



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIOS TEÓRICOS PRÁCTICOS DE LAS INTERACCIONES CALMODULINA-  
PÉPTIDOS PARA EL DESARROLLO DE BIOFÁRMACOS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
Erika León Cruz

TUTOR PRINCIPAL  
Dr. Martín González Andrade  
[Facultad de Medicina](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Georgina Garza Ramos <a href="#">Facultad de Medicina</a>	Dr. Gabriel del Rio Guerra <a href="#">Instituto de Fisiología Celular</a>
---	---

Ciudad de México. Noviembre, 2018.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO**

PRESIDENTE: Rodríguez Sotres Rogelio  
VOCAL: Rivera Chávez José Alberto  
VOCAL: Sosa Peinado Alejandro  
VOCAL: Corzo Burguete Gerardo Alfonso  
SECRETARIO: Rodríguez Romero Adela

Lugar donde se realizó el trabajo de tesis:  
3er. Piso, Torre de Investigación, Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina, UNAM

ASESOR: \_\_\_\_\_  
Dr. Martín González Andrade

SUSTENTANTE: \_\_\_\_\_  
Q.F.B. Erika León Cruz

# DEDICATORIA

## AGRADECIMIENTOS

A la universidad Nacional Autónoma de México que, a través del Posgrado en Ciencias Bioquímicas, me permitió continuar y enriquecer mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría (Registro No. 779858).

A la Facultad de Medicina, Torre de Investigación, por permitirme llevar a cabo este trabajo dentro de sus instalaciones.

A la Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC) de la UNAM, que a través del proyecto LANCAD-UNAM-DGTIC-313, me permitió llevar a cabo las simulaciones de MD en su sistema de supercomputo Miztli.

Al Dr. Martín González Andrade, por el inestimable apoyo y asesoría para la realización de este trabajo en conjunto.

A la Dra. Isabel Velázquez López, por el apoyo técnico brindado.

A la Dra. Georgina Garza Ramos y al Dr. Gabriel del Río Guerra, miembros del Comité Tutor, por la aportación de sus comentarios y observaciones que enriquecieron este trabajo.

A los miembros del jurado asignado, por emitir sus observaciones y comentarios al presente escrito.

# ÍNDICE

i. LISTA DE FIGURAS.....	7
ii. LISTA DE TABLAS .....	9
iii. LISTA DE ABREVIATURAS .....	10
I. RESUMEN .....	12
II. ANTECEDENTES .....	14
Interacciones proteína-proteína .....	14
Señalización de calcio .....	15
Calmodulina .....	16
Blancos moleculares regulados por la calmodulina .....	17
Proteína nNOS .....	19
Proteína skMLCK.....	21
Participación del ion calcio en la activación de las enzimas .....	23
Métodos para la detección de las interacciones CaM-ligando .....	24
Fármacos dirigidos contra la CaM .....	26
Biofármacos .....	27
Péptidos: Componentes biológicos utilizados en la terapéutica.....	29
Interacción proteína CaM-péptido.....	31
Metodologías empleadas en el diseño de péptidos .....	33
III. JUSTIFICACIÓN .....	34
IV. OBJETIVO GENERAL .....	35
V. OBJETIVOS PARTICULARES .....	35
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
Determinación de la concentración de calcio saturante para el biosensor <i>hCaM-M124C-mBBR</i> .....	36
Simulación de MD de la CaM en unión a $Ca^{2+}$ .....	36
Estimación de las constantes de disociación ( $K_d$ ) de los péptidos con el biosensor fluorescente de CaM.....	37
Construcción de modelos estructurales y simulación de MD de los complejos CaM-péptidos .....	37
Parámetros energéticos de unión calculadas por MM/PBSA .....	38
Análisis de las simulaciones de MD para los complejos CaM-péptidos.....	39

Ensayos de competencia de las proteínas skMLCK, nNOS y moléculas bioactivas empleando el biosensor <i>hCaM-M124C-mBBr</i> .....	39
Construcción de los modelos estructurales para los complejos CaM-proteínas .....	40
Diseño de los péptidos específicos para los complejos CaM-proteína .....	43
Identificación de la interfaz del complejo proteico CaM-nNOS y CaM-skMLCK con Peptiderive .....	43
Ensayos de unión de la proteína CaM con los péptidos diseñados .....	43
Acoplamiento y simulación de MD para los complejos CaM-péptido diseñado .....	43
Ensayos de competencia CaM-proteína-péptido diseñado.....	44
Acoplamiento y simulación de MD para los complejos CaM-proteína-péptido .....	44
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	45
Afinidad de los péptidos skMLCK, nNOS, Cav1.1 y calspermin con el biosensor de CaM .....	45
Modelos estructurales de los complejos Ca <sup>2+</sup> -CaM-péptidos.....	54
Simulación de MD de los complejos Ca <sup>2+</sup> -CaM-péptidos.....	56
Ensayos de competencia CaM-proteína nNOS-BIM IV-péptido nNOS.....	61
Ensayos de competencia CaM-proteína skMLCK-Calmidazolium-BIM IV-péptido nNOS .....	65
Modelos estructurales y simulación de dinámica molecular de los complejos proteicos .....	69
Complejo CaM-proteína skMLCK .....	70
Complejo CaM-proteína nNOS.....	73
Diseño de péptidos inhibidores de complejos CaM-proteína .....	75
Identificación de la interfaz CaM-proteína.....	77
Afinidad de los péptidos diseñados MLCK-A y NOS-A con la CaM .....	84
Acoplamiento y dinámica molecular del complejo CaM-péptido utilizando los péptidos diseñados.....	85
Evaluación de la interacción CaM-proteína-péptido diseñado .....	86
Acoplamiento molecular del péptido diseñado con el complejo CaM-proteína .....	90
VIII. CONCLUSIONES .....	94
IX. PERSPECTIVAS .....	95
X. BIBLIOGRAFÍA .....	96
XI. APÉNDICE .....	106
Figuras A1-10 .....	106

A. Modelos estructurales de los complejos CaM-péptidos .....	115
B. Formación de modelos estructurales de los complejos CaM-proteínas .....	129

## i. LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructuras de la proteína calmodulina (CaM) en diferentes conformaciones.....	17
<b>Figura 2.</b> Clasificación de blancos moleculares de la proteína CaM de acuerdo al proceso celular regulado.....	18
<b>Figura 3.</b> (A) Arreglo de los dominios estructurales de la sintasa del óxido nítrico neuronal y (B) secuencia de aminoácidos de la nNOS.....	19
<b>Figura 4.</b> (A) Arreglo estructural de los dominios de la cinasa de la cadena ligera de miosina de músculo esquelético y (B) secuencia de aminoácidos de la skMLCK.....	21
<b>Figura 5.</b> Técnicas utilizadas para el estudio de las interacciones CaM-ligandos.....	26
<b>Figura 6.</b> Principales blancos intracelulares para biofármacos.....	28
<b>Figura 7.</b> (A) Espectros de fluorescencia y (B) curva de la titulación de $Ca^{2+}$ con el biosensor <i>hCaM-M124C-mBBr</i> .....	46
<b>Figura 8.</b> Representación de la CaM y sus dominios EF-hand.....	48
<b>Figura 9.</b> Fluctuaciones por residuo de la CaM en unión a $Ca^{2+}$ durante 100 ns de MD.....	48
<b>Figura 10.</b> Modelos estructurales de las simulaciones de MD de la CaM en función del grado de unión a $Ca^{2+}$ .....	49
<b>Figura 11.</b> Espectros de fluorescencia y curvas de la titulación de los péptidos (A) skMLCK, (B) nNOS, (C) CaV1.1 y (D) Calspermin con el biosensor <i>hCaM-M124C-mBBr</i> a saturación con $Ca^{2+}$ (15 $\mu$ M).....	51
<b>Figura 12.</b> Interacción $Ca^{2+}$ -CaM-péptido skMLCK.....	52
<b>Figura 13.</b> Modelos estructurales de los complejos $Ca^{2+}$ -CaM-péptidos.....	55
<b>Figura 14.</b> Progreso de la simulación de la MD para el complejo $Ca^{2+}$ -CaM-péptido nNOS.....	57
<b>Figura 15.</b> Raíz cuadrática media de las desviaciones en función del tiempo para una simulación de MD de los complejos CaM-péptidos, CaM en conformación abierta y CaM en conformación cerrada.....	59
<b>Figura 16.</b> Contactos de los residuos de la $4Ca^{2+}$ -CaM con los ligandos a lo largo de una simulación de MD.....	60
<b>Figura 17.</b> Residuos aromáticos de las proteínas (A) skMLCK y (B) nNOS.....	61
<b>Figura 18.</b> Estructuras de la (A) bisindolilmaleimida IV y (B) cloruro de calmidazolio.....	62
<b>Figura 19.</b> Espectros de fluorescencia extrínseca de los ensayos de competencia CaM-proteína nNOS-molécula bioactiva-péptido .....	64
<b>Figura 20.</b> Espectros de fluorescencia intrínseca de los ensayos de competencia CaM-proteína nNOS-molécula bioactiva-péptido.....	64
<b>Figura 21.</b> Espectros de fluorescencia extrínseca de los ensayos de competencia CaM-proteína skMLCK-molécula bioactiva-péptido.....	67



<b>Figura 22.</b> Espectros de fluorescencia intrínseca de los ensayos de competencia CaM-proteína skMLCK-molécula bioactiva-péptido.....	67
<b>Figura 23.</b> Espectros de fluorescencia extrínseca de los ensayos de competencia CaM-proteína skMLCK-molécula bioactiva-péptidos .....	69
<b>Figura 24.</b> Alineamiento de las estructuras determinadas para la secuencia de la proteína skMLCK.....	71
<b>Figura 25.</b> Ensamble del complejo CaM-skMLCK.....	71
<b>Figura 26.</b> Raíz cuadrática media de las desviaciones en función del tiempo para una simulación de MD de los complejos proteicos CaM-skMLCK (negro) y CaM-nNOS (rojo).....	72
<b>Figura 27.</b> Alineamiento de las estructuras determinadas para la secuencia de la proteína nNOS.....	74
<b>Figura 28.</b> Ensamble del complejo CaM-nNOS.....	74
<b>Figura 29.</b> Selección de aminoácidos para los péptidos diseñados dirigidos a los complejos CaM-skMLCK y CaM-nNOS.....	76
<b>Figura 30.</b> Modelos estructurales del complejo CaM-proteína nNOS (dominio oxigenasa y de unión a CaM) obtenidos de Peptiderive.....	78
<b>Figura 31.</b> Secuencias de los péptidos lineales propuestos para la interfaz del complejo proteico CaM-nNOS en presencia del dominio de unión a CaM.....	78
<b>Figura 32.</b> Modelos estructurales del complejo CaM-proteína nNOS (dominio oxigenasa) obtenidos de Peptiderive.....	79
<b>Figura 33.</b> Secuencias de los péptidos propuestos para la interfaz del complejo proteico CaM-nNOS en ausencia del dominio de unión a CaM.....	80
<b>Figura 34.</b> Secuencias de los péptidos cíclicos propuestos para la interfaz del complejo proteico CaM-nNOS en ausencia del dominio de unión a CaM.....	80
<b>Figura 35.</b> Modelos estructurales del complejo CaM-proteína skMLCK (dominio de unión a CaM) obtenidos de Peptiderive.....	81
<b>Figura 36.</b> Secuencias de los péptidos propuestos para la interfaz del complejo proteico CaM-skMLCK en presencia del dominio de unión a CaM.....	82
<b>Figura 37.</b> Modelos de la proteína skMLCK con la CaM obtenidos de Peptiderive.....	83
<b>Figura 38.</b> Secuencias de los péptidos propuestos para la interfaz del complejo proteico CaM-skMLCK en ausencia del dominio de unión a CaM.....	83
<b>Figura 39.</b> Ensayos de unión de los péptidos (A) MLCK-A y (B) NOS-A con el biosensor <i>hCaM-M124C-mBBr</i> .....	85
<b>Figura 40.</b> Espectros de fluorescencia extrínseca de los ensayos de competencia de la proteína CaM-proteína nNOS-péptido NOS-A.....	87
<b>Figura 41.</b> Espectros de fluorescencia intrínseca de los ensayos de competencia de la proteína CaM-proteína nNOS-péptido NOS-A.....	88
<b>Figura 42.</b> Espectros de fluorescencia extrínseca de los ensayos de competencia de la proteína CaM-proteína skMLCK-péptido MLCK-A.....	89
<b>Figura 43.</b> Espectros de fluorescencia intrínseca de los ensayos de competencia de la proteína CaM-proteína skMLCK-péptido MLCK-A.....	90
<b>Figura 44.</b> Acoplamiento molecular de los péptidos (A) MLCK-A y (B) NOS-A al complejo CaM-proteína skMLCK y nNOS, respectivamente.....	91
<b>Figura 45.</b> Fluctuación del péptido NOS-A en la simulación de MD del complejo CaM-nNOS-NOS-A.....	92

<b>Figura 46.</b> Fluctuación del péptido MLCK-A en la simulación de MD del complejo CaM-skMLCK-MLCK-A.....	92
<b>Figura A1.</b> Espectros de fluorescencia y titulación del péptido skMLCK con el biosensor <i>hCaM M124C-mBBr</i> .....	106
<b>Figura A2.</b> Espectros de fluorescencia y titulación del péptido nNOS con el biosensor <i>hCaM M124C-mBBr</i> .....	107
<b>Figura A3.</b> Espectros de fluorescencia y titulación del péptido Cav1.1 con el biosensor <i>hCaM M124C-mBBr</i> .....	108
<b>Figura A4.</b> Espectros de fluorescencia y titulación del péptido Calspermin con el biosensor <i>hCaM-M124C-mBBr</i> .....	109
<b>Figura A5.</b> Constantes de disociación de los péptidos skMLCK, nNOS-1, Cav1.1 y Calspermin en función de la concentración de Ca <sup>2+</sup> en la titulación.....	110
<b>Figura A6.</b> Modelos estructurales de las simulaciones de MD de los complejos Ca <sup>2+</sup> -CaM-péptidos.....	111
<b>Figura A7.</b> Determinación de las condiciones experimentales para los ensayos de competencia.....	112
<b>Figura A8.</b> Espectros de fluorescencia intrínseca de albúmina de suero bovino (BSA).....	112
<b>Figura A9.</b> Modelos estructurales de las simulaciones de MD de los complejos Ca <sup>2+</sup> -CaM-proteínas.....	113
<b>Figura A10.</b> Modelos estructurales de las simulaciones de MD de los complejos CaM-proteínas-péptidos diseñados.....	114

## ii. LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Péptidos terapéuticos comercializados.....	30
<b>Tabla 2.</b> Péptidos con motivos de unión a CaM.....	32
<b>Tabla 3.</b> Péptidos modelo utilizados en los ensayos de unión con el biosensor de CaM.....	53
<b>Tabla 4.</b> Determinación de las constantes de disociación de los péptidos modelo a diferentes concentraciones de CaCl <sub>2</sub> con el biosensor <i>hCaM-M124C-mBBr</i> .....	52
<b>Tabla 5.</b> Resultados de la unión de los péptidos skMLCK, nNOS, Cav1.1 y Calspermin a la proteína CaM.....	58
<b>Tabla 6.</b> Péptidos utilizados en el ensayo de unión con el biosensor de CaM.....	84
<b>Tabla 7.</b> Parámetros energéticos obtenidos de la simulación de MD de los complejos CaM-péptidos.....	86

### iii. LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
<b>Å</b>	Angstroms
<b>atm</b>	Atmósfera
<b>hCaM-M124C-mBBR</b>	Biosensor fluorescente de CaM humanizado
<b>BIM IV</b>	Bisindolilmaleimida IV
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcio (ion)
<b>ITC</b>	Calorimetría de Titulación Isotérmica
<b>CaM</b>	Calmodulina
<b>Cav1.1</b>	Canal de calcio asociado a voltaje 1.1
<b>skMLCK</b>	Cinasa de la cadena ligera de miosina del músculo esquelético
<b>smMLCK</b>	Cinasa de la cadena ligera de miosina del músculo liso
<b>CPZ</b>	Clorpromazina
<b>K<sub>d</sub></b>	Constante de disociación
<b>φ</b>	Eficiencia cuántica
<b>ΔG</b>	Energía libre de unión de Gibbs
<b>ΔH</b>	Entalpía
<b>ΔS</b>	Entropía
<b>Phe</b>	Fenilalanina
<b>RMSF</b>	Fluctuación de la desviación estándar de la raíz media cuadrática por residuo
<b>mBBR</b>	Fluoróforo monobromobimano
<b>K</b>	Kelvin
<b>KDa</b>	Kilodalton
<b>λ<sub>emi</sub></b>	Longitud de onda de emisión
<b>λ<sub>exi</sub></b>	Longitud de onda de excitación
<b>MM/PBSA</b>	Mecánica Molecular/Área de superficie de Poisson Boltzmann
<b>μM</b>	Micromolar
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>M</b>	Molar
<b>MD</b>	Molecular Dynamics
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>ns</b>	Nanosegundos
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>MLCK-A</b>	Péptido de la región A de la cinasa de la cadena ligera de miosina de músculo esquelético
<b>NOS-A</b>	Péptido de la región A de la sintasa del óxido nítrico neuronal
<b>ps</b>	Picosegundos
<b>PDB</b>	Protein Data Bank
<b>CaBPs</b>	Proteínas sensoras o específicas de unión a calcio
<b>RMSD</b>	Raíz cuadrática media de las desviaciones

<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>SPR</b>	Resonancia de Plasmon Superficial
<b>eNOS</b>	Sintasa del óxido nítrico endotelial
<b>iNOS</b>	Sintasa del óxido nítrico inducible
<b>nNOS</b>	Sintasa del óxido nítrico neuronal
<b>Na<sup>+</sup></b>	Sodio (ion)
<b>Tyr</b>	Tirosina
<b>FRET</b>	Transferencia de energía por resonancia fluorescente
<b>Trp</b>	Triptófano
<b>UV</b>	Ultravioleta

## I. RESUMEN

El estudio de las interacciones proteína-ligando son importantes para comprender los procesos a nivel molecular, celular y por los fines aplicados que de ellos se desprenden.

Para este trabajo nuestro modelo de estudio fue la proteína calmodulina (CaM), que es una proteína ubicua, altamente conservada y considerada la principal proteína señalizadora de calcio en las células eucariotas. Modula cerca de 300 proteínas relacionadas con diversos procesos fisiológicos y patológicos. Es considerada un blanco molecular al que se han dirigido fármacos antipsicóticos, anticancerígenos y relajantes musculares pero que presentan efectos secundarios debido a la baja selectividad del complejo proteico a inhibir.

La cinasa de la cadena ligera de miosina de músculo esquelético (skMLCK) y la sintasa del óxido nítrico neuronal (nNOS) son dos principales proteínas que regula la CaM y que participan en la contracción de músculo esquelético y la comunicación neuronal, respectivamente. Patológicamente, la skMLCK está asociada con distrofias miotónicas y, por su parte, la nNOS con enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson. Por su importancia farmacológica, se estudiarán las interacciones de estas proteínas con la CaM.

El presente trabajo describe las interacciones moleculares de la CaM en presencia de diferentes ligandos: CaM-Ca<sup>2+</sup>, CaM-péptido a diferentes concentraciones de Ca<sup>2+</sup>, CaM-proteína, CaM-proteína-fármaco, CaM-proteína-fármaco-péptido, CaM-proteína-péptido diseñado, con el objetivo de obtener péptidos para dos complejos proteico específicos. El estudio teórico-experimental de las interacciones CaM-ligando se realizó utilizando herramientas de modelaje molecular y el biosensor *hCaM-M124C-mBBR*, respectivamente.

La parte teórica conllevó a la obtención de los modelos estructurales de los complejos CaM-péptido, CaM-proteína, CaM-proteína-péptido diseñado por modelaje *ab initio* y homología. Posteriormente, se realizaron dinámicas moleculares de los complejos, simulando el comportamiento de las moléculas involucradas en el sistema. El

análisis de estas nos proporcionó información de la interacción estudiada (parámetros termodinámicos teóricos, RMSD, RMSF, residuos participantes).

Los péptidos skMLCK, nNOS, Cav1.1 y Calspermin fueron utilizados como péptidos modelo para los ensayos de unión CaM-péptido. Se determinaron cinco constantes de disociación ( $K_d$ ) en función de las diferentes concentraciones de  $Ca^{2+}$  para cada péptido. Las afinidades de los péptidos por la CaM se encontraron en el orden de concentración nanomolar. Los péptidos skMLCK, nNOS y Calspermin muestran que a mayor concentración de  $Ca^{2+}$  en la titulación su afinidad por la CaM se incrementa, mientras la unión de Cav1.1 no presenta dependencia de la concentración de  $Ca^{2+}$ .

En los ensayos de competencia CaM-ligandos, se observan desplazamientos de la interacción de los ligandos menos afines (proteínas, moléculas bioactivas) por los más afines (péptidos) con el biosensor de CaM, como se había de esperar.

Se determinó una estrategia para el diseño de péptidos específicos para los complejos CaM-skMLCK y CaM-nNOS, considerando la ubicuidad y promiscuidad de la CaM y, asegurar así, una mayor selectividad. Se diseñaron dos péptidos denominados MLCK-A y NOS-A, para la interacción con los complejos CaM-skMLCK y CaM-nNOS, respectivamente.

Los péptidos diseñados no se unen a la CaM. Sin embargo, sí modifican estructuralmente a los complejos proteicos CaM-skMLCK y CaM-nNOS. Lo anterior nos indica que los péptidos diseñados podrían inhibir de manera específica los complejos designados, siendo esto una base para el desarrollo potencial de biofármacos en el tratamiento de patologías relacionadas con los complejos proteicos estudiados.

## II. ANTECEDENTES

### Interacciones proteína-proteína

Las interacciones entre proteínas desempeñan un papel fundamental en la organización estructural y funcional de las células; desde la formación de estructuras macromoleculares, complejos enzimáticos, regulación y la transducción de señales [2, 3].

Las proteínas generalmente se encuentran en un ambiente celular que está rodeado de posibles ligandos (proteínas, cationes, moléculas orgánicas, agua, etc.) con diferentes propiedades. Sin embargo, la mayoría de las proteínas son específicas respecto a su ligando; aunque también existen aquellas que tienen varios ligandos y establecen interacciones con más de una proteína para regular diversos procesos celulares.

Las interacciones proteína-proteína difieren en su afinidad entre las proteínas y el carácter transitorio de la interacción; lo que suele estar directamente relacionado con la función biológica de cada complejo proteico. En la célula, diferentes factores como la concentración, localización y entorno de las proteínas interactuantes afectan la asociación de los complejos proteicos. Existen tres tipos de variables que se pueden ejercer para alterar las interacciones proteína-proteína [4]:

- a) La unión entre dos proteínas requiere que las superficies de interacción se encuentren; lo cual implica co-localización en tiempo y espacio.
- b) La concentración local de las proteínas, la cual depende de los niveles de expresión, tasa de degradación proteica (estabilidad), ambiente molecular y grado de difusión.
- c) Ambiente fisicoquímico local. La afinidad entre los componentes de un complejo puede ser alterada por la presencia de metabolitos, proteínas e iones (por ejemplo,  $\text{Ca}^{2+}$ , ATP) o cambios en las condiciones fisiológicas (por ejemplo, pH, temperatura). También, influyen factores como las modificaciones post-transcripcionales (por ejemplo: fosforilación, acetilación, glicosilaciones, entre otras).

El estudio de las redes de interacción proteica no solo es importante para comprender los procesos celulares y sus implicaciones desde el punto de vista fisiológico; sino además por los fines aplicados que de estas se desprenden como el tratamiento de enfermedades y desórdenes en los que se ven implicados los defectos en las interacciones proteína-proteína, el diseño de fármacos, moléculas bioactivas, etc.

## Señalización de calcio

El ion calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), juega un papel importante en la fisiología de los organismos superiores tras activar múltiples cascadas de señalización con la finalidad de responder a cambios en el ambiente y mantener la homeostasis celular; regulando procesos como la exocitosis, contracción muscular, transcripción genética, metabolismo energético, proliferación celular, entre los más importantes [5-7].

La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular libre está estrechamente controlada y usualmente es más baja en el citosol ( $0.1 \mu\text{M}$ ) que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular ( $1 \text{ mM}$ ), siendo aproximadamente  $10^4$  veces mayor [8]. De manera que, las concentraciones de calcio son moduladas y múltiples proteínas celulares de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  (CaBPs) responden a diferentes concentraciones de calcio, e influyen en la fisiología.

Las CaBPs se clasifican con base en la homología de sus secuencias y estructura terciaria, reconociendo cinco familias principales que incluyen a las anexinas, las de dominio C-2, las pentraxinas, las dependientes de vitamina K y las de dominios EF ( $\alpha$ -hélice-asa- $\alpha$ -hélice) [9, 10]. Entre las proteínas capaces de unir este catión, modular la transmisión y recepción de mensajes intracelulares, posiblemente la mejor estudiada y caracterizada es la proteína calmodulina (CaM), miembro de la familia con dominio EF.



## Calmodulina

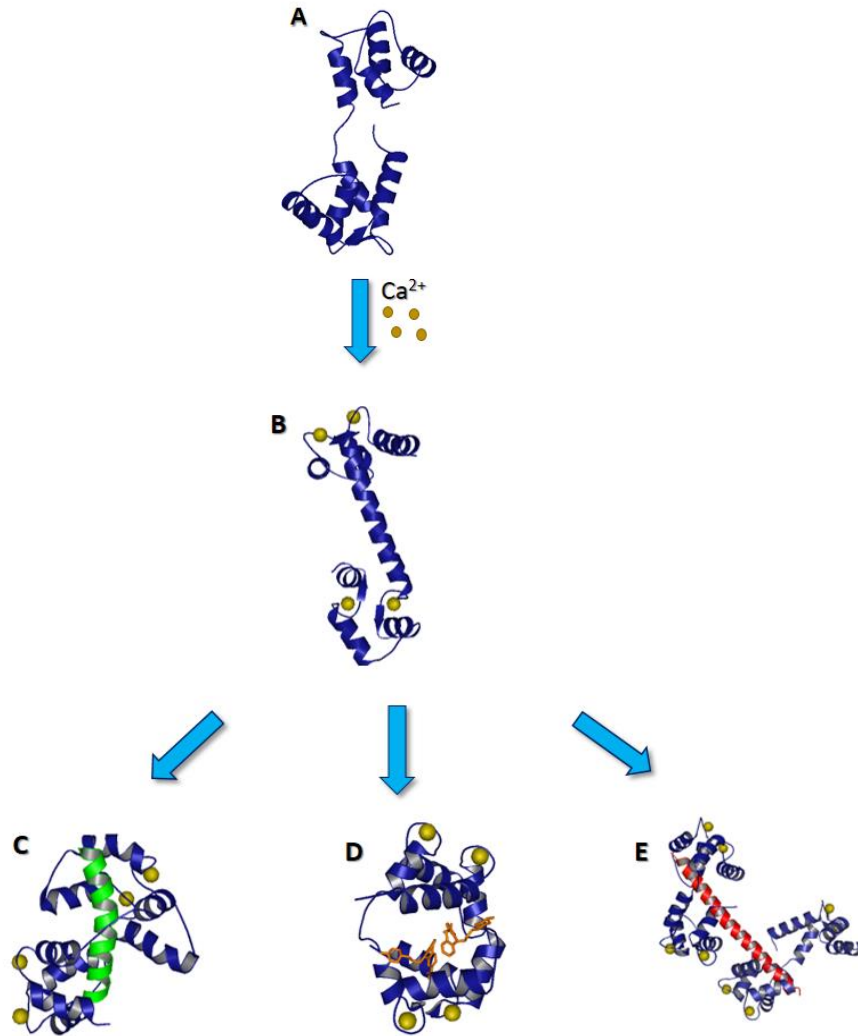
La CaM es una proteína ubicua, altamente conservada y considerada la principal proteína señalizadora de calcio en las células eucariotas animales. Controla diversos procesos fisiológicos como motilidad celular, arquitectura y función del citoesqueleto, la proliferación celular, apoptosis, autofagia, transporte de iones, control osmótico, fosforilación/desfosforilación de proteínas, procesos reproductivos, contracción muscular y expresión de genes [11, 12]. La proteína CaM es una proteína ácida pequeña, conformada por 148 aminoácidos (16.7 KDa) [13]. En la interacción y regulación de múltiples proteínas actúa a través de sus dos dominios globulares denominados “EF-hand”, formados por 2  $\alpha$ -hélices conectadas por un asa de 12 residuos de aminoácidos, adquiriendo una estructura de mancuerna. Cada dominio (lóbulos N y C-terminal) posee dos sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ ; el lóbulo C-terminal tiene una alta afinidad de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_d= 0.2 \mu\text{M}$ ) y el lóbulo N-terminal una afinidad menor ( $K_d=2 \mu\text{M}$ ) [8].

De acuerdo a los estudios cristalográficos, la CaM se puede encontrar en tres principales conformaciones en función de la unión a ligandos (figura 1):

(I) Apo-CaM. Cuando los sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  en la CaM están libres [14].

(II) Holo-CaM. La CaM presenta cambios conformacionales apreciables tras la unión de iones  $\text{Ca}^{2+}$ ; las alfa-hélices de los dominios EF-hand adoptan una orientación casi perpendicular (conformación abierta) [15]. Este cambio conformacional permite que aumente la afinidad de unión de la CaM para cierto número de proteínas diana y ligandos, al exponer regiones altamente hidrofóbicas, conformadas en su mayoría por residuos de metioninas (Met), mismas que se encuentran rodeadas de aminoácidos cargados negativamente, atrayendo así ligandos de naturaleza hidrofóbica y/o polarizados positivamente [16].

(III) Conformación cerrada. Cuando la CaM interacciona con ligandos como proteínas, péptidos o fármacos.



**Figura 1. Estructuras de la proteína calmodulina (CaM) en diferentes conformaciones.** (A) CaM libre de  $\text{Ca}^{2+}$  (1CFD), (B) CaM unida a  $\text{Ca}^{2+}$  (1CLL), (C) CaM- $\text{Ca}^{2+}$  unidos al péptido CAP-23/NAP-22 (1L7Z), (D) CaM- $\text{Ca}^{2+}$  unidos a trifluoperazina (1LIN) y (E) CaM- $\text{Ca}^{2+}$  unido a Cav1.2 (3G43).

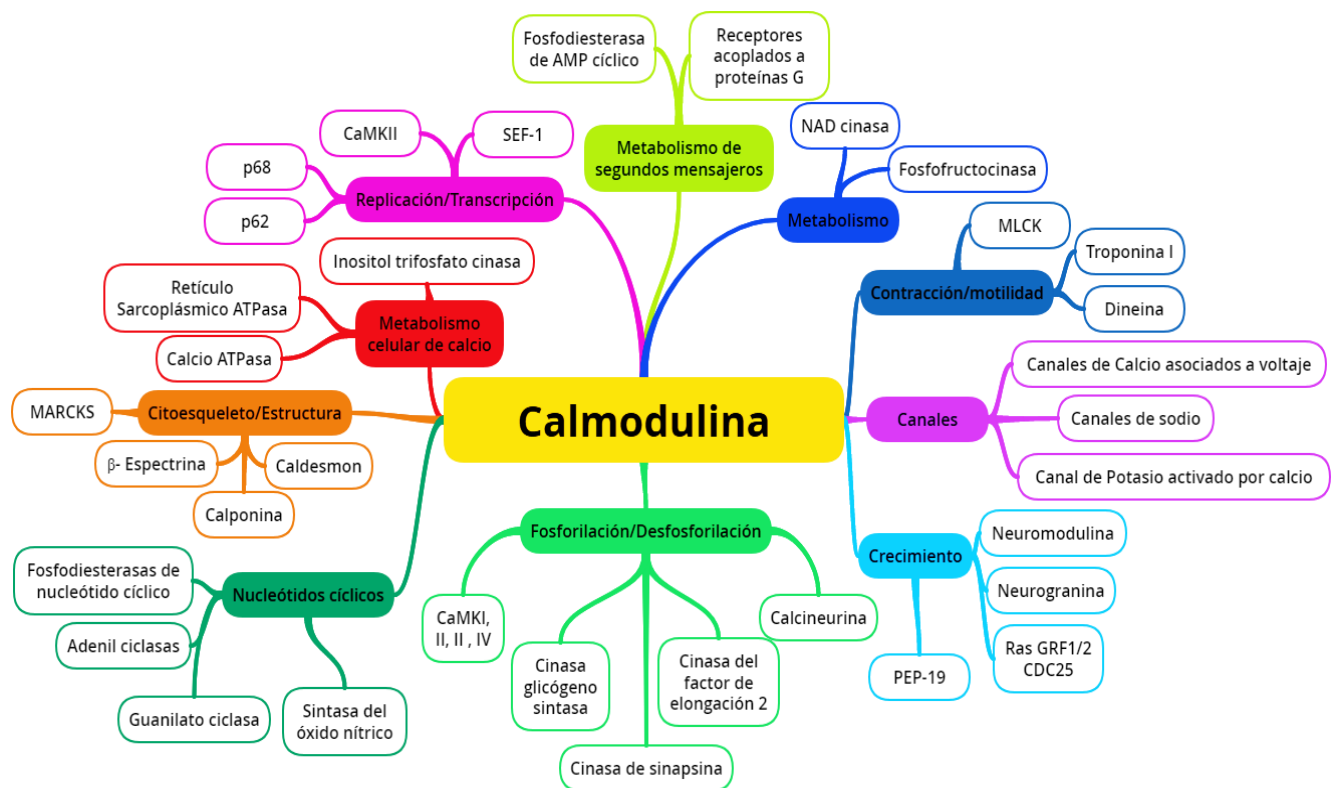
### Blancos moleculares regulados por la calmodulina

Los blancos moleculares que es capaz de regular la proteína CaM son diversos, la figura 2 muestra algunos de ellos. Estos se encuentran involucrados en el crecimiento celular, fosforilación, defosforilación, replicación, transcripción, metabolismo celular de calcio y segundos mensajeros, entre los más importantes [17-19]. Las proteínas de unión a CaM (CaMBP) se han agrupado, principalmente, en dos motivos relacionados denominados 1-8-14 y 1-5-10, según la posición de los residuos hidrofóbicos

conservados. Las proteínas que contienen el motivo 1-8-14 incluyen a calcineurina, óxido nítrico sintasa, adenilil ciclasa y la cinasa de la cadena ligera de miosina. Otras CaMBPS, CaM cinasas (CaMKI, II) y la sinapsina, poseen el motivo 1-5-10. Las CaMBPs que no utilizan estos motivos incluyen a la fosfodiesterasa de nucleótido cíclico 3'-5', adenilil ciclasa de mamífero y distrofina. La CaM también puede unir proteínas en una forma independiente de  $Ca^{2+}$  a través de una secuencia consenso denominada motivo IQ, determinada con base en las cadenas ligeras de miosina de tipo II convencionales y no convencionales, neuromodulina y neurogranina.

La regulación de las CaMBPs depende de la concentración de calcio que exista en el medio intracelular y de acuerdo con esto algunas proteínas se han podido clasificar principalmente en dos categorías [11, 14]:

- Proteínas de unión a CaM dependientes de calcio, proteínas que mantienen conservados los motivos 1-8-14 y 1-5-10.
- Proteínas de unión a CaM independientes de calcio, principalmente aquellas con dominio IQ.

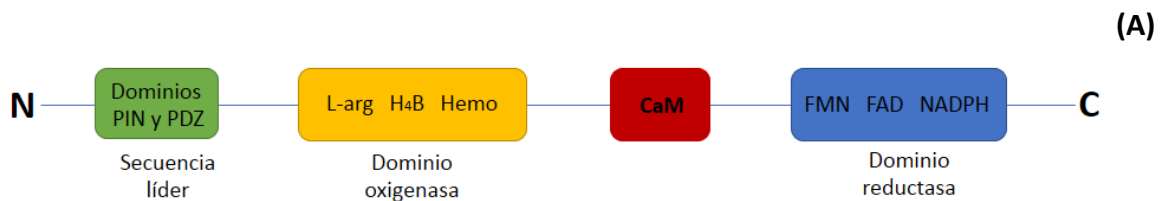


**Figura 2. Clasificación de blancos moleculares de la proteína CaM de acuerdo al proceso celular regulado.** Original de este trabajo.

## Proteína nNOS

El óxido nítrico es producido por la oxidación del aminoácido L-arginina en una reacción catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) y el cual sirve para regular la presión sanguínea, respuesta sináptica y defensa inmune.

La NOS es un homodímero con dominios reductasa y oxigenasa bien caracterizados que coordinan un mecanismo de transferencia de electrones de varios pasos y un interdominio para oxidar la L-arginina y generar óxido nítrico (NO) [20]. La CaM se une en el interdominio para activar así la síntesis de NO (figura 3). Sin embargo, aún no se describe el arreglo conformacional de la interacción, pero se ha propuesto que corresponde a un ensamble de diversas conformaciones [21].



(A)

(B)

```

MEDHMFVGVQQIQPNVISVRLFKRKVGGGLGFLVKERVSKPPVVIISDLIRGGAAEQSGLIQAGDIILAVNGR 70
PLVDLSYDSALEVLRGIASETHVVLILRGPEGFTTHLETTFTGDGTPKTIIRVTQPLGPPTKAVDLSSHQPP 140
AGKEQPLAVDGDGASGPGNGPQHAYDDGQEQEAGSLPHANGLAPRPPGQDPAKKATRVSLSQGRGENNELLKEIE 210
PVLSELLTSGSRGVKGGAPAKAEMKDMGIQVDRDLGKSHKPLPLGVENDRVFNDLWGKGNVPVVLNNPYS 280
EKEQPPTSGKQSPTKNGSPSKCPRFLKVKNWETEVLDTLHLKSTLETGCTEYICMGSIMHPSQHARRP 350
EDVRTKQQLFPLAKEFIDQYYSSIKRFGSKAHMERLEEVENKEIDTTSTYQLKDELIYGAKHAWRNASRC 420
VGRIQWSKLVQVDFARDCTTAHGMFNYICNHVKYATNKGNLRSAITIFPQRTDGKHFVWNSQLIRYAGY 490
KQPDGSTLGD PANVQFTEICIQQGKPPRGRFDVLP LLLQANGNDPELFIQIPPELVLEVPIRHPKFEWFK 560
DLGLKWKYGLPAVSNMLLEIGGLEFSACPFSGWYMGTEIGVRDYCDNSRYNILEEVAKKMNLDMRKTSSLW 630
KDQALVEINIAVLYSFQSDKVTIVDHHSATESFIKHMENEYRCRGGCPADWVWVIPPMSGSITPVFHQEM 700
LNYRLTPSFEYQPDPNWTHVWKGNTGTPTKRRRAIGFKKLAEAVKFSAKLMGQAMAKRVKATILYATETGK 770
SQAYAKTLCEIFKHAFDAKVMSEYDIDVHLEHETLVLVVTTSTFGNGDPPENGEKFGCALMEMRHPNSVQ 840
EERKSYKVRFNVSYSYSQKSSGDGPDLRDNFESAGPLANVRFSVFLGSRAYPHFCAGHAVDTLLEE 910
LGGERILKMBREGDELQEEAFRTWAKKVFKAACDVFCVGDVNIKANNSLISNDRSWKRNKFRLTFFVA 980
EAPELTQGLSNVHKKRVSAARLLSRQNLQSPKSSRSTIFVRLHTNGSQELQYQPGDHLGVFPGNHEDLVN 1050
ALIERLEDAPPVNVQMVKVELLEERNTALGVISNWTDELRLPPCTIFQAFKYLDITTPPTPLQLQFASL 1120
ATSEKEKQRLLVLSKGLQEYEEWKWGKNPTIVEVLEEFPSIQMPATLLLTQLSLLQPRYYSISSSPDMYP 1190
DEVHLTVAIVSYRTRDGEPIHHGVCSSWLNRIQADELVPCFVRGAPSFHLPRNPQVPCILVGPGTGIAP 1260
FRSFWQQRQFDIQHKGMNPCPMVLVFGCRQSKIDHIYREETLQAKNKGVFRELYTAYSREPKPKKYVQD 1330
ILQEQLAESVYRALKEQGGHIYVCGDVTMAADVLKAIQRIMTQQGKLSAEDAGVFISRMRDDNRYHEDIF 1400
GVTLRTYEVTNRLRSESI AFIEESK KDTDEVFSS 1434

```

**Figura 3. (A) Arreglo de los dominios estructurales de la sintasa del óxido nítrico neuronal.** La enzima consiste en una secuencia líder N-terminal de aproximadamente 220 aminoácidos, un dominio oxigenasa central aminoácidos que forma el sitio catalítico activo, un dominio de unión a CaM y un dominio reductasa responsable de la importación y transferencia de electrones al dominio oxigenasa. Figura modificada de Stuehr [22] y **(B) secuencia de aminoácidos de la nNOS.** El dominio de unión a CaM se muestra en color rojo. Se utilizó el código de secuencia de referencia en NCBI NP\_000611.1.

Actualmente, se han descrito tres isoformas de esta enzima presentes en cerebro, hígado y células endoteliales y muestran aproximadamente el 50% de identidad en la secuencia de aminoácidos. La NOS neuronal de tipo I (nNOS) y la NOS endotelial de tipo III (eNOS) se distinguen de la NOS inducible de tipo II (iNOS) en que ambas son enzimas constitutivas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . Las enzimas nNOS y eNOS se activan en neuronas, células endoteliales y ciertos tipos de células por la elevación estimulada por agonistas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y la unión resultante de  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM. Por el contrario, la producción de NO por iNOS se considera independiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . iNOS se induce en macrófagos, así como en otras células como los hepatocitos y el músculo liso vascular, en respuesta a las citoquinas y a las endotoxinas bacterianas [23].

Los dominios de unión a CaM de alta afinidad identificados hasta ahora para las tres isoformas tienen grados muy limitados de homología de secuencia. Sin embargo, estos dominios poseen varias características estructurales comunes. Las regiones de unión a CaM típicamente están contenidas dentro de un tramo corto de 15-20 aminoácidos contiguos que forman una  $\alpha$  hélice anfifílica básica en la proteína diana. Los residuos cargados positivamente y los residuos hidrofóbicos se encuentran en lados opuestos de la hélice.

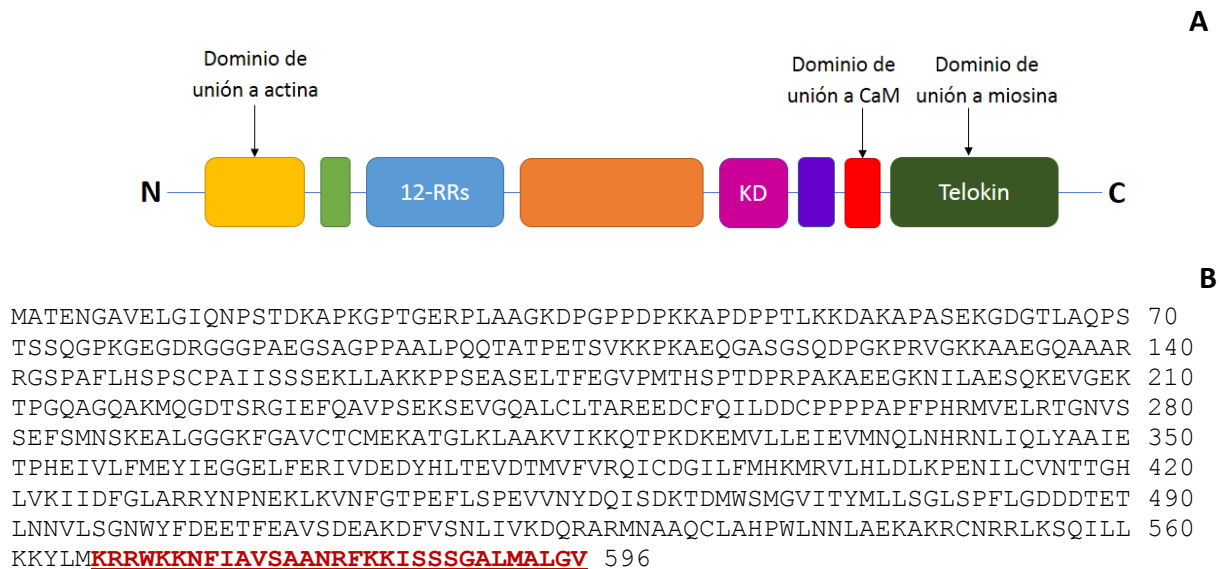
En el caso de la proteína nNOS, la región de interacción con la CaM corresponde al péptido: KRRRAIGFKKLAEAVKFSKLMGQ (figura 3B). Zhang y Vogel [24] reportaron que la afinidad con la que se une el péptido nNOS a la proteína CaM se encuentra en el orden nanomolar ( $K_d=2.2$  nM). La medición se realizó mediante un ensayo enzimático, en la que el péptido nNOS puede inhibir competitivamente la capacidad de la CaM para estimular la actividad de la fosfodiesterasa (PDE), proteína a la que se une CaM.

Por otra parte, Wu y colaboradores [25], determinaron las constantes de velocidad de asociación y disociación,  $K_{on}$  y  $K_{off}$  respectivamente, de los complejos CaM-péptidos nNOS, eNOS e iNOS. A partir de estos datos calcularon la constante de disociación ( $K_d=K_{off}/K_{on}$ ) para cada complejo CaM-péptido y determinaron valores de 5.6 nM, 1.6 nM y 0.1 nM para las constantes de disociación de los péptidos nNOS, eNOS e iNOS, respectivamente. Mientras que la afinidad reportada para el complejo CaM-proteína nNOS es de nM [26].

## Proteína skMLCK

El gen *mylk* codifica para la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK), una enzima dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta cinasa fosforila las cadenas ligeras reguladoras de la miosina para facilitar su interacción con los filamentos de actina y producir la actividad contráctil. Las isoformas de esta proteína más estudiadas y mejor caracterizadas son la cinasa de la cadena ligera de miosina de músculo liso (smMLCK) y cinasa de la cadena ligera de miosina de músculo esquelético, skMLCK (figura 4).

Particularmente, la skMLCK es una proteína cinasa de serina-treonina dependiente de  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  que fosforila la cadena ligera reguladora (RLC) de la miosina sarcomérica. Se expresa a partir del gen *mylk2*, específicamente en fibras musculares esqueléticas, con la mayor abundancia en músculos de contracción rápida (contracción muscular global y la función cardíaca) [27].



**Figura 4. (A) Arreglo estructural de los dominios de la cinasa de la cadena ligera de miosina de músculo esquelético.** 12-RR, repeticiones largas de 12 residuos; KD, dominio cinasa. Figura modificada de Hong, F. et al. [28] y **(B) secuencia de aminoácidos de la skMLCK.** El dominio de unión a CaM se muestra en color rojo. Se utilizó el código de secuencia de referencia en NCBI NP\_149109.1.

Bioquímicamente, la activación ocurre con la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  a CaM formando un complejo  $4\text{Ca}^{2+}\text{-CaM}$  suficiente para la activación con una difusión limitada, unión estequiométrica y desplazamiento de un segmento regulador del núcleo catalítico skMLCK. La secuencia N-terminal de RLC luego se extiende a través de la hendidura

catalítica expuesta para la fosforilación de la Ser15. La eliminación de  $\text{Ca}^{2+}$  da como resultado la disociación lenta de la CaM y la inactivación de skMLCK [29].

Las estructuras de los complejos CaM-péptidos skMLCK y smMLCK han sido determinadas mediante RMN y cristalografía de rayos X, respectivamente. Las dos estructuras comparten características similares entre sí, el péptido diana es  $\alpha$ -helicoidal en ambas estructuras y la hélice central de la CaM se curva, para permitir que los dominios globulares se acerquen [30].

En la figura 4B se observa la secuencia de la proteína skMLCK y la región de aminoácidos que comprende el dominio de unión a CaM en esta proteína (péptido skMLCK) que consta de 26 residuos.

Blumenthal y colaboradores [31], describieron una fuerte interacción entre el péptido skMLCK y la CaM al determinar la inhibición de la actividad de la skMLCK en presencia del péptido con una constante de inhibición de 1 nM. Por otra parte, Lukas y colaboradores [32] determinaron la constante de disociación equivalente a 10 nM mediante apagamiento de la fluorescencia intrínseca atribuida al residuo de triptófano.

El péptido de la MLCK inhibe la activación dependiente de CaM de siete enzimas sensibles a esta regulación: la fosfodiesterasa del nucleótido cíclico del cerebro, adenilato ciclasa del cerebro, adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis*, bomba  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la membrana de glóbulos rojos, calcineurina, fosforilasa b cinasa del músculo esquelético y proteína cinasa multifuncional dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  cerebral [33].

Una de las características de importancia de la skMLCK en el ámbito farmacológico es su relación con la cardiomiopatía hipertrófica familiar. Este trastorno cardíaco hereditario está caracterizado por hipertrofia ventricular. El trastorno tiene variabilidad inter e intrafamiliar que va desde formas benignas hasta formas malignas con alto riesgo de insuficiencia cardíaca y muerte súbita de origen cardíaco.

## Participación del ion calcio en la activación de las enzimas

Como se ha descrito anteriormente, para que se lleve a cabo la activación de las enzimas NOS y MLCK se requiere inicialmente la formación del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM así, diversos grupos de investigación se han encargado del estudio del comportamiento cinético del  $\text{Ca}^{2+}$  en los complejos CaM-péptido y CaM-proteínas, determinando la estequiometría y constantes de disociación del ion calcio de acuerdo a los sitios de unión en la CaM [34].

Actualmente, se conoce que los dominios C y N-terminal de la proteína CaM posee sitios con alta afinidad y sitios con baja afinidad al ion calcio. En ausencia del péptido diana, los dos dominios se unen a  $\text{Ca}^{2+}$  con constantes de disociación de 2 y 13  $\mu\text{M}$ , pero al unir al péptido skMLCK la constante de disociación del ion calcio para los dominios C y N-terminal cambia a 0.02  $\mu\text{M}$  y 0.08  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Por otro lado, al unir la isoforma del músculo liso (smMLCK) se determinaron valores de constantes de disociación de 0.1  $\mu\text{M}$  para el dominio de alta afinidad y 0.2  $\mu\text{M}$  para el dominio de baja afinidad [35].

Las variaciones observadas en las constantes de disociación del  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por los péptidos permiten la activación e inactivación de la CaM para diferentes vías celulares y, probablemente, deben contrarrestar los costos energéticos variables que dirigen el cambio conformacional de activación para diferentes enzimas diana.

Sin embargo, la afinidad de los péptidos por la CaM en función de la concentración de calcio no ha sido completamente descrita, puesto que las constantes de disociación reportadas para los complejos se obtienen a una determinada concentración de calcio, generalmente a saturación; importante así para la función de cada complejo de acuerdo a su localización celular y tisular.



## Métodos para la detección de las interacciones CaM-ligando

La mayoría de los ligandos que se unen a la proteína CaM pueden ser detectados por distintos métodos, la mayoría de ellos *in vitro* (figura 5). Estos métodos incluyen:

(A) Cromatografía de afinidad que implica interacciones altamente específicas entre moléculas de un soluto y una segunda molécula unida covalentemente (inmovilizada) a la fase estacionaria [36].

(B) Espectroscopia diferencial UV-dicroísmo circular es uno de los métodos más sensibles para seguir pequeños cambios en la conformación de la proteína (estructura secundaria) inducida por la unión de ligandos en solución [37].

(C) Mutagénesis sitio dirigida que sirve para identificar los sitios de unión e inhibición en la CaM [38].

(D) Transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET), involucra la transferencia de energía de una molécula donadora a una aceptora, monitoreando así las interacciones de moléculas fluorescentes que se encuentran muy cercanas entre sí (10-100 Ångstroms) y los cambios conformacionales en la misma molécula [39, 40].

(E) Apagamiento de fluorescencia intrínseca requiere la participación de los aminoácidos aromáticos presentes en la proteína. La unión de ligandos a la CaM muestra cambios estructurales que se ven reflejados en la intensidad de fluorescencia o en el desplazamiento del centro espectral [32].

(F) Biosensores fluorescentes son biomoléculas que transducen eventos de unión en señales fluorescentes detectables [26].

(G) Resonancia magnética nuclear (RMN), donde la CaM marcada con  $^{15}\text{N}$  o  $^{13}\text{C}$  se titula con ligandos y produce cambios en desplazamientos químicos que provee de información detallada sobre las interacciones proteína-ligando en solución, así como el conocimiento del sitio de unión, conformaciones de los ligandos y complejos [41-43].

(H) Electroforesis nativa en gel sigue el cambio en la movilidad electroforética del complejo CaM-ligando [44].

(I) Difracción de rayos X determina la aproximación atómica de los complejos proteína-ligando, el arreglo espacial e interacciones [45].

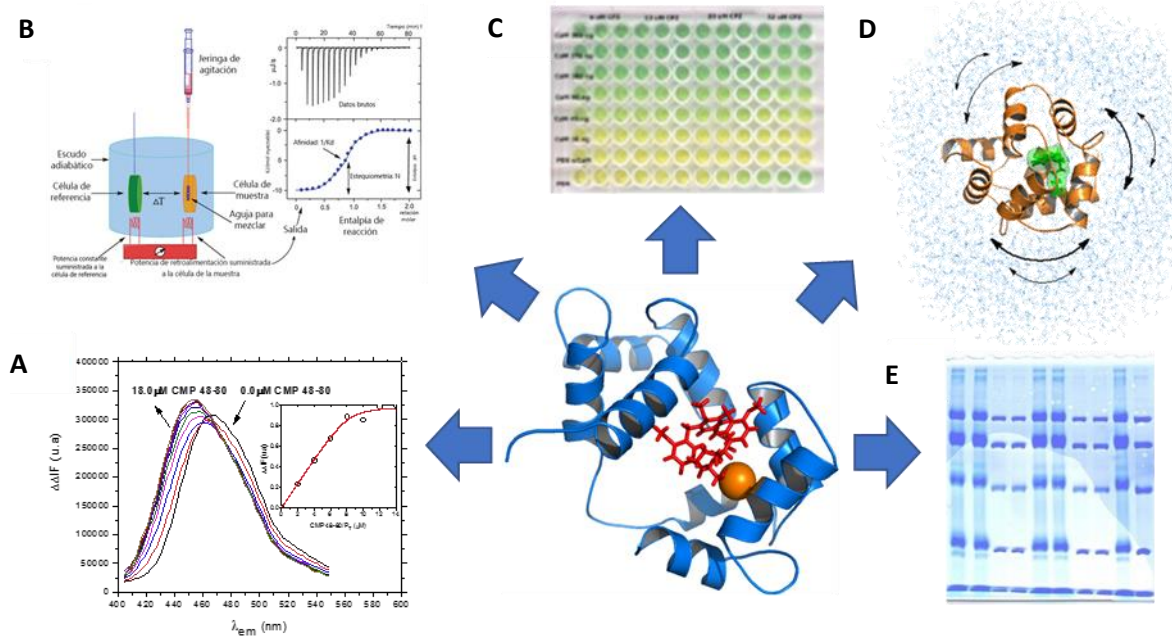
(J) Métodos computacionales utilizados para la caracterización de sitios de unión funcionales receptor-ligante y de plegamiento de proteínas [46].

(K) Resonancia de Plasmon Superficial (SPR) para identificar y cuantificar a ligandos de la CaM, en el que el ligando es inmovilizado sobre la superficie de un chip sensor, el cual presenta una película de oro, y al unir a la CaM cambia el índice de reflectancia de la película a la luz polarizada [47, 48].

(L) Calorimetría de titulación isotérmica (ITC), es el único método para medir directamente el intercambio de calor durante la formación del complejo a temperatura constante. Se titula un ligando en una solución que contiene a la proteína CaM, mientras se mide el calor liberado o absorbido. Los datos obtenidos se procesan y ajustan para obtener una constante de unión, la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ), la entalpía ( $\Delta H$ ) y entropía ( $\Delta S$ ) [49, 50].

(M) Inhibición enzimática de la fosfodiesterasa del AMPc (PDE1) es el ensayo de detección indirecta más ampliamente usado en la detección de interacciones CaM-ligando [51]. La actividad de la PDE1 se puede correlacionar con la cantidad de AMPc liberado durante la reacción enzimática utilizando un radioinmunoensayo. Además, la cantidad de fosfato inorgánico (Pi) liberado por la hidrólisis del AMPc en presencia de CaM y una nucleotidasa se puede cuantificar por métodos espectrofotométricos o radiométricos [52, 53].

Una herramienta de detección directa exitosa desarrollada por nuestro grupo de trabajo es el biosensor *hCaM-M124C-mBBr* que ha sido empleado para detectar la unión de diversos ligandos de la CaM como  $Ca^{2+}$ , fármacos y metabolitos bioactivos. Este biosensor es una proteína humana recombinante, en la que se reemplazó a la metionina 124 por una cisteína, mediante mutagénesis sitio-dirigida y, posteriormente, se une covalentemente el fluoróforo monobromobimano (*mBBr*), confiriéndole la propiedad fluorescente a la proteína. Al unir un ligando, la proteína modificada muestra un cambio en la intensidad del espectro de fluorescencia que puede ser cuantificado [54].



**Figura. 5. Técnicas utilizadas para el estudio de las interacciones CaM-ligandos.** (A) Ensayos de fluorescencia, (B) calorimetría de titulación Isotérmica (ITC), (C) ensayos de actividad enzimática, (D) métodos *in silico* (MD), (E) movilidad electroforética nativa. Modificado de Valverde [55].

### Fármacos dirigidos contra la CaM

El estudio de la CaM como un blanco molecular de fármacos ocurre tras ser implicada en diversos procesos patológicos tales como Alzheimer, esquizofrenia, artritis reumatoide, trastornos del comportamiento, cáncer y SIDA [56]. De manera que, las investigaciones se han centrado en la búsqueda de moléculas que afecten las propiedades moduladoras de la CaM, inhibiendo la formación del complejo proteico (Ca<sup>2+</sup>-CaM-proteína) o que directamente interfieran con la proteína CaM.

Entre los fármacos mejor caracterizados que inhiben a la CaM se encuentran los antipsicóticos derivados de la fenotiazina: clorpromazina y trifluoperazina (inhibidores clásicos de la CaM) [57, 58], arilalquilaminas como arilalquilamina AAA, felodiponas y naftalensulfonamidas, así como agentes antitumorales como la vincristina y KAR-2 (derivado semisintético de la vinblastina).

Otros se encuentran en fase experimental como calmidazolio y ácido mirístico y se han reportado diversos compuestos de origen natural con actividad anti-CaM como la malbranqueamida y  $\beta$ -carbolina eudistomidina, cuyo potencial farmacológico es materia de estudio [53].

Las acciones farmacológicas de las fenotiazinas en el sistema nervioso central son variadas, estas incluyen efectos antipsicóticos, sedantes y extrapiramidales.

Los fármacos dirigidos contra la CaM afectan los sistemas neuroendocrino, gastrointestinal y cardiovascular, particularmente cuando se utilizan en altas concentraciones, demostrando que la inhibición de la CaM se encuentra a diferentes niveles tisulares, lo que puede provocar efectos secundarios.

## Biofármacos

Los recientes avances en biología molecular y poderosas herramientas computacionales han permitido a los investigadores comprender mejor el funcionamiento interno de las patologías humanas a nivel molecular. A medida que nuestro conocimiento de la enfermedad aumenta, este va acompañado con el descubrimiento y desarrollo de medicamentos innovadores [59].

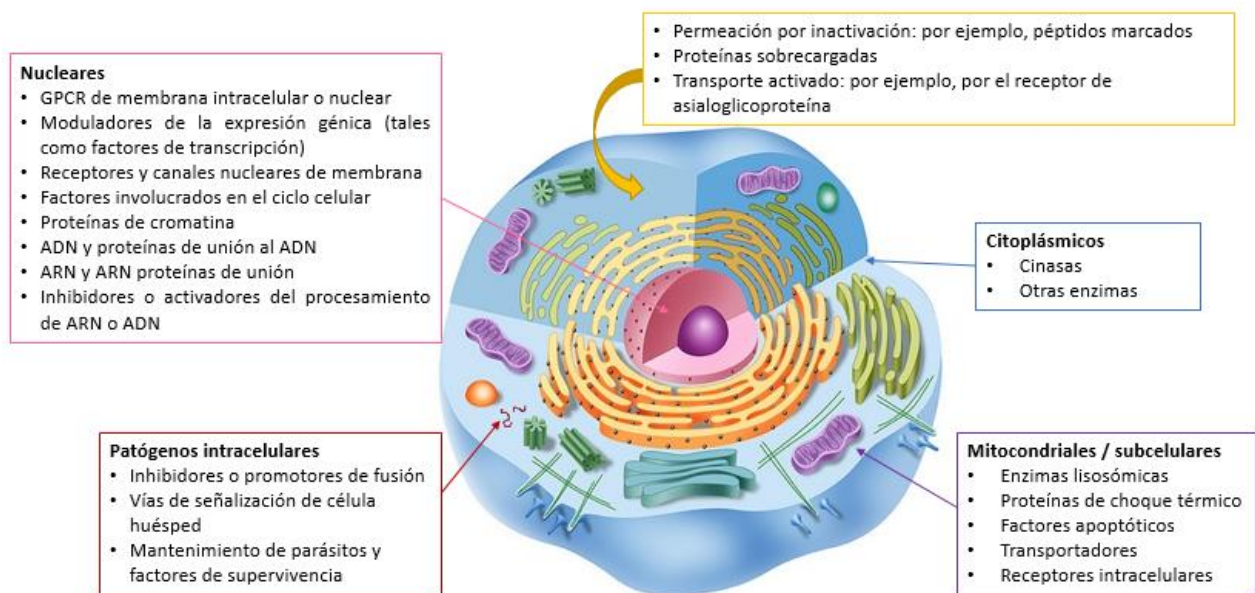
De manera que, en los últimos años, la industria farmacéutica ha enfocado esfuerzos particularmente en la búsqueda de biofármacos, es decir, aquellos productos con actividad farmacológica, cuyo principio activo es de naturaleza biológica y casi siempre son producidos mediante biotecnología [60], ofreciendo una mayor potencia y especificidad comparada con los farmoquímicos convencionales [61] (Figura 6).

Los biofármacos incluyen proteínas recombinantes, anticuerpos monoclonales, vectores de material genético, fragmentos de anticuerpos, oligonucleótidos antisentido, péptidos, y otros. Están dirigidos a enfermedades en una amplia gama de áreas terapéuticas [62] y actualmente se encuentran muchos en fase de desarrollo o bien en comercialización, estos representan cerca del 20% del total de medicamentos de uso actual [63].

La mayoría de los biofármacos son anticuerpos monoclonales; los primeros eran de origen murino y quimérico, pero tras el crecimiento de tecnologías de diseño y fabricación de proteínas recombinantes, los anticuerpos actualmente fabricados son humanizados y humanos [64].

Los anticuerpos humanizados poseen regiones determinantes de complementariedad de las regiones variables de origen murino. La obtención de los anticuerpos es posible con el empleo de métodos como la clonación, secuenciación y expresión de genes de anticuerpos en líneas celulares de mamíferos y avances importantes en la comprensión de la estructura y el modelado por computadora de anticuerpos [65]. Los anticuerpos humanos derivan de la secuencia de aminoácidos totalmente humana donde la especificidad del antígeno se ha seleccionado *in vivo* mediante el uso de ratones genéticamente modificados o mediante procesos de ingeniería de anticuerpos. Los anticuerpos completamente humanos y humanizados conllevan un menor riesgo para inducir respuestas inmunes [66].

En 1982, la compañía farmacéutica Elly Lilly desarrolló la primera insulina recombinante humana, un biofármaco exitoso que actualmente se encuentra disponible en la clínica [67].



**Figura 6. Principales blancos intracelulares para biofármacos.** Figura modificada de Mitragori et al. [61].

## Péptidos: Componentes biológicos utilizados en la terapéutica

Debido al atractivo perfil farmacológico y propiedades intrínsecas, los péptidos representan un excelente punto de partida para el diseño de nuevos biofármacos. Se ha observado que su especificidad se traduce en excelentes perfiles de seguridad, tolerabilidad y eficacia en seres humanos; aunado a lo anterior presentan una menor complejidad en la producción en comparación con los productos biofarmacéuticos basados en proteínas, y por lo tanto los costos de producción suelen ser más bajos [68].

La notable expansión del desarrollo de terapias peptídicas a finales de los años noventa y 2000 llevó a un número sin precedentes de aprobaciones de comercialización en 2012. La tabla 1, muestra algunos péptidos que se encuentran en el mercado para el tratamiento de diversas enfermedades [69, 70].

Las principales áreas terapéuticas que actualmente impulsan el uso terapéutico de fármacos peptídicos son las enfermedades metabólicas y de origen oncológico. El primero puede caracterizarse por el crecimiento epidemiológico de la obesidad así como de la Diabetes Mellitus tipo 2 (MD2); el segundo por un aumento de la mortalidad y la necesidad de reemplazo de la quimioterapia, así como por la atención de apoyo al cáncer [71].

Los péptidos naturales no suelen ser directamente adecuados para su uso como agentes terapéuticos debido a su limitada estabilidad química y física, una semivida en plasma de circulación corta, mismos que deben ser abordados para su uso como biofármacos.

Algunos de estos aspectos han sido resueltos con éxito a través de un diseño tradicional de péptidos terapéuticos, bajo un análisis que relaciona cuatro aspectos [68]:

1. Fortalezas que incluyen buena eficacia, seguridad, tolerabilidad, alta selectividad y potencia.
2. Debilidades como inestabilidad química y física, probabilidad a hidrólisis y oxidación, tendencia a agregación y baja permeabilidad en la membrana.

3. Oportunidades como el descubrimiento de nuevos péptidos incluyendo fragmentación de proteínas, librerías especializadas y optimización de secuencias diseñadas.
4. Amenazas como la inmunogenicidad, nuevos avances en genómica, proteómica y medicina personalizada.

Además del diseño tradicional de péptidos, ha surgido una gama de tecnologías de péptidos que representan oportunidades y direcciones futuras dentro del campo de los péptidos; estos incluyen péptidos multifuncionales y de penetración celular, así como conjugados de fármacos peptídicos y tecnologías que se centran en rutas alternativas para facilitar su administración [72, 73].

<b>Tabla 1. Péptidos terapéuticos comercializados</b> Modificado de Dunn et al. [70] y Nagarajan et al. [74]					
<b>Nombre</b>	<b>Marca</b>	<b>Compañía</b>	<b>Indicación</b>	<b>Categoría</b>	<b>Blanco</b>
Leuprolide	Enantone	Takeda	Cáncer	Antineoplásico, agente hormonal	Receptor de hormona liberadora de gonadotropina
Aldesleukin	Proleukin	Chiron Corp	Cáncer/Infecciones	Agentes antineoplásicos, agentes Anti-VIH	Receptor de interleucina-2 subunidad $\beta$ y $\alpha$
Drotrecogin alfa	Xigris	Eli Lilly and Company	Sepsis severa	Antisepsis	Factor de coagulación VIII, V, trombomodulina
Enfuvirtide	N.A.	Trimeris, Roche	Antiretroviral	Inhibidores fusión VIH	Receptor de oxitocina, oxitocina-neurofisisina 1
Gramicidin D	N.A.	Sanofi	Lesiones de la piel, cara e infecciones	Agente antibacterial, antibiotico	N.A.
Interferon alfa-n1	N.A.	GlaxoSmithKline	Virus del Papiloma Humano	Agente antiviral, agente inmunosupresor	N.A.
Lipoproteína OspA	Lymerix	SmithKline Beecham	Enfermedad de Lyme	Vacunas	Dirigida al receptor tipo toll 2
Exenatide	Byetta	AstraZeneca	Diabetes tipo 2	Agente hipoglucemiante	Agonista GLP-1R
Pramlintide	Symlin	AstraZeneca	Diabetes tipo1/2	N.A.	Agonista de calcitonina
Romiplostim	Nplate	Amgen	Hematología	Agente trombopoyético	Agonista trombopoyetina

## Interacción proteína CaM-péptido

En la base de datos del Protein Data Bank (PDB) se han depositado un gran número de complejos con la proteína CaM, determinados mediante cristalografía de rayos X o Resonancia Magnética Nuclear. Estos incluyen complejos proteína-proteína, proteína-fármaco o proteína-péptido.

La tabla 2 muestra algunos péptidos de unión a la CaM, que representan la región de las diferentes proteínas con las que interacciona la proteína CaM. Las estructuras de los complejos CaM-péptido muestran interacciones en las áreas hidrofóbicas de la proteína CaM, de igual manera que las proteínas y los inhibidores clásicos reportados [75]. Los péptidos poseen una estructura alfa-helicoidal anfifílica con carga positiva, independientemente de sus secuencias de aminoácidos precisas [76].

Estos péptidos poseen afinidades en el orden de  $10^{-6}$  –  $10^{-9}$  M, siendo comparables o más estrictas que las proteínas de longitud completa de la que provienen y mayores a la de los inhibidores clásicos de la CaM ( $10^{-3}$  M) [35]. De manera que, pueden ser potencialmente considerados como biofármacos, por ser moléculas biológicas de alta afinidad a la CaM capaces de ejercer una inhibición en la proteína y a los complejos proteicos de la misma [33].



Tabla 2. Péptidos con motivos de unión a Calmodulina						
Motivo	Nombre	Secuencia	PDB	Ref.	Kd (nM)	Ref.
1-5-10	CaMKI	-----IKKNEFAKSKWKQAFNATAVVRHMRK-----	1MXE	[87]	•	-
	CaMKII	-----LKKFNARRKLGAILTTMLATRNFS-----	1CM1	[88]	270	[77]
1-8-14	skMLCK	-----KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL-----	2LV6	[89]	1.0	[32]
	smMLCK	-----ARRKWQKTGHAVRAIGRLSS-----	1CDL	[90]	1.8	[78]
	DAPK-1	-----RRRWKLDIFSIVSLCNHLTR-----	1ZUZ	-	•	-
	nNOS	-----KRRRAIGFKKLAEAVKFSAKLMGQ-----	2O60	-	2.2	[24]
1-5-8-14	Calcineurin	-----ARKEVIRNKIRAIIGKMARVFSVLR-----	2JZI	-	16	[79]
	Calspermin	-----ARRK-LKAAVKAVVASSRLGS-----	*	-	4.4	[47]
	Receptor de Rianodina-1	-----KSKKAVVHKLKSKORRRRAVVACFRMTPLYN-----	2BCX	[91]	30	[80]
1-7-10	Receptor de NMDA	-----KKKATFRAITSTLASSFKRRRSSK-----	2HQW	[81]	1.9	[81]
1-5-8	PMCA	-----LRRGQILWFRGLNRIQTQIK-----	1CFF	[92]	64	[82]
	Cav1.1	-----KFYATFLIQEHFRKFMKRQEE-----	2VAY	[93]	400	[83]
1-10	Cav1.2	GHMDEVTVGKFFYATFLIQEYFRKFKRRKEQGLVGKPS	2BE6	[94]	230	[84]
	Neuromodulina	-----AATKIQASFRGHI TRKKLKGKKG-----	4E53	[95]	410	[85]
IQ	Neurogranina	-----NAAAAKIQASFRGHMARKKIKSGE-----	4E50	[95]	480	[86]
	Citropin 1.1	-----GLFDVIKKVASVIKKL-----	*	-	-	-

\* Estructura sin resolver, •Sin dato reportado - Sin bibliografía asociada

## Metodologías empleadas en el diseño de péptidos

Se han descrito una gran variedad de péptidos que pueden unirse a su blanco específico para modular algunas respuestas biológicas, celulares y vías de señalización en las que se encuentra implicado. Las metodologías que se han empleado para el diseño de péptidos dirigidos a la CaM son diversas, las principales se mencionan a continuación:

### a) Péptidos con modificaciones en los dominios de unión a CaM.

Cuando existe evidencia del dominio de unión de un ligando a su receptor se prefiere en primera instancia, modificar algunos residuos del dominio para promover o inhibir la interacción del receptor con el ligando.

Existen diversos péptidos diseñados con base en los dominios de unión a la CaM derivados de múltiples proteínas, algunos de estos complejos CaM-péptidos han sido determinados estructuralmente y se encuentran depositados en el PDB.

Uno de ellos, es la estructura de la CaM en complejo con M13 (KRRWKKNFIAVSAANRFK), un péptido derivado de la cadena ligera de miosina de músculo esquelético, cuya estructura fue determinada mediante RMN por Ikura y colaboradores [96].

A partir de este péptido, se diseñaron otros péptidos sintéticos cortos de acuerdo con cada mitad de la secuencia diana y las interacciones con la CaM fueron estudiadas mediante espectroscopia de fluorescencia y por métodos cinéticos. Las constantes de disociación para los péptidos diseñados unidos a la CaM, WF10 (residuos 1-10 de M13) y FW10 (residuos 9-18 de M13, con sustitución Phe-17-Trp) fueron 1  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ , respectivamente [97, 98].

### b) Péptidos derivados de la interfaz CaM-ligando

Las interacciones proteína-proteína juegan un papel crucial en la regulación de procesos biológicos, a estos sitios de interacción se les denomina interfaz. Se han

realizado estudios en búsqueda de las principales características de las interfaces y así, encontrar los factores que contribuyen a la afinidad, especificidad y reconocimiento entre proteínas.

Cuando la estructura del complejo está determinada y se encuentra disponible, se puede comenzar a estudiar la interfaz a partir de ese modelo estructural, o en su defecto simular *in silico* la estructura utilizando técnicas de modelaje molecular.

Utilizando estados agrupados por modelos de Markov se mostró que las interfaces presentadas por las estructuras apo y holo CaM son estérica y químicamente distintas, por lo tanto, pueden proporcionar especificidad. Las interfaces de los complejos CaM-fármaco y CaM-péptido están cubiertas por residuos de fenilalaninas [99].

### III. JUSTIFICACIÓN

Actualmente existe una gran cantidad de fármacos y prototipos de fármacos para múltiples padecimientos en los que se encuentra involucrada a la proteína CaM, por ejemplo, Alzheimer, esquizofrenia, desórdenes de conducta, cáncer, entre otros. La mayoría de dichos fármacos se obtuvieron de forma sintética. Sin embargo, presentan efectos secundarios, posiblemente provocados por su baja selectividad frente al complejo proteico de interés.

La búsqueda de moléculas más selectivas se ha centrado en el diseño de péptidos con propiedades farmacológicas que forjen la base para el desarrollo de biofármacos en el tratamiento de patologías relacionadas con los complejos proteicos estudiados.

Se utilizaron cuatro péptidos modelos (nNOS, skMLCK, Cav1.1 y Calspermin) para evaluar su dependencia con el calcio ( $Ca^{2+}$ ), además de dos proteínas de interés biológico (skMLCK y nNOS) para correlacionar la estructura a la afinidad con la que se unen a la CaM. Se diseñaron los modelos de los complejos CaM-péptido y CaM-proteína, para realizar estudios de MD *in silico* y modelar o predecir la posible forma de unión para cada complejo y determinar sus regiones de inhibición. A partir de estos datos se buscó diseñar nuevos péptidos específicos para los complejos CaM-skMLCK y CaM-nNOS.

## IV. OBJETIVO GENERAL

Estudiar las interacciones a nivel molecular de cuatro complejos CaM-péptido, utilizando el biosensor *hCaM-M124C-mBBr* y herramientas de modelaje molecular para realizar un diseño racional de péptidos con propiedades inhibitorias específicas de los complejos CaM-skMLCK y CaM-nNOS.

## V. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar las constantes de disociación de cuatro péptidos representativos sobre la CaM, en función de la dependencia de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), utilizando el biosensor *hCaM-M124C-mBBr*.
2. Construir e idealizar los modelos estructurales de los complejos CaM-péptidos utilizando los programas Rosetta y Modeller.
3. Realizar simulaciones de dinámica molecular de los péptidos unidos a la proteína CaM utilizando el paquete de programas de simulación de dinámica molecular Amber.
4. Evaluar la similitud estructural de los péptidos que se unen a la proteína CaM.
5. Predecir y determinar las interacciones CaM-proteína y CaM-proteína-péptido.
6. Diseñar nuevos péptidos inhibidores específicos de un complejo, con base en los resultados experimentales y teóricos obtenidos.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Los péptidos skMLCK, nNOS, CaV1.1, Calspermin, MLCK-A y NOS-A se obtuvieron de la compañía GenScript (<https://www.genscript.com/>). Las proteínas skMLCK (MYLK2) y nNOS (neuronal) se obtuvieron de la compañía Thermo Fisher Scientific (<https://www.thermofisher.com/us/en/home/brands/thermo-scientific.html>) y Enzo Life Sciences (<http://www.enzolifesciences.com/>), respectivamente. El biosensor fluorescente *hCaM* M124C-mBBr fue obtenido previamente como se describe por González Andrade y colaboradores. [54]. Las simulaciones de Dinámica Molecular de los complejos solvatados se realizaron en la supercomputadora Miztli de la UNAM (proyecto LANCAD-UNAM-DGTIC-313).

### Determinación de la concentración de calcio saturante para el biosensor *hCaM*-M124C-mBBr

La determinación de la concentración saturante de calcio se realizó adicionando concentraciones conocidas de calcio a partir de una solución 1 mM de CaCl<sub>2</sub> y 5 μM del biosensor en un volumen final de 2 mL, amortiguador Tris-HCL 50 mM, pH 7.5, a 25 °C.

### Simulación de MD de la CaM en unión a Ca<sup>2+</sup>

Se utilizó como modelo estructural el código PDB 1CLL para llevar a cabo la simulación de MD de la CaM sin Ca<sup>2+</sup> o unida a 1, 2, 3 y 4 iones Ca<sup>2+</sup>, eliminando de la CaM uno o más iones Ca<sup>2+</sup>, de acuerdo con la simulación a realizar [100]. Las coordenadas de los archivos mencionados se utilizaron para generar los archivos de topología correspondientes, utilizando el módulo LEAP de Amber16 con el campo de fuerza ff99SB [76, 77].

Se neutralizó el sistema adicionando iones sodio (Na<sup>+</sup>), seguido de una solvatación explícita del complejo en una caja octaédrica con el modelo de agua TIP3P con límite a una distancia de 12 Å de la superficie del complejo. Todas las simulaciones de MD se llevaron a cabo en cinco etapas: (1) minimización de la estructura original, (2) calentamiento desde 0 a 298.15 K en 50 ps, (3) despresurización en 50 ps, (4) equilibrio del sistema a una presión de 1 atm durante 50 ps y (5) simulación de MD de 100 ns.

## Estimación de las constantes de disociación ( $K_d$ ) de los péptidos con el biosensor fluorescente de CaM

Se realizaron curvas de titulación de los péptidos modelo (skMLCK, nNOS, Cav1.1, Calspermin), utilizando una solución 1 mM de cada péptido con el biosensor hCaM M124C-mBBr a una concentración de 5  $\mu\text{M}$  y diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  (0, 3.75, 7.5, 11.25 y 15  $\mu\text{M}$ ), en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, a 25 °C y agitación constante. A partir de la solución de cada péptido correspondiente, se fue adicionando 1  $\mu\text{L}$  de stock (0.5  $\mu\text{M}$ ) de manera repetida hasta alcanzar la saturación del sistema en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en un volumen final de 2 mL.

Los espectros de fluorescencia fueron obtenidos a una longitud de onda de excitación de 381 nm y a un intervalo de emisión de 405-550 nm.

Los cambios en los espectros de fluorescencia fueron analizados para obtener la  $K_d$  del complejo biosensor CaM-péptido, utilizando la siguiente ecuación de unión:

$$y = \frac{\left(1 + \frac{K_d}{P_0} + \frac{L_0}{P_0}\right) - \sqrt{\left(1 + \frac{K_d}{P_0} + \frac{L_0}{P_0}\right)^2 - 4 \frac{L_0}{P_0}}}{2}$$

donde  $y$  representa el grado fraccional de intensidad de fluorescencia a 381 nm,  $K_d$  es la constante de disociación,  $P_0$  y  $L_0$  son la concentración de proteína y ligando presentes, respectivamente [101].

## Construcción de modelos estructurales y simulación de MD de los complejos CaM-péptidos

### Preparación de los archivos de coordenadas iniciales

Se realizó la búsqueda de las estructuras tridimensionales de los complejos de la CaM con los péptidos skMLCK, nNOS, Cav1.1 y Calspermin, disponibles en el PDB. Los archivos de PDB empleados fueron 2LV6 (KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL), 2O60 (KRRRAIGFKLAEAVKFSKLMGQ) y 2VAY (KFYATFLIQEHFRKFMKRQEE), para los péptidos skMLCK, nNOS y CaV1.1, respectivamente. Adicionalmente, se seleccionaron las estructuras en la conformación abierta y cerrada de la CaM, 1CLL y 1A29, respectivamente. El péptido Calspermin fue modelado *ab initio* utilizando el servidor

Robetta (<http://robeta.bakerlab.org/>), debido a que la estructura del péptido no estaba determinada.

Las estructuras de los péptidos skMLCK, Cav1.1 y Calspermin se extrajeron y alinearon a la CaM del archivo 2O60. Finalmente, se eliminaron los solapamientos de las cadenas laterales entre la CaM y los péptidos con la aplicación Relax del programa Rosetta (idealización).

### Simulación de MD de los complejos CaM-péptidos

Las coordenadas iniciales de los péptidos y de la CaM se utilizaron para generar los archivos de topología correspondientes, utilizando el módulo LEAP de Amber16 con el campo de fuerza ff99SB [102, 103]. Se neutralizó el sistema adicionando iones sodio ( $\text{Na}^+$ ), seguido de una solvatación explícita del complejo en una caja octaédrica con el modelo de agua TIP3P con límite a una distancia de 12 Å de la superficie del complejo.

Las simulaciones de MD se realizaron con el siguiente orden: (1) minimización de la estructura original, (2) calentamiento desde 0 a 298.15 K en 50 ps, (3) despresurización en 50 ps, (4) equilibrio del sistema a una presión de 1 atm durante 50 ps y, finalmente, (5) simulación de MD de 100 ns (protocolo en apéndice y en línea en la página <http://biosensor.facmed.unam.mx/tesis-erika/apendice.html>).

### Parámetros energéticos de unión calculadas por MM/PBSA

Utilizando el campo de fuerza de Amber, se obtuvieron los parámetros energéticos de unión mediante Mecánica Molecular/Área de Superficie de Poisson Boltzmann, que utiliza un conjunto de conformaciones representativas para calcular el cambio de energía libre entre dos estados: el estado libre de un receptor y ligando, y la formación del complejo [104]. Las diferencias de energía libre involucran mecánica molecular con modelos implícitos de solvatación. La energía libre de unión ( $\Delta G$ ) entre un ligando (L) y un receptor (R) para formar un complejo se calcula como:

$$\Delta G_{\text{unión}} = \Delta H - T\Delta S \approx \Delta E_{\text{MM}} + \Delta G_{\text{sol}} - T\Delta S$$

$$\Delta E_{\text{MM}} = \Delta E_{\text{interna}} + \Delta E_{\text{electrost}} + \Delta E_{\text{vdw}}$$

$$\Delta G_{\text{sol}} = \Delta G_{\text{PB}} + \Delta G_{\text{SA}}$$

donde  $\Delta E_{MM}$ ,  $\Delta G_{Sol}$  y  $-T\Delta S$  son los cambios de la energía de la mecánica molecular en fase gaseosa, la energía libre de solvatación y la entropía conformacional al unirse, respectivamente.  $\Delta E_{MM}$  comprende  $\Delta E_{interna}$  (enlace, ángulo y ángulo dihedro),  $\Delta E_{electrost}$  (energías electrostáticas) y  $\Delta E_{vdw}$  (energías de Van der Waals).  $\Delta G_{solv}$  es la suma de energía de solvatación electrostática (contribución polar)  $-\Delta G_{PB}$  - y componente de solvatación no electrostática (contribución no polar)  $-\Delta G_{SA}$ . La contribución polar se calcula utilizando el modelo de superficie de Poisson-Boltzmann, mientras que la energía no polar se calcula a partir del área de superficie accesible al solvente (SASA). El cambio de entropía conformacional ( $-T\Delta S$ ) se calcula mediante el análisis de modos normales a partir de un conjunto de instantáneas conformacionales tomadas de la trayectoria de la MD [105, 106].

### Análisis de las simulaciones de MD para los complejos CaM-péptidos

El programa cpptraj de Amber [107] se utilizó para procesar las trayectorias obtenidas de la simulación de MD de los complejos CaM-péptidos y de la CaM en sus diferentes conformaciones durante 100 ns. Se determinó la RMSD y los residuos de interacción de la CaM con los péptidos a lo largo de la trayectoria de MD.

El programa xmgrace se utilizó para visualizar los datos de salida generados por cpptraj de forma gráfica en Ubuntu (Linux), y OriginPro 2016 [108] para graficar el conjunto de datos obtenidos para los complejos CaM-péptidos, Holo-CaM y CaM en su conformación cerrada.

Se analizaron los residuos de la CaM que participan en las interacciones con cada uno de los péptidos durante la MD, empleando la ventana Tk Console del programa VMD [109] y mediante los comandos correspondientes generar una matriz de datos que fue procesada para el análisis.

### Ensayos de competencia de las proteínas skMLCK, nNOS y moléculas bioactivas empleando el biosensor *hCaM-M124C-mBBr*

Para realizar los ensayos de competencia se determinó la concentración mínima requerida del biosensor *hCaM-M124C-mBBr* para obtener una señal de fluorescencia aceptable, en un volumen final de 1 ml de amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, a 25°C.



Se obtuvieron los espectros de fluorescencia en un intervalo de 0.1 - 0.7  $\mu\text{M}$  del biosensor.

Posteriormente, se determinó la concentración máxima de  $\text{CaCl}_2$  correspondiente a la saturación de calcio ( $4\text{Ca}^{2+}$ ) con el biosensor *hCaM-M124C-mBBr* a una concentración de 0.2  $\mu\text{M}$ , en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 a 25 °C, a partir de una solución de 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$ .

Los ensayos de competencia se realizaron utilizando las proteínas nNOS (6.25  $\mu\text{M}$ ), skMLCK (1.95  $\mu\text{M}$ ), una solución de bisindolilmaleimida IV (2 mM), calmidazolium (2 mM) y el biosensor *hCaM-M124C-mBBr* (0.2  $\mu\text{M}$ ) en presencia de  $\text{CaCl}_2$  saturante (3.2  $\mu\text{M}$ ) en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, a 25 °C. Los espectros de fluorescencia para cada ensayo de competencia se obtuvieron siguiendo la fluorescencia intrínseca determinada por los aminoácidos aromáticos, excitando a 280 nm y a 295 nm con un intervalo de emisión de 310-550 nm y siguiendo la fluorescencia del biosensor excitando a 381 nm con un intervalo de emisión de 405-550 nm.

### Construcción de los modelos estructurales para los complejos CaM-proteínas

La construcción de los complejos proteína-proteína (CaM-skMLCK y CaM-nNOS) inició con la búsqueda de los genes y secuencias que corresponden a las proteínas que interactúan con la CaM.

El gen *mylk2* y el gen *nos1* codifican para la proteína skMLCK y nNOS; las secuencias de aminoácidos de las proteínas se obtuvieron de los códigos de acceso NP\_149109.1 y NP\_000611.1 de NCBI, respectivamente.

Utilizando las secuencias de las proteínas en cuestión, se realizó la búsqueda de estructuras determinadas para cada proteína y en complejo con la CaM, las estructuras con mejor identidad y cobertura reportadas en protein BLAST fueron seleccionadas. Los códigos de acceso en el PDB son 2LV6 (péptido) y 2X4F (proteína) para la proteína skMLCK y 2O60 (péptido), 4D1N y 1TLL (dominios oxigenasa y reductasa) para la proteína nNOS.

Las estructuras identificadas cubren una gran parte de los dominios de cada proteína, pero existen regiones que aún no han sido determinadas.

Por lo que modelamos las estructuras de las proteínas skMLCK y nNOS y, en complejo con la CaM para llevar a cabo las simulaciones de MD de los complejos proteicos y así obtener modelos más afinados que nos permitieran estudiar las interacciones y llevar a cabo el diseño de péptidos específicos para los complejos CaM-skMLCK y CaM-nNOS. Los protocolos para el modelaje de las proteínas skMLCK y nNOS se encuentran descritos en el apéndice y en la página <http://biosensor.facmed.unam.mx/tesis-erika/apendice.html>.

### **Complejo CaM-skMLCK**

La construcción del monómero de skMLCK inició con la búsqueda de las estructuras correspondientes a la secuencia de la proteína. Utilizando el servidor Protein BLAST se identificaron a las estructuras con la mejor puntuación y cobertura para la secuencia de la proteína skMLCK siendo 2X4F y 2LV6 (cadena B, dominio de unión a CaM).

Se modeló un péptido de 30 residuos de aminoácidos que comprende los residuos faltantes en las estructuras identificadas para la secuencia de la proteína, utilizando modelaje *Ab initio* (Robetta [110], <http://robetta.bakerlab.org>). El modelo del péptido con mejor puntuación fue elegido y nombrado f-skMLCK.pdb, el cual se utilizó junto con 2X4F y 2LV6, para obtener el modelo del monómero de skMLCK utilizando modelaje por homología con el programa Modeller [111].

El modelo estructural del monómero de skMLCK con menor energía fue elegido y renombrado como mon-skMLCK.pdb. Posteriormente, se realizó la formación del complejo proteína-proteína, mediante la alineación de la estructura de la proteína CaM al monómero de la proteína skMLCK, es decir, en el dominio de unión a la proteína skMLCK que corresponde a la secuencia KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL (péptido skMLCK). Se realizó un afinamiento de las cadenas laterales con la aplicación Relax de Rosetta 2016 [112] al complejo CaM-mon-skMLCK. Finalmente, se llevó a cabo una simulación de MD al vacío durante 50 ns y al término de la simulación se obtuvo un modelo estructural del complejo proteico CaM-skMLCK necesario para el diseño de nuevos péptidos.

## Complejo CaM-nNOS

La construcción del modelo estructural de la proteína nNOS inició con la formación de un monómero con sus dos dominios reductasa y oxigenasa unidos mediante el dominio de unión a CaM (péptido nNOS). Las estructuras disponibles en el PDB para la proteína nNOS cubren la mayoría de la secuencia para esta (4D1N; cadena B 300-720 aa [dominio oxigenasa], 1TLL; cadena B 750-1400 aa [dominio reductasa] y 2O60 cadena B [dominio de unión a CaM]).

Sin embargo, el archivo 1TLL no cubre una región de 12 residuos de aminoácidos adyacente a la región de unión de la proteína CaM. Por lo que, el fragmento de aminoácidos faltante se modeló *ab initio* (Robetta [110], <http://robetta.bakerlab.org>), nombrándolo f-nNOS.pdb. La secuencia de aminoácidos de la proteína y las secuencias de las estructuras determinadas (4D1N, 1TLL. y 2O60) y del fragmento de residuos faltante (f-nNOS.pdb), fueron utilizadas como referencia para obtener el modelo estructural de la proteína nNOS por modelaje por homología con Modeller [111]. El modelo obtenido fue nombrado mon-nNOS.pdb.

Posteriormente, se realizó la formación del complejo proteico mediante la alineación de la estructura de la proteína CaM al monómero de la proteína nNOS, en la región correspondiente a la secuencia KRRRAIGFKKLAEAVKFSAKLMGQ (péptido nNOS). Se realizó un afinamiento de las cadenas laterales en el complejo.

Finalmente, se llevó a cabo la simulación de la MD para el complejo CaM-mon-nNOS durante 100 ns. Al término de la simulación se obtuvo un modelo estructural del complejo el cual fue utilizado para formar el complejo CaM-homodímero-nNOS completo. Así, primero se alineó la cadena A faltante del dominio reductasa al alinear la estructura del archivo 1TLL al complejo antes mencionado, generando la estructura parcial de la proteína nNOS con el dominio reductasa completo para obtener el modelo estructural denominado CaM-dom-reductasa-nNOS.

Después, se alineó la estructura 4D1N a la estructura final del complejo, añadiendo la cadena A faltante del dominio oxigenasa para generar la estructura CaM-homodímero-nNOS. Finalmente, se llevó a cabo una MD al vacío del complejo proteico completo CaM-nNOS durante 50 ns y al término de la simulación se obtuvo un modelo estructural del complejo utilizado posteriormente para el diseño de nuevos péptidos.

## Diseño de los péptidos específicos para los complejos CaM-proteína

Los modelos estructurales de los complejos CaM-skMLCK y CaM-nNOS generados de la MD fueron analizados para determinar los aminoácidos implicados en la interfaz de las proteínas skMLCK y nNOS con la CaM y que serían considerados como posibles péptidos inhibidores de estos complejos. Los péptidos llamados MLCK-A (VDTMVFVRQICDGLFMHKM) y NOS-A (KAHMERLEEVNKEIDTTS) fueron diseñados para interactuar con el complejo CaM-skMLCK y CaM-nNOS, respectivamente.

## Identificación de la interfaz del complejo proteico CaM-nNOS y CaM-skMLCK con Peptiderive

Se utilizó el protocolo Peptiderive [113] del servidor online de Rosetta (<http://rosie.rosettacommons.org/peptiderive>) para determinar los segmentos polipeptídicos provenientes de la interfaz del complejo CaM-nNOS y CaM-skMLCK que contribuyen de forma significativa sobre la energía de unión del complejo y pueden ser susceptibles de inhibición.

Se utilizaron las estructuras del complejo proteico de interés con el dominio de unión a CaM y sin el dominio de unión a CaM. Se indicó a la CaM y proteínas como receptor y ligandos, respectivamente, y la obtención de péptidos lineales y cíclicos provenientes de la interfaz de un intervalo de longitud entre 10-26 residuos de aminoácidos.

## Ensayos de unión de la proteína CaM con los péptidos diseñados

Se realizaron ensayos de unión CaM-péptido diseñado utilizando el biosensor fluorescente *hCaM-M124C-mBBR* (5  $\mu$ M) y los péptidos diseñados MLCK-A y NOS-A, adicionando 1  $\mu$ L de los péptidos (0.5  $\mu$ M) de manera continua hasta una concentración de 10  $\mu$ M en un volumen final de 2 mL en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, a 25°C, con agitación constante.

## Acoplamiento y simulación de MD para los complejos CaM-péptido diseñado

Utilizando la estructura de la proteína CaM unida a  $\text{Ca}^{2+}$  del archivo 2O60 y la secuencia de los péptidos diseñados (MLCK-A y NOS-A), se realizaron acoplamientos moleculares (Docking) proteína-péptido, empleando el servidor web CABS-dock [114]

(<http://biocomp.chem.uw.edu.pl/CABSdock/>). Posteriormente, a los complejos CaM-péptido obtenidos se realizaron las simulaciones de MD durante 100 ns siguiendo el protocolo utilizado con los péptidos inicialmente estudiados.

### Ensayos de competencia CaM-proteína-péptido diseñado

Se llevaron a cabo ensayos de competencia CaM-proteína-péptido diseñado empleando una concentración de 0.2  $\mu\text{M}$  del biosensor fluorescente de CaM, 3.2  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 a 25 °C en volumen final de 1 mL en la celda, para cada ensayo de competencia.

Para el ensayo de competencia que incluyó a la proteína nNOS se utilizó 1  $\mu\text{L}$  de la solución inicial de nNOS (6.25  $\mu\text{M}$ ) y 10  $\mu\text{M}$  de péptido NOS-A. En el ensayo de competencia con la proteína skMLCK se emplearon 2  $\mu\text{L}$  de la solución inicial de skMLCK (1.95  $\mu\text{M}$ ) y 10  $\mu\text{M}$  de péptido MLCK-A. Se obtuvieron los espectros de fluorescencia intrínseca excitando a 280 nm y 295 nm con un intervalo de emisión de 310-550 nm y siguiendo la fluorescencia del biosensor excitando a 381 nm con un intervalo de emisión de 405-550 nm.

### Acoplamiento y simulación de MD para los complejos CaM-proteína-péptido

Se identificaron los sitios probables de interacción de los péptidos diseñados con los complejos CaM-skMLCK y CaM-nNOS, mediante acoplamiento molecular utilizando CABS-dock [114]. Sin embargo, dadas las especificaciones del servidor web solo se permiten realizar acoplamientos moleculares de máximo 500 residuos de aminoácidos correspondientes a las proteínas en cuestión y con una longitud de 4-30 residuos de aminoácidos para los péptidos.

Por lo tanto, se consideraron los residuos que se encontraban en la interfaz de interacción entre las proteínas skMLCK y nNOS con la CaM, y los péptidos MLCK-A (20 residuos) y NOS-A (18 residuos).

Se extrajo el péptido del modelo con menor energía para cada complejo proteína-proteína-péptido obtenido de CABS-dock, y este fue alineado al modelo estructural del complejo CaM-nNOS o CaM-skMLCK para realizar la MD y evaluar la interacción del péptido diseñado en el complejo correspondiente.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio de las interacciones entre proteínas provee información acerca de los procesos biológicos, celulares y de señalización, que son indispensables para la comprensión de enfermedades y desórdenes donde existen defectos en las interacciones proteína-proteína, permitiendo el diseño de fármacos y moléculas bioactivas que modulen estas respuestas afectadas.

### Afinidad de los péptidos skMLCK, nNOS, Cav1.1 y calspermin con el biosensor de CaM

La unión del ion calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) a la CaM es importante para la regulación de sus ligandos a nivel intracelular, provoca la exposición de regiones hidrofóbicas, que están rodeadas por aminoácidos cargados negativamente, y los reportes muestran la interacción de múltiples proteínas e inhibidores en estos sitios.

El calcio se une primero a los sitios del dominio C-terminal de la CaM, que son los de mayor afinidad y, posteriormente, a los dos sitios del dominio N-terminal. Sin embargo, en presencia de proteínas blanco, la unión a calcio se vuelve cooperativa para los cuatro sitios y la afinidad relativa de estos sitios varía [8].

Mediante una titulación de  $\text{CaCl}_2$  utilizando el biosensor de CaM, se determinaron cuatro concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  para lograr diferentes estados de saturación. Estas condiciones experimentales fueron empleadas para realizar los ensayos de unión de los péptidos modelo (skMLCK, nNOS, Cav1.1, Calspermin) con el biosensor. La determinación de cinco constantes de disociación en función del grado de saturación con calcio tiene la finalidad de evaluar la importancia de la participación del ion  $\text{Ca}^{2+}$  en la afinidad de los péptidos modelo hacia la CaM.

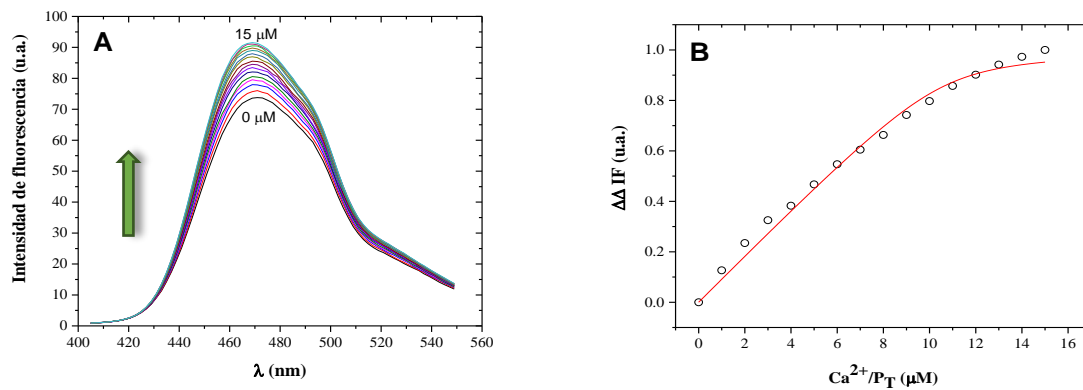
La utilización del biosensor fluorescente de CaM (*hCaM M124C-mBBR*) como herramienta experimental, posee dos ventajas frente a los ensayos enzimáticos comúnmente reportados para la mayoría de los ligandos de la CaM: (1) la capacidad de monitorear más de un ligando a la vez y obtener respuestas de unión específicas y directas para cada uno, (2) su eficiencia cuántica ( $\phi=0.494$ ) respecto a la CaM nativa ( $\phi=0.025$ ), le confiere una mejor sensibilidad lo que permite determinaciones

cuantitativas con menos error experimental. Cabe destacar que su funcionalidad no se ve comprometida por la mutación del aminoácido Met y la modificación química del fluoróforo *mBBR*, respecto a la CaM nativa.

Adicionalmente, se han identificado con el biosensor *hCaM M124C-mBBR* alrededor de 20 inhibidores de la CaM [1, 12, 54, 115, 116]; estos datos apoyan su uso para las determinaciones de unión cualitativas y cuantitativas de nuestros ligandos (moléculas bioactivas, péptidos y proteínas) con la CaM.

La figura 7 muestra la titulación en fluorescencia del calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) con el biosensor *hCaM-M124C-mBBR*, observando un efecto hipercrómico (aumento en la intensidad de fluorescencia) conforme se elevaba la ocupación con  $\text{Ca}^{2+}$  en el sistema ( $15 \mu\text{M}$ ).

A partir de este resultado se establecieron cuatro concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  que comprenden  $3.75 \mu\text{M}$ ,  $7.5 \mu\text{M}$ ,  $11.25 \mu\text{M}$  y  $15 \mu\text{M}$  para realizar los ensayos de unión de los péptidos modelo (skMLCK, nNOS, Cav1.1 y Calspermin) con el biosensor de CaM. Dichos valores corresponden a un 33%, 65%, 88% y 95% de ocupación del ion  $\text{Ca}^{2+}$  en la CaM.



**Figura 7. (A) Espectros de fluorescencia y (B) curva de la titulación de  $\text{Ca}^{2+}$  con el biosensor *hCaM-M124C-mBBR*.** Los espectros se obtuvieron excitando al fluoróforo *mBBR* del biosensor fluorescente de la CaM a una longitud de excitación de 381 nm y a un intervalo de emisión de 405-550 nm. Utilizando una solución 1 mM de  $\text{CaCl}_2$  y una concentración de  $5 \mu\text{M}$  del biosensor *hCaM M124C-mBBR*, en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, a  $25^\circ\text{C}$ .

Los vídeos de las simulaciones de MD de los complejos de la CaM unida a  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentran disponibles en la página <http://biosensor.facmed.unam.mx/tesis-erika/videos.html> (vídeos 1-5). Se realizó el análisis de la simulación de MD de la CaM en función al número de iones  $\text{Ca}^{2+}$  que se unen. La estructura de la CaM empleada tiene el código de acceso 1CLL del PDB (figura 8).

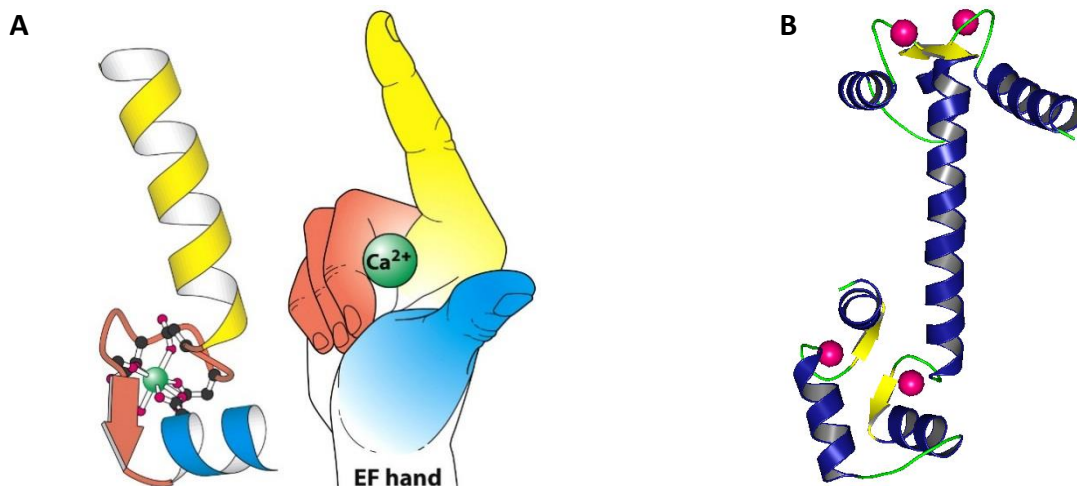
La figura 9 representa la fluctuación de la RMSD por residuo (RMSF), como una medida de la movilidad promedio de cada aminoácido en la proteína CaM a lo largo de 100 ns de la MD. Las regiones que comprenden las estructuras secundarias  $\alpha$ -hélice y giros  $\beta$  en la proteína muestran un RMSF más pequeño debido al tipo de interacciones que presentan, representadas principalmente por puentes de hidrógeno.

Por otra parte, el RMSF disminuye en las regiones correspondientes a asas en función del grado de iones en la CaM, de esta forma, el complejo  $4\text{Ca}^{2+}$ -CaM muestra un menor RMSF en estas zonas, demostrando que los iones  $\text{Ca}^{2+}$  le confieren una estabilidad a la proteína.

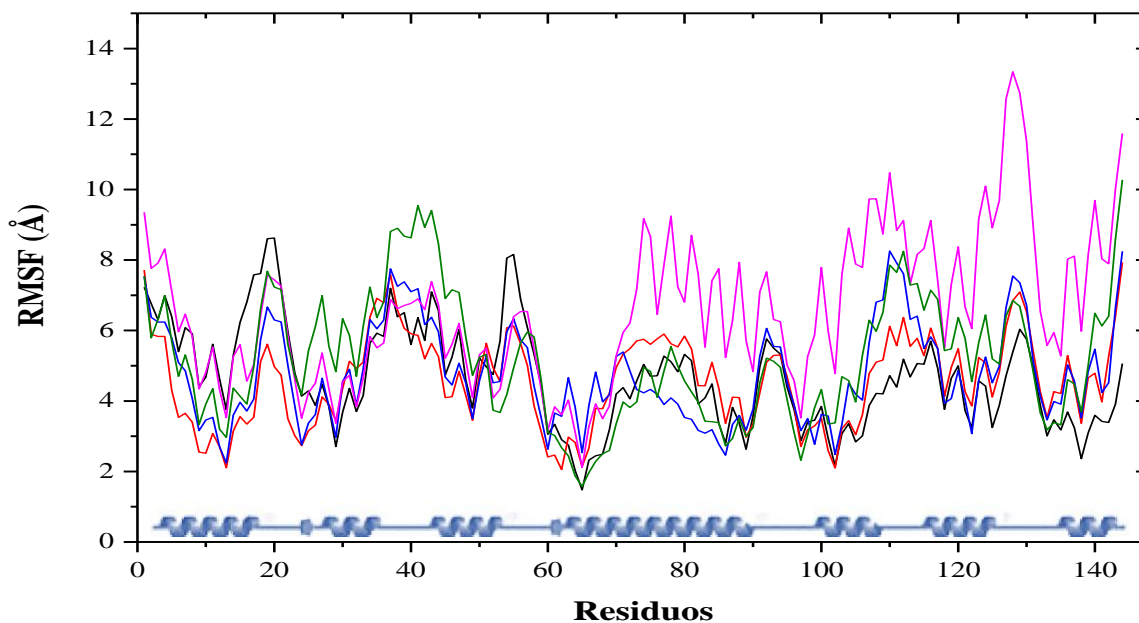
En contraste, la CaM presenta diversas conformaciones durante las simulaciones de MD al unir los iones  $\text{Ca}^{2+}$ , observando que inicialmente los dominios EF-hand se acomodan de forma paralela respecto a su hélice central (residuos 66-92) y, posteriormente, de forma perpendicular respecto a esta (figura 10), exhibiendo en determinado momento y en función del grado de saturación con  $\text{Ca}^{2+}$  regiones ricas en Met (parches hidrofóbicos) que se han identificado como zonas de interacción con ligandos [13, 117]. Las diferentes conformaciones que presente la CaM probablemente permitan unir con mayor o menor afinidad ciertos ligandos y dependerá de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  que esté disponible en el medio.

Se han reportado simulaciones de MD de la CaM en unión a  $\text{Ca}^{2+}$  en ventanas de tiempo de simulación de picosegundos a nanosegundos, con solvatación explícita y contraiones, condiciones que se asemejan a las experimentales. Los resultados muestran una alta flexibilidad en la hélice central y una transición de un estado abierto a cerrado o semicerrado, que se acompaña por una reorientación de las hélices dentro de los dominios EF-hand [118-121], en coincidencia con lo que se ha observado en nuestras simulaciones.





**Figura 8. Representación de la CaM y sus dominios EF-hand.** (A) Representación de un dominio EF-hand en la CaM. Tomado de Berg et al. [122] y (B) CaM representada con sus  $\alpha$ -hélices (azul), giros beta (amarillo) y asas (verde) unida a sus iones  $\text{Ca}^{2+}$  (rosa); estructura 1CLL en el PDB.



**Figura 9. Fluctuaciones por residuo de la CaM en unión a  $\text{Ca}^{2+}$  durante 100 ns de MD.** Fluctuaciones de la CaM sin  $\text{Ca}^{2+}$  (—),  $1\text{Ca}^{2+}$ -CaM (—),  $2\text{Ca}^{2+}$ -CaM (—),  $3\text{Ca}^{2+}$ -CaM (—) y  $4\text{Ca}^{2+}$ -CaM (—). A partir de la estructura 1CLL se realizaron los modelos estructurales  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM empleados en las simulaciones de MD.

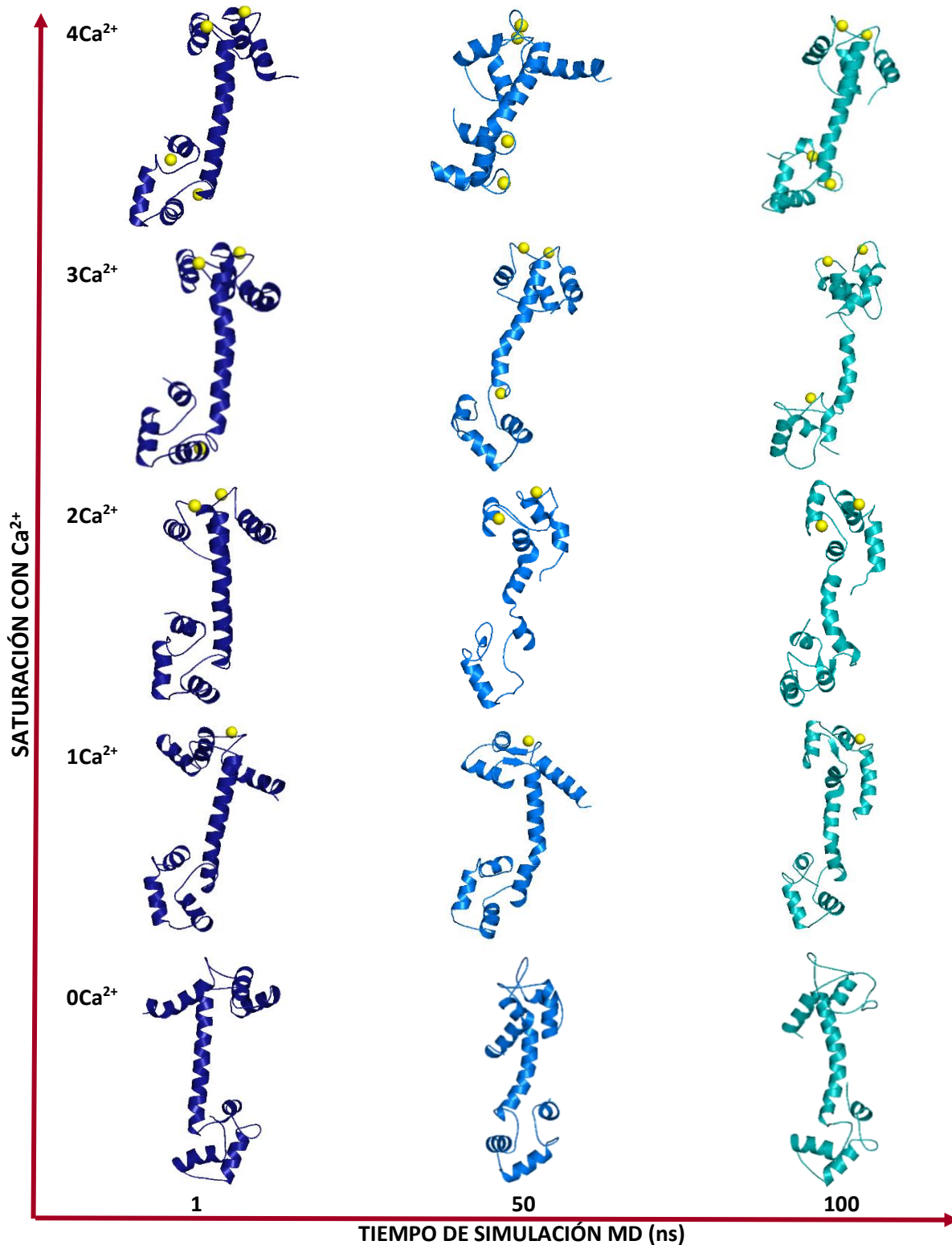


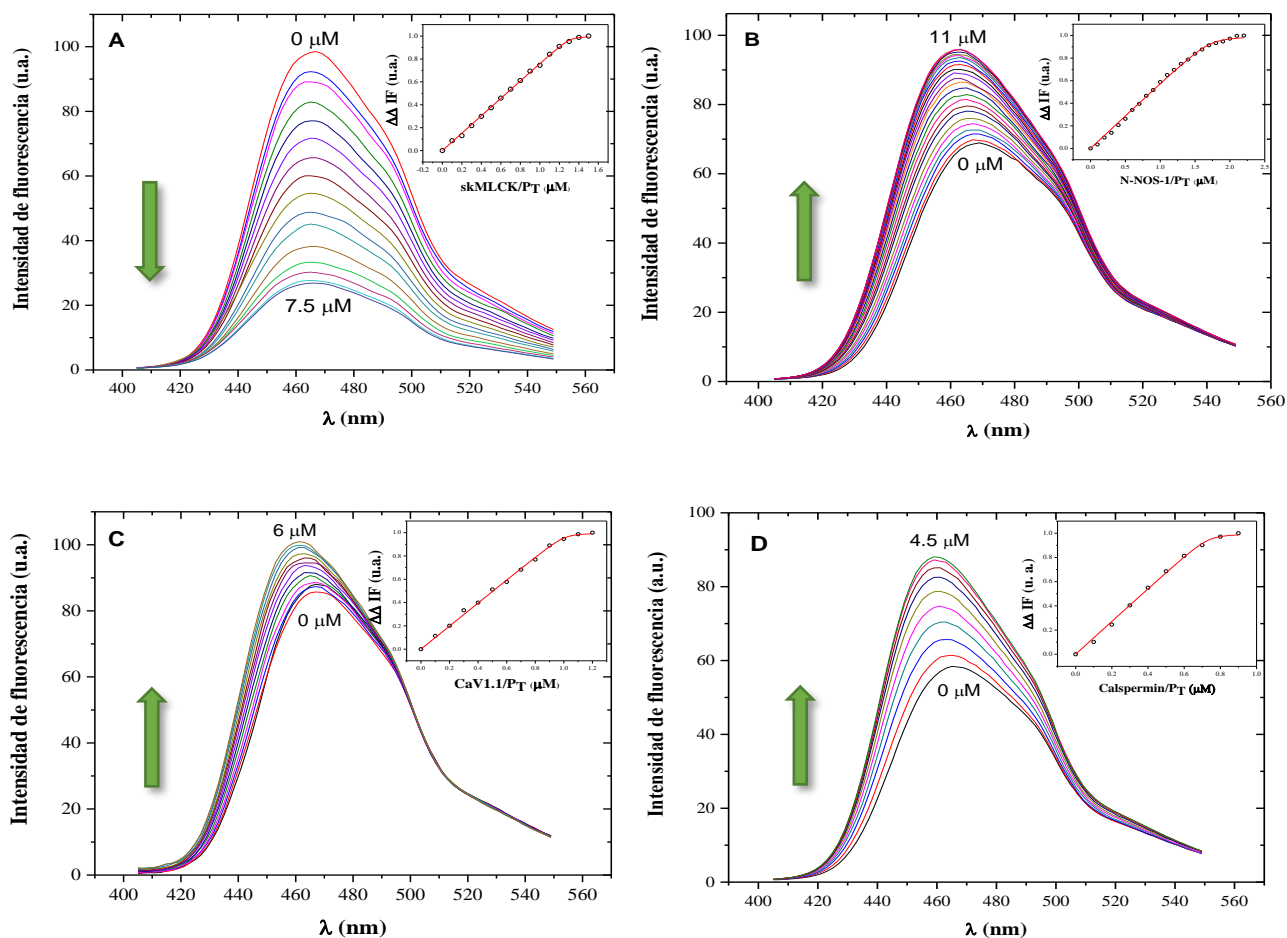
Figura 10. Modelos estructurales de las simulaciones de MD de la CaM en función del grado de unión a Ca<sup>2+</sup>. Las imágenes fueron tomadas a 1, 50 y 100 ns de la simulación de MD de CaM con 0-4 Ca<sup>2+</sup>. Conformación inicial 1CLL.

Se emplearon los péptidos skMLCK, nNOS, Cav1.1 y Calspermin como péptidos modelo para evaluar su interacción y afinidad por la CaM en función de la concentración de Ca<sup>2+</sup> y, posteriormente, realizar un comparativo respecto a los péptidos diseñados (tabla 3).

Tabla 3. Péptidos modelo utilizados en los ensayos de unión con el biosensor de CaM		
Proviene	Péptido	Secuencia
Dominio de unión de CaM en la proteína	skMLCK	KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL
	nNOS	RRAIGFKKLAEAVKFSAKLMGQ
	Cav1.1	KFYATFLIQEHFRKFMKRQEE
	Calspermin	ARRKLKAAVKAVVASSRLGS

Los espectros de fluorescencia obtenidos a partir de la titulación de los péptidos modelo con el biosensor fluorescente (apéndice, figuras A1-4) muestran un máximo de fluorescencia al añadir una concentración de Ca<sup>2+</sup> específica (0-15 µM). Al adicionar el respectivo péptido, los espectros de fluorescencia se modifican y esto es atribuido principalmente al cambio en el microambiente del fluoróforo *mBBr* del biosensor, inducido probablemente por dos factores: el cambio conformacional de la proteína y la interacción directa del péptido con el fluoróforo.

Los espectros de fluorescencia de los péptidos nNOS, Cav1.1. y Calspermin mantienen un efecto hipercrómico en función de la adición del péptido correspondiente al biosensor, como se observa en la figura 11, debido posiblemente a que el fluoróforo *mBBr* queda rodeado en un entorno hidrofóbico cuando la CaM se une al respectivo péptido en el ensayo. Los espectros de fluorescencia para el péptido skMLCK muestran un efecto hipocrómico (disminución de la intensidad de fluorescencia).

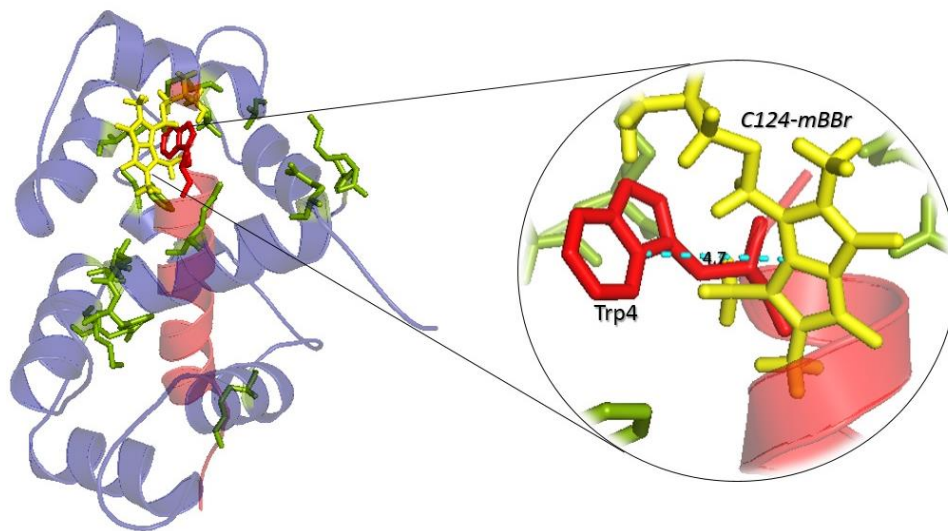


**Figura 11. Espectros de fluorescencia y curvas de la titulación de los péptidos (A) skMLCK, (B) nNOS, (C) Cav1.1 y (D) Calspermin con el biosensor *hCaM-M124C-mBBr* a saturación con  $\text{Ca}^{2+}$  (15  $\mu\text{M}$ ).** Los espectros de obtuvieron excitando al biosensor con a 381 nm y con un intervalo de emisión de 405-550 nm. Utilizando 15  $\mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$  y 5  $\mu\text{M}$  del biosensor *hCaM M124C-mBBr*, en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, a 25°C. Los regráficos muestran la titulación de los péptidos, la línea sólida en color rojo muestra el ajuste realizado.

Se analizaron las interacciones que establecen los péptidos con la CaM utilizando los modelos estructurales de estos complejos; se observó una gran cantidad de interacciones hidrofóbicas y, particularmente, en el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-péptido skMLCK (figura 12) se observa que el residuo Met124 de la proteína CaM, posición modificada a Cys124 y donde se encuentra unido químicamente el fluoróforo *mBBr*, interacciona con el residuo Trp4 del péptido skMLCK con una distancia menor a 5 Å.

Cabe destacar que el péptido skMLCK es el único con el aminoácido aromático Trp (tabla 3), por lo que esta interacción podría ser la responsable de la disminución de los espectros de fluorescencia, observado en los resultados experimentales, provocando un apagamiento debido a transferencias radiativas del residuo Trp con el *mBBR*.

Se han descrito efectos similares cuando se realiza la mutagénesis de los residuos de Met que se encuentran en el dominio C-terminal por selenometionina o leucina [123, 124].



**Figura 12. Interacción  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-péptido skMLCK.** Modelo tridimensional de la interacción del residuo Trp4 del péptido skMLCK (hélice roja) con el fluoróforo *mBBR* de la proteína CaM (amarillo) y los demás residuos que participan en interacciones hidrofóbicas (verde) con el péptido. La figura fue construida con el programa Pymol.

Se determinaron cinco constantes de disociación ( $K_d$ ) para cada uno de los péptidos modelo, skMLCK, nNOS, Cav1.1 y calspermin, en función de las diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  utilizando al biosensor *hCaM M124C-mBBR* (tabla 4).

De acuerdo a los datos obtenidos, las constantes de disociación de los péptidos skMLCK, calspermin y nNOS, muestran que a mayor concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la titulación su afinidad por la proteína CaM se incrementa. Esto es relevante cuando se asocia al proceso celular con el que se ve relacionada la proteína de la cual provienen. La skMLCK participa en la contracción del músculo esquelético, por su parte calspermin se encuentra vinculado con la espermatogénesis y la nNOS en la comunicación neuronal.

Tabla 4. Determinación de las constantes de disociación de los péptidos modelo a diferentes concentraciones de CaCl <sub>2</sub> con el biosensor <i>hCaM-M124C-mBBr</i>					
[Ca <sup>2+</sup> ]	0.0 μM	3.75 μM	7.5 μM	11.25 μM	15.0 μM
Péptido	<i>K<sub>d</sub></i> (nM)				
skMLCK	43.2 ± 13.8	39.7 ± 8.9	9.1 ± 6.0	3.3 ± 1.8	1.4 ± 0.7
nNOS	84.7 ± 17.6	47.7 ± 10.3	34 ± 8.8	9.6 ± 6.7	10.2 ± 0.2
Cav1.1	3.1 ± 2.0	1.5 ± 2.1	1.9 ± 1.4	2.5 ± 0.9	1.9 ± 1.3
Calspermin	32.3 ± 7.4	27.4 ± 7.6	9.9 ± 3.9	10.2 ± 4.9	2.4 ± 1.6

A diferencia de los anteriores, la afinidad del péptido Cav1.1 no se ve afectada por el aumento en la concentración de calcio en la titulación. Los canales Cav1.1 son proteínas que se expresan casi exclusivamente en las células del músculo esquelético. Los cambios conformacionales de los dominios de detección de voltaje en Cav1.1 se transmiten por una liga conformacional a los receptores de rianodina asociados, que liberan Ca<sup>2+</sup> del retículo sarcoplásmico. La inactivación dependiente de Ca<sup>2+</sup> (CDI) está mediada por la CaM al unirse al extremo C-terminal de la proteína Cav1.1 [125, 126]. Se han identificado 3 dominios dentro de esta región: un motivo de unión EF que se une a Ca<sup>2+</sup>, un sitio de unión a CaM y un motivo IQ de unión a CaM [20, 127].

El complejo Ca<sup>2+</sup>-CaM se une al motivo IQ, que corresponde al péptido Cav1.1. Es probable que la inactivación dependiente de Ca<sup>2+</sup> sea la responsable de que no se aprecie un cambio significativo en las constantes de disociación para el péptido Cav1.1 al incrementar las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> en su titulación con el biosensor de CaM, demostrando que la CaM en su conformación Apo u Holo mantiene una afinidad similar por el péptido Cav1.1 [128].

El estudio de la relación de la constante de disociación de los péptidos modelos con la CaM en función del grado de saturación de Ca<sup>2+</sup>, se reportó por primera vez por nuestro grupo de trabajo, puesto que la mayoría de los ensayos donde se referencia una *K<sub>d</sub>* de los péptidos estudiados es realizada a una concentración fija de calcio.

Se ha descrito mediante ensayos de inhibición enzimática una *K<sub>d</sub>* del péptido nNOS hacia la CaM, con un valor de 2.2 nM y, mediante SPR, se estimó una constante entre 0.8-3.9 nM [24, 129], para el péptido skMLCK se ha reportado una constante de disociación aproximada a 1 nM [32, 130], . Se calculó una *K<sub>d</sub>* entre 15 y 50 nM para el complejo CaM-proteína skMLCK utilizando anisotropía de fluorescencia [131], mientras

que el complejo CaM-proteína nNOS refiere una  $K_d$  de 1 nM mediante estudios de apagamiento de fluorescencia [26]. Para el complejo CaM-Cav1.1 la  $K_d$  reportada es de 1.2  $\mu$ M, mediante FRET [132, 133] y para el complejo CaM-proteína Calspermin se ha descrito una  $K_d=4.42$  nM, mediante la técnica de SPR [47].

Las constantes de disociación de los péptidos modelos por la CaM se encuentran en el intervalo de concentración nanomolar (figura A5), mostrando una alta afinidad comparada con inhibidores clásicos, que muestran constantes de disociación en el orden micromolar [1], siendo de gran importancia en el diseño de una molécula que inhiba una respuesta celular y muestre una alta afinidad comparada con el ligando de referencia.

Por otra parte, el estudio de la relación de la concentración de calcio en la afinidad de péptidos con la CaM, aportan información no solo a nivel fisiológico, sino también farmacológico. De forma que, los péptidos pueden tener actividad en tejido u órganos donde la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular sea elevada o baja, como el péptido skMLCK a nivel muscular y el péptido nNOS a nivel neuronal, respectivamente. De este modo, los péptidos pueden ser considerados candidatos potenciales a biofármacos.

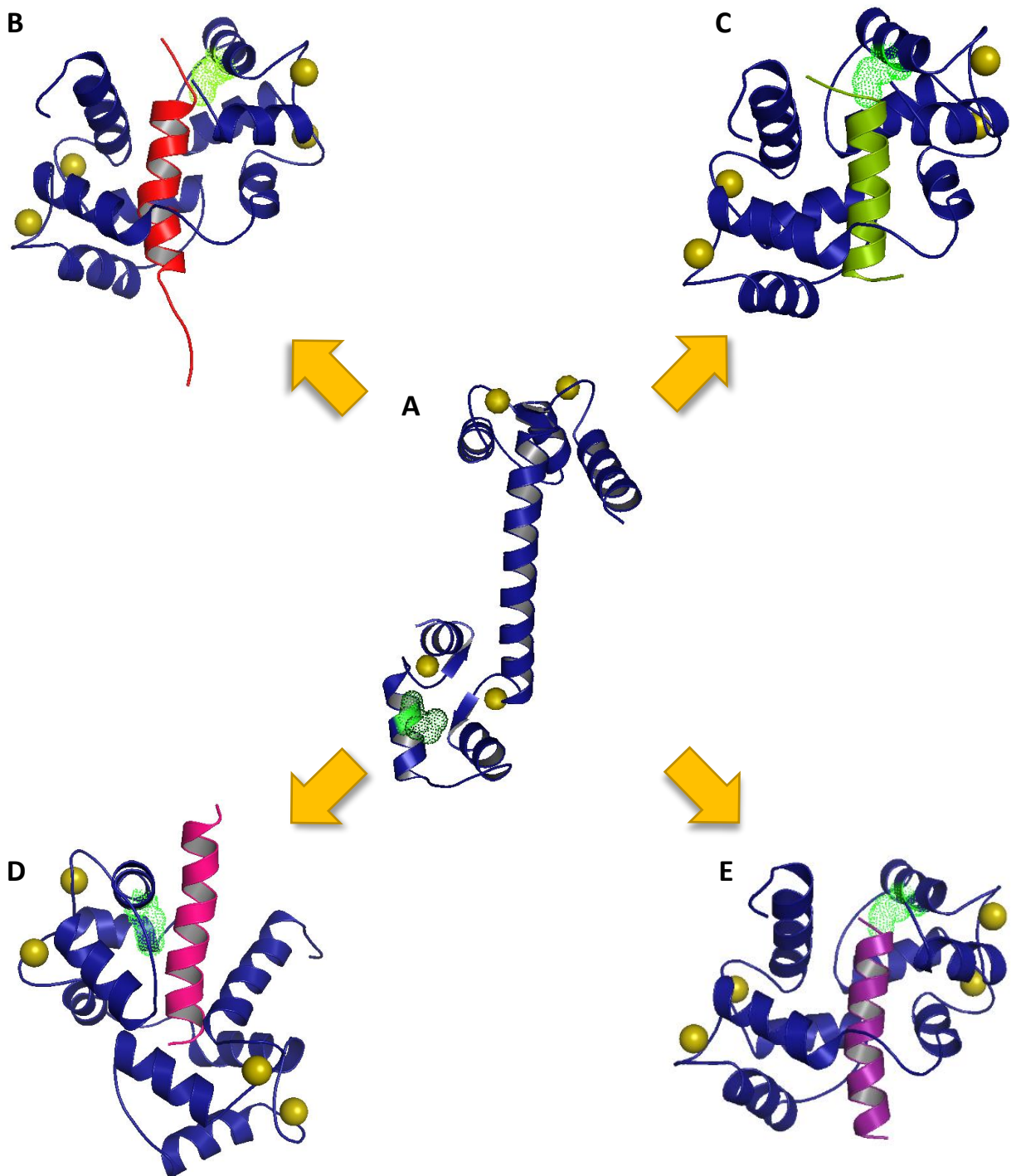
Debido a esto, diversos grupos han centrado su investigación en la búsqueda de péptidos derivados de los dominios de las proteínas de unión a CaM, como skMLCK y nNOS, modificando ciertos residuos de aminoácidos con la finalidad de mejorar la afinidad de estos hacia la CaM [134].

Sin embargo, la ubicuidad y promiscuidad de la CaM, debe ser considerada en el diseño de péptidos, para evitar inhibir complejos proteicos no relacionados con el padecimiento en cuestión a tratar, disminuyendo la probabilidad de efectos secundarios o adversos, asegurando una mayor selectividad y eficacia.

## Modelos estructurales de los complejos $Ca^{2+}$ -CaM-péptidos

Se obtuvieron los modelos estructurales de los complejos  $Ca^{2+}$ -CaM-péptidos, al alinear las estructuras de los péptidos a la estructura de la CaM en su conformación cerrada (2O60), esto para que todos los complejos contaran con la secuencia completa de la CaM y después llevar a cabo la simulación de MD. La figura 13 muestra el cambio

conformacional que presenta la holo-CaM ( $4\text{Ca}^{2+}$ -CaM) al unirse a los péptidos estudiados, esta figura es una representación de la interacción CaM-péptidos.



**Figura 13. Modelos estructurales de los complejos  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-péptidos.** (A) La proteína CaM (color azul) con sus cuatro iones calcio (esferas color azul) unida al (B) péptido skMLCK (hélice roja), (C) péptido nNOS (hélice verde), (D) péptido Cav1.1 (hélice rosa) y (E) péptido Calspermin (hélice morada), con un patrón punteado se muestra la posición 124 donde se encuentra el fluoróforo *mBBr*.



## Simulación de MD de los complejos Ca<sup>2+</sup>-CaM-péptidos

Las simulaciones de MD son una potente herramienta para modelar sistemas macromoleculares tales como complejos proteína-ligando [135]. El empleo de esta herramienta nos permite entender parte de los mecanismos de reconocimiento molecular, en nuestro caso, de la proteína CaM con sus ligandos (péptidos, proteínas), comparando los resultados experimentales obtenidos con los resultados teóricos de la MD.

Los estudios de simulación de MD comprenden 5 etapas: minimización, calentamiento, despresurización, equilibrio y MD (producción), donde se intenta alcanzar condiciones de equilibrio termodinámico semejantes a las experimentales [1, 102, 103].

La figura 14 muestra los cambios en la energía del sistema a lo largo de las diferentes etapas de la simulación de MD para el complejo Ca<sup>2+</sup>-CaM-péptido nNOS, con la finalidad de definir los tiempos establecidos para cada etapa. En las etapas de calentamiento y despresurización es apreciable una inestabilidad energética, debido posiblemente a que la CaM y su ligando muestran cambios conformacionales con un incremento en la entropía del sistema al incrementar la temperatura de 0 a 298 K y al mantener un volumen constante en un periodo de tiempo muy corto.

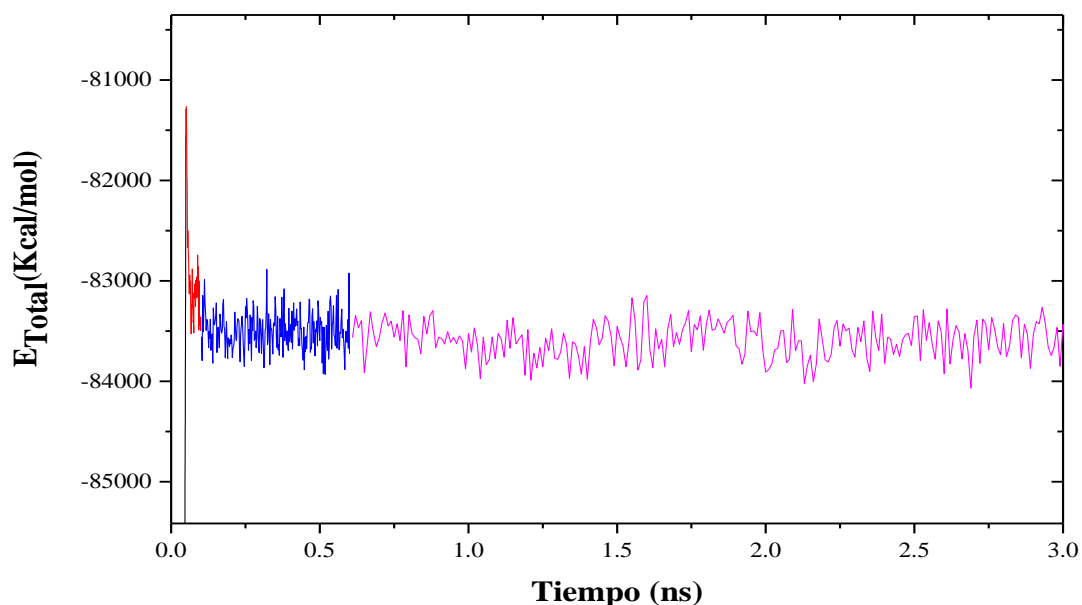
Los vídeos de las simulaciones de MD de los complejos Ca<sup>2+</sup>-CaM-péptidos se pueden consultar en la página web <http://biosensor.facmed.unam.mx/tesis-erika/videos.html> (vídeo 6-9) y observar las imágenes representativas en la figura A6.

La tabla 5 muestra los resultados de la energía libre y sus parámetros energéticos teóricos para los complejos Ca<sup>2+</sup>-CaM-péptidos utilizando el método MM/PBSA que emplea la ecuación  $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$ , donde la energía libre ( $\Delta G^\circ$ ) indica el grado de estabilidad de un sistema resultante del balance de dos contribuciones, la entalpía ( $\Delta H^\circ$ ) y entropía ( $\Delta S^\circ$ ).

La  $\Delta H$  se calcula mediante la fuerza de interacción en el sistema, mientras que la  $\Delta S$  indica los cambios en los grados de libertad del sistema. También, muestra los resultados de la energía libre obtenidos a partir de los datos experimentales utilizando la

ecuación de Van't Hoff en función de la constante de equilibrio como  $\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq}$  [136, 137].

De acuerdo con los resultados teóricos, la entalpía contribuye en mayor medida sobre la energía del sistema, es decir, refleja una mayor fuerza de la interacción de  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM con el péptido respectivo.



**Figura 14. Progreso de la simulación de la MD para el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-péptido nNOS.** (—) Etapa de Calentamiento de 0 a 298 K durante 50 ps, (—) Etapa de Despresurización manteniendo un volumen constante durante 50 ps, (—) Etapa de Equilibrio manteniendo una presión constante de 1 atm durante 500 ps, (—) Etapa de Producción, simulación de MD equivalente a 100 ns.

En todos los complejos  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-péptidos se obtuvo una energía libre negativa, lo que predice que los procesos para la formación de los complejos se llevan a cabo de forma espontánea e indican la estabilidad para la formación de estos.

Los resultados de  $\Delta G^\circ$  experimental y teórica muestran concordancia únicamente para el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-péptido skMLCK. Cabe señalar que, las simulaciones de MD para los complejos CaM-péptidos se realizaron durante 100 ns, por lo que un mayor tiempo de simulación de MD sería óptimo para evaluar un mayor número de conformeros, sus interacciones y energías libres correspondientes.

Los parámetros energéticos obtenidos para los complejos Ca<sup>2+</sup>-CaM-péptidos muestran energías libres más bajas que los reportados para el complejo Ca<sup>2+</sup>-CaM-Clorpromazina (CPZ), un inhibidor clásico de la CaM [1], lo que indica una mayor estabilidad de interacción para los complejos Ca<sup>2+</sup>-CaM-péptidos, principalmente para el complejo Ca<sup>2+</sup>-CaM-péptido skMLCK.

Tabla 5. Resultados de la unión de los péptidos skMLCK, nNOS, Cav1.1 y Calspermin a la proteína CaM					
Péptido	Experimentales		Teóricos <sup>3</sup>		
	$K_d^1$ (nM)	$\Delta G_{exp}^2$ (kcal/mol)	$\Delta G_{teo}$ (kcal/mol)	$\Delta H_{teo}$ (kcal/mol)	$T\Delta S_{exp}$ (kcal/mol)
skMLCK	1.4 ± 0.7	-12.07	-43.8 ± 18.9	-127.6 ± 15.0	-83.8 ± 11.5
nNOS	10.2 ± 0.2	-10.90	-25.4 ± 12.2	-90.1 ± 9.9	-64.7 ± 7.0
Cav1.1	1.9 ± 1.3	-11.89	-10.6 ± 18.2	-71.4 ± 16.6	-60.8 ± 7.3
Calspermin	2.4 ± 1.6	-11.75	-18.3 ± 25.8	-82.8 ± 24.5	-54.4 ± 8.1
CPZ <sup>4</sup>	1439	-7.97	-4.52 ± 1.8	-22.2 ± 2.5	-17.7 ± 7.7

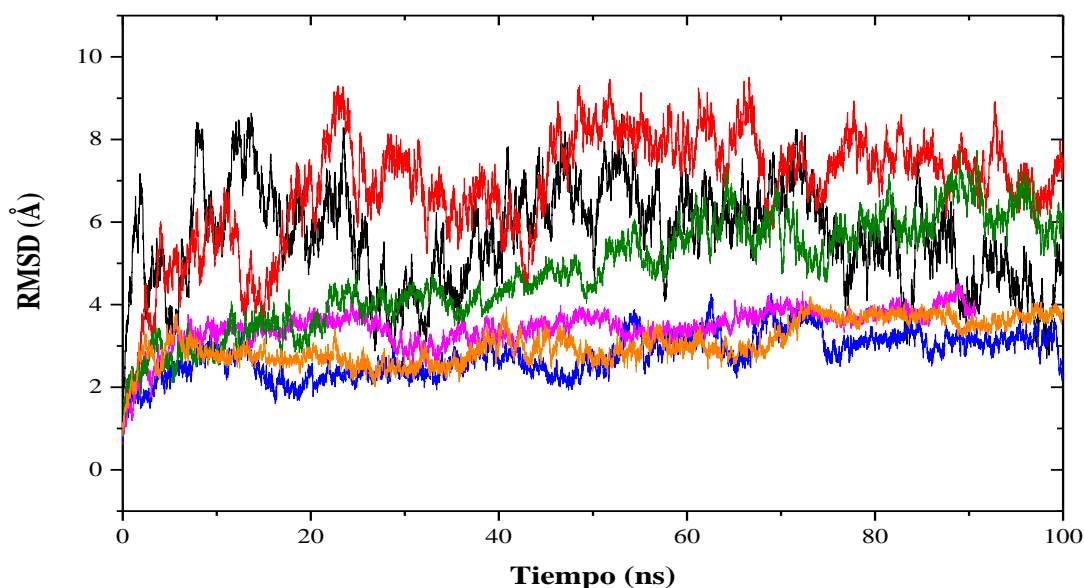
<sup>1</sup>Constante de disociación aparente determinada experimentalmente para el complejo Ca<sup>2+</sup>-CaM-péptido obtenida a saturación con calcio. <sup>2</sup>Energía de Gibbs obtenida a partir de la constante de disociación aparente experimental utilizando la ecuación  $\Delta G^\circ = -RT \ln K_d$ , donde  $R=1.987 \times 10^{-3}$  kcal/mol\*K y  $T=298.15$  K. <sup>3</sup>Resultados obtenidos de una simulación de 100 ns de MD para el complejo CaM-péptido utilizando el método MM/PBSA que emplea la ecuación  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ . <sup>4</sup>Resultados obtenidos de González Andrade et al. [1].

La figura 15 muestra la raíz cuadrática media de las desviaciones (RMSD) de los átomos (C, C $\alpha$ , N y O), con respecto a las coordenadas de equilibrio para los sistemas Ca<sup>2+</sup>-CaM (conformación abierta y cerrada) y de los complejos Ca<sup>2+</sup>-CaM-péptidos durante la simulación de MD.

La RMSD al inicio de la simulación de MD para los complejos Ca<sup>2+</sup>-CaM-péptidos osciló entre 1.3 y 2.0 Å, y para la Ca<sup>2+</sup>-CaM en su conformación abierta y cerrada fue de 3.2 Å y 1.98 Å, respectivamente. Se observa que entre los 8.5 y 9.6 ns de simulación de MD, la RMSD para la mayoría de los complejos Ca<sup>2+</sup>-CaM-péptidos se mantiene constante. Sin embargo, para el complejo Ca<sup>2+</sup>-CaM-péptido Cav1.1 se alcanzó aproximadamente hasta los 61.0 ns con un valor de 6.25 Å y, posiblemente, se deba a que la CaM interacciona principalmente con la región N-terminal del péptido.

Por otra parte, la comparación directa de la RMSD entre la conformación abierta y cerrada de la proteína CaM libre de ligando muestra mayores desviaciones a lo largo de la simulación de ambas conformaciones, lo que nos indica cambios estructurales importantes.

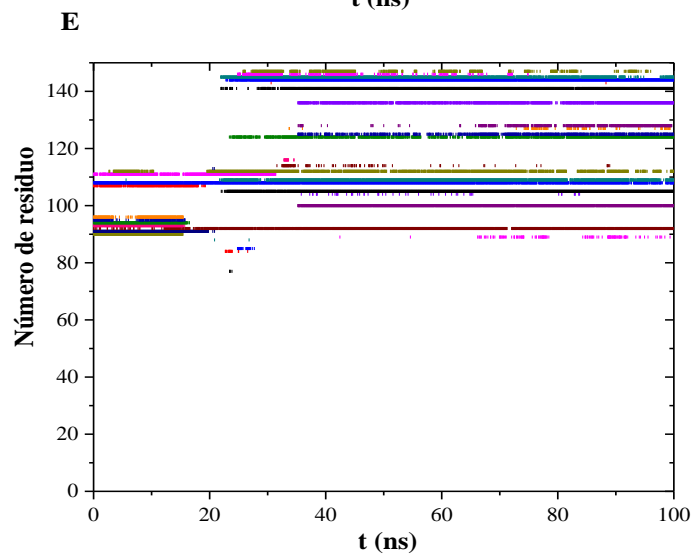
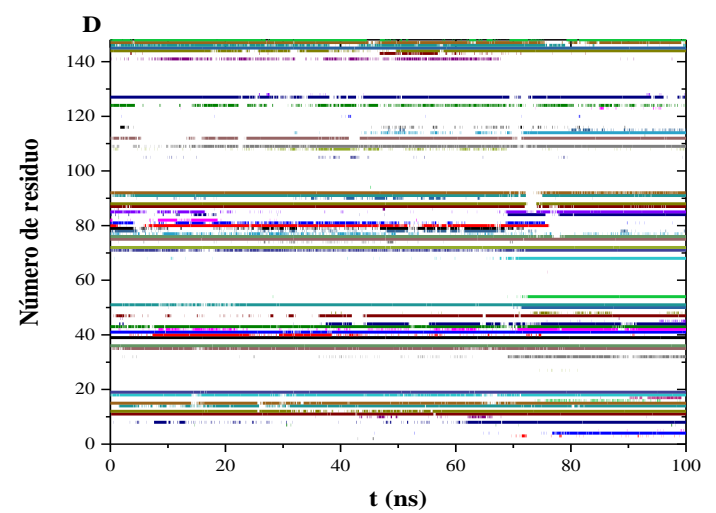
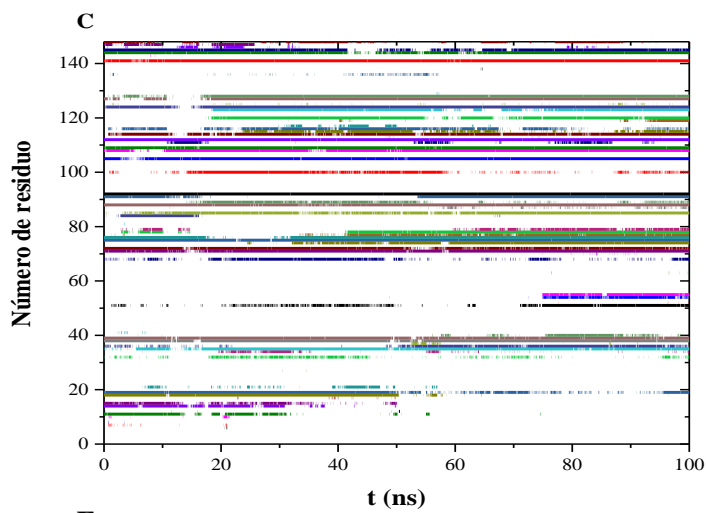
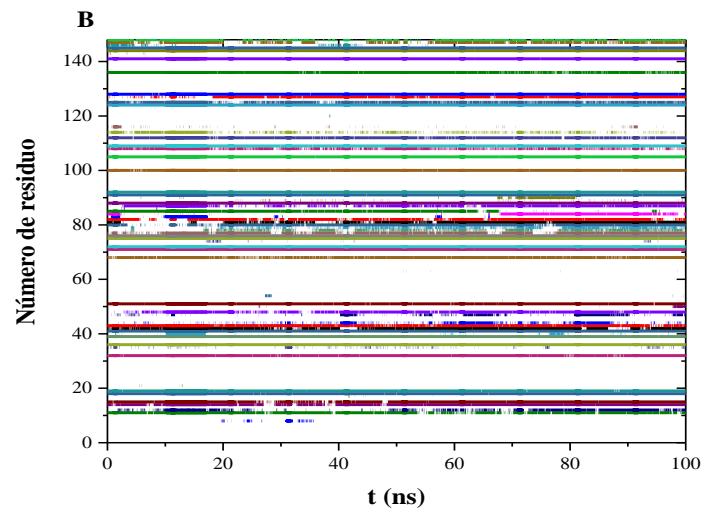
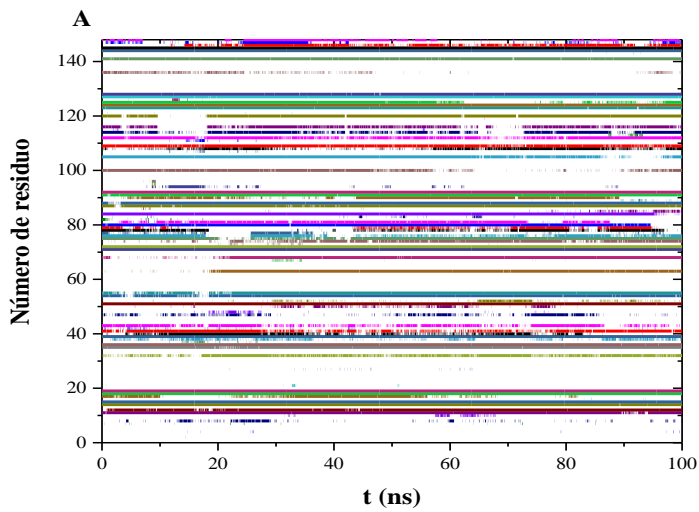
La mayoría de las estructuras cristalográficas de  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM unido a moléculas orgánicas (inhibidores clásicos) tienen valores alrededor de 2 Å de la RMSD, los cambios mayores que este valor están usualmente relacionados con cambios conformacionales en la proteína CaM y, por lo tanto, asociados termodinámicamente con un importante componente entrópico [138, 139]; como es el caso para el complejo CaM-péptido Cav1.1, donde sus valores de entalpía y entropía son cercanos (tabla 5).



**Figura 15. Raíz cuadrática media de las desviaciones en función del tiempo para una simulación de MD de los complejos CaM-péptidos, CaM en conformación abierta y CaM en conformación cerrada.** (—) CaM en conformación abierta, (—) CaM en conformación cerrada, (—) CaM-péptido NNOS1, (—) CaM-péptido skMLCK, (—) CaM-péptido Cav1.1, (—) CaM-péptido Calspermin.

La figura 16 muestra los contactos de los residuos de la CaM en la interacción con los ligandos. La CaM muestra mayor número de interacciones con los péptidos en la simulación de MD respecto a la CPZ.

Los residuos de la CaM que participan en la interacción con el péptido se encuentran distribuidos en toda la proteína, a diferencia de la CPZ que solo su interacción se ve reflejada en algunos residuos y en un momento específico durante la simulación. Lo anterior puede deberse al tamaño de la molécula con la que interacciona la CaM y el tipo de fuerzas intermoleculares involucradas.

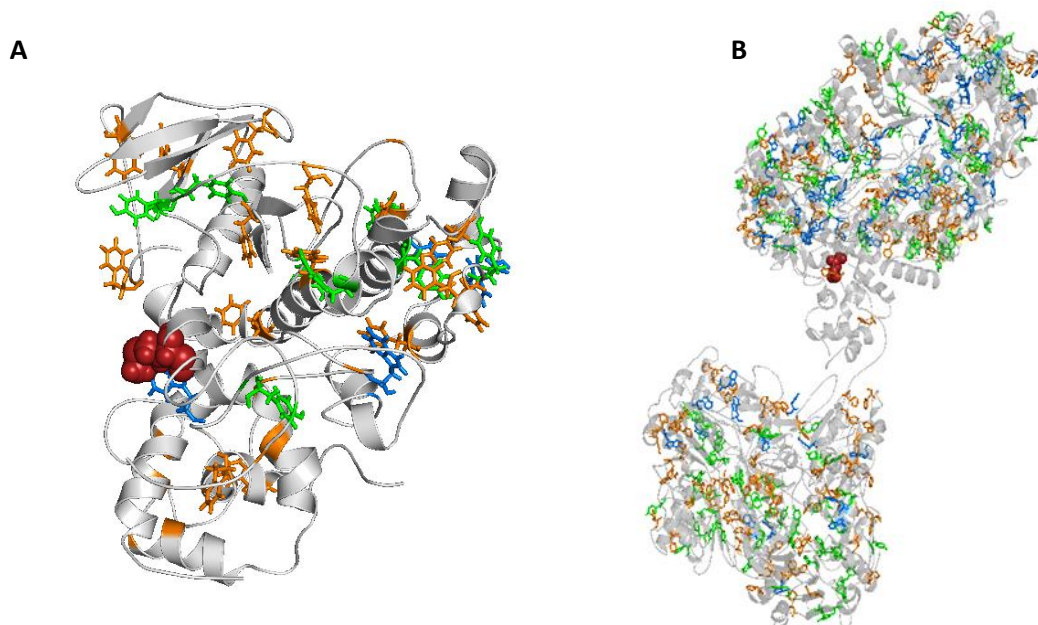


**Figura 16.** Contactos de los residuos de la  $4Ca^{2+}$ -CaM con los ligandos a lo largo de una simulación de MD. (A) Péptido skMLCK, (B) Péptido nNOS, (C) Péptido Cav1.1, (D) Péptido Calpermin y (E) Clorpromazina (datos obtenidos de González et al. [1]). La simulación de MD se realizó a lo largo de 100 ns.

## Ensayos de competencia CaM-proteína nNOS-BIM IV-péptido nNOS

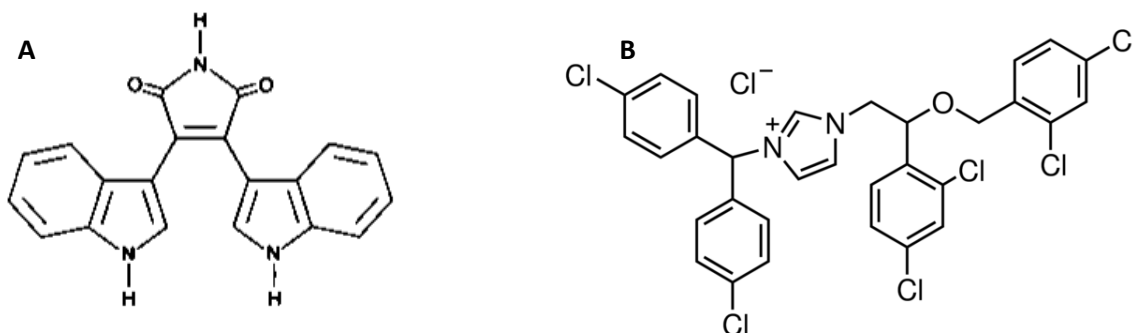
Las constantes de unión que presentan los ligandos por la CaM se encuentran en el orden  $\mu\text{M}$  –  $\text{nM}$ , su unión puede afectarse por la competencia con moléculas que posean una mayor afinidad y especificidad [140].

El estudio del efecto de la competencia entre ligandos por la CaM se evaluó utilizando la fluorescencia intrínseca de las proteínas skMLCK, nNOS (figura 17) y del biosensor de CaM, así como de los péptidos skMLCK y nNOS otorgada por los aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr, Trp) que se presentan en su secuencia, en los primeros tres casos o por la fluorescencia del fluoróforo *mBBr* del biosensor (extrínseca a la CaM nativa), además de la presencia de moléculas bioactivas estudiadas por nuestro grupo de trabajo, que si bien no poseen propiedades fluorescentes, modifican el microambiente cuando se unen a la CaM.



**Figura 17. Residuos aromáticos de las proteínas (A) skMLCK y (B) nNOS.** Se observan los residuos Phe (naranja), Tyr (verde) y Trp (azul) de las proteínas skMLCK y nNOS, la posición 124 de la CaM está representada en color rojo.

La bisindolilmaleimida IV (BIM IV) está reconocida como un inhibidor de la proteína cinasa C (PKC) al unirse al sitio de unión de ATP, al igual que otros miembros de la familia de bisindolilmaleimidias [141, 142], pero nuestro grupo de trabajo lo ha identificado como un inhibidor de CaM [143] (figura 18A). Por otra parte, el cloruro de calmidazolio está reportado como analgésico, ya que bloquea la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a las neuronas espinales al inhibir a la CaM [144] (figura 18B); por su importancia estas moléculas fueron empleadas en los ensayos de competencia.



**Figura 18. Estructuras de la (A) bisindolilmaleimida IV y (B) cloruro de calmidazolio.**

Inicialmente, se establecieron las condiciones a emplear de  $\text{Ca}^{2+}$  y biosensor, de acuerdo a la cantidad y concentración limitante de las proteínas skMLCK y nNOS que se tenían para realizar los ensayos. Se determinó una concentración de calcio de 16 veces mayor a la del biosensor, debido a que la unión de las proteínas skMLCK y nNOS, así como de sus péptidos, dependen de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio (A7).

Posteriormente, se llevaron a cabo los ensayos de competencia obteniendo los espectros de fluorescencia intrínseca excitando a 280 nm (longitud de excitación de los residuos aromáticos Phe, Tyr y Trp) y a 295 nm (longitud de excitación que excita principalmente al Trp) y, finalmente, a 381 nm (longitud de excitación del fluoróforo *mBB* del biosensor). Los espectros de fluorescencia fueron colectados después de la adición de cada ligando modificando únicamente la longitud de onda de excitación respectiva.

La figura 19 muestra los espectros de fluorescencia obtenidos al excitar a 381 nm para los ensayos de competencia entre la proteína CaM, la proteína nNOS, BIM IV, y el péptido nNOS.

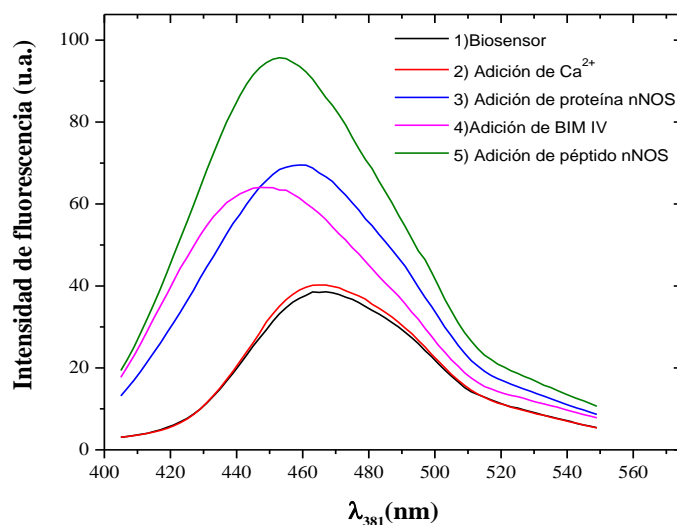
Inicialmente, se observa el espectro de fluorescencia del biosensor de CaM con  $\text{Ca}^{2+}$  ( $3.2 \mu\text{M}$ ), la adición de la proteína nNOS ( $0.0375 \mu\text{M}$ ) provoca un aumento en la intensidad de fluorescencia alrededor de tres veces, efecto de fluorescencia que también se observa en las titulaciones con el péptido extraído de esta proteína.

Posteriormente, tras la adición de BIM IV ( $6 \mu\text{M}$ ) a la mezcla, se observa un apagamiento de la intensidad de fluorescencia y un efecto hipsocrómico (corrimiento del espectro hacia el azul, es decir, a una longitud de onda más corta), efecto atribuido a la interacción entre el fluoróforo *mBBr* y la molécula bioactiva, ya que la última muestra una estructura resonante que al interactuar cerca del *mBBr* puede provocar estos efectos (figura 18A).

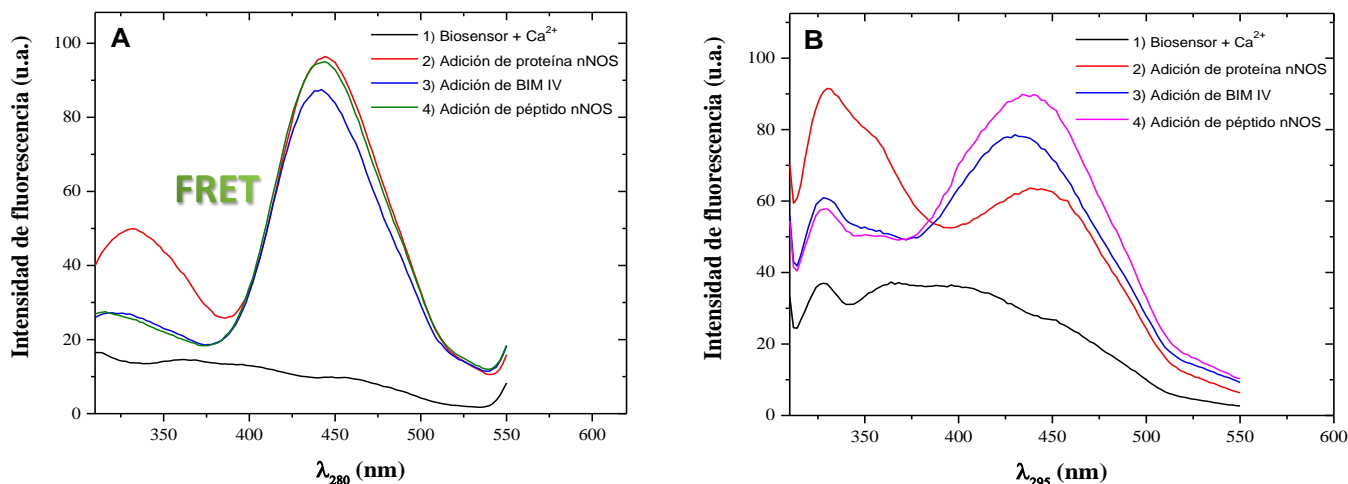
Finalmente, se observa un aumento en la intensidad de fluorescencia de alrededor de dos veces respecto a la última adición, al añadir el péptido nNOS ( $3.1 \mu\text{M}$ ) a la mezcla anterior. En concordancia con una competencia entre la proteína nNOS, el péptido nNOS y la BIM IV, reflejada por el cambio en los espectros de fluorescencia por la adición de cada molécula; donde BIM IV desplaza a la proteína nNOS y el péptido a su vez desplaza a BIM IV.

Esta observación se encuentra relacionada con su constante de disociación, ya que la proteína nNOS y la BIM IV poseen una constante de disociación de  $0.2 \mu\text{M}$  [143], mientras que el péptido tiene una constante de disociación de  $10.2 \text{ nM}$ , siendo el péptido nNOS la molécula que muestra mayor afinidad por la CaM.





**Figura 19. Espectros de fluorescencia extrínseca de los ensayos de competencia CaM-proteína nNOS-molécula bioactiva-péptido.** Los espectros se obtuvieron excitando a 381 nm y registrando un intervalo de emisión de 405-550 nm. Se empleó (—) 0.2  $\mu\text{M}$  del biosensor *hCaM M124C-mBBr* y (—) 3.2  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  (concentración saturante) en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 ,a 25 °C, (—) 0.0375  $\mu\text{M}$  de proteína nNOS, (—) 6  $\mu\text{M}$  de BIM IV y (—) 3.1  $\mu\text{M}$  de péptido nNOS.



**Figura 20. Espectros de fluorescencia intrínseca de los ensayos de competencia CaM-proteína nNOS-molécula bioactiva-péptido.** Los espectros se obtuvieron excitando a 280 nm (A) y 295 nm (B). Se empleó (—) 0.2  $\mu\text{M}$  del biosensor *hCaM M124C-mBBr* y (—) 3.2  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  (concentración saturante) en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 ,a 25 °C, (—) 0.0375  $\mu\text{M}$  de proteína nNOS, (—) 6  $\mu\text{M}$  de BIM IV y (—) 3.1  $\mu\text{M}$  de péptido nNOS.

Al igual que los espectros de fluorescencia excitando a 381 nm, en la figura 20 se observan los espectros para los ensayos de competencia siguiendo la fluorescencia intrínseca en los cuales se observa un cambio en los espectros en función de la adición de cada molécula, de acuerdo a la competencia entre ellas.

En la Figura 20A se aprecia el fenómeno de FRET, al añadir una concentración conocida de la proteína nNOS a la solución experimental (biosensor- $\text{Ca}^{2+}$ ), debido posiblemente a la transferencia de energía del conjunto de aminoácidos aromáticos al fluoróforo *mBB*, tras ser excitados a su respectiva longitud de onda, estos resultados muestran la interacción CaM-proteína nNOS.

El fenómeno de FRET se presenta de manera clara excitando a 280 nm debido a la gran cantidad de residuos aromáticos presentes en la proteína nNOS. Para descartar la posibilidad de que la albúmina, excipiente que contiene la proteína nNOS comercialmente, fuera la proteína que generaba FRET se realizó una titulación de albúmina con el biosensor excitando a 280 nm, observando que incluso a concentraciones mayores de albúmina que la presente en solución para estabilizar a la nNOS, no se observa el fenómeno (apéndice figura A8).

### Ensayos de competencia CaM-proteína skMLCK-Calmidazolio-BIM IV-péptido nNOS

A continuación, se presentan los resultados de los experimentos de interacción de la CaM con la proteína skMLCK, el péptido skMLCK, cloruro de calmidazolio y BIM IV.

La figura 21 muestra los espectros de fluorescencia excitando a 381 nm para la interacción proteína-proteína, proteína-molécula bioactiva y proteína-péptido. Inicialmente se observa el espectro correspondiente al biosensor en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  a saturación. Posteriormente, la adición de 0.013  $\mu\text{M}$  de la proteína skMLCK produce una disminución de la intensidad de fluorescencia de alrededor de 3 veces, el apagamiento de la fluorescencia también se observa en las titulaciones con el péptido extraído de esta proteína.

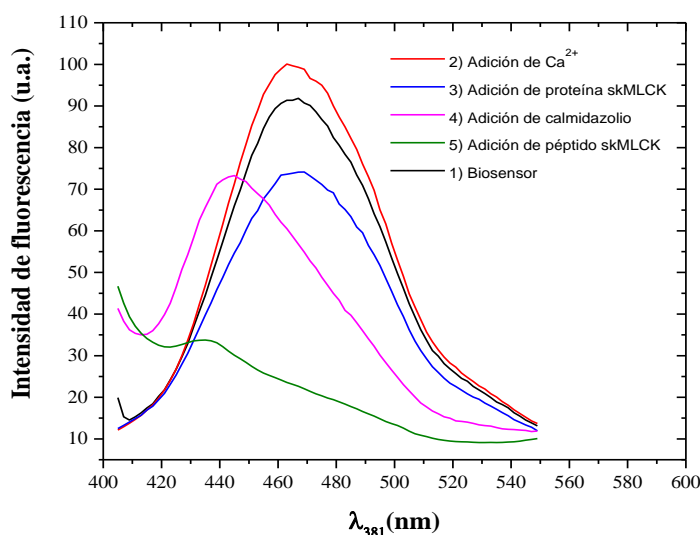
El cloruro de calmidazolio es una molécula anti-CaM recién reportada por nuestro grupo de trabajo como una molécula que presenta un efecto hipercrómico en los espectros de fluorescencia tras su titulación con el biosensor [143].

La adición de 4  $\mu\text{M}$  de calmidazolium (molécula bioactiva anti-CaM) a la mezcla de reacción muestra la presencia de un efecto hipsocrómico, desplazamiento del espectro de fluorescencia hacia el azul, sin un cambio significativo de la intensidad de fluorescencia. Este resultado puede ser atribuido a una interacción amplia con la CaM ya que el compuesto es estructuralmente grande en comparación con los inhibidores clásicos de la CaM como se observa en la figura 18B.

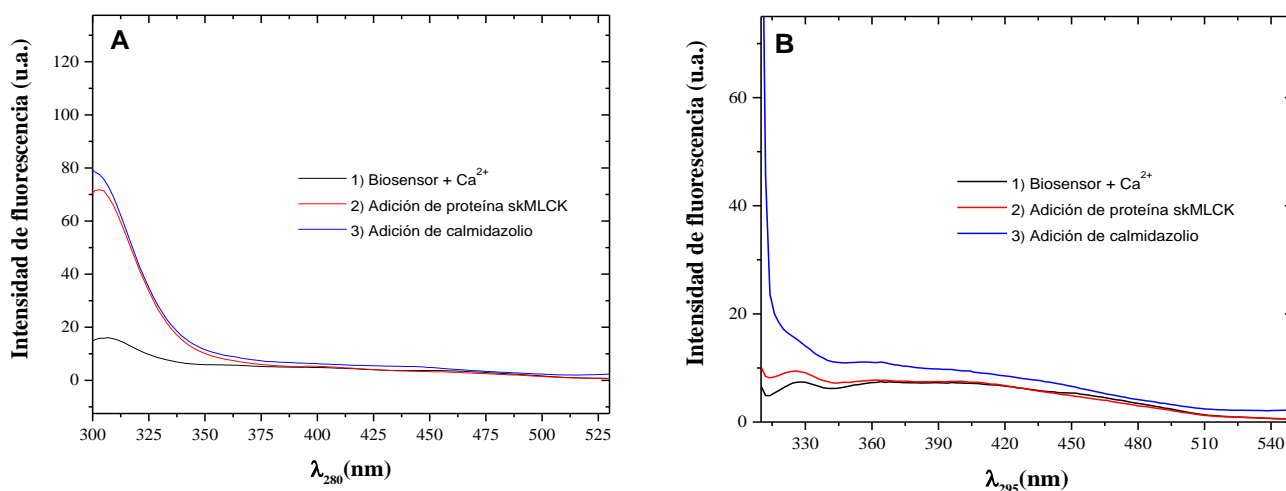
Finalmente, cuando se adiciona 2.7  $\mu\text{M}$  del péptido skMLCK a la mezcla anterior se observa un efecto hipocrómico, el cambio en el espectro de fluorescencia puede asociarse a una competencia del péptido skMLCK sobre las otras moléculas para unirse a la CaM.

Considerando la fluorescencia intrínseca de los ligandos, se excitó a 295 nm y 280 nm, (figura 22) con el objetivo de observar el fenómeno de FRET como en el caso de los ensayos con la proteína nNOS. Sin embargo, no se aprecia la transferencia de energía de los fluoróforos intrínsecos (Phe, Tyr, Trp) hacia el fluoróforo *mBBR*. Esto puede deberse a la interacción que existe entre el residuo Trp de la proteína skMLCK con el fluoróforo *mBBR* (como se describió anteriormente para el péptido de esta proteína) que genere el apagamiento de la fluorescencia. Solo se observa un cambio en la intensidad de fluorescencia intrínseca que indica la adición de ligando a la CaM.

Por otra parte, Blumenthal y colaboradores han descrito una fuerte interacción entre el péptido skMLCK con la CaM determinando una  $K_d=1$  nM mediante una titulación en fluorescencia, utilizando la fluorescencia intrínseca del péptido atribuida al residuo de triptófano [31]. El péptido skMLCK inhibe la activación de la CaM en siete enzimas dependientes de esta proteína: la PDE, adenilato ciclasa del cerebro, adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis*, Bomba  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la membrana de glóbulos rojos, calcineurina, fosforilasa b cinasa del músculo esquelético y proteína cinasa multifuncional dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  cerebral [32, 33]. Lo anterior apoya nuestros resultados, que muestran que el péptido skMLCK posee una alta afinidad por la CaM compitiendo con diversas proteínas blanco incluyendo a la proteína de la que proviene.



**Figura 21. Espectros de fluorescencia extrínseca de los ensayos de competencia CaM-proteína skMLCK-molécula bioactiva-péptido.** Los espectros se obtuvieron excitando a 381 nm y registrando un intervalo de emisión de 405-550 nm. Se empleó (—) 0.2  $\mu\text{M}$  del biosensor *hCaM M124C-mBBR* y (—) 3.2  $\mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$  (concentración saturante) en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, a 25  $^\circ\text{C}$ , (—) 0.013  $\mu\text{M}$  proteína skMLCK, (—) 4  $\mu\text{M}$  de Cloruro de calmidazolio y (—) 2.7  $\mu\text{M}$  de péptido skMLCK.

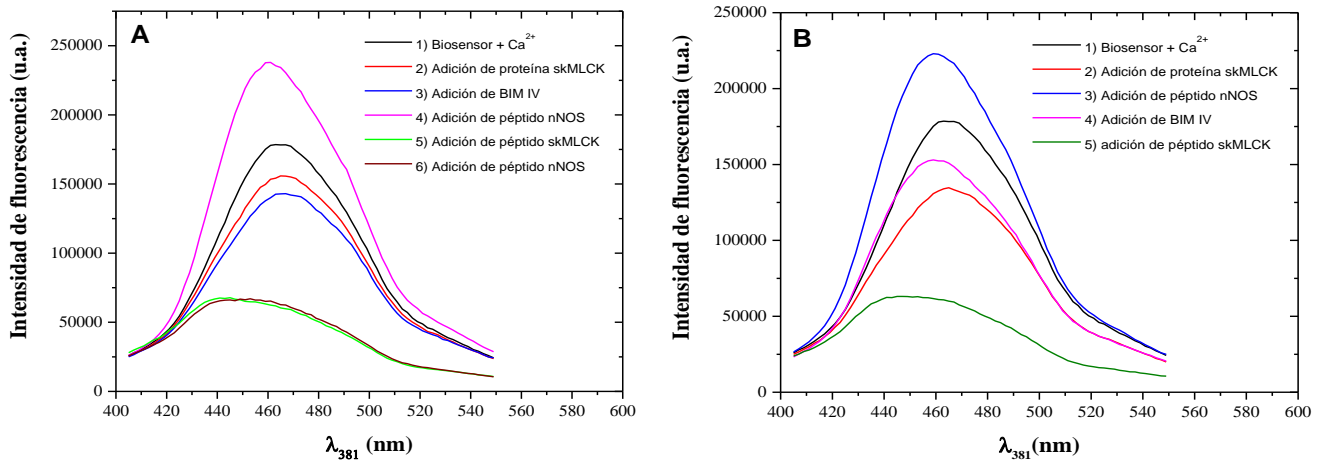


**Figura 22. Espectros de fluorescencia intrínseca de los ensayos de competencia CaM-proteína skMLCK-molécula bioactiva-péptido.** Los espectros se obtuvieron excitando a 280 nm (A) y a 295 nm (B). Se empleó (—) 0.2  $\mu\text{M}$  del biosensor *hCaM M124C-mBBR* y 3.2  $\mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$  (concentración saturante) en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, a 25  $^\circ\text{C}$ , (—) 0.013  $\mu\text{M}$  proteína skMLCK, (—) 4  $\mu\text{M}$  de Cloruro de calmidazolio.

Adicionalmente, se realizaron otros ensayos de competencia CaM-proteína skMLCK-moléculas bioactivas-péptidos (skMLCK, NNOS1); excitando a 381 nm para evaluar principalmente la competencia entre los péptidos nNOS y skMLCK a una concentración de 3.2  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ .

La figura 23A muestra que tras la adición de la proteína skMLCK (0.013  $\mu\text{M}$ ) la intensidad de fluorescencia respecto al espectro de fluorescencia del biosensor con  $\text{Ca}^{2+}$  disminuye. Al añadir BIM IV (6  $\mu\text{M}$ ) se observa un apagamiento de la intensidad de fluorescencia indicando una posible competencia entre la molécula bioactiva y la proteína skMLCK por la unión a la CaM. Posteriormente, la adición del péptido nNOS (3.1  $\mu\text{M}$ ), genera un efecto hipercrómico y al añadir el péptido skMLCK (2.7  $\mu\text{M}$ ) la señal de fluorescencia disminuye. Finalmente, la adición de 3.1  $\mu\text{M}$  de péptido nNOS no muestra un cambio apreciable en el espectro de fluorescencia, demostrando una mayor afinidad el péptido skMLCK ( $K_d=1.4$  nM) con respecto al péptido nNOS ( $K_d=10.2$  nM).

La figura 23B muestra los espectros de fluorescencia del biosensor hCaM M124C-mBBr con  $\text{Ca}^{2+}$ . La adición de la proteína skMLCK muestra un efecto hipocrómico. Al añadir el péptido nNOS se observa un aumento en la intensidad de fluorescencia; la adición de BIM IV muestra una disminución de la intensidad de fluorescencia acompañado de un efecto hipsocrómico. Finalmente, la adición del péptido skMLCK disminuye la intensidad de fluorescencia. Estos resultados muestran la alta afinidad del péptido skMLCK por la CaM con respecto a los otros ligandos, indiferente al orden en que se añadan sino de la afinidad que existe directamente entre la CaM y sus ligandos.



**Figura 23. Espectros de fluorescencia extrínseca de los ensayos de competencia CaM-proteína skMLCK-molécula bioactiva-péptidos.** Los espectros se obtuvieron excitando a 381 nm y registrando un intervalo de emisión de 405-550 nm. Se empleó (—) 0.2  $\mu\text{M}$  del biosensor *hCaM M124C-mBBR* y una concentración de  $\text{CaCl}_2$  saturante (3.2  $\mu\text{M}$ ) en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 a 25  $^\circ\text{C}$ . (A) (—) 0.013  $\mu\text{M}$  de proteína skMLCK, (—) 6  $\mu\text{M}$  de BIM IV, (—) 3.1  $\mu\text{M}$  de péptido nNOS, (—) 2.7  $\mu\text{M}$  de péptido skMLCK y (—) 3.1  $\mu\text{M}$  de péptido nNOS. (B) (—) 0.013  $\mu\text{M}$  de proteína skMLCK, (—) 6  $\mu\text{M}$  de péptido nNOS, (—) 3.1  $\mu\text{M}$  de BIM IV, (—) 2.7  $\mu\text{M}$  de péptido skMLCK.

## Modelos estructurales y simulación de dinámica molecular de los complejos proteicos

Las estructuras de los complejos proteína-proteína pueden determinarse experimentalmente con técnicas como la cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear. Sin embargo, las estructuras determinadas mediante métodos experimentales hasta ahora muestrean una pequeña porción de todas las posibles interacciones proteína-proteína. La predicción de estructuras complejas de esta naturaleza se puede realizar utilizando herramientas de modelaje molecular y ser una alternativa para obtener información.

Se estudiaron las interacciones de dos complejos proteína-proteína: CaM-skMLCK y CaM-nNOS debido a la importancia biológica que representan al participar en la contracción del músculo esquelético y en la regulación sináptica mediante la producción de óxido nítrico, respectivamente. Además de que son las proteínas de las cuales provienen dos de los péptidos modelo estudiados en este trabajo (skMLCK y nNOS).

El estudio de las interacciones proteína-proteína *in silico* se realizó en dos etapas que incluyen: (1) la obtención de los modelos estructurales de cada proteína y los modelos de interacción CaM-proteína utilizando modelaje *ab initio* y por homología, debido a que no existen los modelos estructurales completos de las proteínas ligando y de los complejos en cuestión, y (2) las simulaciones de MD para las interacciones proteína-proteína, con el objetivo de obtener un modelo estructural final que nos permita reconocer las zonas de interacción independientes al dominio de unión a CaM.

### Complejo CaM-proteína skMLCK

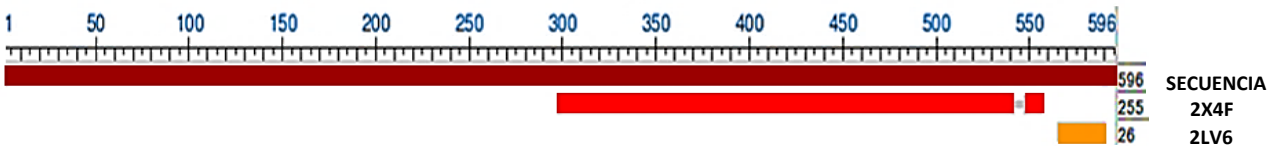
El modelo estructural para el monómero de la cinasa de la cadena ligera de miosina de músculo esquelético se construyó utilizando las estructuras determinadas para esta proteína y que están disponibles en el PDB (figura 24).

La secuencia de aminoácidos de la proteína skMLCK consta de 596 residuos, la estructura 2X4F cuenta con 255 residuos, sin embargo, tiene un segmento sin determinar. La estructura de la cadena B de 2LV6 constituye 26 residuos, que corresponde al dominio de unión de la proteína CaM a esta proteína (péptido skMLCK). Se construyó un péptido con los residuos faltantes mediante modelaje *ab initio*, para ser utilizado en el modelado por homología de la proteína con las estructuras conocidas (figura 25A).

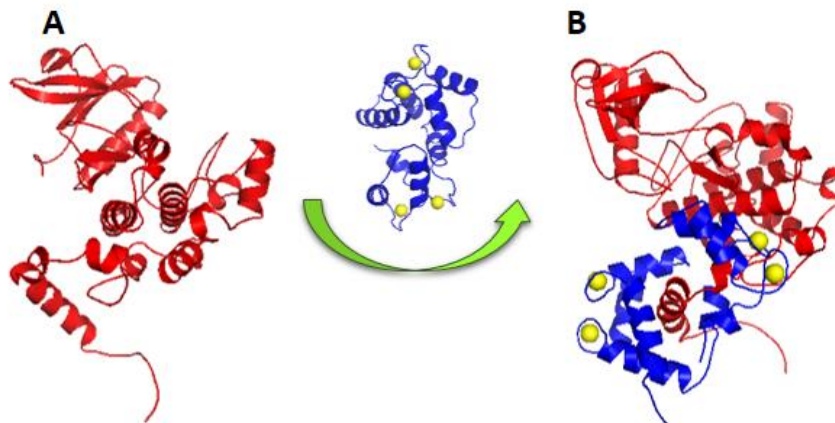
La estructura modelada de la proteína skMLCK comprende los residuos 300-590 de la secuencia de la proteína, debido a que no existen estructuras determinadas para los residuos anteriores a la secuencia mencionada y su modelaje se vuelve complicado de resolver por la baja precisión que ofrecen los programas disponibles, para los que el mejor éxito se limita a secuencias menores a 100 residuos de aminoácidos [145].

Con base al modelo estructural obtenido de la proteína skMLCK se alineó la estructura de la  $4\text{Ca}^{2+}$ -CaM con su dominio de unión que corresponde a la secuencia KRRWKNFIAVSAANRFKKISSSGAL en la proteína skMLCK, obteniendo así un modelo estructural del complejo (figura 25B).

La evaluación de la interacción del complejo se llevó a cabo mediante una simulación de MD a lo largo de 50 ns. La figura A9-A muestra las imágenes representativas de la simulación de MD del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-proteína skMLCK y en la página <http://biosensor.facmed.unam.mx/tesis-erika/video10.html> el vídeo de esta.



**Figura 24. Alineamiento de las estructuras determinadas para la secuencia de la proteína skMLCK.** La estructura de la proteína skMLCK consta de 596 aminoácidos, la estructura 2X4F contiene 255 aminoácidos y el dominio de unión a Calmodulina correspondiente a la cadena B de la estructura 2LV6 consta de 26 aminoácidos.

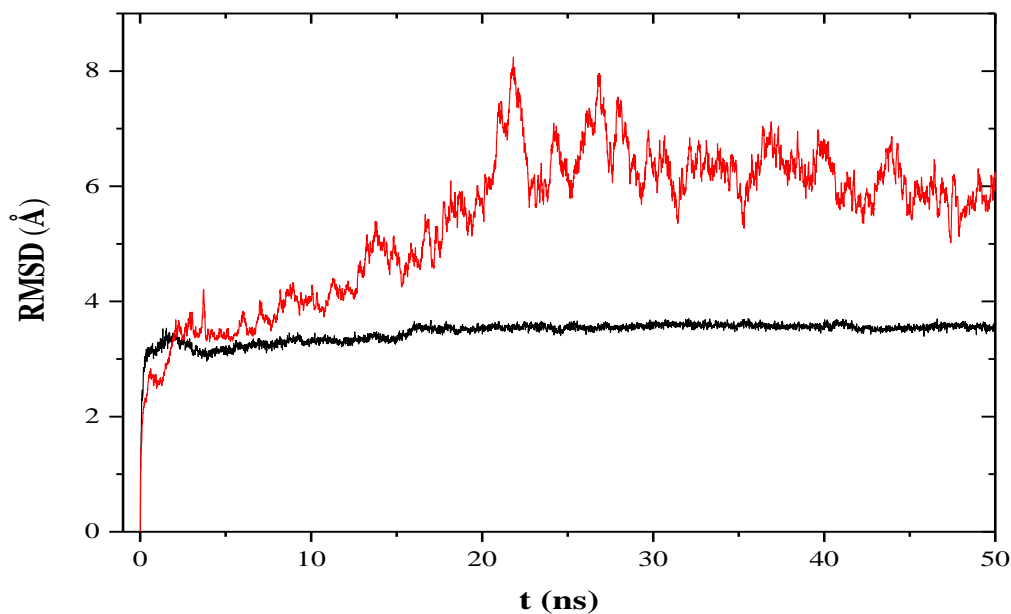


**Figura 25. Ensamble del complejo CaM-skMLCK.** A) Monómero de la proteína skMLCK (color rojo). B) Ensamble de la proteína CaM (color azul) con sus cuatro iones  $\text{Ca}^{2+}$  (esferas en color amarillo) a su dominio de unión en la cadena B de la proteína skMLCK.



El análisis de la simulación nos permitió medir la RMSD para el complejo CaM-skMLCK, que se modificó alrededor de 2.5 angstroms manteniéndose estable a partir de los 5 ns (figura 26). Las condiciones de estabilidad durante la simulación de MD para complejo permitieron obtener un modelo estructural final donde se aprecia la asociación biomolecular, al mantenerse unida la CaM a una región específica (dominio de unión correspondiente al péptido skMLCK) y establecer contacto con la skMLCK en otras regiones, es decir, en la interfaz.

Como se observa en la simulación de MD (<http://biosensor.facmed.unam.mx/tesis-erika/video11.html>) hay una interacción directa del residuo triptófano de la proteína skMLCK y el fluoróforo monobromobimano de la CaM en el biosensor que genera transferencias radiativas ocasionando un apagamiento de fluorescencia como se observa en los resultados experimentales.



**Figura. 26.** Raíz cuadrática media de las desviaciones en función del tiempo para una simulación de MD de los complejos proteicos CaM-skMLCK (negro) y CaM-nNOS (rojo).

## Complejo CaM-proteína nNOS

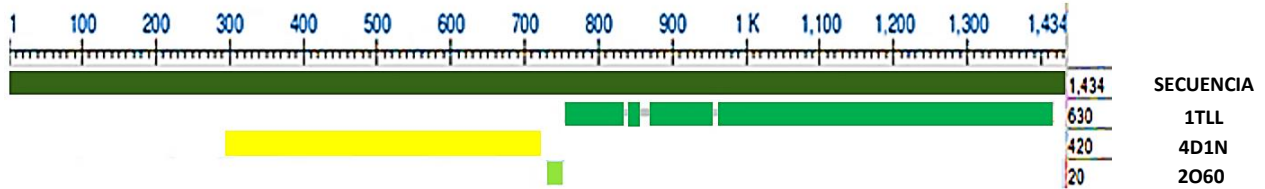
La construcción del modelo estructural de la proteína nNOS inició con la formación del monómero con sus dominios reductasa y oxigenasa unidos a través del dominio de unión a CaM. Las estructuras con mejor cobertura e identidad para los dominios de la nNOS fueron identificadas. Las secuencias de las estructuras de los dominios se alinearon a la secuencia completa (figura 27); la estructura 4D1N cubre los residuos 300-720 aminoácidos correspondientes al dominio oxigenasa y la estructura 1TLL a los residuos 750-1400 aminoácidos que corresponden al dominio reductasa y la cadena B de la estructura 2O60 de 20 aminoácidos correspondiente al dominio de unión a CaM.

Se construyó un modelo de la región entre el dominio reductasa y el dominio de unión a CaM debido a que las estructuras determinadas para estos dominios no cubren esa región en la secuencia de la proteína. El modelaje de la región se realizó mediante modelaje *ab initio*.

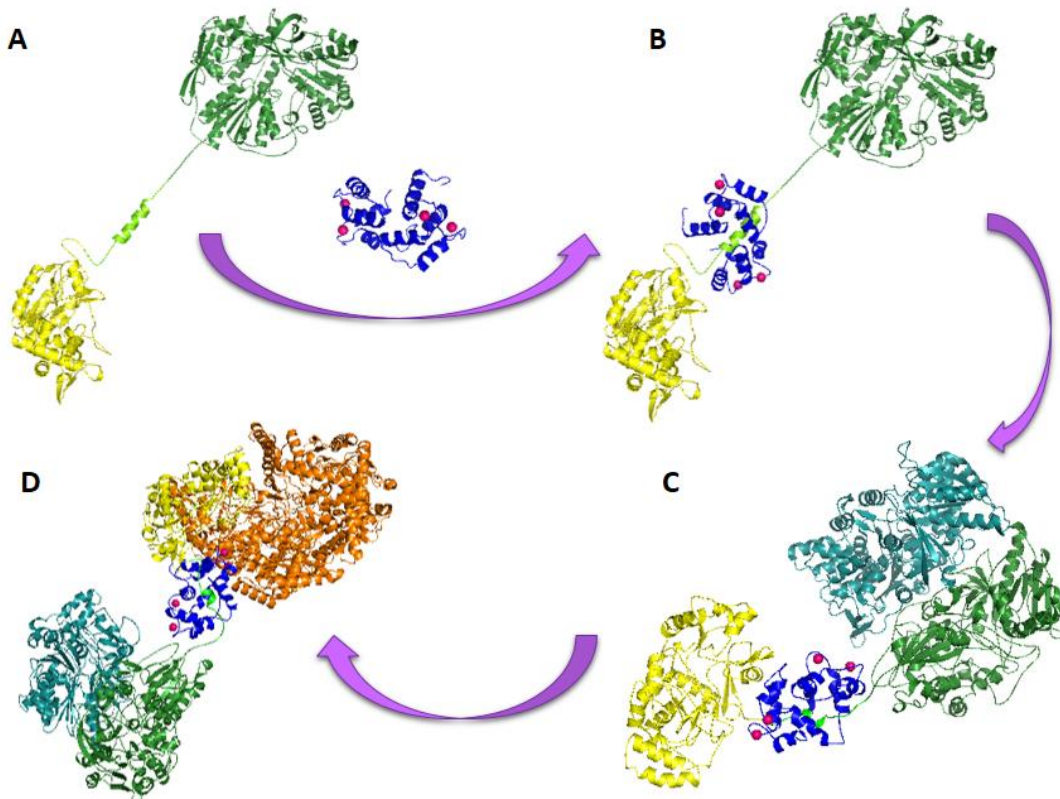
Se utilizó el alineamiento de las secuencias de la estructura modelada y de las estructuras de los dominios de la proteína para obtener una predicción de la estructura tridimensional del monómero de la proteína nNOS mediante modelaje por homología con el programa Modeller (figura 28A). Posteriormente, se realizó la formación del complejo proteína-proteína, mediante el alineamiento de la estructura 4Ca<sup>2+</sup>-CaM al monómero de la proteína nNOS, es decir, a su dominio de unión que corresponde a la secuencia KRRRAIGFKKLAEAVKFSAKLMGQ (figura 28B).

La interacción *in silico* del complejo CaM-monómero de nNOS se realizó mediante una simulación de MD durante 100 ns (la figura A9-B muestra las imágenes representativas de la simulación y en la página <http://biosensor.facmed.unam.mx/tesis-erika/video12.html> la trayectoria de esta). En la figura 28C se observa el modelo estructural obtenido de la simulación de MD, y se aprecia un plegamiento de la proteína nNOS aproximando sus dominios reductasa y oxigenasa hacia la proteína CaM resultado de su interacción, cambio conformacional que se ha observado mediante microscopia electrónica por Southworth y colaboradores [21].

Posteriormente, se acoplaron las cadenas faltantes de los dominios reductasa y oxigenasa de la proteína nNOS para obtener un modelo estructural completo. Finalmente, se llevó a cabo una simulación de MD del complejo  $4\text{Ca}^{2+}$ -CaM-nNOS a lo largo de 50 ns. La figura 28D muestra el modelo estructural final para el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-nNOS.



**Figura 27. Alineamiento de las estructuras determinadas para la secuencia de la proteína nNOS.** La estructura de la proteína nNOS está conformada por 1434 aminoácidos, la estructura 1TLL con 630 aminoácidos y la estructura 4D1N con 420 aminoácidos, forman parte del dominio reductasa y oxigenasa de la proteína nNOS, respectivamente; y el dominio de unión a CaM corresponde a la cadena B de la estructura 2O60.



**Figura 28. Ensamble del complejo CaM-nNOS.** (A) Monómero de la proteína nNOS, con sus dominios reductasa (color verde oscuro), dominio de unión a CaM (color verde claro) y dominio oxigenasa (color amarillo). (B) Ensamble de la proteína CaM a su dominio de unión en el monómero de la proteína nNOS. (C) Acoplamiento de la cadena A faltante (color cian) al dominio reductasa de la proteína nNOS. (D) Acoplamiento de las cadenas A, C y D (color naranja) al dominio oxigenasa de la proteína nNOS.

En contraste, en la figura 26 se observa la RMSD de los átomos del complejo, mostrando cambios durante la simulación de MD, mismos que se aprecian en la trayectoria de la MD que se puede consultar en la página <http://biosensor.facmed.unam.mx/tesis-erika/video13.html> o revisar en la figura A9-C.

La comprensión de la interacción de un ligando con su receptor ha sido fundamental para el diseño de fármacos. La simulación de MD nos ofrece resultados (plegamiento, reconocimiento) que pueden ser aprovechados para el diseño de moléculas que inhiban complejos específicos con base en su interacción [146].

### Diseño de péptidos inhibidores de complejos CaM-proteína

Existen diversas estrategias para el diseño de péptidos dirigidos a un blanco terapéutico particular, proteína o complejo. Sin embargo, deben considerarse sus características para emplear la estrategia apropiada.

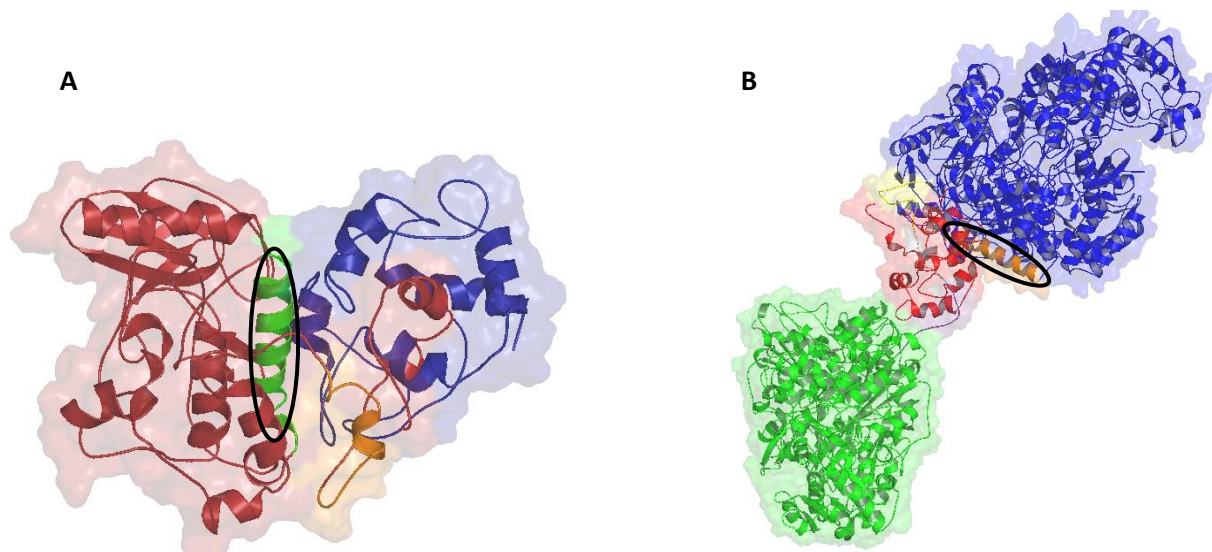
La proteína CaM es una proteína ubicua, con mayor afinidad por los péptidos que incluso a sus proteínas ligandos, de forma que un péptido puede provocar que no solo se inhiba a un complejo específico, sino se modifiquen varias vías de señalización y/o rutas metabólicas en las que participa con otras proteínas y, con ello, la presencia de efectos colaterales y secundarios que deben ser considerados cuando se desea como producto biofarmacéutico.

La ventaja de diseñar un péptido con una secuencia idéntica a la proteína ligando y con la cual la CaM tiene interacción es que puede ser capaz de unirse en la interfaz de las proteínas y, de esta forma, inhibir al complejo específico.

Así, con las estructuras modeladas de las proteínas skMLCK y nNOS se realizó la búsqueda de los residuos de aminoácidos que se encuentran en interacción con la CaM (interfaz) y que son diferentes del dominio de unión a CaM, para considerados como posibles péptidos inhibidores.

Se reconocieron 2 y 3 regiones para los complejos CaM-skMLCK y CaM-nNOS, respectivamente. Se eligió una secuencia de aminoácidos como péptido inhibidor para cada complejo proteico considerando los siguientes criterios para su diseño: (1) proximidad de interacción de la secuencia de aminoácidos (péptido) con la proteína CaM de forma que se impida la interacción proteína-proteína, (2) estructura alfa-hélice de la región en la proteína ligando que permitan su estabilidad y (3) longitud y características hidrofóbicas de los péptidos, una longitud adecuada y péptidos de naturaleza hidrofóbica propiciarían una mejor interacción con el complejo de interés, ya que se ha descrito que una gran mayoría de interfaces proteicas son de carácter hidrofóbico [147].

Finalmente, el péptido llamado MLCK-A (VDTMVFVRQICDGILFMHKM) y el péptido llamado NOS-A (KAHMERLEEVNKEIDTTS) fueron diseñados para la interacción con los complejos CaM-skMLCK y CaM-nNOS, respectivamente (figura 29). Los péptidos diseñados se mandaron a sintetizar para realizar los ensayos de unión experimentales.



**Figura 29. Selección de aminoácidos para los péptidos diseñados dirigidos a los complejos CaM-skMLCK y CaM-nNOS.** (A) La CaM (azul) unida a la proteína skMLCK (rojo) y los residuos que se involucran la interfaz (naranja y verde). (B) La CaM (rojo) unida a la nNOS (dominio oxigenasa en verde y dominio reductasa en azul) y los residuos que involucran la interfaz (naranja, amarillo, morado). Los residuos marcados en óvalos, fueron elegidos para el diseño de péptidos.

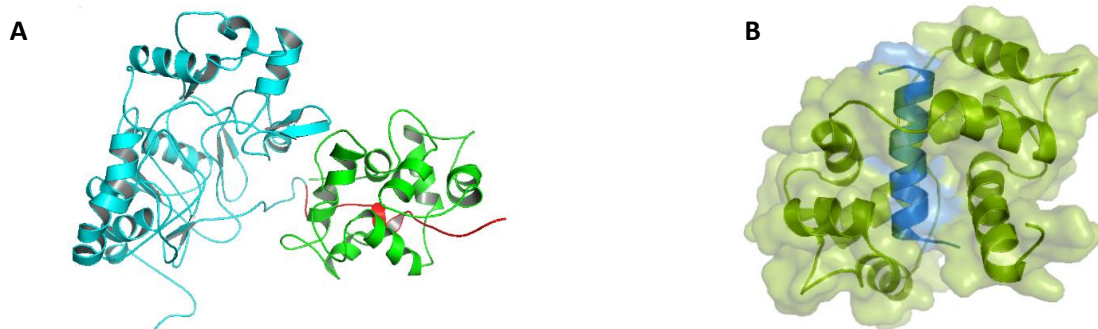
## Identificación de la interfaz CaM-proteína

Se utilizó el protocolo Peptiderive de Rosetta [113] para reconocer los péptidos provenientes de la interfaz de los complejos CaM-proteína estudiados. Este identifica el segmento polipeptídico lineal que puede contribuir de forma significativa sobre la energía de unión en comparación con la del complejo, por lo que pueden ser susceptibles de inhibición y evalúa si los péptidos derivados pueden ciclarse.

Los péptidos cíclicos pueden formarse por un enlace amida entre un grupo amino y un grupo carboxilo, y estos pueden ser de diferentes tipos: (1) de cabeza a cola, que se origina mediante la unión del amino terminal con el carboxilo terminal, (2) de cadena lateral a cadena lateral, mediante la unión de un grupo amino de una cadena lateral de lisina con el grupo carboxilo de la cadena lateral de un ácido aspártico o glutámico, (3) de amino terminal a cadena lateral, entre el amino terminal y carboxilo de la cadena lateral de ácido aspártico o glutámico y (4) de cadena lateral a carboxilo terminal, que se produce entre el  $\epsilon$ -amino de la lisina y el carboxilo terminal. También se encuentran los péptidos cíclicos formados por puentes disulfuros debido a la oxidación de los grupos tiol en las cisteínas [148].

Se identificó al ligando como la estructura de la proteína nNOS que contiene los dominios oxigenasa y de unión a CaM y como receptor a la estructura de la CaM. En la figura 30 se representan los modelos estructurales para el complejo CaM-nNOS, se aprecia la interacción de la CaM con su dominio de unión en la proteína nNOS.

En la figura 31 se observan las secuencias de los péptidos propuestos para la interfaz del complejo proteico CaM-nNOS. La identificación de los péptidos se realizó explorando una longitud entre los 10 y 24 aminoácidos. El péptido de 22 residuos de aminoácidos (KRRAIGFKKLAEAVKFSKLMG) comprende la mayoría de los residuos que se han descrito como el dominio de unión de la CaM en la proteína nNOS con una puntuación de 76.42% del total de la superficie de contacto y con una energía interfacial de -67.74 Kcal/mol. De acuerdo a los resultados determinados por el programa, este péptido no tiene probabilidad de ciclarse y se correlaciona con las estructuras determinadas experimentalmente para el péptido en complejo con la CaM [24].



**Figura 30. Modelos estructurales del complejo CaM-proteína nNOS (dominio oxigenasa y de unión a CaM) obtenidos de Peptiderive.** A) Calmodulina (verde) en complejo con su dominio de unión y el dominio oxigenasa de la proteína nNOS (turquesa) y la secuencia de aminoácidos considerados en la interfaz (rojo). B) Calmodulina (verde) y el péptido KRR AIGFKKLA EAVKFS AKLMG (azul) extraído de la interfaz.

	(42.6%, -37.8 Kcal/mol)	
	K R R A I G F K K L	
	(46.6%, -41.3 Kcal/mol)	
	K R R A I G F K K L A E	
	(52.7%, -46.7 Kcal/mol)	
	R A I G F K K L A E A V K F	
	(63.7%, -52.3 Kcal/mol)	
	I G F K K L A E A V K F S A K L M G	
	(71.0%, -56.5 Kcal/mol)	
	R R A I G F K K L A E A V K F S A K L M	
	(76.4%, -62.9 Kcal/mol)	
	K R R A I G F K K L A E A V K F S A K L M G	
	(77.7%, -68.879 Kcal/mol)	
	P T K R R A I G F K K L A E A V K F S A K L M G	
329	RESIDUO	352

**Figura 31. Secuencias de los péptidos propuestos para la interfaz del complejo proteico CaM-nNOS en presencia del dominio de unión a CaM.** En paréntesis se indica la superficie de contacto de la secuencia de aminoácidos respecto al total de la superficie de contacto del complejo en porcentaje y la energía de unión correspondiente a la interfaz (Kcal/mol).

De la estructura del modelo estructural del complejo CaM-nNOS se eliminó el dominio de unión de la CaM para identificar los residuos que participan en la interacción del complejo pero que difieren de este dominio. Así, se identificó al ligando como la estructura de la proteína nNOS que contiene el dominio oxigenasa y como receptor a la estructura de la CaM. En la figura 32 se representan los modelos estructurales de la interacción CaM-nNOS en ausencia de dominio de unión de la CaM. Se aprecia el péptido VNKEIDTTSTYQ que proviene de la interfaz.

En la figura 33 se observa la secuencia de los péptidos propuestos de la interfaz del complejo proteico CaM-nNOS. La identificación de los péptidos se realizó explorando una longitud entre 10 y 20 aminoácidos. El péptido de 12 residuos que proviene de la cadena C del dominio oxigenasa en la proteína nNOS, contiene algunos residuos del péptido diseñado NOS-A y muestra una puntuación de 43.6% del total de la superficie de contacto y una energía interfacial de -5.0 Kcal/mol.

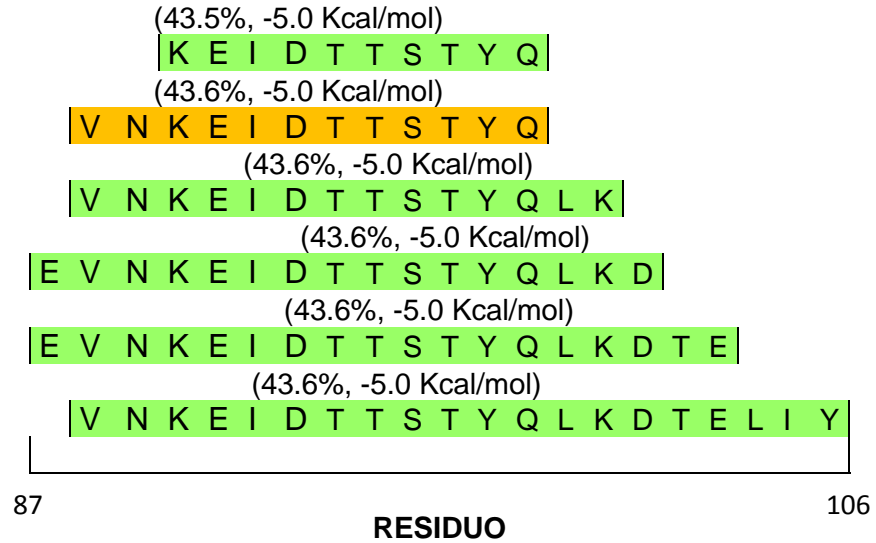
De acuerdo a los resultados, no existe la posibilidad de que el péptido VNKEIDTTSTYQ sea cíclico, lo que representa una posibilidad para utilizar el péptido NOS-A como inhibidor del complejo proteico CaM-nNOS.

Por otra parte, también se identificaron otros péptidos que provienen de la cadena B del dominio oxigenasa. Estos presentaron una mayor puntuación del total de la superficie de contacto (entre 47.5% y 48.04 %), pero tienen una mayor probabilidad de ciclarse, por la formación de un enlace amida entre un grupo amino terminal y un grupo carboxilo terminal del péptido (figura 34).

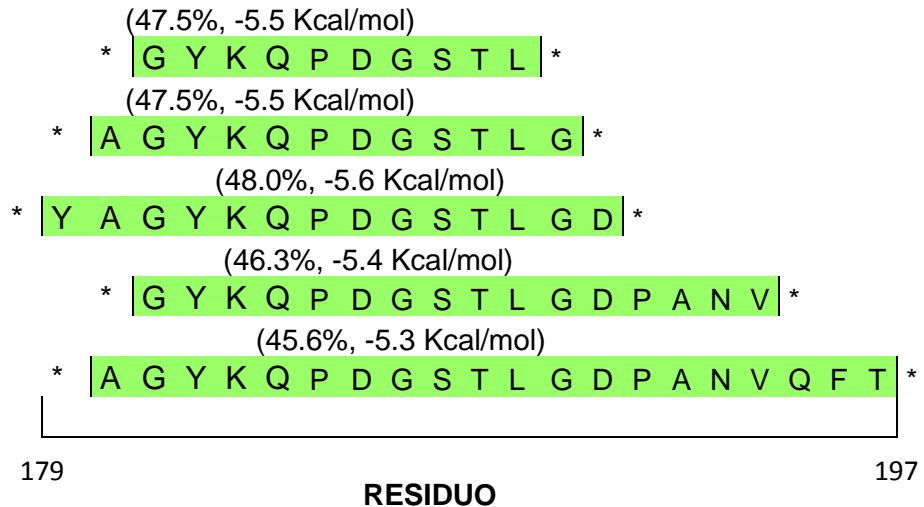


**Figura 32. Modelos estructurales del complejo CaM-proteína nNOS (dominio oxigenasa) obtenidos de Peptiderive.** A) Calmodulina (verde) en complejo con el dominio oxigenasa de la proteína nNOS (turquesa) y la secuencia de aminoácidos considerados en la interfaz. B) Calmodulina (verde) y el péptido VNKEIDTTSTYQ (azul) extraído de la interfaz.





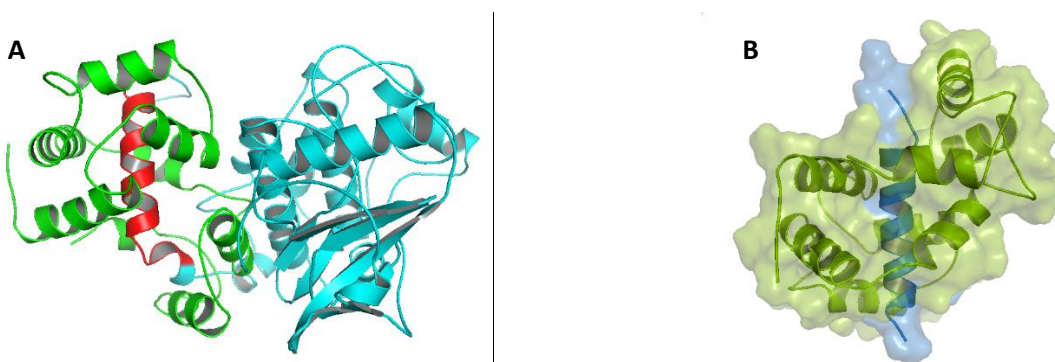
**Figura 33. Secuencias de los péptidos propuestos para la interfaz del complejo proteico CaM-nNOS en ausencia del dominio de unión a CaM.** En paréntesis se indica la superficie de contacto de la secuencia de aminoácidos respecto al total de la superficie de contacto del complejo en porcentaje y la energía de unión correspondiente a la interfaz (Kcal/mol).



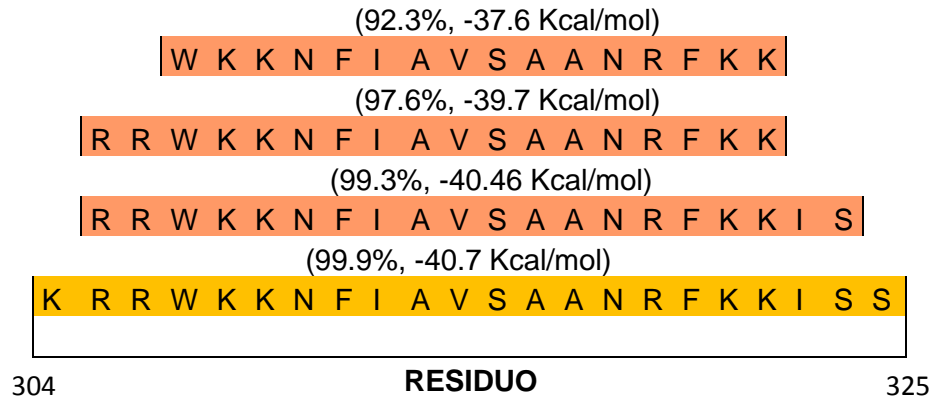
**Figura 34. Secuencias de los péptidos cíclicos propuestos para la interfaz del complejo proteico CaM-nNOS en ausencia del dominio de unión a CaM.** En paréntesis se indica la superficie de contacto de la secuencia de aminoácidos respecto al total de la superficie de contacto del complejo en porcentaje y la energía de unión correspondiente a la interfaz (Kcal/mol), \* aminoácidos que participan en el enlace peptídico para la ciclación del péptido.

Para identificar los péptidos provenientes de la interfaz del complejo CaM-skMLCK modelado se indicó a la estructura de la proteína skMLCK como el ligando, incluyendo el dominio de unión a CaM, y como receptor a la estructura de la CaM. En la figura 35 se observan los modelos estructurales obtenidos del programa para el complejo CaM-skMLCK mostrando la interacción de la CaM con su dominio de unión en la proteína skMLCK.

La figura 36 muestra las secuencias de los péptidos obtenidos de la interfaz del complejo proteico CaM-skMLCK modelado. La identificación de los péptidos se determinó a una longitud entre 16 y 22 aminoácidos. La puntuación de los péptidos obtenidos de la interfaz es más del 90% del total de la superficie de contacto según el protocolo. El péptido de 22 residuos de aminoácidos (KRRWKKNFIAVSAANRFKKISS), comprende la mayoría de los residuos que se han descrito como el dominio de unión de la CaM en la proteína skMLCK, tiene un 99% del total de la superficie de contacto y una energía interfacial de -40.7 Kcal/mol.



**Figura 35. Modelos estructurales del complejo CaM-proteína skMLCK (dominio de unión a CaM) obtenidos de Peptiderive.** A) Calmodulina (verde) en complejo con su dominio de unión en la proteína skMLCK (turquesa) y la secuencia de aminoácidos considerados en la interfaz (rojo). B) Calmodulina (verde) y el péptido KRRWKKNFIAVSAANRFKKISS (azul) extraído de la interfaz.



**Figura 36. Secuencias de los péptidos propuestos para la interfaz del complejo proteico CaM-skMLCK en presencia del dominio de unión a CaM.** En paréntesis se indica el área de selección respecto al área total de la interfaz en porcentaje y la energía de unión correspondiente a la interfaz (Kcal/mol).

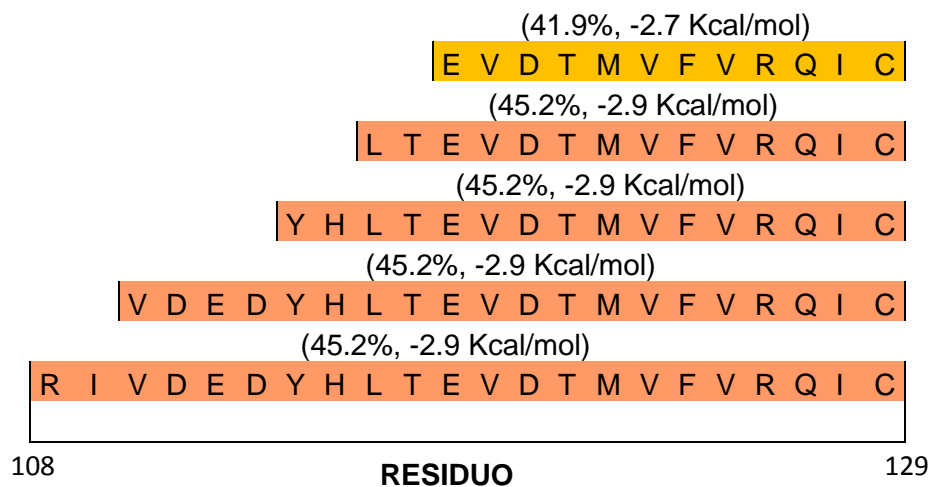
La figura 37 representa los modelos tridimensionales de la interacción CaM-nNOS. Se indicó como ligando a la estructura del monómero de skMLCK sin incluir al dominio de unión a CaM y como receptor a la CaM.

En la figura 38 se observa la secuencia de los péptidos propuestos para la interfaz del complejo proteico CaM-skMLCK. La identificación de los péptidos se determinó a una longitud entre 10-22 aminoácidos. El péptido de 12 residuos (EVDTMVFVRQIC) muestra una puntuación de 41.9% del total de la interfaz y con una energía interfacial de -2.7 Kcal/mol. Si bien este péptido no tiene la mayor puntuación del total de interface y la menor energía, no se determinó como péptido cíclico, por lo que no afectaría su estabilidad y, por lo tanto, se puede utilizar como inhibidor del complejo proteico CaM-skMLCK.

El único péptido cíclico (DLKPENILCVNTTGHLVKIIDFGL) determinado por el programa es distinto en secuencia a los péptidos de la figura 38 y presentó valores menores de interfaz y energía comparados con el péptido de 12 residuos (36.8% del total de la superficie de contacto y una energía interfacial de -2.5 Kcal/mol).



**Figura 37. Modelos de la proteína skMLCK con la CaM obtenidos de Peptiderive.** A) Calmodulina (verde) en complejo con el dominio oxigenasa de la proteína nNOS (turquesa) y la secuencia de aminoácidos considerados en la interfaz. B) Calmodulina (verde) y el péptido EVDTMVFVRQIC (azul) extraído de la interfaz.



**Figura 38. Secuencias de los péptidos propuestos para la interfaz del complejo proteico CaM-skMLCK en ausencia del dominio de unión a CaM.** En paréntesis se indica el área de selección respecto al área total de la interfaz en porcentaje y la energía de unión correspondiente a la interfaz (Kcal/mol).

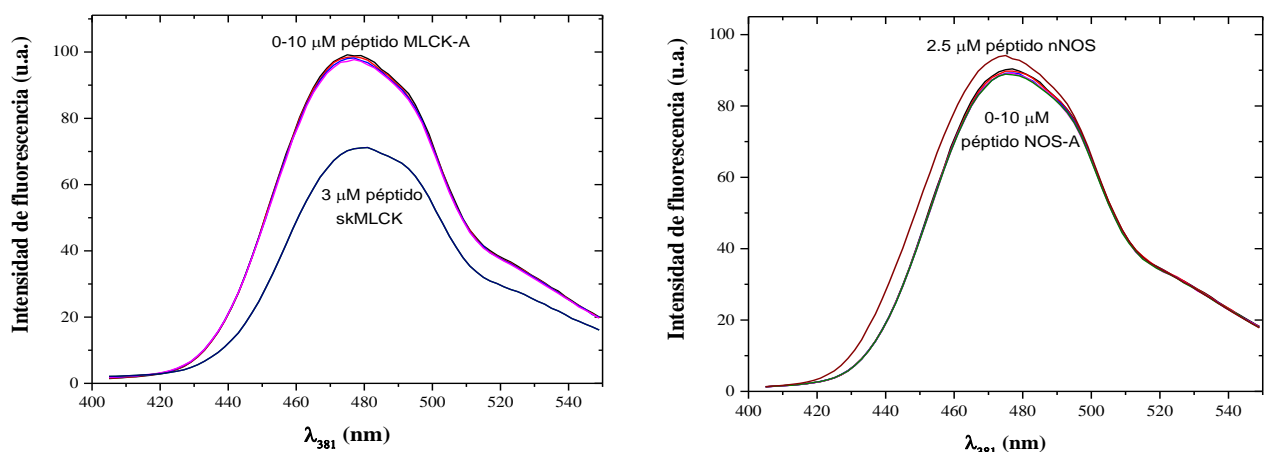
## Afinidad de los péptidos diseñados MLCK-A y NOS-A con la CaM

Con base al diseño de péptidos a partir de los modelos estructurales obtenidos de las simulaciones de MD para los complejos CaM-proteína (CaM-skMLCK y CaM-nNOS) se mandaron a sintetizar los péptidos diseñados (MLCK-A y NOS-A) como posibles inhibidores de los complejos CaM-proteína específicos (tabla 6).

Tabla 6. Péptidos utilizados en el ensayo de unión con el biosensor de CaM		
Proviene	Péptido	Secuencia
Dominio de unión en la proteína	skMLCK	KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL
	nNOS	RRAIGFKKLAEAVKFSAKLMGQ
Interfaz en el complejo proteico	MLCK-A	VDTMVFVRQICDGILFMHKM
	NOS-A	KAHMERLEEVNKEIDTTS

Para identificar su especificidad por el complejo a inhibir, se realizaron estudios de unión de los péptidos diseñados con el biosensor *hCaM-M124C-mBBr*. La figura 39 muestra los espectros de fluorescencia obtenidos del ensayo de unión de los péptidos diseñados al excitar a 381 nm, se observa que la adición constante de concentraciones de péptido MLCK-A o NOS-A (0-10  $\mu$ M) no cambian los espectros de fluorescencia.

Sin embargo, al añadir concentraciones específicas de los péptidos control (tabla 6), skMLCK y nNOS, los espectros de fluorescencia disminuyen e incrementan, respectivamente; como se observa en las titulaciones de estos péptidos. Estos resultados nos indican que los péptidos diseñados no se unen directamente a la CaM.



**Figura 39. Ensayos de unión de los péptidos (A) MLCK-A y (B) NOS-A con el biosensor *hCaM-M124C-mBBR*.** Los péptidos skMLCK y nNOS se utilizaron como controles. Los espectros de fluorescencia se obtuvieron excitando al fluoróforo *mBBR* del biosensor fluorescente de la CaM a 381 nm y registrando un intervalo de emisión de 405-550 nm.

### Acoplamiento y dinámica molecular del complejo CaM-péptido utilizando los péptidos diseñados

Se realizó el acoplamiento de los péptidos diseñados a la CaM en su conformación cerrada utilizando la estructura de la CaM del archivo 2O60, posteriormente se realizó su simulación de MD para los complejos a lo largo de 100 ns. En la tabla 7 se observan las energías libres y los parámetros energéticos teóricos de los complejos CaM-péptidos diseñados obtenidos del análisis de la simulación de MD.

Los complejos CaM-péptido MLCK-A y CaM-péptido NOS-A, presentan valores de energía libre más grandes que los obtenidos para los complejos CaM péptidos skMLCK y nNOS, estos datos nos indican que la unión de los péptidos diseñados a la CaM es inestable y se relacionan con los obtenidos experimentalmente.

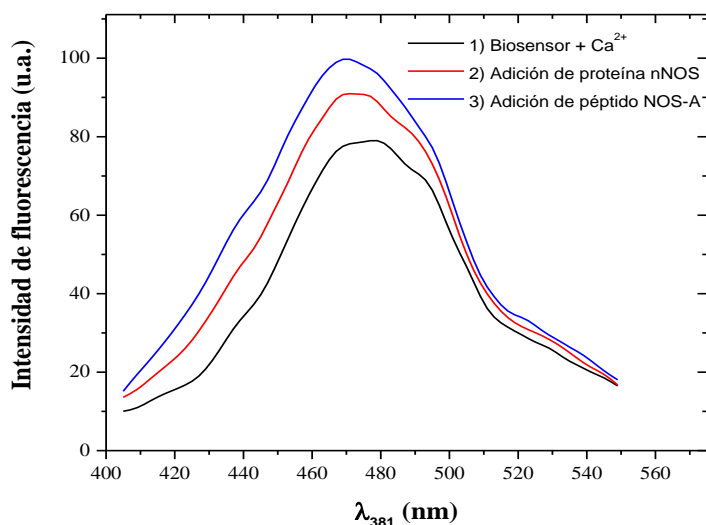
En conjunto, estos resultados apoyan la idea de que los péptidos diseñados no favorecerían la inhibición de cualquier vía de señalización en la que se encuentre implicada la CaM y, por tanto, disminuiría la probabilidad de la aparición de posibles efectos secundarios.

Tabla 7. Parámetros energéticos obtenidos del análisis de la simulación de MD de los complejos CaM-péptidos			
Complejo	$\Delta G_{\text{teórico}}$ (kcal/mol)	$T\Delta S_{\text{teórico}}$ (kcal/mol)	$\Delta H_{\text{teórico}}$ (kcal/mol)
CaM-MLCKA	$-6.57 \pm 11.67$	$-50.53 \pm 7.64$	$-57.10 \pm 8.82$
CaM-NOSA	$1.48 \pm 9.63$	$-55.11 \pm 4.65$	$-53.63 \pm 8.43$
CaM-skMLCK	$-43.79 \pm 18.92$	$-83.88 \pm 11.53$	$-127.68 \pm 15.00$
CaM-nNOS	$-25.30 \pm 12.21$	$-64.79 \pm 7.04$	$-90.10 \pm 9.97$

### Evaluación de la interacción CaM-proteína-péptido diseñado

Para determinar la interacción de los péptidos MLCK-A y NOS-A con los complejos CaM-proteína para los que fueron diseñados (CaM-proteína skMLCK y CaM-proteína nNOS, respectivamente) se analizaron los cambios en los espectros de fluorescencia intrínseca y extrínseca de los complejos, manteniendo las condiciones del biosensor hCaM-M124C-*mBB*r y concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , así como las longitudes de onda de excitación establecidas en los ensayos de competencia realizados en este trabajo.

La figura 40 muestra los espectros de fluorescencia del ensayo para la interacción CaM-nNOS-NOS-A excitando a 381 nm, observando que hay un cambio en el espectro de fluorescencia inicial del biosensor a saturación con  $\text{Ca}^{2+}$  cuando se añade una concentración conocida de proteína nNOS (efecto hiperacrómico), tras la adición del péptido NOS-A, aumenta la intensidad de fluorescencia respecto al espectro de fluorescencia anterior en aproximadamente 20 unidades arbitrarias.

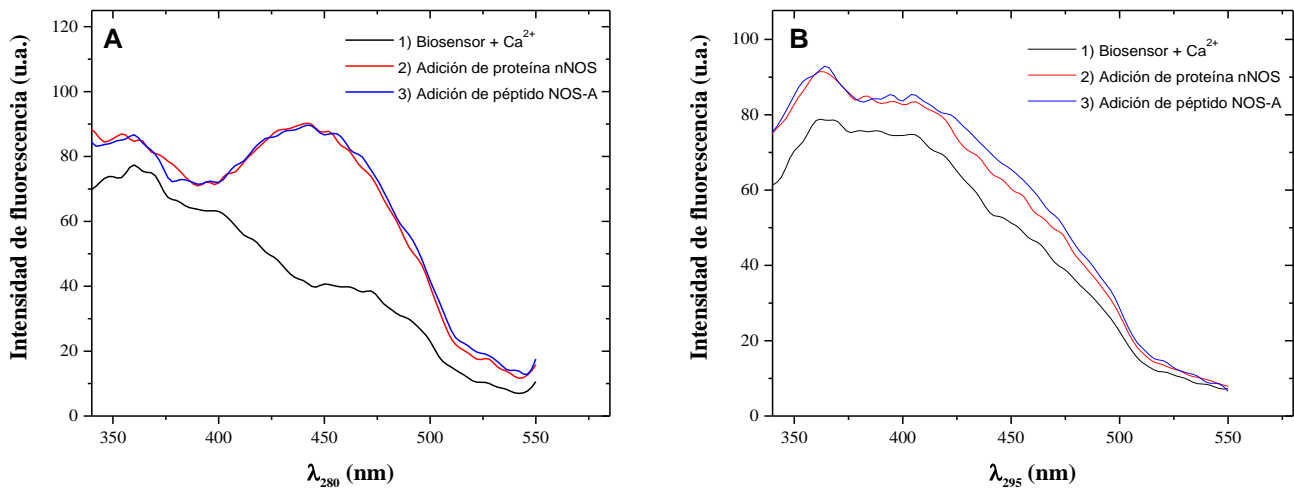


**Figura 40. Espectros de fluorescencia extrínseca de los ensayos de competencia de la proteína CaM-proteína nNOS-péptido NOS-A.** Se empleó (—) 0.2  $\mu\text{M}$  biosensor *hCaM M124C-mBBr* y 3.2  $\mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$  en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, a 25  $^\circ\text{C}$ , (—) 0.013  $\mu\text{M}$  de proteína nNOS y (—) 10  $\mu\text{M}$  de péptido NOS-A. Los espectros se obtuvieron excitando a 381 nm y registrando un intervalo de emisión de 405-550 nm.

Los resultados de los espectros de fluorescencia intrínseca para este ensayo muestran que tras la excitación a 280 nm (figura 41A), se presenta una transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), observando un aumento en la intensidad de fluorescencia a 450 nm, debido probablemente a la excitación del fluoróforo *mBBr* por la absorción de energía emitida por los fluoróforos intrínsecos de la proteína y la proximidad entre ellos. Posteriormente, la adición del péptido NOS-A no presenta cambio alguno en el espectro de fluorescencia cuando se excita a 280 y 295 nm; probablemente atribuido a que el péptido en su secuencia no presenta fluoróforos intrínsecos (figura 41).

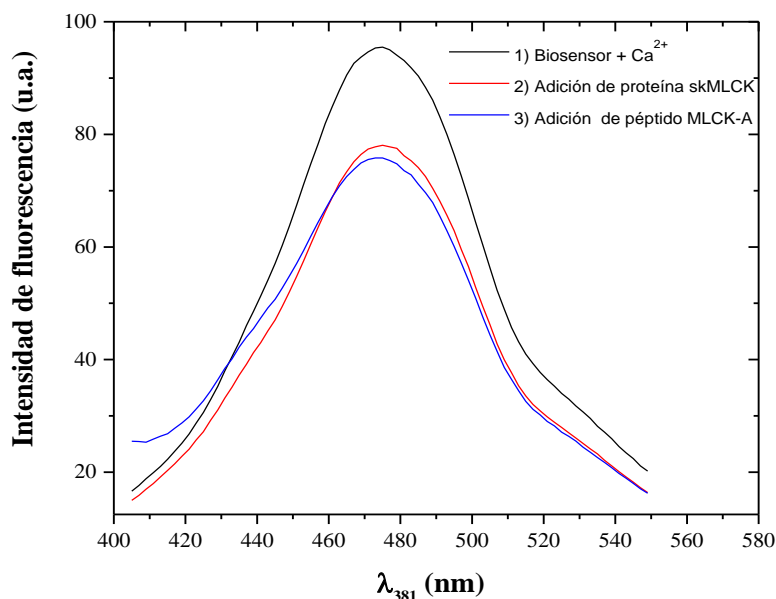
Los resultados de unión CaM-péptido NOS-A y ensayos de competencia CaM-proteína nNOS-péptido NOS-A, indican una interacción del péptido NOS-A con el complejo proteína-proteína, que probablemente presenta un cambio en la interacción del complejo (interfaz).





**Figura 41. Espectros de fluorescencia intrínseca de los ensayos de competencia de la proteína CaM-proteína nNOS-péptido NOS-A.** Se empleó (—) 0.2  $\mu\text{M}$  biosensor *hCaM M124C-mBBr* en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, a 25  $^{\circ}\text{C}$ , (—) 0.013  $\mu\text{M}$  de proteína nNOS y (—) 10  $\mu\text{M}$  de péptido NOS-A. Los espectros se obtuvieron excitando a 280 nm (A) y 295 nm (B).

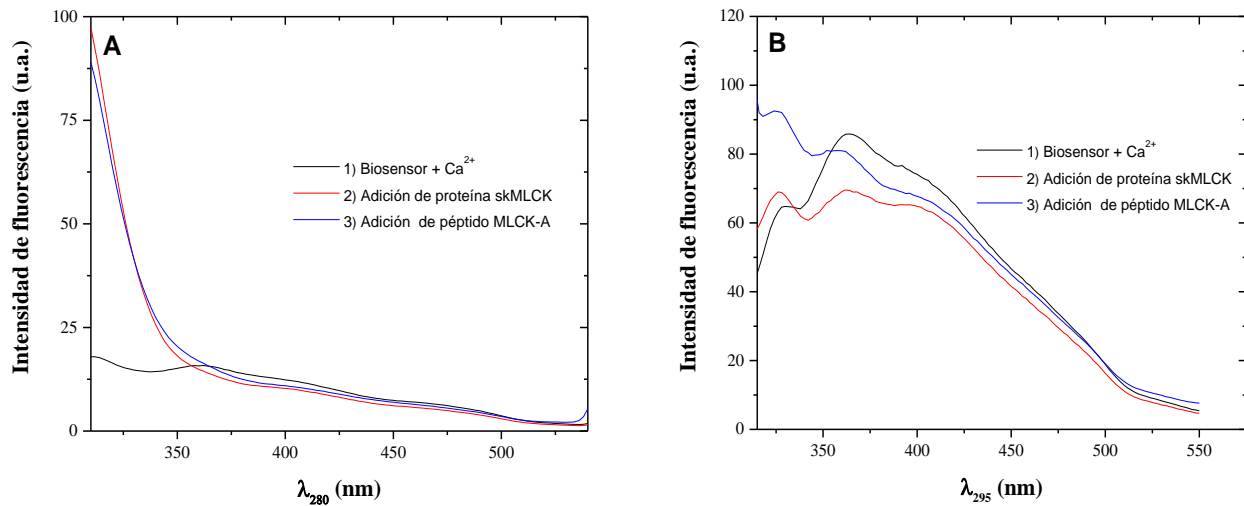
Las Figuras 42 y 43 muestran los resultados de la interacción CaM-proteína skMLCK-MLCK-A. El espectro de fluorescencia excitando a 381 nm (figura 42) para la proteína CaM presenta un máximo de intensidad de fluorescencia de aproximadamente 75 unidades arbitrarias, excitando a 381 nm. Sin embargo, la adición de la proteína skMLCK disminuye la intensidad de fluorescencia inicial, debido posiblemente a la interacción directa del fluoróforo *mBBr* y la proteína skMLCK, como se mencionó anteriormente en los ensayos de unión del péptido del mismo nombre. Finalmente, la adición de 10  $\mu\text{M}$  del péptido MLCK-A muestra una disminución del espectro de fluorescencia, debido probablemente a la interacción del péptido MLCK-A con el complejo proteico CaM-skMLCK.



**Figura 42. Espectros de fluorescencia extrínseca de los ensayos de competencia de la proteína CaM-proteína skMLCK-péptido MLCK-A.** Se empleó (—) 0.2  $\mu\text{M}$  biosensor *hCaM* M124C-mBBR en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 a 25  $^{\circ}\text{C}$ , (—) 0.013  $\mu\text{M}$  de proteína y (—) 0.013  $\mu\text{M}$  de proteína skMLCK. Los espectros se obtuvieron excitando a 381 nm y registrando un intervalo de emisión de 405-550 nm.

La Figura 43A muestra los resultados de la excitación a 280 nm, el espectro de fluorescencia intrínseca de la proteína CaM cambia al adicionar la proteína skMLCK aumentando la intensidad de fluorescencia alrededor de cuatro veces, debido posiblemente a la presencia de residuos de Phe, Tyr y Trp presentes en la proteína. El espectro de fluorescencia intrínseca excitando a 295 nm, muestra un efecto hipocrómico al añadir la proteína skMLCK atribuido posiblemente a la unión de la CaM a su dominio en la proteína skMLCK y la interacción directa del Trp4 (péptido skMLCK) cercano a la posición 124 de la proteína CaM.

Los estudios de fluorescencia muestran que los péptidos no son capaces de unirse a la CaM, por sí sola, pero sí interfieren en un complejo en específico, mostrando una selectividad.

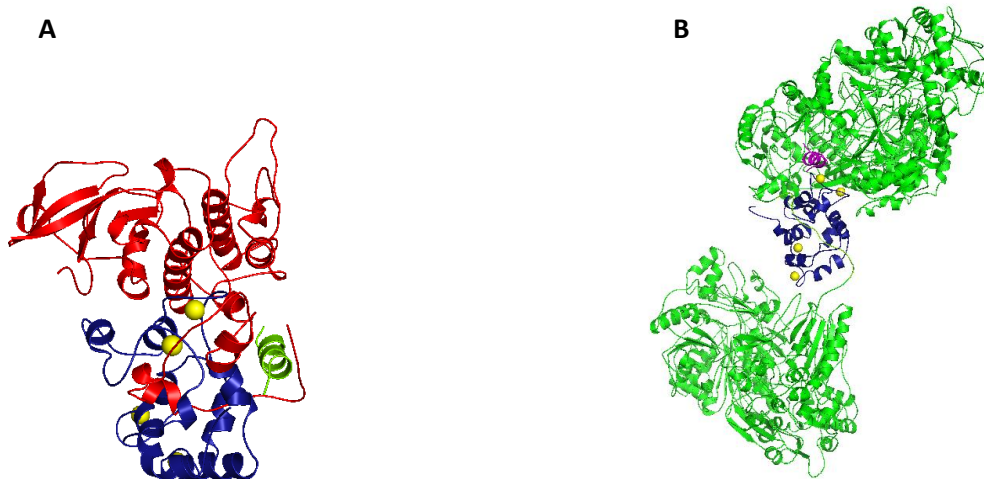


**Figura 43. Espectros de fluorescencia intrínseca de los ensayos de competencia de la proteína CaM-proteína skMLCK-péptido MLCK-A.** Se empleó (—) 0.2  $\mu\text{M}$  biosensor *hCaM* M124C-mBBR en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 a 25  $^{\circ}\text{C}$ , (—) 0.013  $\mu\text{M}$  de proteína y (—) 0.013  $\mu\text{M}$  de proteína skMLCK. Los espectros se obtuvieron excitando a 280 nm (A) y 295 nm (B).

### Acoplamiento molecular del péptido diseñado con el complejo CaM-proteína

Inicialmente se obtuvieron los acoplamientos CaM-proteína-péptido diseñado determinados por el servidor CABS-dock, utilizando una porción de las proteínas skMLCK y nNOS, correspondientes a la región con la que interactúan principalmente con la CaM, debido a que el servidor solo permite realizar acoplamientos moleculares de máximo 500 residuos de aminoácidos en total para las proteínas. Posteriormente, se localizó el mismo sitio en la proteína completa.

La figura 44 muestra el sitio de interacción probable de los péptidos diseñados con los complejos proteicos CaM-skMLCK y CaM-nNOS en función de su baja energía y su RMSD. Como se observa los péptidos diseñados se encuentran en la interfaz de las proteínas. Finalmente, se evaluó la capacidad de interacción de los péptidos con sus complejos proteicos completos mediante una simulación de MD cuya trayectoria se muestra en la página <http://biosensor.facmed.unam.mx/tesis-erika/videos.html> (vídeos 14-16) y en la figura A10 las imágenes representativas de la simulación.



**Figura 44. Acoplamiento molecular de los péptidos (A) MLCK-A y (B) NOS-A al complejo CaM-proteína skMLCK y nNOS, respectivamente.** El péptido MLCK-A se muestra en color verde y el péptido NOS-A en color rosa, mientras que la proteína CaM se encuentra en color azul en presencia de sus cuatro iones  $\text{Ca}^{2+}$  en color amarillo; las proteínas skMLCK en color rojo y la nNOS en color verde.

La figura 45 muestra el RMSF del péptido NOS-A que comprende los residuos 3199-3216 con una fluctuación entre 0.6-1.3 Angstroms, lo que sugiere existen cambios conformacionales mínimos que afecten su estructura e interacción en el complejo CaM-nNOS-NOS-A. Esta interacción podría provocar una afectación en la actividad de la enzima nNOS (producción de óxido nítrico) y farmacológicamente es importante cuando se trata de padecimientos donde la producción de NO es elevada como Alzheimer y Parkinson [149].

Por otra parte, la figura 46 muestra las fluctuaciones de los residuos 482-501 que comprenden al péptido MLCK-A observando que su RMSF se encuentra entre 1-5 Angstroms, a pesar de una gran fluctuación entre los residuos esto permite un cambio en la interacción del complejo proteico CaM-skMLCK, por la intervención del péptido MLCK-A, como se observa en el vídeo depositado en <http://biosensor.facmed.unam.mx/tesis-erika/video16.html>. La interacción podría ser farmacológicamente favorable en las distrofias miotónicas en donde es difícil relajar los músculos después del uso [150].

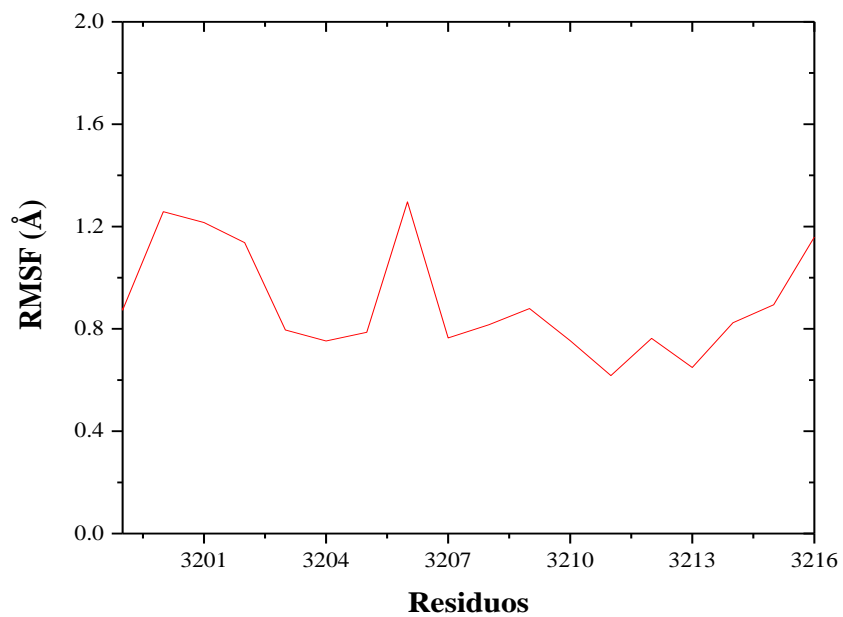


Figura 45. Fluctuación del péptido NOS-A en la simulación de MD del complejo CaM-nNOS-NOS-A.

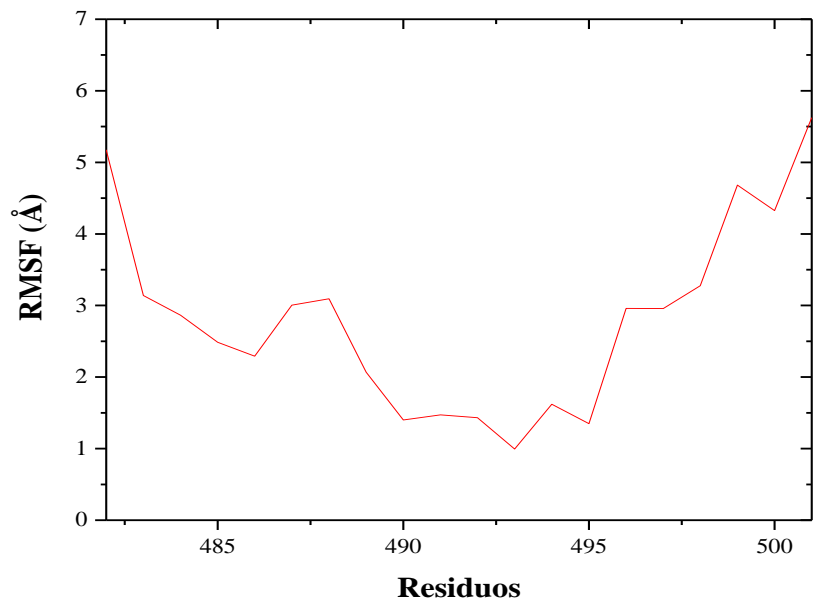


Figura 46. Fluctuación del péptido MLCK-A en la simulación de MD del complejo CaM-skMLCK-MLCK-A.

De acuerdo a los resultados teóricos y experimentales de la interacción de los péptidos NOS-A y MLCK-A con los complejos proteicos CaM-nNOS y CaM-skMLCK, respectivamente, muestran una selectividad para el complejo que fueron diseñados de forma que los péptidos anteriormente descritos pueden figurar como posibles biofármacos y/o ser la base para el desarrollo de nuevos y, con un mayor número de estudios, hacerlos específicos para los padecimientos relacionados con estos complejos como Alzheimer, Parkinson y distrofias miotónicas, por ejemplo.

## VIII. CONCLUSIONES

Las diversas conformaciones que presenta la CaM en ausencia y presencia de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) en sus sitios de unión, observadas durante las simulaciones de MD, probablemente permiten unir con mayor o menor afinidad a sus ligandos, de acuerdo a las interacciones que se establezcan. Los efectos de fluorescencia observados en los ensayos de unión con el biosensor *hCaM-M124C-mBBr* son resultado de la interacción específica de cada ligando. Los péptidos skMLCK, nNOS, Cav1.1 y Calspermin se unen con alta afinidad a la CaM debido a que presentan una gran cantidad de interacciones hidrofóbicas que favorecen su unión, sus constantes de disociación ( $K_d$ ) se encuentran en el orden de concentración nanomolar, y en la mayoría de ellos su afinidad aumenta con la adición de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Los ensayos de competencia CaM-ligandos, demostraron el grado de afinidad ( $K_d$ ) de los ligandos, siendo los péptidos skMLCK, nNOS los que presentan una mayor afinidad por la CaM, que las moléculas bioactivas o proteínas de las cuales provienen. Las herramientas de modelaje molecular nos permitieron obtener modelos estructurales de los diferentes complejos estudiados (proteína-péptido, proteína-proteína, proteína-proteína-péptido) e identificar las principales regiones de interacción independientes del dominio de unión a CaM (interfaz) en las proteínas skMLCK y nNOS y, así, establecer una estrategia para el diseño de péptidos. El estudio de las interacciones CaM-ligando realizadas en esta investigación nos permitieron reconocer a los péptidos MLCK-A y NOS-A como posibles ligandos específicos de los complejos proteicos CaM-skMLCK y CaM-nNOS, y representar la base para el desarrollo de biofármacos de naturaleza peptídica más selectivos.

## IX. PERSPECTIVAS

- Realizar ensayos de simulación de Dinámica Molecular acelerada.
- Realizar ensayos de inhibición enzimática.
- Realizar pruebas de estabilidad de los péptidos diseñados.
- Modificación del péptido diseñado para mejorar su estabilidad.
- Realizar combinaciones de fármacos y péptidos diseñados para obtener un efecto sinérgico.
- Realizar ensayos de competencia entre los péptidos diseñados y los fármacos aplicados en la terapia de las enfermedades para cada complejo CaM-proteína.
- Realización de pruebas en modelos celulares y/o animales.



## X. BIBLIOGRAFÍA

1. González, M., Rodríguez, R., Madariaga, A., Rivera, J., Mata, R. Sosa, A., del Pozo, L. and Arias, I., *Insights into molecular interactions between CaM and its inhibitors from molecular dynamics simulations and experimental data*. J Biomol Struct Dynam, 2016. 34(1): p. 78-91.
2. Pawson, T., M. Raina, and P. Nash, *Interaction domains: from simple binding events to complex cellular behavior*. FEBS Lett, 2002. 513(1): p. 2-10.
3. Golemis, E. and P.D. Adams, *Protein-protein Interactions: A Molecular Cloning Manual*. 2005: CSHLP.
4. Nooren, I.M. and J.M. Thornton, *Diversity of protein-protein interactions*. EMBO J, 2003. 22(14): p. 3486-3492.
5. Brini, M. and E. Carafoli, *Calcium signalling: a historical account, recent developments and future perspectives*. CMLS, 2000. 57(3): p. 354-370.
6. Audran, E., Dagher, R., Gioria, S., Tsvetkov, P., Kulikova, A., Didier, B., Villa, P., Makarov, A., Kilhoffer, M. and Haiech, J., *A general framework to characterize inhibitors of calmodulin: Use of calmodulin inhibitors to study the interaction between calmodulin and its calmodulin binding domains*. Biochim Biophys Acta, Mol Cell Res, 2013. 1833(7): p. 1720-1731.
7. Berridge, M., *Elementary and global aspects of calcium signalling*. J Exp Biol, 1997. 200(2): p. 315-319.
8. Vetter, S.W. and E. Leclerc, *Novel aspects of calmodulin target recognition and activation*. Eur J Biochem, 2003. 270(3): p. 404-14.
9. Clapham, D.E., *Calcium Signaling*. Cell. 131(6): p. 1047-1058.
10. Schwaller, B., *Cytosolic Ca(2+) buffers*. Cold Spring Harbor Perspect Biol, 2010. 2(11): p. 40-51.
11. O'Day, D.H., *CaMBOT: profiling and characterizing calmodulin-binding proteins*. Cell Signalling, 2003. 15(4): p. 347-354.
12. Mata, R., Figueroa, M., Gonzalez, M., Rivera, J., Madariaga, A. and Del Valle, P., *Calmodulin inhibitors from natural sources: an update*. J Nat Prod, 2015. 78(3): p. 576-586.
13. Ishida, H. and H.J. Vogel, *Protein-peptide interaction studies demonstrate the versatility of calmodulin target protein binding*. Prot Pept Lett, 2006. 13(5): p. 455-465.
14. Jurado, L.A., P.S. Chockalingam, and H.W. Jarrett, *Apocalmodulin*. Physiol Rev, 1999. 79(3): p. 661-682.
15. Komeiji, Y., Y. Ueno, and M. Uebayasi, *Molecular dynamics simulations revealed Ca2+-dependent conformational change of Calmodulin*. FEBS Lett, 2002. 521(1): p. 133-139.
16. Martinez, S., Gonzalez, M., Ulloa, M. and Mata, R., *Phytotoxins from the fungus malbranchea aurantiaca*. Phytochem, 2005. 66(9): p. 1012-1026.
17. Mata, R., Figueroa, M., Gonzalez, M., Rivera, J., Madariaga, A. and Del Valle, P., *Calmodulin inhibitors from natural sources: an update*. J Nat Prod, 2015. 78(3): p. 576-86.

18. Berchtold, M.W. and A. Villalobo, *The many faces of calmodulin in cell proliferation, programmed cell death, autophagy, and cancer*. Biochim Biophys Acta, 2014. 1843(2): p. 398-435.
19. Sharma, R.K., *Diversity of calcium action in regulation of mammalian calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase*. Indian J Biochem Biophys, 2003. 40(2): p. 77-91.
20. Tidow, H. and P. Nissen, *Structural diversity of calmodulin binding to its target sites*. FEBS J, 2013. 280(21): p. 5551-65.
21. Yokom, A., Morishima, Y., Lau, M., Su, M., Glukhova, A., Osawa, Y. and Southworth, D., *Architecture of the nitric-oxide synthase holoenzyme reveals large conformational changes and a calmodulin-driven release of the FMN domain*. J Biol Chem, 2014. 289(24): p. 16855-16865.
22. Stuehr, D., *Mammalian nitric oxide synthases*. Biochim Biophys Acta, Bioenerg, 1999. 1411(2): p. 217-230.
23. Venema, R., Sayegh, H., Kent, J. and Harrison, D., *Identification, characterization, and comparison of the calmodulin-binding domains of the endothelial and inducible nitric oxide synthases*. J Biol Chem, 1996. 271(11): p. 6435-6440.
24. Zhang, M. and H. Vogel, *Characterization of the calmodulin-binding domain of rat cerebellar nitric oxide synthase*. J Biol Chem, 1994. 269(2): p. 981-985.
25. Wu, G., V. Berka, and A. Tsai, *Binding kinetics of calmodulin with target peptides of three nitric oxide synthase isozymes*. J Inorg Biochem, 2011. 105(9): p. 1226-1237.
26. Sheta, E., K. McMillan, and B. Masters, *Evidence for a bidomain structure of constitutive cerebellar nitric oxide synthase*. J Biol Chem, 1994. 269(21): p. 15147-15153.
27. Acton, Q.A., *Calcium-calmodulin-dependent Protein Kinases*. 2012: ARASP.
28. Hong, F., Haldeman, B., Jackson, D., Carter, M., Baker, J. and Cremo, C., *Biochemistry of smooth muscle myosin light chain kinase*. Arch Biochem Biophys, 2011. 510(2): p. 135-146.
29. Stull, J., K. Kamm, and R. Vandenoorn, *Myosin light chain kinase and the role of myosin light chain phosphorylation in skeletal muscle*. Arch Biochem Biophys, 2011. 510(2): p. 120-128.
30. Gao, Z., Krebs, J., VanBerkum, M., Tang, W., Maune, J., Means, A., Stull, J. and Beckingham, K., *Activation of four enzymes by two series of calmodulin mutants with point mutations in individual Ca<sup>2+</sup> binding sites*. J Biol Chem, 1993. 268(27): p. 20096-20104.
31. Blumenthal, D., Takio, K., Edelman, A., Charbonneau, H., Titani, K., Walsh, K. and Krebs, E., *Identification of the calmodulin-binding domain of skeletal muscle myosin light chain kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. 82(10): p. 3187-3191.
32. Lukas, T., Burgess, W., Prendergast, F., Lau, W. and Watterson, D., *Calmodulin binding domains: characterization of a phosphorylation and calmodulin binding site from myosin light chain kinase*. J Biochem, 1986. 25(6): p. 1458-1464.
33. Blumenthal, D., Charbonneau, H., Edelman, A., Hinds, T., Rosenberg, G., Storm, D., Vincenzi, F., Beavo, J. and Krebs, E., *Synthetic peptides based on the calmodulin-binding domain of myosin light chain kinase inhibit activation of other*

- calmodulin-dependent enzymes*. Biochem Biophys Res Commun, 1988. 156(2): p. 860-865.
34. Persechini, A. and P. Stemmer, *Calmodulin is a limiting factor in the cell*. Trends Cardio Med, 2002. 12(1): p. 32-37.
  35. Peersen, O., T. Madsen, and J. Falke, *Intermolecular tuning of calmodulin by target peptides and proteins: differential effects on Ca<sup>2+</sup> binding and implications for kinase activation*. Protein Sci, 1997. 6(4): p. 794-807.
  36. Molnár, A., Liliom, K., Orosz, F., Vértessy, B. and Ovádi, J., *Anti-calmodulin potency of indol alkaloids in in vitro systems*. Euro J Phar: Mol Pharm, 1995. 291(2): p. 73-82.
  37. Harmat, V., Böcskei, Z., Náray-Szabó, G., Bata, I., Csutor, A., Hermeicz, I., Arányi, P., Szabó, B., Liliom, K., Vértessy, B. and Ovádi, J., *A new potent calmodulin antagonist with arylalkylamine structure: crystallographic, spectroscopic and functional studies*. J Mol Biol, 2000. 297(3): p. 747-755.
  38. Green, D., Dennis, A., Fam, P., Tidor, B. and Jasanoff, A., *Rational design of new binding specificity by simultaneous mutagenesis of calmodulin and a target peptide*. J Biochem, 2006. 45(41): p. 12547-12559.
  39. Hellstrand, E., Kukora, S., Shuman, C., Steenbergen, S., Thulin, E., Kohli, A., Krouse, B., Linse, S. and Åkerfeldt, K., *Förster resonance energy transfer studies of calmodulin produced by native protein ligation reveal inter-domain electrostatic repulsion*. FEBS J, 2013. 280(11): p. 2675-2687.
  40. Allen, M., Urbauer, R., Zaidi, A., Williams, T., Urbauer, J. and Johnson, C., *Fluorescence labeling, purification, and immobilization of a double cysteine mutant calmodulin fusion protein for single-molecule experiments*. Anal Biochem, 2004. 325(2): p. 273-284.
  41. Gsponer, J., Christodoulou, J., Cavalli, A., Bui, J., Richter, B., Dobson, C. and Vendruscolo, M., *A coupled equilibrium shift mechanism in calmodulin-mediated signal transduction*. J Struc, 2008. 16(5): p. 736-746.
  42. Rodríguez, F., Maestre, M., Coudeville, N., Dimova, K., Junge, H., Lipstein, N., Lee, D., Becker, S., Brose, N. Jahn, O., Carlomagno, T. and Griesinger, C., *Modular architecture of Munc13/calmodulin complexes: dual regulation by Ca<sup>2+</sup> and possible function in short-term synaptic plasticity*. EMBO J, 2010. 29(3): p. 680-691.
  43. Yang, C., G. Jas, and K. Kuczera, *Structure, dynamics and interaction with kinase targets: computer simulations of calmodulin*. Biochim Biophys Acta, Proteins Proteomics, 2004. 1697(1): p. 289-300.
  44. Kim, R., H. Yokota, and S. Kim, *Electrophoresis of proteins and protein-protein complexes in a native agarose gel*. Anal Biochem, 2000. 282(1): p. 147-149.
  45. Gabdoulline, R. and R. Wade, *Biomolecular diffusional association*. Curr Opin Struct Biol, 2002. 12(2): p. 204-213.
  46. Madariaga, A., Hernández, O., Estrada, S. and Mata, R., *Insights on the vasorelaxant mode of action of malbrancheamide*. J Pharm Pharmacol, 2015. 67(4): p. 551-558.
  47. Murphy, A.J., F. Kemp, and J. Love, *Surface plasmon resonance characterization of calspermin-calmodulin binding kinetics*. Anal Biochem, 2008. 376(1): p. 61-72.

48. Drescher, D.G., N.A. Ramakrishnan, and M.J. Drescher, *Surface Plasmon Resonance (SPR) analysis of binding interactions of proteins in inner-ear sensory epithelia*. *Methods Molec Biol* 2009. 493: p. 323-343.
49. Du, X., Li, Y., Xia, Y. , Ai, S. , Liang, J., Sang, P., Ji, X. and Liu, S., *Insights into protein–ligand interactions: mechanisms, models, and methods*. *Int J Molec Sci*, 2016. 17(2): p. 144.
50. Beccia, M., Sauge-Merle, S., Lemaire, D., Brémond, N., Pardoux, R., Blangy, S., Guilbaud, P. and Berthomieu, C., *Thermodynamics of calcium binding to the calmodulin N-terminal domain to evaluate site-specific affinity constants and cooperativity*. *J Biol Inorg Chem*, 2015. 20(5): p. 905-919.
51. Goraya, T. and D. Cooper, *Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent phosphodiesterase (PDE1): Current perspectives*. *Cell Signalling*, 2005. 17(7): p. 789-797.
52. Sharma, R. and J. Wang, *Preparation and assay of the Ca<sup>2+</sup>--dependent modulator protein*. *Adv Cyclic Nucleot Res*, 1979. 10: p. 187-98.
53. Martínez, S., A. Pérez, and R. Mata, *Natural products with calmodulin inhibitor properties*. *Phytochem*, 2007. 68(14): p. 1882-1903.
54. González, M., Figueroa, M., Rodríguez, R., Mata, R. and Sosa, A., *An alternative assay to discover potential calmodulin inhibitors using a human fluorophore-labeled CaM protein*. *Anal Biochem*, 2009. 387(1): p. 64-70.
55. Valverde, A., *Estudios de interacciones moleculares de compuestos bioactivos de la proteína calmodulina para el diseño y desarrollo de nuevos fármacos anti-CAM in Facultad de Química*. 2017, UNAM. p. 82.
56. González, M., Rodríguez, R., Madariaga, A., Rivera, J., Mata, R. Sosa, A., del Pozo, L. and Arias, I. I., *Insights into molecular interactions between CaM and its inhibitors from molecular dynamics simulations and experimental data*. *J Biomol Struct Dynam*, 2016. 34(1): p. 78-91.
57. Weiss, B., Prozialeck, W., Cimino, M., Sellinger, M. and Wallace, T., *Pharmacological regulation of calmodulin*. *ANYAS* 1980. 356(1): p. 319-345.
58. Roufogalis, B.D., *Calmodulin Antagonism*, in *Calcium and Cell Physiology*. 1985, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 148-169.
59. Kenneth, C., C. Frazier, and M. Ceo, *Biopharmaceutical research & development: The process behind new medicines*. 2015, Pharmaceutical Research and Manufacturers of America: Washington, DC. p. 1-20.
60. *Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable*. 2013, Diario Oficial de la Federación.
61. Mitragotri, S., P. Burke, and R. Langer, *Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: formulation and delivery strategies*. *Nat Rev Drug Discov*, 2014. 13(9): p. 655-672.
62. Sharfstein, S., *Non-protein biologic therapeutics*. *Curr Op Biotech*, 2018. 53: p. 65-75.
63. Moscicki, R.A. and P.K. Tandon, *Drug-Development Challenges for Small Biopharmaceutical Companies*. *N Engl J Med*, 2017. 376(5): p. 469-474.
64. García, A., *Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos*. *Neurol*, 2011. 26(5): p. 301-306.

65. Kumar, S., Plotnikov, N., Rouse, J. and Singh, S., *Biopharmaceutical informatics: supporting biologic drug development via molecular modelling and informatics*. J Pharm Pharmacol, 2017: p. 35-41.
66. Harris, W.J., *Humanized Antibodies*, in *Encyclopedia of Immunology* P.J. Delves, Editor. 1998, Elsevier: Oxford. p. 1139-1144.
67. Zaykov, A., J. Mayer, and R. DiMarchi, *Pursuit of a perfect insulin*. Nat Rev Drug Discov, 2016. 15(6): p. 425-439.
68. Fosgerau, K. and T. Hoffmann, *Peptide therapeutics: current status and future directions*. Drug Discovery Today, 2015. 20(1): p. 122-128.
69. Kaspar, A. and J. Reichert, *Future directions for peptide therapeutics development*. Drug Discovery Today, 2013. 18(17): p. 807-817.
70. Dunn, B., *Peptide chemistry and drug design*. 2015: Wiley. 578.
71. Thundimadathil J., *Cancer treatment using peptides: current therapies and future prospects*. J Amino Acids, 2012. 12: p. 1-13.
72. Verdine, G. and G. Hilinski, *Stapled peptides for intracellular drug targets*. Methods Enzym, 2012. 503: p. 3-33.
73. Young, C., Jue, L., Jin, S., Seung, L., Yang, V., Chong, C. and Yoon, P., *Cell penetrating peptides for tumor targeting*. Curr Pharm Biotech, 2011. 12(8): p. 1166-1182.
74. Nagarajan, K., Marimuthu, S., Palanisamy, S. and Subbiah, L., *Peptide therapeutics versus superbugs*. Inter J Pept ResTherap, 2017: p. 114-121.
75. Rhoads, A. and F. Friedberg, *Sequence motifs for calmodulin recognition*. FASEB J, 1997. 11(5): p. 331-340.
76. O'Neil, K. and DeGrado, W., *How calmodulin binds its targets: sequence independent recognition of amphiphilic alpha-helices*. Trends Biochem Sci, 1990. 15: p. 59-64.
77. Evans, T.I. and M.A. Shea, *Energetics of calmodulin domain interactions with the calmodulin binding domain of CaMKII*. Proteins, 2009. 76(1): p. 47-61.
78. Shifman, J.M. and S.L. Mayo, *Modulating calmodulin binding specificity through computational protein design*. J Mol Biol, 2002. 323(3): p. 417-423.
79. Hubbard, M. and C. Klee, *Calmodulin binding by calcineurin. Ligand-induced renaturation of protein immobilized on nitrocellulose*. J Biol Chem, 1987. 262(31): p. 15062-70.
80. Sondergaard, M., Tian, X., Liu, Y., Wang, R., Chazin, W. , Chen, S. and Overgaard, M., *Arrhythmogenic calmodulin mutations affect the activation and termination of cardiac ryanodine receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> release*. J Biol Chem, 2015. 290(43): p. 26151-26162.
81. Ataman, Z., Gakhar, L., Sorensen, B. , Hell, J. and Shea, M., *The NMDA receptor NR1 C1 region bound to calmodulin: Structural insights into functional differences between homologous domains*. Struct, 2007. 15(12): p. 1603-1617.
82. Penheiter, A., Filoteo, A., Penniston, J. and Caride, A., *Kinetic analysis of the calmodulin-binding region of the plasma membrane calcium pump isoform 4b*. Biochemistry, 2005. 44(6): p. 2009-2020.
83. Niu, J., Yang, W., Yue, D., Inoue, T. and Ben-Johny, M., *Duplex signaling by CaM and Stac3 enhances Cav1.1 function and provides insights into congenital myopathy*. J Gen Physiol, 2018: p. 1-17.

84. Hadhimulya, A., Etsuko, M., Zahangir, S. and Masaki, K., *Interactions of calmodulin with the multiple binding sites of cav1.2 Ca<sup>2+</sup> channels*. Vol. 112. 2010. 397-404.
85. Alexander, K., Wakim, B., Doyle, G., Walsh, K. and Storm, D., *Identification and characterization of the calmodulin-binding domain of neuromodulin, a neurospecific calmodulin-binding protein*. J Biol Chem, 1988. 263(16): p. 7544-7549.
86. Seeger, C., V.O. Talibov, and U.H. Danielson, *Biophysical analysis of the dynamics of calmodulin interactions with neurogranin and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II*. J Mol Recognit, 2017. 30(8).
87. Clapperton, J., Martin, S., Smerdon, S., Gamblin, S. and Bayley, P., *Structure of the complex of calmodulin with the target sequence of calmodulin-dependent protein kinase I: studies of the kinase activation mechanism*. J Biochem, 2002. 41(50): p. 14669-79.
88. Wall, M., J. Clarage, and G. Phillips, *Motions of calmodulin characterized using both Bragg and diffuse X-ray scattering*. J Struct, 1997. 5(12): p. 1599-1612.
89. Grishaev, A., N. Anthis, and G. Clore, *Contrast-matched small-angle X-ray scattering from a heavy-atom-labeled protein in structure determination: application to a lead-substituted calmodulin-peptide complex*. J Am Chem Soc, 2012. 134(36): p. 14686-14689.
90. Meador, W., A. Means, and F. Quijcho, *Target enzyme recognition by calmodulin: 2.4 A structure of a calmodulin-peptide complex*. J Scie, 1992. 257(5074): p. 1251-1255.
91. Maximciuc, A., Putkey, J., Shamo, Y. and MacKenzie, K., *Complex of calmodulin with a ryanodine receptor target reveals a novel, flexible binding mode*. J Struct, 2006. 14(10): p. 1547-1556.
92. Elshorst, B., Hennig, M., Forsterling, H., Diener, A., Maurer, M., Schulte, P., Schwalbe, H., Griesinger, C., Krebs, J., Schmid, H. Vorherr, T. and Carafoli, E., *NMR solution structure of a complex of calmodulin with a binding peptide of the Ca<sup>2+</sup> pump*. J Biochem, 1999. 38(38): p. 12320-12332.
93. Halling, D., Georgiou, D., Black, D., Yang, G., Fallon, J., Quijcho, F., Pedersen, S. and Hamilton, S., *Determinants in Ca(V)1 channels that regulate the Ca(2+) sensitivity of bound calmodulin*. J Biol Chem, 2009. 284(30): p. 20041-20051.
94. Van Petegem, F., F. Chatelain, and D. Minor, *Insights into voltage-gated calcium channel regulation from the structure of the Ca(V)1.2 IQ domain-Ca(2+)/calmodulin complex*. Nat Struct Molec Biol, 2005. 12(12): p. 1108-1115.
95. Kumar, V., Chichili, V. P., Zhong, L., Tang, X., Velazquez-Campoy, A., Sheu, F. S., Seetharaman, J., Gerges, N. Z. and Sivaraman, J., *Structural basis for the interaction of unstructured neuron specific substrates neuromodulin and neurogranin with Calmodulin*. Sci Rep, 2013. 3: p. 1392.
96. Ikura, M., M., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., Zhu, G., Klee, C. B. and Bax, A., *Solution structure of a calmodulin-target peptide complex by multidimensional NMR*. J Scie, 1992. 256(5057): p. 632-638.
97. Findlay, W., M. Gradwell, and P. Bayley, *Role of the N-terminal region of the skeletal muscle myosin light chain kinase target sequence in its interaction with calmodulin*. Protein Sci, 1995. 4(11): p. 2375-2382.

98. Bayley, P., W. Findlay, and S. Martin, *Target recognition by calmodulin: dissecting the kinetics and affinity of interaction using short peptide sequences*. Protein Sci, 1996. 5(7): p. 1215-1228.
99. Shukla, D., A. Peck, and V. Pande, *Conformational heterogeneity of the calmodulin binding interface*. Nat Commun, 2016. 7: p. 10910.
100. Chattopadhyaya, R., Meador, W., Means, A. and Quioco, F., *Calmodulin structure refined at 1.7 Å resolution*. J Mol Biol, 1992. 228(4): p. 1177-1192.
101. González, M., Mata, R., Madariaga, A., Rodríguez, R., Pozo, L. and Sosa, A., *Importance of the interaction protein-protein of the CaM-PDE1A and CaM-MLCK complexes in the development of new anti-CaM drugs*. J Molecular Recogn, 2013. 26(4): p. 165-174.
102. Salomon, R., D. Case, and R. Walker, *An overview of the Amber biomolecular simulation package*. Comp Molec Scie, 2013. 3(2): p. 198-210.
103. Case, D., Cheatham, T., Darden, T., Gohlke, H., Luo, R. , Merz, K., Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B. and Woods, R., *The Amber biomolecular simulation programs*. J Comp Chem, 2005. 26(16): p. 1668-1688.
104. Treesuwan, W. and S. Hannongbua, *Bridge water mediates nevirapine binding to wild type and Y181C HIV-1 reverse transcriptase--evidence from molecular dynamics simulations and MM-PBSA calculations*. J Mol Graph Model, 2009. 27(8): p. 921-9.
105. Hou, T., Wang, J., Li, Y. and Wang, W., *Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA methods. 1. The accuracy of binding free energy calculations based on molecular dynamics simulations*. J Chem Inf Model, 2011. 51(1): p. 69-82.
106. Kollman, P., Massova, I., Reyes, C., Kuhn, B., Huo, S., Chong, L., Lee, M., Lee, T., Duan, Y., Wang, W., Donini, O., Cieplak, P., Srinivasan, J., Case, D. A. and Cheatham, T., *Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models*. Acc Chem Res, 2000. 33(12): p. 889-897.
107. Roe, D. and T. Cheatham, *PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data*. J Chem Theory Comput, 2013. 9(7): p. 3084-3095.
108. Seifert, E., *OriginPro 9.1: scientific data analysis and graphing software-software review*. J Chem Inf Model, 2014. 54(5): p. 1552.
109. Hsin, J., Arkhipov, A., Yin, Y., Stone, J. and Schulten, K., *Using VMD - An introductory tutorial*. Curr Prot Bioinf 2008: p. Unit-5.7.
110. Kim, D., D. Chivian, and D. Baker, *Protein structure prediction and analysis using the Robetta server*. Nucleic Acids Res, 2004. 32: p. 526-531.
111. Eswar, N., Webb, B., Marti, M., Madhusudhan, M., Eramian, D., Shen, M., Pieper, U. and Sali, A., *Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller*. Curr Prot Bioinf, 2006. 0 5: p. Unit-5.6.
112. Conway, P., Tyka, M., DiMaio, F., Konerding, D. and Baker, D., *Relaxation of backbone bond geometry improves protein energy landscape modeling*. Protein Scie, 2014. 23(1): p. 47-55.

113. Sedan, Y., Marcu, O., Lyskov, S. and Schueler, O., *Peptiderive server: derive peptide inhibitors from protein–protein interactions*. Nucleic Acids Res, 2016. 44: p. W536-W541.
114. Ciemny, M., Kurcinski, M., Kozak, K. , Kolinski, A. and Kmiecik, S., *Highly Flexible Protein-Peptide Docking Using CABS-Dock*. Methods Mol Biol, 2017. 1561: p. 69-94.
115. González, M., Benito, E., Mata, R. and Moreno, M., *Biosensor for on-line fluorescent detection of trifluoroperazine based on genetically modified calmodulin*. Anal Bioanal Chem, 2012. 402(10): p. 3211-3218.
116. Sosa, A. and M. González, *Fluorescent biosensors for protein interactions and drug discovery, biosensors for health, environment and biosecurity*. 2011: IntechOpen.
117. O'Neil, K. and W. DeGrado, *How calmodulin binds its targets: sequence independent recognition of amphiphilic  $\alpha$ -helices*. Trends Biochem Scie, 1990. 15(2): p. 59-64.
118. Vigil, D., Gallagher, S., Trehwella, J. and García, A., *Functional dynamics of the hydrophobic cleft in the N-domain of calmodulin*. Biophys J 2001. 80(5): p. 2082-2092.
119. Wriggers, W., Mehler, E., Pitici, F., Weinstein, H. and Schulten, K., *Structure and dynamics of calmodulin in solution*. Biophys J, 1998. 74(4): p. 1622-1639.
120. Yang, C., G. Jas, and K. Kuczera, *Structure and dynamics of calcium-activated calmodulin in solution*. J Biomol Struct Dyn, 2001. 19(2): p. 247-271.
121. Shepherd, C. and H. Vogel, *A molecular dynamics study of Ca(2+)-calmodulin: evidence of interdomain coupling and structural collapse on the nanosecond timescale*. Biophys J, 2004. 87(2): p. 780-791.
122. Berg, J., J. Tymoczko, and L. Stryer, *Biochemistry*. 2012, New York: W.H. Freeman and Company.
123. Weljie, A. and H. Vogel, *Tryptophan fluorescence of calmodulin binding domain peptides interacting with calmodulin containing unnatural methionine analogues*. Protein Eng, 2000. 13(1): p. 59-66.
124. Yuan, T., A. Weljie, and H. Vogel, *Tryptophan fluorescence quenching by methionine and selenomethionine residues of calmodulin: orientation of peptide and protein binding*. J Biochem, 1998. 37(9): p. 3187-3195.
125. Stockner, T. and A. Koschak, *What can naturally occurring mutations tell us about Ca(v)1.x channel function?* Biochim Biophys Acta 2013. 1828(7): p. 1598-1607.
126. Catterall, W., Perez, E., Snutch, T. and Striessnig, J., *Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels*. Pharm Rev, 2005. 57(4): p. 411-425.
127. Stroffekova, K., *The IQ motif is crucial for Cav1.1 function*. J Biomed Biotech, 2011. 2011: p. 9.
128. Tang, W., Brent, D., Black, D., Pate, P., Zhang, J., Pedersen, S., Altschuld, R. and Hamilton, S., *Apocalmodulin and Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-binding sites on the Cav1.2 channel*. Biophys J, 2003. 85(3): p. 1538-1547.
129. Fischer, T., *Surface plasmon resonance spectroscopy study in different biosensor surfaces, characterization of protein-peptide and protein-lipid interactions*. BFJ, 2000: p. 1-15.

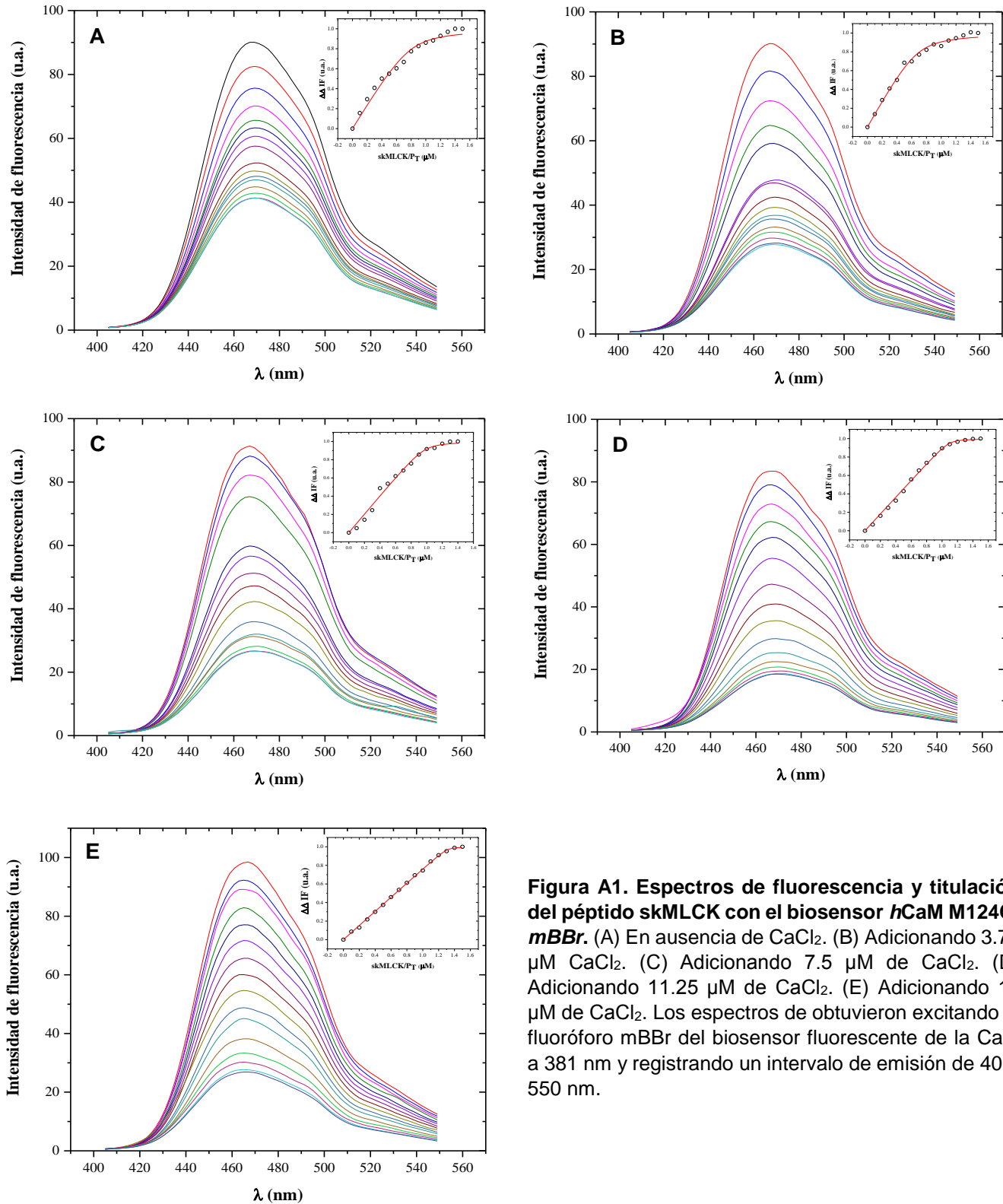


130. Peersen, O.B., T.S. Madsen, and J.J. Falke, *Intermolecular tuning of calmodulin by target peptides and proteins: differential effects on Ca<sup>2+</sup> binding and implications for kinase activation*. Protein Sci, 1997. 6(4): p. 794-807.
131. Olwin, B., Edelman, A., Krebs, E. and Storm, D., *Quantitation of energy coupling between Ca<sup>2+</sup>, calmodulin, skeletal-muscle myosin light chain kinase, and kinase substrates*. J Biol Chem, 1984. 259(17): p. 949-955.
132. Dick, I.E., Tadross, M., Liang, H., Tay, L. , Yang, W. and Yue, D. T., *A modular switch for spatial Ca<sup>2+</sup> selectivity in the calmodulin regulation of Ca<sub>v</sub> channels*. Nat, 2008. 451(7180): p. 830-4.
133. Liu, X., Yang, P., Yang, W. and Yue, D., *Enzyme-inhibitor-like tuning of Ca(2+) channel connectivity with calmodulin*. Nat, 2010. 463(7283): p. 968-972.
134. Green, D., Dennis, A., Fam, P., Tidor, B. and Jasanoff, A., *Rational design of new binding specificity by simultaneous mutagenesis of calmodulin and a target peptide*. J Biochem 2006. 45(41): p. 12547-12559.
135. Karplus, M. and J. McCammon, *Molecular dynamics simulations of biomolecules*. Nat Struct Biol, 2002. 9(9): p. 646-652.
136. Keserü, G., Swinney, D., Mannhold, R., Kubinyi, H. and Folkers, G., *Thermodynamics and kinetics of drug binding*. 2015: Wiley. 37-61.
137. Du, X., Li, Y., Xia, Y., Ai, S., Liang, J., Sang, P., Ji, X. and Liu, S., *Insights into Protein-Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods*. Int J Mol Sci, 2016. 17(2).
138. Xu, M., Yu, L., Wan, B., Yu, L. and Huang, Q., *Predicting Inactive Conformations of Protein Kinases Using Active Structures: Conformational Selection of Type-II Inhibitors*. P One, 2011. 6(7).
139. Baron, R. and J. McCammon, *Molecular recognition and ligand association*. Annu Rev Phys Chem, 2013. 64: p. 151-75.
140. Yan, Z. and J. Wang, *Specificity quantification of biomolecular recognition and its implication for drug discovery*. Scie Rep, 2012. 2: p. 309.
141. Toullec, D., Pianett, P., Cost, H., Charon, D. and Kirilovsky, J., *The Bisindolylmaleimide GF 109203X Is a Potent and Selective Inhibitor of Protein Kinase C*. J Biol Chem, 1991. 266: p. 15771-15781.
142. Davis, P., Hill, C., Lawton, G., Nixon, J., Wilkinson, S., Hurst, S., Keech, E. and Turner, S., *Inhibitors of protein kinase C. 1. 2,3-Bisarylmalimides*. J Med Chem, 1992. 35(1): p. 177-184.
143. Vera, N., *Relación del grado de saturación de Ca<sup>+2</sup> en la afinidad de moléculas bioactivas inhibitoras de la CaM y su efecto farmacológico*, in Facultad de Química. 2017, UNAM. p. 92.
144. Gnegy, M., *Calmodulin in neurotransmitter and hormone action*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1993. 33: p. 45-70.
145. Lee, J., S. Wu, and Y. Zhang, *Ab initio protein structure prediction*, in *From Protein Structure to Function with Bioinformatics*. 2009, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 3-25.
146. Hospital, A., Goñi, J., Orozco, M. and Gelpí, J., *Molecular dynamics simulations: advances and applications*. Adv Appl Bioinf Chem 2015. 8: p. 37-47.
147. Lakey, J. and I. Gokce, *Protein–protein interactions*, in eLS. 2001. p. 1-7.

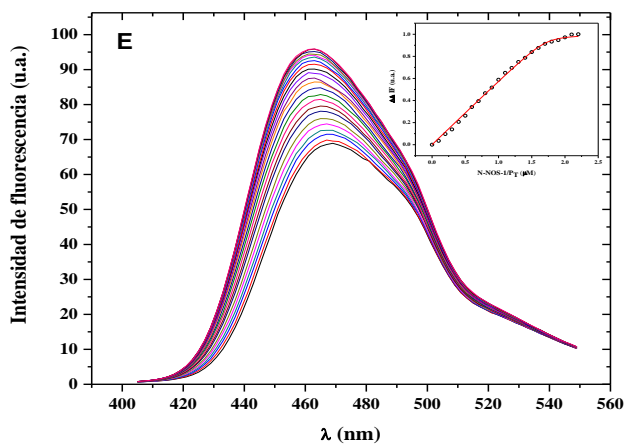
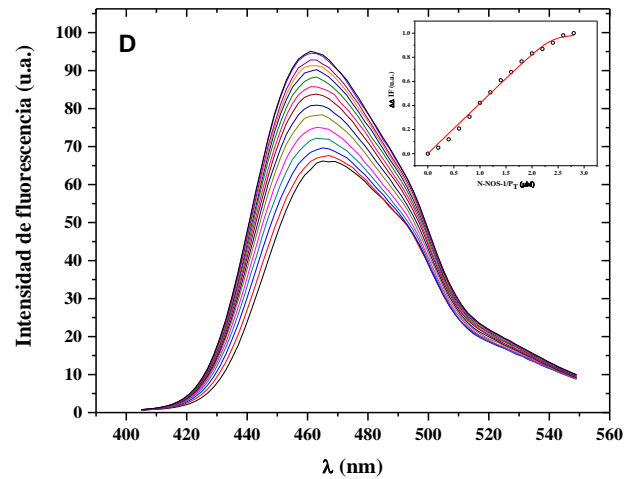
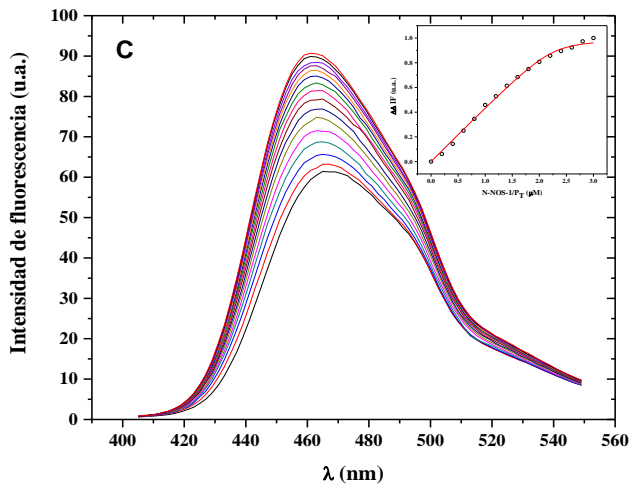
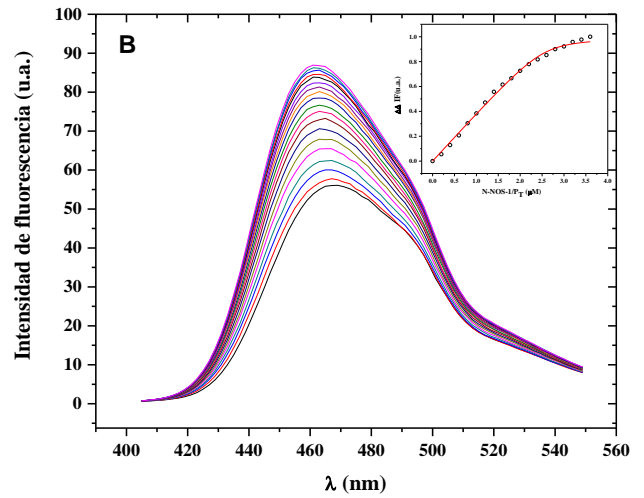
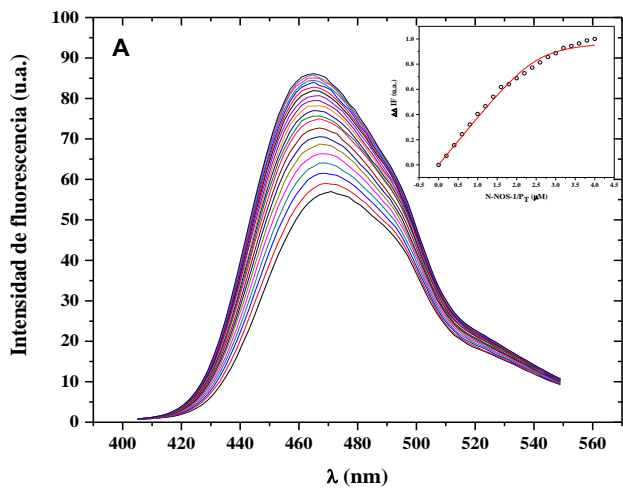
148. Santi, M., Lorenzón, E., Costabel, F. and Tonarelli, G., *Ciclación de péptidos sintéticos a través de la formación de lactamas y puentes disulfuro. Aplicación a diferentes modelos de interés biológico*. Vol. 12. 2008: RG. 1-12.
149. Mukherjee, P., Cinelli, M., Kang, S. and Silverman, R., *Development of nitric oxide synthase inhibitors for neurodegeneration and neuropathic pain*. Chem Soc Rev, 2014. 43(19): p. 6814-6838.
150. Kostrominova, T.Y., Reiner, David S., Haas, R., Ingermanson, R. and McDonough, P., *Automated methods for the analysis of skeletal muscle fiber size and metabolic type*, in *Int Rev Cell Molec Biol* 2013, Acad Press. p. 275-332.

# XI. APÉNDICE

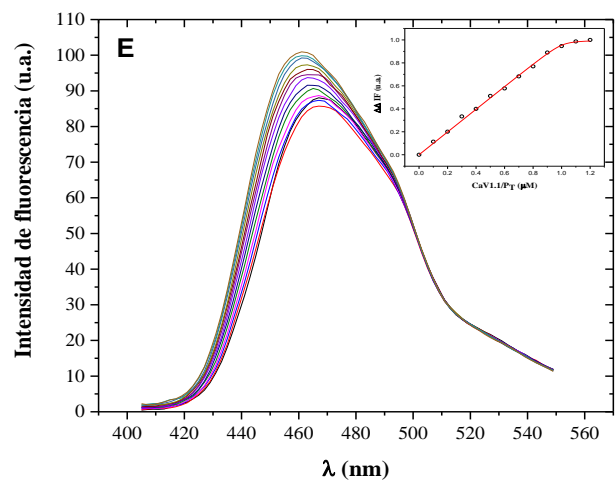
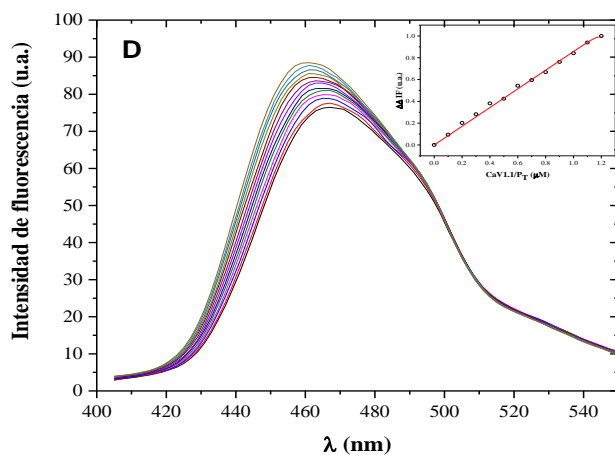
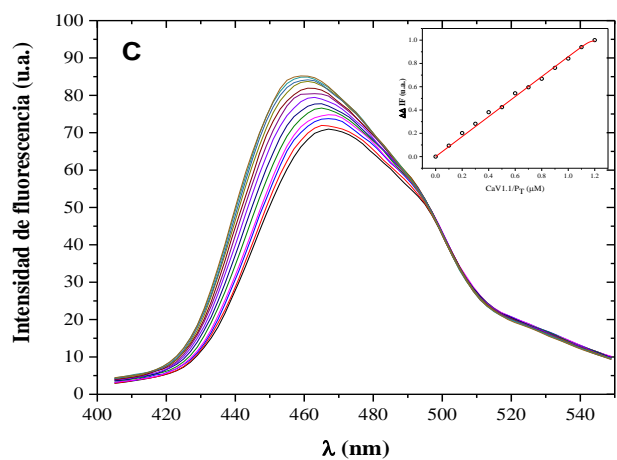
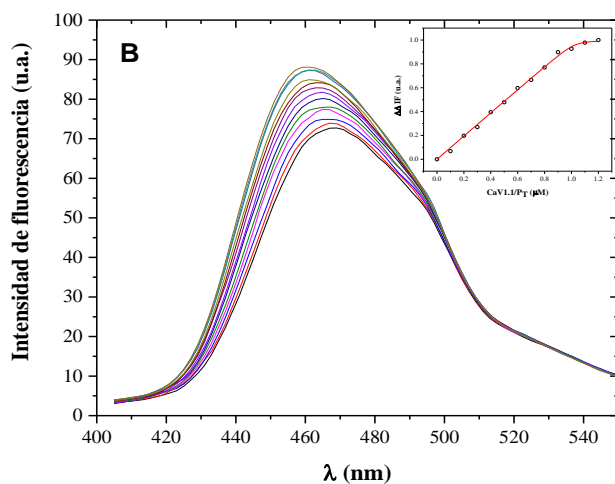
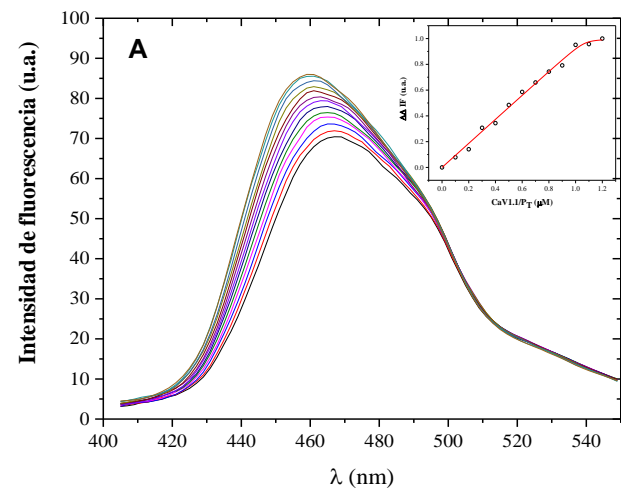
## Figuras A1-10



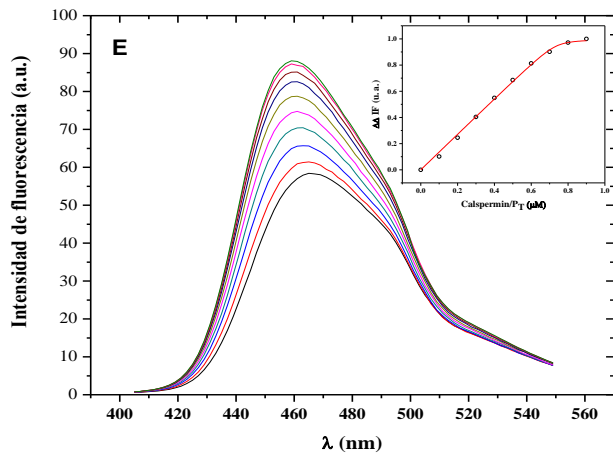
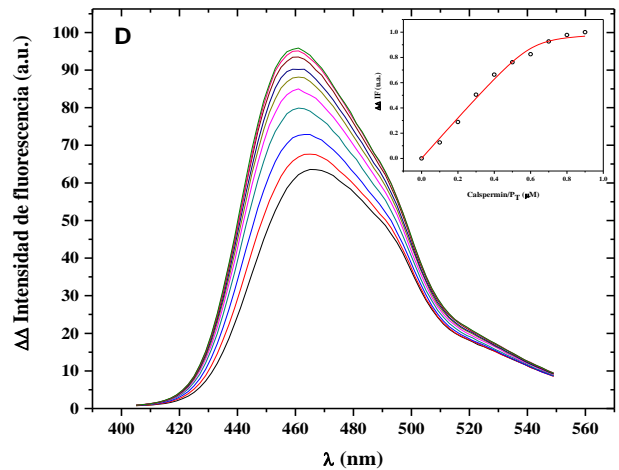
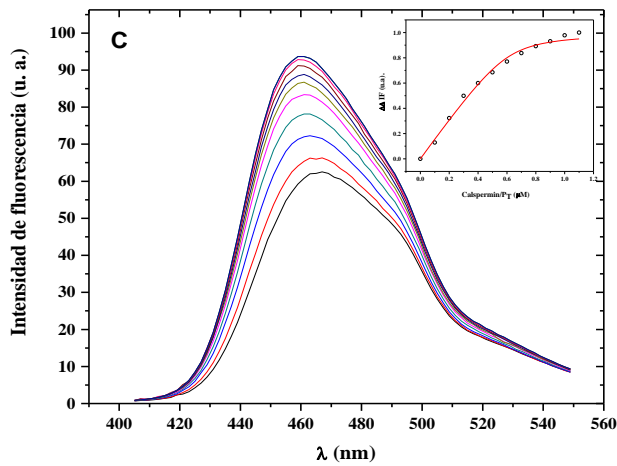
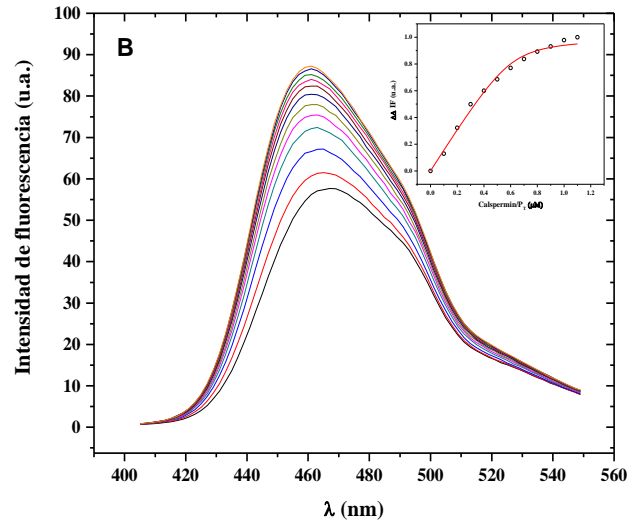
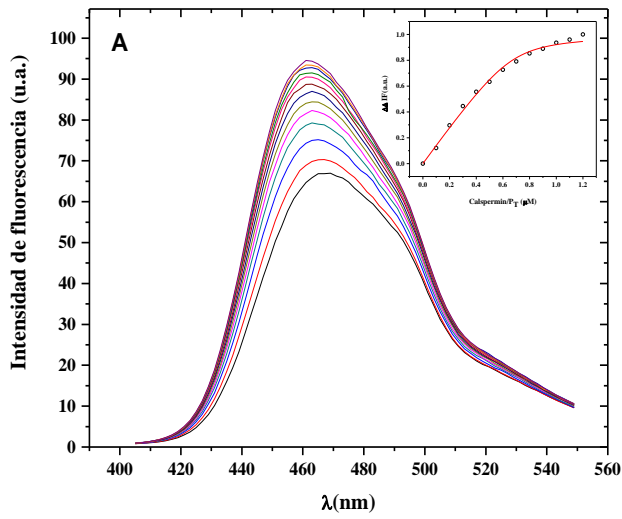
**Figura A1. Espectros de fluorescencia y titulación del péptido skMLCK con el biosensor *hCaM M124C-mBBr*.** (A) En ausencia de  $\text{CaCl}_2$ . (B) Adicionando  $3.75 \mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ . (C) Adicionando  $7.5 \mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$ . (D) Adicionando  $11.25 \mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$ . (E) Adicionando  $15 \mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$ . Los espectros de obtuvieron excitando al fluoróforo mBBr del biosensor fluorescente de la CaM a  $381 \text{ nm}$  y registrando un intervalo de emisión de  $405\text{-}550 \text{ nm}$ .



**Figura A2. Espectros de fluorescencia y titulación del péptido nNOS con el biosensor *hCaM M124C-mBBr*.** (A) En ausencia de  $\text{CaCl}_2$ . (B) Adicionando  $3.75 \mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ . (C) Adicionando  $7.5 \mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$ . (D) Adicionando  $11.25 \mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$ . (E) Adicionando  $15 \mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$ . Los espectros se obtuvieron excitando al fluoróforo mBBr del biosensor fluorescente de la CaM a  $381 \text{ nm}$  y registrando un intervalo de emisión de  $405\text{-}550 \text{ nm}$ .



**Figura A3. Espectros de fluorescencia y titulación del péptido Cav1.1 con el biosensor *hCaM M124C-mBBr*.** (A) En ausencia de  $\text{CaCl}_2$ . (B) Adicionando  $3.75 \mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ . (C) Adicionando  $7.5 \mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$ . (D) Adicionando  $11.25 \mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$ . (E) Adicionando  $15 \mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$ . Los espectros de obtuvieron excitando al fluoróforo mBBr del biosensor fluorescente de la CaM a  $381 \text{ nm}$  y registrando un intervalo de emisión de  $405\text{-}550 \text{ nm}$ .



**Figura A4. Espectros de fluorescencia y titulación del péptido Calspermin con el biosensor *hCaM-M124C-mBBr*.** (A) En ausencia de  $\text{CaCl}_2$ . (B) Adicionando  $3.75 \mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ . (C) Adicionando  $7.5 \mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$ . (D) Adicionando  $11.25 \mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$ . (E) Adicionando  $15 \mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$ . Los espectros de obtuvieron excitando al fluoróforo mBBr del biosensor fluorescente de la CaM a  $381 \text{ nm}$  y registrando un intervalo de emisión de  $405\text{-}550 \text{ nm}$ .

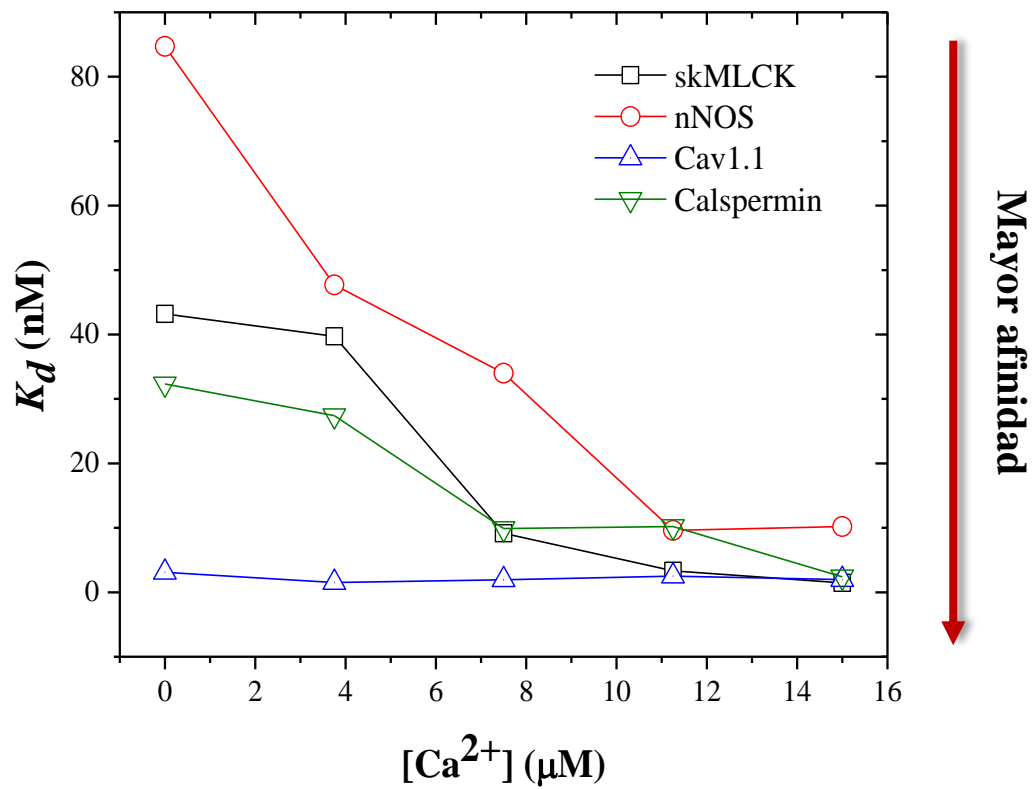
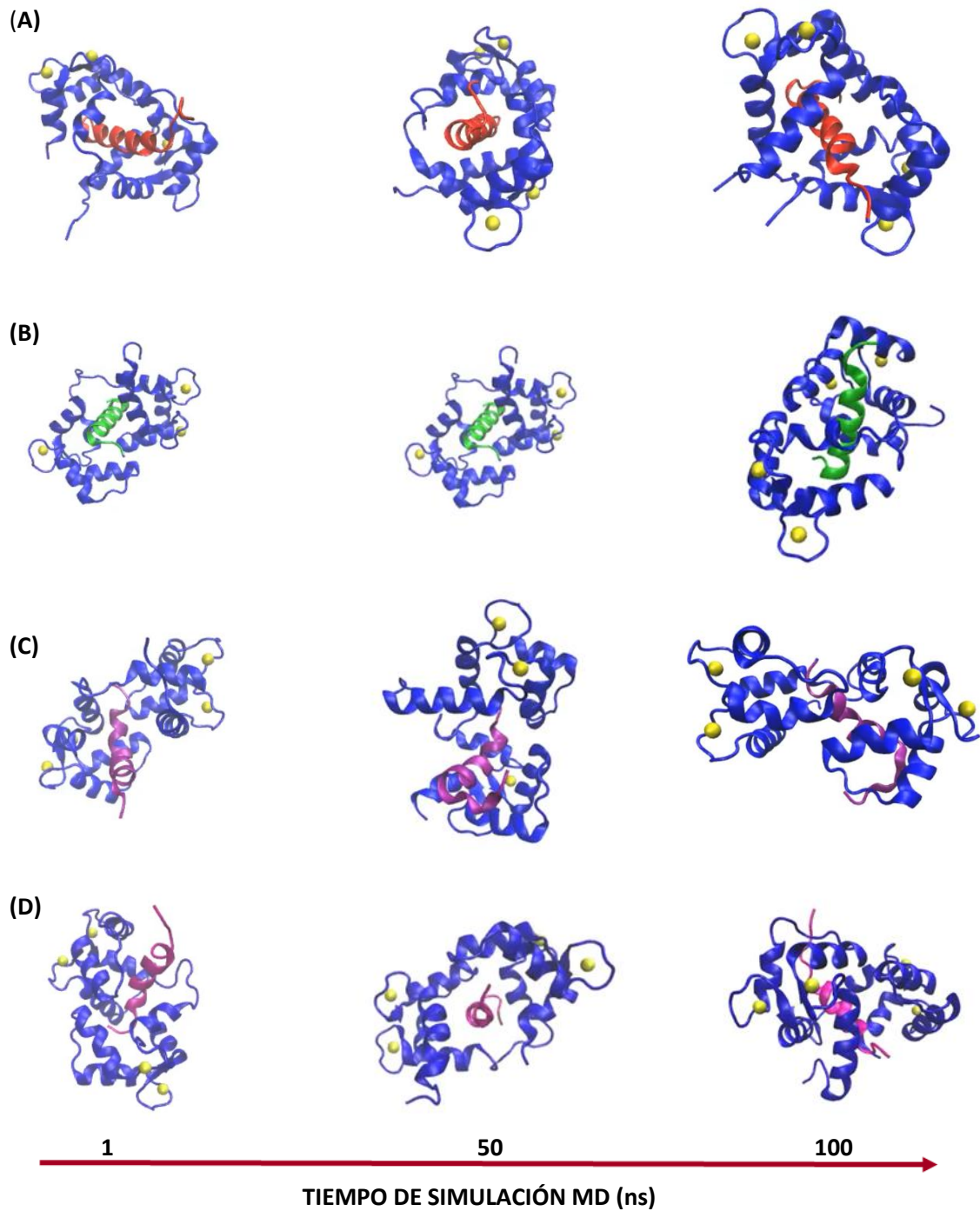
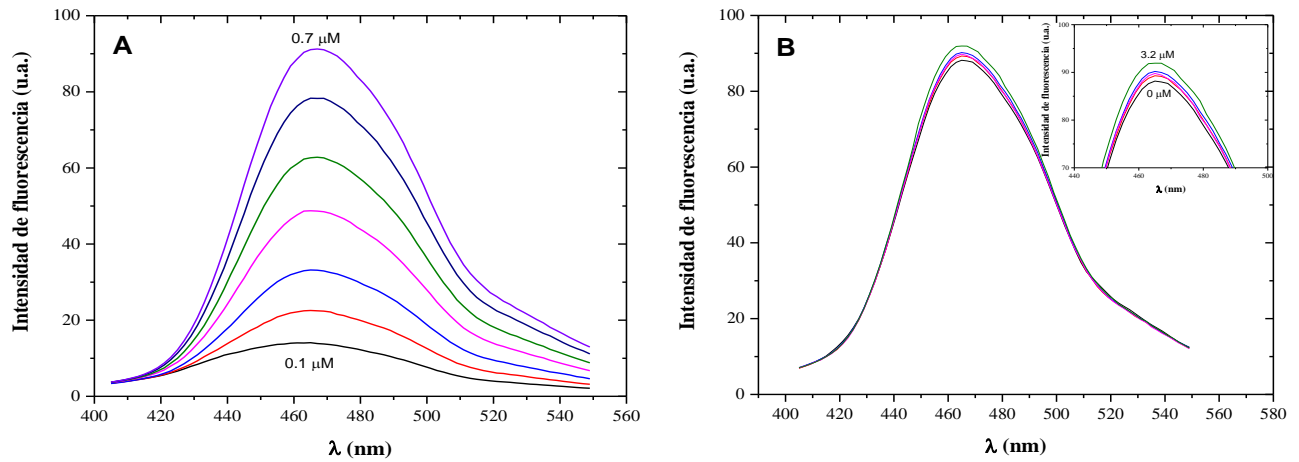


Figura A5. Constantes de disociación de los péptidos skMLCK, nNOS-1, Cav1.1 y Calspermin en función de la concentración de Ca<sup>2+</sup> en la titulación.

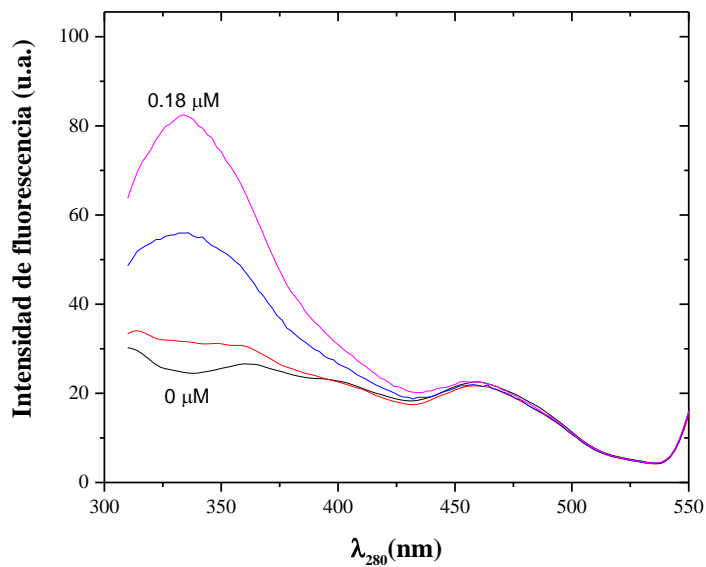


**Figura A6. Modelos estructurales de las simulaciones de MD de los complejos  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-péptidos.** La CaM está representada en color azul y los iones  $\text{Ca}^{2+}$  en color amarillo, (A) péptido skMLCK en color rojo, (B) péptido nNOS en color verde, (C) péptido Cav1.1 en color morado y (D) péptido calspermin en color rosa. Las imágenes fueron tomadas a 1, 50 y 100 ns de la simulación de MD.

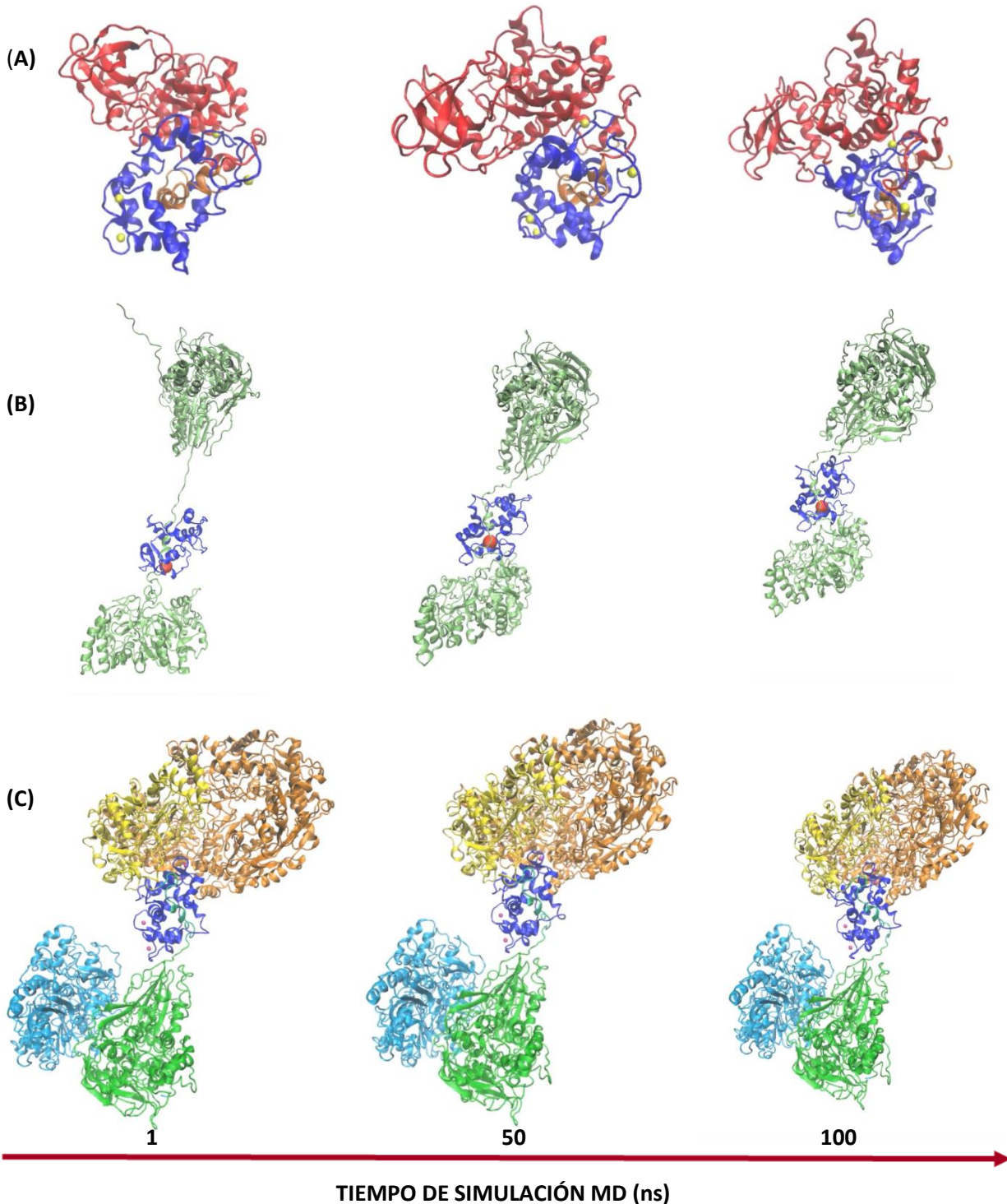




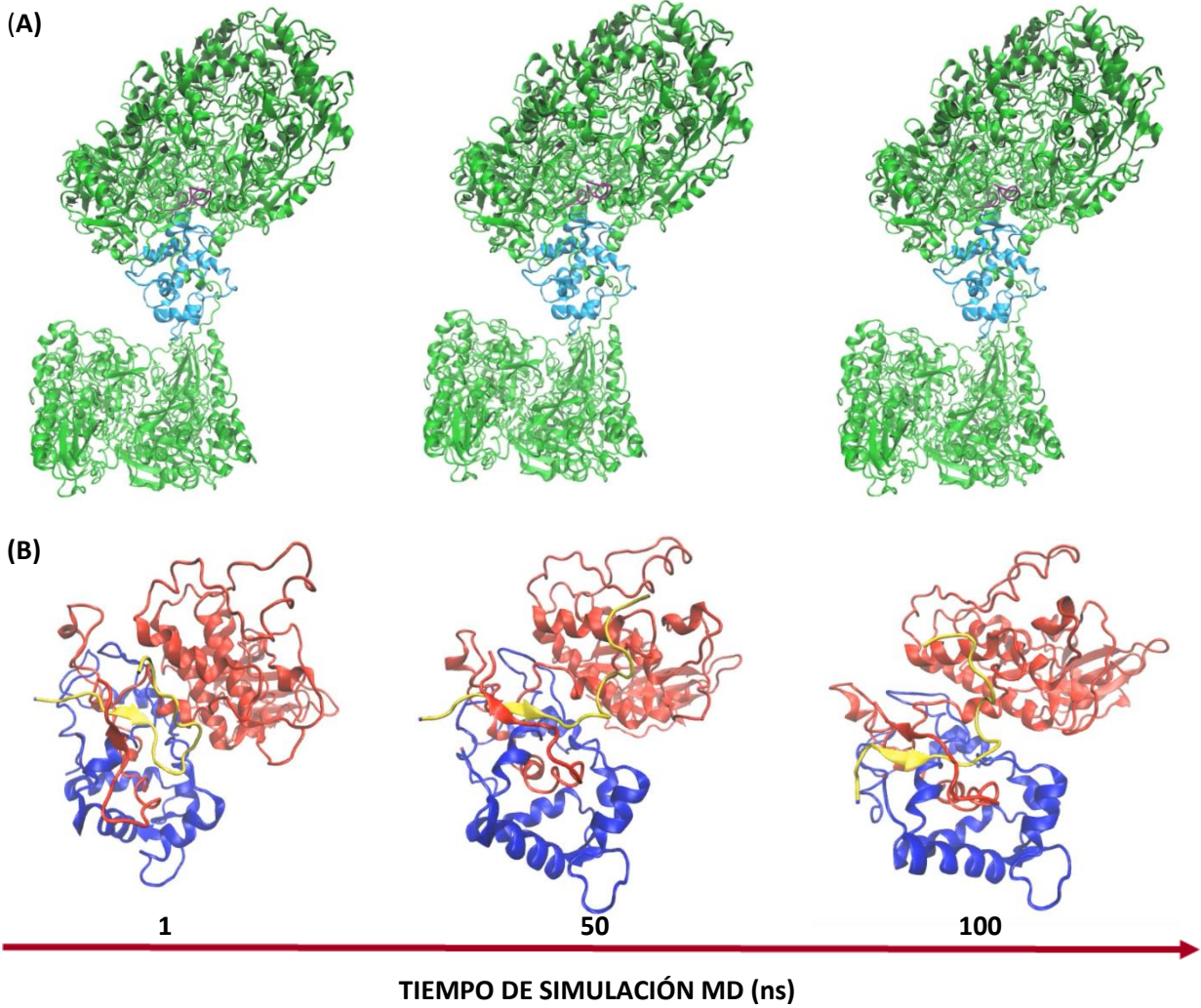
**Figura A7. Determinación de las condiciones experimentales para los ensayos de competencia.** (A) Espectros de fluorescencia del biosensor *hCaM-M124C-mBBr* a diferentes concentraciones y (B) Titulación de CaCl<sub>2</sub>. Los espectros fueron obtenidos a 381 nm y registrando un intervalo de emisión de 405-550 nm.



**Figura A8. Espectros de fluorescencia intrínseca de albúmina de suero bovino (BSA).** Los espectros de fluorescencia fueron obtenidos excitando a 280 nm y registrando un intervalo de emisión de 310-550 nm.



**Figura A9. Modelos estructurales de las simulaciones de MD de los complejos  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-proteínas.** (A) Complejo CaM-proteína skMLCK, la CaM está representada en color azul y los iones  $\text{Ca}^{2+}$  en color amarillo, la proteína skMLCK en color rojo y el dominio de unión a CaM en color naranja (B) complejo CaM-monómero nNOS, la CaM está representada en color azul y el monómero de nNOS en color verde y (C) complejo CaM-proteína nNOS, la CaM está representada en color azul y los iones  $\text{Ca}^{2+}$  en color rosa, dominios oxigenasa en color amarillo y naranja, los dominios reductasa en color verde y azul. Las imágenes fueron tomadas a 1, 50 y 100 ns de la simulación de MD.



**Figura A10. Modelos estructurales de las simulaciones de MD de los complejos CaM-proteínas-péptidos diseñados.** La CaM está representada en color azul, (A) proteína nNOS, en color verde y el péptido diseñado NOS-A en color morado. (B) proteína skMLCK, en color rojo y el péptido diseñado MLCK-A en color amarillo. Las imágenes fueron tomadas a 1, 50 y 100 ns de la simulación de MD.

## A. Modelos estructurales de los complejos CaM-péptidos

### I. Generación del complejo CaM-péptido.

1. En el Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>) buscar y descargar los archivos de coordenadas de los complejos CaM-péptidos (2o60.pdb, 2lv6.pdb, 2vay).

2. En una terminal de Ubuntu 16.04 LTS, una distribución del sistema operativo GNU/Linux disponible de manera gratuita, crear una carpeta nueva "CaM-pep-skMLCK" y guardar los archivos 2o60.pdb, 2lv6.pdb. Abrir pymol con la estructura 2o60.pdb, extraer la estructura de la CaM y guardar la estructura en formato pdb.

```
$ mkdir CaM-pep-skMLCK
$ cd CaM-pep-skMLCK
$ ls
2o60.pdb
2lv6.pdb
$ pymol 2o60.pdb
```

PYMOL:

Display → Sequence

→ Seleccionar 1-148 aa cadena A

→ Action → Duplicate object → File → Save Molecule: CaM-2o60.pdb

→ Seleccionar 1-20 aa cadena B

→ Action → Duplicate object → File → Save Molecule: peptido-nNOS.pdb

3. Alinear la CaM de la estructura 2o60.pdb a la CaM de la estructura 2lv6.pdb, extraer el péptido skMLCK y guardar la estructura en formato pdb.

```
$ pymol CaM-2o60.pdb y 2lv6.pdb
```

PYMOL:

Display → Sequence

→ Seleccionar 1-146 aa cadena A

→ Action → align → to molecule → CaM-2o60.pdb

→ Seleccionar 1-24 aa cadena B

→ Action → Duplicate object → File → Save Molecule: peptido-skMLCK.pdb

4. Editar el archivo CaM-2o60.pdb añadiendo las coordenadas del archivo peptido-skMLCK.pdb y asegurarse que las cadenas laterales del complejo no se sobrelapen.

```
$ gedit CaM-2o60.pdb peptido-skMLCK.pdb &
```

GEDIT:

→ Show → Stick → Archivo → guardar como → CaM-2o60-skMLCK.pdb

```
$ pymol CaM-2o60-skMLCK.pdb
```

PYMOL:  
Show → Sticks

5. Cuando las cadenas laterales de las estructuras se sobrelapan utilizar la aplicación Relax del programa Rosetta (editar el número de estructuras de flag\_input\_relax ) y elegir la estructura con menor energía de los modelos generados (Idealización). Abrir estructura idealizada en pymol, verificar que no existan los sobrelapamientos y eliminar H<sup>+</sup>.

```
$ gedit flag_input_relax
```

---

```
-nstruct 10

-relax:constrain_relax_to_start_coords
-relax:ramp_constraints false

-ex1
-ex2

-use_input_sc
-flip_HNQ
-no_optH false
```

---

```
$ relax.default.linuxgccrelease -s CaM-2o60-skMLCK.pdb @flag_input_relax
$ ls
CaM-2o60-skMLCK_0001.pdb CaM-2o60-skMLCK_0005.pdb CaM-2o60-skMLCK_0009.pdb
CaM-2o60-skMLCK_0002.pdb CaM-2o60-skMLCK_0006.pdb CaM-2o60-skMLCK.pdb
CaM-2o60-skMLCK_0003.pdb CaM-2o60-skMLCK_0007.pdb flag_input_relax
CaM-2o60-skMLCK_0004.pdb CaM-2o60-skMLCK_0008.pdb score.sc
```

```
→ LibreOffice Calc → Archivo → Abrir → score.sc
Total score (más negativo) → CaM-2o60-skMLCK_0002.pdb
$ mv CaM-2o60-skMLCK_0002.pdb CaM-péptido-skMLCK.pdb
$ pymol CaM-péptido-skMLCK.pdb
```

PYMOL:  
Show → Sticks  
Action → Hidrogens → Remove  
File → Save molecule → CaM-péptido-skMLCK.pdb

## II. Generación de archivos para dinámica molecular.

1. Crear carpeta para DM del complejo CaM-péptido y copiar archivos CaM-péptido-skMLCK.pdb, .bsub y .in

```
$ mkdir DM-CaM-pep-skMLCK
$ cd DM-CaM-pep-skMLCK
$ cp ../CaM-péptido-skMLCK.pdb DM-CaM-pep-skMLCK
$ cp ../../*.*.bsub ../../*.*.in DM-CaM-pep-skMLCK
```

```
$ ls
CaM-péptido-skMLCK.pdb
min-q_gpu.bsub
min.in
heat-q_gpu.bsub
heat.in
density-q_gpu.bsub
density.in
equil-q_gpu.bsub
equil.in
prod-q_gpu.bsub
prod.in
```

2. Generar archivos que sean leídos en la DM utilizando AMBER. Colocar los siguientes comandos (Terminal 1):

```
$ pdb4amber -i CaM-péptido-skMLCK.pdb -o CaM-skMLCK-amber.pdb
$ ls
CaM-péptido-skMLCK.pdb
CaM-skMLCK-amber.pdb
min-q_gpu.bsub
min.in
heat-q_gpu.bsub
heat.in
density-q_gpu.bsub
density.in
equil-q_gpu.bsub
```

3. Generar archivos CaM-amber.pdb (protein) y skMLCK-amber.pdb (péptido). Abrir archivo 2o60-2lv6-i.pdb con el procesador de texto (gedit). Seleccionar y copiar la sección del péptido, pegarla en otra ventana del procesador y guardar como skMLCK-amber.pdb, al archivo inicial guardar como CaM-amber.pdb (Revisar que al final de cada sección termine con TER,END).

```
$ gedit CaM-skMLCK-amber.pdb
GEDIT:
Editar → Guardar como → skMLCK-amber.pdb
Editar → Guardar como → CaM-amber.pdb
```

4. Crear los archivos de entrada con el programa tleap. Añadir tipo y carga de iones calcio al complejo (Terminal 2):

```
$ tleap
-----
-----
Welcome to leap! (Mensaje de bienvenida)
>source leaprc.ff99SB
>list
(ofrece una lista con todos los aa, aa modificados, agua y otras moléculas disponibles)
> complejo=loadpdb CaM-skMLCK-amber.pdb
```

```

> list (verificamos que este el descriptor complejo)
>set complejo 148.1 charge +2
>set complejo 149.1 charge +2
>set complejo 150.1 charge +2
>set complejo 151.1 charge +2
>set complejo 148.1 type C0
>set complejo 149.1 type C0
>set complejo 150.1 type C0
>set complejo 151.1 type C0
>check complejo
-----
-----
-----
Unit is Ok! (La adición de tipo y carga de los iones fue correcta)
>saveamberparm complejo CaM-skMLCK-amber.top CaM-skMLCK-amber.xyz

```

5. Terminal 1, observar que se encuentren los archivos de topología y coordenadas.

```

$ ls
CaM-péptido-skMLCK.pdb
CaM-skMLCK-amber.top
CaM-skMLCK-amber.xyz
CaM-skMLCK-amber.pdb
min-q_gpu.bsub
min.in
heat-q_gpu.bsub
heat.in
density-q_gpu.bsub
density.in
equil-q_gpu.bsub

```

6. Terminal 2, neutralizamos el complejo:

```

>charge complex
Total unperturbed charge:-11.00000
Total perturbed charge: -11.0000
>addions complejo Na+ 11
-----
-----
-----
Done adding ions
>charge complex
Total unperturbed charge:0.00000
Total perturbed charge: 0.0000

```

7. Terminal 2, solvamos el complejo:

```

>solvateoct complex TIP3PBOX 12
-----
-----
-----

```

Added 8739 residues

15. Guardamos los archivos de topología y coordenadas

```
>saveamberparm complejo CaM-skMLCK-wat.top CaM-skMLCK-wat.xyz
```

```
>savepdb complejo CaM-skMLCK-wat.pdb
```

8. Terminal 1, observar que se encuentren los archivos

```
$ ls
```

```
CaM-skMLCK-wat.top
```

```
CaM-skMLCK-wat.xyz
```

```
CaM-skMLCK-wat.pdb
```

9. Terminal 2, seguir los siguientes comandos para cargar a la proteína:

```
>proteina= loadpdb CaM-amber.pdb
```

```
>set complejo 148.1 charge +2
```

```
>set complejo 149.1 charge +2
```

```
>set complejo 150.1 charge +2
```

```
>set complejo 151.1 charge +2
```

```
>set complejo 148.1 type C0
```

```
>set complejo 149.1 type C0
```

```
>set complejo 150.1 type C0
```

```
>set complejo 151.1 type C0
```

```
>check protein
```

```
-----
```

```
-----
```

```
-----
```

```
Unit is Ok!
```

10. Guardamos archivos los archivos de topología y coordenadas

```
>saveamberparm proteina CaM.top CaM.xyz
```

11. Terminal 1, observar que se encuentren los archivos

```
$ ls
```

```
CaM.top
```

```
CaM.xyz
```

12. Terminal 2, seguir los siguientes pasos para cargar al péptido

```
>pept= loadpdb skMLCK-amber.pdb
```

```
>check pept
```

```
-----
```

```
-----
```

```
-----
```

```
Unit is Ok!
```



13. Guardamos archivos los archivos de topología y coordenadas. Observar que los archivos se encuentren en la carpeta.

Terminal 2:

```
>saveamberparm pept skMLCK.top skMLCK.xyz
```

```
>quit
```

Terminal 1:

```
$ls
```

```
CaM.top
```

```
CaM.xyz
```

```
skMLCK.top
```

```
skMLCK.xyz
```

```
CaM-skMLCK-wat.top
```

```
CaM-skMLCK-wat.xyz
```

```
CaM-skMLCK-wat.pdb
```

14. Edición de archivos .bsub y .in. Abrir archivos .bsub con procesador de texto, modificar cada uno de los archivos observando que el complejo solvatado "CaM-skMLCK-wat" sea escrito como se muestra más adelante.

```
$ gedit min-q_gpu.bsub
```

---

```
#BSUB -q q_gpu
```

```
#BSUB -n 3
```

```
#BSUB -o STD_PR-min.OUT
```

```
#BSUB -e STD_PR-min.ERR
```

```
date
```

```
pmemd.cuda -O -i min.in -o CaM-skMLCK-wat-min.out -p CaM-skMLCK-wat.top -c CaM-skMLCK-wat.xyz  
-r CaM-skMLCK-wat-min.rst -ref CaM-skMLCK-wat.xyz
```

```
date
```

---

```
$ gedit heat-q_gpu.bsub
```

---

```
#BSUB -q q_gpu
```

```
#BSUB -n 1
```

```
#BSUB -o STD_PR-heat.OUT
```

```
#BSUB -e STD_PR-heat.ERR
```

```
date
```

```
pmemd.cuda -O -i heat.in -o CaM-skMLCK-wat-heat.out -p CaM-skMLCK-wat.top -c CaM-skMLCK-wat-  
min.rst -r CaM-skMLCK-wat-heat.rst -x CaM-skMLCK-wat-heat.mdcrd -ref CaM-skMLCK-wat-min.rst
```

```
date
```

15. En terminal 1, editar el archivo "prod.in" siguiendo estos pasos. Editar y guardar archivo de forma que coincida con el ejemplo.

```
$ vi prod.in
```

---

```
prod (para 100ns)
&cntrl
imin=0,irest=1,ntx=5,
nstlim=50000000,dt=0.002,
ntc=2,ntf=2,
cut=8.0, ntb=2, ntp=1, taup=2.0,
ntpr=5000, ntwx=5000,
ntt=3, gamma_ln=2.0,
temp0=298.15,
/
```

---

→ escribir "i" → modificar texto → oprimir tecla esc → escribir ":wq"

16. Regresar a carpeta CaM-pep-skMLCK y comprimir carpeta DM-CaM-pep-skMLCK para trasladarla a Súper Computo Miztli-UNAM donde se llevará a cabo la dinámica molecular.

```
CaM-pep-skMLCK$ tar czvf DM-CaM-pep-skMLCK.tar.gz DM-CaM-pep-skMLCK
CaM-pep-skMLCK$ scp DM-CaM-pep-skMLCK.tar.gz mga@132.247.177.99:/tmpu/mgs_g/mga/erika
```

### III. Simulación de la Dinámica Molecular

1. En terminal 2, seguir los siguientes pasos para acceder al Tunel VPN.

Tunel VPN

```
$ sudo openvpn --config client.ovpn
user: mga
password: *****
```

```
-----
-----
SECUENCE COMPLETED
```

2. En otra terminal (3) seguir los siguientes pasos para acceder a Super Computo. Revisar archivo comprimido dinamica.tar.gz y descomprimirlo.

```
equipo de supercomputo
$ ssh mga@132.247.177.99
user: mga
password: *****
```

```
[mga@mn328 erika]$ls
DM-CaM-pep-skMLCK.tar.gz
```

```
$ tar zxvf DM-CaM-pep-skMLCK.tar.gz
```

```
$ ls
DM-CaM-pep-skMLCK.tar.gz
DM-CaM-pep-skMLCK
$ rm DM-CaM-pep-skMLCK.tar.gz
```

3. Cargar los módulos amber 14 y cuda para comenzar las simulaciones de las dinámicas moleculares.

```
[mga@mn328 erika]$ module load amber-14
```

```
[mga@mn328 erika]$ module load cuda
```

```
[mga@mn328 erika] module list
```

Currently Loaded Modulefiles:

```
1) intel/2015.1.133   3) amber/14
2) mpi/intel-5.0.2p-044 4) cuda/6.5
```

4. Ingresar a la carpeta "DM-CaM-pep-skMLCK" y ver archivos.

```
[mga@mn328 erika]$ cd DM-CaM-pep-skMLCK
[mga@mn328 DM-CaM-pep-skMLCK]$ ls
```

5. Cargar archivos bsub en el siguiente orden: 1. Minimización, 2. Calentamiento, 3. Densidad, 4. Equilibrio y 5. Producción. Se genera un número de trabajo, el cual se debe identificar. Una vez que termina la simulación correspondiente, se generan diversos archivos respecto al proceso realizado. Por ejemplo, al término de la minimización se generan 4 archivos (.out, .rst, .ERR y .OUT), revisando el archivo STD\_PR-min.ERR para asegurarse que el proceso se llevó a cabo exitosamente, si es así no se muestra nada. Se prosigue con el siguiente archivo hasta terminar.

```
$ bsub < min-q_gpu.bsub
766740
```

```
$ ls
CaM-skMLCK-wat-min.out
CaM-skMLCK-wat-min.rst
mdinfo
STD_PR-min.ERR
STD_PR-min.OUT
```

```
$ more STD_PR-min.ERR
```

```
$
```

```
$ bsub < heat-q_gpu.bsub
766741
```

```
$ ls
STD_PR-heat.OUT
```

```
STD_PR-heat.ERR
CaM-skMLCK-wat-heat.mdcrd
CaM-skMLCK-wat-heat.out
```

```
$ls
```

```
2o60-2lv6.pdb          CaM-skMLCK-wat-prod.mdcrd  min-q_gpu.bsub
CaM-skMLCK-amber_nonprot.pdb CaM-skMLCK-wat-prod.out    mmpbsa_gb_nmode.in
CaM-skMLCK-amber.pdb    CaM-skMLCK-wat-prod.rst    nnos-amber.pdb
CaM-skMLCK-amber_renum.txt CaM-skMLCK-wat.top         skMLCK-amber.top
CaM-amber.pdb           CaM-skMLCK-wat.xyz         skMLCK-amber.xyz
CaM-skMLCK.top          CaM-skMLCK.xyz             prod.in
CaM-skMLCK-wat-density.mdcrd CaM-amber.top              prod-q_gpu.bsub
CaM-skMLCK-wat-density.out CaM-amber.xyz              STD_PR-density.ERR
CaM-skMLCK-wat-density.rst density.in                  STD_PR-density.OUT
CaM-skMLCK-wat-equil.mdcrd density-q_gpu.bsub         STD_PR-equil.ERR
CaM-skMLCK-wat-equil.out  equil.in                   STD_PR-equil.OUT
CaM-skMLCK-wat-equil.rst  equil-q_gpu.bsub          STD_PR-heat.ERR
CaM-skMLCK-wat-heat.mdcrd heat.in                     STD_PR-heat.OUT
CaM-skMLCK-wat-heat.out   heat-q_gpu.bsub            STD_PR-min.ERR
CaM-skMLCK-wat-heat.rst   leap.log                   STD_PR-min.OUT
CaM-skMLCK-wat-min.out    mdinfo                     STD_PR-prod.ERR
CaM-skMLCK-wat-min.rst    min.in                     STD_PR-prod.OUT
```

#### IV. Evaluación de la energía del sistema

1. Evaluar la energía del sistema durante la simulación de dinámica molecular. Crear una carpeta denominada “Energía” dentro de la carpeta DM-CaM-pep-skMLCK, donde se encuentre el archivo process\_mdout.perl y escribir los siguientes comandos:

```
$ mkdir Energia
$ cd Energia
$ perl process_mdout.perl ../1CaM-skMLCK-min.out
$ ls
$ xmgrace CaM-skMLCK.ETOT
```

#### V. Análisis de la simulación de Dinámica Molecular

1. Abrir otra terminal en Super Computo y en la carpeta DM-CaM-pep-skMLCK generar una carpeta llamada Analisis. Añadir archivos mmpbsa y mmpbs a esta carpeta. Editar el archivo .bsub como se muestra en el ejemplo. Cargar los módulos amber 14 y cuda para comenzar el análisis.

```
[mga@mn328 DM-CaM-pep-skMLCK]$ mkdir Analisis
```

```
[mga@mn328 DM-CaM-pep-skMLCK]$ cd Analisis
```

```
[mga@mn328 DM-CaM-pep-skMLCK]$ scp mga@132.247.177.99:---ruta---/mmpbsa_gb_nmode.in .
```

```
[mga@mn328 Analisis]$ scp mga@132.247.177.99:---ruta---/mmpbsa_q_4p.bsub .
```

```
$ ls
mmpbsa_gb_nmode.in
```

```
mmpbs_q_4p.bsub
```

```
$ vi mmpbsa_q_4p.bsub
```

---

```
#BSUB -q q_hpc  
#BSUB -n 8  
#BSUB -o STD_PR-MMPBSA.OUT  
#BSUB -e STD_PR-MMPBSA.ERR
```

```
date
```

```
mpirun -np 8 MMPBSA.py.MPI -O -i mmpbsa_gb_nmode.in -o RESULTADOS-CaM-skMLCK-wat-100ns.dat  
-sp ../CaM-skMLCKwat.top -cp ../CaM-skMLCK-wat.top -rp ../CaM-amber.top -lp ../skMLCK-amber.top -y  
../CaM-skMLCK-wat-prod.mdcrd > progress.cat
```

```
date
```

```
~  
~  
~  
~  
~  
~
```

---

```
[mga@mn328 analisis]$ module load amber/14
```

```
[mga@mn328 analisis]$ module load cuda
```

```
[mga@mn328 analisis]$ bsub < mmpbsa_q_4p.bsub
```

```
47040
```

2. Revisar el progreso del trabajo y al termino analizar los resultados de cada parámetro termodinámico (DS, DH, DG). Regresar a la carpeta de inicio (../erika\$), comprimir DM-CaM-pep-skMLCK y copiar a los documentos del sistema operativo Ubuntu.

```
[mga@mn328 analisis]$ tail -f progress.cat
```

```
[mga@mn328 analisis]$ more RESULTADOS-CaM-skMLCK-100ns.dat
```

Ejemplo:

ENTROPY RESULTS (HARMONIC APPROXIMATION) CALCULATED WITH NMODE:

Complex:

Entropy Term	Average	Std. Dev.	Std. Err. of Mean
Translational	16.4931	0.0000	0.0000
Rotational	16.7566	0.0084	0.0027
Vibrational	1894.5997	8.7081	2.7537
Total	1927.8495	8.7066	2.7533

Receptor:

Entropy Term	Average	Std. Dev.	Std. Err. of Mean
Translational	16.3869	0.0000	0.0000
Rotational	16.6976	0.0328	0.0104
Vibrational	1708.9471	6.3290	2.0014
Total	1742.0317	6.3318	2.0023

Ligand:

Entropy Term	Average	Std. Dev.	Std. Err. of Mean
Translational	14.5548	0.0000	0.0000
Rotational	13.6838	0.0223	0.0071
Vibrational	222.3788	3.2464	1.0266
Total	250.6175	3.2629	1.0318

Differences (Complex - Receptor - Ligand):

Entropy Term	Average	Std. Dev.	Std. Err. of Mean
Translational	-14.4486	0.0000	0.0000
Rotational	-13.6248	0.0286	0.0091
Vibrational	-36.7262	7.0324	2.2238
DELTA S total=	-64.7997	7.0412	2.2266

GENERALIZED BORN:

Complex:

Energy Component	Average	Std. Dev.	Std. Err. of Mean
VDWAALS	-1191.3560	21.1782	0.2118
EEL	-13714.6628	110.9237	1.1092
EGB	-4023.7996	95.5062	0.9551
ESURF	70.3497	2.4720	0.0247
G gas	-14906.0188	114.1605	1.1416
G solv	-3953.4499	94.4261	0.9443
TOTAL	-18859.4687	49.6188	0.4962

Receptor:

Energy Component	Average	Std. Dev.	Std. Err. of Mean
VDWAALS	-959.8291	19.1692	0.1917
EEL	-10909.9068	113.5655	1.1357
EGB	-4876.3900	103.6859	1.0369
ESURF	76.5333	1.9733	0.0197
G gas	-11869.7359	114.6313	1.1463
G solv	-4799.8567	103.0559	1.0306
TOTAL	-16669.5926	48.7218	0.4872

Ligand:

Energy Component	Average	Std. Dev.	Std. Err. of Mean
VDWAALS	-96.0543	4.5475	0.0455
EEL	-1467.7879	49.7575	0.4976
EGB	-550.1852	45.9901	0.4599
ESURF	14.2555	0.4744	0.0047
G gas	-1563.8421	49.9999	0.5000
G solv	-535.9297	45.6734	0.4567
TOTAL	-2099.7718	10.2703	0.1027

Differences (Complex - Receptor - Ligand):

Energy Component	Average	Std. Dev.	Std. Err. of Mean
VDWAALS	-135.4727	7.4755	0.0748
EEL	-1336.9681	92.4938	0.9249
EGB	1402.7756	87.4918	0.8749
ESURF	-20.4392	1.0348	0.0103
DELTA G gas	-1472.4407	92.8834	0.9288
DELTA G solv	1382.3364	87.0284	0.8703
DELTA TOTAL	-90.1043	9.9799	0.0998

Using Normal Mode Entropy Approximation: DELTA G binding = -25.3046 +/- 12.2  
138

```
Analisis$ cd ..
Analisis$ cd ..
Analisis$ tar czvf DM-CaM-pep-skMLCK.tar.gz DM-CaM-pep-skMLCK
```

En terminal 1 (Ubuntu):

```
$ scp mga@132.247.177.99:/tmpu/mga_g/mga/erika/DM-CaM-pep-skMLCK.tar.gz .
$ tar zxvf DM-CaM-pep-skMLCK.tar.gz
$ ls
DM-CaM-pep-skMLCK
DM-CaM-pep-skMLCK.tar.gz
$ rm DM-CaM-pep-skMLCK.tar.gz
```

## VI. Visualización de la simulación de Dinámica Molecular

1. Ingresar a la carpeta DM-CaM-pep-skMLCK en el sistema operativo Ubuntu, abrir el programa VMD y seguir los pasos como se muestra a continuación.

```
$ cd DM-CaM-pep-skMLCK
$ vmd
```

En ventana de VMD:

File → New molecule → Browse → CaM-skMLCK-wat.top  
Determine file type → AMBER7 PARM → Load

→ Browse → CaM-skMLCK-wat-prod.mdcrd  
Determine file type → AMBER coordinates with periodic box → Load

En ventana de VMD main/Graphical representations:

Graphics → Representations → Drawing method → New Cartoon  
Selec atoms Protein

Cuando termina el número de fragmentos (10000) modificar el fondo de la figura.

En ventana color controls

Categories: Display    Names: Background    Colors: 8 white

En ventana Graphical representations

Create Rep  
Selections  
Keyboards → resname Value → CA  
Apply  
DRaw style  
Colorin method  
ColorID → 4  
Drawing method → Beads

Create Rep  
Selections



Keyboards → residue  
Selec atoms Residue 153 to 172  
Apply  
DRaw style  
Colorin method  
ColorID → 7  
Drawing method → New Cartoon

2. En ventana de VMD main:

→ Extensions → Tk console

Main console display active (Tcl8.5.6 / Tk8.5.6)

(DM-CaM-pep-skMLCK) 1 % ls

(DM-CaM-pep-skMLCK) 2 % source scan4feature.tcl

(DM-CaM-pep-skMLCK) 3 % scanDtraj {matrix-CaM-skMLCK.dat } {protein and (same residue as (within 4.0 of (resname CA)))} {protein} {residue} {top}

protein and (same residue as (within 4.0 of (resname CA))); protein; residue; top  
see \$frmhits(\$framenummer) for atoms, residues or molecules  
fulfilling the condition at each frame  
see \$lstglb for a list of those fullfilling the condition at at least one frame  
\$hitsatas(\$attribute,\$frame\_number) holds the matrix data produced  
10000 frames processed for 40 residue records

3. Observar que el archivo matrix-CaM-skMLCK.dat se encuentre presente en la carpeta DM-CaM-pep-skMLCK

\$ ls

\$ gedit matrix-cam-nnos.dat

4. Calcular el RMSD. Editar archivo backbone\_rms.in como el ejemplo coincidiendo con los archivos de la carpeta y verificar gráfico con el programa xmgrace.

\$ gedit backbone\_rms.in

---

trajin CaM-skMLCK-wat-prod.mdcrd  
reference CaM-skMLCK-wat-equil.rst  
rms reference out CaM-skMLCK-wat-backbone.rms @C,CA,N

---

\$ cpptraj ../CaM-skMLCK-wat.top -i backbone\_rms.in

\$ xmgrace CaM-skMLCK-wat-backbone.rms

## B. Formación de modelos estructurales de los complejos CaM-proteínas

### Complejo CaM-prot-nNOS

**1.** Buscar la secuencia de aminoácidos correspondiente a la proteína nNOS en NCBI protein y descargar en formato FASTA.

NCBI → Protein

>NP\_000611.1 nitric oxide synthase, brain isoform 1 [Homo sapiens]

**2.** Con base a la secuencia de la proteína buscar las estructuras con mayor cobertura e identidad para la proteína nNOS en BLAST PROTEIN.

BLAST PROTEIN → inserción de secuencia en formato FASTA → Database → Protein Data Bank proteins (pdb) → blast

**3.** Crear una carpeta llamada “CaM-nNOS-prot” y descargar los archivos pdb de las estructuras elegidas para la proteína nNOS y el dominio de unión a CaM del Protein Data Bank.

```
$ mkdir CaM-nNOS-prot
```

```
$ cd CaM-nNOS-prot
```

```
$ ls
```

```
1tll.pdb (dominio reductasa)
```

```
4d1n.pdb (dominio oxidasa)
```

```
2o60.pdb (dominio de unión a CaM y proteína CaM)
```

**4.** Generar un archivo FASTA de las estructuras y con la secuencia original de la proteína nNOS alinearlas en el servidor COBALT Multiple Alignment Tool. Descargar el archivo y guardarlo como “nNOS-alignment.fa”. Observar que existe una región de aminoácidos anterior al dominio de unión de la CaM que no es cubierta por la estructura del dominio oxigenasa (4d1n.pdb) que se modelará *ab initio* (Robetta) utilizando el archivo obtenido.

Terminal 1:

```
$ pdb2fasta *.pdb
```

```
$ ls
```

```
1tll.pdb (dominio reductasa)
```

```
4d1n.pdb (dominio oxidasa)
```

```
2o60.pdb (dominio de unión a CaM y proteína CaM)
```

```
FASTA_sequences.fasta
```

```
$ gedit FASTA_sequences.fasta
```

COBALT Multiple Alignment Tool → inserción de secuencias en formato FASTA → Align

Download → Fasta plus gap → EDZRHPE212-alignment.fa

Robetta → Fragment Libraries

Paste Fasta :

> nNOS

YQPDPWNTHVWKGKTNGTPTKRRAIGFK

→ Submit

5. Crear una carpeta llamada “Frag-nNOS”, descargar los fragmentos creados y elegir el modelo con mejor score. Alinear nuevamente en COBALT las secuencias de las estructuras, incluida el modelo de la región de aminoácidos construida *ab initio* y descargar

Terminal 1:

```
$ mkdir Frag-nNOS
```

```
$ cd Frag-nNOS
```

```
$ ls
```

```
F_00000001.pdb
```

```
...
```

```
F_00000050.pdb
```

```
score.fsc
```

LibreOffice Calc → score.fsc

```
$ cd ..
```

```
CaM-nNOS-prot$ ls
```

```
F_00000001.pdb (modelo de residuos faltantes)
```

```
1tll.pdb (dominio reductasa)
```

```
4d1n.pdb (dominio oxidasa)
```

```
2o60.pdb (dominio de unión a CaM y proteína CaM)
```

```
$ mv F_00000001.pdb F_nNOS.pdb
```

```
$ pdb2fasta *.pdb
```

COBALT Multiple Alignment Tool → inserción de secuencias en formato FASTA → Align

Download → Fasta plus gap → FDZRHPE212-alignment.fa

Terminal 1:

```
$ mv EDZRHPE212-alignment.fa nNOS-alignment.fa
```

```
$ ls
```

```
F_nNOS.pdb (modelo de residuos faltantes)
```

```
1tll.pdb (dominio reductasa)
```

```
4d1n.pdb (dominio oxidasa)
```

```
2o60.pdb (dominio de unión a CaM y proteína CaM)
```

```
FASTA_sequences.fasta
```

```
nNOS-alignment.fa
```

6. Modelado por homología. Añadir y editar los archivos align-multiple.ali y model-multiple.py.





8. Elegir el modelo del monómero con mejor score y renombrarlo como mon-nNOS.pdb, para construir la estructura completa de la proteína nNOS.

```
$ cat resultados.log
→ mejor modelo
$ mkdir mono-nNOS
$ cp nNOS-300.B99990001.pdb mon-nNOS
$ cd mono-nNOS
$ ls
nNOS-300.B99990001.pdb
$ mv nNOS-300.B99990001.pdb mon-nNOS.pdb
```

9. Alinear la proteína CaM a su dominio de unión en la proteína nNOS y guardar las coordenadas en el archivo NOS-300.B99990001.pdb y renombrarlo como “CaM-mon-nNOS.pdb”.

```
$ mv nNOS-300.B99990001.pdb mon-nNOS.pdb
$ ls
mon-nNOS.pdb
2o60.pdb
$ pymol *.pdb
```

PYMOL:

Display → Sequence

→ Seleccionar cadena B (péptido nNOS) de 2o60.pdb

→ Action → align → to molecule → CaM-mon-nNOS.pdb

→ Seleccionar 1-148 aa cadena A

→ Action → Duplicate object → File → Save Molecule: CaM.pdb

```
$ gedit CaM.pdb CaM-mon-nNOS.pdb &
```

GEDIT:

archivo → guardar como → CaM-mon-nNOS.pdb

```
$ pymol CaM-mon-nNOS.pdb
```

### Preparación de archivos de coordenadas

1. Crear carpeta para DM del complejo CaM- monómero-nNOS y copiar modelo CaM-mon-nNOS.pdb a la carpeta. Generar los archivos que serán leídos en la DM utilizando AMBER, creando los archivos de entrada con el programa tleap. Añadir tipo y carga de iones calcio al complejo. Colocar los siguientes comandos:

(Terminal 1):

```
$ mkdir DM-CaM-mon-nNOS
```

```
$ cp CaM-mon-nNOS.pdb DM-CaM-mon-nNOS
```

```
$ cd DM-CaM-mon-nNOS
```

```
$ pdb4amber -i CaM-mon-nNOS.pdb -o CaM-mon-nNOS-amber.pdb
```

(Terminal 2):

```
$ tleap
```

```
-----  
-----
```

```
Welcome to leap! (Mensaje de bienvenida)
```

```
>source leaprc.ff99SB
```

```
> complejo=loadpdb CaM-mon-nNOS-amber.pdb
```

```
set complejo 148.1 charge +2
```

```
>set complejo 149.1 charge +2
```

```
>set complejo 150.1 charge +2
```

```
>set complejo 151.1 charge +2
```

```
>set complejo 148.1 type C0
```

```
>set complejo 149.1 type C0
```

```
>set complejo 150.1 type C0
```

```
>set complejo 151.1 type C0
```

```
>check complejo
```

```
-----  
-----  
-----
```

```
Unit is Ok! (La adición de tipo y carga de los iones fue correcta)
```

```
>saveamberparm complejo CaM-mon-nNOS-amber.top CaM-mon-nNOS-amber.xyz
```

```
Terminal 1:
```

```
$ ls
```

```
CaM-mon-nNOS.pdb
```

```
CaM-mon-nNOS-amber.pdb
```

```
CaM-mon-nNOS-amber.top
```

```
CaM-mon-nNOS-amber.xyz
```

```
min-vac.in
```

```
md-vac.in
```

3. Editar los archivos de entrada de la simulación de Dinámica Molecular como se muestra en el ejemplo. Ingresar a la computadora Barracuda y trasladar la carpeta comprimida DM-CaM-mon-nNOS que contine los archivos de entrada y de coordenadas para la DM.

```
$ ls
```

```
min-vac.in
```

```
md-vac.in
```

```
$ gedit min-vac.in
```

```
polyA-polyT 10-mer: initial minimisation prior to MD
```

```
&cntrl
```

```
imin = 1,
```

```
maxcyc = 5000,
```

```
ncyc = 250,  
ntb = 0,  
igb = 0,  
cut = 12  
/
```

```
$ gedit min-vac.in
```

```
10-mer DNA MD in-vacuo, 12 angstrom cut off  
&cntrl  
imin = 0, ntb = 0,  
igb = 0, ntp = 5000, ntwx = 5000,  
ntt = 3, gamma_ln = 1.0,  
tempi = 300.0, temp0 = 300.0,  
nstlim = 25000000 dt=0.002,  
cut = 12.0  
/
```

```
$ ssh erika@132.148.131.98  
password: *****
```

```
$ ls  
min-vac.in  
md-vac.in  
CaM-mon-nNOS.pdb  
DM-CaM-mon-nNOS.pdb  
CaM-mon-nNOS-amber.top  
CaM-mon-nNOS-amber.xyz
```

### **Simulación de Dinámica Molecular del complejo CaM-monómero-nNOS**

1. Cargar el módulo Amber para iniciar las simulaciones de dinámica molecular. Realizar una minimización y posteriormente el proceso de DM.

```
[erika@barracuda DM-CaM-mon-nNOS]$ module load amber/amber14
```

```
$ mpirun -n 5 sander.MPI -O -i min-vac.in -o DM-CaM-mon-nNOS-min.out -p DM-CaM-mon-nNOS.top -c DM-CaM-mon-nNOS.xyz -r DM-CaM-mon-nNOS-min.rst & 2>&1
```

```
$ls  
min-vac.in  
md-vac.in  
CaM-mon-nNOS.pdb  
DM-CaM-mon-nNOS.pdb  
CaM-mon-nNOS-amber.top
```



```

CaM-mon-nNOS-amber.xyz
nNOS-CaM-amber-min.out
nNOS-CaM-amber-min.rst
$ mpirun -n 8 sander.MPI -O -i md-vac.in -o DM-CaM-mon-nNOS-md.out -p DM-CaM-mon-
nNOS.top -c DM-CaM-mon-nNOS.rst -r DM-CaM-mon-nNOS-md.rst -x nNOS-CaM-amber-
md.mdcrd & 2>&1
$ls
min-vac.in
md-vac.in
CaM-mon-nNOS.pdb
DM-CaM-mon-nNOS.pdb
CaM-mon-nNOS-amber.top
CaM-mon-nNOS-amber.xyz
nNOS-CaM-amber-min.out
nNOS-CaM-amber-min.rst

```

### **Evaluación de la energía del sistema**

1. Evaluar la energía del sistema durante la simulación de Dinámica molecular. Crear una carpeta llamada “Energía” que contenga el archivo process\_mdout.perl y escribir los siguientes comandos:

```

$ mkdir Energia
$ cd Energia
$ perl process_mdout.perl ../DM-CaM-mon-nNOS-md.out
$ ls
$ xmgrace DM-CaM-mon-nNOS.ETOT

```

### **Análisis de la Simulación de la Dinámica Molecular**

1. Calcular el RMSD. Crear una carpeta denominada “Análisis” que contenga el archivo cal\_rms.in y editarlo como el ejemplo, coincidiendo con los archivos de la carpeta. Observar gráfico con el programa xmgrace.

```

$ mkdir Analisis
$ cd Analisis
$ls
cal_rms.in
$ gedit cal_rms.in

```

---

```

trajin ../nNOS-CaM-amber-md.mdcrd
rms first mass out DM-CaM-mon-nNOS-md.rms time 0.1

```

---

```
$ cpptraj -p ../CaM-mon-nNOS-amber.top -i cal_rms.in
$ xmgrace DM-CaM-mon-nNOS-md.rms
```

### Visualización de la trayectoria

1. Abrir VMD en la carpeta DM-CaM-mon-nNOS, para observar la trayectoria de Dinámica Molecular del monómero de la nNOS unido a la CaM.

```
$ vmd
```

VMD:

```
File → New molecule → Browse → CaM-mon-nNOS-amber.top
Determine file type → AMBER7 PARM → Load
→ Browse → nNOS-CaM-amber-md.mdcrd
Determine file type → AMBER coordinates → Load
```

En ventana de VMD main/Graphical representations:

```
Graphics → Representations → Drawing method → New Cartoon
Selec atoms Protein
```

Cuando termina el número de fragmentos modificar el fondo de la figura.

En ventana color controls

```
Categories: Display   Names: Background   Colors: 8 white
```

En ventana Graphical representations

```
Create Rep
Selections
Keyboards → rename Value → CA
Apply
Draw style
Colorin method
ColorID → 4
Drawing method → Beads
```

```
Create Rep
Selections
Keyboards → residue
Selec atoms Residue 1 to 148
Apply
Draw style
Colorin method
ColorID → 7
Drawing method → New Cartoon
```

## Obtención de modelo estructural final

1. Ir a la ventana VMD main y posicionarse en el número final de frames y con click derecho seleccionar:

→ Save coordinates → File type: pdb Frames: First: 9999 Last: 9999 Stride:1 → Save  
→ Filname: ... /DM-CaM-mon-nNOS.pdb

## Adición de cadenas faltantes

1. Utilizando pymol se añaden las cadenas faltantes al modelo DM-CaM-mon-nNOS.pdb siguiendo los siguientes pasos:

```
$ mkdir Complejo-CaM-nNOS
$ ls
DM-CaM-mon-nNOS.pdb
1tll.pdb
4d1n.pdb
$ pymol DM-CaM-mon-nNOS.pdb 1tll.pdb
```

## PYMOL:

→ all → show → cartoon  
Display → Sequence  
1tll → Action → align → to molecule → DM-CaM-mon-nNOS.pdb

2. Seleccionar cadena faltante del dominio reductasa y guardar coordenadas para añadir a modelo DM-CaM-mon-nNOS.pdb y asegurarse que las cadenas laterales del complejo no se sobrelapen.

1tll Cadena A → Action → Duplicate object → File → Save Molecule: Cadena-A-1tll.pdb  
\$ gedit DM-CaM-mon-nNOS.pdb Cadena-A-1tll.pdb &

## GEDIT:

Guardar como → CaM-dominio-reductasa-nNOS.pdb  
\$ pymol CaM-dominio-reductasa-nNOS.pdb

## PYMOL:

All → Show → Sticks  
Archivo → guardar como → CaM-dominio-reductasa-nNOS.pdb

3. Añadir la cadena faltante del dominio oxigenasa al modelo estructural anterior.

PYMOL:

→ CaM-dominio-reductasa-nNOS.pdb

File → Open → 4d1n.pdb

→ all → show → cartoon

Display → Sequence

4d1n → Action → align → to molecule → CaM-dominio-reductasa-nNOS.pdb

4d1n Cadena A → Action → Duplicate object → File → Save Molecule: Cadena-A-4d1n.pdb

\$ gedit CaM-dominio-reductasa-nNOS.pdb Cadena-A-4d1n.pdb &

GEDIT:

Guardar como → CaM-homodimero-nNOS.pdb

\$ pymol CaM-homodimero-nNOS.pdb

PYMOL:

All → Show → Sticks

Archivo → guardar como → CaM-homodimero-nNOS.pdb

## Complejo CaM-prot-skMLCK

1. Buscar la secuencia de aminoácidos correspondiente a la proteína nNOS en NCBI protein y descargar en formato FASTA.

NCBI → Protein

> NP\_149109.1 myosin light chain kinase 2, skeletal/cardiac muscle [Homo sapiens]

2. Con base a la secuencia de la proteína buscar las estructuras con mayor cobertura e identidad para la proteína skMLCK en BLAST PROTEIN.

BLAST PROTEIN → inserción de secuencia en formato FASTA → Database → Protein Data Bank proteins (pdb) → blast

3. Crear una carpeta llamada “CaM-skMLCK-prot” y descargar los archivos pdb de las estructuras elegidas para la proteína nNOS y el dominio de unión a CaM del Protein Data Bank.

```
$ mkdir CaM-skMLCK-prot
$ cd CaM-skMLCK-prot
$ ls
2x4f.pdb
2lv6.pdb
FASTA_sequences.fasta
$ gedit FASTA_sequences.fasta
```

COBALT Multiple Alignment Tool → inserción de secuencias en formato FASTA → Align

Download → Fasta plus gap → EDZRHPE212-alignment.fa

Robetta → Fragment Libraries

Paste Fasta :

> skMLCK

KRRWKKNFIAVSAANRFKISSSGAL

→ Submit

4. Crear una carpeta llamada “ Frag-skMLCK”, descargar los fragmentos creados y elegir el modelo con mejor score. Alinear nuevamente en COBALT las secuencias de las estructuras, incluida el modelo de la región de aminoácidos construida ab initio y descargar

Terminal 1:

```
$ mkdir Frag-skMLCK
```

```
$ cd Frag-skMLCK
```

```
$ ls
```

```
F_00000001.pdb
```

```
...
```

```
F_00000050.pdb
```

```
score.fsc
```

LibreOffice Calc → score.fsc

```
$ cd ..
```

```
CaM-skMLCK-prot$ ls
```

```
F_00000001.pdb (modelo de residuos faltantes)
```

```
2x4f.pdb (monómero incompleto de skMLCK)
```

```
2lv6.pdb (dominio de unión a CaM y proteína CaM)
```

```
$ mv F_00000001.pdb F_skMLCK.pdb
```

```
$ pdb2fasta *.pdb
```

COBALT Multiple Alignment Tool → inserción de secuencias en formato FASTA → Align

Download → Fasta plus gap → FEZRHPE212-alignment.fa

Terminal 1:

```
$ mv FEZRHPE212-alignment.fa skMLCK-alignment.fa
```

```
$ ls
```

```
F_skMLCK.pdb
```

```
2x4f.pdb
```

```
2lv6.pdb
```

```
FASTA_sequences.fasta
```

```
skMLCK-alignment.fa
```

5. Modelado por homología. Añadir y editar los archivos align-multiple.ali y model-multiple.py como se muestra en el ejemplo.

```
C; A multiple alignment in the PIR format; used in tutorial

>P1;2x4f
structureX:2x4f:80 :A:373 :A:ferredoxin:Azotobacter vinelandii: 1.90: 0.19
DIPAPPAPFDHRIVTAKQGAVNSFYTVSKTEIL-----GQVHKCEETATGLKLAAKIIKT
RGMKDKEEVKNEISVMNQLDHANLIQLYDAFESKNDIVLMEYVDGGELFDRIIDESYNL
TELDTILFMKQICEGIRMHQMYILHLDLKPENILCVNRDAKQIKIIDFGLARRYKPREK
LKVNFGTPEFLAPEVVNYDFVSFPTDMWSVGVIAYMLLSGLSPFLGDNDAETLNNILACR
WDLEDEEFQDISEEAKEFISKLLIKEKSWRISASEALKHPWLS-----HKLHSRLSAQ-
-----*

>P1;2lv6
structureN:2lv6: 1 :B: 26 :B:ferredoxin:Bacillus schlegelii:-1.00:-1.00
-----
-----
-----
-----
-----
-----
-----KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL-----*

>P1;F-skMLCK
structureN:F-skMLCK: 1 :A: 29 :A:ferredoxin:Bacillus schlegelii:-1.00:-1.00
-----
-----
-----
-----
-----NNLAEKAKRCNRRLKSQI
LLKKYLMKRRW-----*

>P1;secuencia-skMLCK
sequence:secuencia-skMLCK:1 : :338 : :ferredoxin:Peptococcus aerogenes: 2.00:-1.00
DCPPPPAPFPHRMVELRTGNVSSEFSMNSKEALGGGKFGAVCTCMEKATGLKLAAKVIKK
QTPKDKEMVLLIEIVMNLNHRNLIQLYAAIETPHEIVLFMEYIEGGELFERIVDEDYHL
TEVDTMVFVRQICDILFMHKMRVHLHDLKPENILCVNTTGHVLVKIIDFGLARRYNPNEK
LKVNFGTPEFLSPEVVNYDQISDKTDMWSMGVITYMLLSGLSPFLGDDDETETLNNVLSGN
WYFDEETFEAVSDEAKDFVSNLIVKQQRARMNAAQCLAHPWLNLAEKAKRCNRRLKSQI
LLKKYLMKRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGALMALGV*|
```

6. Generar el modelo estructural del monómero de skMLCK, exportando la carpeta comprimida CaM-skMLCK-prot a la computadora “Barracuda” y seguir los siguientes comandos.

```
$ ssh erika@132.148.131.98
password: *****
$ tar czvf CaM-skMLCK-prot.tar.gz CaM-skMLCK-prot
$ scp CaM-skMLCK-prot.tar.gz erika@132.148.131.98:/home/erika
$ tar xzvf CaM-skMLCK-prot.tar.gz
$ rm CaM-skMLC-prot.tar.gz
$ cd CaM-skMLCK-prot
$ python model-multiple.py > resultados.log & 2>&1
```

7. Elegir el modelo del monómero con mejor score y renombrarlo como mon-skMLCK.pdb, para construir posteriormente el complejo CaM-skMLCK.

```
$ cat resultados.log
→ mejor modelo
$ mkdir CaM-mono-skMLCK
$ cp skMLCK.B99990004.pdb CaM-mono-skMLCK
$ cd CaM-mono-skMLCK
$ ls
skMLCK.B99990004.pdb
$ mv skMLCK.B99990004.pdb mon-skMLCK.pdb
```

**8.** Alinear la proteína CaM a su dominio de unión en la proteína skMLCK y guardar las coordenadas en el archivo mon-skMLCK.pdb y renombrarlo como “CaM-mon-skMLCK.pdb”.

```
$ ls
mon-skMLCK.pdb
2lv6.pdb
$ pymol *.pdb
```

PYMOL:

Display → Sequence

→ Seleccionar cadena B (péptido skMLCK) de 2lv6.pdb

→ Action → align → to molecule → mon-skMLCK.pdb

→ Seleccionar 1-148 aa cadena A de 2lv6.pdb

→ Action → Duplicate object → File → Save Molecule: CaM.pdb

```
$ gedit CaM.pdb mon-skMLCK.pdb &
```

GEDIT:

archivo → guardar como → CaM-mon-skMLCK.pdb

```
$ pymol CaM-mon-skMLCK.pdb
```

## Preparación de archivos de coordenadas

**1.** Crear carpeta para DM del complejo CaM-monómero-skMLCK copiar modelo CaM-mon-skMLCK.

**2.** Generar los archivos que serán leídos en la DM utilizando AMBER, creando los archivos de entrada con el programa tleap. Añadir tipo y carga de iones calcio al complejo. Seguir los siguientes comandos:

(Terminal 1):

```
$ mkdir DM-CaM-mon-skMLCK
```

```
$ cp CaM-mon-skMLCK DM-CaM-mon-skMLCK
```

```
$ cd DM-CaM-mon-skMLCK
```

```
$ pdb4amber -i CaM-mon-skMLCK.pdb -o CaM-mon-skMLCK-amber.pdb
```



(Terminal 2):

```
$ tleap
```

```
-----
```

```
-----
```

Welcome to leap! (Mensaje de bienvenida)

```
>source leaprc.ff99SB
```

```
> complejo=loadpdb CaM-mon-skMLCK-amber.pdb
```

```
>set complejo 148.1 charge +2
```

```
>set complejo 149.1 charge +2
```

```
>set complejo 150.1 charge +2
```

```
>set complejo 151.1 charge +2
```

```
>set complejo 148.1 type C0
```

```
>set complejo 149.1 type C0
```

```
>set complejo 150.1 type C0
```

```
>set complejo 151.1 type C0
```

```
>check complejo
```

```
-----
```

```
-----
```

```
-----
```

Unit is Ok! (La adición de tipo y carga de los iones fue correcta)

```
>saveamberparm complejo CaM-mon-skMLCK-amber.top CaM-mon-skMLCK-amber.xyz
```

Terminal 1:

```
$ ls
```

```
CaM-mon-skMLCK.pdb
```

```
CaM-mon-skMLCK.pdb
```

```
CaM-mon-skMLCK-amber.top
```

```
CaM-mon-skMLCK-amber.xyz
```

```
min-vac.in
```

```
md-vac.in
```

**3.** Editar los archivos de entrada de la simulación de Dinámica Molecular como se muestra en el ejemplo. Ingresar a la computadora Barracuda y trasladar la carpeta comprimida DM-CaM-mon-skMLCLK que contine los archivos de entrada y de coordenadas para la DM.

```
$ ls
```

```
min-vac.in
```

```
md-vac.in
```

```
$ gedit min-vac.in
```

polyA-polyT 10-mer: initial minimisation prior to MD

```
&cntrl
```

```
imin = 1,
```

```
maxcyc = 5000,
```

```
ncyc = 250,  
ntb = 0,  
igb = 0,  
cut = 12  
/
```

```
$ gedit min-vac.in
```

10-mer DNA MD in-vacuo, 12 angstrom cut off

```
&cntrl  
imin = 0, ntb = 0,  
igb = 0, ntp = 5000, ntwx = 5000,  
ntt = 3, gamma_ln = 1.0,  
tempi = 300.0, temp0 = 300.0,  
nstlim = 25000000, dt = 0.002,  
cut = 12.0  
/
```

```
$ tar czvf DM-CaM-mon-skMLCK.tar.gz DM-CaM-mon-skMLCK
```

```
$ ssh erika@132.148.131.98
```

```
password: *****
```

```
$ tar xzvf DM-CaM-mon-skMLCK.tar.gz
```

```
$ cd DM-CaM-mon-skMLCK
```

```
$ ls
```

```
CaM-mon-skMLCK.pdb
```

```
CaM-mon-skMLCK-amber.top
```

```
CaM-mon-skMLCK-amber.xyz
```

```
min-vac.in
```

```
md-vac.i
```

### **Simulación de Dinámica Molecular del complejo CaM-monómero-skMLCK**

**1.** Cargar el módulo amber para iniciar las simulaciones de Dinámica Molecular. Realizar una minimización y continuar con el proceso de DM.

```
[erika@barracuda DM-CaM-mon-nNOS]$ module load amber/amber14
```

```
$ mpirun -n 5 sander.MPI -O -i min-vac.in -o CaM-mon-skMLCK-min.out -p CaM-mon-skMLCK-  
amber.top -c CaM-mon-skMLCK-amber.xyz -r CaM-mon-skMLCK-min.rst & 2>&1
```

```
$ls
```

```
min-vac.in
```

```
md-vac.in
```

```
CaM-mon-skMLCK.pdb
```

```
CaM-mon-nNOS-amber.top
```

```
CaM-mon-nNOS-amber.xyz
```

```
CaM-mon-skMLCK-min.rst
CaM-mon-skMLCK-min.out
```

```
$ mpirun -n 8 sander.MPI -O -i md-vac.in -o CaM-mon-skMLCK-md.out -p CaM-mon-skMLCK
.top -c CaM-mon-skMLCK.rst -r CaM-mon-skMLCK-md.rst -x CaM-mon-skMLCK-md.mdcrd &
2>&1
$ls
min-vac.in
md-vac.in
CaM-mon-skMLCK.pdb
CaM-mon-skMLCK-amber.top
CaM-mon-skMLCK-amber.xyz
CaM-mon-skMLCK-min.rst
CaM-mon-skMLCK-min.out
CaM-mon-skMLCK-md.mdcrd
CaM-mon-skMLCK-md.out
```

### **Evaluación de la energía del sistema**

1. Evaluar la energía del sistema durante la simulación de Dinámica molecular. Crear una carpeta llamada “Energía” que contenga el archivo process\_mdout.perl y escribir los siguientes comandos:

```
$ mkdir Energia
$ cd Energia
$ perl process_mdout.perl ../CaM-mon-skMLCK-md.out
$ ls
$ xmgrace CaM-mon-skMLCK .ETOT
```

### **Análisis de la Simulación de la Dinámica Molecular**

1. Calcular el RMSD. Crear una carpeta denominada “Análisis” que contenga el archivo cal\_rms.in y editarlo como el ejemplo, coincidiendo con los archivos de la carpeta. Observar gráfico con el programa xmgrace.

```
$ cd ..
$ mkdir Analisis
$ cd Analisis
$ls
cal_rms.in
$ gedit cal_rms.in
```

---

```
trajin ../CaM-mon-skMLCK-md.mdcrd
rms first mass out CaM-mon-skMLCK.rms time 0.1
```

---

```
$ cpptraj -p ../CaM-mon-skMLCK .top -i cal_rms.in
$ xmgrace CaM-mon-skMLCK-md.rms
```

## Visualización de la trayectoria

1. Abrir VMD en la carpeta DM-CaM-mon-skMLCK observar la trayectoria de Dinámica Molecular del monómero de la skMLCK unida a la CaM.

\$ vmd

VMD:

File → New molecule → Browse → CaM-mon-skMLCK-amber.top

Determine file type → AMBER7 PARM → Load

→ Browse → CaM-mon-skMLCK-md.mdcrd

Determine file type → AMBER coordinates → Load

Cuando termina el número de fragmentos modificar el fondo de la figura.

En ventana color controls

Categories: Display   Names: Background   Colors: 8 white

En ventana de VMD main/Graphical representations:

Graphics → Representations → Drawing method → New Cartoon

Selec atoms Protein

En ventana Graphical representations

Create Rep

Selections

Keyboards → resname Value → CA

Apply

Draw style

Colorin method

ColorID → 4

Drawing method → Beads

Create Rep

Selections

Keyboards → residue

Selec atoms Residue 1 to 148

Apply

Draw style

Colorin method

ColorID → 7

Drawing method → New Cartoon

## Obtención de modelo estructural final

1. Ir a la ventana VMD main y posicionarse en el número final de frames y con click derecho seleccionar:

→ Save coordenates → File type: pdb   Frames: First: 9999 Last: 9999 Stride:1 → Save

→ Filname: ... /DM-CaM-mon-skMLCK.pdb