



Universidad de la República
Facultad de Ciencias
PEDECIBA Biología

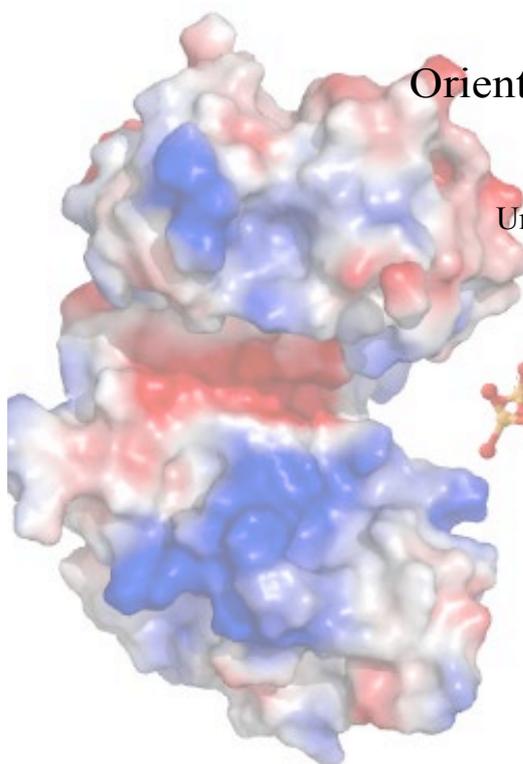
TESIS DE DOCTORADO

“Biología Estructural de Protein Quinasas: las Serin/Treonin-Quinasas de Leishmania”

Sofía Horjales

Orientador: Dr. Alejandro Buschiazzo

Unidad de Cristalografía de Proteínas
Institut Pasteur de Montevideo



Tribunal

Dra. Beatriz Garat
Dra. Andrea Villarino
Dr. Sergio Pantano

Noviembre de 2015

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todos los que de alguna manera contribuyeron con este trabajo directa o indirectamente, en particular:

A Alejandro, quien me ha orientado todos estos años, y me permitió llevar a cabo este trabajo en su laboratorio. Por siempre tener la paciencia para enseñar y por haber estado en todo momento;

A Fabiana San Martín y Juan Imelio, que han realizado sus trabajos de inicio a la investigación y han colaborado con el desarrollo de este proyecto;

A todos los compañeros de BS y del Instituto, por tantos momentos compartidos, por la buena , colaboración, discusiones y hacer el día a día mejor incluso frente a los los pequeños avances y fracasos;

A todos nuestros colaboradores del LEISHDRUG, por permitirtantos intercambios y experiencias enriquecedoras;

A PEDECIBA, ANII y Leishdrug por la financiación recibida;

A mi familia y amigos por haberme apoyado en todo momento

Índice

RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	3
<i>Leishmania: un grupo de parásitos que causan la enfermedad zoonótica conocida como leishmaniasis</i>	11
<i>Leishmaniasis</i>	15
<i>En Leishmania, las proteín-quinasas aparecen como blancos terapéuticos de gran interés</i>	19
<i>Leishmaniasis: diagnóstico, profilaxis y tratamiento</i>	20
<i>Proteín-quinasas</i>	23
<i>Las Ser/Thr quinasas: del marco general al caso particular de Leishmania</i>	29
<i>Introducción general a la arquitectura de las STPKs</i>	31
<i>Un grupo de STPKs de especial interés: las proteín-quinasas activadas por mitógeno</i>	36
<i>Otras Ser/Thr quinasas de Leishmania relevantes</i>	39
<i>Modelos de estudio: las MAPKs y la CK1 de Leishmania</i>	40
<i>Las MAPKs de Leishmania</i>	40
<i>La caseín quinasa 1 de leishmania</i>	45
HIPÓTESIS	46
OBJETIVO GENERAL	47
<i>Objetivos específicos</i>	47
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	48
MATERIALES Y MÉTODOS	49
<i>Subclonado de blancos seleccionados en vectores de expresión</i>	49
<i>Vectores de expresión en sistemas procariotas</i>	51
<i>Vectores de expresión en L. tarantolae</i>	51
<i>Cepas bacterianas para amplificación de plásmidos</i>	52
<i>Cepas bacterianas para la expresión de proteínas recombinantes</i>	52
<i>Secuenciación</i>	53
<i>Análisis de secuencias de ADN</i>	53
<i>Cultivos de bacterias</i>	53
<i>Preparación de células competentes y transformación</i>	53
<i>Cultivo y transfección de células S2 de Drosophila</i>	54
<i>Purificación de ADN plasmídico</i>	54
<i>Cuantificación de ácidos nucleicos</i>	55
<i>Electroforesis de ácidos nucleicos</i>	55
<i>Digestión de ADN plasmídico con enzimas de restricción</i>	55

<i>Ligación de fragmentos de ADN</i>	55
<i>Mutagénesis sitio-dirigidas</i>	56
<i>PCR-Reacción en Cadena de la polimerasa</i>	56
<i>Expresión de quinasas recombinantes en E. coli y purificación para posteriores estudios estructurales</i>	57
<i>Expresión de quinasas recombinantes en células de Drosophila</i>	57
<i>Purificación de proteínas recombinantes</i>	58
<i>Análisis de proteínas por electroforesis</i>	59
<i>Western blot</i>	59
<i>Ensayos biofísicos y funcionales en solución</i>	60
<i>Geles bidimensionales</i>	60
<i>Actividad enzimática en ensayo acoplado</i>	61
<i>Medidas de actividad en IVKA (in vitro kinase assay)</i>	61
<i>Titulación isotérmica por calorimetría</i>	62
<i>Ensayo de desplazamiento térmico por fluorescencia (TSA- Termal Shift Assay)</i>	62
<i>Obtención de cristales</i>	63
<i>Cristalización y caracterización estructural de complejos relevantes de quinasas de Leishmania con moléculas activas (inhibidores, análogos de sustratos, etc) así como mutantes sitio dirigidos basados en la estructura</i>	64
<i>Difracción de rayos X</i>	65
<i>Procesamiento de datos y determinación de la estructura tridimensional</i>	66
<i>Análisis estructural: caracterización de elementos estructurales determinantes de la plasticidad y de potencial relevancia para el diseño racional de drogas</i>	66
<i>Alineamientos múltiples de secuencia y estructural</i>	67
<i>Dinámica molecular</i>	67
<i>Modelado 3D Ab initio del péptido C- terminal de LmaMPK10</i>	69
<i>Preparación de proteína para estudios de “docking “</i>	70
<i>Obtención de la biblioteca de compuestos</i>	70
<i>“Docking” de compuestos a la estructura de LmaMPK10DC utilizando GOLD</i>	70
<i>Post análisis de los compuestos seleccionados</i>	71
<i>Validación de los ligandos seleccionados por ensayos de inhibición</i>	71
RESULTADOS	72
CAPÍTULO I: Expresión, purificación, cristalización y determinación de la estructura tridimensional de Ser/Thr quinasas de interés de L. major	72
<i>i) La MAPK LmaMPK7</i>	<i>72</i>
<i>ii) La caseína quinasa LmaCK1</i>	<i>86</i>
<i>iii) La MAPK LmaMPK4</i>	<i>98</i>
<i>iv) La MAPK LmaMPK10</i>	<i>112</i>
<i>Expresión y purificación de LmaMPK10</i>	<i>113</i>
<i>Rastreo de condiciones de cristalización de LmaMPK10</i>	<i>114</i>
<i>Ensayos iniciales de difracción de rayos X</i>	<i>117</i>
<i>Proteólisis limitada y diseño de la variante truncada LmaMPK10ΔC</i>	<i>117</i>
<i>Expresión y purificación de LmaMPK10ΔC</i>	<i>118</i>
<i>Rastreo de condiciones de cristalización de LmaMPK10ΔC</i>	<i>119</i>
<i>Optimización de cristales de LmaMPK10ΔC</i>	<i>120</i>
<i>Difracción de rayos X y colecta de datos</i>	<i>121</i>

<i>Procesamiento de datos de difracción de rayos X</i>	122
<i>Determinación de la estructura 3D de LmaMPK10ΔC</i>	123
<i>Depósito de la estructura cristalográfica</i>	126
CAPÍTULO II: <i>Análisis estructural y bioquímico de la MAPK10 y de mutantes seleccionados: identificación de determinantes de plasticidad y potenciales mecanismos de regulación de la actividad</i>	128
<i>Estructura 3D de la LmaMPK10ΔC</i>	130
<i>Características distintivas de LmaMPK10 en relación a las Ser/Thr quinasas</i>	137
<i>Caracterización bioquímica de LmaMPK10ΔC</i>	148
a) <i>Ensayos de actividad acoplada</i>	148
b) <i>Geles bidimensionales</i>	149
c) <i>Actividad quinasa in vitro (IVKA) en presencia de ATP marcado</i>	152
d) <i>Buscando la forma activa de LmaMPK10</i>	156
e)	
CAPÍTULO III: <i>Análisis estructural y biofísico de LmaMPK10 en complejo con moléculas “activas” (inhibidores y/o análogos de sustrato): hacia el diseño racional de drogas</i>	157
<i>Ensayos de unión a ligandos</i>	157
<i>Unión de ATP a LmaMPK10</i>	157
<i>Unión de SB203580 a LmaMPK10</i>	158
<i>Determinación de la estructura cristalográfica de LmaMPK10ΔC en complejo con ligandos</i>	161
<i>Análisis del sitio de unión al nucleótido</i>	165
<i>Definición de la especificidad de sustrato: relevancia de los motivos proteicos cortos</i>	171
<i>Búsqueda de nuevos inhibidores de la LmaMPK10ΔC</i>	172
<i>Evaluación de potenciales compuestos inhibidores</i>	173
<i>Búsqueda de interactores de LmaMPK10ΔC</i>	178
DISCUSIÓN	183
<i>Expresión, purificación, cristalización y determinación de la estructura tridimensional de Ser/Thr quinasas de interés de Leishmania major: desafíos y contribución de la biología estructural</i>	183
<i>Nuestros blancos seleccionados en Leishmania: LmaMPK7, LmaCK1, LmaMPK4, LmaMPK10</i>	184
<i>Análisis estructural y bioquímico de la MAPK LmaMPK10: determinantes en la plasticidad y potenciales mecanismos de regulación de la actividad</i>	190
<i>Análisis estructural y biofísico de LmaMPK10 en complejo con moléculas “activas” (inhibidores y/o análogos de sustrato): hacia el diseño racional de</i>	

<i>drogas</i>	197
<i>Modelo de auto inhibición de LmaMPK10</i>	200
<i>Actividad de LmaMPK10</i>	205
<i>Búsqueda de potenciales inhibidores de LmaMPK10</i>	207
<i>Función de LmaMPK10</i>	208
<i>PERSPECTIVAS</i>	210
<i>REFERENCIAS</i>	212

RESUMEN

Las proteínas-quinasas de serina/treonina (STPKs por sus siglas en inglés “*Serine/Threonine Protein Kinases*”) son moléculas ubicuas involucradas en la transducción de señales. Actúan como “interruptores moleculares”, presentando al menos 2 conformaciones extremas: el estado activo y el inactivo. Distintas STPKs son blancos de medicamentos para combatir varias enfermedades (cáncer, inflamación, infecciones parasitarias, etc), algunos ya aprobados y a la venta, otros en diferentes etapas de investigación clínica. El objetivo de esta tesis se centra en comprender los mecanismos moleculares implicados en la regulación de las STPKs, usando como modelo las STPKs de *Leishmania*, agente etiológico de la leishmaniasis. Se seleccionaron las MAPK (“*Mitogen Activated Protein Kinases*”), pues constituyen una familia de quinasas importante en estos protozoos parásitos, así como la CK1 (caseína-quinasa 1) otra STPK para la que se cuenta con evidencias preliminares muy promisorias en cuanto a su relevancia biológica y como blanco terapéutico. Una de las hipótesis centrales por detrás de nuestros estudios enfocados en proteínas candidatas como blancos terapéuticos, es que la información estructural detallada será útil en una estrategia de descubrimiento/desarrollo de compuestos líderes hacia drogas anti-leishmánicas, actualmente muy necesarias para combatir esta dolencia.

LmaMPK10 es una MAPK de *Leishmania* que es fosforilada específicamente en el pasaje de estadio promastigote/amastigote, por ende potencialmente reguladora de procesos vinculados a la capacidad infectiva de estos parásitos. Además, en el curso de esta Tesis, LmaMPK10 resultó ser relevante para la sobrevivencia de los parásitos en el estadio amastigota. LmaMPK10 presenta características atípicas en sitios muy conservados de su secuencia. LmaMPK10 de *L. major* fue producida en forma recombinante y purificada a homogeneidad. La proteína entera se cristalizó, y permitió coleccionar datos de difracción de rayos X a partir de monocristales. La estructura cristalina se pudo resolver utilizando una variante truncada en los últimos 46 residuos C-terminales (LmaMPK10 Δ C), resultando en un modelo atómico refinado a 1.9Å de resolución. Este es el primer reporte de una estructura 3D de una MAPK de Trypanosomátidos

LmaMPK10 resultó ser similar a la STPK humana p38, con mayores índices de similitud estructural que a otras MAPKs humanas. Sin embargo, se identificaron diferencias significativas en el sitio de unión al nucleótido así como en potenciales sitios reguladores, fundamentalmente en el dominio N-terminal de LmaMPK10. Un elemento de particular relevancia en este sentido refiere al motivo DFG, al inicio del bucle de activación, muy conservado en todas las STPKs, y asociado centralmente al mecanismo regulatorio por fosforilación del bucle de activación y rearrreglo del sitio catalítico. En LmaMPK10 este motivo está mutado por DFN, y esa sustitución de una glicina impide el movimiento típico denominado “*DFG-in / DFG-out*” que se observa en el pasaje entre conformación inactiva a activa de las MAPKs, por rearrreglo de la cadena lateral de la fenilalanina del motivo. LmaMPK10 parece estar así bloqueada en un estado pre-activado. Este trabajo de Tesis también resultó en la determinación de la estructura cristalina de LmaMPK10 Δ C en complejo con un inhibidor específico de p38, el SB203580. Dicha estructura, así como el estudio biofísico de la asociación de ligandos a LmaMPK10, reveló un mecanismo regulatorio de autoinhibición mediado por el extremo C-terminal, singular de estas enzimas MPK10 presentes en *Leishmania* y otros Trypanosomátidos, pero ausentes en mamíferos.

Denodados esfuerzos fueron invertidos en la identificación del(de los) sustrato(s) y/o

interactor(es) natural(es) de LmaMPK10, evidencias que sin dudas avanzan en esta dirección, sin ser aún concluyentes. Se abren así perspectivas de gran interés, bien concretas, para definir los detalles bioquímicos y celulares de la(s) vía(s) de señalización en la(s) que está implicada LmaMPK10 en *Leishmania*. Esta tesis contribuye al conocimiento de las vías de señalización en Trypanosomátidos, aporta centralmente al análisis detallado de las SPTKs en estos protozoos, con eventuales elementos de valor en las estrategias racionales de descubrimiento de fármacos.

Introducción

La función de las proteínas depende esencialmente de su estructura tridimensional. La cristalografía de rayos X ha contribuido significativamente a determinar la estructura molecular de un número importante de proteínas que hoy conocemos. Además del interés en definir la posición de los átomos componentes de una macromolécula, la Biología Estructural moderna ha realizado aportes sustanciales al reconocimiento de las proteínas como polímeros flexibles. Esta plasticidad suele ser moderada (excepto en ejemplos extremos de proteínas intrínsecamente desestructuradas), conduciendo al polímero a adoptar una serie de estados conformacionales precisos. La conformación de una proteína está así dada por el arreglo espacial de sus átomos, y abarca todos los estados conformacionales cinéticamente accesibles que no impliquen la ruptura de enlaces covalentes. La existencia de distintos estados conformacionales de una proteína ha sido estudiada por distintas técnicas experimentales como resonancia magnética nuclear, fluorescencia y cristalografía de proteínas (Carlson & McCammon, 2000, Rejto & Freer, 1996) y permitió resaltar la flexibilidad estructural como un atributo esencial, sin el cual muchas proteínas carecerían de los mecanismos funcionales y/o regulatorios.

Esta tesis procura contribuir al avance en el entendimiento de cómo la flexibilidad de las proteínas está asociada a su función al nivel molecular y atómico, desde una perspectiva estructural, con particular apoyo en el uso de la cristalografía de macromoléculas.

Nos centramos en el estudio de las proteín-quinasas como modelo, dado que son proteínas ampliamente caracterizadas, que presentan varias conformaciones correspondientes a distintos estados de regulación de su función bioquímica y celular. Las proteín-quinasas son enzimas muy importantes desde el punto de vista biológico, ubicuas, participan en una asombrosa variedad de vías de transducción de señales reguladoras de procesos celulares fundamentales como el control de la transcripción, la progresión del ciclo celular y la diferenciación, entre muchos otros. La plasticidad estructural de estas enzimas, con más claridad actualmente en las serín/treonín-quinasas, se ha reconocido como una propiedad central en la modulación de su actividad biológica.

El estudio de las proteín-quinasas además de estar estimulado por su participación en importantes procesos celulares, se debe a su demostrada relevancia como blancos terapéuticos. La cristalografía de distintas proteín-quinasas ha permitido el desarrollo de drogas eficaces o de compuestos líder de potencial relevancia terapéutica para diversas

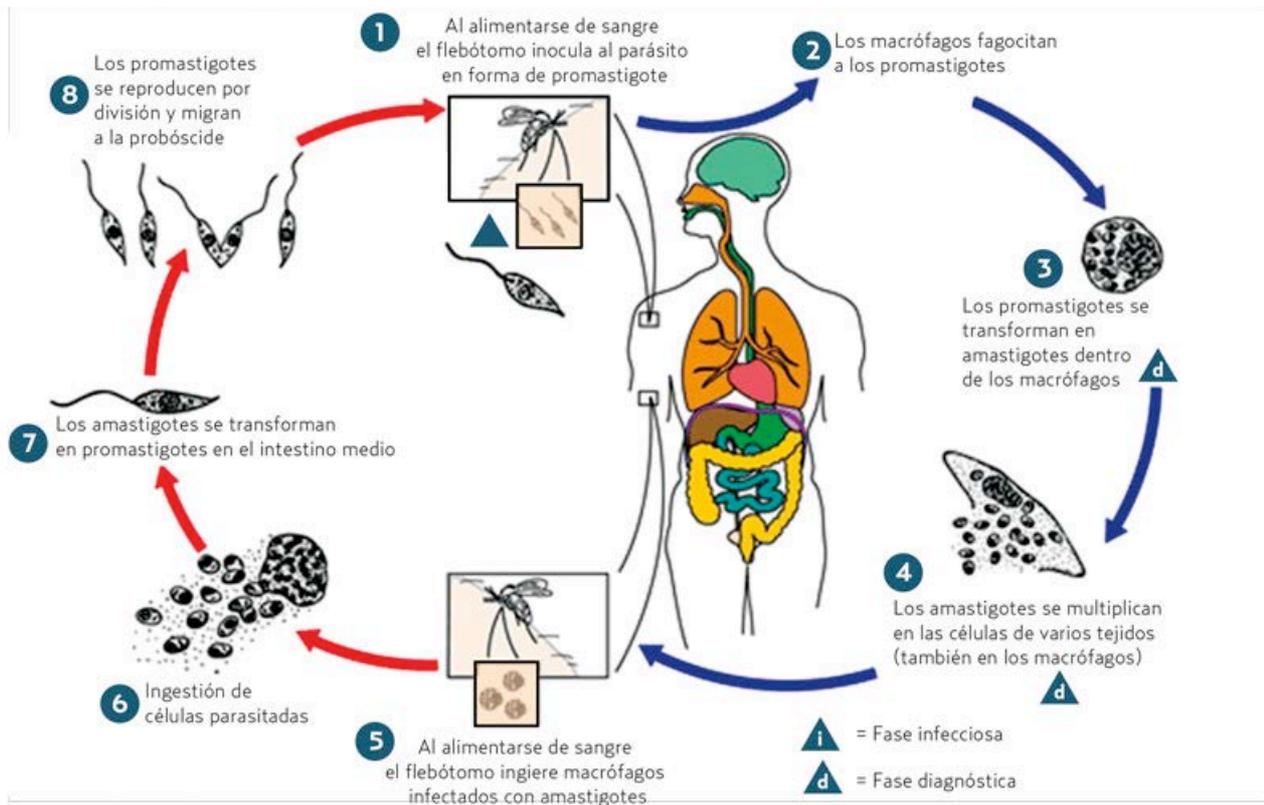
enfermedades como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, asociadas a procesos inflamatorios, e incluso, enfermedades infecciosas (Noble et al., 2004, Naula et al., 2005).

Esta tesis se enmarcó en un consorcio internacional multicéntrico, LEISHDRUG, cuyo principal objetivo fue comprender a las moléculas de señalización asociadas a la virulencia del parásito intracelular *Leishmania*, con particular interés en la exploración del quinoma de *Leishmania spp.*, de utilidad para el desarrollo de nuevas drogas antiparasitarias.

A continuación se describirá el contexto y antecedentes pertinentes que enmarcan este trabajo. Se destacará la relevancia del parásito a nivel sanitario mundial y la importancia de la búsqueda de nuevas drogas antiparasitarias desde el abordaje de la biología estructural. A continuación se introducirán las principales características de las proteín-quinosas, las particularidades de las quinosas de *Leishmania*, y más específicamente, las proteínas seleccionadas como modelos de estudio concretos para este trabajo.

Leishmania: un grupo de parásitos que causan la enfermedad zoonótica conocida como leishmaniasis

Leishmania es un género de protozoarios de la clase Kinetoplástida, orden Trypanosomátidos. Uno de los géneros más conocidos de Trypanosomátidos es *Trypanosoma*, incluyendo a los parásitos *T. brucei* (causante de la enfermedad del sueño) y *T. cruzi* (responsable de la enfermedad del Chagas). El género *Leishmania* incluye aproximadamente 35 especies diferentes, aunque se reconoce su característica plasticidad genómica y la eventualidad de cruzamientos híbridos, con lo que el número e identidad precisa de las especies totales es aún materia de debate (Stevens, 2008). *Leishmania* muestra típicamente formas de vida parásita, que infectan diversas especies de huéspedes, mostrando siempre un ciclo de vida con varios estadios y varios hospederos. Los parásitos son transmitidos por la hembra de un jején hematófago, que juega el rol de vector para la transmisión de la enfermedad. El número de especies de jejenes capaces de transmitir *Leishmania* es muy alto (más de 93 especies han sido reportadas WHO (2010) Annual report. Geneva) incluidas en los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*, en el viejo y en el nuevo mundo respectivamente (Neuber, 2008; Saporito *et al.*, 2013). El ciclo de vida de *Leishmania* es complejo, con lo que la enfermedad es infecciosa pero no directamente contagiosa: es imprescindible el pasaje por el insecto vector para diseminar el parásito de mamífero a mamífero (Figura 1).



Fuente: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

Figura 1. Ciclo de vida de *Leishmania spp.* En los distintos estadios se observa la alternancia de hospederos con el pasaje de formas amastigotes y promastigotes.

La hembra del jején se nutre con sangre de mamíferos y es así que, eventualmente, puede alimentarse con sangre infectada por *Leishmania*, que se encuentra en su estadio amastigote intracelular. Una vez en el tracto digestivo del insecto vector, en la zona media del intestino se diferencian a promastigotes procíclicos, los cuales se dividen, migran hacia la zona anterior y colonizan las válvulas faríngeas, convirtiéndose en promastigotes metacíclicos (forma infecciosa). (Teixeira *et al.*, 2013. El ciclo de vida de *Leishmania* incluye dos estadios: el promastigota (procíclico y metacíclico infeccioso) que presenta un flagelo en la región anterior, y el amastigota intracelular replicativo (carente de flagelo externo) (Figura 2).

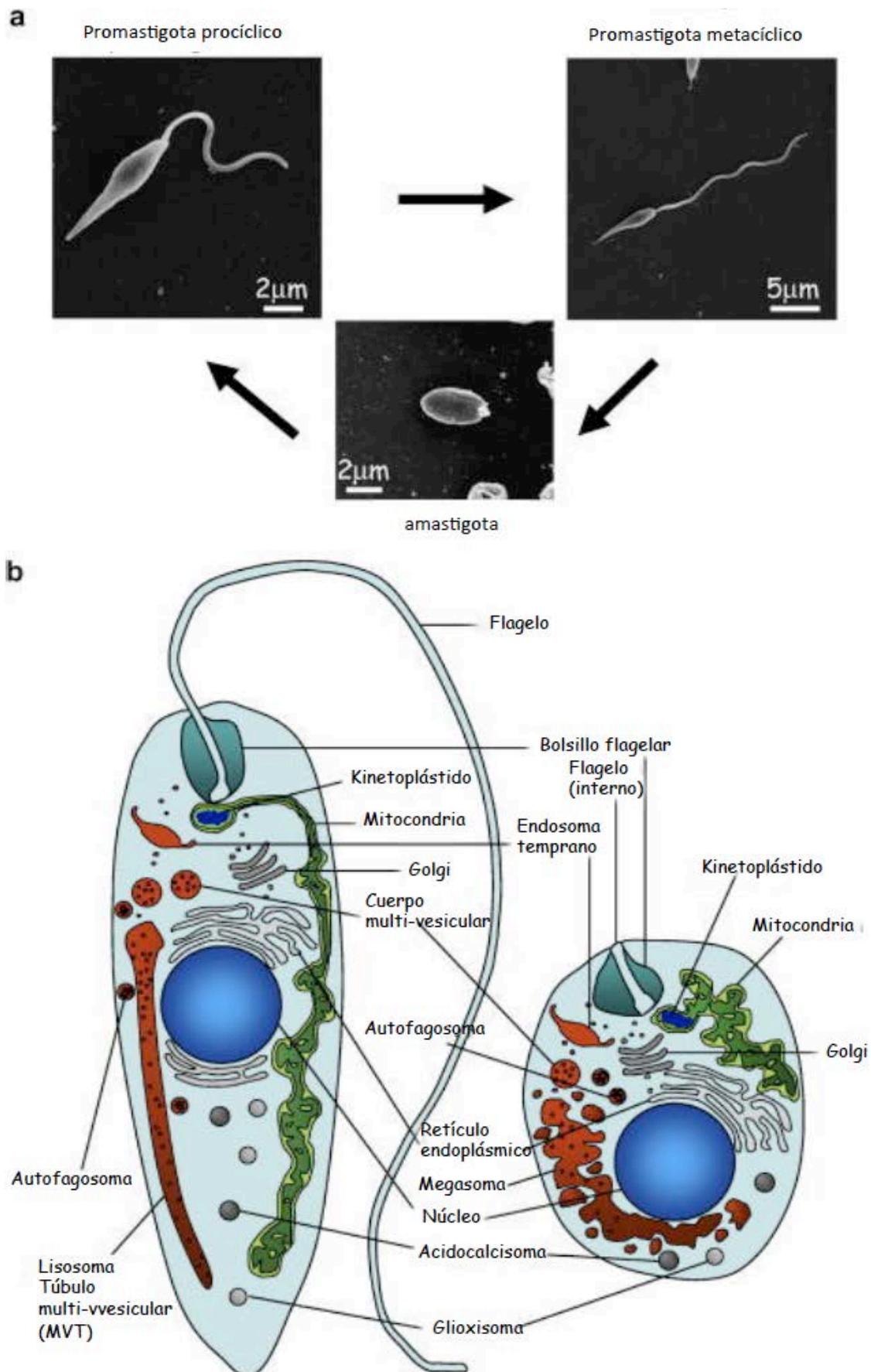


Figura 2. (A) Micrografías electrónicas de los diferentes estadios de *Leishmania*, (B) Esquema de la organización estructural de las formas promastigota y amastigota (Tomado de Besteiro *et al.*, 2007).

Durante la diferenciación del parásito, de amastigotes a promastigotes, se ha observado que éstos secretan fosfoproteoglicanos que condicionan el ambiente del tracto digestivo favoreciendo la metacicloénesis, haciendo resistentes a las formas procíclicas replicativas contra enzimas digestivas del insecto (Dostalova & Volf, 2012). Los fosfoproteoglicanos forman parte de un gel secretorio que obstruye el tracto digestivo del insecto, provocando la regurgitación de los promastigotes y facilitando así su transmisión (Dostalova & Volf, 2012). Así, cuando el insecto vector succiona sangre de un mamífero sano, los promastigotes metacíclicos son regurgitados e inoculados en el hospedero definitivo. Adicionalmente, estudios anteriores han demostrado que *Leishmania* induce una modulación del comportamiento del insecto en el flebótomo infectado, quizás mediado por la secreción de estos fosfoproteoglicanos así como por la cantidad de promastigotes metacíclicos presentes. Esta modulación consiste en hacer al jején más persistente en el tiempo dedicado a alimentarse, lo que conlleva a una mayor transmisión del parásito a su hospedero definitivo (Rogers & Bates, 2007).

Los promastigotes metacíclicos de *Leishmania* pueden infectar una gran variedad de mamíferos, desde roedores, caninos a seres humanos. Dado que algunas especies del parásito tienen capacidad de infectar distintos mamíferos además del hombre, la leishmaniasis es considerada efectivamente como una enfermedad zoonótica. En particular el perro es un reservorio de gran incidencia en algunas zonas endémicas como la cuenca mediterránea en Europa, norte de África y cercano oriente. *Leishmania* es un parásito intracelular obligado de células del sistema retículoendotelial: macrófagos, monocitos y células de Langerhans (Neuber, 2008).

Una vez dentro del hospedero mamífero, los promastigotas pueden ser fagocitados por neutrófilos y éstos son rápidamente reclutados hacia el sitio de inflamación en donde se alimentó el vector. Funcionarían como células hospederas temporales, que pueden permanecer allí por horas sin replicarse y mantienen su infectividad (Peters *et al.*, 2008). Se han postulado dos modelos no excluyentes en cuanto a la relevancia funcional de esta infección de neutrófilos por parte de *Leishmania*. De acuerdo al modelo del “caballo de Troya”, los neutrófilos infectados entran en apoptosis, y los macrófagos ingieren por fagocitosis los cuerpos apoptóticos con el parásito, y así se desencadena la entrada “silenciosa” del mismo al macrófago, debido a que se evita la activación de mecanismos efectores (van Zandbergen *et al.*, 2004). En cambio el modelo del “conejo de Troya”, los promastigotes abandonan a los neutrófilos antes de que éstos entren en apoptosis. Los neutrófilos apoptóticos silencian la respuesta efectora de los macrófagos hospederos, y esto es

explotado por los promastigotes oportunistas que infectan así activamente a los macrófagos (Ritter *et al.*, 2009). En ambos modelos, la capacidad de los neutrófilos de funcionar como mecanismo de evasión de la respuesta inmune depende del genoma del hospedero y la cepa del parásito, mediando silenciamiento de la respuesta efectora (Ritter *et al.*, 2009). Técnicas de microscopía de alta resolución han permitido observar que el mecanismo de entrada de *Leishmania* al macrófago es un proceso activo que requiere una interacción adecuada del promastigote con la superficie de la célula hospedera, generalmente utilizando el extremo distal de su flagelo (Forestier, 2013). Una vez que el parásito es fagocitado, queda incluido en el compartimiento sub-celular del fagosoma, allí pierde su flagelo y secreta lipoproteoglicanos. Como parte de la respuesta defensiva frente al ataque oxidativo de la célula, se ha descrito que los lipoproteoglicanos evitan el ensamblaje de la enzima NADPH oxidasa, reduciendo la exposición de los amastigotes a radicales libres (Lodge & Descoteaux, 2006 de Morais *et al.*, 2015) e interfiriendo además con el reclutamiento de bombas de protones ATPasas a la membrana del fagosoma, evitando su acidificación (Vinet *et al.*, 2009). En suma, la maduración normal del fagosoma se ve inhibida, y los amastigotes se encuentran en un ambiente menos hostil para su supervivencia y proliferación. Además, mediante la fosforilación de blancos en el hospedero, en particular de MAPKs (o del tipo ERK) inhibe la muerte del parásito mediada por células y promueve su propia sobrevivencia regulando algunas funciones celulares (Martinez & Petersen, 2014).

Leishmaniasis

La leishmaniasis es un grupo heterogéneo de enfermedades (Neuber, 2008 Kevric *et al.*, 2015) causada por al menos 20 especies diferentes del género *Leishmania* (Croft *et al.*, 2006a; Peacock *et al.*, 2007). Existen tres formas de leishmaniasis (Kevric *et al.*, 2015):

- cutánea: es la forma más común y menos severa, generando una lesión en la piel en el sitio de la picadura; lo que genera úlceras abiertas, que tienden a curar espontáneamente muy lentamente (algunos meses a más de un año), aunque se han reportado casos cutáneos muy diseminados, que no llegan a curar sin tratamiento;

- muco-cutánea: afecta no sólo la piel sino también las mucosas, produciendo úlceras cutáneas y una destrucción de mucosas; con lesiones típicamente en nariz y boca, generando terribles deformaciones que asemejan a lepra; y,

- la leishmaniasis sistémica o visceral (VL por sus siglas en inglés), también conocida

como kala-azar, que afecta al hombre de forma sistémica, pudiendo llegar a ser mortal (Chappuis *et al.*, 2007). Los pacientes con VL desarrollan esplenomegalia, episodios febriles irregulares, anemia, pancitopenia, pérdida de peso y debilidad progresiva durante períodos de semanas o meses. Casi todos los pacientes de VL mueren en pocos meses si no son tratados.

La leishmaniasis es una enfermedad de distribución mundial, habiéndose reportado casos en todos los continentes excepto Oceanía. Persiste en áreas remotas y pobres donde hay recursos de salud limitada y los pacientes tienen poco acceso a medidas preventivas y/o a las drogas. Para la VL, surgen 500.000 nuevos casos por año que ocurren mayoritariamente en áreas rurales del subcontinente Indio (India, Nepal, Bangladesh), Brasil, Sudan y Etiopía (Guerin *et al.*, 2002; Figura 3). El número real de casos de VL es desconocido, pero en India se estima que sólo son reportados el 20% de los casos totales. En la Tabla 1 se resume la presentación clínica y distribución mundial de distintas especies del género *Leishmania*.

Tabla 1. Distribución geográfica y manifestaciones clínicas de distintas especies de *Leishmania* (tomado de Neuber, 2008).

Clinical presentation	Pathogen	Region
Visceral leishmaniasis (kala-azar or dumdum fever)	<i>L.d. donovani</i>	China, India, Iran, Sudan, Kenya, Ethiopia
	<i>L.d. infantum</i>	Mediterranean countries
	<i>L.d. chagasi</i>	Brazil, Columbia, Venezuela, Argentina
Cutaneous leishmaniasis (oriental sore or tropical sore, uta ulcer or chiclero ulcer or Aleppo boil)	<i>L. tropica</i>	Mediterranean countries, Afghanistan
	<i>L. major</i>	Middle East, Western and Northern Africa, Kenya
	<i>L. aethiopica</i>	Ethiopia
	<i>L. mexicana</i>	Central America, Amazon regions
Mucocutaneous leishmaniasis (espundia)	<i>L.-braziliensis complex</i>	Brazil, Peru, Ecuador, Columbia, Venezuela

Se han reportado casos de contagio de leishmaniasis asociados al uso compartido de jeringas (Cruz *et al.*, 2002), así como también se han reportado casos infrecuentes de transmisión congénita de la enfermedad (Pagliano *et al.*, 2005). Los cambios climáticos y de urbanización implican que actualmente los vectores infectados cambien su distribución geográfica, teniendo acceso a regiones que no estaban afectadas, y así exponiendo a nuevas poblaciones a

tratamiento eficaz, seguro y asequible disponible, con 350 millones de personas consideradas en riesgo de contraer la enfermedad, un total de 12 millones de personas actualmente infectadas en 98 países, y alrededor de 2 millones de casos nuevos cada año (Saporito et al., 2013). Los tres síndromes principales en el ser humano, tienen evolución y pronóstico diferente en función de la especie de *Leishmania* infectante y de la susceptibilidad genética e inmunológica del hospedero (Ritter et al., 2009; Saporito et al., 2013; McGwire & Satoskar, 2014). La leishmaniasis cutánea es principalmente causada por *L. major* y *L. tropica* en el Viejo Mundo, y *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* y *L. braziliensis* en el Nuevo Mundo (McGwire & Satoskar, 2014); la forma mucocutánea de la enfermedad, está principalmente asociada a infecciones por *L. braziliensis*, donde el parásito se extiende por metástasis desde la inflamación local hasta el tejido mucocutáneo, lo que provoca las erosiones y ulceraciones en el espacio nasofaríngeo (Neuber, 2008); en cambio la VL es típicamente causada por *L. donovani* en el subcontinente indio y África del Este, así como por *L. infantum* (= *L. chagasi*) en la región del Mediterráneo y el Nuevo Mundo. Es en el caso de *L. infantum* en el que los perros actúan como reservorio zoonótico adicional preponderante (Guerin et al., 2002). Las especies causantes de VL presentan un tropismo preferencial por las vísceras, pudiéndose extender hasta el bazo, hígado, nodos linfáticos y médula ósea (Neuber, 2008; Saporito et al., 2013). Según la OMS, la VL puede presentar períodos de incubación que van desde 10 días a 1 año, y los pacientes inmunocompetentes no tratados pueden presentar dolor abdominal, episodios febriles irregulares, pérdida de peso, anemia, pancitopenia, linfadenopatía, hepatosplenomegalia y un 85-90% de los pacientes con VL que no reciben tratamiento mueren (Stockdale & Newton, 2013). En pacientes en condiciones de inmunodepresión, como infección por VIH o tratamientos inmunosupresores, se ve comprometida la capacidad del sistema inmune de responder ante la infección por *Leishmania* y permite la reactivación de la enfermedad desde sitios de latencia del parásito; más precisamente, la epidemia de SIDA ha modificado la epidemiología y la clínica de la VL, dado que tanto VIH como *Leishmania* son capaces de infectar la misma célula hospedera –el macrófago–, estableciendo un círculo vicioso en donde el parásito induce una producción viral más robusta y el virus aumenta la replicación parasitaria (Saporito et al., 2013). En pacientes con SIDA, la infección por *Leishmania* es fulminante y la respuesta al tratamiento se ve notoriamente disminuida (Neuber, 2008). Dado que *Leishmania* establece una infección crónica asintomática por tiempos prolongados en el individuo infectado, es necesario el rastreo del parásito en el organismo antes de iniciar cualquier tratamiento inmunosupresivo que permita el progreso de la leishmaniasis (Saporito et al., 2013).

Algunos pacientes satisfactoriamente tratados para VL, y que luego se mantienen asintomáticos por meses o años, desarrollan una proliferación fulminante y progresiva de parásitos dentro de la piel que da lugar a una cuarta manifestación clínica denominada *leishmaniasis post-kala-azar dérmica*. Estos pacientes sufren hipopigmentación y lesiones maculares, papulares y/o nodulares (McGwire & Satoskar, 2014). Las lesiones son ricas en el parásito, por lo que se cree que esta manifestación de la enfermedad es importante en la transmisión de la VL. De esta manera, entender los aspectos epidemiológicos y clínicos de la leishmaniasis post-kala-azar dérmica puede definir estrategias para controlar la leishmaniasis visceral (Mukhopadhyay *et al.*, 2014).

En Leishmania, las proteín-quinasas aparecen como blancos terapéuticos de gran interés

Las proteín-quinasas (PQs) son un importante grupo de enzimas, que catalizan reacciones de fosfotransferencia, en particular fosforilando específicamente a sustratos proteicos. Más adelante describiremos con detalle las características esenciales de estas enzimas y su clasificación actual (ver pág. 24-26). Vale la pena sin embargo adelantar aquí, que las PQs son proteínas ubicuas en Biología, mediando centralmente procesos de transducción de señales. En particular, las MAPKs (por sus siglas en inglés *Mitogen Activated Protein Kinases*) son enzimas que responden a cambios intra- o extra-celulares, que en el caso de *Leishmania spp.*, parecen participar en eventos de comunicación molecular entre el parásito y el hospedero (Cayla *et al.*, 2014). Esto es especialmente relevante en el contexto de la necesidad de adaptación fisiológica de estos parásitos para resistir y/o evadir respuestas inmunitarias del hospedero.

Durante su ciclo de vida (Fig. 1) los parásitos están sujetos a diversos cambios ambientales: temperatura, pH, exposición al O₂ y especies reactivas del nitrógeno, exposición a la actividad proteolítica extracelular intensa así como a condiciones de deficiencia nutricional. Muchas de estas señales disparan la diferenciación de *Leishmania*, afectando la expresión génica y resultando en cambios morfológicos y bioquímicos importantes (Rochette *et al.*, 2008). En base al importante rol que tienen las PQs en mamíferos en los procesos de diferenciación y regulación del ciclo celular y las observaciones realizadas en relación al rol biológico de varias MAPKs de *Leishmania*, actualmente se acepta que al menos varias MAPKs están vinculadas a la detección de cambios ambientales y biogénesis flagelar en Trypanosomatidos en general (Rotureau *et al.*, 2009), y en particular en *Leishmania* (Morales

et al., 2007, Morales *et al.*, 2008, Wiese, 1998, Wiese, 2007).

Leishmaniasis: diagnóstico, profilaxis y tratamiento

El diagnóstico de la enfermedad, generalmente se realiza mediante detección de anticuerpos específicos contra el parásito en el suero de los pacientes. También puede diagnosticarse por observación microscópica de los parásitos en muestras obtenidas de biopsias (Murray *et al.*, 2005; Elmahallawy *et al.*, 2014). Además, numerosos métodos han sido desarrollados, entre ellos la detección del parásito por PCR (Antinori *et al.*, 2007). Poder establecer estrategias de prevención efectivas para la VL es un enorme desafío en áreas endémicas, generalmente ubicadas en las zonas más pobres y remotas del planeta (Croft *et al.*, 2006a). En la última década se ha progresado en el entendimiento de los mecanismos inmunológicos de la leishmaniasis, pero muy pocas vacunas candidato han avanzado más allá de fases experimentales iniciales (Jain & Jain, 2015 Rezvan & Moafi, 2015), con lo que actualmente no se dispone de vacunas eficaces para ninguna forma de leishmaniasis humana (Nagill & Kaur, 2011).

Otras estrategias para prevenir la enfermedad tienen como blanco al vector, o a la población de reservorios animales, así como el despliegue de mecanismos que eviten que el hombre sea picado (Stockdale & Newton, 2013). Se ha observado que la utilización de redes de cama (mosquiteros) con insecticidas de liberación lenta han efectivamente reducido la incidencia de VL en áreas endémicas de forma significativa (Mondal *et al.*, 2013). Adicionalmente, el uso de repelentes de insectos (piretroides sintéticos principalmente) en perros se ha convertido en la herramienta más eficiente para la prevención de la infección por *L. infantum* en estos animales (Otranto & Dantas-Torres, 2013).

En relación a los tratamientos disponibles, la quimioterapia sigue siendo el elemento más importante en el control de la VL. Las drogas utilizadas se relacionan con cuatro aspectos particulares de la biología de *Leishmania*: (i) la localización intracelular de la forma amastigote en el fagolisosoma ácido del macrófago; (ii) los requerimientos farmacocinéticos diferenciales de drogas que se distribuyen en hígado, bazo y médula ósea en la VL; (iii) las diferencias significativas en la sensibilidad de las drogas en las especies de *Leishmania* causantes de la enfermedad en humanos y (iv) la influencia de la inmunosupresión asociada a la leishmaniasis, que puede reducir la efectividad de algunas drogas (Barrett & Croft, 2012). Existen numerosos agentes terapéuticos utilizados actualmente para tratar la VL, todos con

contraindicaciones y efectos colaterales significativos que limitan su uso en zonas endémicas de la enfermedad (de Menezes *et al.*, 2015). Algunos ejemplos son (ver la estructura química de los compuestos en la Figura 4):

- *Antimoniales pentavalentes*. Actúan directamente sobre procesos moleculares del parásito e incrementan la actividad microbica del macrófago (McGwire & Satoskar, 2014). El tratamiento dura hasta 30 días y se administra por vía intravenosa o intramuscular. Los efectos secundarios incluyen cardiotoxicidad, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, pancreatitis, desbalance de electrolitos y pancitopenia. Además, se ha reportado resistencia emergente del parásito, y los costos del tratamiento son elevados (Jain & Jain, 2013).

- *Anfotericina B*. Desestabilizante de membranas del parásito por unión al ergosterol (McGwire & Satoskar, 2014). El tratamiento dura entre 15 y 20 días y es administrado por vía intravenosa. Los efectos secundarios incluyen nefrotoxicidad severa, los cuales se ven disminuidos si se formula la droga con compuestos lipoides. No obstante, en este último caso el tratamiento tiene costos muy elevados (Jain & Jain, 2013).

- *Paromomicina*. Bloquea la síntesis proteica en el parásito uniéndose al ARN ribosomal 16S (McGwire & Satoskar, 2014). La vía de administración es intramuscular, el tratamiento es económicamente accesible y dura 21 días. Sus efectos secundarios incluyen nefrotoxicidad, ototoxicidad y, en menor medida, hepatotoxicidad (Jain & Jain, 2013).

- *Miltefosina*. Es el único agente administrado por vía oral, y el tratamiento dura 28 días. Los efectos secundarios incluyen teratogenicidad, nefrotoxicidad y hepatotoxicidad; además, está contraindicado en el embarazo (McGwire & Satoskar, 2014). La edelfosina ha surgido como análogo alquilolisofosfolípido de la miltefosina, mostrando mayor efectividad contra parásitos promastigotes y amastigotes (Varela *et al.*, 2012).

- *Pentamidina*. Interfiere con la biosíntesis de macromoléculas del parásito como ADN, ARN, fosfolípidos y proteínas. El tratamiento dura entre 21 y 28 días, y sus efectos secundarios incluyen nefrotoxicidad, cardiotoxicidad, hipoglucemia y efectos sobre la médula ósea (McGwire & Satoskar, 2014).

- *Sitamaquina*. Es la única droga que ha sido desarrollada específicamente para el combate de la VL. La vía oral de administración, su baja resistencia reportada y su costo reducido la hacen un buen candidato, sin embargo presenta importantes efectos secundarios como dolor abdominal, dispepsia, glomerulonefritis e insuficiencia renal (Singh *et al.*, 2012). Además, el uso clínico de este compuesto se ve limitado por estar aún en investigación.

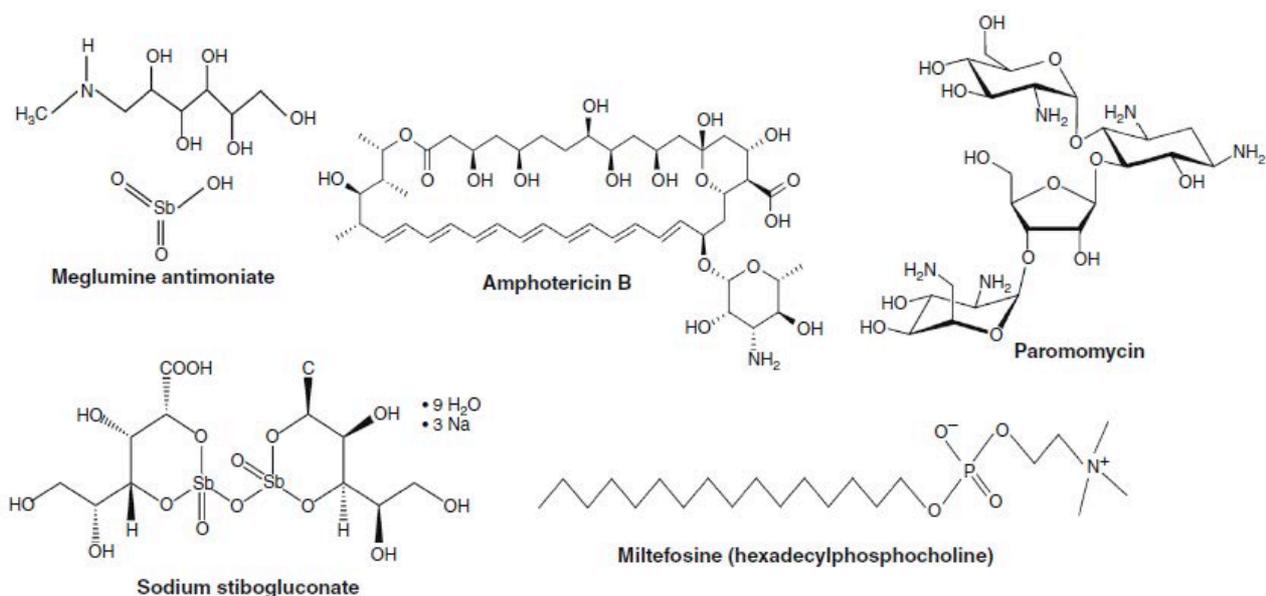


Figura 4. Agentes quimioterapéuticos antileishmánicos convencionales. Fuente: Jain & Jain, 2013.

La combinación de drogas ha mostrado resultados terapéuticos promisorios, con aumento de eficacia y efectos secundarios reducidos, menor duración de tratamientos (hasta 8 días), costos más accesibles y resistencia emergente reducida (Jain & Jain, 2013).

Algunos tratamientos convencionales, como el uso de antimoniales pentavalentes, se evitan en algunas áreas endémicas debido a la aparición de cepas de parásitos resistentes (Guerin et al., 2002). En este contexto, el aumento en el número de pacientes con VL co-infectados con VIH podrían representar un reservorio potencial: estos pacientes presentan alta carga parasitaria y respuesta inmunológica atenuada, por lo que responden lentamente al tratamiento, facilitando la selección de parásitos resistentes. En cuanto al uso de fármacos de larga vida media, como anfotericina B o miltefosina, la posibilidad de resistencia emergente tampoco debe ser ignorada (Croft *et al.*, 2006b).

En suma, los fármacos actualmente utilizados presentan inconvenientes significativos, ya sea por la vía parenteral de administración, larga duración de tratamientos, resistencia emergente, toxicidad y/o costos elevados que limitan su uso en áreas endémicas de la enfermedad (de Menezes et al., 2015). Además, los fármacos en desarrollo clínico son, o bien reformulaciones de medicamentos anteriores, terapias de combinación, o el resultado de conmutación terapéutica, ofreciendo alternativas genuinas muy limitadas a los pacientes que sufren de leishmaniasis. Existe por ende una necesidad urgente de identificar nuevos blancos

terapéuticos para el desarrollo de medicamentos innovadores contra la leishmaniasis, y en particular para combatir su forma visceral.

Proteín-quinasas

Las quinasas, también conocidas como fosfotransferasas (EC 2.7.X.X), son enzimas capaces de catalizar la transferencia de un grupo fosfato desde un sustrato dador (generalmente un nucleósido-trifosfato como el ATP) a un segundo sustrato, el sustrato aceptor. Al resultado de dicho proceso catalítico se lo suele denominar genéricamente *fosforilación*. La variedad natural de sustratos aceptores específicos es sorprendente y la modificación funcional debida a la fosforilación, esto es, el cambio en las propiedades fisicoquímicas de la molécula antes y después de la incorporación de uno o más grupos fosfato, es muchas veces dramática, razón por la cual las fosforilaciones juegan un rol muy importante en la bioquímica de las células. El sustrato aceptor de la quinasa puede ser de naturaleza muy variada, pequeñas moléculas, carbohidratos, lípidos, proteínas, etc. A su vez, el grupo fosfato puede ser transferido a distintos tipos de grupos reactivos en los aceptores: hidroxilos (EC 2.7.1.X, como en el caso de las hexoquinasas, glicerol-quinasas, etc), carboxilatos (EC 2.7.2.X, fosfoglicerato-, aspartato-quinasas, etc.), grupos nitrogenados (EC 2.7.3.X, creatin-, arginin-quinasas, etc.), fosfatos (2.7.4.X, nucleósido-fosfato-quinasas, etc.), entre otros (Cheek *et al.*, 2005).

Las proteín-quinasas (PQ) son en este contexto general, un subgrupo de las quinasas, definido como aquél que utiliza sustratos aceptores de naturaleza peptídica (péptidos y/o proteínas): son enzimas capaces de catalizar la transferencia de un grupo fosfato desde un sustrato dador (generalmente un nucleósido-trifosfato como el ATP) al segundo sustrato que es una proteína o péptido (Fig. 5).

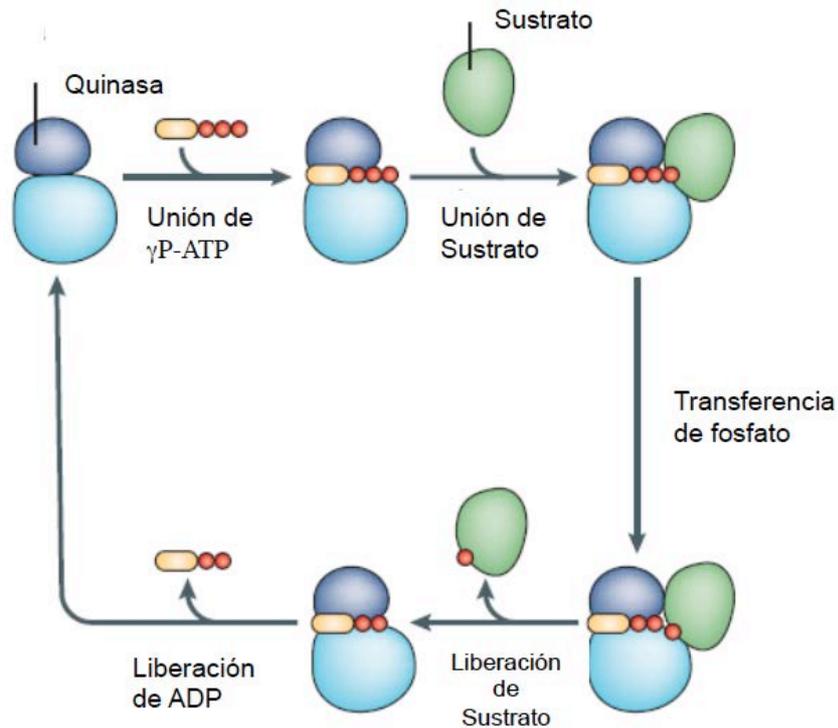


Figura 5. Fosforilación de sustratos proteicos catalizados por quinzas de proteínas o proteína-quinzas. El ATP se une al sitio activo de la quinasa, luego se incorpora el sustrato proteico y el γ P del ATP es transferido al sustrato. Posteriormente se libera el sustrato (producto fosforilado) del sitio activo de la quinasa, y por último también se libera la molécula de ADP (tomado de Ubersax & Ferrell, 2007).

Las proteínas quinzas típicas (TPKs, por sus siglas en inglés) comparten un plegamiento tridimensional común con dos lóbulos separados por un surco profundo, que será descrito en detalle más abajo. El bolsillo de unión al ATP, se ubica entre ambos lóbulos, lo que muestran una flexibilidad “en bisagra”, basculando entre una conformación “abierta” y otra “cerrada”, dependiendo de la unión del ATP y el estado de activación de la molécula. Existe también otro grupo de quinzas, las quinzas atípicas (AKs) que son fosfotransferasas homólogas a las TPK, aunque no conservando todos los motivos característicos. Estas AKs representan familias relativamente grandes de proteínas con sustratos muy diversos como antibióticos aminoglucósidos, colina, fosfatidilinositol, etc (Hanks & Hunter, 1995, Scheeff & Bourne, 2005).

Las PQs se clasifican según el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular NC-IUBMB (Hunter, 1991) en base a los distintos residuos aminoácidos aceptores de fosfatos. En las proteínas sustrato podemos encontrar:

- 1) aminoácidos con cadena lateral hidroxilada que son fosforilados mediante la

formación de un enlace fosfoéster. Hay dos tipos, los que presentan un grupo alcohol, como en las serinas y treoninas; o, un grupo fenol, en las tirosinas. Las fosfotransferasas específicas para estos aminoácidos se denominan serin/treonin-quinasas (E.C.2.7.11.X) y tirosin-quinasas (E.C. 2.7.10.X), respectivamente. Hay también quinasas de especificidad dual, capaces de fosforilar tanto Ser/Thr como Tyr (E.C. 2.7.12.X);

2) aminoácidos con aminas reactivas, generalmente en el grupo imidazol de histidinas, permiten la N-fosforilación a través de la formación de un enlace fosforamido (Attwood *et al.*, 2007). Son sustratos de fosfotransferasas conocidas como histidin-quinasas (E.C.2.7.13.X);

3) aminoácidos ácidos como el aspartato y el glutamato presentan un grupo acilo como aceptor del grupo fosfato y producen anhídros mixtos de gran reactividad (Stock *et al.*, 2000). Sus fosfotransferasas específicas son denominadas aspartil- o glutamil- quinasas (antes clasificados en el grupo E.C.2.7.14.X, ahora incluidas en el grupo 2.7.11.1 de S/T-quinasas no específicas); y,

4) cisteínas, que pueden experimentar reacciones de S-fosforilación en su grupo tiol, generalmente como intermediarias de reacciones enzimáticas de transferencia de grupos fosfato. Las enzimas que participan en estas reacciones se conocen como cistein-quinasas (E.C.2.7.11.1).

Hay numerosos ejemplos donde las PQs fosforilan otras PQs, o inclusive muestran una actividad de autofosforilación específica y fisiológicamente relevante.

Las PQs eucariotas (ePKs por sus siglas en inglés) conforman la superfamilia más grande de enzimas involucrada en la transducción de señales, expresión génica y homeostasis celular (Shi *et al.*, 2006) siendo codificadas por aproximadamente el 2% de los genes en mamíferos (Hanks & Hunter, 1995, Huse & Kuriyan, 2002, Parang *et al.*, 2001, Shen *et al.*, 2005). Esta superfamilia, comprende enzimas que fosforilan residuos de serina, treonina o tirosina, y presentan caracteres estructurales, de secuencia y funcionales compartidos, revelando que derivan de un ancestro común (Hanks & Hunter, 1995, Scheeff & Bourne, 2005). Inicialmente se creyó que era una familia de proteínas típica de mamíferos y otros vertebrados, pero se han encontrado miembros de las ePQs en plantas, hongos, protozoarios y aun en bacterias (Ortiz-Lombardia *et al.*, 2003, Wehenkel *et al.*, 2008). La figura 6 muestra el árbol filogenético de ePQs en humanos permite distinguir los diferentes grupos de ePQs (Manning *et al.*, 2002). Las ePQs se clasifican en siete grandes clases, en base a estudios de secuencia, especificidad de sustrato y modo de regulación:

- 1) **CK** (de tipo *casein kinase*);
- 2) dependientes de nucleótidos y diacilglicerol/fosfolípidos, denominadas **AGC** (incluyen las familias **PKA**, **PKG**, y **PKC**);
- 3) quinasas dependientes de calcio/calmodulina **CAMK** (del inglés, *calmodulin dependent kinases*);
- 4) las quinasas del grupo **CMGC** (comprenden a las familias **CDK** ó quinasas dependientes de ciclinas, **MAPK** ó proteín-quinasas activadas por mitógeno, **GSK** ó quinasas de la glucógeno sintasa, y **CLK** ó quinasas similares a CDKs);
- 5) las tirosin quinasas libres y unidas a receptores de membrana (**TK** -ó tirosín-quinasas- y las **TKL** -ó “de tipo tirosín-quinasa”);
- 6) **STE** (reguladoras de MAPKs, homólogas a las quinasas *Sterile 7*, 11 y 20 identificadas en levaduras); y,
- 7) PQs que no encajan en otras clases colectivamente agrupadas en **OPK** (“*other protein kinases*”) (Hanks, 2003)

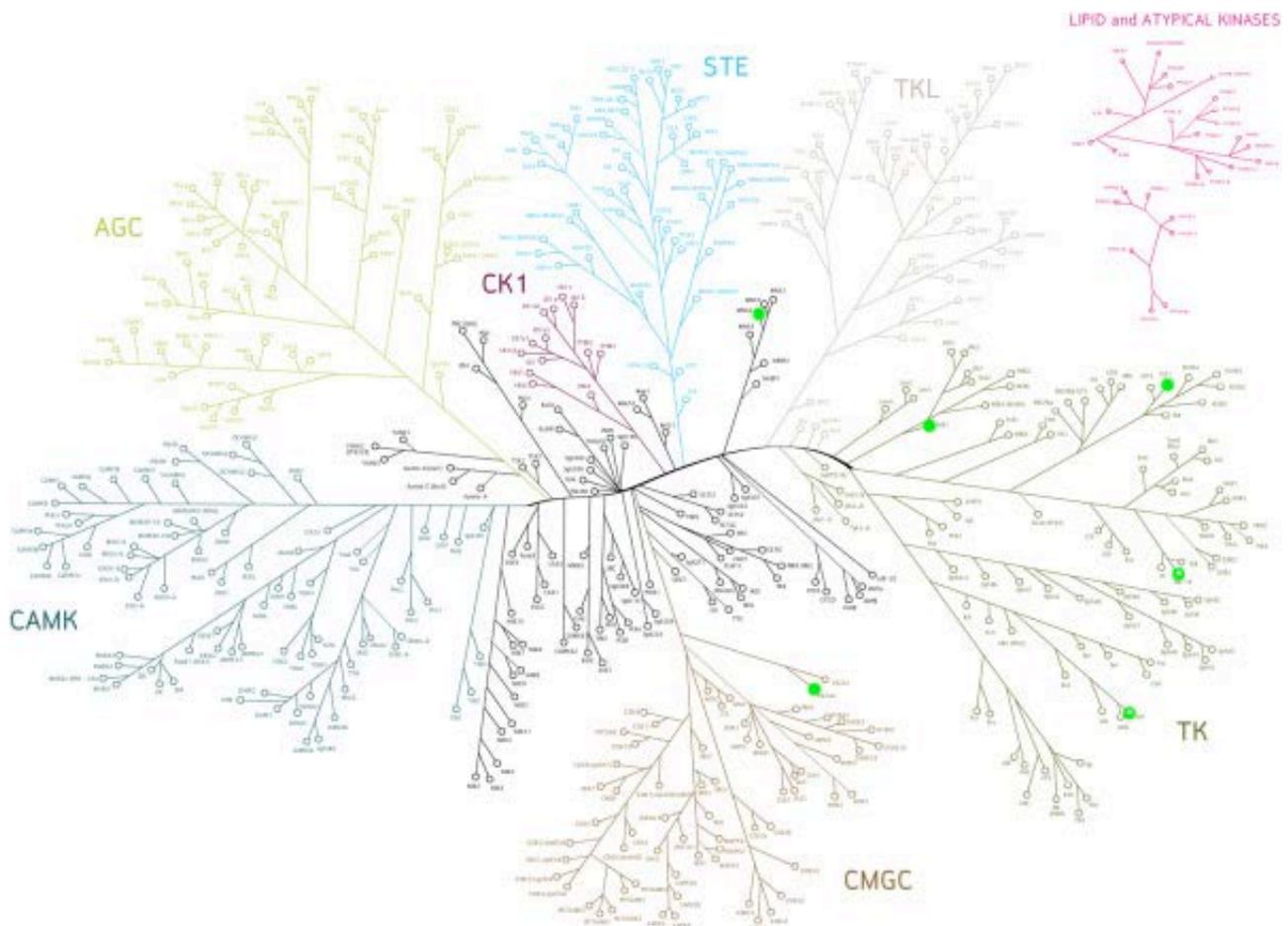


Figura 6. Árbol filogenético del quinoma humano como se describe en Manning *et al.* (2002) en base a similitudes de secuencia.

Las PQs son entonces enzimas que catalizan la fosforilación de proteínas aceptoras mediante la transferencia de un grupo fosfato del ATP (el fosfato gamma), a uno o más aminoácidos específicos. La modificación resultante en las cadenas laterales de dichos aminoácidos, representa una de las modificaciones post-traduccionales más comunes en biología. Es un mecanismo de transmisión de la información (por “marcado” de sustratos proteicos específicos, en momentos y localizaciones subcelulares específicas) en respuesta a diversos estímulos (o señales), en el que el amplio repertorio de PQs cumple el rol de transductor de dicha señal. Siendo estrictos, la transducción de una señal implica en general que dicha señal es extracelular, la PQ funciona como receptora, y transduce dicha señal externa en una respuesta interna en la célula. Sin embargo, desde el punto de vista mecanístico molecular, la “señalización” puede en verdad incluir señales intra-celulares, o incluso estar contenida en una cascada de transmisiones, en las que distintas PQs intermedias se fosforilan específica y consecutivamente entre sí, disparando una o más respuestas celulares río abajo. La adición de grupos fosfatos a las proteínas blanco finales suele promover cambios en sus actividades enzimáticas, localizaciones celulares y/o interacciones con otras proteínas, regulando así grupos de funciones celulares. Por este motivo a su vez, la actividad de las propias PQs está fuertemente regulada (ya sea por fosforilación, o también por unión de moléculas efectoras o proteínas reguladoras, y/o modificación de la estructura cuaternaria), con lo que se definen "vías de señalización" precisas, que generan redes de transducción de señales de gran complejidad (Shi et al., 2006).

Las proteín-quinasa juegan su rol celular de transmitir información debido a que, al nivel molecular, son verdaderos 'interruptores', presentando al menos 2 conformaciones tridimensionales extremas: el estado “*prendido*” o activado, y el estado “*apagado*” en el cual su actividad es mínima o indetectable. El cambio entre ambos estados es reversible, y bien definido en el espacio tridimensional. La figura 7 esquematiza este tipo de equilibrio entre ambos estados.

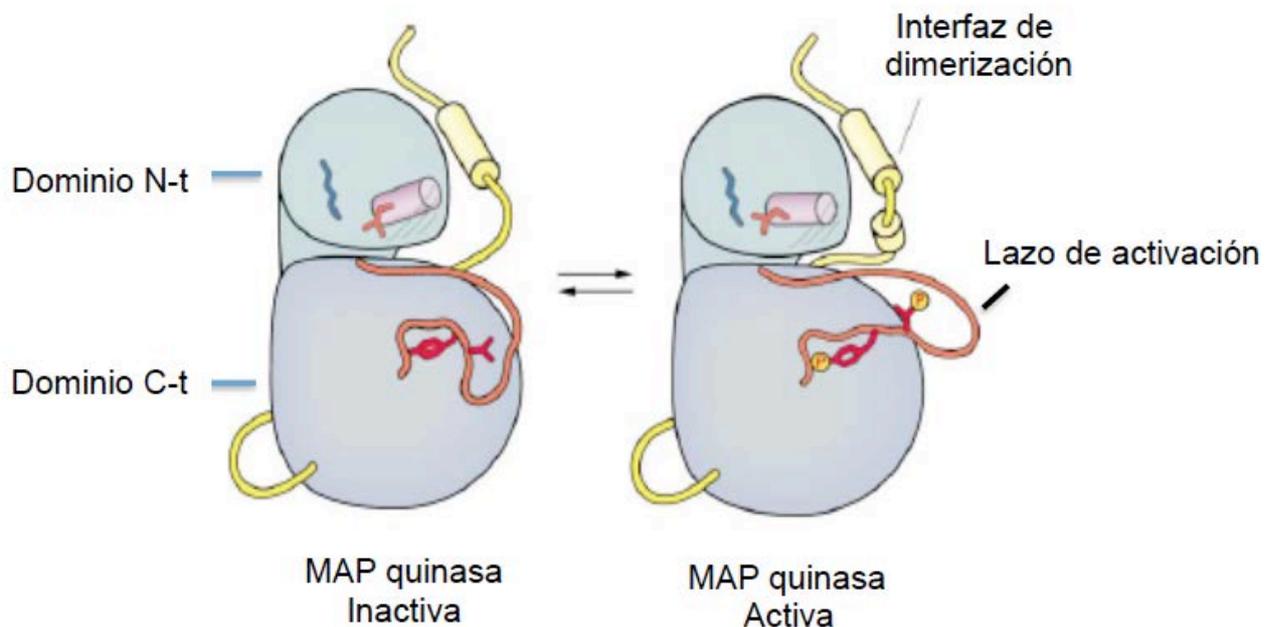


Figura 7. Transición prendido/apagado de las proteín-quinasas. Representación esquemática tomando como modelo una clase de PQs regulada por fosforilación del segmento de activación (marcado en color naranja). La fosforilación promueve una serie de re-arreglos y reorientaciones estructurales, incluyendo un movimiento general de apertura/cierre entre los dos subdominios (tomado de Huse & Kuriyan, 2002).

El grupo de PQs que fosforilan en aminoácidos serina, treonina y tirosina es el más estudiado. Se ha observado que el estado activo de las distintas quinastas es muy similar estructuralmente, mientras que, en contraste, la conformación inactiva en distintas PQs muestra una gran diversidad de variantes estructurales, capaces de moverse hacia el estado activo por vías diferentes en cada caso (Huse & Kuriyan, 2002). Este fenómeno tiene explicación desde el punto de vista evolutivo, dado que las conformaciones inactivas están mucho menos sujetas a constricciones espaciales precisas, pues en dicha configuración la proteína no tiene que catalizar una reacción química definida (por ende los grupos catalíticamente relevantes tienen mayor espacio de exploración de conformeros alternativos). El correlato de interés para nosotros es que dicha plasticidad, observada como variedad de conformaciones inactivas, es la que abre la posibilidad al nivel molecular para que la célula regule la activación de distintas PQs por vías enteramente diferentes: dado que las conformaciones son distintas, cada PQ puede interactuar con distintos componentes regulatorios o ser fosforilada/desfosforilada por quinastas/fosfatases específicas, asegurando la

especificidad de cada vía de señalización. Este concepto a su vez explica el gran interés por avanzar en la exploración detallada del quinoma (el conjunto de todas las proteín-quinzasas codificadas en un genoma, o bien en un sentido proteómico, aquél subconjunto que se expresa en un tipo celular y en un momento dado), aun sabiendo que todas estas proteínas (>500 en el hombre) comparten un plegamiento común y un mecanismo catalítico muy semejante. El enorme desafío es entender cómo, en este contexto de conservación general, las diferencias detalladas, al nivel atómico preciso, permiten a las células alcanzar una enorme especificidad de acción celular y/o de mecanismos regulatorios característicos de cada una de las diversas vías de transducción.

Esto conduce a una noción fundamental en un emprendimiento de Biología Estructural de proteín-quinzasas: es necesario profundizar el estudio de estas enzimas en distintos y variados modelos biológicos, pues es de esperar que así logremos dilucidar nuevos e inesperados mecanismos regulatorios, contribuyendo a entender la exquisita especificidad de las innumerables vías de transducción en las que están implicadas.

Junto a este desafío fundamental de avanzar en la comprensión de las redes de transmisión de información en las células, el estudio de las proteín-quinzasas está estimulado por su participación en importantes procesos celulares que las transforman en blancos terapéuticos de demostrada relevancia. La cristalografía de distintas PQs ha permitido el desarrollo de drogas eficaces en relación a diversas enfermedades como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, asociadas a procesos inflamatorios, e incluso, enfermedades infecciosas (Noble et al., 2004).

Nuestro principal objetivo apunta a contribuir al conocimiento estructural de las proteín-quinzasas como moléculas transductoras de señales. Nos centraremos en las Ser/Thr quinzasas de *Leishmania spp.*, un grupo poco estudiado, y cuyas características las señalan como blancos terapéuticos para el desarrollo de nuevas drogas contra este parásito patógeno.

Las Ser/Thr-quinzasas : del marco general al caso particular de Leishmania

Conocidas como STPKs, de la denominación en inglés *Serine/Threonine Protein Kinase*, son una familia de proteínas que actúan en vías de transducción de señales en eucariotas y procariotas. Estas quinzasas modifican a sus proteínas sustrato mediante la adición covalente

del grupo P γ del ATP, a la cadena lateral de un residuo de serina o treonina.

Las STPKs presentan típicamente un alta especificidad por sus sustratos, aun cuando sus sitios de fosforilación pueden ser muy limitados en número como es el caso de la MEK1 de mamíferos, que probablemente fosforile tan sólo 4 sitios en todo el proteoma (2 en ERK1 y 2 en ERK2); y sin embargo otras, como las CDK (quinasas dependientes de ciclinas), fosforilan con gran especificidad un amplio espectro de proteínas estructuralmente diferentes e implicadas en diversos procesos biológicos. Esta especificidad de selección del residuo fosforilable es frecuentemente dependiente de la interacción con residuos aromáticos adyacentes al sitio de fosforilación (Ubersax & Ferrell, 2007). Se han determinado las secuencias consenso de una gran diversidad de sustratos que son fosforilados por distintas PQs como se muestra en la Tabla 2, remarcando que sin embargo, para muchas otras PQs se desconoce aún los sitios específicos.

Tabla 2. Algunas PQs y sus sustratos específicos^a (tomado de Adams, 2001).

	name	consensus sequence
	serine protein kinases	
PKA	cAMP-dependent protein kinase	-R-R-X- S /T-hyd-
PhK	phosphorylase kinase	-R-X-X- S /T-F-F-
cdk2	cyclin-dependent kinase-2	- S /T-P-X-R/K
ERK2	extracellular-regulated kinase-2	-P-X- S /T-P-
	tyrosine protein kinases	
c-Src	cellular form of the transforming agent of the Rous sarcoma virus	-E-E-I- Y -E/G-X-F-
v-Fps	transforming agent of the Fujinami sarcoma virus	-E-I- Y -E-X-I/V-
Csk	C-terminal Src kinase	-I- Y -M-F-F-F-
InRK	Insulin receptor kinase	- Y -M-M-M-
EGFR	Epidermal growth factor receptor	-E-E-E- Y -F-

^a Phosphorylation sites (P-sites) are shown in bold type.

Hay distintos niveles de determinación de la especificidad de sustrato: el primero surge de las características estructurales finas del sitio activo; otro nivel involucra interacciones de acoplamiento (“*docking*” en inglés) entre dominios del sustrato y dominios de la quinasa. Estos motivos de acoplamiento aumentan la afinidad de la quinasa por su sustrato específico. Adicionalmente, algunas STPK usan la unión a compañeros modulares (proteínas accesorias o “*scaffolding*”) que contienen dominios de unión que guían a la quinasa a reconocer su sustrato blanco.

Es importante resaltar que en el contexto del enorme bagaje de información bioquímica, fisiológica y estructural de PQs humanas y de vertebrados superiores, la información disponible para PQs de bacterias y de eucariotas inferiores es notablemente escasa. ***Es claro***

que se necesita profundizar mucho el estudio estructural de estas enzimas en parásitos patógenos, tanto con fines básicos como para explorar potenciales blancos de nuevos fármacos (Naula et al., 2005).

Teniendo en cuenta la totalidad de la familia Trypanosomatidae, al comienzo de esta Tesis había sólo una estructura tridimensional de una PQ resuelta (PDB 3E3P; al comenzar esta Tesis no estaba publicada, luego apareció el artículo durante mi trabajo de Tesis Ojo *et al.*, 2011) de *Leishmania major*, que corresponde a una glucógeno sintasa quinasa GSK. El grupo de protozoos patógenos donde se ha avanzado más en este campo es el de los Apicomplexa (Doerig *et al.*, 2008), incluyendo en particular una docena de PQs de *Plasmodium spp.* (Holton *et al.*, 2003), *Toxoplasma gondii* (Wei *et al.*, 2013) y *Cryptosporidium parvum* (Wernimont *et al.*, 2010).

Introducción general a la arquitectura de las STPKs

Todas las Ser/Thr quinasas comparten el plegamiento básico ePK de las TPKs de aproximadamente 270 aminoácidos (Hunter, 1991, Huse & Kuriyan, 2002). Este plegamiento tiene características conservadas en su estructura primaria, dividiéndose en 12 subdominios, definidos por regiones con patrones característicos de aminoácidos conservados que juegan roles esenciales en la función de la enzima (Hanks & Hunter, 1995) (Fig.8).

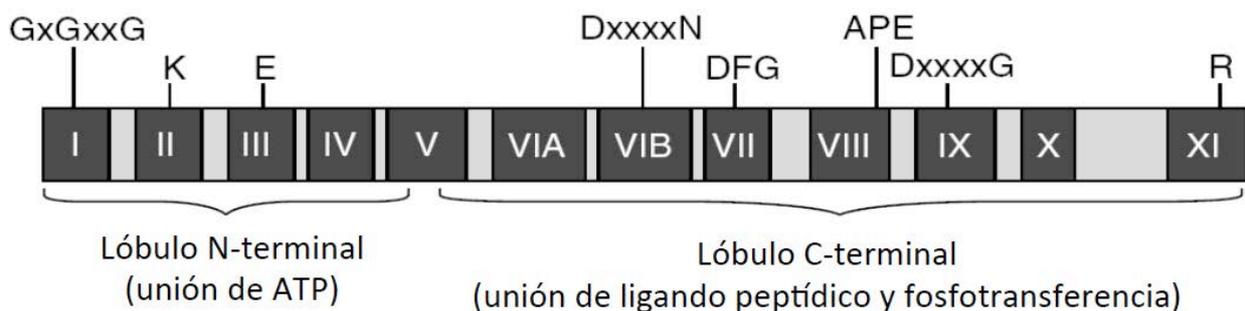


Figura 8. El dominio proteína-quinasa de tipo eucariota (ePK). Los 12 subdominios conservados se indican en números romanos. Se indican las posiciones de los residuos y motivos altamente conservados. La función de unión del Mg-ATP está básicamente en el lóbulo N-terminal, mientras que la unión al sustrato es responsabilidad fundamentalmente del lóbulo C-terminal (tomado de Hanks, 2003).

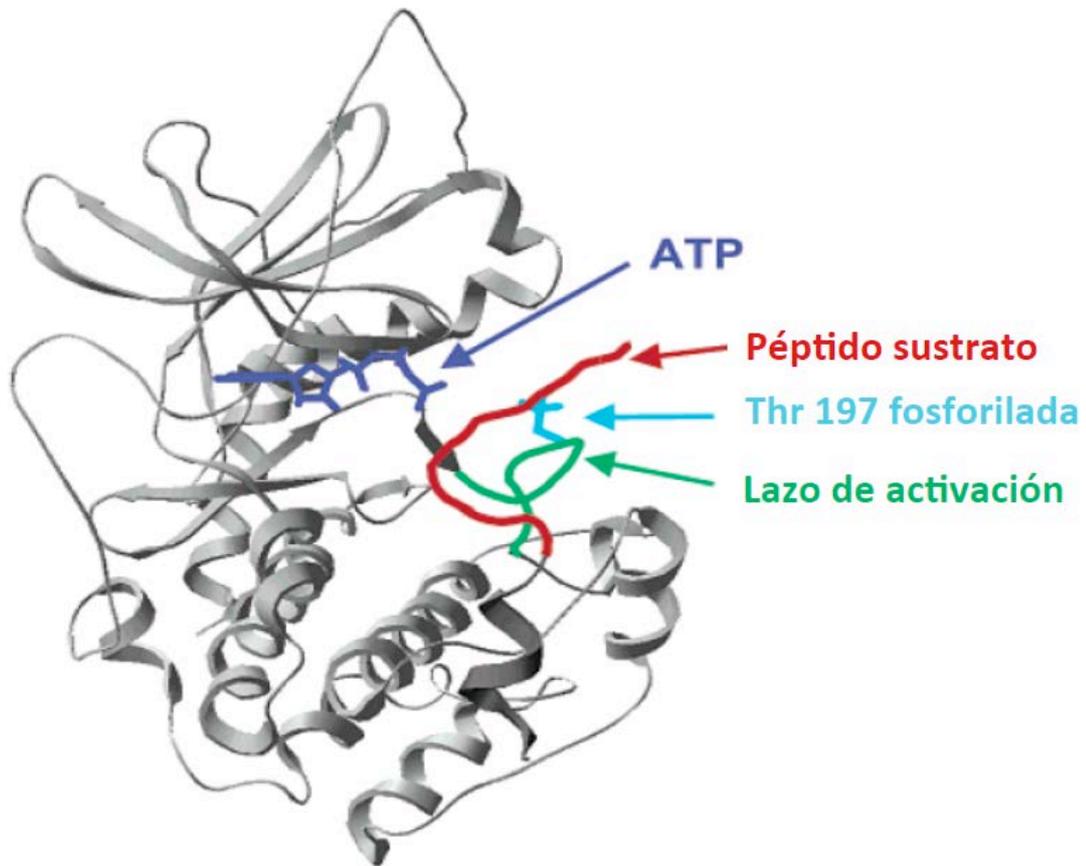


Figura 9. Estructura tridimensional de la conformación catalíticamente activa de PKA 1ATP de *Mus musculus*, revelando el plegamiento de tipo proteína-quinasa eucariota ePK, y sus elementos funcionales clave (tomado de Adams, 2003).

La estructura tridimensional de este plegamiento ePK (Fig. 9) fue observada experimentalmente por vez primera usando cristalografía de rayos X, resolviendo la estructura 3D de la PQ dependiente de AMPc, una STPK conocida como proteín-quinasa A (PKA) (Knighton *et al.*, 1991).

El plegamiento ePK se ordena espacialmente formando 2 lóbulos o dominios, uno más pequeño hacia el N-terminal, plegado principalmente en hoja β , (incluyendo los subdominios I-IV); y otro más grande, C-terminal, compuesto principalmente por α -hélices (subdominios VIa-XI), como se observa en la figura 8. Entre ambos lóbulos se forma un surco o bolsillo donde se encuentra el sitio catalítico, que permite la unión al ATP y al sustrato aceptor (Scheeff & Bourne, 2005). Los subdominios conservados forman unidades estructurales de orden superior (Hanks & Hunter, 1995), y describiremos a continuación los rasgos estructurales más importantes de cada uno de ellos. La figura 10 sirve de soporte ilustrativo para identificar algunos de los elementos importantes en los mecanismos catalíticos y/o regulatorios, que se refieren a los distintos subdominios.

El subdominio I, en el extremo amino terminal (Nt) contiene el motivo consenso GXGX ϕ G (donde ϕ es usualmente una tirosina o una fenilalanina). Este bucle rico en glicinas se localiza entre las hebras $\beta 2$ y $\beta 3$, y contribuye a generar un bolsillo hidrofóbico que acomoda a la adenina del ATP. Este bucle también es conocido como bucle P, dado que los residuos de glicina permiten que se aproxime a los fosfatos del ATP, una característica típica en muchas proteínas que unen nucleótidos.

El subdominio II contiene la Lys72 (respetando la numeración de PKA), absolutamente conservada, que se ha identificado como un aminoácido esencial para la actividad catalítica. Esta Lys ayuda a anclar y orientar el ATP, ya que interacciona con los fosfatos α y β . Además, en las conformaciones activas de las quinasas forma un puente salino con el grupo carboxilo de la cadena lateral del Glu91, también ultra-conservado en el subdominio III.

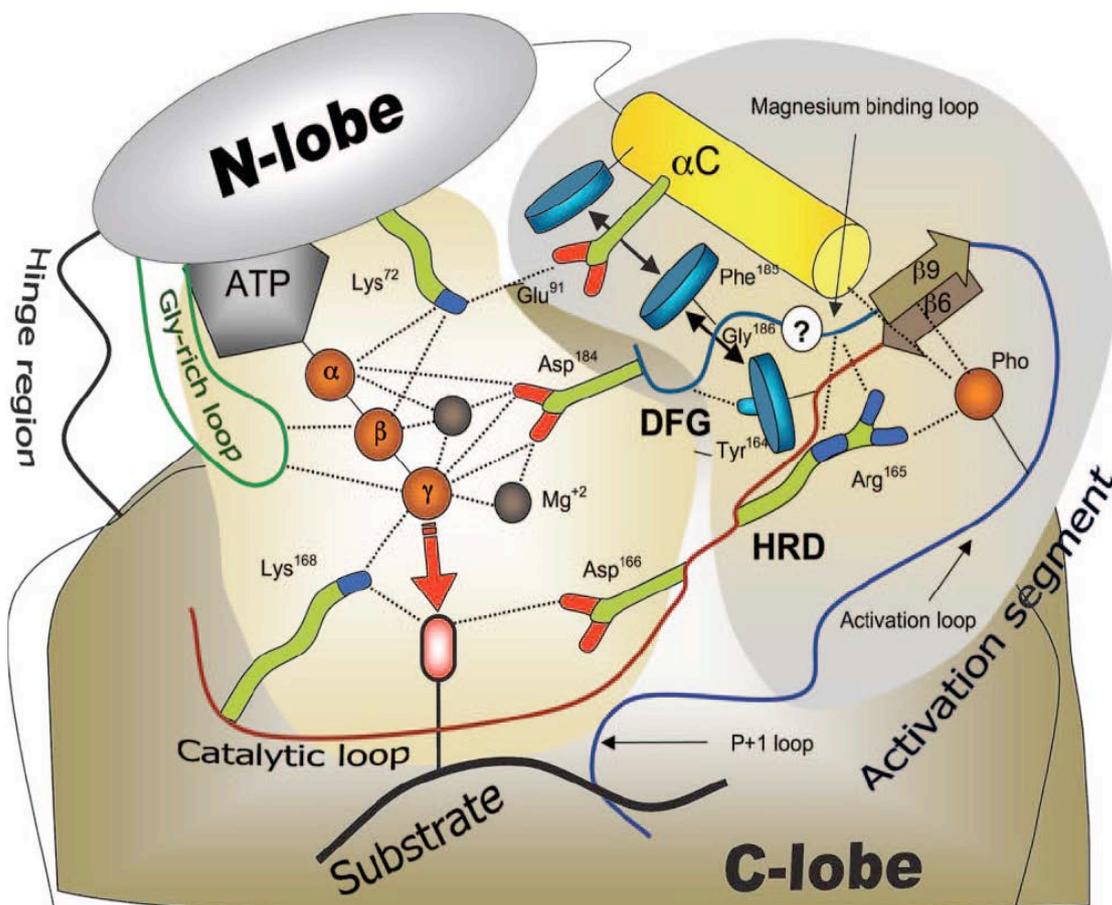


Figura 10. Sitio activo de una ePK. Ilustración esquemática de las interacciones en el núcleo catalítico, con el ATP y el sustrato peptídico, en la conformación activa de la quinasa. Se remarcan los residuos y elementos de estructura secundaria claves en la catálisis y en la regulación. La numeración de los residuos corresponde a la de PKA de *Mus musculus* (tomado de Kornev *et al.*, 2006).

La α -hélice C, define al subdominio III, y representa la única hélice conservada en el dominio Nt. Esta hélice está directamente implicada en importantes cambios conformacionales que ocurren en el centro catalítico. El Glu91 mencionado antes, se localiza en el centro de esta hélice. El par iónico Lys72-Glu91, altera la conformación de la hélice α C, fijándola en una ubicación “activa”. Muchos mecanismos regulatorios funcionan alterando la conformación de esta hélice Clave, afectando la integridad de estas interacciones, disparando el interruptor “prendido/apagado”.

El subdominio IV se corresponde con la hebra β 4, hidrofóbica y contiene residuos poco conservados, por lo que no estaría involucrada en la catálisis o reconocimiento del sustrato, sirviendo un rol estructural. A continuación, el subdominio V, hace de vínculo entre los dos lóbulos, incluyendo la hebra β 5 hidrofóbica del lóbulo Nt, la hélice α C en el lóbulo Ct y el lazo conector entre ambos. Los residuos de este subdominio contribuyen a la formación del bolsillo hidrofóbico que aloja los anillos de la ribosa y adenina del ATP.

El subdominio VIa forma una gran hélice hidrofóbica, la hélice α E, sin residuos altamente conservados. Los residuos hidrofóbicos de los subdominios IV, V y VIa, están implicados en la funcionalidad de las quinasas, a través de la formación de una “espina” hidrofóbica, formada por los residuos Leu95, Leu106, Phe185 y Tyr/His163 que se apilan formando un núcleo rígido entre el dominio Ct y el Nt cuya conformación varía con el estado de activación de la quinasa (Kornev et al., 2006, Kornev *et al.*, 2008, Ten Eyck *et al.*, 2008). Esta espina hidrofóbica permitiría coordinar los movimientos entre los 2 lóbulos permitiendo a la enzima alternar entre conformaciones activa e inactiva. Se ha demostrado que mutaciones en esta espina llevan a un aumento de la flexibilidad del bucle de activación en la MAP quinasa ERK2 y a la inactivación total de la MAP quinasa p38 (Kornev et al., 2008).

El subdominio VIIb está formado por las cortas hebras β 6 y β 7 conectadas por un bucle, el cual contiene la tríada conservada His-Arg-Asp (que incluye el Asp166). Este bucle se denomina bucle catalítico, porque el Asp166 es la base catalítica de la enzima: abstrae al protón del grupo oxhidrilo del residuo fosforilable en el sustrato (de la cadena lateral de una Ser o Thr en las STPKs). El oxhidrilo así desprotonado se transforma en un oxianión al que el fosfato- γ del ATP-Mg²⁺ puede ser transferido.

El subdominio VII se arregla espacialmente en un motivo “hebra β /bucle/hebra β ” y comprende las hebras β 8 y β 9. Contiene un triplete muy conservado Asp-Phe-Gly (DFG) en el bucle. El aspartato incluido en este motivo DFG, establece contactos polares con los 3 fosfatos del ATP, directamente o a través de la coordinación del Mg²⁺. La fenilalanina del

DFG hace contactos hidrofóbicos con la hélice αC y con el motivo cercano HRD (en el subdominio VIb) del bucle catalítico. Esta Phe posiciona correctamente al Asp en el motivo DFG, y acomoda la hélice αC facilitando el contacto Lys72-Glu91. La Gly del motivo DFG también tiene un rol clave en posicionar correctamente al Asp y permitir el switch “apagado/prendido” de la quinasa, mediada por la gran flexibilidad intrínseca de los residuos Gly en cuanto a rotámeros de la cadena principal (Kornev et al., 2006).

El subdominio VIII incluye el motivo altamente conservado Ala-Phe-Glu (APE, residuos 206-208 en PKA) que se pliega sobre el surco inter-lóbulos, y participa en el reconocimiento del péptido sustrato de la quinasa. Dicho sustrato se une en una conformación extendida entre el sitio de unión al ATP y el denominado bucle de activación, el cual está incluido en este subdominio VIII. La denominación de ‘bucle de activación’ proviene del hecho que una gran cantidad de PQs son fosforiladas en residuos ubicados en este bucle, como paso imprescindible para hacer el switch del estado inactivo al activo. En PKA por ejemplo, la activación de la quinasa requiere de la fosforilación de la Thr197 en este bucle. El bucle de activación es uno de los segmentos más flexibles de la molécula. Su fosforilación lo suele estabilizar en una conformación extendida que permite la unión del sustrato peptídico, de otro modo inhibida. Así, el bucle de activación es uno de los elementos clave en la plasticidad de estas proteínas, con capacidad para sufrir cambios conformacionales regulados. El laboratorio de Susan Taylor ha propuesto un modelo de activación iniciado por la fosforilación de la Thr197 (Cauthron *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 1998). La fosforilación de este residuo promueve su interacción con la Arg165 del bucle catalítico, y con la Lys189 forzando la formación de la hoja $\beta 8$ - $\beta 9$, y la formación de varios puentes de hidrógeno (H) importantes, entre ellos el formado por la amida de la cadena principal de la Gly186, que rota y forma un puente de H con el Asp184 en el mismo motivo DFG, posicionando correctamente al aspartato. La desfosforilación de la Thr197, destruye todo el ensamblado debido a la repulsión electrostática entre la Arg165 y la Lys189, desarmando el arreglo de la hoja β , los puentes de H y promoviendo el switch de la Gly del DFG a la posición inactiva.

El subdominio IX corresponde a la gran hélice αF , que participa del reconocimiento del sustrato proteico. Contiene un residuo conservado (Asp220) que estabiliza al bucle catalítico del subdominio VIb estableciendo puentes de H con los primeros dos residuos del motivo HRD. El subdominio X, constituido por la hélice αG , es el menos conservado de los subdominios y su función se desconoce. El subdominio XI se extiende hasta el extremo Ct y la característica más conservada es la Arg280 entre las hélices αH y αI .

La plasticidad del plegamiento ePKs, y en especial la de su forma inactiva, hace posible la regulación de la actividad catalítica a través de diversos mecanismos moleculares. Ejemplos de estos últimos incluyen: ciclos de fosforilación y desfosforilación, la interacción con segundos mensajeros, o la presencia de unidades regulatorias y/o de dominios específicos de unión a sustratos (Biondi & Nebreda, 2003).

De particular relevancia es la fosforilación del bucle catalítico previamente mencionada, una estrategia ampliamente utilizada entre las PQs como forma de control de su actividad. Esta modificación puede ocurrir de forma autocatalítica o mediada por la acción de otras quinasas, como ocurre en las complejas cascadas de señalización mediadas por MAPKs, que se describen brevemente a continuación.

Un grupo de STPKs de especial interés: las proteína-quinzas activadas por mitógeno

Las PQs activadas por mitógeno (MAPK, de la denominación en inglés *Mitogen Activated Protein Kinases*) pertenecen al grupo de las GMGC (Hanks & Hunter, 1995). Son PQs que responden a estímulos químicos o físicos extracelulares (entre ellos el uso de mitógenos, sustancias capaces de disparar la división celular), y regulan diversos procesos celulares como expresión génica, diferenciación, apoptosis y división celular (Kultz, 1998). Las vías de señalización por MAPKs comienzan con un estímulo extracelular que promueve la activación de una tirosín-quinasa receptora (TRK por sus siglas en inglés). La TRK activada típicamente se autofosforila promoviendo de este modo la activación de Ras, una GTPasa que transfiere el estímulo a través de una cascada de señalización. La propia MAPK, es finalmente fosforilada por otra quinasa (MAPKK / MEK ó MAP quinasa quinasa, que son PQs de la clase STE capaces de fosforilar tanto Ser/Thr como Tyr), la cual requiere ser a su vez activada río arriba por una MAPKKK (MAP quinasa quinasa quinasa) como se muestra en la figura 11.

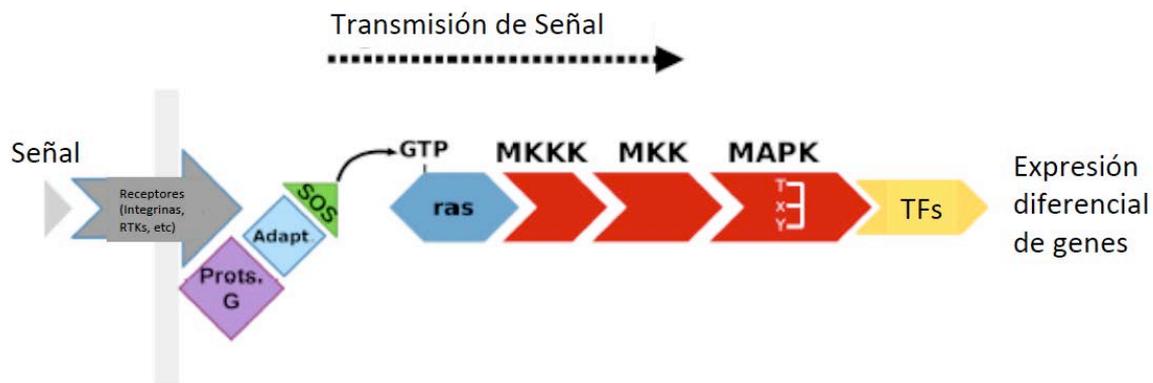


Figura 11. Esquema resumido de las vías de transducción de señales mediadas por MAPKs. El dibujo resalta la linealidad y la complejidad de las vías asociadas a estas quinasas, y los efectos finales observados sobre la célula (Cayla, 2014).

Las MAPKs se activan por una doble fosforilación en 2 residuos conservados, una Thr y una Tyr del motivo TXY en el bucle de activación. A su vez, típicamente presentan una extensión C-terminal que vuelve desde el lóbulo mayor para terminar plegándose contra el lóbulo N-terminal. En dicho segmento hay otra serina que es fosforilada, modificando la superficie expuesta y gatillando la homo-dimerización (Khokhlatchev *et al.*, 1998), al menos esto ha sido evidenciado para la MAPK humana ERK1/2. Es este doble evento de fosforilación del bucle de activación sumado a la dimerización, que termina por activar completamente la actividad intrínseca de fosfotransferasa de la propia MAPK. Las proteínas sustrato de las MAPKs tienen las Ser o Thr fosforilables en la secuencia consenso PX(T/S)P. La especificidad de la vía está altamente regulada e incluye interacciones quinasa-quinasa y quinasa-sustrato, colocalización de quinasas en proteínas “de andamiaje” (*scaffolding*) e inhibición de quinasas (Qi & Elion, 2005, Zhang & Dong, 2007). Estas proteínas de andamiaje pueden actuar también de intermediarias entre los sustratos y las MAPKs, reclutándolos ambos en el mismo complejo.

Una vez activada, la MAPK fosforila un rango de sustratos presentes en varios compartimientos celulares. Esta cascada de señalización está conservada evolutivamente desde levaduras a mamíferos (Coulombe & Meloche, 2007).

Existen 4 grupos principales que conforman la familia de las MAPK en mamíferos (al menos estos grupos representan la mayor parte de las MAPKs conocidas, y las más estudiadas): las ERK 1/2, varias isoformas de p38, las quinasas del N-terminal de c-Jun (JNK), y ERK5 (Cargnello & Roux, 2011):

- 1) ERK1/2, son quinasas reguladas por señales extracelulares. Principalmente son activadas por receptores de superficie celular (de tipo tirosín-quinasas). Tienen un rol central en la proliferación y diferenciación celular.
- 2) Las quinasas de la familia del maino-terminal de c-Jun (JNK1, 2 y 3) también conocidas como quinasas activadas por estrés (SAPKs – stress activated protein kinases) están implicadas en el control de la transcripción, ciclo celular y proliferación, y apoptosis.
- 3) Las distintas isoformas de p38 (α , β y γ) están implicadas en las respuesta a estrés, la regulación de procesos inflamatorios y la sobrevida celular.
- 4) ERK5, es activada en respuesta a factores de crecimiento, estrés oxidativo y cambios de osmolaridad y está involucrada en la sobrevida y proliferación celular.

Además, hay 3 grupos de MAPKs, que son MAP quinasas “atípicas” por los siguientes motivos:

- 1) ERK3/4, no poseen la Tyr fosfo-aceptora en el bucle de activación. En cambio poseen el motivo SEG en la extensión C-terminal potencialmente implicada en la localización celular (Cargnello & Roux, 2011):
- 2) ERK 7/8 posee un extensión C-terminal potencialmente implicada en la localización celular y auto activación (Abe *et al.*, 1999)
- 3) Las quinasas de tipo Nemo (NLK), presentan la tirosina del motivo TxY reemplazada por una glicina o glutamina

En la figura 11 se visualiza la complejidad de las interconexiones de las vías que involucran a MAPKs en células de mamíferos y las importantes respuestas que regulan.

Los miembros de la familia de las MAPKs que fueron caracterizados primero históricamente, son las ERK (*Extracelular Regulated Kinases*). La familia ERK contiene el motivo TEY (Thr-Glu-Tyr) en el bucle de activación. ERK1/ERK2 (85% idénticas, ambas también conocidas como MAPK1 en humanos) están implicadas en una vía de señalización característica de MAPK (Boutros *et al.*, 2008). Típicamente, la estimulación de receptores de factores de crecimiento (Tyr-quinasas), lleva a la activación de una GTPasa (Ras), que en su forma activada recluta a la MAPKKK Raf a la membrana para su activación por fosforilación. Raf activada, fosforila y activa a las MAPKKs MEK1/MEK2, que a su vez activan a las quinasas ERK1 y ERK2 por fosforilación de la treonina y tirosina en el bucle de activación.

ERK1/ERK2 son quinasas dirigidas por prolinas ya que fosforilan serinas o treoninas que se encuentren seguidas por una Pro (Coulombe & Meloche, 2007).

La fosforilación del motivo TxY en el bucle de activación de las MAPKs está así directamente catalizada por MKKs, lo que genera rearrreglos estructurales que convierten a la MAPK en su estado activado. La fosforilación de la treonina permite la estabilización del bucle de activación a través de la estabilización de la glicina del motivo DFG, y desplazamiento de la Phe del mismo motivo desde la configuración inactiva (“*DFG-out*”, referido en inglés al hecho que la cadena lateral de la Phe queda en este estado “afuera” de la espina hidrofóbica que vertebrata a los dos lóbulos de la quinasa en su estado activo), hacia su configuración activa (“*DFG-in*”) (Kornev et al., 2006 Meharena *et al.*, 2013). El movimiento de la Phe permite posicionar de forma correcta al Asp del DFG para las interacciones hidrofóbicas necesarias con el HRD de la hélice α C (Kornev et al., 2006) El motivo DFG esta implicado directamente en el alineamiento de residuos hidrofóbicos, lo que permite el arreglo apropiado de las espinas catalítica y regulatoria (Kornev et al., 2006, Taylor & Kornev, 2011) indispensable para la estabilización del estado activado de la MAPK (Hu *et al.*, 2015).

En resumen, las ePQa son moléculas dinámicas que transitan varias configuraciones entre el estado activo e inactivo (Taylor *et al.*, 2012; Meharena et al., 2013). Además, de los mecanismos regulatorios clásicos conservados mencionados, se han reportado numerosos mecanismos regulatorios diferentes de las ePQ, algunos involucran dimerización (Hu *et al.*, 2013); autoinhibición (Kovacs *et al.*, 2015); unión a proteínas auxiliares o de andamiaje (Zalatan *et al.*, 2012) y mecanismos alostéricos (Malmstrom *et al.*, 2015). Todos estos mecanismos muchas veces co-existen y se refuerzan para permitir la regulación precisa de las vías de señalización celulares

Otras Ser/Thr quinasas relevantes

Las familias de Ser/Thr-quinasas denominadas caseín-quinasa 1 y 2 (CK1 y CK2) se cuentan entre las primeras PQs a ser descriptas. En los últimos años se ha avanzado mucho en la comprensión de la función de las distintas isoformas de CK1, en particular estudiando las proteínas de mamíferos (Knippschild *et al.*, 2005). Se ha demostrado la regulación de la actividad de quinasa de las CK1 por una variedad de factores: estímulos extracelulares, localización subcelular de distintas isoformas, sus interacciones con varias otras proteínas y estructuras celulares, así como la autofosforilación y corte proteolítico de sus dominios regulatorios C-terminales. Las isoformas de CK1 de mamíferos fosforilan una gran diversidad

de sustratos, entre ellos proteínas regulatorias clave implicadas en el control de la diferenciación celular, la proliferación, la segregación de cromosomas y los ritmos circadianos. La desregulación y/o la aparición de formas mutadas de CK1 han demostrado estar ligadas a enfermedades neurodegenerativas y cáncer.

Los miembros de la familia de casein-quinasa 1 (CK1) de *Leishmania* representan dianas terapéuticas prometedoras. La isoforma 2 (CK1.2) ha sido identificada como una exoquinasa capaz de fosforilar proteínas del huésped, ejerciendo así una potencial acción inmunosupresora sobre las células del huésped infectadas. Por otra parte, su inhibición reduce el crecimiento de promastigotes (Allocco *et al.*, 2006).

Modelos de estudio : las MAPKs y la CK1 de Leishmania

Las MAPKs de Leishmania

Estas quinasas fueron elegidas como modelo principal de este doctorado, elección enmarcada en el contexto del consorcio interdisciplinario LEISHDRUG. Financiado por un proyecto de la Unión Europea (Framework Program 7, 2008-2012), LEISHDRUG apuntó a identificar y caracterizar proteín-quinasas de *Leishmania* asociadas a la virulencia de las formas infecciosas del parásito, explorando la potencialidad de quinasas seleccionadas como blanco para el desarrollo de medicamentos anti-leishmániasicos. La priorización de blancos para nuestros estudios cristalográficos fue realizada en colaboración con otros miembros del consorcio, especialmente con los grupos dirigidos por Cédric Notredame (Centre de Regulació Genòmica, Barcelona) y Manuela Helmer-Citterich (Università degli Studi di Roma Tor Vergata, Roma) aplicando herramientas bioinformáticas, y mediante ensayos *in vitro* y proteómicos (Gerald Spaeth, Molecular parasitology and Signaling Unit, Institut Pasteur, Paris) basados en la detección de la actividad fosfotransferasa de proteínas naturales y recombinantes de *Leishmania*. Nuestro aporte al consorcio se basó en el estudio cristalográfico de proteín-quinasas recombinantes de *Leishmania* contribuyendo a identificar potenciales moléculas inhibidoras, y optimizarlas de acuerdo a una estrategia de diseño racional, en colaboración con el grupo de Química Medicinal dirigido por el Prof. Conrad Kunick (Technische Universität Braunschweig, Alemania). En suma, los blancos seleccionados involucraron una serie de PQs de *Leishmania major*, priorizadas en función a caracteres fenotípicos (estadío específicas, y ligadas a virulencia) y caracteres distintivos de

sus secuencias (Morales et al., 2007): las MAPKs LmaMPK4, LmaMPK7 y LmaMPK10, y la caseín-quinasa LmaCK1.

Como ya se mencionó, la superfamilia de las proteín-quinasa está muy conservada en las distintas especies. En líneas generales, las PQs de parásitos muestran un 35-65% de identidad a nivel de aminoácidos, con los homólogos putativos de organismos modelos (Doerig, 2004) y la secuencia primaria permite la clasificación de dichas quinasa en las familias de PQs ya conocidas. También hay ejemplos de marcos abiertos de lectura, codificando dominios catalíticos que pueden ser identificados inequívocamente como PQs, pero que no pueden ser clasificados en ninguna de las familias conocidas. Además algunos protozoos parásitos poseen PQs que pertenecen a familias de quinasa que no existen en animales. Un ejemplo claro son las proteín-quinasa dependientes de calcio (CDPKs) que se han descrito en ciliados y apicomplexa, pero no en vertebrados.

Los estudios tradicionales de filogenia molecular, han permitido la identificación de quinasa de *Leishmania* y de Trypanosomatidae basada en similitud de secuencias. Las STPKs poseen los motivos típicos de ePK descritos previamente. Las quinasa identificadas pertenecen a las familias de AGC, CAMK, CK, STE, GMGC, entre otras. Las quinasa TK o de tipo TK, muy conocidas y estudiadas en vertebrados, miembros tanto de la familia de Tyr-quinasa citosólicas o ligadas a la membrana, no han sido identificadas en los genomas de los Trypanosomatidae (U *et al.*, 2014. Tampoco se han identificado Receptores acoplados a Proteína G, y las adenilato ciclasas son diferentes a las conocidas en mamíferos (Tagoe *et al.*, 2015). Algunos miembros de las ePKs están poco representados, como las CAMK y AGC, mientras que otros están claramente expandidos, como es el caso de las familias de quinasa STE y CMGC, estos últimos incluyendo a las MAPKs asociadas a la regulación del ciclo celular, diferenciación y respuesta celular a varios tipos de estrés (Parsons *et al.*, 2005). En los Trypanosomatidae las familias STE y CMGC, representan el 40% del quinoma, mientras que en humanos sólo representan el 20%; esta diferencia puede reflejar los requerimientos del parásito a la adaptación a los cambios del ambiente del hospedero. Tomando todos estos datos en conjunto, podemos asumir que las vías de señalización y regulación clásicas conocidas en vertebrados, están modificadas y pueden jugar roles diferentes (Figura 12).

Se han identificado varias clases de PQs putativas en el genoma de *Leishmania*, entre ellas 15 miembros de la subfamilia ERK de las MAPKs (Doerig, 2004, Doerig *et al.*, 2005, Naula et al., 2005, Wiese, 2007) y el eje MAPK, MAPKK y MAPKKK se encuentra bien conservado en estas especies. El análisis del genoma de *Leishmania major* ha revelado 179 ePKs, un número que representa aproximadamente el 2% de su genoma. Entre éstas, se han

identificado 17 MAPKs (Naula et al., 2005, Parsons et al., 2005), algunas de las cuales se presentan en la Tabla 3. Estas quinasas están conservadas en *Trypanosoma brucei* y *T. cruzi* a excepción de MPK7 y MPK8 (Wiese, 2007). El tamaño de las MAPK reportadas varía entre 300 y 1600 aminoácidos, presentado los 12 motivos típicos de las quinasas que forman el núcleo catalítico y el sitio de unión canónico al ATP GxGxxG, el motivo de Ser/Thr quinasa HRDLK, el motivo característico del bucle de activación TXY. El plegamiento tipo quinasa que habitualmente consta de unos 300 aminoácidos, en muchos casos es extendido por varias inserciones, por ejemplo en las quinasas MPK7, MPK8, MPK12 y MPK15. Las quinasas identificadas presentan la secuencia TEY, por lo que se clasifican en el mismo subgrupo de las ERK de animales, levaduras y plantas.

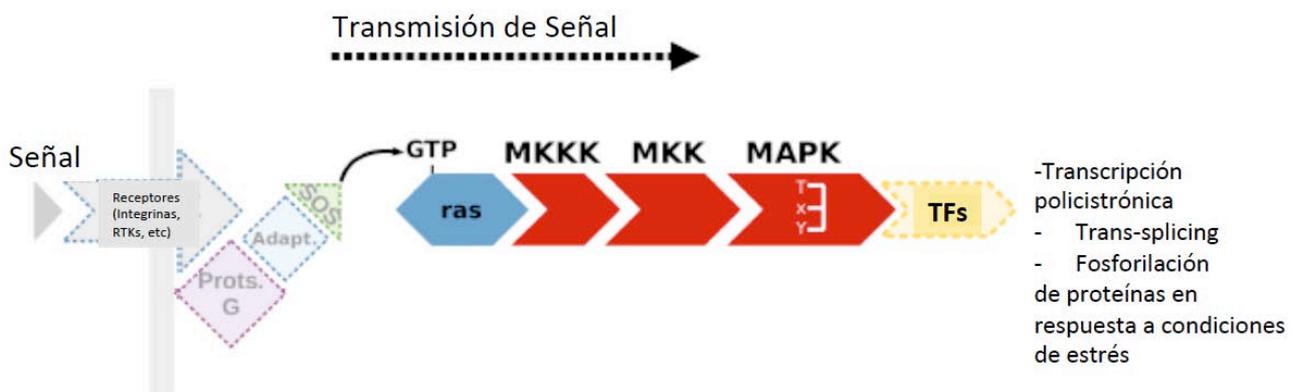


Figura 12. Esquema que resume el modelo propuesto para las vías de señalización que involucran Ser/Thr protein quinasas (STPKs) en *Leishmania*. Tomado de (Cayla, 2014).

Se han realizado distintos trabajos que permitieron conocer algunas características de estas MAPKs:

-MPK1: se demostró que es esencial en *L. mexicana* (Wiese, 1998) y estaría implicada en la virulencia del parásito, mediando la replicación de la forma amastigote (Wiese et al., 2003b Wiese et al., 2003a)

-MPK2: relacionada con la génesis del flagelo, morfogénesis celular y en el establecimiento de la infección (Wiese, 2007)

-MPK3: estaría involucrada en la elongación del flagelo, estaría bajo el control de la MKK (AJ243118) que la fosforila *in vivo* e *in vitro* (Erdmann et al., 2006).

-MPK4: es esencial para *Leishmania* (Wang *et al.*, 2005, Dacher *et al.*, 2014) y estaría involucrada en la respuesta a cambios de pH particularmente relevantes en la metacicloogénesis de promastigotes (Dacher *et al.*, 2014). La activación de MPK4 estaría catalizada por MKK5, que la fosforila en los residuos TxY del bucle de activación (John von Freyend *et al.*, 2010) Se ha encontrado a MPK4 fosforilada en el estadio amastigote (Morales *et al.*, 2007)

-MPK5: estaría involucrada en la regulación de la virulencia del parásito (Wiese, 2007). Se ha demostrado que esta quinasa abunda en amastigotes en relación a los promastigotes de *L. donovani* (Rosenzweig *et al.*, 2008)

-MPK7: es una quinasa que presenta la actividad fosfotransferasa aumentada en amastigotes axénicos (Morales *et al.*, 2007). La sobre-expresión de esta proteína genera una disminución en la virulencia del parásito (Morales *et al.*, 2010) por lo que podría estar vinculada al control del ciclo celular (Morales *et al.*, 2010, Morales *et al.*, 2007). Además parece controlar la síntesis de proteínas en el estadio amastigote (Morales *et al.*, 2010)

-MPK9: en *L. mexicana* está involucrada en el control del largo del flagelo y en la morfogénesis celular (Wiese *et al.*, 2003a)

-MPK10: es una quinasa que presenta la actividad fosfotransferasa aumentada en amastigotes axénicos (Morales *et al.*, 2007). Además, se ha detectado fosforilada en amastigotes, pudiendo regular procesos estadio específicos

-MPK11: la cantidad de esta quinasa parece ser regulada durante la diferenciación de promastigotes a amastigotes. Se detecta sólo en las fases I y II de la diferenciación y pasa a ser indetectable en las fases III y IV (Rosenzweig *et al.*, 2008).

-MPK13 y 14: jugarían un rol en el control del largo del flagelo (Bengs *et al.*, 2005, Erdmann *et al.*, 2006)

Tabla 3. MAPKs identificadas en *Trypanosomatidae* (tomado de Wiese, 2007).

Mitogen-activated protein kinases in trypanosomatids

	<i>Leishmania mexicana</i>	<i>Leishmania major</i>	<i>Leishmania infantum</i>	<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
MPK1	LmxMPK1 (former name LMPK) Z95887	LmjMPK1 LmjF36.6470	+	+	Tb10.6k15.2790	+
MPK2	LmxMPK2 AJ293280	LmjMPK2 LmjF36.0720	+	+	Tb10.70.2070	++
MPK3	LmxMPK3 AJ293281	LmjMPK3 LmjF10.0490	+	+	Tb927.8.3550	+
MPK4	LmxMPK4 AJ293282	LmjMPK4 LmjF19.1440	+	+	Tb10.61.0250	++
MPK5	LmxMPK5 AJ293283	LmjMPK5 LmjF30.2910	+	+	Tb927.6.4220	++
MPK6	LmxMPK6 AJ293284	LmjMPK6 LmjF32.3250	+	+	Tb11.01.8550	+
MPK7	LmxMPK7 AJ293285	LmjMPK7 LmjF13.1640	+	+	-	-
MPK8	LmxMPK8 AJ293286	LmjMPK8 LmjF28.0580	+	+	-	-
MPK9	LmxMPK9 (MAK) AJ293287	LmjMPK9 LmjF19.0180	+	+	Tb10.61.1850	++
MPK10	LmxMPK10 DQ308411	LmjMPK10 LmjF10.0200	+	+	Tb927.8.3770	++
MPK11	LmxMPK11 DQ026027	LmjMPK11 LmjF33.1380	+	+	Tb10.389.1730	++
MPK12	LmxMPK12 DQ026026	LmjMPK12 LmjF30.0370	+	+	Tb927.6.1780	+
MPK13	LmxMPK13 (LF4; MOK) DQ812905	LmjMPK13 (LF4) LmjF35.5010	+	+	Tb09.211.0960	++
MPK14	LmxMPK14 (MAK) DQ812906	LmjMPK14 LmjF27.0100	+	+	Tb927.3.690	++
MPK15	LmxMPK15 DQ812907	LmjMPK15 LmjF33.2070	+	+	Tb10.329.0030	+

Motif search in GeneDB with: T.Y...R.YR.PE.

+, copy of gene present but temporary ID.

++, two copies.

-, no homologue.

El trabajo de Morales y colaboradores (Morales et al., 2007), centrado en el estudio de quinasas de *Leishmania major*, permitió identificar algunas MAPKs con características de particular relevancia en el marco de este proyecto. Por ejemplo LmaMPK10, es una quinasas que presenta un patrón de fosforilación estadio-específico (sólo se fosforila en el estadio amastigote replicativo), con lo que está de alguna forma ligada a la progresión en el ciclo de vida. Por otro lado, LmaMPK7, también activada en amastigotes, es sumamente interesante dado que carece de homólogos en *Trypanosoma*, y posee un tamaño significativamente mayor a las MAPK humanas, debido a dos grandes inserciones en sitios clave de la molécula (en el sitio de unión al ATP y en el bucle de activación), por lo que puede revelarse como un blanco

de drogas ideal. En fin, LmaMPK4 es una de las MAPKs que se fosforilan específicamente cuando el parásito se diferencia de promastigote a amastigote. Como los amastigotes representan el estadio proliferativo intracelular, LmaMPK4 es un candidato interesante posiblemente involucrado en regular fenómenos relacionados a la diferenciación del parásito y la patogénesis. Además, el *knockout* génico correspondiente a LmaMPK4 demostró que MPK4 en *L. mexicana* es esencial para su supervivencia (Wang et al., 2005) y en *L. major* (Dacher et al., 2014).

La caseína quinasa 1 de Leishmania

La disponibilidad relativamente reciente del genoma de *Leishmania major*, ha permitido circunscribir el quinoma de este parásito, como dijimos antes, a 179 proteínas-quinasas (Naula et al., 2005, Parsons et al., 2005). Del quinoma de *Leishmania* la caseína-quinasa 1 (CK1, por sus siglas en inglés) parece jugar un rol central en la vida del parásito, aun cuando los procesos biológicos específicos en los que está implicada no están aun suficientemente claros.

En uno de los primeros estudios de caracterización de CK1 de *Leishmania*, se reportó que la isoforma 2 de LmaCK1 es una ecto-proteína-quinasa (ecto-PQ) constitutivamente secretada por promastigotes (Sacerdoti-Sierra & Jaffe, 1997). Allí se demuestra la especificidad de sustrato típica de CK1 (y no CK2), e inhibición por compuestos generales de PQs (por ejemplo staurosporina), así como por moléculas específicas para CKs (CKI-7). Usando péptidos específicos para CK1 o CK2 como sustratos de reacción, la isoforma 2 de LmaCK1 demostró ser una CK1.

Usando compuestos derivados de purinas 2,6,9-trisustituídas (originalmente desarrollados como inhibidores de proteínas-quinasas dependientes de ciclinas), inmovilizados en columnas, el equipo de Laurent Meijer (Rachidi *et al.*, 2014) demostró la capacidad de purificar CK1 de varios parásitos patógenos, incluyendo *Leishmania mexicana* (Knockaert *et al.*, 2000). Estas ecto-PQs son capaces de fosforilar sustratos exógenos, así como endógenos. Entre los sustratos exógenos, se ha demostrado que la isoforma 2 de LmaCK1 fosforila *in vivo* la cadena IFNAR1 del receptor de interferón (IFN) de tipo 1 (Liu *et al.*, 2009), disparando así la ubiquitinación y degradación del receptor, en consecuencia jugando un rol crucial en la regulación negativa de la señalización mediada por IFN- α/β .

La isoforma 2 de LmaCK1 fue luego clonada y expresada en forma recombinante (Allocco et al., 2006), pudiendo demostrarse que inhibidores de CK1, de las familias de pirroles tri-sustituídos e imidazopiridinas, bloquean el crecimiento del parásito en cultivo.

Usando la proteína recombinante, los autores demostraron que estos compuestos inhiben específicamente la isoforma 2 de LmaCK1. Estos estudios de inhibición fueron más tarde profundizados y refinados, con iteración “a ciegas” (sin conocer la estructura de la proteína blanco) de síntesis orgánica y análisis de relación estructura-actividad (Marhadour *et al.*, 2012). Algunos de los compuestos obtenidos demostraron hacer blanco en la isoforma 2 de LmaCK1. Los mismos exhiben buena actividad contra el crecimiento tanto de promastigotes como de amastigotes intracelulares de *Leishmania major*, asociados a baja toxicidad contra la línea celular humana HeLa.

La determinación de la estructura molecular de la isoforma 2 de LmaCK1 permitirá optimizar en forma racional las propiedades de potencia y selectividad de estos compuestos líder, manteniendo propiedades farmacológicas (cinéticas y dinámicas) adecuadas. Para ello es preciso optimizar sistemas de expresión recombinante con rendimientos suficientes, para purificar a homogeneidad la enzima y rastrear entonces condiciones de cristalogénesis que permitan abordar su estudio cristalográfico.

Hipótesis

Las proteín-quinasa de tipo eucariota de *Leishmania spp.* son proteínas que regulan importantes eventos en la sobrevivencia e infectividad de estos parásitos, regulando también eventos de patogenicidad. Las MAPKs son una familia de proteín-quinasa particularmente amplificada en el genoma de los tripanosomátidos, probablemente cumpliendo roles biológicos relevantes. Algunas de ellas podrían ser esenciales para la sobrevivencia de estos patógenos, transformándose en blancos moleculares para descubrir nuevos medicamentos antileishmánicos. La estructura 3D de dichos blancos aportará datos valiosos para la comprensión de su función y el desarrollo de compuestos líderes de drogas eficaces.

Objetivo general

Este trabajo intenta contribuir al estudio estructural de las proteín-quinasa como moléculas transductoras de señales. Con énfasis en comprender los detalles moleculares de los cambios conformacionales asociados al ciclo catalítico y/o regulatorio de estas enzimas.

Objetivos específicos

I) Expresión, purificación, cristalización y determinación de la estructura tridimensional de Ser/Thr quinasas de interés de *Leishmania major*.

II) Análisis estructural y bioquímico de la MAPK LmaMPK10 y de mutantes seleccionados: identificación de determinantes en la plasticidad y potenciales mecanismos de regulación de la actividad.

III) Análisis estructural y biofísico de LmaMPK10 en complejo con moléculas ‘activas’ (inhibidores y/o análogos de sustrato): hacia el diseño racional de drogas.

Estrategia Experimental

Los proyectos de biología estructural tienen como objetivo final conocer la estructura tridimensional de la/las proteínas de interés y así poder relacionar dicha estructura con la función o regulación de las proteínas. Para esto es necesario sortear una serie de etapas. La obtención de grandes cantidades de proteína puras y de alta calidad (homogeneidad química y conformacional), ya sea de fuentes naturales o de sistemas de expresión de proteínas recombinantes. La obtención de cristales de proteínas capaces de difractar rayos X. Y la determinación de las fases del patrón de difracción, para poder en última instancia resolver la estructura cristalográfica. Atravesar estas etapas con éxito no siempre es sencillo. Esquema de la figura 13, resume la estrategia experimental básica que empleamos en este proyecto.

Las numerosas etapas que describimos hacen que los proyectos cristalográficos originales tengan un riesgo no despreciable (Rupp, 2015), asociado a sortear los pasos limitantes propios de esta aproximación experimental, en especial dos: producción de proteína recombinante soluble en cantidades importantes, y la cristalización de la proteína en una forma adecuada para realizar experimentos de difracción de rayos X.

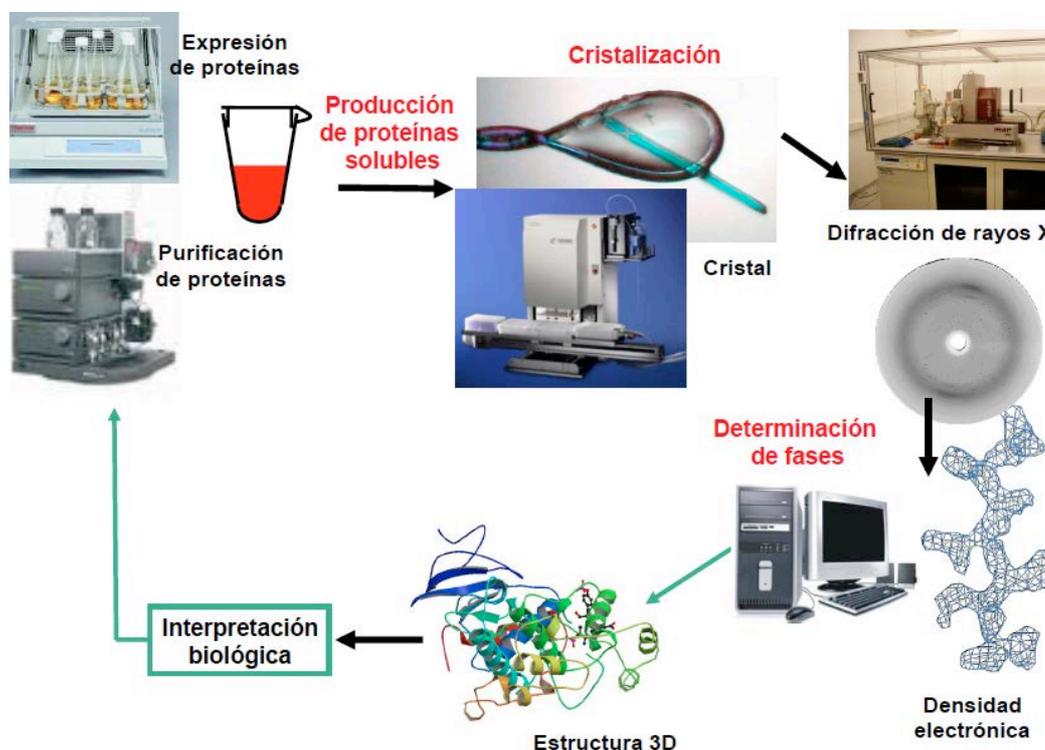


Figura 13. Esquema básico de la estrategia experimental empleada para el desarrollo de proyectos cristalográficos.

Materiales y Métodos

Subclonado de blancos seleccionados en vectores de expresión

Los genes candidatos que expresan las quinasas de interés fueron seleccionados y clonados en los laboratorios colaboradores del consorcio en vectores de clonado. Se construyeron los vectores de expresión adecuados para evaluar la expresión de dichos blancos en diferentes sistemas heterólogos. La estrategia general se basó en la fusión a la proteína recombinante de una etiqueta de seis histidinas. Esta etiqueta puede ser removida en algunos casos mediante el empleo de la proteasa TEV (*Tobacco Etch Virus*) que reconoce el sitio Glu-X-X-Tyr-X-Gln/Ser en las proteínas recombinantes producidas. La proteasa TEV fue producida y purificada en el laboratorio a partir de un clon de solubilidad mejorada que nos aportó el laboratorio del Dr Pedro Alzari (Unidad de Microbiología Estructural, Institut Pasteur, París). Alternativamente se utilizaron otros sitios de corte específicos para otras proteasas.

El subclonado se llevó a cabo mediante el diseño de oligonucleótidos específicos a ser usados como cebadores (“*primers*”) para amplificar por PCR las secuencias deseadas. El diseño de los oligonucleótidos cebadores se realizó de forma de agregar sitios de restricción que permitan amplificar la secuencia de interés entre sitios de restricción conocidos. Los sitios seleccionados están ausentes de la secuencia codificante y son compatibles con sitios de restricción de los distintos vectores de expresión elegidos. Se eligieron sitios de restricción 5’ y 3’ diferentes (subclonado orientado) que generen extremos cohesivos (aumentando la eficiencia de ligación). La secuencia codificante de los blancos seleccionados fue amplificada mediante PCR, utilizando una polimerasa de alta fidelidad (Phusion, BioLabs). El producto de PCR obtenido y el vector de expresión, fueron digeridos separadamente con las endonucleasas correspondientes, y purificados. Las construcciones recombinantes se generaron en una reacción de ligación usando T4 ADN ligasa.

Se amplificó mediante PCR la secuencia codificante de LmaMPK7, a partir del vector pGEM (cedido amablemente por el grupo de G. Spaeh). Dicha amplificación se realizó

utilizando cebadores apropiados que portan sitios de restricción de interés para el posterior clonado. El clonado inicial se realizó en el vector pQE30-TEV, tanto el producto de PCR como el vector se digireron con enzimas de restricción con extremos cohesivos compatibles y luego se ligaron ambos fragmentos en una reacción de ligación. pQE30-TEV es un vector derivado de pQE30. De forma análoga se procedió para el clonado de LmaMPK7 en otros vectores o de las secuencias codificantes de otras quinasas en otros vectores. Se procedió de forma análoga con otras construcciones que involucraron diferentes vectores de expresión o secuencias codificantes de diferentes proteínas blanco.

Como método alternativo de clonado se utilizó el clonado libre de enzimas de restricción. Para esto se diseñaron primers adecuados, y se procedió con el método descrito en (van den Ent & Lowe, 2006).

Con los siguientes blancos se procedió de forma análoga a lo descrito para LmaMPK7. La tabla resume los oligos que fueron diseñados para generar las diferentes construcciones que se construyeron durante esta tesis.

Tabla 4. Resumen de cebadores utilizados para realizar las diferentes construcciones empleadas en esta tesis.

Secuencia	Construcciones generadas			
CGCGGATCCATGCAGGCCAAGGGCGA	pQE80-PK10FL	PQE80PK10ΔC	pQE80-PK10QQQ	pQE80-PK10-S395A
ACGCGTCGACTCACGACGGGGCCGG	pQE80-PK10FL	pQE80-PK10-S395A		
ACGCGTCGACTCAGTCGTTGAAGCGCTCCA	PQE80PK10ΔC			
ACGCGTCGACTCACTGTTGCTGCGCCGCCACG	pQE80-PK10QQQ			
CATGCCATGGATGTTCAACGAAGCAGCGGT	pLEXSY-mpk7			
ACGCGTCGACATGTTCAACGAAGCAGCGGTCCCGT	pLEXSY-mpk7			
CTAGCTAGCATGAGCACCATCACCACCGCT	pLEXSY-mpk7			
CCCCTTAAGATGAGCACCATCACCACCGCT	pLEXSY-mpk7			
GGGAAGCTTTCAATGAGCACCATCACCACCGCT	pQE30TEV-Pk7	pQE80-Pk7	pQE80-TEV-PK7	
GGCGGATGATCA-ATGTTCAACGAAGCAGCGGTCCCGT	pQE30TEV-Pk7	pQE80-PK7	pQE80-TEV-PK7	
Ctttggctctcgcctcgggagatct ATGTTCAACGAAGCAGCGGTCCCGT	pT460-PK7			
GAATCATCTCAGTCAAATAAGGGGGATCC-ATGTTCAACGAAGCAGCGGTCCCGT	pT353-PK7			
GCCTTATCGTCATCGTCTTCGAAGGGCCCGAGCACCATCACCACCGCT	pT460-PK7	pT353-PK7		
CCCAAGCTTCTATTTCGTTCAATTGTGAATGGGCTTCA	pTricHis-mkp4	pET-Trx-pk4		
CGGGGTACCATGGCTCAACTCGTCCCT	pTricHis-mkp4			
CATGCCATGG ATGGCTCAACTCGTCCCT	pET-Trx-pk4			
GAAGCTCGGGTGGCTCCAGCTGCCGATCCCTATTTCGTTCAATTGTGAATGGG	pQE-80-PK4	pET28a-PK4	pETDsbC-PK4	
GGATCGGAAAACCTGTATTTTCAGGGATCCATGGCTCAACTCGTCCCT TAGC	pQE-80-PK4	pET28a-PK4	pETDsbC-PK4	
GGATCGGAAAACCTGTATTTTCAGGGATCCATGAACGTTGAGCTGCGTGTT	pQE80-CK1	pET-Trx-CK1		
TTGGCTGCAGGTGCAGCCCAAGATCCTTTTTCATTGTTGTTCCGGTGCGCCGGA	pQE80-CK1	pET-Trx-CK1		
CCCGGATCCGATGAACGTTGAGCTGCG	pET22b-CK1	pET22b-CK1Δ298	pET22b-CK1Δ285	
CCCCCTCGAGTTGTTGTTCCGGTGCGCC	pET22b-CK1			
CCCCCTCGAGAGCTTTCAGAGTCCAGTCCG	pET22b-CK1Δ298			
CCCCCTCGAGTTGCGGTACAACAGATCACGG	pET22b-CK1Δ285			
CtttggctctcgcctcgggagatctATGAACGTTGAGCTGCGTGTTGGTAATCGC	pT460-CK1	pT460-CK1Δ298	pT460-CK1Δ285	
GccttatcgtcatgctctcgaaggccctTGTTGTTCCGGTGCGCCGGAATCCTGGTTG	pT460-CK1	pT353-CK1		
GAATCATCTCAGTCAAATAAGGGGGATCCATGAACGTTGAGCTGCGTGTTGGTAATCGC	pT353-CK1	pT353-CK1Δ298	pT353-CK1Δ285	
GCCTTATCGTCATCGTCTTCGAAGGGCCACGTTTCAGAGTCCAGTCCG	pT460-CK1Δ298			
GCCTTATCGTCATCGTCTTCGAAGGGCCCTTCGCGTACAACAGATCACGG	pT460-CK1Δ285			

Vectores de expresión en sistemas procariotas

pQE30, pQE80, pET32a, pET43.1, pET28a, pET22b, pBAD-tio-TOP, pET-Trx, pTrcHis,

Para el sistema de *E. coli*, se realizaron diversas construcciones con el fin de aumentar las chances de producción de proteína soluble en cantidad suficiente (>10mg). Se utilizaron los vectores: pQE30 y pQE80 (Qiagen) que incluyen un promotor T5; pQE80 codifica además un super-represor LacI en *cis*; pTrcHis (Invitrogen), con un promotor quimérico -35/-10 Trp/Lac más débil, promoviendo niveles más bajos de expresión; pET28 y pET43 (Novagen) con promotor muy fuerte T7; en el caso de pET43, incluyendo una fusión N-terminal con la proteína Nus para aumentar la solubilidad de la proteína blanco. Los vectores recombinantes se usaron para transformar células competentes de las cepas apropiadas de *Escherichia coli*. La selección de transformantes se basó en métodos convencionales.

Vectores de expresión en el Sistema de *L. tarantolae*

pLEXSy-Ineo / pLEXSy-hyg2 (Jena Bioscience)

El vector pLEXY-Ineo, es un vector para la expresión inducible de proteínas y codifica para la resistencia al antibiótico Lesy Neo (diferente a la neomicina empleada en bacterias) , lo que facilita la selección de transfectantes.

El vector pLEXY-hyg2, es un vector para la expresión constitutiva de proteínas y codifica para la resistencia antibiótico higromicina, lo que facilita la selección de transfectantes.

Ambos vecotres pueden integrarse en el genoma de Leishmania o funcionar como episomas. Además, en ambos casos, de acuerdo a los sitios de colnado que se eligan; facilitan la expresión de proteínas recombinantes en el citoplasma de Leishmania o como proteínas de secreción.

Vectores de expresión en el sistema eucariota de células S2 de *Drosophila*

pMT/BiP/V5-His, pT460, pT353

El vector pMT/BiP/V5-His permite la expresión inducible de proteínas recombinantes de

secreción. Posee un promotor de metalotionina inducible por Sulfato de cobre o cloruro de cadmio. Genera proteínas de fusión con el péptido BiP de insectos que dirige a las proteínas hacia la vía secretoria en las células S2 de *Drosophila*. Además, las proteínas generadas tienen un fusión C-terminal al epítipo V5 y a una etiqueta de 6 histidinas lo que permite la detección y purificación de las proteínas recombinantes expresadas.

pT460 y pT353 son vectores adaptados a partir del pMT/BiP/V5-His por Thomas Krey (laboratorio de Felix Ray- I.Pasteur Paris). En pT460 se reemplazó las etiquetas C-terminales (V5 e His) por un etiqueta de estreptatina. pT353, es adaptado de pT460, se eliminó la fusión al péptido BiP, lo que genera proteínas recombinantes expresadas en el citosol celular.

Todos estos vectores requieren de ser co-transfectados con un vector de selección, en este caso se usaron pCoBlast y pCoPuro que otorgan resistencia a la Blastidina y Puomicina respectivamente.

Cepas bacterianas de *E. coli* para la amplificación de plásmidos

Las cepas se utilizaron con el fin de amplificar plásmidos con diferentes objetivos

Escherichia coli K12 XL1 Blue (Agilent/Stratagene- 200236)

Escherichia coli TOP10F' (Invitrogen-C3030)

Escherichia coli –dam –dcm GM2163 (Fermentas M0099)

Cepas bacterianas para la expresión de proteínas recombinantes

TOP10 F' (Invitrogen-C3030)

BL21(DE3) pLysS (Invitrogen -C6060)

HMS 174 (DE3) (Novagen- 69456)

Rosetta Blue (DE3) pLysS (Novagen-70956)

Rosetta-gami (DE3) pLyS (Novagen 70432)

C41 (DE3) (Sigma- CMC0017)

M15 (Qiagen)

Shuffle (NEB- C3026H)

Secuenciación

Todas las construcciones realizadas fueron confirmadas en última instancia por secuenciado en el servicio de la Unidad de Biología molecular del Institut Pasteur de Montevideo. Se utilizaron cebadores específicos de los vectores o de ser necesario se diseñaron cebadores internos de las secuencias clonadas cuando el largo de las mismas así lo requirió.

Análisis de secuencias de ADN

Las secuencias fueron analizadas en el programa BioEdit (Hall, 1999). Para los análisis de similitud e identificación de secuencias se utilizaron los algoritmos de BLAST que están disponibles en la base de datos del GeneBank.

Cultivo de bacterias

Los cultivos líquidos de bacterias se realizaron en medio LB a 37°C con agitación salvo en casos indicados donde se reemplazó el medio de cultivo por TB (Terrific Broth) y se varió la temperatura de cultivo entre 20 °C y 37 °C según se indicó. En el caso de las células transformadas con plásmidos portadores de resistencia se agregó el antibiótico adecuado en el medio de cultivo.

Las bacterias también se cultivaron en medio semisólido en placas de Petri con LB-agar con o sin antibiótico según el caso.

Para la conservación a largo plazo, Las cepas bacterianas utilizadas se almacenaron en LB-glicerol 25 %, a -80 °C.

Preparación de células competentes y transformación

Se prepararon células competentes mediante el protocolo de cloruro de calcio de Ausubel (1989). La transformación se realizó descongelando las bacterias (conservadas a -80°C) en hielo. Se incubaron 10-30 minutos con 1 µL de plásmido (250-500 ng/µL) en hielo. Posteriormente se realiza un shock térmico de 2 minutos a 42 °C y luego otros 2 minutos en

hielo. Se agregaron 500-1000 μ L de LB sin antibiótico, y se incubaron a 37 °C durante 1 hora para permitir su recuperación. Se plaquearon \sim 100 μ L en medio selectivo LB-Agar+antibiótico. Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C.

Cultivo y transfección de células S2 de Drosophila

Las células S2 de Drosophila (Invitrogen) fueron cultivadas en medio de cultivo Schneider (Gibco) con el agregado de 10% de suero fetal bovino (SFB) y Penicilina/Estreptomicina e incubadas a 28 °C. Los pasajes se realizaron por dilución del cultivo cada 2-3 días. La transfección de las células se realizó con el reactivo Effectine (Qiagen) según recomendaciones del fabricante. Los clones se seleccionaron durante 3 semanas en medio de cultivo Schneider suplementado con 10 % de SFB. Posteriormente las células fueron adaptadas al cultivo en ausencia de SFB; en medio de cultivo Xpress (Lonza).

Purificación de ADN plasmídico

El ADN plasmídico fue aislado de acuerdo al protocolo de Ausubel (1989) con algunas modificaciones, en el cual las bacterias se someten a lisis alcalina. Las células, provenientes de un cultivo ON de 3-5 mL, se precipitaron mediante centrifugación a 3000 rpm 2 min en tubos Eppendorf. Se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 300 μ L de Solución I y ARNasa y se mezclaron por agitación y se incuban 5 minutos a TA. Se agregaron 300 μ L de Solución II y se invirtió el tubo 5 veces. Luego se agregaron 300 μ L de solución III fría y se agitó por inversión. Se centrifugó la mezcla a 12000 g, 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y agregó 0.7 volúmenes de isopropanol. Se centrifugó a 12000 g 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó con 1mL de etanol 70 % frío. Se eliminó el sobrenadante y se secó el precipitado al aire. Por último se resuspendió en 50 μ L de agua miliQ.

Para los ensayos de transfección de células eucariotas que requieren ADN plasmídico en grandes cantidades y libre de endotoxinas bacterianas se partió de un cultivo de 50 mL de LB y se utilizó el kit Midi Prep (GE) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Cuantificación de los ácidos nucleicos

La concentración y calidad de los ácidos nucleicos se determinó por espectrofotometría a partir de la determinación de absorbancia a 260 nm (1 unidad de absorbancia \approx 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ADN). Se utilizó un Nanodrop (Thermo Scientific) que permite realizar un espectro de absorción y obtener la Abs 260nm de la muestra así como la relación de Abs 260/Abs 280.

Electroforesis de ácidos nucleicos

La calidad y el tamaño de los plásmidos se analizaron en electroforesis en geles de agarosa al 0,8-1% en buffer TAE 1X (0.04 M Tris-acético, 1mM de EDTA). Los ácidos nucleicos se visualizaron con bromuro de etidio, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las muestras se sembraron con buffer de carga 1X, (Fermentas) y se utilizó marcador de peso molecular 1 Kb, fermentas.

Digestión de ADN plasmídico con enzimas de restricción

10 μg de plásmido se digirieron en 50 μL de reacción con la enzima de restricción adecuada según indicaciones del proveedor (New England Biolabs, Roche o Invitrogen). La mezcla se incubó a 37°C durante al menos 1 hora o a la temperatura recomendada en termomixer (Eppendorff). Si fue necesario, luego de terminada la reacción las ER se inactivan a 65°C durante 10 min. La reacción se verificó mediante electroforesis de agarosa 0.8%. De ser necesario, los productos de la digestión se purificaron del gel mediante el kit de GE.

Ligación de fragmentos de ADN

Los subclonados realizados con enzimas de restricción requirieron de una reacción de ligación. Los fragmentos de ADN a ser ligados, con extremos cohesivos se incubaron con la T4 ADN ligasa en una reacción de 20 μL (Promega) según recomendaciones del proveedor.

Mutagénesis sitio-dirigida

Se utilizó el método basado en extensión de oligonucleótidos mutagénicos por PCR (disminuyendo riesgos de errores de lectura), utilizando la enzima de alta fidelidad Phusion y corte de ADN parental usando la enzima DpnI (que reconoce ADN parental metilado, purificado de *E. coli*). Se realizó una reacción de amplificación utilizando la Taq Phusion de alta fidelidad. Los mutantes de LmaMPK10 se realizaron utilizando los oligos de la siguiente Tabla que contienen los cambios de base/es necesarios para generar los mutantes. Los productos generados se transforman en células de *E.coli* competentes para su posterior análisis.

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados para la obtención de mutantes puntuales de LmaMPK10 mediante mutagénesis sitio dirigida.

Nombre	Secuencia
Asn 178 Gly 1	/5 Phos/ CCATCTGCGACTTCGGCCTCGCGCGCA
Asn 178 Gly 2	/5 Phos/TGATGTCGTTGTTGTcgcctaaca
Ser 30 Gly 1	/5 Phos/GCAGCGCTTTATCGGCAGTGGCAGCTA
Ser 30 Gly 2	/5 Phos/ACCGTGTAGGGAGACTGCAtcgcgt
Phe 210Tyr 1	/5 Phos/GCAGTTCAAGGGCTATACGAAGCTGGTGGGA
Phe 210Tyr 2	/5 Phos/ATGACCAGCTCCGGCGCA
His 160Lys 1	/5 Phos/CACCGCGACCTGAAGCCCGGCAACATCT
His 160Lys 2	/5 Phos/AACGACGCCGGCTTCGTG
His195 Thr 1	/5 Phos/ACGCACTACGTGACGACCCGCTGGTACCGT
His195 Thr 2	/5 Phos/CTTGTTTCGCATCCGCTgtgtcct
Lys189Met 1	/5 Phos/AGCGGATGCGAACATGACGCACTACGTG
Lys189Met 2	/5 Phos/GTGTCTCGCGCGCAggt

PCR- Reacción en cadena de la polimerasa

El ADN fue amplificado por PCR utilizando 10 ng de ADN plasmídico como molde. Se utilizó el kit de Taq Phusion, una Taq de alta fidelidad. Brevemente, se mezclan los componentes de la reacción: oligonucleótidos sentido y antisentido, buffer 1X que contiene MgCl₂, 25 µM de dNTPs, 10ng de ADN y 1 unidad de polimerasa en un volumen final de 50 µL. Los ciclos de amplificación se realizaron en termociclador. Generalmente se incubaba a 95°C durante 5 minutos, seguido por 35 ciclos de (95°C de desnaturalización 30 s, 65°C de hibridación 30 s y 72°C de extensión 2 m), finalmente se realiza una extensión final de 7 minutos a 72 °C. Los ciclos de amplificación fueron adaptados según nuestras necesidades,

tamaño del fragmento a amplificar o aplicación.

Expresión de quinasas recombinantes en *E. coli* y purificación para posteriores estudios estructurales

Las células de *E. coli* transformadas con diferentes vectores de expresión se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB) suplementado con ampicilina (100 µg / ml; o el antibiótico adecuado) hasta una DO₆₀₀ de 0,8. La temperatura se varió de 20 a 37° C según se indica en cada ensayo. Los cultivos fueron inducidos con el inductor apropiado (en general isopropiltiogalactósido IPTG, o arabinosa en el caso de pBAD) durante 4 horas u ON, usando protocolos de optimización de sobre-expresión convencionales (rastreo de fase de crecimiento óptima, tiempo de inducción, temperatura y concentración de inductor óptimos).

Se utilizaron incubadores orbitales para realizar estas operaciones. Al cabo de la inducción, las células se cosecharon por centrifugación a 5000rpm y 4°C, y se lisaron con métodos estándar (lisis química –detergentes y lisozima- y física-sonicación). Brevemente, las células se aislaron por centrifugación a 2000 g. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 50 mM Tris.HCl pH 8.5, 500 mM NaCl, suplementado con un cocktail de inhibidores de proteasa libre de EDTA (Roche, Indianapolis, IN, EE.UU.). La suspensión se incubó con lisozima (1mg/mL) por 30 minutos y el ADN fue degradado con 10mM MgCl₂ y tratamiento con DNasa. Se realizaron ciclos de sonicado (cinco pulsos de 30") utilizando una micropunta.

Se obtuvieron sobrenadantes solubles clarificados por centrifugación a 15000 g durante 30 minutos. La fracción insoluble se recuperó del pellet mediante solubilización en 8M urea para su posterior análisis.

Expresión de quinasas recombinantes en células de *Drosophila*

Las células Schneider 2 de *Drosophila* se cultivaron a 28 °C en medio Schneider suplementado con 10 % de suero fetal bovino. Se co- transfectaron con los plásmidos de expresión (pMT (invitrogen)) y de selección (pCoBlast o pCoPuro) adecuados, usando el reactivo de transfección Effectene (Qiagen). Se seleccionaron luego los clones de interés durante 2-3 semanas con el antibiótico blastidina o puromicina según el caso. Las células

transfectadas se adaptaron progresivamente durante al menos 3 semanas al medio Xpress (Lonza), que permite el cultivo en ausencia de suero fetal bovino. La inducción de las proteínas recombinantes se realizó con CdCl_2 o CuCl_2 según recomendaciones del proveedor. La expresión de la proteína deseada se evaluó por Western blot, SDS-PAGE y espectrometría de masa. Las proteínas recombinantes fueron secretadas al medio de cultivo y al contener una etiqueta de histidinas o “strep-tag” facilitó su posterior purificación.

Purificación de proteínas recombinantes

Los sobrenadantes solubles clarificados constituyeron la fuente principal de proteínas blanco a ser purificadas por métodos de cromatografía líquida. Para ello contamos con equipos de media y alta presión (Akta Prime® y Purifier® - General Electric Life Sciences) y un set de columnas con diversa química de superficie, porosidad y diámetro de partículas. Dado que las construcciones empleadas generaron en su mayoría proteínas recombinantes con etiquetas de histidinas, la primer etapa de purificación consistió en una afinidad con níquel quelado a ácido iminodiacético inmovilizado, para unir la etiqueta de histidinas (IMAC). Además se dispuso de columnas (General Electric Life Sciences) de gel filtración analíticas y preparativas (Superdex 75 y 200), de intercambio iónico (MonoQ y MonoS, ResourceQ 15 y ResourceS 15) y de hidrofobicidad así como una columna de streptatina (de afinidad al strep-tag).

Brevemente, la fracción soluble de extractos de proteínas totales se sometió a cromatografía de afinidad Ni^{2+} (HisTrap, GE Healthcare Life Sciences, Waukesha, WI, EE.UU.), después de la adición de 20 mM imidazol. Se recuperó la fracción no unida para su posterior análisis. Las proteínas retenidas en la columna se eluyeron con un gradiente lineal 4 %-100 % de buffer (50 mM Tris pH 8.5, 500 mM NaCl y 500 mM imidazol) en 15 volúmenes de columna. Se colectaron fracciones de a 1mL y se agruparon las fracciones relevantes. Con el fin de remover la etiqueta de histidinas en las proteínas recombinantes portadoras del sitio TEV, se incubaron con la proteasa TEV mientras se dializó durante la noche contra 50 mM Tris pH 8.5 y 500 mM NaCl a 4 °C. Se realizó una segunda purificación en columna de Ni^{2+} dónde se recogió el “flowthrough” flujo a través y se sometió a cromatografía de exclusión molecular con un Superdex 26/60 75 prep (GE Healthcare Ciencias de la Vida) previamente equilibrada con

20mM Tris pH 8.5 y 150 mM NaCl. Las fracciones del pico de elución se agruparon, se concentró de ser posible hasta 10 mg/ml, y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Análisis de proteínas por electroforesis

Las proteínas se resolvieron por electroforesis en gel de poliacrilamida (10-15 %) con SDS. Las muestras se mezclaron con partes iguales de buffer de carga para proteínas 2X (62.5 mM Tris pH 6.8; 1.25% SDS; 12.5% glicerol; 12.5% β-mercaptoetanol y 0.05 % azul de bromofenol) y se calentaron a 100 °C durante 5 minutos. El gel se corrió en buffer de corrida 1X (25 mM Tris pH 8.3, 200 mM Glicina, 0.1 % SDS) a 25 mA por gel. Para la estimación del tamaño molecular se utilizó un marcador de peso molecular comercial indicado en cada caso. Los geles se tiñeron con una solución de azul de Coomassie (0.25 % de azul de Coomassie; 10 % ácido acético, 90 % etanol) y se decoloraron en una solución de decoloración (10 % ácido acético; 50 % etanol)

Western blot

Los geles se transfirieron a una membrana Hybond C (Amersham) del mismo tamaño del gel. Se siguió con el protocolo de Ausubel utilizando un dispositivo de transferencia húmedo y la solución de transferencia (25 mM Tris-HCl pH 8.3; 150 mM Glicina, 0.037 % SDS, 20 % etanol). La transferencia se realizó a 100V durante 1 hora o a 25 V ON. Las membranas, una vez transferidas, se bloquearon en PBS, 0.1 % Tween, 3 % albúmina, durante 60 minutos a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C.

Luego se incubaron en el anticuerpo correspondiente, según se indique durante 60 minutos a temperatura ambiente con agitación. Se realizaron tres lavados de 5 minutos en PBS, 0.1 % Tween 20. Posteriormente, las membranas se incubaron en una solución de anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa HRP (dilución 1:10000) o anti IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina (1:30000) durante 60 minutos a temperatura ambiente, con agitación y en oscuridad. Se realizaron al menos tres lavados de 5 minutos cada uno. La detección se realizó utilizando un sistema quimioluminiscente (Pierce) o el sustrato NBT/BCIP (Sigma).

Ensayos biofísicos y funcionales en solución

Las proteínas solubles fueron concentradas de acuerdo a la necesidad, usando ultrafiltración (dispositivos Vivaspín de distintos puntos de corte, Sigma). La determinación de la concentración de proteína se efectuó en general por absorbancia a 280nm en un espectrofotómetro (Varian), eventualmente se recurrió a otros métodos basados en colorimetría con reactivos específicos (Bradford o ácido bicinónico) de acuerdo a protocolos estándar (Coligan & Wiley InterScience (Online service)).

Como control de calidad previos a los ensayos de cristalización se realizó dispersión de luz visible con un instrumento disponible en nuestro Instituto (Zetasizer®, Malvern Instruments). Se buscaron condiciones en las que la proteína se comportara como una especie homogénea monodispersa (<20 % índice de polidispersión en modo dinámico). Para mejorar este aspecto, de ser necesario se usó cromatografía preparativa de exclusión por tamaño como última etapa de purificación.

La actividad quinasas se evaluó por distintos métodos. En primer lugar se realizó un estudio bioquímico analítico, empleando técnicas de electroforesis bidimensional (2D) y análisis por LC-masas. Para esto, LmaMPK10 pura, fue incubada con o sin ATP, en presencia de extractos de Leishmania o con fosfatasa alcalina. Este tipo de aproximación nos permitió identificar isoformas de LmaMPK10, y caracterizar péptidos fosforilados de esta quinasa.

Geles bidimensionales

20 µg de muestra se purifica por el kit 2D CleanUp (GE Healthcare) y se resuspende en 125 µL del buffer de rehidratación (7 M urea, 2 M tiourea, 2 % CHAPS, 0.5 % IPG Buffer 3-11 NL, 0.002 % azul de bromofenol) + 17 mM DTT. Luego se carga en tiras de isoelectroenfoque DryStrip 4-7; 7 cm (GE Healthcare) por rehidratación pasiva durante toda la noche a temperatura ambiente. Programa de IEF: 300 V, constante, 30 min; 1000 V, en gradiente, 30 min; 5000 V, en gradiente, 90 min; 5000 V, constante, hasta 2 kVh. Luego de la primer dimensión, las tiras fueron incubadas en Buffer de equilibración (6 M urea, 75 mM Tris pH 8.8, 29.3 % glicerol, 2 % SDS, 0.002 % azul de bromofenol) + DTT (64.83 mM) durante 15 min a temperatura ambiente con agitación. Y posteriormente en Buffer de equilibración (urea 6M, 75 mM Tris pH 8,8, glicerol 29,3 %, SDS 2 %, azul de bromofenol 0,002 %) + Iodoacetamida (IAA) (135.16 mM) 15 min a temperatura ambiente con agitación. La segunda dimensión consistió en un SDS-PAGE al 10 % convencional donde se corrió un

marcador de PM (Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis). El gel se tiñó con azul de Coomassie.

Actividad enzimática en ensayo acoplado

Desde un segundo abordaje bioquímico, se intentó caracterizar los parámetros cinéticos de LmaMPK10 mediante el empleo de un ensayo acoplado (Lindsley, 2001). Los ensayos enzimáticos fueron usados como medida de funcionalidad, en especial luego de generar mutantes sitio-dirigidos. Para ello se puso a punto un método estándar de medición de actividad de Ser/Thr-quinasa. Brevemente, la producción de ADP, generada por la reacción de fosforilación, será acoplada a una segunda reacción, la oxidación de NADH por la piruvato quinasa (Sigma) en presencia de fosfoenolpiruvato y lactato deshidrogenasa (Sigma). El sistema acoplado se utilizó en exceso. La oxidación del NADH fue seguida con un espectrofotómetro Cary® UV-visible y monitoreada a 340 nm a 25 °C. La reacción de autofosforilación fue seguida de forma continua en un volumen final de 200 µl en 50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ (o 10 mM MnCl₂ o sin agregado de catión divalente), 1 mM DTT, 3 mM fosfoenolpiruvato, 240 mM NADH, 5 unidades de piruvato quinasa, 23 unidades de lactato deshidrogenasa, 5 mM ATP, 20 µM β-glicerofosfato, 10 µM ortovanadato y LmaMPK10 o LmaMPK10ΔC a concentraciones que variaron entre 10 y 30 µM. Las reacciones se monitorearon durante una hora. También se ensayó la fosforilación de un sustrato fosforilable, la β-caseína (Sigma) que se utilizó entre 10-50 µM. El ensayo fue calibrado en idénticas condiciones usando 1 µM de la Ser/Thr PK PknB de *Mycobacterium tuberculosis* y 8 µM de su sustrato GarA (Villarino et al., 2005), como control positivo (cedidos gentilmente por la Dra. Rosario Durán).

Medida de actividad en IVKA (in vitro kinase assay)

Alternativamente se midió la capacidad de auto-fosforilarse o de fosforilar sustratos genéricos de las quinastas en ensayos de actividad a punto final en presencia de ATP marcado radiactivamente. La mezcla de reacción se realizó en un volumen total de 30 µl que contienen 500 ng de LmaMPK10ΔC recombinante purificada o LmaMPK10ΔC-Lys51Ala en 50 mM HEPES pH 7.4, 10 mM MnCl₂, 1 mM DTT, 20 mM β-glicerofosfato, 0.1 mM NaVO₄ y ATP (20 mM ATP + 5 mCi [³²P]ATP). La reacción se incubó 20 min a 30 °C bajo constante

agitación y se detuvo por la adición de 6 μl de buffer de carga de proteínas. La reacción mezcla se separó por SDS-PAGE. El gel se tiñó con Coomassie, se secó, y se sometió a autorradiografía.

Titulación isotérmica por calorimetría

La asociación de LmaMPK10 y LmaMPK10 ΔC a SB203580 se cuantificó usando una titulación isotérmica por calorimetría de alta precisión VP-ITC (MicroCal Inc., Piscataway, NJ, EE.UU.). LmaMPK10 (34 μM) o LmaMPK10 ΔC (3 μM) puras, se diluyeron en 20 mM Tris (pH 8.5), 50 mM NaCl, y 0.8 % DMSO. El SB203580 se diluyó en el mismo buffer y utilizado a 450 μM para LmaMPK10 o a 45 μM para LmaMPK10 ΔC . Las soluciones fueron desgaseadas, bajo ligero vacío a 30 °C. El montaje experimental consistió en inyecciones repetidas de SB203580 en la celda calorimétrica conteniendo LmaMPK10 o LmaMPK10 ΔC . Los experimentos se realizaron a 30 °C con una inyección previa de 1 μl , seguido de 29 inyecciones de 10 μl separadas por 360 s y con una aguja con rotación 394 rpm. El procesamiento de datos que incluyó la determinación del calor de dilución, corrección de línea de base, normalización y ajuste de las isotérmicas de unión se realizó en el software Origin 7. Previo al análisis de las isotermas de unión se realizó la corrección de los datos por el calor de dilución tanto del ligando como de la macromolécula. El ajuste de la línea de base se realizó de forma manual. Las señales del calor fueron integradas y normalizadas por la cantidad de ligando inyectado. Las constantes de asociación K_a ($K_a=1/K_d$), la estequiometría molar (N) y la entalpía de unión (ΔH) se determinaron luego de obtener las curvas ajustadas con un modelo de interacción de “un tipo de sitio”. La energía libre de Gibbs y la entropía de unión se calcularon de las ecuaciones $\Delta G = -RT\ln K_a$ y $\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/T$ respectivamente, donde R es la constante general de los gases y T la temperatura absoluta en Kelvin.

Ensayo de desplazamiento térmico fluorescencia (TSA-Thermal Shift Assay)

La desnaturalización de LmaMPK10 se monitoreó en el equipo de PCR-en tiempo real LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Meylan 38242, Francia), mediante el seguimiento del aumento de la fluorescencia del colorante SYPRO® Orange Molecular Probes, Life Technologies SAS, 91190 Saint Aubin, France). SYPRO® Orange se vende a una solución 5000X LmaMPK10 y LmaMPK10 ΔC recombinantes se prepararon en 50 mM Hepes pH 7.5,

1 mM DTT, 10 mM MnCl₂ y la concentración apropiada de ATP o SB203580 en un volumen final de reacción de 10 µL y se incubó en pocillos de placas FrameStar® blancas de 384 pocillos (4titude, 92220 Bagneux, Francia). Se realizaron experimentos preliminares para ajustar las concentraciones óptimas de SYPRO Orange y LmaMPK10, que resultaron ser 5X y 2.5 mM, respectivamente (datos no mostrados). Temperatura inicial se fijó en 20 °C durante 15 segundos y la temperatura final fue 95 °C, llegando en un gradiente con una tasa de 0.06 °C por segundo. La intensidad de fluorescencia se midió en modo continuo con 10 adquisiciones por °C, las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 483 nm y 610 nm respectivamente. Se utilizó el módulo "Tm calling analysis" del software básico Roche LC480 para trazar intensidades de fluorescencia en función de la temperatura. La temperatura de transición (T_m) entre los estados plegados y desplegados se obtiene de la derivada de la curva de fluorescencia en función de la temperatura de desnaturalización.

Obtención de cristales

La búsqueda de condiciones de cristalogénesis fue asistida con la estación robótica de dispensado de nanogotas disponible en el Institut Pasteur de Montevideo. Se rastrearon condiciones de cristalogénesis hasta obtener cristales únicos, de calidad adecuada para hacer experimentos de difracción de rayos X. La Unidad de Cristalogénesis dispone de un robot de cristalización Honeybee963® (Digilab) en una sala de cristalización a temperatura controlada (20±1°C). Dicho robot permitió el rastreo simultáneo de 96 condiciones independientes por placa, y de hasta tres proteínas diferentes por condición, en gota sentada en experimentos de difusión de vapor al equilibrio. Se utilizaron kits comerciales estándar, principalmente basados en variación de polietilenglicoles y de sulfato de amonio como agentes precipitantes (Suite de Screenings JCSG Core [Qiagen]; y Crystal Screen [Hampton Research]), disponibles en el laboratorio. Los kits se presentan en formato de placas de 96 pocillos profundos (CrystalQuick de 96 pocillos, Greiner Bio-One), listos para ser utilizados directamente por el robot, de modo que los tiempos de preparación por placa se reducen a 2-3 min / placa, sin problemas de evaporación en gotas de 100-300nl. La miniaturización que logra el instrumento dispensando gotas de muy bajo volumen, reduce en un orden de magnitud la cantidad de proteína requerida si se compara con aproximaciones manuales clásicas, por lo que necesitamos típicamente soluciones con 1-5 mg de proteína pura para ser capaces de lanzar ensayos suficientemente amplios (aproximadamente 400 condiciones

independientes por rastreo).

La visualización de las placas de robot se aseguró con un sistema semiautomático con cámara y microscopio con platina robotizada (Cryscam®, Art Robbins) y la manipulación de cristales fue asistida con microscopios estereoscópicos (SZX7 magnificación máxima 110X; y un SZX16 230X trinocular, con cámara digital para captura de imágenes) capaces de analizar luz polarizada para evaluar preliminarmente la calidad de los cristales en términos de birrefringencia. El laboratorio cuenta así mismo con todo el instrumental necesario para hacer criocristalografía, congelando en nitrógeno líquido los cristales seleccionados, lo que mejora significativamente la calidad de los datos y minimiza los fenómenos de daño por irradiación típicos en difracción de rayos X a temperatura ambiente.

Una vez que se encontraron condiciones iniciales de cristalización, se procedió a optimizar las mismas de forma manual por difusión de vapor en gota colgante, usando gotas más grandes (2 microlitros, en placas VDX® Hampton Research, Aliso Viejo, CA, EE.UU), lo que generalmente redundaba en cristales de mayor volumen. Se afinaron las condiciones siguiendo protocolos convencionales de rastreo fino de variaciones en pH, precipitante y sales. Eventualmente se repitieron las condiciones en placas que se incubaron a 4°C. Por ejemplo, para LmaMPK10ΔC se utilizaron 2 μL de la solución de proteína (10 mg/mL) y 2 μL de la solución de reservorio conteniendo 0.1 M HEPES pH 7.5, 12 % PEG 4000, 5 % glicerol, y 5 % isopropanol. Los cristales de apo-LmaMPK10ΔC aparecieron después de 4 días.

Cristalización y caracterización estructural de complejos relevantes de quinasas de Leishmania con moléculas ‘activas’ (inhibidores, análogos de sustrato, etc), así como de mutantes sitio-dirigidos basados en la estructura

Se intentó la cristalización de las quinasas blanco cristalizadas en complejo con moléculas activas. Con este término se engloba de manera general un conjunto amplio de moléculas que se unan y, eventualmente, modifiquen, a las quinasas blanco. Entre ellas hay algunas que son candidatos naturales ATP y derivados, incluyendo análogos no hidrolizables (AMP-PCP, AMP-PNP) y otros inhibidores conocidos para Ser/Thr PQs derivados del nucleótido. Para obtener los complejos binarios, se procedió de la manera clásica, primero intentando la

incorporación de la molécula pequeña por simple difusión en el licor madre con los cristales ya formados (“soaking”). Si el empaquetamiento cristalino obstaculizara la unión al sitio específico, o si esta unión disparara un cambio conformacional mayor capaz de destruir la red cristalina, se procederá alternativamente a generar el complejo en solución y luego co-cristalizar esta especie. En ocasiones la co-cristalización puede requerir una nueva etapa de rastreo de condiciones de cristalogénesis.

En los ensayos de co-cristalización se incubaron soluciones de proteína en presencia de 5mM de ligandos (ATP, ADP, AMP-PCP o SB203580) y 10 mM MgCl₂ ó MnCl₂.

Los ensayos de “soaking”, se realizaron embebiendo cristales LmaMPK10ΔC previamente preformados en licor madre que contiene 4 mM SB203580 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.).

Difracción de rayos X

Se realizaron experimentos de difracción de rayos X sobre cristales únicos. Se realizó la crioprotección de cristales en el mismo licor madre pero agregando 20-25 % final de glicerol, y se congelaron en N₂ líquido.

La Unidad de Cristalografía de Proteínas está dotada de un equipo para medir difracción de cristales únicos de macromoléculas. Contando con un ánodo rotatorio de cobre con un diseño de microfente (70 micras) Rigaku MicroMax-007HF®. El haz primario se focaliza y monocromatiza con espejos en multicapa confocales Varimax optimizados para maximizar el flujo (Varimax-HF®, Osmic) en la muestra. Los cristales congelados se montaron en el goniómetro (geometría de un solo ángulo de rotación phi) incluido en la mesa del detector Mar345dtb® (Mar Research). El detector Mar345 es una placa de imagen de 345 mm de diámetro efectivo máximo (pixels de 100 o de 150 micras). El goniómetro dispone de un motor 2θ que nos permite llegar a una resolución máxima de 1.2 Å de colección. Se cuenta asimismo con un criosistema (Cryosystems Series 700®, Oxford Cryosystems) que mantiene el cristal bajo un flujo lineal de nitrógeno a 100°K. El nitrógeno líquido necesario para alimentar este sistema es generado *in situ* gracias a un generador de nitrógeno líquido a partir del aire atmosférico (LN-40®, Rigaku).

Luego de una caracterización preliminar para determinar los parámetros de celda, grupo cristalino puntual y calidad de la difracción, los cristales que difractaron más allá de 3.5 Å se

seleccionaron para coleccionar juegos completos de datos, siguiendo estrategias de colecta adecuadas de acuerdo la simetría y características de celda.

Procesamiento y determinación de estructuras tridimensionales

Los datos colectados fueron procesados con el software instalado en la Unidad (MOSFLM (Powell, 1999) y Scala (Collaborative Computational Número del Proyecto 4, 1994)). El mantenimiento del parque informático con el que cuenta la Unidad (5 estaciones de trabajo bajo Linux CentOS5, 4Gb RAM, tarjetas gráficas Nvidia o ATI de 256Mb, biprocesadores Pentium 3GHz) fue mantenido regularmente con el apoyo del Servicio Central de Informática del IPMont. Se dispuso de una gran variedad de paquetes de software que permiten el flujo de información a lo largo de todo el proceso computacional de determinación, refinamiento y validación de estructuras tridimensionales, así como el trabajo de visualización en 3D para la interpretación de mapas de densidad electrónica y construcción de modelo.

Para la determinación de las fases se utilizó el método de reemplazo molecular implementado en el programa AMoRe (Trapani & Navaza, 2008) usando modelos de PQs suficientemente relacionadas como sondas de búsqueda. En el caso de LmaMPK10ΔC se utilizó como sonda de búsqueda la estructura de p38α humana (PDB ID código 3HV3). La construcción de modelos para datos con resolución mejor a 2.3-2.5 Å se realizó en forma automatizada con el programa Arp/wArp (Morris *et al.*, 2003). De lo contrario, el trazado se realizó de forma manual, usando COOT (Emsley & Cowtan, 2004). El refinamiento de los modelos se realizó por métodos de máxima verosimilitud, tal como se implementa en los programas REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 1997), PHENIX.REFINE (Adams *et al.*, 2002) o BUSTER (Smart *et al.*, 2012). Se realizaron ciclos de refinamiento en el espacio recíproco alternados con reconstrucción manual y validación (Emsley & Cowtan, 2004). La validación se llevó adelante en forma iterativa durante en el refinamiento, usando las herramientas incluidas en COOT y con el programa PROCHECK (Collaborative Computational Project Number 4, 1994). Las estructuras validadas fueron depositadas en la PDB. La visualización, análisis, y la obtención de figuras se realizó con PyMol (Delano, 2002; The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.4 Schrödinger, LLC), y los mapas de potencial electrostático se calcularon con el programa APBS (Baker *et al.*, 2001).

Alineamientos Múltiples de Secuencia y Estructural

Los ortólogos de LmaMPK10 fueron identificados por Psi-blast. El alineamiento múltiple de secuencias se llevó a cabo usando T-Coffee (Notredame *et al.*, 2000) y ClustalX (Larkin *et al.*, 2007). La estructura libre de LmaMPK10 (PDB 3PG1) se utilizó para el alineamiento estructural con DALI (Holm & Rosenstrom, 2010). Los alineamientos se depuraron manualmente con Jalview, tomando en cuenta información estructural y se colorearon según el código Clustal.

Análisis estructural: caracterización de elementos estructurales determinantes en la plasticidad y de potencial relevancia para el diseño racional de drogas

Las estructuras obtenidas siguiendo el objetivo específico 1, fueron sometidas a análisis estructurales incluyendo en particular la descripción general del plegamiento, topología y conectividad de elementos de estructura secundaria. El análisis de la distribución de factores de desplazamiento atómico o factores B, por residuo, es un primer indicador para identificar zonas de mayor y menor flexibilidad. Para descifrar elementos funcionales determinados por la estructura, la comparación de distintas estructuras homólogas superpuestas es imprescindible, señalando residuos y/o regiones de la molécula de especial importancia. En este caso podremos comparar las quinasas de *Leishmania* con la miríada de estructuras de quinasas eucariotas accesibles en la PDB. En ese tipo de análisis comparativo, la identificación de la(s) parte(s) de la molécula conformacionalmente invariable con respecto al conjunto superpuesto de conformeros, es una etapa clave, dado que dicho sub-núcleo 'rígido' de residuos se constituye así en *referencia* para análisis subsiguientes, típicamente por superposición y cálculo de desviaciones cuadráticas medias. Esto nos permite identificar regiones o residuos clave en la determinación de plasticidad entre proteínas en distintos estados de activación y/o entre distintos complejos de la misma quinasa (apo vs distintos ligandos).

Otros métodos ortogonales fueron también incluidos, en particular aquéllos que están siendo desarrollados recientemente para el análisis de PQs humanas por el equipo de Susan Taylor (Kornev *et al.*, 2006). En este caso la idea es la de reconocer patrones locales (parches, típicamente < 10 Å) invariantes, identificadores de regiones rígidas. Algunas zonas son así fácilmente reconocidas como regiones móviles, y pueden ser luego sometidas a validación

experimental por estudios de mutagénesis y ensayos funcionales de actividad/regulación.

El análisis de interacciones proteína-proteína y proteína-ligando (en el caso de complejos), se efectuó con LIGPLOT (Wallace, 1995), y con el servidor PISA (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html) Para el análisis de conservación de secuencia proyectada en la superficie molecular se utilizó el servidor Consurf (<http://consurf.tau.ac.il>).

En cuanto a la contribución de información estructural para diseño de drogas, se puso énfasis en la comparación de los bolsillos del sitio catalítico, en especial el bolsillo de unión a ATP, con los equivalentes de PQs humanas, a fin de identificar aquellos caracteres de mayor diferenciación que puedan ser explotados para modificar *leads* y/o moléculas activas (Scapin, 2002). Se analizaron los puntos de potenciales contactos ligando-proteína (puentes de hidrógeno, pares salinos, bolsillos hidrofóbicos) con el fin de mejorar la afinidad y/o la especificidad por motivos patognomónicos del parásito.

Dinámica molecular

Se utilizaron como coordenadas iniciales las estructuras de LmaMPK10 3PG1 y 3UIB. Los segmentos experimentales faltantes en ambas modelos cristalográficos se modelaron con el programa Modeller9v6. Los bucles de activación se generaron en base a p38 α (1R3C), de acuerdo con la similitud de secuencia en el bucle. Los parámetros para SB203580 se obtuvieron usando Gaussian 09 y Antecámara, un módulo incluido en Ámbar 12. Se realizó una simulación dinámica molecular (MD) corta de SB203580 en agua para probar los parámetros de la droga. Para las corridas, donde se incluyó ATP, coordenadas ATP se copiaron del complejo p38 γ -ATP superpuesta (1CM8). Los hidrógenos se agregaron en todos los casos con el módulo de tleap del paquete Amber 12. Los estados de protonación se asignaron a los residuos valorables (Asp yGlu se consideraron cargados negativamente; Lys y Arg cargados positivamente). La protonación de la His fue asignada favoreciendo la formación de puentes de H. Cada proteína fue sumergida en una caja octaédrica truncada de TIP3P aguas. El sistema consistió en la proteína, además de 10.000 moléculas de agua c.a., 2 iones Mg⁺² y ATP para LmaMAPK10-ATP. Cada sistema se optimizó usando primero un algoritmo de gradiente conjugado para 2000 pasos. Esta optimización fue seguida por un simulación MD de 100ps de duración a volumen constante, donde la temperatura del sistema se elevó lentamente hasta 300K. El calentamiento fue seguido por una temperatura constante a lo largo

de 100 ps y simulación MD a presión constante para equilibrar la densidad del sistema. Durante todo el proceso los átomos Ca de las proteínas fueron restringidos por 10kcal/mol y 1 kcal/mol de potencial armónico para cada proceso. La presión y temperatura se mantuvieron con el baróstato de Berendsen y el termostato respectivamente (Berendsen, 1984). Todas las simulaciones se realizaron en condiciones de contorno periódicas y se utilizó el algoritmo SHAKE para retener los átomos de H en las longitudes de enlace de equilibrio, permitiendo el uso de un paso de tiempo 2fs. El modelo de aguas corresponde a TIP3P. Todos los parámetros de los residuos de la proteína corresponden al campo de fuerza de Amber 99SB (Hornak et al., 2006). Los parámetros del ATOM fueron tomados de Meagher y cols (Meagher et al., 2003). Los parámetros restantes son los mismos que los utilizados en el estudio de la MAPK p38 γ (Rodríguez Limardo et al., 2011). Para cada sistema las simulaciones de MD se llevaron a cabo durante 100ns sin restricciones y a temperatura y presión constante.

Modelado 3D ab initio del péptido C-terminal de LmaMPK10

Se utilizó el algoritmo del servidor PEP-FOLD (Maupetit *et al.*, 2009) a través del sitio <http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/PEP-FOLD>, para predecir las coordenadas atómicas factibles de la extensión C-terminal, ausente en la construcción de LmaMPK10 Δ C. En base a la predicción de estructura secundaria esta extensión parece desestructurada. La secuencia correspondiente al péptido completo fue utilizada para el modelado *ab initio* pero el rango de reconstrucción fue elegido para reconstruir los primeros 36 residuos (Thevenet *et al.*, 2012). Los límites de la secuencia fueron: NH₂-LRERR...THSLM-COOH. El programa genera clusters ordenados de acuerdo a cálculos de energía sOPEP (Thevenet et al., 2012). Los 5 mejores modelos fueron visualizados en Pymol, mostrando una organización en dos α -hélices. La figura 105 fue preparada manualmente por adición de un modelo del extremo C-terminal al modelo cristalográfico de LmaMPK10 Δ C, con el programa Coot (Emsley & Cowtan, 2004). Esta hélice incluye la secuencia LRERREEVARERAVAAQQ, correspondiente a los 18 residuos que conforman la hélice predicha. Luego del docking, agregado de hidrógenos, el modelo fue sujeto a minimización de energía (Brunger, 2007) para evitar “clashes”. Este modelo fue posteriormente usado para superponer los diferentes modelos de PEP-FOLD 3D (Krissinel & Henrick, 2004). El lazo presente entre las 2 α -hélices permitiría una gran flexibilidad. La segunda hélice del modelo, interfiere directamente, ocupando parcialmente el

bolsillo de unión al nucleótido en el core LmaMPK10.

Preparación de Proteína para estudios de “docking”

La estructura cristalina de LmaMPK10 Δ C (3PG1) y de LmaMPK10 Δ C en complejo con SB203580 (3UIB) se utilizaron para identificar potenciales ligandos inhibidores de LmaMPK10. Como primer paso la estructura fue preparada mediante la eliminación de moléculas de agua y ligando SB2. Se agregaron los átomos de hidrógeno usando el programa Sybyl (SYBYL 8.0, Tripos International, 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA) y se realiza una minimización de la energía de la molécula resultante.

Obtención de la biblioteca de compuestos

La biblioteca de ligandos se extrajo de la base de datos ZINC (<http://zinc.docking.org>) (Irwin & Shoichet, 2005). Se seleccionaron moléculas con las propiedades químicas, similares a SB203580, un inhibidor de LmaMPK10 Δ C. Las moléculas tienen un rango de peso molecular entre 300-500kDa; un log P calculado entre 2-5; TPSA entre 40-350 y una carga neta de -2 (como el ATP, el sustrato natural de LmaMPK10) y cero (como el SB2). Se generó una lista de aproximadamente 150.000 compuestos.

“Docking” de compuestos a la estructura LmaMPK10 Δ C utilizando GOLD

Después de la obtención de la librería de compuestos ligandos y la preparación de la proteína, se determinó una cuadrícula de 6Å correspondiente a sitio de unión de SB203580 con el fin de llevar a cabo el acoplamiento. El docking de compuestos se realizó usando GOLD (Cole, 2005; Liebeschuetz *et al.*, 2012), en la cuadrícula seleccionada y habilitando un pose por compuesto. El software generó un a puntuación para cada compuesto, lo que permitió clasificarlos según dicho score. Una vez clasificados, con las mejores 150 poses se realizó un nuevo docking usando el programa VINA-Autodock (Trott & Olson, 2010) .

Post-análisis de compuestos seleccionados

Se realizó una comparación del ranking de compuestos puntuados por GOLD (Cole, 2005, Liebeschuetz *et al.*, 2012) y por Vina-AutoDock (Trott & Olson, 2010). Como estos métodos tienen diferentes algoritmos de búsqueda y función de puntuación no fue posible hacer la comparación directa. En su lugar elegimos los compuestos mejor clasificados por ambos programas y empezamos una visualización "manual" y el análisis de los ligandos seleccionados "dockeados" en complejo con la proteína. Programa LIGPLOT (Laskowski & Swindells, 2011) se utilizó para el análisis de las interacciones dentro del complejo, como los enlace de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas entre átomos receptor y ligandos dentro de un radio de 5 Å. Pymol y COOT se utilizaron para visualizarse las interacciones y para preparar las figuras.

Validación de los ligandos seleccionados por ensayos de inhibiciones

La validación de los ligandos se realizó mediante ensayos de competencia en medidas de actividad con el protocolo de IVKA previamente descrito, comparando la actividad de la proteína en presencia y ausencia de potenciales inhibidores.

Brevemente, la mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 20 µl que contienen 6 µL de la proteína purificada (de *E. coli* o de *L. donovani*) 50 mM MOPS pH 7.4, 100 mM NaCl, 10 mM MnCl₂, 1 mM DTT, 20 mM β-glicerofosfato, 0.1 mM NaVO₄ y ATP (0.2 mM ATP y 1 µCi [³²P]ATP) en presencia de 25 µg de MBP y de la molécula que se está evaluando (10-20 µM). La reacción se incubó durante 30 min a 37 °C bajo constante agitación y se detuvo por la adición de 6 µl de buffer de carga de proteínas y se calentó la mezcla a 100 °C durante 5 min. La reacción mezcla se separó por SDS-PAGE. El gel se tiñó con Coomassie, se secó, y se sometió a autorradiografía a -80 °C.

Resultados

CAPÍTULO I

Expresión, purificación, cristalización y determinación de la estructura tridimensional de Ser/Thr quinasas de interés de Leishmania major

Los proyectos de biología estructural tienen numerosos cuellos de botella, entre ellos la expresión soluble de las proteínas blanco de interés, con buen rendimiento y calidad para subsiguientes estudios. Es por ese motivo que se eligieron 4 quinasas blanco de *Leishmania*, todas ellas de interés por los motivos ya comentados en la Introducción, pero que sirvieran eventualmente como planes de contingencia en el caso de que una o más demostraran ser recalcitrantes en expresión y/o cristalización. Así es que procedimos a evaluar la expresión soluble de estas quinasas de *Leishmania* en *E. coli* y en otros sistemas de expresión heterólogos eucariotas.

i) La MAPK LmaMPK7

El clonado en el vector de expresión pQE30 en el correcto marco abierto de lectura de LmaMPK7 fue verificado por secuenciación. Este análisis también demostró que la secuencia codificante de LmaMPK7 incluye una mutación puntual (comparado con la secuencia publicada del gen codificante Lmj F13.1640) que genera un cambio no-conservativo de aminoácido (Pro499→Leu) y una mutación sinónima en un sitio contiguo. Se repitió todo el procedimiento de sub-clonado, y se obtuvo el mismo resultado, descartando así errores puntuales generados durante la PCR.

El análisis del alineamiento de secuencias de diferentes quinasas (ver más adelante) mostró que la mutación se ubica al final de una α -hélice bien conservada. Dado que esta posición es semi-conservada, y encontramos en diferentes MAPKs diferentes residuos Leu, Ile, Pro y Gly sin mayores cambios, se decidió continuar trabajando con esta secuencia que fue aislada a partir de parásitos por nuestros colaboradores.

Los ensayos de expresión iniciales fueron realizados con la construcción pQE30-TEV-MPK7 en diferentes cepas de *E. coli* (Top10 F', M15 y XL1-Blue). Se variaron las condiciones de cultivo (temperatura, horas de inducción, medio de cultivo). Las condiciones evaluadas se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de expresión de pQE30-TEV-MPK7 evaluadas en *E. coli*.

Cepa bacteriana	Temperatura (°C)	IPTG (mM)	Tiempo de inducción (horas)	Medio de cultivo
XL1-Blue	30	1	4	LB (Luria -Bertani)
	20		o.n.	
Top10F'	37	1	4	
	20		o.n.	
M15	37	1	4	
	20		o.n.	
Top 10 F'	20	1	o.n.	
		0,2		
		0,01		
	37	1	4	
		0,2		
		0,01		
			TB (Terrific Broth)	

La expresión de LmaMPK7 se analizó mediante SDS-PAGE, comparando la fracción total de proteínas de un cultivo inducido con la de uno no inducido (Fig. 14). Este análisis por SDS-PAGE permitió observar la inducción de un banda correspondiente a una proteína del peso molecular esperado (66.4 kDa) en varias de las condiciones evaluadas. En un paso posterior, se evaluó la fracción soluble de LmaMPK7. Esto se realizó tras el fraccionamiento diferencial por centrifugación de las proteínas totales del cultivo celular. Así, del lisado celular, se obtiene una fracción soluble de proteínas y una insoluble. La Figura 15 muestra el análisis por SDS-PAGE de ambas fracciones: en todas las condiciones evaluadas de cultivo se observa que la proteína inducida se localiza principalmente en la fracción insoluble.

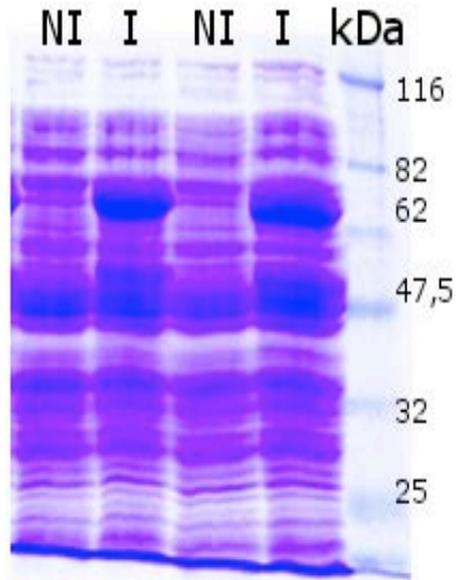


Figura 14. Expresión de LmaMPK7 en la cepa TOP10F' de *E. coli*. Análisis por SDS-PAGE al 10% teñido con Coomassie Blue. NI e I corresponden a las fracciones de cultivo no inducido e inducido con 1mM de IPTG de la cepa transformada con el vector pQE30-TEV-LmaMPK7, cultivada a 37°C (izquierda) y a 20°C (derecha).

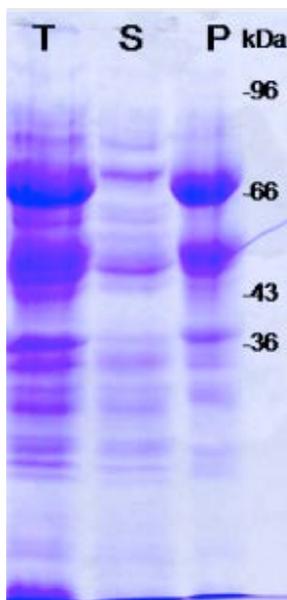


Figura 15. Análisis por SDS-PAGE al 10% de la distribución de LmaMPK7 en las fracciones soluble (S) e insoluble o precipitable (P). El extracto total (T) de proteínas de un cultivo de *E. coli* de la cepa TOP10F' inducido se corrió como control de referencia. Se señalan los pesos moleculares de acuerdo a marcadores de peso molecular de referencia.

La fracción de LmaMPK7 soluble obtenida de las condiciones de cultivo ensayadas parece ser escasa o nula. De todas formas, para evaluar si pequeñas cantidades de LmaMPK7 soluble pudieran ser purificadas y escaladas, se decidió realizar una cromatografía de afinidad a Ni²⁺ a partir de un cultivo de 1L de LB. Luego de cosechar y lisar las células, la fracción soluble fue incubada en una columna His-Trap Ni-column (GE Healthcare, 1mL). Se realizó la elución en un gradiente de imidazol (de 0,02 a 0,5 M, en 30 min, como se observa en la Figura 16).

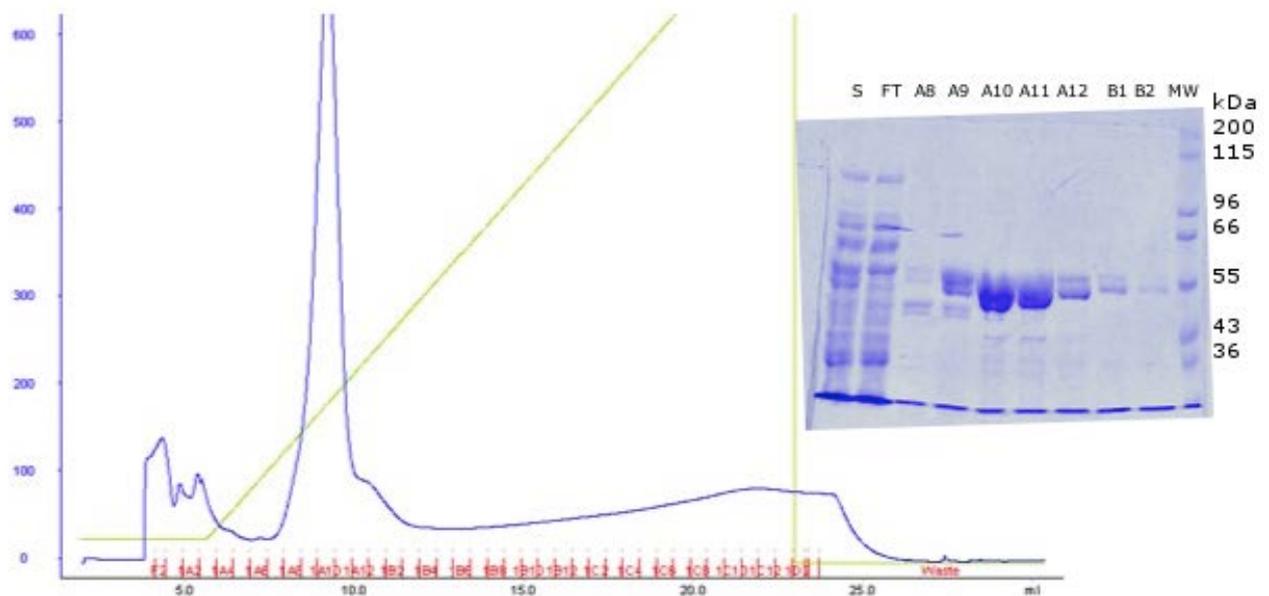


Figure 16. a) Cromatograma de elución de la purificación de His-LmaMPK7 por IMAC. b) Análisis por SDS-PAGE de las Fracciones correspondientes al pico de elución. S: fracción soluble de proteínas totales; FT: fracción no unida en la IMAC; A8-B2: diferentes fracciones del pico de elución

El pico de elución fue colectado y analizado por SDS-PAGE como se observa en la figura 17 y algunas bandas fueron analizadas por espectrometría de masa MALDI-TOF. No se identificó por MS ningún péptido correspondiente a LmaMPK7, en las fracciones eluidas, pero si se identificó la presencia de las proteínas bacterianas : chaperona DnaK y proteína ribosomal S1 (marcadas con *); glucosamina-6-P sintetasa (*) y chaperona GroEL-GroES (*).

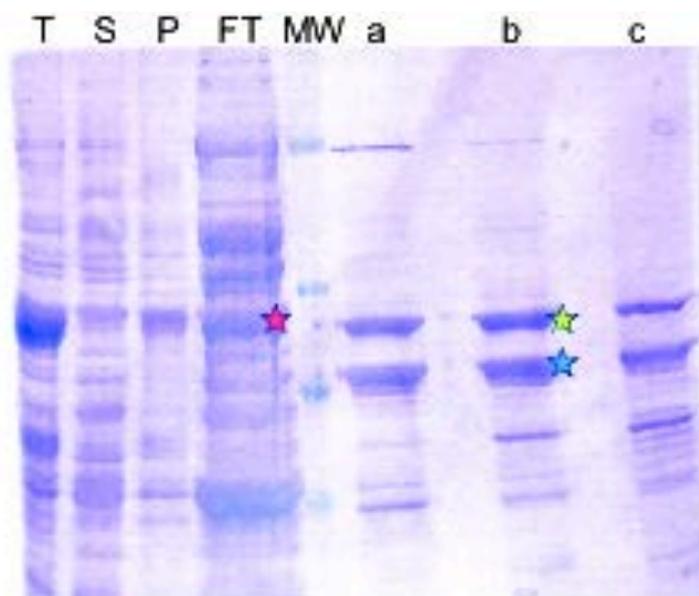


Figura 17. Análisis de fracciones de diferentes pasos de purificación por SDS_PAGE 10%. Las letras corresponden a: T = extracto de proteínas totales; S = fracción soluble; P = fracción insoluble; FT = fracción “no-unida”(flow-through); a/b/c = fracciones sucesivas colectadas durante la elución de la IMAC. Las estrellas de colores indican las bandas que fueron analizadas por MS.

Se concluye que LmaMPK7 se expresa de forma insoluble a partir de pQE30 en las condiciones de inducción ensayadas.

Dado que hasta este momento sólo habíamos utilizado una construcción, decidimos profundizar en la evaluación del uso de *E. coli* como sistema para expresar de forma heteróloga a LmaMPK7, pero extendiendo la exploración a una variedad de vectores con propiedades esperadas de expresión diferentes. Con este fin se sub-clonó la secuencia codificante de LmaMPK7 en 6 plásmidos de expresión: pET28a, pET32a, pET43.1a (vectores pET de Novagen), pTricHis-a (Invitrogen), pQE80L (Qiagen), y el vector pQE80L-TEV derivado del vector pQE80, que incluye el cassette TEV (para posterior digestión de la etiqueta de fusión). Cada vector tiene diferentes características que pueden afectar el producto generado, como se resume en la tabla 7. El clonado fue verificado por el análisis con enzimas de restricción y PCR, con oligonucleótidos específicos para LmaMPK7.

Tabla 7. Resumen de las características de los productos esperados de LmaMPK7 a partir de las diferentes construcciones.

	pET28a	pET32a	pET43.1a	pTrcHis(a)	pQE80L	pQE80L-TEV
MW(kDa)	71.7	85.1	128.2	67.3	68.8	69
pI	6.8	6.0	5	6.44	6.7	6.7
Proteína de fusión		thioredoxin	NusA			
Especificidad del Sitio de corte	trombina	Trombina/enteroquinasa	Trombina/enteroquinasa	enteroquinasa	-	TEV
Predicción de solubilidad http://www.biotech.ou.edu/	71	58.4	65.8	63.9	66.8	66.4

Luego se analizó la expresión de LmaMPK7 en diferentes condiciones de cultivo/inducción y cepas de *E. coli* y se procedió a la evaluación de su expresión soluble siguiendo una estrategia masiva (*high-throughput*). Las células se crecieron en 2 ml de LB o TB en placas de 24 pozos. Se emplearon las cepas de *E. coli*: BL21 (DE3) pLysS, HMS174 (DE3), Rosetta-gami (DE3) pLysS y TOP 10 F'. Los cultivos de se indujeron a una densidad óptica Ab_{600nm} cercanas a 1, agregando 1mM final de IPTG, durante 4 horas a 37 °C, ó alternativamente toda la noche (aprox 16hs) a 20 °C. Se ensayaron 48 condiciones diferentes que se resumen en la tabla 8.

Tabla 8. Diferentes condiciones evaluadas combinando vectores, cepas de *E. coli* y condiciones de cultivo para expresar LmaMPK7.

cepa	Vector	N°	Tamaño esperado (kDa)	Medio de cultivo	Abs ₆₀₀ pre- inducción		Abs ₆₀₀ post-inducción	
					20°C	37°C	20°C	37°C
Bl21 (DE3) pLysS	pET-28 a	1	71	LB	1.153	1,072	3.74	4.14
	pET-32 a	2	85	LB	1.150	1.172	5.11	3.80
	pET 43.1 a	3	130	LB	1.088	1.032	4.49	3,76
	pTrcHis (a)	4	67.3	LB	0.986	0.945	4.87	5.17
	pQE80	5	68.4	LB	1.004	0.931	6.30	5.15
	pQE80TEV	6	68.8	LB	0.987	0.897	6.42	5.21
HMS 174 (DE3)	pET-28 a	7	71	LB	0.835	0.883	3.79	4.00
	pET-32 a	8	85	LB	0.870	0.893	2.63	3.07
	pET 43.1 a	9	130	LB	0.921	0.918	2.52	2.94
	pTrcHis (a)	10	67.3	LB	0.807	0.855	4.51	5.64
	pQE80	11	68.4	LB	0.860	0.915	4.36	3.27
	pQE80TEV	12	68.8	LB	0.968	0.971	4.47	3.75
Rosetta -gami B(DE3) pLysS	pET-28 a	13	71	LB	1.083	1.052	2.93	3.24
	pTrcHis (a)	14	85	TB	1.013	0.970	2.72	3.57
	pET 43.1 a	15	130	LB	1.346	1.488	3.70	4.01
	pTrcHis (a)	16	67.3	LB	0.913	1.030	3.58	5.35
	pQE80	17	68.4	LB	1.241	1.117	4.18	4.20
	pQE80TEV	18	68.8	LB	1.050	0.947	4.02	4.01
TOP 10 F'	pTrcHis (a)	19	67.3	TB	1.075	0.769	4.98	3,99
	pQE80	20	68.4	TB	1.060	0.746	1.80	4,31
	pQE80TEV	21	68.8	TB	1.066	0.766	1.88	3,91
	pTrcHis (a)	22	67.3	LB	0.896	0.910	3.56	3,83
	pQE80	23	68.4	LB	0.884	0.823	2.01	3,29
	pQE80TEV	24	68.8	LB	0.890	0.801	2.18	3,28

Las fracciones soluble e insoluble fueron analizadas en el sistema “E-PAGE™ 96 High-Throughput Protein Electrophoresis System” (Invitrogen) en la Unidad de Proteínas Recombinantes del Institut Pasteur Montevideo. Como todas estas construcciones de LmaMPK7 contienen una fusión a una etiqueta de histidinas, se realizó un Western blot utilizando un anticuerpo anti-His-tag (Clonetechnich n°631212- 6xHis Monoclonal Antibody, dilución 1:5000) (Figs. 18 & 19).

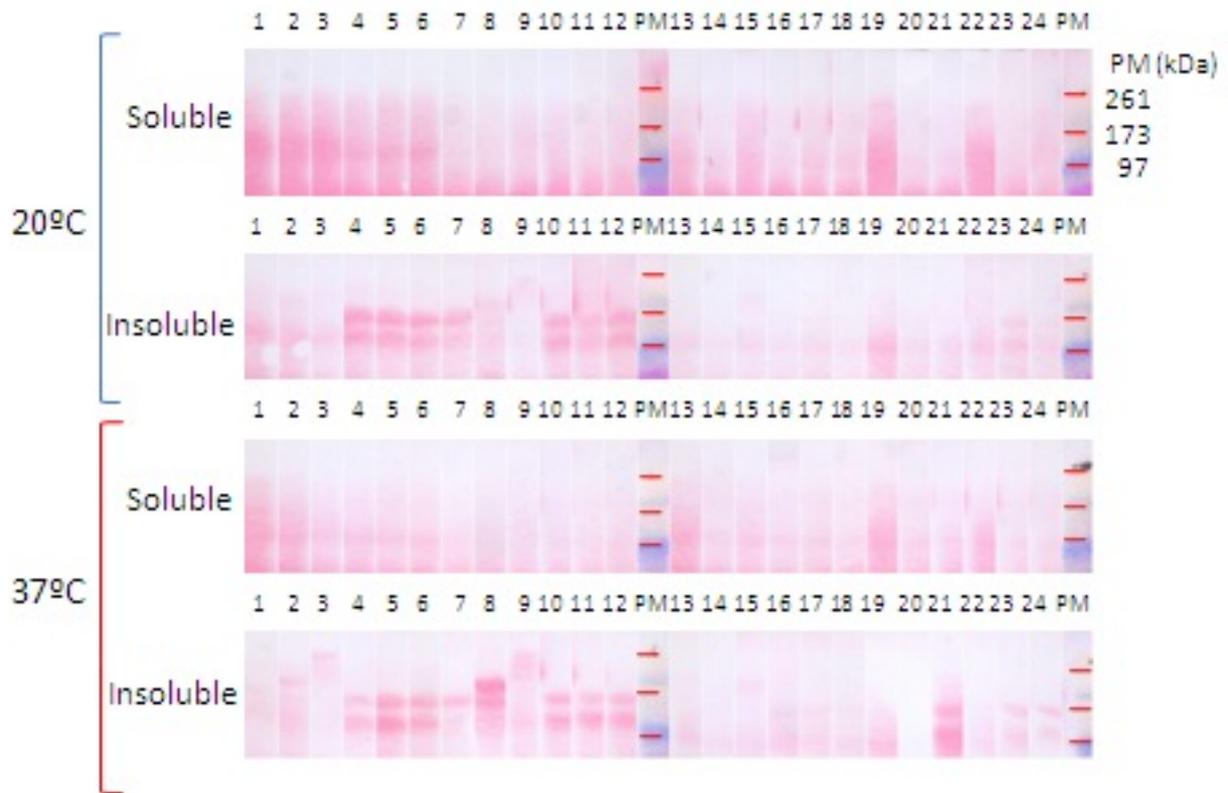


Figura 18. Membrana de Western blot teñida con Rojo Ponceau. Los números se corresponden con la combinación de cepa y vector descrita en la tabla 8.

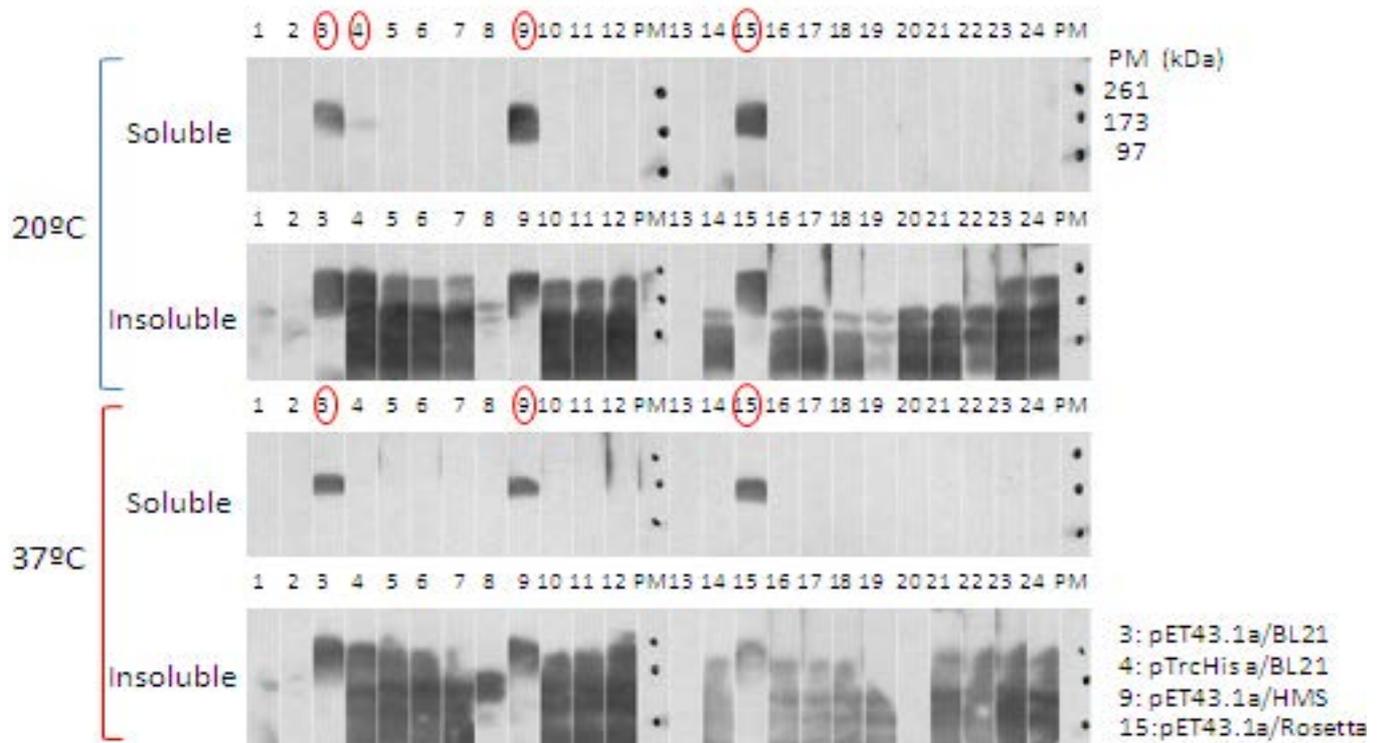


Figura 19. Análisis por Western blot utilizando un anticuerpo anti-His-tag, con los mismos filtros que la figura 18. Los círculos rojos señalan condiciones en las que proteínas de la fracción soluble reaccionan con el anticuerpo primario anti-His-tag.

Para lograr una mejor resolución en el análisis, las fracciones solubles que dieron señal positiva con el anticuerpo anti-His-tag, se analizaron por SDS-PAGE y Western blot en geles convencionales (Figura 20). Hay tres condiciones (3, 9 y 15) que involucran al vector pET43a, que permiten la expresión soluble de LmaMPK7 fusionada a NusA. Es importante recordar que la masa molecular de la proteína NusA-His-LmaMPK7 es de 128 kDa. Las bandas positivas que provienen de la construcción de pET43.1a (fracciones 3S, 9S y 15S) muestran un peso molecular menor, sugiriendo degradación proteica. Como la etiqueta de His en este vector se ubica entre la proteína NusA (proteína de 50 kDa) y la proteína blanco LmaMPK7, la degradación podría ocurrir desde cualquiera de los extremos o desde ambos.

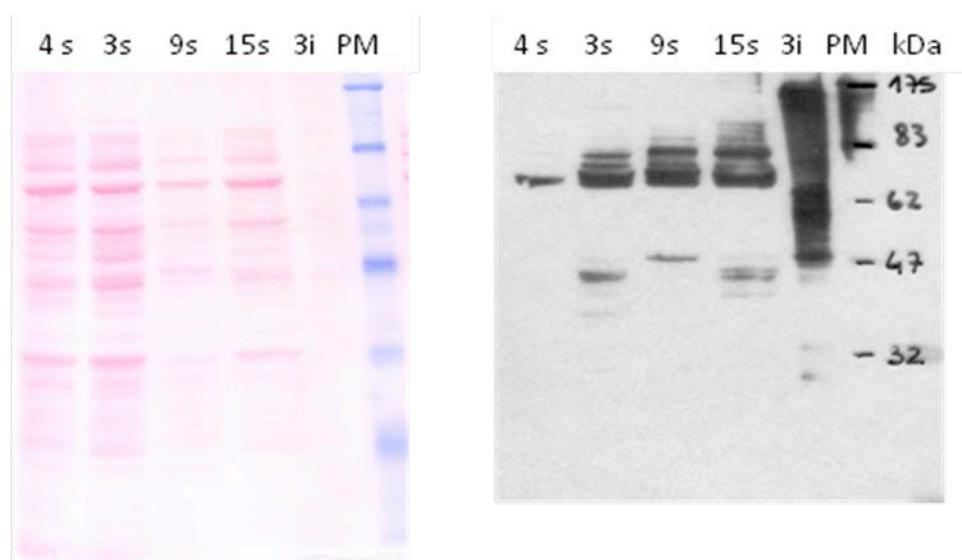


Figura 20. Análisis por Western blot con el anticuerpo anti-His-tag, sembrando las fracciones solubles 3s, 4s 9s y 15s (correspondientes respetivamente a las fracciones solubles de pET43.1a/BL21 (DE3) pLysS, pTrcHis/BL21(DE3) pLysS, pET43.1a/HMS174 (DE3) y pET43.1a/Rosetta-gami (DE3) pLysS), y la fracción insoluble 3i (de pET43.1a/BL21 (DE3) pLysS) incluida como control.

Con el fin de analizar la naturaleza de la degradación que se observa cuando LmaMPK7 se obtiene como fusión a NusA en el extremo N-terminal a partir del vector pET43.1a, decidimos realizar un cultivo a mayor escala. Elegimos trabajar en una condición de inducción (HMS174 (DE3) pLyS pET43.1a- NusA-LMaMPK7, inducción ON a 20 °C), para realizar un cultivo de 1 L de LB. Luego de la lisis bacteriana, se recuperó la fracción soluble y se realizó una cromatografía de afinidad (IMAC) (Fig. 21). Las fracciones de elución de 0,5 mL se colectaron y analizaron por SDS-PAGE (Fig. 22).

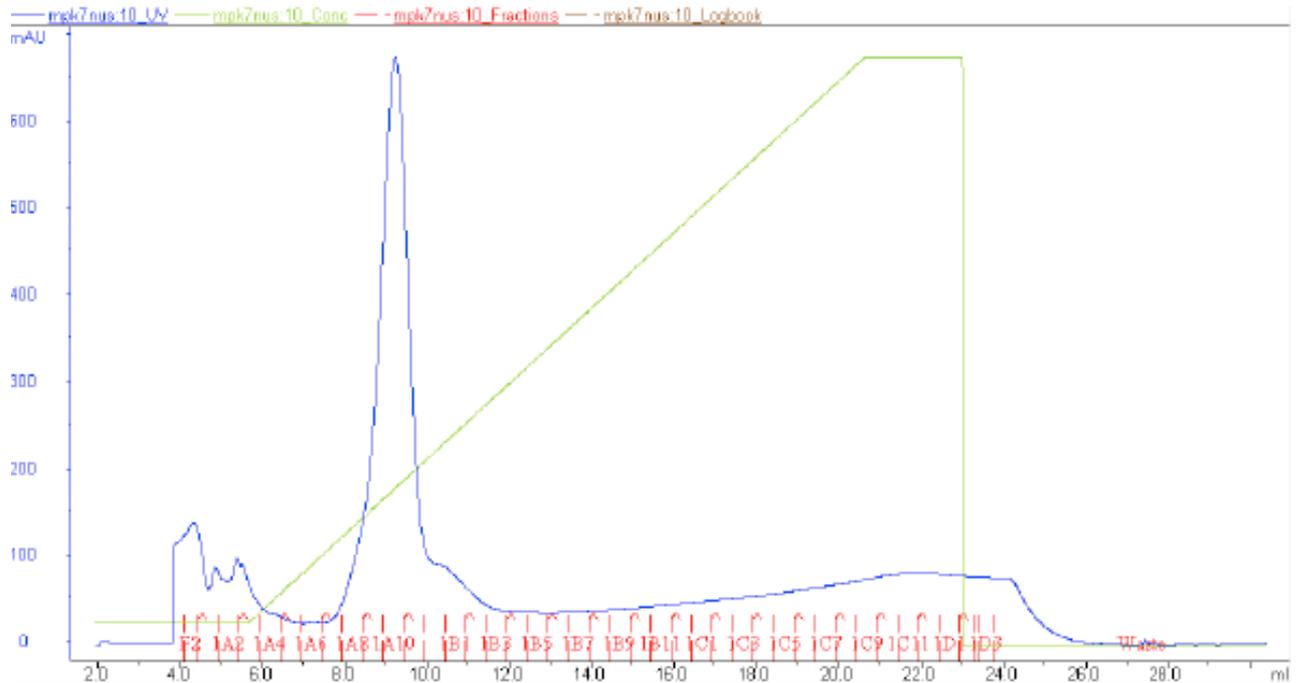


Figura 21. Cromatograma de la IMAC de NusA-His-LmaMPK7. Un gradiente lineal de imidazol de 0 a 0.5 M se observa con línea verde.

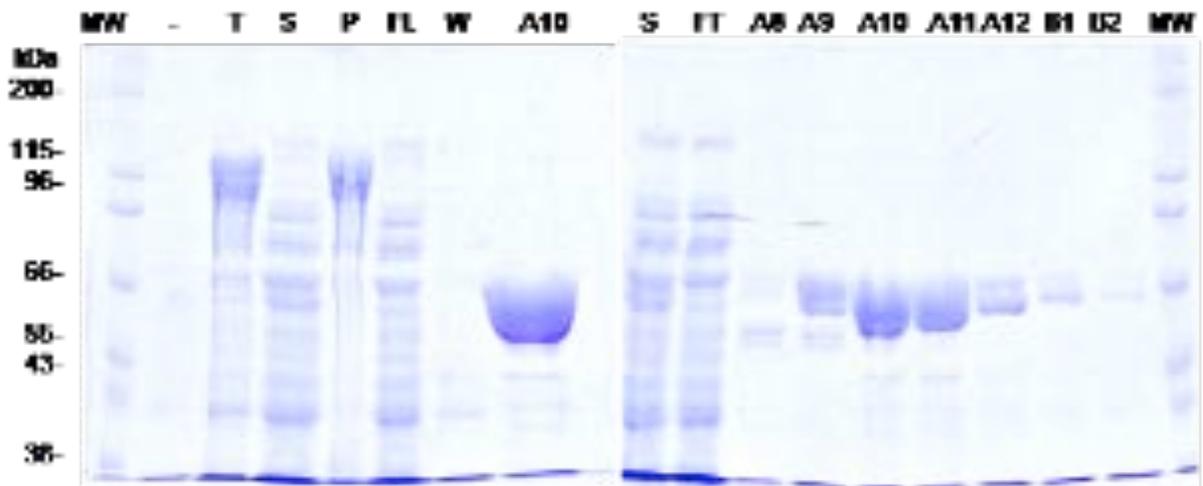


Figura 22. Análisis por SDS-PAGE (poliacrilamida 8%) de las fracciones correspondientes a los diferentes pasos de purificación de NusA-His-LmaMPK7. T = extracto total de proteínas; S = fracción soluble; P = fracción insoluble; FT = fracción no-unida a la columna (*flow-through*); W = lavado de columna (*washes*); A8-B2 = fracciones sucesivas colectadas durante el gradiente de elución.

Las fracciones purificadas de NusA-His-LmaMPK7 se analizaron por Western blot. Se encontró una banda doble de aproximadamente 70kDa, que reacciona específicamente con el anticuerpo anti-His-tag (Fig. 23). Las bandas fueron cortadas del gel de acrilamida y

analizadas por espectrometría de masa. El resultado confirmó la presencia de NusA, pero ningún péptido de LmaMPK7 fue identificado. El experimento se repitió, obteniendo el mismo resultado. Este resultado se puede explicar si suponemos que el C-terminal de la proteína LmaMPK7 fusionada está desplegado, y sea fácilmente susceptible a degradación. Así es que obtuvimos mayoritariamente la fusión NusA sobre-expresada como producto.

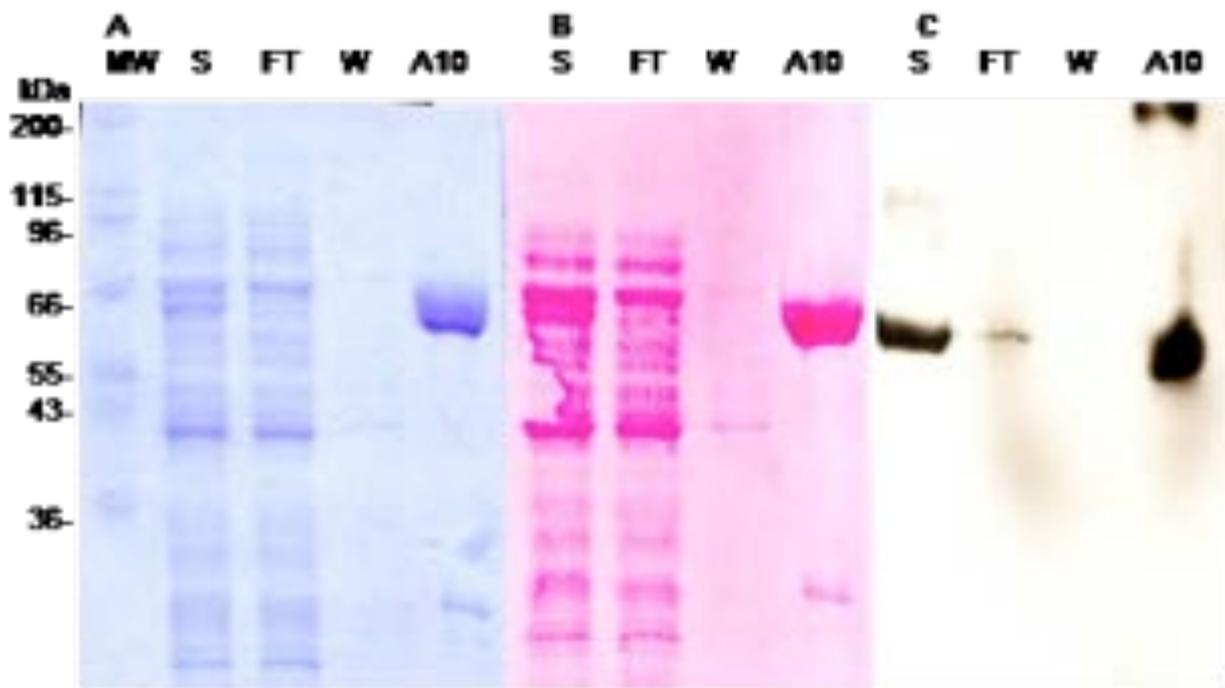


Figura 23. Análisis por Western blot de las fracciones purificadas a partir de los ensayos de expresión de pET43.1a-LmaMPK7. A) SDS-PAGE (10%) teñido con azul de Coomassie; B) Membrana transferida y teñida con rojo Ponceau; C) Western blot revelado con anticuerpos anti-His-tag. S = fracción soluble; FT =fracción no-unida de la columna (*flow-through*); W = lavado de columna (*washes*); A10 = pico de elución.

En resumen, se encontraron 7 de 48 condiciones ensayadas, donde LmaMPK7 se expresa en *E. coli* como una proteína parcialmente soluble. 6 de las 7 condiciones involucran fusiones a la proteína NusA. (pET43.1 -en 3 cepas adecuadas para expresar a partir de promotores T7: HMS174 (DE3); BL21 pLyS (DE3) y Rossetta-gami (DE3); tanto a 20 °C ON y a 37 °C 4 hs). Desafortunadamente, estas 6 condiciones muestran a la proteína sobre-expresada con signos de degradación. La única condición independiente de NusA involucra a pTricHis-LmaMPK7 en células BL21-pLyS (inducidas a 20 °C ON). Se procedió a escalar dicha condición, comparando la expresión de LmaMPK7 desde el vector pTricHis a 20 °C y

también a 37 °C, como se muestra en la Figura 24. Sin embargo, la purificación por IMAC a partir de la fracción de proteínas solubles del cultivo a 20 °C no permitió observar una cantidad detectable de LmaMPK7 (resultado no mostrado).

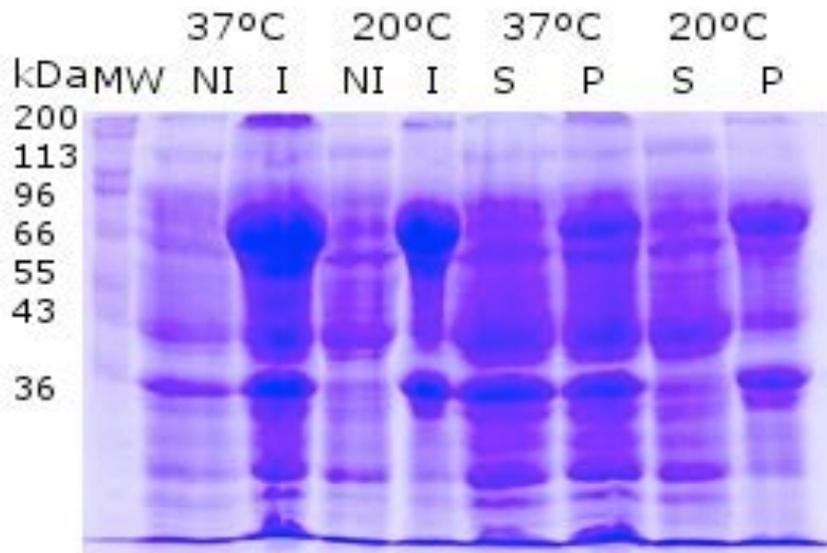


Figura 24. Expresión de LmaMPK7 en la cepa BL21 de *E. coli* transformada con el vector pTric-His-LmaMPK7. Análisis por SDS-PAGE (10 %) teñido con azul de Coomassie. NI y T corresponden a las fracciones totales de proteínas de los cultivos no inducido (NI) e inducido (T) con 1mM de IPTG a 20 °C ON y a 37 °C durante 4 horas.

LmaMPK7 codifica una proteína grande comparada con otras MAPK putativas de *Leishmania*. Muestra caracteres distintivos funcionales y/o regulatorios. En particular muestra inserciones en el sitio de unión al ATP y en el bucle de activación. LmaMPK7 se fosforila en el estadio amastigote del parásito y resultados preliminares muestran que sería esencial para la sobrevivencia del parásito. Por todo esto se continuaron invirtiendo esfuerzos por conseguir la expresión soluble y con buen rendimiento de esta proteína, procediéndose a evaluar un sistema de expresión eucariota: las células S2 de *Drosophila*.

Células S2 de *Drosophila* como sistema de expresión de LmaMPK7

Se clonó la secuencia codificante de LmaMPK7 en el vector pMT/Bip/V5/His (Invitrogen).

Este vector permite la expresión de la proteínas de interés con una etiqueta de histidinas, un tag V5 y codificando la proteína de interés como proteína de secreción, ya que la expresa como fusión al péptido BIP en el extremos N-terminal. BIP direcciona el producto proteico hacia el retículo endoplásmico y vía de secreción por defecto. Realicé una pasantía en la Unidad de Virología Estructural que dirige el Dr Felix Rey (Institut Pasteur, Paris), bajo la supervisión directa de Thomas Krey. Durante este período, se puso a punto la técnica de tranfección y se generaron clones transfectados de manera estable con los vectores pMT/Bip/V5/His-LmaMPK7 y pCoBlast. Las células fueron adaptadas a crecer en medio de cultivo libre de suero.

A partir de dichas células transfectadas, de vuelta en nuestro laboratorio se procedió a la evaluación de la expresión de LmaMPK7 (en 30 mL de medio de cultivo). Se realizó la inducción con metales pesados, ensayando cobre y cadmio, inductores del promotor de metalotioneína presente en el plásmido. Las células se cosecharon y se analizaron los extractos celulares obtenidos por SDS-PAGE y Western blot como se muestra en las figuras 25 y 26. También se analizó la fracción correspondiente al medio de cultivo y al medio de cultivo concentrado, ya que LmaMPK7 se esperaba como proteína de secreción.

Efectivamente, pudimos corroborar que LmaMPK7 se expresaba en este sistema como proteína de secreción. Para ello se analizaron dos de las proteínas detectadas en el medio de cultivo correspondientes a especies del tamaño esperado (aprox 70 kDa), y una de ellas fue identificada como LmaMPK7 por espectrometría de masas. La proteína mayoritaria en el medio de cultivo resultó ser BSA(albúmina bovina) pese a que las células crecían en un medio libre de suero fetal bovino. El análisis por Western blot mostró que la abundancia de proteínas con tag V5 era muy baja, pudiendo detectarse incluso en cultivos no inducidos. Se decidió purificar LmaMPK7 a partir de su etiqueta de histidinas, para evaluar si un escalado en volumen de cultivo pudiera permitir la obtención de cantidades de proteína suficiente. Esta estrategia no resultó simple, probablemente debido a interferencia de la etiqueta de histidinas, que junto con los metales para inducir, formarían complejos o agregados de efecto negativo en la expresión y la viabilidad de los cultivos (T Krey, comunicación personal). De hecho, los intentos de escalar y purificar cantidades suficientes de LmaMPK7 como proteína de secreción no fueron exitosos (resultados no mostrados).

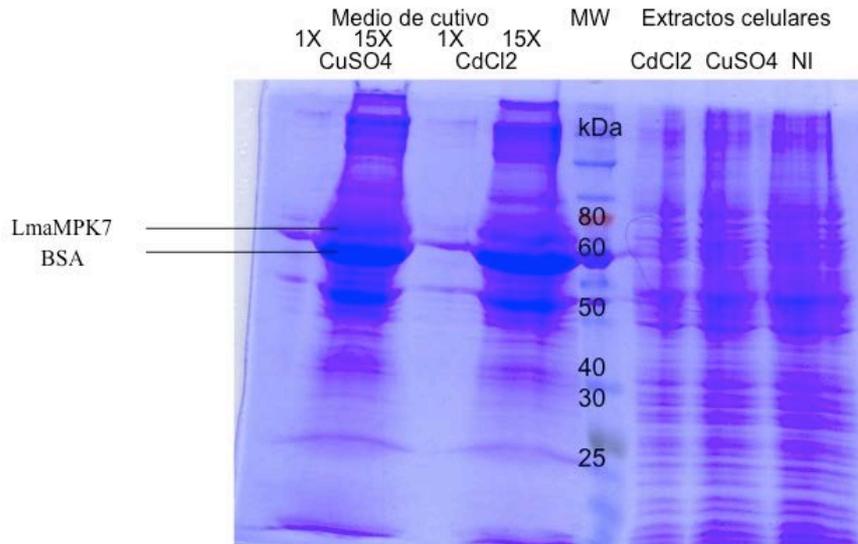


Figura 25. Análisis por SDS-PAGE de la expresión de LmaMPK7 en células de *Drosophila* transfectadas. Se compara la inducción de LmaMPK7 por Cu^{+2} y por Cd^{+2} a nivel de extractos celulares y en el medio de cultivo, dado que LmaMPK7 se expresa como proteína de secreción. El medio de cultivo se separó de las células por centrifugación y se analizó sin concentrar (1X) y concentrado 15 veces (15X) por centrífugación. LmaMPK7 y BSA se identificaron por MS.

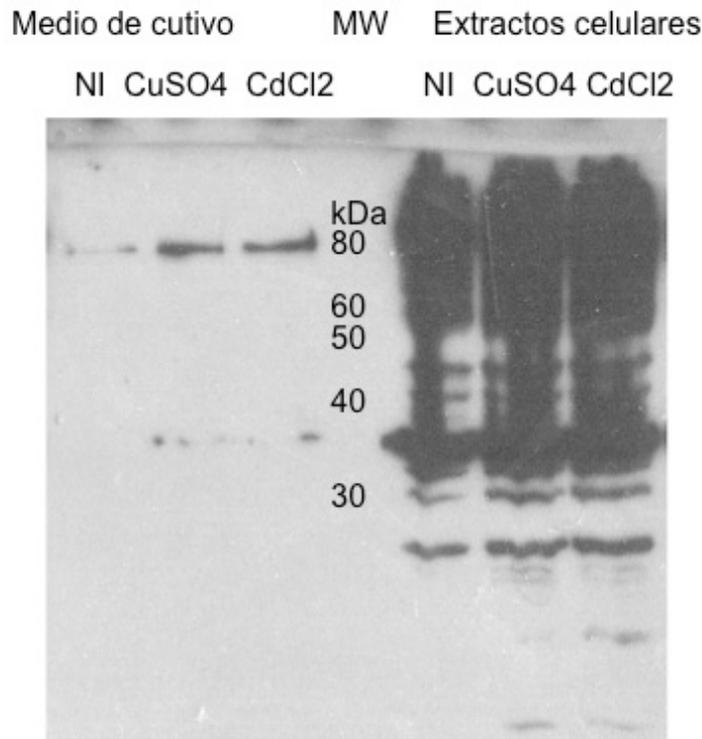


Figura 26. Análisis por western blot de la expresión de LmaMPK7 en células de *Drosophila* transfectadas. Se compara la inducción de LmaMPK7 por Cu^{+2} y por Cd^{+2} a nivel de extractos celulares y en el medio de cultivo, dado que LmaMPK7 se expresa como proteína de secreción. NI corresponde a la fracción no inducida de cultivo. Se utilizó el anticuerpo anti V5.

Se decidió entonces utilizar una construcción alternativa, utilizando una etiqueta “strep-tag” reemplazando a las histidinas. Para ello contamos con los vectores p460 y p353, cedidos gentilmente por el grupo de Felix Rey. Se generaron las construcciones y se realizaron los ensayos de transfección con éxito. Se llegó a obtener cultivos de 50mL, permitiendo inducción con Cu^{+2} o Cd^{+2} , y posterior purificación a partir del sobrenadante del cultivo con una columna de estreptatina “*streptactin*” (GE) (como se observa en la figura 27). Se obtuvo una cantidad exigua de proteína durante la elución con desbiotina, la cual fue analizada por Western blot, sin éxito en la detección de bandas específicas reveladas con anticuerpo anti-streptag. En suma, integrando todas las dificultades encontradas para expresar de forma soluble LmaMPK7 con buen rendimiento, decidimos invertir nuestros esfuerzos en otras proteínas blanco.

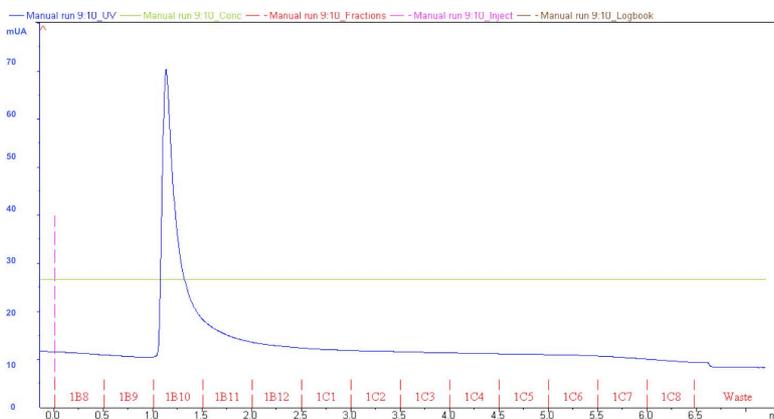


Figura 27. Cromatograma de elución de LmaMPK7 de la columna estreptatina 1mL) La purificación se realizó a partir de 50 mL de un cultivo de células de *Drosophila* co-transfectadas con los vectores pT460-LmaMPK7 y pCoPuro, luego de 5 días de inducción con Cd^{+2} .

ii) La caseín-quinasa Lma-CK1

Se partió de una construcción recombinante codificando para la isoforma 2 de la proteína-quinasa CK1 de *Leishmania major* (LmaCK1.2, de ahora en más denominada LmaCK1), clonada en el plásmido de expresión pBAD-tio (cedida gentilmente por el equipo de Gerald Spaeth, Institut Pasteur, Paris). Dicha construcción permite expresar LmaCK1 fusionada a tiorredoxina en *E. coli*. Nuestros colaboradores ya habían expresado y purificado LmaCK1 recombinante en pequeñas escalas con fines bioquímicos (Rachidi *et al.*, 2014) como se muestra en la figura 28.

Debido a que el rendimiento obtenido era muy bajo para nuestros fines, además de que en la purificación se retenía a un gran número de proteínas contaminantes, decidimos evaluar otros sistemas de expresión.

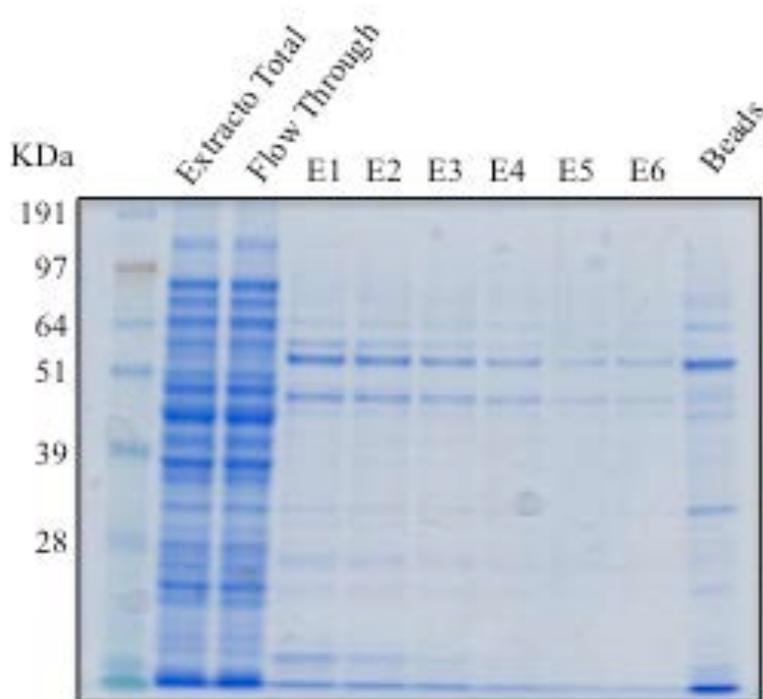


Figura 28. Análisis por SDS_PAGE de la expresión de LmaCk1 en *E. coli* Rosetta a partir del vector pBAD-tio-LmaCK1. A partir del extracto total de proteínas solubles se realizó la purificación de LmaCk1 utilizando la resina Talon en batch. Se observan las fracciones de elución (E1-E6).

La secuencia codificante de LmaCK1 fue subclonada en el vector de expresión pQE80-TEV mediante el método de clonado clásico por PCR y corte con enzimas de restricción. El correcto sub-clonado se verificó por secuenciación. La sobreexpresión de LmaCK1 fue evaluada en diferentes cepas de *E. coli* HMS174(DE3), BL21(DE3) pLysS, Top10F' y Rosetta-Blue (DE3) a diferentes temperaturas (20°C ON, ó 37°C por 4 hs). En ninguna de las condiciones evaluadas se evidenció una banda sobre-expresada del tamaño esperado. Para evaluar si una fracción minoritaria de LmaCK1 se expresara soluble, se procedió a purificar LmaCK1 mediante IMAC a partir de la fracción soluble. En la figura 29 se observa el análisis de las fracciones del cultivo y obtenidas en la purificación por SDS-PAGE. Se seleccionaron bandas de las fracciones correspondientes al pico de elución (aproximadamente 41 kDa) que se analizaron por espectrometría de masa MALDI-TOF. Las bandas seleccionadas no fueron identificadas como LmaCK1. Resultaron ser proteínas de origen procariota, claramente contaminantes unidos inespecíficamente a la columna de Ni⁺².

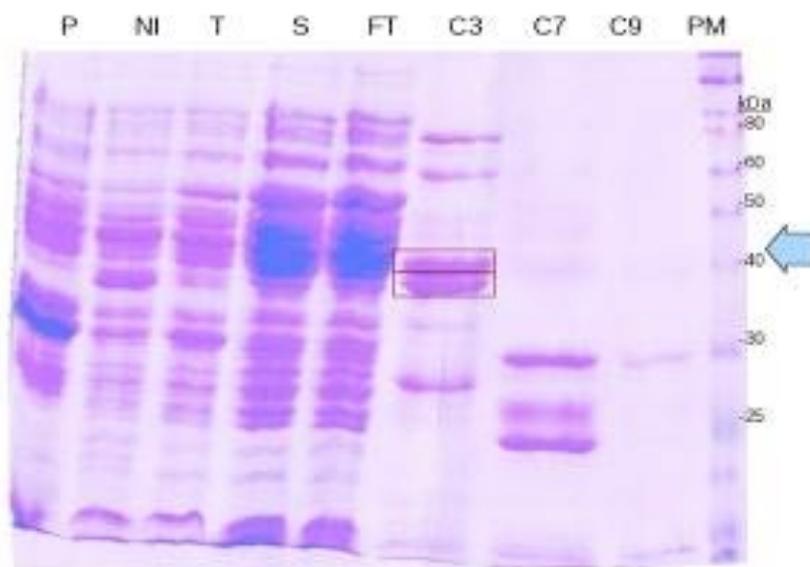


Figura 29. Análisis por SDS-PAGE de la expresión y purificación de LmaCK1 de la cepa TOP10F' de *E. Coli* transformada con el vector pQE80-LmaCk1. La flecha indica el tamaño molecular esperado para Lma-Ck1. Las fracciones analizadas corresponden a NI: cultivo no inducido; T: fracción total de proteínas de cultivo inducido; S: Fracción soluble de proteínas de cultivo inducido; P: Fracción del *pellet* insoluble de cultivo inducido; FT: fracción no unida IMAC *flow-through*; C3, C7 y C9 representan diferentes picos de elución del gradiente de imidazol de la IMAC. Las bandas analizadas por MS están resaltadas en un recuadro.

Aún cuando la construcción inicialmente disponible en pBAD generara una fusión con una proteína grande, como la tiorredoxina, dado que los intentos con una etiqueta corta de 6xHis en pQE80 fueron fallidos, se decidió reproducir las condiciones de expresión de nuestros colaboradores con pBAD-tio-LmaCK1 en la cepa de *E. coli* Rosetta. Se aisló la fracción soluble, y se sometió a una primera purificación de afinidad a metales dado que la fusión incluye una etiqueta de 6xHis. Siguiendo el protocolo utilizado por nuestros colaboradores, se utilizó una columna de cobalto (Talon®, GE). Se logró obtener proteína de fusión soluble (Fig. 30), cuya identidad fue confirmada por espectrometría de masas. La purificación usando la columna de cobalto no es sin embargo completa, ya que LmaCK1 eluye con varios contaminantes. Se identificó a la proteína mayoritaria que fue purificada, como la epimerasa/deshidratasa dependiente de NAD de *Escherichia*. A pesar de reiterados esfuerzos que incluyeron el agregado de pasos de purificación por intercambio iónico y gel filtración, no se logró optimizar la purificación.

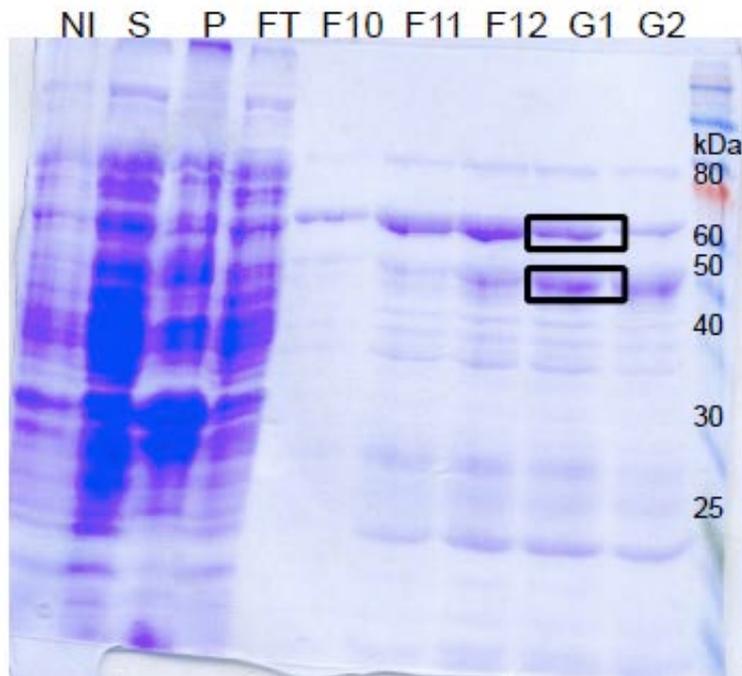


Figura 30. Análisis por SDS-PAGE de la expresión de pBAD-Trx-LmaCK1 en Rosetta a partir de 1L de LB, inducido con arabinosa a 37°C durante 4 hs y purificación por columna TALON® (afinidad a cobalto). La identidad de las proteínas señaladas fue confirmada por MS. Se identificó a la Epimerasa/deshidratasa dependiente de NAD de *Escherichia coli* y con el tamaño esperado a la Caseína quinasa LmaCK1.2 *Leishmania major*.

Dada las dificultades para la purificación completa así como para el corte de la fusión de tiorredoxina, que precipitaba a la proteína optamos por 2 estrategias: evaluar diferentes sistemas de expresión de LmaCK1, y trabajar con la mezcla heterogénea de proteínas obtenida de la purificación (fracciones G1-G2). Dado que muchas veces el proceso de cristalización permite purificar a una proteína de la mezcla decidimos rastrear condiciones de cristalogénesis. Se logró obtener 150 μ L de una solución de proteínas a 5mg/mL y se largó un rastreo robótico de casi 400 condiciones de cristalización. Se encontraron 2 condiciones en las que la mezcla utilizada generó cristales como muestra la figura 31.

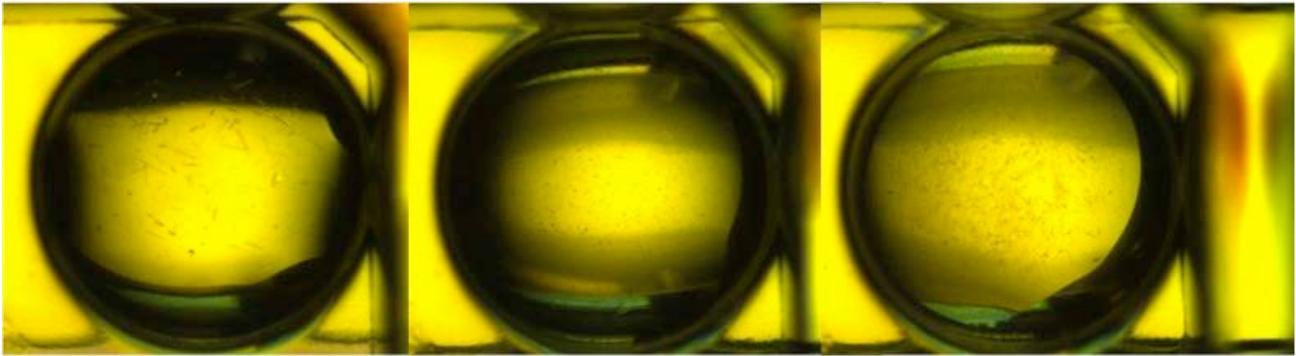


Figura 31. Cristales obtenidos en el rastreo de condiciones de la fusión LmaCK1-tiorredoxina utilizando el kit JCSGII(A4;B4;B7).

Los intentos de reproducir los cristales de forma manual fracasaron. Los cristales obtenidos en el “screening” se utilizaron para experimentos de difracción de rayos X, pero no se logró obtener difracción de los mismos.

Se decidió evaluar otras combinaciones de vectores y cepas de expresión a fin de encontrar las condiciones en las que LmaCK1 se expresara soluble con mejores rendimientos. Este trabajo formó parte de la beca de iniciación a la investigación ANII de la Lic. Fabiana San Martín, a quien yo co-orienté en nuestro laboratorio.

La secuencia codificante de LmaCK1 fue subclonada en el vector de expresión pET-Trx (cedido gentilmente por el Dr. Marcelo Commini, Institut Pasteur de Montevideo). El vector pET-Trx permite expresar la proteína de interés fusionada a la tiorredoxina y posee un sitio de corte por enteroquinasa que permite eventualmente clivar la fusión. Otro vector ensayado fue el pQE80-TEV ya mencionado anteriormente. El subclonado en pET-Trx se realizó siguiendo protocolos disponibles de clonado sin enzimas de restricción. Los plásmidos pQE80-TEV-LmaCK1 y pET-Trx-LmaCK1, fueron transformados en diferentes cepas de *E. coli*: Rosetta Blue, BL21, C41 y HMS174. Se realizaron ensayos de expresión en diferentes condiciones de cultivo (a 37°C 4hs, y a 20°C toda la noche). Se tomaron muestras de la fracción inducida y no inducida y se aislaron las fracciones soluble e insoluble. Dichas fracciones se analizaron por SDS-PAGE y por Western blot. Las condiciones ensayadas se resumen en la Tabla 9. En las condiciones evaluadas LmaCK1 se expresa en grandes cantidades pero mayoritariamente en forma insoluble (la Fig. 32 muestra un resultado representativo). Se eligieron dos condiciones para evaluar el rendimiento de purificación de la proteína por IMAC con cobalto como metal de afinidad (Fig. 33). Las cantidades purificadas son sin embargo, muy bajas, y con un grado de pureza insuficiente.

Tabla 9. Condiciones de expresión evaluadas para LmaCK1.

VECTOR	CEPA	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (hs)
pBAD-Trx-CK1	Rosetta	20	ON
	Rosetta	37	4
pQE80-CK1	TOP 10F'	20	ON
	TOP 10F'	37	4
	BL21	20	ON
	BL21	37	4
	Rosetta Blue	18	ON
	Rosetta Blue	37	4
	HMS174	20	ON
	HMS174	37	4
pET-Trx-CK1	BL21	20	ON
	BL21	37	4
	Rosetta Blue	20	ON
	Rosetta Blue	37	4
	HMS174	20	ON
	HMS174	37	4
	C41	20	ON
	C41	37	4

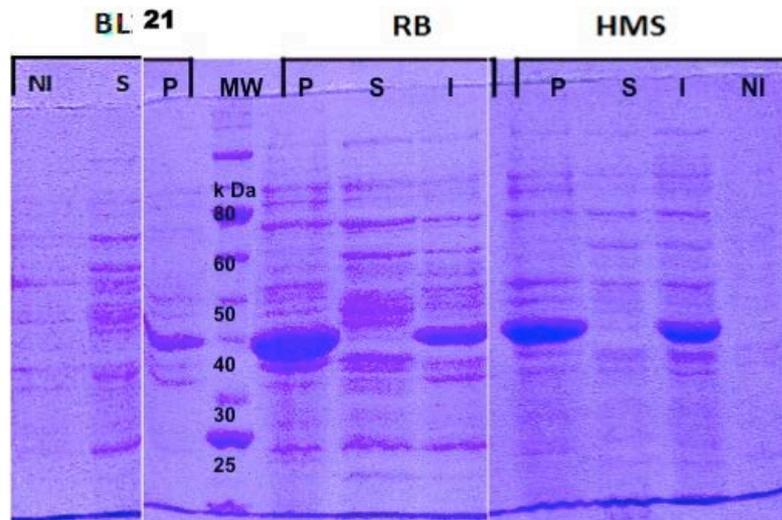


Figura 32. Análisis por SDS-PAGE de la expresión de LmaCK1 a pequeña escala (10 mL de cultivo) con el vector pQE80 en distintas cepas de *E. coli*. NI=no inducido; S=inducido, fracción soluble; P=inducido, pellet insoluble; I=inducido, proteína total); MW=marcadores de peso molecular

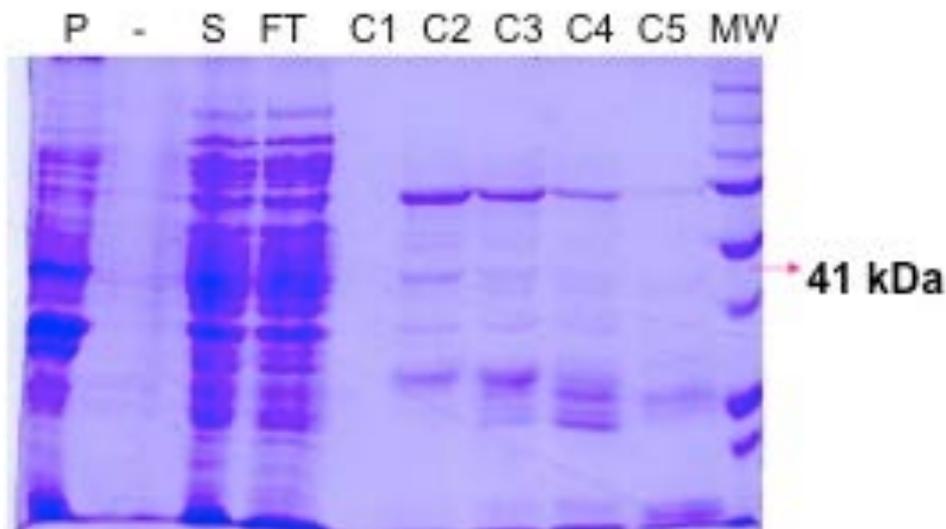


Figura 33. Análisis por SDS-PAGE de la purificación de LmaCK1.2 usando IMAC de cobalto. La flecha marca el tamaño esperado de la proteína blanco. S=fracción soluble; P=pellet insoluble; FT=proteínas no unidas a la columna; C1-C5=sucesivas fracciones de elución por gradiente lineal de imidazol.

De modo que LmaCK1 se podía expresar en grandes cantidades, pero en la gran mayoría de los casos, en la fracción insoluble. Siendo LmaCK1 una proteína más pequeña que LmaMPK7, se intentó purificar LmaCK1 desde la fracción insoluble de proteínas, mediante la realización de ensayos de desnaturalización/renaturalización en columna, sin éxito (resultados

no mostrados).

LmaCK1 podría ser una ectoproteín-quinasa (en base a las evidencias de que LmaCK1.2 sería una proteína secretada en *Leishmania* – Sacerdoti-Sierra & Jaffe, 1997; Dan-Goor *et al.*, 2013), por ese motivo se decidió evaluar la expresión de esta proteína en el periplasma de *E. coli*. Con este propósito, la secuencia codificante de la proteína se subclonó en el plásmido pET22b. Este plásmido expresa la proteína blanco como fusión con el péptido señal PelB, que direcciona proteínas al periplasma. Se ensayaron la expresión de estas construcciones en distintas condiciones, en cepas de *E. coli* (DE3) pLys- (expresando la T7 ARN polimerasa bajo promotor inducible por IPTG, pero no conteniendo la lisozima del fago T7, que dificultaría la separación limpia del contenido periplasmático).

A su vez, dado que las proteínas de la familia CK1 difieren significativamente en el largo y estructura de su extremo C-terminal (más allá del dominio ePK conservado), se crearon mutantes truncados en esta extensión (la que se predice como región desestructurada y móvil, lo que dificultaría su cristalización, y quizás su expresión estable). De hecho, las estructuras cristalográficas de caseín-quinasa obtenidas hasta el momento son mutantes truncados que terminan alrededor del residuo 298 (de acuerdo a la numeración de LmaCK1.2) por lo que se generaron los mutantes truncados LmaCK1- Δ 298 y LmaCK1- Δ 285, en base al modelado por homología usando como templatado una caseín-quinasa de arroz de secuencia similar (3SV0). En la proteína de arroz se observa que la α -hélice C-terminal se extiende hasta el residuo 285, después de lo cual la proteína muestra un bucle y una corta α -hélice, con una extensión final desestructurada (Fig. 34). Por este motivo decidimos crear los mutantes LmaCK1 Δ 298 y LmaCK1 Δ 285 porque muchas de las estructuras obtenidas hasta el momento terminan en estos residuos (ver Fig. 35) a partir del cual la secuencia de la proteína es muy poco conservada.

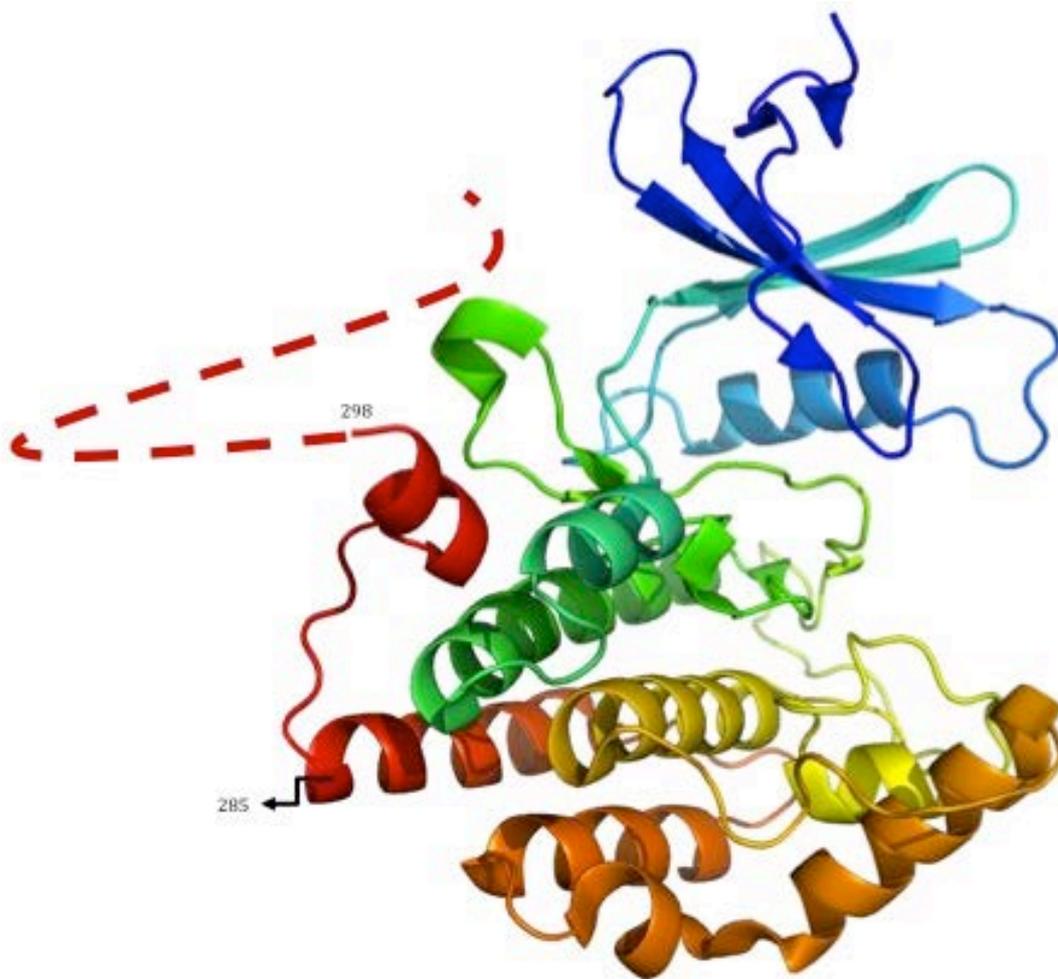


Figura 34. Predicción de la estructura tridimensional de LmaCK1 obtenida utilizando como sonda la estructura 3D obtenida por difracción de rayos X de una caseín-quinasa de arroz con 65% de identidad de secuencia con LmaCK1.2. En este modelo se observa que la α -hélice C-terminal se extiende hasta el residuo 285 (de acuerdo a la numeración de LmaCK1.2) después del cual se ve un bucle, una corta α -hélice, y finalmente una extensión C-terminal desestructurada. El trazo punteado resalta la extensión C-terminal de LmaCK1, ausente en las estructuras tridimensionales de CK1 conocidas.

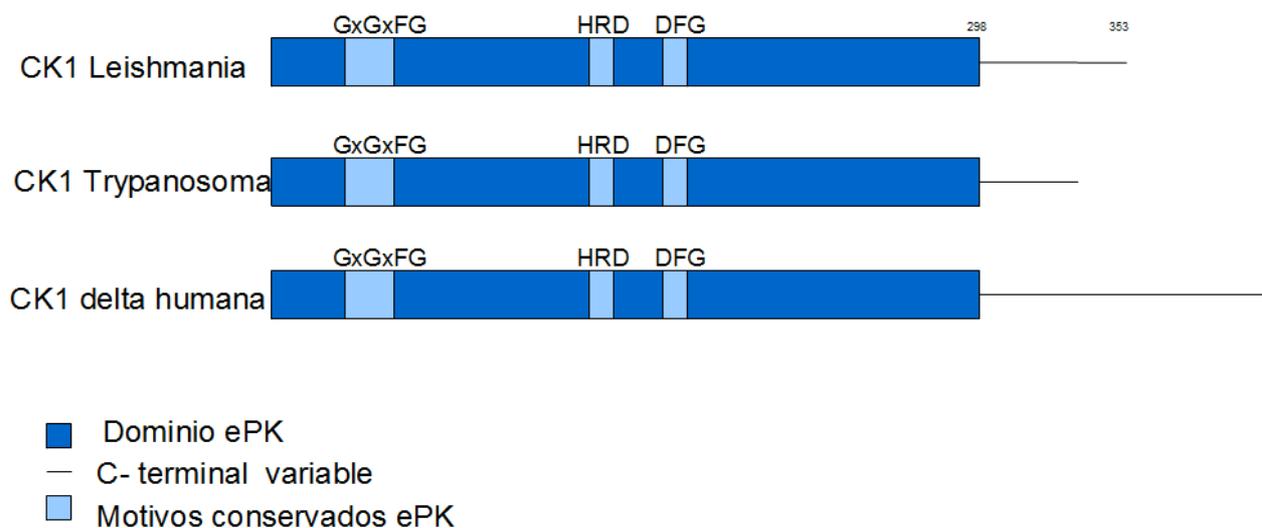


Figura 35. Esquema comparativo de elementos clave en la estructura de las CK1 de diferentes organismos. Como parte de las ePKs, el dominio quinasa de las CK1 está muy conservado con el bucle P, el sitio de unión al ATP, y las secuencias HRD y DFG. Los extremos C-terminales, sin embargo, están muy poco conservados y presentan una fuerte función inhibitoria, mediada por fosforilación.

Se realizó el clonado correspondiente para generar las construcciones mediante el método libre de enzimas, utilizando oligonucleótidos específicos, confirmando los productos por secuenciación. Se realizaron los ensayos de expresión con el plásmido pET22-LmaCK1Δ285 en diversas cepas de *E. coli* (BL21 DE3⁺ pLys⁻, Shuffle, RosettaGami, HMS-174, Rosetta Blue y C41) y distintas condiciones de inducción (25°C toda la noche, o bien 37°C 4hs). La tabla 10 resume todas las condiciones evaluadas. En todos los casos, luego de la inducción se aislaron y analizaron por SDS-PAGE las fracciones de proteína total no inducida e inducida. Los resultados muestran que en todas las condiciones, la proteína recombinante LmaCK1Δ285-His se sobreexpresa en pequeñas cantidades, siendo la cepa HMS-174 inducida 4 hs a 37°C (figura 36), la que presenta mayores niveles de expresión. Se analizó si esta proteína se expresa de forma soluble en las fracciones citoplásmica o periplásmica. Por lo que se aislaron dichas fracciones y se analizaron por SDS-PAGE. Muestras de las fracciones inducida, no inducida, periplásmica, soluble e insoluble fueron analizadas por SDS-PAGE, observándose que la mayor cantidad de proteína se encuentra en la fracción insoluble.

Tabla 10. Resumen de condiciones de expresión como proteína de secreción evaluadas de LmaCK1.

VECTOR	CEPA	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (hs)
pET22b-CK1Δ285	BL21 (DE3)	37	4
	Shuffle	37	3,5
	RosettaTagami	37	3,5
	HMS-174	37	4
	HMS-174	25	on
	Rosetta Blue	37	4
	Rosetta Blue	25	on
	C41	37	4
	C41	25	on
pET22b-CK1Δ298	BL21 (DE3)	37	4
	Shuffle	37	3,5
	RosettaTagami	37	3,5
	HMS-174	37	4
	HMS-174	25	on
	Rosetta Blue	37	4
	Rosetta Blue	25	on
	C41	37	4
	C41	25	on

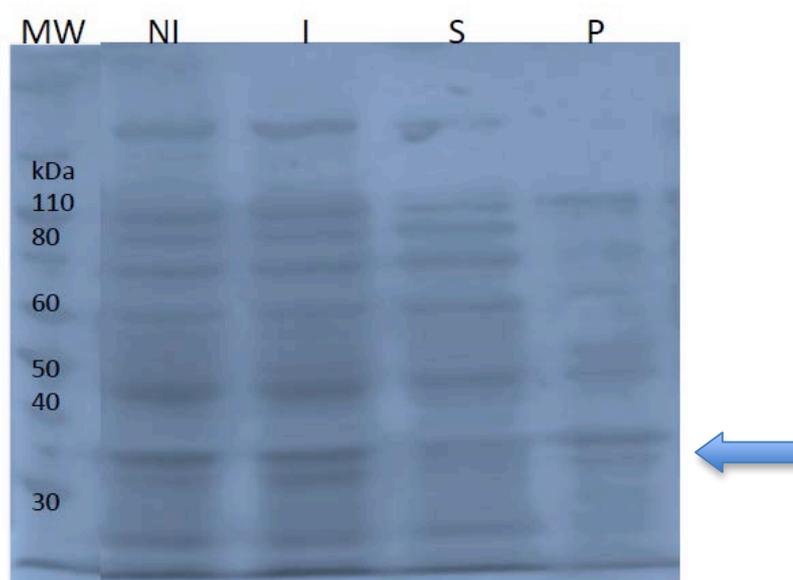


Figura 36. Análisis por SDS-PAGE de la expresión de LmaCK1Δ285 como proteína de secreción al periplasma de *E. coli* HMS174 cultivada a 37°C e inducida durante 4 horas. La proteína recombinante tiene un peso molecular aprox de 37kDa. NI=no inducido; S=inducido, fracción soluble; P=inducido, pellet insoluble; I=inducido, proteína total); MW=marcadores de peso molecular

Dado que LmaCK1 es una proteína eucariota, y teniendo en cuenta las eventuales dificultades que esto puede acarrear utilizando *E. coli* como sistema de expresión, se decidió evaluar su expresión usando células S2 de *Drosophila* como sistema de expresión heterólogo. Se subclonó LmaCK1 y sus versiones truncadas en dos vectores de expresión derivados del pMT-V5-His. El plásmido pT460 que permite la expresión de la proteína fusionada al péptido señal BIP que transporta la proteína de fusión BIP-LmaCK1-streptag al retículo endoplásmico para su posterior secreción. El plásmido pT353 carece de este péptido señal y por tanto permite la expresión citoplasmática de LmaCK1-streptag. Ambos son inducibles con cloruro de cadmio o sulfato de cobre y expresan la proteína fusionada en su extremo C-terminal a una etiqueta Strep-tag, que permite purificar la proteína por cromatografía de afinidad con estreptavidina.

Se estableció el cultivo de células S2 de *Drosophila* y se realizó la transfección de las células con el plásmido pT460-LmaCK1 Δ 285 o pT353-LmaCK1 Δ 285 y con el plásmido de selección pCoPuro. A las 2 semanas de selección de clones transfectantes se comenzó la adaptación de las células al medio libre de suero fetal bovino. Al mes de la transfección, se realizó un ensayo de expresión, con 20mL de cultivo, tomando muestras a los 1, 3, 5 y 7 días post-inducción con CdCl₂. El análisis por SDS-PAGE y Western blot con anticuerpos anti-Strep-tag confirman que efectivamente la proteína recombinante LmaCK1 Δ 285 se expresa, aunque en pequeñas cantidades en las células transfectadas con pT460-LmaCK1 Δ 285. La purificación de esta proteína por cromatografía de afinidad con estreptavidina rinde muy pequeñas cantidades de proteína, menos de 25 μ g/ litro de cultivo (si asumimos que se observa en el SDS-PAGE una banda de <50 ng). En estas condiciones, no hemos podido aún realizar estudios de cristalización, incluso si pensáramos en escalar el proceso en fermentador.

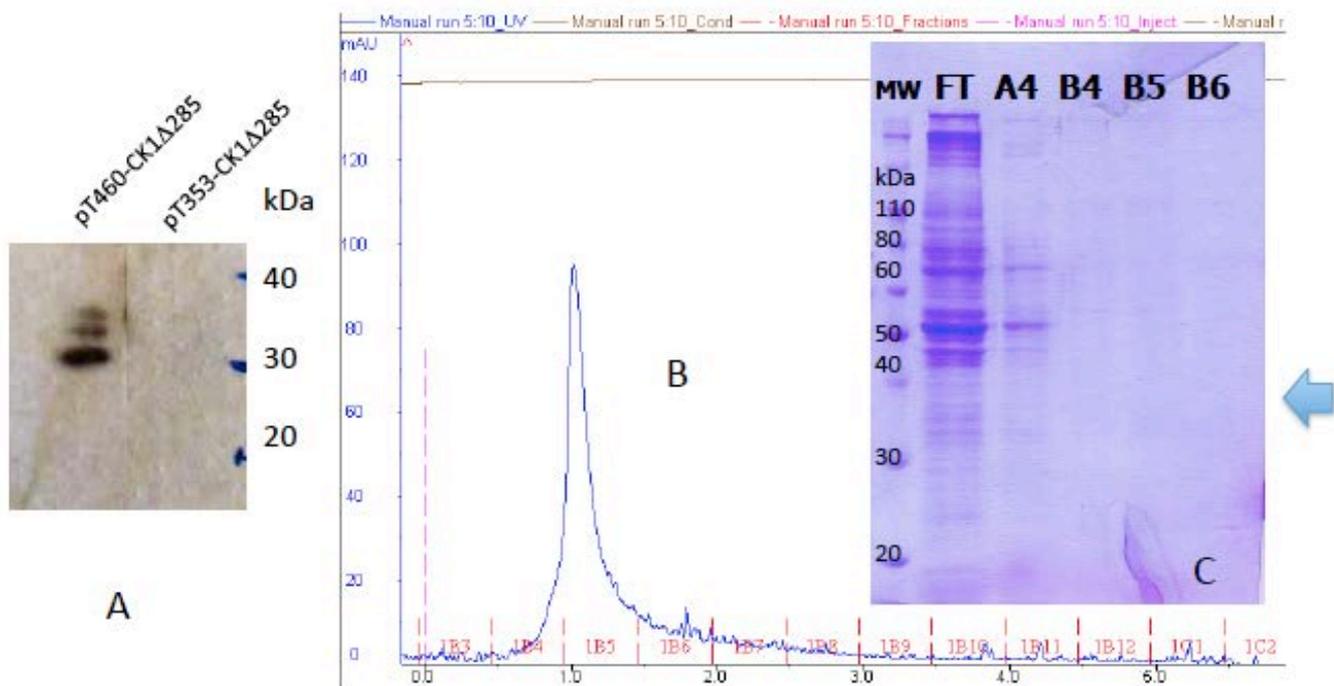


Figura 37. Análisis de la expresión y purificación de LmaCK1Δ285 a partir de células S2 de *Drosophila* transfectadas con el vector pT460-LmaCk1Δ285. A) Análisis por western blot de la expresión de LmaCk1Δ285 y LmaCk1Δ298 en extractos totales de células S2 transfectadas. Se utilizó el anticuerpo anti-Strep-tag para detectar las proteínas recombinantes. B) Cromatograma de elución de la purificación de LmaCk1Δ285 por columna de estreptatina. C) Análisis de las fracciones obtenidas durante la purificación de LmaCk1Δ285 por SDS-PAGE.

iii) La MAPK LmaMPK4

Se clonó la secuencia codificante de LmaMPK4 en el vector de expresión pTricHis mediante el método de clonado convencional por PCR y enzimas de restricción. Se transformó la cepa de *E. coli* BL21 y se evaluó la expresión soluble de la quinasa. En la figura 37 se muestra el análisis por SDS-PAGE donde se observa la expresión de una banda del tamaño esperado en el cultivo inducido. La identidad de esta proteína se confirmó por espectrometría de masa, coincidiendo con LmaMPK4. Sin embargo, LmaMPK4, en estas condiciones de cultivo se expresó mayoritariamente de forma insoluble (fig 38).

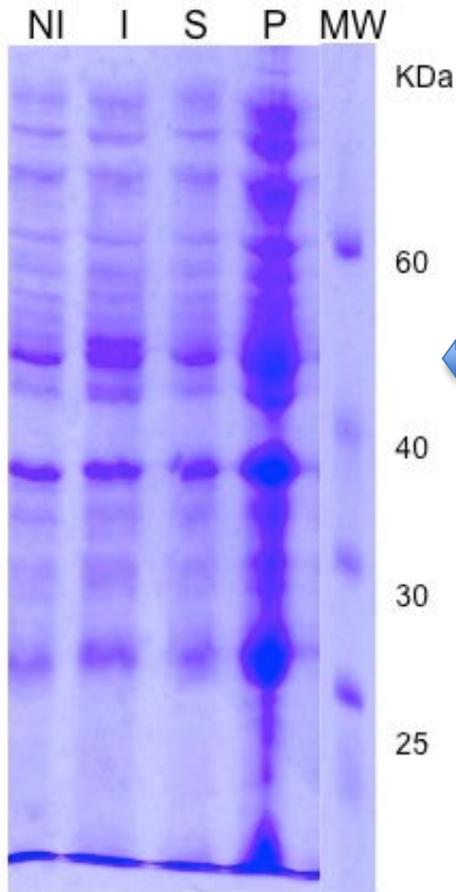


Figura 38. Análisis por SDS-PAGE (10%) del cultivo no inducido (NI) e inducido con 1 mM IPTG (I) de la cepa BL21 (DE3) pLysS transformada con el vector pTricHis-LmaMPK4 a 20°C ON. Las fracciones S = fracción soluble y P= fracción insoluble; se obtuvieron por centrifugación diferencial a 15000g

Posteriormente se clonó la secuencia codificante de LmaMPK4 en los vectores de expresión pQE80 y pET28a por el método de clonado sin enzimas de restricción (pQE80 y pET28a). Dicho clonado se verificó por secuenciación. El trabajo con estos 2 últimos vectores formó parte de la tesina de final de carrera y beca de iniciación a la investigación ANII del Lic. Juan Andrés Imelio, que yo co-orienté en nuestro laboratorio.

Se realizaron ensayos de expresión en cultivos a pequeña escala a 37°C utilizando las cepas de *E. coli* BL21, TOP10F', HMS174, C41 y RosettaBlue. Se analizó por SDS-PAGE el extracto total y las fracciones soluble e insoluble por SDS-PAGE (Fig. 39). Se observa una sobre-expresión de LmaMPK4 en todas las cepas evaluadas. Sin embargo, la banda esperada de aproximadamente 44 kDa se observa mayoritariamente en las fracciones insolubles. Solo en las fracciones solubles de las cepas BL21 y HMS174, se aprecia una tenue banda del tamaño esperado. Decidimos por ello estudiar en mayor detalle la sobre-expresión de LmaMPK4 en las cepas BL21 y HMS174 a 20°C, en búsqueda de obtener un mejor rendimiento de LmaMPK4 soluble.

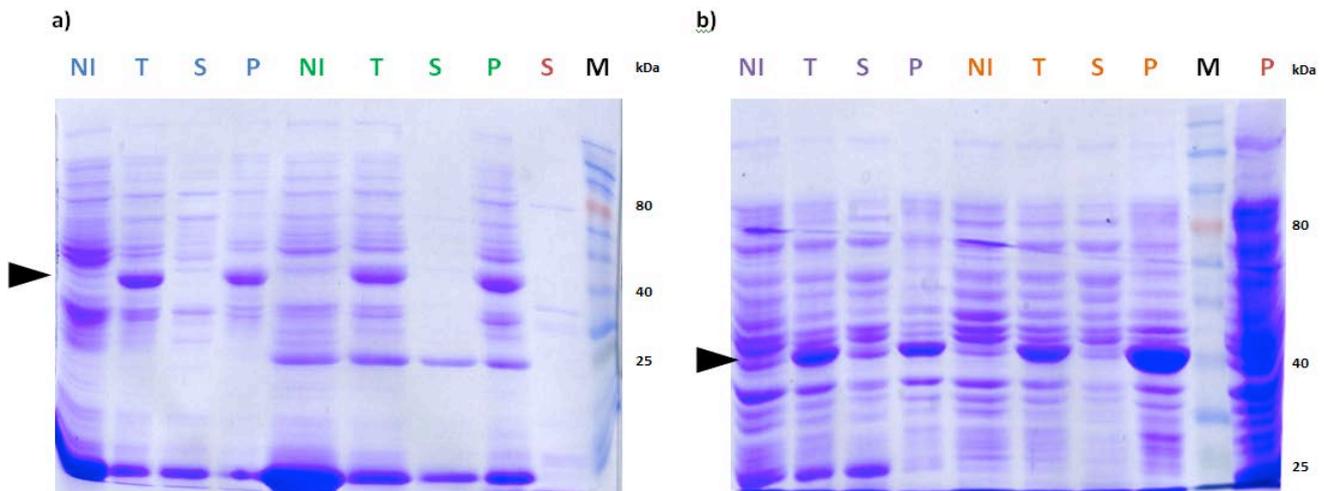


Figura 39. Análisis por SDS-PAGE (10%) de la expresión de LmaMPK4 usando el plásmido de expresión pQE80 a 37°C por 3 hs. en las cepas de *E. coli*: (a) TOP10F' (azul), RosettaBlue (verde) y C41 (rojo); (b) BL21 (violeta), HMS174 (naranja) y C41 (rojo). Para la inducción se utilizó IPTG 1 mM. Se sembraron 15 μ L de muestra con β -mercaptoetanol en cada pocillo, con previa desnaturalización a 100°C por 5 min. Las flechas negras indican la banda correspondiente a LmaMPK4 (peso molecular teórico: 44 kDa). NI: fracción no inducida; T: extracto total; S: fracción soluble; P: fracción insoluble; M: marcadores de peso molecular.

El análisis por SDS-PAGE de las fracciones obtenidas a 20 °C (Figura 40) reveló un mayor rendimiento en la producción de LmaMPK4 soluble, en relación a la expresión a 37 °C. La banda de mayor intensidad correspondiente a proteína soluble fue observada con la cepa BL21. De cualquier modo, la expresión de LmaMPK4 en todos los casos siguió siendo mayoritariamente insoluble.

Con el objetivo de confirmar la identidad de la proteína sobre-expresada, así como de evaluar si el rendimiento obtenido por litro de cultivo es suficiente para nuestros subsiguientes estudios, se realizaron ensayos de expresión en 0,5 L de cultivo (BL21 inducida ON a 20 °C), se separó la fracción soluble y se purificó mediante IMAC en condiciones nativas (Figura 41). Se realizó una elución por gradiente de imidazol, se analizó la pureza y rendimiento por SDS-PAGE y Western blot. Se observa la presencia proteínas de diferentes tamaños que eluyen como contaminantes inespecíficos.

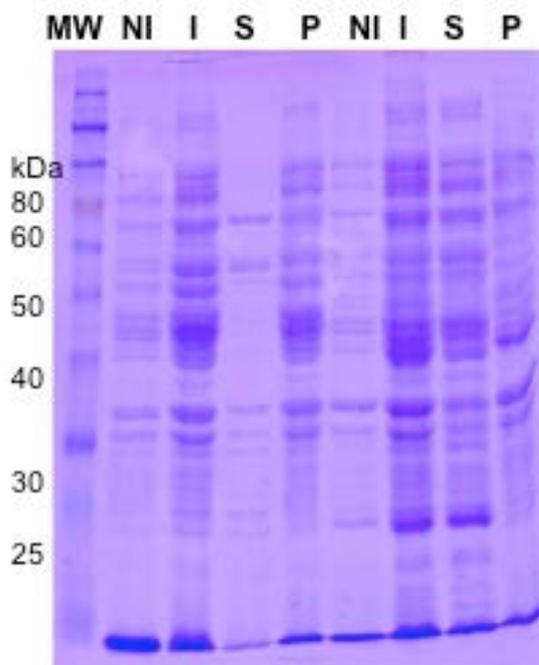


Figura 40. Análisis por SDS-PAGE 10% de la expresión de pQE80-LmaMPK4 a 20°C o.n. en distintas cepas de *E. coli* HMS174 (izquierda) y BL21 (derecha) NI: fracción no inducida; I: extracto total; S: fracción soluble; P: fracción insoluble; MW: marcadores de peso molecular.

En el SDS-PAGE de la figura 42 se observa el análisis de la purificación de LmaMPK4 a partir de la cepa BL21. Se observa una banda de aproximadamente 44kDa que podría corresponder a LmaMPK4, en las fracciones de elución C4 a C8. Sin embargo, por espectrometría de masas, se determinó que LmaMPK4 se ubica en una banda de menor peso molecular, más tenue, que se observa claramente en C8. De esta manera, se determinó la presencia LmaMPK4 en forma soluble, aunque en bajas cantidades (menos de 1µg por litro de cultivo). Adicionalmente, tras purificación por afinidad a níquel se determinó que la proteína eluye con contaminantes. Estas cantidades de proteína son insuficientes para posteriores estudios estructurales.

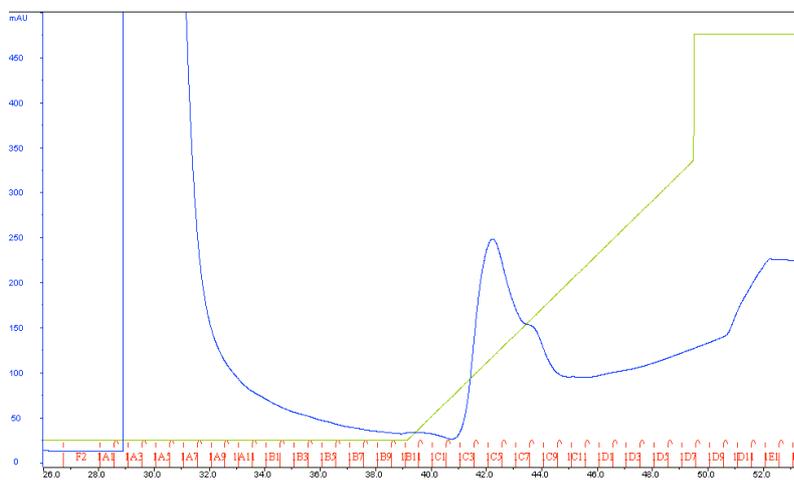


Figura 41. Cromatograma de purificación por afinidad a níquel de fracción soluble de BL21 tras expresión a 20°C. Gráfico azul: perfil de elución (mU A₂₈₀ vs mL elución); gráfico verde: gradiente lineal de imidazol (4-100% en 30 mins.).

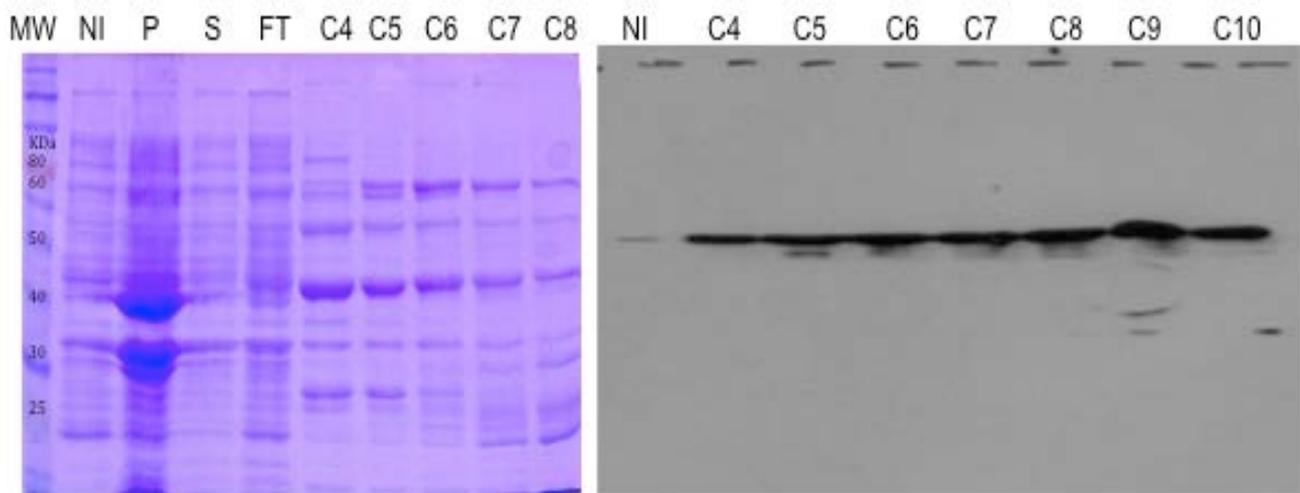


Figura 42. **(a)** Evaluación por SDS-PAGE de las fracciones eluidas C4 a C8. Se incluyó en el análisis las fracciones no inducida (NI), insoluble (P), soluble (S) y *flowthrough* o componentes no unidos a la columna (FT). MW: marcadores de peso molecular. **(b)** Western blot revelado con anticuerpo anti-His-tag de las fracciones eluidas C4 a C10 y la fracción no inducida. La señal del anticuerpo secundario se observó cerca de los ~44 kDa.

Con el fin de optimizar el paso de purificación por afinidad a metal inmovilizado, se empleó alternativamente cromatografía de afinidad a cobalto (Figura 43a). El pico de absorbancia del cromatograma de elución fue analizado por SDS-PAGE (Figura 43b). Se identifica un banda tenue del tamaño esperado para LmaMPK4 y muchas otras bandas que podrían ser contaminantes. Adicionalmente, teniendo en cuenta el punto isoelectrico de LmaMPK4 (~6,2), se realizó cromatografía de intercambio iónico con buffer A (20 mM Tris pH 8,5, 100 mM NaCl) y un gradiente lineal de buffer B (20 mM Tris pH 8,5, 500 mM NaCl). Dado que a pH 8,5 la proteína se encuentra cargada negativamente, se empleó una matriz cargada positivamente (monoQ, GE) para permitir su unión (intercambio aniónico). El análisis por SDS-PAGE de los eluatos correspondientes a los picos de absorbancia no reveló presencia detectable de LmaMPK4 (datos no mostrados).

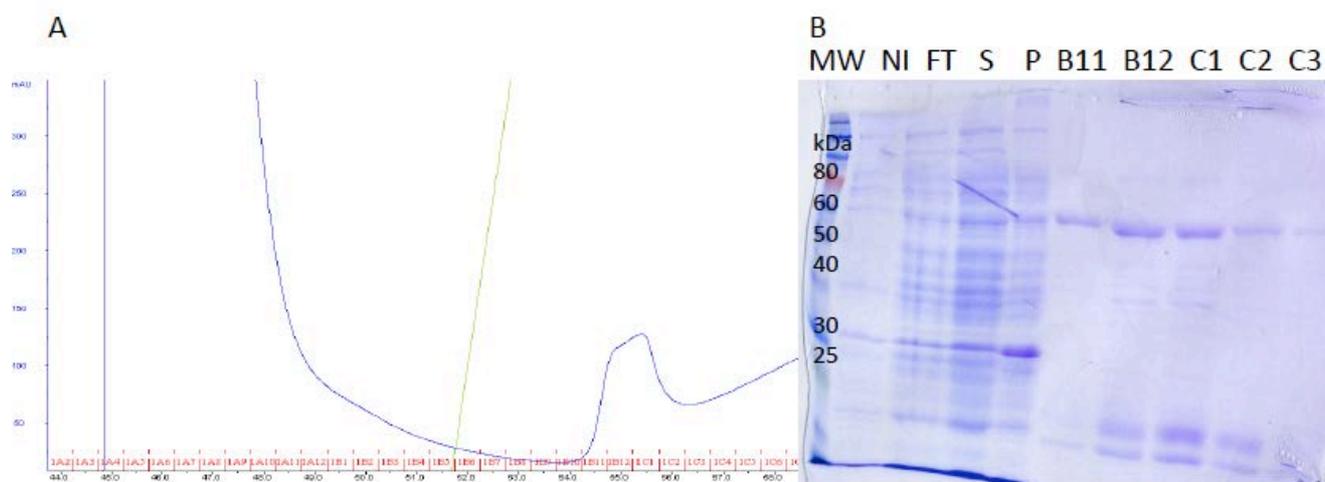


Figura 43. (a) Cromatograma de purificación por afinidad a cobalto de fracción soluble de BL21 tras expresión a 20 °C. Gráfico azul: perfil de elución (mUA₂₈₀ vs mL elución); gráfico verde: gradiente lineal de imidazol (4-100% en 30 mins.). (b) Evaluación del pico de absorbancia por SDS-PAGE (10% acrilamida) de los eluatos B11 a C3, sembrando 20 µL de muestra con b-mercaptoetanol en cada pocillo. Se incluyó en el análisis las fracciones no inducida (NI), soluble (S), insoluble (P) y *flowthrough* (FT), sembrando 10 µL de muestra con β-mercaptoetanol en cada pocillo. En todos los casos se desnaturalizó a 100°C por 5 mins. M: marcadores de peso molecular. La flecha negra indica la banda correspondiente a PK4 (peso molecular teórico: 44 kDa).

Avanzando en la exploración de alternativas para expresar LmaMPK4 en forma soluble, se ensayó la inducción de la expresión de la proteína bajo el control transcripcional de un promotor que emplea la polimerasa T7, de distinto origen (a partir del vector pET28a). Se realizaron ensayos de expresión a pequeña escala (10 mL de cultivo) a 37°C mediante inducción con 1m IPTG utilizando las cepas de *E. coli* BL21, C41 y RosettaBlue, y se analizó el extracto total y las fracciones soluble e insoluble por SDS-PAGE (Figuras 44 a, b, c). Se logró sobre-exresar LmaMPK4 en todas las cepas, sin embargo, el cambio de promotor no resultó en una mejora del rendimiento de expresión soluble: LmaMPK4 nuevamente se mostró presente mayoritariamente como especie insoluble (excepto en la cepa BL21 donde ni siquiera se detectó sobre-expresión).

Ante la posibilidad de tener una baja cantidad de expresión soluble, pero que pudiera ser escalable, se decidió proceder con un ensayo de purificación por afinidad a níquel partiendo de mayor volumen de cultivo (500 mL), induciendo a 37°C, y utilizando la cepa Rosetta Blue de *E. coli*. El perfil de elución mediante gradiente lineal de imidazol no reveló presencia detectable de LmaMPK4 (datos no mostrados).

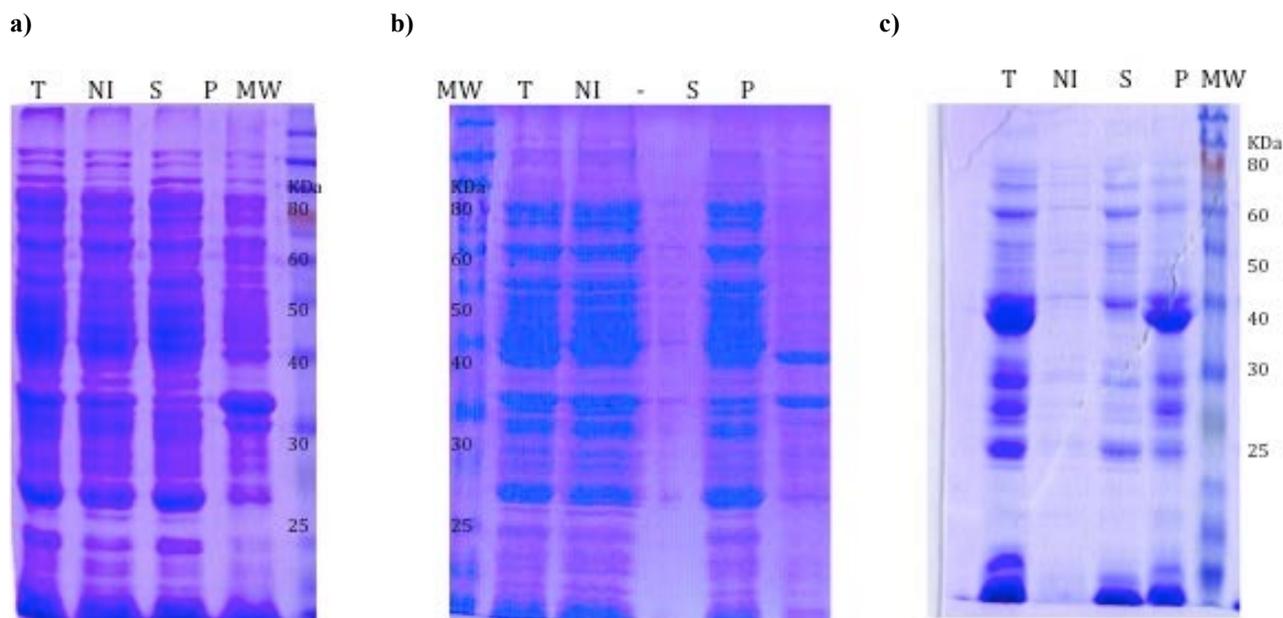


Figura 44. Análisis por SDS-PAGE al 10% de la expresión de LmaMPK4 en vector pET28a a 37°C por 3 hs. en las cepas de *E. coli*: **(a)** BL21, **(b)** C41 y **(c)** Rosetta Blue. Para la inducción se utilizó IPTG 1 mM. NI: fracción no inducida; T: extracto total; S: fracción soluble; P: fracción insoluble; MW: marcadores de peso molecular.

Muchas veces, las proteínas heterólogas se expresan como fusión a otra proteína para facilitar su plegamiento y/o aumentar su solubilidad. Se decidió trabajar en colaboración con el Dr. Agustín Correa, que generó la construcción en fusión con la proteína DsbC en el vector pET (Correa *et al.*, 2014). La secuencia aminoacídica de LmaMPK4 recombinante consta de 385 aminoácidos, un peso molecular teórico de 44 kDa y un punto isoeléctrico de 6.12. La fusión DsbC-PK4 posee 605 aminoácidos, un peso molecular teórico de 68 kDa y un punto isoeléctrico de 6,21. La etiqueta de histidinas es agregada al extremo amino terminal de DsbC recombinante e interrumpe su traslocación al periplasma, truncando la secuencia señal de traslocación (DDAAIQQTLAKMGIKSSDIQ) y recluyendo a la pLmaMPK4 en el citoplasma bacteriano.

Con el fin de evaluar la expresión de la fusión DsbC-PK4, se realizaron ensayos de expresión en 10 mL de cultivo tanto a 37 °C por 3 horas, como a 20 °C por 14 horas. Las muestras no inducida, total, soluble e insoluble fueron posteriormente analizadas por SDS-PAGE (Figura 45). Se observó que la expresión de LmaMPK4 fusionada a DsbC (aprox 68kDa) se expresó mayoritariamente insoluble, aunque se pudo apreciar una tenue banda a la altura del peso esperado, en la fracción soluble tanto a 20 °C como a 37 °C.

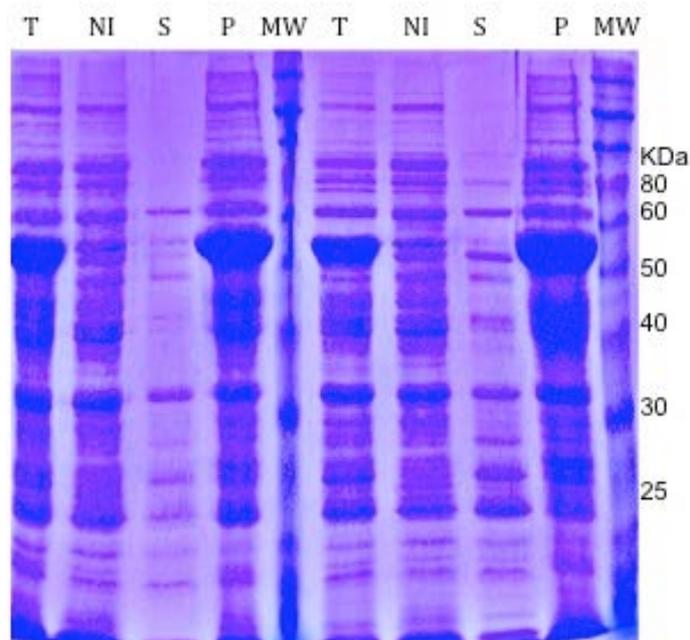


Figura 45. Análisis por SDS-PAGE al 10% de la expresión de DsbC-LmaMPK4 en vector pET, cepa Rosetta. A 37 °C por 3 hs. (izquierda) y a 20 °C por 14 hs (derecha). Para la inducción se utilizó IPTG 1 mM. NI: fracción no inducida; T: extracto total; S: fracción soluble; P: fracción insoluble; MW: marcadores de peso molecular.

Teniendo en cuenta el análisis por SDS-PAGE, para la purificación por afinidad a níquel se realizó ensayo de expresión con 1L de cultivo a 20 °C. A modo de poner a punto el protocolo de purificación de la fusión DsbC-PK4, se empleó gradiente de imidazol tanto lineal (4 a 100% en 1 hora) como escalonado (escalones de 20, 40, 65 y 100 %). El perfil de elución por gradiente lineal de imidazol mostró tres picos de absorbancia solapados a 18, 30 y 40% de imidazol agregado, respectivamente (Figura 46a). En el análisis por SDS-PAGE se observó en los tres picos una banda tenue de aproximadamente 65 kDa que corresponde a DsbC-PK4, obteniéndose en mayores cantidades que en la purificación de LmaMPK4 sin fusión, aunque aún en presencia de contaminantes. Este resultado fue confirmado por MS. Se observó que DsbC-PK4 migra en el gel entre dos bandas intensas correspondientes a dos contaminantes mayoritarios que eluyen de forma reproducible (Figura 46b).

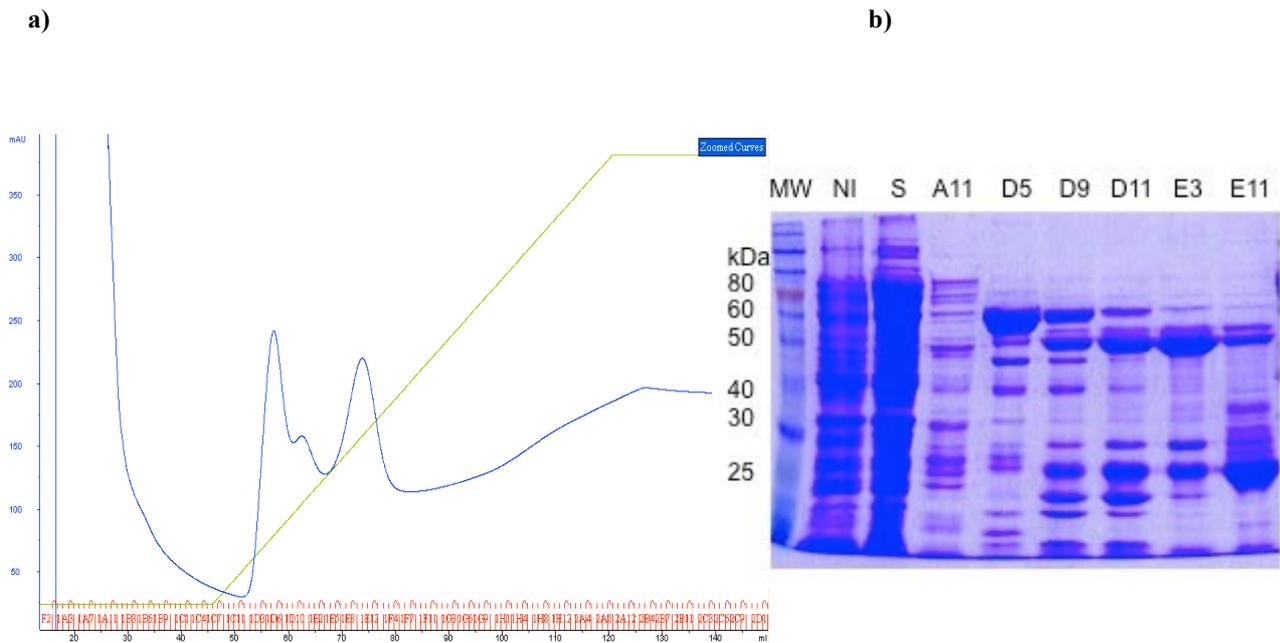


Figura 46. (a) Cromatograma de purificación por afinidad a níquel de fracción soluble de Rosetta tras expresión a 20 °C. Gráfico azul: perfil de elución (mUA₂₈₀ vs mL elución); gráfico verde: gradiente lineal de imidazol (4-100% en 1 h.). (b) Evaluación del pico de absorbancia por SDS-PAGE (10% acrilamida) de los eluatos A11, D5, D9, D11, E3 y E11, sembrando 20 µL de muestra con b-mercaptoetanol en cada pocillo. Se incluyó en el análisis las fracciones no inducida (NI), soluble (S), insoluble (P) y *flowthrough* (FT), sembrando 10 µL de muestra con b-mercaptoetanol en cada pocillo. En todos los casos se desnaturalizó a 100 °C por 5 mins. M: marcadores de peso molecular. La flecha negra indica la banda correspondiente a DsbC-PK4 (peso molecular teórico: 68 kDa).

Alternativamente, tras ensayo de expresión con 1 L de cultivo a 20 °C por 14 hs, se realizó purificación por afinidad a níquel empleando escalonado de imidazol, partiendo inicialmente desde 4% de imidazol y aumentando su concentración de forma escalonada a 20, 40, 65 y 100% de imidazol (Figura 47a). El perfil de elución mostró cuatro picos de absorbancia de aproximadamente 900, 300, 200 y 250 mUA en los escalones de 20, 40, 65 y 100% de imidazol, respectivamente. Los picos fueron analizados por SDS-PAGE (Figura 47b), donde se vio que DsbC-PK4 eluye a concentraciones de 40, 65 y 100% de imidazol, siendo la fracción más pura la obtenida a una concentración de 100% de imidazol. También se observaron las bandas intensas a 20 y 40% de imidazol, correspondientes a los contaminantes mayoritarios que eluyen de manera reproducible. Se determinó por espectrometría de masa la presencia de DsbC-PK4 soluble (Figuras 47) y la identidad de estos contaminantes: la decarboxilasa de UDP-glucuronato (dUGA; peso molecular teórico: 73 kDa) y la chaperonina GroEL/ES (peso molecular teórico: 55 kDa) de *E. coli*. La banda mayoritaria observada a la altura de los 25 kDa corresponde a DsbC nativa monomérica.

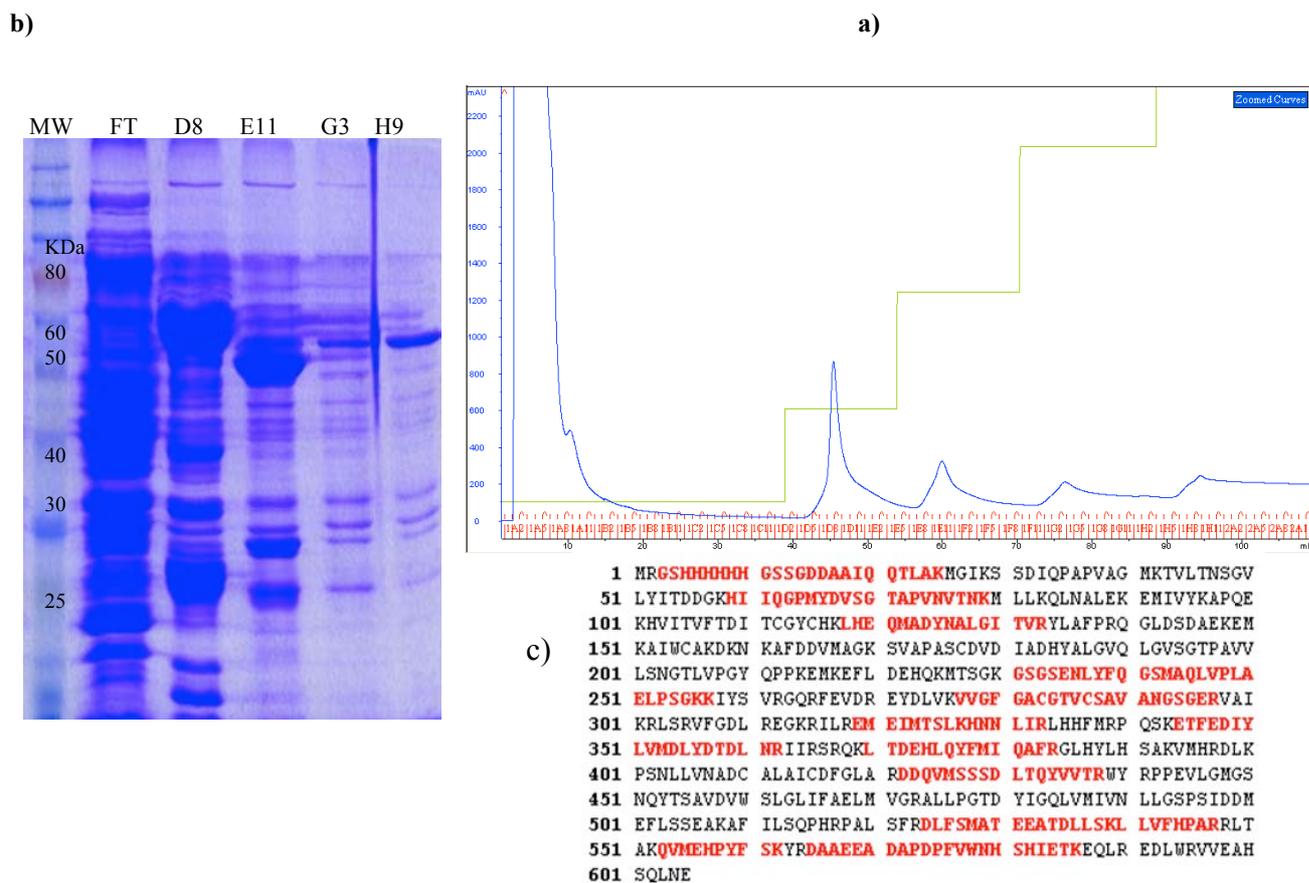


Figura 47. (a) Cromatograma de purificación por afinidad a níquel de fracción soluble de Rosetta tras expresión a 20 °C. Gráfico azul: perfil de elución (mUA₂₈₀ vs mL elución); gráfico verde: gradiente escalonado de imidazol (4, 20, 40, 65 y 100%). (b) Análisis por SDS-PAGE (10% acrilamida) de los eluatos D8, E11, G3 y H9, sembrando 20 µL de muestra con β-mercaptoetanol en cada pocillo. Se incluyó en el análisis el *flowthrough* (FT), sembrando 10 µL de muestra con β-mercaptoetanol. En todos los casos se desnaturizó a 100 °C por 5 mins. M: marcadores de peso molecular. DsbC-PK4 tiene un peso molecular teórico: 68 kDa. (c) Péptidos identificados por espectrometría de masa. Se indican en rojo los aminoácidos identificados con el análisis de la banda correspondiente a DsbC-PK4 recombinante, extraída del gel de poliacrilamida. Los aminoácidos identificados se muestran sobre la secuencia de DsbC-PK4 clonada. Se obtuvo una cobertura de secuencia del 38%.

Partiendo de un cultivo de 1 L e induciendo a 20 °C por 14 hs, se eligió proceder realizando escalonado de imidazol. Para intentar deshacernos del contaminante dUGA, que eluye a una concentración de 20% de imidazol, se partió inicialmente con 20% de buffer B y posteriormente se emplearon escalones de 40, 65 y 100% (Figura 48a), donde en todos se había constatado la elución de DsbC-PK4 (Figura 46). El perfil de elución muestra dos picos de absorbancia (de 600 y 400 mUA, aproximadamente), que fueron analizados por SDS-PAGE (Figura 48b). Se observó en el gel la presencia de bandas a la altura del tamaño esperado de DsbC-PK4, de mayor intensidad que las observadas en gel tras la purificación de LmMPK4 sin fusión.

La fusión eluyó tanto en el escalón de buffer B 40% como de 65%, siendo mayoritaria la

elución en éste último. No se observó posterior elución de la fusión tal como se vio en la Figura 48b, donde DsbC-PK4 eluye con la menor cantidad de contaminantes a 100% de imidazol. Cabe aclarar que la banda intensa correspondiente al eluato C7, rondando los 60 kDa, corresponde al contaminante GroEL/ES, y no a DsbC-PK4. Se observa claramente que dicha proteína migra inmediatamente por debajo de DsbC-PK4 en el eluato C10 (Figura 48b). De esta manera, es la primera vez que se obtiene PK4 soluble en cantidades significativas, de acuerdo a lo analizado por SDS-PAGE e identificado por espectrometría de masa. El corte con la proteasa TEV resultó en la precipitación de PK4, por lo que se trabajó con la fusión en la búsqueda de obtener cristales que difracten rayos X. Así, fueron seleccionados los eluatos D6 a D13 (10 mL de muestra) para el paso de purificación adicional.

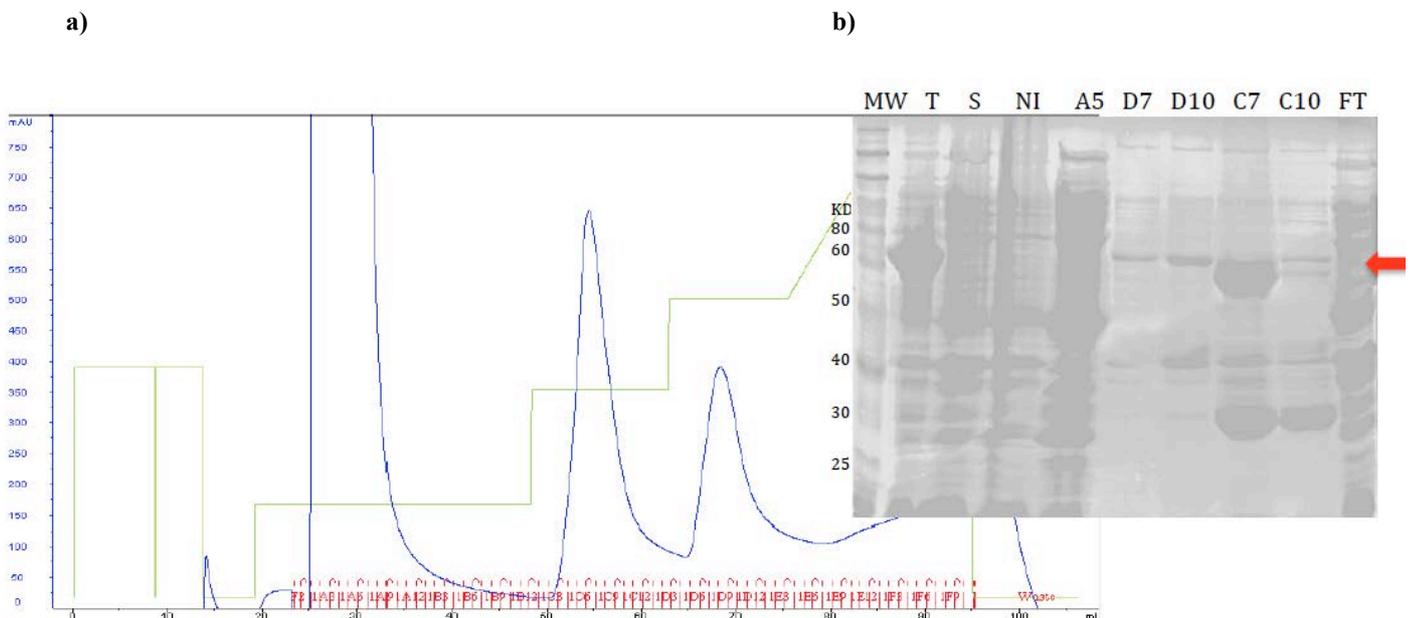


Figura 48. (a) Cromatograma de purificación por afinidad a níquel de fracción soluble de Rosetta tras expresión a 20 °C. Gráfico azul: perfil de elución (mUA280 vs mL elución); gráfico verde: gradiente escalonado de imidazol (20-40-65-100%). (b) Evaluación de los picos de absorbancia por SDS-PAGE (10% acrilamida) de los eluatos A5, C7, C10, D7 y D10. Se sembraron 20 μ L de muestra con b-mercaptoetanol en cada pocillo. Se incluyó en el análisis el extracto total (T) y las fracciones no inducida (NI), soluble (S), insoluble (P) y “flowthrough” o componentes no adsorbidos a la columna (FT), donde se sembraron 5 μ L de muestra con b-mercaptoetanol. En todos los casos se desnaturalizó a 100 °C por 5 mins. M: marcadores de peso molecular. La flecha roja indica la banda correspondiente a DsbC-PK4 (peso molecular teórico: 68 kDa).

El paso adicional de purificación consistió en una cromatografía de exclusión molecular por

gel filtración, en condiciones nativas. El perfil de elución (Figura 49) mostró un pico de absorbancia a 280nm de aproximadamente 120 mUA a los 116 mL de volumen total eluido. El cálculo del peso molecular de DsbC-PK4, sustituyendo su volumen de elución en la ecuación observada en la Figura 20a correspondiente a la curva de calibración de la columna, determinó que el tamaño aproximado de DsbC-PK4 es de 730 kDa, por lo que podría tratarse de un decámero. Ensayos paralelos de dispersión de luz visible fueron consistentes con una estructura cuaternaria decamérica de la fusión DsbC-PK4 (datos no mostrados; Agustín Correa, comunicación personal). De esta manera, pensamos que DsbC y PK4 pueden estar interaccionando mediante puentes disulfuro: las condiciones oxidantes pudieron ser aportadas por el buffer utilizado en la cromatografía de afinidad, que otorga un pH 8 que hace muy reactivos a los tioles (Nozach *et al.*, 2013). Para verificar esta hipótesis, se analizó la fusión por SDS-PAGE con y sin b-mercaptoetanol (Figura 50). El análisis por gel muestra idéntica migración de DsbC-PK4 con y sin agente reductor, lo cual descarta posibles interacciones mediante enlaces disulfuro covalentes.

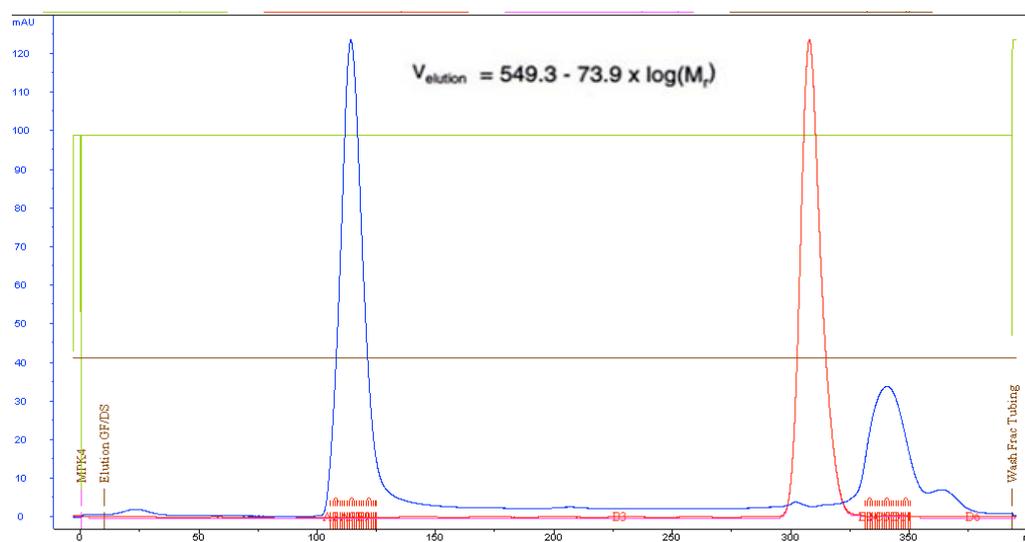


Figura 49. Segundo paso de purificación por gel filtración de los eluatos D7 a D10 correspondientes a la cromatografía de afinidad a níquel mediante gradiente escalonado de imidazol (Figura 18). Se utilizó la columna 26/60 HiLoad Superdex 200. Gráfico azul: perfil de elución; gráfico rojo: conductancia. En la parte superior de la figura se observa la ecuación de la función de calibración de la columna. $V_{elution}$: volumen de elución en mL; $\log(M_r)$: logaritmo decimal del peso molecular.

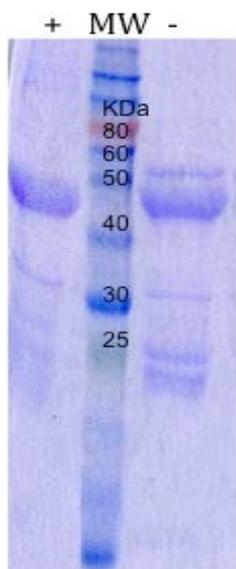


Figura 50. Análisis por SDS-PAGE al 10% de fracción insoluble de cepa Rosetta con (+) y sin (-) agente reductor (β -mercaptoetanol) tras sobreexpresión de DsbC-PK4 con IPTG 1 mM. Las muestras fueron previamente resuspendidas en urea 8 M, y desnaturalizadas calentando a 100 °C por 5 mins. M: marcadores de peso molecular.

En colaboración con Agustín Correa, se probaron construcciones adicionales que permiten la expresión de PK4 fusionada a dominios conocidos por mejorar niveles de expresión soluble de proteínas blanco; en este contexto, se sobreexpresó PK4 fusionada por su dominio N-terminal a la proteína de unión a maltosa (MBP), lo cual no resultó en un aumento significativo de rendimiento de PK4 soluble (datos no mostrados).

Las fracciones correspondientes al pico obtenido en la cromatografía de exclusión molecular fueron acumuladas reduciéndose en una única muestra, para luego ser concentrada con dispositivos centrifugables. El análisis espectrofotométrico a 280 nm determinó que, tras dos pasos de purificación y concentración de la muestra, se obtuvieron 8 mg/mL de DsbC-PK4. Sin embargo, este valor no es representativo de su cantidad total, debido a que la muestra presenta contaminantes minoritarios que, a su vez, pueden interferir con la cristalogénesis de la proteína de interés.

Hasta el momento se rastrearon 384 condiciones iniciales independientes de cristalogénesis por difusión de vapor en gota sentada a 20 °C. La proteína DsbC-PK4 estaba disuelta en el buffer de elución de la columna de gel filtración. En el ensayo se obtuvieron pequeños cristales (Figuras 51a, 52a) en dos condiciones diferentes del rastreo de cristalogénesis, conteniendo respectivamente 0,1 M CAPS pH 10.5 y 40% (v/v) MPD (Figura 23); y 1 M LiCl₂, 0.1 M Tris pH 8.5 y 20% (p/v) PEG 6000 (Figura 24) en sus respectivos reservorios. En ambos casos, los cristales se formaron en la gota compuesta por DsbC-LmaMPK4, 5 mM AMP-PCP y 10 mM MgCl₂. Los cristales seleccionados fueron evaluados por difracción por rayos X, donde los patrones de difracción (Figuras 51b, 52b) mostraron que ninguno de los

cristales se componen de nuestra proteína de interés, debido a la ausencia de un patrón de difracción esperable para una proteína del tamaño y complejidad de DsbC-PK4. Probablemente, los cristales obtenidos correspondan a sales o pequeños péptidos que no corresponden a la proteína de interés.

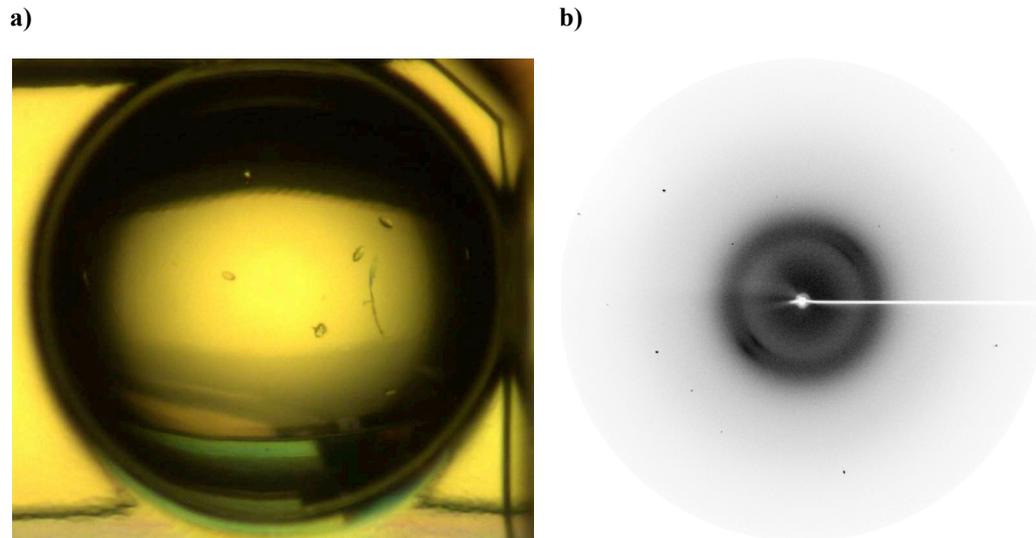


Figura 51. (a) Cristales obtenidos en el rastreo de cristalogénesis de la muestra con DsbC-PK4 en gota sentada, en reservorio compuesto de 0,1 M CAPS pH 10,5 y 40% (v/v) MPD. Los cristales se formaron en la gota compuesta de muestra proteica (DsbC-PK4), AMP-PCP 5 mM y $MgCl_2$ 10 mM. (b) Patrón de difracción de rayos X obtenido para los cristales.

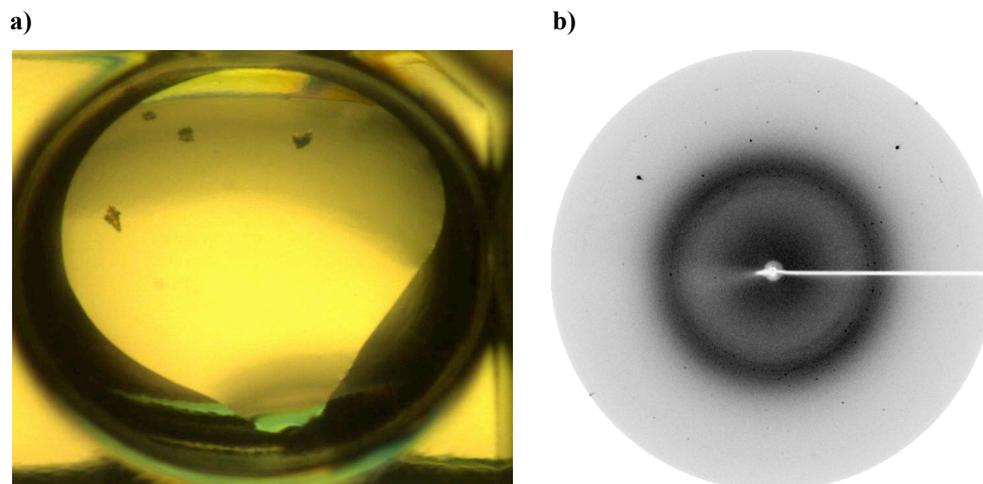


Figura 52. (a) Cristales obtenidos en el rastreo de cristalogénesis de la muestra con DsbC-PK4 en gota sentada, en reservorio de 90 uL compuesto de 1 M $LiCl_2$, 0,1 M Tris pH 8,5 y 20% (p/v) PEG 6000. Los cristales se formaron en la gota compuesta de muestra proteica (DsbC-PK4), AMP-PCP 5 mM y $MgCl_2$ 10 mM. (b) Patrón de difracción de rayos X obtenido para los cristales.

iv) La MAPK LmaMPK10

El inserto codificante de LmaMPK10 fue subclonado por PCR desde el vector pGEM (cedido amablemente por G. Spaeth, Institut Pasteur, Paris) al vector de expresión pQE80-TEV. Se utilizaron primers específicos con extremos 5' con sitios para las enzimas de restricción que permitieron el correcto clonado. El clonado se verificó por secuenciación automática.

Se realizaron ensayos de expresión con el vector pQE80-TEV-LmaMPK10 en la cepa de *E. coli* Top10 F', a 20°C y 37°C con inducción con 1mM IPTG ON ó 4 hs, respectivamente. Las fracciones de cultivo inducidas y no inducidas, así como el fraccionamiento de las proteínas solubles e insolubles se analizaron por SDS-PAGE (Fig. 53). Se observó la inducción de una proteína del peso molecular esperado (~45 kDa). El análisis de las fracciones soluble e insoluble mostró que una gran fracción de la proteína sobre-expresada se expresa de forma soluble, y esto es más notorio cuando se induce a 20°C (Fig. 53).

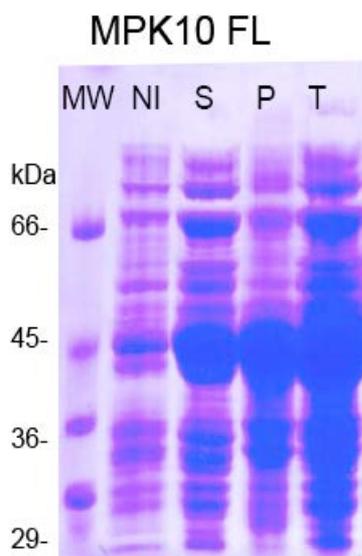


Figura 53. Análisis por SDS-PAGE de la expresión de LmaMPK10 FL (*full lenght*) en *E. coli* Top10F' y distribución de las fracciones Soluble (S) e insoluble (P). (T) corresponde al extracto de proteínas totales. (NI) corresponde al extracto total de proteínas de un cultivo no inducido. Las células Top10F' fueron cosechadas, lisadas y fraccionadas el S y P por centrifugación. El gel de acrilamida se realizó al 10 % y se tiñó con azul de Coomassie.

Expresión y purificación de LmaMPK10

Con el fin de purificar LmaMPK10 se escaló el proceso de expresión. Se realizó un cultivo de un litro inducido para la expresión de LmaMPK10 ON a 20°C. Las células se cosecharon, se lisaron y se obtuvo la fracción soluble por centrifugación a 15000g. Se realizó un primer paso de purificación en cromatografía de afinidad a metales a partir de la fracción de proteínas. Se aplicó un gradiente lineal de imidazol para la elución de las proteínas unidas a la columna en el cual se obtuvo un pico de elución de más de 2UAbs de aproximadamente 4mL (Fig. 54). Todas las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación fueron analizadas por SDS-PAGE (Fig. 54), confirmando la purificación de una proteína de aproximadamente 45kDa con muy buen rendimiento. La identidad de la proteína mayoritaria fue analizada por MS, siendo identificada como LmaMPK10. Mediante la cuantificación por espectrofotometría de las proteínas purificadas se realizó un estimativo del rendimiento de LmaMPK10 soluble, siendo de 7-10mg/L de cultivo. Este resultado permitió continuar con los objetivos de la tesis descritos anteriormente.

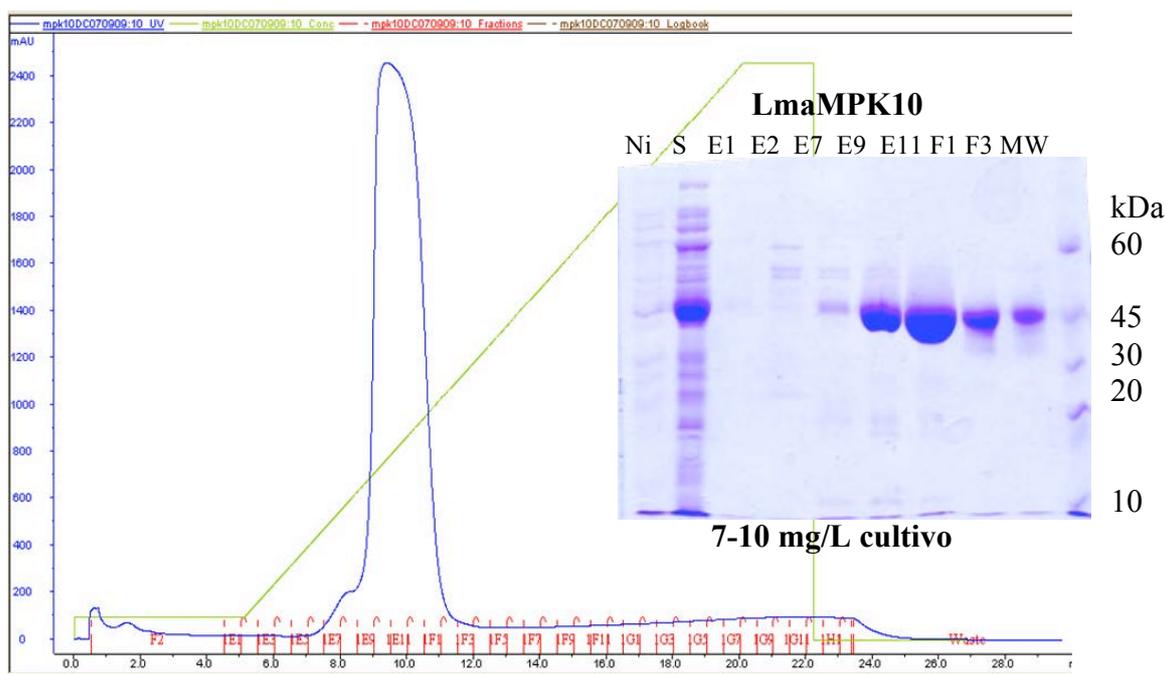


Figura 54. Cromatograma de elución de His-LmaMPK10 por IMAC. LmaMPK10 se purificó a partir de la fracción soluble (S) de un cultivo de 1L de LB crecido on a 20°C. Las fracciones del cultivo no inducido (NI), la fracción soluble de proteínas (S) así como las diferentes fracciones colectadas durante la IMAC se analizaron por SDS-PAGE (10%).

La construcción empleada para la expresión de LmaMPK10, agrega una etiqueta de histidinas en el extremo N-t de la proteína. Si bien esto es muy útil para la purificación de la proteína de interés, otras veces puede afectar el comportamiento de la proteína en subsiguientes aplicaciones. Por este motivo se intentó remover dicha etiqueta mediante el corte específico con la proteasa TEV. Luego del paso de purificación por IMAC, se agruparon las fracciones correspondientes al pico de elución y LmaMPK10 fue sometida a proteólisis de la etiqueta de histidinas con la proteasa TEV durante una diálisis ON a 4°C. La proteólisis de la etiqueta de histidinas fue evaluada mediante SDS-PAGE (Figura 55).

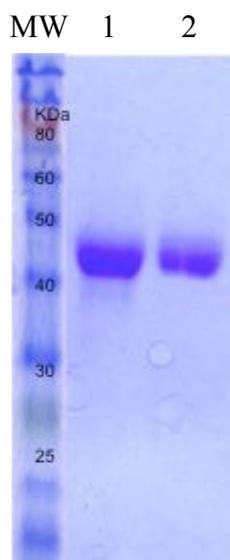


Figura 55. Análisis por SDS-PAGE de la digestión del extremo N-terminal de LmaMPK10 tras la incubación con la proteasa TEV. 1) LmaMPK10 incubada con TEV ON en diálisis y repurificada de la fracción no unida de una segunda IMAC, 2) LmaMPK10 sin digerir.

A continuación se sometió a LmaMPK10 a una cromatografía de exclusión molecular G-75 (fig. 56) con el fin de obtener una preparación que no sea sólo químicamente pura, sino también conformacionalmente homogénea. El análisis del perfil de elución revela que la proteína eluye principalmente como monómero de aprox 45kDa. La proteína luego fue concentrada por ultrafiltración llegando a obtener una solución de proteínas de hasta 50mg/mL, pero decidimos trabajar con una solución de 10 mg/mL. La concentración de proteínas se determinó por absorbancia a 260 nm.

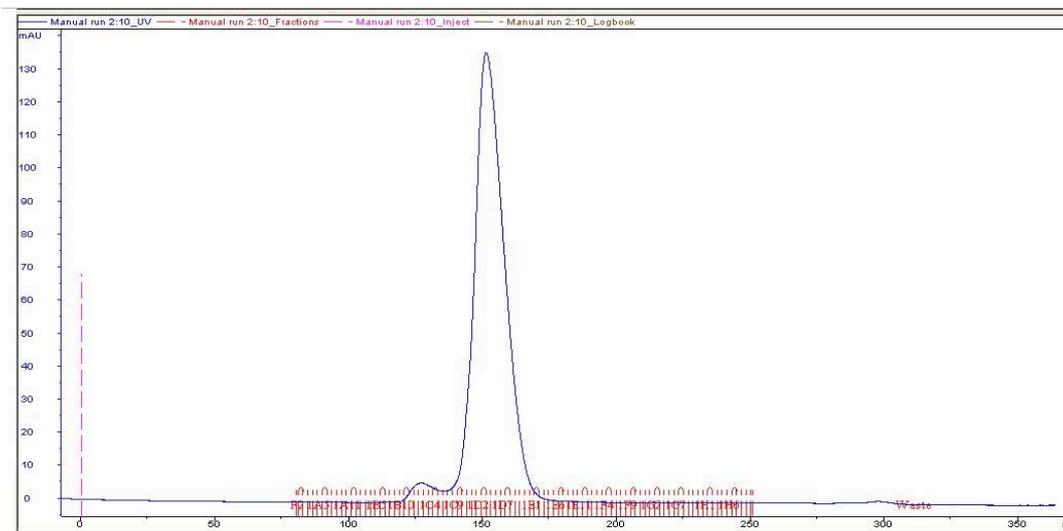


Figura 56. Cromatograma de elución LmaMPK10 de una superdex 75. Las fracciones que corresponden al pico principal fueron agrupadas y concentradas por centricon. La solución de proteína fue conservada a 4°C en Tris 20mM pH 8.5, NaCl 100mM.

Rastreo de condiciones de cristalización de LmaMPK10

Se realizó una búsqueda inicial de condiciones de cristalización, usando el robot Honeybee963, lo que permitió evaluar 384 condiciones (Suite de Screenings JCSG Core (Qiagen, Venlo, Países Bajos)). Se identificaron 3 condiciones iniciales con crecimiento cristalino:

1. 0.1 M MES pH 6; 1.2 M AMSO4 (screening robot JCSG)
2. 0.1 M Cacodilato-Na pH 6.5; 1.26 M AmSO4 (screening robot JCSG)
3. 0.1 M MES pH 6.5; 1.6 M AMSO4, 10 % dioxano (screening robot JCSG)

En todas ellas los cristales tenían un aspecto similar, pequeños y con hábito de crecimiento en aguja. En algunos casos se observaban ramilletes de agujas. Se intentó optimizar el hábito de estos cristales, de forma manual, mediante el método de difusión de vapor en gota colgante, variando las condiciones iniciales de cristalización (precipitante, pH, aditivos, etc) y se logró obtener pequeñas barras individuales en la condición:

1. 0.1 M Cacodilato-Na pH 6.7; 1.26 M AmSO4 (optimizando)

Además, como todas las condiciones encontradas de cristalización de LmaMPK10 poseen sulfato de amonio como precipitante, se realizó un rastreo manual utilizando el kit de 96 condiciones en base a sulfato de amonio (QIAGEN), lo que brindó una nueva condición de cristalización:

1. 0.05 M Tri-citrato-Na; 1.2 M AmSO₄, 3% isopropanol (screening manual AmSO₄)

Si bien se encontraron varias condiciones donde se desarrollaban cristales de LmaMPK10, estos no cambiaron su aspecto (Fig. 57). Se intentó la estrategia de microsembrado de cristales, que muchas veces permite la obtención de cristales de mayor tamaño mediante el agregado de semillas de cristal preformadas a una gota fresca que permita el crecimiento del cristal, evitando así la etapa de nucleación. Pero esta estrategia no generó el resultado esperado.

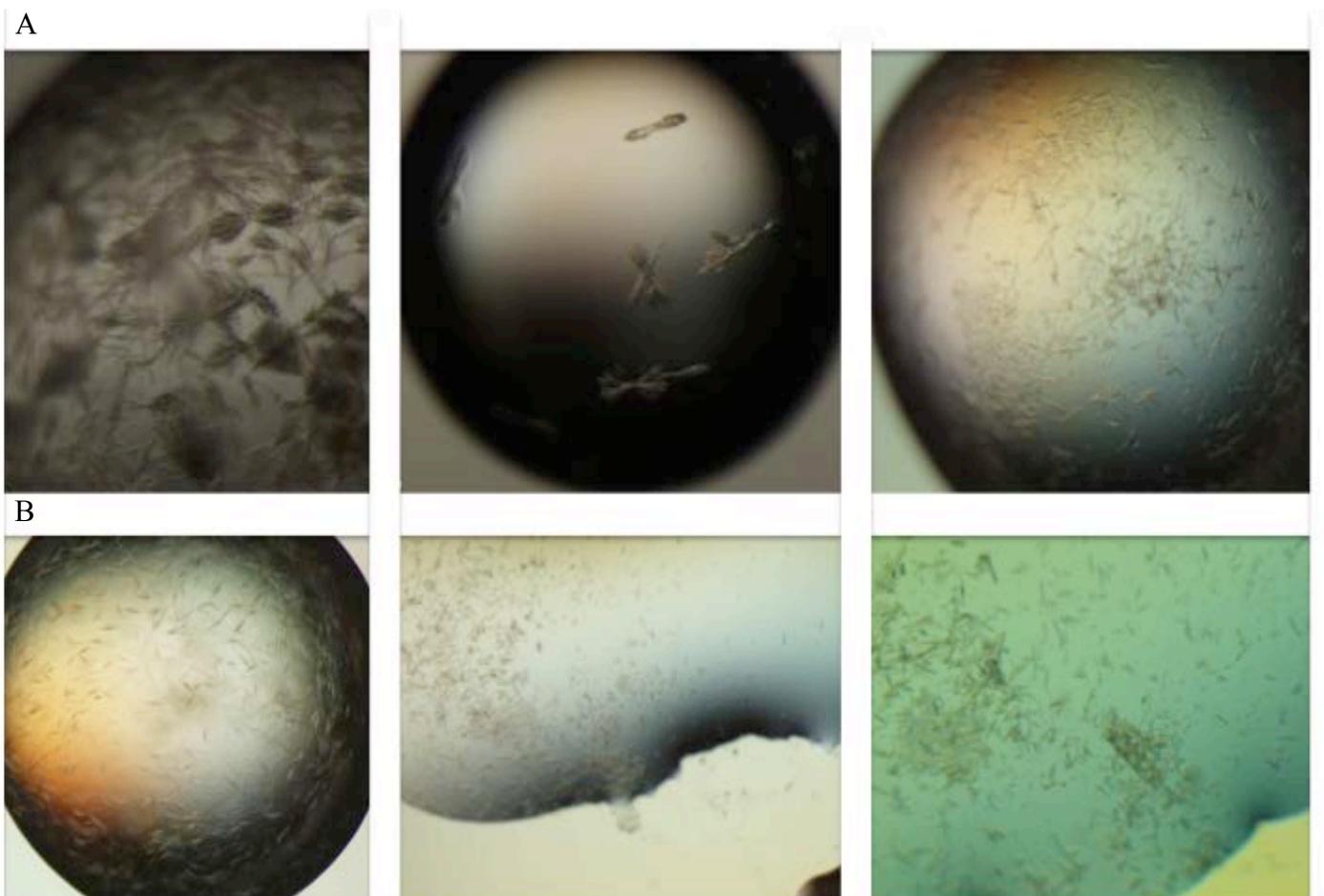


Figura 57. Imágenes captadas con lupa de cristales de LmaMPK10 en gotas colgantes obtenidas en A) 0.1 M MES pH 6-7; 1.2 M AmSO₄ y B) 0,1 Cacodilato de sodio pH 6,7-6,9; 1,26M Sulfato de amonio.

Ensayos iniciales de difracción de rayos X

Los cristales de LmaMPK10 fueron utilizados para realizar experimentos de difracción, con el fin de obtener una caracterización cristalográfica inicial (calidad de difracción, y eventualmente determinación de elementos de simetría y grupo de espacio). Para esto fue necesario “pescar” los cristales con un lazo bajo lupa, incubarlos en la solución de crioprotección y congelarlos en nitrógeno líquido. Por último, el cristal en su lazo fue montado en el goniómetro para la colecta inicial de imágenes. Este procedimiento para los cristales de LmaMPK10 fue sumamente laborioso debido al pequeño tamaño de los cristales, baja densidad y su capacidad de formar cristales como ramilletes lo que dificultaba la “pesca” de cristales únicos. De todas maneras, tras muchos intentos se logró con éxito el procedimiento. Si bien estos experimentos mostraron difracción a baja resolución, indicando que se trata de cristales de proteína, nunca se logró mejorar estos patrones de difracción como para permitir extraer información molecular útil (la resolución fue típicamente tan baja, que no se logró tampoco determinar el grupo de espacio de estas formas cristalinas sin ambigüedad). Para descartar que los cristales de LmaMPK10 fueran dañados por el agente utilizado como crioprotector, se procedió a evaluar otros agentes criopreservantes como sacarosa y etilenglicol, además de intentar la colecta de datos a temperatura ambiente. Estas estrategias fracasaron generando siempre datos de baja resolución.

Se enviaron cristales congelados en nitrógeno líquido de LmaMPK10 a los sincrotrones de ALS en Berkeley, USA así como a SOLEIL, Francia, sin tener mejoras detectables en los datos colectados. Así se descartó que nuestra fuente de rayos X no fuera lo suficientemente intensa para medir los “microcristales” de LmaMPK10.

Este resultado podría deberse a que las moléculas de proteína tiene mucha flexibilidad en alguna porción, lo que puede introducir defectos de crecimiento en los cristales: el desorden resultante se manifiesta entre otras cosas por el muy pequeño tamaño de los cristales (que detienen tempranamente su crecimiento por acumulación de defectos), y sobre todo por difracción de baja resolución. Siguiendo esta hipótesis, se diseñó un experimento de proteólisis limitada para detectar bucles o regiones desestructuradas dentro de la proteína.

Proteólisis limitada y diseño de la variante truncada LmaMPK10 Δ C

En cristalografía de proteínas es común utilizar a la proteólisis limitada para detectar regiones globulares de las proteínas, y aumentar las chances de obtener cristales bien empaquetados. Así, en la Figura 58, se muestra el perfil de digestión obtenido durante un ensayo de proteólisis controlada con tripsina, revelando la presencia de cortes muy tempranos, pero

también de la aparición de un núcleo resistente de LmaMPK10 a la proteasa. Este núcleo resistente fue analizado por espectrometría de masas, pudiendo determinar que se trata de la proteína LmaMPK10 pero sin los últimos 46 residuos en su extremo C-terminal. Si bien era posible el rastreo de condiciones de cristalización con este núcleo de proteína estable, decidimos diseñar una construcción capaz de expresar la proteína truncada. Se procedió al clonado de la secuencia codificante de LmaMPK10 de manera de eliminar los últimos 46 residuos C-terminales, en el vector pQE80L-TEV para posteriormente evaluar de su expresión. Dicha proteína truncada en el C-t, la llamaremos LmaMPK10 Δ C.

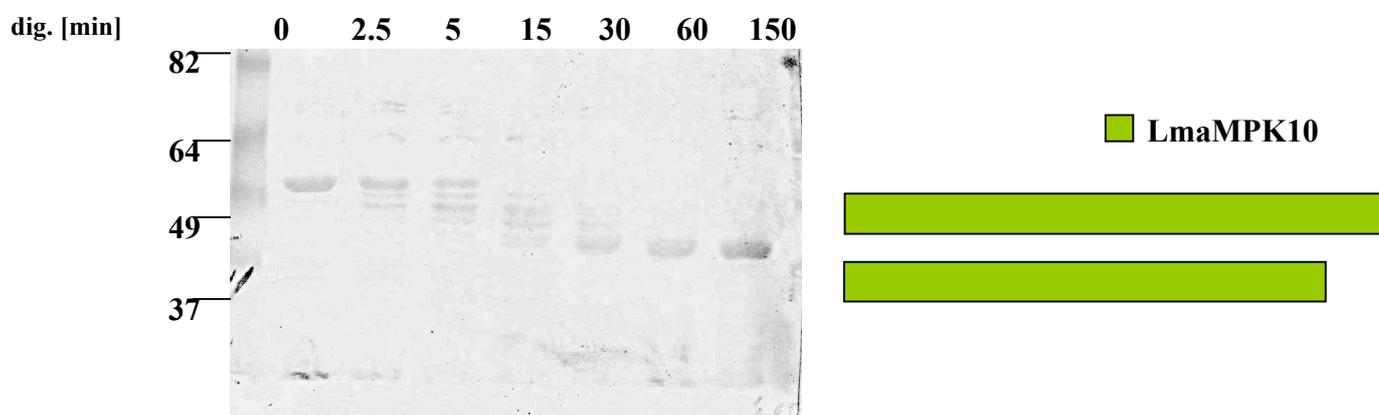


Figura 58. Análisis por SDS-PAGE de la digestión LmaMPK10 recombinante con tripsina. Se incubaron 5 μ g de proteína por carril en relación tripsina:LmaMPK10 1:200. La digestión se realizó a temperatura ambiente. Se identificó el core resistente a la proteólisis por MS.

Expresión y purificación de LmaMPK10 Δ C

Se realizaron ensayos de expresión de pQE80-TEV-LmaMPK10 Δ C en la cepa de *E. coli* Top10 F', a 20°C induciendo con 1mM IPTG ON. Se detectó la sobre-expresión soluble de una proteína del tamaño molecular esperado (41 kDa) (Fig. 59).

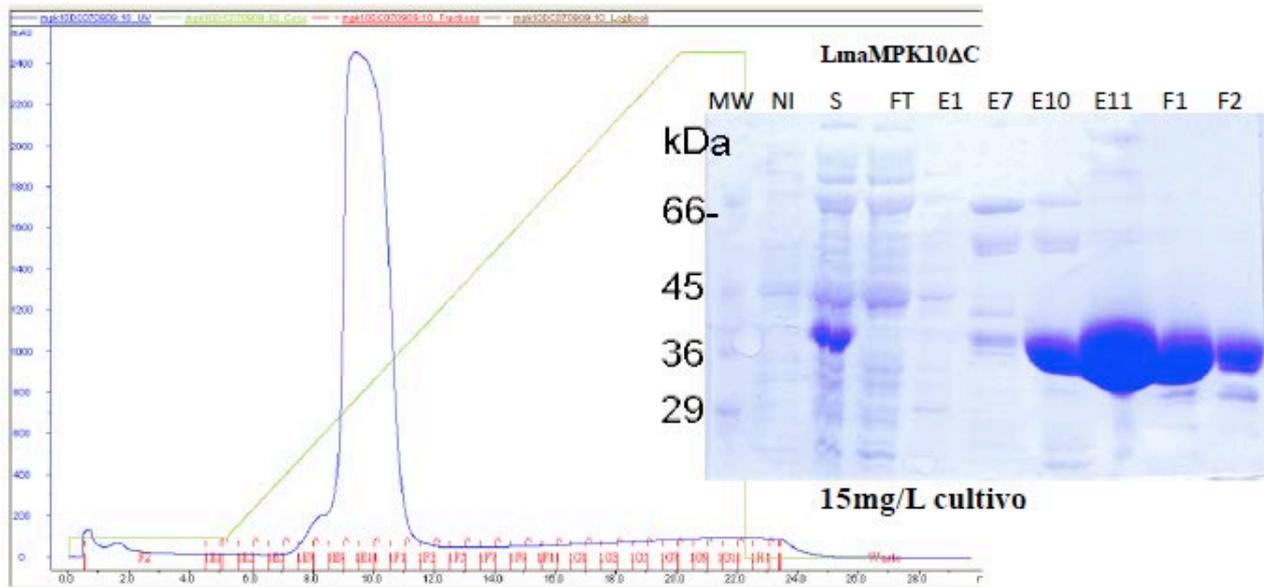


Figura 59. Análisis por SDS-PAGE de la expresión y purificación de LmaMPK10 Δ C en *E. coli* Top10F'. Las fracciones analizadas: (NI) corresponde al extracto total de proteínas de un cultivo no inducido y (S) a la las fracción Soluble, (FT) a la fracción no unida a la IMAC y las fracciones de elución que corresponden al cromatograma de la izquierda (E1-F2) El gel de acrilamida se realizó al 10 % y se tiñó con azul de Coomassie.

Para optimizar el protocolo de purificación de LmaMPK10 Δ C, se siguió la misma estrategia descrita más arriba para LmaMPK10 entera. Se logró purificar LmaMPK10 Δ C con un rendimiento de 15-18 mg de proteína por litro de cultivo (Fig. 59). La proteína se incubó con la proteasa TEV con el fin de remover la etiqueta de histidinas durante una diálisis ON. La última etapa de purificación fue también una cromatografía de exclusión molecular con el fin de cambiar el buffer, bajar la concentración de sales y de imidazol, y a la vez obtener una solución de proteína homogénea para avanzar en estudios cristalográficos. La solución de proteínas fue concentrada por ultrafiltración hasta 10mg/mL.

Rastreo de condiciones de cristalización de LmaMPK10 Δ C

Se evaluaron las condiciones de cristalización previamente encontradas para LmaMPK10 pero ninguna de ellas generó cristales. La proteína LmaMPK10 Δ C claramente se comportó de forma diferencial frente a la proteína nativa. Se sometió entonces a la LmaMPK10 Δ C a un rastreo de 384 condiciones (Kit JCSG-Qiagen) de cristalización que se diferencian en buffers, sales, pH y aditivos, utilizando el robot Honeybee963. Se logró identificar una sola condición en la que aparecieron cristales al cabo de 4 días (Fig. 60): 0.1M Hepes pH 7.5; 20% PEG 4000; 10% isopropanol.

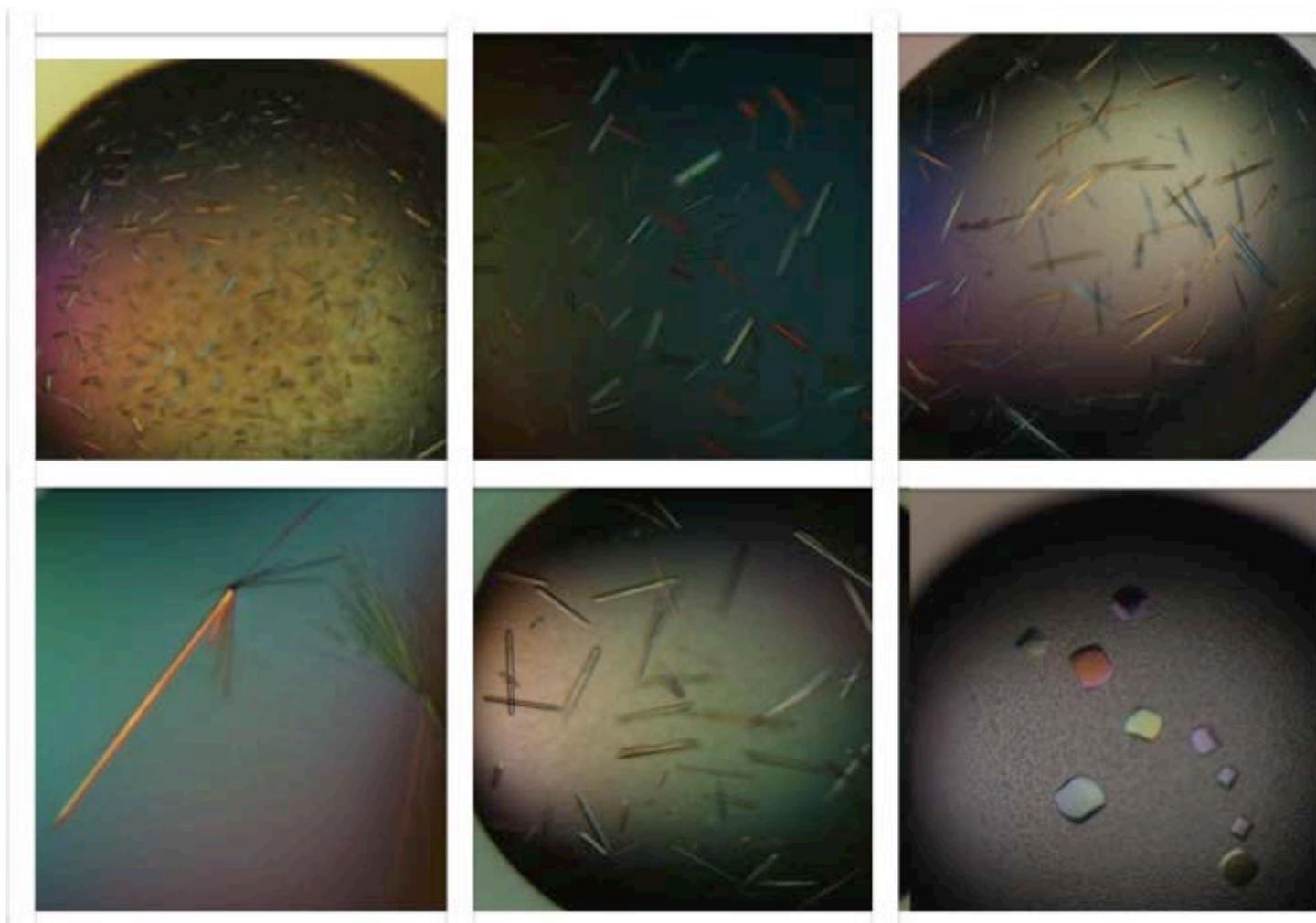


Figura 60. Imágenes captadas con lupa de cristales de LmaMPK10 Δ C en gotas colgantes obtenidas en la optimización de la condición 0.1M HEPES pH 7.5; 20% PEG 4000; 10 % isopropanol, 5% glicerol.

Optimización de cristales de LmaMPK10 Δ C

La optimización de las condiciones de cristalogénesis fue realizada manualmente, usando el método de difusión de vapor en gota colgante. Se procedió a variar la condición de cristalización encontrada inicialmente, modificando en forma sistemática el agregado de 5% de isopropanol y disminuyendo a 12% el precipitante PEG 4000. Esta estrategia demostró ser exitosa, los cristales crecieron hasta mayor tamaño, y con hábitos de crecimiento que resultaron en facetas bien definidas (Fig. 61). Lo que es más importante, estos cambios se reflejaron en significativas mejoras en los experimentos de difracción de rayos X, como se describe a continuación.

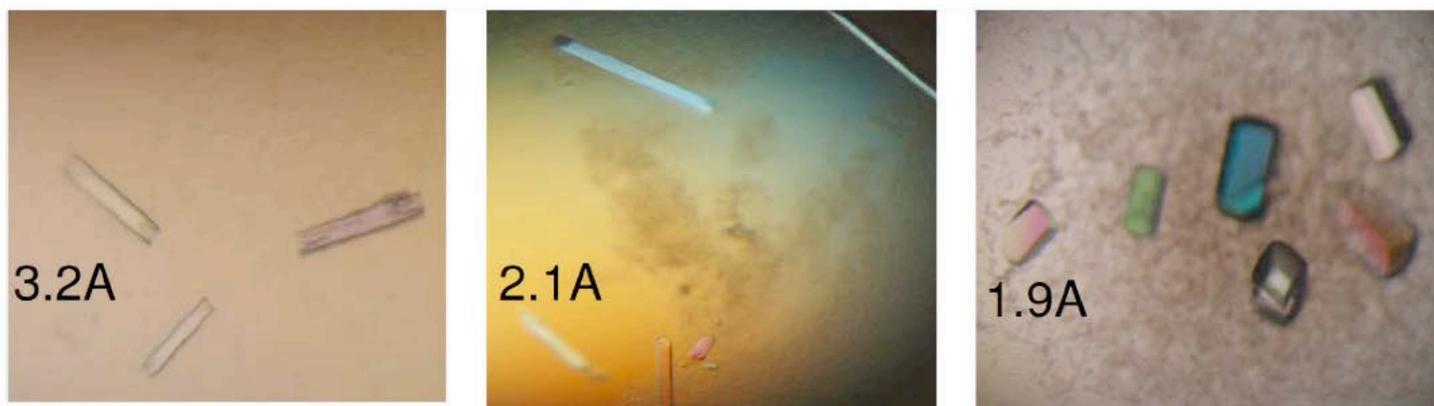


Figura 61. Optimización de las condiciones de cristalización de LmaMPK10 Δ C. Inicialmente difractando los rayos X hasta 3.2Å de resolución, la optimización permitió obtener cristales que difractan típicamente a resolución casi atómica (1.9Å).

Difracción de rayos X y colecta de datos

Los mejores cristales de LmaMPK10 Δ C fueron crioprottegidos con una solución conteniendo licor madre y 20% de glicerol y luego congelados rápidamente en nitrógeno líquido. Se pescaron con bucles de nylon, y se montaron en la cabeza goniométrica del equipo de difracción con que se cuenta en el Institut Pasteur de Montevideo. Se midieron una serie de imágenes para determinar que se trata de cristales de proteína, y asimismo se pudo avanzar en una primera caracterización de elementos de simetría. Estos cristales de LmaMPK10 Δ C pertenecen al grupo puntual 422, compatible con el sistema cristalino tetragonal, y en principio sugiriendo una red primitiva. Inicialmente difractaron a una resolución de \sim 3.2Å. Tras la optimización manual de las condiciones de cristalogénesis, la resolución fue paulatinamente mejorando, llegando a \sim 1.9Å. Se colectó un juego de datos completo utilizando el detector MAR345 del instrumento de difracción que tenemos en el laboratorio. La estrategia de colecta de datos se calculó en el programa MOSFLM (Powell, 1999) (subrutina STRATEGY) y depende de la geometría del cristal. Por este motivo, se tomaron 2 fotos preliminares colectadas a 90° una de otra, y esto permitió el análisis de la geometría del cristal. Así, dada su simetría tetragonal 422, el juego de datos completo se conformó de 60 imágenes tomadas a una distancia cristal-detector de 135mm, con 0.75 grados de oscilación por imagen, cubriendo un rango de 45°.

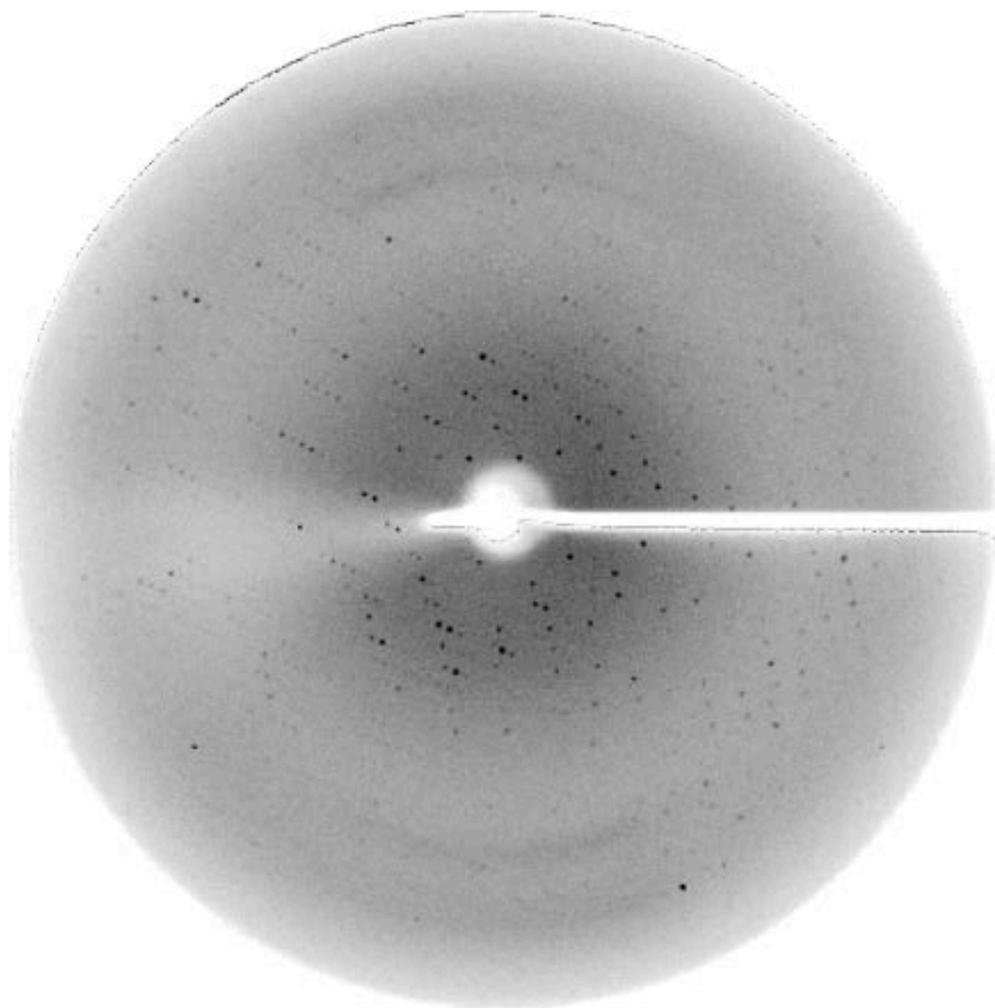


Figura 62. Imagen de difracción de rayos X representativa de la difracción de LmaMPK10 Δ C. LmaMPK10 Δ C cristalizó en el grupo puntual 422 (más tarde se confirmaría que se trata del grupo de espacio P4₃2₁2), y se colectaron juegos de datos completos en el laboratorio usando un detector de área MAR345 (Mar Research).

Procesamiento de datos de difracción de rayos X

Los datos se procesaron con el paquete de programas de CCP4 (Collaborative Computational Número del Proyecto 4, 1994). El indexado e integración se realizó con el programa *MOSFLM*, el escalado y “*merging*” con *SCALA* y la reducción de intensidades a amplitudes (y análisis concomitante de datos de distribución de intensidades) con *TRUNCATE*. Para avanzar en la determinación de elementos de simetría hacia la definición del grupo de espacio, las imágenes de difracción fueron evaluadas en el espacio recíproco (usando *HKLVIEW*) en particular para ver extinciones sistemáticas y elementos de traslación y rotación en la celda cristalina; también se avanzó en estos análisis calculando mapas de auto-rotación (con

MOLREP) usando los valores de intensidad de las reflexiones indexadas. Esto nos permitió avanzar en la definición del grupo de espacio y se pudo inferir que los ejes b y c se corresponden probablemente con ejes helicoidales por lo que hay una sugerencia fuerte de que el eje b sea 2_1 y que el c sea 4_3 o 4_1 . La determinación del grupo de espacio es importante para el análisis de los datos y la obtención de una solución estructural. En nuestro caso, el grupo de espacio sólo se pudo definir evaluando las posibles soluciones en la etapa de reemplazo molecular (como se describe más adelante), dado que los grupos de espacio alternativos $P4_32_12$ y $P4_12_12$ son indistinguibles en base sólo al patrón de intensidades de difracción medidas.

Determinación de la estructura 3D de LmaMPK10 Δ C

Las fases de LmaMPK10 Δ C se obtuvieron por reemplazo molecular. (Trapani & Navaza, 2008) Esta estrategia utiliza fases de una estructura conocida de otra proteína, siempre que ésta tenga una similitud estructural significativa con la estructura que se quiere resolver. Así en nuestro caso, se utilizó como sonda de búsqueda de reemplazo molecular la estructura de la MAPK p38 α humana (PDB 3HV3), proteína que muestra 38% de identidad de secuencia con LmaMPK10, y que por ende se prevé tenga suficiente homología estructural. Se contrastaron los coeficientes de las funciones de rotación, traslación y de “fitting” y eligieron las mejores soluciones. Las soluciones fueron evaluadas por la visualización del empaquetamiento, sin choques entre moléculas vecinas y a la vez asegurando un empaquetamiento continuo consistente con un cristal 3D. Se observó un monómero de proteína por unidad simétrica. Y se confirmó el grupo de espacio $P4_32_12$. Una vez resuelta la estructura, se realizó el refinamiento en espacio recíproco utilizando inicialmente el programa Refmac5 (Murshudov et al., 1997) y luego el programa *Phenix.refine* (Adams et al., 2002). La estrategia inicial de refinamiento utilizada incluyó 2 dominios TLS (*Translation Libration and Screw*) (Winn et al., 2001) que se definieron correspondiendo separadamente al dominio N-terminal y C-terminal de la proteína, y un reemplazo simulado (“*simulated annealing*”) en los primeros ciclos. También se consideraron los factores B atómicos isotrópicos. La estrategia global fue conservativa, dada la baja resolución inicial de los datos a 3.2 Å lo que redujo significativamente el factor R_{free} . El refinamiento se realizó de forma cíclica, iterando con reconstrucción manual del modelo en espacio real (utilizando los mapas de densidad electrónica como guía) utilizando el programa *Coot* (Emsley & Cowtan, 2004).

A medida que se avanzó con el refinamiento, los mapas de densidad electrónica fueron de

creciente calidad (Figura 64). En particular, el lóbulo C-terminal mostró mapas de excelente calidad, mientras que la región correspondiente al lóbulo N-terminal mostró regiones menos definidas, o bien mapas con cociente señal/ruido más bajo. Estos mapas permitieron la construcción del modelo atómico de la mayoría de los residuos de la proteína, excluyendo los 4 primeros N-terminales, el último aminoácido C-terminal, y la zona comprendida entre las posiciones 180-194. Este último segmento corresponde al bucle de activación, y aunque la densidad electrónica era visible, no fue suficientemente clara para plantear una interpretación inequívoca, sugiriendo una alta flexibilidad o la presencia de conformaciones alternativas, no distinguibles a esta resolución. También se excluyeron del modelo las cadenas laterales de 14 residuos (Glu 6, Ile 29, Ser 31, Ile 46, Val 57, Ser 58, Asp 59, Arg 61, Thr 62, Lys 350, Glu 357, Arg 358) por motivos similares. Los factores B de esas partes modeladas dentro de los mapas de densidad electrónica, son extremadamente altos, algo que se discutirá más adelante. La obtención de datos a mayor resolución (1.95 Å) también permitió mejorar los mapas de densidad electrónica y utilizar programas como Arp/wArp (Morris et al., 2003) para la (re)construcción automatizada del modelo. Los ciclos finales de refinamiento se realizaron con el programa BUSTER (Smart et al., 2012). La resolución alcanzada permitió refinar moléculas de agua estructurales. Por otro lado, el agua no estructurada ocupó el 52% de la unidad asimétrica.

Los parámetros $R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ evolucionaron favorablemente a lo largo de los ciclos de refinamiento desde valores de 49/50 % convirgiendo a valores de 19/22%. Los parámetros del modelo se encuentran dentro del promedio en comparación con estructuras conocidas de similar resolución. Como muestra la figura 63, todos los residuos de la estructura se encuentran en regiones permitidas del gráfico de Ramachandran, con el 96.3% en regiones favorecidas. En cambio, si observamos el parámetro del coeficiente de correlación de la densidad electrónica comparando densidad observada con la calculada a partir del modelo refinado final (CC=0.886) está más bajo de lo esperado. Esto se explica por la densidad electrónica débil en varias regiones del lóbulo N-terminal. Si bien el modelo fue trazado en este lóbulo en su gran mayoría (sobre todo en la cadena principal), probablemente corresponde con secciones de la proteína de gran flexibilidad.

MolProbity Ramachandran analysis

3PG1, model 1

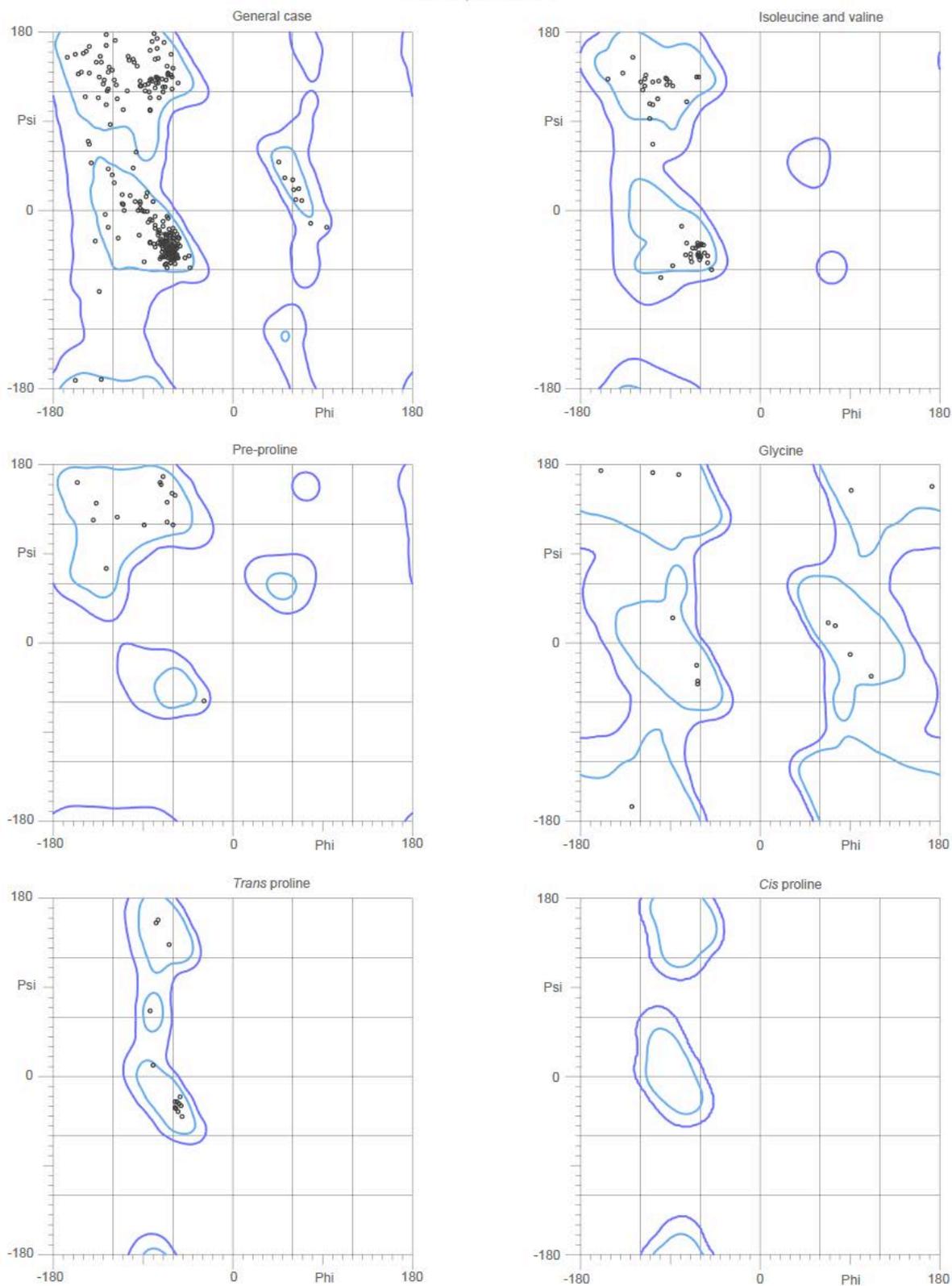


Figura 63. Gráfico de Ramachandran para el modelo 3PG1 de LmaMPK10ΔC obtenido de MolProbity.

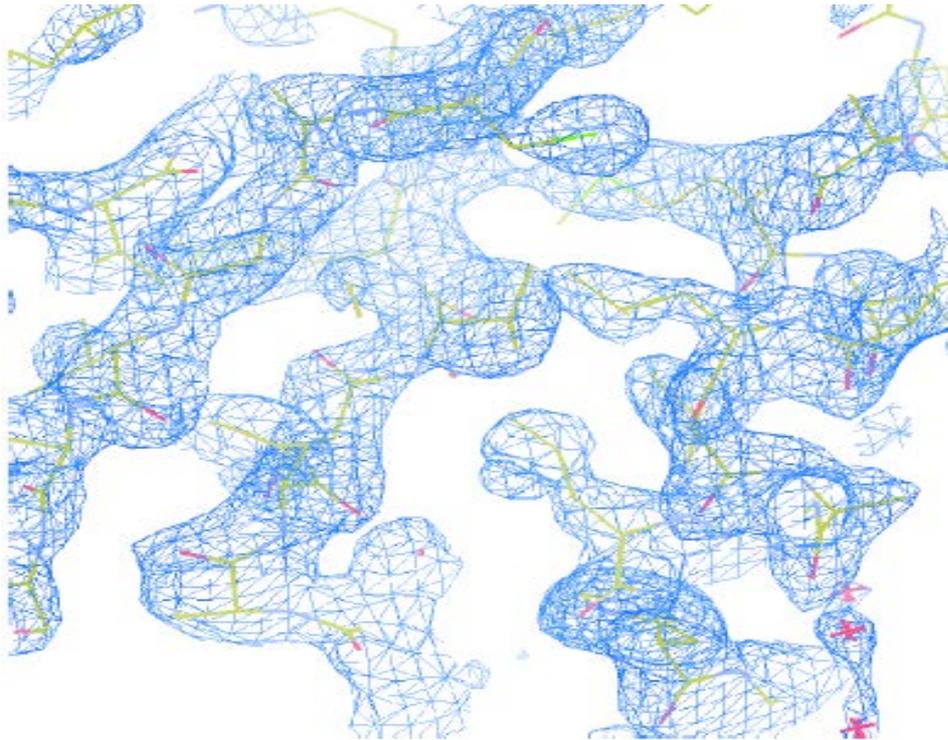


Figura 64. Una vista del mapa de densidad electrónica refinado ($2mF_{\text{obs}}-DF_{\text{calc}}$) de LmaMPK10 Δ C contorneado a un nivel de 1σ . Imagen obtenida con el programa Coot.

Depósito de la estructura cristalográfica

El modelo estructural obtenido fue depositado en el banco de datos PDB (Protein Data Bank), con código 3PG1.

Tabla11. Parámetros cristalográficos de LmaMPK10ΔC

LmaMPK10ΔC	
Grupo de espacio	P4 ₁ 2 ₁ 2
Moléculas de proteína por unidad asimétrica	1
Contenido de solvente (%)	52,4
Longitud de onda (Å)	1,5418
Resolución (Å) a	28,73-1,95 (2,06-1,95)
Reflexiones medidas	110807
Multiplicidad a	3,5 (3,5)
Completitud (%) a	98,3 (97,4)
R _{meas} (%) a,b	5,0 (53,7)
<I/σ(I)> a	15,8 (1,4)
a=b (Å)	81,26
c (Å)	129,38
Resolución de refinamiento (Å)	28,73-1,95
R _{cryst} [N° refs] c	0,192 [29996]
R _{free} [N° refs] c	0,224 [1638]
Rms de enlace (Å)	0,011
Rms de ángulos (°)	1,07
Átomos de proteínas no hidrógenos	2706
Átomos de agua	193
Átomos de ligandos	-
Factor B promedio general (Å ²)	53,6
Factor B promedio de cadena principal (Å ²)	51,9
Factor B promedio de cadenas laterales (Å ²)	55,5
Factor B promedio de aguas (Å ²)	52,7
Factor B promedio de ligandos (Å ²)	-
Coefficiente de correlación de mapa vs modelo (General/ local) d	0,84/0,88
N° residuos en regiones del gráfico de ramachandran (Permitidos/favorables/no permitidos) e	337/325/0
Código ID de la Protein Data Bank	3PG1

a Los valores entre paréntesis aplican a la capa de mayor resolución.

$$b \quad R_{meas} = \sum_h \sqrt{N_h / (N_h - 1)} \sum_i |I_i - \langle I \pm \rangle| / \sum_h \sum_i I_{\pm}$$

N_h es la multiplicidad para cada reflexión, I_i es la intensidad i_n observada de la reflexión h, <I> es el promedio de intensidades de todas las reflexiones h, siendo $I_{\pm} = 1/N_h \sum_i (I_{(-)} \text{ or } I_{(+)})$

\sum_h se toma sobre todas las reflexiones; se toma \sum_i sobre todas las observaciones de cada reflexión

$$c \quad R = \sum_h |F(h)_{obs} - F(h)_{calc}| / \sum_h |F(h)_{obs}|; \quad R_{cryst} \text{ y } R_{free} \text{ se calcularon usando el juego de reflexiones hkl de trabajo y testigo respectivamente}$$

d Calculado con Phenix get_cc_mtz_pdb (Adams et al., 2002).

e Calculado con Molprobit (Chen et al., 2010).

CAPÍTULO II

Análisis estructural y bioquímico de la MAPK LmaMPK10 y de mutantes seleccionados: identificación de determinantes en la plasticidad y potenciales mecanismos de regulación de la actividad.

La estructura de LmaMPK10 Δ C fue el primer reporte de una estructura de una MAPK de tripanosomátidos. Presenta la estructura clásica, bi-lobular de las ePKs. El lóbulo C-terminal está compuesto exclusivamente por α -hélices, mientras que el N-terminal está formado principalmente por hebras β formando una hoja β , y hay dos α -hélices que forman parte de este lóbulo, la α C, y una hélice C-terminal que vuelve desde el lóbulo C-terminal y se pliega sobre el N-terminal, que es típica de MAPKs. En la interfaz entre ambos lóbulos se ubica el sitio de unión al ATP. El lóbulo N-terminal (N-t) y la última extensión C-terminal tienen diferencias estructurales respecto a otras MAPKs como ERK2 y p38 que se detallarán más adelante. Como se observa en la figura 62, el lóbulo N-t incluye 5 hebras β estructuralmente conservadas (β 1- β 5), rodeadas por 3 hélices alfa expuestas al solvente: las mencionadas hélice α C altamente conservada, la hélice C-terminal α 11, y una α -hélice al comienzo de la proteína, la hélice α 1, conformada por los primeros residuos de la secuencia de LmaMPK10 Δ C. Esta hélice está generalmente ausente de todas las MAPKs conocidas de vertebrados, donde encontramos una hoja β conformada por dos hebras; con lo que parece ser una característica común en estas proteínas de Trypanosomátidos. Esta observación es reforzada por el reciente reporte de una MAPK putativa de *L. donovani* (LDBPK_331470; 4QNY) que presenta una hélice similar y en la misma orientación que LmaMPK10. Además, en la estructura de GSK-1 de *Leishmani* (otra GMGC) también se observa la presencia de una α -hélice N-terminal, pero ésta adopta una orientación totalmente distinta a la de LmaMPK10 Δ C; rotada aprox 90°, lo que podría hablar de una característica más general de quinasas de Tripanosomátidos. En cambio, la recientemente conocida estructura de la MAPK3 de *L. donovani* (LdBPK_100540; 4O2Z) carece de este tipo de elementos de estructura secundaria y en cambio se obreva la clásica hoja β conformada por 2 hebras.

Podemos también observar una pequeña inserción única de LmaMPK10 Δ C (ausente en otras quinasas conocidas), en su lóbulo N-terminal, y estructurada en forma de una horquilla β (residuos 55-63). Esta horquilla se ubica topológicamente antes de la hélice α C, una hélice importante que controla la regulación de la activación de las ePQs.

La bisagra entre los lóbulos N-t y C-t (residuos 113-116) es corta y se localiza justo después

del residuo “gatekeeper” (Thr 112), importante en permitir la unión del ATP al bolsillo de unión al nucleótido. Generalmente la presencia de residuos voluminosos (ej: Met) hace que las quinasas tengan menor actividad catalítica (Emrick *et al.*, 2006; Azam *et al.*, 2008).

El lóbulo C-terminal está mejor conservado, y es muy semejante al de otras proteín-quinasas conocidas. Está constituido casi exclusivamente por elementos de estructura secundaria helicoidales, salvo por una pequeña hoja β de 3 hebras ($\beta 6$ - $\beta 8$) localizada cerca de la superficie de unión al sustrato.

La última α -hélice ($\alpha 11$), proviene del extremo C-terminal, pero volviendo sobre el lóbulo N-terminal y formando parte del plegamiento de éste último, lo cual es característico de todas las MAPKs.

Entre las hélices αG y la αH se insertan 2 hélices formando una inserción típica de MAPKs (llamada MKI, conformada por las hélices $\alpha 7$ y $\alpha 8$) (Kannan & Neuwald, 2004). Se ha descrito en ERK1/2 la existencia de un motivo Ser-Pro-Ser (SPS) en la MKI, que funcionaría como una señal de localización nuclear no-canónica regulada por la fosforilación de Ser (Chuderland *et al.*, 2008 Plotnikov *et al.*, 2011). En LmaMPK10, también encontramos el motivo SPS en la MKI, aunque no es estructuralmente equivalente al de ERK (en el sitio equivalente se encuentra un motivo Thr-Pro-Lys en LmaMPK10): en LmaMPK10 el SPS se localiza en el lado opuesto de la MKI, y está bien expuesto al solvente.

En la figura 65 se representa la estructura molecular de LmaMPK10 ΔC , destacando todos los elementos previamente mencionados. Gran parte del bucle de activación no pudo ser incluido en el modelo, pues la densidad electrónica no era suficientemente clara como para trazar la cadena de forma inequívoca. Me permito insistir en el hecho que la densidad electrónica no está ausente, con lo que lo más probable es que se trate de conformaciones alternativas (al menos dos), que implican que el bucle es flexible, y que a esta resolución no están suficientemente definidas.

En la estructura de la MAPK putativa de *L. donovani* (4QNY), también está ausente parte del bucle de activación (aunque se modelaron más residuos que en LmaMPK10). Además es interesante resaltar que el PDB 4QNY presenta como ya mencionamos la hélice N-terminal similar a la descrita en LmaMPK10 y carece de los últimos 55 residuos C-terminales.

Estructura 3D de LmaMPK10ΔC

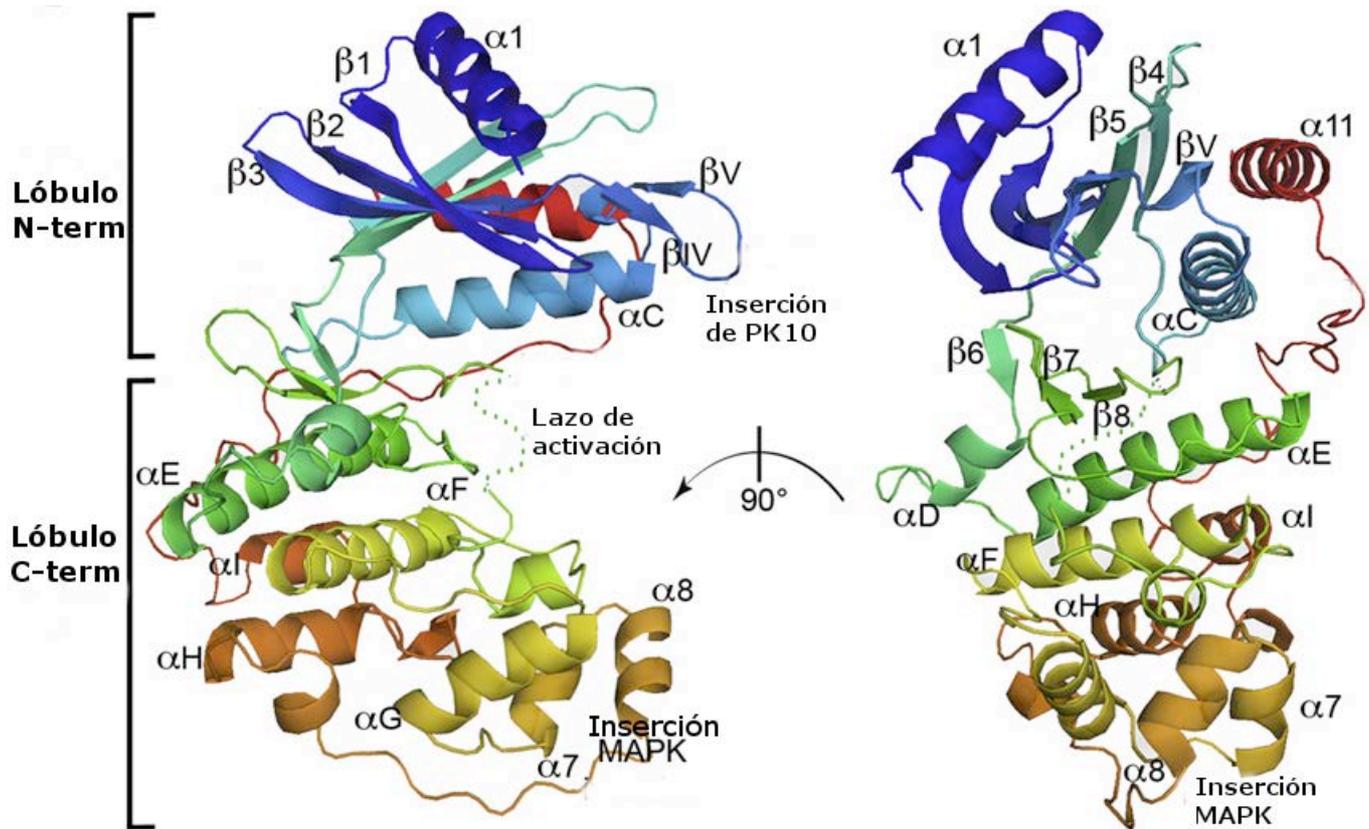


Figura 65. Estructura 3D de LmaMPK10ΔC. Representación esquemática del modelo entero, visto desde dos orientaciones (el panel de la derecha está rotado 90° con respecto al de la izquierda, de acuerdo a un eje vertical en el plano del papel); el modelo está coloreado con una rampa de azul a rojo, indicando la dirección N-terminal a C-terminal; con el esquema se subrayan los elementos de estructura secundaria que, junto con elementos específicos de LmaMPK10, están etiquetados.

En la figura 66, se muestra la ubicación de los elementos de estructura secundaria de LmaMPK10ΔC en el contexto de su secuencia. Se destacan los elementos característicos a las MAPKs así como los elementos de estructura secundaria novedosos que se describieron más arriba, únicos a LmaMPK10. Más importante aún, queremos destacar aquí posiciones que se encuentran estrictamente conservadas en MAPKs (y de hecho en muchas ePKs), que en LmaMPK10 se encuentran sustituidas, aspecto de gran interés que se desarrolla en profundidad más adelante.

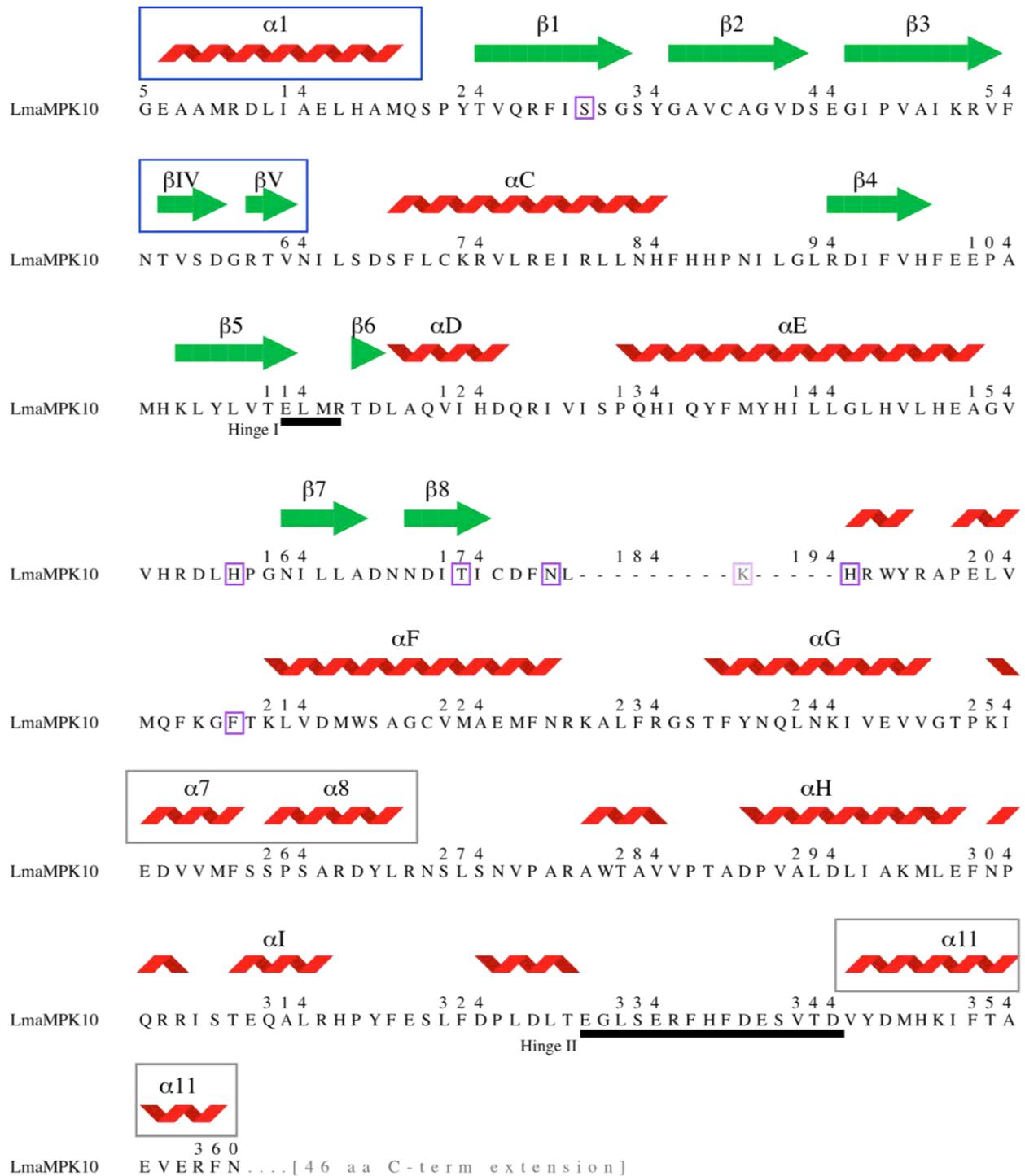
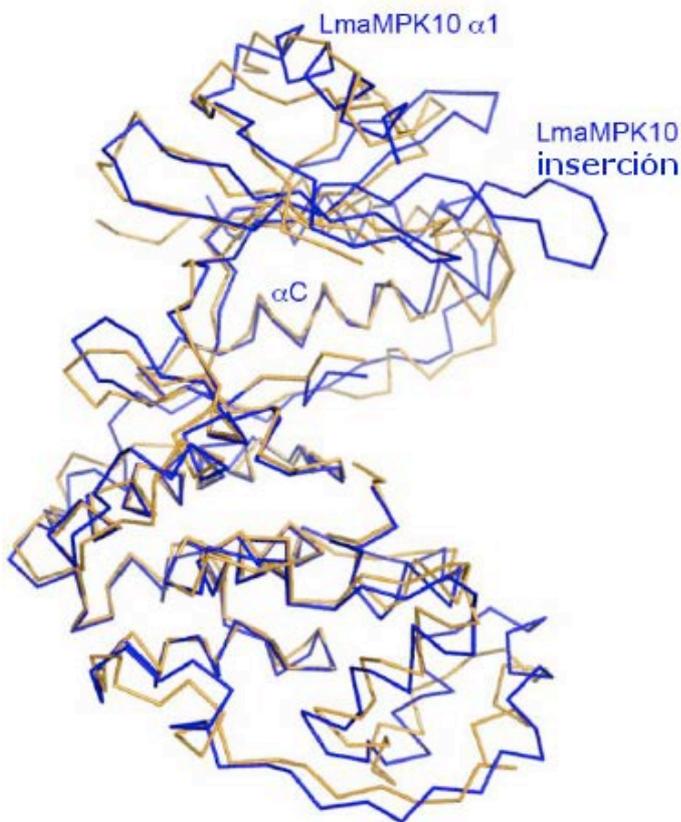


Figura 66. Esquema de la secuencia de aminoácidos de LmaMPK10 Δ C, con los elementos de estructura secundaria superpuestos en la parte superior. Las cajas azules resaltan características nuevas, específicas de LmaMPK10, a saber: la α -hélice N-terminal α 1 (reemplazando a una hoja β antiparalela de dos hebras que es típica en todas las MAPKs conocidas) y una horquilla β (β 4- β 5) con el bucle inserto entre ambas hebras, la cual está presente sólo en LmaMPK10 y sus ortólogos en protozoos Trypanosomatidae. En cajas grises se señalan elementos típicos comunes a todas las MAPKs, tales como la inserción MKI (α 7- α 8) y la última α -hélice (α 11) que se pliega en el lóbulo N-

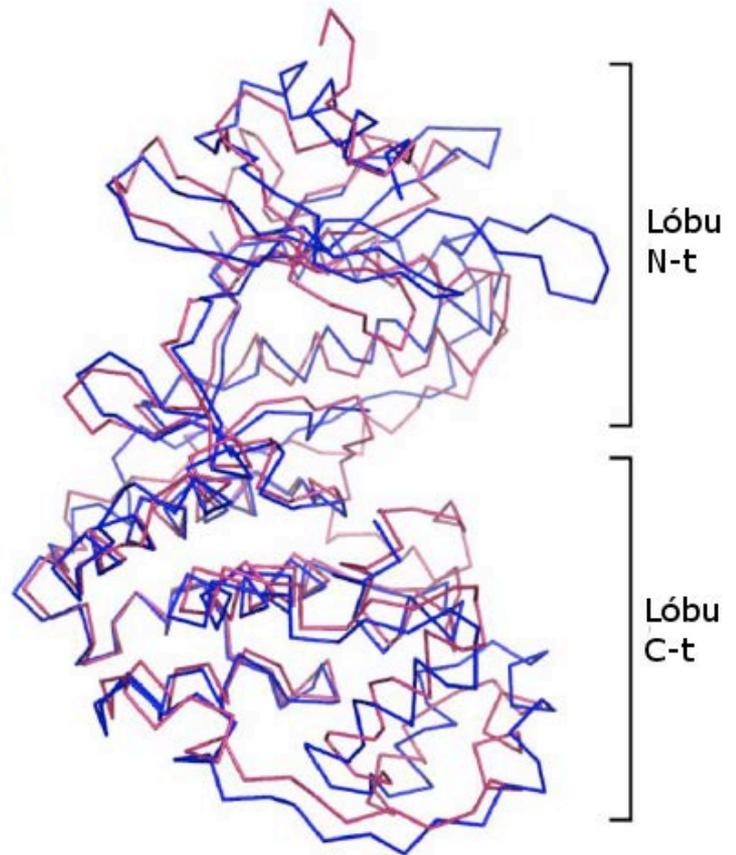
terminal de la proteína. Se destacan siete posiciones de aminoácidos con cuadros de color violeta, subrayando sitios muy o estrictamente conservados en proteínas quinasas canónicas ePK, que están sustituidos sólo en LmaMPK10 y ortólogos Trypanosomatidae (discusión detallada en el texto principal). Tener en cuenta que hay secciones helicoidales más pequeñas que no se señalan aquí por motivos de claridad, que se describen en el texto principal. LmaMPK10 contiene 46 aminoácidos después de la hélice $\alpha 11$, que no están presentes en la proteína usada para cristalizar, debidamente indicados al final de la secuencia en este esquema. Los primeros cuatro residuos N-terminales no fueron observados en la densidad electrónica, por lo que no fueron incluidos en el modelo final. Tañil como se describe con mayor detalle en el texto, la densidad electrónica fue ambigua en la región correspondiente al bucle de activación (residuos 180-194), con lo que éste no fue incluido en el modelo refinado final, y aquí en el esquema esto se indica con guiones. Dentro del bucle de activación, la Lys189 se muestra en colores apagados, resaltando que también aquí hay una modificación propia de LmaMPK10 de gran interés, en relación a otras ePKs conocidas.

De la comparación de LmaMPK10 con ortólogos humanos, las PQs ERK1/2 y p38 α (40% y 36% de identidad con LmaMPK10, respectivamente; ver Figura 68), resultaron ser las más parecidas. A pesar de la que la similitud de secuencia es más alta con ERK1/2, los índices de similitud estructural es ligeramente superior con p38 α (DALI puntajes Z de 35.6 con p38 α [código PDB 3GFE] ; frente a 34.1 con ERK2 [PDB 3ERK]), muy por encima de otras quinasas homólogas que muestran puntuaciones Z DALI <30, tales como JNK3 (2P33), CDK2 (1JST) y GSK3 (1H8F).

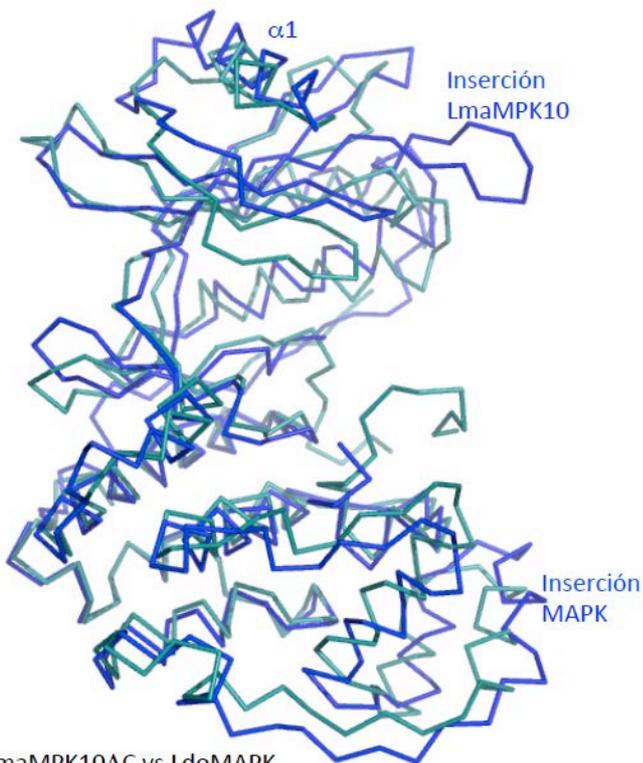
Estas diferencias estructurales pueden ser identificadas en general cuando superponemos la estructura de LmaMPK10 ΔC con la de p38 o ERK (Figura 66). Los cambios más importantes se pueden observar en el lóbulo N-terminal, en el que la posición de la hélice αC y varios bucles son más similares entre LmaMPK10 y p38 α que con ERK.



LmaMPK10 ΔC vs p38 α



LmaMPK10 ΔC vs ERK2



LmaMPK10 ΔC vs LdoMAPK

Figura 67. La alineación estructural de LmaMPK10 ΔC con las MAPKs humanas de mayor similitud y con la MAPK de *L. donovani* de estructura conocida. Representación en cinta de LmaMPK10 ΔC superpuesta a p38 α , a ERK2 y la MAPK (4QNY). Se indican en LmaMPK10 ΔC elementos distintivos tales como la hélice $\alpha 1$ en el N-terminal y la inserción de la horquilla β . Nótese el mayor grado de superposición estructural de αC , entre otras regiones, a la base de la mayor similitud estructural de LmaMPK10 con p38, en comparación con otras MAPKs humanas. Además, se observa como la $\alpha 1$ es una característica compartida con la MAPK de *L. donovani*.

Se utilizó el programa APBS (Baker et al., 2001) para calcular el potencial electrostático mapeado sobre la superficie accesible al solvente de LmaMPK10 Δ C (Fig. 68) y se lo comparó al de otras MAPK relacionadas (ERK2, p38 y MAPK de *L. donovani* con *LmaMPK10*). En la figura 68, se observan regiones con concentración de cargas negativas en el dorso de las proteínas, o sea en la cara opuesta al sitio de unión al ATP. En LmaMPK10 esta región es particularmente extensa y homogénea. Esto podría tener relevancia pensando en la función de la proteína en cuanto a la posibilidad de interactuar con diferentes proteínas o sustratos de naturaleza básica. De todos modos es muy importante resaltar que esta proteína está trunca en su extremo C-terminal, con lo que no sabemos a ciencia cierta cómo se estructura la extensión final de 46 residuos. Esta extensión podría de hecho estar plegada uniéndose a la cara dorsal de LmaMPK10 Δ C, con lo que el potencial electrostático final sea diferente (ver más abajo en la Figura 105). Por otro lado, en la zona de unión al sustrato peptídico, se identifican por el contrario un conjunto denso de cargas positivas, lo que podría correlacionarse con la naturaleza ácida del (de los) potencial(es) sustrato(s).

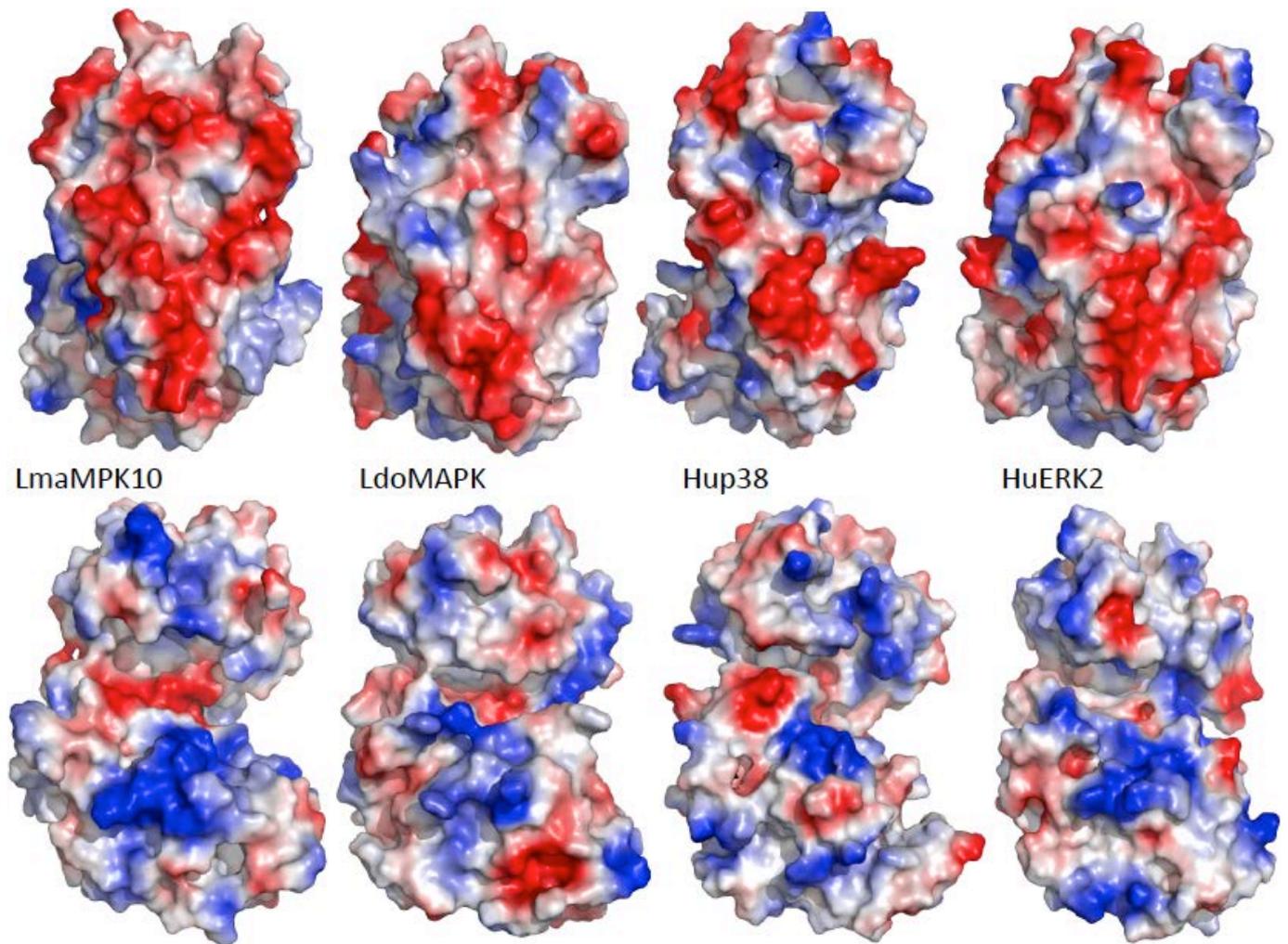


Figura 68. Potencial electrostático mapeado sobre la superficie accesible al solvente de LmaMPK10 Δ C, de una MAPK putativa de *L. donovani*, y de p38 y ERK2 humanas.

Dado que las proteín-quinasas presentan conformaciones diferenciales que distinguen el estado activo del inactivo, se procedió a evaluar la estructura de LmaMPK10 Δ C para determinar el estado funcional adoptado en esta forma cristalina. Para ello se cuenta con un conjunto de caracteres conocidos en otras quinasas, que han sido cristalizadas en ambos estados.

LmaMPK10 Δ C no muestra residuos fosforilados en su estructura cristalina, que son típicos de las formas activas de MAPKs, en las cuales la Thr y la Tyr del bucle de activación son fosforilados para activar la quinasa. Es verdad que el bucle de activación completo no pudo ser incluido en el modelo final refinado de LmaMPK10 Δ C (por marcada flexibilidad), pero ensayos complementarios de geles bidimensionales, presentados más adelante en esta Tesis, son consistentes con esta observación.

La comparación de LmaMPK10 Δ C con estructuras activas de ERK2 (2GPH) permite visualizar que LmaMPK10 Δ C se encuentra más abierta, en una configuración semejante a la hallada en estructuras de quinasas inactivas: la unión del nucleótido suele disparar un cambio conformacional que lleva a la compactación de ambos lóbulos (Ring *et al.*, 2011; Rodríguez Limardo *et al.*, 2011; Simard & Rauh, 2014)

El glutamato estrictamente conservado del lóbulo N-terminal (Glu78 según numeración de LmaMPK10), es bien conocido por establecer un puente salino con una lisina en β 3 (Lys51), cuando las PQs están en su conformación activa (Taylor & Radzio-Andzelm, 1994). En LmaMPK10 Δ C, no podemos ser concluyentes en este sentido: estos dos residuos cargados muestran sus cadenas laterales aproximarse, el grupo carboxilato del Glu78 se encuentra a 3.9 Å del grupo ϵ -amino de la Lys51. Sin embargo, el mapa de densidad electrónica es débil en estas cadenas laterales, y los factores B son bien elevados (Lys51= 94.4 ; Glu78=95.2), elementos consistentes con una alta movilidad, sugiriendo que en todo caso esta interacción no es fuerte (Fig. 69 y 67).

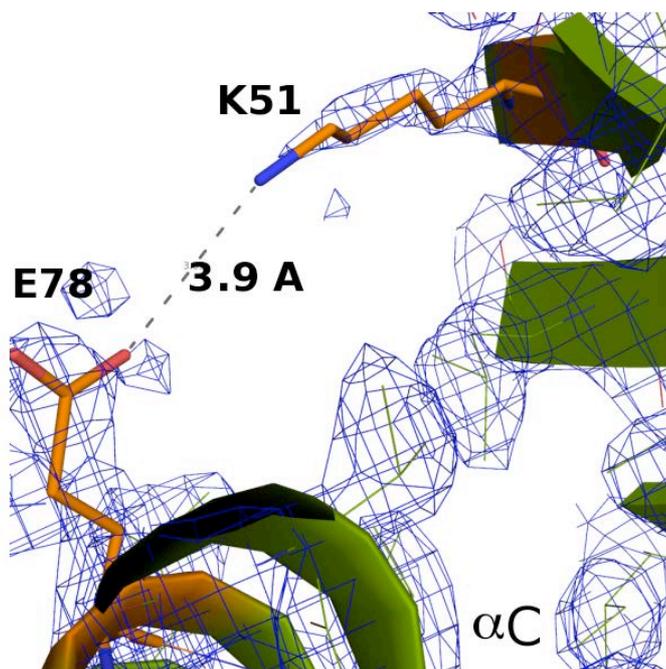


Figura 69. Detalle del mapa de densidad electrónica (pesado por σ_A , $2mF_{obs} - DF_{calc}$ contorneado a 1σ) correspondiente a los residuos Lys51 y Glu78 de LmaMPK10 Δ C. Se indica con línea punteada la distancia interatómica entre ambos residuos. Nótese la densidad electrónica débil de las cadenas laterales de estos aminoácidos (indicativo de alta flexibilidad).

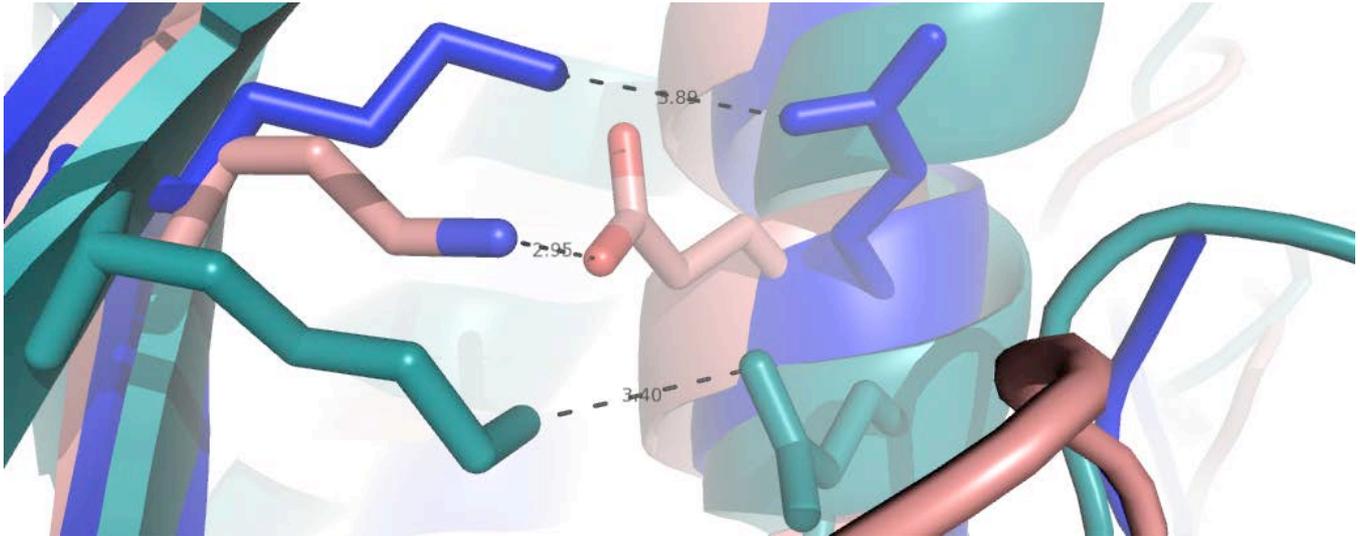


Figura70. Detalle de la interacción correspondiente a los residuos Lys51 y Glu78 de LmaMPK10ΔC donde se destacan las distancia entre los residuos. Superposición de LmaMPK10ΔC (azul) con la estructura de ERK2 (2ERK) en su estado activo (verde) y p38 (3GCP)-unida a SB203580 (rosa) que forman un puente salino más estrecho entre ambos residuos.

Características distintivas de LmaMPK10 en relación a las Ser/Thr quinasas

Se analizó la similitud de LmaMPK10 con otras quinasas, concentrando la atención en residuos conservados, que han demostrado ser clave para la actividad y también para para la regulación de las proteín-quinasa. Se utilizaron algoritmos de alineamiento múltiple de secuencias (ClustalW, Larkin et al., 2007) y de estructuras (DALI, Holm & Rosenstrom, 2010), incluyendo en particular un conjunto de quinasas humanas y de otros parásitos Trypanosomátidos, para identificar residuos/regiones parásito-específicas o únicas de *Leishmania*. En primer lugar aparece con claridad (Fig. 71) la presencia del dominio tipo ePK, incluyendo los 12 motivos altamente conservados (Hanks *et al.*, 1988; Manning et al., 2002), como era de esperar. Si observamos el alineamiento estructural y de secuencia, podemos observar que LmaMPK10 tiene alta similitud con muchas MAPKs, en particular las de la familia ERK y p38. Si analizamos la secuencia aminoacídica en detalle, podemos identificar los residuos ultraconservados para las ePK (Kannan *et al.*, 2007) presentes en LmaMPK10 (Figura 72) , los que junto a los elementos patognómicos del grupo CMGC de PQs, permiten clasificar a LmaMPK10 como una ePK del grupo de CMGC Si bien en LmaMPK10 se observan los residuos típicos de ePKs (Kannan et al., 2007), pero existen algunas sustituciones puntuales en posiciones particularmente interesantes. Yendo ahora más

específicamente a las quinasas de la clase GCMC (Kannan & Neuwald, 2004), si bien la mayoría de los residuos que las definen están efectivamente conservados en LmaMPK10, se observan algunas sustituciones en posiciones altamente conservadas: la Met205 (posición ocupada típicamente por una Leu en MAPKs), la Phe210 (sustituyendo una Tyr) y la Arg234 (reemplazando una Pro). En relación a las características que definen al grupo de las MAPKs, además del bucle de activación con la secuencia fosforilable THY, encontramos el inserto MAPK (MKI) de unos 50 residuos, localizado en el lóbulo C-terminal (Pimienta & Pascual, 2007), que ya mencionamos. Además, muchas MAPKs presentan también una extensión C-terminal variable, flexible y poco conservada como la que posee LmaMPK10.

Lmj_MPK10/1-377 --MQAKGEAAMRDLEAELHAMQSPITVQRFISSGSGYAVCAQGVDS E -G I R -VAIKR V FNTVSDGRTVNILSDS -FLCKRV-LREIRLNLHF---HFNPLGLGRDFIVH-----FEERAMHKLYLVTELMRDLAQVH---GRIVITSR 132
 Hu_ERK1/1-320 --(23)VPGEVEMVKQDFDVGPRITLQLYIGEGAYGMVSA YH-VRKTR-VAIKKI-----SFFEHQ-TYCCRT-LREIQILLRF---RHENVIGINDILIRA-----STLEAMRD---VYIQDLMEDLYKLLK---SQ--LSN 121
 Hu_ERK2/1-331 --(6)AGAGHEMVRQGVDFDVGPRITLQLYIGEGAYGMVSA YH-VNKVR-VAIKKI-----SFFEHQ-TYCCRT-LREIKILLRF---RHENVIGINDILIRA-----PTIQOMKD---VYIQDLMEDLYKLLK---TH--LSN 120
 Hu_ERK3/1-721 -----MAEKFEELMNIHGFDLGRSMDLPLGCGGGLVFSAVDND-CDKR-VAIKKI-----VLTDR-QS YKHA-LREIKIIRRL---DHDNIVKVFELIGPSGSQLTDDVGSLELNSVYIQEYMETDLANVE---GR-LLE 126
 Hu_ERK4/1-587 -----MAEKQDCIASVYVDLGGRFVDLPGGLGFGVNLVLSAVDSR---ACRKA VAVKII-----ALSDA-RSMKHA-LREIKIIRRL---DHDNIVKVFELIGPSGSQLTDDVGSLELNSVYIQEYMETDLARLLE---GT-LAE 123
 Hu_ERK5/1-478 --(35)LALLKARDFDVTFDVGDENIEIEIIGNCAYGVVSA-RRRLGQQQ-VAIKKI-----FNADAVVTNAKRT-LRELKILKHF---KHDNIIAIDILIRRT---VYGEFKS---VYVLDLMEIDLHAIH---SS--LTL 124
 Hu_ERK7/1-538 -----MCTVVDRIYVRVLLRROLGQCA YGVWKA VDRR-LGEV-VAIKKI-----FDAPFDK-TDAQR-FREITLLQEGG---DHPNIIISLLDVIIR---END-RD---IYLVFEMFDLNAVI---KGL-LQD 111
 Hu_JNK2-81/1-353 --(11)QFYSVQVADS TITVLKRRQOQLKPIGS GAQGVCAAFD-TVLGIS-VAVKLL-----SRPFNQ-THAKRA-YRELVLLKCV---NHKNIISLLNVFTQ---KTL EEFQD---VYVME LMDANLCOVH---ME---LDH 121
 Hu_p38alpha/1-360 --MSQERFTFYRQELNKTIWEVEERQONLSRPGSGAYGVVSA YDAR-LRQK-VAVKLL-----SRPFSS-IHAART-YRELRLLKHM---KHEVIGLLDVFPA---RSL EEFND---VYVTHLMGADLNNIV---C K--LTD 124
 Hu_p38beta/1-368 --(1)AGFYRQELNKTIWEVEERQONLSRPGSGAYGVVSA YDAR-LRQK-VAVKLL-----SRPFSS-IHAART-YRELRLLKHM---KHEVIGLLDVFPA---RSL EEFND---VYVTHLMGADLNNIV---C K--LTD 124
 Hu_p38gamma/1-342 --(8)SGFYRQELNKTIWEVEERQONLSRPGSGAYGVVSA YDAR-LRQK-VAVKLL-----SRPFSS-IHAART-YRELRLLKHM---KHEVIGLLDVFPA---RSL EEFND---VYVTHLMGADLNNIV---C K--LTD 124
 Hu_p38delta/1-339 MSLIRKKGFYKQDVNKTAWELRKTIVSRTHVYSGAYGVVSA YDAR-LRQK-VAVKLL-----SRPFSS-IHAART-YRELRLLKHM---KHEVIGLLDVFPA---RSL EEFND---VYVTHLMGADLNNIV---C K--LTD 124
 Lmj_MPK1/1-326 -----MTYIGIDGEEVQRIRLRHIGSGAYGVVCAALDRR-TG-KCVALKVV-----YDAGFNV-QGART-YREVM LQRER---HNFIVIGLVDVIR---ANDI-D---LYLVFELI EADLTAIIR---KNL--LOR 111
 Lmj_MPK3/1-388 --(14)GDFKVVNVSGSPEFVRSKVTLLKILGMGAYG IACSLDGD-TCEK-VIKKC-----RDVFRDV-EDCKRV-LREIDMMRF---HHE NLLNVNLI PPL---KREYHSEF---VYVVTPLMDVDMNVLR---SRV--LE 125
 Lmj_MPK4/1-359 --(11)SGKKIYSVRQRFVDRDLKVVYFGACCTVCSAVANG-SCEK-VIKKC-----SRVFCDL-RECKRI-LREIMETS---KHNILIRLHFMRPQ---SK ETFED---IYVMDLYDLDLNRIR---SRK--LED 123
 Lmj_MPK5/1-377 --(24)RKRKYVCVRQGSFDIDDNITVSVIGHGAYGVVCAALDRR-TG-KCVALKVV-----SRVFE DL-IDCRRI-WREI LLLRILKECCRNVLRLIRVLPPR---DRI MEFRD---LYLVTDLYDIDLFSIR---ANKCES I 126
 Lmj_MPK6/1-621 -----MEANETLGLIGLGEYTVGVVKA-RSRYGKL-VAIKRF-----KQTEQL-EHVRKTS-LREIKLLQLL---QHPNIVRLLEDVFR---EGKLYLVF EIDQITLQLL---S TTRGLRR 101
 Lmj_MPK7/1-592 --(32)SEHKSYHVRGSI FEVAHPHEVLNGIGYCA YGVVCAAVDLRLVA (70)VAIKKV-----TKVFDLL-VDCRR-LREIKLLRYL---QHPNIVRLMEVGRPPAR-TGASSAAAFD---IYLVTDLMDL GALLR---SS E--IAM 132
 Lmj_MPK8/1-358 -----MDNVDVLEVIGEGTYGVVKKRDKRIN-RI VAVKFM-----KNFTN-AYVYVAMRELRLVQLL---KSEPNVQLLETFKQ---KNR---VYVMEYIPRSLDLVLE---E VHG-LPE 101
 Lmj_MPK9/1-373 -----MERITVMQGLDGCSECTVSKA QNTS-TG EIVAVKFM-----KQRFHSEEE---CLG-LREIQSLRKY---QHPNIVKLVKLVYR---EKTE---LFMIF EYCEKNI FQIQRADEM (6)SD 102
 Lmj_MPK11/1-380 -----MPATKSLAEIQAEVRRLLERLIGAGSYGVVIRARDTK-SDNRLVAMKRV-----NKEIFEV-ILA KR-LREIKLLAHF---NDDNII GLRNILTPK---DRENFDH---FYVMDIME DLKQVLR---SG E--LTE 123
 Lmj_MPK12/1-380 --(13)NKVYVFGVNDYRLEVEFERNVQHFVGRGAYGVVCAAVDAVY-NEB-VAIKKV-----MHLFDDA-VDA KR-VREYKLLAYL---KHPNIIISLKD LFKS---D BVDVTVSE---LYVTDLMDLMDA I LR---S RIRLAA 125
 Lmj_MPK13/1-358 -----MDKYEILAQIGDCTFESVLAADIK-TO-QYVAIKKM-----KKA FEO---VNR-LREIQAVRRL---QHPNIVDLVEYL---FDRTER-LALVLELMDMSLYELK---GRK Y--LGE 99
 Lmj_MPK14/1-339 -----MDKYEILAQIGDCTFESVLAADIK-TO-QYVAIKKM-----KKA FEO---VNR-LREIQAVRRL---QHPNIVDLVEYL---FDRTER-LALVLELMDMSLYELK---GRK Y--LGE 99
 Lmj_MPK15/1-976 -----MHLLAGRIILVKQIGKGGFVAVVETDAI-LEDN-VAIKTI-----SRVYVNE---RRR-LPEVIDMCRF-HEAHPHVGTFSIFA-KG (60)-TKTDEEN---VHIVMPLMKDGLFYFIRLLSSS (12)A 118



Lmj_MPK10/1-377 QHIOYFMYHILLGLHVLHEAGVHHRDLHPGNI LLA---DNNDITICDFNLAREDTADAN---KHIVYTRWYRAPELVM-QFKCFIKLVDMWGACGVMAEMFNRAKALFRG-STFY-NGLNKIVVEVGTPKIEDVVMFS---SARDYLNRN 272
 Hu_ERK1/1-320 DHICVFLYQILRGLKVIHSANVLRDLKPSNLLIN---TTCDLXICDFGLARHIDPEHDTGFLTEYVATRWYRAPEIML-NSKCVTKSIDIWSVGCILAEMLSNRPIFG-KHYL-DQNLHILGLIGSPQEDLNCI---NMKARNYLQSL 265
 Hu_ERK2/1-331 DHICVFLYQILRGLKVIHSANVLRDLKPSNLLIN---TTCDLXICDFGLARHIDPEHDTGFLTEYVATRWYRAPEIML-NSKCVTKSIDIWSVGCILAEMLSNRPIFG-KHYL-DQNLHILGLIGSPQEDLNCI---NMKARNYLQSL 264
 Hu_ERK3/1-721 EHARLFMYQLLRGLKVIHSANVLRDLKPSNLLIN---EDLVLIKDFGLARIMDBHSHKQHLSEGLVTKWYRSRLLLS-NNNYTKAIDMWAAGCIFAEMLTGTLFAGAHLEL-EQMQILILEIPVYVHEEDRQELLSVIVYINRDMTEF 274
 Hu_ERK4/1-587 EHAKLFMQQLLRGLKVIHSANVLRDLKPSNLLIN---EDLVLIKDFGLARIMDBHSHKQHLSEGLVTKWYRSRLLLS-NNNYTKAIDMWAAGCILAEMLTGTLFAGAHLEL-EQMQILILEIPVYVHEEDRQELLSVIVYINRDMTEF 274
 Hu_ERK5/1-478 EHYRNFLLQQLRGLKVMHSAQV IHRDLKPSNLLIN---ENGELEKIDFGMARLCTSPAE (3)MTEYVATRWYRAPELML-SLHEITQAILDWVGCIFCEMLAROLFPG-KNYV-HQLQIMMVLGSPAVYQAVG---AERYVRIQSL 268
 Hu_ERK7/1-538 VHYRNFLLQQLRGLKVMHSAQV IHRDLKPSNLLIN---ANCTVLCDFGLARSLDGLPEG (3)MTEYVATRWYRAPEVLL-SSHRITLGDVMMWALCGILEMELRCRPLPG-TSTL-HQLELILEIPPESEDL LALGL---S CRAV LHO 254
 Hu_JNK2-81/1-353 ERMSNLLYQMLCGIKHLHAGI IHRDLKPSNIVVK---SDCTLKIDFGFLARLACTNEM---MTPYVYTRWYRAPEVIL-GMVKENVDIWSVGCIMAEMLVHNVLPFG-RDVI-DQWNVYEQLGTPSAEFMKLQTVRNVYENRKK 263
 Hu_p38alpha/1-360 DHVQFLIYQILRGLKVIHSADIIHRDLKPSNLA V N---EDGELKIDFGFLARHIDDE---MTPYVATRWYRAPEIML-NWMMHNTQVDIWSVGCIMAEMLTGRPLFG-TDHI-NLQQIMRLTTPSAYL INRPF---SHEARNYIQSL 262
 Hu_p38beta/1-368 EHVQFLVYQILRGLKVIHSAGI IHRDLKPSNVA V N---EDGELKIDFGFLARQADEE---MTPYVATRWYRAPEIML-NWMMHNTQVDIWSVGCIMAEMLTGRPLFG-TDHI-NLQQIMRLTTPSAYL INRPF---SHEARNYIQSL 262
 Hu_p38gamma/1-342 DRIOFLVYQMLKGLRVIHAA G IHRDLKPSNLA V N---EDGELKIDFGFLARQADEE---MTPYVATRWYRAPEVIL-NWMMHNTQVDIWSVGCIMAEMLTGRPLFG-TDHI-NLQQIMRLTTPSAYL INRPF---SHEARNYIQSL 260
 Hu_p38delta/1-339 EKIOFLVYQMLKGLRVIHAA G IHRDLKPSNLA V N---EDGELKIDFGFLARHIDDE---MTPYVATRWYRAPEVIL-SWMMHNTQVDIWSVGCIMAEMLTGRPLFG-TDHI-NLQQIMRLTTPSAYL INRPF---SHEARNYIQSL 262
 Lmj_MPK1/1-326 DHKRFLLYQMLRGLKVIHAAQNI IHRDLKPSNVA V N---SDCSIKLDFGLARTFRSGFD (6)LDYIATRWYRPELIL-KSRAYSTAMDMWAGCVIEMELTGRPLFG-RNHL-DQLRLI VEAIGVPSDADVRS LH---ELET LINS 255
 Lmj_MPK3/1-388 SHMOYFVYQILRGLKVIHSANVAHRDLKPSNLLV N---ISCELEKIDFGLSRSVDVPS E---LTDYVITRWYRPELILL-ENTNYSYAVDIWSVGCIFAEMNRRPVFPG-RNIM-DQLRMIAQHIKPPASIVE-----HREALEK 260
 Lmj_MPK4/1-359 EHLQXFMIOAFRGLHVLHSAKVMHHRDLKPSNLLV N---ADCALAICDFGLARDDQVMSSD---LQYVYVTRWYRPEVILGMSNOYTSYAVDVWVGLGLIFAEMLVGRALLPG-TDYIGQQLVMI VNLGLKPSIDMFE L---SSEAEF ILS 266
 Lmj_MPK5/1-377 DLLRRISVRLRCLADMHSMGIVHRDIKPSNLLRDEKNAEVI-VCDFGLARAGLHRLSELDLTDYVYTRWYRPELILL-MCPYSYRDIWAAGCVMAEYAMORPLFAG-RDYI-HQLQVLSIPIITGVDFIERSS (8)IANKKIGTR 275
 Lmj_MPK6/1-521 ELRR-YTQQLRGI EFCNHNHVIHRDVPENVID---ESGLMLCDFGFARQTSARGK---YTDYVATRWYRPELIL-GDVA YGRVDVWVGLGCMFAELDGGPLFPGESDL-DQLCLIMQTCGRVQRLVFI---MHNRLNHSFF 241
 Lmj_MPK7/1-592 DQLRFIAYQLMKVLYVYSSGVI IHRDLKPSNLLN---GNCDMLCDFGFLRGGVPAWE (49)LTDYVYTRWYRPELILL-MGRNHYAIDMWAAGCILAEMVLRPLFTG-ANLL-SALALILEIPGLRQVQIPPE (20)---HGTARRD 275
 Lmj_MPK8/1-358 DQLRVLLFTILLGIRCHRNHVIHRDVPENVID---DDGAASLCDFGFLRQLQ (69)MNYVATRWYRPEMLL-GMSYIYAVDMWAGY IMAEADGEP LPLPGKTEL-EQLS LIQTRIGDFAAYEAA (34)ASDVRDAAR 248
 Lmj_MPK9/1-373 KEIRIIMCGTLLGQVQAIHKAGFMHRDLKPSNLLS---GD-LVYVADFGFLAKELRSRPE---FTEYVYTRWYRAPELVLL-HS THNYSYVDIWAAGY IFAELCLRPLPGTSE---DQLFKICSVLGRANENDEG---YQLARRINMR 240
 Lmj_MPK11/1-380 AHIOQFIYQALDLHIHSAAGV IHRDITPANI V N---TNCDLKIDFGFLAENQDGEY---MDYVYTRWYRPELVLM-EDKCHYSADMDWVGCILELGLLGSPLFG-KDRV-NQDKIVDVI VPS EEDINSYV---S SAAKYLKK 264
 Lmj_MPK12/1-380 CHGQVFLDILLCALQYIHSANVLRDLKPSNLLD---SECNLLKIDFGFLARGLGHDDT---MDYVYTRWYRPELVLL-EDKCHYSADMDWVGCILELGLLGSPLFG-KDVI-NQINILVELLGI F---DLARDLPSSTSKA IYHLS 266
 Lmj_MPK13/1-358 EKVRVYMQQLKGLDHAHRIQVHRDIKPEL LID---AEGHLIADFGCKGVSKL P---LFEYIYTRWYRPECLL-TDQVYNYKMDLWAGCVFPEI IALFPLPGSNEL-DQVHRIHNVLGPTEILERL---KFKGTHMDYDF 238
 Lmj_MPK14/1-339 4)VKNIHRDMLALVNIHKRGMFHRDMKPEL LIRKEASGDEYVLDADFGLVKEIRARPE---FDYVYTRWYRPELILL-QDRFGAAVDVWAGC IIMVELITMRPLPGTNEV-DQLFKIMSVLGRPEEVAWGLRL---AKKIRYTF 246
 Lmj_MPK15/1-976 QVAVVFAPGICGLDNLHQFIIHRDMLVRL (5)YMRITAIADMDLADQAQS---DIIYICTRYRPPREVI L-SVSGSRIIDVILGCGFIEMGCTGTLFIMRTA (14)GLEVLNIIIGTPAAEDIERMII---SNAHL LQR 263



```

Lmj_MPK10/1-377      L--SNVBAR---AWTAVVP----TADPVALDLIAKMLEFNPQRRISTEQALRHPYFESLFDPLDLTEGLERHFHDESVTDVYDMHKIFTAEVERFNDLRREREEVARERAVAAQQQGEQVLGTDHMPRTHSLMELAGSAPAPSS----- 407
Hu_ERK1/1-320       P---SKTKV--AWAKLFP----KDSKALDLDLRMLTFNPHKPFIFAMELDDLKERLKELEIFQETARFQPGVLEAP----- 333
Hu_ERK2/1-331       P---HKNKV--PWNRLFP----NADSKALDLDLRMLTFNPHKPFKFDMELDDLKERLKELEIFQETARFQPGYRS----- 330
Hu_ERK3/1-721       H-----KFP---LTQLLP----GISREALDFLEKILTFSPMDRLTAEEALSHPYMSIYSPFMDPEISSPHFHIIDEVDDILLM-DETHSHIYNWERYHDCQFSEHDWVPHNNFDIDEVQLDPRALSDVTDEEEVQVDPRK(321)---- 405
Hu_ERK4/1-587       S-STWVKRP--LRKLLP----EVNSEADLFLEKILTFNPMDRLTAEMGLQHPYMSYSCFEDEPTSQHPFRIEDEIDDIVLM-AANQSQLSNWDTCSRYVLSLSDLEWRPDRCDASAEVQRDPRAAGS-APLAEDVQVDPRK(188)---- 404
Hu_ERK5/1-478       P-----PQRYVWETVYYP----CADRQALSLLCRMLRFEFSARISAAAALRHPFLAKYHDPDDEPDCAFPDFDAFDREALTRERIKEAIVAEIEDFHARR(423)----- 364
Hu_ERK7/1-538       L--GSRPRQT--LDALLP----PDTSPREALDLRLLVFAFDKEADVRRRAHEGCVQLSVPEYRSRYVQMILECCGSSGTSREKCPGEGVSPSAHLHKPRADPQLPSRTFVQGRPRPQSSPGHDPAEHESPRAAKNVPKQNSAP(126)---- 395
Hu_JNK2-81/1-353    P-GIKFEELFPDWIFPSESERDKIKTSQARDLLSKMLVIDPKRQIYDAQLEEREHA-IIEWKELIYKEVMDWEERSKNGVVKDQPSAQMQQ----- 353
Hu_p38alpha/1-360   T-----QMPKMNFAVFI---GANPLAVDLLEKMLVLDLKKRIIAAQLAHAYFAQYHDPDDEPVADPYDQSFESRDLIDEWKSLTYDEVISFVPPPLDQEESES----- 360
Hu_p38beta/1-368    P-----PMPQKDLSSIFR---GANLPAIDLLGRMLVLDLQRYVAAEALAHAYFSQYHDREDEPEAEPEYDESVEAKERTLEEWKELTYQEVLSFKPPEPPKPPGSLIEIQ----- 364
Hu_p38gamma/1-342  P-----ELEKDFASILIN---ASPLAVNLEKMLVLDLAEQVQYDDSFDDVDRT-LDEWKRVTYKEVLSFKPRQLGARVSKETPL----- 338
Hu_p38delta/1-339  P-----QTPRKDFLQFLP---RASPOAADLLEKMLLDVQKQDFDDEKLEHEKLT-VDEWKQHIYKEIVNFSPIARKDSRRRSCKML----- 340
Lmj_MPK1/1-326      P-----TFL-IFSPFLVG--NKSLKDSSEADLMMKLIYFNPKRRLPLVDEKII-YTK-----EEKANLYDEIGMRYRHHITDYY----- 323
Lmj_MPK3/1-388      NELPDSLNIPKLVPGLA---GNTEGIDFLSKMWTLDPSKRPAAADMLAHPYLAHLHDEEEDPACSCFPLWAHESTMGVSELRRFAWADIVDYNPSLEQATPPVTTAGGSSSKNGSGHH----- 378
Lmj_MPK4/1-359      P-----HRAALSFRLFISM---ATEEATDLLSKLLVFNHARRLTAQVMHPYFSSKYRDAEEADAPDFVWNHSHIETKEQLREDLWRVVEAHSQLE----- 356
Lmj_MPK5/1-377      R-----LRQLLS-----KLPRDGLLELVTEMLAFENKRIIAQEALKHPFSSVGGPDDCKSYAPP-ELDLGDMHAEVSECLRRAIWDLQYYRQK----- 361
Lmj_MPK6/1-621      TLCLIMQTCGPVQRLLVF---IFMHNPLNGII-SFPTP-AQRLTCEL-MELPYFTRDGFDRYEAELQAMGLPQLRSTPTTSA PSTQRRAPDQAAALG(774)----- 340
Lmj_MPK7/1-592      PLTLDQVHSQVLFHSTLFGFKVDYPIISGLILIAKLLSFDPRKRPTALEALRDPFFWLDYDRDEILRCPASDPSVAREQIDDIAAYQKAHPCVVVDES PVF(79)----- 381
Lmj_MPK8/1-358      TES-KQSTSSYLTERVGC---RIAKAGLNLLHGLLRIDAAERITVEEALGHPYFDSVGRFDATANGARRVCNSNGACDEAADNRPTTAETAESMLMR(1141)----- 348
Lmj_MPK9/1-373      P-----TVAFTPLRHILIT---TAPPAAVDLMAQLMRFNPAEHNPFQMAASVAVAQMSNVGLTSMNSPPPPTTSNALSFKYANLNOGNRSPLSVSSTSA PFGSSALOGSVTS-SNIVRSVTTQRKTSVFNAAADSDDEFNF----- 373
Lmj_MPK11/1-380     S-----HRPQADWRQRYFP---KASPEALDLLRHMLVFNPKRTLF--RFDENEQKTIIMDKRAIYKESYKFNHEHPSSMRATTMYSAFNTPSVAAPSVATEGECRSAQQTIEKNIPEDVAEENFDFREQV----- 382
Lmj_MPK12/1-380     P--PSKGGK--LEEAAP(45)EEYAEFVDFIFGLLCYNBAKIYRWDADGTAFTLIPQLRQLFIDEIGGKEASTRSS----- 338
Lmj_MPK13/1-358     P-----KKQGTGLGKLLP---HVSVAEALDMKLLTYDEEQKHSASISRPTTVYDDAHAIGLGGSPRKTTNGMPSLNSLTLSARKLPIVIDGKSPTKSCTLVFNQSTLHQVHCAAAATSAGDDLVARSLPKLI----- 363
Lmj_MPK14/1-339     P-----KVASGLAQALP---SHIPLPDLDLRQMLVYDPKVRLLTAEQCLQHPFNVGIDECNAPSAAALDQLALMAKRMLPGSKTAPPALKSPITTDQVA(311)----- 343
Lmj_MPK15/1-976     AARRPSQLRQL--IEQNWILHTSADEKEKWIDLITRCVAAFBEQTLVSYSGSDSTRANKAAVSAAHRCRQQSVALHFDNSAFMAHLSPGSAFRHRPASPDLGTLAAAFSSEESGPVVEDTPLLGPATFRNRI TRRRSSAAQEEED(319) 415

```



Figura 71. Alineamiento de LmaMPK10 con secuencias de proteínas ortólogas y parálogas seleccionadas. Las secuencias seleccionadas están rotuladas a la izquierda con un código que contiene los nombres de Especie_Proteína. El código de especies utilizado fue: Hu: *Homo sapiens*, Lmj: *Leishmania major*. La numeración de residuos de cada secuencia se indica en la columna de la derecha. Las MAPKs putativas de *Leishmania* así como un conjunto de quinasas humanas más relacionadas (p38, ERKs, JNK entre otras) fueron seleccionadas para resaltar las posiciones altamente conservadas en ePKs. La conservación de las secuencias está representada con el código de colores Clustal. Brevemente, los residuos conservados son aquellos que son compartidos por el 50-60% de las secuencias y son resaltados en colores de acuerdo al tipo de residuo: los hidrofóbicos en azul (W,L,V,I,M,F,A,C); los básicos en rojo (K,R); los ácidos en magenta (D,E); los polares no cargados en verde (T,S,N,Q); los mixtos polar/hidrofóbicos en cyan (H,Y); P (en amarillo) y G (en naranja). Abajo del alineamiento de señalan las regiones de estructura secundaria nombradas de acuerdo a la estructura de LmaMPK10ΔC, para tener una referencia espacial. El plegamiento de tipo ePK contiene 12 motivos altamente conservados (Hanks et al., 1988).

La comparación con otras MAPKs permitió identificar otros residuos conservados que presentan sustituciones en posiciones funcional o estructuralmente relevantes. Estos aminoácidos “atípicos” en LmaMPK10 están compartidos entre todos los ortólogos de LmaMPK10 de protozoos Trypanosomatidae, pero no en las otras 16 MAPKs de *Leishmania* que en cambio muestran allí los típicos residuos de ePKs convencionales. Como se describe en detalle a continuación, estas “sustituciones” están localizadas en bucles o segmentos que juegan roles funcionales importantes en MAPKs (Figuras 72 y 73):

- 1) El bucle P (residuos 30-34), que contiene la secuencia conservada GXGXXG, está directamente implicado en el posicionamiento del nucleótido cuando éste se une a la proteína, acercando las glicinas a los grupos fosfato α y β . En LmaMPK10, dicha secuencia contiene a la Ser30 reemplazando a la primera Gly conservada.
- 2) En ERK2, la reacción de fosfotransferencia es catalizada por el Asp147 (incluido en el motivo HRD) que actúa como base general, y asistida por la Lys149, que interactúa con el fosfato γ del ATP, permitiendo su correcto posicionamiento y estabilizando el estado de transición. (Turjanski *et al.*, 2009). En LmaMPK10 el Asp catalítico está conservado (corresponde al Asp158), pero la Lys se encuentra sustituida por la His160. Esta His está ocupando una posición clave en el sitio de unión al ATP, muy cerca y apuntando en la misma dirección que el Asp158 catalítico. La presencia de una His en esta posición se observa en muy pocos miembros de la familia de ePK, en particular en ELKs (ePK like kinase family) de procariotas (Kannan *et al.*, 2007). Las quinasas ELKs presentan una gran diversidad de secuencia y funcional, y no están bien caracterizadas. Sus sustratos incluyen proteínas y también pequeñas moléculas (lípidos, azúcares y aminoácidos) y parecen tener funciones reguladoras.
- 3) Luego del motivo HRD, hay otra sustitución inusual en la posición 173, donde encontramos que la Lys canónica, está reemplazada por una Thr en LmaMPK10.
- 4) Quizás la sustitución más importante, dada su importancia funcional, involucra al motivo conservado DFG, que delimita, el comienzo del bucle de activación. La Asn178 en LmaMPK10 sustituye a la Gly típica de este motivo. Esta Gly está directamente involucrada en el switch regulatorio entre las conformaciones *DFG-in* (estado activo) y el *DFG-out* (inactivo) de las ePKs (Kornev *et al.*, 2006; Pargellis *et al.*, 2002), switch que está ligado al movimiento inter-lóbulos y a la acomodación del sitio activo para la catálisis. La presencia de la Asn en la posición 178 de LmaMPK10 tendría consecuencias en el *switch on-off*: una Asn en lugar de una Gly hace que la

cadena principal sea más rígida, pues el residuo de Gly tiene una inusual libertad en la adopción de ángulos dihedros ϕ/ψ pues es el único aminoácido sin cadena lateral. En particular la configuración de este residuo observada en un diagrama de Ramachandran, en las estructuras de quinasas en estado inactivo, haría incompatible o energéticamente muy costoso la presencia de otro tipo de aminoácido, incluyendo una Asn. Además, en LmaMPK10 la Asn178 está adicionalmente estabilizada por un puente de H entre su propia cadena lateral y el O de la cadena principal del Glu78, agregando una restricción a la posición de la hélice α C y haciendo aún menos probable el movimiento requerido para el *flip* DFG(N) *in/out*.

- 5) También se pueden identificar sustituciones en el bucle de activación, clave en la regulación de ePKs. La Thr190 y la Tyr192, los 2 residuos fosforilables que forman parte del motivo THY, están en un contexto poco usual en LmaMPK10. La posición 189, típicamente es un residuo hidrofóbico en ePKs, mientras que en LmaMPK10 está ocupada por una Lys (no incluida en nuestro modelo cristalográfico, por la alta movilidad del bucle de activación y la consecuente densidad electrónica débil).
- 6) La Thr típicamente conservada en la posición 195 en el motivo TRWY, se encuentra sustituida por una His en LmaMPK10.
- 7) Finalmente, una sustitución tal vez más sutil pero en una región clave de la proteína, en la posición 210, involucra la sustitución de una Tyr conservada, por una Phe en LmaMPK10. Vale esta mención debido a la importancia funcional del grupo OH de la cadena lateral fenólica descrita en el mecanismo de *switch on/off* de muchas quinasas CMGC (Kannan & Neuwald, 2004), principalmente por la estabilización de la Thr fosforilable del bucle de activación en el estado activo de la quinasa.

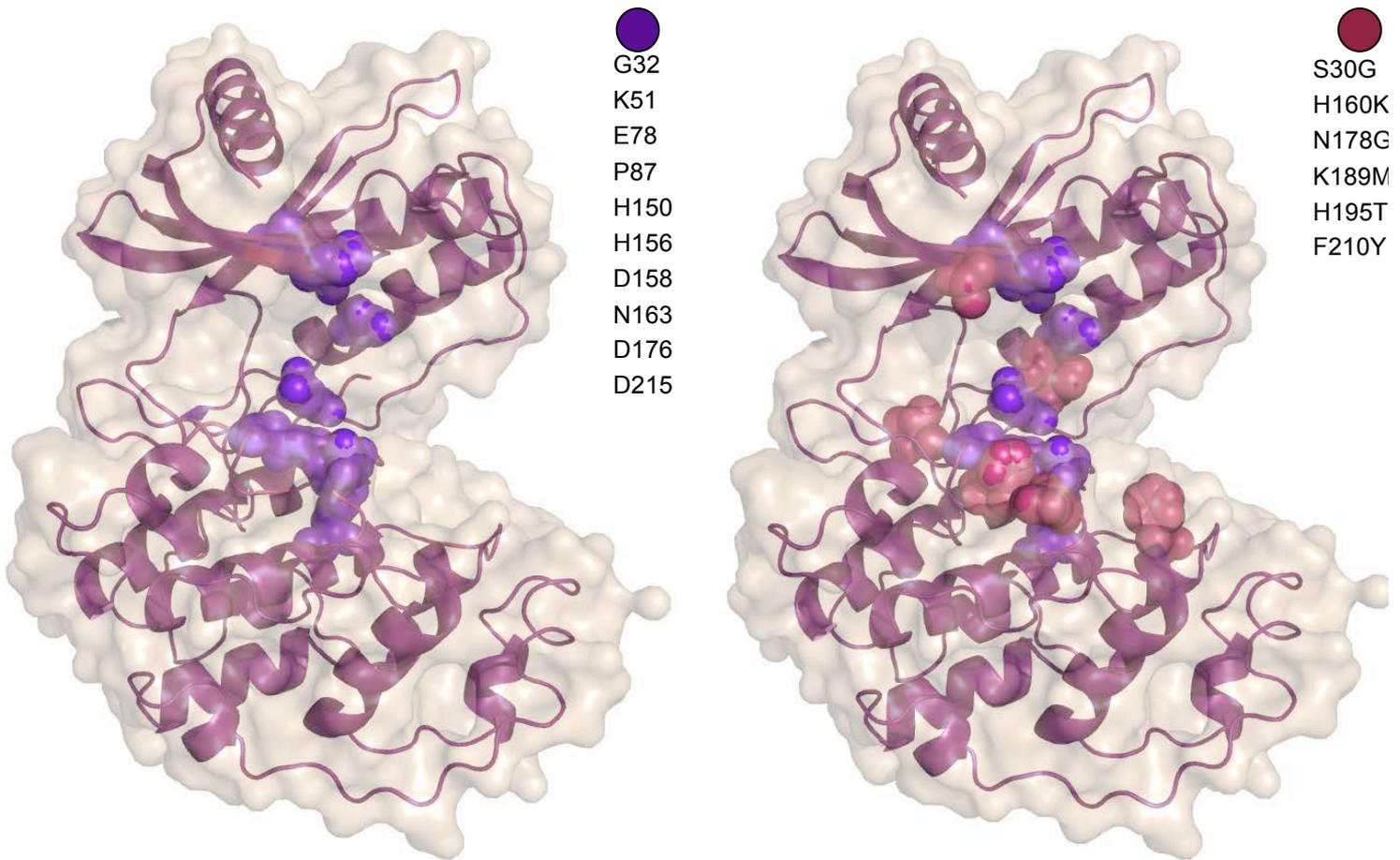


Figura 72. Posiciones clave que muestran aminoácidos atípicos en LmaMPK10 en comparación con la secuencia consenso de una MAPK. En violeta se remarcan residuos ultra-conservados en todas las proteína-quinasas de tipo eucariota (y también conservados en LmaMPK10, argumentando a favor de que LmaMPK10 es una quinasa funcional). En magenta se muestran los amino ácidos modificados en LmaMPK10, en posiciones yuxtapuestas a sitios clave ultra-conservados. El grado de conservación de estos residuos modificados es extremadamente alto en proteína-quinasas.

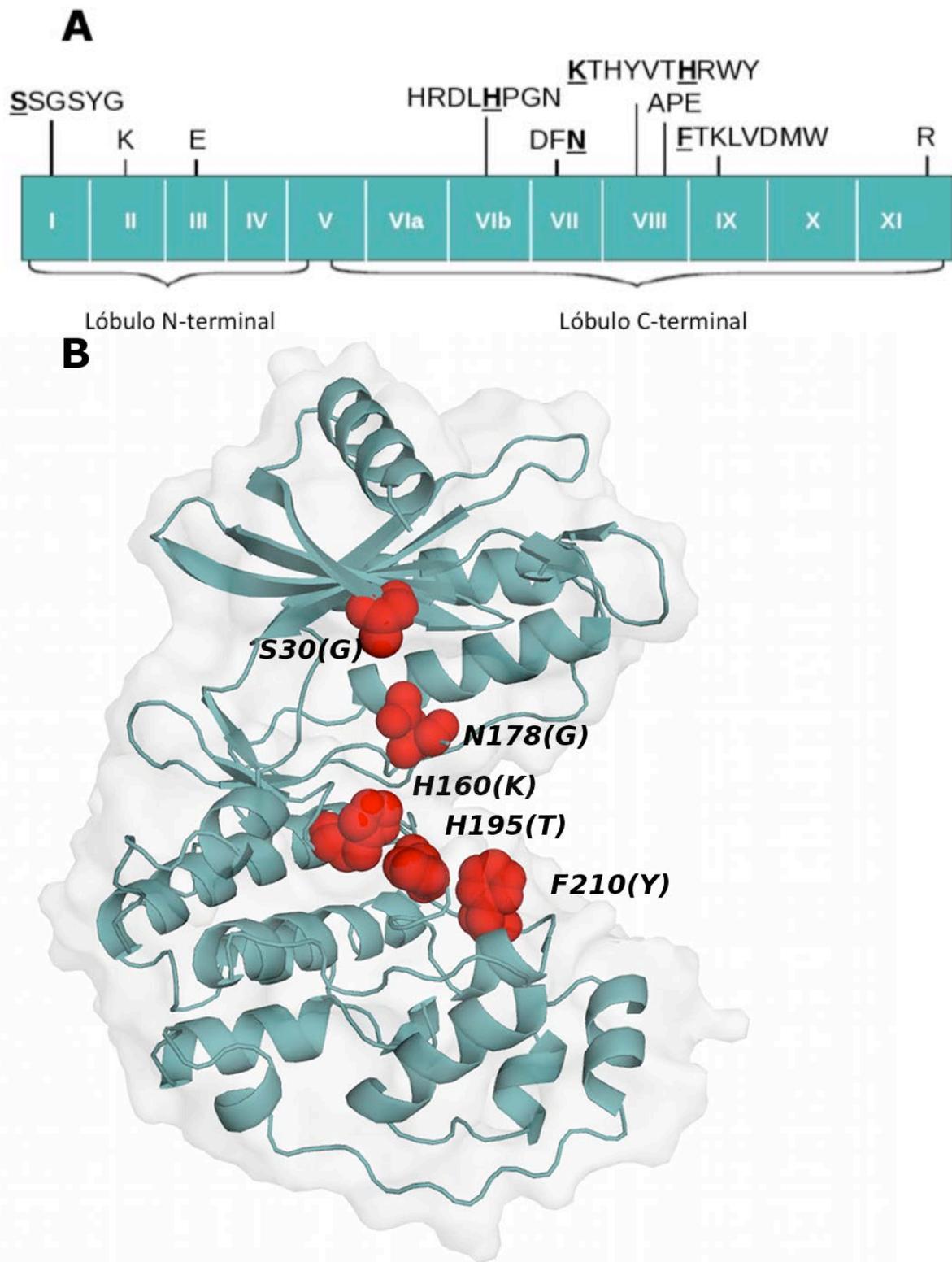


Figura 73. Otra vista relacionada a la Fig 68, subrayando el detalle de las sustituciones LmaMPK10-específicas en posiciones funcionales clave (A) Representación esquemática de la secuencia completa de LmaMPK10, mostrando las posiciones relativas de los los 12 motivos ePK conservados (en números romanos) y algunos motivos de secuencia importantes donde encontramos modificaciones de LmaMPK10. Se resaltan las secuencias conservadas de cada dominio ePK (B) Representación de la estructura LmaMPK10 Δ C, con la superficie accesible al solvente en color transparente superpuesta. Para mayor claridad, sólo cinco de las sustituciones puntuales de LmaMPK10 se marcan con esferas rojas. Se resaltan las posiciones sustituidas en LmaMPK10 (en rojo) en motivos conservados.

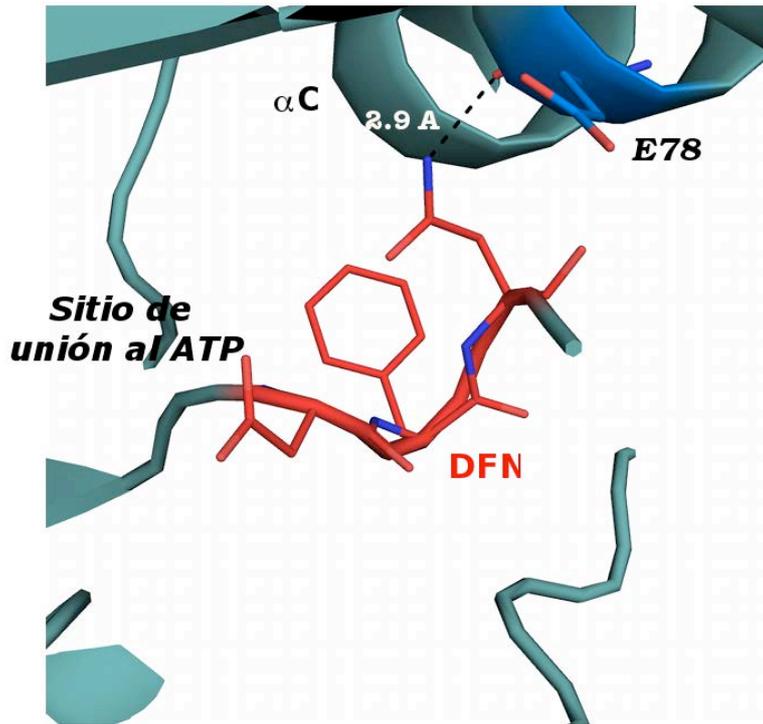


Figura 74. Primer plano del motivo DFG modificado, que ha evolucionado a DFN en LmaMPK10. Se indica el puente de H que une la cadena lateral de la Asn al Glu78 clave de la hélice α C. Se observa la Phe del motivo DFN en su configuración "Phe-in", asemejándose a la arquitectura de las quinasas en el estado activo. El sitio de unión a ATP está indicado como referencia espacial

Con el objetivo de caracterizar el rol funcional de estas sustituciones en posiciones clave observadas en LmaMPK10 y sus ortólogos, se generaron mutantes puntuales de LmaMPK10 en 6 residuos únicos (Ser30Gly, His160Lys, Asn178Gly, Lys189Met, His195Thr, Phe210Tyr), además del hexa-mutante, con los seis residuos mutados en forma simultánea. Estas mutaciones fueron diseñadas para revertir a los residuos típicos conservados en ePKs. Se expresaron y purificaron las distintas proteínas recombinantes. Algunos de estos mutantes presentaron cambios en las propiedades fisicoquímicas de las proteínas (solubilidad, cristalizabilidad), pero en ninguno de ellos se logró detectar actividad por encima del nivel de la proteína salvaje (ver más abajo en ensayos de actividad). No se detectó una ganancia de actividad en autofosforilación o utilización de sustratos sustitutos (MBP, caseína) (resultados no mostrados).

Dado el gran interés funcional que tiene el motivo DFG, delimitando el comienzo del bucle de

activación, nos abocamos a resolver la estructura cristalográfica del mutante puntual de LmaMPK10, sustituyendo la asparagina que se ve en LmaMPK10 salvaje, por la glicina que se observa en casi todas las quinasas conocidas. Logramos cristalizar este mutante en la misma condición que LmaMPK10 Δ C, y se resolvió su estructura 3D por síntesis de Fourier, dado que resultó ser un cristal tetragonal isomorfo a la proteína salvaje. El refinamiento de la estructura no está culminado aún, algunos parámetros se resumen en la tabla 12. El análisis comparativo de LmaMPK10 Δ C vs el mutante LmaMPK10 Δ C_DFG reveló idéntica estructura global. Sin embargo, analizando en detalle la región cercana al sitio de la sustitución, en el mutante se logra visualizar la modificación de la Asn natural por Gly. Además, se observan cambios estructurales en el bucle P, con la Tyr34 cambiando su posición (Fig. 75), con lo que no podemos descartar que este cambio tenga implicancias en la unión al nucleótido.

Tabla 12. Parámetros cristalográficos del mutante LmaMPK10 Δ C-DFG

LmaMPK10ΔC-DFG	
Grupo de espacio	P4 ₃ 2 ₁ 2
Moléculas de proteína por unidad asimétrica	1
Longitud de onda (Å)	1,5418
Resolución (Å)	40,4-2,6
Reflexiones medidas	110807
Multiplicidad	4,0 (3,8)
Complejitud (%)	96,3 (79,2)
Rmeas (%)	9,2 (46,1)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	14,0 (2,8)
a=b (Å)	80,91
c (Å)	129,79
Resolución de refinamiento (Å)	40,4-2,6
R _{cryst}	0,201
R _{free}	0,285
Rms de ángulos (°)	0,009
Rms de ángulos (°)	1,07

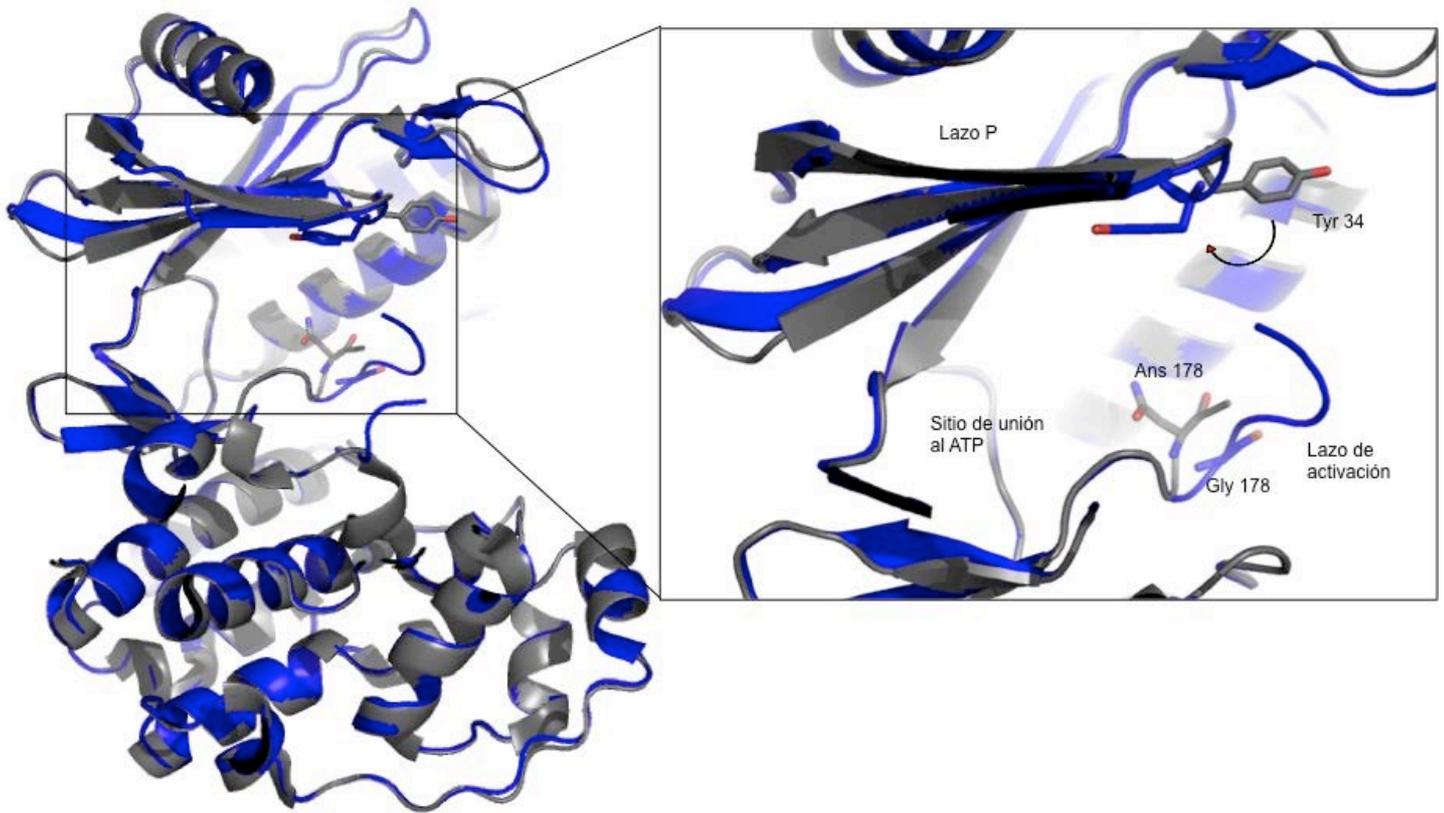


Figura 75. Superposición de las estructuras de LmaMPK10 Δ C (PDB ID 3PG1, en gris) y LmaMPK10 Δ C mutante DFG (en azul). Se observa el detalle del bucle P, resaltando los cambios observados en la Tyr34 y el comienzo del bucle de activación donde se destaca el motivo DFN/DFG mutado.

El análisis detallado del motivo DFG en el contexto de la estructura de LmaMPK10, revela que la sustitución por la glicina, genera cambios en las asociaciones entre residuos. La figura 76 muestra cómo la pérdida de la Asn178 que formaba un puente de H con el Glu78 de la α C, hace que la cadena principal de la Gly178 pase a formar puentes de H con la cadena lateral de la Arg77 presente en la α C. Esto hace que el comienzo del bucle de activación tenga un corrimiento de 3.4 Å.

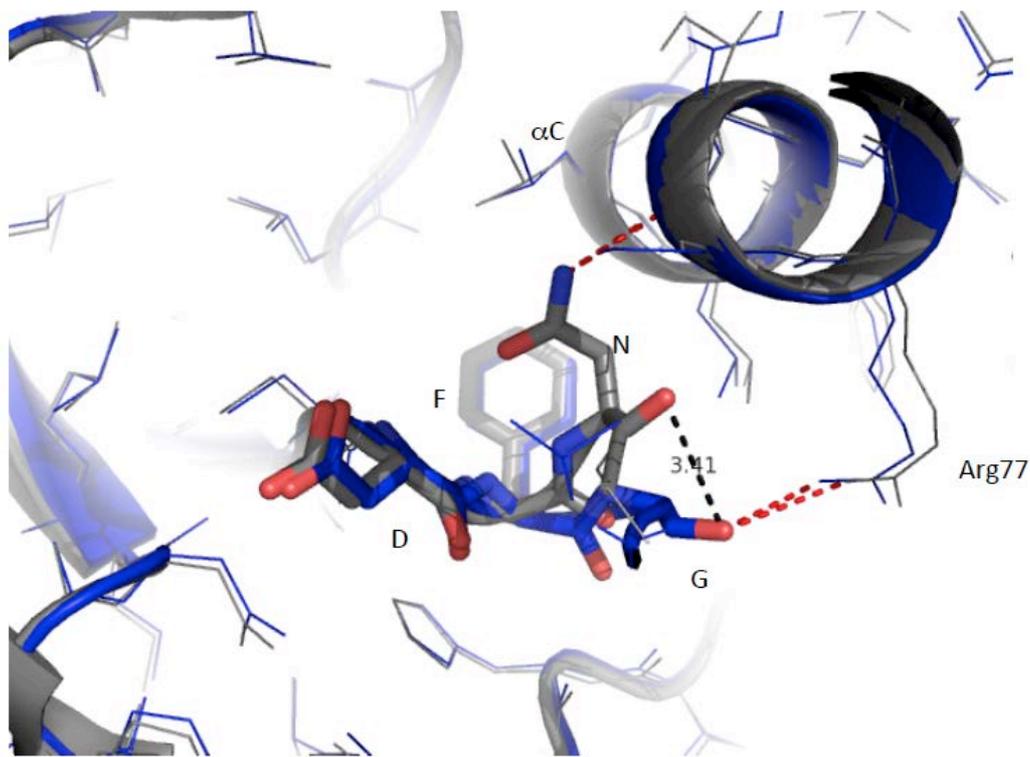


Figura 76. Se observa el detalle del motivo DFN y del DFG de LmaMPK10 resaltando las interacciones por puentes de H que establecen dichos residuos.

Caracterización bioquímica de LmaMPK10ΔC

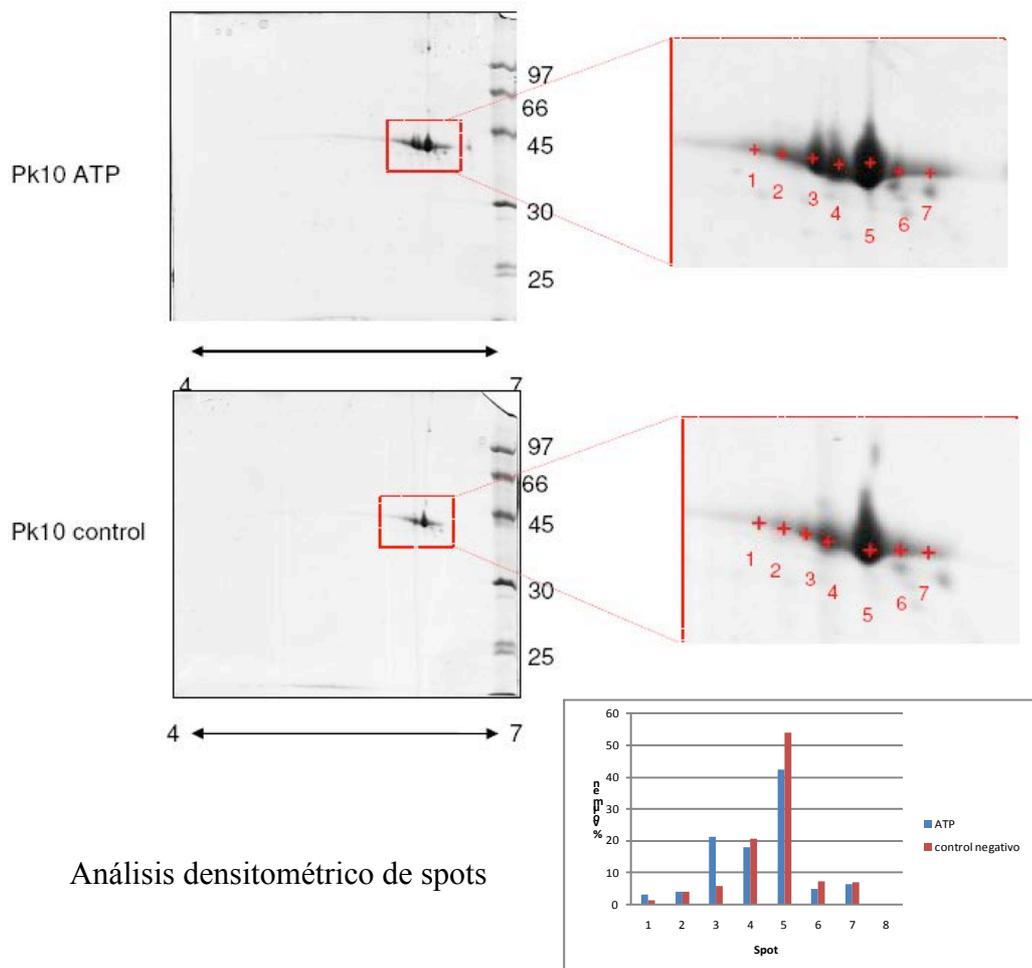
a) Ensayos de actividad enzimática acoplada

Con el objetivo de caracterizar la cinética de fosforilación de LmamPK10, se utilizó un ensayo acoplado (Lindsley, 2001). La detección del consumo de ATP se correlaciona directamente con la fosforilación, y este consumo es detectado en el ensayo acoplado. Brevemente, el aumento de la concentración de ADP, se acopla a la oxidación de NADH por la piruvato quinasa, en presencia de fosfoenolpiruvato y lactato deshidrogenasa. El sistema acoplado se utiliza en exceso para evitar el agotamiento de reactivos. La oxidación de NADH se monitorea por espectrofotometría a 340 nm a 25°C. Para ensayar actividad de autofosforilación, se evaluaron concentraciones de enzima entre 10 y 30 μM (de LmaMPK10, LmaMPK10ΔC o mutantes). Las reacciones se monitorearon por un máximo de 1 hora, sin detectar consumo de ATP. También se intentó determinar la fosforilación de sustratos genéricos (sustitutos), para lo cual se utilizó β -caseína y MBP (*myelin basic protein*), variando

la concentración entre 10-50 μM . Tampoco en estos casos se midieron niveles detectables de fosforilación. El ensayo fue calibrado en idénticas condiciones usando 1 μM de la Ser/Thr quinasa PknB de *Mycobacterium tuberculosis* y 8 μM de su sustrato específico GarA (Villarino *et al.*, 2005) como control positivo. Este resultado fue al comienzo desalentador e incluso manejamos la hipótesis de que LmaMPK10 fuera una pseudoquinasa, pero los ensayos siguientes nos condujeron a nuevas hipótesis. La evaluación de los mutantes puntuales de LmaMPK10 ΔC no mostraron ganancia de función.

b) Geles Bidimensionales

Con el fin de caracterizar bioquímicamente a la proteína LmaMPK10 ΔC recombinante (expresada y purificada en *E. coli*), y determinar si es posible fosforilarla o activarla *in vitro*, se realizaron estudios para identificar formas fosforiladas de la proteína. Para esto se realizaron geles de electroforesis bidimensionales con la proteína purificada, comparando con geles 2D de la proteína purificada e incubada con ATP y Mn^{2+} . Estos ensayos revelaron que las proteínas purificadas recombinantes se conforman por una población heterogénea de especies con diferentes puntos isoeléctricos (Fig 77). Esto podría explicarse por la presencia diferencial de residuos fosforilados, o bien de otras modificaciones postraduccionales. La incubación de LmaMPK10 ΔC con ATP resultó en el cambio de la proporciones relativas de las distintas isoformas, consistente en principio con una modificación en el grado de fosforilación de la población. El análisis por MS de algunos de los *spots*, permitió identificar diferentes péptidos de LmaMPK10 fosforilados, en el bucle de activación y en otros sitios de la proteína (Tabla 13).



Análisis densitométrico de spots

Figura 77. Análisis de los perfiles de fosforilación de LmaMPK10 Δ C recombinante purificada. Los geles de poliacrilamida bidimensionales (a la izquierda) teñidos con azul de Coomassie, muestran la separación de LmaMPK10 Δ C en una serie de isoformas. Los paneles superior e inferior son corridas similares, con la proteína previamente incubada con ATP (arriba) o incubada sólo con buffer (abajo). Los spots numerados corresponden a diferentes isoformas de LmaMPK10 Δ C. Se seleccionaron los spots número 5 (especie mayoritaria) y 3 (uno de los spots que mostraba mayor modificación diferencial por incubación con ATP), para proceder con tripsinización de las bandas cortadas y análisis por LC-MS.

Tabla 13. Péptidos fosforilados de LmaMPK10 Δ C identificados por HPLC fase reversa MS/MS. Corresponden a los *spots* 3 y 5 mostrados en la Fig 71 (aquí indicados en distintas filas) de diferentes condiciones experimentales como se indica (esto es, sin o con agregado de ATP).

	Dominio LmaMPK10	Secuencia péptidica	Control Spot 3	Control Spot 5	ATP Spot 3	ATP Spot 5
1	N-terminal	TVNIL <u>S</u> DSFLCK	-	-	+(?)	+/-
2	N-terminal	TVNILSD <u>S</u> FLCK	-	-	+(?)	+/-
3	C-terminal	IF <u>T</u> A EVER	-	-	+	-
4	Activation loop	THYV <u>T</u> HR	+	-	+	+
5	Activation loop	EDTADAN K <u>T</u> HYVTHR	+/-	-	+	-
6	Activation loop	EDTADAN K <u>T</u> HY <u>V</u> THR	+/-	-	+	+/-

Este resultado fue alentador, porque nos permitió detectar residuos fosforilados de LmaMPK10. Siendo algunos de ellos los típicos residuos del lazo de activación del motivo THY que podrían ser explicados por su actividad de autofosforilación. Además se detectaron otros residuos que podrían tener otras implicancias estructurales o funcionales, pero dado que es una proteína recombinante purificada de *E. coli* carecía de relevancia biológica hasta ser identificados en la proteína purificada de parásitos. De todas formas, la ausencia de una marcada actividad quinasa de LmaMPK10 recombinante podría explicarse si pensamos en la conformación inactiva de la proteína. Muchas quinasas requieren de otras proteínas para ser activadas. Posiblemente la activación de LmamPK10 sea mediada por proteínas el parásito que aún no han sido identificadas. En particular, es bien conocida la cascada de activación de las MAPKs que necesitan ser fosforiladas en su bucle de activación por su MKK específica. Siguiendo esta hipótesis se diseñó un experimento en procura de la forma fosforilada (activada) de LmaMPK10 por su MKK específica. Se purificó His-LmaMPK10 y His-LmaMPK10 Δ C, las que se incubaron ON con extractos de proteínas de parásitos amastigotes (*L. donovani*), inhibidores de fosfatasas, ATP y Mg²⁺. Es bueno remarcar que hay evidencias de que LmaMPK10 se fosforila en el estadio amastigote del parásito (Morales et al., 2007). Luego se procedió a repurificar la proteína a través de su etiqueta de histidinas y se analizaron comparativamente en geles de electroforesis 2D comparando con proteínas control (esto es,

no tratadas con extractos de amastigotes ni ATP). En estos ensayos no se encontraron cambios significativos en los perfiles de *spots* (Fig 78).

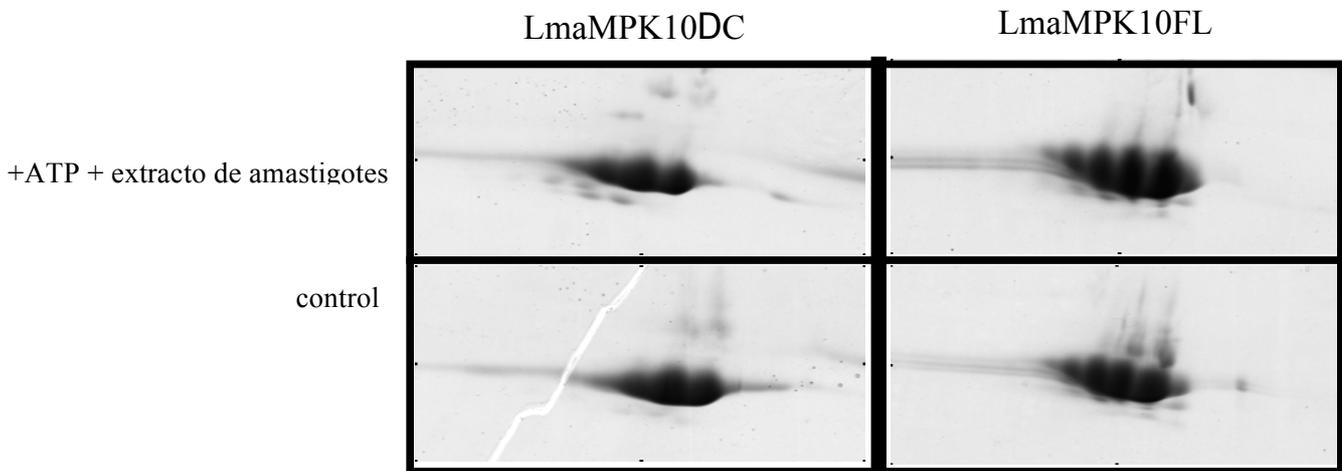


Figura 78. Análisis de las isoformas de LmaMPK10 recombinante purificada tras su incubación con ATP y extractos de amastigotes. Se muestran los gels de poliacrilamida bidimensionales teñidos con azul de Coomassie. Los paneles superior e inferior son corridas similares, con la proteína previamente incubada con ATP y extractos de amastigotes (arriba) o incubada sólo con buffer (abajo).

c) Actividad quinasa in vitro (IVKA) en presencia de ATP marcado

Tomando en cuenta que no pudimos detectar actividad quinasa en la proteína recombinante y que varios residuos conservados en regiones clave de LmaMPK10 están sustituidos en comparación con las secuencias típicas de ePKs, consideramos la posibilidad de que LmaMPK10 sea una pseudoquinasa. Para descartar esta hipótesis se realizaron ensayos de actividad en presencia de [$^{32}\text{P}\gamma$]-ATP como sustrato dador de grupos fosfato, aumentando así la sensibilidad del método. Para esto decidimos comparar la actividad de la proteína recombinante con la proteína purificada de parásitos. Brevemente, la quinasa se incubó en presencia de ATP marcado, en un buffer adecuado y se agregó un sustrato genérico fosforilable. La reacción se analizó mediante SDS-PAGE y autorradiografía como se muestra en la figura 79. Se comparó la actividad de autofosforilación de LmaMPK10 Δ C con la actividad del mutante puntual Lys51Ala (la Lys51 es requerida para establecer el puente salino con el Glu78 en el estado activado de las ePKs) como control negativo de actividad (Fig 79).

Además, se analizó a la proteína nativa, en su contexto biológico natural. Para ello se cultivaron parásitos (*L. donovani*) transfectados con construcciones que expresan la proteína de fusión GFP-LmaMPK10 (gentilmente cedidos por el grupo de G. Spaeth, Inst Pasteur – Paris), se cosecharon y lisaron, y mediante inmunoprecipitación a partir de extractos de proteínas solubles de amastigotes, utilizando un anticuerpo anti GFP, se purificó la proteína de fusión. La fracción obtenida fue caracterizada por Western blot con antisuero anti-GFP, verificando la presencia de la proteína LmaMPK10 fusionada a GFP (73.9 KDa), para luego utilizarla como fuente de enzima en ensayos de actividad con [³²Pγ]-ATP. La autofosforilación no fue detectada, aunque no podemos descartar que esto sea debido a que LmaMPK10 ya se encuentra fosforilada en amastigotas. Sin embargo, la actividad de fosfotransferencia a MBP fue confirmada (Fig. 79). Coherentemente con una actividad quinasa genuina de LmaMPK10, dicha fosfotransferencia mostró ser dependiente de la integridad del sitio activo: la mutante Lys51Ala no mostró actividad. Es importante destacar de cualquier modo que la actividad de fosfotransferencia de LmaMPK10 fue mucho más débil que la de ERK2 (resultado no mostrado), con lo que no podemos descartar la necesidad de otros factores eventualmente necesarios para una activación completa, pero si podemos concluir que LmaMPK10 no es una pseudoquinasa. Estos resultados refuerzan la idea de la importancia del contexto de las proteínas del parásito en la activación y actividad de LmaMPK10. Posiblemente la existencia de MKKs específicas o de proteínas de andamiaje que colaboren en la actividad/conformación de LmaMPK10 son requerimientos importantes para detectar la conformación activa de la proteína.

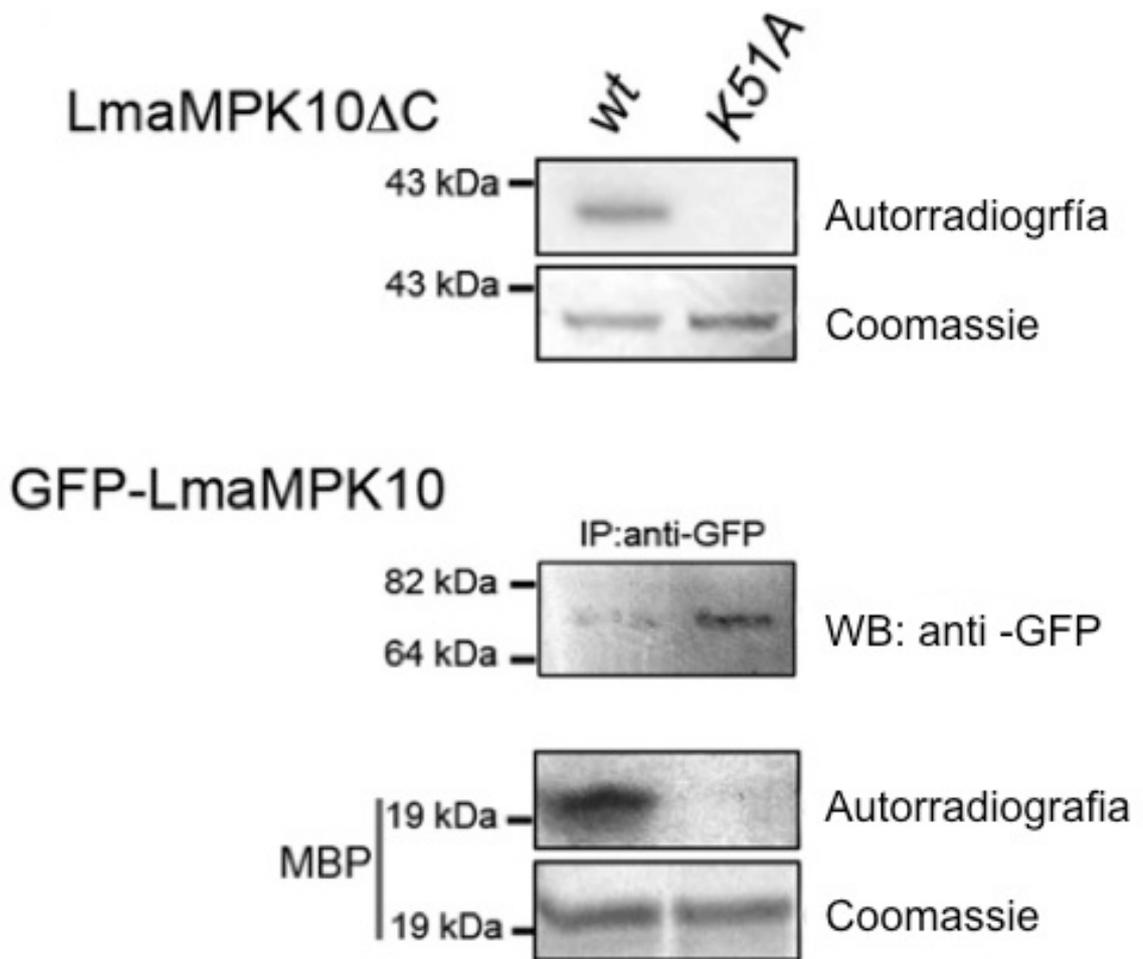


Figura 79. Análisis por SDS-PAGE y autorradiografía de la actividad quinasa de LmaMPK10 y del mutante inactivo K51A en presencia de $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. Arriba se muestra la capacidad de autofosforilación de LmaMPK10DC recombinante pura (41 kDa). En el panel inferior se observa la actividad de la proteína transgénica GFP-LmaMPK10 purificada de parásitos amastigotas axénicos (*L. donovani*) en presencia de la proteína básica de la mielina (MBP; 21 kDa). GFP-LmaMPK10 es purificada por inmunoprecipitación utilizando anticuerpos anti-GFP [IP: anti-GFP]).

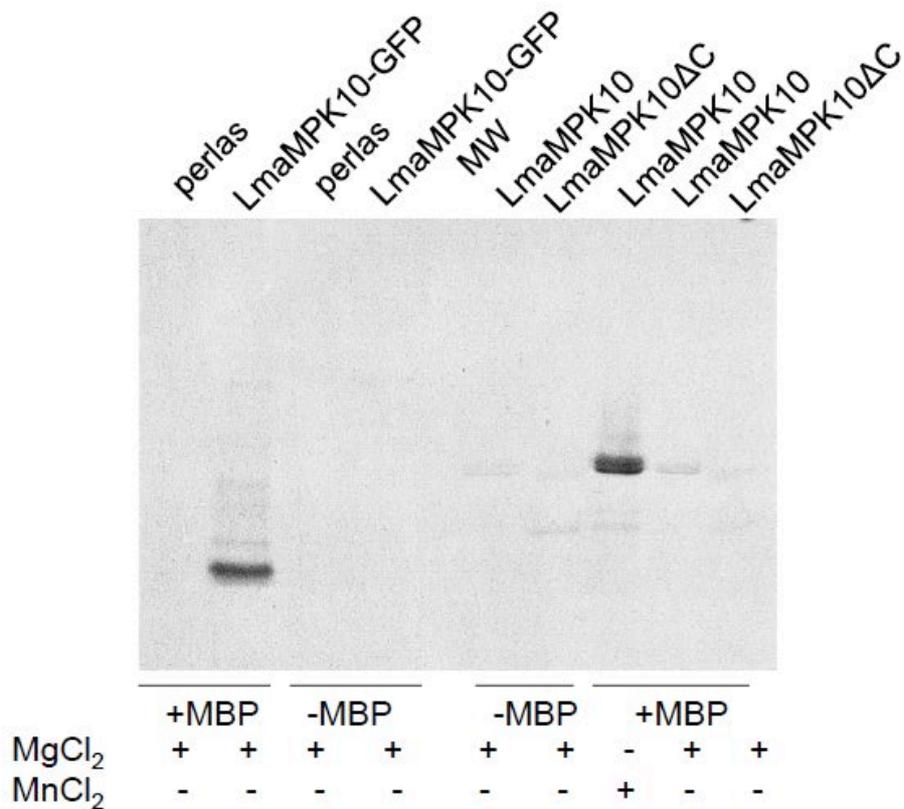


Figura 80. Análisis por autorradiografía de la actividad quinasa de LmaMPK10-GFP purificada de parásitos transgénicos y de LmaMPK10 y LmaMPK10ΔC recombinante presencia de $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. El ensayo se realizó en presencia o ausencia de MBP ; Mn^{+2} y Mg^{+2} .

En la figura 80 se comparó la actividad de la proteína recombinante purificada de *E. coli* y la proteína transgénica purificada de parásitos (por inmunoprecipitación). Las proteínas purificadas de parásitos se comportaron de forma diferencial, teniendo preferencia por el catión divalente Mg^{+2} y favoreciendo la fosforilación del sustrato genérico MBP en relación a la actividad de autofosforilación. Las proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* no mostraron actividad clara de fosforilación de sustratos genéricos y prefieren en cambio Mn^{+2} como cofactor. Además, la actividad de LmaMPK10ΔC es notablemente mayor que la de LmaMPK10. Este resultado se discutirá en profundidad más adelante. Es interesante resaltar que la actividad de autofosforilación de las proteínas recombinantes sólo se da en presencia de un sustrato genérico. La actividad en este caso, no solo depende de la arquitectura ePK, puesto que la mutante muerta Lys51Ala reveló una actividad de fosforilación indetectable; sino también de algún otro tipo de estabilización que genera el sustrato y favorece la actividad quinasa.

La caracterización de la actividad de LmaMPK10 purificada de parásitos y recombinante fue un capítulo importante de la Tesis de Doctorado de Mathieu Cayla (laboratorio de G. Spaeth, Institut Pasteur, París)(Cayla et al., 2014).

d- Buscando la forma activa de LmaMPK10

Debido a las dificultades encontradas para fosforilar *in vitro* a LmaMPK10, y siempre con el fin de estudiar la forma activa, probablemente fosforilada, de la misma, nos propusimos la expresión y purificación de LmaMPK10 a partir de parásitos transfectados. El aislamiento y purificación de la forma fosforilada “natural” de la proteína, nos permitiría probar en forma directa la hipótesis de que la activación de LmaMPK10 depende de la fosforilación específica por otras proteín-quinasa río arriba, sólo activas en el parásito en el pasaje al estadio amastigote. Este trabajo formó parte de una pasantía en el laboratorio dirigido por el Dr Gerald Spaeth (Parasitología Molecular y Señalización, Institut Pasteur, París).

Se realizaron transfecciones de *Leishmania tarentolae* con construcciones que expresan LmaMPK10 (usando plásmidos de expresión para *Leishmania* pLexY). Los dos intentos realizados no condujeron a resultados positivos, debido a dificultades mayores en la obtención de parásitos transfectantes.

Hasta el momento sin embargo, esta estrategia de purificar la forma natural de LmaMPK10 sigue siendo un objetivo mayor en el marco de un enfoque de Biología Estructural, pues nos permitiría luego estudiar comparativamente el fenómeno de la activación (regulación catalítica de la enzima, como base central de la señalización celular) en base a los cambios conformacionales disparados por la activación (fosforilación), entre las formas activa e inactiva de LmaMPK10.

CAPÍTULO III

Análisis estructural y biofísico de LmaMPK10 en complejo con moléculas ‘activas’ (inhibidores y/o análogos de sustrato): hacia el diseño racional de drogas.

Ensayos de unión a ligandos

La determinación de la estructura de LmaMPK10 en complejo con un nucleótido, un derivado de nucleótido o un inhibidor competitivo, constituye un paso importante en una estrategia de descubrimiento de drogas basada en estructura. Con este objetivo se realizaron experimentos de tanto de “soaking” como de co-cristalización con ATP, ADP y AMP-PCP en presencia o ausencia de Mg^{2+} ó Mn^{2+} . Los ensayos de co-cristalización se realizaron mediante rastreo de 384 condiciones con mezclas de LmaMPK10 Δ C o LmaMPK10 con ATP, ADP y AMP-PCP en presencia o ausencia de Mg^{2+} ó Mn^{2+} . Los ensayos de co-cristalización no condujeron a cristales de proteínas en las condiciones ensayadas. Por otro lado se realizaron ensayos de “soaking” en los cuales, cristales preformados de LmaMPK10 Δ C se incubaron en tiempos cortos (menores a 5 minutos) con mezclas de los ligandos mencionados. Se resolvieron todas estas estructuras (datos no mostrados), revelando en todos los casos que el sitio de unión al nucleótido no estaba ocupado por ninguna de estas moléculas. Teniendo en cuenta esta dificultad inicial con una aproximación cristalográfica, se decidió rastrear eventuales compuestos que se unan al bolsillo de LmaMPK10, y cuantificar eventualmente las constantes de asociación, utilizando calorimetría por titulación isotérmica (ITC) y ensayos de corrimiento térmico basados en fluorescencia (*Thermal Shift Assays*).

Unión de ATP a LmaMPK10

En primer lugar se intentó determinar la afinidad de unión de LmaMPK10 al ATP o a moléculas relacionadas con el ATP mediante ITC, para cuantificar la constante de disociación al equilibrio. La señal/ruido fue muy baja para poder determinar las constantes, lo que podría reflejar una sorprendentemente débil asociación ATP-LmaMPK10, que sería consistente con las dificultades descritas más arriba para obtener las estructuras 3D de dicho complejo binario. De cualquier modo, no puede descartarse el efecto del gran calor de dilución del Mg^{2+} que efectivamente se detecta en el ensayo, y que a pesar de denodados esfuerzos no

pudimos evitar. Sin embargo, los ensayos de corrimiento térmico basados en fluorescencia tampoco fueron capaces de revelar unión específica de LmaMPK10 a ATP, utilizando la proteína completa así como la variante trucada en el C-terminal (ver páginas 144-145).

Unión de SB203580 a LmaMPK10

Estudios previos ya habían sugerido que SB203580, un inhibidor específico de la MAPK humana p38 (Cuenda *et al.*, 1995), era capaz de inhibir la actividad de LmaMPK10 (Morales *et al.*, 2007). Por ello, intentamos caracterizar la unión de este inhibidor a LmaMPK10 usando ITC, en ensayos similares a los efectuados con ATP. Tanto la quinasa salvaje como la versión truncada LmaMP10 Δ C unieron SB203580 con una estequiometría de 1:1 (Tabla 13; Figura 81). La asociación muestra un componente fuertemente entálpico. La constante de disociación se mostró significativamente afectada por la presencia/ausencia de los últimos 46 residuos C-terminales de LmaMPK10: LmaMP10 Δ C tiene ~30 veces mayor afinidad por el inhibidor en comparación con LmaMPK10 entera (Tabla 14). Este resultado no deja de llamar nuestra atención debido a que los 46 residuos C-terminales presentes en LmaMPK10 parecerían estar distantes del sitio de unión al nucleótido.

Los ensayos por TSA confirmaron este perfil. En estos ensayos de corrimiento térmico, LmaMPK10 recombinante es incubada con el fluoróforo *SYPRO Orange*, para luego someterla a un programa de aumento gradual de temperatura. El *SYPRO Orange* es sensible al ambiente hidrofóbico/hidrofílico, uniéndose con mayor facilidad a regiones de baja constante dieléctrica. El proceso de desplegamiento disparado por el aumento de temperatura, expone regiones hidrofóbicas de la proteína en estudio, lo que resulta en un aumento neto de la fluorescencia emitida por el fluoróforo. El uso de TSA (Fig. 82) confirmó esencialmente los resultados que se habían obtenido previamente por ITC, no arrojando valores significativos con ATP y derivados de nucleótido, pero sí mostrando la unión de SB203580 a la proteína, dicha asociación siendo más fuerte cuando se utiliza la variante truncada en C-terminal. Otra característica relevante que pudo ser revelada por TSA es que la proteína entera es significativamente más estable ($>12^{\circ}\text{C}$) que la proteína LmaMP10 Δ C (Fig. 82). Además, en la proteína truncada la unión del inhibidor SB203580 produce un aumento en la estabilidad de la proteína que se refleja en el aumento de la T_m .

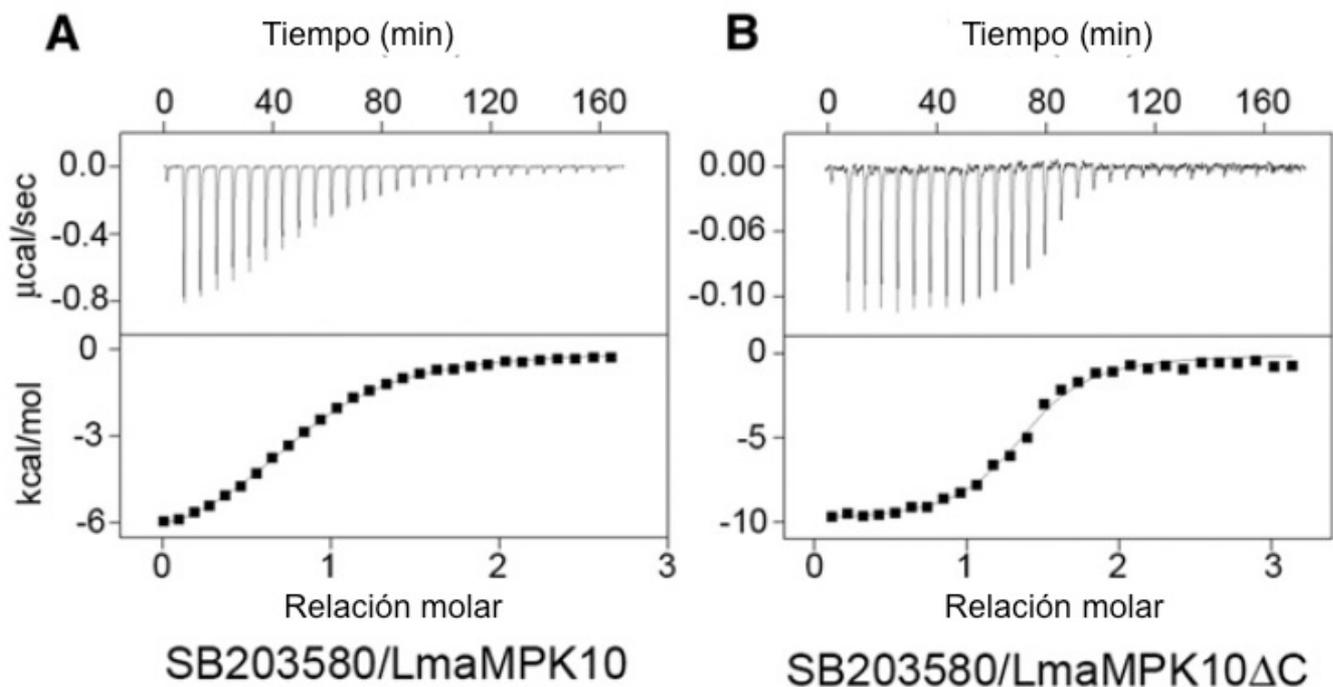


Figura 81. Análisis termodinámico de la unión de SB203580 a LmaMPK10. La figura muestra una comparación de las curvas ITC entre (A) la proteína completa y (B) la forma truncada en el extremo C-terminal LmaMPK10 Δ C, ambas tituladas con el inhibidor de p38 humana SB203580. Cada ensayo se realizó por duplicado. Los paneles superiores muestran los flujos de calor crudos medidos en el experimento, mientras que los paneles inferiores grafican los calores de inyección integrados (normalizados por la cantidad de SB203580 inyectado en cada caso). Se puede notar las estequiometrías similares en términos de la relación molar inhibidor:proteína, mientras que las constantes de disociación cambian significativamente, pudiendo ser estimadas en $5.3 \pm 0.21 \mu\text{M}$ (en el caso de LmaMPK10) y de $0.16 \pm 0.015 \mu\text{M}$ (para la variante truncada LmaMPK10 Δ C, sin los últimos 46 aminoácidos).

Tabla 14. Análisis de la interacción de LmaMPK10 con el inhibidor SB2035870 por ITC. Los valores fueron obtenidos como promedio de 2 ensayos independientes, con el error estándar entre paréntesis, para la media indicada.

Proteína	Estequiometría	Kd (μM)	ΔG (kcal.mol^{-1})	ΔH (kcal.mol^{-1})	T ΔS (kcal.mol^{-1})
LmaMPK10	0,82 (0,0024)	5,3 (0,21)	-7,36 (0,021)	-7,15 (0,068)	0,21 (0,089)
LmaMPK10 Δ C	1,33 (0,035)	0,16 (0,015)	-9,5 (1)	-10,3 (1,13)	-0,80 (0,088)

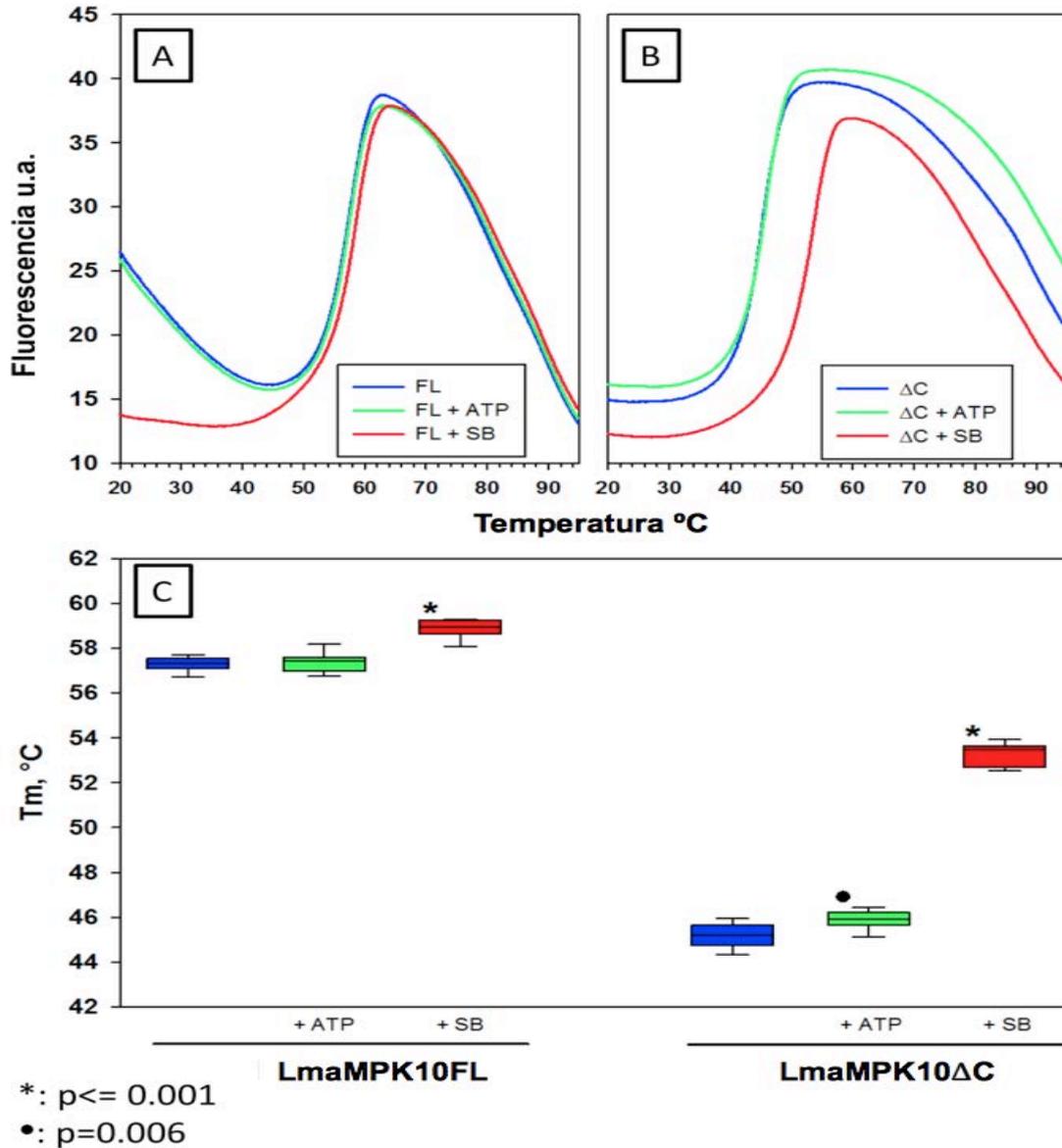


Figura 82. Ensayo de corrimiento térmico por fluorescencia (*fluorescence thermal shift assays* o *thermofluor*). Perfiles de desnaturalización de LmaMPK10 recombinante, monitoreando la desnaturalización de la proteína con el fluoróforo *SYPRO Orange*: (A) LmaMPK10, o (B) LmaMPK10ΔC (ambas a 2.5μM), sólo se muestran en línea azul; o en presencia de 5uM ATP (línea verde) o del inhibidor SB203580 (SB, línea roja). La derivada de las curvas de intensidad de fluorescencia permite calcular las temperaturas de fusión (*melting Temperature* ó *T_m*). Para cada condición se realizaron 9 réplicas. (C) Boxplots donde se observa el T_m mínimo y máximo para cada condición. Los resultados se evaluaron por ANOVA usando el método de Holm-Sidak para múltiples comparaciones contra un grupo control (la proteína libre) utilizado el software SigmaPlot (v11.0). Las diferencias significativas se resaltan con asteriscos o puntos.

Determinación de la estructura cristalográfica de LmaMPK10ΔC en complejo con ligandos

Tal como se describió más arriba, una serie de ensayos de cristalización de LmaMPK10 y de LmaMPK10ΔC fue ensayada en complejo con distintos ligandos nucleotídicos o derivados : ATP, ADP, AMP-PCP y SB203580, éste último un inhibidor específico conocido de la MAPK humana p38. La incubación de cristales de LmaMPK10ΔC con SB203580 (experimentos de “soaking”) resultó exitosa, y permitió determinar la estructura 3D del complejo binario. El SB203580 tiene baja solubilidad en agua por lo que se solubiliza en DMSO. La incubación con DMSO, vimos que tiene un efecto sobre los cristales de LmaMPK10ΔC, que se vuelven más frágiles. Al cabo de probar la difracción de un número de cristales, se eligió el que llegaba a mayor resolución y se resolvió su estructura a 2.65Å (PDB 3UIB). Se colectaron 60 imágenes dado su grupo de espacio tetragonal P4₃2₁2, a una distancia de 255mm del detector, con 1 grado de oscilación por imagen. La estructura se resolvió por reemplazo molecular usando el modelo refinado de la estructura apo LmaMPK10ΔC (PDB 3PG1). En los ciclos iniciales de refinamiento se utilizó la técnica de “templado simulado” (*simulated annealing*), y los ciclos de refinamiento en el espacio recíproco fueron iterados con reconstrucción manual del modelo. La construcción del modelo de hecho no fue evidente, ya que el lóbulo N-terminal muestra regiones relativamente extensas con densidad electrónica pobremente definida. Los fragmentos de residuos 1-6, 17-24, 28-33, 57-63, 97-107 y 360-361, así como el bucle de activación (180-191), no pudieron ser incluidos en el modelo final por falta de densidad electrónica interpretable inequívocamente. Las cadenas laterales de 19 residuos, la mayoría en el dominio N-terminal, no se incluyeron en el modelo por la misma razón. La tabla 14 resume los parámetros cristalográficos del cristal y del modelo obtenido (fig 83A). La figura 83B, muestra el modelo molecular del complejo de LmaMPK10 con el inhibidor SB203580. Si bien no se evidencian cambios notorios respecto a la estructura no unida (3PG1) podemos destacar una leve estructuración en algunos de los residuos del bucle de activación, y algunos movimientos en el bucle P, involucrado en la unión al nucleótido. El análisis de los factores B, o de desplazamiento atómico, fundamentalmente en el lóbulo N-terminal de la proteína, refinaron a valores muy altos, lo que revela una importante flexibilidad. Esta característica parece ser un rasgo distintivo de LmaMPK10 en comparación con otras MAPKs como p38 y ERK1/2. La figura 84 resume el análisis comparativo de los factores B de las estructuras de LmaMPK10 3PG1 y 2UIB en relación a p38, lo que denota la gran flexibilidad del lóbulo N-terminal en LmaMPK10.

Tabla 15. Parámetros cristalográficos de la estructura de LmaMPK10ΔC en complejo con el inhibidor SB203580

LmaMPK10ΔC +SB203580	
Grupo de espacio	P4 ₃ 2 ₁ 2
Moléculas de proteína por unidad asimétrica	1
Contenido de solvente (%)	52.6
Longitud de onda (Å)	1.5418
Resolución (Å) a	43.1-2.63 (2.77-2.63)
Reflexiones medidas	59508
Multiplicidad a	4.5 (4.5)
Complejitud (%) a	97.7 (84.3)
R _{meas} (%) a,b	9 (58.7)
<1/σ α(l)> a	13.7 (1.3)
a=b (Å)	80.9
c (Å)	131.02
Resolución de refinamiento (Å)	43.1-2.65
R _{cryst} [N° refs] c	0.215 [12184]
R _{free} [N° refs] c	0.241 [997]
Rms de enlace (Å)	0.008
Rms de ángulos (°)	1.04
Átomos de proteínas no hidrógenos	2422
Átomos de agua	59
Átomos de ligandos	27
Factor B promedio general (Å ²)	76.1
Factor B promedio de cadena principal (Å ²)	75.2
Factor B promedio de cadenas laterales (Å ²)	78.1
Factor B promedio de aguas (Å ²)	52.7
Factor B promedio de ligandos (Å ²)	86
Coefficiente de correlación de mapa vs modelo (General/ local) d	0.82/0.87
N° residuos en regiones del gráfico de ramachandran (Permitidos/favorables/no permitidos) e	297/282/0
Código ID de la Protein Data Bank	3UIB

a Los valores entre paréntesis aplican a la capa de mayor resolución.

$$b \quad R_{meas} = \sum_h \sqrt{N_h / (N_h - 1)} \sum_i |I_i - \langle I \pm \rangle| / \sum_h \sum_i I_{\pm};$$

N_h es la multiplicidad para cada reflexión, I_i es la intensidad I_n observada de la reflexión h, <I> es el promedio de intensidades de todas las reflexiones h, siendo $I_{\pm} = 1/N_h \sum_i (I_{(-)} \text{ or } I_{(+)})$

\sum_h se toma sobre todas las reflexiones; se toma \sum_i sobre todas las observaciones de cada reflexión

$$c \quad R = \sum_h |F(h)_{obs} - F(h)_{calc}| / \sum_h |F(h)_{obs}|; \quad R_{cryst} \text{ y } R_{free} \text{ se calcularon usando el juego de reflexiones hkl de trabajo y testigo respectivamente}$$

d Calculado con Phenix get_cc_mtz_pdb (Adams et al., 2002).

e Calculado con Molprobit (Chen et al., 2010).

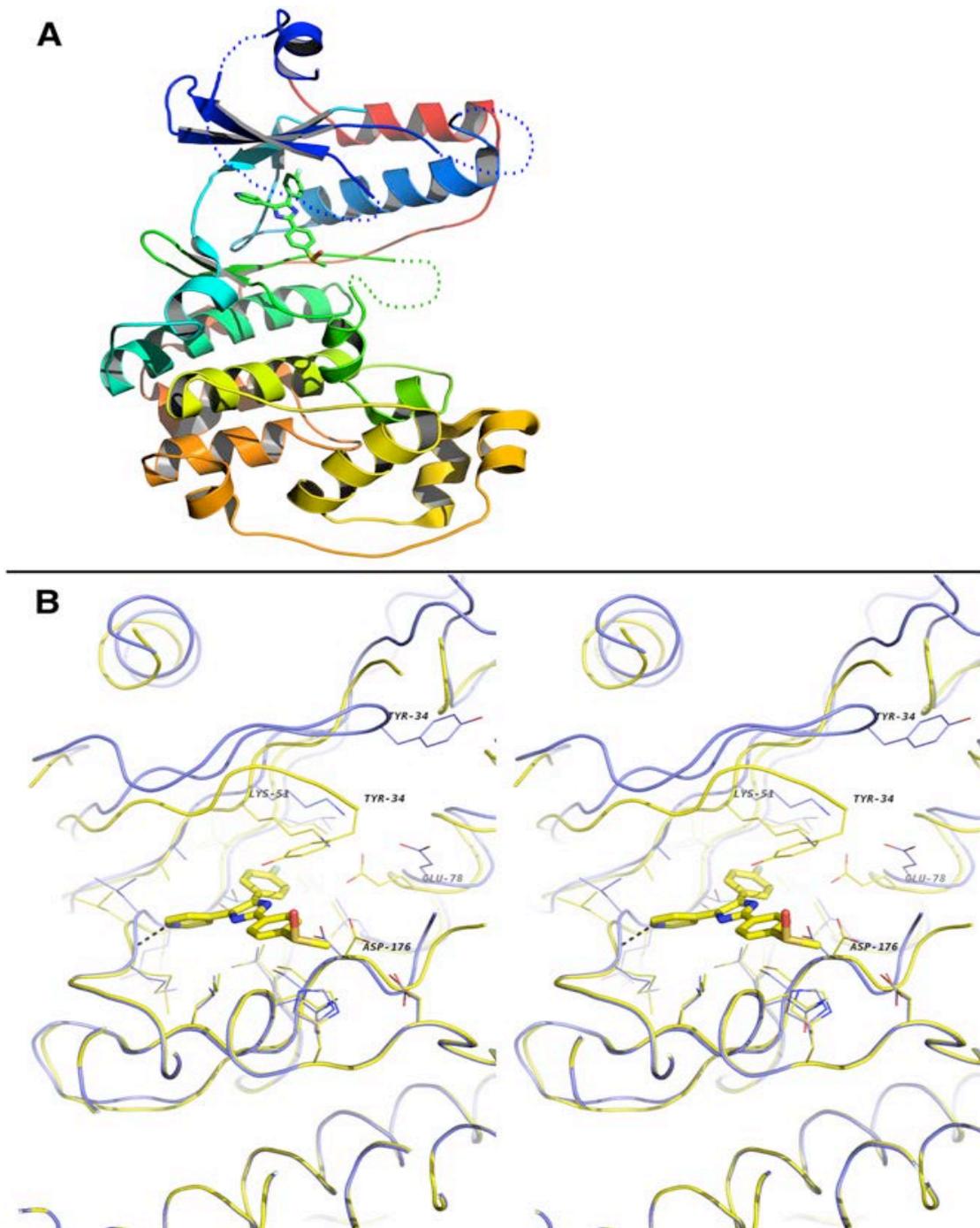
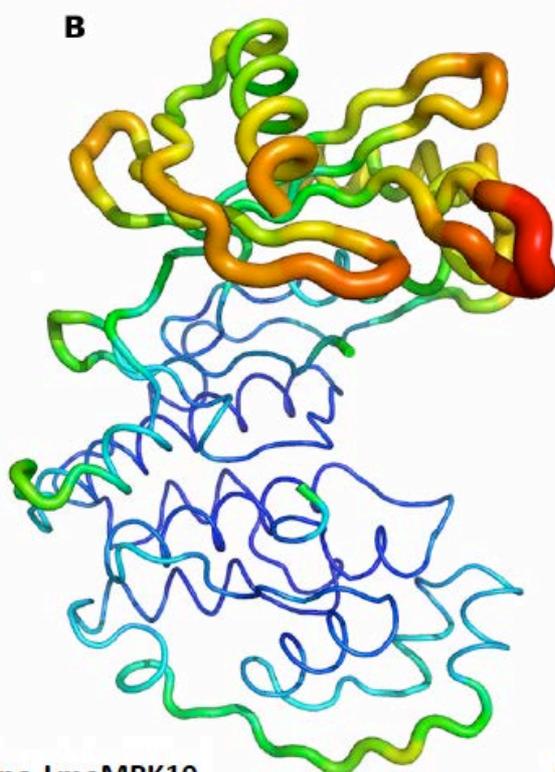
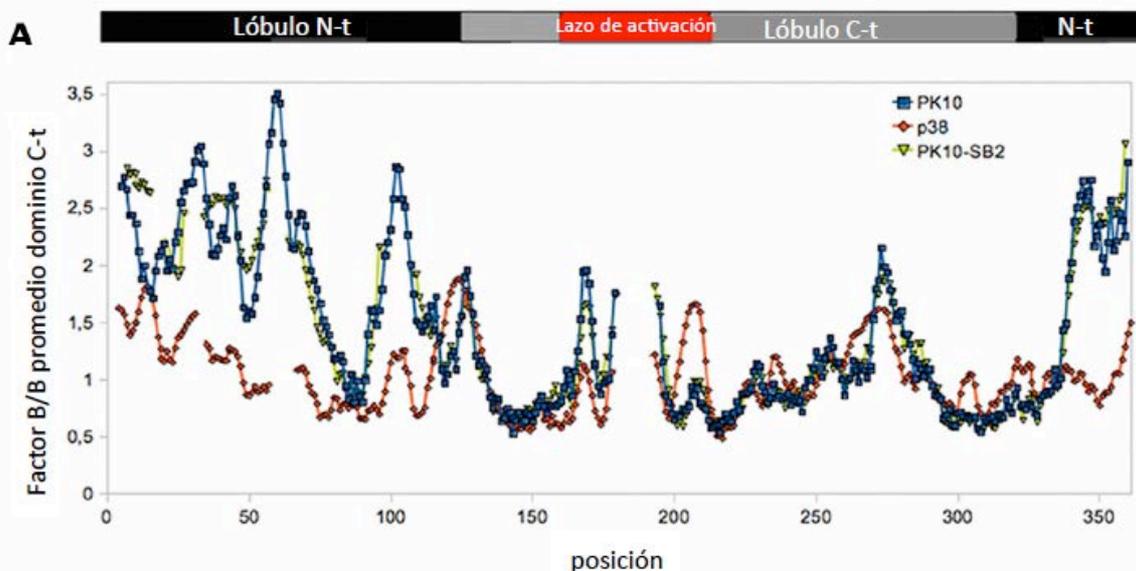
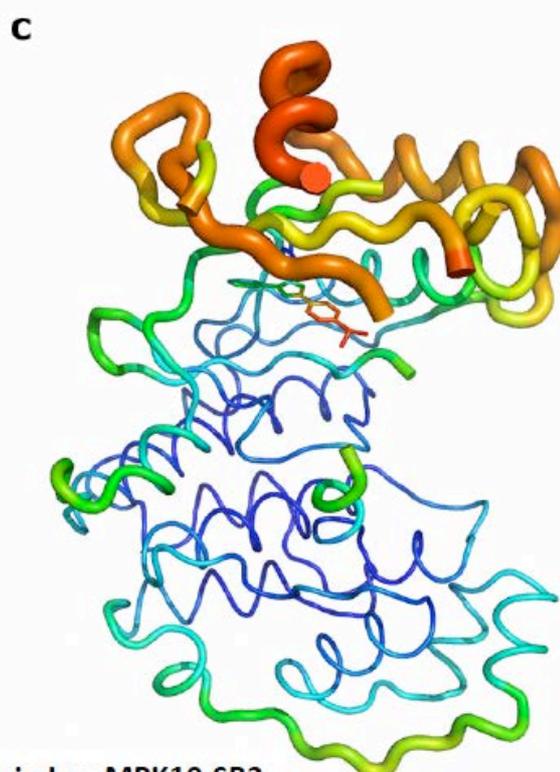


Figura 83. (A) Estructura 3D de LmaMPK10 Δ C en complejo con SB203580. (A) Representación en *cartoon* de LmaMPK10 Δ C en complejo con el inhibidor SB203580. El modelo está coloreado de acuerdo a una rampa del azul al rojo, indicando el sentido del polipéptido de N-terminal a C-terminal. El inhibidor está resaltado en *sticks* y coloreado por su naturaleza atómica (oxígeno, rojo; nitrógeno, azul; carbono, verde; azufre, amarillo; y, flúor en celeste). Las líneas punteadas representan segmentos de la proteína no incluidos en el modelo por la densidad electrónica débil. (B) Superposición de la forma apo de LmaMPK10 Δ C (azul) vs LmaMPK10 Δ C en complejo con el inhibidor SB203580 (amarillo), mostrado en estéreo. El inhibidor y los residuos que interactúan con él se representan en *sticks* y coloreados por átomo. Para mayor claridad, sólo se marcan aquéllos que presentan cambios más importantes. El único puente de H entre el SB203580 y la cadena principal de la metionina 115 está indicado en línea punteada.



Apo-LmaMPK10



Complejo LmaMPK10-SB2

Figura 84. Análisis de los parámetros de desplazamiento atómico (factores B) comparando las estructuras de LmaMPK10 Δ C y p38 α humana. (A) Factores B graficados por residuo aminoacídico. Los factores B han sido normalizados, y se presentan como el cociente del valor absoluto por residuo dividido por el factor B promedio del lóbulo C-terminal de cada proteína. Se muestra arriba del gráfico, un esquema lineal para servir de referencia de posiciones de los aminoácidos mapeados en la organización de dominios de las proteínas. (B) y (C) muestran representaciones en cintas deformadas de las estructuras de LmaMPK10 Δ C apo y unida a SB203580, respectivamente. El color y ancho de las cintas correlacionan con los valores de los parámetros de desplazamiento atómico (factores B) de cada residuo ('azul-a-rojo', y 'fino-a-grosso', corresponden a la rampa de valores 'bajos-a-altos' de factores B). Las líneas de puntos representan segmentos de las proteínas que no fueron incluidas en el modelos debido a densidad electrónica débil o indetectable.

Análisis del sitio de unión al nucleótido

El sitio de unión al nucleótido yace entre los 2 lóbulos de LmaMPK10 (Fig. 83). Los residuos involucrados en catálisis de proteín-quinasas están conservados en LmaMPK10, siendo el Asp158 del motivo HRD responsable de la fosfotransferencia. Sin embargo existen varias diferencias importantes en el sitio activo, la catálisis por el Asp158 en otras quinasas es asistida por una Lys (Lys149 en ERK2); que en LmaMPK10 está sustituida por la His160. Para el caso de LmaMPK10 utilizaremos la estructura 3D del complejo con SB203580 para analizar esta región clave de la proteína, dado que los intentos por cristalizarla en presencia de ATP fueron hasta ahora infructuosos. La mayor parte de los contactos entre residuos del bolsillo de unión y el inhibidor son interacciones de van der Waals (Fig 83B, 85, 86). Sólo se distingue un puente de H entre 2 átomos de nitrógeno, el de la cadena principal de la Met115 y el NB1 del inhibidor, en el anillo de piridina, que actúa como aceptor. La superposición estructural de los modelos de LmaMPK10 Δ C apo y en complejo con SB203580, permite enfocarnos en los rearrreglos asociados a la unión del inhibidor, dado que ambos resultan de cristales que mantienen el mismo grupo de espacio, y que muestran empaquetamientos cristalinos semejantes. Se puede notar el movimiento de “cerrado” entre ambos lóbulos cuando la estructura está en complejo con el inhibidor (Fig. 85). Este movimiento es más marcado si se sigue la posición de la Tyr34. La Tyr34 situada en el bucle P se acerca al ligando, indicando que todo este bucle, aun cuando no está bien definido en densidad electrónica en su totalidad, se aproxima al ligando (normalmente ATP), cerrando el sitio de unión al ligando. Recordemos que esta Tyr34, en el mutante de LmaMPK10DFG se encuentra en una orientación similar a la que vemos para la proteína en complejo con el inhibidor SB203580.

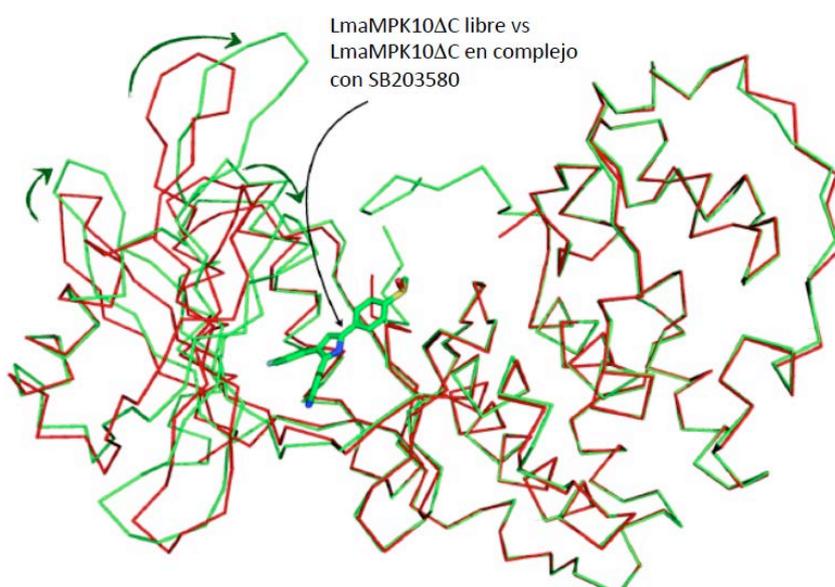


Figura 85. Superposición de la forma apo de LmaMPK10 Δ C (rojo) vs LmaMPK10 Δ C en complejo con el inhibidor SB203580 (verde). Se resalta el movimiento general de “cerrado” de la estructura tras la unión al ligando.



Figura 86. Superposición de la forma apo de LmaMPK10 Δ C (verde) vs LmaMPK10 Δ C en complejo con el inhibidor SB203580 (bordó). El inhibidor se representa como bolas y palos, en verde coloreado por átomo. Los residuos que interaccionan con él se representan en *sticks* y coloreados por átomo. Para mayor claridad, sólo se marcan aquéllos que presentan cambios más importantes. El único puente de H entre el SB23580 y la cadena principal de la metionina 115 está indicado en línea punteada y se resalta la distancia de 2.4 Å.

La cadena lateral del Asp176 está corrida en la proteína en complejo, acomodando al inhibidor en lugar. Aunque la Lys51 está más cerca a la cadena lateral del Glu78, sigue mostrando signos de alta flexibilidad como en la estructura apo, mostrando débil densidad electrónica en su cadena lateral. El análisis detallado del motivo DFN se observa en la figura 87. Se observa cómo el movimiento de la Asn178 del motivo DFN, genera la ruptura del puente de H que formaba con el Glu78 de la hélice α C y en su lugar pasa a asociarse con la Arg77 y la cadena principal de la Val75, ambos residuos pertenecientes a α C. No se detectaron diferencias significativas en el lóbulo C-terminal entre ambas estructuras.

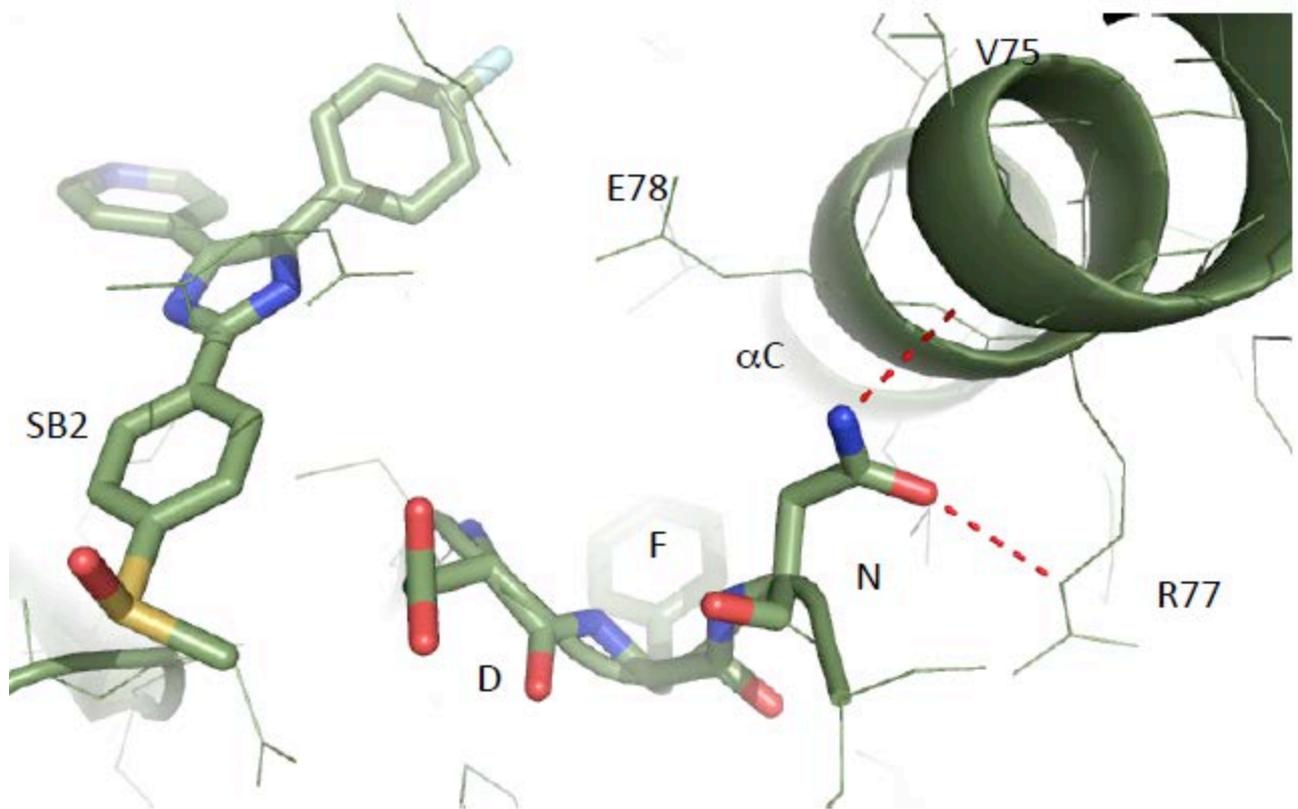


Figura 87. Detalle del DFN y de las interacciones que se establecen por puentes de H con residuos de la hélice αC una vez unido el ligando SB203580.

El análisis del potencial electrostático mapeado sobre la superficie de LmaMPK10 ΔC en complejo con SB203580 se muestra en la figura 88. Como destacamos previamente existe un gran parche de cargas negativas en el lado opuesto al sitio de unión al ATP, lo que podría tener implicancias en la interacción con otras proteínas. Sobre el sitio de unión al sustrato peptídico abundan las cargas positivas, lo que nos hace pensar en un sustrato específico de LmaMPK10 de naturaleza ácida. Además, es interesante mencionar que en el sitio de unión al ATP, nucleótido que funciona naturalmente como sustrato dador del grupo fosfato, hay un parche de cargas negativas concentradas, lo que podría de alguna manera afectar la forma en que el nucleótido (cargado de forma negativa) se una a la proteína. Esto podría relacionarse con nuestra dificultad en detectar la asociación de ATP a LmaMPK10. Si analizamos la estructura de LmaMPK10 con la molécula de ATP superpuesta en el bolsillo de unión al

ligando vemos como los átomos de Mg^{+2} , que habitualmente coordinan los grupos fosfato del ATP, deben acomodarse para minimizar la interacción entre el parche de cargas negativas y y estos grupos fosfato del ATP cargados negativamente (Fig. 89).

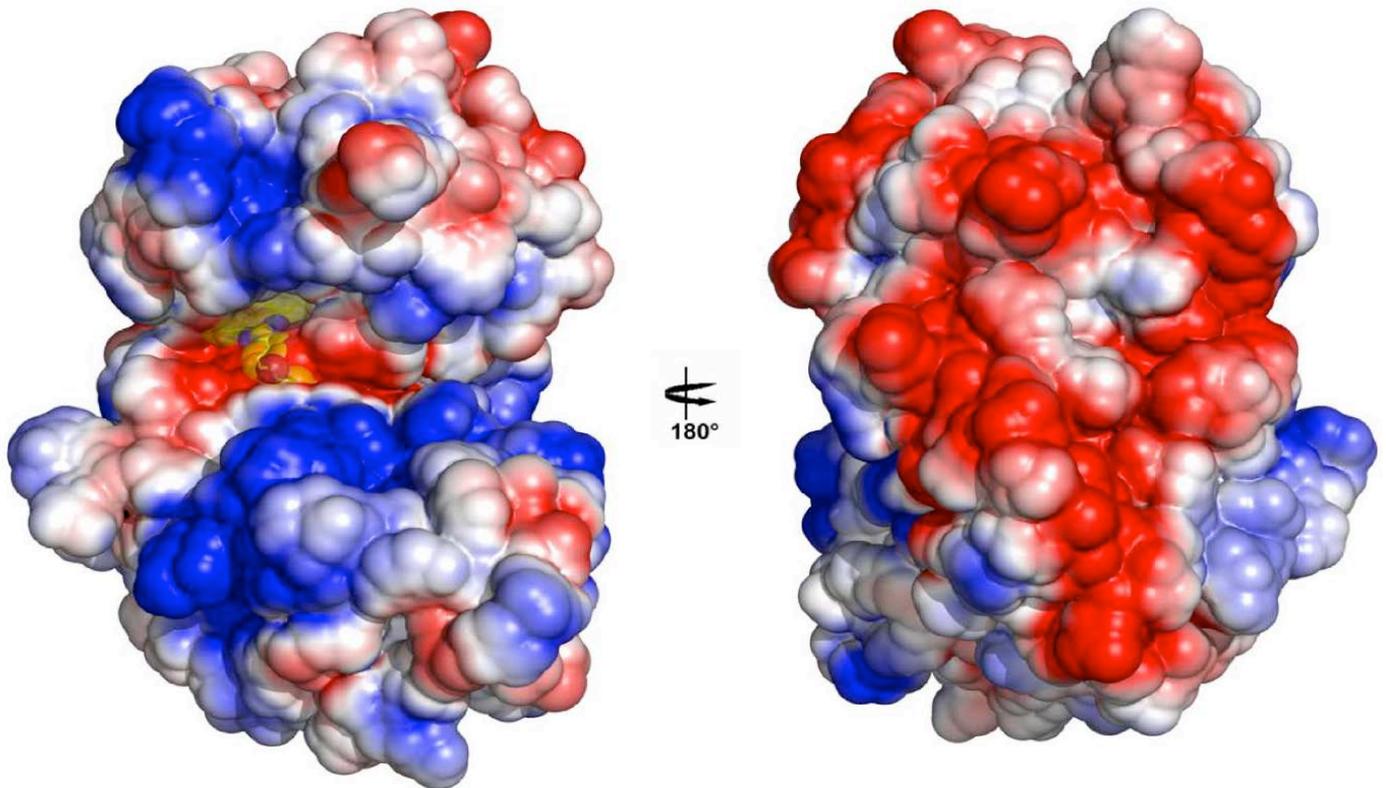


Figura 88. Estructura 3D de LmaMPK10 Δ en complejo con el inhibidor SB203580. Aquí se representa la estructura de la proteína como superficie expuesta al solvente, la cual está coloreada de acuerdo a un mapa de potencial electrostático calculado (usando el programa APBS Baker et al., 2001). En la orientación del panel izquierdo se puede observar el surco profundo que separa al lóbulo N-terminal (hacia la parte superior en esta vista de la molécula) del C-terminal (hacia la parte inferior), con el inhibidor (cuyos carbonos se colorean en amarillo) ocupando el bolsillo de unión de ATP. El panel derecho es igual pero con vista rotada 180° de acuerdo a un eje vertical en el plano del papel. Nótese la distribución de carga heterogénea, con un parche altamente positivo en la región de unión al sustrato, y una región marcadamente negativa en el dorso de la proteína (panel derecho; recordar sin embargo que a LmaMPK10 Δ le faltan los últimos 46 aminoácidos en el extremo C-terminal, que podrían “cubrir” este parche negativo, ver más abajo).

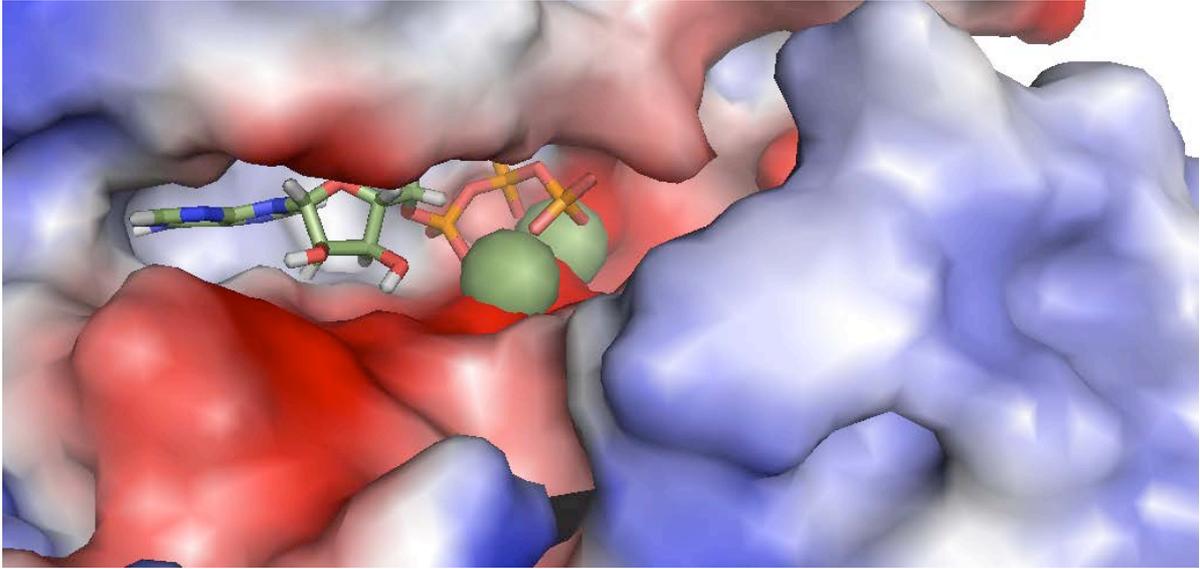


Figura 89. Detalle del bolsillo de unión al nucleótido de LmaMPK10, con una molécula de ATP superpuesta. Notar como los átomos de Mg^{+2} se posicionan para minimizar la repulsión electrostática de los grupos fosfato del ATP y las cargas negativas de la proteína.

Virando nuestra atención a la comparación de LmaMPK10 con otras MAPKs, en particular las de origen humano, podemos comparar cómo se une el SB203580 a LmaMPK10 o bien a p38. En el diagrama de la figura 90, se detallan los residuos cercanos capaces de interactuar con el inhibidor, revelando varias diferencias. Por otro lado la figura 91 muestra cómo la orientación del inhibidor es diferente en ambas proteínas, aun cuando en ambas ocupa el mismo bolsillo de unión. Pese al parecido de ERK con p38, ERK no une naturalmente al inhibidor SB203580. Sin embargo, se ha reportado un mutante artificial de ERK2 (PDB 1PME, Fox *et al.* 1998) capaz de unirse al SB203580, por ingeniería de proteínas injertando 5 mutaciones de residuos de p38. Notablemente, la superficie de interacción y la orientación del inhibidor en LmaMPK10 son más similares a las de este mutante de ERK2. Podemos distinguir que el bolsillo de unión al ATP de LmaMPK10 tiene una hendidura más pequeña y expone un patrón de potencial electrostático en la superficie del sitio activo diferente (Fig. 91), en comparación con ERK2 y p38 α . El estrechamiento de la hendidura comparado con p38 α se debe al mayor cerrado del bucle P rico en glicinas que hay en LmaMPK10 sobre el análogo de nucleótido. Esto está ligado al inusual hecho de que la

configuración “*DFG-in*” de la apo-LmaMPK10 no cambia en el complejo LmaMPK10ΔC-SB203580. En el caso de p38α el ligando SB203580 se une y estabiliza la conformación “*DFG-out*”, donde la Phe169 del motivo DFG contribuye a la unión directa al inhibidor. En suma, LmaMPK10 se une naturalmente a SB203580 de una forma “tipo ERK”, muy semejante al perfil de asociación observado en la estructura 1PME de la quinasa humana. Encontramos diferencias interesantes en el modo de unión del inhibidor, y en la esfera de residuos proteicos en interacción directa con el mismo (Fig. 91). Estas características diferenciales pueden ser explotables para diseñar nuevos inhibidores más potentes y específicos contra LmaMPK10.

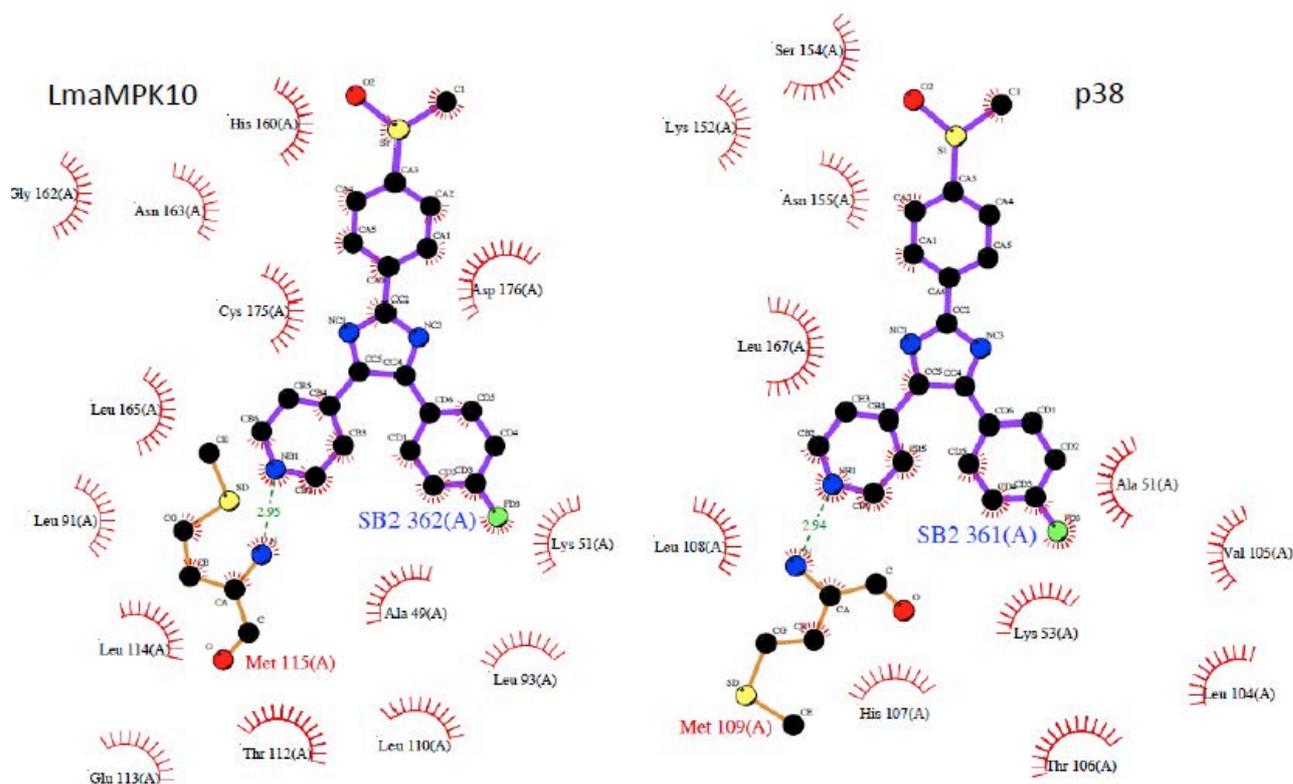


Figura 90. Vista del sitio de unión al ligando en LmaMPK10ΔC y en p38α humana detallando los residuos de LmaMPK10 y p38 involucrados en la interacción directa con SB203580. El diagrama fue obtenido con LIGPLOT.

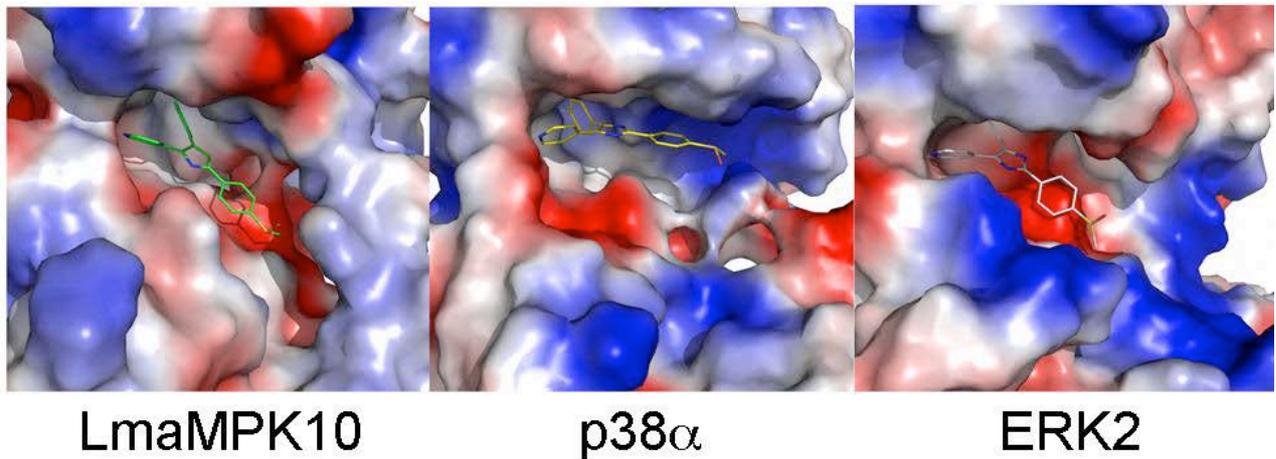


Figura 91. Detalle del bolsillo de unión al nucleótido de LmaMPK10 Δ C. Se representa la superficie expuesta la solvante coloreada de acuerdo al potencial electrostático. Se comparan los complejos: LmaMPK10 Δ C-SB203580 (panel izquierdo), p38 α humana-SB203580 (pdb 3GCP; panel central) y ERK2 humana- SB203580 (1PME; panel derecho) en la misma orientación, luego de la superposición estructural. El ligando SB203580 se representa en bastones coloreado por átomo. Notar el bolsillo más angosto de LmaMPK10 Δ C en relación a p38, y la similitud general de LmaMPK10 con ERK2, en relación a la orientación del SB203580. Recordar que SB203580 no se une a ERK2, esta estructura fue obtenida con un pentamutante, cambiando residuos claves a los presentes en p38 (Fox *et al.*, 1998)

Definición de la especificidad de sustrato: relevancia de motivos proteicos cortos

Hay sitios bien definidos en MAPKs humanas, de importancia clave en la determinación de la especificidad del(de los) sustrato(s) proteico(s), que se han denominado “*CD/ED Docking Sites*”. Estos están efectivamente presentes en la estructura de LmaMPK10, pero con cambios importantes en las características detalladas de los residuos que los componen (Fig. 92). Estas sustituciones podrían significar cambios importantes de especificidad de unión a los sustratos específicos de esta quinasa de *Leishmania*, con lo que podrían ser usados como sitios “drogables”.

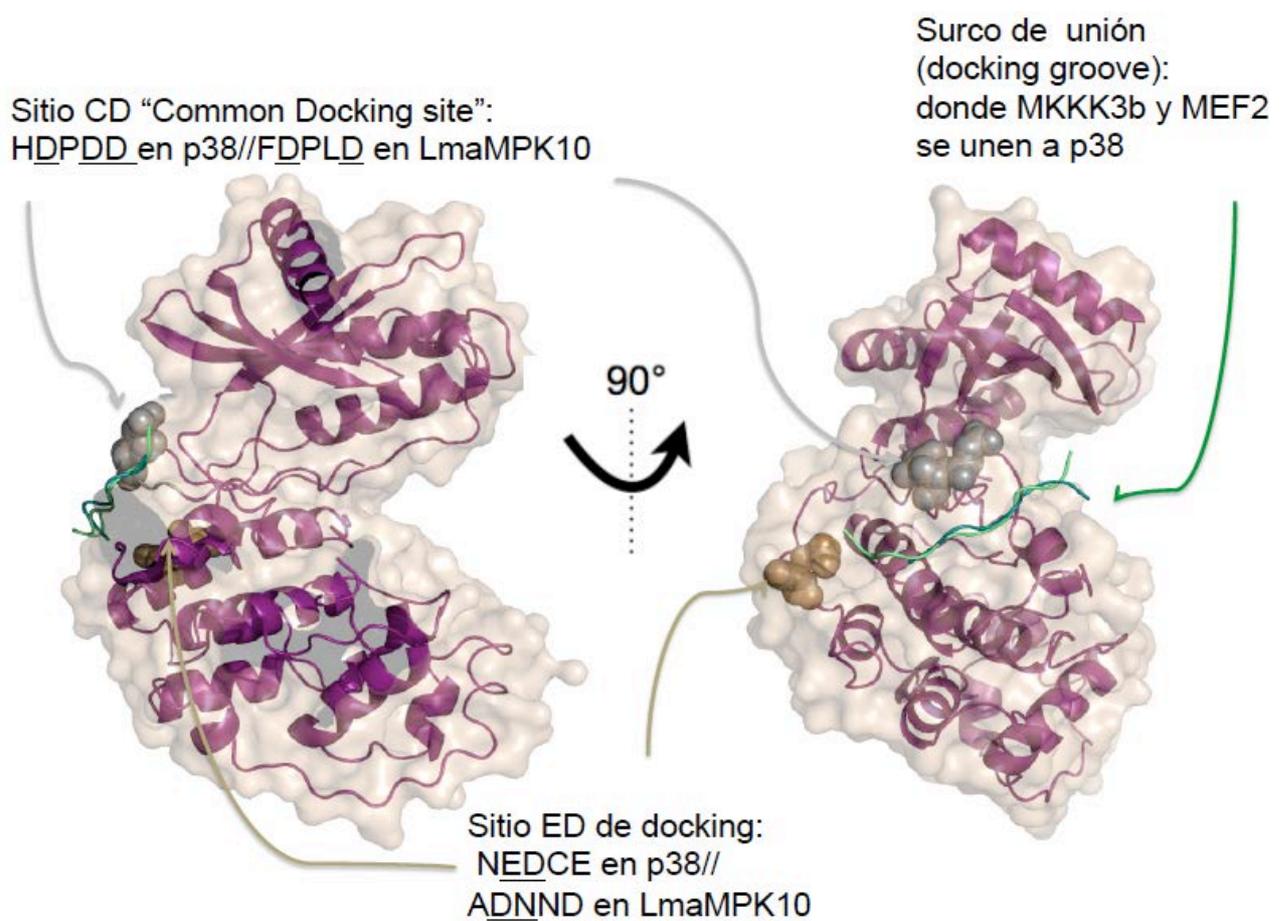


Figura 92. Sitios de unión de sustratos proteicos, comparación entre p38 y LmaMPK10. En verde se muestra de forma ilustrativa, la posición de ligandos proteicos tal como se han observado unidos a p38. En representación de esferas se resaltan las posiciones donde hay significativas diferencias con LmaMPK10. Las dos orientaciones elegidas, permiten ver las posiciones de los sitios CD y ED con mayor claridad.

Búsqueda de nuevos inhibidores de LmaMPK10ΔC

Esta tesis fue enmarcada en el proyecto Europeo-FP7 Leishdrug, que se propuso como objetivo final identificar y caracterizar nuevos compuestos líder hacia el diseño de drogas con actividad antiparasitaria. Muy recientemente nuestros colaboradores en el Institut Pasteur

lograron generar un *knock-out* condicional de LmaMPK10 y demostraron que esta quinasa juega un rol importante en el estadio amastigote en *L. major* (Cayla, 2014), afectando directamente la sobrevivencia de este parásito. Si bien no se ha confirmado la esencialidad de LmaMPK10, esta quinasa fue seleccionada como potencial candidato a blanco de drogas pensando en una estrategia dirigida por estructura. Es una quinasa que además presenta características interesantes que podría diferenciarla en relación a otras quinasa de hospedero mamífero. Con el objetivo entonces de diversificar los abordajes de análisis estructural, realizamos una colaboración con el Laboratorio de Química Medicinal y Computacional del Instituto de Física de Sao Carlos (Universidad de Sao Paulo), dirigida por el Dr Adriano Andricopulo, donde realicé una pasantía. Se utilizaron las estructuras de LmaMPK10 con el fin de realizar una búsqueda computacional de potenciales ligandos inhibidores de LmaMPK10 y otros blancos potenciales de Trypanosomatidos. Se conformó una librería de compuestos químicos a partir de la base de compuestos ZINC. Para esto se seleccionaron moléculas con propiedades químicas, similares a SB203580 (rango de peso molecular, carga, solubilidad, etc), generando así una lista de aproximadamente 150000 compuestos. Usando la estructura de LmaMPK10 3UIB (a la que se le retiró el inhibidor del bolsillo de unión) y el programa de docking virtual Gold (versión 5.1, con un abordaje semi-flexible, que permite el giro de los ángulos de torsión de los grupos –OH de Ser, Thr y Tyr con el fin de optimizar los puentes de H con el ligando y la rotación de las cadenas laterales de Lys), se rastrearon estos 150000 compuestos, en base a su capacidad de unión al sitio de unión al nucleótido. Estos compuestos se ordenaron según un *score*, de acuerdo a su capacidad de unirse *in silico* a LmaMPK10. Los mejores 50 compuestos fueron evaluados por un segundo programa de docking, Autodock-VINA. Con la asistencia del Dr. Sergio Pantano se logró priorizar esta lista, acotándola a 15 potenciales inhibidores (Tabla 16), para proceder a su síntesis y ensayos *in vitro* e *in vivo*. Es interesante resaltar que la mayoría de las moléculas seleccionadas tienen alguna semejanza estructural con SB203580.

Tabla 16. Los mejores 15 compuestos obtenidos del docking virtual en GOLD y Autodock-VINA con LmaMPK10ΔC

Código ZINC	Estructura química	Código ZINC	Estructura química
ZINC02255542		ZINC08826095	
ZINC09367146		ZINC08745039	
ZINC04436141		ZINC09680021	
ZINC02250262		ZINC02751356	
ZINC09016356		ZINC04235909	
ZINC17784301		ZINC02255543	
ZINC08850291		ZINC08709148	
ZINC09591393			

Evaluación de potenciales compuestos inhibitorios

Hasta el momento nuestra posibilidad de ensayar la actividad de LmaMPK10 se basa en el ensayo de IVKA previamente descrito. Por lo tanto diseñamos un ensayo de inhibición, para realizar una caracterización preliminar de la capacidad de estos compuestos de inhibir la actividad de LmaMPK10 *in vitro* y los comparamos con el inhibidor SB203580. Se lograron sintetizar 13 de los compuestos seleccionados, lo que fueron disueltos en DMSO (Tabla 17). Además, trabajamos con la proteína transgénica fusionada a GFP, purificada de parásitos (*L. donovani*) y con la proteína recombinante purificada de *E. coli* debido a que como describimos tienen un comportamiento diferencial en este tipo de ensayos.

Tabla 17. Lista de disponibles y evaluados por IVKA

n°	cpd ID	ZINC ID
1	C385-0051	ZINC09680021
2	C519-0209	ZINC04436141
3	F2335-0143	ZINC08850291
4	NAT9-272996	ZINC04235909
5	PB164779678	ZINC17784301
6	STL236232	ZINC02255542
7	STK828727	ZINC02250262
8	STK862851	ZINC02751356
9	Z102684118	ZINC08745039
10	Z107105476	ZINC09367146
11	Z234516212	ZINC08709148
12	Z25491584	ZINC08826095
13	Z65444838	ZINC09591393
14	No recibido	ZINC09016356
15	No disponible	ZINC00801612

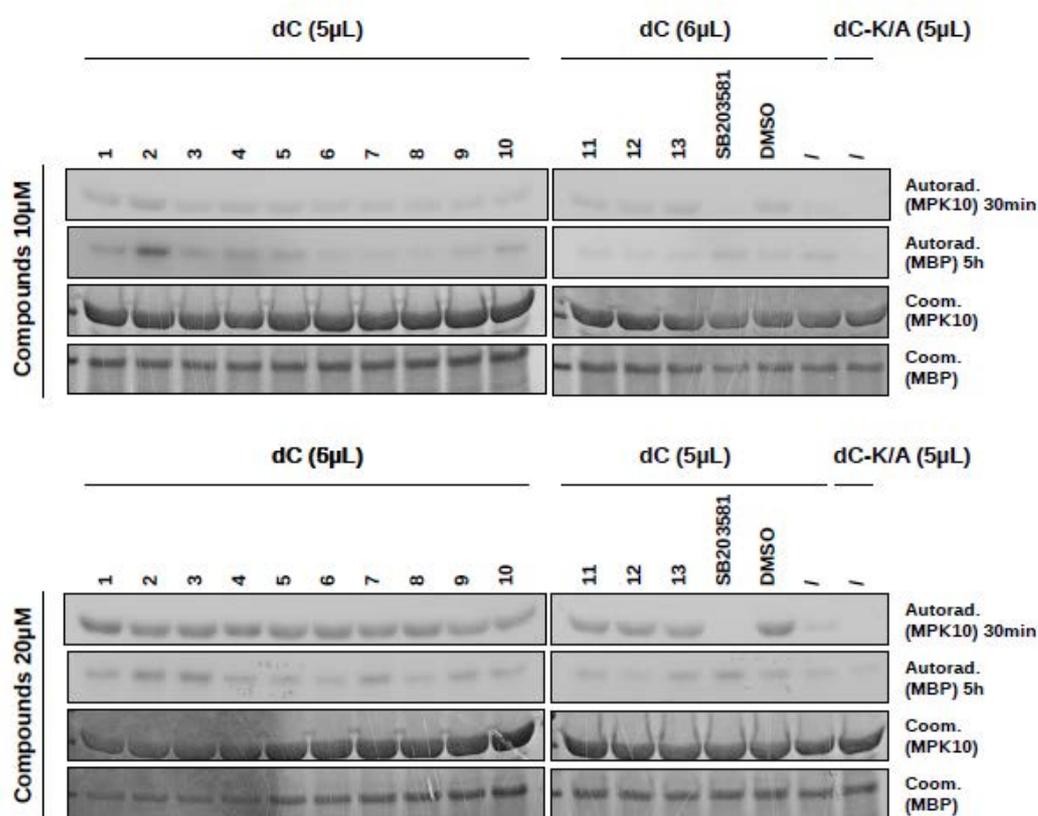


Figura 93. Análisis de la actividad quinasa de LmaMPK10 Δ C recombinante purificada de *E. coli*. En ensayo se realiza en presencia de ATP marcado y se evalúa la actividad de autofosforilación así como la fosforilación de un sustrato genérico (MBP) en presencia de diferentes compuestos a 10 y 20 μ M.

Como se observa en la figura 93, la mayor inhibición de la actividad de autofosforilación se detecta en presencia de SB203580. En cambio la presencia de dicho inhibidor, no parece modificar sustancialmente la fosforilación del sustrato MBP. Hay que recordar que la fosforilación del sustrato por la proteína LmaMPK10 Δ C purificada de *E.coli* no es muy notoria como se da con la proteína purificada de parásitos. Los compuestos sintetizados no resultaron en efectos significativos de modulación de la actividad de LmaMPK10. Podemos destacar que el compuesto 2 (10 μ M) parece tener una actividad potenciadora de la fosforilación de MBP, lo que debería someterse a ensayos confirmatorios.

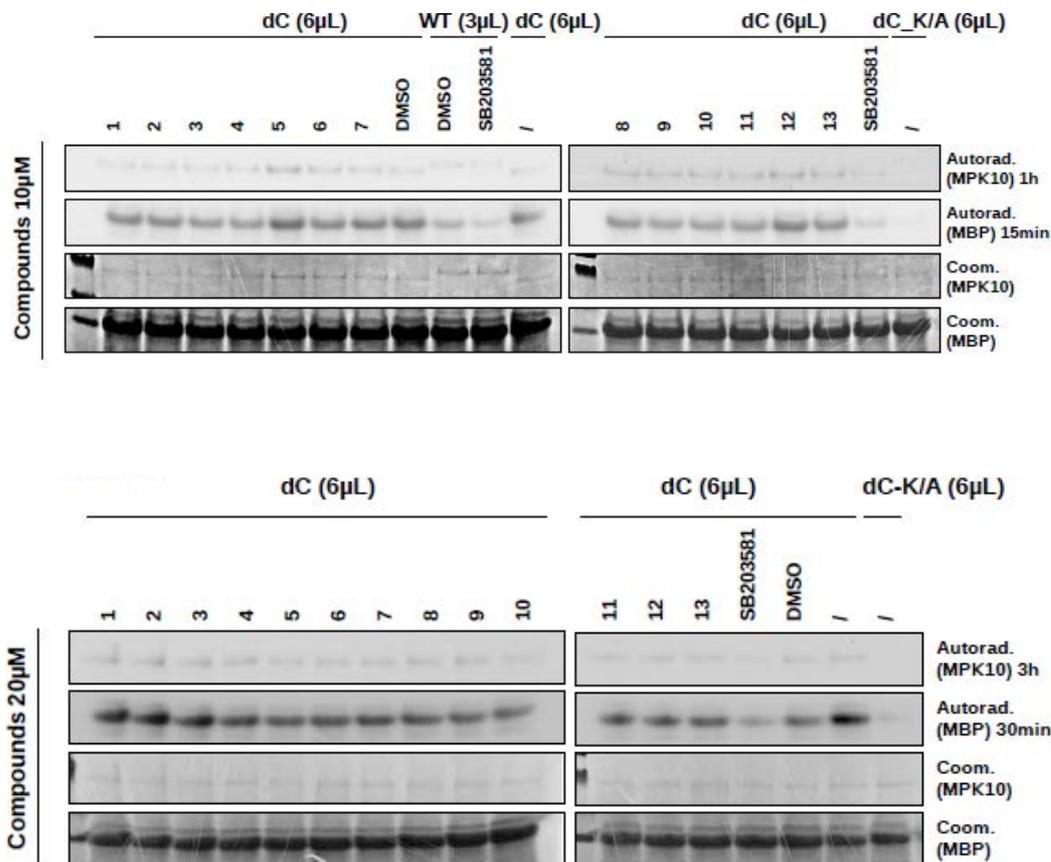


Figura 94. Análisis de la actividad quinasa de LmaMPK10 WT y ΔC transgénicas purificada de *L. donovani*. En ensayo se realiza en presencia de ATP marcado y se evalúa la actividad de autofosforilación así como la fosforilación de un sustrato genérico (MBP) en presencia de diferentes compuestos a 10 y 20 μM .

El empleo de la proteína purificada de parásitos resulta interesante porque como se mencionó anteriormente presenta una actividad de fosforilación de MBP más marcada en relación a proteína purificada de *E. coli*. Así se puede ver en la figura la inhibición parcial que muestra el SB203580 en la proteína transgénica WT y en la mutante ΔC . A pesar de la menor cantidad de proteína purificada de parásitos, como se revela en la tinción por Coomassie, se observa altamente activa incluso en presencia de los potenciales inhibidores seleccionados.

En suma, en las condiciones evaluadas los compuestos seleccionados no actividad inhibitoria detectable, con lo que no proseguimos estudios ulteriores.

Búsqueda de interactores de LmaMPK10ΔC

En conjunto, este trabajo representa un gran avance en la comprensión molecular y estructural de proteínas-quinasas importantes en la biología de estos protozoos patógenos. Sin embargo, es claro que se requieren continuados esfuerzos para construir una imagen completa de los mecanismos de señalización en los que están implicadas. El desarrollo del *knock-out* condicional de LmaMPK10 por nuestros colaboradores y la conclusión de que esta quinasa juega un rol importante para la supervivencia del estadio amastigote en *L. major* (Cayla, 2014), abre una herramienta ideal para avanzar en los estudios estructura/función que nosotros nos habíamos trazado entre los objetivos científicos de este trabajo de Tesis. Ensayos preliminares del grupo de G. Spaeth mostraron que LmaMPK10 co-inmunoprecipita con una proteína ortóloga de una de las subunidades de un complejo macromolecular grande llamado FACT en levaduras (por *facilitates chromatin transcription*) Winkler & Luger, 2011; Hondele *et al.*, 2013; Tessarz & Kouzarides, 2014) (Fig. 95)). Esta asociación parece ser estadio-específica, pues la co-inmunoprecipitación de FACT sólo se observa en promastigotes. Además se evaluó dicha co-inmunoprecipitación con LmaMPK4 y LmaMP7, y se observó que este homólogo de FACT también precipita con LmaMPK4 pero no lo hace con LmaMPK7.

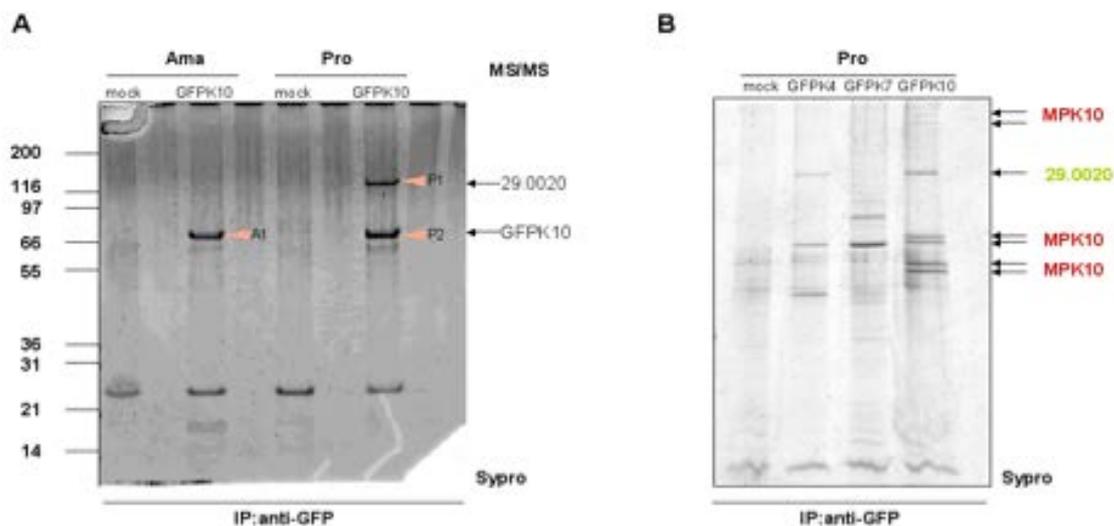


Figura 95. Análisis por SDS-PAGE de la inmunoprecipitación de LmaMPK10 a partir de extractos de *L. donovani* transfectados para la expresión de quinasas fusionadas a GFP. A) La inmunoprecipitación de LmaMPK10 fue evaluada en pro y amastigotas; B) Se comparó la inmunoprecipitación de LmaMPK10 con la de LmaMPK4 y LmaMPK7.

Para avanzar en esta línea nosotros generamos un anticuerpo policlonal en conejo anti-LmaMPK10 (Polo Tecnológico de la Facultad de Química). El suero policlonal se purificó por afinidad utilizando una columna de NHS-LmaMPK10 (GE). El suero purificado fue evaluado contra diferentes extractos de tripanosomátidos. Como se observa en las figuras 96 y 97, el anticuerpo policlonal es capaz de identificar LmaMPK10 específicamente, en un extracto de proteínas de *Leishmania*, así como en el contexto de un extracto de proteínas de *E. col*

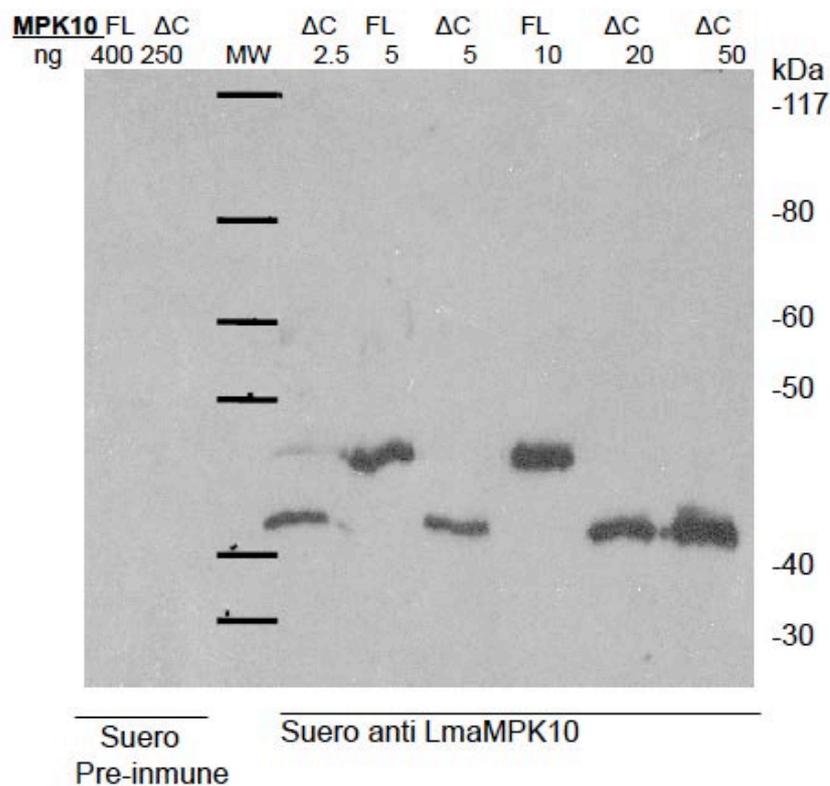


Figura 96. Análisis por western blot para evaluar la sensibilidad en la reactividad del suero policlonal anti LmaMPK10 purificado por afinidad. Se utilizaron diferentes cantidades de LmaMPK10 y LmaMPK10ΔC recombinante purificada.

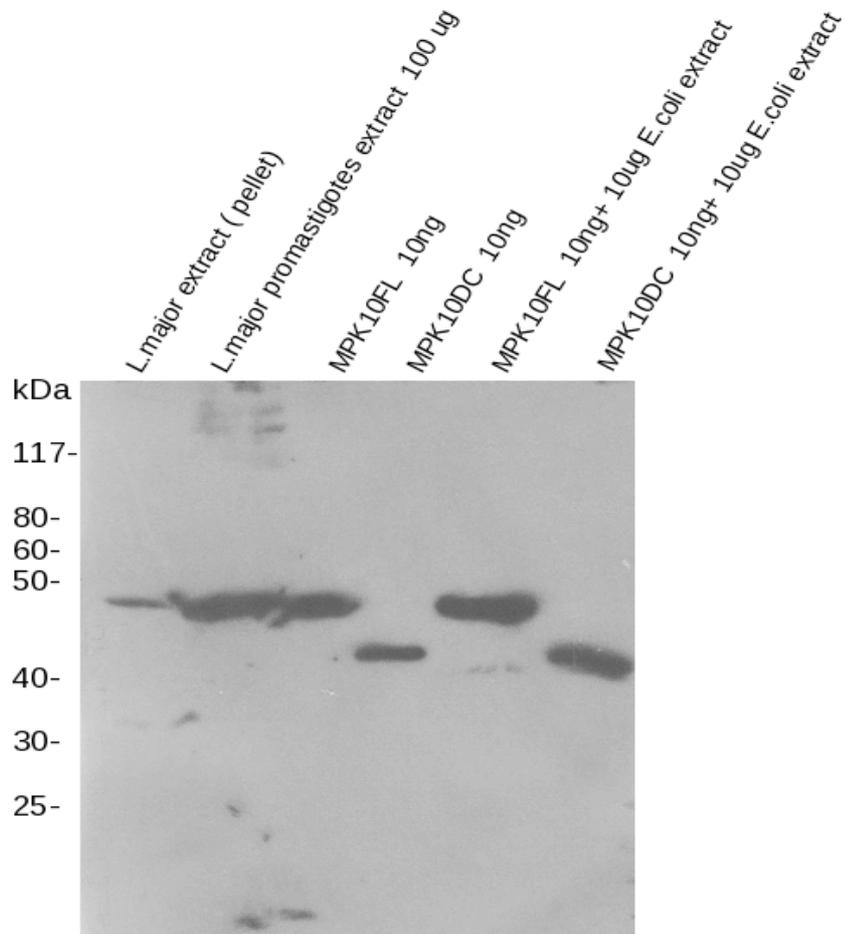


Figura 97. Análisis por western blot para evaluar la especificidad en la reactividad del suero policlonal anti LmaMPK10 purificado por afinidad.

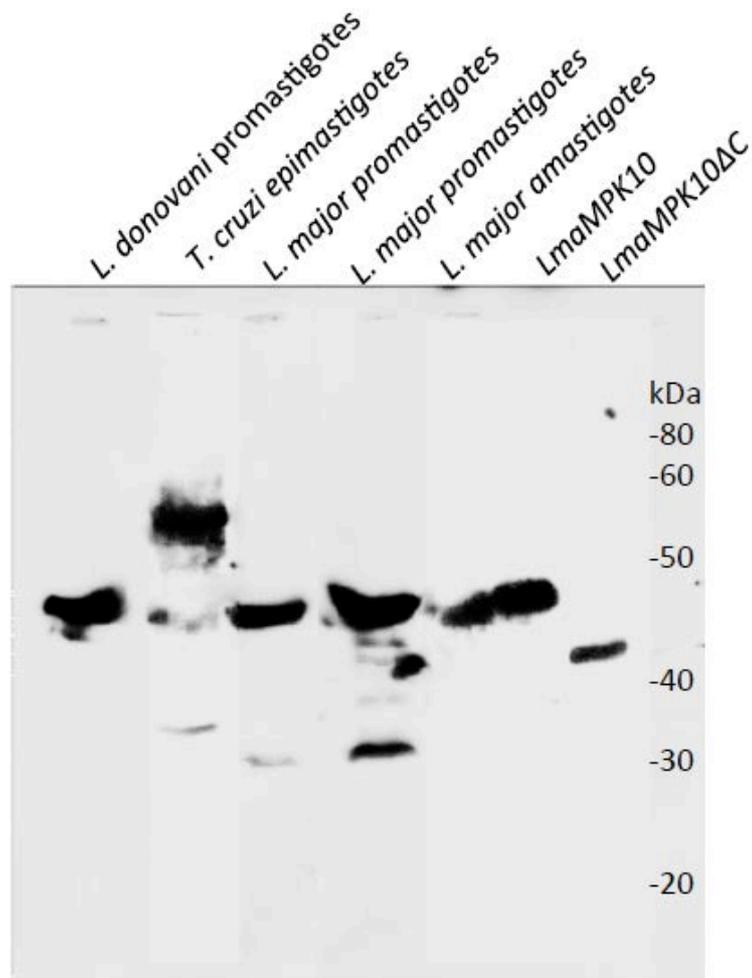


Figura 98. Análisis por westren blot evaluando la identificación de MPK10 en diferentes especies de tripanosomatidos y diferentes estadios del parásito. Se sembraron 35µg de promastigotas de *L. donovani*; 70 µg de epimastigotas de *T. cruzi*; 35 y 70 µg de promastigotas de *L. major*; 35 µg de amastigotas de *L. major*; 10 ng de LmaMPK10 pura recombinante y 10 ng de LmaMPK10ΔC pura recombinante.

El análisis de diferentes estadios de *Leishmania* confirma que LmaMPK10 se expresa de forma constitutiva, estando presente tanto en promastigotas como en amastigotas. En los extractos correspondientes a promastigotas de *L. major* se observan bandas de menor peso molecular, pudiendo ser productos de degradación de LmaMPK10 o reacción cruzada con otras proteínas (quizás otras quinasas con epitopes similares?). Poco se conoce sobre la expresión de la MAPK10 en *Trypanosoma*. El análisis de un extracto de epimastigotas de *T. cruzi* reveló la presencia de una banda del tamaño esperado para MPK10, pero además una banda mayoritaria de mayor tamaño aproximadamente 55kDa) y otra de menor tamaño (~35 kDa).

El anticuerpo policlonal anti-LmaMPK10 en conejo fue previsto para caracterizar la co-inmunoprecipitación de LmaMPK10 con FACT. Se pusieron a punto protocolos de inmunoprecipitación de LmamMPK10 a partir de extractos de *Leishmania* que fueron exitosos (resultado no mostrado).

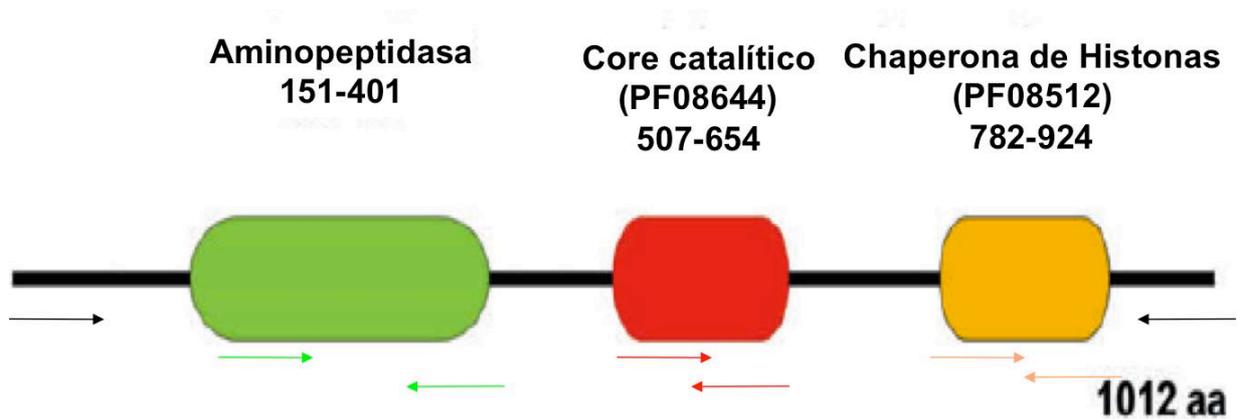


Figura 99. Esquema de los subdominios presentes en FACT de levaduras. Las flechas indican los diferentes oligonucleótidos que se diseñaron para subclonar los diferentes dominios del ortólogo de FACT de *Leishmania* (Lj F29.0020) en vectores de expresión en *E. coli*.

Subclonamos esta proteína ortóloga de la subunidad Spt16 de FACT de *Leishmania*, en su versión completa así como dividida en sub-dominios, con el fin de expresarla en forma recombinante, y caracterizar la eventual interacción entre LmaMPK10 y FACT, idealmente definiendo qué dominio(s) de FACT son importantes en dicha asociación. Todos los subdominios de FACT se sobre-expresaron, aunque resultaron ser especies insolubles en *E. coli*, con lo que esta línea deberá continuarse más allá de este trabajo de Tesis.

Discusión

Expresión, purificación, cristalización y determinación de la estructura tridimensional de Ser/Thr quinasas de interés de *Leishmania major*: desafíos y contribución de la Biología Estructural.

Como mencionamos previamente, los proyectos de biología estructural tienen numerosos cuellos de botella debido a las diferentes etapas que se deben atravesar con éxito hasta llegar a un modelo de la estructura molecular con resolución atómica de una proteína. Los más comunes son la expresión soluble de las proteínas blanco de interés; la obtención de cristales de la proteína blanco y que esos cristales difracten los rayos X; y por último pero no menor, la determinación de las fases de los patrones de difracción, para la resolución de la estructura cristalográfica. Es en este escenario que se eligieron cuatro proteín-quinasas blanco de *Leishmania* con el fin de seleccionar el/los más adecuado/s para nuestros intereses, además de poder tener alternativas a la hora de sobrepasar los cuellos de botella típicos. Efectivamente, durante el desarrollo de esta Tesis nos hemos encontrado con dificultades en la obtención de proteínas solubles en cantidad y calidad adecuada para fines cristalográficos, para varios de los blancos originalmente seleccionados.

El estudio estructural de biomoléculas mediante cristalografía de rayos X requiere de la obtención de grandes cantidades de la proteína de interés, de forma soluble, pura y homogénea. Los sistemas de expresión procariotas, como *E. coli*, suelen ser el hospedero predilecto para la expresión de proteínas heterólogas ya que ofrecen ventajas como facilidad de uso, bajo costo, tiempos de generación cortos y escalabilidad para la producción industrial de proteínas recombinantes (Zerbs *et al.*, 2014). No obstante, cuando se trata de sobre-expresar proteínas de origen eucariota, pueden aparecer dificultades debido a la ausencia de maquinarias de modificaciones postraduccionales (como acetilación, metilación, fosforilación, glicosilación, etc. de tipo eucariotas), lo que puede resultar en la producción de proteínas inactivas y/o en la formación concomitante de cuerpos de inclusión insolubles (Sahdev *et al.*, 2008).

¿Por qué vale la pena correr estos riesgos, y proponerse sortear los obstáculos propios de enfoques de Biología Estructural? La potencia de estos métodos es proporcional a la cantidad de información implícita en las estructuras moleculares que obtenemos. Estos datos no son sólo descriptivos, sino que nos permiten frecuentemente revelar mecanismos funcionales, en

los niveles bioquímicos y a veces incluso celulares, asociados a las proteínas que nos planteamos estudiar: en el caso de las PQs de tipo eucariota, dado que el mecanismo de catálisis enzimática (en tanto que fosfotransferasas) es compartido por todas ellas y actualmente bien entendido, lo que resulta fascinante y de gran valor es el conocer cómo se regula esta actividad en cada caso. Sabemos que entender este mecanismo de “interruptor” nos puede proveer de información no sólo de interés fundamental en biología, sino incluso con valor aplicado hacia el diseño racional de inhibidores o moduladores para modificar el estatus de actividad biológica de una quinasa específica en las células vivas. Los ejemplos de desarrollos de drogas exitosas, que han cambiado la terapéutica en enfermedades difíciles, u otras de mal pronóstico, tienen en el Gleevec (imatinib) un ejemplo muy inspirador de la combinación de la biología estructural de la tirosina-quinasa BCR-Abl, con la modelización molecular de compuestos, y la química medicinal y farmacología, para tener un compuesto capaz de unirse diferencialmente al estado apagado, *Phe-out* de la quinasa blanco, estabilizando dicho estado *in vivo*, y convirtiéndose en un exitoso tratamiento para combatir la leucemia mieloide crónica (Druker & Lydon, 2000).

Si bien el caso de Gleevec es el más conocido, comercializado en farmacias y hospitales del mundo entero desde comienzos de este siglo, varias otras PQs son blanco de desarrollo racional de medicamentos, y benefician de la información detallada de su estructura para ganar en exquisita especificidad (disminuyendo efectos colaterales por inhibición indeseada de otras quinasas), y para actuar del modo más inteligente y evitando el desarrollo de resistencia por mutaciones en la PQ (Zhang *et al.*, 2009; Klebl *et al.*, 2011; Lounnas *et al.*, 2013).

Nuestros blancos seleccionados en *Leishmania*: *LmaMPK7*, *LmaCK1*, *LmaMPK4*, *LmaMPK10*

1- *LmaMPK7* es un blanco de gran interés en el marco de nuestros estudios: es un quinasa que es diferencialmente fosforilada en el estadio infectivo del parásito, y además presenta varias inserciones importantes en sitios relevantes de la enzima. Está ausente en el género *Trypanosoma*, pudiendo regular funciones específicas en *Leishmania*. Se evaluó la expresión soluble de *LmaMPK7* en *E. coli* en 62 condiciones diferentes y en casi todas las condiciones ensayadas la proteína se expresó de forma insoluble. Las variaciones en condiciones ensayadas procuran en general disminuir la síntesis de proteínas o bien, la velocidad de

síntesis de la proteína blanco. Frecuentemente esto redundaba en mayor oportunidad de plegamiento correcto, con lo que, aun si disminuye el rendimiento total de proteína producida, en casos favorables la fracción de proteína soluble aumenta significativamente. La inducción de expresión en pequeña escala fue así ensayada a distintas temperaturas y tiempos (37°C por 3 h, o bien 20°C por 14 h). El uso de distintos promotores también apuntó al mismo objetivo de ensayar distintas cinéticas de expresión proteica, por ejemplo usando un promotor más fuerte como T7, y otro algo más débil como T5. Los mejores resultados se encontraron expresando a LmaMPK7 como proteína de fusión, probablemente de esta manera se mejoró su solubilidad, de todas formas esto no alcanzó para obtener proteína en cantidad pura y homogénea para nuestros fines.

Se detectó la expresión soluble de LmaMPK7 en 4 condiciones, pero el rendimiento obtenido fue extremadamente bajo para nuestros requerimientos. En todos los intentos de purificación de LmaMPK7 a partir de la fracción soluble de proteínas expresadas, nunca logramos identificarla por espectrometría de masa entre las proteínas purificadas. Dada nuestra dificultad para expresar de forma soluble a LmaMPK7, y considerándola una proteína de interés, decidimos ceder el vector al Dr. Agustín Correa que desarrolló un sistema de búsqueda y evaluación de condiciones de expresión de proteínas solubles. Así se ensayó la expresión de LmaMPK7 en 12 vectores nuevos, fusionada a diferentes proteínas (CelD, MBP, SUMO, DsbC y Trx) y en al menos 2 condiciones de cultivos diferentes sin obtener resultados positivos (Correa et al., 2014).

Una estrategia que no evaluamos y que se podría ensayar es la co-expresión de LmaMPK7 con chaperonas moleculares. Se han reportado numerosos casos que esta estrategia favorece la obtención de ePQs solubles (Haacke *et al.*, 2009).

No se puede descartar que LmaMPK7 requiera modificaciones post-traduccionales que sean efectivamente imprescindibles para su correcto plegamiento. Se ha documentado en *E. coli* que la expresión en forma soluble de quinasas de serina/treonina aumenta cuando se las co-expresan con sus respectivos activadores específicos río arriba o sus sustratos, en la cascada de señalización (Yue *et al.*, 2000). En este contexto, podríamos intentar evaluar la co-expresión de una MAPKK específica (aún desconocida) para LmaMPK7, en procura de aumentar la solubilidad de nuestra proteína de interés en un sistema de expresión procariota. De ser exitosa, esta aproximación permitiría, simultáneamente, obtener LmaMPK7 en su conformación fosforilada (estado activo en MAPKs), para posteriores análisis de eventuales inhibidores mediante ensayos enzimáticos (John von Freyend et al., 2010) y estudios estructurales de complejos. Dado que hay al menos 4 MAPKKs putativas en el genoma, no se

pudo abordar esta alternativa de modo sistemático en el curso de mi trabajo de Tesis. Como plan de contingencia, en principio de más rápida evaluación, decidimos realizar ensayos de expresión en sistemas heterólogos eucariotas, los que podrían aportar la maquinaria de modificación post-traducciona que permita el correcto plegamiento de LmaMPK7, resultando en un aumento de su solubilidad. En primer lugar se seleccionó el sistema de *Leishmania tarentolae*. Se subclonó la secuencia condicante de LmaMPK7 en los vectores de expresión específicos para este sistema: a) pLexy I neo y b) pLex hyg2 (el primero permite la inducción de la expresión y en el segundo la expresión de la proteína recombinante es constitutiva). Las construcciones se enviaron al Institut Pasteur de París donde nuestros colaboradores (G. Spaeth) realizaron la transfección de *L. tarentolae* y evaluaron su expresión. En ningún caso lograron obtener clones de *L. tarentolae* que expresaran LmaMPK7. Este resultado podría explicarse considerando que la sobre-expresión de LmaMPK7 fuera tóxica para la sobrevivencia del parásito.

Decidimos entonces evaluar la expresión de LmaMPK7 en células S2 de *Drosophila*. Se subclonó la secuencia en vectores de expresión pT353 y pT460 (cedidos gentilmente por Thomas Kray-el primero permite la expresión citoplásmica de la proteína de interés y el segundo la expresión como proteína de secreción). Como se detalló previamente, se logró expresar LmaMPK7 de forma soluble en la línea celular S2 de *Drosophila*, pero el rendimiento obtenido no fue adecuado para nuestros objetivos de estudios estructurales. De todas formas es importante señalar que este sistema requiere de mayor análisis, en relación a la evaluación de diferentes condiciones de cultivo o incluso al escalado del mismo. Debido a los tiempos de cada ensayo de transfección y de cultivo, esto sobrepasó los objetivos de esta Tesis.

2- Se logró expresar LmaCK1 recombinante en forma soluble en el sistema procariota *E. coli*. Las únicas condiciones encontradas que nos permitieron confirmar la producción de LmaCK1 en forma soluble implican su expresión como proteína de fusión a la tiorredoxina. Sin embargo, intentos por clivar esta fusión, que es demasiado grande (y con conexión flexible a nuestro blanco) fracasaron, sugiriendo fuertemente que la tiorredoxina mantiene efectivamente la fusión soluble, pero que nuestra proteína de interés sufre de problemas de plegado que se despliegan una vez clivada. Dado que estas explicaciones no eran concluyentes, se procedió de todos modos a ensayos de cristalización de la proteína de fusión, lamentablemente sin resultados positivos, lo que en definitiva imposibilitó posteriores

estudios cristalográficos. Sin abandonar en este punto los esfuerzos, se puso énfasis a continuación en la modificación de las propias construcciones de la quinasa, en busca de mejoras de su comportamiento. Se realizó un modelado por homología (usando quinasas CK ortólogas, en particular de arroz PDB 3SV0, dado su similitud de secuencia) y se analizaron en detalle alineamientos múltiples de la secuencia codificante de LmaCK1 con otras quinasas, conduciendo en definitiva a proponer versiones truncadas de la quinasa de *Leishmania* en su extremo C-terminal. Además, dado que LmaCK1 parecería ser una proteína de secreción de *L. major* (Sacerdoti-Sierra & Jaffe, 1997; Rachidi et al., 2014), se intentó optimizar su expresión en *E. coli* como proteína periplásmica. Estos intentos con variantes cortas, así como redirigiendo su expresión a periplasma, no mostraron mejoras de rendimiento como forma soluble, por lo que decidimos, como último intento, evaluar la expresión de LmaCK1 en *Drosophila*, el sistema heterólogo eucariota que describimos previamente. Si bien detectamos la expresión de LmaCK1 como proteína de secreción en este sistema (de hecho, usando la versión más corta de la proteína LmaCK1.2Δ285), el rendimiento obtenido en las condiciones evaluadas no resultó suficiente para nuestros objetivos.

3- Se logró producir de forma recombinante a la proteína LmaMPK4, aunque el rendimiento de la forma soluble fue demasiado bajo en todas las condiciones evaluadas. La proteína se agrega mayoritariamente en cuerpos de inclusión insolubles, lo que en definitiva resulta en una escasa producción de proteína soluble, en todo caso insuficiente para estudios cristalográficos y estructurales (<0,04mg/ por litro de cultivo).

Se logró expresar LmaMPK4 como proteína de fusión a la disulfuro isomerasa DsbC. Se notó un aumento de la solubilidad de LmaMPK4, aparentemente por acción “guiada” por la proteína “solubilizadora”, sugiriendo la utilidad de la actividad chaperona previamente documentada de DsbC (Nozach et al., 2013). Por vez primera se lograron cantidades importantes de proteína soluble, al cabo de la primera etapa de purificación por cromatografía de afinidad a níquel. La fusión eluyó como una forma aparentemente decamérica de acuerdo a los resultados de cromatografía de exclusión por tamaño, descartando mediante SDS-PAGE (con y sin agente reductor) que las interacciones entre monómeros se deban a puentes disulfuro. Desafortunadamente, el corte con TEV resultó en la inmediata precipitación de LmaMPK4, concluyendo que probablemente el efecto de DsbC sea solubilizador de la fusión, pero no de auténtica acción chaperona sobre la quinasa. El incorrecto plegado de la quinasa sería así consistente con la co-elución observada de modo reproducible de la proteína GroEL/ES en la

purificación por afinidad a níquel de la fusión recombinante. GroEL/ES es una chaperona de *E. coli* que colabora interaccionando con proteínas de gran tamaño –tal como DsbC-LmaMPK4– y facilitando su correcto plegamiento (Chaudhuri *et al.*, 2009).

Dado que estas interpretaciones no pueden descartar que la fusión DsbC-LmaMPK4 tenga un correcto plegamiento, se rastrearon condiciones de cristalización con la proteína de fusión sin clivar con TEV, sabiendo que DsbC *per se* cristaliza (McCarthy *et al.*, 2000). Este rastreo permitió generar cristales, pero los patrones de difracción obtenidos con dichos *hits* iniciales resultaron en perfiles propios de pequeñas moléculas (sales, aditivos, de la condición de cristalogénesis).

Queda pendiente evaluar la expresión de ortólogos de LmaMPK4 de otras especies patógenas de *Leishmania*. Muchas veces, cambios puntuales en uno o pocos residuos se traducen en cambios en la solubilidad de la proteína de interés. Otra estrategia posible podría ser la optimización de la secuencia codificante de LmaMPK4 para su expresión en *E. coli*. Muchas veces, esta alternativa, facilita el correcto plegado de la proteína en cuestión. Como se discutió para LmaMPK7, la co-expresión de LmaMPK4 con chaperonas específicas o con su MAPKK específica, podría también incrementar su solubilidad mediante una mejora en el plegado o mediante la modificación de la fosforilación, estrategias que podrán ser ensayadas más allá de este trabajo de Tesis.

4- Se logró expresar LmaMPK10 recombinante soluble en *E. coli* con buen rendimiento. Se puso a punto los protocolos adecuados para su purificación y se rastrearon condiciones de cristalización. La construcción correspondiente a LmaMPK10 entera permitió purificar proteína, la cual cristalizó en varias condiciones diferentes. Sin embargo, en todas ellas los cristales crecieron en forma de muy pequeñas agujas. Denodados intentos de optimización de dichos cristales incluyeron la variación de condiciones por agregado de aditivos o mediante técnicas de sembrado. Sin embargo, no se logró la obtención de cristales que difractaran los rayos X. Ensayos de proteólisis limitada con tripsina permitieron detectar un núcleo de la proteína resistente a la degradación en las condiciones del ensayo. Los resultados de espectrometría de masa revelaron que este núcleo está formado por la proteína a excepción de los últimos 46 residuos del extremo C-terminal. Este resultado llevó a la construcción recombinante que expresa la proteína truncada: LmaMPK10 Δ C. LmaMPK10 Δ C también se expresó soluble con buen rendimiento en *E. coli*, pero a diferencia de la proteína entera, sólo cristalizó en una de las 384 condiciones de cristalización evaluadas. Los cristales resultaron más grandes, con forma de barras y difractaron (luego de una optimización de las condiciones

de cristalogénesis iniciales) a 1.95Å. Estos resultados son consistentes con aquellos producto de proteólisis limitada: es probable que el extremo C-terminal de LmaMPK10, conteniendo regiones desestructuradas de más fácil acceso a la proteasa, afecte el empaquetamiento de la proteína en los cristales. Así, LmaMPK10ΔC resultó en cristales de mejor calidad capaces de difractar los rayos X con alta resolución.

Se realizó la colecta de datos de difracción de rayos X, y el procesamiento de las imágenes. Las fases de LmaMPK10ΔC se obtuvieron luego por reemplazo molecular utilizando como sonda de búsqueda la estructura de p38α humana (PDB 3HV3). El intento de utilizar ERK como sonda de búsqueda, resultó en soluciones de reemplazo molecular de peor calidad (peor contraste en la función de rotación, peores coeficientes de correlación en la función de translación). Este resultado está de acuerdo con los resultados previamente descriptos, relacionados con los alineamientos estructurales y de secuencia: a pesar de la que la similitud de secuencia es más alta con ERK1/2, la superposición estructural de LmaMPK10 es ligeramente más importante con P38α (por ejemplo, usando el algoritmo de superposición estructural múltiple DALI, los puntajes Z obtenidos con el modelo final refinado de LmaMPK10ΔC son de 35.6 con P38α [PDB ID 3GFE] frente a 34.1 con ERK2 [3ERK]).

Los mapas de densidad electrónica generados fueron de excelente calidad para el lóbulo C-terminal y de señal más débil para el lóbulo N-terminal.

Las principales dificultades que atravesamos han estado ligadas a la obtención de las proteínas blanco en cantidad y de forma soluble. Se han invertido intensos esfuerzos para sortear dichos problemas ha significado un gran entrenamiento en lo referido al trabajo de expresión de proteínas recombinantes en sistemas heterólogos. Existen muchas otras estrategias que pueden ser evaluadas a la hora de expresar una proteína recombinante en un sistema heterólogo. Sin embargo, la necesidad imperativa de obtener estas proteínas en forma soluble y en las grandes cantidades requeridas para subsiguientes estudios cristalográficos, también ha significado una gran dosis de frustración, en vistas a ver avanzar con mayor celeridad el estudio estructural de estas proteínas que tienen gran interés en parasitología. Este tipo de problemas es uno de los principales cuellos de botella que atraviesa la cristalografía de proteínas hoy en día, razón por la cual el proyecto apuntaba a varios blancos diferentes, y contaba con planes de contingencia que nos han permitido seguir adelante exitosamente con la línea central de investigación. En particular, el trabajo con la quinasa LmaMPK10 ha sido

muy exitoso, y aseguró mi entrenamiento en el área de la cristalografía de proteínas, desde la expresión, purificación y manipulación genética de proteínas recombinantes, hasta la cristalización de macromoléculas y la determinación de su estructura molecular por difracción de rayos X.

Análisis estructural y bioquímico de la MAPK LmaMPK10: determinantes en la plasticidad y potenciales mecanismos de regulación de la actividad.

Como era de esperar LmaMPK10 Δ C presenta la estructura clásica, bi-lobular de las ePKs con sus 12 motivos altamente conservados. Tras el análisis detallado de la estructura de LmaMPK10 inmediatamente se lograron identificar dos características novedosas:

* la hélice α 1 en el extremo N-terminal. Esta hélice está ausente en otras MAPKs, en la mayoría de las cuales se ve reemplazada por una hoja β de dos hebras. Un reporte reciente de la estructura de una MAPK de *L. donovani* (4QNY) muestra que este tipo de hélices puede ser una característica más general de otras MAPKs del género *Leishmania*. Además, la GSK-1 de *Leishmania* (Ojo et al., 2011), otra ePK, presenta también una α -hélice N-terminal, aunque ubicada en una orientación totalmente diferente a α 1 de LmaMPK10. Este tipo de estructura podría estar jugando roles en el reconocimiento de las proteínas, incluso permitiendo a LmaMPK10 anclarse a otras estructuras.

*una corta inserción de siete residuos (55-63) en el lóbulo N-terminal, única de LmaMPK10, que conforma una horquilla β . Bien expuesta al solvente, esta horquilla justo precede a la hélice α C, que sabemos juega un papel clave en la regulación del switching activo-apagado en ePKs. La posición topológica de esta horquilla, justo antes de la hélice α C invita a especular sobre un rol regulatorio, pues la eventual unión de otras proteínas a esta horquilla β fácilmente podría transmitir de modo directo un corrimiento de la hélice α C con consecuencias regulatorias, de un modo bien análogo a lo que ocurre en quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) con la hélice PSTAIRE (equivalente estructural a α C)(Pavletich, 1999; Palmieri & Rastelli, 2013).

El análisis de cargas electrostáticas en superficie reveló una gran concentración de cargas negativas en el dorso de la proteína (en la cara opuesta al sitio de unión al ATP) y en la zona de unión al péptido sustrato se distribuyen principalmente cargas positivas. La distribución heterogénea de cargas, así como la presencia de elementos de estructura secundaria únicos en

esta proteína y bien expuestas al solvente, son características compatibles con potenciales asociaciones proteína:proteína a proteínas de anclaje, y a sustratos peptídicos de naturaleza ácida.

El análisis de la conservación de secuencia y de motivos estructurales llevó a la identificación de residuos con características importantes que en LmaMPK10 se encuentran sustituidos. Sumado a las grandes dificultades para detectar la actividad quinasa clara en LmaMPK10 recombinante así como para obtener complejos de LmaMPK10 con análogos de nucleótidos, manejamos la hipótesis de estar en presencia de una pseudoquinasa. Clásicamente las pseudoquinasas se definen por ausencia de uno o varios de los residuos catalíticos relevantes (Kornev & Taylor, 2009; Eyers & Murphy, 2013), aunque sólo el análisis de secuencia no es suficiente ya que se debe confirmar la ausencia de actividad de fosforilación. Aproximadamente el 10% de los motivos ePKs entran en esta categoría. Lo interesante es que la ausencia de actividad de fosforilación, no implican que las pseudoquinasas no tengan una función relevante, hoy en día se han reportado numerosos trabajos describiendo nuevas actividades, generalmente regulatorias, para esta quinasa supuestamente “muertas”.

Determinar la actividad de una quinasa no es tarea fácil ya que muchas veces los ensayos *in vitro* son cuestionados ya sea por trabajar con proteínas recombinantes expresadas en sistemas heterólogos, o por trabajar con proteínas purificadas de origen eucariota que provengan otras quinasa contaminantes (Lucet *et al.*, 2013). Más aún, la ausencia de actividad, no significa que la quinasa esté en estado inactivo constitutivo ya que modificaciones post-traduccionales, interacciones alostéricas o requerimientos del sustrato adecuado que mimeticen el contexto celular son difíciles de ensayar (Eyers & Murphy, 2013). Existen numerosas estrategias para evaluar la posibilidad de unión a ligandos nucleotídicos como estudios cristalográficos de los complejos, espectroscopia de fluorescencia con análogos de nucleótidos fluorescentes, cromatografía de afinidad al ATP, TSA, ITC, etc (Lucet *et al.*, 2013).

En esta tesis intentamos determinar la unión del ATP o sus análogos con varias estrategias: medidas de actividad por ensayos cinéticos acoplados, determinación de la unión del nucleótido por fluorescencia (utilizando TNP-ADP-resultado no mostrado), ITC y TSA con ATP así como numerosos intentos de obtención del complejo LmaMPK10 Δ C con análogos de nucleótidos. Todas estas estrategias fracasaron o no presentaron resultados claros.

Los únicos indicios de la actividad de LmaMPK10 que detectamos fueron en presencia de ATP marcado. Además, Mathieu Cayla, integrante de nuestro grupo de colaboradores en I.P.Paris, desarrolló su tesis de doctorado caracterizando la actividad de LmaMPK10 en estos

ensayos IVKA (*in vitro kinase assay*) además de generar un mutante knockout condicional, y determinar la importancia de esta proteína para la supervivencia de los amastigotos de *Leishmania*. La generación de mutantes puntuales o el hexamutante en las 6 posiciones conservadas en MAPK, que se ven sustituidas de LmaMPK10 no resultaron en cambios en la actividad de la proteína.

En este contexto decidimos realizar un análisis exhaustivo de la estructura de apo-LmaMPK10, intentando describir si estamos en presencia de una estructura activa o inactiva de la quinasa.

La conformación de la forma apo de LmaMPK10 que resolvimos, muestra que la proteína sería capaz de unir ligandos (tiene el sitio de unión a nucleótido completo y libre para alojar ATP, de hecho conseguimos resolver la estructura también en complejo con un inhibidor que ocupa el sitio de unión al nucleótido). Además, todos los residuos implicados en catálisis, así como los 10 residuos ultraconservados en ePKs (Kannan et al., 2007), están presentes en LmaMPK10. Las pseudoquinasas tienen tendencia a sufrir modificaciones en estos residuos (pues no hay presión de selección en cuanto a actividad catalítica), o bien a obliterar el bolsillo de unión a ATP por la misma razón evolutiva.

Sin embargo, a la vez LmaMPK10 comparte algunas características con quinastas que han sido resueltas en su estado inactivo:

- Aun cuando este bucle no pudo ser incluido en el modelo final, datos de espectrometría de masas obtenidos a partir de muestras de LmaMPK10 usadas para cristalizar sugieren efectivamente que los residuos Thr y Tyr fosforilables no están fosforilados. Habitualmente en la forma activa de las MAPK encontramos al menos 2 residuos fosforilados en el bucle de activación (TXY). La alta flexibilidad del bucle de activación en sí mismo no es una firma inequívoca del estado activado: p38 α no fosforilada en estado inactivo muestra sin embargo un bucle de activación bien ordenado y definido en la densidad electrónica (PDB ID code 1P38), mientras que formas activas de ERK, doble-fosforiladas en el motivo TEY del bucle de activación, también muestran al bucle ordenado (2ERK).
- En las quinastas activas, el glutamato conservado en la hélice α C del lóbulo N-terminal, forma un puente salino con un lisina de la hebra β 3 (Taylor & Radzio-

Andzelm, 1994). Aunque la distancia entre las cadenas laterales de la Lys51 y el Glu78 es consistente con un puente salino (3.9Å), típico de ePKs activadas, la Lys51 es muy móvil en nuestras estructuras de LmaMPK10, sugiriendo fuertemente que esta interacción iónica en todo caso no es fuerte. De todas maneras hemos encontrado que si bien estos residuos son críticos para la actividad de la quinasa (mutantes K/A vuelven a las quinasas inactivas) las distancias a la que se ubican en las diferentes quinasas son variables.

- Otro de los caracteres que la aproximan con estados “apagados” está su conformación inter-lobular abierta, que solo se observa ligeramente más cerrada cuando la proteína está unida al inhibidor SB203580 (Fig 85).

Decidimos entonces utilizar la aproximación desarrollada por el grupo de Susan Taylor (Kornev et al., 2006), útil en la comparación de múltiples estructuras, y diseñada para capturar cambios globales involucrando rearrreglos complejos. Comparamos la estructura de LmaMPK10 Δ C con diferentes estructuras de quinasas cristalizadas en conformaciones activas o inactivas realizando una superposición estructural. Esta aproximación compara los vectores de orientación C α -C β de cada residuo superpuesto, si el residuo tiene una orientación similar y comprate propiedades fisicoquímicas. Brevemente, el proceso tiene tres etapas: primero se utiliza un algoritmo que genera el gráfico de la proteína que contiene las aristas de los vectores C α -C β de cada residuo; luego se comparan los gráficos de aristas entre proteínas; y las aristas se consideran similares si contienen residuos con propiedades fisicoquímicas similares y vectores C α -C β congruentes. Finalmente se obtiene un gráfico comparativo dónde sólo se incluyen las aristas con una conexión similar existente en las proteína comparadas. Los residuos con mayor puntuación, involucran más conexiones conservadas entre residuos; generalmente juegan roles importantes funcionales y/o estructurales. El número de conexiones refleja también la conservación evolutiva de las posiciones. Generamos entonces un score AA al comparar LmaMPK10 quinasas activas y un score AI, al compararla con conformaciones inactivas (p38 y ERK2 humanas). La posición Asn178 en el *pdb* de LmaMPK10 se reemplazó por Gly de forma de ser considerada en el gráfico final, por su relevancia la determinación de las configuraciones DFG-*in*/ DFG-*out*.

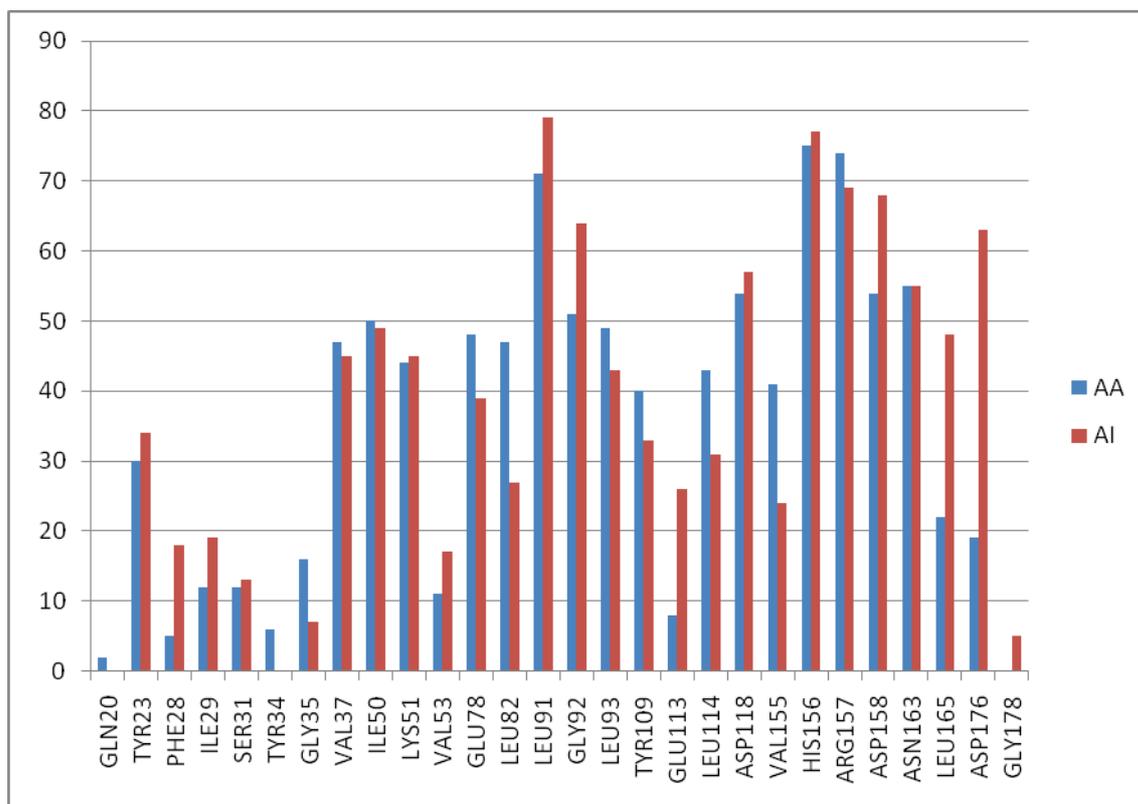


Figura 100. Comparación de AA y AI de LmaMPK10. Los valores de AA y AI fueron obtenidos mediante análisis comparativo de pk10 con estructuras de ERK2 y de p38 activas e inactivas. Los residuos del lóbulo C-t no fueron incluidos debido a que están altamente conservados y no presentaron cambios apreciables

Esta aproximación parecía en principio muy prometedora para poder concluir sobre la conformación de la forma apo de LmaMPK10, era más semejante a las conformaciones activas de otras PQs, o a las inactivas? Como se muestra en la Figura 100, LmaMPK10 parece compartir configuraciones de un serie de residuos con quinasas activas, pero también otros con inactivas, con lo que no podemos ser concluyentes. Este estudio se extendió también considerando estructuras activas e inactivas de IRK, CDK-2 y SRC, sin generar resultados claros (resultado no mostrado).

Utilizando este algoritmo se describieron en MAPKs residuos conservados, hidrofóbicos que no participan directamente en la catálisis, pero que son fundamentales para permitir a la PQ adoptar una conformación catalíticamente competente. Dichos residuos conservados forman parte de dos “espinas” o columnas vertebrales: una catalítica (C) y otra regulatoria (R). El

estado activo de ePKs requiere de la presencia de estas dos columnas continuas (no interrumpidas) de aminoácidos hidrofóbicos apilados (Kornev et al., 2006; Taylor & Kornev, 2011). Aun cuando las ePKs en estado inactivo muestran muchas configuraciones diferentes, el único motivo en común entre todas esas conformaciones inactivas es la ruptura de la espina R, conseguida de una otra manera.

En nuestro afán por clasificar la estructura de LmaMPK10 como configuración activa o inactiva pasamos a analizar las espinas hidrofóbicas en LmaMPK10. Los residuos implicados en armar una espina C (catalítica) continua (Ala49, Val37, Leu165, Leu166, Ile164, Leu119, Val222, y Met226), están bien posicionados en LmaMPK10, constituyendo así una arquitectura típica del estado activo, que se termina de completar por la entrada del ATP al bolsillo, tal como se lo puede observar mimetizado por el ligando SB203580 en la estructura del complejo (Fig 101).

Además la presencia de una espina regulatoria continua, no rota, sugiere que LmaMPK10 fue cristalizada en una configuración activa. El residuo de asparagina (Asn178) sustituyendo a la glicina altamente conservada en todas las ePKs dentro del motivo DFG, en verdad estabiliza a la Phe177 de dicho motivo en una configuración “*DFG-in*”, completando la espina R (Leu93, Leu82, Phe177, y His156) (Figura 101).

Habitualmente en las configuraciones activas de las quinasas el aspártico y la glicina del motivo DFG forman un puente de H (Kornev et al., 2006). Este puente de H característico del estado activo, está ausente en la estructura apo de LmaMPK10 Δ C. En cambio, la configuración *DFG-in* está estabilizada a través de un puente de H entre la cadena lateral de la Asn178 y el oxígeno de la cadena principal del Glu78 en la hélice α C (Figura 74), que es bueno insistir, es un residuo clave en orientar apropiadamente a la hélice α C de modo de completar la espina R (las leucinas 82 y 93 se ubican en esta hélice). En el mutante de LmaMPK10DFG, que podría tener la libertad de formar el puente de H dentro del motivo DFG, este enlace no se forma. En cambio se observa que la cadena principal de la Gly178 pasa a formar un puente de H con la Arg77 de la α C. Esto genera un movimiento del comienzo del bucle de activación de 3.4 Å. Este enlace con la Arg77 se observa con la Asn178 en la estructura de LmaMPK10 Δ C en complejo con el inhibidor (figura 76).

En el caso de LmaMPK10 el *flipping* de la Phe177 hacia una configuración inactiva “*DFG-out*” parece, o bien directamente imposible, o al menos penalizado con un alto costo energético, pues la Asn178 no tiene la flexibilidad intrínseca necesaria en los ángulos

dihedros rotables de su cadena principal, un rol funcional asegurado de manera única por una glicina (Kornev et al., 2006). Podemos resaltar un elemento de apoyo adicional a esta hipótesis de comportamiento de activación diferente de la enzima de *Leishmania* comparada con las MAPKs humanas: SB203580, conocido inhibidor específico de p38, estabiliza la configuración *DFG-out* de p38 α . A pesar de que pudimos confirmar que SB203580 se une a LmaMPK10, no es sin embargo capaz de disparar o estabilizar el *flipping* de la fenilalanina hacia una configuración *DFG-out* como se ve claramente en la estructura del complejo LmaMPK10-SB203580.

Entonces si LmaMPK10 se encuentra en estado pre-activo, la unión del nucleótido desencadena finalmente algún re-arreglo molecular? O existen otros mecanismos moleculares que aseguren su regulación dentro de la célula?

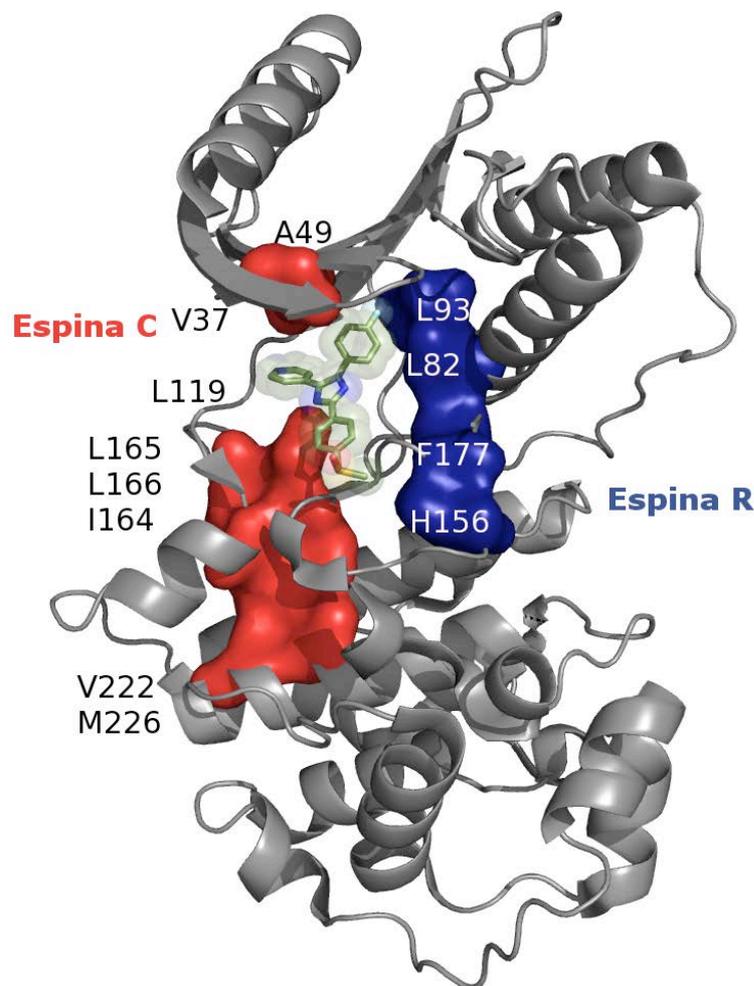


Figura 101. Espinas regulatoria y catalítica de LmaMPK10 Δ C. Se observa el modelo en cintas de LmaMPK10 en complejo con SB203580 en bastones y son la superficie transparente. Las superficies sólidas componen las espinas Regulatoria (R) en azul y Catalítica (C) en rojo. Hay que notar que la espina R es continua y la C se vuelve continua una vez unida el ligando. La arquitectura de LmaMPK10 estaría en una configuración “DFG-in” consistente con el estado activo.

Análisis estructural y biofísico de LmaMPK10 en complejo con moléculas ‘activas’ (inhibidores y/o análogos de sustrato): hacia el diseño racional de drogas.

En nuestro trabajo no logramos caracterizar la unión del ATP a LmaMPK10 y dado que la incorporación del nucleótido o derivados directos ha sido imposible la obtención del complejo cristalográfico; se mimetizó el estado de LmaMPK10 unida a ATP, usando el análogo SB203580. Teniendo en consideración los factores B extremadamente altos observados globalmente en esta estructura en complejo, así como la mayor plasticidad diferencial del lóbulo N-terminal (Fig 84), nos propusimos analizar una hipotética tendencia intrínseca a la plasticidad de LmaMPK10 usando aproximaciones *in silico* por dinámica molecular, en colaboración con el grupo liderado por Adrian Turjanski (Fac de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, Buenos Aires). De este modo, la estructura apo fue comparada con la unida a SB203580, así como a una tercer estructura, obtenida por simulación, en la cual una molécula de ATP fue unida (por *docking*) al bolsillo de unión al nucleótido (por superposición con la estructura experimental de p38 γ unida a ATP, PDB 1CM8). También se realizó un cálculo similar usando la estructura 1R3C de p38 α , a ser usada como referencia. Como se podía anticipar a partir de las estructuras cristalográficas, LmaMPK10 Δ C mostró efectivamente una mayor flexibilidad que p38 α , en particular en el lóbulo N-terminal. Por otro lado la inserción única a LmaMPK10 (la horquilla β), ausente en p38, es altamente flexible, tanto en la forma apo como en la unida a SB203580. Este comportamiento más plástico no se ve “rigidificado” al unirse el SB203580 en el bolsillo del nucleótido, mientras que sí se logra una clara estabilización cuando se usa un auténtico residuo de ATP. Este efecto significativamente diferente del ATP con respecto al SB253080 se puede analizar con mayor detalle. Sólo cuando el ATP está unido, se anticipa que el bucle P se cierre mucho más estrechamente al nucleótido, lo que a su vez correlaciona con una interacción ahora sí mucho más fuerte entre la Lys51 y el Glu78 (Fig. 103 A-C). Es así que el átomo N ζ de la Lys51 se predice interactuando con la cadena lateral acídica del Glu78, así como con los fosfatos α y β del propio ATP, tal como se ha observado en otras estructuras de MAPKs unidas a nucleótido (Bellon *et al.*, 1999 Xie *et al.*, 1998). La distancia entre la Lys51 y el Glu78 oscila a lo largo de las simulaciones entre 3.5–8.0Å en ambas formas, libre y unida SB203580, midiendo la distancia entre el átomo N ζ de la Lys51 y el C δ del carboxilato del Glu78, debido al frecuente

switch entre los oxígenos del grupo carboxilato durante las dinámicas. Estas distancias predichas en solución pueden así ser agrupadas en dos poblaciones principales, una de las cuales corresponde a la distancia interatómica observada en las estructuras cristalográficas.

Por ende, incluso cuando el anillo pirimidina del SB203580 ocupa la position equivalente a la base adenina del ATP, completando la espina catalítica, esto no parece ser suficiente para, por sí mismo, disparar el conjunto completo de modificaciones hacia una configuración plenamente activa, y en particular el SB203580 parece ser deficiente en estabilizar el par iónico Lys51- Glu78 (junto con los movimientos correlacionados del bucle P y la hélice α C, como se ven en nuestra estructura).

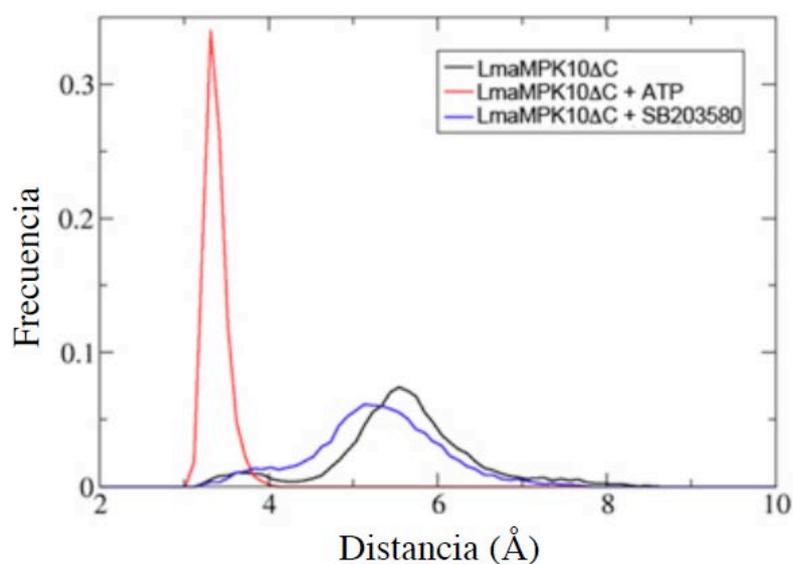


Figura 102. Histograma de la distancia interatómica entre el NZ de la Lys 51 al CD del Glu78. Se compara la estructura de apo-LmaMPK10 Δ C con LmaMPK10 Δ C unida a ATP o a SB203580. El eje vertical muestra la distribución de probabilidad relativa. Las distancias en las simulaciones se colectaron y la probabilidad de distribución se generó cada 0,1 Å y se graficaron en función de número total de distancias colectadas. Como control se corrió una dinámica molecular independiente desde el mismo punto de partida, sin el agregado de ligandos, demostrando que la estructura de partida no afectó la salida final de la simulación.

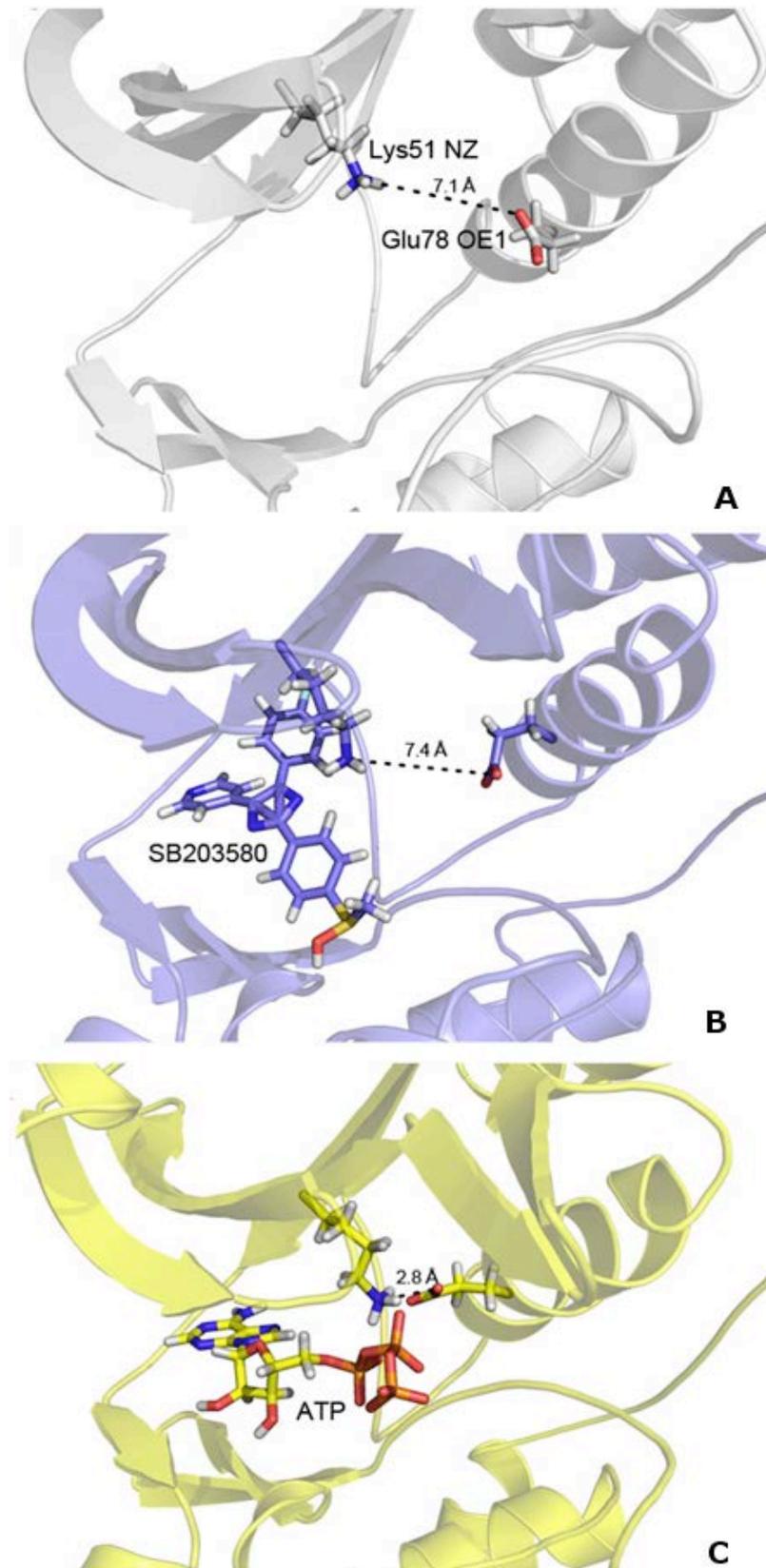


Figura 103. Representación en cartoon del modelo final de LmaMPK10ΔC luego de 100ns de simulación dinámica en su forma libre (A), en complejo con SB203580 (B) o en complejo con ATP (C). En los tres paneles se resalta la Lys51 y el Glu 78 en bastones. Se observa que el ATP genera un estrechamiento del puente salino Lys-Glu (las distancias marcadas son entre el NZ de la Lys y el OE1 del Glu78) y un rearrreglo conformacional de la hélice α C y el lazo P.

En resumen, la estructura apo-LmaMPK10 estaría en un estado pre-activado, pero la unión del nucleótido desencadenaría re-arreglos moleculares que conducirían al estado activo final. Ahora, en este estado pre-activado, LmaMPK10 sería capaz de unir al nucleótido en cualquier momento? Recordemos que es una quinasa que se expresa constitutivamente. Que papel jugaría la fosforilación del lazo de activación? Claramente, la enzima está necesitando de mecanismos de regulación de su actividad independientes de la unión al ligando nucleotídico. En este contexto analizaremos un conjunto de resultados que nos llevaron a postular un modelo de autoinhibición en LmaMPK10, una estrategia ya empleada por otras ePQs conocidas.

Modelo de autoinhibición

La baja calidad de los cristales de LmaMPK10 entera (Fig 57), así como la identificación de un segmento sensible a la proteólisis en el extremo C-terminal de 46 aminoácidos (Fig 58), pueden ser re-interpretados en el contexto de la estructura de LmaMPK10 y de una mayor estabilidad térmica detectada por TSA para la proteína completa (Fig 82). Debemos también agregar los resultados obtenidos por calorimetría en la determinación de la unión de SB203580 a LmaMPK10 donde encontramos que este ligando tiene mayor afinidad por LmamPK10AC (Fig 81, Tabla 13).

Un modelo consistente con toda la evidencia anticipa una extensión C-terminal de LmaMPK10, con un cierto grado no despreciable de movilidad en solución de modo de volverse particularmente sensible a la acción de proteasas. Parte de esa extensión podría estar interaccionando con el núcleo de la quinasa, lo que explicaría que la proteína entera es más termoestable que la proteína trunca (Fig 82). Subrayemos que la presencia de la extensión C-terminal de la proteína resulta en una disminución de >30 veces en la constante de asociación del análogo de ATP SB203580, consistente con un rol de interferencia de dicha extensión sobre el bolsillo de unión al nucleótido (auto-inhibición). En apoyo a esta hipótesis, la predicción de estructura secundaria de los 46 residuos C-terminales, da resultados reproducibles utilizando diferentes algoritmos, resultando en una hélice α incluyendo los primeros ~20 residuos, seguida de un bucle conectando a una segunda hélice α más corta hacia el final (Fig 104).

unión del ATP, ejerciendo así el efecto auto-inhibitorio observado en relación a la unión del nucleótido. Las concentraciones de ATP en la célula son típicamente altas (\sim mM), y las PQs han evolucionado un conjunto diverso de mecanismos moleculares para evitar las consecuencias potencialmente deletéreas de una activación inapropiada. La particular arquitectura “*locked-in*” (esto es, trabada en la configuración de tipo activo “*DFG-in*”) de LmaMPK10, sin el canónico mecanismo de *flipping* de la Phe que es dependiente de la glicina del motivo DFG, puede estar relacionada con la aparición de un mecanismo regulatorio diferente, que mantiene a LmaMPK10 apagada hasta tanto su propio péptido C-terminal es competido fuera del bolsillo de unión al ATP.

Para probar esta hipótesis se realizó un modelado 3D *ab initio* de los primeros 36 residuos del péptido C-terminal utilizando PEP-FOLD (Thevenet et al., 2012), resultando en un conjunto de soluciones bien agrupadas, y perfectamente consistente con la predicción de estructura secundaria. Entre los mejores modelos (de acuerdo al sistema de *score* de este algoritmo, así como la predicción de valores de energía libre), existen varios que podrían explicar bien las observaciones experimentales evidenciadas. Así, la extensión C-terminal podría llegar desde el dorso de LmaMPK10 al sitio de unión al ATP. Desde la hélice α 11 hasta la bisagra próxima al bolsillo de unión al ATP, hay una distancia de aproximadamente 25Å, lo que concuerda perfectamente el largo predicho de residuos que involucran el motivo hélice-bucle-hélice de la extensión modelada. Además, la primera mitad de los 46 residuos de dicha extensión, muestra una serie de residuos cargados de forma alternada, de modo que las argininas (de carga positiva en sus cadenas laterales) podrían acomodarse perfectamente interaccionando con la superficie negativa observada en el dorso de LmaMPK10 Δ C (Figura 105).

Un mecanismo alostérico más sofisticado podría implicar cambios conformacionales que se desencadenen por la unión del péptido C-terminal a sitios alejados del sitio de unión al ligando, eventualmente resultando en un efecto autoinhibitorio. El movimiento inter-lobular y el posicionamiento preciso de la hélice α C y el bucle de activación son pasos clave en el ciclo catalítico de las proteínas quinasas. MAPKs parecen haber evolucionado de una cola C-terminal única para acoplar eventos alostéricos que se dan entre la cola C-terminal y el sitio de docking D y la inserción β 4- β 5. Los residuos que participan en estas interacciones están altamente conservados en MAPKs en diversos organismos. Así, las MAPK las interacciones alostéricas pueden actuar junto con componentes catalíticos para facilitar el pasaje entre conformaciones activas e inactivas (Nguyen *et al.*, 2015)

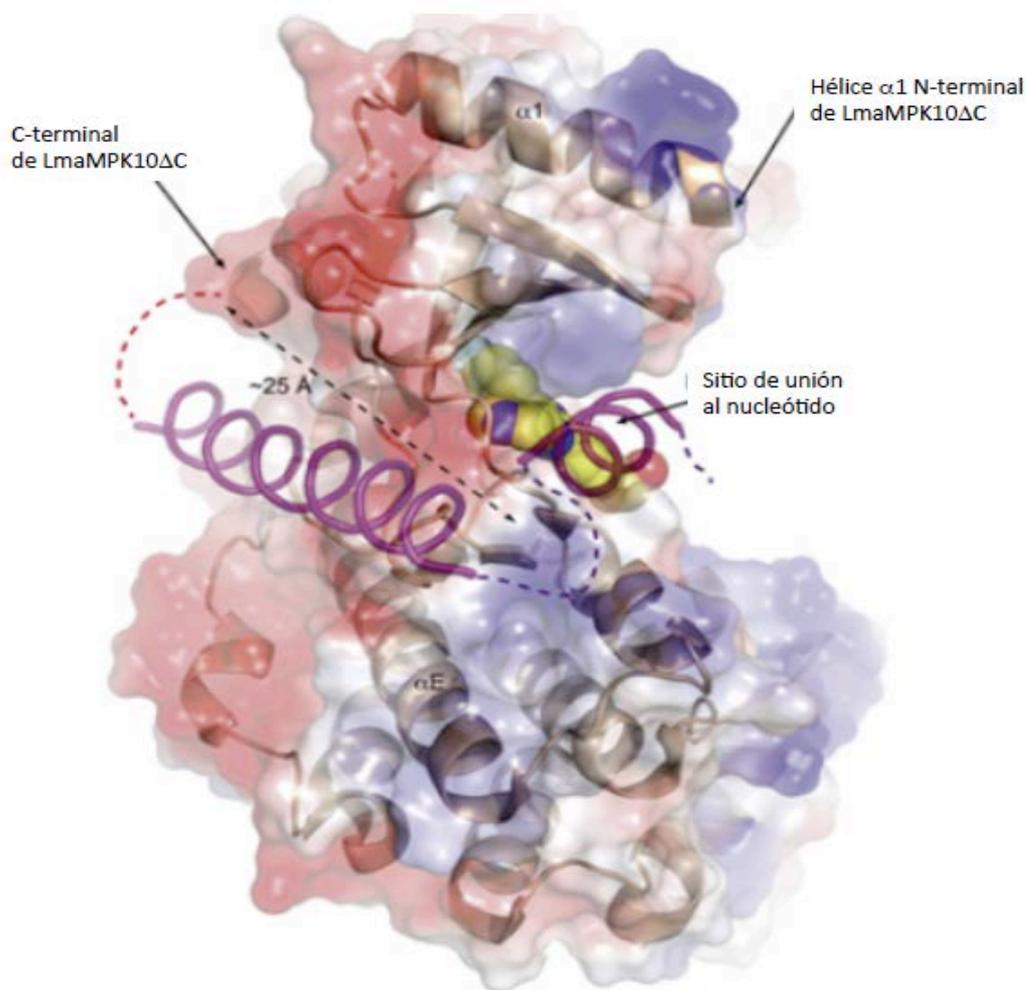


Figura 105. Modelo plausible de la asociación de la extensión C-terminal en la construcción truncada de LmaMPK10 Δ C. La estructura de apo-LmaMPK10 se muestra en cartoon, con el mapa electrostático de potencial de superficie accesible al solvente superpuesto en transparente. Las coordenadas de el inhibidor SB203580 se obtuvieron del complejo (3UIB) y se representó como esferas coloreadas por átomos en el sitio de unión al nucleótido. Las 2 α -hélices predichas de la extensión C-terminal, ausente en LmaMPK10 Δ C, se muestran en cintas violetas. Sus coordenadas corresponden al modelo ab initio mejor puntuado que incluye sólo los primeros 36 residuos de la extensión C-t. Los 2 residuos que conectan la $\alpha 1$ con la extensión Ct se representaron como líneas punteadas rojas: el lazo conector y los 10 residuos finales se marcan en punteado violeta. Notar como el largo de la primer hélice predicha coincide con la distancia entre $\alpha 1$ y el sitio de unión al ligando.

Este modelo *in silico* espera pruebas experimentales, ilustra distancias plausibles, y toma en cuenta distancias y restricciones estereoquímicas peptídicas, además de explicar la estabilización térmica y la autoinhibición de la proteína completa. En un intento de demostrar este modelo, diseñamos un nuevo mutante de LmaMPK10 (LmaMPK10QQQ) truncado en

los últimos 27 residuos C-terminales. Así, esperábamos encontrar una LmaMPK10 más estable y capaz de unir ligandos. El mutante se expresó en *E. coli* con muy buen rendimiento y se purificó de forma análoga a lo descrito para LmaMPK10. Se buscaron condiciones de cristalización de la proteína libre y en presencia de SB203580 y análogos de nucleótidos, pero hasta el momento las condiciones ensayadas no han dado cristales de proteína. Quedan pendientes estudios biofísicos que permitan caracterizar la unión de ligandos a este mutante LmaMPK10QQQ y así corroborar el modelo propuesto.

De modo independiente, se reportó una fuerte línea de evidencia que apoya al modelo de auto-inhibición que proponemos (Cayla et al., 2014). Brevemente, Cayla y colaboradores estudiaron el rol de la extensión C-terminal de LmaMPK10 como regulador negativo de la actividad de LmaMPK10. La actividad de la proteína truncada recombinante se ve aumentada en relación a la proteína WT. Además, la sobre-expresión de LmaMPK10 Δ C en parásitos amastigotas axénicos lleva a un 80% de muerte parasitaria. Este resultado sugiere fuertemente que LmaMPK10 Δ C es tóxica para los parásitos amastigotas. Este resultado se puede entender considerando que la proteína truncada está pre-activada y la ausencia de la extensión C-terminal impide su modulación *in vivo*.

Los mecanismos de auto-inhibición no son tan frecuentes en MAPK (Cargnello & Roux, 2011), pero se han descrito para ERK5, que posee una larga extensión C-terminal (Buschbeck & Ullrich, 2005). Además, la quinasa TbECK1 de *T. brucei*, una quinasa tipo ERK y tipo CDK, que comparte características con ambas quinasas, posee un dominio C-terminal con función autoinhibitoria (Ellis et al., 2004).

Poco se conoce sobre las MAPKs de Trypanosomátidos, pero el reciente reporte de la estructura de una MAPK putativa de *L. donovani* (4QNY) nos hace pensar que puedan compartir algunas características estructurales y/o funcionales. Además de compartir la novedosa hélice N-terminal presente en LmamPK10, la estructura reportada carece de los últimos 55 residuos C-terminales. Así podríamos hipotetizar que existen mecanismos regulatorios comunes en Tripanosomátidos y diferentes a los descritos para MAPK de mamíferos.

Sería importante estudiar si la extensión C-terminal es modificada *in vivo* (por ejemplo, por fosforilación, unión de otras moléculas, dimerización o incluso eventos de proteólisis) en procesos ligados a la activación fisiológica. Es interesante señalar que nuestros colaboradores del grupo de G. Spaeth (Inst Pasteur, Paris) describieron la presencia de un residuo fosforilado

(Ser395) en la extensión C-terminal de LmaMPK10, conservado en tripanosomátidos (Cayla et al., 2014). Detectaron que dicho residuo se encuentra fosforilado en promastigotas, cuando LmaMPK10 es menos activa, y desfosforilado en amastigotas. Por este motivo decidimos mutar la Ser fosforilable de esta extensión hacia una alanina para evitar la fosforilación y determinar si es posible la conformación completamente activa de LmaMPK10. El mutante recombinante fue expresado y purificado de *E. coli* y se largaron ensayos de cristalización en las condiciones de cristalización de LmaMPK10. Se obtuvieron cristales similares a los obtenidos para LmaMPK10, pero que una vez más demostraron no ser capaces de difractar los rayos X. Los rastreos de condiciones de cristalización no generaron nuevas condiciones ni cristales en hábitos diferentes a los obtenidos con LmaMPK10. Probablemente la forma de LmaMPK10 que cristaliza es la activa, que carece de residuos fosforilados en el C-terminal. Otro experimento exploratorio complementario interesante sería mutar la Ser fosforilable hacia un glutámico de forma de mimetizar el residuo fosforilado y eventualmente caracterizar la estructura inactiva de esta proteína, posiblemente con el sitio de unión al ATP ocluido por el C-terminal.

Actividad de LmaMPK10

La determinación de la actividad de LmaMPK10 por métodos cinéticos no fue posible. De todas formas esto es algo común en muchas MAPKs, generalmente no se comportan como las enzimas clásicas y muchas veces es necesario reproducir las condiciones que ocurren en un contexto celular para detectar actividad (Lucet et al., 2013). En cambio, métodos más sensibles como el empleo de ^{32}P –ATP permitió caracterizar la actividad de esta proteína. Esto fue estudiado en detalle por nuestros colaboradores (Cayla et al., 2014). Se pueden sacar algunas conclusiones de sus estudios, como se resume a continuación:

-LmaMPK10 recombinante prefiere Mn^{+2} mientras que LmaMPK10 purificada de parásitos usa Mg^{+2} .

-El mutante Lys51→Ala es inactivo, lo que habla de la importancia de la interacción iónica entre la Lys51 y el Glu78.

-LmaMPK10ΔC es más activa que LmaMPK10, resultado que ya discutimos y apoya nuestro modelo de auto-inhibición.

-La proteína de parásitos purificada de amastigotas axénicas es más activa que la purificada de promastigotas, lo que habla de la existencia de mecanismos regulatorios de la actividad de LmaMPK10, ya que es una proteína que se expresa de forma constitutiva.

-La proteína recombinante se autofosforila en este tipo de ensayos y no presenta una fosforilación marcada de los sustratos genéricos, teniendo una leve preferencia por la caseína como sustrato fosforilable. En cambio la proteína purificada de parásitos fosforila al sustrato genérico ofrecido (MBP, caseína, etc) mientras que la autofosforilación es escasa o indetectable.

Todos estos resultados muestran un comportamiento diferencial entre las proteínas recombinantes purificadas de bacterias y las purificadas de parásitos. Si bien es verdad que las proteínas de parásitos estudiadas se purifican como proteínas de fusión a GFP y eso puede llevar a restricciones estructurales y/o funcionales; podemos también entender estas diferencias pensando en los mecanismos regulatorios que existen en parásitos, en particular, las modificaciones post-traduccionales que pueden sufrir las proteínas en el contexto biológico natural o proteínas moduladoras que puedan interactuar y co-purificar con LmaMPK10.

El estudio de los residuos fosforilados de forma estadio específica en los parásitos demostró que el motivo THY se fosforila en los residuos Thr190 y Tyr192 en amastigotas, en cambio en promastigotas sólo se encuentra fosforilado el residuo Tyr192. La fosforilación de ambos residuos resultó necesaria para la completa activación de LmaMPK10. Estos resultados apoyan nuestra hipótesis de que LmaMPK10 parece estar en un estado pre-activado, sin la necesidad de la fosforilación del motivo THY. De hecho podríamos pensar que la fosforilación del bucle de activación, no genera grandes cambios en el sitio de unión al nucleótido, sin embargo re-estructura el sitio de unión al sustrato peptídico, y facilita la unión del sustrato fosforilable; sólo en estas condiciones detectaríamos la fosforilación de sustratos genéricos. En la proteína recombinante purificada de bacterias se describieron los péptidos fosforilados en la Tabla 13. No se detectó el péptido doblemente fosforilado en la Thr190 y la Tyr192, algo que parece necesario para la actividad de LmaMPK10 en parásitos. Esto podría explicar por qué la proteína recombinante LmaMPK10 no fosforila sustratos genéricos, pero si se auto-fosforila de forma residual.

Búsqueda de potenciales inhibidores de LmaMPK10

Dado que esta tesis se enmarcó en un proyecto cuyo objetivo final era el desarrollo de nuevos compuestos con actividad anti-leishmania, la obtención de la estructura de LmaMPK10 permitió abordar estrategias dirigidas hacia el diseño racional de drogas. Nuestro primer abordaje fue el de la estrategia FLiK, recientemente descrita (Simard *et al.*, 2009; Simard & Rauh, 2014) que permite realizar un screening a gran escala de diferentes ligandos. Brevemente, se realiza un ensayo de unión a la quinasa basado en fluorescencia, y de esta manera se pueden caracterizar ligando que estabilizan la conformación inactiva de la quinasa. Para esto es necesario unir un fluoróforo al lazo de activación, mediante la incorporación de una Cys reactiva justo al comienzo de este bucle. La condición previa es la de mutar todas las Cys reactivas de la proteína (mutándolas a Ser o Ala) de forma de evitar la unión del fluoróforo en sitios no deseados. Alternativamente, se pueden seguir los cambios del bucle P, mediante la mutación de la Tyr presente en ese bucle hacia una Cys reactiva capaz de incorporar fluoróforo. Así generamos 2 mutantes de LmaMPK10 Δ C: Tyr34Cys y Leu179Cys (recordar que todas las Cys nativas: 38, 72, 175 y 221, fueron mutadas a Ser). Los mutantes fueron expresados y purificados en *E. coli*, en las mismas condiciones que las descritas para LmaMPK10 Δ C, sin embargo el rendimiento fue al menos 20 veces menor. Además, la elución de la cromatografía de IMAC mostró un patrón de varios picos (resultado no mostrado), sugiriendo una importante heterogenidad conformacional. La estabilidad de estas proteínas mutadas se vió afectada por algunos de los cambios efectuados en los dos mutantes, probablemente asociado a la mutación de alguna de las Cys endógenas (ya que eran las mutaciones compartidas entre ambos). Podríamos haber empleado una estrategia para revertir esas Ser a Cys, de forma individual, y determinar si es o no posible usar algunos de esos mutantes para la estrategia FLik, Sin embargo, el trabajo era importante, y el riesgo significativo, por lo que escapó al alcance de esta Tesis.

Es en este contexto que decidimos embarcamos en otro enfoque para la búsqueda de nuevos ligandos de LmaMPK10 con potencialidad de inhibición. Al disponer de la estructura de LmaMPK10 libre y unida a un ligando, en la configuración activa, utilizamos una estrategia de screening virtual basado en estructura, en el que el conocimiento previo de la estructura 3D de la proteína blanco es crítico. Así es que un paso importante en el screening virtual de compuestos es el diseño adecuado de la base de datos de potenciales ligandos para la molécula diana. En nuestro caso, acotamos la base de compuestos seleccionando de la base ZINC, a compuestos con características similares a las del SB203580, que ya sabíamos que se

une a LmaMPK10. Es claro que se podrían lograr bases más amplias, con más compuestos, pero el tiempo de procesamiento crece enormemente.

Los programas de docking emplean diferentes algoritmos para considerar la flexibilidad de los ligandos (y de la proteína blanco), y usan también funciones de puntuación (score) diferentes, a través de la evaluación de interacciones entre los compuestos y la proteína blanco. En definitiva se decidió utilizar dos aproximaciones: las implementadas en los programas GOLD y Autodock- VINA. De los 150000 compuestos analizados, seleccionamos una lista de 15, los mejor ranqueados en ambos programas.

Mediante ensayos preliminares logramos evaluar estos compuestos en ensayos de IVKA sin lograr identificar actividad inhibitoria en ninguno de ellos. Eventualmente se podría caracterizar en el futuro la asociación de estos compuestos a LmaMPK10 mediante TSA o ITC, técnicas que ya empleamos y resultaron exitosas para caracterizar la unión de SB203580.

Función de LmaMPK10

LmaMPK10 ha demostrado ser una proteín-quinasa importante para la sobrevivda de los amastigotas de *Leishmania* (Cayla, 2014). Además, se ha demostrado que LmaMPK10 funciona como antígeno protector en modelos vacunales animales (Kumari *et al.*, 2011).

En este trabajo de Tesis se ha avanzado sustancialmente en la comprensión de la estructura 3D de LmaMPK10, no sólo libre sino también unida al ligando SB203580. Se ha caracterizado la actividad de esta quinasa *in vitro*, y se ha propuesto un modelo de regulación de la actividad de la LmaMPK10 por mecanismos autoinhibitorios (que parece estar modulado a su vez por fosforilación de residuos, véase Cayla *et al.*, 2014). Es dable destacar también que es preciso avanzar mucho aún en el conocimiento de la vía de señalización en la que LmaMPK10 está implicada *in vivo*. De hecho, poco se conoce de estas vías de señalización mediadas por MAPK en trypanosomátidos en general. Como mencionamos en la introducción, estás vías parecen tener modificaciones importantes en comparación con las conocidas vías de mamíferos ya que por ejemplo, no existen los clásicos receptores de tipo tirosín-quinasa en superficie, desencadenando la cascada de señalización. Si bien se han identificado genes de MKK en trypanosomátidos, desconocemos si son los reguladores principales de la actividad de las MAPKs. Muchas de las MAPKs se expresan de forma constitutiva, y al menos en el caso de LmaMPK10, la fosforilación no parece ser el principal

mecanismo de activación de quinasa. Se han realizado algunos intentos por conocer interactores de LmaMPK10, ya sean éstos sustratos o proteínas que puedan unirse para modular su función. Se identificó una proteína homóloga a la subunidad Spt16 de FACT de levaduras (codificada por el gen Lmj29.0020 en *L. major*) por el equipo de G. Spaeth (comunicación personal). FACT es un factor remodelador de la cromatina, y es un regulador la actividad transcripcional como se ha demostrado en levaduras o mamíferos (Mason & Struhl, 2003; Saunders *et al.*, 2003). En trypanosomátidos la regulación de la transcripción tiene diferencias importantes con otros eucariotas, ya que por ejemplo, no parece haber regulación del inicio de transcripción, lo ARN mensajeros son policistrónicos, y tienen una regulación pos-transcripcional importante (por *trans*-splicing y por regulación de la estabilidad de los ARNm). En este contexto, un factor remodelador de la cromatina cobra un valor especial para entender la funcionalidad de las vías asociadas a MAPKs en *Leishmania*. Se observó que la subunidad Spt16 de FACT co-inmunoprecipita con LmaMPK10 y con LmaMPK4 pero no con LmaMPK7. Empezamos un intento serio de caracterizar la interacción LmaMPK10-FACT. Para esto clonamos los dominios de Spt16/FACT en vectores de expresión procariotas y evaluamos su expresión. Los sub-dominios de FACT se sobre-expresaron, pero siempre resultaron en especies insolubles, lo que nos impidió seguir avanzando por este camino. Otros experimentos interesantes para confirmar y caracterizar esta interacción podrían realizarse en parásitos con ensayos de doble híbrido.

Perspectivas

Nuestro trabajo estuvo íntimamente ligado a la colaboración con el “Laboratory of Molecular Parasitology and Signaling” (Institut Pasteur, Paris), quienes desde una perspectiva genética y de parasitología molecular, esperaban avanzar en: a) la identificación de la(s) quinasa(s) río arriba que específicamente sean responsables de activar a las MPKs de interés en las que nos hemos concentrado, así como también eventualmente en la identificación de sustratos específicos; y, b) la generación de una cepa de *L. major knock-out* para LmaMPK10. Ambos puntos eran importantes para este trabajo de Tesis: de haber contado con un protocolo de activación de LmaMPK10, eso hubiera abierto las puertas a los objetivos de comparación y determinación del mecanismo de activación de la vía al nivel molecular, así como a la validación de compuestos inhibidores optimizados con la información estructural que hemos contribuido (y eventualmente pasaje a pruebas *in vivo* con parásitos en modelo animal). Hasta el momento no contamos aún con métodos para activar específicamente a LmaMPK10. En cuanto al *knock-out* de LmaMPK10, este objetivo fue finalmente conseguido en el IPasteur-Paris, tardíamente, en la especie *L. donovani*. Sin embargo, el retraso en este hallazgo impidió esencialmente en el marco de esta Tesis doctoral, avanzar en un estudio sistemático de relación estructura/función, en base a las hipótesis que derivan de nuestros análisis estructurales. Si bien LmaMPK10 no resultó esencial para *Leishmania*, se demostró que es una quinasa importante afectando la sobrevivencia del parásito en el estadio amastigota.

Se ha avanzado mucho en el estudio de la estructura de LmaMPK10, pero aún hay un gran camino por recorrer en el sentido de comprender de una forma más precisa, cómo funciona la(s) vía(s) de señalización en la(s) que está implicada en parásitos Trypanosomátidos.

Será muy interesante evaluar la importancia funcional de los diferentes elementos estructurales característicos de LmaMPK10 (como la α -hélice N-terminal, los sitios de docking, la inserción en horquilla β del dominio N-terminal, etc), mediante el estudio de mutantes guiados por estructura. Contando ahora con la cepa *knock-out* de *L. donovani* para MPK10, las distintas construcciones mutantes podrían evaluarse funcionalmente transformando (complementando) parásitos y ensayando parámetros funcionales básicos, como sobrevivencia, curva de crecimiento y parámetros metabólicos, o bien capacidad y virulencia de infección.

Elucidar la función celular de LmaMPK10 sigue siendo un objetivo clave. Los ensayos de identificación y caracterización de interactores moleculares, ya sean éstos sustratos o

proteínas que se unan a LmaMPK10 (modulando su función catalítica, o su localización subcelular, etc), podrán aportar indicios claros.

Las MAPKs de *Leishmania* y de Trypanosomátidos en general, siguen siendo mayoritariamente desconocidas. Esta familia de proteínas se ha expandido en el genoma de estos protozoos parásitos, con lo que parecen jugar roles clave en la biología de los mismos, probablemente nivel de la regulación fisiológica, quizás afectando sobrevivencia y/o capacidad infectiva de los mismos. Es por ello que siguen siendo interesantes blancos moleculares, más aún teniendo en cuenta que presentan mecanismos regulatorios diferentes a los ya bien caracterizados de las MAPKs de mamíferos; su potencial es evidente en el marco de estrategias de descubrimiento y optimización de nuevos medicamentos anti-tripanosomátidos. Estamos convencidos de que se deben seguir invirtiendo esfuerzos para una mejor comprensión molecular de estas proteínas, y de sus funciones bioquímicas y celulares.

Referencias

(2015). Descubren nuevo parásito en el Norte del país que puede transmitirse de perros a personas. El Observador. <http://www.elobservador.com.uy/descubren-nuevo-parasito-el-norte-del-pais-que-puede-transmitirse-perros-personas-n683604>.

Abe, M. K., Kuo, W. L., Hershenson, M. B. and Rosner, M. R. (1999) "Extracellular signal-regulated kinase 7 (ERK7), a novel ERK with a C-terminal domain that regulates its activity, its cellular localization, and cell growth" Mol Cell Biol **19**(2): 1301-1312.

Adams, J. A. (2001) "Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases" Chem Rev **101**(8): 2271-2290.

Adams, J. A. (2003) "Activation loop phosphorylation and catalysis in protein kinases: is there functional evidence for the autoinhibitor model?" Biochemistry **42**(3): 601-607.

Adams, P. D., Grosse-Kunstleve, R. W., Hung, L. W., Ioerger, T. R., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Read, R. J., Sacchettini, J. C., Sauter, N. K. and Terwilliger, T. C. (2002) "PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination" Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **58**(Pt 11): 1948-1954.

Allocco, J. J., Donald, R., Zhong, T., Lee, A., Tang, Y. S., Hendrickson, R. C., Liberator, P. and Nare, B. (2006) "Inhibitors of casein kinase 1 block the growth of *Leishmania major* promastigotes in vitro" Int J Parasitol **36**(12): 1249-1259.

Antinori, S., Calattini, S., Longhi, E., Bestetti, G., Piolini, R., Magni, C., Orlando, G., Gramiccia, M., Acquaviva, V., Foschi, A., Corvasce, S., Colomba, C., Titone, L., Parravicini, C., Cascio, A. and Corbellino, M. (2007) "Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected and HIV-uninfected patients: a single-center, 8-year experience in Italy and review of the literature" Clin Infect Dis **44**(12): 1602-1610.

Attwood, P. V., Piggott, M. J., Zu, X. L. and Besant, P. G. (2007) "Focus on phosphohistidine" Amino Acids **32**(1): 145-156.

Azam, M., Seeliger, M. A., Gray, N. S., Kuriyan, J. and Daley, G. Q. (2008) "Activation of tyrosine kinases by mutation of the gatekeeper threonine" Nat Struct Mol Biol **15**(10): 1109-1118.

Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J. and McCammon, J. A. (2001) "Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome" Proc Natl Acad Sci U S A **98**(18): 10037-10041.

Barrett, M. P. and Croft, S. L. (2012) "Management of trypanosomiasis and leishmaniasis" Br Med Bull **104**: 175-196.

- Bellon, S., Fitzgibbon, M. J., Fox, T., Hsiao, H. M. and Wilson, K. P. (1999) "The structure of phosphorylated p38gamma is monomeric and reveals a conserved activation-loop conformation" Structure **7**(9): 1057-1065.
- Bengs, F., Scholz, A., Kuhn, D. and Wiese, M. (2005) "LmxMPK9, a mitogen-activated protein kinase homologue affects flagellar length in *Leishmania mexicana*" Mol Microbiol **55**(5): 1606-1615.
- Berendsen, H. J. C., Postma, J.P.M., van Gunsteren, W.F., DiNola, A., and Haak, J.R. (1984) "Molecular dynamics with coupling to an external bath" J Chem Phys **81**: 3684-3790.
- Besteiro, S., Williams, R. A., Coombs, G. H. and Mottram, J. C. (2007) "Protein turnover and differentiation in *Leishmania*" Int J Parasitol **37**(10): 1063-1075.
- Biondi, R. M. and Nebreda, A. R. (2003) "Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions" Biochem J **372**(Pt 1): 1-13.
- Boutros, T., Chevet, E. and Metrakos, P. (2008) "Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer" Pharmacol Rev **60**(3): 261-310.
- Brunger, A. T. (2007) "Version 1.2 of the Crystallography and NMR system" Nat Protoc **2**(11): 2728-2733.
- Buschbeck, M. and Ullrich, A. (2005) "The unique C-terminal tail of the mitogen-activated protein kinase ERK5 regulates its activation and nuclear shuttling" J Biol Chem **280**(4): 2659-2667.
- Cargnello, M. and Roux, P. P. (2011) "Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases" Microbiol Mol Biol Rev **75**(1): 50-83.
- Carlson, H. A. and McCammon, J. A. (2000) "Accommodating protein flexibility in computational drug design" Mol Pharmacol **57**(2): 213-218.
- Cauthron, R. D., Carter, K. B., Liauw, S. and Steinberg, R. A. (1998) "Physiological phosphorylation of protein kinase A at Thr-197 is by a protein kinase A kinase" Mol Cell Biol **18**(3): 1416-1423.
- Cayla, M. (2014). Caractérisation fonctionnelle de la MAP kinase MPK10 de *Leishmania*. PhD, UNIVERSIT E PARIS DIDEROT (Paris 7), Ecole Doctorale B3MI, Microbiologie procaryote et eucaryote.
- Cayla, M., Rachidi, N., Leclercq, O., Schmidt-Arras, D., Rosenqvist, H., Wiese, M. and Spath, G. F. (2014) "Transgenic analysis of the *Leishmania* MAP kinase MPK10 reveals an auto-inhibitory mechanism crucial for stage-regulated activity and parasite viability" PLoS Pathog **10**(9): e1004347.
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., Alvar, J. and Boelaert, M. (2007) "Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?" Nat Rev Microbiol **5**(11): 873-882.

Chaudhuri, T. K., Verma, V. K. and Maheshwari, A. (2009) "GroEL assisted folding of large polypeptide substrates in Escherichia coli: Present scenario and assignments for the future" Prog Biophys Mol Biol **99**(1): 42-50.

Cheek, S., Ginalski, K., Zhang, H. and Grishin, N. V. (2005) "A comprehensive update of the sequence and structure classification of kinases" BMC Struct Biol **5**: 6.

Chen, V. B., Arendall, W. B., 3rd, Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S. and Richardson, D. C. (2010) "MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography" Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **66**(Pt 1): 12-21.

Cheng, J., Randall, A. Z., Sweredoski, M. J. and Baldi, P. (2005) "SCRATCH: a protein structure and structural feature prediction server" Nucleic Acids Res **33**(Web Server issue): W72-76.

Cheng, X., Ma, Y., Moore, M., Hemmings, B. A. and Taylor, S. S. (1998) "Phosphorylation and activation of cAMP-dependent protein kinase by phosphoinositide-dependent protein kinase" Proc Natl Acad Sci U S A **95**(17): 9849-9854.

Chuderland, D., Konson, A. and Seger, R. (2008) "Identification and characterization of a general nuclear translocation signal in signaling proteins" Mol Cell **31**(6): 850-861.

Cole, J. C. N., J.W.M. & Taylor, R. (2005) "Protein-Ligand Docking and Virtual Screening with GOLD " Virtual Screening in Drug Discovery (Eds. B. Shoichet, J. Alvarez), Taylor & Francis CRC Press, Boca Raton, Florida, USA

Correa, A., Ortega, C., Obal, G., Alzari, P., Vincentelli, R. and Opezzo, P. (2014) "Generation of a vector suite for protein solubility screening" Front Microbiol **5**: 67.

Coulombe, P. and Meloche, S. (2007) "Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions" Biochim Biophys Acta **1773**(8): 1376-1387.

Croft, A. M., Taylor, N. A. and Rodenhurst, K. E. (2006a) "Sandflies and leishmaniasis" Lancet **367**(9505): 112.

Croft, S. L., Sundar, S. and Fairlamb, A. H. (2006b) "Drug resistance in leishmaniasis" Clin Microbiol Rev **19**(1): 111-126.

Cruz, I., Morales, M. A., Noguer, I., Rodriguez, A. and Alvar, J. (2002) "Leishmania in discarded syringes from intravenous drug users" Lancet **359**(9312): 1124-1125.

Cuenda, A., Rouse, J., Doza, Y. N., Meier, R., Cohen, P., Gallagher, T. F., Young, P. R. and Lee, J. C. (1995) "SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1" FEBS Lett **364**(2): 229-233.

Cuff, J. A. and Barton, G. J. (1999) "Evaluation and improvement of multiple sequence methods for protein secondary structure prediction" Proteins **34**(4): 508-519.

Dacher, M., Morales, M. A., Pescher, P., Leclercq, O., Rachidi, N., Prina, E., Cayla, M.,

Descoteaux, A. and Spath, G. F. (2014) "Probing druggability and biological function of essential proteins in Leishmania combining facilitated null mutant and plasmid shuffle analyses" Mol Microbiol **93**(1): 146-166.

Dan-Goor, M., Nasereddin, A., Jaber, H. and Jaffe, C. L. (2013) "Identification of a secreted casein kinase 1 in Leishmania donovani: effect of protein over expression on parasite growth and virulence" PLoS One **8**(11): e79287.

de Menezes, J. P., Guedes, C. E., Petersen, A. L., Fraga, D. B. and Veras, P. S. (2015) "Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis" Biomed Res Int **2015**: 815023.

de Moraes, C. G., Castro Lima, A. K., Terra, R., dos Santos, R. F., Da-Silva, S. A. and Dutra, P. M. (2015) "The Dialogue of the Host-Parasite Relationship: Leishmania spp. and Trypanosoma cruzi Infection" Biomed Res Int **2015**: 324915.

Doerig, C. (2004) "Protein kinases as targets for anti-parasitic chemotherapy" Biochim Biophys Acta **1697**(1-2): 155-168.

Doerig, C., Billker, O., Haystead, T., Sharma, P., Tobin, A. B. and Waters, N. C. (2008) "Protein kinases of malaria parasites: an update" Trends Parasitol **24**(12): 570-577.

Doerig, C., Billker, O., Pratt, D. and Endicott, J. (2005) "Protein kinases as targets for antimalarial intervention: Kinomics, structure-based design, transmission-blockade, and targeting host cell enzymes" Biochim Biophys Acta **1754**(1-2): 132-150.

Dostalova, A. and Volf, P. (2012) "Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview" Parasit Vectors **5**: 276.

Druker, B. J. and Lydon, N. B. (2000) "Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia" J Clin Invest **105**(1): 3-7.

Ellis, J., Sarkar, M., Hendriks, E. and Matthews, K. (2004) "A novel ERK-like, CRK-like protein kinase that modulates growth in Trypanosoma brucei via an autoregulatory C-terminal extension" Mol Microbiol **53**(5): 1487-1499.

Elmahallawy, E. K., Sampedro Martinez, A., Rodriguez-Granger, J., Hoyos-Mallecot, Y., Agil, A., Navarro Mari, J. M. and Gutierrez Fernandez, J. (2014) "Diagnosis of leishmaniasis" J Infect Dev Ctries **8**(8): 961-972.

Emrick, M. A., Lee, T., Starkey, P. J., Mumby, M. C., Resing, K. A. and Ahn, N. G. (2006) "The gatekeeper residue controls autoactivation of ERK2 via a pathway of intramolecular connectivity" Proc Natl Acad Sci U S A **103**(48): 18101-18106.

Emsley, P. and Cowtan, K. (2004) "Coot: model-building tools for molecular graphics" Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **60**(Pt 12 Pt 1): 2126-2132.

Erdmann, M., Scholz, A., Melzer, I. M., Schmetz, C. and Wiese, M. (2006) "Interacting protein kinases involved in the regulation of flagellar length" Mol Biol Cell **17**(4): 2035-2045.

- Eyers, P. A. and Murphy, J. M. (2013) "Dawn of the dead: protein pseudokinases signal new adventures in cell biology" Biochem Soc Trans **41**(4): 969-974.
- Forestier, C. L. (2013) "Imaging host-Leishmania interactions: significance in visceral leishmaniasis" Parasite Immunol **35**(9-10): 256-266.
- Fox, T., Coll, J. T., Xie, X., Ford, P. J., Germann, U. A., Porter, M. D., Pazhanisamy, S., Fleming, M. A., Galullo, V., Su, M. S. and Wilson, K. P. (1998) "A single amino acid substitution makes ERK2 susceptible to pyridinyl imidazole inhibitors of p38 MAP kinase" Protein Sci **7**(11): 2249-2255.
- Frishman, D. and Argos, P. (1996) "Incorporation of non-local interactions in protein secondary structure prediction from the amino acid sequence" Protein Eng **9**(2): 133-142.
- Guerin, P. J., Oliaro, P., Sundar, S., Boelaert, M., Croft, S. L., Desjeux, P., Wasunna, M. K. and Bryceson, A. D. (2002) "Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda" Lancet Infect Dis **2**(8): 494-501.
- Haacke, A., Fendrich, G., Ramage, P. and Geiser, M. (2009) "Chaperone over-expression in Escherichia coli: apparent increased yields of soluble recombinant protein kinases are due mainly to soluble aggregates" Protein Expr Purif **64**(2): 185-193.
- Hall, T. A. (1999) "BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment program for Windows 95/98/NT" Nucleic Acids Symposium Series **41**: 95-98.
- Hanks, S. K. (2003) "Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective" Genome Biol **4**(5): 111.
- Hanks, S. K. and Hunter, T. (1995) "Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification" FASEB J **9**(8): 576-596.
- Hanks, S. K., Quinn, A. M. and Hunter, T. (1988) "The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains" Science **241**(4861): 42-52.
- Holm, L. and Rosenstrom, P. (2010) "Dali server: conservation mapping in 3D" Nucleic Acids Res **38**(Web Server issue): W545-549.
- Holton, S., Merckx, A., Burgess, D., Doerig, C., Noble, M. and Endicott, J. (2003) "Structures of P. falciparum PfPK5 test the CDK regulation paradigm and suggest mechanisms of small molecule inhibition" Structure **11**(11): 1329-1337.
- Hondele, M., Stuwe, T., Hassler, M., Halbach, F., Bowman, A., Zhang, E. T., Nijmeijer, B., Kotthoff, C., Rybin, V., Amlacher, S., Hurt, E. and Ladurner, A. G. (2013) "Structural basis of histone H2A-H2B recognition by the essential chaperone FACT" Nature **499**(7456): 111-114.
- Hornak, V., Abel, R., Okur, A., Strockbine, B., Roitberg, A. and Simmerling, C. (2006) "Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters" Proteins **65**(3): 712-725.

Hu, J., Ahuja, L. G., Meharena, H. S., Kannan, N., Kornev, A. P., Taylor, S. S. and Shaw, A. S. (2015) "Kinase regulation by hydrophobic spine assembly in cancer" Mol Cell Biol **35**(1): 264-276.

Hu, J., Stites, E. C., Yu, H., Germino, E. A., Meharena, H. S., Stork, P. J., Kornev, A. P., Taylor, S. S. and Shaw, A. S. (2013) "Allosteric activation of functionally asymmetric RAF kinase dimers" Cell **154**(5): 1036-1046.

Hunter, T. (1991) "Protein kinase classification" Methods Enzymol **200**: 3-37.

Huse, M. and Kuriyan, J. (2002) "The conformational plasticity of protein kinases" Cell **109**(3): 275-282.

Irwin, J. J. and Shoichet, B. K. (2005) "ZINC--a free database of commercially available compounds for virtual screening" J Chem Inf Model **45**(1): 177-182.

Jain, K. and Jain, N. K. (2013) "Novel therapeutic strategies for treatment of visceral leishmaniasis" Drug Discov Today **18**(23-24): 1272-1281.

Jain, K. and Jain, N. K. (2015) "Vaccines for visceral leishmaniasis: A review" J Immunol Methods **422**: 1-12.

John von Freyend, S., Rosenqvist, H., Fink, A., Melzer, I. M., Clos, J., Jensen, O. N. and Wiese, M. (2010) "LmxMPK4, an essential mitogen-activated protein kinase of *Leishmania mexicana* is phosphorylated and activated by the STE7-like protein kinase LmxMCK5" Int J Parasitol **40**(8): 969-978.

Jones, D. T. (1999) "Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices" J Mol Biol **292**(2): 195-202.

Kannan, N. and Neuwald, A. F. (2004) "Evolutionary constraints associated with functional specificity of the CMGC protein kinases MAPK, CDK, GSK, SRPK, DYRK, and CK2alpha" Protein Sci **13**(8): 2059-2077.

Kannan, N., Taylor, S. S., Zhai, Y., Venter, J. C. and Manning, G. (2007) "Structural and functional diversity of the microbial kinome" PLoS Biol **5**(3): e17.

Kevric, I., Cappel, M. A. and Keeling, J. H. (2015) "New World and Old World *Leishmania* Infections: A Practical Review" Dermatol Clin **33**(3): 579-593.

Khokhlatchev, A. V., Canagarajah, B., Wilsbacher, J., Robinson, M., Atkinson, M., Goldsmith, E. and Cobb, M. H. (1998) "Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation" Cell **93**(4): 605-615.

Klebl, B., Müller, G. and Hamacher, M. (2011). Protein kinases as drug targets. Weinheim, Wiley-VCH.

Knighton, D. R., Zheng, J. H., Ten Eyck, L. F., Ashford, V. A., Xuong, N. H., Taylor, S. S. and Sowadski, J. M. (1991) "Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase" Science **253**(5018): 407-414.

Knippschild, U., Gocht, A., Wolff, S., Huber, N., Lohler, J. and Stoter, M. (2005) "The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes" Cell Signal **17**(6): 675-689.

Knockaert, M., Gray, N., Damiens, E., Chang, Y. T., Grellier, P., Grant, K., Fergusson, D., Mottram, J., Soete, M., Dubremetz, J. F., Le Roch, K., Doerig, C., Schultz, P. and Meijer, L. (2000) "Intracellular targets of cyclin-dependent kinase inhibitors: identification by affinity chromatography using immobilised inhibitors" Chem Biol **7**(6): 411-422.

Kornev, A. P., Haste, N. M., Taylor, S. S. and Eyck, L. F. (2006) "Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism" Proc Natl Acad Sci U S A **103**(47): 17783-17788.

Kornev, A. P. and Taylor, S. S. (2009) "Pseudokinases: functional insights gleaned from structure" Structure **17**(1): 5-7.

Kornev, A. P., Taylor, S. S. and Ten Eyck, L. F. (2008) "A helix scaffold for the assembly of active protein kinases" Proc Natl Acad Sci U S A **105**(38): 14377-14382.

Kovacs, E., Das, R., Wang, Q., Collier, T. S., Cantor, A., Huang, Y., Wong, K., Mirza, A., Barros, T., Grob, P., Jura, N., Bose, R. and Kuriyan, J. (2015) "Analysis of the Role of the C-Terminal Tail in the Regulation of the Epidermal Growth Factor Receptor" Mol Cell Biol **35**(17): 3083-3102.

Krissinel, E. and Henrick, K. (2004) "Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions" Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **60**(Pt 12 Pt 1): 2256-2268.

Kultz, D. (1998) "Phylogenetic and functional classification of mitogen- and stress-activated protein kinases" J Mol Evol **46**(5): 571-588.

Kumari, S., Singh, S., Saha, B. and Paliwal, P. K. (2011) "Leishmania major MAP kinase 10 is protective against experimental L. major infection" Vaccine **29**(48): 8783-8787.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. and Higgins, D. G. (2007) "Clustal W and Clustal X version 2.0" Bioinformatics **23**(21): 2947-2948.

Laskowski, R. A. and Swindells, M. B. (2011) "LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery" J Chem Inf Model **51**(10): 2778-2786.

Liebeschuetz, J. W., Cole, J. C. and Korb, O. (2012) "Pose prediction and virtual screening performance of GOLD scoring functions in a standardized test" J Comput Aided Mol Des **26**(6): 737-748.

Lin, K., Simossis, V. A., Taylor, W. R. and Heringa, J. (2005) "A simple and fast secondary structure prediction method using hidden neural networks" Bioinformatics **21**(2): 152-159.

Lindsley, J. E. (2001) "Use of a real-time, coupled assay to measure the ATPase activity of

DNA topoisomerase II" Methods Mol Biol **95**: 57-64.

Liu, J., Carvalho, L. P., Bhattacharya, S., Carbone, C. J., Kumar, K. G., Leu, N. A., Yau, P. M., Donald, R. G., Weiss, M. J., Baker, D. P., McLaughlin, K. J., Scott, P. and Fuchs, S. Y. (2009) "Mammalian casein kinase 1alpha and its leishmanial ortholog regulate stability of IFNAR1 and type I interferon signaling" Mol Cell Biol **29**(24): 6401-6412.

Lodge, R. and Descoteaux, A. (2006) "Phagocytosis of *Leishmania donovani* amastigotes is Rac1 dependent and occurs in the absence of NADPH oxidase activation" Eur J Immunol **36**(10): 2735-2744.

Lounnas, V., Ritschel, T., Kelder, J., McGuire, R., Bywater, R. P. and Foloppe, N. (2013) "Current progress in Structure-Based Rational Drug Design marks a new mindset in drug discovery" Comput Struct Biotechnol J **5**: e201302011.

Lucet, I. S., Babon, J. J. and Murphy, J. M. (2013) "Techniques to examine nucleotide binding by pseudokinases" Biochem Soc Trans **41**(4): 975-980.

Malmstrom, R. D., Kornev, A. P., Taylor, S. S. and Amaro, R. E. (2015) "Allostery through the computational microscope: cAMP activation of a canonical signalling domain" Nat Commun **6**: 7588.

Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. and Sudarsanam, S. (2002) "The protein kinase complement of the human genome" Science **298**(5600): 1912-1934.

Marhadour, S., Marchand, P., Pagniez, F., Bazin, M. A., Picot, C., Lozach, O., Ruchaud, S., Antoine, M., Meijer, L., Rachidi, N. and Le Pape, P. (2012) "Synthesis and biological evaluation of 2,3-diarylimidazo[1,2-a]pyridines as antileishmanial agents" Eur J Med Chem **58**: 543-556.

Martinez, P. A. and Petersen, C. A. (2014) "Chronic infection by *Leishmania amazonensis* mediated through MAPK ERK mechanisms" Immunol Res **59**(1-3): 153-165.

Mason, P. B. and Struhl, K. (2003) "The FACT complex travels with elongating RNA polymerase II and is important for the fidelity of transcriptional initiation in vivo" Mol Cell Biol **23**(22): 8323-8333.

Maupetit, J., Derreumaux, P. and Tuffery, P. (2009) "PEP-FOLD: an online resource for de novo peptide structure prediction" Nucleic Acids Res **37**(Web Server issue): W498-503.

McCarthy, A. A., Haebel, P. W., Torronen, A., Rybin, V., Baker, E. N. and Metcalf, P. (2000) "Crystal structure of the protein disulfide bond isomerase, DsbC, from *Escherichia coli*" Nat Struct Biol **7**(3): 196-199.

McGwire, B. S. and Satoskar, A. R. (2014) "Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment" QJM **107**(1): 7-14.

Meagher, K. L., Redman, L. T. and Carlson, H. A. (2003) "Development of polyphosphate parameters for use with the AMBER force field" J Comput Chem **24**(9): 1016-1025.

Meharena, H. S., Chang, P., Keshwani, M. M., Oruganty, K., Nene, A. K., Kannan, N.,

- Taylor, S. S. and Kornev, A. P. (2013) "Deciphering the structural basis of eukaryotic protein kinase regulation" PLoS Biol **11**(10): e1001680.
- Mondal, D., Huda, M. M., Karmoker, M. K., Ghosh, D., Matlashewski, G., Nabi, S. G. and Kroeger, A. (2013) "Reducing visceral leishmaniasis by insecticide impregnation of bed-nets, Bangladesh" Emerg Infect Dis **19**(7): 1131-1134.
- Morales, M. A., Pescher, P. and Spath, G. F. (2010) "Leishmania major MPK7 protein kinase activity inhibits intracellular growth of the pathogenic amastigote stage" Eukaryot Cell **9**(1): 22-30.
- Morales, M. A., Renaud, O., Faigle, W., Shorte, S. L. and Spath, G. F. (2007) "Over-expression of Leishmania major MAP kinases reveals stage-specific induction of phosphotransferase activity" Int J Parasitol **37**(11): 1187-1199.
- Morales, M. A., Watanabe, R., Laurent, C., Lenormand, P., Rousselle, J. C., Namane, A. and Spath, G. F. (2008) "Phosphoproteomic analysis of Leishmania donovani pro- and amastigote stages" Proteomics **8**(2): 350-363.
- Morris, R. J., Perrakis, A. and Lamzin, V. S. (2003) "ARP/wARP and automatic interpretation of protein electron density maps" Methods Enzymol **374**: 229-244.
- Mukhopadhyay, D., Dalton, J. E., Kaye, P. M. and Chatterjee, M. (2014) "Post kala-azar dermal leishmaniasis: an unresolved mystery" Trends Parasitol **30**(2): 65-74.
- Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R. and Saravia, N. G. (2005) "Advances in leishmaniasis" Lancet **366**(9496): 1561-1577.
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A. and Dodson, E. J. (1997) "Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method" Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **53**(Pt 3): 240-255.
- Nagill, R. and Kaur, S. (2011) "Vaccine candidates for leishmaniasis: a review" Int Immunopharmacol **11**(10): 1464-1488.
- Naula, C., Parsons, M. and Mottram, J. C. (2005) "Protein kinases as drug targets in trypanosomes and Leishmania" Biochim Biophys Acta **1754**(1-2): 151-159.
- Neuber, H. (2008) "Leishmaniasis" J Dtsch Dermatol Ges **6**(9): 754-765.
- Nguyen, T., Ruan, Z., Oruganty, K. and Kannan, N. (2015) "Co-conserved MAPK features couple D-domain docking groove to distal allosteric sites via the C-terminal flanking tail" PLoS One **10**(3): e0119636.
- Noble, M. E., Endicott, J. A. and Johnson, L. N. (2004) "Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure" Science **303**(5665): 1800-1805.
- Notredame, C., Higgins, D. G. and Heringa, J. (2000) "T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment" J Mol Biol **302**(1): 205-217.

Nozach, H., Fruchart-Gaillard, C., Fenaille, F., Beau, F., Ramos, O. H., Douzi, B., Saez, N. J., Moutiez, M., Servent, D., Gondry, M., Thai, R., Cuniasse, P., Vincentelli, R. and Dive, V. (2013) "High throughput screening identifies disulfide isomerase DsbC as a very efficient partner for recombinant expression of small disulfide-rich proteins in *E. coli*" Microb Cell Fact **12**: 37.

Ojo, K. K., Arakaki, T. L., Napuli, A. J., Inampudi, K. K., Keyloun, K. R., Zhang, L., Hol, W. G., Verlinde, C. L., Merritt, E. A. and Van Voorhis, W. C. (2011) "Structure determination of glycogen synthase kinase-3 from *Leishmania major* and comparative inhibitor structure-activity relationships with *Trypanosoma brucei* GSK-3" Mol Biochem Parasitol **176**(2): 98-108.

Ortiz-Lombardia, M., Pompeo, F., Boitel, B. and Alzari, P. M. (2003) "Crystal structure of the catalytic domain of the PknB serine/threonine kinase from *Mycobacterium tuberculosis*" J Biol Chem **278**(15): 13094-13100.

Otranto, D. and Dantas-Torres, F. (2013) "The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health" Trends Parasitol **29**(7): 339-345.

Ouali, M. and King, R. D. (2000) "Cascaded multiple classifiers for secondary structure prediction" Protein Sci **9**(6): 1162-1176.

Pagliano, P., Carannante, N., Rossi, M., Gramiccia, M., Gradoni, L., Faella, F. S. and Gaeta, G. B. (2005) "Visceral leishmaniasis in pregnancy: a case series and a systematic review of the literature" J Antimicrob Chemother **55**(2): 229-233.

Palmieri, L. and Rastelli, G. (2013) "alphaC helix displacement as a general approach for allosteric modulation of protein kinases" Drug Discov Today **18**(7-8): 407-414.

Parang, K., Till, J. H., Ablooglu, A. J., Kohanski, R. A., Hubbard, S. R. and Cole, P. A. (2001) "Mechanism-based design of a protein kinase inhibitor" Nat Struct Biol **8**(1): 37-41.

Pargellis, C., Tong, L., Churchill, L., Cirillo, P. F., Gilmore, T., Graham, A. G., Grob, P. M., Hickey, E. R., Moss, N., Pav, S. and Regan, J. (2002) "Inhibition of p38 MAP kinase by utilizing a novel allosteric binding site" Nat Struct Biol **9**(4): 268-272.

Parsons, M., Worthey, E. A., Ward, P. N. and Mottram, J. C. (2005) "Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*" BMC Genomics **6**: 127.

Pavletich, N. P. (1999) "Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdk, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors" J Mol Biol **287**(5): 821-828.

Peacock, C. S., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J. C., Quail, M. A., Peters, N., Adlem, E., Tivey, A., Aslett, M., Kerhornou, A., Ivens, A., Fraser, A., Rajandream, M. A., Carver, T., Norbertczak, H., Chillingworth, T., Hance, Z., Jagels, K., Moule, S., Ormond, D., Rutter, S., Squares, R., Whitehead, S., Rabbinowitsch, E., Arrowsmith, C., White, B., Thurston, S., Bringaud, F., Baldauf, S. L., Faulconbridge, A., Jeffares, D., Depledge, D. P., Oyola, S. O., Hilley, J. D., Brito, L. O., Tosi, L. R., Barrell, B., Cruz, A. K., Mottram, J. C., Smith, D. F. and Berriman, M. (2007) "Comparative genomic analysis of three *Leishmania*

species that cause diverse human disease" Nat Genet **39**(7): 839-847.

Peters, N. C., Egen, J. G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., Lawyer, P., Fay, M. P., Germain, R. N. and Sacks, D. (2008) "In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies" Science **321**(5891): 970-974.

Pimienta, G. and Pascual, J. (2007) "Canonical and alternative MAPK signaling" Cell Cycle **6**(21): 2628-2632.

Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S. and Seger, R. (2011) "The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation" Biochim Biophys Acta **1813**(9): 1619-1633.

Powell, H. R. (1999) "The Rossmann Fourier autoindexing algorithm in MOSFLM" Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **55**(Pt 10): 1690-1695.

Qi, M. and Elion, E. A. (2005) "MAP kinase pathways" J Cell Sci **118**(Pt 16): 3569-3572.

Rachidi, N., Taly, J. F., Durieu, E., Leclercq, O., Aulner, N., Prina, E., Pescher, P., Notredame, C., Meijer, L. and Spath, G. F. (2014) "Pharmacological assessment defines *Leishmania donovani* casein kinase 1 as a drug target and reveals important functions in parasite viability and intracellular infection" Antimicrob Agents Chemother **58**(3): 1501-1515.

Rejto, P. A. and Freer, S. T. (1996) "Protein conformational substates from X-ray crystallography" Prog Biophys Mol Biol **66**(2): 167-196.

Rezvan, H. and Moafi, M. (2015) "An overview on *Leishmania* vaccines: A narrative review article" Vet Res Forum **6**(1): 1-7.

Ring, A. Y., Sours, K. M., Lee, T. and Ahn, N. G. (2011) "Distinct patterns of activation-dependent changes in conformational mobility between ERK1 and ERK2" Int J Mass Spectrom **302**(1-3): 101-109.

Ritter, U., Frischknecht, F. and van Zandbergen, G. (2009) "Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites?" Trends Parasitol **25**(11): 505-510.

Rochette, A., Raymond, F., Ubeda, J. M., Smith, M., Messier, N., Boisvert, S., Rigault, P., Corbeil, J., Ouellette, M. and Papadopoulou, B. (2008) "Genome-wide gene expression profiling analysis of *Leishmania major* and *Leishmania infantum* developmental stages reveals substantial differences between the two species" BMC Genomics **9**: 255.

Rodriguez Limardo, R. G., Ferreira, D. N., Roitberg, A. E., Marti, M. A. and Turjanski, A. G. (2011) "p38gamma activation triggers dynamical changes in allosteric docking sites" Biochemistry **50**(8): 1384-1395.

Rogers, M. E. and Bates, P. A. (2007) "*Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission" PLoS Pathog **3**(6): e91.

Rosenzweig, D., Smith, D., Myler, P. J., Olafson, R. W. and Zilberstein, D. (2008) "Post-

translational modification of cellular proteins during *Leishmania donovani* differentiation" Proteomics **8**(9): 1843-1850.

Rost, B., Sander, C. and Schneider, R. (1994) "PHD--an automatic mail server for protein secondary structure prediction" Comput Appl Biosci **10**(1): 53-60.

Rotureau, B., Morales, M. A., Bastin, P. and Spath, G. F. (2009) "The flagellum-mitogen-activated protein kinase connection in Trypanosomatids: a key sensory role in parasite signalling and development?" Cell Microbiol **11**(5): 710-718.

Rupp, B. (2015) "Reviewing biomolecular crystallography proposals: time for a paradigm change" Trends Biochem Sci.

Sacerdoti-Sierra, N. and Jaffe, C. L. (1997) "Release of ecto-protein kinases by the protozoan parasite *Leishmania major*" J Biol Chem **272**(49): 30760-30765.

Sahdev, S., Khattar, S. K. and Saini, K. S. (2008) "Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies" Mol Cell Biochem **307**(1-2): 249-264.

Salomon, O. D., Basmajdian, Y., Fernandez, M. S. and Santini, M. S. (2011) "*Lutzomyia longipalpis* in Uruguay: the first report and the potential of visceral leishmaniasis transmission" Mem Inst Oswaldo Cruz **106**(3): 381-382.

Saporito, L., Giammanco, G. M., De Grazia, S. and Colomba, C. (2013) "Visceral leishmaniasis: host-parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host" Int J Infect Dis **17**(8): e572-576.

Saunders, A., Werner, J., Andrusis, E. D., Nakayama, T., Hirose, S., Reinberg, D. and Lis, J. T. (2003) "Tracking FACT and the RNA polymerase II elongation complex through chromatin in vivo" Science **301**(5636): 1094-1096.

Scapin, G. (2002) "Structural biology in drug design: selective protein kinase inhibitors" Drug Discov Today **7**(11): 601-611.

Scheeff, E. D. and Bourne, P. E. (2005) "Structural evolution of the protein kinase-like superfamily" PLoS Comput Biol **1**(5): e49.

Shen, K., Hines, A. C., Schwarzer, D., Pickin, K. A. and Cole, P. A. (2005) "Protein kinase structure and function analysis with chemical tools" Biochim Biophys Acta **1754**(1-2): 65-78.

Shi, Z., Resing, K. A. and Ahn, N. G. (2006) "Networks for the allosteric control of protein kinases" Curr Opin Struct Biol **16**(6): 686-692.

Simard, J. R., Getlik, M., Grutter, C., Pawar, V., Wulfert, S., Rabiller, M. and Rauh, D. (2009) "Development of a fluorescent-tagged kinase assay system for the detection and characterization of allosteric kinase inhibitors" J Am Chem Soc **131**(37): 13286-13296.

Simard, J. R. and Rauh, D. (2014) "FLiK: a direct-binding assay for the identification and kinetic characterization of stabilizers of inactive kinase conformations" Methods Enzymol **548**: 147-171.

Singh, N., Kumar, M. and Singh, R. K. (2012) "Leishmaniasis: current status of available

drugs and new potential drug targets" Asian Pac J Trop Med **5**(6): 485-497.

Smart, O. S., Womack, T. O., Flensburg, C., Keller, P., Paciorek, W., Sharff, A., Vornheim, C. and Bricogne, G. (2012) "Exploiting structure similarity in refinement: automated NCS and target-structure restraints in BUSTER" Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **68**(Pt 4): 368-380.

Soto, D. S. A. L. L. V. B. C. C. S. P. M. E. V. Y. B. C. (2015) "PRIMER BROTE DE LEISHMANIASIS DE TRANSMISIÓN AUTÓCTONA LOCALIDAD: ARENITAS BLANCAS, SALTO." Distribución y estacionalidad del vector Lutzomyia longipalpis.

Stevens, J. R. (2008) "Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes" Parasite **15**(3): 226-232.

Stock, A. M., Robinson, V. L. and Goudreau, P. N. (2000) "Two-component signal transduction" Annu Rev Biochem **69**: 183-215.

Stockdale, L. and Newton, R. (2013) "A review of preventative methods against human leishmaniasis infection" PLoS Negl Trop Dis **7**(6): e2278.

Tagoe, D. N., Kalejaiye, T. D. and de Koning, H. P. (2015) "The ever unfolding story of cAMP signaling in trypanosomatids: vive la difference!" Front Pharmacol **6**: 185.

Taylor, S. S., Keshwani, M. M., Steichen, J. M. and Kornev, A. P. (2012) "Evolution of the eukaryotic protein kinases as dynamic molecular switches" Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **367**(1602): 2517-2528.

Taylor, S. S. and Kornev, A. P. (2011) "Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins" Trends Biochem Sci **36**(2): 65-77.

Taylor, S. S. and Radzio-Andzelm, E. (1994) "Three protein kinase structures define a common motif" Structure **2**(5): 345-355.

Teixeira, D. E., Benchimol, M., Rodrigues, J. C., Crepaldi, P. H., Pimenta, P. F. and de Souza, W. (2013) "The cell biology of Leishmania: how to teach using animations" PLoS Pathog **9**(10): e1003594.

Ten Eyck, L. F., Taylor, S. S. and Kornev, A. P. (2008) "Conserved spatial patterns across the protein kinase family" Biochim Biophys Acta **1784**(1): 238-243.

Tessarz, P. and Kouzarides, T. (2014) "Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics" Nat Rev Mol Cell Biol **15**(11): 703-708.

Thevenet, P., Shen, Y., Maupetit, J., Guyon, F., Derreumaux, P. and Tuffery, P. (2012) "PEP-FOLD: an updated de novo structure prediction server for both linear and disulfide bonded cyclic peptides" Nucleic Acids Res **40**(Web Server issue): W288-293.

Trapani, S. and Navaza, J. (2008) "AMoRe: classical and modern" Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **64**(Pt 1): 11-16.

Trott, O. and Olson, A. J. (2010) "AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of

docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading" *J Comput Chem* **31**(2): 455-461.

Turjanski, A. G., Hummer, G. and Gutkind, J. S. (2009) "How mitogen-activated protein kinases recognize and phosphorylate their targets: A QM/MM study" *J Am Chem Soc* **131**(17): 6141-6148.

U, M., Talevich, E., Katiyar, S., Rasheed, K. and Kannan, N. (2014) "Prediction and prioritization of rare oncogenic mutations in the cancer Kinome using novel features and multiple classifiers" *PLoS Comput Biol* **10**(4): e1003545.

Ubersax, J. A. and Ferrell, J. E., Jr. (2007) "Mechanisms of specificity in protein phosphorylation" *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(7): 530-541.

van den Ent, F. and Lowe, J. (2006) "RF cloning: a restriction-free method for inserting target genes into plasmids" *J Biochem Biophys Methods* **67**(1): 67-74.

van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W. and Laskay, T. (2004) "Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages" *J Immunol* **173**(11): 6521-6525.

Varela, M. R., Villa-Pulgarin, J. A., Yepes, E., Muller, I., Modolell, M., Munoz, D. L., Robledo, S. M., Muskus, C. E., Lopez-Aban, J., Muro, A., Velez, I. D. and Mollinedo, F. (2012) "In vitro and in vivo efficacy of ether lipid edelfosine against Leishmania spp. and SbV-resistant parasites" *PLoS Negl Trop Dis* **6**(4): e1612.

Villarino, A., Duran, R., Wehenkel, A., Fernandez, P., England, P., Brodin, P., Cole, S. T., Zimny-Arndt, U., Jungblut, P. R., Cervenansky, C. and Alzari, P. M. (2005) "Proteomic identification of M. tuberculosis protein kinase substrates: PknB recruits GarA, a FHA domain-containing protein, through activation loop-mediated interactions" *J Mol Biol* **350**(5): 953-963.

Vinet, A. F., Fukuda, M., Turco, S. J. and Descoteaux, A. (2009) "The Leishmania donovani lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of synaptotagmin V" *PLoS Pathog* **5**(10): e1000628.

Wang, Q., Melzer, I. M., Kruse, M., Sander-Juelch, C. and Wiese, M. (2005) "LmxMPK4, a mitogen-activated protein (MAP) kinase homologue essential for promastigotes and amastigotes of Leishmania mexicana" *Kinetoplastid Biol Dis* **4**: 6.

Wehenkel, A., Bellinzoni, M., Grana, M., Duran, R., Villarino, A., Fernandez, P., Andre-Leroux, G., England, P., Takiff, H., Cervenansky, C., Cole, S. T. and Alzari, P. M. (2008) "Mycobacterial Ser/Thr protein kinases and phosphatases: physiological roles and therapeutic potential" *Biochim Biophys Acta* **1784**(1): 193-202.

Wei, F., Wang, W. and Liu, Q. (2013) "Protein kinases of Toxoplasma gondii: functions and drug targets" *Parasitol Res* **112**(6): 2121-2129.

Wernimont, A. K., Artz, J. D., Finerty, P., Jr., Lin, Y. H., Amani, M., Allali-Hassani, A., Senisterra, G., Vedadi, M., Tempel, W., Mackenzie, F., Chau, I., Lourido, S., Sibley, L. D. and Hui, R. (2010) "Structures of apicomplexan calcium-dependent protein kinases reveal

mechanism of activation by calcium" Nat Struct Mol Biol **17**(5): 596-601.

WHO (2010) "Control of the leishmaniasis - World Health Organization."

Wiese, M. (1998) "A mitogen-activated protein (MAP) kinase homologue of *Leishmania mexicana* is essential for parasite survival in the infected host" EMBO J **17**(9): 2619-2628.

Wiese, M. (2007) "Leishmania MAP kinases--familiar proteins in an unusual context" Int J Parasitol **37**(10): 1053-1062.

Wiese, M., Kuhn, D. and Grunfelder, C. G. (2003a) "Protein kinase involved in flagellar-length control" Eukaryot Cell **2**(4): 769-777.

Wiese, M., Wang, Q. and Gorcke, I. (2003b) "Identification of mitogen-activated protein kinase homologues from *Leishmania mexicana*" Int J Parasitol **33**(14): 1577-1587.

Winkler, D. D. and Luger, K. (2011) "The histone chaperone FACT: structural insights and mechanisms for nucleosome reorganization" J Biol Chem **286**(21): 18369-18374.

Winn, M. D., Isupov, M. N. and Murshudov, G. N. (2001) "Use of TLS parameters to model anisotropic displacements in macromolecular refinement" Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **57**(Pt 1): 122-133.

Xie, X., Gu, Y., Fox, T., Coll, J. T., Fleming, M. A., Markland, W., Caron, P. R., Wilson, K. P. and Su, M. S. (1998) "Crystal structure of JNK3: a kinase implicated in neuronal apoptosis" Structure **6**(8): 983-991.

Yue, B. G., Ajuh, P., Akusjarvi, G., Lamond, A. I. and Kreivi, J. P. (2000) "Functional coexpression of serine protein kinase SRPK1 and its substrate ASF/SF2 in *Escherichia coli*" Nucleic Acids Res **28**(5): E14.

Zalatan, J. G., Coyle, S. M., Rajan, S., Sidhu, S. S. and Lim, W. A. (2012) "Conformational control of the Ste5 scaffold protein insulates against MAP kinase misactivation" Science **337**(6099): 1218-1222.

Zerbs, S., Giuliani, S. and Collart, F. (2014) "Small-scale expression of proteins in *E. coli*" Methods Enzymol **536**: 117-131.

Zhang, J., Yang, P. L. and Gray, N. S. (2009) "Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors" Nat Rev Cancer **9**(1): 28-39.

Zhang, Y. and Dong, C. (2007) "Regulatory mechanisms of mitogen-activated kinase signaling" Cell Mol Life Sci **64**(21): 2771-2789.