridges	4
LEU_A	171	A:LEU171	Water Bridges	451
TPO_A	172	A:TPO172	Water Bridges	1539
PRO_A	173	A:PRO173	Water Bridges	10
VAL_A	174	A:VAL174	Water Bridges	505
VAL_A	175	A:VAL175	Water Bridges	453
VAL_A	176	A:VAL176	Water Bridges	249
THR_A	177	A:THR177	Water Bridges	790
LEU_A	178	A:LEU178	Water Bridges	1612
TRP_A	179	A:TRP179	Water Bridges	214
ARG_A	181	A:ARG181	Water Bridges	52
VAL_A	185	A:VAL185	Water Bridges	2
GLN_A	188	A:GLN188	Water Bridges	167
GLY_A	216	A:GLY216	Water Bridges	278
ASN_A	217	A:ASN217	Water Bridges	1000
SER_A	218	A:SER218	Water Bridges	120
GLU_A	219	A:GLU219	Water Bridges	2107
ASP_A	221	A:ASP221	Water Bridges	9
GLN_A	222	A:GLN222	Water Bridges	352
ATP_A	304	A:ATP304	Water Bridges	2112

Interacción proteína-péptido en Modelo 1 - Restraint 2:

Res_chain	Resid	Resinfo	Type	Interact
TYR_A	17	A:TYR17	HBond	198
ARG_A	38	A:ARG38	HBond	1529
GLY_A	43	A:GLY43	HBond	17
GLY_A	44	A:GLY44	HBond	53

GLY_A	45	A:GLY45	HBond	1
ILE_A	51	A:ILE51	HBond	71
SER_A	52	A:SER52	HBond	3332
THR_A	53	A:THR53	HBond	3235
GLU_A	56	A:GLU56	HBond	2049
GLU_A	86	A:GLU86	HBond	90
ARG_A	139	A:ARG139	HBond	1
ASP_A	140	A:ASP140	HBond	1559
LYS_A	142	A:LYS142	HBond	3
GLN_A	168	A:GLN168	HBond	1612
ALA_A	170	A:ALA170	HBond	7
TPO_A	172	A:TPO172	HBond	5669
VAL_A	174	A:VAL174	HBond	2555
VAL_A	175	A:VAL175	HBond	102
VAL_A	176	A:VAL176	HBond	219
TRP_A	179	A:TRP179	HBond	4
ASN_A	217	A:ASN217	HBond	12
GLU_A	219	A:GLU219	HBond	1
ATP_A	304	A:ATP304	HBond	20
ALA_A	16	A:ALA16	Hydrophobic	270
TYR_A	17	A:TYR17	Hydrophobic	906
VAL_A	39	A:VAL39	Hydrophobic	21
PRO_A	40	A:PRO40	Hydrophobic	766
PRO_A	50	A:PRO50	Hydrophobic	1221
ILE_A	51	A:ILE51	Hydrophobic	3
ALA_A	170	A:ALA170	Hydrophobic	223
PRO_A	173	A:PRO173	Hydrophobic	92
VAL_A	174	A:VAL174	Hydrophobic	848
VAL_A	175	A:VAL175	Hydrophobic	25
VAL_A	176	A:VAL176	Hydrophobic	937
TRP_A	179	A:TRP179	Hydrophobic	263
ARG_A	55	A:ARG55	Ionic	1
GLU_A	56	A:GLU56	Ionic	56
TPO_A	172	A:TPO172	Ionic	11
ALA_A	16	A:ALA16	Water Bridges	75
TYR_A	17	A:TYR17	Water Bridges	800
ARG_A	38	A:ARG38	Water Bridges	596
VAL_A	39	A:VAL39	Water Bridges	1
PRO_A	40	A:PRO40	Water Bridges	45
ASN_A	41	A:ASN41	Water Bridges	2
GLY_A	42	A:GLY42	Water Bridges	447

GLY_A	43	A:GLY43	Water Bridges	332
GLY_A	44	A:GLY44	Water Bridges	621
GLY_A	45	A:GLY45	Water Bridges	138
GLY_A	46	A:GLY46	Water Bridges	12
ILE_A	51	A:ILE51	Water Bridges	557
SER_A	52	A:SER52	Water Bridges	724
THR_A	53	A:THR53	Water Bridges	2605
ARG_A	55	A:ARG55	Water Bridges	12
GLU_A	56	A:GLU56	Water Bridges	1851
ARG_A	85	A:ARG85	Water Bridges	18
GLU_A	86	A:GLU86	Water Bridges	98
THR_B	116	B:THR116	Water Bridges	1
ARG_A	139	A:ARG139	Water Bridges	328
ASP_A	140	A:ASP140	Water Bridges	1143
LYS_A	142	A:LYS142	Water Bridges	81
ARG_A	163	A:ARG163	Water Bridges	1
TYR_A	167	A:TYR167	Water Bridges	34
GLN_A	168	A:GLN168	Water Bridges	1335
MET_A	169	A:MET169	Water Bridges	22
ALA_A	170	A:ALA170	Water Bridges	1465
TPO_A	172	A:TPO172	Water Bridges	235
PRO_A	173	A:PRO173	Water Bridges	15
VAL_A	174	A:VAL174	Water Bridges	2150
VAL_A	175	A:VAL175	Water Bridges	11
VAL_A	176	A:VAL176	Water Bridges	76
THR_A	177	A:THR177	Water Bridges	17
LEU_A	178	A:LEU178	Water Bridges	1
TRP_A	179	A:TRP179	Water Bridges	28
ARG_A	181	A:ARG181	Water Bridges	19
CYS_A	215	A:CYS215	Water Bridges	2
ASN_A	217	A:ASN217	Water Bridges	31
SER_A	218	A:SER218	Water Bridges	1
GLU_A	219	A:GLU219	Water Bridges	20
ATP_A	304	A:ATP304	Water Bridges	1328

Interacción proteína-péptido en Modelo 2- Libre:

Res_chain	Resid	Resinfo	Type	Interact
GLU_A	11	A:GLU11	HBond	269
ILE_A	12	A:ILE12	HBond	52

VAL_A	14	A:VAL14	HBond	5
GLY_A	15	A:GLY15	HBond	3
ALA_A	16	A:ALA16	HBond	93
TYR_A	17	A:TYR17	HBond	1707
ARG_A	38	A:ARG38	HBond	215
SER_A	52	A:SER52	HBond	1733
THR_A	53	A:THR53	HBond	9
THR_A	83	A:THR83	HBond	6
ASP_A	84	A:ASP84	HBond	1526
ARG_A	85	A:ARG85	HBond	3
GLU_A	86	A:GLU86	HBond	1597
ASP_A	99	A:ASP99	HBond	837
THR_A	102	A:THR102	HBond	6
ASP_A	105	A:ASP105	HBond	35
GLU_A	144	A:GLU144	HBond	252
GLN_A	168	A:GLN168	HBond	246
TPO_A	172	A:TPO172	HBond	5995
VAL_A	176	A:VAL176	HBond	35
THR_A	177	A:THR177	HBond	78
GLY_A	216	A:GLY216	HBond	1
ASN_A	217	A:ASN217	HBond	1
ATP_A	304	A:ATP304	HBond	1545
VAL_A	14	A:VAL14	Hydrophobic	124
ALA_A	16	A:ALA16	Hydrophobic	394
TYR_A	17	A:TYR17	Hydrophobic	1503
PRO_A	40	A:PRO40	Hydrophobic	663
LEU_A	161	A:LEU161	Hydrophobic	55
ALA_A	170	A:ALA170	Hydrophobic	77
LEU_A	171	A:LEU171	Hydrophobic	14
VAL_A	175	A:VAL175	Hydrophobic	212
VAL_A	176	A:VAL176	Hydrophobic	178
LEU_A	178	A:LEU178	Hydrophobic	35
TRP_A	179	A:TRP179	Hydrophobic	21
PRO_A	212	A:PRO212	Hydrophobic	9
CYS_A	215	A:CYS215	Hydrophobic	22
GLU_A	11	A:GLU11	Ionic	42
ASP_A	84	A:ASP84	Ionic	312
ARG_A	85	A:ARG85	Ionic	1
GLU_A	86	A:GLU86	Ionic	96
ASP_A	99	A:ASP99	Ionic	9
ASP_A	105	A:ASP105	Ionic	2

ASP_A	140	A:ASP140	Ionic	41
GLU_A	144	A:GLU144	Ionic	184
ARG_A	163	A:ARG163	Ionic	18
TPO_A	172	A:TPO172	Ionic	10
ATP_A	304	A:ATP304	Ionic	557
GLU_A	11	A:GLU11	Water Bridges	322
ILE_A	12	A:ILE12	Water Bridges	109
GLY_A	13	A:GLY13	Water Bridges	1
VAL_A	14	A:VAL14	Water Bridges	390
GLY_A	15	A:GLY15	Water Bridges	228
ALA_A	16	A:ALA16	Water Bridges	778
TYR_A	17	A:TYR17	Water Bridges	1668
GLY_A	18	A:GLY18	Water Bridges	11
THR_A	19	A:THR19	Water Bridges	1
ARG_A	38	A:ARG38	Water Bridges	1706
PRO_A	40	A:PRO40	Water Bridges	5
ASN_A	41	A:ASN41	Water Bridges	1
GLY_A	43	A:GLY43	Water Bridges	3
SER_A	52	A:SER52	Water Bridges	535
THR_A	53	A:THR53	Water Bridges	2297
ARG_A	55	A:ARG55	Water Bridges	3
GLU_A	56	A:GLU56	Water Bridges	3535
SER_A	81	A:SER81	Water Bridges	52
THR_A	83	A:THR83	Water Bridges	213
ASP_A	84	A:ASP84	Water Bridges	777
ARG_A	85	A:ARG85	Water Bridges	143
GLU_A	86	A:GLU86	Water Bridges	870
ILE_A	87	A:ILE87	Water Bridges	1
LYS_A	88	A:LYS88	Water Bridges	29
ASP_A	99	A:ASP99	Water Bridges	510
ARG_A	101	A:ARG101	Water Bridges	1
THR_A	102	A:THR102	Water Bridges	20
ASP_A	105	A:ASP105	Water Bridges	56
ARG_A	139	A:ARG139	Water Bridges	302
ASP_A	140	A:ASP140	Water Bridges	117
LYS_A	142	A:LYS142	Water Bridges	15
GLU_A	144	A:GLU144	Water Bridges	407
ASP_A	158	A:ASP158	Water Bridges	91
GLY_A	160	A:GLY160	Water Bridges	4
ALA_A	162	A:ALA162	Water Bridges	3
ARG_A	163	A:ARG163	Water Bridges	127

TYR_A	167	A:TYR167	Water Bridges	83
GLN_A	168	A:GLN168	Water Bridges	816
ALA_A	170	A:ALA170	Water Bridges	96
LEU_A	171	A:LEU171	Water Bridges	4
TPO_A	172	A:TPO172	Water Bridges	2036
VAL_A	174	A:VAL174	Water Bridges	1
VAL_A	176	A:VAL176	Water Bridges	370
THR_A	177	A:THR177	Water Bridges	431
ARG_A	210	A:ARG210	Water Bridges	6
CYS_A	215	A:CYS215	Water Bridges	18
GLY_A	216	A:GLY216	Water Bridges	15
ASN_A	217	A:ASN217	Water Bridges	14
ATP_A	304	A:ATP304	Water Bridges	4972
HOH_A	306	A:HOH306	Water Bridges	7

Interacción proteína-peptido en Modelo 2- Restraint 1:

Res_chain	Resid	Resinfo	Type	Interact
TYR_A	17	A:TYR17	HBond	172
ARG_A	38	A:ARG38	HBond	4
GLY_A	43	A:GLY43	HBond	1
GLY_A	44	A:GLY44	HBond	482
GLY_A	45	A:GLY45	HBond	243
SER_A	52	A:SER52	HBond	559
ARG_A	85	A:ARG85	HBond	8
GLU_A	86	A:GLU86	HBond	641
ASP_A	140	A:ASP140	HBond	29
LYS_A	142	A:LYS142	HBond	9
TYR_A	167	A:TYR167	HBond	1571
GLN_A	168	A:GLN168	HBond	3002
ALA_A	170	A:ALA170	HBond	1
TPO_A	172	A:TPO172	HBond	5870
VAL_A	176	A:VAL176	HBond	191
THR_A	177	A:THR177	HBond	2653
GLY_A	216	A:GLY216	HBond	243
ASN_A	217	A:ASN217	HBond	20
GLU_A	219	A:GLU219	HBond	3549
GLN_A	222	A:GLN222	HBond	2207
ATP_A	304	A:ATP304	HBond	2832
ALA_A	16	A:ALA16	Hydrophobic	467

TYR_A	17	A:TYR17	Hydrophobic	953
PRO_A	40	A:PRO40	Hydrophobic	370
TYR_A	167	A:TYR167	Hydrophobic	1331
ALA_A	170	A:ALA170	Hydrophobic	1099
LEU_A	171	A:LEU171	Hydrophobic	268
VAL_A	175	A:VAL175	Hydrophobic	285
VAL_A	176	A:VAL176	Hydrophobic	202
LEU_A	178	A:LEU178	Hydrophobic	83
TRP_A	179	A:TRP179	Hydrophobic	12
ARG_A	55	A:ARG55	Ionic	1
GLU_A	56	A:GLU56	Ionic	1
ARG_A	163	A:ARG163	Ionic	2
TPO_A	172	A:TPO172	Ionic	14
GLU_A	219	A:GLU219	Ionic	29
ALA_A	16	A:ALA16	Water Bridges	155
TYR_A	17	A:TYR17	Water Bridges	1369
ARG_A	38	A:ARG38	Water Bridges	1161
PRO_A	40	A:PRO40	Water Bridges	984
ASN_A	41	A:ASN41	Water Bridges	30
GLY_A	42	A:GLY42	Water Bridges	986
GLY_A	43	A:GLY43	Water Bridges	13
GLY_A	44	A:GLY44	Water Bridges	444
GLY_A	45	A:GLY45	Water Bridges	184
ILE_A	51	A:ILE51	Water Bridges	98
SER_A	52	A:SER52	Water Bridges	1168
THR_A	53	A:THR53	Water Bridges	160
ARG_A	55	A:ARG55	Water Bridges	22
GLU_A	56	A:GLU56	Water Bridges	62
ARG_A	85	A:ARG85	Water Bridges	101
GLU_A	86	A:GLU86	Water Bridges	309
ARG_A	139	A:ARG139	Water Bridges	3
ASP_A	140	A:ASP140	Water Bridges	467
LYS_A	142	A:LYS142	Water Bridges	309
ASP_A	158	A:ASP158	Water Bridges	1
ARG_A	163	A:ARG163	Water Bridges	107
SER_A	166	A:SER166	Water Bridges	8
TYR_A	167	A:TYR167	Water Bridges	1034
GLN_A	168	A:GLN168	Water Bridges	2829
MET_A	169	A:MET169	Water Bridges	20
ALA_A	170	A:ALA170	Water Bridges	693
LEU_A	171	A:LEU171	Water Bridges	314

TPO_A	172	A:TPO172	Water Bridges	274
VAL_A	174	A:VAL174	Water Bridges	5
VAL_A	175	A:VAL175	Water Bridges	10
VAL_A	176	A:VAL176	Water Bridges	1315
THR_A	177	A:THR177	Water Bridges	1291
LEU_A	178	A:LEU178	Water Bridges	54
TRP_A	179	A:TRP179	Water Bridges	51
GLY_A	216	A:GLY216	Water Bridges	1285
ASN_A	217	A:ASN217	Water Bridges	289
SER_A	218	A:SER218	Water Bridges	38
GLU_A	219	A:GLU219	Water Bridges	1503
GLN_A	222	A:GLN222	Water Bridges	1841
ATP_A	304	A:ATP304	Water Bridges	1140

Interacción proteína-péptido en Modelo 2- Restraint 2:

Res_chain	Resid	Resinfo	Type	Interact
GLY_A	15	A:GLY15	HBond	1
ALA_A	16	A:ALA16	HBond	5
TYR_A	17	A:TYR17	HBond	35
ARG_A	38	A:ARG38	HBond	431
PRO_A	40	A:PRO40	HBond	8
ASN_A	41	A:ASN41	HBond	87
GLY_A	42	A:GLY42	HBond	22
GLY_A	43	A:GLY43	HBond	60
GLY_A	44	A:GLY44	HBond	14
GLY_A	45	A:GLY45	HBond	1
SER_A	52	A:SER52	HBond	2
ASP_A	84	A:ASP84	HBond	8
ARG_A	85	A:ARG85	HBond	4832
GLU_A	86	A:GLU86	HBond	2295
ARG_A	139	A:ARG139	HBond	192
ASP_A	140	A:ASP140	HBond	56
LYS_A	142	A:LYS142	HBond	847
TPO_A	172	A:TPO172	HBond	45
VAL_A	175	A:VAL175	HBond	61
VAL_A	176	A:VAL176	HBond	10
THR_A	177	A:THR177	HBond	16
TYR_A	180	A:TYR180	HBond	1
ATP_A	304	A:ATP304	HBond	6881

ALA_A	16	A:ALA16	Hydrophobic	587
TYR_A	17	A:TYR17	Hydrophobic	787
PRO_A	40	A:PRO40	Hydrophobic	134
LEU_A	171	A:LEU171	Hydrophobic	2
VAL_A	174	A:VAL174	Hydrophobic	31
VAL_A	175	A:VAL175	Hydrophobic	37
VAL_A	176	A:VAL176	Hydrophobic	40
LEU_A	178	A:LEU178	Hydrophobic	395
TYR_A	180	A:TYR180	Hydrophobic	25
ARG_A	38	A:ARG38	Ionic	66
ARG_A	85	A:ARG85	Ionic	95
LYS_A	88	A:LYS88	Ionic	2
ATP_A	304	A:ATP304	Ionic	420
VAL_A	14	A:VAL14	Water Bridges	62
GLY_A	15	A:GLY15	Water Bridges	369
ALA_A	16	A:ALA16	Water Bridges	301
TYR_A	17	A:TYR17	Water Bridges	86
THR_A	19	A:THR19	Water Bridges	19
ARG_A	38	A:ARG38	Water Bridges	716
PRO_A	40	A:PRO40	Water Bridges	12
ASN_A	41	A:ASN41	Water Bridges	532
GLY_A	42	A:GLY42	Water Bridges	484
GLY_A	43	A:GLY43	Water Bridges	371
GLY_A	44	A:GLY44	Water Bridges	148
GLY_A	45	A:GLY45	Water Bridges	32
GLY_A	46	A:GLY46	Water Bridges	2
GLY_A	48	A:GLY48	Water Bridges	4
ILE_A	51	A:ILE51	Water Bridges	10
SER_A	52	A:SER52	Water Bridges	34
THR_A	53	A:THR53	Water Bridges	29
GLU_A	56	A:GLU56	Water Bridges	6
ASP_A	84	A:ASP84	Water Bridges	56
ARG_A	85	A:ARG85	Water Bridges	1696
GLU_A	86	A:GLU86	Water Bridges	1051
LYS_A	88	A:LYS88	Water Bridges	7
ARG_A	139	A:ARG139	Water Bridges	444
ASP_A	140	A:ASP140	Water Bridges	2714
LYS_A	142	A:LYS142	Water Bridges	443
GLU_A	144	A:GLU144	Water Bridges	233
ASN_A	145	A:ASN145	Water Bridges	4
ASP_A	158	A:ASP158	Water Bridges	119

ARG_A	163	A:ARG163	Water Bridges	12
ALA_A	170	A:ALA170	Water Bridges	8
LEU_A	171	A:LEU171	Water Bridges	3
TPO_A	172	A:TPO172	Water Bridges	840
VAL_A	174	A:VAL174	Water Bridges	235
VAL_A	175	A:VAL175	Water Bridges	311
VAL_A	176	A:VAL176	Water Bridges	28
THR_A	177	A:THR177	Water Bridges	177
TYR_A	180	A:TYR180	Water Bridges	90
ARG_A	181	A:ARG181	Water Bridges	210
ASN_A	217	A:ASN217	Water Bridges	1
ATP_A	304	A:ATP304	Water Bridges	2525

Interacción proteína-peptido en Modelo 3 – Libre:

Res_chain	Resid	Resinfo	Type	Interact
GLU_A	11	A:GLU11	HBond	4158
ILE_A	12	A:ILE12	HBond	6
GLY_A	13	A:GLY13	HBond	6
VAL_A	14	A:VAL14	HBond	21
GLY_A	15	A:GLY15	HBond	1
ALA_A	16	A:ALA16	HBond	4
THR_A	19	A:THR19	HBond	1050
ARG_A	38	A:ARG38	HBond	154
ASP_A	84	A:ASP84	HBond	4
ARG_A	85	A:ARG85	HBond	3
GLU_A	86	A:GLU86	HBond	594
LYS_A	88	A:LYS88	HBond	2
HIS_A	95	A:HIS95	HBond	5
VAL_A	96	A:VAL96	HBond	1
ASP_A	97	A:ASP97	HBond	237
GLN_A	98	A:GLN98	HBond	2
ASP_A	99	A:ASP99	HBond	5360
THR_A	102	A:THR102	HBond	1
ASP_A	105	A:ASP105	HBond	6982
LYS_A	106	A:LYS106	HBond	242
ARG_A	139	A:ARG139	HBond	1
ASP_A	140	A:ASP140	HBond	12
GLU_A	144	A:GLU144	HBond	6
THR_A	177	A:THR177	HBond	518

TRP_A	179	A:TRP179	HBond	8
GLU_A	206	A:GLU206	HBond	11
ARG_A	210	A:ARG210	HBond	4
ATP_A	304	A:ATP304	HBond	115
ILE_A	12	A:ILE12	Hydrophobic	18
VAL_A	14	A:VAL14	Hydrophobic	645
ALA_A	16	A:ALA16	Hydrophobic	60
VAL_A	175	A:VAL175	Hydrophobic	5
TRP_A	179	A:TRP179	Hydrophobic	103
PRO_A	212	A:PRO212	Hydrophobic	1
GLU_A	11	A:GLU11	Ionic	118
ARG_A	38	A:ARG38	Ionic	7
ARG_A	85	A:ARG85	Ionic	3
GLU_A	86	A:GLU86	Ionic	1
LYS_A	88	A:LYS88	Ionic	18
ASP_A	99	A:ASP99	Ionic	15
ASP_A	105	A:ASP105	Ionic	174
GLU_A	144	A:GLU144	Ionic	4
GLU_A	206	A:GLU206	Ionic	3
VAL_A	9	A:VAL9	Water Bridges	40
GLU_A	11	A:GLU11	Water Bridges	1459
ILE_A	12	A:ILE12	Water Bridges	620
GLY_A	13	A:GLY13	Water Bridges	40
VAL_A	14	A:VAL14	Water Bridges	346
GLY_A	15	A:GLY15	Water Bridges	81
ALA_A	16	A:ALA16	Water Bridges	60
TYR_A	17	A:TYR17	Water Bridges	2
GLY_A	18	A:GLY18	Water Bridges	1
THR_A	19	A:THR19	Water Bridges	375
TYR_A	21	A:TYR21	Water Bridges	8
LYS_A	22	A:LYS22	Water Bridges	152
ARG_A	38	A:ARG38	Water Bridges	146
THR_A	83	A:THR83	Water Bridges	7
ASP_A	84	A:ASP84	Water Bridges	5
ARG_A	85	A:ARG85	Water Bridges	26
GLU_A	86	A:GLU86	Water Bridges	27
LYS_A	88	A:LYS88	Water Bridges	25
HIS_A	95	A:HIS95	Water Bridges	108
VAL_A	96	A:VAL96	Water Bridges	18
ASP_A	97	A:ASP97	Water Bridges	281
GLN_A	98	A:GLN98	Water Bridges	49

ASP_A	99	A:ASP99	Water Bridges	47
ARG_A	101	A:ARG101	Water Bridges	8
THR_A	102	A:THR102	Water Bridges	581
LEU_A	104	A:LEU104	Water Bridges	6
ASP_A	105	A:ASP105	Water Bridges	3255
LYS_A	106	A:LYS106	Water Bridges	515
ARG_A	139	A:ARG139	Water Bridges	110
ASP_A	140	A:ASP140	Water Bridges	121
LYS_A	142	A:LYS142	Water Bridges	131
GLU_A	144	A:GLU144	Water Bridges	225
TPO_A	172	A:TPO172	Water Bridges	29
VAL_A	175	A:VAL175	Water Bridges	1
THR_A	177	A:THR177	Water Bridges	228
TRP_A	179	A:TRP179	Water Bridges	64
GLU_A	206	A:GLU206	Water Bridges	30
ARG_A	210	A:ARG210	Water Bridges	44
LYS_A	211	A:LYS211	Water Bridges	1
ASN_A	217	A:ASN217	Water Bridges	1
ATP_A	304	A:ATP304	Water Bridges	579

Interacción proteína-péptido en Modelo 3 – Restraint 1:

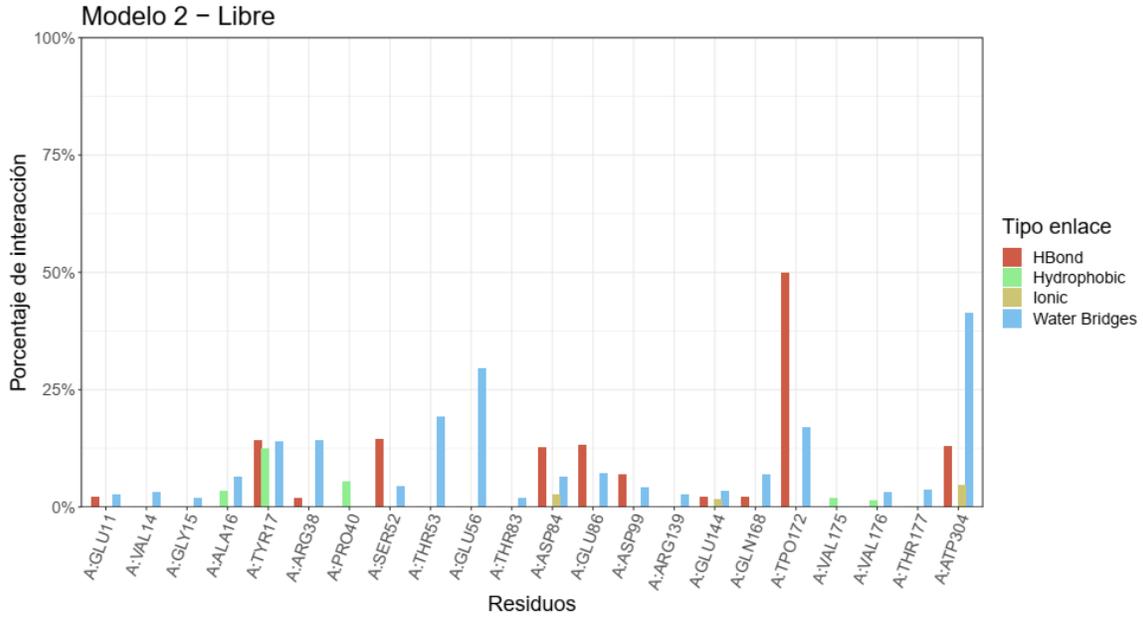
Res_chain	Resid	Resinfo	Type	Interact
GLU_A	11	A:GLU11	HBond	1728
ILE_A	12	A:ILE12	HBond	417
VAL_A	14	A:VAL14	HBond	150
GLY_A	15	A:GLY15	HBond	274
ALA_A	16	A:ALA16	HBond	167
TYR_A	17	A:TYR17	HBond	534
THR_A	19	A:THR19	HBond	574
ARG_A	38	A:ARG38	HBond	18
PRO_A	40	A:PRO40	HBond	3
ASN_A	41	A:ASN41	HBond	324
GLY_A	42	A:GLY42	HBond	8
GLY_A	43	A:GLY43	HBond	324
GLY_A	44	A:GLY44	HBond	21
GLY_A	45	A:GLY45	HBond	21
GLY_A	46	A:GLY46	HBond	24
THR_A	83	A:THR83	HBond	14
ASP_A	84	A:ASP84	HBond	526

ARG_A	85	A:ARG85	HBond	2979
GLU_A	86	A:GLU86	HBond	1285
ASP_A	99	A:ASP99	HBond	49
ARG_A	101	A:ARG101	HBond	1
THR_A	102	A:THR102	HBond	97
ASP_A	105	A:ASP105	HBond	388
ARG_A	139	A:ARG139	HBond	3
LYS_A	142	A:LYS142	HBond	294
GLU_A	144	A:GLU144	HBond	777
VAL_A	176	A:VAL176	HBond	11
THR_A	177	A:THR177	HBond	53
TRP_A	179	A:TRP179	HBond	7
GLY_A	216	A:GLY216	HBond	1
ASN_A	217	A:ASN217	HBond	25
SER_A	218	A:SER218	HBond	2
GLU_A	219	A:GLU219	HBond	173
ATP_A	304	A:ATP304	HBond	2912
VAL_A	14	A:VAL14	Hydrophobic	600
ALA_A	16	A:ALA16	Hydrophobic	361
TYR_A	17	A:TYR17	Hydrophobic	985
VAL_A	37	A:VAL37	Hydrophobic	9
PRO_A	40	A:PRO40	Hydrophobic	293
PRO_A	50	A:PRO50	Hydrophobic	4
LEU_A	161	A:LEU161	Hydrophobic	2
LEU_A	171	A:LEU171	Hydrophobic	2
VAL_A	175	A:VAL175	Hydrophobic	274
VAL_A	176	A:VAL176	Hydrophobic	27
TRP_A	179	A:TRP179	Hydrophobic	121
PRO_A	212	A:PRO212	Hydrophobic	2
GLU_A	11	A:GLU11	Ionic	127
ARG_A	38	A:ARG38	Ionic	20
ASP_A	84	A:ASP84	Ionic	13
ARG_A	85	A:ARG85	Ionic	17
GLU_A	86	A:GLU86	Ionic	1043
ASP_A	99	A:ASP99	Ionic	78
ASP_A	105	A:ASP105	Ionic	52
GLU_A	144	A:GLU144	Ionic	39
GLU_A	219	A:GLU219	Ionic	9
GLU_A	11	A:GLU11	Water Bridges	610
ILE_A	12	A:ILE12	Water Bridges	52
GLY_A	13	A:GLY13	Water Bridges	62

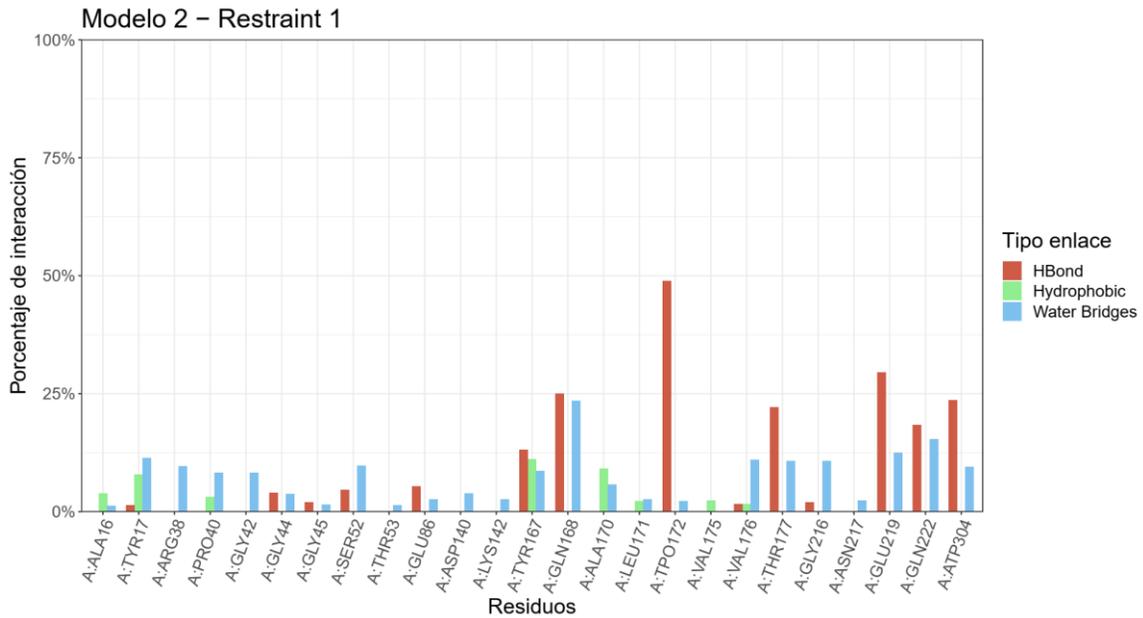
VAL_A	14	A:VAL14	Water Bridges	994
GLY_A	15	A:GLY15	Water Bridges	637
ALA_A	16	A:ALA16	Water Bridges	941
TYR_A	17	A:TYR17	Water Bridges	1350
GLY_A	18	A:GLY18	Water Bridges	21
THR_A	19	A:THR19	Water Bridges	213
TYR_A	21	A:TYR21	Water Bridges	17
ARG_A	38	A:ARG38	Water Bridges	1057
PRO_A	40	A:PRO40	Water Bridges	5
ASN_A	41	A:ASN41	Water Bridges	747
GLY_A	42	A:GLY42	Water Bridges	8
GLY_A	43	A:GLY43	Water Bridges	135
GLY_A	44	A:GLY44	Water Bridges	562
GLY_A	45	A:GLY45	Water Bridges	291
GLY_A	46	A:GLY46	Water Bridges	247
GLY_A	47	A:GLY47	Water Bridges	4
GLY_A	48	A:GLY48	Water Bridges	2
ILE_A	51	A:ILE51	Water Bridges	3
SER_A	52	A:SER52	Water Bridges	4
THR_A	53	A:THR53	Water Bridges	10
THR_A	83	A:THR83	Water Bridges	453
ASP_A	84	A:ASP84	Water Bridges	432
ARG_A	85	A:ARG85	Water Bridges	2236
GLU_A	86	A:GLU86	Water Bridges	949
LYS_A	88	A:LYS88	Water Bridges	59
ASP_A	99	A:ASP99	Water Bridges	952
ARG_A	101	A:ARG101	Water Bridges	1
THR_A	102	A:THR102	Water Bridges	94
ASP_A	105	A:ASP105	Water Bridges	607
LYS_A	106	A:LYS106	Water Bridges	4
ARG_A	139	A:ARG139	Water Bridges	1183
ASP_A	140	A:ASP140	Water Bridges	164
LYS_A	142	A:LYS142	Water Bridges	777
GLU_A	144	A:GLU144	Water Bridges	894
GLY_A	160	A:GLY160	Water Bridges	1
ARG_A	163	A:ARG163	Water Bridges	3
TPO_A	172	A:TPO172	Water Bridges	1107
VAL_A	176	A:VAL176	Water Bridges	86
THR_A	177	A:THR177	Water Bridges	849
LEU_A	178	A:LEU178	Water Bridges	3
TRP_A	179	A:TRP179	Water Bridges	24

ARG_A	181	A:ARG181	Water Bridges	2
GLY_A	216	A:GLY216	Water Bridges	12
ASN_A	217	A:ASN217	Water Bridges	101
SER_A	218	A:SER218	Water Bridges	3
GLU_A	219	A:GLU219	Water Bridges	53
GLN_A	222	A:GLN222	Water Bridges	5
ATP_A	304	A:ATP304	Water Bridges	1171
HOH_A	306	A:HOH306	Water Bridges	55

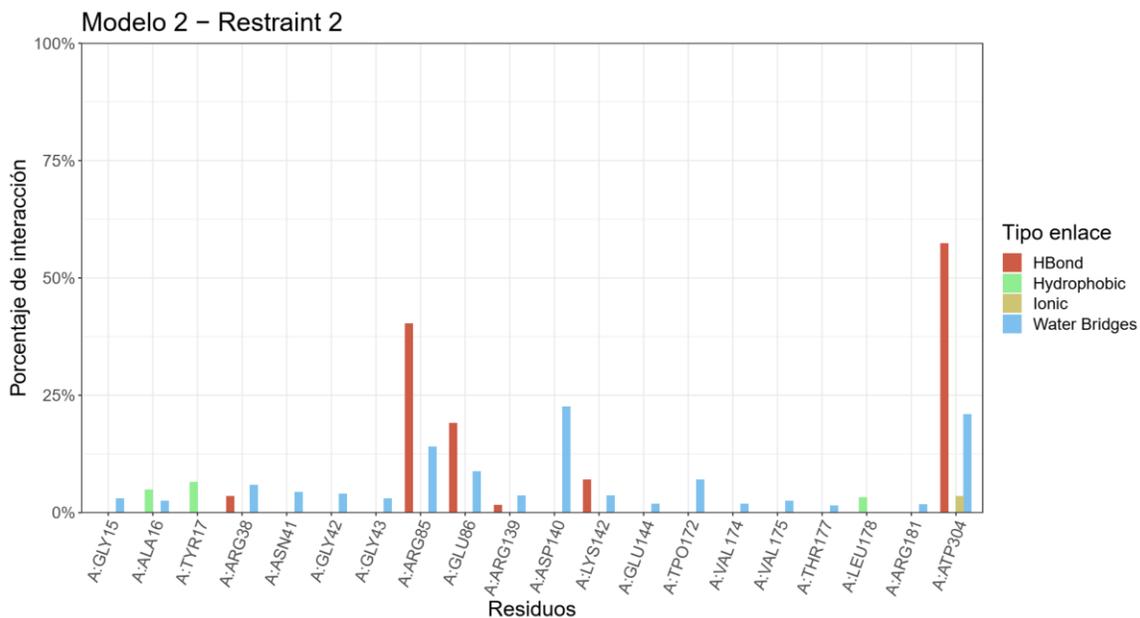
Material Suplementario 4: Gráficos de interacción:



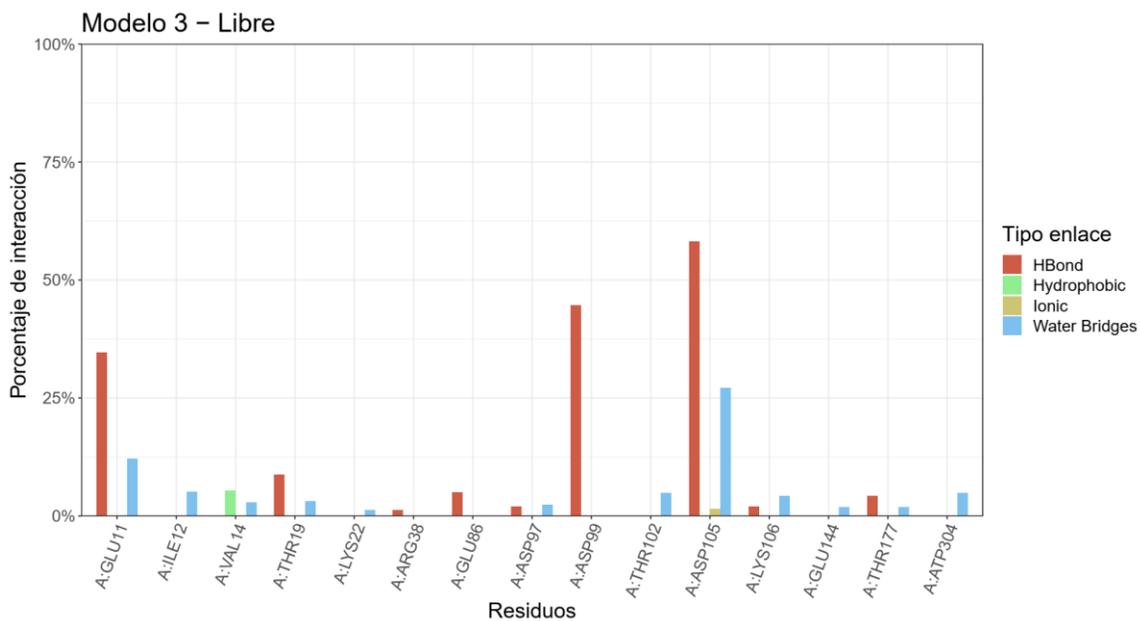
Residuos de CDK4 que interactúan con el péptido de Rb en Modelo 2 sin restricción.



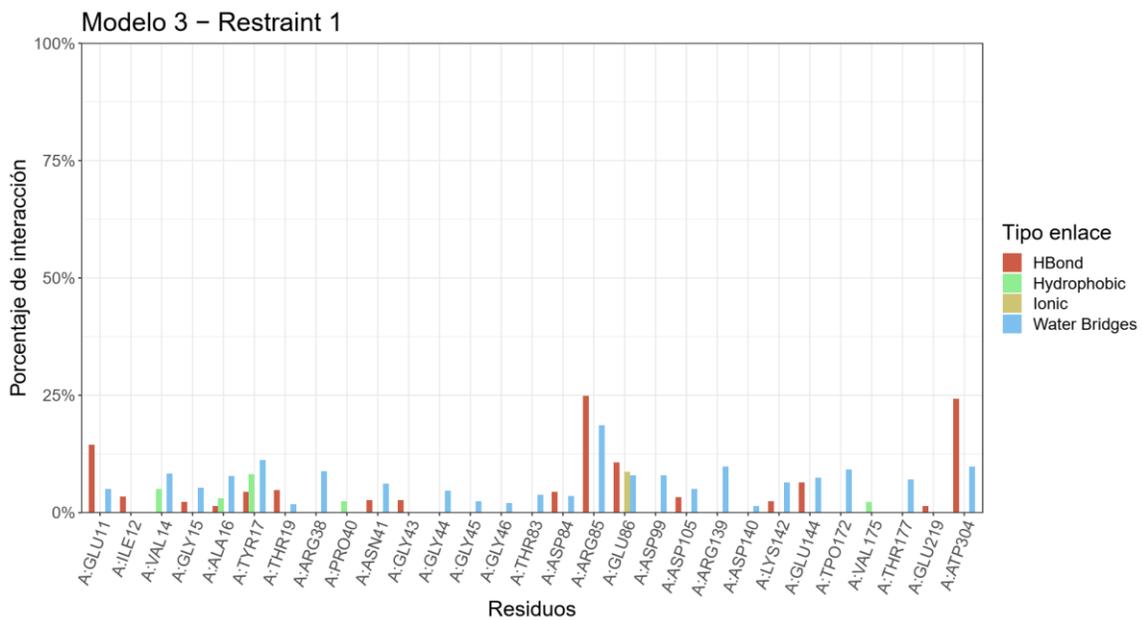
Residuos de CDK4 que interactúan con el péptido de Rb en Modelo 2 con Restraint 1.



Residuos de CDK4 que interactúan con el péptido de Rb en Modelo 2 con Restraint 2.

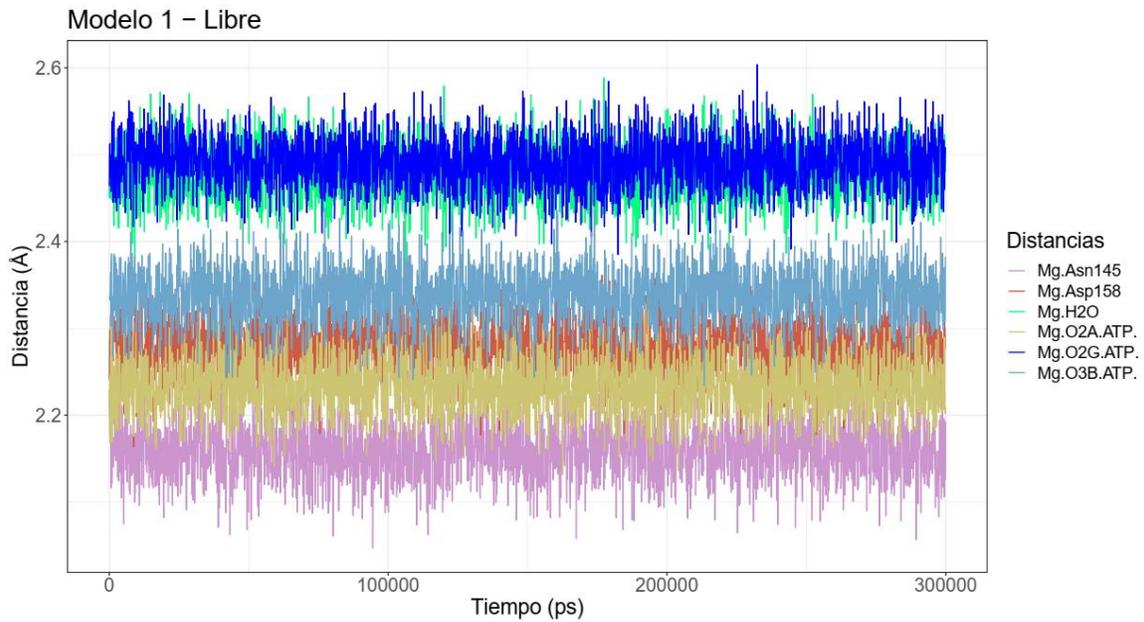


Residuos de CDK4 que interactúan con el péptido de Rb en Modelo 3 sin restricción.

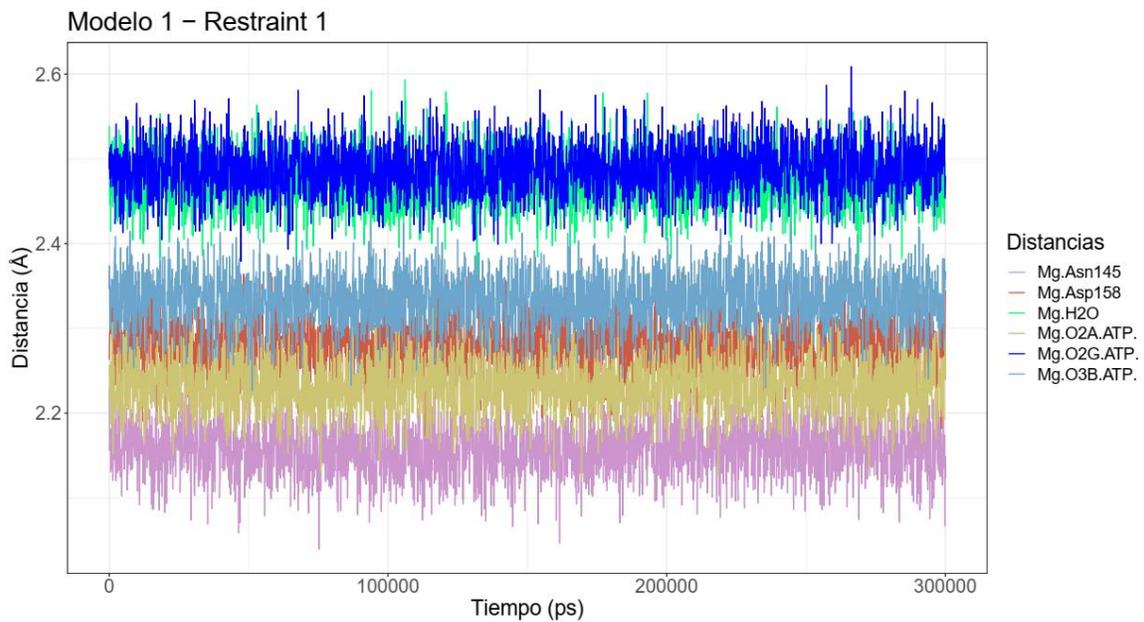


Residuos de CDK4 que interactúan con el péptido de Rb en Modelo 3 con Restraint 1.

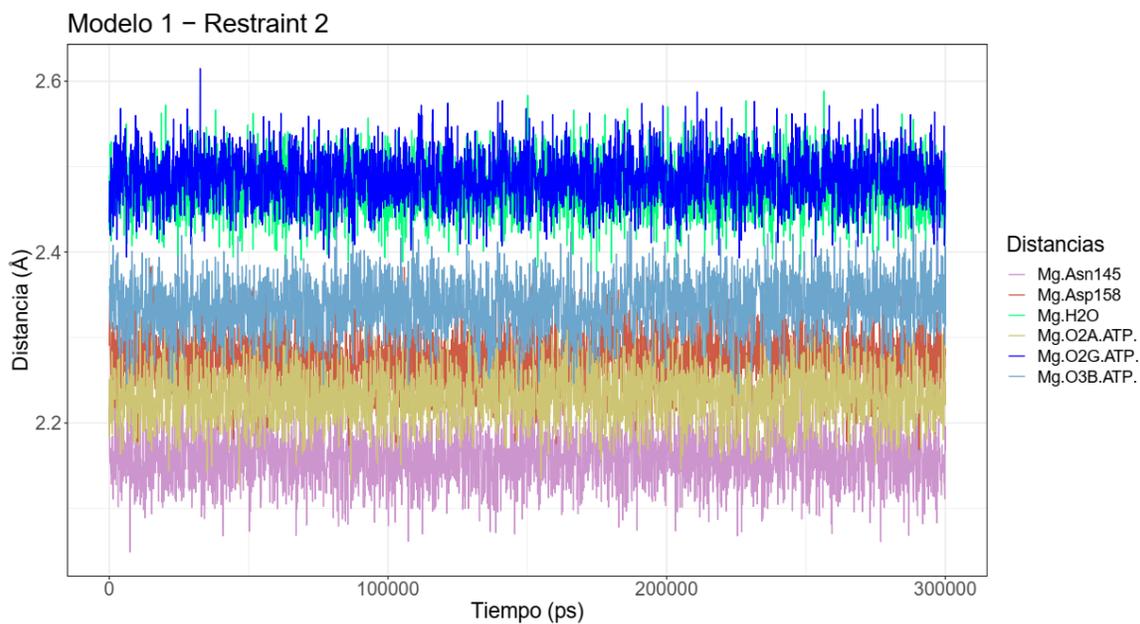
Material Suplementario 5: Distancias en coordinación del ion magnesio en sitio activo



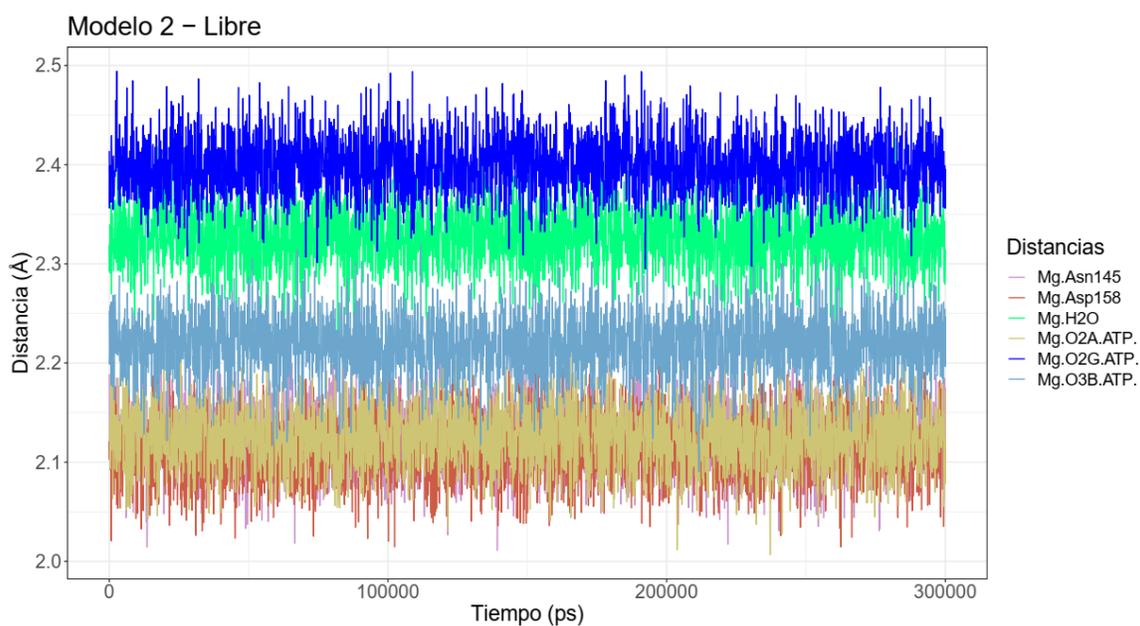
Distancias de la coordinación octaédrica del Mg^{2+} en Modelo 1 sin restricción.



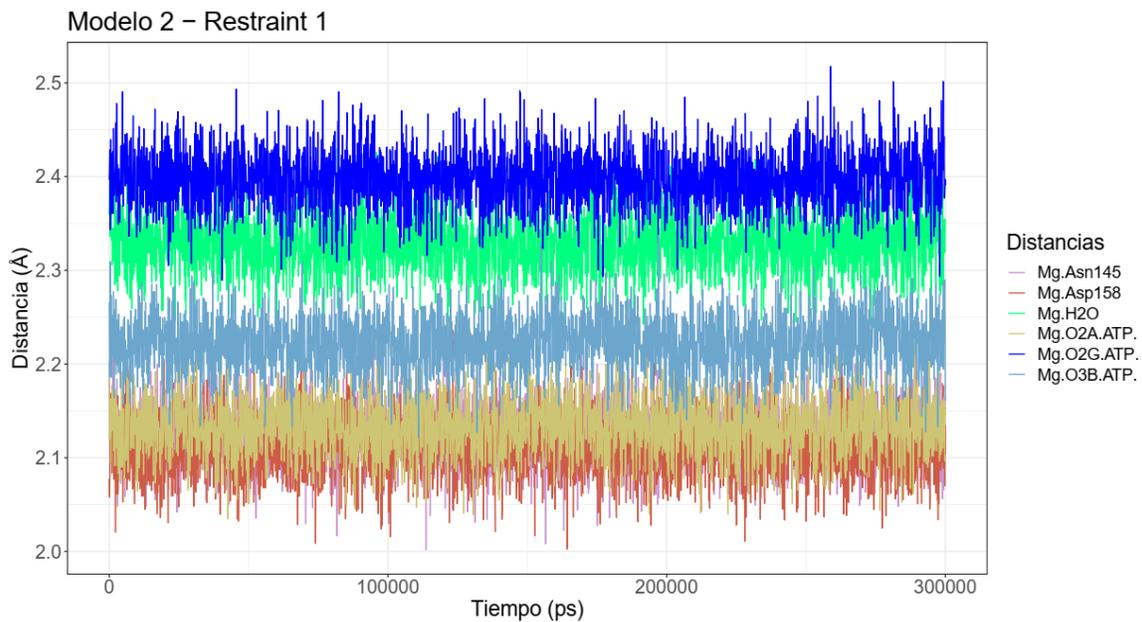
Distancias de la coordinación octaédrica del Mg^{2+} en Modelo 1 con restricción 1.



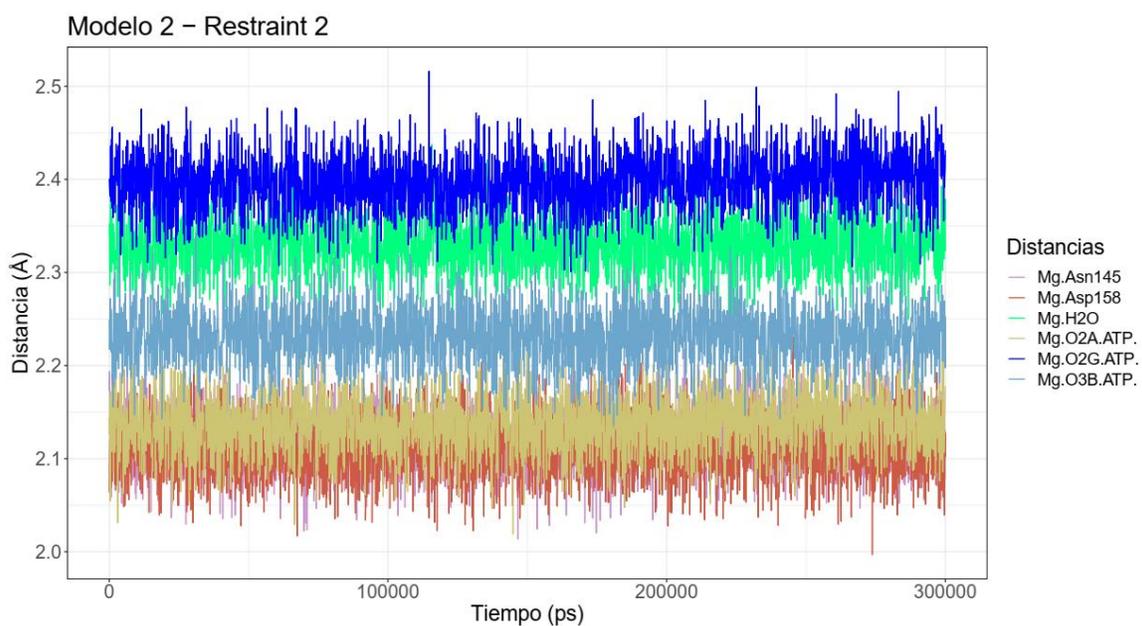
Distancias de la coordinación octaédrica del Mg^{2+} en Modelo 1 con restricción 2



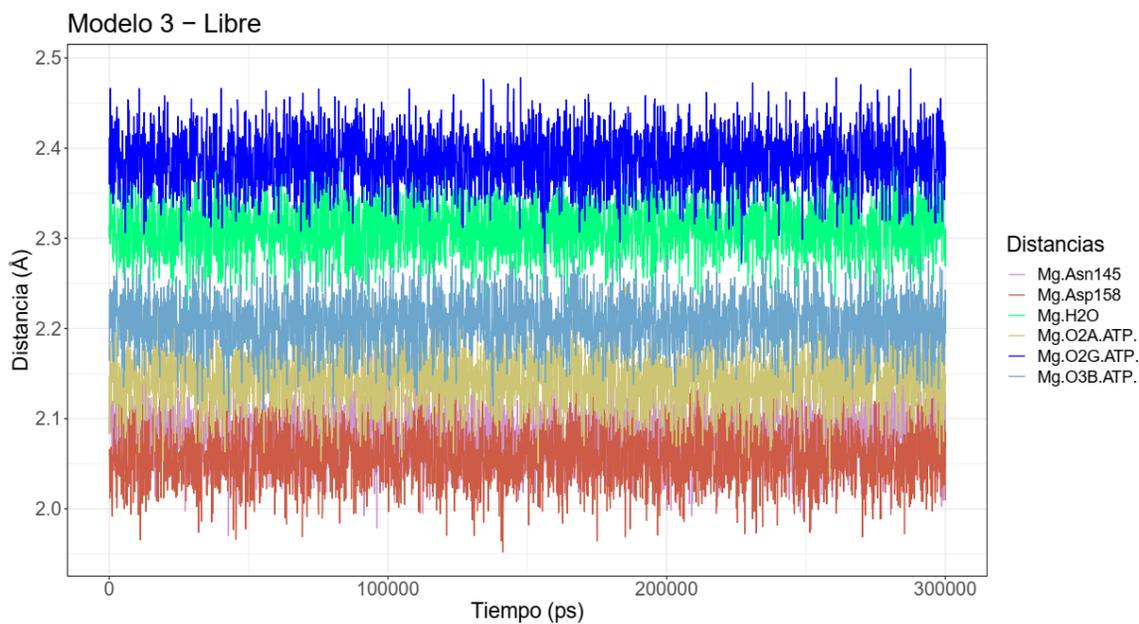
Distancias de la coordinación octaédrica del Mg^{2+} en Modelo 2 sin restricción..



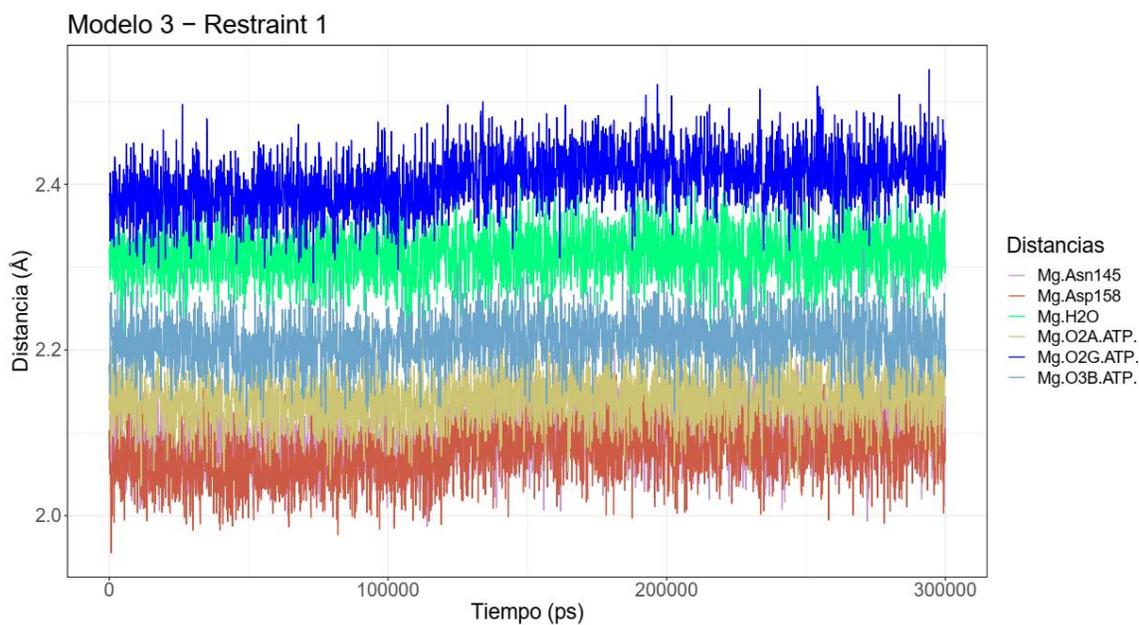
Distancias de la coordinación octaédrica del Mg^{2+} en Modelo 2 con restricción 1.



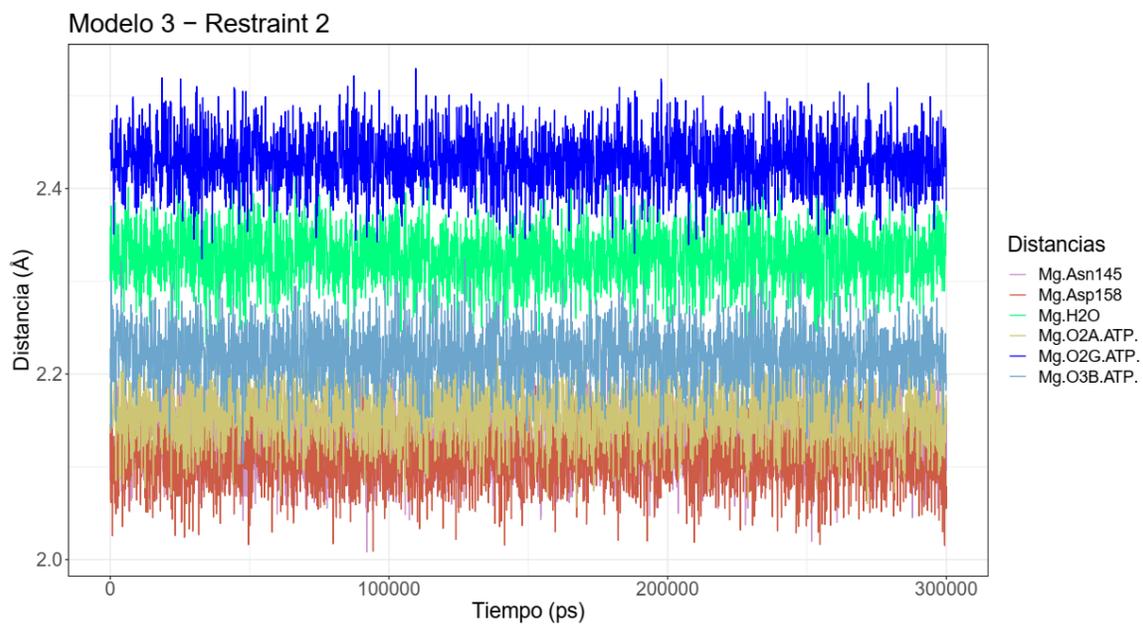
Distancias de la coordinación octaédrica del Mg^{2+} en Modelo 2 con restricción 2



Distancias de la coordinación octaédrica del Mg^{2+} en Modelo 3 sin restricción.



Distancias de la coordinación octaédrica del Mg^{2+} en Modelo 2 con restricción 1.



Distancias de la coordinación octaédrica del Mg^{2+} en Modelo 2 con restricción 2.