



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

***“Efecto de la fosforilación y los fosfomiméticos en la
estructura y dinámica del péptido C-terminal
desordenado de la proteína adenoviral E1B55kDa”***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

MARCO ANTONIO RAMÍREZ MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Carmen Nina Pastor Colón

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO, 2019

JURADO EVALUADOR DE TESIS

Dr. Enrique Rudiño Piñera

IBT-UNAM

Presidente

Dra. Lina Rivillas Acevedo

CIDC-UAEM

Secretario

Dr. Carlos Amero Tello

CIQ-UAEM

Vocal

Dra. Carmen Nina Pastor Colón

CIDC-UAEM

Suplente

Dr. Ramón Gonzalez García-Conde

CIDC-UAEM

Suplente

Agradecimientos

Al laboratorio de Dinámica de Proteínas, a CONACyT por la beca de maestría (CVU 858905) y al proyecto INFR-2014-02-231504. Al Laboratorio de Supercómputo y Visualización en Paralelo, UAM-Iztapalapa; al Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México, por los recursos computacionales, el apoyo y la asistencia técnica a través de los proyectos número O-2016/048 y O-2017/022.

A mi comité tutorial, por el tiempo brindado en cada semestre, las correcciones, sugerencias y consejos aportados.

Resumen

Las proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs) carecen de una estructura tridimensional fija y realizan múltiples funciones. Un mecanismo molecular empleado para la regulación de las posibles conformaciones accesibles de una IDP es la fosforilación de residuos de serinas y treoninas; este mecanismo es mimetizado experimentalmente mediante la mutación de dichos residuos por aspartato o glutamato, suponiendo que la adición de carga es el efecto de interés, pero hay diferencias estructurales entre fosfatos y carboxilatos que pudieran hacer sus efectos no equivalentes. En este proyecto empleamos dinámica molecular para estudiar un péptido de 20 aminoácidos proveniente del extremo C-terminal de la proteína adenoviral E1B55kDa. Esta proteína está involucrada en el ciclo de replicación viral y es regulada por fosforilación. Para evaluar el efecto que tiene la fosforilación sobre el paisaje conformacional que visita el péptido, construimos variantes fosforiladas, fosfomiméticas (glutamato y aspartato) y nulas (alanina). Usamos el campo de fuerza Charmm36m, el programa NAMD con el solvente TIP3P, a 298 K, 0.15 NaCl y 1 atm de presión. Para determinar la similitud entre la fosforilación y las mutaciones fosfomiméticas analizamos las interacciones intracadena y con el agua, así como la formación de estructura secundaria. Nuestros resultados sugieren que la versión fosforilada es más compacta, mientras que las fosfomiméticas parecen ser más extendidas. Además, identificamos a los residuos arginina 9 y fosfotreonina 19 como residuos clave en el establecimiento de interacciones, motivo por el cual decidimos agregar las mutantes R9A en sus variantes fosforilada y silvestre, así como las mutantes T19A en sus versiones silvestre, fosforilada y fosfomiméticas. Los resultados de estas simulaciones muestran que no existe un cambio considerable en la compactación del péptido, sin embargo, el patrón de interacciones con los demás residuos negativos presentes en el péptido son diferentes para cada variante. Debido a que la interacción R9-pT19 es la más frecuente, analizamos el tipo de estructura que se forma cuando esta interacción se da; observamos que la versión fosforilada no adquiere ningún tipo de estructura secundaria durante la interacción antes mencionada. Esto sugiere que la interacción de este segmento puede estar dada por formación de complejos difusos (fuzzy), mientras que las demás variantes muestran estructuras similares entre ellas que pudieran influir en el mecanismo de interacción con proteínas virales y/o celulares. Basados en los resultados anteriores podemos concluir que las mutantes fosfomiméticas no están recreando los resultados obtenidos con las versiones fosforiladas, por lo que no son 100% equivalentes.

Índice

| | |
|--|----|
| 1. Introducción..... | 1 |
| 1.1 Generalidades de las proteínas desordenadas..... | 1 |
| 1.2 Fosforilación de IDPs | 2 |
| 1.3 Proteína adenoviral E1B55kDa | 3 |
| 2. Marco teórico | 4 |
| 2.1 Estudio de IDPs..... | 4 |
| 2.2 Uso de fosfomiméticos | 5 |
| 2.3 Estudio de E1B55kDa | 6 |
| 3. Justificación..... | 8 |
| 4. Hipótesis | 8 |
| 5. Objetivo | 8 |
| 5.1 Objetivos particulares | 9 |
| 6. Metodología | 9 |
| 6.1 Obtención de secuencia a modelar. | 9 |
| 6.2 Modelos iniciales. | 9 |
| 6.3 Dinámica molecular. | 10 |
| 6.4 Análisis. | 11 |
| 7. Resultados y discusión | 11 |
| 7.1 Selección del segmento a trabajar | 11 |
| 7.2 Estructuras iniciales | 12 |

| | |
|---------------------------------|----|
| 7.3 Dinámica molecular | 13 |
| 7.4 Radio de giro | 13 |
| 7.5 Puentes de hidrógeno | 14 |
| 7.6 Estructura secundaria | 20 |
| 7.7 Mutante T19A..... | 26 |
| 7.8 Mutante R9A | 30 |
| 8. Conclusiones..... | 33 |
| 9. Bibliografía: | 34 |
| 10. Anexos | 37 |
| 10.1 Anexo I..... | 37 |

Figuras y Tablas

| | |
|---|----|
| Figura 1 Regiones desordenadas en proteínas. | 1 |
| Figura 2 Clasificación de IDPs según su composición de aminoácidos..... | 2 |
| Figura 3 Motivos de reconocimiento molecular (MoRFs). | 2 |
| Figura 4 Fosforilación de proteínas.. | 3 |
| Figura 5 Representación esquemática de E1B55kDa..... | 4 |
| Figura 6 Comparación estructural de los residuos modificables. | 6 |
| Figura 7 Producción de progenie viral..... | 7 |
| Figura 8 Perfil de desorden. | 12 |
| Figura 9 Ensamble inicial. | 12 |
| Figura 10 Estructuras iniciales. | 13 |
| Figura 11 Radio de giro del ensamble..... | 14 |
| Figura 12 Puentes de hidrógeno con el agua..... | 15 |
| Figura 13 Puentes de hidrógeno mediados por agua. | 16 |
| Figura 14 Puentes de hidrógeno intracadena. | 17 |

| | |
|---|----|
| Figura 15 Enriquecimiento de interacciones. | 18 |
| Figura 16 Puentes de hidrógeno entre los residuos fosforilables..... | 18 |
| Figura 17 Mapa de calor fosfomiméticas contra fosforilada. | 19 |
| Figura 18 Enriquecimiento fosforilada vs fosfomiméticas. | 20 |
| Figura 19 Estructura de la interacción..... | 21 |
| Figura 20 Mapas de Ramachandran de los residuos modificados..... | 23 |
| Figura 21 Enriquecimiento de alfa hélice. | 23 |
| Figura 22 Interacciones hélice alfa C-terminal fosforilada..... | 24 |
| Figura 23 Interacciones no presentes en la hélice C-terminal. | 25 |
| Figura 24 Radio de giro de las mutantes T19A. | 26 |
| Figura 25 Mapas de calor de las diferentes variantes T19A. | 27 |
| Figura 26 Estructura secundaria T19A. | 28 |
| Figura 27 Interacciones hélice alfa C-terminal fosforilada T19A. | 29 |
| Figura 28 Radio de giro de la mutante R9A en sus dos variantes. | 30 |
| Figura 29 Puentes de hidrógeno R9A. | 31 |
| Figura 30 Estructura secundaria R9A.. | 32 |
| Figura 31 Radio de giro, N-terminal cargado.. | 37 |
| Figura 32 Puentes de hidrógeno N-terminal cargado..... | 38 |
| | |
| Tabla 1 Colección de predictores de desorden. | 9 |
| Tabla 2 Estructura de la interacción arginina 9 con residuo 19. | 21 |

Abreviaturas

IDPs = Proteínas Intrínsecamente Desordenadas (por sus siglas en inglés)

IDRs = Regiones Intrínsecamente Desordenadas (por sus siglas en inglés)

MoRFs = Motivos de Reconocimiento Molecular (por sus siglas en inglés)

MPT = Modificaciones Postraduccionales

RNA = Ácido Ribonucleico

NES = Señal de Exportación Nuclear

RNP = Dominio de interacción con RNA

NMR = Resonancia Magnética Nuclear

SAXs = Dispersión de Rayos X de Bajo Ángulo

DC = Dicroísmo Circular

DLS = Dispersión Dinámica de Luz

CK2 = Caseína Cinasa 2

CIDC = Centro de Investigación en Dinámica Celular

pSpSpT = Variante que tiene fosforilados los residuos 14, 15 y 19

DDD = Mutante que tiene residuos de aspartato en las posiciones 14, 15 y 19

EEE = Mutante que tiene residuos de glutamato en las posiciones 14, 15 y 19

AAA = Mutante que tiene residuos de alanina en las posiciones 14, 15 y 19

SST = Variante silvestre del péptido

T19A = Mutantes que tienen una alanina en la posición 19

R9A = Mutantes que tienen una alanina en la posición 9

fs = femtosegundos

ps = picosegundos

ns = nanosegundos

μs = microsegundos

K = grados Kelvin

Atm = atmosferas

NPT = ensamble de dinámica molecular que mantiene el número de partículas, presión y temperatura constantes.

VDW = interacciones de Van Der Waals

Å = Armstrong

RMSD = Root Mean Squared Deviation (Desviación cuadrática media)

Asp, D = Aspartato
His, H = Histidina
Leu, L = Leucina
Val, V = Valina
Ala, A = Alanina
Cys, C = Cisteína
Thr, T = Treonina
Arg, R = Arginina
Glu, E = Glutamato
Phe, F = Fenilalanina
Gly, G = Glicina
Ser, S = Serina

1. Introducción

1.1 Generalidades de las proteínas desordenadas

Las proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs) carecen de una estructura tridimensional definida pero llevan a cabo múltiples funciones ¹. Estas proteínas se presentan como una colección de conformaciones que van desde completamente extendidas hasta conformaciones cercanas a las globulares (Figura 1) ². Están implicadas en varios procesos celulares, tales como vías de señalización o regulación de ciclo celular, y también se han relacionado con enfermedades neurodegenerativas, cáncer y agregación ³.



Figura 1 Regiones desordenadas en proteínas. Las proteínas pueden ser completamente desordenadas (IDPs, a la derecha), contener regiones desordenadas (IDRs) entre dominios ordenados o estar completamente plegadas (a la izquierda) ².

Entre las principales características de las IDPs se encuentran una baja proporción de aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos, los cuales se cree, participan en el proceso de colapso hidrofóbico presente en proteínas globulares ⁴. Están enriquecidas con aminoácidos cargados, los cuales, según su disposición y cantidad en la secuencia determinan las posibles conformaciones visitadas por la IDP ⁵. Esto permite clasificarlas de acuerdo a la composición y distribución de dichos aminoácidos en su secuencia, generando cuatro regiones denominadas R1, R2, R3 y R4, las cuales se describen a continuación(Figura 2) ⁶:

R1: Proteínas tipo globulares, las cuales contienen poca carga y cantidades similares de aminoácidos positivos y negativos.

R2: Quimeras entre glóbulos y horquillas, con mayor cantidad de carga

R3: Horquillas que son polianfolitos (igual cantidad de aminoácidos positivos y negativos).

R4: Conformaciones extendidas, las cuales están compuestas por polielectrolitos (mayor número de cargas positivas o negativas).

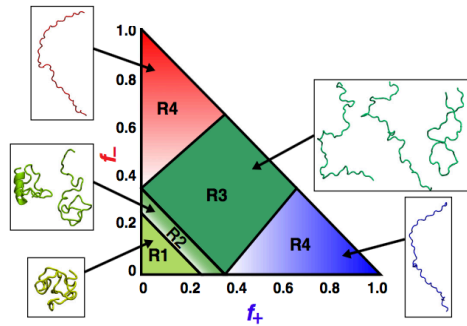


Figura 2 Clasificación de IDPs según su composición de aminoácidos. Cada región representa diferentes tipos de conformaciones según la cantidad de carga⁶.

Debido a que las IDPs pueden adoptar múltiples conformaciones, muchas de las interacciones que realizan están asociadas a una transición de desorden a orden en alguna región de la proteína. Estas regiones son conocidas como MoRFs (Motivos de reconocimiento molecular) y se clasifican en alfa, beta, irregulares y complejos según sea la estructura que toman cuando están interactuando con otra molécula⁷ (Figura 3). Cabe señalar que una misma región puede adquirir diferentes conformaciones para interactuar con diferentes moléculas².

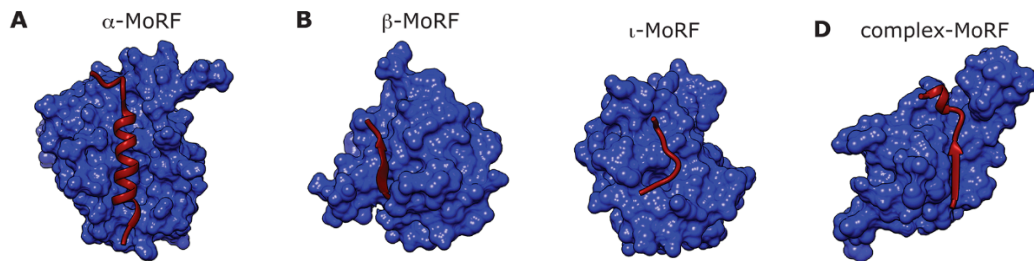


Figura 3 Motivos de reconocimiento molecular (MoRFs) Se muestra de izquierda a derecha la clasificación de los MoRFs, cada uno adoptando diferentes conformaciones⁷.

1.2 Fosforilación de IDPs

La fosforilación es una de las modificaciones postraduccionales (MPT) más abundantes en proteínas, y se estima que cerca de dos tercios del proteoma humano es susceptible de esta modificación⁸. Al igual que las proteínas plegadas, las IDPs también son reguladas por modificaciones postraduccionales (fosforilación) que afectan su actividad, plegamiento o localización celular⁹. Esta modificación postraducciona es llevada a cabo por proteínas cinasas que agregan un grupo fosfato, principalmente en los residuos serina, treonina y tirosina (Figura 4)¹⁰. Muchos sitios de fosforilación se encuentran en regiones desordenadas de proteínas, principalmente las serinas y treoninas, a diferencia de la tirosina, residuo poco

común en estas regiones ¹¹. A pesar de su abundancia, muchos de los efectos de la fosforilación en la dinámica de proteínas no son conocidos pero se anticipa que sean importantes dado el efecto de la densidad de carga en la conformación y dinámica de las IDPs discutido arriba, y se han ligado con transiciones de desorden a orden, interacciones proteína-proteína y cascadas de señalización¹¹.

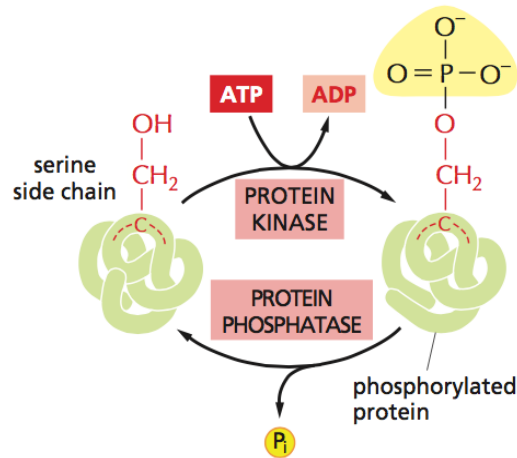


Figura 4 Fosforilación de proteínas. El mecanismo general es llevado a cabo por una proteína cinasa que agrega el grupo fosfato en el grupo OH de los aminoácidos serina (imagen), treonina y tirosina ¹².

1.3 Proteína adenoviral E1B55kDa

La proteína adenoviral E1B55kDa, es una proteína proveniente de Adenovirus humano tipo 5, contiene 496 aminoácidos y está presente en etapas tempranas y tardías en la infección por adenovirus, actuando mediante la inhibición de proteínas celulares ¹³. Posee dos regiones desordenadas, una en el extremo N- y otra en el C-terminal; dicho desorden está conservado en los demás tipos de adenovirus humano, siendo más prevalente en el extremo N-terminal ¹⁴. Además, se ha visto que diferentes modificaciones postraduccionales alteran su actividad, como su interacción con p53 o el transporte y procesamiento de RNA mensajeros virales¹³. Entre las modificaciones postraduccionales más estudiadas en E1B55kDa se encuentran la SUMOilación de la lisina 104 en el extremo N-terminal y la fosforilación de serina 490, serina 491 y treonina 495, en el extremo C-terminal, modificaciones que se creen están interconectadas entre sí ¹⁵. Además, estudios previos han mostrado que la fosforilación de los sitios antes mencionados, son clave para la eficiencia de infección, así como para la producción de progenie viral. La figura 5 muestra de forma esquemática la secuencia de dicha proteína y se señalan los sitios que son modificados.

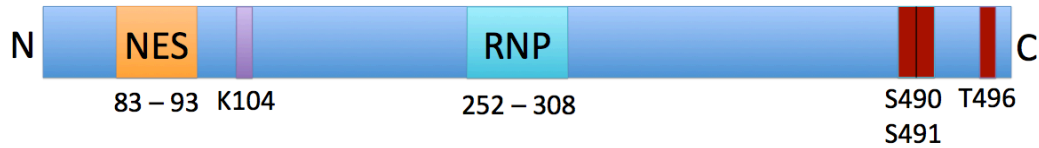


Figura 5 Representación esquemática de E1B55kDa. La figura muestra los 496 residuos que componen a E1B55kDa y en diferente color se muestran los sitios de modificación (K104, S490/491 y T495) así como otras regiones de interés (NES, RNP).

Posee un señal de exporte nuclear (NES) y un dominio de interacción con RNA (RNP) identificados a nivel de secuencia y por mutagénesis^{13 16}. En etapas tempranas de encarga de la ubiquitinación de p53 por la E3 ligasa formada entre E1b55kDa, E4Orf6 y otras proteínas celulares, la recluta a centros de replicación viral o la inhibe por medio de la unión a su sitios de transactivación. Por otra parte, en etapas tardías se encarga de la exportación de RNA mensajero viral fuera del núcleo para favorecer la traducción de dichos mensajeros¹⁷.

En este proyecto estudiamos un segmento proveniente del extremo C-terminal de E1B55kDa, el cual contiene los tres sitios de fosforilación. Haciendo uso de dinámica molecular clásica de todos los átomos, evaluamos el comportamiento de dicho segmentos en diferentes condiciones. Con base en experimentos previos, se realizaron mutantes que nos permitan entender las interacciones que realizan las diferentes mutaciones, con la espera de poder comprobar nuestras observaciones experimentalmente.

2. Marco teórico

2.1 Estudio de IDPs

Las proteínas intrínsecamente desordenadas, debido a sus características, han sido un reto para ser estudiadas experimentalmente. Entre los métodos experimentales más utilizados, y que han sido adaptados para IDPs, están la resonancia magnética nuclear (NMR), dispersión de rayos X de bajo ángulo (SAXS), dicroísmo circular (DC), filtración por columna, y dispersión dinámica de luz (DLS), entre otros².

De la misma manera se han desarrollado herramientas computacionales que nos permiten complementar la información obtenida por métodos experimentales, e incluso obtener información que es difícilmente obtenible por alguno de los métodos previos. Uno de

los primeros acercamientos fue la creación de predictores de desorden basados en la secuencia de la proteína; dichos predictores toman en cuenta diferentes propiedades como la carga, o el número de repeticiones presentes en la secuencia. Para tener un mejor desempeño en estas predicciones, se han creado servidores que dan un consenso de diferentes predictores¹⁸.

Otra herramienta que ha empezado a ser cada vez más utilizada en el modelado de proteínas intrínsecamente desordenadas es la dinámica molecular. Esta herramienta nos permite simular una proteína en solución y analizar sus movimientos a nivel atómico¹⁹. Uno de sus principales usos ha sido en el estudio del proceso de plegamiento, el cual ocurre en escalas temporales desde pico hasta milisegundos²⁰. El uso de esta técnica ha mostrado resultados que son comparables con datos experimentales²¹ y que han permitido hacer predicciones sobre el comportamiento de las proteínas.

La mayoría de los programas dedicados a hacer dinámica molecular, como NAMD²², Charmm²³, y Gromacs²⁴, entre otros, utilizan potenciales diseñados para proteínas con un plegamiento estable, lo que dificulta el estudio de las IDPs usando dichos potenciales. Esto ha llevado al desarrollo de campos de fuerza y estrategias de simulación especializados para IDPs. Tal es el caso de Campari²⁵ el cual emplea métodos de Monte Carlo para simular sistemas biológicos utilizando el modelo de solvente implícito ABSINTH²⁶. A finales del 2016, el campo de fuerza de Charmm²⁷ realizó cambios en sus parámetros con la finalidad de optimizarlo para su uso con proteínas desordenadas. Este nuevo campo de fuerza fue llamado Charmm36m²⁸, y ha mostrado una mejor correlación con datos experimentales de IDPs, tales como resonancia magnética nuclear (NMR) y dispersión de rayos X de bajo ángulo (SAXS)²⁸.

2.2 Uso de fosfomiméticos

Debido a que la fosforilación es una MPT que está presente en IDPs¹¹, una de las estrategias para estudiar esta modificación ha sido mediante el uso de mutantes que reemplazan los residuos fosforilables por un residuo de aspartato o glutamato con el fin de emular el efecto que tiene la fosforilación (fosfomiméticos)¹⁰, ya que esta mutación también agrega una carga negativa en el sitio de la modificación. Sin embargo, a pesar de esta adición de carga, la estructura de los residuos fosfomiméticos y los residuos fosforilados es diferente (Figura 6). Además, la carga neta añadida por cada grupo fosfato es -2, la cual difiere de la añadida por glutamato/aspartato, la cual es -1. Otra mutación empleada para

estudiar dicha modificación es el cambio a alanina, esto con el fin de impedir la fosforilación y poder evaluar el comportamiento de la proteína en ambos casos.

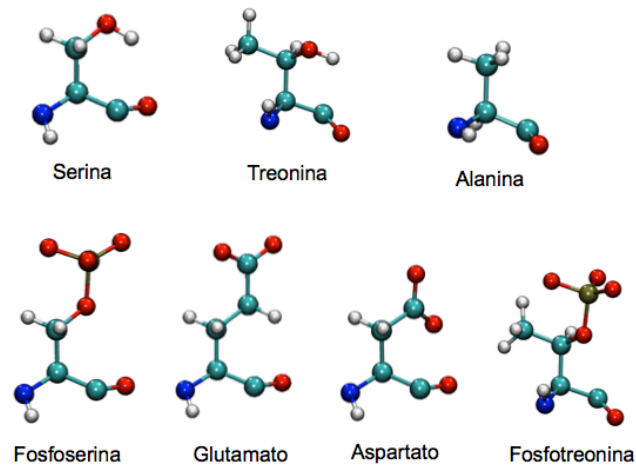


Figura 6 Comparación estructural de los residuos modificables. Se muestran las estructuras de la serina, treonina y sus variantes fosforiladas, así como la de los residuos fosfomiméticos (aspartato y glutamato) y alanina.

A pesar de que esta estrategia ha sido ampliamente usada para estudiar los efectos biológicos de la fosforilación, aún existen dudas sobre su equivalencia, debido a que hay estudios en los cuales los fosfomiméticos no tienen un efecto similar a la fosforilación. Por ejemplo, la fosforilación en tres sitios de fosforilación del factor de transcripción 4E-BP2 induce la formación de estructuras tipo láminas beta, mientras que la mutación de dichos sitios a aspartato o glutamato mantienen el estado desordenado de dicho segmento⁹. Otra estrategia que se ha propuesto es la adición de dos residuos de aspartato/glutamato en el lugar de la modificación para la generación de fosfomiméticos¹⁰, esto con el fin de igualar la diferencia de carga entre fosfatos y carboxilatos.

2.3 Estudio de E1B55kDa

Como se mencionó en la introducción, E1B55kDa es una proteína adenoviral que está presente durante la etapa temprana y tardía durante la infección por Adenovirus. A pesar de ser una proteína encargada de la regulación de múltiples procesos, no existe información estructural debido a su carácter desordenado en los extremos N- y C- terminal y a múltiples dificultades en su expresión heteróloga.

Estudios previos han mostrado que la fosforilación en el extremo C-terminal de E1B55kDa es importante para el avance efectivo de la infección. Dicha modificación postraduccional es

llevada a cabo por la proteína cinasa CK2 en las posiciones 490 y 491. En el caso de la posición 495 aún existen dudas respecto a la cinasa encargada de fosforilar dicho residuo²⁹. Para entender el efecto de dicha modificación se han generado una serie de variantes fosfomiméticas (S490D,S491D,T495D) ³⁰. Estos estudios han mostrado un comportamiento similar respecto a la localización celular de E1B55kDa silvestre y las fosfomiméticas, a diferencia de las mutaciones que impiden la fosforilación (mutaciones a alanina) ³⁰. Sin embargo, a pesar de tener información sobre los procesos que regulan a E1B55kDa y de sus posibles dianas, no existe información estructural, ni sobre el efecto concreto que tiene la fosforilación en la estructura y dinámica de la proteína en esta zona.

Resultados preliminares del Laboratorio de Virología Molecular del Centro de Investigación en Dinámica Celular (CIDC) han mostrado que la mutante simple de treonina 495 a aspartato tiene un comportamiento similar a la mutante doble de las serinas 490 y 491 a aspartato, mientras que la mutante T495A disminuye la producción viral comparado con las mutantes simples de las serinas a alanina (Figura 7). La mutante triple a alanina tiene un comportamiento comparable con la infección sin E1B55kDa, y la mutante triple a aspartato (pM) presenta un incremento en la producción de progenie viral. Otros resultados sugieren además, que las mutantes dobles de serina 490 y 491 por aspartato, tienen un efecto sobre la formación de centros de replicación viral e impide la fosforilación de la treonina 495. Lo que lleva a pensar en un posible orden de fosforilación. Estos resultados muestran a la treonina 495 como un residuo de interés para ser estudiado.

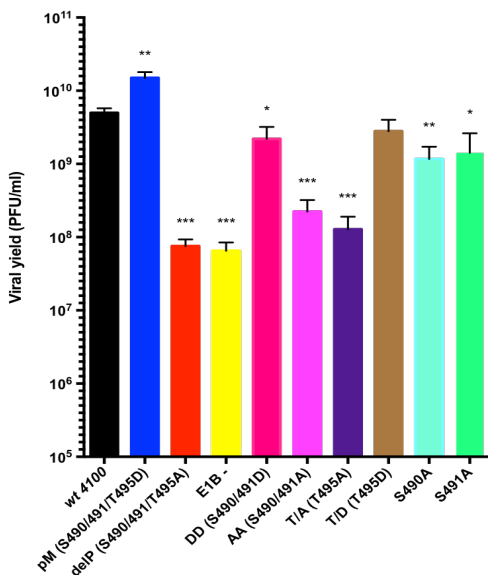


Figura 7 Producción de progenie viral. Se muestran las mutantes estudiadas en el laboratorio de virología molecular del CIDC y su efecto sobre la producción de progenie viral. Datos de Raúl López Antonio.

En un primer acercamiento, este proyecto se dedicó al estudio de la variante triple fosforilada, triple fosfomimética (aspartato y glutamato) y triple nula (alanina), en comparación con la proteína sin modificación (silvestre). También se estudió el efecto de las mutaciones R9A y T19A, la primera de ellas en sus variantes silvestre y fosforilada, mientras que para la segunda realizamos las variantes silvestre (SSA), fosfomiméticas (DDA/EEA) y fosforilada (pSpSA).

3. Justificación

E1B55kDa es una fosfoproteína que participa en el ciclo de replicación viral de Adenovirus en diferentes etapas, sin embargo, no existe información estructural debido al carácter desordenado de sus extremos N- y C-terminales. Además, la mutación a aspartato/glutamato para emular fosforilación en residuos de serina y treonina es una estrategia que no siempre explica la actividad de la versión silvestre. Entender cual es la equivalencia entre esta modificación postraducciona l y el uso de fosfomiméticos en la regulación de la estructura local de regiones desordenadas de proteínas, nos puede ayudar a entender los mecanismos implicados en la regulación de la infección. Además, debido a que la generación de fosfomiméticos es una herramienta utilizada tanto en IDPs como en proteínas plegadas, caracterizar sus efectos podría ayudar a desarrollar nuevas técnicas para el estudio de esta modificación. El uso de glutamato como fosfomimético es una estrategia que no ha sido usada en la proteína E1B5kDa.

4. Hipótesis

Existen diferencias en las consecuencias estructurales y dinámicas producidas por la fosforilación de serinas y treoninas y la mutación a aspartato/glutamato en regiones intrínsecamente desordenadas, debido a la distinta estructura de los carboxilatos y los fosfatos.

5. Objetivo

Caracterizar la formación de estructura residual en el extremo C-terminal de E1B55kDa en su variante silvestre, fosfomimética (aspartato y glutamato), fosforilada y triple nula (alanina), así como en las demás mutantes.

5.1 Objetivos particulares

- Delimitar al péptido C-terminal de E1B55kDa.
- Generar múltiples modelos iniciales idénticos para todas las variantes.
- Realizar dinámica molecular de los modelos obtenidos.
- Caracterizar estructuralmente los ensamblajes generados para las variantes, con miras a compararlas con datos experimentales.

6. Metodología

6.1 Obtención de secuencia a modelar.

La secuencia de E1B55kDa fue obtenida de la base de datos de NCBI con número de acceso AAQ19287. Con esta secuencia, calculamos la probabilidad de desorden haciendo uso de una colección de predictores (Tabla 1). Cada programa nos arrojó diferentes probabilidades de desorden por residuo y obtuvimos el promedio de esas predicciones. Graficamos los resultados obtenidos y tomamos los últimos 20 residuos del extremo C-terminal, los cuales presentan un alto grado de desorden, contienen los tres sitios de fosforilación y su longitud es apta para síntesis *in vitro*.

| | | | |
|------------------------|----------------------------|----------------------|-------------------------|
| Globplot ³¹ | RONN ³² | iPDA ³³ | Disoclust ³⁴ |
| PONDR ³⁵ | IUPRED ³⁶ | Poodle ³⁷ | MFDp ³⁸ |
| DisEMBL ³⁹ | Metadisorder ¹⁸ | PrDOS ⁴⁰ | Cspritz ⁴¹ |
| DISOPRED ⁴² | Disprot ⁴³ | Spritz ⁴⁴ | FoldIndex ⁴⁵ |

Tabla 1 Colección de predictores de desorden. Se tomo la predicción de cada programa y obtuvimos el promedio.

6.2 Modelos iniciales.

Usando el servidor PEPFOLD3⁴⁶ obtuvimos las estructuras iniciales partiendo de la secuencia silvestre. Dicho servidor nos regresó 100 modelos diferentes. Las mutaciones en las posiciones 14, 15 y 19, así como la fosforilación, se hicieron sobre estas estructuras usando el servidor Charmm-gui⁴⁷. Generamos 11 péptidos con las siguientes secuencias:

1. DHLVLACTRAEFGSSDEDTD (Silvestre)

2. DHLVLACTRAEFG**pSpS**DED**pTD** (Fosforilada)
3. DHLVLACTRAEFG**DD**DEDD (Fosfomimética-Aspartato)
4. DHLVLACTRAEFG**EE**DEDED (Fosfomimética-Glutamato)
5. DHLVLACTRAEFG**AA**DEDED (Nula-Alanina)
6. DHLVLACTRAEFG**SS**DEDED (Silvestre T19A SSA)
7. DHLVLACTRAEFG**pSpS**DEDED (Fosforilada T19A pSpSA)
8. DHLVLACTRAEFG**DD**DEDED (Fosfomimética Aspartato T19A DDA)
9. DHLVLACTRAEFG**EE**DEDED (Fosfomimética Glutamato T19A EEA)
10. DHLVLACT**AA**EFG**SS**DEDED (R9A Silvestre)
11. DHLVLACT**AA**EFG**pSpS**DED**pTD** (R9A Fosforilada)

6.3 Dinámica molecular.

Una vez obtenidas las estructuras iniciales, usamos el servidor Charmm-gui para armar las cajas de simulación. Utilizamos el modelo de solvente explícito TIP3P y adicionamos 0.15 molar de NaCl. Debido a que la secuencia que estamos modelando parte de una proteína más grande, usamos el parche ACE en el extremo N-terminal para acetilar dicho extremo y evitar efectos provenientes de la carga adicional. Para cada sistema se realizó una minimización de 1000 pasos usando el algoritmo conjugate gradient y 150 ps de dinámica molecular para el solvente. Posteriormente se realizaron 2000 pasos de minimización para todo el sistema y procedimos a la producción de dinámica molecular con el campo de fuerza Charmm36m²⁸ y el programa NAMD²².

Todas las dinámicas se realizaron en un ensamble NPT usando 2 fs como tiempo de integración y el algoritmo Leapfrog-Verlet para resolver las ecuaciones de movimiento, así como el pistón de Langevin para mantener la temperatura y presión constantes a 298K y 1 atm, respectivamente. Para el suavizado de las interacciones de VDW se utilizó la función de switch y shift para las de Coulomb, con un corte de 12 Å. La lista de vecinos se actualizó cada 10 pasos, utilizando un corte de 14 Å. El guardado de los datos para análisis se realizó cada 500 pasos, generando así archivos con 1,000 fotos cada uno para cada péptido simulado.

Se realizaron corridas cortas de 50 ns para cada sistema, obteniendo así, 5 microsegundos de tiempo de simulación acumulado para cada variante. Con esta estrategia queremos explorar ampliamente el paisaje conformacional que visita cada variante, con el fin de obtener convergencia estructural entre modelos.

6.4 Análisis.

Para cada modelo de cada variante se calculan propiedades estructurales tales como *radio de giro* y *RMSD* (contra la estructura inicial y los miembros del ensamble). Este último nos permite ver cuánto cambiaron las estructuras respecto a la estructura inicial, mientras que el radio de giro es una medida global del tamaño de la proteína y nos permite saber qué tan extendida o compacta se encuentra.

Para calcular *puentes de hidrógeno* con el agua e intracadena, tomamos una distancia de corte de 2.4 Å y, para el caso de la fosforilación, declaramos los aceptores y donadores de puentes puente de hidrógeno para el grupo fosfato. Todos estos análisis se compararon con la versión silvestre y obtuvimos el enriquecimiento de cada interacción (Fold-change), para obtener dicho valor dividimos el promedio de la persistencia de cada interacción dividida entre el total de modelos simulados y el resultado obtenido se divide entre el valor de la versión silvestre. Esto con el fin de encontrar cuáles son las interacciones que son más o menos frecuentes. Para el cálculo de *estructura secundaria*, calculamos el valor de los ángulos diedros phi/psi para cada residuo y graficamos dichos valores en mapas de Ramachandran. Usamos el programa STRIDE de Carma ⁴⁸ para los diferentes tipos de estructura secundaria que obtuvo el péptido, en sus distintas variantes, a lo largo de la simulación y obtuvimos el porcentaje para todo el ensamble. Todos los cálculos, con excepción de la estructura secundaria se realizan con el programa Charmm40²³.

Debido a que estamos trabajando con ensambles de múltiples estructuras, se muestran las distribuciones de cada propiedad, mientras que en el caso de los puentes de hidrógeno se muestra el promedio de cada interacción normalizada respecto a la versión silvestre.

Para poder hacer la comparación de propiedades entre péptidos, todas las figuras y gráficas se realizan con VMD ⁴⁹ y la paquetería Matplotlib de python, respectivamente.

7. Resultados y discusión

7.1 Selección del segmento a trabajar

Basados en los resultados obtenidos por los predictores de desorden, calculamos el promedio de la probabilidad de desorden para cada residuo (Figura 8).

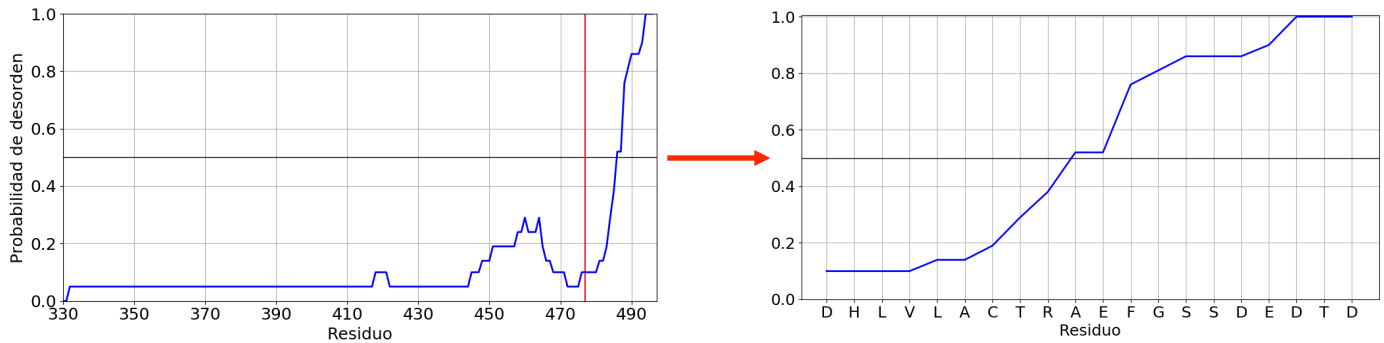


Figura 8 Perfil de desorden. Se muestra el perfil de desorden de los últimos 167 residuos del extremo C-terminal de E1B55kDa. La línea roja representa la región que se seleccionó y a la izquierda el perfil de desorden de dicha región y su secuencia.

El segmento seleccionado contiene los tres sitios de fosforilación (490, 491 y 495 en la proteína completa; 14, 15 y 19 en el péptido), además notamos que la secuencia cuenta con un solo contraión (arginina 9 en el péptido). La numeración que se usará a partir de aquí es la presente en el péptido (del 1 al 20).

7.2 Estructuras iniciales

Usando el servidor PEPFOLD3 obtuvimos 100 estructuras iniciales. Para determinar qué tan diverso es el ensamble inicial calculamos el RMSD por parejas entre todas las estructuras y graficamos la distribución; también calculamos el radio de giro. La figura 9 muestra la distribución de ambos para el ensamble inicial.

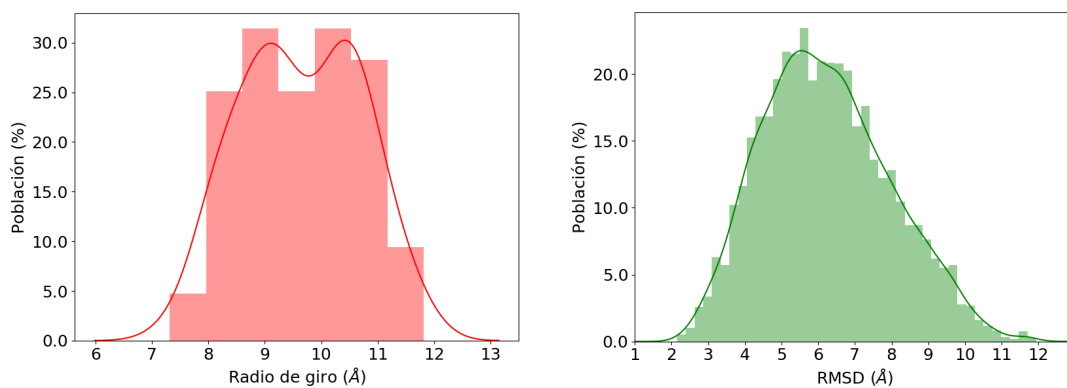


Figura 9 Ensamble inicial. Los histogramas muestran la distribución de radio de giro (rojo) y RMSD por parejas (verde) para las estructuras iniciales.

Estos resultados sugieren que las estructuras iniciales son diferentes entre sí, con un RMSD promedio de 6 Å entre ellas. En el caso del radio de giro podemos observar que tenemos estructuras compactas de 7.2 Å hasta estructuras extendidas de casi 12 Å (Figura 10).

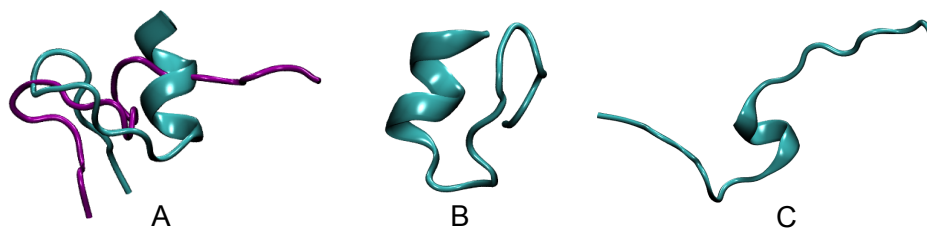


Figura 10 Estructuras iniciales. A) Se muestra el RMSD promedio entre dos estructuras (6 Å) del ensamble inicial. B) y C) radio de giro más chico 7.2 Å y más grande 11.82 Å, respectivamente.

Dado que las estructuras iniciales son diferentes podemos suponer que estamos partiendo de un ensamble diverso y seremos capaces de muestrear mejor el paisaje conformacional del péptido.

7.3 Dinámica molecular

Se realizaron 1,100 simulaciones (11 péptidos con 100 modelos diferentes cada uno) que corresponden a las variantes silvestre (SST), aspartato (DDD), glutamato (EEE), alanina (AAA), fosforilada (pSpSpT), las mutantes T19A: SSA, DDA, EEA, pSpSA, y las mutantes R9A con los residuos 14, 15 y 19 fosforilados y sin fosforilar.

Se mostrarán primero los resultados de las variantes silvestre, fosforilada, fosfomiméticas y nulas (alanina), mientras que las nuevas mutantes se mostrarán al final.

7.4 Radio de giro

Para cada variante se calculó el radio de giro respecto a la estructura inicial, se concatenaron los resultados y se graficó el histograma (Figura 11). Los histogramas muestran una amplia distribución en todos los casos, siendo el modelo con glutamato (línea verde) el que presenta valores más extendidos, mientras que la versión fosforilada presenta un pico más pronunciado entre los 10 11 Å y no alcanza valores tan altos como las demás.

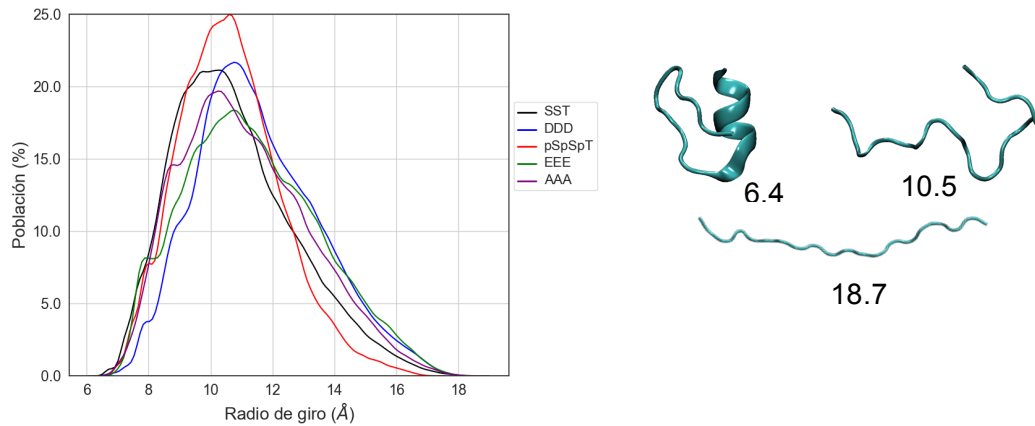


Figura 11 Radio de giro del ensamblado. Se muestran los histogramas para cada variante. A la derecha se muestran las estructuras con el radio de giro más pequeño, promedio y más grande, respectivamente.

Estos resultados sugieren que la versión fosforilada hace un mayor número de interacciones que le confieren cierto grado de compactación, resultado diferente al esperado ya que al ser un polielectrolito negativo esperábamos obtener conformaciones extendidas. Por el contrario, las variantes fosfomiméticas presentan una distribución más extendida, lo que indica que las interacciones que promueven compactación en la fosforilada se pierden o son menos frecuentes en las fosfomiméticas.

7.5 Puentes de hidrógeno

Debido a los resultados obtenidos con el radio de giro, decidimos mirar a los puentes de hidrógeno, tanto los que hace el péptido con el agua, como los intracadena y los mediados por agua.

La figura 12 muestra el número total de puentes de hidrógeno que forma cada residuo con el agua, promediado sobre todo el tiempo de simulación.

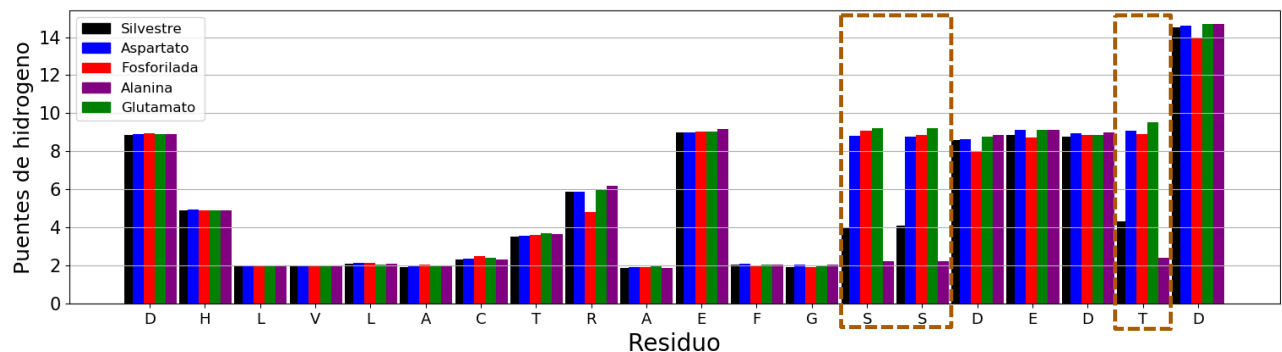
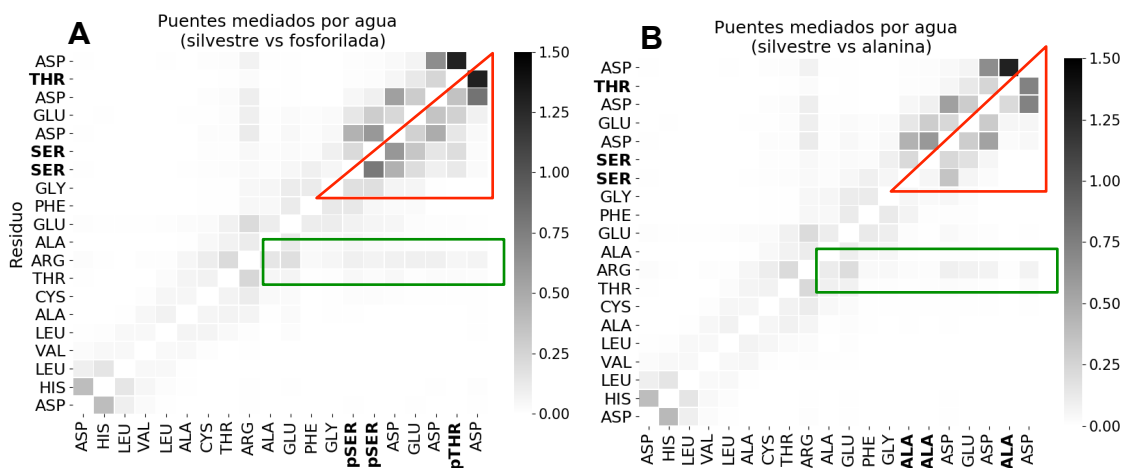


Figura 12 Puentes de hidrógeno con el agua. Se presenta el número total de puentes de hidrógeno que hace cada residuo en la diferentes variantes. Las cajas punteadas encierran los sitios de fosforilación/mutación.

Debido a que estamos trabajando con un péptido desordenado, es de esperar que cada residuo haga casi su máximo de interacciones con el agua. En el caso de los residuos no polares como leucina, valina, alanina, fenilalanina y glicina, el número esperado de puentes de hidrógeno es de dos puentes por residuo. Para aspartato y glutamato, 6 o más puentes de hidrógeno (debido al carboxilato presente en ellos); histidina, serina y treonina con 4 puentes cada uno; cisteína 3 puentes y por último arginina 7 puentes. Como podemos observar en la figura 12, la arginina 9 hace un menor número de puentes de hidrógeno (~5 puentes) en la versión fosforilada (línea roja) comparada con las demás versiones, mientras que los fosfatos en las posiciones 14 y 15 (líneas rojas encerradas) se comportan igual que los glutamatos y aspartatos (líneas verdes y azules, respectivamente), contrario a lo esperado, debido a que por el incremento de carga en estos residuos el número de puentes de hidrógeno también debería ser mayor. En el caso de la treonina 19 de la versión fosforilada también se ve una disminución de puentes de hidrógeno comparada con las demás variantes. Creemos que esto puede estar relacionado con la formación de interacciones entre la arginina 9 y los residuos fosforilados, especialmente con la fosfotreonina 19.

Analizamos los puentes de hidrógeno mediados por agua en búsqueda de más interacciones, especialmente entre los residuos modificados. La figura 13 muestra los mapas de calor de dichos puentes.



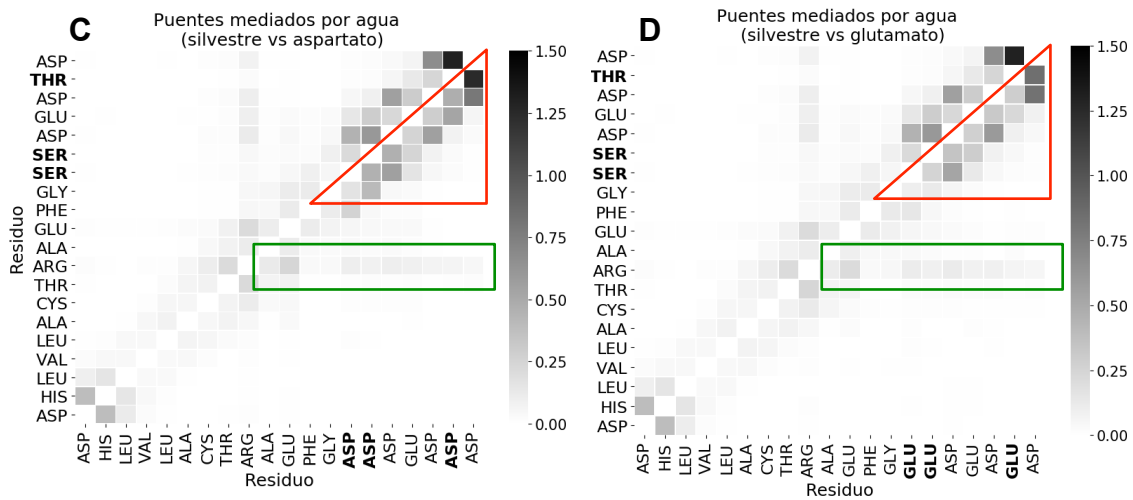


Figura 13 Puentes de hidrógeno mediados por agua. Cada cuadro muestra la comparación de los puentes formados respecto a la versión silvestre (panel superior en cada mapa de calor). A) Silvestre vs Fosforilada B) Silvestre vs Alanina C) Silvestre vs Aspartato D) Silvestre vs Glutamato. Los triángulos rojos muestran la región rica en cargas en el extremo C-terminal. El rectángulo verde muestra los puentes de agua que realiza la arginina 9.

Debido a la presencia de cargas en el extremo C-terminal del péptido, esperamos que haya un incremento en la formación de puentes de agua. Los resultados muestran que, en el caso de la versión fosforilada, hay un mayor número de interacciones en comparación con las variantes fosfomiméticas. A pesar de que estas mutantes (panel C y D figura 13) también incrementan la carga del péptido, las interacciones son menores, además, el glutamato parece formar más interacciones comparada con aspartato. Como era de esperarse, eliminar la carga en las posiciones 14, 15 y 19 (panel B figura 13) provoca la disminución en la formación de dichas interacciones. En el caso de la arginina 9 (rectángulos verdes), podemos observar que en las variantes fosfomiméticas, la formación de puentes de agua con este residuo es mayor comparada con la fosforilada. Con la mutante a alanina, estas interacciones se pierden. Para analizar más detalladamente las posibles interacciones entre residuos decidimos obtener el número de puentes de hidrógeno intracadena. La figura 14 muestra el número total de puentes de hidrógeno intracadena por residuo para cada variante.

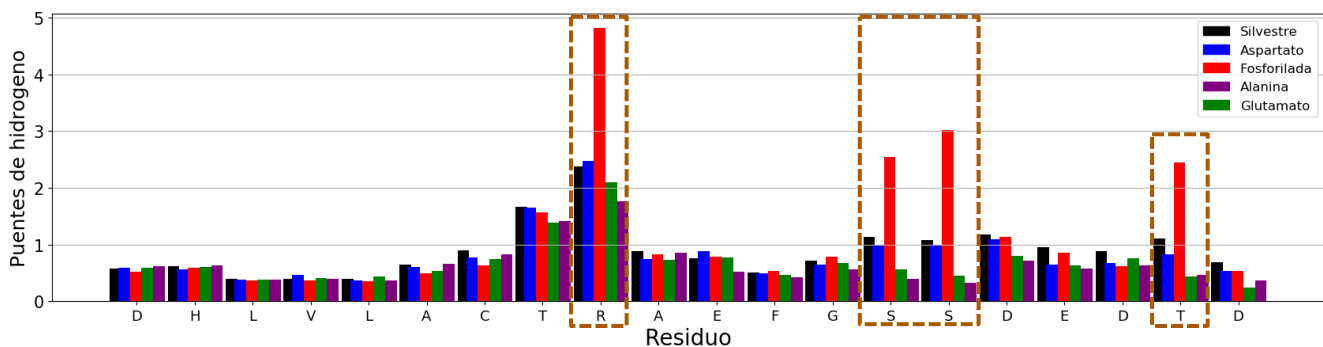


Figura 14 Puentes de hidrógeno intracadena. Se muestra el total de puentes de hidrógeno por residuo, y en las cajas punteadas se encierran aquellos que realizaron un mayor número de interacciones.

Como se puede observar en la figura 14, hay poca formación de puentes intracadena, con excepción de los residuos fosforilados y la arginina 9 en la versión fosforilada (líneas rojas encerradas). Esto puede explicar el comportamiento extendido visto en el radio de giro y la formación de puentes con el agua visto en las Figuras 11 y 12, respectivamente. Comparando los resultados de los puentes de hidrógeno con el agua y los intracadena, pudimos notar que la arginina 9 en la versión fosforilada hace menos puentes de hidrógeno con el agua, lo cual se ve recompensado en las interacciones intracadena.

Usando estos datos podemos suponer que la arginina 9 realiza interacciones más frecuentes con los fosfatos en comparación con los carboxilatos presentes en las versiones fosfomiméticas. Para poder identificar aquellos pares de residuos que están interactuando, realizamos un mapa de calor en el cual se muestran aquellas interacciones que son más frecuentes (Fold-change) en las distintas versiones respecto a la versión silvestre (Figura 15). En el triángulo superior de cada figura se muestra el cociente del promedio de la persistencia de cada interacción en cada variante con la versión silvestre.

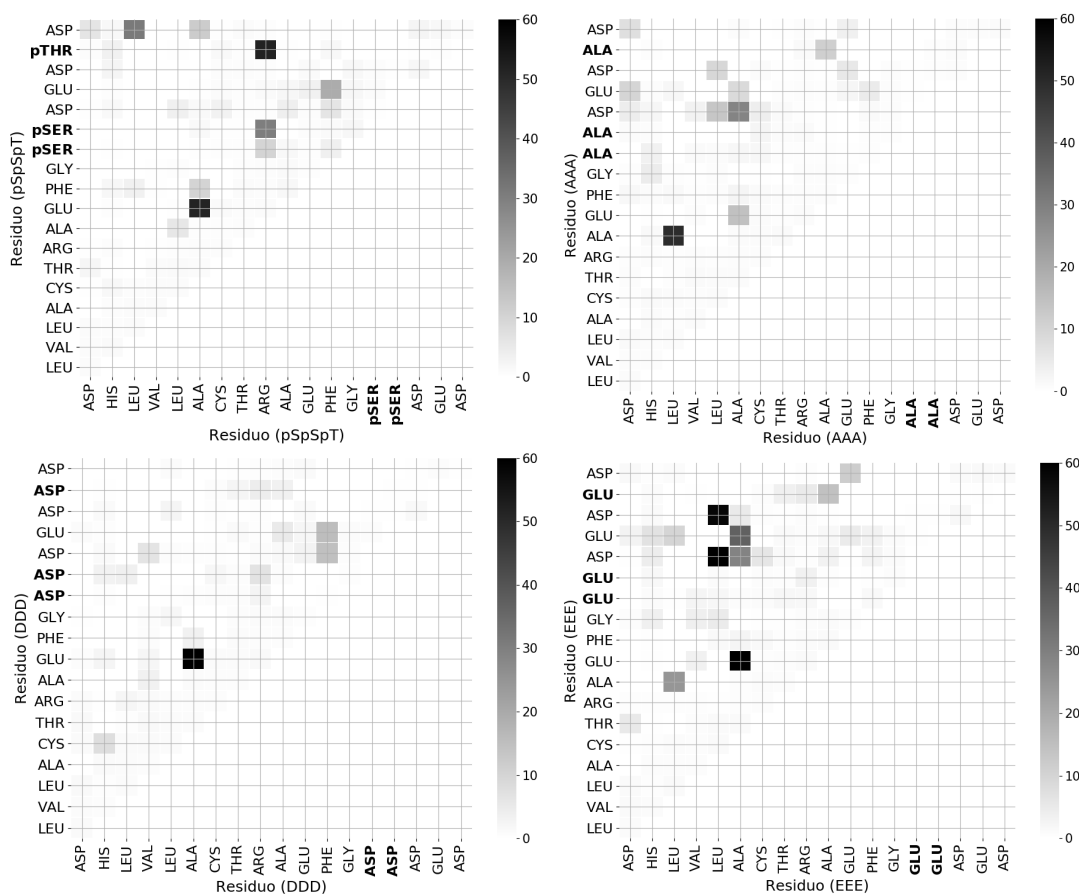


Figura 15 Enriquecimiento de interacciones. Se muestra el enriquecimiento por pares de cada interacción respecto a la versión silvestre. Los puntos más oscuros son aquellos que tuvieron un valor de Fold-change más grandes.

Los mapas de calor respecto al péptido silvestre (Figura 15) mostraron que en la versión fosforilada las interacciones más frecuentes ocurrían entre los residuos fosforilados con la arginina 9, decidimos mirar detalladamente dichas interacciones, y compararla en las demás variantes (Figura 16).

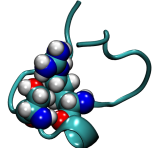

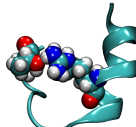
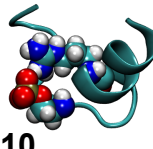
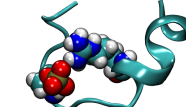
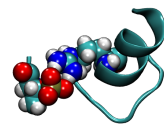
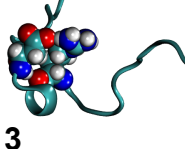
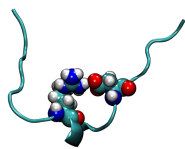
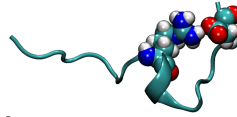
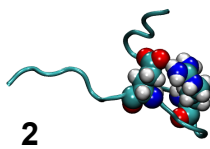
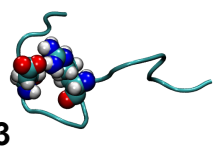

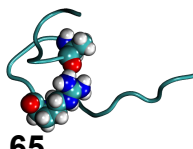
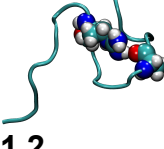
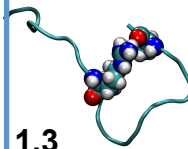
| | Residuo 14 | Residuo 15 | Residuo 19 |
|-------------|---|--|--|
| Silvestre |  1 |  1 |  1 |
| Fosforilada |  10 |  30 |  52 |
| Aspartato |  3 |  7 |  4 |
| Glutamato |  2 |  3 |  5 |
| Alanina |  0.65 |  1.2 |  1.3 |

Figura 16 Puentes de hidrógeno entre los residuos fosforilables. Se muestran de izquierda a derecha las interacciones que realiza la arginina 9 con los residuo 14, 15 y 19, en las versiones silvestre, fosforilada, aspartato, glutamato y alanina, respectivamente. Debajo de cada estructura se muestra el enriquecimiento respecto a la silvestre.

Estos resultados muestran que la arginina 9 es un residuo que interactúa de forma activa con los fosfatos. Realiza interacciones que son hasta 52 veces más frecuentes comparado con la versión silvestre. En el caso de las mutantes fosfomiméticas podemos observar que la frecuencia es similar para las tres posiciones. Como era de esperarse, las interacciones con alanina son menores y en las posiciones 15 y 19 ligeramente más frecuentes

Otro aspecto que quisimos investigar fue qué tan frecuentes son las interacciones comparando las mutantes fosfomiméticas respecto a la versión fosforilada (Figura 17), esto con el fin de ver si las mutaciones fosfomiméticas son equivalentes a la fosforilación.

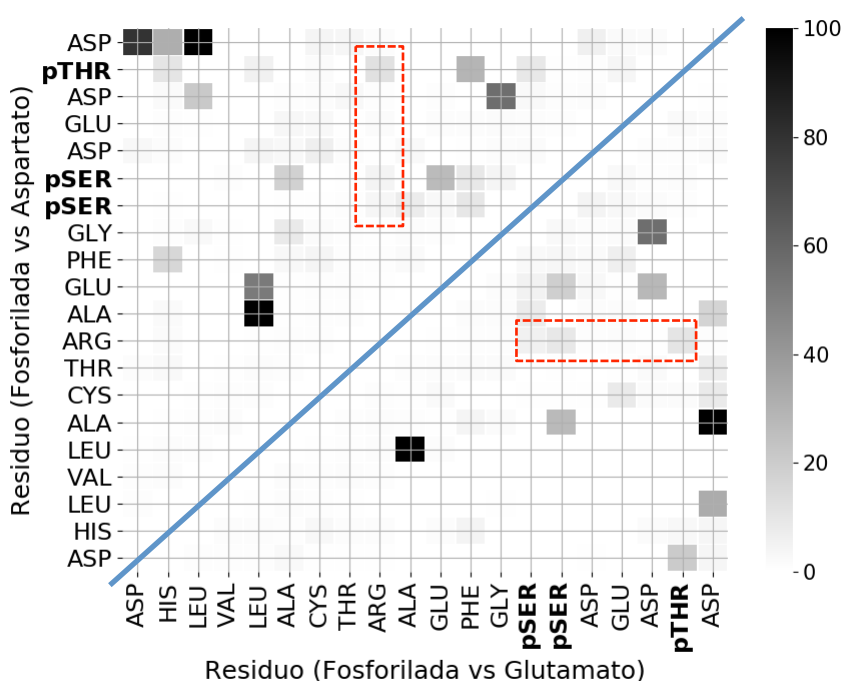


Figura 17 Mapa de calor fosfomiméticas contra fosforilada. En la parte superior del gráfico se muestra el cociente fosforilada/aspartato, mientras que en el de abajo se muestra fosforilada/glutamato.

Este resultado muestra que incluso entre variantes fosfomiméticas, las interacciones son diferentes en los dos casos. Cuando vemos las interacciones que se realizan entre los residuos fosforilados y la arginina 9, podemos notar que son más frecuentes en la versión fosforilada. Los valores para dichas interacciones se muestran en la figura 18. Sin embargo, la figura 17 también muestra que existen otras interacciones mucho más frecuentes y que son diferentes en ambas variantes. Para la versión con glutamato las interacciones más

frecuentes son Alanina 10 con Leucina 5 y aspartato 20 con alanina 6. Para la variante con aspartato, dichas interacciones son aspartato 1 con aspartato 20 y aspartato 20 con leucina 3, ambas variantes comparten la interacción Alanina 10 – Leucina 5. Esto podría sugerir que los residuos fosforilados no son los únicos que están interactuando.

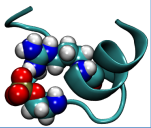
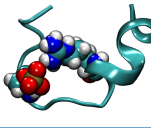
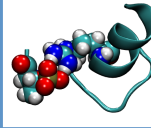
| | | | |
|------------------------|---|--|---|
| Estructura Cociente |  |  |  |
| Fosforilada/Asp | 4 | 5 | 12 |
| Fosforilada/Glu | 6 | 9 | 10 |

Figura 18 Enriquecimiento fosforilada vs fosfomiméticas. De izquierda a derecha se muestran las interacciones que realizan los residuos 14, 15 y 19 con la arginina 9. Los números indican el enriquecimiento de cada interacción respecto a la fosforilada.

Como muestran los mapas de calor, las interacciones de los fosfatos con la arginina 9 son más frecuentes que en las versiones fosfomiméticas. Estos cambios podrían, además, tener un efecto sobre el comportamiento del péptido en cuanto a la formación de estructura secundaria.

7.6 Estructura secundaria

Tomando en cuenta que la interacción de fosfotreonina 19 con la arginina 9 fue la que tuvo el enriquecimiento más grande, pensamos en que esta interacción podría ser clave para el establecimiento de interacciones con otras proteínas, por lo cual decidimos ver cuál era el tipo de estructura secundaria que adoptaba el segmento localizado entre ambos residuos cuando la interacción se daba. Obtuvimos aquellas estructuras de las simulaciones en las cuales la arginina 9 estuviera haciendo puente de hidrógeno con la posición 19. Para estas estructuras calculamos la estructura secundaria, obtuvimos la secuencia de letras que representa a cada tipo de estructura y buscamos la secuencia más frecuente. La figura 19 muestra el resultado de este análisis.

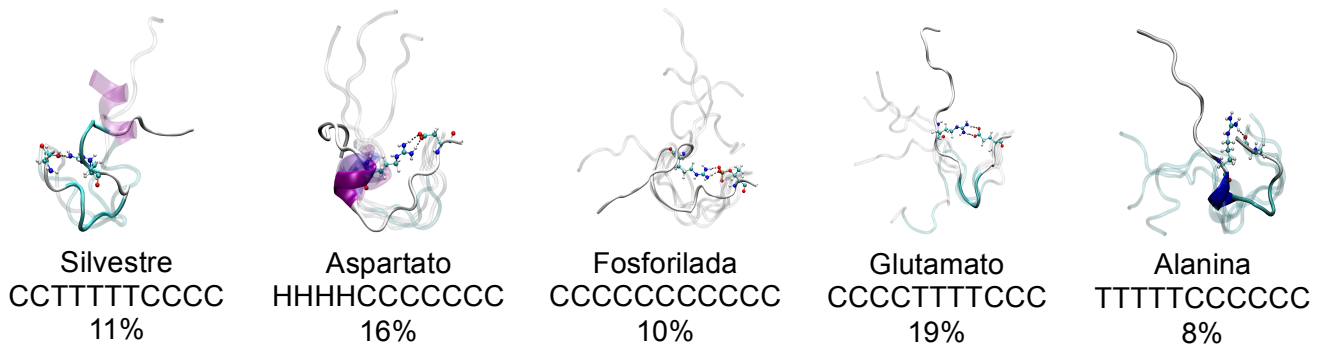


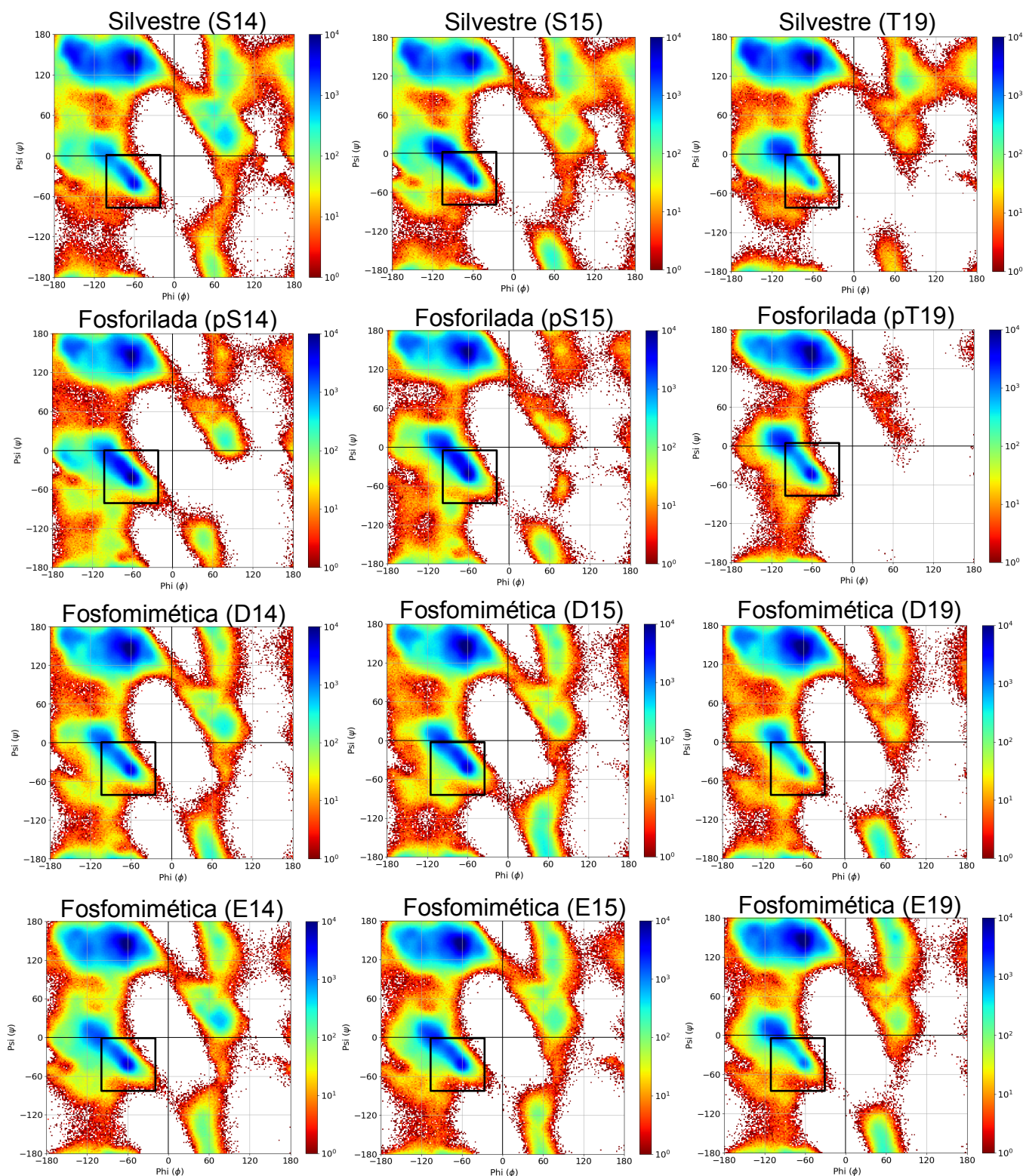
Figura 19 Estructura de la interacción. Se muestra la estructura secundaria que adopta la región entre los residuos 9 y 19. Debajo se muestra el código de letras para cada tipo de estructura, C = coil (blanco), H = hélice alfa (morado), T = turns (cian) y el porcentaje de repeticiones en el conjunto de muestra.

La estructura preferida varía según la variante, pero podemos observar que la secuencia de letras en la versión silvestre y la glutamato es muy similar, y que en las versiones aspartato y alanina parece haber formación de estructura cerca de la arginina 9. La versión fosforilada se mantiene desordenada, es decir, no adopta ningún tipo de estructura cuando esta interacción sucede. La tabla 2 muestra el número de veces que se encontró la interacción 9-19 en todo el ensamble para cada variante, así como el número de veces que se encontró la palabra dada.

| Variante | Número de interacciones 9 - 19 | Número de repeticiones de secuencia | Porcentaje |
|-------------|--------------------------------|-------------------------------------|------------|
| Silvestre | 7896 | 942 | 11 |
| Fosforilada | 1204308 | 122959 | 10 |
| Aspartato | 127309 | 20898 | 16 |
| Glutamato | 87458 | 17170 | 19 |
| Alanina | 14991 | 1328 | 8 |

Tabla 2 Estructura de la interacción arginina 9 con residuo 19. En todos los casos partimos de un ensamble del mismo tamaño para todas las variantes (5,000,000 de fotos). Se muestran, el número de fotos en las que se encontró la interacción 9-19, así como el número de veces que se encontraron las palabras descritas en la figura 19 para cada variante y el porcentaje que representa.

Debido a que la interacción de la arginina 9 con el residuo 19 es poco frecuente, decidimos observar qué es lo que hace cada uno de los residuos modificados en todo el ensamble. Se muestran los mapas de Ramachandran de cada uno de estos residuos (Figura 20).



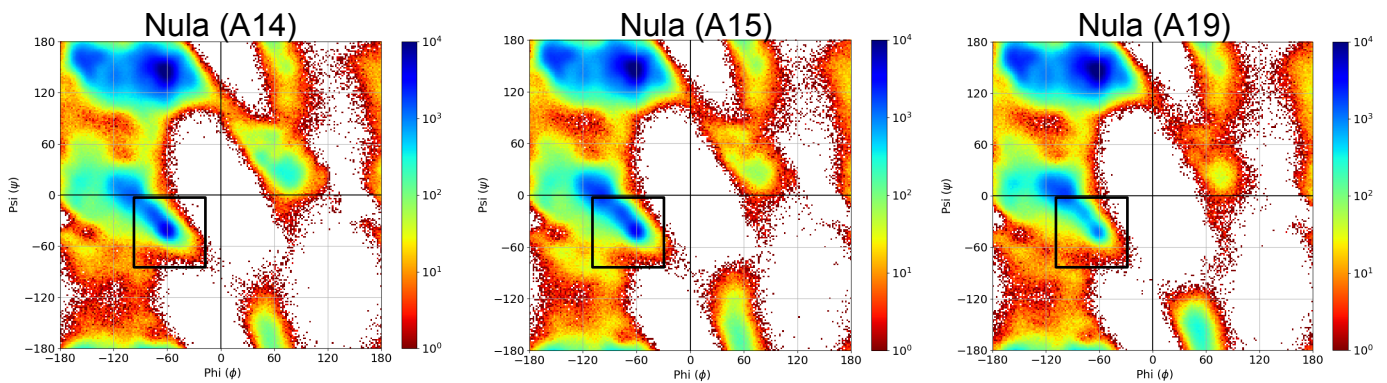


Figura 20 Mapas de Ramachandran de los residuos modificados. Se muestran los histogramas en 2D de cada residuo modificado para cada variante. En el cuadro negro se encierra la zona de estructura tipo alfa hélice.

Los mapas de Ramachandran muestran que en todos los casos hay un incremento de estructura tipo alfa hélice en el ensamble fosforilado en comparación con las demás variantes. Para poder observar que tan grande es este incremento graficamos el porcentaje de alfa hélice por residuo y dividimos respecto a la silvestre. El resultado se muestra en la Figura 21.

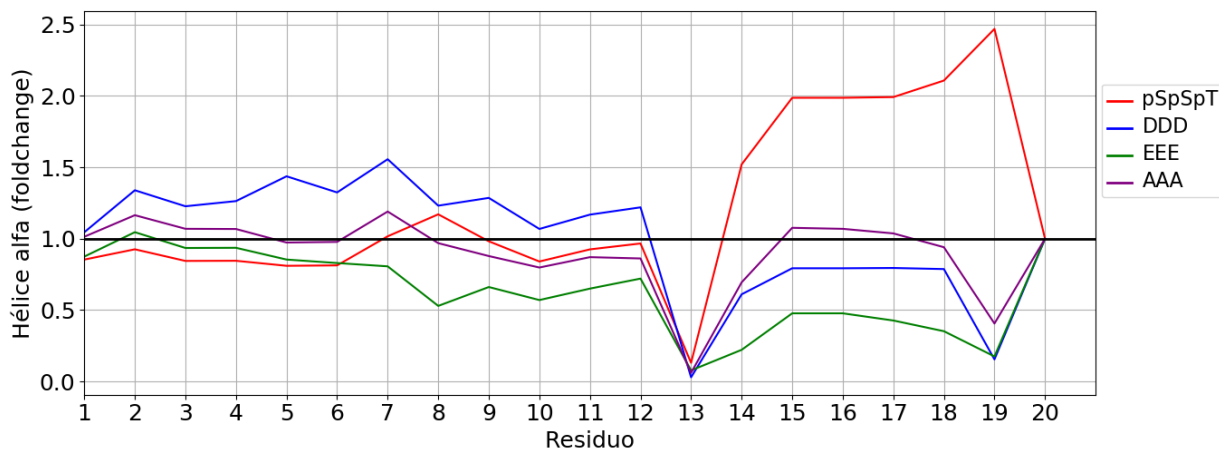


Figura 21 Enriquecimiento de alfa hélice. La imagen muestra el enriquecimiento de alfa hélice para todo el ensamble. La línea negra horizontal corresponde a la versión que tomamos como referencia (silvestre).

Los resultados anteriores muestran que la versión fosforilada (línea roja) tiene preferencia por hacer estructura alfa hélice en el extremo C-terminal (sitio de las modificaciones). En particular la posición 19 muestra un incremento de 2.5 veces en comparación con la silvestre.

Es de interés notar que las versiones fosfomiméticas tienen un comportamiento similar, sin embargo, la versión con aspartato (línea azul) forma más alfa hélice que la versión con glutamato (línea verde). Las versiones silvestre y con alanina (nula) forman aproximadamente la misma cantidad de hélice en la posiciones 15 a 18.

Debido a este incremento de hélice en la versión fosforilada, obtuvimos aquellas interacciones que pudieran estar estabilizando dicha estructura. Tomamos todas aquellas estructuras en las que estuviera presente esta hélice y sobre ellas calculamos los puentes de hidrógeno. La Figura 22 muestra el mapa de calor de dichas interacciones y las estructuras asociadas.

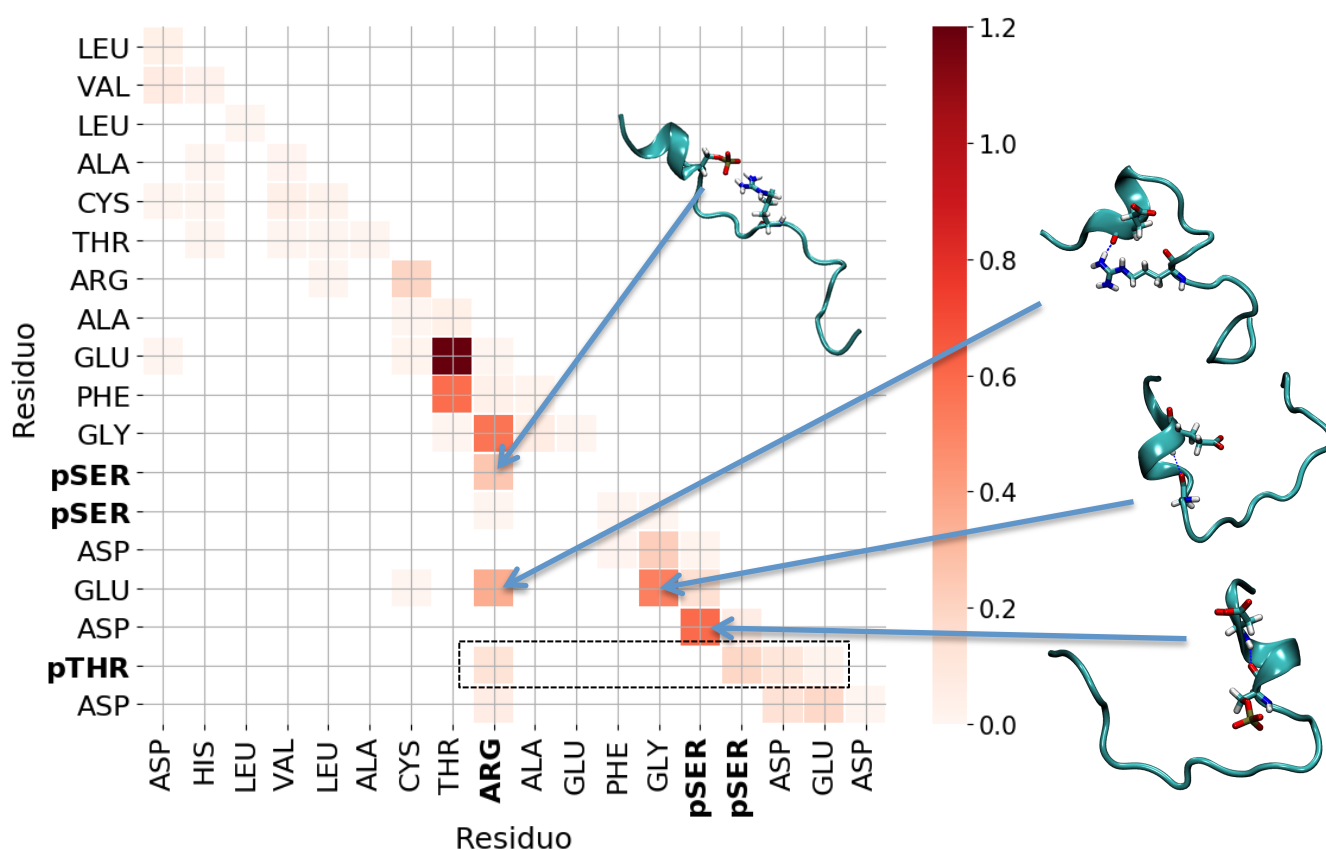


Figura 22 Interacciones hélice alfa C-terminal fosforilada. Se muestra el mapa de calor de las interacciones presentes en la hélice C-terminal fosforilada, a la izquierda las estructuras de las interacciones más frecuentes. Se señalan sólo aquellas interacciones que ocurren a partir del residuo 14 (sitio en donde inicia la hélice).

La Figura 22 muestra que en la hélice C-terminal la fosfoserina 14, así como el glutamato 17, aspartato 18 y arginina 9 son los que se encargan de la estabilización de la hélice. Además,

los residuos fosfotreonina 19 y aspartato 20 realizan varias interacciones con los residuos cercanos. Estos resultados sugieren que la presencia de carga negativa y su interacción con el agua están ayudando en la formación de estructura residual en el extremo C-terminal. Sin embargo, esta hélice es menos frecuente en las versiones fosfomiméticas. Cabe señalar que las interacciones arginina 9 con glicina 13, treonina 8 con fenilalanina 12 y treonina 8 con glutamato 11, no son parte de la hélice C-terminal, pero muestran valores altos de persistencia. La estructura de dichas interacciones se muestra en la figura 23.

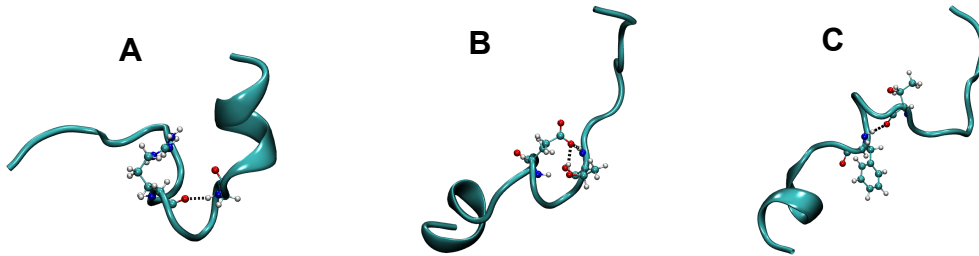


Figura 23 Interacciones no presentes en la hélice C-terminal. Se muestran las interacciones que tienen alta persistencia pero que no son parte de la hélice. A) Arginina 9 con Glicina 13. B) Treonina 8 con Glutamato 11. C) Treonina 8 con Fenilalanina 12.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en la Figura 21, en todos los casos, con excepción de la versión fosforilada, hay una disminución de alfa hélice en la posición 19; este resultado podría estar asociado a los cambios observados experimentalmente por la mutante T/A (T495A), en la cual hay una disminución en la producción de progenie viral.

Con base en lo antes mencionado decidimos generar las mutantes T19A, en las versiones silvestre (SSA), fosfomiméticas (DDA/EEA), y fosforiladas (pSpSA). Partimos de las mismas estructuras iniciales y las simulaciones se realizaron con las mismas condiciones que las anteriores.

7.7 Mutante T19A

Al igual que las variantes anteriores, evaluamos el nivel de compactación de las nuevas mutantes graficando la distribución del radio de giro. La Figura 24 muestra la comparación por pares.

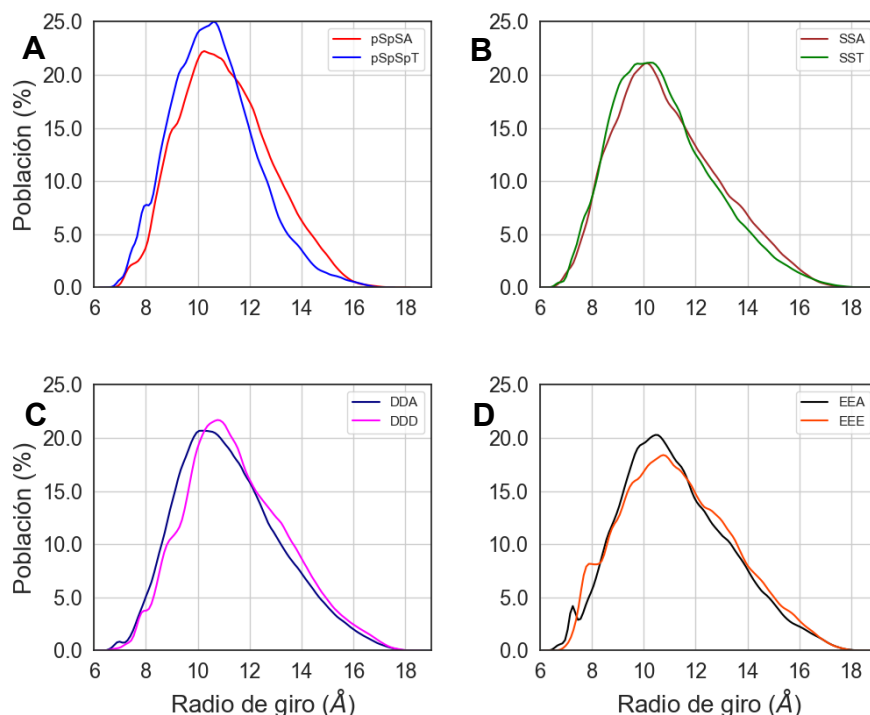


Figura 24 Radio de giro de las mutantes T19A. Se muestra el radio de giro de la mutante T19A en todas sus variantes respecto a la triple mutante. A) Fosforilada vs Fosforilada-T19A, B) Silvestre vs Silvestre-T19A, C) Aspartato vs Aspartato-T19A, D) Glutamato vs Glutamato-T19A.

El radio de giro muestra que eliminar la fosfotreonina 19 tiene un efecto sobre la compactación del péptido, haciéndolo más extendido que la triple fosforilada. En el caso de las demás variantes, no se muestra una diferencia considerable ya que al mutar a posición 19 el comportamiento es similar al original.

Debido a que la fosfotreonina 19 era el residuo que realizaba el mayor número de interacciones con la arginina 9, graficamos los mapas de calor de cada variante y comparamos los resultados con las mutantes originales (Figura 25).

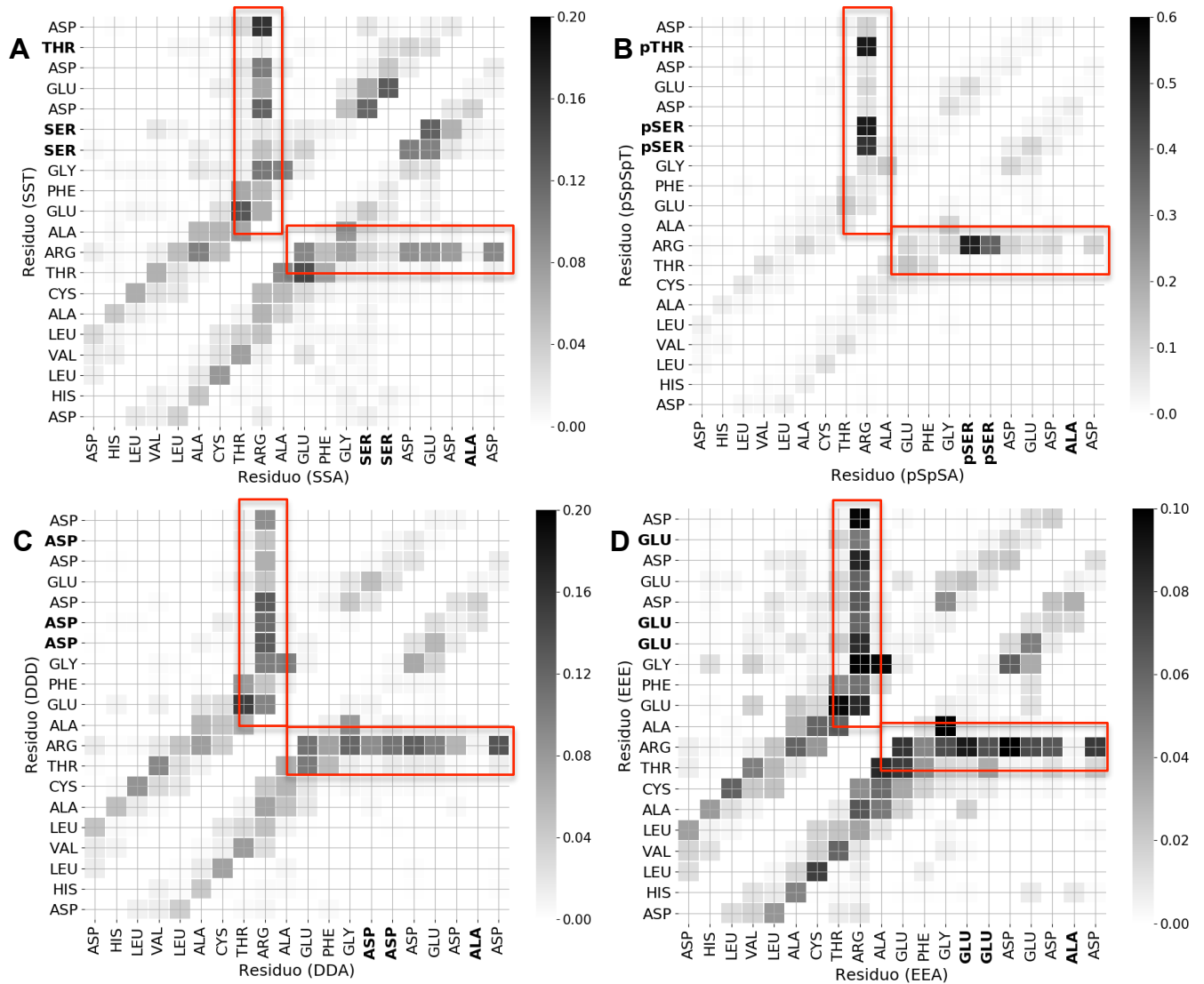


Figura 25 Mapas de calor de las diferentes variantes T19A. Se muestran los mapas de calor de las interacciones por residuo para cada variante. En el panel superior se muestran los puentes de hidrógeno de las variantes originales. El panel inferior muestra las mutantes con el residuo 19 mutado a alanina. A) Silvestre (SSA), B) Fosforilada (pSpSA), C) Aspartato (DDA) y D) Glutamato (EEA). En cajas rojas se muestran las interacciones que realiza la arginina 9.

Las interacciones muestran que en todos los casos, cuando hay ausencia de la treonina 19, la arginina 9 empieza a establecer más interacciones con los demás residuos negativos. Estas interacciones podrían estar compensando aquellas que se perdieron al mutar dicha

treonina. En el caso de pSpSA, se pierde la interacción R9-pT19, y esto podría explicar la pérdida de compactación vista en el radio de giro.

Basados en los resultados anteriores de estructura secundaria, en los que se mostraba que la versión fosforilada tendía a formar más alfa hélice en comparación con los demás (especialmente la posición 19), graficamos la estructura secundaria de los ensamblajes y los comparamos con los originales (Figura 26).

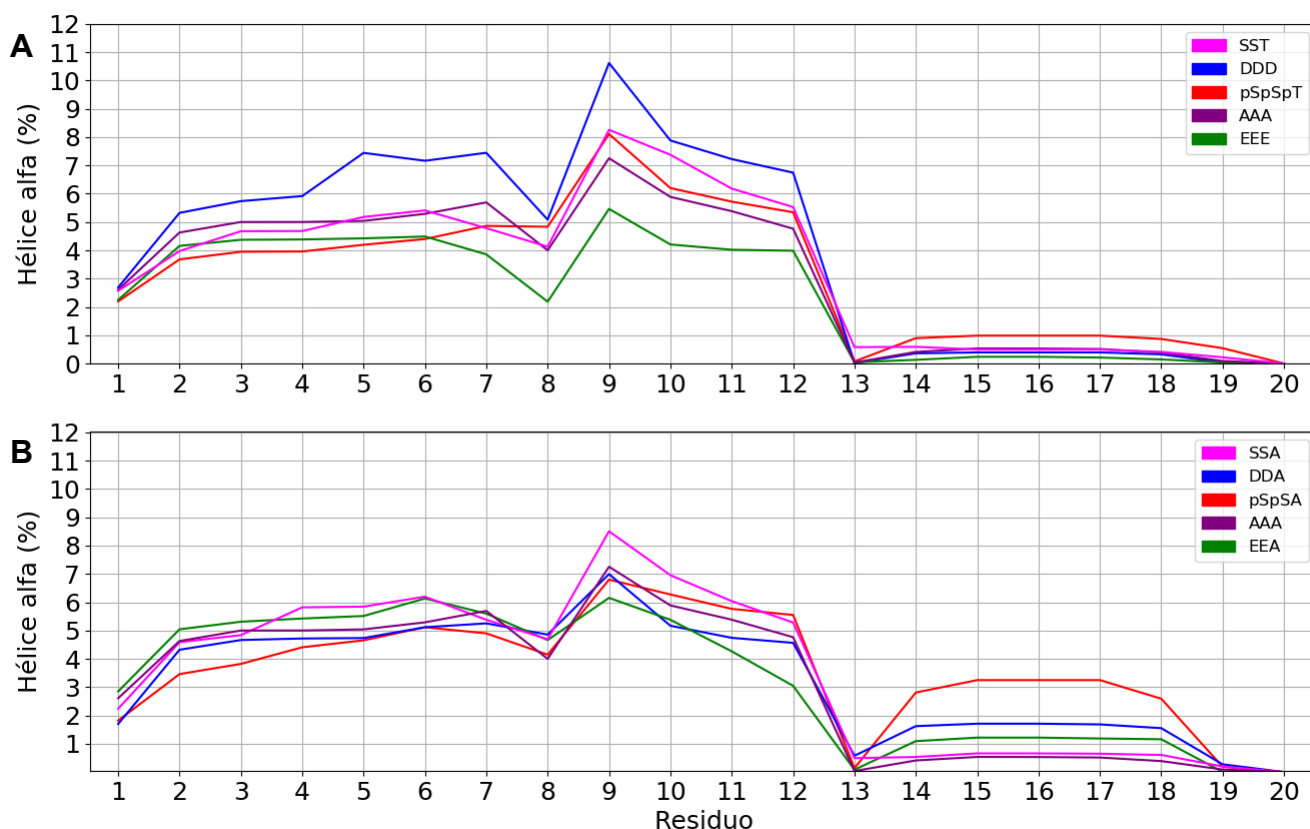


Figura 26 Estructura secundaria T19A. Se muestra el porcentaje de estructura secundaria por residuo en todo el ensamblaje. A) mutantes T19A, B) variantes originales.

La formación de estructura tipo alfa hélice en todo el ensamblaje muestra que la región comprendida entre los residuos 14 a 18 tienen un incremento en la formación de dicha estructura, sin embargo en la posición 19 en donde se encuentra la mutación T19A se pierde la capacidad de hacer hélice. Estos resultados sugieren que la ausencia de la treonina 19 en la versión fosforilada favorece la formación de estructura residual, la cuál podría estar relacionada con un aumento o decremento en su capacidad de establecer interacciones con otras proteínas.

Debido a que notamos este aumento, decidimos ver, al igual que en la triple fosforilada, cuales son las interacciones que pudieran estar estabilizando la hélice. La figura 27 muestra dicho análisis.

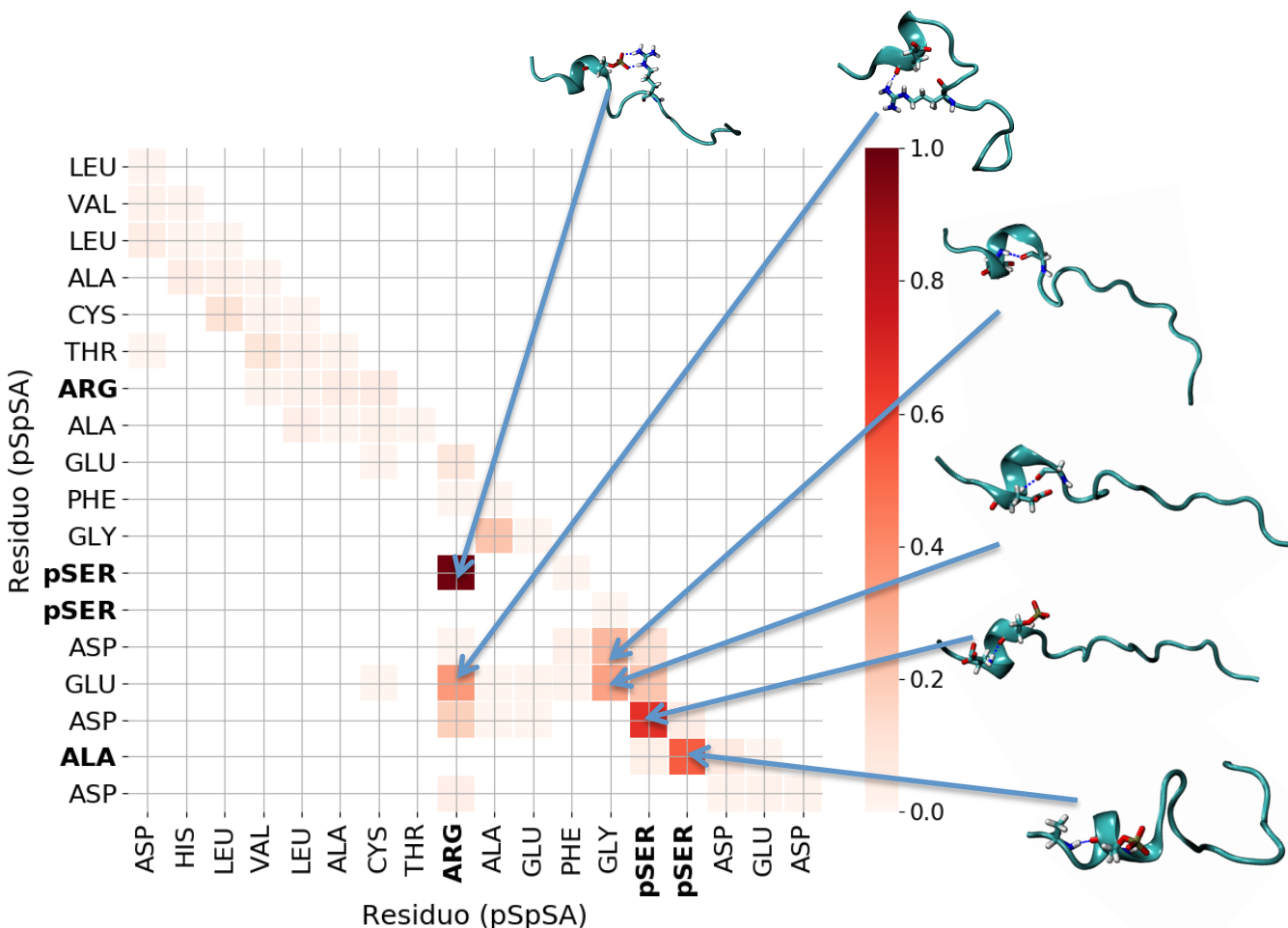


Figura 27 Interacciones hélice alfa C-terminal fosforilada T19A. Se muestra el mapa de calor de las interacciones presentes en el extremo C-terminal de la mutante T19A en su versión fosforilada. A la izquierda se muestran las estructuras de las interacciones más frecuentes.

Este análisis muestra que el número de interacciones que estabilizan a la hélice incrementan y hay más participación de los dos residuos fosforilados restantes. Además, es de especial interés que la alanina 19 está formando una de las interacciones más frecuentes con la fosfoserina 15. La arginina 9 también se muestra como un residuo presente en dichas interacciones. La aparición de nuevas interacciones o el aumento de las ya existentes al momento de eliminar la posición 19, podría sugerir que la interacción de estos dos residuos es importante en la dinámica de la proteína. En el caso de las mutantes fosfomiméticas,

existen diferencias en la formación de las interacciones formadas por la versión fosforilada. Estas diferencias pueden estar asociadas a que las estructuras del aspartato y glutamato no son exactamente iguales a las de fosfoserina/fosfotreonina; otro aspecto a considerar es la carga neta de cada uno de ellos. La carga neta de los residuos fosforilados es -2, mientras que la de glutamato/aspartato es -1.

Tomando en cuenta de que el único residuo positivo en la secuencia del péptido es la arginina 9, y que además, ha mostrado ser importante en la formación de puentes de hidrógeno con los fosfatos, investigamos cuál qué efecto tiene eliminar esta carga positiva en presencia de los fosfoserina/fosfotreonina y serina/treonina. Generamos las mutantes R9A en sus variantes fosforiladas y silvestre.

7.8 Mutante R9A

En las simulaciones previas, notamos que la versión fosforilada visitaba conformaciones más compactas. Creemos que estas conformaciones están siendo favorecidas por la interacción de los fosfatos con la arginina 9. Para evaluar de forma global el incremento o disminución de compactación se graficó la distribución de radio de giro de la mutante R9A con los residuos 14, 15 y 19 fosforilados y sin fosforilar (Figura 28).

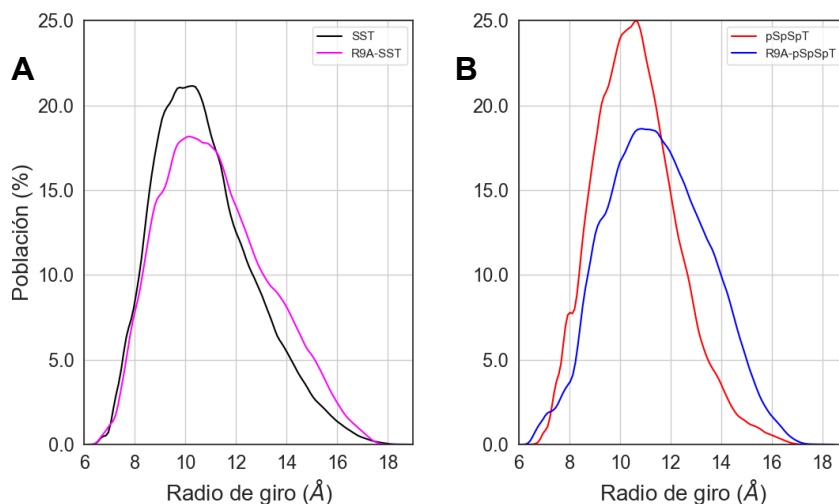


Figura 28 Radio de giro de la mutante R9A en sus dos variantes. A) R9A sin fosforilar vs péptido silvestre, B) R9A fosforilada vs péptido fosforilado.

El radio de giro muestra que la mutante R9A, en presencia de los residuos fosforilados lleva a estados más extendidos del péptido, lo que sugiere que la arginina 9 promueve compactación, esto probablemente mediante la interacción con los fosfatos. El histograma

del panel A de la figura 28, muestra que cuando no hay fosforilación, el cambio en la compactación es menor.

Para analizar el cambio en las interacciones realizadas por los fosfatos en ausencia de la arginina, graficamos los puentes de hidrógeno en ambas variantes (Figura 29).

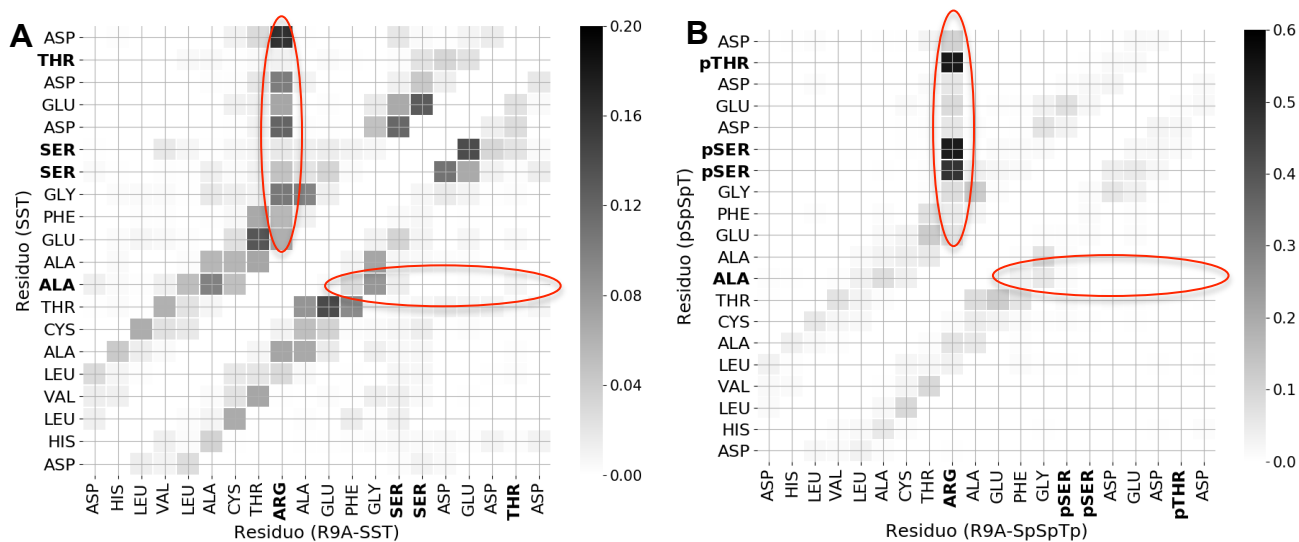


Figura 29 Puentes de hidrógeno R9A. En el panel superior se muestran los puentes de hidrógeno realizados por las variantes con arginina en su versión silvestre y fosforilado. En el panel inferior las mutantes R9A. A) R9A silvestre vs péptido silvestre, B) R9A fosforilada vs péptido fosforilado. Los óvalos rojos muestran las interacciones realizadas por Arg/Ala.

Como se puede observar en los mapas de calor, las interacciones de puente de hidrógeno formadas por las versión fosforilada con la arginina 9 se pierden casi por completo, lo que explica la obtención de estados más extendidos. En el caso de la versión silvestre se puede ver que hay una redistribución de las interacciones, lo cual puede estar asociado con los pocos cambios que se notaron en el radio de giro. A pesar de lo antes mencionado, las demás interacciones parecen mantenerse. Ya que la eliminación de la carga positiva generó cambios en el ensamble, evaluamos cómo fue el cambio en la estructura secundaria dada esta eliminación. Para eso se graficó el porcentaje de estructura secundaria en el ensamble (Figura 30).

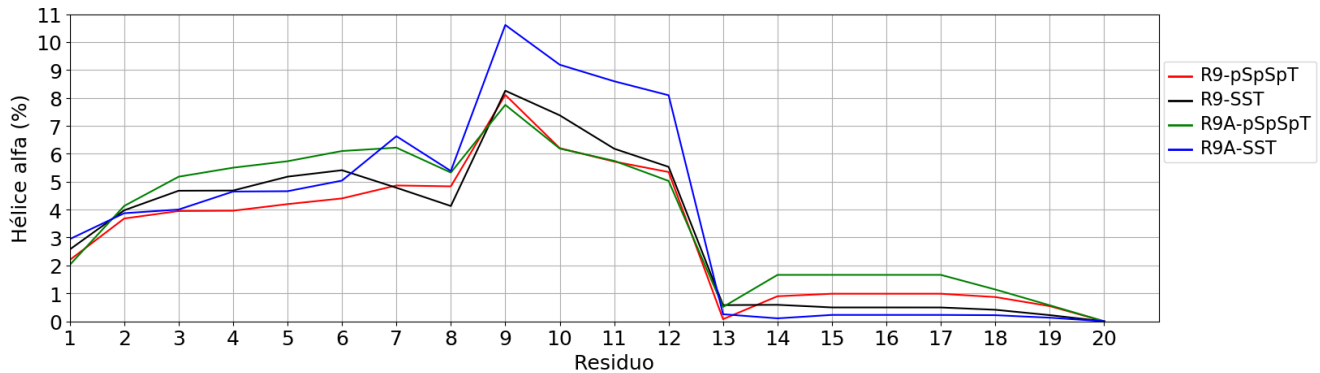


Figura 30 Estructura secundaria R9A. Se muestra el porcentaje de estructura secundaria por residuo a lo largo del ensamble.

El gráfico muestra que la ausencia de la arginina 9 en la versión fosforilada (línea verde) lleva a un aumento de estructura tipo alfa hélice en los extremos N- y C- terminal, mientras que en la versión silvestre (línea azul) el aumento se ve más pronunciado en la mitad del péptido. El aumento de alfa hélice en el extremo N-terminal es de esperarse debido a que la alanina es un residuo que promueve la formación de hélices, mientras que en el extremo C-terminal se ve nuevamente que hay un leve incremento de hélice alfa respecto a la versión fosforilada, lo que puede estar nuevamente relacionado con la interacción con el agua. En las variantes sin fosforilar (línea azul y negra) el comportamiento en el extremo C-terminal es similar entre las dos, lo que indica que la ausencia de fosforilación no forma hélice.

Con los resultados previos, podemos notar que la arginina 9 es importante para realizar interacciones intracadena con los demás residuos del péptido. Estas interacciones se pierden en la mutante R9A en su versión fosforilada, mientras que en la silvestre estas interacciones se distribuyen.

Otro residuo clave en la formación de interacciones es la fosfotreonina 19, ya que en los resultados anteriores dicho residuo fue el que presentaba un enriquecimiento mayor cuando interactuaba con la arginina. El efecto de la ausencia de este residuo muestra que hay un incremento en la formación de hélice en el extremo C-terminal, la cual está siendo estabilizada por interacciones que involucran a la fosfoserina 14 y 15 así como a la arginina 9.

8. Conclusiones

El análisis de las primeras simulaciones mostró que la arginina 9 es un contraión importante para el establecimiento de interacciones y que lleva al péptido a visitar estados compactos.

Las interacciones que realiza la arginina 9 con los fosfatos es más frecuente que con las demás variantes, siendo el residuo 19 el que más veces lo hace.

Las mutantes fosfomiméticas parecen tener un comportamiento similar en el establecimiento de interacciones, sin embargo, el análisis de estructura secundaria mostró que cuando la interacción entre el residuo 19 y arginina 9 se da, las conformaciones que adopta cada variante es distinta.

La versión fosforilada no adquiere ningún tipo de estructura secundaria durante la interacción antes mencionada. Esto sugiere que la interacción de este segmento puede estar dada por formación de complejos difusos (fuzzy).

Las fosfomiméticas y silvestre de la mutante T19A no muestran cambios en la compactación, sin embargo, la variante fosforilada parece ir hacia estados extendidos. Además, notamos que la arginina 9 al estar en un ambiente negativo es capaz de formar un gran número de interacciones pero teniendo preferencia hacia los fosfatos.

Debido a que la treonina 19 (495 en la proteína completa) parece ser importante para establecer un orden de fosforilación. El comportamiento obtenido debido a su mutación puede tener un efecto sobre las funciones de E1B55kDa.

La mutante R9A tiene un efecto sobre el estado de compactación del péptido, ya que al eliminar la única carga positiva de la secuencia los fosfatos tienden a hacer más interacciones con el agua.

Las mutantes fosfomiméticas no están recreando los resultados obtenidos con las versiones fosforiladas, por lo que podemos concluir que no son 100% equivalentes.

9. Bibliografía:

- (1) Tompa, P., y Han, K.-H. (2012) Intrinsically disordered proteins. *Phys. Today* 65, 64–65.
- (2) Habchi, J., Tompa, P., Longhi, S., y Uversky, V. N. (2014) Introducing Protein Intrinsic Disorder. *Chem. Rev.* 114, 6561–6588.
- (3) Babu, M. M., van der Lee, R., de Groot, N. S., y Gsponer, J. (2011) Intrinsically disordered proteins: regulation and disease. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 21, 432–440.
- (4) Uversky, V. N. (2013) Unusual biophysics of intrinsically disordered proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1834, 932–951.
- (5) Das, R. K., y Pappu, R. V. (2013) Conformations of intrinsically disordered proteins are influenced by linear sequence distributions of oppositely charged residues. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 13392–13397.
- (6) Das, R. K., Ruff, K. M., y Pappu, R. V. (2015) Relating sequence encoded information to form and function of intrinsically disordered proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 32, 102–112.
- (7) van der Lee, R., Buljan, M., Lang, B., Weatheritt, R. J., Daughdrill, G. W., Dunker, A. K., Fuxreiter, M., Gough, J., Gsponer, J., Jones, D. T., Kim, P. M., Kriwacki, R. W., Oldfield, C. J., Pappu, R. V., Tompa, P., Uversky, V. N., Wright, P. E., y Babu, M. M. (2014) Classification of Intrinsically Disordered Regions and Proteins. *Chem. Rev.* 114, 6589–6631.
- (8) Darling, A. L., y Uversky, V. N. (2018) Intrinsic disorder and posttranslational modifications: The darker side of the biological dark matter. *Front. Genet.* 9, 1–18.
- (9) Bah, A., Vernon, R. M., Siddiqui, Z., Krzeminski, M., Muhandiram, R., Zhao, C., Sonenberg, N., Kay, L. E., y Forman-Kay, J. D. (2014) Folding of an intrinsically disordered protein by phosphorylation as a regulatory switch. *Nature* 519, 106–109.
- (10) Hunter, T. (2012) Why nature chose phosphate to modify proteins. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 367, 2513–2516.
- (11) Nishi, H., Fong, J. H., Chang, C., Teichmann, S. A., y Panchenko, A. R. (2013) Regulation of protein–protein binding by coupling between phosphorylation and intrinsic disorder: analysis of human protein complexes. *Mol. Biosyst.* 9, 1620.
- (12) Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Keith, R., y Pete, W. (2014) Molecular biology of the cell Sixth Edit. Garland Science, United States.
- (13) Blackford, A. N., y Grand, R. J. a. (2009) Adenovirus E1B 55-kilodalton protein: multiple roles in viral infection and cell transformation. *J. Virol.* 83, 4000–4012.
- (14) Sieber, T., Scholz, R., Spoerner, M., Schumann, F., Kalbitzer, H. R., y Dobner, T. (2011) Intrinsic disorder in the common N-terminus of human adenovirus 5 E1B-55K and its related E1BN proteins indicated by studies on E1B-93R. *Virology* 418, 133–143.
- (15) Wimmer, P., Blanchette, P., Schreiner, S., Ching, W., Groitl, P., Berscheminski, J., Branton, P. E., Will, H., y Dobner, T. (2013) Cross-talk between phosphorylation and SUMOylation regulates transforming activities of an adenoviral oncoprotein. *Oncogene* 32, 1626–1637.
- (16) Horridge, J. J., y Leppard, K. N. (1998) RNA-binding activity of the E1B 55-kilodalton protein from human adenovirus type 5. *J. Virol.* 72, 9374–9379.
- (17) Muller, S., y Dobner, T. (2008) The adenovirus E1B-55K oncoprotein induces SUMO modification of p53. *Cell Cycle* 7, 754–758.
- (18) Kozlowski, L. P., y Bujnicki, J. M. (2012) MetaDisorder: a meta-server for the prediction of intrinsic disorder in proteins. *BMC Bioinformatics* 13, 111.
- (19) Leach, A. R. (2001) Molecular modelling : principles and applications. Prentice Hall.
- (20) Naganathan, A. N., y Muñoz, V. (2005) Scaling of Folding Times with Protein Size. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 480–481.
- (21) Konrat, R. (2014) NMR contributions to structural dynamics studies of intrinsically

- disordered proteins. *J. Magn. Reson.* 241, 74–85.
- (22) Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kalé, L., y Schulten, K. (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* 26, 1781–1802.
- (23) Brooks, B. R., Brooks, C. L., Mackerell, A. D., Nilsson, L., Petrella, R. J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., Caflisch, A., Caves, L., Cui, Q., Dinner, A. R., Feig, M., Fischer, S., Gao, J., Hodoscek, M., Im, W., Kuczera, K., Lazaridis, T., Ma, J., Ovchinnikov, V., Paci, E., Pastor, R. W., Post, C. B., Pu, J. Z., Schaefer, M., Tidor, B., Venable, R. M., Woodcock, H. L., Wu, X., Yang, W., York, D. M., y Karplus, M. (2009) CHARMM: The biomolecular simulation program. *J. Comput. Chem.* 30, 1545–1614.
- (24) Pronk, S., Pall, S., Schulz, R., Larsson, P., Bjelkmar, P., Apostolov, R., Shirts, M. R., Smith, J. C., Kasson, P. M., van der Spoel, D., Hess, B., y Lindahl, E. (2013) GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics* 29, 845–854.
- (25) Vitalis, A., y Pappu, R. V. (2009) Chapter 3 Methods for Monte Carlo Simulations of Biomacromolecules, en *Annual Reports in Computational Chemistry*, pp 49–76. Elsevier.
- (26) Vitalis, A., y Pappu, R. V. (2009) ABSINTH: A new continuum solvation model for simulations of polypeptides in aqueous solutions. *J. Comput. Chem.* 30, 673–699.
- (27) Best, R. B., Zhu, X., Shim, J., Lopes, P. E. M., Mittal, J., Feig, M., y MacKerell, A. D. (2012) Optimization of the Additive CHARMM All-Atom Protein Force Field Targeting Improved Sampling of the Backbone ϕ , ψ and Side-Chain χ 1 and χ 2 Dihedral Angles. *J. Chem. Theory Comput.* 8, 3257–3273.
- (28) Huang, J., Rauscher, S., Nawrocki, G., Ran, T., Feig, M., de Groot, B. L., Grubmüller, H., y MacKerell, A. D. (2016) CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. *Nat. Methods* 14, 71–73.
- (29) Ching, W., Dobner, T., y Koyuncu, E. (2011) The Human Adenovirus Type 5 E1B 55-Kilodalton Protein Is Phosphorylated by Protein Kinase CK2. *J. Virol.* 86, 2400–2415.
- (30) Schwartz, R. a, Lakdawala, S. S., Eshleman, H. D., Russell, M. R., Carson, C. T., y Weitzman, M. D. (2008) Distinct requirements of adenovirus E1b55K protein for degradation of cellular substrates. *J. Virol.* 82, 9043–9055.
- (31) Linding, R., Russell, R. B., Neduva, V., y Gibson, T. J. (2003) GlobPlot: Exploring protein sequences for globularity and disorder. *Nucleic Acids Res.* 31, 3701–3708.
- (32) Yang, Z. R., Thomson, R., McNeil, P., y Esnouf, R. M. (2005) RONN: The bio-basis function neural network technique applied to the detection of natively disordered regions in proteins. *Bioinformatics* 21, 3369–3376.
- (33) Su, C. T., Chen, C. Y., y Hsu, C. M. (2007) IPDA: Integrated protein disorder analyzer. *Nucleic Acids Res.* 35, 465–472.
- (34) McGuffin, L. J. (2008) Intrinsic disorder prediction from the analysis of multiple protein fold recognition models. *Bioinformatics* 24, 1798–1804.
- (35) Xue, B. (2011) Ponder.
- (36) Lint Mé Szá Ros, B., Simon, I. N., Dosztá, Z., y Casadio, R. (2009) Prediction of Protein Binding Regions in Disordered Proteins. *PLoS Comput Biol* 5.
- (37) Shimizu, K., Hirose, S., y Noguchi, T. (2007) POODLE-S: Web application for predicting protein disorder by using physicochemical features and reduced amino acid set of a position-specific scoring matrix. *Bioinformatics* 23, 2337–2338.
- (38) Mizianty, M. J., Peng, Z., y Kurgan, L. (2013) MFDp2. *Intrinsically Disord. Proteins* 1, e24428.
- (39) Linding, R., Jensen, L. J., Diella, F., Bork, P., Gibson, T. J., y Russell, R. B. (2003) Protein disorder prediction: Implications for structural proteomics. *Structure* 11, 1453–1459.

- (40) Ishida, T., y Kinoshita, K. (2007) PrDOS: prediction of disordered protein regions from amino acid sequence. *Nucleic Acids Res.* 35, W460–W464.
- (41) Walsh, I., Martin, A. J. M., Di Domenico, T., Vullo, A., Pollastri, G., y Tosatto, S. C. E. (2011) CSpritz: Accurate prediction of protein disorder segments with annotation for homology, secondary structure and linear motifs. *Nucleic Acids Res.* 39, 190–196.
- (42) Ward, J. J., McGuffin, L. J., Bryson, K., Buxton, B. F., y Jones, D. T. (2004) The DISOPRED server for the prediction of protein disorder. *Bioinformatics* 20, 2138–2139.
- (43) Sickmeier, M., Hamilton, J. A., LeGall, T., Vacic, V., Cortese, M. S., Tantos, A., Szabo, B., Tompa, P., Chen, J., Uversky, V. N., Obradovic, Z., y Dunker, A. K. (2007) DisProt: The database of disordered proteins. *Nucleic Acids Res.* 35, 786–793.
- (44) Vullo, A., Bortolami, O., Pollastri, G., y Tosatto, S. C. E. (2006) Spritz: a server for the prediction of intrinsically disordered regions in protein sequences using kernel machines. *Nucleic Acids Res.* 34, W164–W168.
- (45) Prilusky, J., Felder, C. E., Zeev-Ben-Mordehai, T., Rydberg, E. H., Man, O., Beckmann, J. S., Silman, I., y Sussman, J. L. (2005) FoldIndex©: A simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded. *Bioinformatics* 21, 3435–3438.
- (46) Lamiable, A., Thévenet, P., Rey, J., Vavrusa, M., Derreumaux, P., y Tufféry, P. (2016) PEP-FOLD3: faster de novo structure prediction for linear peptides in solution and in complex. *Nucleic Acids Res.* 44, W449–W454.
- (47) Jo, S., Kim, T., Iyer, V. G., y Im, W. (2008) CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *J. Comput. Chem.* 29, 1859–1865.
- (48) Glykos, N. M. (2006) Software news and updates carma: A molecular dynamics analysis program. *J. Comput. Chem.* 27, 1765–1768.
- (49) Humphrey, W., Dalke, A., y Schulten, K. (1996) VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* 14, 33–38.

10. Anexos

10.1 Anexo I

Al inicio del proyecto se simularon 100 modelos para cada variante (silvestre, fosforilada, fosfomiméticas (aspartato, glutamato) y nula (alanina)), las cuales tenían en extremo N-terminal cargado. Dichas simulaciones arrojaron los siguientes resultados:

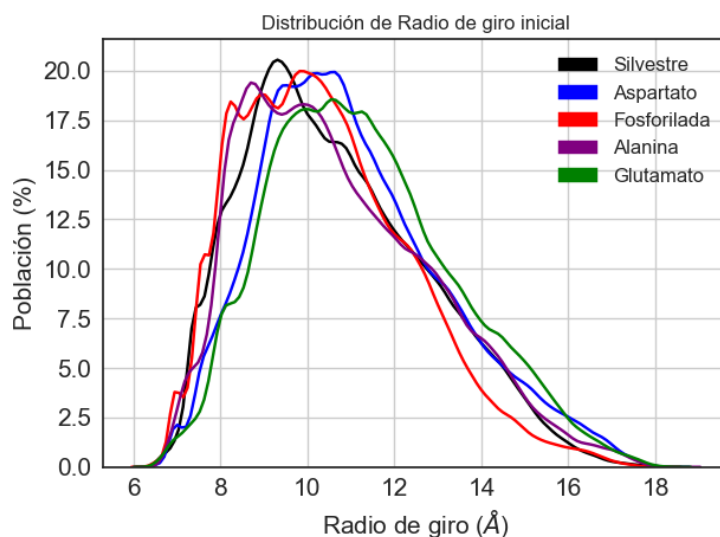


Figura 31 Radio de giro, N-terminal cargado. Se muestra la distribución para las cinco variantes con el extremo N-terminal cargado (carga positiva).

La distribución muestra estados compactos, los cuales se creen son inducidos por la carga positiva extra presente en el N-terminal. Esta compactación es más notoria en la versión fosforilada, lo cual sugiere que dicho extremo está interactuando con los fosfatos.

Se graficaron los puentes de hidrógeno de dichas variantes para encontrar aquellas interacciones realizadas por el extremo N-terminal (Figura 31). De igual forma obtuvimos el promedio de cada interacción y lo dividimos entre el valor obtenido para la versión silvestre (fold-change)

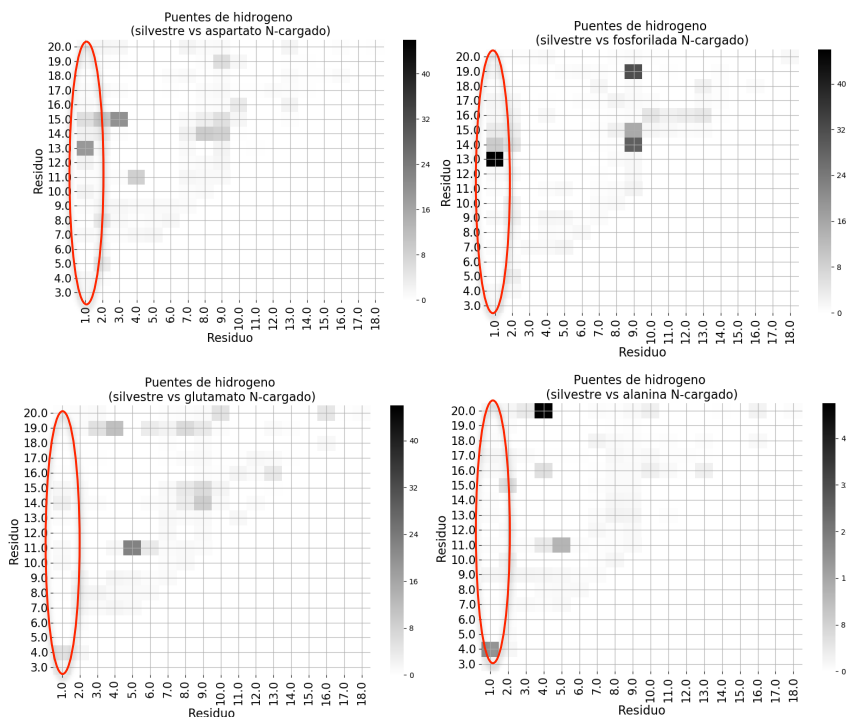


Figura 32 Puentes de hidrógeno N-terminal cargado. Se muestran los mapas de calor del enriquecimiento de los puentes de hidrógeno formados en las variantes cargadas. Los óvalos rojos muestran las interacciones realizadas por el residuo 1.

Las interacciones encerradas en rojo en la figura 31 no están presentes en los péptidos con el extremo N-terminal acetilado, lo que sugiere que dicha carga extra podría afectar los resultados obtenidos. Debido a esto decidimos repetir las simulaciones pero esta vez acetilando dicho extremo y son los resultados que se mostraron.



DR. VICTOR BARBA LÓPEZ
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada "Efecto de la fosforilación y los fosfomiméticos en la estructura y dinámica del péptido C-terminal desordenado de la proteína adenoviral E1B55kDa" que presenta el alumno Marco Antonio Ramírez Martínez (10009558) para obtener el título de Maestro en Ciencias.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

| NOMBRE | DICTAMEN | FIRMA |
|--|----------|--------------------|
| Dr. Enrique Rudiño Piñera IBT-UNAM | Aprobado | |
| Dra. Lina Rivillas Acevedo CIDC-UAEM | Aprobado | Lina Rivillas |
| Dr. Carlos Amero Tello CIQ-UAEM | Aprobado | Carlos Amero Tello |
| Dra. Carmen Nina Pastor Colón CIDC-UAEM | Aprobado | Carmen Nina Pastor |
| Dr. Ramón Gonzalez García-Conde CIDC-UAEM | APROBADO | |