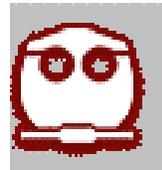




UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

CREACIÓN DE HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA
EL ESTUDIO DE CINASAS: EL CASO DE LA CDC2

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A:

MELCHOR ROA HUERTA

Tutor: DR. RUY PÉREZ MONTFORT

MÉXICO, D.F.

Abril 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

CREACIÓN DE HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE CINASAS: EL CASO DE LA CDC2

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de Maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Ruy Pérez Montfort en el laboratorio 201 Ote, en el Departamento de Bioquímica del Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Ruy Pérez Montfort	IFC. UNAM
Dr. Jorge Vazquez	Facultad de Química. UNAM
Dr. Alejandro Zentella Dehesa	IFC. UNAM

Se reconoce la colaboración del Dr. Alejandro Zentella Dehesa del Departamento de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de Biología Celular.

Se reconoce la colaboración del Dr. Hector Barrios López del Departamento de Bioquímica del Instituto de Química, UNAM, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de Síntesis Química.

Se reconoce la asesoría técnica de la Bióloga Nallely Cabrera González en los experimentos de Biología Molecular.

Se reconoce la asesoría técnica del Biólogo José Luis Ventura Gallegos en los experimentos de Biología Celular.

El proyecto fue apoyado por CONACyT (36249-N). Durante los estudios de Maestría goce de una beca otorgada por CONACyT y DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día 28 de Abril de 2004.

El jurado de examen estuvo constituido por:

PRESIDENTE	Dr. Jesús Adolfo García Sainz	IFC.UNAM
VOCAL	Dr. Alejandro Zentalla Dehesa	IFC.UNAM
SECRETARIO	Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra	Fac. de Química. UNAM
SUPLENTE	Dr. Hector Barrios López	Inst. de Química UNAM
SUPLENTE	Dr. Félix Recillas Targa	IFC.UNAM

CONTENIDO

RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS	4
1.2. PROTEÍNAS CINASAS	5
1.2.1. GENERALIDADES	5
1.2.2. ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS CINASAS	5
1.2.3. REGULACIÓN DE LAS PROTEÍNAS CINASAS	6
1.3. CINASAS DEPENDIENTES DE CICLINA	8
1.3.1. CDKs: REGULADORES DEL CICLO CELULAR	8
1.3.2. ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS CDKs	9
1.3.3. REGULACIÓN DE LAS PROTEÍNAS CDKs	9
1.4. PROTEÍNAS BLANCO DE CINASAS	10
1.4.1. ESPECIFICIDAD DE PROTEÍNAS CINASAS	10
1.4.2. IDENTIFICACIÓN DE SUSTRATOS	11
1.5. ESTRATEGIA QUÍMICO GENÉTICA	13
1.5.1. SISTEMA ORTÓLOGO	13
1.5.2. ANTECEDENTES EN CINASAS	13
1.5.3. ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA CDC28	19
1.6. LA PROTEÍNA CDC2	19
1.6.1. SUSTRATOS DE LA PROTEÍNA CDC2	19
2. HIPÓTESIS	21
3. OBJETIVO	21

4.	MATERIALES Y MÉTODOS		22
4.1.	SÍNTESIS DE LOS INHIBIDORES		22
4.2.	CLONACIÓN Y MUTAGÉNESIS DE GEN <i>cdc2</i>		24
4.3.	CO-TRANSFECCIÓN CELULAR		24
4.4.	CITOMETRÍA DE FLUJO		25
4.5.	WESTERN BLOT		26
4.6.	ACTIVIDAD DE CINASA		26
5.	RESULTADOS		28
5.1	SÍNTESIS DE INHIBIDORES		28
5.2	MUTACIÓN Y CLONACIÓN DEL GEN <i>cdc2</i>	29	
5.3	COTRANSFECCIÓN CELULAR		31
5.4	INFECCIÓN CELULAR		32
5.5	EXPRESIÓN DE CDC2 Y CDC2F80G		35
5.6	ACTIVIDAD DE CINASA DE CDC2 Y CDC2F80G		36
6.	DISCUSIÓN		39
7.	CONCLUSIONES		43
8.	PERSPECTIVAS		44
9.	APÉNDICE		45
10.	BIBLIOGRAFÍA		47

RESUMEN

La fosforilación es el elemento control de las señales de transducción. Este proceso post-transcripcional actúa como un “switch químico” que permite el flujo de la información de manera regulada. La identificación de sustratos fisiológicos de las proteínas cinasas con las técnicas convencionales siempre presentan ambigüedad debido a la alta homología entre estas enzimas. Una solución a este problema es modificar la proteína cinasa de interés para aceptar un ligando ortogonal que no es reconocido por la enzima silvestre ni por otras cinasas. Esta estrategia implica realizar una mutación silenciosa puntual en el sitio de unión a ATP para crear una cavidad única que permite acomodar un ligando que complementa la mutación, es decir, se crea una nueva y exclusiva superficie de interacción entre la cinasa y el ligando. Esta herramienta permite inhibir exclusivamente una cinasa *in vitro* e *in vivo* y definir su papel y sus sustratos.

En este trabajo se desarrollan las herramientas para inhibir la actividad *in vitro* de la proteína cinasa CDC2 (CDK1) como primera aproximación a la búsqueda de distintos sustratos. Se sintetizaron ligandos modificados que funcionan como inhibidores (PP1 y NM) y se realizó la mutación F80G en la CDC2. El gen mutante se transfectó en células de mamífero, la proteína CDC2F80G se inmunoprecipitó y se evaluó la actividad de cinasa utilizando los inhibidores sintetizados.

La estrategia descrita es una metodología importante para poder definir diversos y nuevos sustratos, el efecto de inhibición y el papel fisiológico de una proteína cinasa particular dentro de una vía de transducción.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS.

La fosforilación reversible de proteínas es un mecanismo de control de muchos procesos celulares. Esta reacción se cataliza por dos superfamilias de enzimas, las proteínas cinasas y las proteínas fosfatasas. Las primeras catalizan la transferencia del fosfato y del ATP a grupos hidroxilo de residuos de serina, treonina o tirosina de la proteína sustrato. Las segundas catalizan la hidrólisis del enlace fosfoéster formado entre el fosfato y el residuo para producir fosfato inorgánico y un grupo hidroxilo libre¹ (Fig.1.1). La actividad de estas enzimas controla un gran número de eventos celulares incluyendo el flujo de segundos mensajeros², los cambios en la expresión genética³, la morfología y el tamaño celular⁴, además, procesos como la percepción y la memoria pueden ser analizados como eventos de fosforilación⁵. Aún no se describe ninguna vía de transducción en que no participen cinasas y fosfatasas^{1,6}

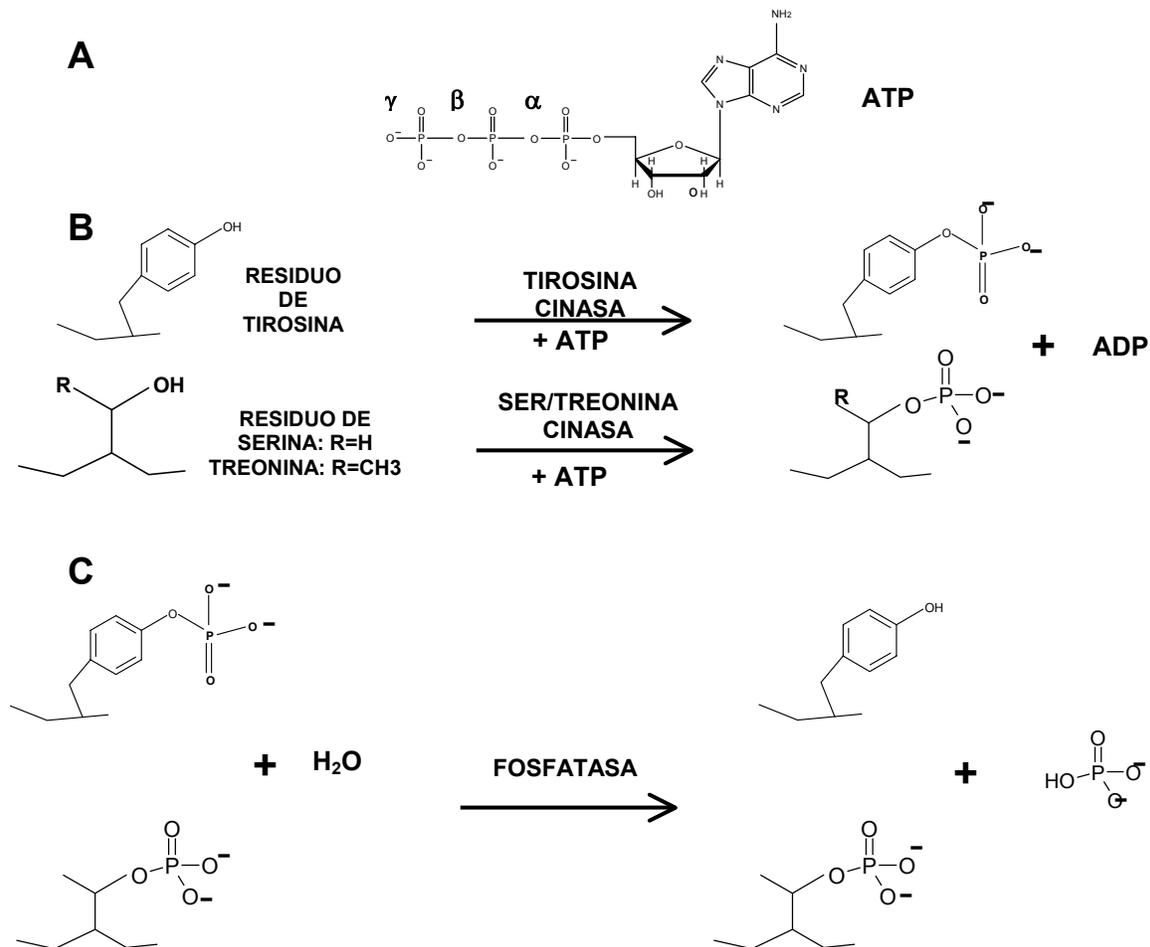


Figura 1.1 Reacción química catalizada por las proteínas cinasas y fosfatasas. **A.** Estructura del ATP. **B.** Reacción catalizada por las proteínas cinasas. **C.** Reacción catalizada por las proteínas fosfatasas.

El estado de fosforilación de una proteína puede regular su actividad enzimática, establecer interacciones proteína-proteína, determinar su concentración, localización o distribución celular. Por esto, la reacción de fosforilación ó desfosforilación actúa como un “switch químico” específico, rápido y reversible, permitiendo que la transmisión de las señales en la célula sea altamente regulada⁷. En células de mamífero, por ejemplo, la tercera parte de las proteínas presentan unión a grupo fosfato, se codifican aproximadamente 1000 proteínas cinasas y de 300 a 500 fosfatasas y se presenta una alta redundancia y solapamiento de sustratos entre este tipo de enzimas^{7, 8}. Las características de la fosforilación probablemente expliquen porqué esta modificación covalente ha sido adoptada por las células eucariotes como el principal mecanismo de control¹.

1.2. PROTEÍNAS CINASAS

1.2.1 GENERALIDADES

Las cinasas, también llamadas fosfotransferasas, son enzimas dependientes de ATPMg²⁺, que transfieren el grupo fosfato de la posición γ del ATP a grupos hidroxilo fosforilables⁹. Aunque el sitio activo es común en todas las cinasas y el mecanismo químico es simple, la unión del sustrato y la activación del sitio catalítico de la cinasa son complejos, involucrando cambios estructurales como resultado de fosforilaciones o de interacciones con proteínas reguladoras que aumentan o reprimen su actividad catalítica^{9, 10}.

1.2.2 ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS CINASAS

La superfamilia de las cinasas presenta características conservadas tanto a nivel de secuencia primaria como a nivel estructural. Presentan tres dominios principales que participan en la especificidad al sustrato y en la actividad catalítica de la enzima^{10, 11}. El dominio SH1, que es el responsable de la catálisis, mientras que los dominios SH2 y SH3 son no catalíticos y responsables de la localización celular, reconocimiento al sustrato y regulación de la actividad. A diferencia del resto de las enzimas, en las cinasas la región catalítica está separada de la región de reconocimiento al sustrato permitiendo que los dominios actúen independientemente del resto de la proteína (Fig. 1.2)^{12,13,14}.

Dominio Catalítico

Las proteínas cinasas pueden ser identificadas como tales por medio de una búsqueda directa de la secuencia del dominio SH1, llamado también dominio catalítico o dominio de cinasa¹⁵. Es una región altamente conservada de 270 aminoácidos y es responsable de la unión al ATP y la proteína sustrato, así como de catalizar la reacción de fosfotransferencia. El dominio SH1 forma una cavidad en el sitio de unión al nucleótido y presenta una secuencia común en las proteínas cinasas llamada motivo de Rossmann (GXGXXG) que contiene repeticiones de residuos de glicina^{15, 16}.

Dominio No Catalítico

El dominio SH2 es una región moduladora de 140 a 250 residuos que tiene la habilidad de unirse fuerte y específicamente a la proteína sustrato. Reconoce una pequeña secuencia de 3 a 5 residuos que flanquean residuos de fosfotirosina y permiten a las proteínas que los presentan unirse al sitio activo ^{16,17}.

El dominio SH3 es una región relativamente pequeña de 55 a 75 residuos, participa en la interacción con la proteína sustrato, aumenta las uniones intramoleculares controlando la actividad catalítica (el SH3 interactúa estrechamente con la porción amino terminal del dominio SH1) y determina la localización de la proteína en la célula. Todos los ligandos del dominio SH3 tienen una secuencia consenso rica en residuos de prolina (PXXP) ^{16,18} (Fig. 1.2).

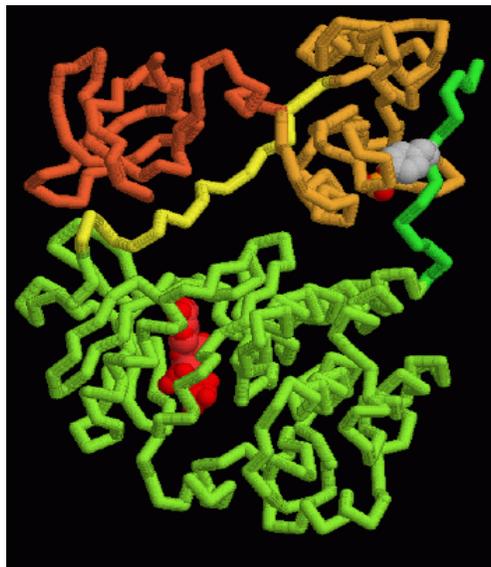


Figura 1.2. Estructura general de una proteína cinasa. Estructura tubular de la proteína Src. En color verde se muestra el dominio SH1, en color naranja el dominio SH2 y en color amarillo el dominio SH3.

1.2.3 REGULACIÓN DE LAS PROTEÍNAS CINASAS

Algunas proteínas cinasas han sido cristalizadas y las estructuras obtenidas mediante estudios de rayos X han permitido observar las interacciones moleculares con el ATP, la proteína sustrato, y las diferentes conformaciones de la enzima que indican formas activas o inactivas, que adquieren dependiendo de la regulación. La fosforilación y la unión a otras proteínas son los procesos principales de regulación de las cinasas ^{7,19,20,21}. Por ejemplo, la tirosina cinasa Src (Fig. 1.2) presenta dos conformaciones resultado de la regulación por fosforilación; una conformación abierta o activa en la cual el sitio activo está expuesto y accesible a la unión de los ligandos (ATP y sustrato) y otra cerrada o inactiva en la cual la proteína está plegada de tal forma que los ligandos no tienen acceso al sitio activo²⁰ (Fig. 1.3).



Figura 1.3. Cambios estructurales en la regulación de la cinasa Src dependiente de fosforilación. La fosforilación de Y416 y la desfosforilación de Y527 le proporcionan la conformación activa a la enzima.

Otras cinasas, además de ser reguladas por fosforilación, son moduladas por la unión a proteínas reguladoras, por ejemplo las cinasas CDKs (del inglés *cyclin dependent kinase*). Estas cinasas forman complejo con una proteína llamada ciclina y requieren ser fosforiladas en el asa-T para activarse. La unión a la ciclina y la fosforilación en el asa-T, resultan en cambios estructurales que permiten el acceso al sitio catalítico y activan la cinasa^{22, 23}. (Fig. 1.4)

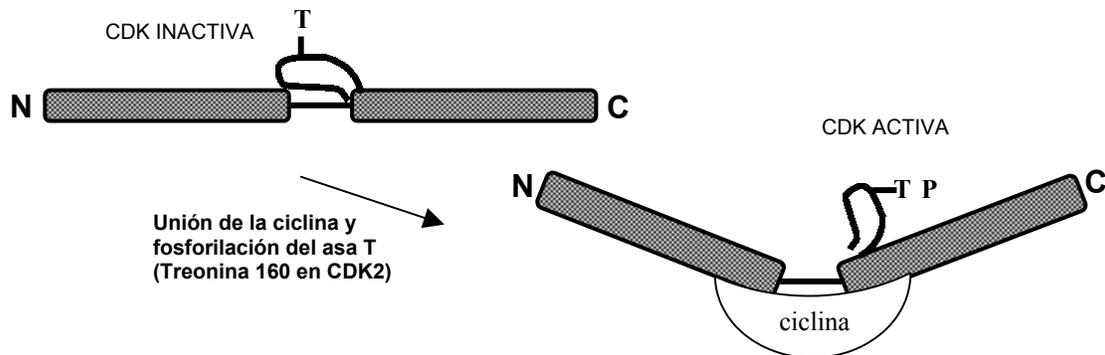


Figura 1.4. Cambios estructurales en la regulación de las cinasas CDKs. La fosforilación de treonina 160 en el asa T de CDK2 y la unión de la ciclina le proporcionan la conformación abierta o activa.

1.3. CINASAS DEPENDIENTES DE CICLINA

1.3.1 CDKs: REGULADORES DE CICLO CELULAR

El ciclo celular en eucariontes superiores se regula por una familia de serin-treonin cinasas conocidas como CDKs (*cyclin dependent kinases*). Como su nombre lo indica, las CDKs deben asociarse con una ciclina para activarse y de esta manera poder fosforilar sustratos que en consecuencia permiten el avance y control de las fases del ciclo celular⁶⁸⁻⁶⁹.

En levaduras una sola CDK controla el ciclo celular, (CDC28 en *Saccharomyces cerevisiae* y CDC2 en *Schizosaccharomyces pombe*), asociándose con múltiples ciclinas. En *S. cerevisiae*, CDC28 se asocia a tres ciclinas durante la fase de G1 (Cln1-3) del ciclo celular, dos ciclinas tipo b en la fase S (Clb5 y Clb6) y cuatro en la fase M (Clb1-4). En *S. pombe* CDC2 se asocia a la ciclina Cdc13 en la fase M y con las ciclinas Cig 2 y 1 en la fase S^{68,70} (Fig. 1.5).

Con el descubrimiento de 13 CDKs y 25 ciclinas en mamíferos se especuló que la regulación del ciclo era más compleja, sin embargo, los estudios han mostrado que sólo 4 CDKs; CDK4, CDK6, CDC2 (CDK1) y CDK2 juegan un papel importante en la regulación del ciclo celular⁶⁸ (Fig. 1.5).

El genoma completo de *Caenorhabditis elegans* provee una visión completa de las cinasas y de la familia de CDKs en los eucariotes superiores; de entre los 19 099 genes, 493 (2.6%) codifican para proteínas cinasas y entre ellas hay 14 CDKs, además presenta 34 ciclinas⁷¹.

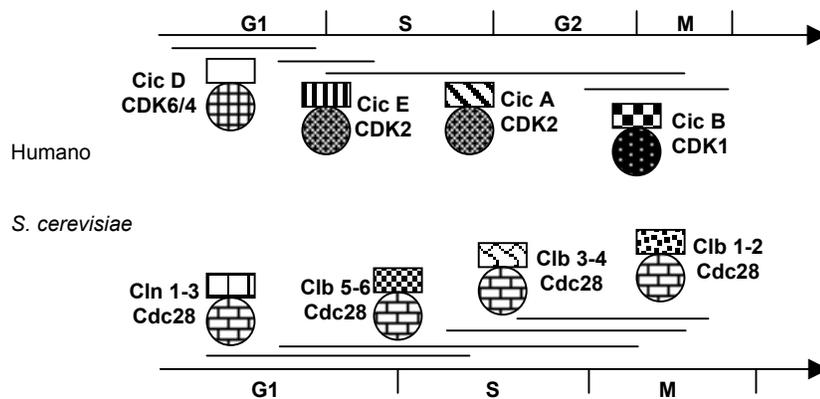


Figura 1.5. Complejos reguladores del ciclo celular. En la parte superior de la figura se muestran los complejos de CDK/ciclina de humano que están presentes en cada una de las fases del ciclo y en la parte inferior se muestran los complejos de CDK/ciclina de levadura.

1.3.2 ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS CDKS

Las proteínas CDKs tienen un peso molecular aproximado de 34 KDa. La molécula está organizada en dos lóbulos principales, uno pequeño, formado por el extremo amino terminal que consiste en su mayoría de láminas β (L1) y un lóbulo grande, carboxilo terminal que presenta esencialmente hélices α (L2). El sitio de unión al ATP y a la proteína sustrato se localiza entre estos dos lóbulos⁶⁹. (Fig. 1.6)

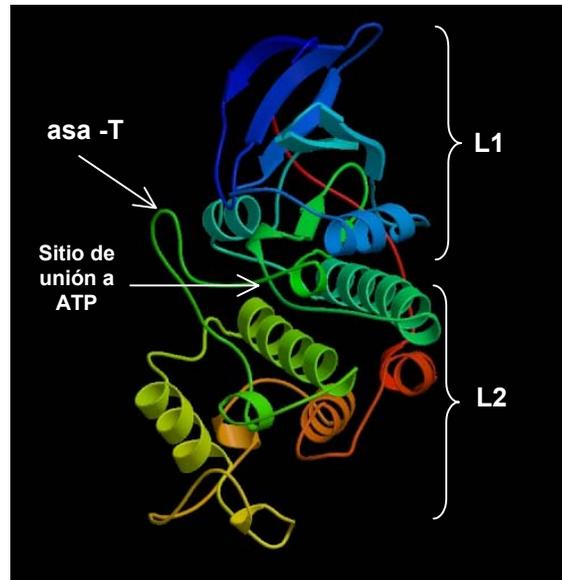


Figura 1.6 Estructura general de CDKs. L1. Lóbulo menor formado de láminas β , L2. Lóbulo mayor formado de hélices α .

1.3.3 REGULACIÓN DE LAS PROTEÍNAS CDKS

Las CDKs son cinasas altamente reguladas. Cuando la cinasa se encuentra como monómero es inactiva, a medida que avanza el ciclo celular va formando complejo con una ciclina y dicha unión le confiere una activación parcial, esto como resultado de cambios en la estructura. Sin embargo, después de formar los complejos, la cinasa activadora de CDKs, CAK (ciclina H y CDK7) fosforila a la CDK en una región llamada asa-T (treonina 161 en CDC2), que por un lado estabiliza el complejo y por otro le confiere la máxima activación. Esta fosforilación provoca que el asa-T se extienda permitiendo el acceso al sitio catalítico (Fig. 1.6). Bajo otras circunstancias el complejo puede ser regulado negativamente por fosforilación en la tirosina15 y en menor grado en la treonina 14. La fosforilación de uno o ambos sitios inhibe la actividad de la enzima^{68,69} (Fig. 1.7)

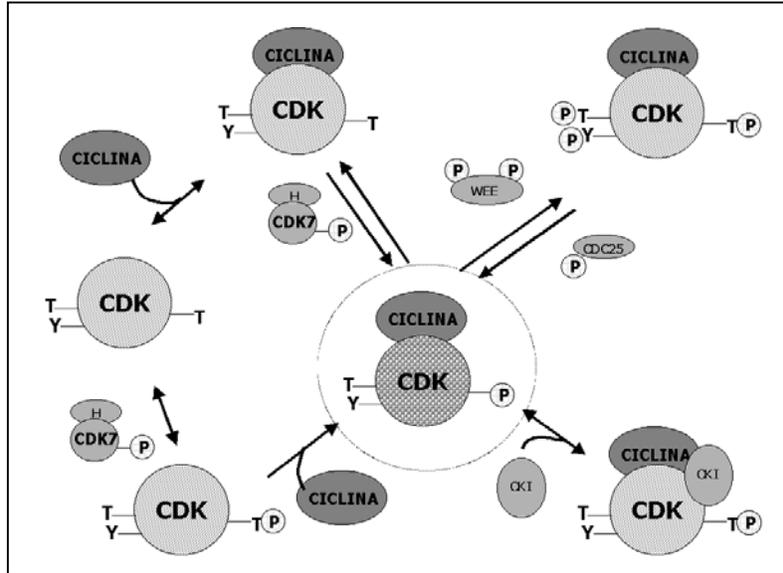


Figura 1.7 Regulación de las proteínas CDKs. En el centro se muestra la forma activa de las CDKs, las cinco formas restantes son complejos inactivos.

1.4. PROTEÍNAS BLANCO DE CINASAS

1.4.1 ESPECIFICIDAD DE LAS PROTEÍNAS CINASAS

En las últimas dos décadas se ha intentado definir los sustratos de algunas familias de cinasas como una primera forma de abordar el estudio de las señales de transducción. La primera aproximación para encontrar los sustratos específicos de una cinasa fue determinar el dominio de la enzima encargado de la selección del sustrato, sin embargo, se encontró que la selectividad de las cinasas por sus sustratos presentan una gran variedad y que la selección del sustrato no está determinada por un dominio en particular. Se consideraba que sólo los dominios SH2 y SH3 colaboraban en el reconocimiento al sustrato, pero posteriormente se demostró que también el dominio SH1 participa y que además muestra preferencias para unir ciertos péptidos^{7,16,25}. La segunda aproximación fue encontrar una secuencia consenso en los sustratos, para investigar este punto se han desarrollado varias técnicas como son la síntesis de péptidos y bibliotecas de fagos. Así también, se han realizado diferentes análisis estadísticos para determinar las secuencias peptídicas consenso a las que se unen estas enzimas²⁴⁻²⁹. Sin embargo los resultados de estas investigaciones confirman que la especificidad de las cinasas por los sustratos presentan una amplia variedad y que no puede estar representada con precisión por una sola secuencia consenso.

1.4.2 IDENTIFICACIÓN DE SUSTRATOS DE PROTEÍNAS CINASAS

La fosforilación como mecanismo central de regulación sugiere que el número de enzimas con actividad de cinasa o fosfatasa se encuentra en altos niveles en la célula^{1, 8}. Con este antecedente y considerando que los estudios bioquímicos de cinasas individuales no permiten definir sustratos ni el papel de la enzima, se han desarrollado algunas metodologías para tratar de identificar los sustratos fisiológicos de las cinasas. Entre las principales están el mapeo de péptidos combinados²⁴, la tecnología con chips de proteínas³⁰, el mapeo con bibliotecas de fagos³¹, la modulación de metales divalentes requeridos³² y el uso de inhibidores altamente específicos³³. Sin embargo, el problema central que enfrentan estos métodos es que todas las cinasas emplean el mismo donador de fosfato, el ATP. Debido a esto, ha sido necesario desarrollar métodos para identificar las moléculas sustrato participantes en una vía de transducción y así determinar el orden de los eventos para establecer las relaciones entre las diferentes vías. Existen actualmente varios métodos genéticos y bioquímicos para abordar este problema que se fundamentan principalmente en la eliminación específica de la actividad de una proteína cinasa.

“KNOCK OUT” DE GENES

El método genético más común para eliminar la actividad de una cinasa es suprimir el gen de la enzima, método conocido como “knock-out”. Este método es gen-específico ya que utiliza un evento de recombinación homóloga para eliminar la región codificante del gen de interés. Sin embargo, los “knock-out” de genes de cinasas son ambiguos y generalmente no permiten asignar un papel funcional al gen eliminado^{34, 35}. Algunos “knock-out” de genes de cinasas han mostrado fenotipos “medios”, esto puede ser debido a la redundancia de las cinasas por los sustratos y/o que otras proteínas compensan la falta de la fosforilación de los sustratos. Estos ajustes impiden definir la función de una cinasa en particular, por ejemplo, las células “knock-out” del gen de la tirosina cinasa de adhesión focal (FAK), contienen niveles más altos de proteínas tirosin-cinasas comparados con las células silvestres, esto sugiere que otras tirosinas cinasas se expresan o activan para compensar la falta del gen eliminado³⁶. También es importante mencionar que un gen mutado puede ser afectado en los dominios no catalíticos, por lo que no es claro si el fenotipo “knock-out” se origina sólo por la pérdida de la actividad, por la localización errónea en la célula o por falta de interacción proteína–proteína de la enzima en cuestión.

MUTANTES CONDICIONALES

Otro método genético es el uso de mutantes condicionales. Una mutante condicional es una forma desestabilizada de la proteína que únicamente retiene su actividad en una condición permisiva, pero que la pierde en condiciones restrictivas (cambios de temperatura principalmente)^{37,38}. Tales mutantes pueden ser más informativas que el “knock-out” de un gen debido a que la proteína puede ser desestabilizada de forma controlada con un cambio rápido de condición. Desafortunadamente, este método se

utiliza principalmente en organismos haploides unicelulares (levaduras) y además resulta de un complicado mapeo genético y fenotípico. Así mismo, no es fácil saber si el fenotipo celular se origina directamente por la falta de actividad de la proteína condicionada, o por un efecto en la localización de la misma o como resultado del plegamiento erróneo. Hay que considerar además que el rápido cambio a la condición permisiva o restrictiva puede tener efecto sobre el fenotipo afectando otras proteínas o vías y nuevamente los ajustes que realiza la célula impiden definir con claridad la participación de la proteína específica.

ANTICUERPOS

Una herramienta bioquímica que permite obtener moléculas que pueden eliminar la actividad de una cinasa en particular, son los anticuerpos. Los anticuerpos específicos anti-cinasa (o incluso anticuerpos para una forma fosforilada de la enzima) se han utilizado como inhibidores específicos³⁹. Se han hecho avances en el estudio de las vías de transducción gracias a estas moléculas, sin embargo su uso para ensayos *in vivo* son limitados, ya que no pueden penetrar a las células y requieren ser microinyectados, esto dificulta su uso en los estudios de este campo.

INHIBIDORES

La aproximación más primitiva y en la que aún se continúa trabajando es el uso de inhibidores (drogas o agentes terapéuticos), los cuales en los últimos años han sido ampliamente explorados⁴⁰⁻⁴⁴. El uso de inhibidores para el estudio de las enzimas sigue siendo el método de elección, ya que son moléculas pequeñas, permeables a la célula y que se unen con alta selectividad a su proteína blanco inhibiendo la actividad. Las ventajas de los inhibidores sobre los otros métodos son, primero, que no le dan tiempo a la célula para compensar la falta de actividad de la proteína, segundo, permiten evaluar efectos de inhibición parcial o total y tercero, sólo afectan el sitio catalítico de la enzima y no afectan la localización celular ni las interacciones proteína-proteína de la enzima.

Actualmente casi todos los inhibidores de cinasas se acoplan al sitio de unión a ATP de la proteína^{21, 45,46}. Debido a que el sitio de unión está presente en todas las cinasas, el problema de selectividad es una limitante. Tanto la homología de la superfamilia en el sitio activo, como el número de estas enzimas en la célula y la posible citotoxicidad del compuesto, incrementan la dificultad de generar una molécula específica para una cinasa. Aunque la topología general de los sitios de unión a ATP es muy semejante en estas proteínas, hay diferencias estructurales substanciales que pueden ser cruciales en el diseño de fármacos y que están siendo exploradas. El resultado de los estudios de estas pequeñas diferencias ha dado origen al diseño y síntesis de inhibidores como la estaurosporina, flavopiridol, paulonas, indirubina y purinas. Estos inhibidores han sido evaluados y continúan siendo modificados para atacar el sitio activo de las cinasas y son la base para el diseño de nuevas drogas⁴⁷.

1.5. ESTRATEGIA QUÍMICO GENÉTICA

1.5.1 SISTEMA ORTÓLOGO

En un esfuerzo por comprender detalladamente la regulación y el flujo de la información en los sistemas biológicos, se ha desarrollado una estrategia en la que se combina la síntesis química y la mutagénesis dirigida. El objetivo es generar un ligando específico y exclusivo para una enzima activa pero sensible al ligando y que juntos permitan observar los efectos de su interacción.

Esta estrategia utiliza sustratos o ligandos diseñados que presentan una característica química que no está presente en sustratos naturales. La modificación química puede consistir en un cambio de carga, una eliminación, adición, o una simple alteración en un sustituyente que no modifique las propiedades de la molécula. Los ligandos modificados son excluidos del sitio activo de las enzimas silvestres (sustratos muertos u ortogonales) pero son reconocidos por las enzimas sensibilizadas o mutantes las cuales poseen los cambios necesarios para permitir la nueva interacción electrostática o estérica sin afectar su función^{48, 49, 50}.

Para aplicar esta estrategia, se realizan mutaciones silenciosas puntuales en el sitio de unión de la enzima, cambios que le permiten interactuar con mayor afinidad con un ligando modificado que con el sustrato natural.

El ligando ortólogo puede funcionar como un sustrato, un activador o un inhibidor que por ser diferente del sustrato fisiológico permite una interacción exclusiva que puede ser controlada. En resumen, esta estrategia crea una nueva superficie de interacción específica proteína-ligando⁵¹⁻⁵⁴.

Con la posibilidad de transfectar células con el gen que codifica la enzima mutante, se pueden obtener células en las que sólo la enzima mutante es selectivamente activada o inhibida por el ligando diseñado. El estudio del fenotipo de las células con una activación o inhibición específica provee una estrategia más clara para determinar el papel de la enzima en una vía metabólica o de transducción⁵⁴⁻⁵⁷.

Con el uso de estos métodos se han modificado algunas proteínas que incluyen GTPasas, hormonas nucleares, glutaminyl tRNA aminoacyl sintetasa y una amplia variedad de cinasas^{51, 52, 58-60}.

1.5.2 ANTECEDENTES EN CINASAS

INHIBICIÓN ESPECÍFICA DE UNA CINASA

Diseño de la proteína modificada

Shokat y colaboradores utilizaron técnicas de modelaje molecular y de ingeniería genética, para crear nuevas cinasas con el propósito de desarrollar un sistema de inhibición específico. El objetivo fue generar una cavidad en el sitio de unión de las enzimas para que fueran sólo reconocidas por moléculas inhibitoras que complementaran la mutación, es decir, obtener proteínas con un potencial único de selección^{48, 51}. Esta estrategia podría permitir identificar los sustratos y el papel de una cinasa en una vía de transducción (Fig. 1.8).

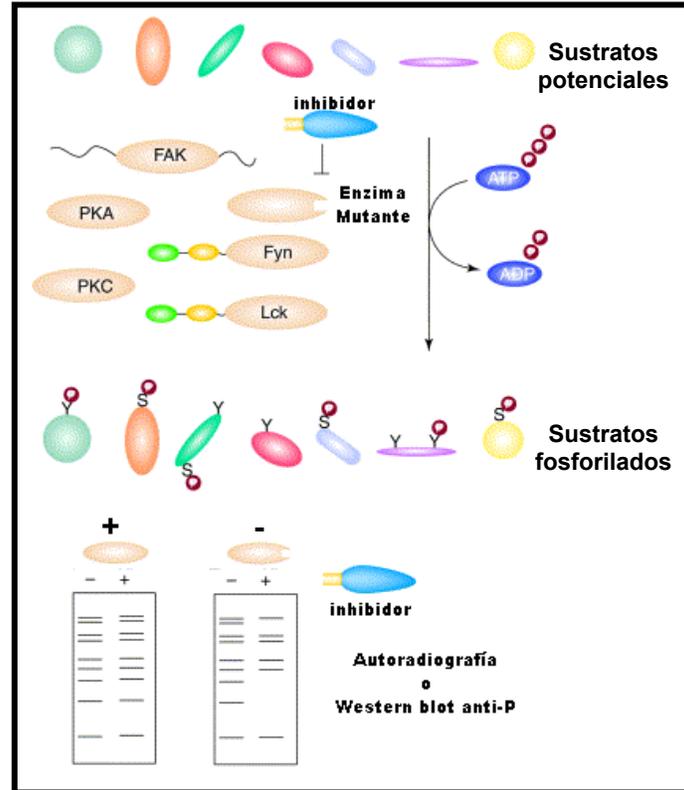


Figura 1.8. Identificación indirecta de sustratos de cinasas con el sistema ortólogo. Se diseña un inhibidor que se adecúe al sitio activo de una cinasa modificada. El inhibidor sólo se une a la cinasa mutante y no es reconocido por las cinasas silvestres. Los efectos de inhibición se pueden evaluar en un ensayo de cinasa con y sin inhibidor. La reacción se realiza en presencia de ATP marcado que sólo es utilizada por la enzima silvestre. Después de la separación de proteína en gels de una o dos dimensiones, las proteínas radiomarcadas en el gel positivo permiten identificar las proteínas que no son detectadas por autoradiografía del gel negativo. Posteriormente se recuperan las bandas del gel positivo y se identifican por espectrometría de masas.

Shokat y colaboradores modificaron tirosin-cinasas por mutagénesis dirigida el sitio de unión al ATP para formar espacios o cavidades mayores que no están presentes en ninguna cinasa silvestre. En la proteína v-Src, la mutación silenciosa de un aminoácido grande por uno pequeño permitió realizar este primer objetivo. La mutación de la isoleucina 338 por glicina (I338G) generó una cavidad que no afectó la actividad enzimática y que le confirió alta sensibilidad a nuevas moléculas. Dichas moléculas son sustratos muertos u ortólogos para las cinasas silvestres. Las moléculas fueron diseñadas por derivatizaciones de la molécula de PP1, un inhibidor selectivo de proteínas de la familia de cinasas Src.

Con el alineamiento de las secuencias de varias proteínas cinasas Shokat y colaboradores dedujeron que el cambio equivalente (en esta posición) en otras familias de cinasas puede también conferirles sensibilidad a estas moléculas modificadas⁵⁴. Con base

en esto, utilizaron proteínas de diferentes familias y generaron una serie de proteínas mutantes (Fig.1.9)

Proteína Cinasa	Familia	Especificidad	Función celular	Alineación con respecto a I338 de v-Src
v-Src	Src	Tirosina	Oncogén	332 E P I Y I V I E Y M S K
c-Fyn	Src	Tirosina	Activación linfocítica	333 E P I Y I V T E Y M N K
c-Abl	Abl	Tirosina	Transcripción	309 P P F Y I I T E F M T Y
CAMK II α	Depend/calcio	Ser/treonina	Memoria	383 G H H Y L I T D L V T G
CDK2	Depend/ ciclina	Ser/treonina	Ciclo celular	74 N K L Y L V F E F L H Q
CDC28	Depend/ ciclina	Ser/treonina	Ciclo celular <i>S. cerevisiae</i>	74 H K L Y L V F E F L D L
Fus3	Activ/Mitogénicos	Ser/treonina	Apareamiento <i>S. cerevisiae</i>	97 N E V Y I I Q E L M Q T

Figura 1.9 Proteínas cinasas seleccionadas por Shokat y colaboradores. Alineación parcial de la secuencia de proteínas cinasas con respecto a I338 de la proteína v-Src. En el recuadro se marcan los residuos correspondientes a dicha posición que en general son residuos voluminosos que fueron mutados por residuos pequeños.

Los aminoácidos equivalentes en la posición 338 de la proteína v-Src se mutaron por residuos pequeños (alanina o glicina) en las proteínas cinasas seleccionadas para generar cinasas mutantes con una nueva superficie de interacción (Fig.1.9).

Diseño del inhibidor

Con las estructuras tridimensionales de algunas cinasas y utilizando programas de modelaje molecular, Shokat y colaboradores obtuvieron imágenes de las orientaciones más probables de inhibidores de cinasas en los sitio de unión de las enzimas⁴¹ (Fig. 1.10A). La estructura de la proteína CDK2 permitió comparar la orientación de la estaurosporina (inhibidor potente de cinasas) y de una molécula ortóloga diseñada (9-bencilestaurosporina) estableciendo que la mutación F80G en la proteína CDK2 (equivalente a I338 en v-Src) permite adaptar la molécula 9-bencilestaurosporina. El espacio o cavidad que se origina con la mutación se ocupa por el grupo aromático de la molécula diseñada (Fig. 1.10A y B).

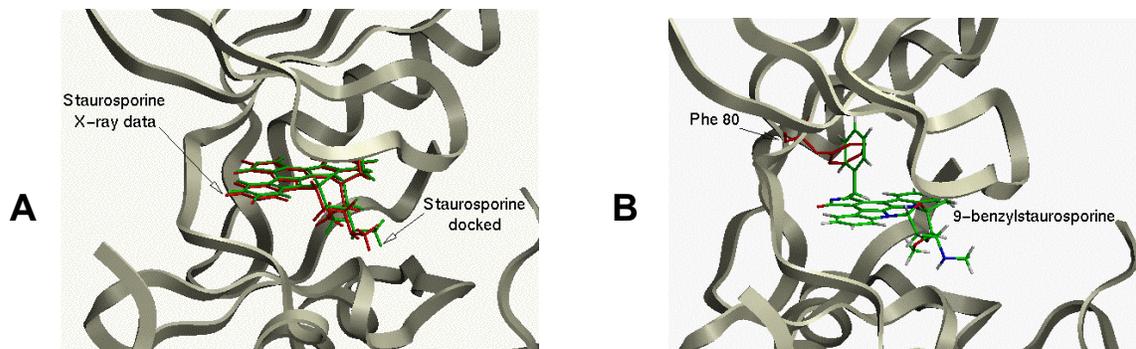


Figura 1.10. Orientación de ligandos en el sitio activo de CDK2. **A.** Orientación de la estaurosporina. La estructura modelada (verde) complementa correctamente con la estructura obtenida por rayos X (rojo) en el sitio activo de la proteína silvestre. **B.** Orientación de la 9-

bencilestaurosporina (verde) en el sitio activo de CDK2. Se observa claramente que el grupo bencilo de la F80 (en rojo) de la proteína y el de la 9-bencilestaurosporina (en verde) ocupan el mismo espacio.

Con estas observaciones Shokat y colaboradores diseñaron 10 moléculas análogas utilizando como estructura general una molécula de pirazolo pirimidina (Fig. 1.11a) a la cual se le hicieron derivatizaciones en el carbono 3 (C3)^{51, 52} (Fig. 1.11b).

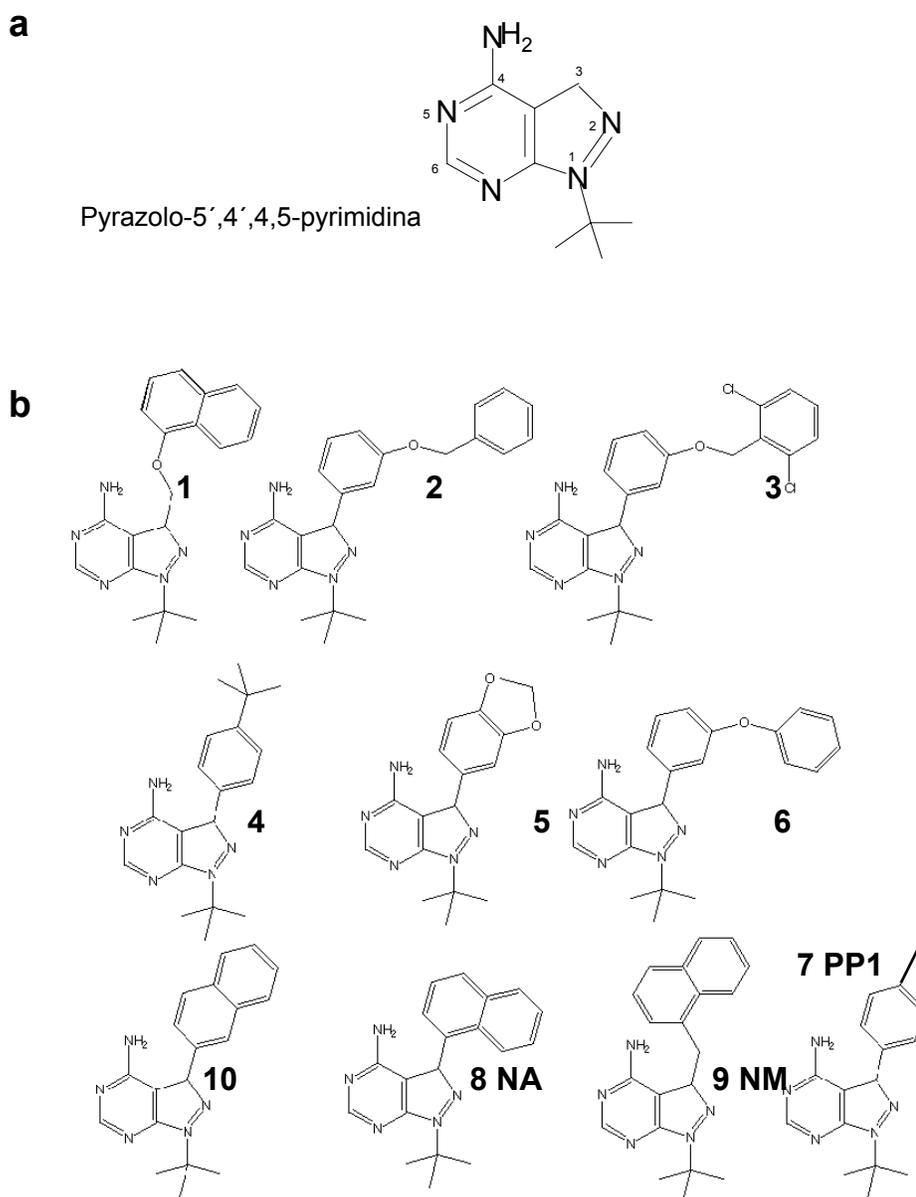


Figura 1.11. **a.** Esqueleto de la molécula de pirazolo pirimidina. **b.** Estructura de ligandos análogos producto de la derivatización del C3 de la molécula de pirazolo pirimidina. Los grupos aromáticos adicionados en el C3 del esqueleto de pirazolo pirimidina se diseñaron para ocupar el espacio que se origina con la mutación puntual en las cinasas.

Para evaluar la sensibilidad de las proteínas mutantes a estos inhibidores análogos se realizaron ensayos enzimáticos de fosforilación e inhibición con las enzimas silvestres y mutantes purificadas utilizando ATP γ^{32} y la proteína histona H1 como sustratos. Los resultados mostraron que los inhibidores 8 (NA) y 9 (NM) presentaron una mayor afinidad por las cinasas mutantes evaluadas^{52, 54} (Fig. 1.12).

El valor IC₅₀ comparado entre la cinasas silvestres y mutantes mostraron una amplia diferencia de hasta tres ordenes de magnitud. Esto sugiere que aunque las enzimas silvestres se unen a las moléculas ortólogas (en unidades μ molares) hay una inhibición específica de las cinasas mutantes a muy bajas concentraciones, lo que refleja una alta afinidad y selectividad de los análogos por el sitio modificado (orden nanomolar)⁵⁴.

Es importante señalar que aunque PP1(7) es un inhibidor selectivo de cinasas de la familia Src, se encontró que la mutación puntual a las cinasas analizadas les confiere una más alta sensibilidad específica por este inhibidor.

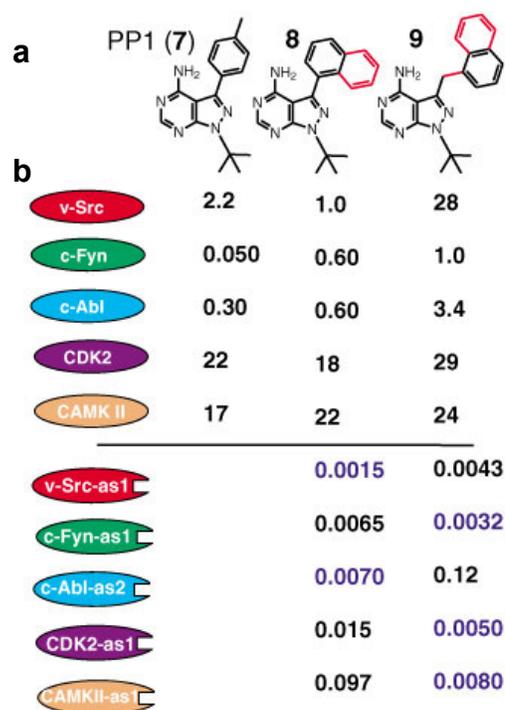


Figura 1.12. Estructura química de los inhibidores análogos y el IC₅₀ (μ M). **a.** estructura química del inhibidor PP1(7), el inhibidor análogo NA (8) y el inhibidor análogo NM (9). **b.** Valores del IC₅₀. En el panel superior se muestra el IC₅₀ para las enzimas silvestres y en el panel inferior se muestra el IC₅₀ para las mutantes. El inhibidor PP1 se une con una mayor afinidad a las enzimas mutantes que a las silvestres (resultados no mostrados).

Con esta estrategia se ha logrado identificar y validar los sustratos de algunas cinasas y/o definir su participación en algunas vías de señalización^{41, 55-57,77}.

IDENTIFICACIÓN DIRECTA DE SUSTRATOS DE CINASAS

Además de los inhibidores ortólogos, se ha diseñado y sintetizado un nucleótido modificado que funciona como el ATP sustrato, el N6-bencil ATP, (Fig. 1.13a) el cual es sustrato único de las enzimas cinasas modificadas^{61-64,67}. El grupo aromático adicionado a la molécula ocupa el espacio que se genera con las mutaciones descritas anteriormente, de tal manera que se obtiene un ATP sustrato que le permite a la cinasa mutante llevar a cabo su actividad. Además, si el N6-bencil ATP presenta el fosfato γ radioactivo, facilita la identificación directa de los sustratos que son fosforilados por la cinasa (Fig. 1.13b).

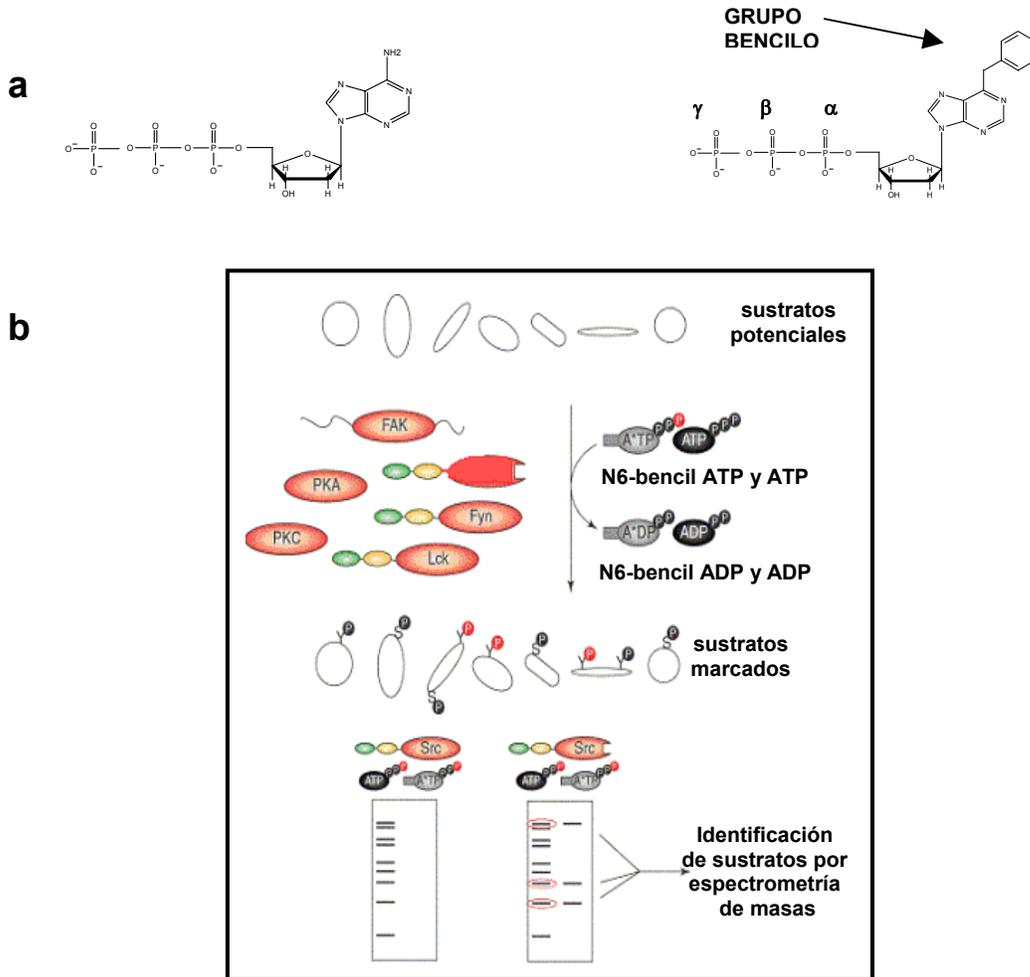


Figura 1.13. Marcaje directo de sustratos con el ATP modificado. **a.** Estructura química del ATP y del N6-bencil ATP. La estructura es similar al ATP pero presenta una derivatización en el C6 con un grupo bencilo. El fosfato γ puede estar marcado radiactivamente. **b.** Identificación directa de sustratos. Empleando cinasas modificadas que utilizan al nucleótido ortólogo (N6-bencil ATP γ ³²P) permite marcar los sustratos directos de la enzima. La reacción se realiza en presencia del ATP ortólogo marcado que sólo se reconoce por la enzima modificada. Después de la separación de proteína en geles de una o dos dimensiones, las proteínas radiomarcadas son detectadas por autoradiografía, recuperadas del gel e identificadas por espectrometría de masas.

Aplicando esta estrategia químico-genética en la que se crea una nueva área de interacción entre el ligando y la enzima se puede estudiar el papel de las cinasas y buscar sustratos endógenos. Esta estrategia ya se ha utilizado para identificar algunos sustratos de diferentes proteínas cinasas^{65,66,75,76,78}.

1.5.3 ANÁLISIS DE LA CINASA CDC28 MUTANTE

La cinasa CDC28 es la enzima encargada de regular las fases de ciclo celular en *S. cerevisiae*^{68, 69, 70}. Considerando que CDC28 tiene un 62% de identidad con CDK2, Shokat y colaboradores supusieron que la mutante de CDC28 era igualmente susceptible a los análogos del inhibidor PP1.

Con la mutación F80G de CDC28 se originó la cinasa mutante CDC28-as1. Con la enzima purificada se observó que era altamente sensible al inhibidor ortólogo NM (9). (IC₅₀ = 3 nM para CDC28-as1 y 44000 nM para CDC28). El cambio F80G resultó en una mutante que presentó una alta afinidad y especificidad por el inhibidor análogo diseñado NM⁵⁴.

El grupo de Shokat evaluó el ciclo celular en *S. cerevisiae* con células transformadas con CDC28-as1 y analizando la inhibición *in vivo*, los resultados fueron los siguientes:

En condiciones normales las células con la proteína mutante mostraron viabilidad normal y perfiles similares de DNA con respecto a una cepa silvestre. Se presentó una diferencia mínima en el crecimiento de las células con la proteína mutante, como consecuencia de que CDC28-as1 tiene una constante catalítica (*K_{cat}*) seis veces menor a CDC28 silvestre⁵⁴.

Utilizando el inhibidor NM (9), el grupo de Shokat mostró que a una concentración de 500 nM del compuesto no hay efectos significativos en la fisiología de las células con la proteína silvestre, y que las células con CDC28-as1 con 50 nM presentan una inhibición de crecimiento del 50% y que con 500 nM se produce una inhibición completa de crecimiento.

1.6 LA PROTEÍNA CDC2

En eucariontes superiores la proteína CDC2 también llamada CDK1, controla la salida de G2 y la entrada a la fase mitótica uniéndose a la ciclina A y posteriormente a lo largo de la fase M uniéndose a la ciclina B. Se sabe que la activación del complejo CDC2/ciclina B juega un papel crucial en el establecimiento de la mitosis, así como en la regulación de eventos mitóticos subsecuentes tales como separación del centrosoma, condensación de los cromosomas, ruptura de la membrana nuclear, y reorganización microtubular, en estos eventos se encuentra activa fosforilando diferentes proteínas⁷². Por ejemplo, el complejo CDC2 /ciclina B fosforila la lámina nuclear que conduce a su desensamblaje, un evento importante en el inicio de la ruptura de la membrana nuclear. Además, el complejo se ha localizado asociado con el aster y huso mitótico y está involucrado en el rearrreglo de los microtúbulos durante la mitosis fosforilando proteínas en los cuerpos polares del huso⁷³.

1.6.1 SUSTRATOS DE LA PROTEÍNA CDC2

Como se muestra en la figura 1.5 CDC2 forma heterodímeros con ciclina A y B. Las diferencias en la actividad de estos complejos no han sido evaluadas, sin embargo ambos complejos presentan una preferencia por sustratos con secuencia S/T-P-X-K/R. Actualmente han sido pocos los sustratos identificados para el complejo CDC2/ciclina A. Esto se debe posiblemente al poco tiempo que ambas proteínas forman este complejo.

Algunos de los principales sustratos que se han identificado para el complejo CDC2/ciclina B incluyen a la proteína histona H1, a la lámina nuclear, la misma ciclina B, a algunos tipos de microtúbulos y filamentos intermedios. Estos sustratos en general también participan en la fase de mitosis. Los sustratos identificados para CDC2 en eucariotes superiores se muestran en el Apéndice 1.

Hay poca evidencia que considere una relación funcional entre el evento mitótico y la fosforilación de sustratos del complejo CDC2⁷⁴. Por lo tanto, la identificación de sustratos fisiológicos de los complejos CDC2/ciclina B y CDC2/ciclina A y la comprensión de la regulación espacio-temporal de la interacción CDC2/ciclina B-A permanecen como metas importantes a cumplir, así como el mecanismo por el cual estos complejos inician la mitosis y permiten los subsecuentes eventos del ciclo celular.

De acuerdo con estos antecedentes y con la alta homología que presentan CDC28 de *S. cerevisiae* y CDC2 de mamífero (62%) se plantea en este trabajo la obtención de una enzima CDC2 mutante (F80G) y la inhibición de su actividad con los inhibidores PP1 y NM.

2. HIPÓTESIS

Una proteína cinasa CDK con la mutación silenciosa F80G le conferirá sensibilidad específica a una molécula inhibidora que complementa la mutación.

3. OBJETIVO

Crear una nueva superficie de interacción entre una proteína CDK y moléculas ortólogas para inhibir la actividad de cinasa de forma específica *in vitro*

ESTRATEGIA

- I. Realizar la síntesis química de los inhibidores PP1 y NM.
- II. Realizar la mutación F80G de la enzima CDC2 y clonar el gen silvestre y el mutante en un vector de expresión.
- III. Transfectar células de mamífero con las versiones silvestre y mutante de CDC2.
- IV. Obtener los complejos CDC2/ciclina activos e inhibir selectivamente la actividad de cinasa con los inhibidores PP1 y NM.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 SÍNTESIS DE LOS INHIBIDORES PP1 y NM

La estrategia general para la síntesis del inhibidor PP1 (4-amino-1-tertbutil-3-(p-metilfenil)pirazolo [3,4-d pirimidina]) y del inhibidor análogo NM (4-amino-1-tertbutil-3-(1-naftilmetil)pirazolo [3,4-d pirimidina]) involucró procedimientos establecidos para generar pirazoles tetrasustituídos⁷⁹. Todos los reactivos utilizados en la síntesis fueron adquiridos en FLUKA y utilizados sin ningún tratamiento a menos que se indique lo contrario.

Para sintetizar el inhibidor PP1 se partió del cloruro de toluilo (Fig.4.1a) y para la síntesis del NM se utilizó cloruro de naftilacetilo que al no conseguirse comercialmente tuvo que ser sintetizado. (Fig.4.1b).

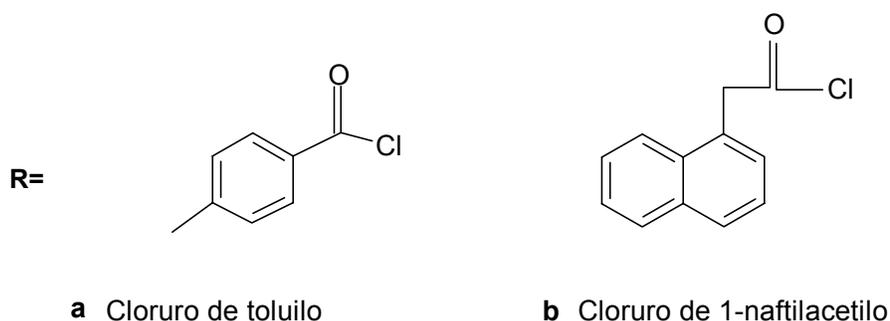


Figura 4.1 Estructura química de los grupos sustituyentes para el C3.

SÍNTESIS DEL CLORURO DE 1-NAFTILACETILO

En atmósfera inerte de N₂, a 75 ml de benceno seco se adicionaron 16 mmol de ácido 1-naftilacético (SIGMA) y 16 mmol de pentacloruro de fósforo. La solución resultante se agitó a 50°C por 12 horas. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y el disolvente se evaporó a presión reducida. El aceite resultante se destiló al vacío para obtener el cloruro de 1-naftilacetilo como un aceite amarillo claro que se caracterizó por sus propiedades espectroscópicas comparadas con las descritas en la literatura⁸⁰ (Fig. 4.2).

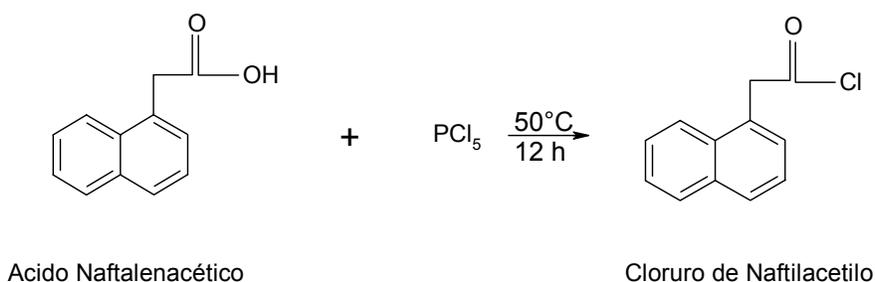


Figura 4.2. Esquema de reacción y estructura química de los sustratos para generar el cloruro de 1-naftilacetilo.

SÍNTESIS DE LOS INHIBIDORES PP1 Y NM

A 100 ml de tetrahidrofurano se adicionó 100 mmol de malononitrilo, 200 mmol de hidruro de sodio y 100 mmol del cloruro del ácido correspondiente. La mezcla se agitó por una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó 0.12 moles de sulfato de dimetilo (ALDRICH) y se refluxó por 2.5 horas. Se dejó enfriar y se adicionó 0.25 moles de trietilamina y 0.1 moles de clorhidrato de tert-butil hidracina. Se calentó a reflujo por 1.5 horas. Se evaporó el disolvente y la mezcla resultante se extrajo con agua y acetato de etilo (3 x 150 ml). Se secó la fase orgánica con $MgSO_4$, se filtró y concentró el disolvente. El residuo resultante se aplicó en una columna de sílica de malla 70 eluyendo con una mezcla de éter de petróleo y acetato de etilo (1:1). Las fracciones conteniendo el producto (cromatografía en capa fina) se reunieron, se concentraron y por cada gramo de éste se agregaron 15 ml de formamida reflujiéndose por 3.5 horas. La mezcla de reacción se enfrió, se le adicionó agua y se colectó el precipitado, posteriormente se redisolvió en etanol caliente y se decoloró con carbón activado. Finalmente el etanol se evaporó para obtener el compuesto puro. Los productos fueron caracterizados por comparación de sus propiedades espectroscópicas con las reportadas en la literatura. La pureza se determinó mediante HPLC.

(Fig. 4.3).

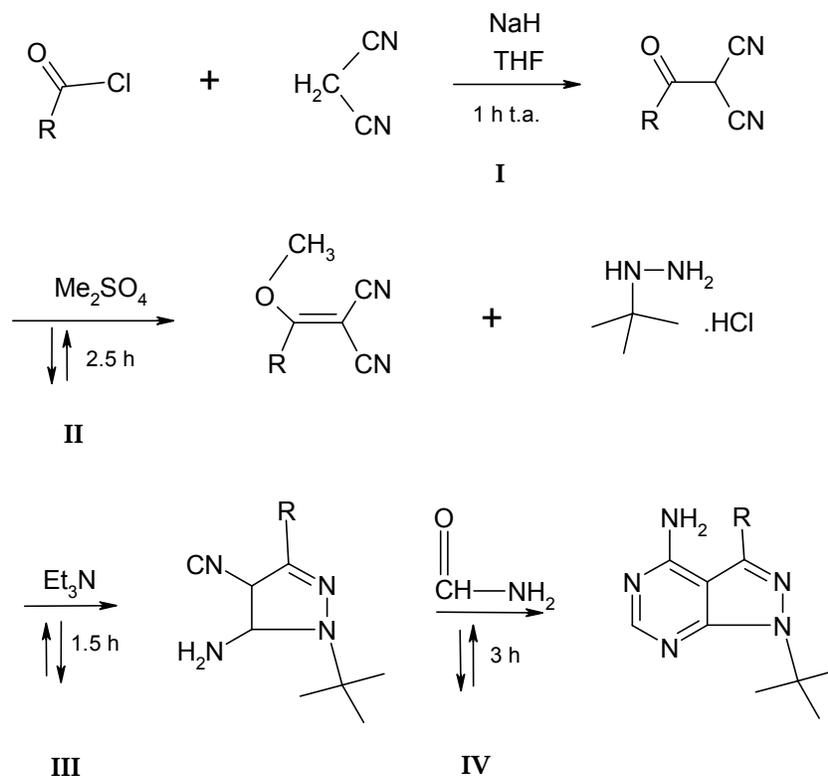


Figura 4.3 Esquema de reacción para sintetizar los inhibidores PP1 y NM. **I.** El cloruro correspondiente, malononitrilo e hidruro de sodio en THF, 1h a temperatura ambiente. **II** Adición de sulfato de dimetilo en reflujo, 2.5 h. **III.** Adición de trietilamina y clorhidrato de tert-butil hidracina a reflujo, 1.5 h. **IV.** Adición de formamida y reflujo, 3.5 h.

4.2. CLONACIÓN Y MUTAGÉNESIS DEL GEN *cdc2*

CLONACIÓN DEL GEN *cdc2*

El plásmido pTZ18R (ATCC) portador del gen silvestre *cdc2* se incubó con la enzima Eco RI (GIBCO BRL) para obtener la secuencia del gen *cdc2* de 1.2 kb. Este fragmento se clonó en el plásmido pCLNRXGFP para originar el plásmido pCLNRXGFP-*cdc2*, con éste vector se transformaron bacterias TOP´10. Las colonias transformantes se seleccionaron en placas de agar con ampicilina (100µg/ml) (SIGMA)

MUTACIÓN PUNTUAL F80G DEL GEN *cdc2*

El gen mutante *cdc2F80G* se construyó por mutagénesis dirigida con la técnica de PCR, utilizando el gen *cdc2* silvestre como templado y los oligonucleótidos mutagénicos F80G: 5´gtatctcatcggagagttcctgt 3´sentido y 5´acaggaactctccgatgagatac 3´antisentido.

La introducción de una mutación puntual requiere de tres reacciones de PCR. En la primera (PCR1), se amplifica la parte del gen flanqueada por el oligonucleótido sentido externo y el oligonucleótido mutagénico antisentido, en la segunda reacción (PCR2) se amplifica el resto del gen con el oligonucleótido mutagénico sentido y el oligonucleótido externo antisentido. En la tercera reacción (PCR3) se combinan los productos del PCR1 y PCR2, los cuales hibridan en la parte complementaria para lograr la amplificación total del gen mutado utilizando los oligonucleótidos externos sentido y antisentido.

CLONACIÓN DEL GEN *cdc2F80G*

Una vez obtenidos los productos del PCR 3 se procedió a realizar la clonación en el vector pCLNRXGFP. El gen mutante se clonó en el vector pCLNXGFP para producir el plásmido pCLNXGFP-*cdc2F80G*. Con este vector se transformaron bacterias TOP´10. Las colonias transformantes se seleccionaron en placas de agar con ampicilina (100 µg/ml).

La secuencia nucleotídica del gen, la mutación puntual y la dirección del gen en el vector se confirmaron por secuenciación.

4.3. CO-TRANSFECCIÓN CELULAR

CULTIVOS CELULARES

Las líneas celulares 293T y STO se cultivaron en medio de cultivo definido MEM y DMEM respectivamente (GIBCO, USA), suplementado con 5% de suero de ternera y 5% de suero fetal de bovino (GIBCO), antibióticos (penicilina y estreptomycin) y antimicóticos

(anfotericina B) y 2 mM de glutamina (GIBCO, USA). Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire y de humedad saturada.

GENERACIÓN DE PARTÍCULAS RETROVIRALES CON EL ADN COMPLEMENTARIO cdc2 Y cdc2F80G.

La línea celular 293-T se co-transfectó con la técnica de fosfato de calcio con los plásmidos pCLNRXGFP con o sin transgen (pCLNRXGFP-*cdc2* y pCLNRXGFP-*cdc2F80G*) y el plásmido pCLNECO.

Se utilizó un kit de transfección con fosfato de calcio (Invitrogen) siguiendo las instrucciones de manufactura. Se transfectaron en placas de 6 pozos 3 x 10⁵ células por condición, 1) sin el gen o plásmido vacío, 2) con el gen silvestre y 3) con el gen mutante. Se dejaron incubando 24 horas y posteriormente se les cambio el medio de cultivo. La cosecha de partículas virales en el medio de cultivo de las células 293T se realizó a las 48 horas post- transfección.

INFECCIÓN DE LAS CÉLULAS STO CON LAS PARTÍCULAS RETROVIRALES

El medio de cultivo recuperado de las células 293T se centrifugó a 15000 rpm por 15 min. El sobrenadante se mezcló con un volumen de medio de cultivo suplementado y se adicionó a las células STO. La infección se confirmó 24 horas post-infección observando la fluorescencia de la GFP en microscopio confocal y posteriormente se les cambió el medio de cultivo.

4.4. CITOMETRÍA DE FLUJO

EFICIENCIA DE INFECCIÓN

Las células STO infectadas se incubaron con medio de cultivo suplementado y posteriormente se despegaron con tripsina 0.1% en verseno y se centrifugaron a 1300 rpm por 5 min. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se lavaron 2 veces con 1 ml de solución de fosfatos (PBS). Al final se resuspendieron en 1 ml de PBS. Se evaluó la

fluorescencia de las células en citómetro de flujo (FACScalibur, Becton Dickinson), utilizando células STO no infectadas como control. Se colectaron 1×10^4 eventos por cada condición. La adquisición y el análisis de los datos se realizó con el programa Cellquest en el canal de emisión de 530 nm (FL2-H). Los datos se presentan como histogramas de los eventos fluorescentes.

CICLO CELULAR

Las células se sembraron en cajas petri de 60 mm de diámetro (27 cm^2) a una densidad celular de 1×10^4 células/ cm^2 . Al siguiente día las células se despegaron con tripsina al 0.1% en verseno, y se centrifugaron por 5 min a 14000 rpm. Las células se lavaron con PBS 2 veces. Posteriormente, se extrajeron los núcleos y se tiñó el ADN con yoduro de propidio (IP), utilizando el kit Cycletest™ (Becton Dickinson) siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante. El contenido de ADN de los núcleos se evaluó por citometría de flujo. Se colectaron 1×10^4 eventos por cada condición y se utilizaron células STO no infectadas como control. La adquisición y el análisis de los datos se realizó con el programa Cellquest en el canal de emisión de 585 nm (FL2-A). Los datos se presentan como histogramas de los eventos fluorescentes.

4.5. WESTERN BLOT

Las células STO cultivadas en cajas de 60 mm se lavaron 2 veces con PBS, y se lisaron en un amortiguador de lisis conteniendo inhibidores de proteasas: 10 $\mu\text{g/ml}$ de leupeptina, 10 $\mu\text{g/ml}$ de aprotinina y 1 mM de PMSF (SIGMA, USA). Las células se rasparon con un gendarme y se centrifugaron a 14000 rpm durante 15 min a 4°C. Posteriormente se colectó el sobrenadante.

Se cuantificó la concentración de proteína por el método de Bradford, utilizando albúmina bovina como estándar. Después, se separaron 20 μg de proteína de cada condición en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE al 12%). Las proteínas separadas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (MSI, USA). Las membranas se bloquearon por 1 h con TBS-Tween 0.1% conteniendo 5% de leche descremada. Posteriormente se incubaron durante 1.5 h con los anticuerpos correspondientes; anti-CDC2 monoclonal (1:200), anti-CDK2 monoclonal (1:200), anti-Ciclina A monoclonal (1:200), anti-Ciclina B policlonal (1:500) (todos de Santa Cruz Biotechnology, USA). Posteriormente se lavaron las membranas 3 veces durante 15 min con TBS-Tween-leche y se incubaron con anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (1:1000). Las proteínas se evidenciaron por la quimioluminiscencia de la reacción de la peroxidasa con el luminol (Supersignal, Pierce, GB).

4.6.1 ACTIVIDAD DE CINASA

INMUNOPRECIPITACIÓN

Las células cultivadas en cajas de 60 mm se lavaron 2 veces con PBS, y se lisaron en un amortiguador de inmuno-lisis conteniendo fosfoaminoácidos e inhibidores de proteasas: 10 µg/ml de leupeptina, 10 µg/ml de aprotinina y 1 mM de PMSF (SIGMA, USA). Las células se rasparon con un gendarme y se centrifugaron a 14000 rpm durante 15 min a 4°C. Posteriormente se colectó el sobrenadante.

Al sobrenadante se le adicionó anticuerpo anti-CDC2 conjugado con proteína A-sefarosa. La mezcla fue incubada en agitación 12 horas a 4°C. Los inmunocomplejos se precipitaron por centrifugación y se lavaron 5 veces con el de inmuno-lisis.

ENSAYO DE CINASA

Los inmunocomplejos se resuspendieron en 20 µl de amortiguador de cinasa (50 mM de Tris-HCL pH 7.5, 10 mM de MgCl₂, 150 mM de NaCl, 1 mM de DTT, 5 mM de EGTA, 20 mM de ATP, 5 µCi de ATP (γ -³²P)). Como sustrato se utilizaron 5 µg de histona H1 (Calbiochem), y los inhibidores olomucina 60 µM y estaurosporina 1 µM (SIGMA). Los inhibidores PP1 y NM a 10 y 5 µM. La reacción se realizó a 30°C por 30 min. Para detener la reacción se adicionó buffer de cargado. Después de someter la muestra a ebullición por 5 min los productos de reacción se separaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE al 12%). Posteriormente los geles se secaron en un secador (BIORAD modelo 583). Los geles secos se colocaron en pantallas de fluor por 12 horas. La fosforilación de la proteína histona H1 se evidenció utilizando un detector de emisiones (Scanner Storm) por la emisión de radiación del fósforo radioactivo captada en la pantalla.

5. RESULTADOS

5.1. SÍNTESIS DE INHIBIDORES

Se utilizó la metodología para sintetizar pirazoles tetrasustituidos, en general esta síntesis involucró tres pasos. Primero, con los cloruros correspondientes, el malononitrilo y el clorhidrato de alquilhidrazina se logró preparar aminonitrilos en un sistema "one-pot". A continuación se purificaron parcialmente en una columna de sílica y posteriormente se convirtieron a pirazolopirimidinas utilizando formamida. Finalmente los inhibidores se purificaron por recristalización y filtración, esto se realizó tantas veces fue necesario hasta obtener el producto en forma de pequeños cristales blancos. Los inhibidores producidos se caracterizaron por métodos espectroscópicos (Fig. 5.1 y Apéndice II)

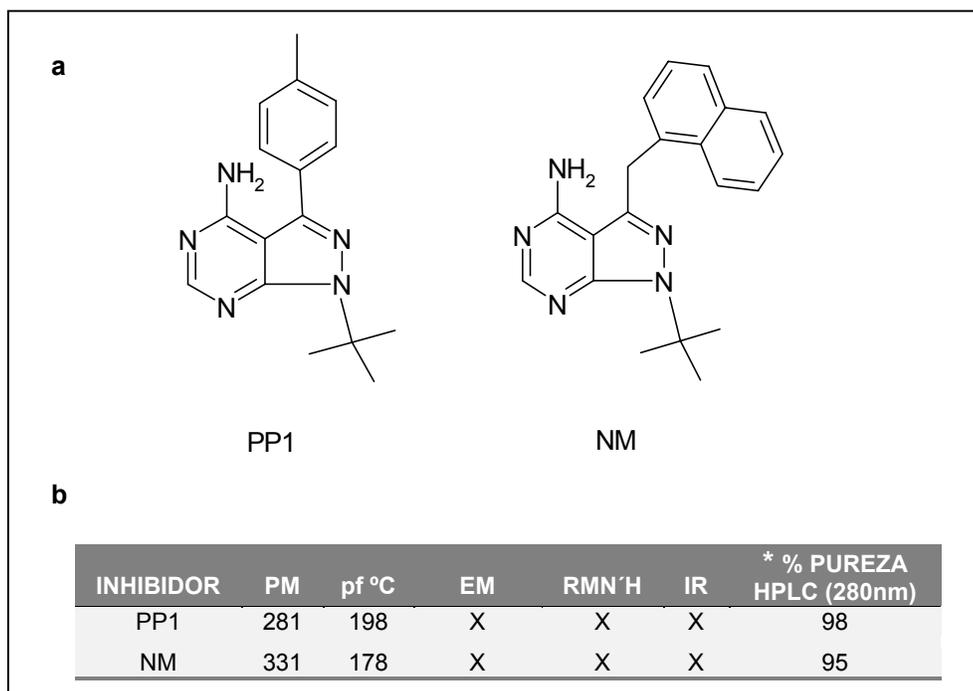


Figura 5.1. **a.** Estructura molecular de los inhibidores sintetizados. PP1. 4-amino-1-tert-butil-3-(p-metilfenil) pirazolo [3,4-d pirimidina], NM. 4-amino-1-tert-butil-3-(1-naftilmetil) pirazolo [3,4-d pirimidina]. **b.** Caracterización química de los inhibidores PP1 y NM. (PM) peso molecular, (pf) punto de fusión, (EM) espectrometría de masas, (RMNH) resonancia magnética nuclear de protones, (IR) espectrometría de infrarrojo, (*) porcentaje de pureza evaluada en HPLC a 280 nm.

5.2 MUTACIÓN Y CLONACIÓN DEL GEN *cdc2*.

Basados en los trabajos de Shokat y colaboradores en los que genera enzimas CDK2 y CDC28 mutantes funcionales, realizamos la mutación de gen *cdc2* en la posición 80, utilizando la técnica de PCR (Fig. 5.2).

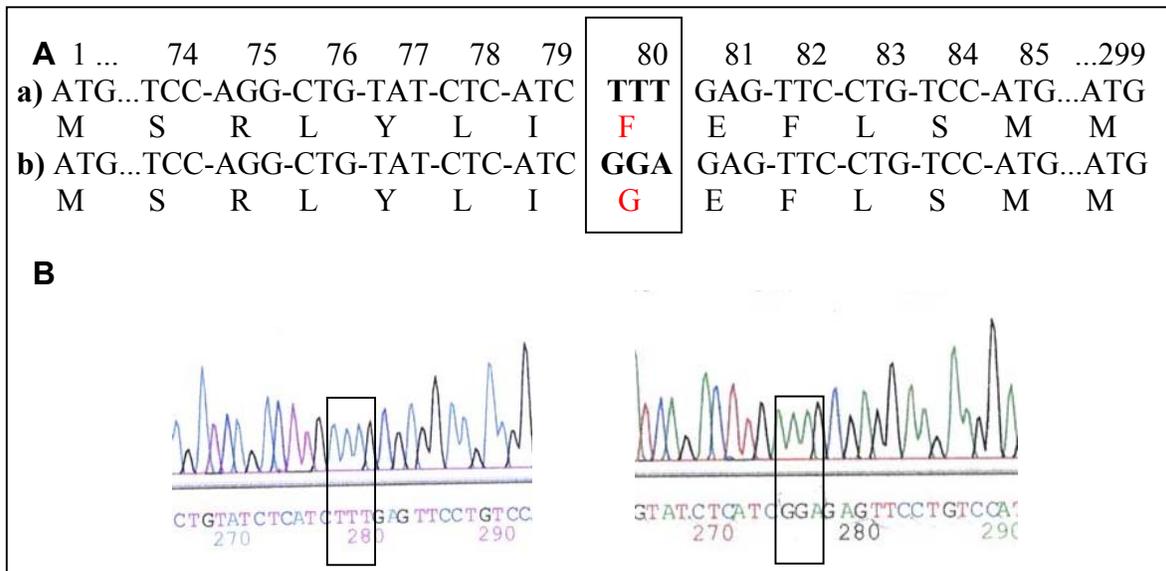


Figura 5.2 **A**. Secuencias nucleotídicas y de aminoácidos de CDC2 silvestre (**a**) y de CDC2 F80G (**b**). **B** Fluorograma de la secuenciación, 1. *cdc2* silvestre, 2. *cdc2F80G*. El codón de cambio se presenta en recuadro.

El gen silvestre *cdc2* y mutante *cdc2F80G* se clonaron en el sitio de multiclonación (MCS) del vector pCLNXGFP para producir los vectores pCLNRXGFP-*cdc2* y pCLNRXGFP-*cdc2F80G* respectivamente. Los genes quedaron bajo el promotor del citomegalovirus (CMV) (Fig. 5.3). La mutación puntual y la clonación de los genes se confirmaron por secuenciación y se verificó que efectivamente hay una mutación puntual en el triplete TTT que codifica para fenilalanina 80 por GGA que codifica para glicina.

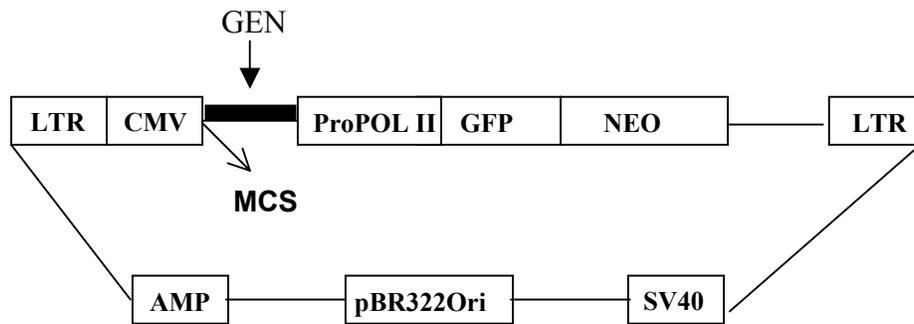


Figura 5.3. Mapa del plásmido PCLNRXGFP. **LTR**. Secuencia de inserción a capsido, **CMV**. promotor del citomegalovirus, **ProPOL II**. Promotor de la polimerasa II, **NEO**. Gen de resistencia a neomicina, **AMP**. Gen de resistencia a ampicilina, **pBR322Ori**. Origen de replicación, **MCS**. Sitio de multiclonación que presenta sitios de corte para las enzimas Eco R1, Bgl II, Xho 1, Nru 1 y Hind III.

5.3. CO-TRANSFECCIÓN CELULAR

La línea celular 293T se co-transfectó para producir partículas virales. El plásmido pCLNECO contiene los genes que codifican para las proteínas virales de la capsida y el pCLNRXGFP, contiene el gen de interés, bajo el promotor del CMV que es constitutivo y proporciona una transcripción constante. Así mismo, este plásmido presenta el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el promotor de la polimerasa II y esto permitió evaluar la eficiencia de transfección al observar la fluorescencia verde utilizando el microscopio confocal (Fig. 5.4).

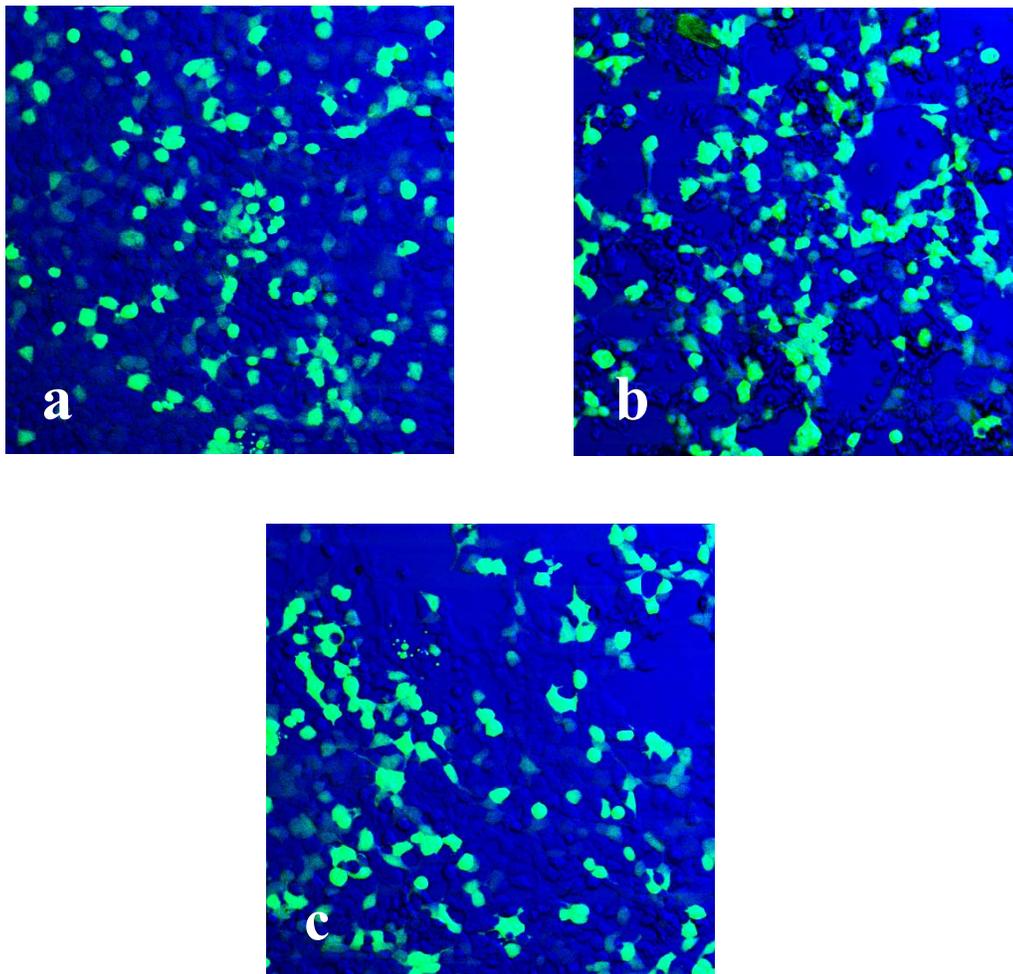


Figura 5.4 Co-transfección de células 293T formadoras de partículas retrovirales. Las células se transfectaron con la técnica de fosfato de calcio con los plásmidos pCLNECO y pCLNRXGFP con o sin inserto del gen *cdc2* y *cdc2F80G*. La fluorescencia de la GFP se usó como gen reportero. **a.** Células co-transfectadas con pCLNECO y pCLNRXGFP. **b.** Células co-transfectadas con pCLNECO y pCLNRXGFP-*cdc2*. **c.** Células co-transfectadas con pCLNECO y pCLNRXGFP-*cdc2F80G*.

Los ensayos de co-transfección mostraron la primera evidencia técnica de una co-transfección exitosa que es la observación de cristales precipitados en la caja petri (resultados no mostrados). A las 24 horas post-transfección se observaron las células 293T en el microscopio confocal confirmando la transfección por la expresión del gen reportero GFP. Se generaron tres tipos de partículas virales, el primero con el plásmido vacío (pGFP), el segundo con el plásmido con el gen *cdc2* y el tercero con el plásmido con el gen *cdc2F80G*. En las tres condiciones se observó una alta eficiencia (Fig 5.4).

5.4. INFECCIÓN CELULAR

EXPRESIÓN DE LA GFP EN CÉLULAS STO

La línea celular STO se infectó con las partículas virales recuperadas del medio de cultivo de las células 293T y 24 horas post-infección se observaron en el microscopio confocal confirmando la infección por la expresión del gen reportero GFP. La expresión de la GFP fue heterogénea o diferencial, es decir, hay de baja, media y alta intensidad de fluorescencia en las células infectadas.

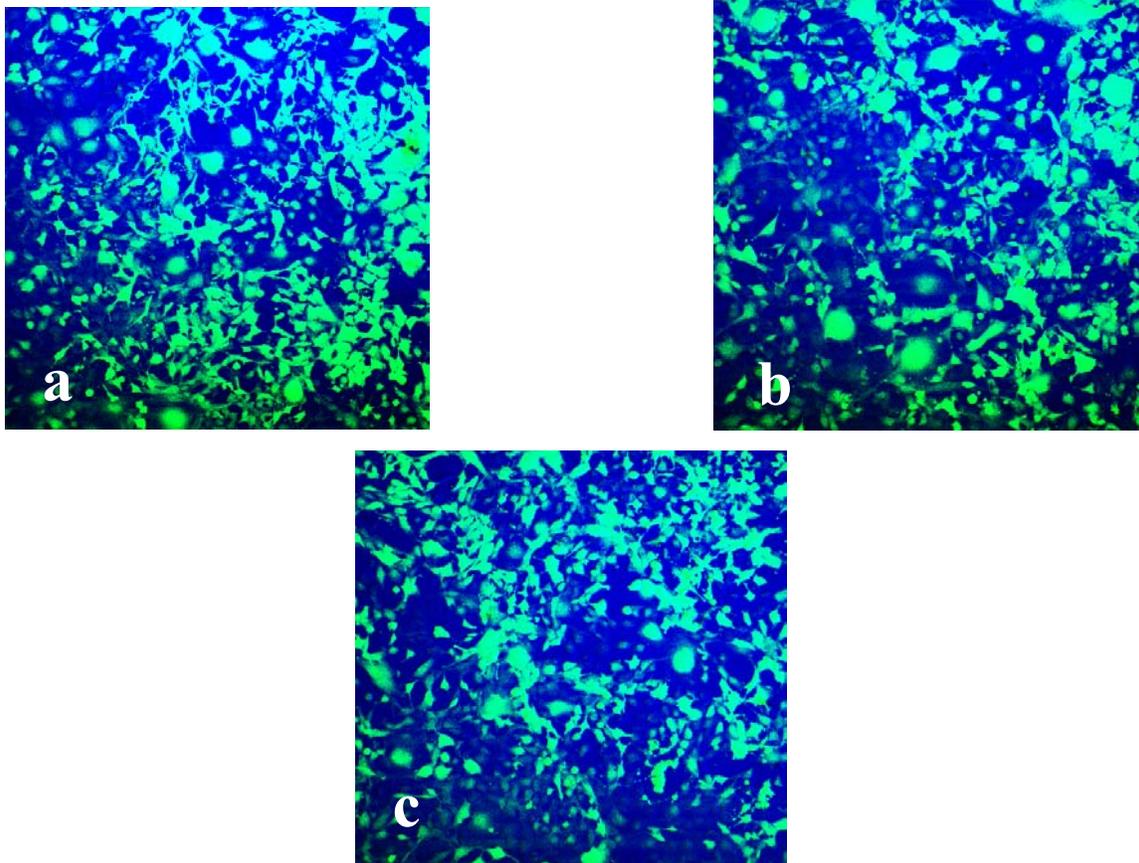


Figura 5.5. Expresión de la GFP en células STO infectadas. **a.** Células infectadas con partículas virales (pv) que contienen el transgen de pCLNXGFP sin inserto. **b.** Células

infectadas con pv que contienen transgen de pCLNXGFP-*cdc2*. **c.** Células infectadas con pv que contienen el transgen de pCLNXGFP-*cdc2F80G*.

EFICIENCIA DE INFECCIÓN EN CÉLULAS STO

Las células STO de las tres condiciones de infección presentaban una apariencia en tamaño y forma normal con respecto a células STO control que no se trataron con partículas virales (CTRL). Se determinó el porcentaje de células infectadas en las 3 condiciones evaluando las poblaciones fluorescentes en el citómetro de flujo. El porcentaje refleja la eficiencia de infección. Los resultados de este ensayo muestran que las tres poblaciones celulares presentan una eficiencia en promedio del 80% (Fig. 5.6). Este ensayo confirma los resultados obtenidos por microscopía confocal. Se pueden observar poblaciones heterogéneas en intensidad de fluorescencia.

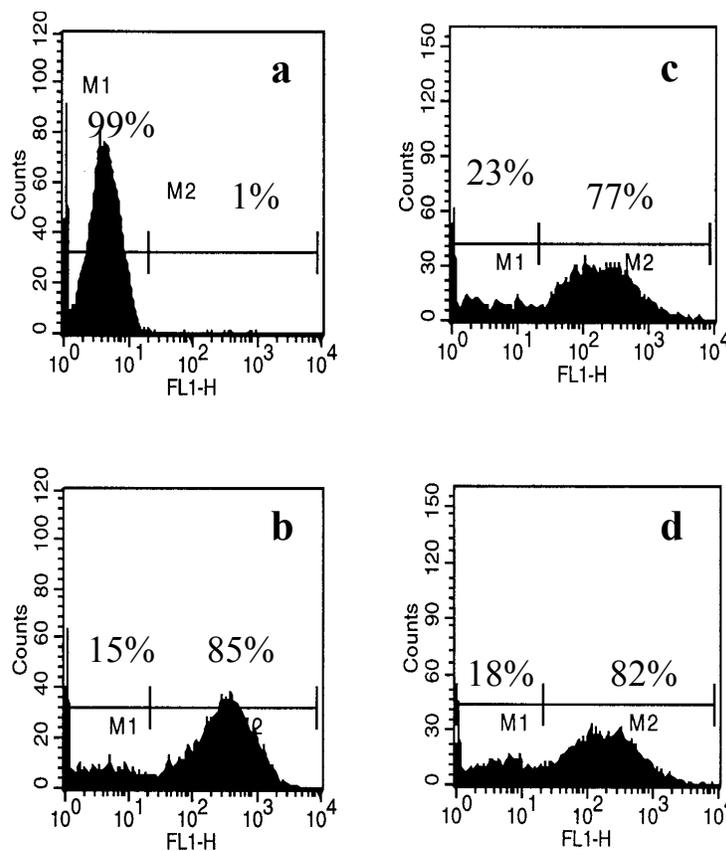


Figura 5.6. Eficiencia de infección porcentual de células STO. **a.** Células STO control no infectadas. **b.** Células infectadas con el transgen de pCLNRXGFP. **c.** Células infectadas con el transgen de pCLNRXGFP-*cdc2*. **d.** Células infectadas con el transgen de pCLNRXGFP-*cdc2F80G*. Los porcentajes se muestran en cada histograma. El eje de las X indica la intensidad de fluorescencia (FL1H), **M1**. Población no fluorescente, **M2**. Población fluorescente.

EFFECTO EN EL CICLO CELULAR

Considerando que CDC2 es una proteína reguladora del ciclo celular y que interviene particularmente en la fase S tardía y toda la fase M, analizamos si la sobreexpresión de las proteínas CDC2 silvestre, CDC2F80G y la GFP tienen algún efecto sobre la regulación o proliferación celular.

Se evaluó el contenido de ADN de las células STO infectadas de cada condición, así como de células control. La incorporación proporcional del Yoduro de propidio a los ácidos nucleicos permite delimitar la cantidad de ADN que tienen los núcleos individuales, es decir, en fase G₁ (M1), núcleos en replicación, o fase S (M2) y núcleos en las fases G₂ y M (M3). Los resultados presentados en forma histogramas se transformaron a porcentajes en el gráfico de barras (Fig. 5.7).

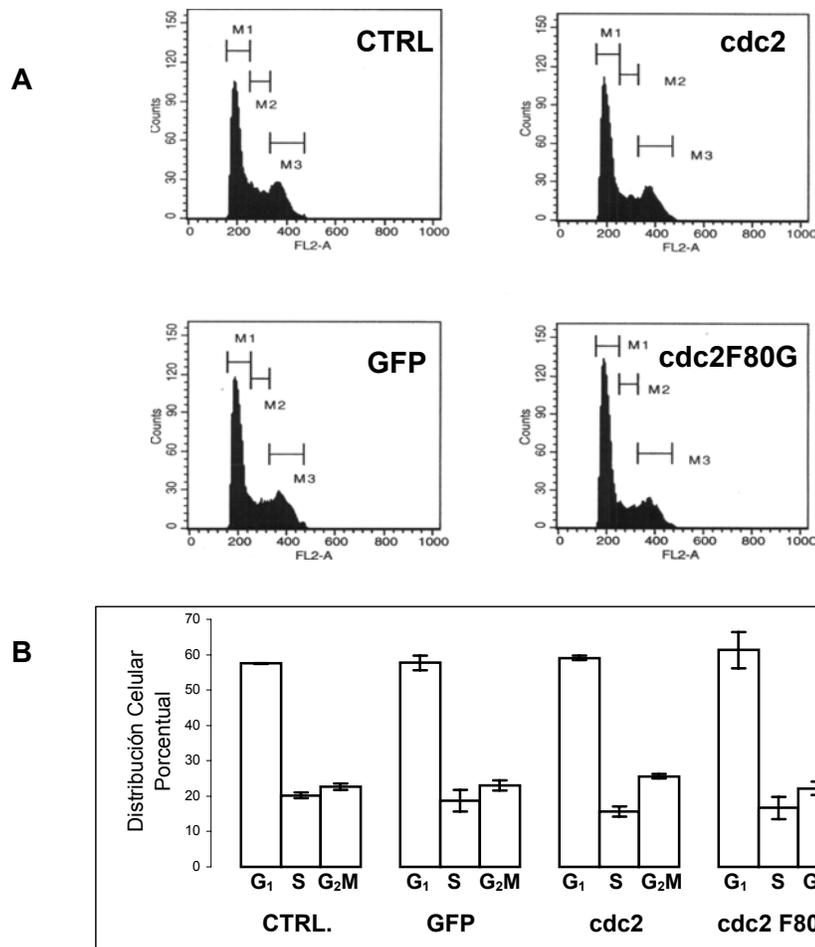


Figura 5.7. Efecto de la sobreexpresión de proteínas sobre la proliferación de células STO. **A.** Histograma de la distribución de fluorescencia del IP. El eje de las X indica la intensidad de fluorescencia del IP (FL2H) **B.** Gráfico de la distribución celular porcentual en las fases del ciclo celular. **CTRL.** Células no infectadas. **GFP.** Células infectadas con el transgen de pCLNRXGFP. **cdc2.** Células infectadas con el transgen de pCLNRXGFP-

cdc2. **cdc2F80G**. Células infectadas con el transgen de pCLNRXGFP-*cdc2F80G*. Promedio de tres ensayos.

5.5. EXPRESIÓN DE CDC2 y CDC2F80G

Para confirmar que efectivamente hay una sobreexpresión de la proteína silvestre y la mutante se obtuvieron extractos totales de proteína de las tres condiciones celulares y de las células control y se realizaron ensayos de western blot (Fig. 5.8).

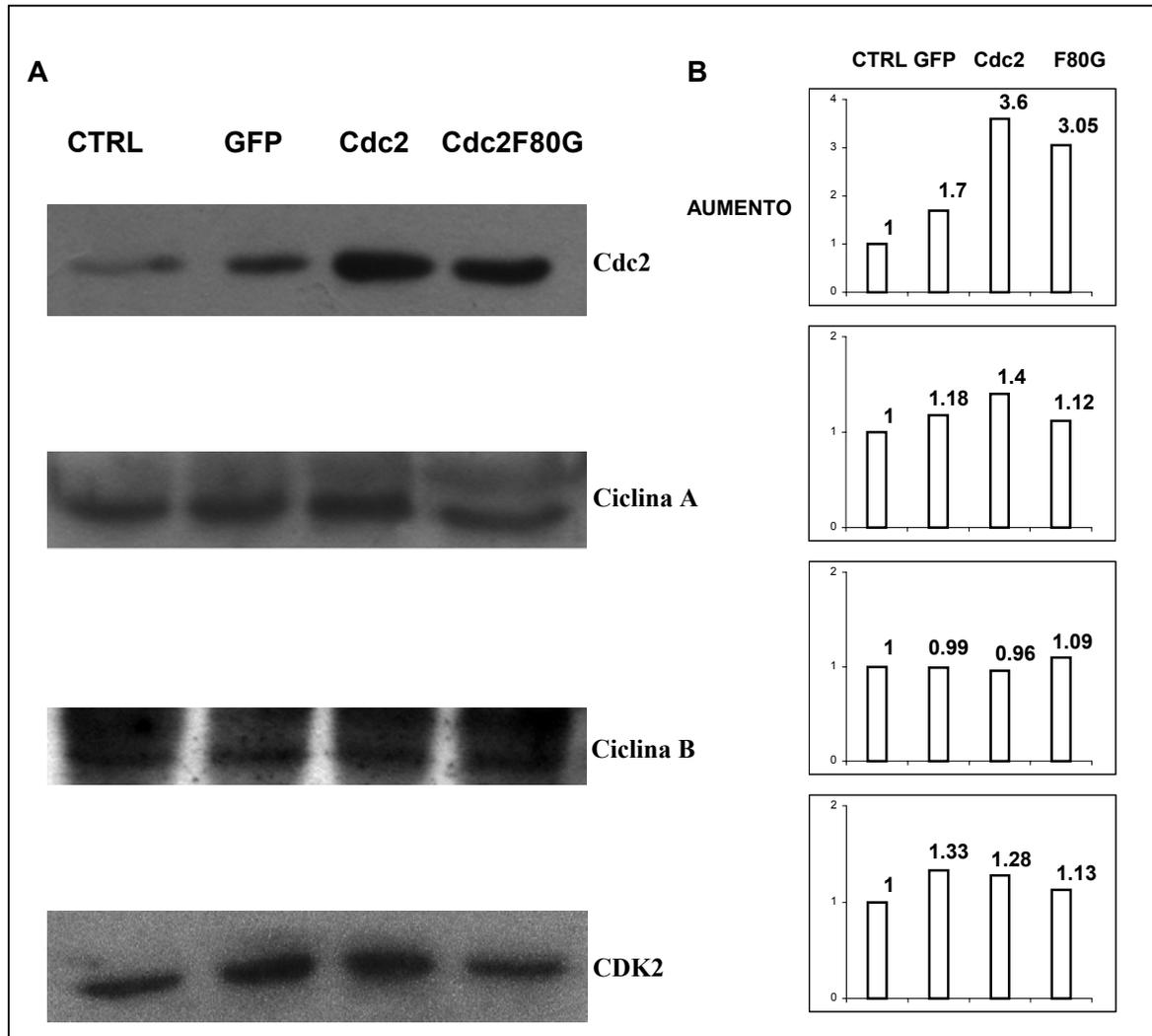


Figura 5.8 Expresión de CDKs y ciclinas en células STO. **A**. Western blot. **B**. Análisis densitométrico. **CTRL**. Células control no infectadas. **GFP**. Células infectadas con el transgen de pCLNRXGFP. **cdc2**. Células infectadas con el transgen de pCLNRXGFP-*cdc2*. **cdc2F80G**. Células infectadas con el transgen de pCLNRXGFP-*cdc2F80G*

Con el objetivo de investigar si la enzima CDC2 silvestre sobreexpresada se distribuye igual que la silvestre se realizó un ensayo de western blot para identificar la proteína en el núcleo y en el citoplasma de células infectadas. En este ensayo se observó que la proteína sobreexpresada se distribuye en las mismas proporciones que la enzima silvestre (resultados no mostrados).

Así mismo, para demostrar que la sobreexpresión de una CDK no afecta la expresión de sus proteínas reguladoras o de otras CDKs, se realizaron ensayos de western blot utilizando anticuerpos contra Ciclina A, Ciclina B y CDK2 (Fig. 5.8).

Los resultados muestran que hay una sobreexpresión de las proteínas CDC2 silvestre y CDC2F80G de al menos 2 veces, por lo tanto, efectivamente se sobreexpresan dichos genes. Es importante mencionar que también se presenta una mayor expresión en las células que tienen el plásmido vacío, sin embargo, este fenómeno ya se ha observado en el laboratorio con la transfección de genes como Bcl-2 e IKB α por ejemplo, tal parece que la infección o transfección con el pCLNXGFP genera una mayor expresión de algunos genes. Debido a esto podemos descartar la posibilidad de contaminación con los otros dos tipos celulares transfectados. Como se observa en la figura 5.8, solo hay sobreexpresión de CDC2 silvestre y mutante más no de las ciclinas A y B, las cuales son las parejas reguladoras de CDC2, además la sobreexpresión de CDC2 silvestre y de la CDC2F80G no modifica la expresión de otra CDK reguladora del ciclo como la CDK2.

5.6 ACIVIDAD DE CINASA DE LA PROTEÍNA CDC2

La cinasa CDC2 requiere unirse a la ciclina A o B y este heterodímero debe ser fosforilado en el asa-T para adquirir una forma activa. Con esta premisa y con la finalidad de mostrar que la proteína cinasa CDC2 es capaz de formar complejos y fosforilar sustratos, se evaluó la actividad de cinasa utilizando inmunoprecipitados de extractos celulares y la proteína histona H1 como sustrato, la cual es un blanco fisiológico de la enzima.

La sobreexpresión de la CDC2 y la inmunoprecipitación con anticuerpo monoclonal anti CDC2 permitieron obtener complejos activos de CDK/Ciclina que se confirmó con la fosforilación de histona H1 (Fig 5.9a).

De acuerdo con el objetivo de este trabajo primero se analizó la inhibición de la proteína CDC2 silvestre sobreexpresada con 2 inhibidores de cinasas de amplio espectro como la estaurosporina y la olomucina y de la misma forma se utilizó el inhibidor PP1 sintetizado (Fig 5.9a).

Este experimento permitió mostrar i) que la enzima sobreexpresada CDC2 silvestre es capaz de fosforilar un sustrato fisiológico, ii) que la enzima sobreexpresada CDC2 silvestre se inhibe por inhibidores de cinasas, iii) que la enzima sobreexpresada CDC2 silvestre no se afecta a concentraciones menores de 10 μ M de PP1 y que presenta un efecto de inhibición a una concentración de 25 μ M.

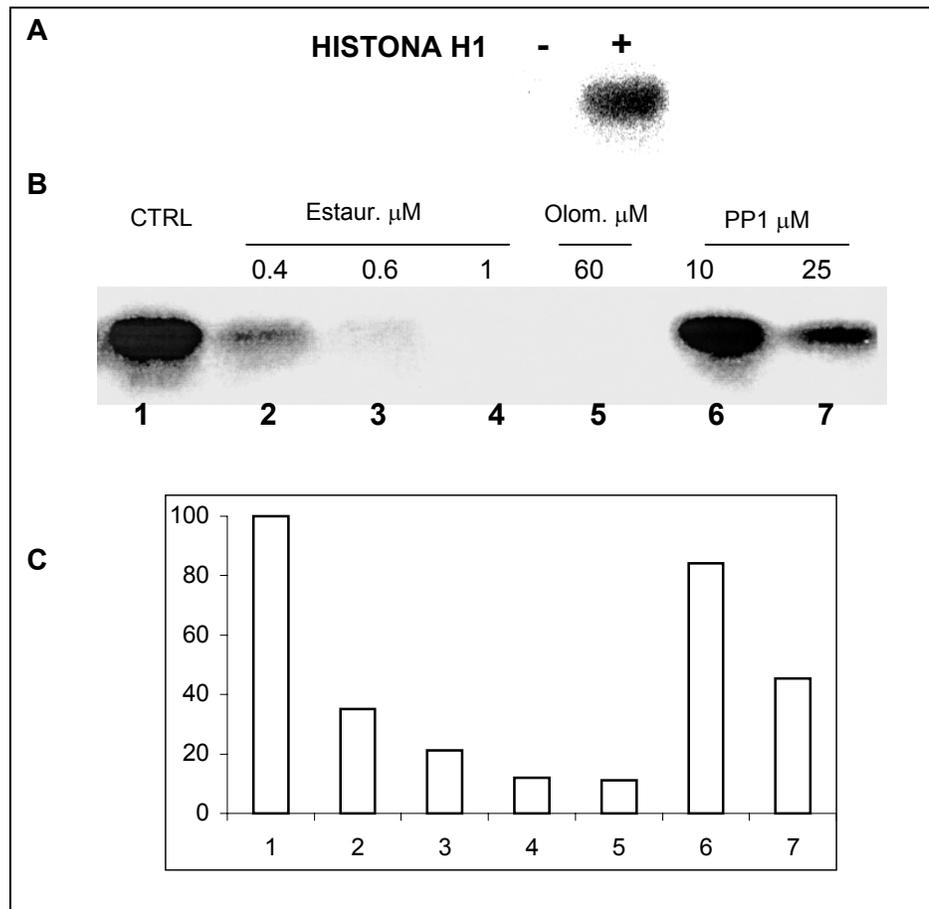


Figura 5.9. Actividad de cinasa de CDC2 silvestre sobreexpresada. **A.** Autoradiografía de la fosforilación de la proteína histona H1 (5 μg). **B.** Autoradiografía de la fosforilación de la proteína histona H1 y efecto de los inhibidores estaurosporina, olomucina y del inhibidor PP1 (μM) en la cinasa CDC2 silvestre. **C.** Gráfico del análisis densitométrico porcentual de B.

Con los resultados obtenidos se procedió a evaluar la actividad de la enzima silvestre CDC2 (de células transfectadas con el plásmido vacío) y de la enzima mutante CDC2F80G para observar el efecto de la inhibición con los inhibidores PP1 y NM. Los resultados muestran que esta enzima mutante es mucho más sensible al inhibidor que la enzima silvestre; es decir, la enzima mutante presenta mayor afinidad por las moléculas diseñadas (Fig. 5.10).

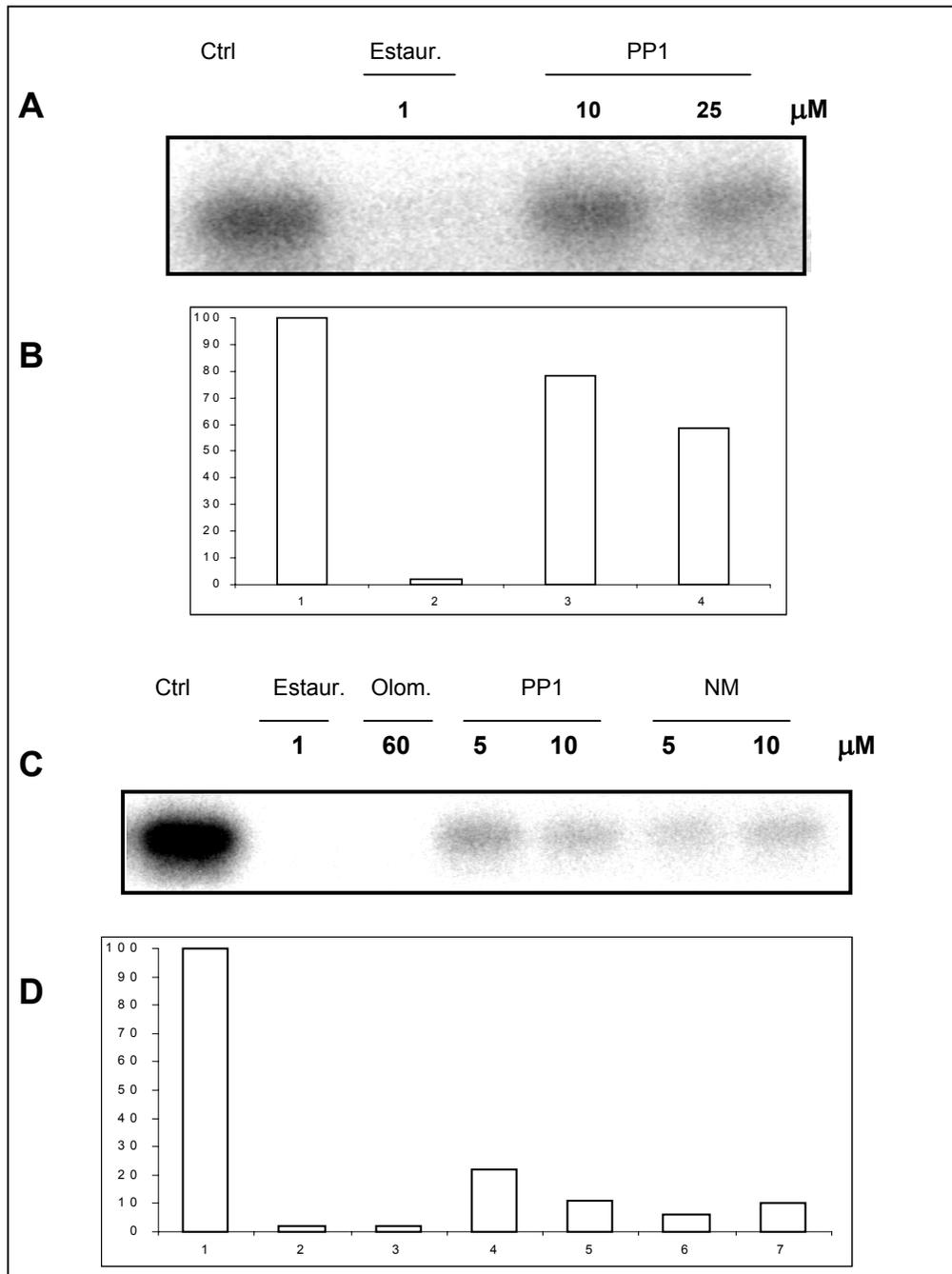


Figura 5.10 Inhibición de la actividad de CDC2. **A**. Autoradiografía de la fosforilación de la proteína histona H1 e inhibición con PP1 de la enzima CDC2 silvestre, **B**. Gráfico del análisis densitométrico porcentual, **C**. Autoradiografía de la fosforilación de la proteína histona H1 e inhibición con PP1 y NM de la enzima CDC2F80G, **D**. Gráfico del análisis densitométrico porcentual.

6. DISCUSIÓN

La fosforilación reversible de las proteínas es catalizada por las proteínas cinasas y las proteínas fosfatasa que regulan la mayoría de los aspectos de la vida celular. Las proteínas cinasas catalizan la transferencia del fosfato γ del ATP a residuos de serina, treonina, tirosina o histidina de proteínas sustrato. Las cinasas se localizan en membrana, citosol, asociadas al citoesqueleto o en el núcleo y están involucradas en todas las funciones celulares. Su participación en todas las diferentes vías hace de esta superfamilia un elemento importante en las señales de transducción. La identificación de los sustratos *in vivo* de las cinasas podría proveer una comprensión más detallada de las cascadas de señalización y un avance significativo en la búsqueda de blancos importantes para el diseño de fármacos. Sin embargo, la homología del sitio activo, la redundancia y el solapamiento de sustratos entre las cinasas ha hecho difícil encontrar blancos directos.

Una estrategia químico genética desarrollada por Shokat y su grupo representa una nueva herramienta para el estudio de las señales de transducción. Esta metodología que implica crear una nueva superficie de interacción entre una cinasa mutante y un inhibidor ha sido exitosamente empleada para estudiar la función de algunas proteínas cinasas incluyendo tirosinas cinasas como la proteína Src y cinasas dependientes de ciclinas como Cdc28 y CDK2.

En el presente trabajo aplicamos esta estrategia para evaluar la inhibición específica *in vitro* de la proteína cinasa dependiente de ciclina CDC2 (CDK1) de células de mamífero.

Síntesis de inhibidores

El inhibidor PP1 y la molécula ortogonal NM (Fig. 5.1) se sintetizaron utilizando la metodología para obtener pirazoles tetrasustituidos. El primero es un inhibidor de cinasas que es altamente específico para proteínas de la familia Src. El segundo es una molécula derivatizada de PP1 que presenta un grupo sustituyente más voluminoso, el naftilmetilo. La selección de PP1 como estructura general del diseño de moléculas es debido a que el anillo de pirazolo pirimidina se une con la misma orientación como el anillo de purina del ATP en el sitio de reconocimiento a nucleótido.

En el apéndice II se muestran los espectros para la caracterización de los ligandos sintetizados, los cuales presentan una pureza del 95 %.

Mutación y clonación del gen cdc2

El siguiente paso implicó crear una mutación puntual en el sitio de unión al ATP de la CDC2 de mamífero (Fig. 5.2). Considerando la homología del 62% y el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las CDKs empleadas por el grupo

de Shokat, inferimos que así como en la cinasa CDK2 y en la Cdc28, la mutación de la fenilalanina 80 por una glicina (F80G) genera una enzima sensible a inhibidores ortólogos, por lo tanto, la misma mutación habilitaría a la enzima CDC2 a ser reconocida por dichas moléculas. El alineamiento de las secuencias nucleotídicas indicaron realizar el cambio del codón TTT de F por GGA de G. El objetivo fue crear una cavidad en el sitio de unión al nucleótido eliminando un residuo voluminoso y poner en su lugar un residuo pequeño; cambio que no debe afectar la actividad de la enzima. La modificación de F 80 por G se realizó con la técnica de PCR en la cual los oligonucleótidos mutagénicos presentaron la permuta del triplete codificante TTT por GGA, de tal forma que el gen amplificado total presentó únicamente este cambio de codón, resultado que se confirmó por secuenciación (Fig. 5.2). El primer criterio inherente para el éxito de esta estrategia es que la mutación puntual debe ser silenciosa, es decir, la modificación que se le induce debe tener poco o ningún efecto en la actividad de la proteína, este parámetro se evaluó transfectando células de mamífero, para lo cual el gen silvestre se clonó en el vector de expresión PCLNXGFP. La ventaja de utilizar este plásmido es que presenta el gen reportero de la GFP que permite observar la eficiencia de transfección.

Co-transfección e infección celular

La clonación del gen silvestre y del gen mutante en el plásmido pCLNRXGFP permitió co-transfectarlo con el plásmido pCLNECO en células 293T (Fig 5.4) Se co-transfectaron tres condiciones: el plásmido vacío o GFP (pCLNRXGFP), plásmido con inserto CDC2 silvestre o CDC2 (pCLNRXGFP-*cdc2*) y el plásmido con inserto CDC2F80G (pCLNRXGFP-*cdc2*F80G) Se generaron las partículas virales y se utilizaron posteriormente para infectar células STO y así transfectar en gen de la cinasa (Fig. 5.5). Por microscopia confocal observamos que la eficiencia de transfección fue muy alta, cerca del 80% de las células presentan fluorescencia, (en experimentos previos se obtuvo una eficiencia del 90% en células STO y 80% en células L929). La expresión de la GFP fue diferencial, en la población transfectada con el plásmido vacío se presenta una mayor homogeneidad en la intensidad de fluorescencia comparada con las células que fueron transfectadas con el plásmido que contiene inserto, sin embargo, el grueso de la población en las tres condiciones de transfección presentan una intensidad de fluorescencia media, es decir, es pequeña la población de células que presentan intensidades de fluorescencia alta y baja (Fig. 5.6). En microscopia confocal observamos que las células que fluorescen con alta intensidad adquieren una morfología atípica y después de 1 semana de cultivo disminuye esta población, sin embargo las células con una intensidad baja y media (que en realidad es una intensidad alta comparada con otros tipos celulares transfectados) permanecen con la misma intensidad y con el mismo porcentaje 20 días post-transfección. Posteriormente utilizando medio de selección se obtuvieron poblaciones celulares con una intensidad de fluorescencia alta y homogénea.

Efecto en el ciclo celular

Con los resultados del análisis de ciclo celular inferimos que la enzima mutante presenta poco o no presenta ningún efecto negativo en su actividad de cinasa. No hay diferencias importantes en la distribución de la cantidad de ADN en las áreas M1, M2 y M3 entre las células control y las tres poblaciones transfectadas (Fig. 5.7). Si las cinasas transfectadas no fueran funcionales, se presentaría un retraso en el ciclo, como consecuencia de la titulación de las ciclinas A y B con las que se forma complejo y no permitiría el avance del ciclo. Los resultados obtenidos del análisis de la cantidad de ADN de las células transfectadas, las CDC2F80G presentan la mayor desviación estandar sin embargo no existe una diferencia importante comparando los resultados de las 4 poblaciones evaluadas (Fig. 5.7B). Si consideramos que Cdc28-as1 en levaduras presenta una constante catalítica 6 veces menor que la silvestre, nuestra enzima debe tener un efecto semejante, sin embargo, posiblemente por el hecho de que en células STO sobreexpresamos la enzima CDC2, capturamos o titulamos toda la ciclina reguladora y llevamos la catálisis a una eficiencia semejante a la silvestre, en otras palabras, si la enzima presenta una menor afinidad o velocidad de reacción como consecuencia de la mutación, la sobreexpresión permite ocultar este efecto, esto siempre y cuando se reclute a toda la ciclina reguladora ya sea A o B. Cabe señalar que las células STO se duplican cada 24 horas y los experimentos de ciclo celular se realizaron 10, 13 y 20 días post-transfección, de tal forma que la mutación, y la sobreexpresión no tienen efecto aparente en el ciclo celular. Pero también, consideramos que con este tipo de análisis el efecto puede no ser visible o que la sensibilidad del ensayo no permite observarlo.

Expresión de CDC2 y CDC2F80G

A la par de estos experimentos se confirmó que la sobreexpresión de la cinasa de ciclo celular CDC2 no afecta la expresión de sus proteínas reguladoras como la ciclina A y B o de la proteína CDK2 con la cual CDC2 presenta una coincidencia espacio - temporal compartiendo la proteína reguladora ciclina A en la fase de G2. Los inmunoblots muestran que la sobreexpresión de CDC2 y CDC2F80G no tiene ningún efecto aparente en la expresión de sus proteínas reguladoras ni en la expresión de la CDK2. Sin embargo, un posible efecto que no es observable con este ensayo de inmunoblot es sí las proteínas CDC2 y CDC2F80G sobreexpresadas permiten que la proporción de CDK2 unida a ciclina A sea igual a la de células no transfectadas. La gráfica muestra por un lado, que la expresión de ciclina A en células transfectadas con CDC2 silvestre y mutante tienen un aumento mínimo y por otro, que hay una sobreexpresión de CDC2 silvestre y mutante de al menos 2 veces, esto permite inferir que la proporción de ciclina A unida a CDC2 es mayor y por lo tanto hay menos complejos CDK2 ciclina A (Fig. 5.8)

Actividad de cinasa

Se ha demostrado *in vitro* que los 4 principales complejos CDK/ciclina reguladores del ciclo celular son capaces de fosforilar la proteína histona H1 en los 6 sitios fosforilables dependientes de ciclo celular, sin embargo, de las 4 CDKs, solo Cdc2 en complejo con la ciclina B se ha demostrado su fosforilación *in vivo*. Con la posibilidad de obtener complejo activo de CDC2/Ciclina, se evaluó la actividad de la cinasa CDC2 sobreexpresada y se mostró que efectivamente fosforila a la proteína histona H1 *in vitro* (Fig. 5.9 A). Con este resultado, evaluamos la actividad de cinasa de la misma enzima en presencia de inhibidores de cinasas de amplio espectro, así como del inhibidor PP1 (Fig. 5.9 B). La inhibición total de la actividad de cinasas de CDC2 silvestre se presenta a una concentración de 1 μ M de estaurosporina y 60 μ M de olomucina. El inhibidor PP1 inhibe la fosforilación de la histona H1 solo en un 15% a una concentración de 10 μ M, pero a una concentración de 25 μ M la disminuye al 50% (Fig. 5.9c) La molécula de PP1 es un inhibidor de cinasas que a concentraciones micromolares puede tener efectos sobre un amplio grupo de cinasas, de tal manera que el resultado de inhibición de la CDC2 no sorprende. Además estos resultados concuerdan con los descritos para la inhibición de las CDKs con PP1 a 10 μ M (actividad porcentual del 85%). Los resultados obtenidos con la CDC2 sobreexpresada se confirmaron con los obtenidos de la CDC2 silvestre de células control (Fig. 5.10 A, B), la fosforilación del sustrato se inhibe totalmente a 1 μ M de estaurosporina y la actividad disminuye 15 y 50% a 10 y 25 μ M del inhibidor PP1 respectivamente. Por otro lado, la proteína CDC2F80G, igualmente se evaluó con estaurosporina, olomucina y los inhibidores sintetizados PP1 y NM (Fig. 5.10 C, D). Los datos muestran que la enzima mutante presenta una actividad semejante a la silvestre, además que la estaurosporina y olomucina se unen al sitio activo de la CDC2F80G con igual afinidad que a CDC2 silvestre, por lo que la mutación no tiene efecto aparente sobre la unión a otros inhibidores y posiblemente al ATP.

La enzima CDC2F80G es más sensible al inhibidor PP1 ya que a 10 μ M la fosforilación del sustrato disminuye a un 15%, contrastando el 85% de actividad que presenta la CDC2 silvestre con la misma concentración de PP1. El cambio del residuo F por G genera una enzima mucho más sensible. La inhibición de la actividad de CDC2F80G con la molécula NM es mayor, incluso a una concentración de 5 mM, este dato permite inferir acerca de la posible afinidad. En la proteína silvestre, no hay espacio para aceptar la molécula NM la cual es más voluminosa (presenta un grupo sustituyente más grande) que PP1. En la proteína mutante, la cavidad creada por el cambio de la F por la G, permite acomodar mejor a NM y por lo tanto presenta mayor afinidad.

Cabe señalar que no se presentó una inhibición total de la actividad de la cinasa mutante CDC2F80G, esta actividad residual es posiblemente la actividad de la enzima endógena que forma complejo activo y que no se puede inhibir con los nuevos ligandos. En promedio la actividad residual es del 10%.

Los datos sugieren que es posible eliminar la actividad de una cinasa en particular, sin embargo el problema que existe en este trabajo es la presencia de la CDC2 silvestre endógena, que en última instancia puede ser eliminada con la técnica de Knock out y así solo tener la enzima modificada que permitiría controlar la actividad de cinasa de manera exclusiva tanto *in vitro* como *in vivo*.

Estos resultados son consistentes con los datos obtenidos por Shokat en los que se demuestra que las cinasas mutantes son más sensibles a PP1 y a NM.

En general las herramientas desarrolladas funcionan y la estrategia químico-genética permitirá abordar desde otro punto el estudio de las cinasas para definir con mayor habilidad y certeza los blancos fisiológicos de las proteínas cinasas.

Futuros experimentos deberán enfocarse a la búsqueda de sustratos directos evaluando lizados totales celulares e incluso células completas, aprovechando que los ligandos son permeables a la célula

7. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se desarrollaron las herramientas moleculares que permitirán aplicar la estrategia químico-genética ideada por el Dr. K. Shokat: i) La síntesis química de dos moléculas, el PP1, inhibidor de cinasas y el NM inhibidor ortogonal, los cuales se caracterizaron por métodos químicos y espectrofotométricos, ii) Generación de la cinasa CDC2 con una mutación puntual y silenciosa F80G, iii) Obtención de células transfectadas con la versión silvestre y mutante de CDC2, las cuales se sobreexpresan dos veces más que la endógena, iv) Obtención de complejos activos de CDC2/ciclina y CDC2F80G /cyclina capaces de fosforilar histona H1, v) Inhibición de los complejos CDC2/ciclina y CDC2F80G/ciclina con inhibidores de amplio espectro y vi) el efecto de PP1 y NM en la parcial inhibición del complejo CDC2F80G/ciclina. Demostrando que la modificación de la proteína permite aceptar más específicamente al ligando ortogonal que al ligando natural y de esta forma analizar una proteína en particular.

La creación de una nueva superficie de interacción entre la enzima y el ligando permitirá la identificación de sustratos fisiológicos de las proteínas cinasas

8. PERSPECTIVAS

La síntesis de los inhibidores, la obtención de una cinasa modificada y la estandarización de las metodologías utilizadas nos permitirán buscar sustratos directos para lo cual se requiere continuar con las siguientes tareas:

- a) Síntesis orgánica del N-6 benzil ATP que presente el fosfato γ radioactivo, el cual posibilitará el marcaje directo de los sustratos.
- b) Establecer ensayos de cinasa con proteínas que se sospeche ser blancos de la CDC2
- c) Sincronizar cultivos celulares y obtener los extractos nucleares y citoplásmicos y realizar con éstos los ensayos de cinasa.
- d) Establecer la metodología para identificar sustratos fosforilados en geles de doble dimensión.
- e) Determinar los efectos de la inhibición *in vivo* en células transfectadas con la CDC2F80G.
- f) Obtener células que no presenten la CDC2 endógena o eliminarla para iniciar el marcaje de sustratos *in vivo*.

9. APÉNDICE I

Sustratos identificados o que se sospecha son fosforilados por la proteína cinasa CDC2 en eucariontes superiores.

SUSTRATO	CARACTERÍSTICAS
Histona H1 ⁸¹	Contribuye en las interacciones nucleosomales
Lamina nuclear ⁸²	Componente de la membrana nuclear
Microtúbulos ⁸³	Asociados a motores tales como CENP-E o Eg5 y asociados a proteínas
Ciclina B ⁸⁴	Proteína reguladora, es fosforilada en la secuencia de retención citoplásmica
WARTS ⁸⁵	componente dinámico del aparato mitótico
Kid ⁸⁶	cromocinesina importante en el alineamiento de cromosomas en la placa de metafase
NIMA ⁸⁷	Cinasa de las familias: Polo-Like
P70 S6 ⁸⁸	Cinasa moduladora de la biosíntesis ribosomal y la capacidad traduccional
Emi1 ⁸⁹	Proteína capaz de inhibir el APC en las fases S y G2
NAAP1 and NAAP2 ⁹⁰	Proteínas nucleares que se unen a DNA.
MCM2 and MCM4 ⁹¹	Subunidades del APC
Endonucleasa Fen1 ⁹²	Enzima clave en la maquinaria de replicación en fase S tardía
Bcl-2 ⁹³	Esta proteína es fosforilada en células tratadas con inhibidores de microtúbulos*
El péptido beta amiloide (Abeta) ⁹⁴	Péptido implicado en la patología de la enfermedad de Alzheimer*
Cdc20/Fizzy ⁹⁵	Proteína que se acopla a la forma activa del ciclosoma

* Sustratos accidentales de CDC2/Ciclina B, los cuales no son fisiológicos en condiciones normales.

APÉNDICE II

Los resultados obtenidos de los análisis espectroscópicos de los inhibidores se presentan en el siguiente orden:

Para el inhibidor PP1

- a. Espectro de resonancia magnética nuclear de protones (RMNH)
- b. Espectro de Masas
- c. Espectro infrarrojo

Para el inhibidor NM

- d. Espectro de resonancia magnética nuclear de protones (RMNH)
- e. Espectro de Masas
- f. Espectro de infrarrojo

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Hunter, T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80, 225-236 (1995).
2. van Leeuwen, J.E. & Samelson, L.E. T cell antigen-receptor signal transduction. *Curr. Opin. Immunol.* 11, 242-248 (1999).
3. Spellman, P.T., Sherlock, G., Zhang, M.Q., Iyer, V.R., Anders, K., Eisen, M.B., Brown, P.O., Botstein, D. & Futcher, B. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol. Biol. Cell* 9, 3273-3297 (1998).
4. Insogna, K., Tanaka, S., Neff, L., Home, W., Levy, J. & Baron, R. Role of c-Src in cellular events associated with colony-stimulating factor-1-induced spreading in osteoclasts. *Mol. Reprod. Dev.* 46, 104-108 (1997).
5. Philpot, B.D., Lim, J.H., Halpain, S. & Brunjes, P.C. Experience-dependent modifications in MAP2 phosphorylation in rat olfactory bulb. *J. Neurosci.* 17, 9596-9604 (1997).
6. Hunter, T. Signaling-2000 and beyond. *Cell* 100, 113-127 (2000).
7. Shokat, K.M. Tyrosine kinases: modular signaling enzymes with tunable specificities. *Chem. Biol.* 2, 509-514 (1995).
8. Hunter, T. A thousand and one protein kinases. *Cell* 50, 823-829 (1987).
9. Adams, J. A. Kinetic and Catalytic Mechanisms of Protein Kinases. *Chem. Rev.* 101, 2271-2290 (2001).
10. Pawson, T. Protein Modules and Signalling Networks. *Nature* 373, 573-580 (1995).
11. Pawson, T., Scott, J.D. Signaling Through Scaffold, Anchoring, and Adaptor Proteins. *Science* 278, 2075-2080 (1997).
12. Cohen, G.B., Reb, R. & Baltimore, D. Modular Binding Domains in Signal Transduction Proteins. *Cell* 80, 237-248 (1995).
13. Pinna, L.A. & Ruzzene, M. How Do Protein Kinases Recognize their Substrates? *Biochim. Biophys. Acta* 1314, 191-225 (1996).
14. Seidel-Dugan, C., Meyer, B.E., Thomas, S.M. & Brugge, J.S. Effects of SH2 and SH3 Deletions on the Functional Activities of Wild-type and Transforming Variants of c-Src. *Mol. Cell Biol.* 12, 1835-1845 (1992).
15. Hanks, S.K. & Quinn, A.M. Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of

-
- family members. *Methods Enzymol.* 200, 38-62 (1991).
16. AGT.Src.Biochemistry (Moscow) vol 65, n. 1 (2000).
17. Marengere, L.E.M., Songyang, Z., Gish, G.D., Schaller, M.D., Parsons, J.T., Stern, M.J., Cantley, L.C. & Pawson, T. SH2 Domain Specificity and Activity Modified by a Single Residue. *Nature* 369, 502-505 (1994).
18. Yu, H., Rosen, M.K., Shin, T.B., Seidel-Dugan, C., Brugge, J.S. & Schreiber, S.L. Solution Structure of the SH3 Domain of Src and Identification of its Ligand-binding Site. *Science* 258, 1665-1668 (1992).
19. Zheng, J., Knighton, D.R., Ten-Eyeck, L.F., Karlsson, R., Zuong, N.-H. & Taylor, S.S. Crystal Structure of the Catalytic Subunit of cAMP-dependent Protein Kinase Complexed with MgATP and Peptide Inhibitor. *Biochem.* 32, 2154-2161 (1993).
20. Xu, W., Harrison, S.C. & Eck, M.J. Three-dimensional Structure of the Tyrosine Kinase c-Src. *Nature* 385, 595-601 (1997).
21. Schindler, T., Sicheri, F., Pico, A., Gazit, A., Levitzki, A. & Kuriyan, J. Crystal Structure of Hck in Complex with a Src-family Selective Tyrosine Kinase Inhibitor. *Mol. Cell* 3, 639-648 (1999).
22. Morgan, D.O. & DeBondt, H.L. Protein Kinase Regulation: Insights from Crystal Structure Analysis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 239-246 (1994).
23. De Bondt, H.L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H.D., Morgan, D.O. & Kim, S.H. Cyclins and Cyclin Dependent Kinases. *Nature* 363, 595-602 (1993).
24. Songyang, Z., Blechner, S., Hoagland, N., Hoekstra, M.F., Piwnica-Worms, H. & Cantley, L.C. Use of an Oriented Peptide Library to Determine the Optimal Substrates of Protein Kinases. *Curr. Biol.* 11, 973-982 (1994).
25. Songyang, Z., Carraway, K.J., Eck, M., Harrison, S.C., Feldman, R.A., Lorenzo, M.J. & Cantley, L.C. Catalytic Specificity of Protein Tyrosine Kinases is Critical for Selective Signaling. *Nature* 373, 536-539 (1995).
26. Rickles, R.J., Botfield, M.C., Weng, Z., Taylor, J.A., Green, O.M., Brugge, J.S. & Zoller, M.J. Identification of Src, Fyn, Lyn, PI3K, and Abl SH3 Domain Ligands Using Phage Display Libraries. *EMBO J.* 13, 5598-5604 (1994).
27. Rickles, R.J., Botfield, M.C., Zhou, X.-M., Henry, P.A., Brugge, J.S. & Zoller, M.J. Phage Display Selection of Ligand Residues Important for Src Homology 3 Domain Binding Specificity. *Proct. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10,909-910,913 (1995).
28. Sparks, A.B., Rider, J.E. & Kay, B.K. Mapping the Specificity of SH3 Domains with Phage-Displayed Random-Petide Libraries. *Methods Mol. Bio.* 84, 87-103 (1998).
-

-
29. Kreegipuu, A., Blom, N., Brunak, S. & Jarv, J. Statistical Analysis of Protein Kinase Specificity Determinants. *FEBS* 430, 45-50 (1998).
 30. Zhu H., Klemic J.F., Chang S., Bertone P., Casamayor A., Klemic K., Smith G., Gerstein M., Reed M.A., Snyder M. *Nat. Genet.* 26, 283-9 (2000).
 31. Fukunaga r., Hunter T. *EMBO J.*, 16, 1921-33 (1997).
 32. Knebel A., Morrice N., Cohen P. *EMBO J.*, 20, 4360-9 (2001)
 33. Holmstrom T.H., Tran S.E., Johnson V.L., Ahn N.G., Chow S.C., Erikson J.E. *Mol. Cell Biol.*, 19, 5991-6002 (1999).
 34. Chan, V.W., Meng, F., Soriano, P., DeFranco, A.L. & Lowell, C.A. Characterization of the B lymphocyte populations in Lyn-deficient mice and the role of Lyn in signal initiation and down-regulation. *Immunity* 7, 69-81 (1997).
 35. Stein, P.L., Lee, H.M., Rich, S. & Soriano, P. pp59 *fyn* mutant mice display differential signaling in thymocytes and peripheral T cells. *Cell* 70, 741-750 (1992).
 36. Ilic, D. *et al.* Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature* 377, 539-544 (1995).
 37. Surana, U., Robitsch, H., Price, C., Schuster, T., Fitch, I., Futcher, A.B. & Nasmyth, K. The role of CDC28 and cyclins during mitosis in the budding yeast *S. cerevisiae*. *Cell* 65, 145-161 (1991).
 38. Charles, J.F., Jaspersen, S.L., Tinker-Kulberg, R.L., Hwang, L., Szidon, A. & Morgan, D.O. The Polo-related kinase Cdc5 activates and is destroyed by the mitotic cyclin destruction machinery in *S. cerevisiae*. *Curr. Biol.* 8, 497-507 (1998).
 39. Gullick, W.J., Downward, J., Foulkes, J.G. & Waterfield, M.D. Antibodies to the ATP-binding site of the human epidermal growth factor (EGF) receptor asspecific inhibitors of EGF-stimulated protein-tyrosine kinase activity. *Eur. J. Biochem.* 158, 245-253 (1986).
 40. Cohen P. and Goedert M. Engineering protein kinases with distinct nucleotide specificities and inhibitor sensitivities by mutation of a single amino acid. *Chemistry & Biology*, july, 5:R161-R164 (1998)
 - 41.- Bishop A.C., Buzko O. and Shokat K.M. Magic bullets for protein kinases. *TRENDS in Cell Biology* Vol. 11 N. 4. April (2001).
 42. Knockaert M., Greengard P. and Meijer L. Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *TRENDS in Pharmacological Sciences* Vol. 23, n. 9, september (2002).
 43. Mitchison, T.J. Towards a pharmacological genetics. *Chem. Biol.* 1, 3-6 (1994).

-
44. Schreiber, S.L. Chemical genetics resulting from a passion for synthetic organic chemistry. *Bioorg. Med. Chem.* 6, 1127-1152 (1998).
45. Maly, D.J., Choong, I.C. & Ellman, J.A. Combinatorial target-guided ligand assembly: identification of potent subtype-selective c-Src inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 2419-2424 (2000).
46. Norman, T.C., Gray, N.S., Koh, J.T. & Schultz, P.G. A structure-based approach to kinase inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 7430-7431 (1996).
47. Fischer P.M. and Lane D.P. Inhibitors of cyclin-dependent Kinases as Anti-Cancer Therapeutics. *Current Medicinal Chemistry*, 1213-1245 (2000). °C
48. Bishop A., Buzko O., Heyeck-Dumas S., Jung I., Kraybill B., Liu Y., Shah K., Ulrich S., Witucki L., Yang F., Zhang Ch. And Shokat K.M. Unnatural Ligands for Engineered Proteins: New Tools for Chemical Genetics. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 29:577-606 (2002).
49. Shogren-Knaak M.A., Alaimo P.J. and Shokat K.M. Recent Advances in Chemical Approaches to the Study of Biological Systems. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 17:40533 (2001).
50. Shokat K. and Velleca M. Novel chemical genetics approaches to the discovery of signal transduction inhibitors *Drug Discovery Today*, vol 7, n. 6, august (2002).
51. Bishop, A.C., Shah, K., Liu, Y., Witucki, L., Kung, C. & Shokat, K.M. Design of allele-specific inhibitors to probe protein kinase signaling. *Curr. Biol.* 8, 257-266 (1998).
52. Bishop, A.C., Kung, C.-Y., Shah, K., Witucki, L., Shokat, K.M. & Liu, Y. Generation of monospecific nanomolar tyrosine kinase inhibitors via a chemical genetic approach. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 627-631 (1999).
53. Liu, Y., Shah, K., Yang, F., Witucki, L. & Shokat, K.M. Engineering Src family protein kinases with unnatural nucleotide specificity. *Chem. Biol.* 5, 91-101 (1998).
54. Bishop A.C., Ubersax J.A., Petsch D.T., Matheos D.P., Gray N.S., Blethrow J., Shimizu E., Tsien J. Z., Schultz P.G., Rose M.D., Wood J.L., Morgan D.O. and Shokat K.M. A chemical switch for inhibitor-sensitive alleles of any protein kinase. *Nature*, vol. 407, 21 september (2002).
55. Kraybill B.C., Elkin L.L., Blethrow J.D., Morgan D.O. and Shokat K.M. Inhibitor Scaffolds as new allele Specific Kinase Substrates. *J. Am. Chem. Soc.* 124:12118-12128 (2002).
56. Weiss E.I., Bishop A.C., Shokat K. M. and Drubin D.G. Chemical genetic analysis of the budding-yeast p21-activated kinase Cla4p. *Nature Cell Biology*, vol. 2, october (2000)
-

-
57. Niswender C.M., Ishihara R.W., Judge L.M., Zhang Ch., Shokat K.M. and McKnight S. Protein engineering of protein Kinase A catalytic subunits results in the acquisition of novel inhibitor sensitivity. *JBC.*, may 28 (2002).
58. Clackson, T., Yang, W., Rozamus, L.W., Hatada, M., Amara, J.F., Rollins, C.T., Stevenson, L.F., Magari, S.R., Wood, S.A., Courage, N.L., Lu, X., Cerasoli, F.J., Gilman, M. & Holt, D.A. Redesigning an FKBP-ligand Interface to Generate Chemical Dimerizers with Novel Specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 10437-10442 (1998).
59. Koh, J., Putnam, M., Tomic-Canic, M. & McDaniel, C.M. Selective Regulation of Gene Expression Using Rationally-Modified Retinoic Acid Receptors. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 1984-1985 (1999).
60. Bishop, A.C., Buszko, O., Heyeck-Dumas, S., Jung, I., Kraybill, B., Liu, Y., Shah, K., Ullrich, S., Witucki, L., Yang, F. & Shokat, K.M. Design of Orthogonal Pairs. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**(2000).
61. Shah, K., Liu, Y., Deirmengian, C. & Shokat, K.M. Engineering Unnatural Nucleotide Specificity for Rous Sarcoma Virus Tyrosine Kinase to Uniquely Label its Direct Substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3565-3570 (1997).
62. Liu, Y., Shah, K., Yang, F., Witucki, L., and Shokat, K.M. A Molecular Gate which Controls Unnatural ATP Analog Recognition by the Tyrosine Kinase v-Src. *Bioorg. Med. Chem.* **6**, 1219-1226 (1998).
63. Gillespie P.G., Gillespie S.K., Mercer J.A., Shah K. and Shokat K.M. Engineering of the Myosin-I \square Nucleotide-binding Pocket to Create selective Sensitivity to N^6 -modified ADP Analogs. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, n. 44:31373-31381, october 29 (1999).
64. Ulrich, S.M., Buzko O., Shah K. and Shokat K.M. Towards the Engineering of an Orthogonal Protein Kinase/Nucleotide Triphosphate Pair. *Tetrahedron*, **56**:9495-9502 (2000).
65. Polson A.G., Huang L., Lukac D.M., Blethrow J.D., Morgan D.O., Burlingame A.L. and Ganem D. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus K-bZIP Protein Is Phosphorylated by Cyclin-dependent Kinases. *Journal of Virology*, vol. 75, n. 7:3175-3184, apr. (2001).
66. Eblen S.T., Kumar N.V., Shah K., Henderson M.J., Watts C.K., Shokat K.M. and Weber M.J. Identification of Novel ERK2 Substrates through Use of an Engineered Kinase and ATP Analogs. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, n. 17:14926-14935, april 25 (2003).
67. Shah K., Liu Y., Deirmengian C. And Shokat K.M. Engineering unnatural nucleotide specificity for Rous sarcoma virus tyrosine linase to uniquely label its direct substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol 94:3565-3570, april (1997).
68. Morgan, D.O. Cyclin-Dependent Kinases: Engines, Clocks, and Microprocessors. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **13**:261-91 (1997).
-

69. Morgan, D.O. Principles of CDK regulation. *Nature*, 374:131-134 (1995).
70. Nasmyth K. At the Heart of the budding yeast cell cycle. *Trends enet.* 12:405-412 (1996).
71. Plowman et al., 1999.
72. Nigg E.A., Blangy A. and lane H.A. *Exp. Cell. Res.* 229:174-180 (1996).
73. Peter M., Nakagawa J., Doree M., Labbe J.C. and Nigg E.A. *Cell* 61:591-602 (1990).
74. Nurse P. *Cell* 100:71-78 (2000).
75. Habelhah H, Shah K, Huang L, Burlingame AL, Shokat KM, Ronai Z. Identification of new JNK substrate using ATP pocket mutant JNK and a corresponding ATP analogue. *J Biol Chem.* 2001 May 25;276(21):18090-5.
76. Ting AY, Witte K, Shah K, Kraybill B, Shokat KM, Schultz PG. Phage-display evolution of tyrosine kinases with altered nucleotide specificity. *Biopolymers.* 2001;60(3):220-8.
77. Carroll AS, Bishop AC, DeRisi JL, Shokat KM, O'Shea EK. Chemical inhibition of the Pho85 cyclin-dependent kinase reveals a role in the environmental stress response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Oct 23;98(22):12578-83.
78. Ubersax JA, Woodbury EL, Quang PN, Paraz M, Blethrow JD, Shah K, Shokat KM, Morgan DO. Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature.* 2003 Oct 23;425(6960):859-64.
79. Hanefeld U., Rees Ch. W., White A.J. and Williams D.J. One-pot synthesis of tetrasubstituted pyrazoles-proof of regiochemistry. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.1* (1996).
80. Striejewske, W. S. y Conry, R. R. Synthesis of copper (I) complexes with a novel naphthyl-appended macrocyclic ligand, including the crystal and molecular structure of the first copper (I)-n2-naphthyl complex. *Chem. Commun.* 555-556 (1998)
81. Boulikas, T. Phosphorilation of transcription factors and control of cell cycle. *Critical Reviews in Eucariotic Gene Expression.* 5 (1): 1-77 (1995).
82. Peter M, Heitlinger E, Haner M, Aebi U, Nigg EA Disassembly of in vitro formed lamin head-to-tail polymers by CDC2 kinase. *EMBO J.* 1991 Jun;10(6):1535-44.
83. Ohta, K., Shiina, N., Okamura, E., Hisanaga, S., Kishimoto, T., Endo, S., Gotoh, Y., Nishida, E., y Sakai, H. Microtubule enucleating activity of centrosomes in cell-free extracts from *Xenopus* eggs: involvement of phosphorylation and accumulation of pericentriolar material. *J. Cell Sci.*, 104: 125-137.(1993)

-
84. Ohashi A., Minami N. and Imai H. Nuclear Accumulation of Cyclin B1 in Mouse Two-cell Embryos Is Controlled by the Activation of Cdc2. *Biology of Reproduction* 65, 1195-1200 (2001).
85. Morisaki T., Hirota T., Iida S., Marumoto T., Hara T., Nishiyama Y., Kawasuki M., Hiraoka T., Mimori T., Araki N., Izawa I., Inagaki M., Saya H. WARTS tumor suppressor is phosphorylated by Cdc2/cyclin B at spindle poles during mitosis. *FEBS Lett.* Oct 9;529 (2-3): 319-24 (2002).
86. Ohsugi M., Tokai-Nishizumi N., Shiroguchi K., Toyoshima Y.Y., Inoue J. and Yamamoto. Cdc2-mediated phosphorylation of Kid controls its distribution to spindle and chromosomes. *OMBO Journal*, vol 22, n. 9: 2091-2103 (2003).
87. Ye XS, Fincher RR, Tang A, Osmani AH, Osmani SA. Regulation of the anaphase-promoting complex/cyclosome by bimAAPC3 and proteolysis of NIMA. *Mol Biol Cell.* 1998 Nov;9(11):3019-30.
88. Papst P.J., Sugiyama H., Nagasawa M., Lucas J.J., Maller J.L., Terada N. Cdc2-cyclin B phosphorylates p70 S6 kinase on Ser411 at mitosis. *J. Biol. Chem.* Jun 12;273 (24):15077-84 (1988).
89. Margottin-Goguet F, Hsu, J. Y., Loktev, A., Hsieh, H.M., Reimann, J.D., Jackson, P.K. Prophase destruction of Emi1 by the SCF(betaTrCP/Slimb) ubiquitin ligase activates the anaphase promoting complex to allow progression beyond prometaphase. *Dev Cell.* 2003 Jun;4(6):813-26.
90. Matoba K, Matsumoto Y, Hongo T, Nagamatsu Y, Sugino H, Shimizu T, Takao T, Shimonishi Y, Ikegami S. Chemical structure of nuclear proteins which are phosphorylated during meiotic maturation of starfish oocytes. *Biochemistry.* 2000 May 30;39(21):6390-400.
91. Fujita M, Yamada C, Tsurumi T, Hanaoka F, Matsuzawa K, Inagaki M. Cell cycle- and chromatin binding state-dependent phosphorylation of human MCM heterohexameric complexes. A role for cdc2 kinase. *J Biol Chem.* 1998 Jul 3;273(27):17095-101.
92. Henneke G, Koundrioukoff S, Hubscher U. Phosphorylation of human Fen1 by cyclin-dependent kinase modulates its role in replication fork regulation. *Oncogene.* 2003 Jul 10;22(28):4301-13.
93. Pathan, N., Aime-Sempe, C., Kitada, S., Basu, A., Haldar, S., Reed, J.C., Microtubule-targeting drugs induce bcl-2 phosphorylation and association with Pin1. *Neoplasia.* 2001 Nov-Dec;3(6):550-9.
94. Milton, N.G. Phosphorylation of amyloid-beta at the serine 26 residue by human cdc2 kinase. *Neuroreport.* 2001 Dec 4;12(17):3839-44.
95. Golan A., Yudkovsky Y. and Hershko A. The Cyclin-Ubiquitin Ligase Activity of Cyclosome/APC Is Jointly Activated by Protein Kinases Cdk1-Cyclin B and Plk. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol 277, n. 18, may 3, 15552-15557 (2002).
-