



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



CEINBIO
Centro de Investigaciones Biomédicas
Universidad de la República - Montevideo | UY

Tesis de Maestría
PEDECIBA Bioinformática

Consecuencias estructurales y funcionales de la
nitración de tirosinas en proteínas celulares: el caso
de la chaperona Hsp90

Lic. Alfonso Taboada
Tutor: Dr. Rafael Radi
Cotutor: Dr. Ari Fernando Zeida

Lugar de realización:
Departamento de Bioquímica y Centro de Investigaciones Biomédicas
(CEINBIO), Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay.

RESUMEN

La tirosina es un aminoácido aromático especialmente propenso a sufrir modificaciones químicas, entre ellas la nitración. Esta modificación consiste en el reemplazo del hidrógeno en la posición 3 del anillo fenólico por un grupo nitró. Una de las proteínas humanas propensas a sufrir cambios funcionales a partir de la nitración, es la Hsp90, centro de este proyecto. Es miembro de la familia altamente conservada de las chaperonas, involucrada tanto en la regulación de la homeostasis celular como en la respuesta al estrés celular. Se comporta como un homodímero en solución y mediante un mecanismo catalítico impulsado por la hidrólisis de ATP, está involucrada en el plegamiento, maduración y estabilización de una amplia variedad de proteínas clientes.

Trabajos previos han revelado que la nitración de tirosinas específicas ubicadas en las posiciones 33 o 56 en la Hsp90, es suficiente para inducir cambios en el metabolismo celular y también una ganancia en su función tóxica, provocando la muerte en motoneuronas. Sin embargo, los cambios estructurales y dinámicos que surgen a partir de esta modificación química no han sido caracterizados aún.

El presente proyecto busca develar las bases moleculares que conectan la nitración en los residuos mencionados con cambios en la estructura y dinámica proteica, que permitan explicar las diferencias observadas en la función de la chaperona. Para ello, se utilizaron herramientas computacionales de simulación de dinámica molecular, posibilitando el análisis de los cambios estructurales y dinámicos asociados a la nitración de los residuos de tirosina claves. Nuestros resultados evidencian que estas modificaciones promueven cambios estructurales de corto y mediano alcance, afectando a través de dos regiones diferentes, las propiedades de unión de nucleótidos en el sitio correspondiente y perturbando además el equilibrio entre los distintos estados oligoméricos de la proteína. Dichos resultados fueron correlacionados con evidencia experimental que paralelamente se generó *in vitro*.

Esta comprensión integral de los cambios estructurales y funcionales inducidos por la nitración en la Hsp90, abre las puertas al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas específicamente a sus formas nitradas y a su función patológica.

ABSTRACT

Tyrosine is an aromatic amino acid that is particularly prone to oxidative post-translational modifications, including nitration. This modification consists of the replacement of the hydrogen atom at position 3 of the phenolic ring by a nitro group. One human protein that is especially susceptible to functional changes upon nitration is Hsp90, the focus of this project. Hsp90 is a highly conserved molecular chaperone involved in the regulation of cellular homeostasis and the cellular stress response. It behaves as a homodimer in solution and, through a catalytic mechanism driven by ATP hydrolysis, participates in the folding, maturation, and stabilization of a wide variety of client proteins.

Previous studies have revealed that nitration of specific tyrosine residues at positions 33 or 56 in Hsp90 is sufficient to induce alterations in cellular metabolism as well as a gain of toxic function, leading to motor neuron death. However, the structural and dynamic changes arising from this chemical modification have not yet been fully characterized.

The present project aims to elucidate the molecular bases linking nitration of these residues to changes in protein structure and dynamics that may account for the observed functional differences of the chaperone. To this end, computational molecular dynamics simulations were employed, enabling the analysis of structural and dynamic alterations associated with nitration of key tyrosine residues. Our results indicate that these modifications promote short- and medium-range structural changes that, through two distinct regions, affect nucleotide-binding properties at the corresponding site and additionally perturb the equilibrium among different oligomeric states of the protein. These findings were correlated with *in vitro* experimental evidence generated in parallel.

This integrated understanding of the structural and functional changes induced by Hsp90 nitration opens new avenues for the development of therapeutic strategies specifically targeting its nitrated forms and their pathological function.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
1.1. Modificaciones oxidativas postraduccionales de proteínas.....	1
1.2 Nitración de tirosinas en proteínas.....	3
1.2.1 Propiedades fisicoquímicas de la tirosina.....	3
1.2.2 Modificaciones postraduccionales de la tirosina.....	4
1.2.3 Mecanismos de nitración de tirosina.....	6
1.2.4 Propiedades de la 3-nitrotirosina y consecuencias biológicas de su nitración..	8
1.3 Chaperona Hsp90.....	11
1.3.1 Clasificación.....	13
1.3.2 Estructura.....	14
1.3.3 Relación estructura-función.....	17
1.3.4 Rol de la Hsp90 Beta en la fisiología celular.....	18
1.3.5 Nitración de la Hsp90.....	19
1.4 Importancia de los abordajes computacionales en la biología estructural.....	21
1.5 Objetivos:.....	23
1.5.1 Objetivo general.....	23
1.5.2 Objetivos específicos.....	23
2. METODOLOGÍA.....	24
2.1 Generalidades acerca de los métodos de modelado y simulación molecular utilizados en esta Tesis.....	24
2.1.1 Simulaciones de dinámica molecular.....	24
2.1.2 Métodos derivados de dinámica molecular utilizados.....	28
2.1.2.1 Simulaciones a pH constante.....	28
2.1.2.2 Estimación de energía de unión: MM-GBSA.....	29
2.1.3 Frustración molecular: principios y utilidades.....	30
2.2 Aspectos específicos sobre los protocolos de modelado y simulación computacional utilizados en esta Tesis.....	32
2.2.1 Descripción de los sistemas moleculares simulados.....	32

2.2.2 Simulaciones de dinámica molecular convencional.....	35
2.2.3 Titulación de aminoácidos mediante simulaciones a pH constante.....	36
2.2.4 Estimación de energía de unión del ATP.....	37
2.2.5 Análisis de la relevancia de la relación estructura función por aminoácido utilizando el concepto de frustración.....	38
3. RESULTADOS.....	40
3.1 Dinámica conformacional del ATP-lid en la enzima nativa.....	40
3.1.1 Análisis de la información estructural disponible.....	40
3.1.2 Comparación estructural y dinámica de los modelos ATP-lid abierto vs cerrado..	43
3.1.3 Conclusiones.....	47
3.2 Impacto de la nitración de Y33 en la estructura y actividad de la enzima.....	48
3.2.1 Evaluación del entorno de Y33 en el contexto del dímero de la Hsp90.....	48
3.2.2 Resultados experimentales obtenidos en el modelo Y33 mono-nitrada.....	49
3.2.3 La nitración en Y33 promueve cambios estructurales y energéticos a nivel de la unión de nucleótidos en un modelo del dímero cerrado.....	51
3.2.4 La nitración en Y33 afecta la dinámica del ATP-lid en un modelo del dímero abierto.....	55
3.2.5 Conclusiones.....	57
3.3 Impacto de la nitración en Y56 en la estructura y actividad de la enzima.....	58
3.3.1 Evaluación del entorno de Y56 en el contexto del NTD de la Hsp90.....	58
3.3.2 Resultados experimentales obtenidos en el modelo Y56 mono-nitrada.....	59
3.3.3 Nitración en Y56 promueve cambios estructurales a nivel del ATP-lid.....	61
3.3.4 Conclusiones.....	63
4. DISCUSIÓN.....	64
5. PERSPECTIVAS.....	69
6. BIBLIOGRAFÍA.....	71
7. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DE ESTA TESIS.....	85
8. AGRADECIMIENTOS.....	86

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. Modificaciones oxidativas postraduccionales de proteínas.

La oxidación constituye una de las modificaciones postraduccionales más frecuentes que pueden sufrir las proteínas. Estas modificaciones oxidativas implican que determinados aminoácidos sean modificados químicamente como consecuencia de reacciones con especies oxidantes, lo que puede impactar de múltiples maneras las propiedades de las proteínas¹.

Existen distintos tipos de modificaciones postraduccionales inducidas por especies reactivas que pueden dar lugar a la oxidación proteica. Una de las formas de organizar estos distintos tipos de modificaciones existentes, es según el aminoácido afectado. En este contexto, la cisteína es el residuo más susceptible en comparación con el resto y presenta una amplia variedad de modificaciones oxidativas posibles. Bajo condiciones de estrés oxidativo la cisteína puede ser oxidada por especies reactivas de oxígeno, formando ácido sulfónico, sulfénico o sulfínico, o especies reactivas de nitrógeno para formar S-nitroso-tioles o sulfonamidas por ejemplo. Otro cambio frecuente es la formación de puentes de disulfuro entre dos residuos de cisteína, una modificación que constituye uno de los mecanismos más comunes de regulación redox en proteínas²⁻⁴.

La metionina, aunque menos reactiva que la cisteína, puede sufrir también este tipo de modificaciones y se ubica como el segundo residuo más sensible. Su cadena lateral tioéter puede reaccionar con especies reactivas de oxígeno y nitrógeno formando sulfóxido para formar metionina sulfóxido. Esta modificación es reversible y está regulada por el sistema de metionina sulfóxido reductasas (MsrA y MsrB)⁵⁻⁷ u otras enzimas con esta actividad.

Los aminoácidos aromáticos también presentan una alta sensibilidad a la acción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, formando en general productos de oxidación irreversibles. En el caso de la tirosina, esta puede sufrir hidroxilación, nitración, formación de radical tirosilo o formación de di-tirosina⁸⁻¹⁰. Los residuos de triptófano, por su parte, pueden oxidarse a hidroxitriptófano¹¹, experimentar la fragmentación del anillo indol¹² o nitrarse para formar nitro-triptófano¹³. La histidina puede oxidarse a 2-oxo-histidina, mientras que la fenilalanina puede hidroxilarse o

nitrarse^{14,15}. Por otra parte, los aminoácidos alifáticos como lisina, prolina, arginina y asparagina, también pueden oxidarse, aunque generalmente requieren condiciones más severas que los aminoácidos recién mencionados y sus modificaciones suelen ser irreversibles¹⁶.

La carbonilación constituye una modificación irreversible caracterizada por la incorporación de grupos carbonilo en las cadenas laterales de ciertos aminoácidos. Además, bajo condiciones de estrés oxidativo severo, pueden ocurrir reacciones que afectan directamente al esqueleto peptídico en lugar de su cadena lateral, provocando su ruptura y fragmentación¹⁷.

Las consecuencias funcionales de estas modificaciones son muy variadas. A menudo, dan lugar a proteoformas menos estables que se caracterizan por la exposición de aminoácidos hidrofóbicos en su superficie y cambios en el plegamiento. Estos cambios pueden afectar la actividad de la proteína y favorecer la formación de dímeros, oligómeros o de agregados proteicos¹⁸. La oxidación también modula su degradación por parte de los sistemas proteolíticos intracelulares. Mientras que el daño oxidativo suave o moderado estimula su degradación, el daño oxidativo severo puede disminuir su susceptibilidad a la proteólisis, debido principalmente a la agregación y los entrecruzamientos químicos¹⁸. Asimismo, estas modificaciones pueden remodelar el interactoma, alterando las asociaciones de la proteína con otras proteínas, metabolitos u otras biomoléculas¹⁹. También pueden inducir cambios en la localización subcelular de la proteína, alterando señales o interacciones necesarias para su correcto transporte y distribución²⁰. En conjunto, algunas de estas alteraciones suelen conducir a la pérdida o modificación de la función de la proteína (y sólo en raras ocasiones a una ganancia de función)^{18,21}. La Figura 1 muestra un esquema representativo de las consecuencias funcionales y/o celulares de modificaciones oxidativas en proteínas.

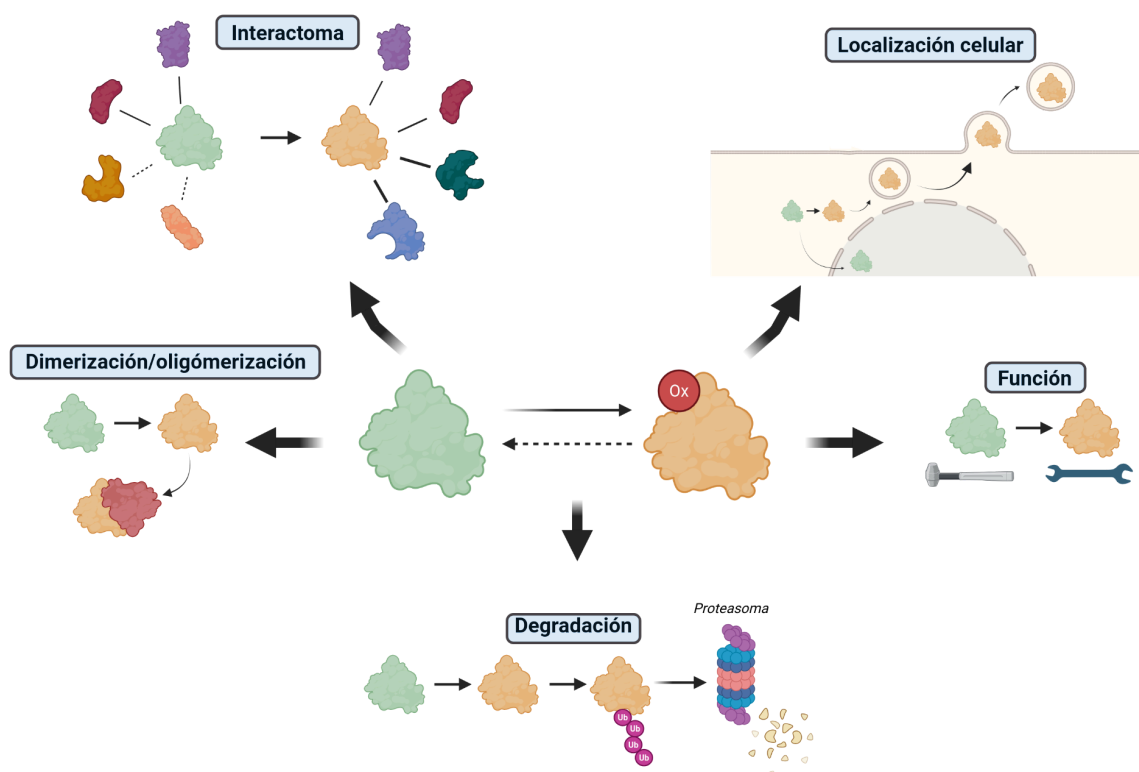


Figura 1: Representación esquemática de consecuencias bioquímicas y biológicas de la oxidación proteica.

1.2 Nitración de tirosinas en proteínas

1.2.1 Propiedades fisicoquímicas de la tirosina

La tirosina (Tyr; Y) es un aminoácido aromático que participa en numerosas funciones estructurales y regulatorias en las proteínas. Se caracteriza por la presencia de un anillo fenólico (Fig. 2). Esta estructura le confiere una dualidad en sus propiedades: es parcialmente hidrofóbica por el anillo aromático y parcialmente hidrofílica por el grupo hidroxilo. La polaridad del grupo $-OH$ permite la formación de enlaces de hidrógeno y su participación en interacciones ion-dipolo, contribuyendo a la estabilidad estructural de las proteínas.

Desde el punto de vista espectroscópico, la tirosina es responsable de parte de la absorción de la luz ultravioleta en las proteínas, presentando un máximo de absorción alrededor de los 280 nm (Fig. 2). Esta propiedad la hace particularmente útil en

estudios de dinámica proteica y cambios conformacionales. Desde el punto de vista de sus propiedades ácido-base, el grupo hidroxilo posee un pKa cercano a 10.1, lo que permite su ionización en medios alcalinos y modula su reactividad en diversos contextos bioquímicos²².

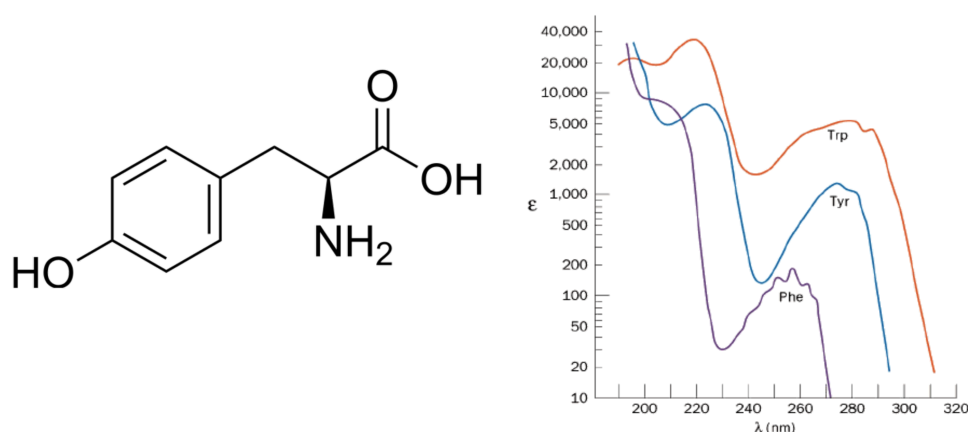


Figura 2: A la izquierda se muestra la estructura del aminoácido tirosina. A la derecha se muestran los espectros de absorción de absorción de tirosina comparada con el triptófano y fenilalanina.

Además de estas características, la tirosina presenta otras propiedades fisicoquímicas relevantes. El anillo aromático puede participar con interacciones π - π con otros residuos aromáticos y en interacciones cation- π con residuos cargados positivamente, tales como lisina o arginina²³. Asimismo, la cadena lateral de este residuo posee un volumen relativamente grande, lo que condiciona su acomodo en cavidades o regiones de la proteína que se encuentren relativamente enterradas^{24,25}. Desde el punto de vista químico, el grupo fenólico muestra una reactividad significativa frente a especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, lo que convierte a este residuo en uno de los blancos preferenciales de oxidación y nitración durante procesos de estrés oxidativo^{26,27}.

1.2.2 Modificaciones postraduccionales de la tirosina.

Un aspecto clave de la tirosina es su capacidad para ser modificada postraduccionamente. Estas modificaciones pueden alterar tanto las propiedades fisicoquímicas del aminoácido, como así también tener consecuencias a nivel estructural y funcional de las proteínas a las que la tirosina pertenece²⁸.

Entre estas modificaciones, ciertas transformaciones específicas sobre residuos de tirosina han adquirido particular relevancia debido a su impacto en algunos procesos biológicos y han sido ampliamente caracterizadas. Una de las modificaciones más clásicas y funcionalmente relevantes de la tirosina es su sulfatación en el grupo fenólico, una reacción catalizada por la tirosil-proteína sulfotransferasa (TPST), enzima que transfiere un grupo sulfato desde el donador universal 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS) al oxígeno fenólico del residuo de tirosina (Fig. 3). Si bien se han identificado un número considerable de proteínas que son sulfatadas en residuos de tirosina, el rol funcional de esta modificación no siempre ha sido claramente establecido, aunque en algunos casos sí se ha demostrado que la sulfatación puede ser determinante para interacciones proteína-proteína de alta afinidad^{10,29}.

Otra modificación postraducciona de gran relevancia en tirosinas es la fosforilación a nivel del OH- fenólico, regulada por quinasas que añaden grupos fosfato (Fig. 3) y fosfatasas que los retiran, es un mecanismo central para controlar la actividad y las interacciones de las proteínas. Participa en numerosos procesos celulares y su alcance es más amplio de lo que se creía, abarcando desde la señalización hasta funciones estructurales y metabólicas. Las alteraciones en este equilibrio están implicadas en diversas enfermedades, en especial el cáncer, lo que ha impulsado el desarrollo de inhibidores de quinasas que han cambiado el tratamiento de varios tumores³⁰⁻³².

Asimismo, la tirosina puede sufrir la adición de un grupo nitro (Fig. 3), constituyendo otra de las posibles modificaciones postraduccionales. Esta modificación, al ocasionar alteraciones considerables en las propiedades fisicoquímicas de la tirosina, puede inducir cambios significativos en la estructura y/o función de la proteína, provocando, por ejemplo, una pérdida de actividad, aunque en algunos casos también puede conferir funciones nuevas que no estaban presentes en la proteína original. Además, la nitración de tirosina puede interferir en cascadas de fosforilación³³.

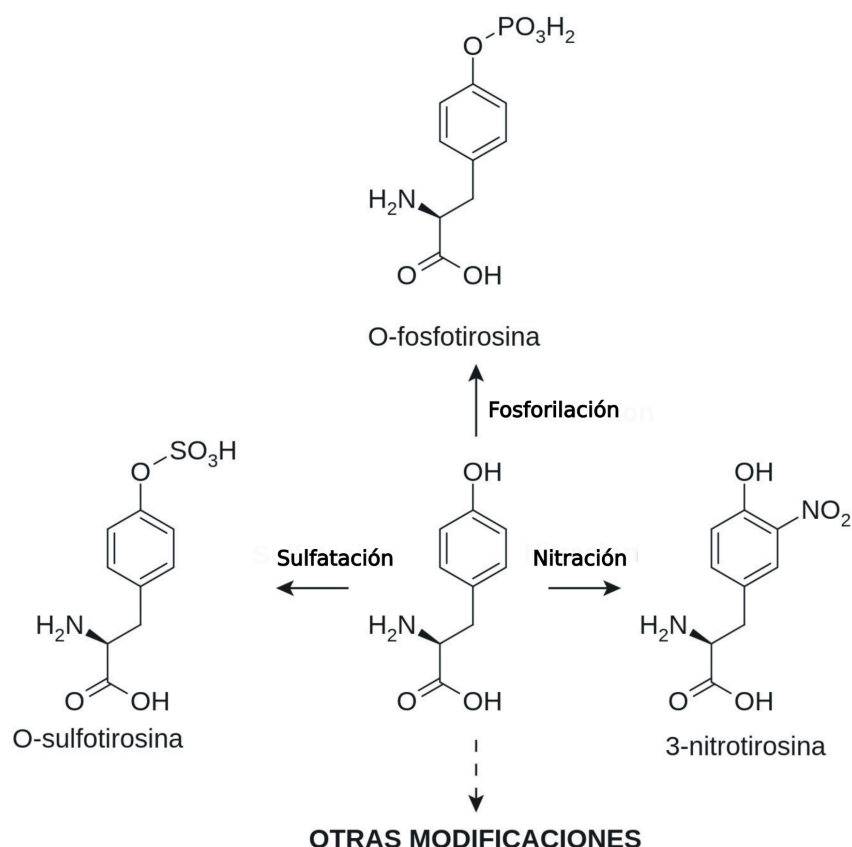


Figura 3: Algunas de las posibles modificaciones postraduccionales que puede sufrir la tirosina. De arriba hacia abajo: sulfatación, fosforilación, nitración. Las estructuras se muestran en sus versiones completamente protonadas.

Cabe aclarar que estas tres modificaciones mencionadas, si bien son importantes, no son las únicas. Otras modificaciones postraduccionales tales como cloración, bromación, yodación, oxidación, O-glicosilación o acetilación, aunque menos frecuentes, también son posibles y son muy relevantes desde el punto de vista biológico^{34–39}.

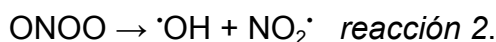
1.2.3 Mecanismos de nitración de tirosina.

Esta Tesis aborda principalmente el impacto de la nitración de residuos de tirosina. Entre los mecanismos que conducen a esta modificación se destacan aquellos que dependen de la química de radicales libres (Fig. 4). Estos incluyen la acción del peroxinitrito (ONOO^-) y de hemoperoxidasas, que generan especies reactivas como el radical dióxido de nitrógeno ($\text{NO}_2^\cdot$), involucrado en la nitración de tirosina

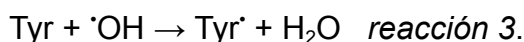
El peroxinitrito (ONOO^-) es un potente agente oxidante y nitrante que se forma a partir de la reacción rápida entre el óxido nítrico ($\text{NO}^\cdot$) y el superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$):



Este compuesto es capaz de nitrar residuos de tirosina en proteínas a través de la formación de radicales. La nitración de la tirosina en presencia de ONOO^- generalmente ocurre en dos pasos. Primero, el ONOO^- se descompone en un radical hidroxilo ($\text{}^\bullet\text{OH}$) y un radical $\text{NO}_2^\bullet$:



El radical hidroxilo es extremadamente reactivo y puede oxidar la tirosina formando un radical de tirosilo ($\text{Tyr}^\bullet$):



Luego, el radical $\text{NO}_2^\bullet$ se acopla al radical de tirosilo para formar 3-nitrotirosina:

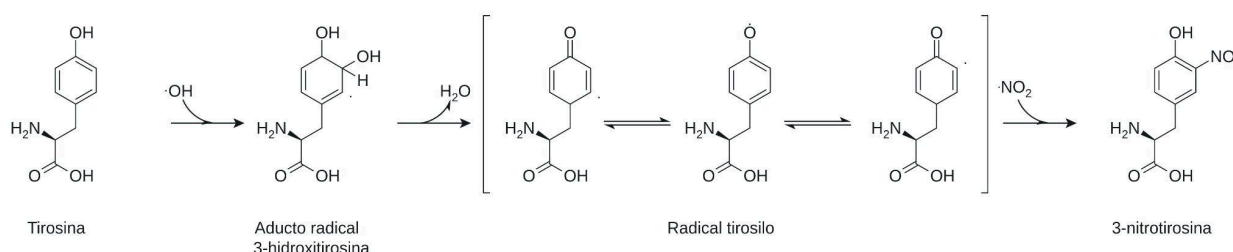
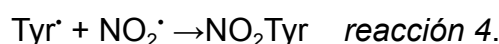


Figura 4: Formación de 3-nitrotirosina dependiente de radicales libres. Se muestran los pasos de reacción involucrados en la formación de 3-nitrotirosina a partir de radicales libres provenientes del peroxinitrito.

Por otro lado, las hemoperoxidasas como la mieloperoxidasa (MPO) y la eosinofiloperoxidasa (EPO) son enzimas que utilizan peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para oxidar sustratos. En una primera reacción, la hemoperoxidasa en su estado férrico (MPO-Fe^{3+}) reacciona con H_2O_2 para generar el complejo oxoférrico (MPO-Compound I) y agua:



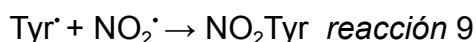
A continuación, el compuesto I, que es un oxidante fuerte, puede oxidar al nitrito por un electrón para formar radical dióxido de nitrógeno.



Este radical puede llevar a la nitración de tirosinas debido a que puede tanto, oxidar a la tirosina a radical tirosilo, como luego reaccionar con el radical tirosilo para formar 3-nitrotirosina.



Alternativamente, las hemoperoxidasas pueden oxidar la tirosina a un radical de tirosilo (Tyr•), que luego reacciona con el radical NO₂• para formar 3-nitrotirosina:



En ambos casos, el proceso puede resumirse en dos etapas principales: primero, la oxidación de la tirosina a un radical fenólico, y luego el acoplamiento de este con un radical dióxido de nitrógeno. La nitración ocurre típicamente en la posición orto del anillo aromático con respecto al grupo hidroxilo, generando 3-nitrotirosina como producto final^{26,40}.

En determinadas condiciones, la formación de 3-nitrotirosina puede verse limitada debido a la competencia de reacciones que involucran a las especies radicalarias, lo que reduce la eficiencia de la nitración directa. En este contexto, se ha propuesto una vía alternativa en la cual la tirosina puede sufrir primero una adición de un grupo nitroso en el anillo fenólico, dando lugar a la formación de 3-nitrosotirosina. Esta modificación, puede posteriormente oxidarse y dar lugar a la formación de 3-nitrotirosina²⁶.

1.2.4 Propiedades de la 3-nitrotirosina y consecuencias biológicas de su nitración

La incorporación de un grupo nitro en la posición 3 del anillo fenólico de la tirosina altera significativamente sus propiedades fisicoquímicas. Uno de los cambios más importantes es la disminución del pKa del grupo hidroxilo fenólico, que pasa de aproximadamente 10.1 en la tirosina nativa a valores de entre 7.2 y 7.5 en la 3-nitrotirosina. Esto implica que cerca del 50% de estas moléculas se encuentran ionizadas a pH fisiológico, modificando su comportamiento ácido-base y su carga neta en condiciones biológicas. Este cambio en la ionización también impacta sobre su solubilidad: mientras que en su forma no cargada la 3-nitrotirosina resulta más hidrofóbica que la tirosina (lo que se traduce en mayor retención en cromatografía reversa), al encontrarse ionizada en medios básicos se vuelve considerablemente más hidrofílica. Además, la nitración provoca un aumento en el volumen de la cadena lateral de aproximadamente 30 Å³, lo que puede generar restricciones estéricas en sitios estructuralmente compactos^{41,42}. Las propiedades espectroscópicas también se ven modificadas, ya que la 3-nitrotirosina presenta un máximo de absorción en torno a

los 357–360 nm en medios ácidos y uno desplazado a 427–430 nm en condiciones alcalinas, confiriéndole un color amarillo característico; además, se observa una disminución de la absorción en 276 nm, típica de los aminoácidos aromáticos⁴². Además, a diferencia de la tirosina, la forma nitrada no fluoresce, lo que favorece su comportamiento como aceptor no fluorescente en estudios de transferencia de energía por resonancia de Förster (FRET por sus siglas en inglés), mientras que su reducción a aminotirosina le confiere fluorescencia con emisiones detectables entre 308 y 350 nm, según el pH⁴².

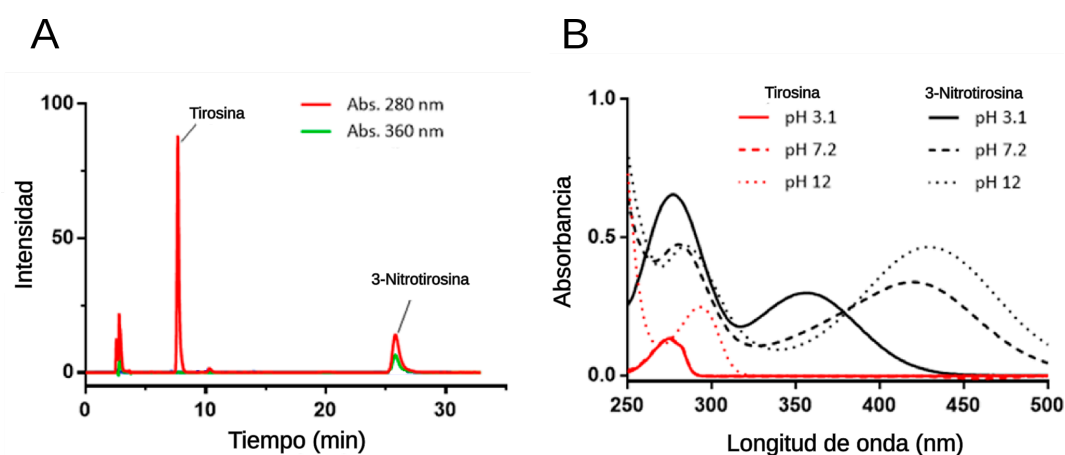


Figura 5: A: Diferencias de tiempo de la HPLC. B: diferencias en las longitudes de onda para la tirosina y la 3-nitrotirosina a distintos pHs. Modificado de Ferrer et al., 2018

Entre las diversas modificaciones oxidativas que pueden experimentar las proteínas, la nitración de residuos aromáticos representa un caso particularmente relevante por su potencial para alterar procesos celulares clave. Este tipo de modificación, que implica la incorporación de un grupo nitro a la tirosina, puede influir tanto en la arquitectura tridimensional como en la actividad biológica de la proteína. Los efectos observados abarcan desde alteraciones drásticas en la función hasta situaciones en las que no se detectan cambios aparentes. Sin embargo, la presencia de nitración no siempre debe interpretarse como la causa directa de la modificación funcional, dado que los agentes nitrantes también reaccionan con otros aminoácidos sensibles a la oxidación, como cisteína o metionina, lo que complica la atribución de los efectos a un único sitio de modificación^{43,44}.

Más allá de sus particularidades fisicoquímicas, la nitración de tirosinas conlleva importantes consecuencias biológicas. Una de ellas es la afectación de su sensibilidad a la degradación proteolítica⁴⁵: la exposición de proteínas aisladas o células en cultivo a

peroxinitrito incrementa su degradación, atribuida a una eliminación más rápida de las proteínas nitradas por el proteasoma⁴⁵⁻⁴⁹. Otro efecto relevante es la interferencia con la fosforilación de la tirosina, proceso clave en la regulación de múltiples vías de señalización celular. Se ha propuesto que el cambio en el pKa del grupo hidroxilo fenólico inducido por la nitración impide su fosforilación, ya que las tirosina quinasas reconocen el grupo hidroxilo neutro y no la forma fenolato cargada negativamente. No obstante, también el impedimento estérico y la distorsión estructural local podrían contribuir a este efecto^{43,50}. Cabe señalar que la relación entre nitración y fosforilación puede ser bidireccional: la fosforilación puede prevenir la nitración, sugiriendo que ambas modificaciones compiten por el mismo residuo; mientras que algunos estudios indican que el propio peroxinitrito podría promover la fosforilación a nivel celular. En conjunto, la interacción entre nitración y fosforilación de tirosina podría actuar como modulador en la señalización, afectando el equilibrio entre fosforilación y desfosforilación mediada por quinasas y fosfatasas^{43,51,52}. Finalmente, entre otras consecuencias posibles a partir de la nitración de tirosinas se encuentra la alteración de funciones mitocondriales críticas como la actividad de la Superóxido Dismutasa de Manganeseo (MnSOD), contribuyendo así a procesos de daño oxidativo e inflamación crónica⁵³⁻⁶⁰.

La nitrotirosina, tanto en su forma libre como unida a proteínas, se ha relacionado con al menos 50 patologías y en más de 80 modelos animales o cultivos celulares⁶¹. Su presencia ha sido documentada en enfermedades cardiovasculares, pulmonares, diabetes y trastornos neurodegenerativos, entre otras patologías^{60,62-72}. En el caso de la superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD), la nitración del residuo catalítico tirosina 34 (Y34) conduce a una pérdida marcada de su actividad antioxidante, lo que impide la detoxificación eficiente del superóxido y exacerba el daño cardiovascular asociado al estrés oxidativo. En el ámbito de las enfermedades neurodegenerativas, la α -sinucleína nitrada se acumula en agregados proteicos característicos de patologías como Parkinson y Alzheimer, sugiriendo un rol directo en la disfunción sináptica y la progresión de estas enfermedades. Por su parte, la nitración de calmodulina modifica de manera significativa su afinidad por la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), alterando la regulación de la producción de óxido nítrico y contribuyendo a la disfunción vascular. Finalmente, la nitración del citocromo c en el residuo Y74 potencia su actividad peroxidasa y bloquea la activación de la caspasa-9, interfiriendo con la

cascada apoptótica y abriendo la posibilidad de que este mecanismo impacte tanto en el desarrollo tumoral como en patologías neurodegenerativas^{73–76}. Estos ejemplos se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1: Ejemplos de nitraciones en distintas proteínas, sus respectivas observaciones y enfermedades o condiciones asociadas.

Proteína	Observaciones clave	Enfermedad o condición asociada
MnSOD	Nitración en residuos de tirosina 34 (Y34) inactiva la enzima antioxidante, aumentando estrés oxidativo	Enfermedades cardiovasculares y daño oxidativo ⁷³
α -Sinucleína	Nitración en Y39 favorece formación de agregados y se asocia con inhibición del proteosoma	Parkinson, Alzheimer ⁷⁴
Calmodulina	Nitración en residuos puede aumentar significativamente la unión a la eNOS, alterando la señalización	Posibles implicaciones en disfunciones vasculares y de señalización ⁷⁵
Citocromo-c	Nitración en Y74 aumenta la actividad peroxidasa y bloquea la activación de caspasa-9, impidiendo la señalización apoptótica	Disrupción del proceso de apoptosis, potencial implicancia en patologías donde la eliminación celular está alterada (cáncer, neurodegeneración) ⁷⁶
Hsp90	Nitración de Y33 y/o Y56 produce una ganancia tóxica en motoneuronas que llevan a su muerte.	Neurodegeneración (muerte de motoneuronas; posibles vínculos con ELA, traumas neuronales)

1.3 Chaperona Hsp90

La respuesta al *shock* térmico fue descubierta en la década de 1960 por el genetista Ferruccio Ritossa, quien observó la aparición de “puffs” cromosómicos (regiones descondensadas del cromosoma asociadas a una intensa actividad transcripcional) en las glándulas salivarias de *Drosophila melanogaster* expuesta a temperaturas elevadas, lo que indicaba una activación transcripcional rápida de determinados genes⁷⁷. Años más tarde, estudios bioquímicos permitieron identificar proteínas específicas inducidas por calor, entre ellas una de aproximadamente 90 kDa que posteriormente recibiría el nombre de Hsp90⁷⁸. En esta nomenclatura, la sigla Hsp

proviene del inglés *Heat Shock Protein*, mientras que el número corresponde de manera aproximada a su masa molecular estimada en kilodaltons (kDa).

La Hsp90 es una chaperona molecular dependiente de ATP cuya función principal es facilitar el plegamiento, la maduración y la estabilización de proteínas cliente, incluyendo quinasas, receptores hormonales y factores de transcripción^{79–81}. La actividad ATPasa de una Hsp90 es central para su mecanismo de acción, y la unión e hidrólisis de ATP impulsa un ciclo conformacional (Fig. 6) que conduce a la activación y maduración de las proteínas cliente. La diversidad estructural de las proteínas cliente de la Hsp90 hace necesario que esta proteína coopere con una variedad de co-chaperonas que modulan y ajustan su actividad y, por ende, su ciclo conformacional⁸².

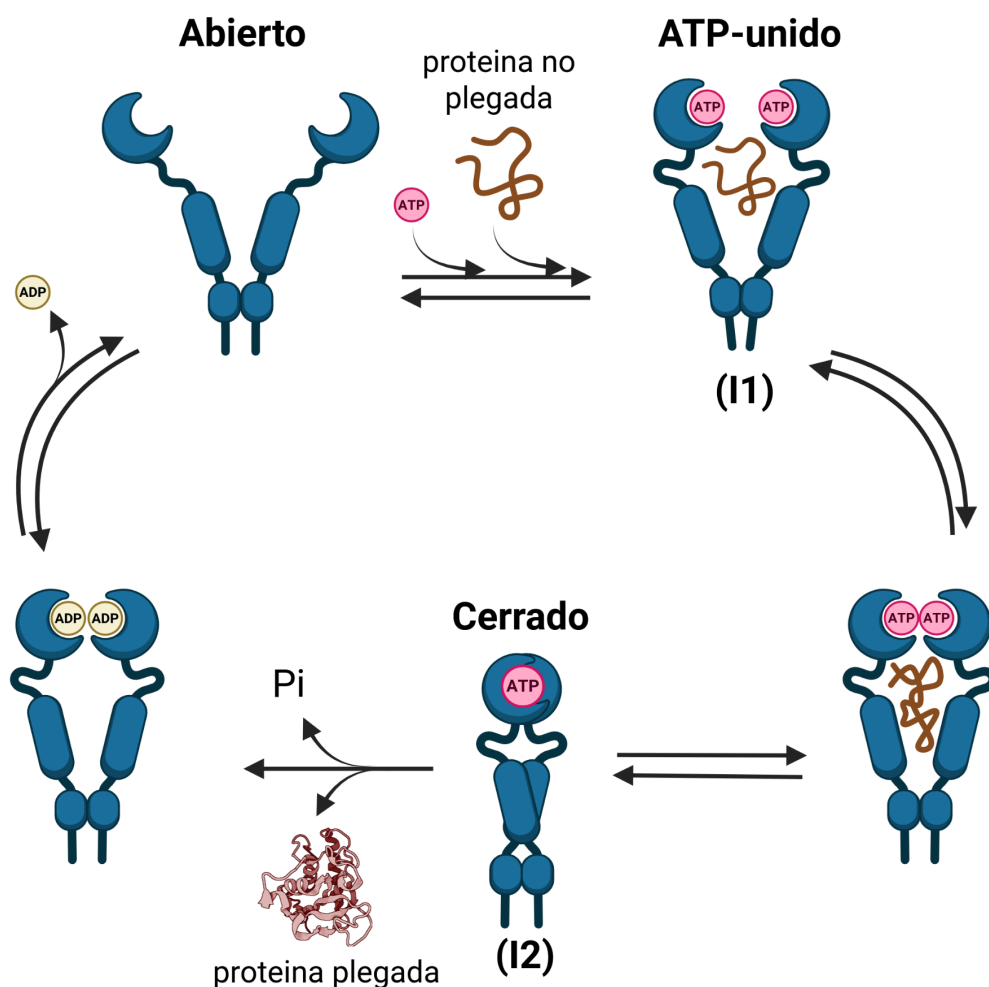


Figura 6: Esquema del ciclo catalítico de la Hsp90.

Más allá de esta función, la Hsp90 es una chaperona molecular muy abundante que también desempeña un papel esencial en numerosos procesos celulares, incluyendo el control del ciclo celular, la supervivencia celular y diversas vías de señalización^{83–88}. Es crucial para la respuesta celular al estrés y juega un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis celular^{80,89–92}. En los últimos 10 años, se ha convertido en un importante objetivo terapéutico en el tratamiento del cáncer⁹³ y ha despertado un creciente interés como diana terapéutica en trastornos neurodegenerativos^{94,95}, así como en el desarrollo de antivirales⁹⁶ y tratamientos contra infecciones por protozoos⁹⁷.

1.3.1 Clasificación

Como se mencionó anteriormente, la familia de proteínas Hsp90 pertenece al grupo de chaperonas con dominio ATPasa característico que catalizan la hidrólisis de ATP en ADP y fosfato inorgánico (clasificada en la base de datos *BRENDA* con el número EC3.6.4.10). Esta actividad es esencial para generar los cambios conformacionales necesarios en el plegado y la maduración de proteínas cliente. Altamente conservada, la familia Hsp90 (código *Pfam* PF00183) se encuentra en organismos de todos los reinos de la vida, excepto en las arqueas^{98,99}. Existen cuatro homólogos de Hsp90 en distintos compartimentos celulares: la Hsp90 citosólica (predominante en eucariotas), la Grp94 en el retículo endoplásmico, TRAP1 en mitocondrias y la Hsp90 de cloroplastos (en plantas), además de HtpG en bacterias. A diferencia de las formas eucariotas, HtpG no es esencial bajo condiciones fisiológicas normales, aunque resulta importante para el crecimiento a altas temperaturas, lo que indica un papel adaptativo frente al estrés^{78,100}. En mamíferos, la isoforma citosólica se presenta como Hsp90α (*HSP90AA1*), inducible por estrés, y Hsp90β (*HSP90AB1*), de expresión constitutiva, las cuales comparten una alta identidad de secuencia pero difieren en su regulación y algunos de sus roles fisiológicos^{101,102}. Estas variantes se diferencian principalmente por su localización subcelular y especialización funcional, tal como se resume en la Tabla 2.

Tabla 2: Diferentes miembros de la familia Heat Shock Protein y su respectiva localización celular.

Organismo	Nombre del gen	Nombre de la proteína	Localización celular
<i>Homo Sapiens</i>	<i>HSP90AA1</i>	Hsp90AA1	Citoplasma
<i>Homo Sapiens</i>	<i>HSP90AA2</i>	Hsp90AA2	Citoplasma
<i>Homo Sapiens</i>	<i>HSP90AB1</i>	Hsp90AB1	Citoplasma
<i>Homo Sapiens</i>	<i>HSP90B1</i>	Hsp90B1; GRP94	Retículo endoplásmico
<i>Homo Sapiens</i>	<i>TRAP1</i>	TRAP1; HSP75	Mitocondria
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>HSP82</i>	ATP-dependent molecular chaperone HSP82	Citoplasma
<i>Escherichia Coli</i>	<i>htpG</i>	HtpG (Hsp90 homóloga, ATPasa)	Citoplasma
<i>Trypanosoma brucei</i>	<i>HSP83</i>	Hsp83 (Hsp90 homóloga)	Citoplasma

1.3.2 Estructura

En condiciones fisiológicas, la Hsp90 es un homodímero, cuya estructura comprende tres dominios principales: el dominio N-terminal (NTD), el dominio medio (MD) y el dominio C-terminal (CTD)^{103–106}. En eucariotas, estos dominios están conectados por una región intermedia cargada y flexible conocida como “linker”, que vincula el NTD con el MD¹⁰⁷. Cada dominio cumple funciones estructurales y funcionales específicas. El NTD contiene el sitio de unión a ATP, el MD participa en la interacción con co-chaperonas y proteínas cliente, y el CTD es responsable de la dimerización de la proteína. Además, en algunas isoformas, el CTD presenta motivos como MEEVD o KDEL, que determinan su localización citoplasmática o en el retículo endoplasmático, respectivamente. Una representación esquemática de la topología y estructura de la Hsp90 se muestra en la Figura 7.

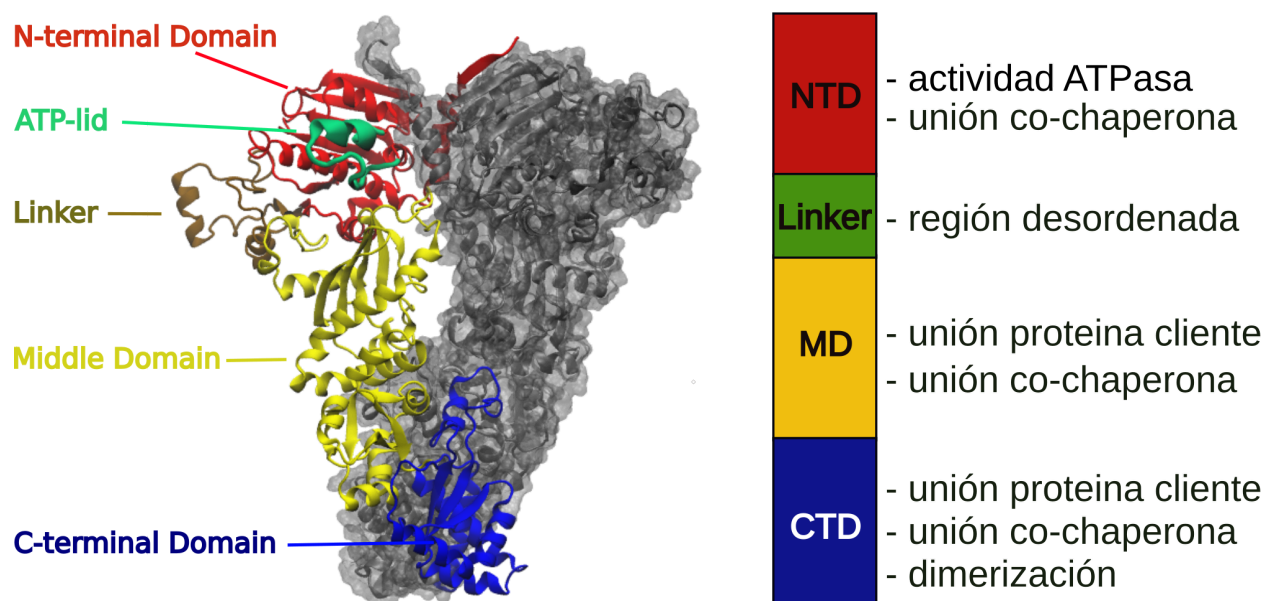


Figura 7: Estructura de dímero de la Hsp90 identificando sus distintos dominios: dominio N-terminal (rojo), región ATP-lid (verde), región linker (marrón), dominio medio (amarillo) y dominio C-terminal (azul). Para cada dominio se describen algunas de las implicancias en las funciones de la chaperona.

El dominio N-terminal de la Hsp90 es crucial para la función de esta chaperona. Este dominio contiene el sitio de unión al ATP^{108,109}, lo cual es esencial para impulsar los cambios conformacionales necesarios para el ciclo funcional del dímero¹¹⁰ (ver Fig. 6). En este sitio de unión se encuentra la región conocida como “ATP-lid” (“tapa de ATP”) (Fig. 8), una región flexible que actúa como una tapa sobre el sitio de unión del ATP. Cuando el ATP se une, el ATP-lid se cierra sobre el nucleótido, lo que facilita los cambios conformacionales necesarios para la actividad ATPasa y la interacción con proteínas cliente. Este mecanismo de apertura y cierre es crucial para el funcionamiento y la regulación de la Hsp90¹¹⁰. De hecho, se ha demostrado que la Hsp90 posee una actividad ATPasa basal propia, mediada por su dominio N-terminal^{108,110}. Además, el dominio N-terminal tiene la capacidad de unirse a co-chaperonas, proteínas desplegadas y pequeños péptidos¹¹¹, facilitando así el correcto plegamiento y estabilización de una amplia gama de proteínas cliente. Cabe señalar que estudios cinéticos han mostrado que el verdadero paso limitante del ciclo ATPasa no es la hidrólisis del ATP, sino los cambios conformacionales asociados a este proceso⁸².

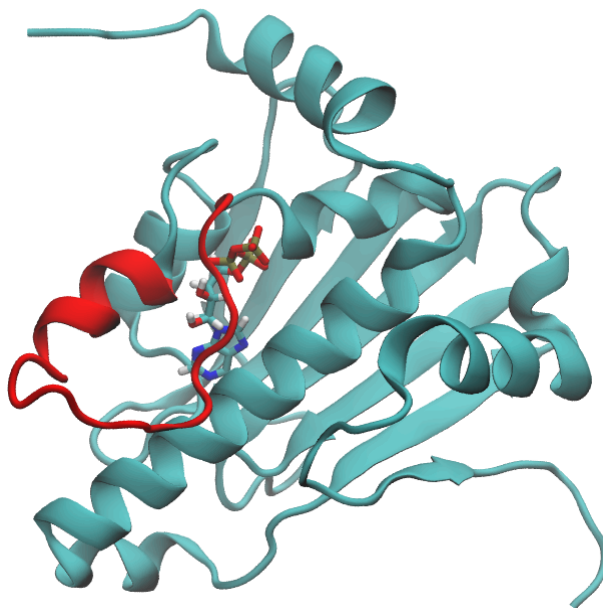


Figura 8: Dominio N-terminal (NTD) de Hsp90 mostrando la región ATP-lid (rojo) y la molécula de ATP.

La región linker es un segmento altamente cargado y flexible que conecta el NTD con el MD. Su longitud y composición varían entre especies e isoformas¹¹². Se ha propuesto que esta región otorga dinamismo estructural, permitiendo adaptarse a la gran variedad de interacciones de Hsp90 en el entorno citoplasmático^{112,113}. Sin embargo, el rol funcional de esta región aún es motivo de debate: algunos estudios la consideran moduladora de la actividad de la chaperona¹¹⁴, mientras que otros le atribuyen un papel más estructural^{102,110}. Además, cabe aclarar que esta región no aparece en los modelos estructurales experimentales debido a que es una región intrínsecamente desordenada. Esto quiere decir que no adopta una conformación secundaria estable en solución, sino que fluctúa en varias conformaciones. Esta flexibilidad o fluctuación hace que no sea posible generar un patrón de difracción en técnicas de cristalografía por ejemplo.

El MD modula la actividad de la Hsp90 mediante la interacción con el fosfato-γ del ATP unido en el NTD, influyendo así en la actividad ATPasa de la proteína¹¹⁶. También se ha demostrado su participación en la unión con co-chaperonas como Aha1 y en la interacción directa con proteínas cliente¹¹⁷.

El CTD contiene el dominio responsable de la homodimerización de Hsp90¹¹⁸ y el motivo MEEVD, fundamental para la interacción con co-chaperonas que poseen

dominios TPR (*tetratricopeptide repeat*). También alberga un sitio de unión a nucleótidos cuya ocupación ocurre después de la del sitio N-terminal, actuando como regulador alostérico de la actividad ATPasa¹¹⁹. A comparación con el sitio N-terminal, el sitio de unión C-terminal presenta menor especificidad por el nucleótido.

1.3.3 Relación estructura-función

Estudios estructurales^{120,121} revelaron que la Hsp90 adopta una serie de conformaciones distintas (Fig. 6). Para establecer un modelo cinético de las reorganizaciones conformacionales en la Hsp90, se emplearon técnicas biofísicas, incluidas la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia en conjunto o a nivel de molécula única (FRET) y la ultracentrifugación analítica (AUC), las cuales permitieron descomponer en detalle las etapas del ciclo ATPasa^{122,123}. En el estado *apo*, la Hsp90 adopta predominantemente una conformación abierta en forma de “V”. La unión de ATP al NTD desencadena el reposicionamiento de un segmento del *ATP-lid* y conduce a la formación del primer estado intermedio (I1)¹²³. Una vez que el ATP se une, este *lid* en el NTD puede cerrarse sobre la entrada del bolsillo de unión al ATP, ayudando así a atrapar al ATP. Este movimiento es posible gracias a dos posiciones flexibles, G103 y G130 (numeración en humanos), en la base del mismo. El *ATP-lid* se estabiliza mediante una serie de enlaces de hidrógeno que interactúan con el grupo fosfato- γ del ATP. La reestructuración del *lid*, a su vez, desestabiliza la hélice α 1 del NTD, ya que normalmente se encuentra empaquetada contra la conformación abierta del *lid*. Esta α -hélice ahora se vuelve móvil y se desplaza junto con la cadena β 1 del dominio N-terminal. En total, los primeros 30 residuos aproximadamente de cada monómero de la Hsp90 se remodelan como parte de un intercambio de hojas β entre los dominios N-terminales que conducen a la N-dimerización.

Aunque el ATP unido ahora está atrapado en el NTD y la proteína ha sufrido una dimerización de sus dominios N-terminales, la hidrólisis del ATP sigue dependiendo de la modulación del lazo catalítico (segmento de residuos conservados del MD que estabiliza la conformación cerrada). Esto implica la asociación de los NTD de la Hsp90 con sus dominios medios. Esto permite que el lazo catalítico de cada dominio medio alcance el sitio activo del NTD de la misma subunidad. Así, el residuo de R392 del lazo catalítico puede ahora interactuar directamente con el fosfato- γ del ATP. La

estabilización de la conformación activa del lazo catalítico se logra mediante un contacto hidrofóbico entre I126 del NTD y L386 del lazo catalítico⁸².

Los cambios estructurales descritos inducen la adopción de un estado cerrado, en el cual los NTD están dimerizados y asociados con los dominios medios. Esta compactación estructural representa el segundo estado intermedio (I2), en el cual el ATP es hidrolizado. La posterior hidrólisis de ATP disipa la energía acumulada, favorece la disociación de los dominios N-terminales y promueve la liberación del cliente, retornando al estado abierto inicial¹²³ (Fig. 6).

1.3.4 Rol de la Hsp90β en la fisiología celular

La Hsp90β (HSP90AB1) constituye la isoforma citosólica constitutiva de Hsp90 en mamíferos y es esencial para la viabilidad celular. A diferencia de Hsp90α (HSP90AA1), que se induce fuertemente en condiciones de estrés, la Hsp90β se expresa de manera estable y sostenida, lo que refleja su función primordial en el mantenimiento de la homeostasis celular¹⁰². La relevancia fisiológica de esta isoforma ha sido demostrada en modelos knockout, donde la eliminación de HSP90AB1 en ratón provoca letalidad embrionaria temprana, poniendo de manifiesto un rol indispensable en el desarrollo¹²⁴.

El repertorio de clientes de la Hsp90β incluye una amplia gama de proteínas críticas para la señalización intracelular, tales como quinasas, factores de transcripción y receptores nucleares. Entre ellos destacan AKT, ERK y NF-κB, ejes centrales de proliferación, crecimiento y control de apoptosis^{102,125}. La interacción con estas rutas suele estar mediada por co-chaperonas especializadas: Cdc37, en el caso de las quinasas; Hop, que facilita la transferencia de proteínas desde Hsp70; y p23, que estabiliza el complejo Hsp90 en su estado unido a ATP. De esta forma, Hsp90β contribuye a asegurar la estabilidad y funcionalidad de proteínas clave en múltiples procesos de señalización^{80,126,127}.

Además de su papel como chaperona constitutiva, la Hsp90β cumple funciones específicas en distintos contextos fisiológicos. Se ha asociado con la diferenciación del trofoblasto y el desarrollo embrionario temprano, donde modula rutas de señalización necesarias para la organogénesis¹²⁴. En tejidos adultos, participa en la regeneración

muscular tras una lesión, regulando la vía de p53 mediante su interacción con la ubiquitina ligasa MDM2, y en la diferenciación de hepatocitos a través de la modulación del factor HNF4 α . Asimismo, regula el metabolismo de la glucosa, ácidos grasos y colesterol, en parte mediante la estabilización y activación de factores de transcripción como SREBP^{128,129}. También se ha descrito su intervención en la respuesta a la vitamina D a través del receptor VDR¹³⁰, así como en el mantenimiento de la unión neuromuscular mediante la estabilización de rapsina, necesaria para la agregación de receptores de acetilcolina¹³¹.

Más allá de estas funciones, la Hsp90 β presenta actividades adicionales que reflejan su plasticidad funcional. En el citoesqueleto, interactúa con actina y tubulina, contribuyendo al ensamblaje y estabilidad de microtúbulos y fibras de actina, lo que refuerza su papel como un “pegamento molecular” transitorio. Cabe destacar que una fracción estimada entre un 5–10% de la proteína se localiza en el núcleo, donde interactúa con nucleolos, histonas y factores de transcripción, modulando procesos de remodelado de cromatina y regulación génica. Incluso se ha descrito que, en determinadas condiciones, puede secretarse al espacio extracelular, participando en migración y cicatrización celular, aunque en este punto la isoforma α está mejor caracterizada¹²⁵.

En conjunto, estas evidencias consolidan a la Hsp90 β como una isoforma indispensable, no solo para el mantenimiento basal de la célula, sino también como un regulador clave en procesos fisiológicos específicos de desarrollo, regeneración, metabolismo y señalización. En este contexto, resulta especialmente pertinente analizar como modificaciones postraduccionales, tales como la nitración de tirosinas, pueden alterar tanto su comportamiento estructural como sus funciones.

1.3.5 Nitración de la Hsp90

Diversos estudios han demostrado que la Hsp90 es blanco de modificaciones postraduccionales que afectan su función, entre ellas, la nitración de residuos de tirosina. Ya en 2007, se demostró que el peroxinitrito induce nitración de Hsp90 en neuronas motoras y células PC12, lo que conduce a la pérdida de su actividad protectora y a la promoción de la apoptosis¹³². Posteriormente, Franco et al. (2013)¹³³ identificaron a la Hsp90 como una de las proteínas más significativamente nitradas en

tejidos neuronales bajo condiciones de estrés oxidativo. Mediante técnicas de inmunoprecipitación y espectrometría de masas, detectaron que la nitración en los residuos Y33 y/o Y56 del NTD de la Hsp90 β era suficiente para inducir una ganancia en la función tóxica: la proteína modificada promovió la muerte celular a través de la activación del receptor purinérgico P2X7 y la vía apoptótica mediada por Fas. A nivel tisular, se observó acumulación de Hsp90 nitrada en médula espinal de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (ELA), así como en modelos animales de ELA y de lesión medular, lo que sugiere una relevancia fisiopatológica de esta modificación en enfermedades neurodegenerativas asociadas al estrés oxidativo. Ampliando estos hallazgos, Franco et al. (2015)¹³⁴ demostraron que en células PC12, una fracción de Hsp90 nitrada se asocia con la membrana mitocondrial externa, afectando negativamente parámetros clave de la función mitocondrial, como el potencial de membrana, el consumo de oxígeno y la producción de ATP. A través de variantes recombinantes con incorporación puntual de un grupo nitrógeno en Y33, evidenciaron que esta única modificación es suficiente para inducir disfunción mitocondrial. Más recientemente, Franco et al. (2024)¹³⁵ describieron un rol adicional de la Hsp90 nitrada como modulador de la inflamación. En particular, la nitración en Y33 e Y56, inducida por peroxinitrito, promueve una ganancia de función en modelos celulares de *Schwannoma*, incrementando la proliferación y reprogramando el metabolismo celular. Estos efectos dependen del residuo nitrado: la modificación en Y33 reduce la respiración mitocondrial y aumenta la fuga de protones, mientras que la nitración en Y56 favorece la glucólisis y activa vías de señalización asociadas a P2X7 (como ya se había observado en el trabajo de Franco et al. 2013).

En conjunto, estos hallazgos posicionan a la Hsp90 nitrada no solo como una proteína disfuncional, sino también como un agente activo en procesos patológicos mediados por estrés oxidativo.

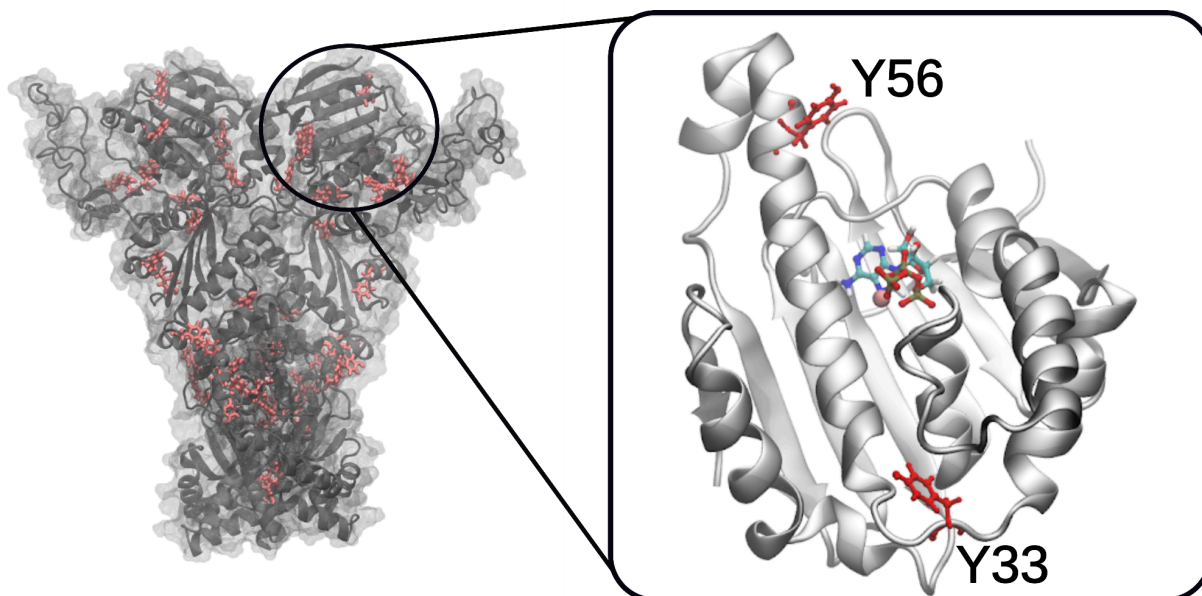


Figura 9: Representación del dímero de Hsp90 con todas las tirosinas resaltadas en rojo (izquierda) y detalle del NTD (derecha) mostrando los residuos de tirosina 33 y 56 resaltados en rojo, junto con la molécula de ATP y Magnesio.

En síntesis, aunque la importancia funcional de la nitración en Y33 y Y56 ha sido demostrada en distintos modelos celulares y animales, no se ha explorado en detalle cómo estas modificaciones alteran la estructura y la dinámica conformacional de Hsp90 ni cómo dichas alteraciones se relacionan con sus consecuencias funcionales.

1.4 Importancia de los abordajes computacionales en la biología estructural

La biología estructural surgió como una disciplina destinada a comprender cómo la organización tridimensional de las macromoléculas determina sus funciones biológicas. Para este fin, se han consolidado dos grandes enfoques experimentales: las técnicas de baja resolución, como por ejemplo dicroísmo circular o fluorescencia, las cuales proporcionan una visión global de la forma, el tamaño y la organización supramolecular, y las técnicas de alta resolución, las cuales permitieron describir la arquitectura molecular con detalle atómico. Las más destacadas son la cristalografía de rayos X, la resonancia magnética nuclear (NMR) y la criomicroscopía electrónica de partículas individuales¹³⁶. En este contexto, las técnicas computacionales surgieron como un complemento indispensable, al posibilitar la exploración de la dinámica de las macromoléculas, la visualización de estados conformacionales transitorios y la

integración de información procedente de diferentes fuentes experimentales. Estas aproximaciones no solo brindan un mayor nivel de detalle, difícil o incluso imposible de alcanzar solamente con experimentos, sino que también permiten evaluar *in silico* el efecto de mutaciones o modificaciones estructurales de forma más accesible¹³⁷.

Los abordajes computacionales de la biología estructural han transformado la manera en que se abordan algunas preguntas fundamentales de la ciencia. Gracias a la combinación de simulaciones y datos experimentales, hoy es posible comprender mecanismos moleculares complejos que antes resultaban inaccesibles. Dentro de este marco general, la biología estructural computacional se subdivide en distintas aproximaciones que permiten abordar la complejidad de las macromoléculas desde diferentes perspectivas. Entre ellas se encuentran los métodos QM/MM (Quantum Mechanics/Molecular Mechanics), métodos híbridos que combinan la mecánica cuántica para describir con alta precisión una región pequeña y crucial del sistema (como un sitio activo) con mecánica molecular clásica para modelar el resto de la proteína y su entorno. Otro grupo de metodologías lo constituyen el *docking*, empleado para caracterizar interacciones proteína–ligando o proteína–proteína; el *threading*, que permite identificar pliegues estructurales más allá de la homología de secuencia; y los métodos de predicción de estructuras, un campo actualmente en plena expansión, impulsado hoy en día por la irrupción de técnicas de inteligencia artificial¹³⁸. Finalmente, la dinámica molecular (DM) constituye una metodología que permite explorar la flexibilidad conformacional y los cambios estructurales de las macromoléculas a lo largo del tiempo. Este enfoque resulta muy importante en el contexto del presente trabajo de tesis, en el cual se hará especial énfasis en su aplicación¹³⁷.

1.5 Objetivos:

Habiendo descrito la estructura, función, relevancia fisiológica e implicación en distintos procesos biológicos de la Hsp90, resulta necesario entender cómo la nitración está afectando los cambios funcionales en esta proteína. Diversos estudios han demostrado que la Hsp90 es susceptible a nitrarse bajo condiciones de estrés oxidativo. La nitración de dos residuos de tirosina de interés ya ha sido previamente asociada con alteraciones funcionales a nivel celular.

En esta tesis nos proponemos dilucidar desde una perspectiva estructural, cómo dicha modificación postraducciona oxidativa puede explicar los cambios observados, centrándonos en estos dos residuos.

1.5.1 Objetivo general

- Estudiar las consecuencias dinámicas y estructurales que surgen a partir de la nitración de determinados residuos de tirosina en la chaperona celular Hsp90.

1.5.2 Objetivos específicos

- Caracterizar el rol de la nitración de tirosinas específicas en la estructura y dinámica de Hsp90.
- Determinar las bases moleculares que subyacen a los cambios funcionales observados en la proteína.

2. METODOLOGÍA

Esta Tesis de Maestría forma parte de un proyecto más amplio desarrollado en colaboración con el equipo de investigadoras de Oregon State University y Florida International University (Dra. Maria Clara Franco y Dra. Tilottama Chatterjee). Dicho grupo llevó adelante el proyecto de Doctorado de Tilottama Chatterjee bajo la dirección de la Dra. María Clara Franco, donde parte de sus resultados experimentales específicos fueron concebidos en forma conjunta y sirvieron de sustrato para el desarrollo y discusión de los estudios bioinformáticos desarrollados en el marco de esta Tesis de Maestría. En este trabajo de Tesis se presentan algunos de esos datos con la debida atribución de autoría, dejando constancia de que fueron realizados y obtenidos por nuestros colaboradores y se incluyen con el propósito de contextualizar y complementar los análisis computacionales aquí desarrollados. El producto de esta colaboración fue recientemente publicado¹³⁹.

2.1 Generalidades acerca de los métodos de modelado y simulación molecular utilizados en esta Tesis

2.1.1 Simulaciones de dinámica molecular

En el marco de la mecánica estadística, un sistema molecular puede encontrarse en una gran cantidad de configuraciones microscópicas o microestados. El objetivo de una simulación de dinámica molecular es muestrear de manera representativa este espacio de configuraciones, de modo que las trayectorias obtenidas permitan describir propiedades macroscópicas del sistema. En mecánica estadística, la probabilidad asociada a cada microestado depende de su energía y de las condiciones termodinámicas fijadas. Esta relación se formaliza mediante la distribución de Boltzmann, que constituye la base del muestreo en dinámica molecular. Esta distribución se puede expresar únicamente en función de las coordenadas espaciales según la ecuación 1.

$$P(x) = \frac{e^{-\beta U(x)}}{Z} \quad \text{ecuación 1}$$

Donde $U(x)$ es la energía potencial de esas configuraciones, β es el inverso de la temperatura por la constante de Boltzmann y Z es la función de partición

configuracional. Esta expresión constituye la base teórica de las simulaciones de dinámica molecular, ya que garantiza que las configuraciones muestreadas reflejen el macroestado termodinámico definido por el ensemble empleado.

Las simulaciones de dinámica molecular (DM) constituyen un método computacional utilizado para describir el movimiento de átomos y moléculas en función del tiempo. Su fundamento radica en la mecánica clásica, donde las fuerzas que actúan sobre cada átomo se obtienen a partir del gradiente de una energía potencial. Esta energía potencial se describe mediante una función analítica que depende únicamente de las coordenadas atómicas, descomponiendo esta energía en distintos términos correspondientes a interacciones de pares entre partículas. A la serie de ecuaciones y parámetros necesarios para su resolución se los denomina campo de fuerza. La forma general de la energía potencial en los campos de fuerza clásicos utilizados usualmente en biomoléculas puede expresarse como:

$$U(x) = \sum_{\text{enlaces}} k_b (l - l_0)^2 + \sum_{\text{ángulos}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{torsiones}} \frac{1}{2} V_n [1 + \cos(n\phi - \gamma)] \\ + \sum \frac{q_{ij}}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} + 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad \text{ecuación 2}$$

Los tres primeros términos corresponden a las interacciones intramoleculares, mientras que el último agrupa las interacciones intermoleculares.^{140,141}

Las interacciones intramoleculares incluyen el estiramiento de enlaces, modelado como un potencial armónico:

$$V_{\text{enlace}} = \frac{1}{2} k_b (r - r_0)^2 \quad \text{ecuación 3}$$

donde k_b es la constante de fuerza del enlace, r es la distancia actual entre los átomos enlazados, y $r - r_0$ es la distancia de equilibrio del enlace; la energía de ángulo, que describe la energía asociada con los ángulos entre tres átomos conectados por dos enlaces y también se suele modelar mediante un potencial armónico:

$$V_{\text{angulo}} = \frac{1}{2} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad \text{ecuación 4}$$

donde k_θ es la constante de fuerza del ángulo, θ es el ángulo actual, y θ_0 es el ángulo de equilibrio; y la energía de torsión, que describe la energía asociada con la torsión alrededor de un enlace y se modela mediante una serie de términos armónicos donde V_n es la barrera de torsión, n es el número de términos, ϕ es el ángulo de torsión, y γ es la fase:

$$V_{torsión} = \sum \frac{1}{2} V_n [1 + \cos(n\phi - \gamma)] \quad \text{ecuación 5}$$

Las interacciones intermoleculares incluyen las fuerzas de Van der Waals, que describen las interacciones atractivas o repulsivas a corta distancia entre átomos o moléculas no enlazados y se suelen modelar mediante un potencial de Lennard-Jones:

$$V_{LJ} = 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad \text{ecuación 6}$$

donde ϵ es la profundidad del pozo potencial, σ es la distancia a la cual la energía es cero, y r es la distancia entre dos átomos; y las interacciones electrostáticas, que describen las fuerzas entre partículas cargadas y se modelan mediante la ley de Coulomb:

$$V_{coulomb} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_1 q_2}{r} \quad \text{ecuación 7}$$

donde q_1 y q_2 son las cargas de los átomos, r es la distancia entre ellos, y ϵ_0 es la permitividad del vacío.

A partir de la energía potencial descrita, se derivan las fuerzas instantáneas que siente cada átomo en una posición dada, las cuales determinarán su evolución temporal en la simulación. Repitiendo de forma iterativa este cálculo de fuerzas e integrando las ecuaciones de movimiento en pequeños *timesteps*, se obtiene una trayectoria y esto nos permite describir la evolución del sistema a lo largo del tiempo. En este contexto, los algoritmos de integración son la herramienta que permite resolver las ecuaciones de movimiento usando las fuerzas obtenidas de la energía potencial. Estas ecuaciones se expresan como $F_i = m_i a_i$, donde F_i es la fuerza sobre la partícula, m_i es la masa y a_i es la aceleración, la cual es la derivada segunda de la posición r_i respecto al tiempo.

Entre los algoritmos de integración más comunes está el algoritmo de Verlet. En este método, la posición de una partícula en el tiempo $t + \Delta t$ se calcula a partir de las posiciones en tiempos t y $t - \Delta t$ mediante la fórmula:

$$r_i(t + \Delta t) = 2r_i(t) - r_i(t - \Delta t) + a_i(t)\Delta t^2 \quad \text{ecuación 8}$$

Aunque no proporciona directamente las velocidades, estas pueden aproximarse si es necesario. Una variante mejorada es el algoritmo de Velocity-Verlet, que también calcula las velocidades. Primero, actualiza las posiciones descritas en la ecuación 8, luego calcula las fuerzas y aceleraciones en el nuevo tiempo, y finalmente, actualiza las velocidades:

$$v_i(t + \Delta t) = v_i(t) + \frac{1}{2}[a_i(t) + a_i(t + \Delta t)]\Delta t \quad \text{ecuación 9}$$

El algoritmo de Leapfrog es otra opción, donde las velocidades y posiciones se actualizan de manera intercalada para mantener la estabilidad y eficiencia del cálculo. Resolver las ecuaciones de Newton mediante estos algoritmos es fundamental para simular correctamente el comportamiento de un sistema en dinámica molecular.

En la práctica, para llevar a cabo una simulación de dinámica molecular se construye una caja de simulación con condiciones periódicas de contorno (PBC), que permiten que una partícula que sale por un lado de la caja reingrese por el lado opuesto, evitando efectos de borde. Posteriormente, el sistema se solvata mediante la adición de moléculas de agua y, en caso necesario, se incorporan iones para neutralizar la carga neta y reproducir condiciones fisiológicas. Estas condiciones de simulación se establecen con el fin de representar un ensemble bien definido. Un ensemble es una colección teórica de un número muy grande de réplicas de un sistema, cada una en un microestado posible compatible con ciertas condiciones termodinámicas. Dependiendo de las variables que se mantengan constantes (energía, volumen, temperatura, presión), se pueden definir distintos ensembles. El Ensemble Microcanónico (NVE) conserva el número de partículas a volumen y energía constantes. El Ensemble Canónico (NVT) mantiene constantes el número de partículas, el volumen y la temperatura. Se implementa acoplando el sistema a un termostato que regula la temperatura (por ejemplo el termostato de Berendsen). Por su parte, el Ensemble Isotérmico–isobárico (NPT) conserva el número de partículas, presión y temperatura,

permitiendo fluctuaciones de volumen. Se implementa mediante la combinación de un termostato y un baróstato (como Parrinello–Rahman o Berendsen).

2.1.2 Métodos derivados de dinámica molecular utilizados

2.1.2.1 Simulaciones a pH constante

En las simulaciones a pH constante, el objetivo es muestrear de manera simultánea las conformaciones del sistema y los estados de protonación de los residuos titulables. Para cada valor de pH simulado, se determina la fracción de tiempo en que un residuo dado se encuentra desprotonado. Esa fracción, f^- , refleja directamente la ocupación relativa de los distintos estados de protonación a lo largo de la trayectoria. Como ejemplo, en la Figura 10 se muestra la variación del pH aplicada a lo largo de una simulación de titulación, donde puede observarse el cambio escalonado en los valores de pH en función del tiempo

Para obtener el pK_a aparente de cada residuo, las fracciones calculadas a distintos pH se ajustan a una función despejada de Henderson–Hasselbalch:

$$f^- = \frac{1}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad \text{ecuación 10}$$

que describe la transición sigmoideal entre las formas protonada y desprotonada. En este ajuste, el único parámetro libre es el pK_a , definido como el valor de pH en el cual el residuo está 50% protonado y 50% desprotonado. De este modo, las simulaciones permiten conectar el comportamiento dinámico y estructural de la biomolécula con sus propiedades de titulación ácido–base.

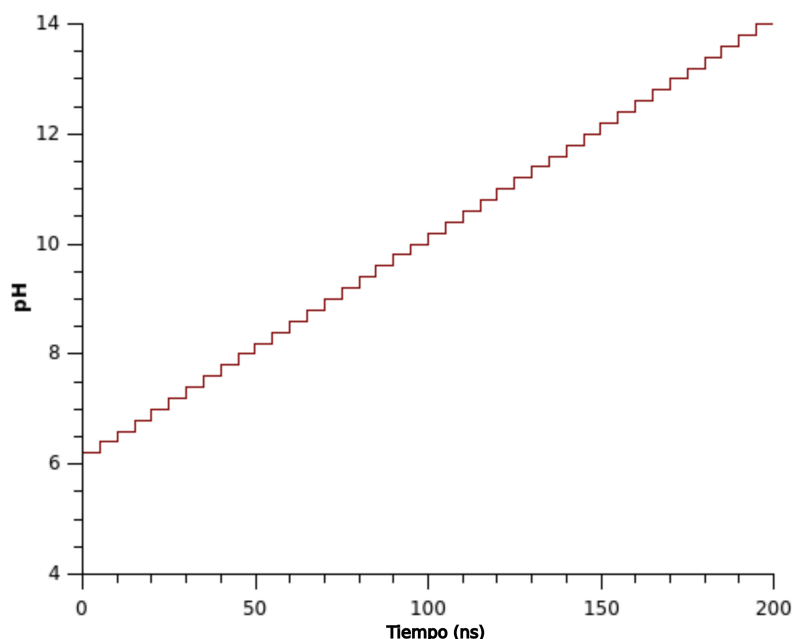


Figura 10: Ejemplo de variación del pH a lo largo de la simulación

2.1.2.2 Estimación de energía de unión: MM-GBSA

La estimación de energías de unión a partir de simulaciones de dinámica molecular puede abordarse mediante diferentes metodologías. Entre los enfoques más utilizados se encuentran los métodos de energía libre alostérica (alchemical free energy methods, como FEP o TI), que permiten estimaciones muy precisas pero requieren un esfuerzo computacional considerable, y los métodos de energía libre de punto final (endpoint methods), dentro de los cuales se destacan MM-PBSA y MM-GBSA, ampliamente empleados por su equilibrio entre precisión y eficiencia^{142–144}.

El método de Mecánica Molecular con Solvatación Implícita y Área de Superficie Generalizada (MM-GBSA, por sus siglas en inglés) combina la energía potencial clásica obtenida del campo de fuerza (mecánica molecular, MM) con un modelo implícito de solvatación (Generalized Born, GB) y un término proporcional al área de superficie (Surface Area, SA) accesible al solvente. El cálculo se realiza sobre un conjunto de estructuras representativas extraídas de las trayectorias de dinámica molecular, permitiendo evaluar de manera aproximada la estabilidad relativa de complejos proteína-ligando y los efectos de modificaciones específicas en el entorno molecular.

En términos formales, la energía libre de unión se define como:

$$\Delta G_{unión} = G_{complejo\ proteína-ligando} - G_{proteína} - G_{ligando}$$

donde cada término G se descompone en:

$$G = E_{MM} + G_{solv} - TS$$

donde E_{MM} es la energía de mecánica molecular (que involucra términos de van der Waals y electrostáticos). Mientras que G_{solv} representa la energía de solvatación, calculada mediante el modelo Generalized Born (GB) para la contribución polar y el término de superficie (SA) para la contribución no polar. Por otro lado TS representa la contribución entrópica, que en este trabajo no se consideró debido a su elevado costo computacional y alta variabilidad en la estimación (opcional, dependiendo del caso).

El método MM-GBSA se emplea de manera extendida en estudios de dinámica molecular por su balance entre costo computacional y capacidad predictiva, y ha mostrado correlaciones razonables con datos experimentales en distintos sistemas de proteína-ligando^{145,146}.

2.1.3 Frustración molecular: principios y utilidades

El concepto de frustración en proteínas proviene de la física de sistemas complejos y hace referencia al grado en que las interacciones locales dentro de una macromolécula entran en conflicto con el estado conformacional globalmente más favorable. En términos simples, una proteína está “frustrada” cuando no todas sus interacciones internas pueden optimizarse de manera simultánea.

En la teoría del plegamiento proteico, se postula que las proteínas nativas se organizan en un paisaje energético en forma de embudo (*energy funnel*), donde la mayoría de las interacciones cooperan para guiar la secuencia hacia una conformación estable y funcional. Sin embargo, este paisaje no es perfectamente liso: contiene valles y barreras locales generados por interacciones subóptimas. Dichas irregularidades constituyen la frustración residual.

La frustración puede analizarse en dos niveles. A nivel global, el principio de mínima frustración establece que el plegamiento eficiente requiere una gran brecha energética entre el estado nativo y configuraciones mal plegadas, en relación con la dispersión de energías:

$$\frac{\Delta E}{\sigma} \gg 1 \quad \text{ecuación 11}$$

Donde $\Delta E = E_{mal \text{ plegada}} - E_{nativa}$ y σ el desvío estándar de energías de estados alternativos^{147,148}. Un valor elevado de este cociente asegura un paisaje energético con forma de embudo, característico de un plegamiento robusto y cooperativo. A nivel local, la frustración se cuantifica mediante un índice F_i , definido como un z-score que compara la energía de la interacción nativa con la de configuraciones alternativas (decoys):

$$F_i = \frac{E_0 - \langle E_u \rangle}{\sigma_u} \quad \text{ecuación 12}$$

donde E_0 es la energía de la interacción nativa, $\langle E_u \rangle$ el promedio de las energías alternativas y σ_u su desvío estándar. En este contexto, los *decoys* corresponden a configuraciones alternativas generadas *in silico*, ya sean interacciones no nativas o mutaciones en los residuos involucrados, que se utilizan como referencia estadística para evaluar la interacción nativa¹⁴⁹:

$$F_{i \text{ rel}} = \frac{E_0 - \mu_{\text{decoys}}}{\sigma_{\text{decoys}}} \quad \text{ecuación 13}$$

Este índice permite clasificar interacciones en tres categorías: mínimamente frustradas ($F_{i \text{ rel}} > 1$), donde la interacción contribuye de manera robusta a la estabilidad global; neutra ($-1 \leq F_{i \text{ rel}} \leq 1$), donde la interacción no está claramente favorecida ni desfavorecida; y altamente frustradas ($F_{i \text{ rel}} < -1$), donde la interacción compite con configuraciones alternativas y suele asociarse a sitios funcionales o regiones dinámicas. Además de la definición general del índice de frustración local, el análisis puede desglosarse en dos variantes principales^{149,150}: La frustración de contacto (F_{ij}^c), evalúa la interacción nativa entre un par de residuos i,j en comparación con un conjunto de configuraciones alternativas (*decoys*).

$$F_{ij}^c = \frac{E_{ij}^N - \langle E_{ij'}^U \rangle}{\sqrt{\frac{1}{N} \sum_{k=1}^n (E_{ij'}^U - \langle E_{ij'}^U \rangle)^2}} \quad \text{ecuación 14}$$

Por su parte, la frustración mutacional (F_{ij}^m), evalúa el cambio en la energía de interacción al sustituir *in silico* los residuos en la posición i,j , comparando la interacción nativa con la distribución de interacciones posibles tras mutaciones.

$$F_{ij}^m = \frac{E_{ij}^{T,N} - \langle E_{ij'}^{T,U} \rangle}{\sqrt{\frac{1}{N} \sum_{k=1}^n (E_{ij'}^{T,U} - \langle E_{ij'}^{T,U} \rangle)^2}}$$

ecuación 15

Todas estas métricas están implementadas en herramientas computacionales como *Frustratometer*, un paquete de R que automatiza su cálculo y visualización¹⁵⁰. Esto permite mapear la distribución espacial de la frustración en proteínas, facilitando la identificación de regiones críticas para la flexibilidad estructural, la interacción con ligandos y la regulación alostérica. *Frustratometer* no constituye un método independiente, sino un paquete de R que implementa las métricas de frustración desarrolladas previamente por Ferreiro y colaboradores¹⁵¹. Su función principal es automatizar el cálculo y la visualización de frustración local, facilitando la aplicación práctica de los conceptos introducidos por Ferreiro, Parra y colaboradores^{149,150}.

2.2 Aspectos específicos sobre los protocolos de modelado y simulación computacional utilizados en esta Tesis.

2.2.1 Descripción de los sistemas moleculares simulados

Como punto de partida, se realizaron simulaciones del NTD de la Hsp90β humana. Para el sistema con el *ATP-lid* en conformación abierta, el modelo inicial se generó a partir de la estructura cristalográfica PDB ID: 5UCJ, eliminando el inhibidor presente. El ATP se colocó en el sitio activo mediante alineamiento con la estructura cristalográfica PDB ID: 3T0Z. En el caso del NTD con el *lid* en conformación cerrada, el modelo se obtuvo recortando el NTD a partir del modelo del dímero descrito a continuación.

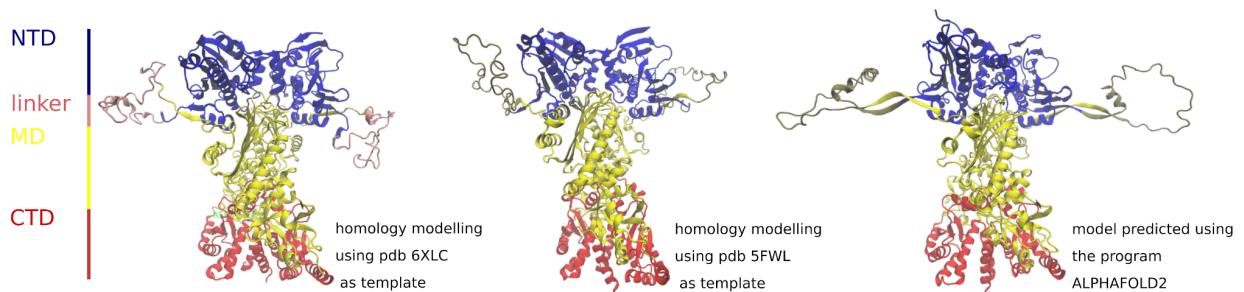


Figura 11: Modelos estructurales del homodímero de la Hsp90β generados por enfoques distintos

Para estudiar la dinámica del homodímero Hsp90 β , el modelo inicial se generó a partir de tres estrategias diferentes, dada la ausencia de una estructura completa determinada experimentalmente. En primer lugar, se construyeron dos modelos por homología utilizando como plantillas la estructura del complejo humano Hsp90–Cdc37–Cdk4 (PDB ID: 5FWK) y la estructura de Hsp90 β de levadura (PDB ID: 6XLC); como tercera aproximación, se obtuvo un modelo mediante AlphaFold2^{152,153}. Cada uno de estos tres modelos se sometió a simulaciones de 200 ns. Dado que el comportamiento dinámico observado no presentó diferencias significativas entre ellos, el análisis completo se llevó a cabo sobre el modelo basado en la estructura del complejo humano (PDB ID: 5FWK). En todos los casos (tanto en el dímero como en el NTD), las propiedades dinámicas de los sistemas se evaluaron y compararon en presencia o ausencia de la nitración en las tirosinas Y33 y/o Y56, considerando además ambos posibles estados de protonación y la presencia o ausencia de ligando. Una descripción detallada de los sistemas simulados se presenta en las Tablas 4 y 5. En resumen, en esta Tesis se corrieron y analizaron más de 25 microsegundos de dinámica molecular de sistemas con diverso número de átomos y características.

Tabla 4: Sistemas del NTD de Hsp90 β con el ATP-lid en conformación abierta: condición de ligando (apo/ATP/ADP) y tiempo de simulación.

Modelo inicial (PDB ids)	Estado de Y33/Y56	Nucleótido	Tiempo total simulado (ns)
5UCJ	Nativo	apo	1000
5UCJ	Nativo	ATP	1000
5UCJ	Nativo	ADP	1000
5UCJ	³³ Y-NO ₂ (OH)	apo	1000
5UCJ	³³ Y-NO ₂ (OH)	ATP	1000
5UCJ	³³ Y-NO ₂ (O ⁻)	apo	1000
5UCJ	³³ Y-NO ₂ (O ⁻)	ATP	1000
5UCJ	⁵⁶ Y-NO ₂ (OH)	apo	1000
5UCJ	⁵⁶ Y-NO ₂ (OH)	ATP	1000
5UCJ	⁵⁶ Y-NO ₂ (O ⁻)	apo	1000
5UCJ	⁵⁶ Y-NO ₂ (O ⁻)	ATP	1000

Tabla 5: Sistemas del Dímero de Hsp90β: condición de ligando (apo/ATP/ADP) y tiempo de simulación.

Modelo inicial (PDB ids)	Sistema	Nucleótido	Tiempo (ns)
5FWK	Nativo	apo	1000
5FWK	Nativo	ATP	1000
5FWK	Nativo	ADP	1000
5FWK	$^{33}\text{Y-NO}_2\text{ (OH)}$	apo	1000
5FWK	$^{33}\text{Y-NO}_2\text{ (OH)}$	ATP	1000
5FWK	$^{33}\text{Y-NO}_2\text{ (O}^-\text{)}$	apo	1000
5FWK	$^{33}\text{Y-NO}_2\text{ (O}^-\text{)}$	ATP	1000
5FWK	$^{56}\text{Y-NO}_2\text{ (OH)}$	apo	1000
5FWK	$^{56}\text{Y-NO}_2\text{ (OH)}$	ATP	1000
5FWK	$^{56}\text{Y-NO}_2\text{ (O}^-\text{)}$	apo	1000
5FWK	$^{56}\text{Y-NO}_2\text{ (O}^-\text{)}$	ATP	1000
5FWK	$^{33-56}\text{Y-NO}_2\text{ (O}^-\text{)}$	ATP	2000

2.2.2 Simulaciones de dinámica molecular convencional

Para las DMs, cada uno de los sistemas descritos se analizó en solvente explícito siguiendo protocolos estándar. Los sistemas se incorporaron en una caja de agua octaédrica TIP3P, manteniendo una distancia mínima de 12 Å al borde en los sistemas Hsp90-NTD y de 10 Å en los homodímeros. Los parámetros de la proteína se generaron utilizando el campo de fuerza *Amber ff14SB*, mientras que los parámetros para el ATP y el ADP¹⁵⁴, o la 3-nitrotirosina, tanto en estados protonados como desprotonados¹⁵⁵, fueron tomados de desarrollos previos. Todas las simulaciones se llevaron a cabo con AMBER 18, bajo condiciones de contorno periódicas y un radio de corte de 10 Å para las interacciones no enlazadas. Las longitudes de los enlaces de hidrógeno se mantuvieron restringidas en su valor de equilibrio mediante el algoritmo SHAKE, mientras que la temperatura (300 K) y la presión (1 atm) se controlaron utilizando un termostato de Langevin y un barostato isotérmico-isobárico (NPT). Tras

un proceso de minimización energética (1000 pasos hasta alcanzar convergencia), se realizó un protocolo de equilibración y termalización para llevar los sistemas a 300 K en 25 ps. Finalmente, se efectuaron las simulaciones de dinámica molecular de producción con distintos tiempos de simulación por sistema (ver Tablas 4 y 5) sumando en total 24 μ s de simulación entre todos los sistemas. La visualización de trayectorias y la preparación de figuras se realizaron con el programa VMD.

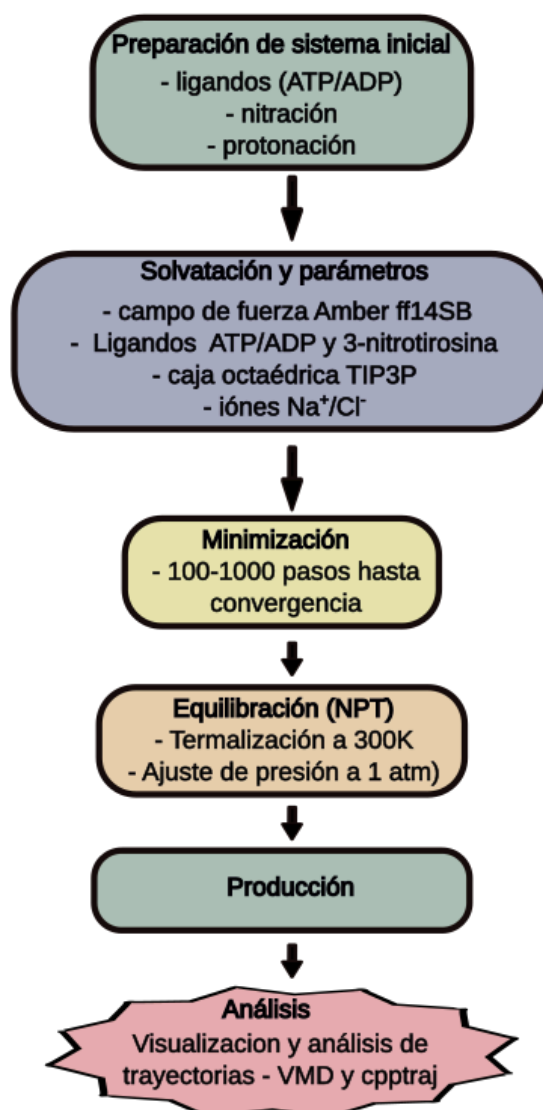


Figura 12: Esquema del flujo de trabajo empleado en las simulaciones de dinámica molecular

2.2.3 Titulación de aminoácidos mediante simulaciones a pH constante

Para obtener una buena predicción del pKa de las tirosinas 33 y 56 de la Hsp90 se realizaron titulaciones a pH constante, *pHtMD* (del inglés pH-titration molecular

dynamics)¹⁵⁶. Esta metodología permite evaluar de forma simultánea el estado de protonación de los residuos de interés y el muestreo conformacional de la proteína, lo que proporciona valores de pKa más representativos. Para ello, se llevó a cabo una única simulación a pH constante de varios cientos de nanosegundos, en la que el valor del pH se fue modificando progresivamente. Siguiendo este flujo de trabajo, cada unidad de pH correspondió a 50 ns de simulación total.

El protocolo aplicado consistió en asignar a la proteína el campo de fuerza *constph*, equivalente al *ff99SB* con las modificaciones necesarias para residuos titulables, y preparar la estructura siguiendo lo descrito en la Sección 2.2.1. A continuación, se realizó una simulación inicial de 5 ns a pH constante, durante la cual se relajó el solvente y se evaluó el estado de protonación de los residuos cada 0,2 ns. Posteriormente, el pH se incrementó en pasos de 0,2 unidades en un rango de 6 a 14, repitiendo el mismo procedimiento de forma iterativa hasta completar la titulación. Una vez obtenida la fracción de tiempo en la que cada residuo permaneció desprotonado, los datos se ajustaron a la ecuación de Henderson–Hasselbalch (ecuación 10; véase Sección 2.1.2.1), de la que se obtuvo el pK_a aparente como único parámetro libre.

Para las titulaciones realizadas en la Hsp90 abierta o cerrada, se tomó como estructura de partida la cristalográfica PDB ID: 5FWK, utilizando el dímero completo para representar la conformación cerrada y el dominio NTD aislado para la conformación abierta.

2.2.4 Estimación de energía de unión del ATP.

Los cálculos de energía libre de unión mediante MM-GBSA se realizaron con el módulo MMPBSA.py de AmberTools. A partir de las trayectorias de 1000 ns (2000 *frames* en total), se seleccionaron 20 estructuras representativas (snapshots) espaciadas cada 50 ns. Para la evaluación de la contribución de solvatación se utilizó el modelo implícito GB-OBC (*igb* = 2), con una fuerza iónica de 0,15 M. El sistema se particionó en receptor y ligando mediante máscaras de selección, y se llevó a cabo una descomposición energética por residuo para identificar las contribuciones individuales a la unión del ATP.

2.2.5 Análisis de la relevancia de la relación estructura función por aminoácido utilizando el concepto de frustración.

La frustración energética local se cuantificó con *FrustratometeR*¹⁵¹, que implementa el índice F_i como *z-score* entre la energía nativa de cada contacto y la distribución de energías alternativas (*decoys*) (ecuación 12)¹⁴⁹. Se emplearon los umbrales por defecto del paquete para clasificar contactos como mínimamente frustrados, neutros o altamente frustrados¹⁵⁰.

El análisis se realizó sobre el dímero completo de Hsp90 (PDB ID: 5UCJ), considerando diferentes estados conformacionales (dímero abierto y cerrado) y condiciones de nitración de las tirosinas (nativa; Y33 nitrada protonada/deprotonada; Y56 nitrada protonada/deprotonada). Para el análisis dinámico se partió de una trayectoria de 1000 ns (2000 *frames*) y se efectuó un submuestreo a 200 *frames*, exportados con *CPPTRAJ* (*trajout frame_ pdb multi*) y procesados como archivos de entrada para los análisis.

En primer lugar, se calcularon mapas de frustración configuracional y los perfiles de F_i por residuo. Estos mapas muestran, para cada residuo, la proporción de contactos dentro de un radio de 5 Å clasificados en las distintas categorías de frustración. De este modo, se obtiene un retrato espacial de la distribución de frustración local en toda la proteína.

La sensibilidad local de Y33 y/o Y56 se evaluó mediante mutagénesis *in silico*. En este análisis cada residuo se reemplaza por otras identidades posibles y se recalculan las energías de interacción, lo que permite estimar cómo cambia la categoría de frustración de los contactos vecinos al residuo mutado. Así, es posible si la identidad de Y33 o Y56 condiciona la estabilidad relativa de su entorno local y, en consecuencia, su potencial rol funcional. Además, el análisis incluyó la comparación de cada residuo en conformaciones abiertas y cerradas, con el fin de evaluar si el impacto de Y33 o Y56 sobre sus vecinos dependen del estado conformacional de la proteína.

Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis dinámico tanto para Y33 como para Y56 y sus distintas conformaciones, utilizando los 200 *frames* ordenados temporalmente de cada una de las dinámicas. Como el paquete no provee medidas resumidas (e.g., medianas), las trayectorias se representaron frame a frame. Para cada residuo se

calcularon las proporciones de contactos dentro de un radio de 5 Å, clasificadas según su categoría de frustración (mínimamente, neutra o altamente frustrada), lo que permitió seguir la evolución temporal de la frustración local en torno a Y33 o Y56.

3. RESULTADOS

En esta sección se presentarán los resultados obtenidos divididos en tres partes distintas. En primer lugar se describen los resultados más generales, analizando el entorno estructural de las tirosinas de interés, sin considerar aún su nitración. En la segunda parte se detallan los cambios estructurales y funcionales derivados de la nitración de Y33 (NY33), presentando tanto los resultados computacionales obtenidos, como los resultados experimentales realizados por nuestros colaboradores. Finalmente, la tercera parte se centra en los cambios observados a partir de la nitración en Y56 (NY56), siguiendo una estructura de análisis similar.

3.1 Dinámica conformacional del *ATP-lid* en la enzima nativa

Con el objetivo de organizar el análisis estructural en orden creciente de complejidad y de reducir los costos computacionales al inicio, se decidió comenzar las simulaciones utilizando el dominio N-terminal (NTD) aislado (Ver Fig. 7 y 9). Es importante señalar que el NTD puede adoptar distintas conformaciones según la conformación del *ATP-lid* (región dinámica que abarca los aminoácidos 103–130), el cual puede encontrarse tanto en una conformación abierta como cerrada, atravesando además una serie de estados intermedios. Diversos estudios han demostrado que esta región desempeña un papel central en la dinámica de unión y liberación de nucleótidos, actuando como una compuerta estructural que regula el acceso al sitio de unión ATP^{157,158}. En este contexto, el análisis inicial del NTD permitió estudiar de manera más directa y controlada la dinámica intrínseca del *ATP-lid*, aislándolo del resto de los dominios y simplificando el sistema. Se comparó el comportamiento del NTD a partir de modelos iniciales presentando el *ATP-lid* en conformaciones abiertas o cerradas. Este análisis pretende evaluar de forma simplificada las propiedades dinámicas del NTD en el contexto del dímero de la Hsp90 en su estado abierto, conformación que adopta durante su ciclo catalítico (ver Fig. 6).

3.1.1 Análisis de la información estructural disponible

Con el objetivo de conocer el contexto estructural de la Hsp90, se comenzó realizando una búsqueda exhaustiva de las distintas estructuras cristalográficas depositadas en el

Protein Data Bank (PDB). En una primera instancia, esta búsqueda se centró solamente en el NTD aislado, por las razones ya mencionadas previamente.

Para ello, se recopilaron todas las estructuras disponibles correspondientes a la Hsp90 humana, y obtenidas a diferentes resoluciones de difracción. A continuación se detallan algunas de esas estructuras, indicando su resolución, método experimental y el identificador de PDB en la Tabla 6.

De las dos estructuras resueltas por NMR incluidas en la tabla (PDB ID: 8B7J y 8B7I), una corresponde a la conformación del *ATP-lid* en estado abierto y la otra a una conformación cerrada. Cada una de estas entradas fue depositada como un ensemble de 20 modelos estructurales, los cuales reflejan la variabilidad conformacional permitida por los datos experimentales de NMR.

Solapando los distintos modelos de ensembles asociados al *ATP-lid* abierto por un lado, y los ensembles correspondientes al *ATP-lid* cerrado por el otro, se observó que las conformaciones abiertas presentan una menor variabilidad estructural en comparación con aquellas en estado cerrado (Fig. 13). Además, un estudio de Loison y colaboradores observaron que la conformación abierta y cerrada no son equivalentes en términos de estabilidad¹⁵⁹. De hecho el estado abierto del *ATP-lid* es termodinámicamente más favorable, mientras que el estado cerrado representa un pozo local de energía. Esto explica por qué el *lid* puede cerrarse transitoriamente, pero la proteína tiende espontáneamente a volver al estado abierto.

Tabla 6: Listado de estructuras cristalográficas analizadas del dominio NTD de la Hsp90 humana.

PDB ID	Método experimental	Resolución (Å)	Observaciones	Referencias
6N8Y	Difracción de rayos X	1.55	Complejo con inhibidor purínico KFY.	Huck et al. (2019) ¹⁶⁰
1UYM	Difracción de rayos X	2.45	Complejo con inhibidor purínico PU3.	Wright et al. (2004) ¹⁶¹
3NMQ	Difracción de rayos X	2.2	Complejo con inhibidor sintético EC144.	Yun et al. (2011) ¹⁶²
6N8W	Difracción de rayos X	3.1	Estructura apo del NTD.	Huck et al. (2019) ¹⁶⁰
3T0Z	Difracción de rayos X	2.19	Complejo con ATP.	Li et al. (2012) ¹²³
5UCJ	Difracción de rayos X	1.7	Complejo con inhibidor Hsp90β-selectivo.	Khandelwal et al. (2018) ¹⁶³
8B7J	NMR	-	Ensemble NMR; estructura apo del NTD, estado abierto del <i>ATP-lid</i> .	Henot et al. (2022) ¹⁵⁹
8B7I	NMR	-	Ensemble NMR; estructura apo del NTD, estado cerrado del <i>ATP-lid</i> .	Henot et al. (2022) ¹⁵⁹

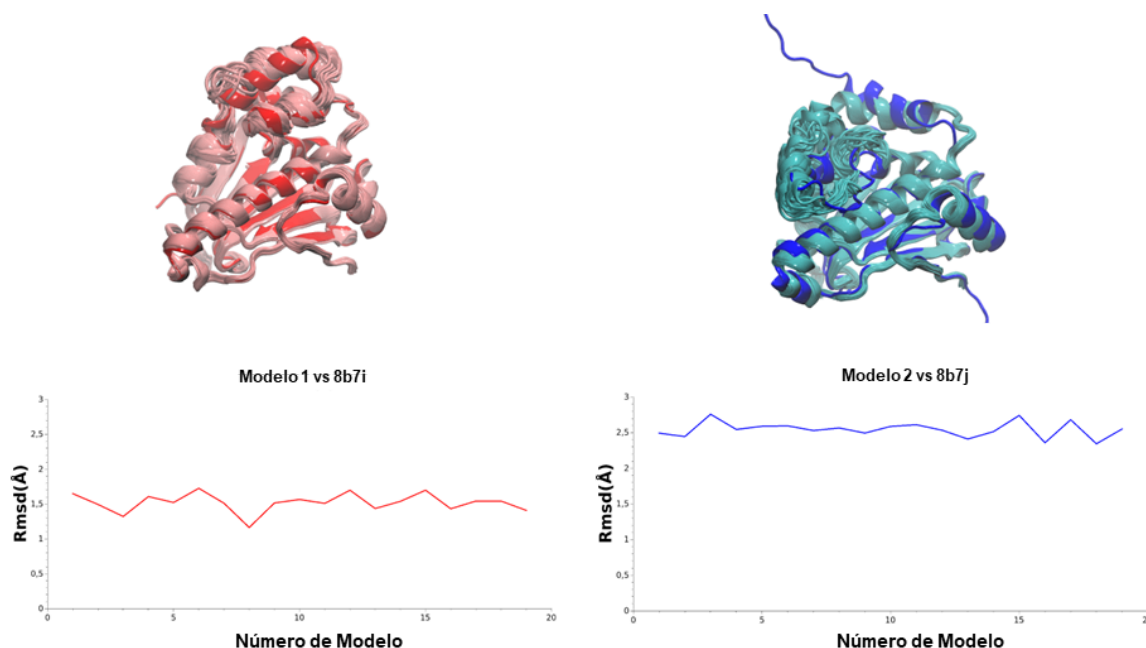


Figura 13: Superposición de estructuras representativas del dominio N-terminal de Hsp90α con el ATP-lid en conformación abierta (rojo) y cerrada (azul). En la parte superior se observan las estructuras obtenidas del PDB solapadas, mientras que en la parte inferior se muestran los valores de RMSD calculados respecto a una estructura de referencia. Se aprecia una menor desviación estructural entre las conformaciones con el ATP-lid abierto en comparación con las cerradas, indicando una mayor variabilidad estructural en el estado cerrado.

3.1.2 Comparación estructural y dinámica de los modelos *ATP-lid* abierto vs cerrado

La comparación dinámica de los modelos del NTD con el *ATP-lid* abierto o cerrado, se realizó a partir del análisis de trayectorias de dinámica molecular que utilizaron a los PDBids 5UCJ y 5FWK como estructuras de partida, respectivamente, en presencia o ausencias de ATP. Un aspecto interesante a tener en cuenta de esta variabilidad conformacional es que, cuando el *ATP-lid* se encuentra en estado abierto, interacciona principalmente con la Y33, mientras que en la conformación cerrada lo hace con la Y56 (Fig. 14).

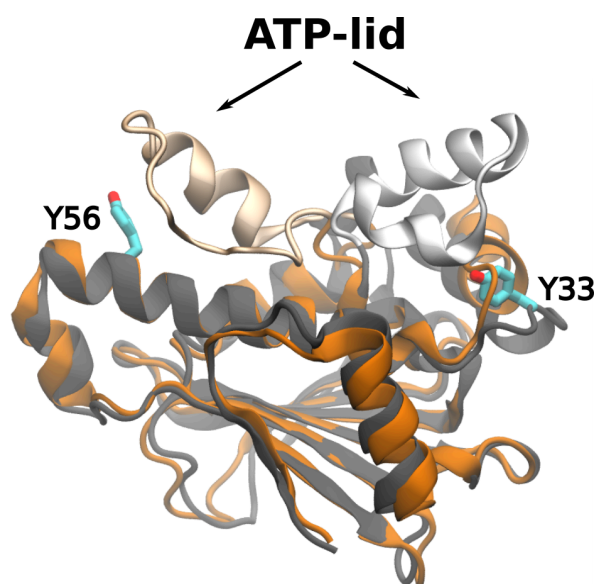


Figura 14: Solapamiento de las estructuras del NTD donde se observa la diferencia conformacional en las regiones del ATP-lid (PDBid: 5UCJ, 5FWK).

En el caso del NTD con el ATP-lid en conformación abierta, la Y33 se encuentra más enterrada dentro de la proteína, interaccionando incluso con algunos residuos de la región del ATP-lid. En contraste, la Y56 se halla expuesta al solvente, sin ninguna interacción con otras regiones de la proteína. Por otro lado, cuando el ATP-lid se encuentra en conformación cerrada, quien interacciona con el ATP-lid pasa a ser Y56, disminuyendo así su exposición al solvente (Fig. 15).

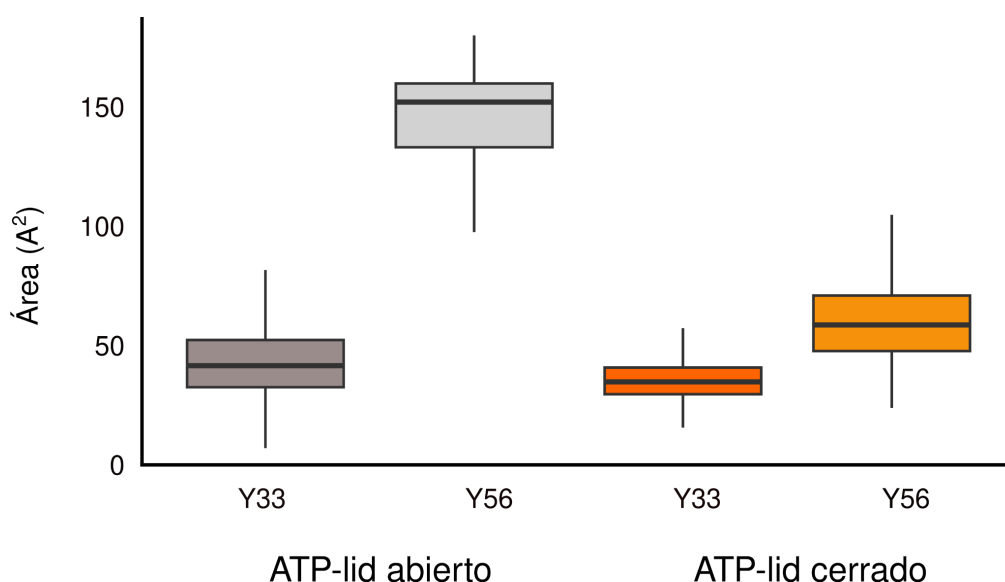


Figura 15: Comparación del grado de exposición al solvente de las tirosinas Y33 y Y56 en el dominio N-terminal de Hsp90 en conformación con el ATP-lid abierto (gris) y con el ATP-lid cerrado (naranja). Se presentan los valores de área superficial accesible al solvente (SASA),

Se calcularon los RMSFs para el *ATP-lid* tanto en su conformación abierta como cerrada, comparando el sistema con ATP frente al sistema sin ligando. En el caso de el NTD con el *ATP-lid* en conformación abierta se observó una pequeña disminución en la flexibilidad del *lid* en presencia de ATP, dando a entender que la unión del ligando le confiere mayor estabilidad estructural a esta región. Mientras que en el caso del NTD con el *ATP-lid* en conformación cerrada, se observó una mucho mayor flexibilidad del *ATP-lid* en la proteína sin ligando con respecto al NTD unido a ATP (Fig. 16).

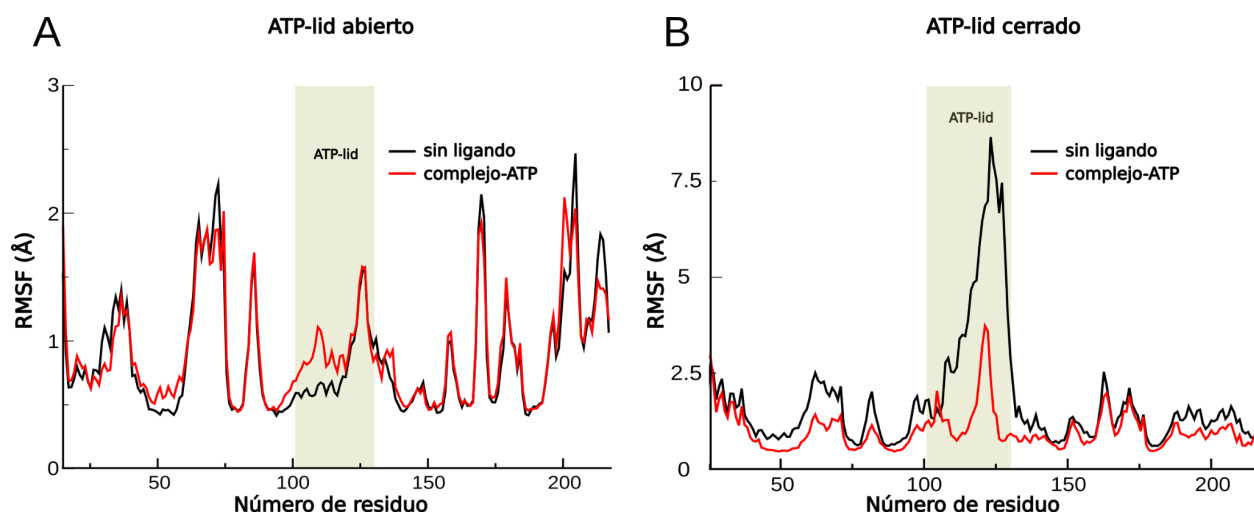


Figura 16: (A) Fluctuación cuadrática media por residuo (RMSF) del dominio N-terminal (NTD) con el *ATP-lid* en conformación abierta (A), o con el *ATP-lid* en conformación cerrada (B), comparando el sistema sin ligando (negro) y el sistema con ATP unido (rojo).

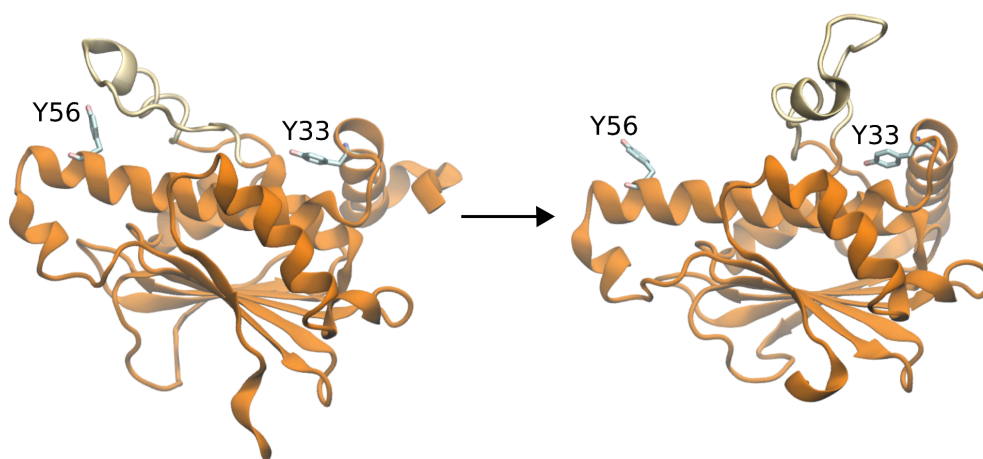


Figura 17: Conformación del *ATP-lid* del dominio N-terminal (NTD) de Hsp90 al inicio (izquierda) y al final (derecha) de la simulación de 2 μ s. Se observa que, en el sistema apo, el *ATP-lid* inicialmente cerrado tiende a desplazarse hacia una conformación más abierta

De hecho, durante una simulación extendida de 2 microsegundos, el sistema apo no solo mostró una gran flexibilidad en el *ATP-lid*, sino que además se observó una leve

tendencia de dicha región a desplazarse hacia la conformación abierta, lo que sugiere una inestabilidad intrínseca del estado cerrado en ausencia de ATP (Fig. 16-17), en concordancia con lo reportado por Loison y colaboradores mencionado anteriormente¹⁵⁹.

Con el fin de explorar la sensibilidad local de los residuos de tirosina a partir de la sustitución por otros aminoácidos, se realizó un análisis de frustración mutacional. Esta herramienta permite evaluar cómo la sustitución de un residuo de interés, por los 20 aminoácidos canónicos, modifica el patrón de frustración con sus contactos locales. Así, en esta clase de análisis se puede observar como mutaciones resaltadas en verde determinarían una estabilización de la interacción entre los pares analizados, mientras que aquellas en rojo indican mutaciones que implicarían una interacción más frustrada. El análisis se realizó para Y33 o Y56, tanto para el NTD con el *ATP-lid* en conformación abierta como cerrada. La comparación entre Y33 o Y56 reveló diferencias en la respuesta mutacional frente a los cambios conformacionales del dímero (Fig. 18).

En el caso de Y33, la conformación con el *ATP-lid* cerrado presenta varias mutaciones que resultan en alta frustración (color rojo), especialmente hacia I38, lo que sugiere que estas interacciones son críticas para la estabilidad local. Al cambiar a la conformación *ATP-lid* abierta, se observa que las interacciones con I38 pasan a ser mínimamente frustradas, indicando que ciertas mutaciones en Y33 mejoran la interacción local con este residuo. Además, en esta conformación aparecen nuevos contactos con residuos del *lid*, tales como D122 e I123. En particular, D122 muestra un comportamiento interesante, ya que la tirosina nativa (Y33) aparece como altamente frustrada, mientras que varias mutaciones disminuyen los niveles de esta frustración.

Por otro lado, en el caso de Y56, la conformación con el *ATP-lid* cerrado muestra un alto nivel de frustración al mutar los contactos de S58 y L59, lo que indica que mutar Y56 afecta negativamente estas interacciones. Además, hay mutaciones que afectan negativamente su interacción con I123, residuo perteneciente al *ATP-lid*, subrayando la relevancia de esta región sobre la Y56 en esta configuración. En contraste, en la conformación con el *ATP-lid* abierto, Y56 presenta un alto nivel de frustración en los contactos con D52, S58, L59 y T60. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, debido a la ubicación de Y56 en el contexto del *lid* abierto, no se establecen contactos directos con residuos del *ATP-lid*.

En términos generales, tanto para Y33 como para Y56, la transición del estado abierto al cerrado del dímero implicó una reorganización significativa de sus contactos locales, lo que se refleja en los cambios en los niveles de frustración y en los residuos que interactúan con estas tirosinas.

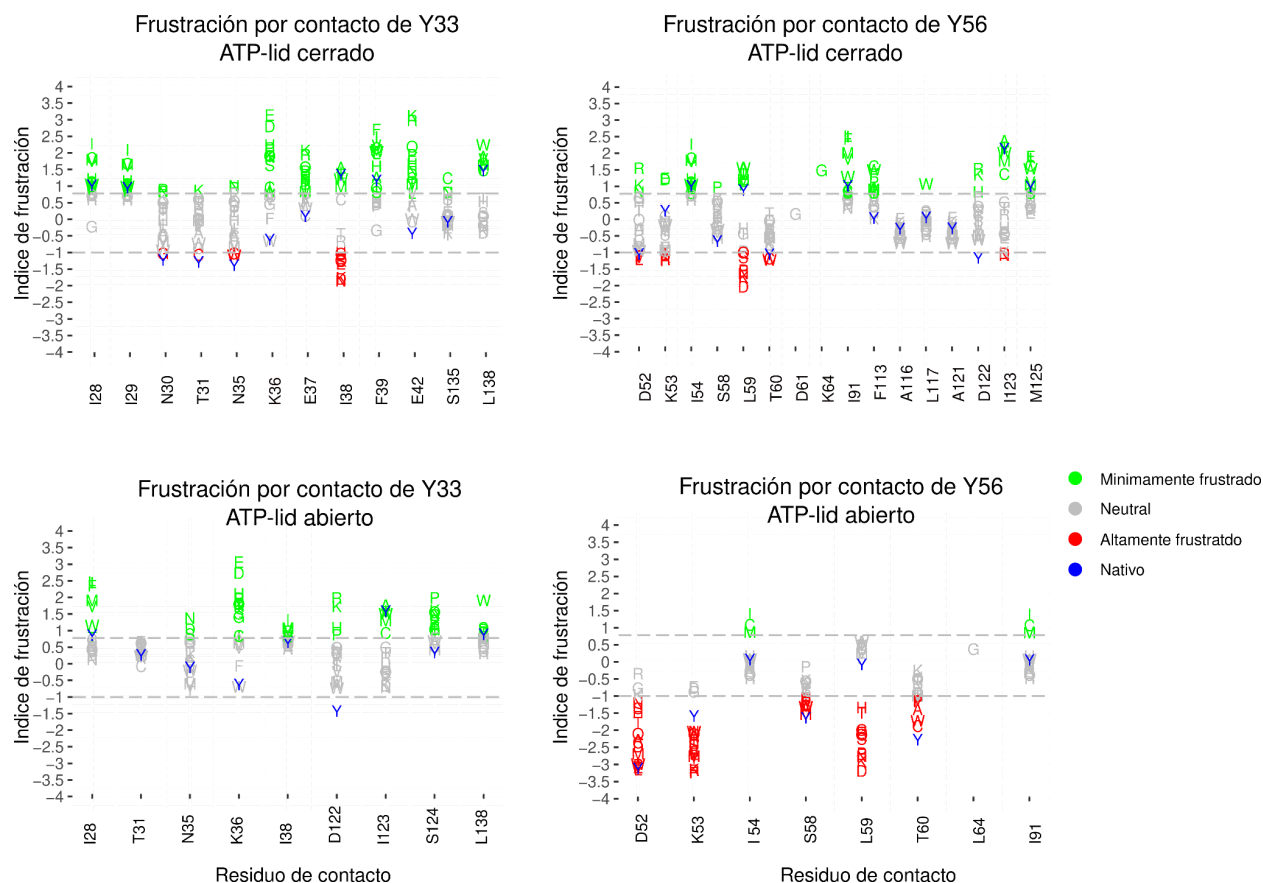


Figura 18: Frustración por contacto de los residuos Y33 e Y56 en las conformaciones cerrada y abierta del ATP-lid. Se muestran los índices de frustración resultantes de mutaciones individuales en Y33 (izquierda) e Y56 (derecha), para los 20 residuos de aminoácidos canónicos. Los valores de frustración están clasificados como: mínimamente frustrado (verde), neutral (gris), altamente frustrado (rojo), y el estado nativo del residuo (azul).

3.1.3 Conclusiones

En conjunto, la dinámica del *ATP-lid* está modulada por distintos factores, entre ellos la presencia o ausencia de nucleótidos. Nuestros resultados indican que, en ausencia de ATP, esta región presenta un aumento en su flexibilidad, y que además este aumento es más marcado cuando el *ATP-lid* está en conformación cerrada. Esta evidencia sugiere una mayor tendencia a la apertura del *ATP-lid* en ausencia de ATP, en concordancia con lo descrito por Loison y colaboradores¹⁵⁹.

Por otro lado, dependiendo del estado conformacional, el *ATP-lid* puede interactuar con los residuos de tirosina 33 o 56, de especial importancia para esta Tesis, ya que sugiere que una eventual modificación (como la nitración) en estas tirosinas podría afectar la dinámica local de esta región, y potencialmente, la entrada y salida de nucleótidos. Además, los resultados sugieren que varios aminoácidos del *ATP-lid* serían sensibles a modificaciones en estas tirosinas, resaltando la relevancia estructural de estas posiciones. El impacto de la nitración en estos residuos de tirosina sobre la dinámica del *ATP-lid* es motivo de discusión de las siguientes secciones de resultados.

3.2 Impacto de la nitración de Y33 en la estructura y actividad de la enzima.

3.2.1 Evaluación del entorno de Y33 en el contexto del dímero de la Hsp90.

Además de las diferencias conformacionales asociadas al estado del *ATP-lid*, la apertura global del dímero también contribuye significativamente a la reorganización estructural de la Hsp90. Esta apertura modifica el entorno local de residuos de Y33. En la conformación abierta, Y33 se encuentra orientado hacia el exterior y no establece interacciones directas con la cadena del protómero opuesto, lo que le confiere un entorno más polar y accesible al solvente (Fig. 19A). En contraste, en la conformación cerrada del dímero, Y33 se ubica en una interfaz más compacta, donde puede quedar parcialmente enterrado y en proximidad con residuos de la cadena complementaria. El análisis de SASA para Y33 (Fig. 19C) confirma esta hipótesis. La distribución de área accesible es significativamente mayor en la conformación abierta (media $\approx 35.3 \text{ \AA}^2$) en comparación con la cerrada (media $\approx 23.9 \text{ \AA}^2$). Esta diferencia también tiene un impacto en el pKa, el cual reveló diferencias marcadas entre ambas conformaciones. En la conformación abierta, Y33 presenta un valor de pKa ≈ 11.6 , mientras que en la conformación cerrada el residuo no alcanza a desprotonarse en el rango de pH analizado, indicando un pKa mayor a 14. Este resultado sugiere que el entorno menos accesible al solvente en la conformación cerrada, estabiliza la forma protonada del residuo.

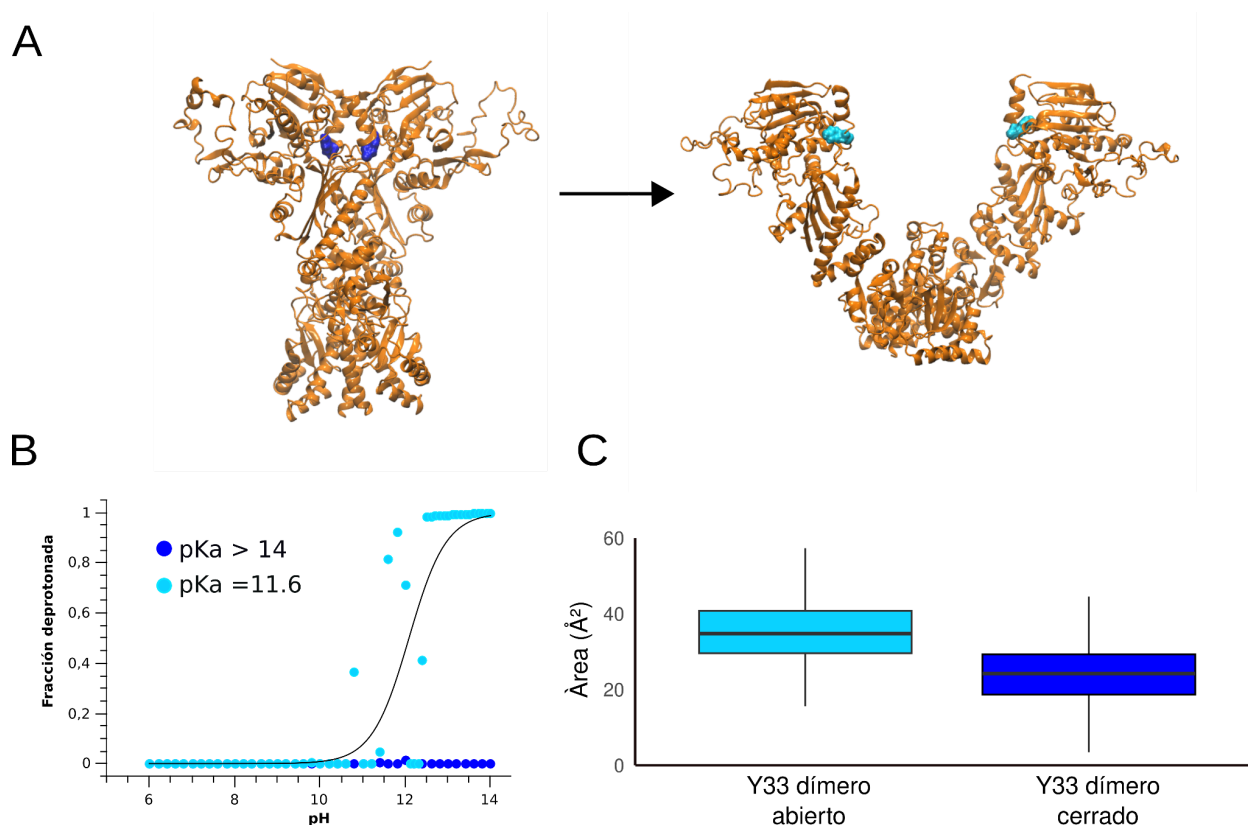


Figura 19: (A) Representación estructural de las conformaciones abierta y cerrada del dímero de Hsp90, con el residuo Y33 resaltado en celeste (abierto) y azul (cerrada). (B) Curva de titulación para Y33 en la conformación abierta del dímero (celeste) y cerrada (azul). (C) Superficie accesible al solvente (SASA) de Y33 en las conformaciones de dímero abierto (celeste) y cerrado (azul).

3.2.2 Resultados experimentales obtenidos en el modelo Y33 mono-nitrada.

Como se mencionó en la Metodología, el grupo de nuestra colaboradora Dra. Maria Clara Franco (Florida International University, EEUU), tiene la capacidad de producir y purificar proteoformas de la Hsp90 humana mono-nitradas en las tirosinas 33 y 56 mediante la técnica de nitración co-traducciona. Esta herramienta, previamente puesta a punto y validada^{133,164}, nos permitió diseñar y llevar a cabo experimentos bioquímicos y biofísicos con las distintas proteoformas de relevancia para esta Tesis. Es así que a continuación se presentan y discuten resultados de dicroísmo circular, ultracentrifugación analítica y medidas de las distintas actividades enzimáticas, obtenidas para las distintas versiones (nativa y mono-nitradas) de la proteína.

La nitración específica de la Y33 provocó alteraciones notorias tanto en la estructura secundaria como en la cuaternaria de la Hsp90. El análisis mediante dicroísmo circular (CD) en la región del lejano ultravioleta reveló una disminución marcada en la

absorbancia a 195 nm y una reducción en la separación entre los mínimos característicos a 202 y 222 nm, indicando una pérdida de contenido α -helicoidal y una mayor proporción de estructura β en la proteína nitrada (Fig. 20A). A nivel cuaternario, los ensayos de ultracentrifugación analítica (AUC) confirmaron la coexistencia de múltiples especies oligoméricas tras la nitración en Y33. Además del dímero característico (~ 5.6 S), se detectaron picos adicionales a 4.1 S y 14.1 S, correspondientes a una fracción monomérica inestable y a oligómeros de mayor orden, respectivamente (Fig. 20B). La presencia simultánea de estas poblaciones sugiere que la nitración en Y33 desestabiliza el dímero nativo, favoreciendo la formación de agregados. En conjunto, los resultados de CD y AUC demuestran que la modificación en Y33 altera tanto la organización de la estructura secundaria como la cuaternaria de la Hsp90.

Asimismo, la nitración sitio-específica en Y33, produjo una disminución del 60 % en la actividad ATPasa aproximadamente con respecto a la proteína nativa. En cambio, la actividad *holdasa* evaluada a través de la capacidad de Hsp90 para proteger a la citrato sintasa de la agregación, no se vio afectada por la nitración en Y33. La Hsp90 nitrada en Y33 conservó la misma eficiencia que la proteína no modificada en la prevención de la agregación en condiciones de shock térmico (Fig. 20D). Esto sugiere que, si bien la nitración en Y33 compromete la función dependiente de ATP, no altera la capacidad de la chaperona para mantener proteínas parcialmente desplegadas en estado soluble, posiblemente debido a que la interacción con el sustrato estabiliza el dímero nativo y contrarresta la desestabilización estructural inducida por la nitración.

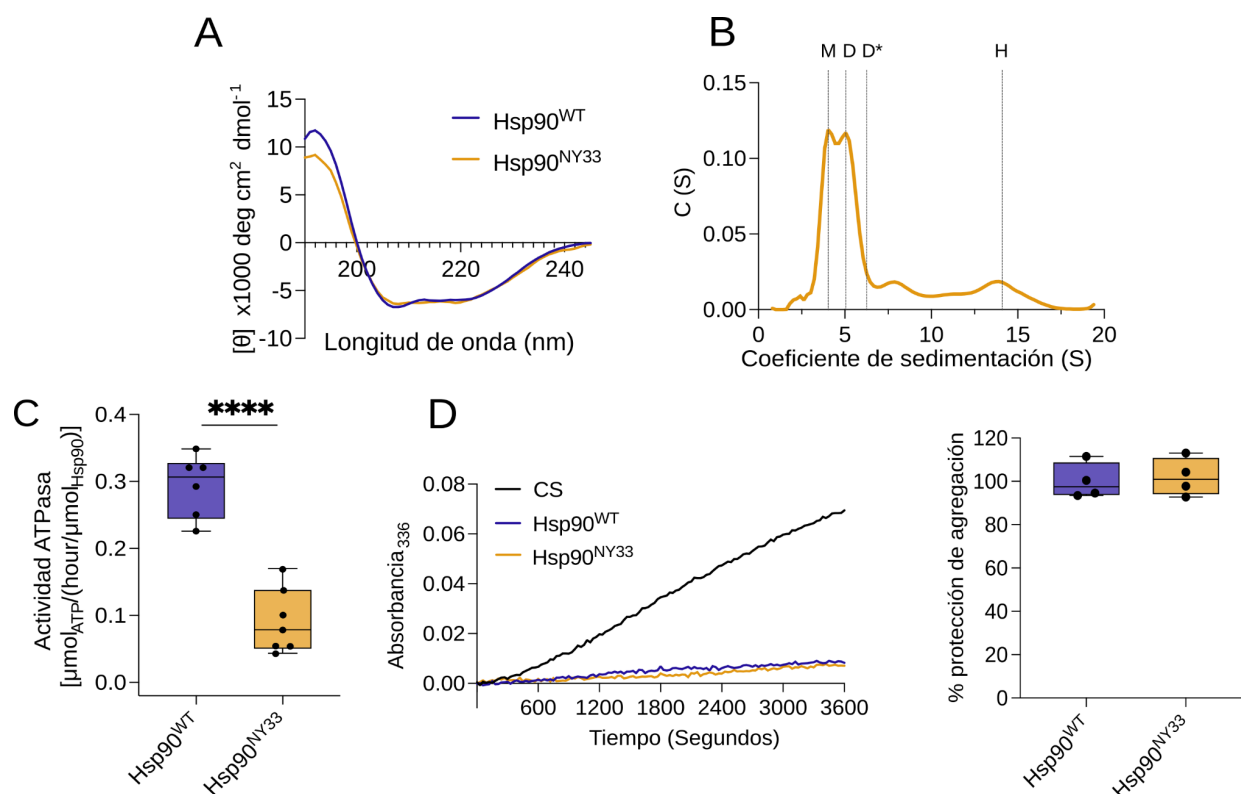


Figura 20: (A) Cambios en la estructura secundaria de Hsp90 tras la incorporación sitio-específica de nitrotirosina en la posición 33 (Hsp90^{NY33}), analizados mediante dicroísmo circular. (B) Perfil de coeficiente de sedimentación obtenido por ultracentrifugación analítica (AUC) para Hsp90^{NY33}, mostrando picos correspondientes al monómero (M), dímero (D), dímero en conformación más cerrada (D*) y una población oligomérica (H). (C) Actividad ATPasa de Hsp90^{WT} y Hsp90^{NY33}, mostrando una disminución significativa (~60 %) en la proteína nitrada. (D) Ensayo de actividad holdasa mostrando la prevención de la agregación térmica de citrato sintasa (CS).

3.2.3 La nitración en Y33 promueve cambios estructurales y energéticos a nivel de la unión de nucleótidos en un modelo del dímero cerrado.

Con un mayor nivel de detalle molecular, a partir de simulaciones de dinámica clásica, se observó que durante las primeras etapas de las mismas Y33 interacciona con R392, un residuo ubicado en el dominio medio, y que dicha interacción se fortalecía particularmente cuando Y33 se encontraba nitrada en su forma desprotonada (Fig. 21A). R392 es un residuo conservado (Fig. 22) que interacciona con el ATP, siendo crítico para la estabilización de la conformación cerrada y necesario para la hidrólisis del ATP^{165,166}. Se observó que la forma nitrada y desprotonada de Y33 (NY33O⁻) atraía a R392, alejándolo de la molécula de ATP (Fig. 21B), desestabilizando así la interacción R392–ATP. En conjunto, estos resultados sugieren que la nitración en Y33

podría contribuir a la disminución en la actividad ATPasa, ya observada tras la nitración de dicha tirosina en los resultados experimentales.

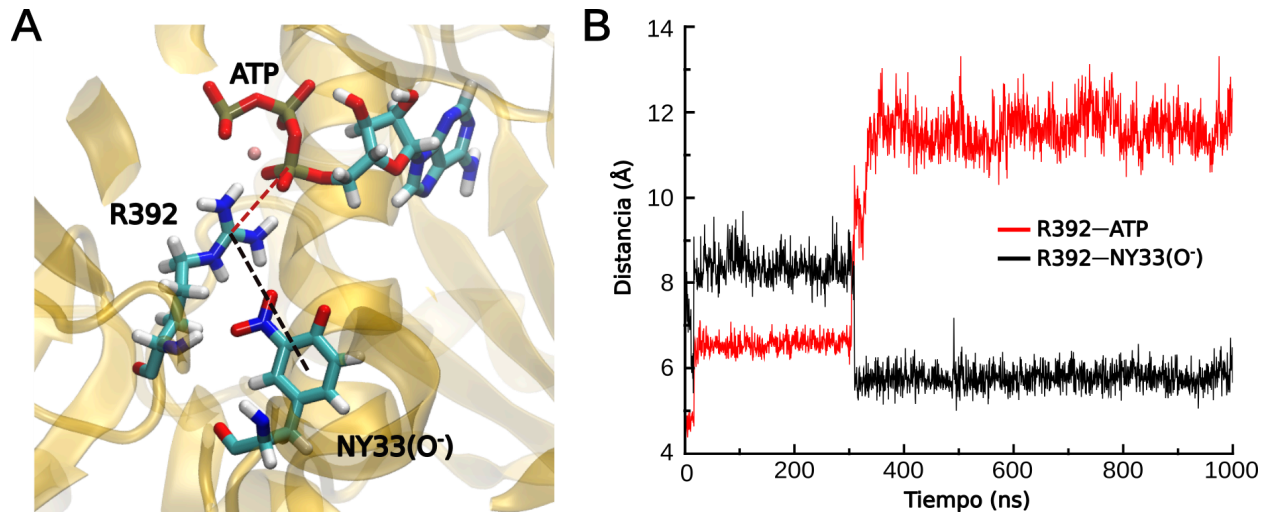


Figura 21: (A) Representación estructural de las interacciones entre Y33, R392 y ATP . (B) evolución de la distancia entre el átomo de carbono del grupo guanidinio de R392 y el átomo de fósforo α del ATP (traza roja), o entre el átomo de carbono del grupo guanidinio de R392 y NY33 en su estado desprotonado (traza negra), obtenida a partir de simulaciones de dinámica molecular del homodímero completo y cerrado de Hsp90.



Figura 22: Representación de la conservación evolutiva de los residuos de la Hsp90 β , mostrando que la Y33 y la R392 se encuentran altamente conservadas

Asimismo, y en continuidad con lo descrito acerca de la interacción entre la Y33 la R392 y el ATP, ampliamos el análisis evaluando la variación de la frustración local alrededor de la Y33, y evaluando también la energía libre de unión del ATP. De este modo, se observó que en las variantes nitradas (NY33O⁻ y NY33OH) se asocian con un alejamiento R392–ATP y un incremento de $\Delta G_{\text{unión}}$ hacia valores menos negativos, consistente con una menor afinidad del nucleótido (Fig. 23.A-B). Mientras que en NY33O⁻ se observa una disminución sostenida en los índices de frustración (Fig. 23C).

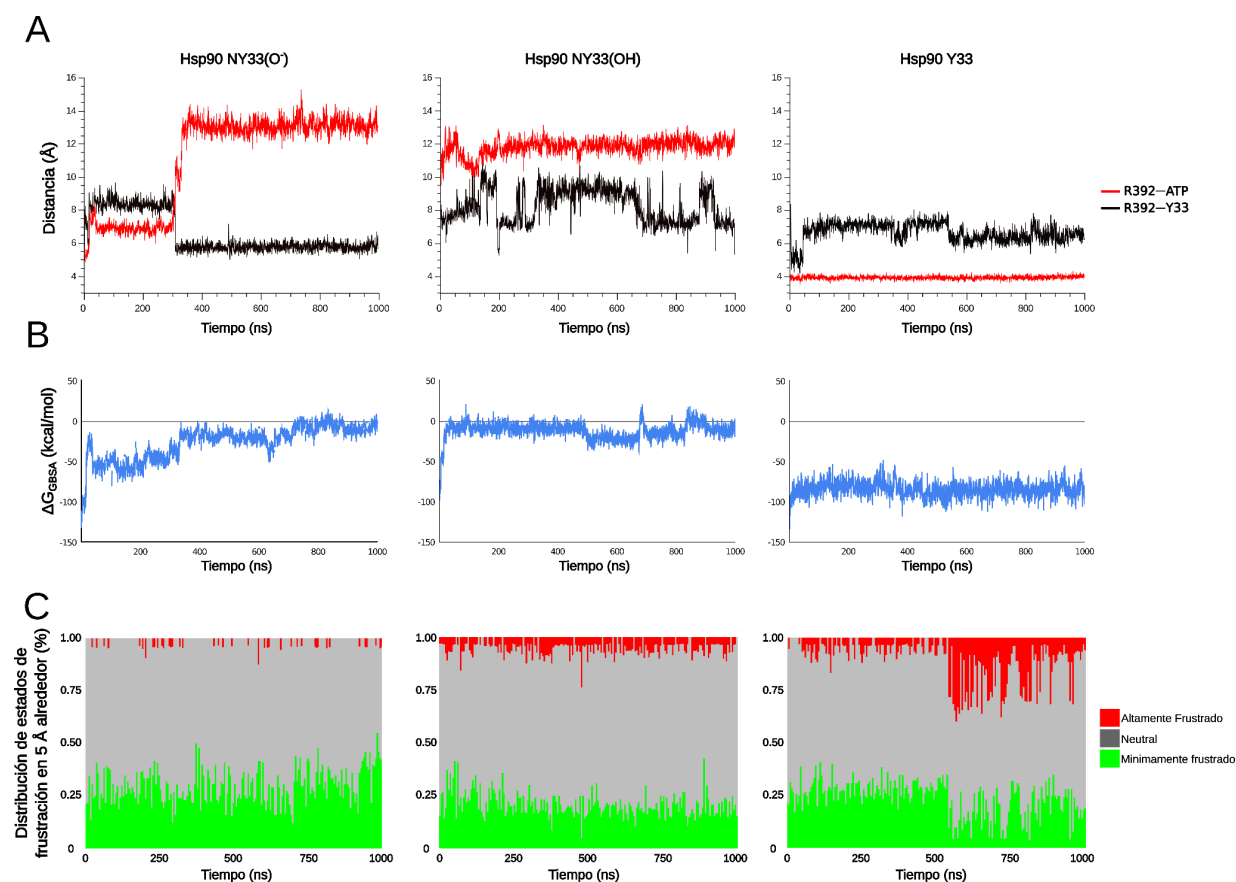


Figura 23: (A) Distancia entre los residuos de R392 e Y33 (negro) y entre R392 y el ATP (rojo) a lo largo de la trayectoria. (B) Variación de la energía libre de unión durante el tiempo. (C) Distribución temporal de los estados de frustración local de Y33, calculados para los contactos dentro de un radio de 5 Å. Se muestran las proporciones de contactos altamente frustrados (rojo), neutrales (gris) y mínimamente frustrados (verde). Estos análisis se realizaron para tres sistemas: Hsp90 NY33(O⁻), Hsp90 NY33(OH) y Hsp90 Y33 sin modificar, como se indica en la parte superior de cada panel.

Se realizó un análisis de descomposición de la contribución por residuo a la de energía libre de unión ($\Delta G_{\text{unión}}$) para cada uno de los sistemas analizados. En la Figura 24 se presentan los residuos con mayor contribución al $\Delta G_{\text{unión}}$ en cada caso. Es

particularmente relevante observar que el valor total de $\Delta G_{\text{unión}}$ disminuye notablemente en las variantes nitradas de Y33 en comparación con el sistema nativo, lo que sugiere una pérdida de afinidad a partir de dicha modificación. Además, el análisis por residuo revela una diferencia significativa en la contribución de R392, un residuo clave por lo mencionado anteriormente. Mientras que en el sistema nativo R392 presenta un aporte considerable a la energía libre de unión, en las variantes nitradas su contribución es prácticamente nula: aparece con un valor muy bajo en el sistema NY33(O⁻) y está completamente ausente en NY33(OH). Cabe destacar que estas diferencias estructurales previamente descritas promovidas por la nitración de Y33, generan también que otra serie de residuos próximos al ATP, como Q128, F129 y V131, muestren un descenso marcado en su interacción con el mismo y por consiguiente, una menor contribución al $\Delta G_{\text{unión}}$.

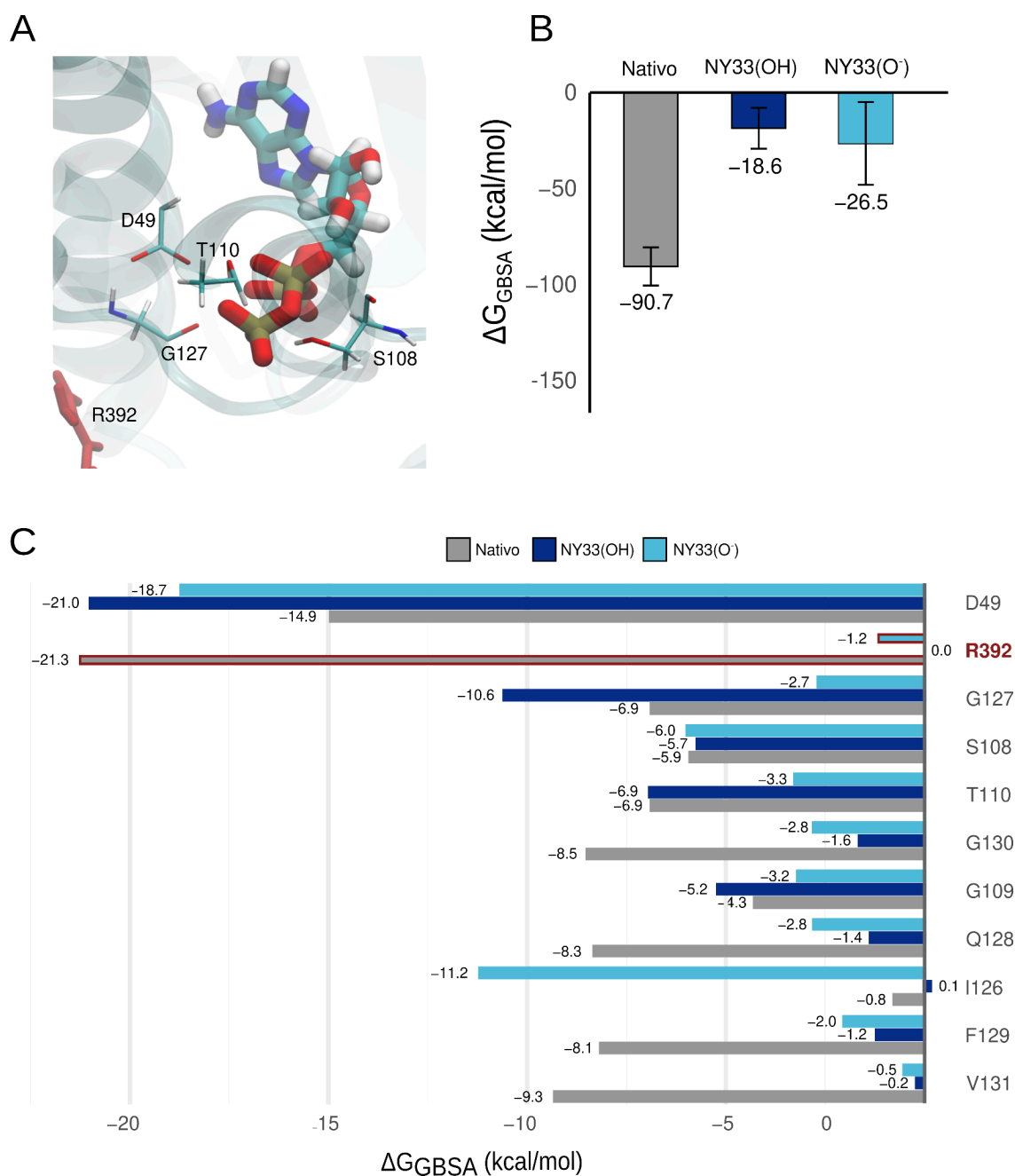


Figura 24: (A) Representación estructural del ATP en el sitio de unión, mostrando los residuos que más contribuyen a la energía libre de unión. El residuo R392 se encuentra destacado en color bordó. (B) Comparación de la energía libre de unión para los tres sistemas simulados: Hsp90 Y33 (gris), Hsp90 NY33(OH) (azul oscuro) y Hsp90 NY33(O⁻) (celeste). (C) Descomposición de energía libre de unión por residuo, mostrando las principales contribuciones en cada sistema, con el residuo R392 también resaltado en bordó.

3.2.4 La nitración en Y33 afecta la dinámica del *ATP-lid* en un modelo del dímero abierto

También se analizó el comportamiento del NTD como un modelo representativo de la dinámica de este dominio en la conformación abierta del homodímero. En la

conformación del *ATP-lid* abierto, Y33 se encuentra en estrecha interacción con esta región, lo que sugiere que este residuo podría estar involucrado en los cambios conformacionales asociados a su movimiento. Los análisis de la variación del volumen del *pocket* (cavidad delimitada por residuos específicos, correspondiente a sitios activos o de unión de ligando) muestra una menor variabilidad cuando el nucleótido está presente. Además, se observa que hacia la segunda mitad de la dinámica este volumen tiende a disminuir de forma sostenida.

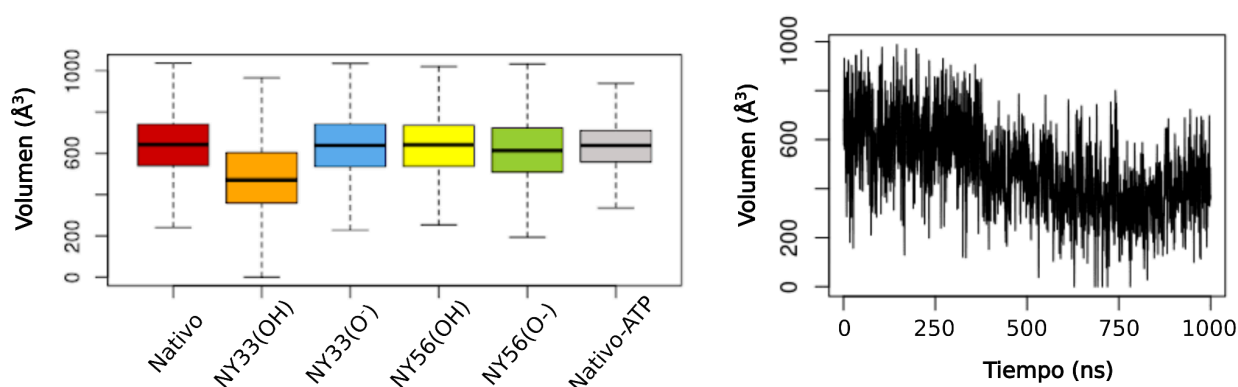


Figura 25: A la derecha, se presentan los valores promedio de volumen para cada sistema representado por distintos colores. A la izquierda se muestra la evolución temporal del volumen del *pocket* a lo largo de las trayectorias simuladas.

Un análisis comparativo de la dinámica de estos sistemas mostró que la nitración también afectó la movilidad del *lid* en esta conformación. Los cambios observados fueron menos específicos que los descritos para el dímero cerrado, pero evidenciaron que la nitración en Y33 aumenta la movilidad del *lid* (Fig. 26A), confirmando que la nitración de Hsp90 en Y33 afecta la dinámica de dicha región.

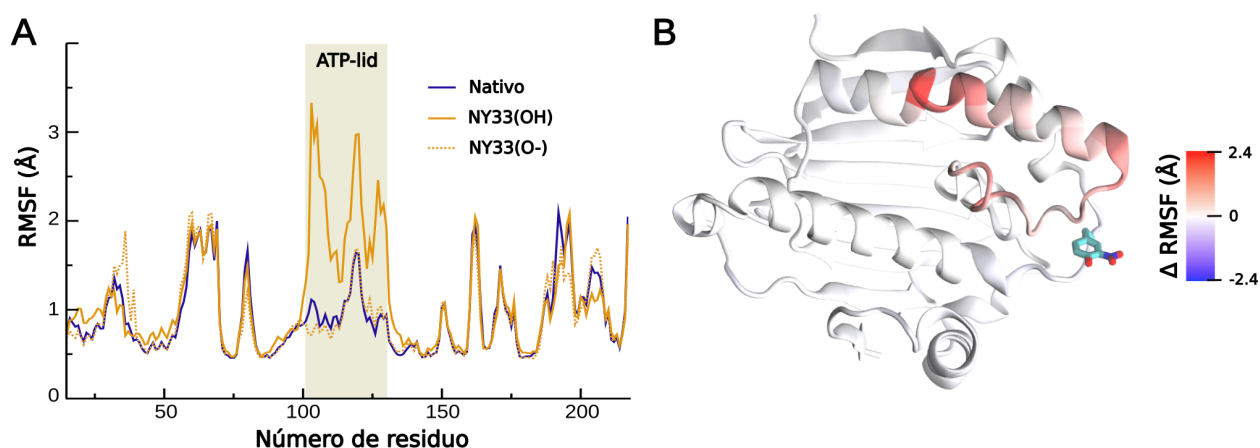


Figura 26: A) Fluctuaciones cuadráticas medias (RMSF, Å) de los residuos del NTD en función del estado de Y33, destacando la región del ATP-lid. (B) Las diferencias de RMSF entre la forma nitrada desprotonada (NY33O⁻) y la nativa, se muestran mapeadas sobre la estructura del NTD.

3.2.5 Conclusiones

Los resultados presentados en este capítulo muestran que la nitración en Y33 altera la estructura secundaria y cuaternaria de la Hsp90. Además, se observó que esta modificación nitro-oxidativa promueve una reducción significativa de su actividad ATPasa sin modificaciones en la actividad *holdasa*.

Desde el punto de vista atómico, el análisis de la estructura y dinámica de la enzima sugieren que la modificación en Y33 perturba la interacción de R392 con el ATP, un contacto clave para la estabilización del nucleótido a su sitio de unión, que además ha sido demostrado como muy importante para la actividad ATPasa de la Hsp90¹⁶⁵. En concordancia, los análisis energéticos indican que la variantes nitrada en ambos estados posibles de protonación, presentan valores de $\Delta G_{\text{unión}}$ menos negativos, reflejando una menor afinidad por el nucleótido, junto con una disminución casi completa de la contribución energética de R392. Finalmente, la nitración en Y33 también modifica la dinámica del *ATP-lid* en su conformación abierta, lo que sugiere una posible interferencia adicional en los procesos asociados a la entrada o salida de ligando.

3.3 Impacto de la nitración en Y56 en la estructura y actividad de la enzima

3.3.1 Evaluación del entorno de Y56 en el contexto del NTD de la Hsp90

Estudiando el entorno de Y56 con respecto a la conformación del *ATP-lid*, se observó que en la conformación abierta de esta región, Y56 se encuentra en un entorno mucho más accesible al solvente (Fig. 27.A). En contraste, en la conformación cerrada del *ATP-lid*, Y56 se encuentra formando más interacciones con algunos residuos de esta región. El análisis de SASA para Y56 (Fig. 27.C) confirma que la distribución de área accesible es significativamente mayor cuando el *ATP-lid* se encuentra en conformación abierta (media $\approx 147 \text{ \AA}^2$) en comparación con la conformación cerrada (media $\approx 60.2 \text{ \AA}^2$). Esta diferencia también tiene un impacto en el pKa, el cual reveló diferencias marcadas entre ambas conformaciones. En la conformación abierta, Y56 presenta un valor de pKa ≈ 10.9 , mientras que en la conformación cerrada del *ATP-lid*, el pKa del residuo aumenta a valores de 13.4, sugiriendo que la conformación de Y56 cuando interactúa con el *ATP-lid*, tiene una menor probabilidad de encontrarse en estado deprotonado en comparación con la Y56 expuesta al solvente.

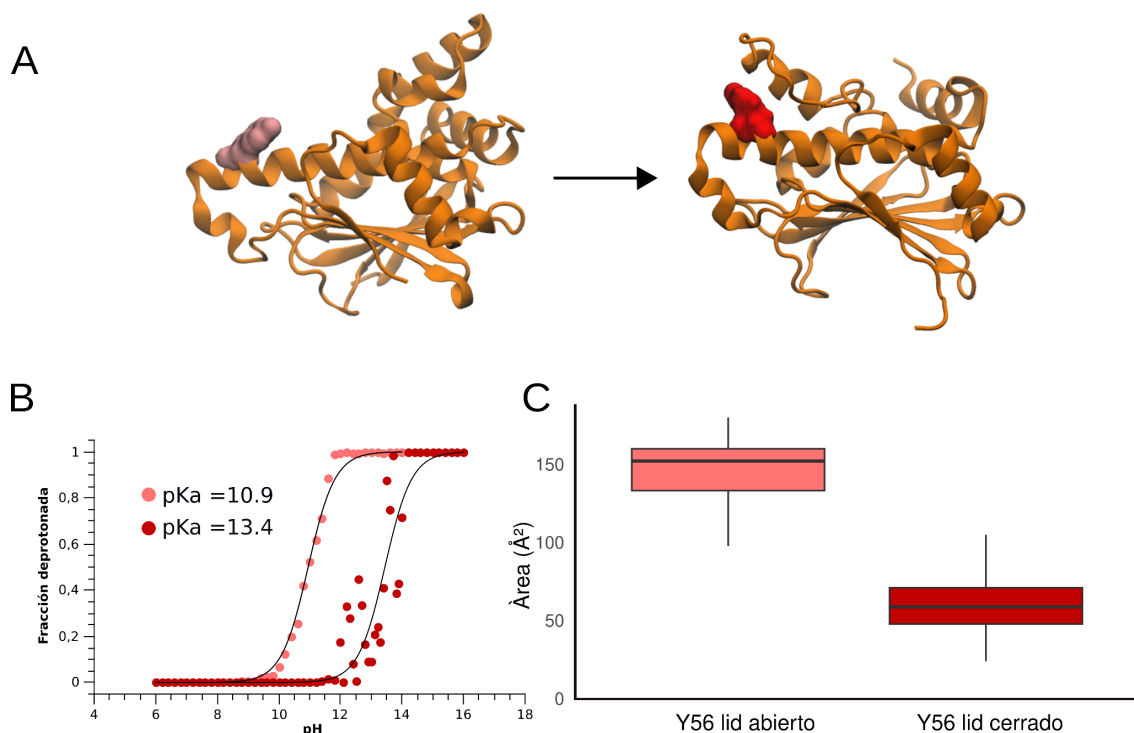


Figura 27: (A) Representación estructural de las conformaciones del NTD con el ATP-lid en estado abierto y cerrado, con el residuo Y56 resaltado en rosado (lid abierto) y rojo (lid cerrado). (B) Curva de titulación para Y56 en la conformación del lid abierto (rosado) y cerrado (rojo). (C) Superficie accesible al solvente (SASA) de Y56 en las conformaciones del lid abierto (rosado) y cerrado (rojo).

3.3.2 Resultados experimentales obtenidos en el modelo Y56 mono-nitrada

Desde un punto de vista estructural, los análisis de dicroísmo circular (CD) del mutante nitrado Hsp90^{NY56} mostraron una disminución en la absorbancia a 195 nm, indicando pérdida parcial del contenido α -helicoidal (Fig. 28A). El análisis por ultracentrifugación analítica (AUC) confirmó que la población predominante de la Hsp90^{NY56} corresponde al dímero con un coeficiente de sedimentación de 5.6 S, similar al observado para Hsp90 nativa (Fig. 28B). A diferencia de la nitración en Y33, no se detectó una población monomérica significativa, lo que sugiere que la nitración en Y56 no desestabiliza el dímero. Los oligómeros observados representan una fracción menor y probablemente transitoria.

Además, la incorporación sitio-específica de una nitrotirosina en esta posición provocó una disminución del 80% en la actividad ATPasa en comparación con la proteína nativa (Fig. 28C), lo que sugiere que la nitración en Y56 interfiere directamente con el

mecanismo catalítico de hidrólisis de ATP. Asimismo, la nitración en Y56 afectó de forma significativa la actividad *holdasa* independiente de ATP. En los ensayos de agregación térmica de citrato sintasa, Hsp90^{NY56} mostró una reducción cercana al 50 % en la capacidad de protección frente a la agregación respecto a Hsp90^{WT} (Fig. 28D-E). A diferencia de la nitración en Y33, que no alteró sustancialmente la función *holdasa*, los resultados obtenidos para Y56 indican que esta modificación produce cambios conformacionales dentro del dímero que, aunque no lo desestabilizan, disminuyen su eficiencia funcional.

En conjunto, estos resultados demuestran que la nitración en Y56 altera tanto la actividad catalítica dependiente de ATP como la función chaperona de Hsp90, probablemente mediante reajustes conformacionales en el dominio N-terminal que afectan la dinámica del *ATP-lid* y el acoplamiento entre dominios, dando lugar a una forma estructuralmente estable pero con una disminución en su función.

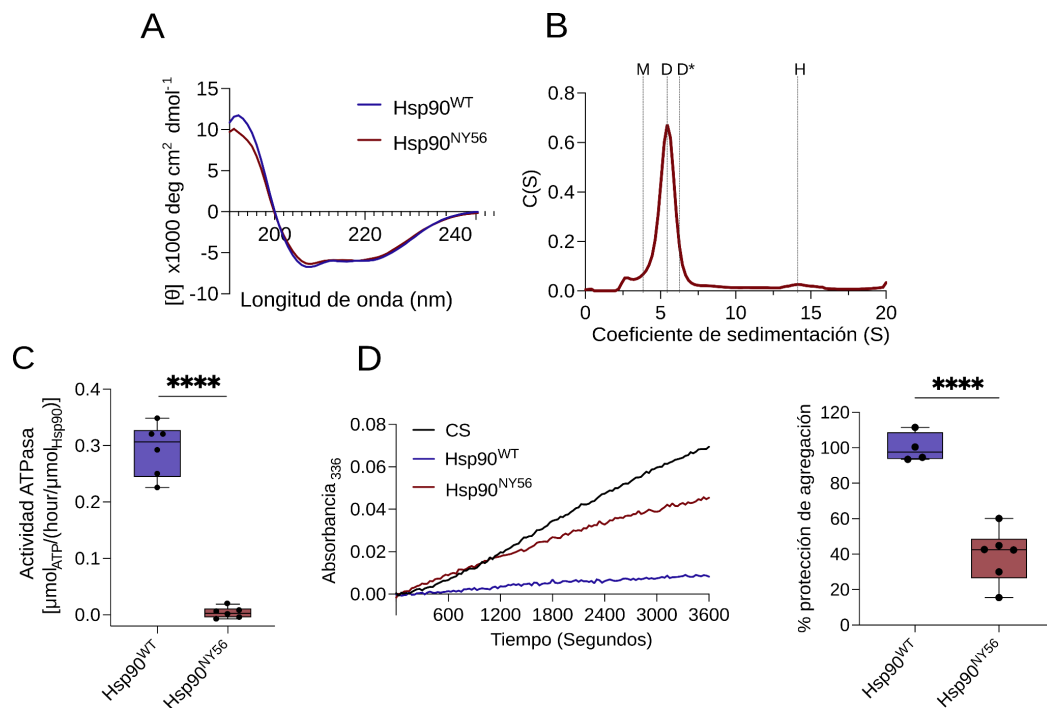


Figura 28: A) Cambios en la estructura secundaria de Hsp90 tras la incorporación sitio-específica de nitrotirosina en la posición 56 (Hsp90^{NY56}), analizados mediante dicroísmo circular. B) Perfil de coeficiente de sedimentación obtenido por ultracentrifugación analítica (AUC) para Hsp90^{NY56}, mostrando picos correspondientes al monómero (M), dímero (D), dímero en conformación más cerrada (D*) y una población oligomérica (H). C) Actividad ATPasa de Hsp90^{NY56}, expresada como μmol de ATP consumidos por hora en relación con Hsp90. D) Ensayo de actividad holdasa mostrando la prevención de la agregación térmica de citrato sintasa (CS).

3.3.3 Nitración en Y56 promueve cambios estructurales a nivel del *ATP-lid*.

Debido a la localización superficial de Y56, este residuo puede influir indirectamente sobre la dinámica del dominio N-terminal (NTD) y en particular sobre la región del *ATP-lid*. Para analizar el efecto estructural de su nitración, se realizaron simulaciones de dinámica molecular tanto del NTD aislado como del dímero completo de Hsp90 β , considerando las distintas formas de protonación de la nitrotirosina.

Los resultados mostraron que la nitración en la Y56 modula de manera significativa la flexibilidad del *ATP-lid*, y que el efecto depende del estado ácido-base del residuo nitrado. En la forma desprotonada NY56O⁻, la carga negativa del grupo nitro genera repulsión electrostática con los residuos 113–115 del *ATP-lid*, promoviendo una conformación más abierta y flexible de esta región y exponiendo el entorno de NY56O⁻ al solvente. En cambio, en la forma protonada (NY56OH), se observó la formación de un puente de hidrógeno entre el grupo hidroxilo de la NY56 y A116, junto con interacciones hidrofóbicas entre el grupo nitro y L117, que estabilizan una conformación cerrada y rígida del *lid* (Fig. 29).

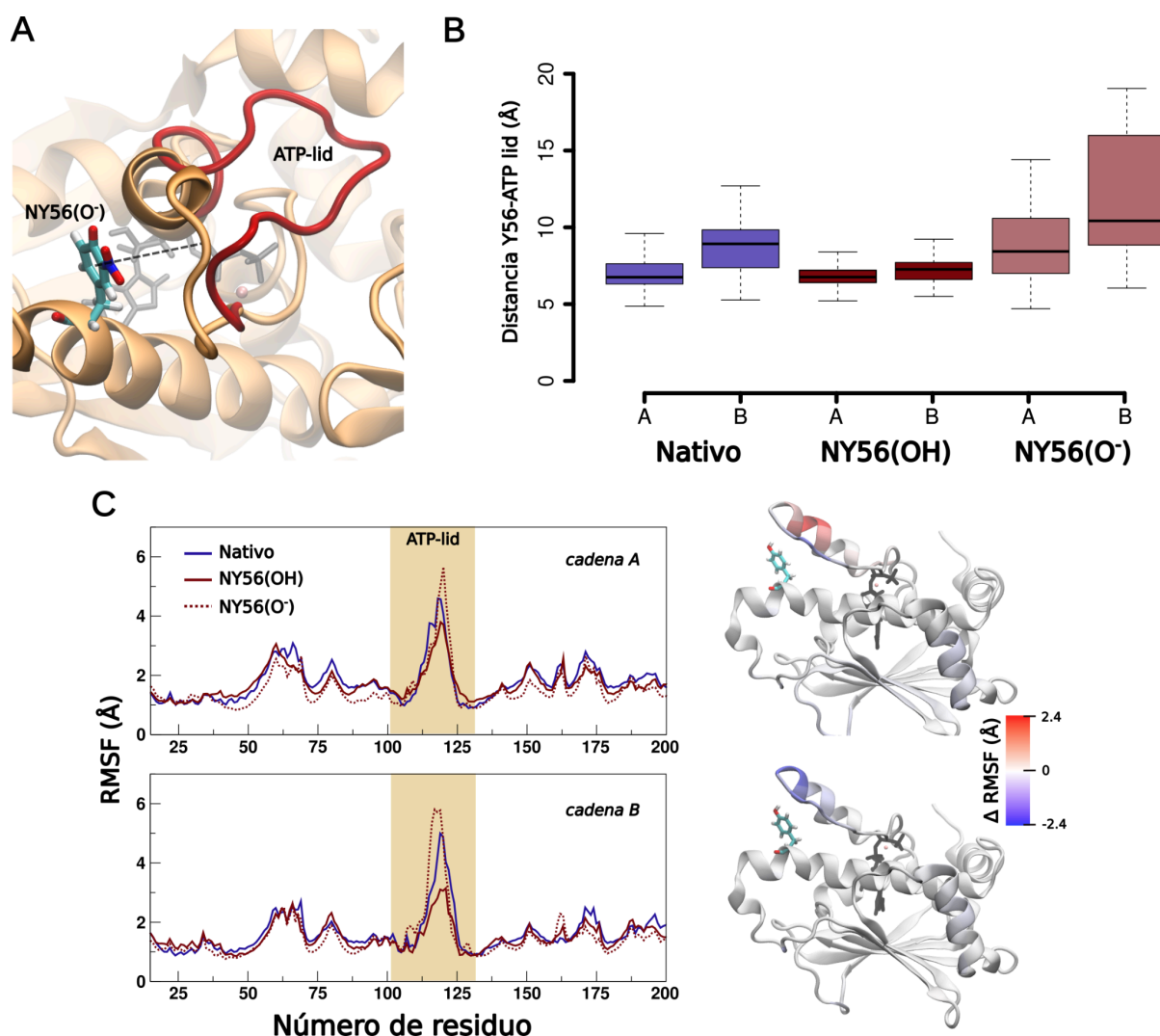


Figura 29: (A) Representación estructural de las interacciones entre NY56 con el “ATP-lid”. La conformación abierta del “ATP-lid” favorecida por la NY56 desprotonada se muestra superpuesta y resaltada en rojo. A la derecha: distribuciones de distancia Y56–ATP-lid (Å) en función del estado de Y56 (nativa, nitrada y protonada, o nitrada y desprotonada) para cada protómero (cadenas A y B) durante las simulaciones de dinámica molecular del dímero completo de Hsp90. (C) Fluctuaciones cuadráticas medias (RMSF, Å) de los residuos del dominio N-terminal (NTD) en función del estado de Y56, destacando la región del “ATP-lid”. Las diferencias de RMSF entre NY56O⁻ y la proteína nativa (arriba), o entre NY56OH y la proteína nativa (abajo), se muestran mapeadas sobre la estructura del NTD.

En conjunto, estos resultados indican que la nitración en Y56 introduce un mecanismo de regulación conformacional dependiente del pH, en el cual la forma protonada favorece un ATP-lid cerrado, mientras que la forma desprotonada favorece su apertura. Dado que la movilidad de esta región regula el acceso y la liberación del nucleótido en el sitio activo, se infiere que la nitración de Y56 podría alterar el equilibrio entre las

conformaciones abiertas y cerradas de Hsp90, afectando así la eficiencia del intercambio de nucleótidos durante la catálisis.

3.3.4 Conclusiones

La nitración sitio-específica en Y56 impacta en la estructura y función de la Hsp90, aunque lo hace con algunas diferencias respecto a lo observado para la nitración de Y33. Si bien esta modificación induce cambios moderados en la estructura secundaria, el estado cuaternario del dímero permanece mayormente conservado. No obstante, la actividad funcional se ve severamente comprometida, y a diferencia de la nitración en Y33, en este caso se observa una disminución en ambas actividades, ATPasa y *holdasa*.

Los estudios computacionales sugieren que este efecto funcional se podría relacionar con la capacidad de Y56 para modular la dinámica conformacional del *ATP-lid*, potencialmente modificando las propiedades de intercambio de nucleótidos.

4. DISCUSIÓN

El objetivo general de la presente Tesis se enfocó en estudiar las consecuencias estructurales y dinámicas promovidas por la nitración de dos residuos de tirosina claves en la chaperona celular Hsp90, para de esta manera, describir las bases moleculares que explican los cambios funcionales observados con estas modificaciones. Diversos estudios han investigado las consecuencias estructurales y funcionales asociadas a la nitración de tirosinas en proteínas, destacando que esta modificación postraducciona puede alterar tanto la dinámica local como el comportamiento global de las proteínas. En general, se ha observado que la incorporación del grupo nitro modifica características fisicoquímicas del residuo afectado, tales como su volumen y/o polaridad, repercutiendo en su interacción con residuos locales a donde se produjo la modificación, su dinámica conformacional y, en última instancia, en su actividad biológica.

Frieg *et al.*¹⁶⁷, quienes estudiaron la nitración en Y336 de la glutamina sintetasa humana mediante métodos computacionales y experimentales, demostraron que la nitración de este residuo altera no solo la estructura y dinámica locales, sino también la actividad enzimática global. En particular, observaron que dicha modificación afecta la interacción del residuo nitrado con el ATP en su sitio de unión, lo que sugiere que este cambio químico puede perturbar de forma indirecta la relación de la enzima con su ligando. En otro ejemplo relevante, Demicheli *et al.*¹⁶⁸ demostraron que la unión de cardiolipina al citocromo c induce cambios estructurales que vuelven más accesible la Y67, favoreciendo su nitración. Una vez modificada, Y67 experimenta alteraciones en su carga y en su pKa. Como consecuencia, aumenta la afinidad del citocromo c por la cardiolipina, lo que a su vez potencia su actividad peroxidasa. En un trabajo del mismo equipo, se describió que la incorporación del grupo nitro en el anillo aromático de Y34 de la manganeso superóxido dismutasa (Mn-SOD) ocasiona un bloqueo parcial del canal de acceso hacia el sitio metálico por el que ingresa el sustrato superóxido anión, generando un obstáculo estérico que dificulta su llegada al sitio catalítico. Como resultado de este impedimento estérico y la repulsión electrostática asociada a su forma desprotonada, esta perturbación estructural deriva en una marcada pérdida de la actividad enzimática¹⁶⁹. Una observación muy similar fue realizada para el caso de la hierro superóxido dismutasa (Fe-SOD), donde la nitración en Y35 (la tirosina más

próxima al centro férrico), produce una reorganización estructural que perturba el entorno del sitio activo¹⁷⁰. En la misma línea, en 2009 nuestro equipo demostró por primera vez como la nitración de un residuo de tirosina específico en una proteína puede conducir a un cambio conformacional¹⁷¹. En efecto, la nitración de la tirosina 74 de citocromo c conduce a una alteración estructural importante que afecta, entre otras cosas, la unión del grupo hemo a la proteína. Este cambio conformacional ha sido recientemente confirmado *in cellula* con anticuerpos monoclonales específicos contra conformaciones alternativas de citocromo c confirmando la ocurrencia y relevancia biológica del fenómeno¹⁷². En conjunto, estos ejemplos muestran casos de cómo la nitración de tirosinas específicas pueden inducir alteraciones estructurales que repercuten directamente en la función enzimática. Los resultados presentados en esta Tesis evidencian un impacto a nivel atómico y del entorno local a partir de la nitración de las tirosinas 33 y 56, que promueven cambios significativos a nivel de la estructura secundaria y cuaternaria de la proteína. Nos fue posible además, correlacionar con los cambios funcionales observados *in vitro*, con aspectos estructurales y dinámicos que surgieron a partir de nuestros análisis. Es importante destacar que dichos efectos no dependen únicamente de la incorporación del grupo nitro, sino también del estado de protonación del residuo. En otras palabras, tanto la adición del grupo nitro como la presencia de una carga negativa en el estado aniónico modifican el entorno local de estas tirosinas, lo que puede vincularse con los cambios estructurales y funcionales asociados a esta modificación. El caso de la nitración en Y56 es el ejemplo más claro: los dos estados de protonación de la tirosina nitrada conducen a consecuencias estructurales que podrían considerarse opuestas, destacando que la nitración por sí sola no determina el efecto final. En particular, la forma desprotonada promueve una mayor flexibilidad del *ATP-lid*, mientras que la forma protonada tiende a rigidizar esta región. Finalmente, cabe señalar que es la propia nitración la que posibilita la coexistencia de estos dos estados de ionización, ya que, como se mencionó en la introducción, la presencia del grupo nitro reduce el valor de pKa del residuo.

Habiendo discutido ejemplos donde la nitración de tirosinas induce cambios en la función de proteínas, es importante poner en contexto biológico los resultados *in vitro* e *in silico* aquí obtenidos y discutidos. El posible rol de las proteínas nitradas como impulsoras de distintas patologías comenzó a emerger hace dos décadas^{27,173–176}. Empleando metodologías de vanguardia, en particular, la incorporación de nitro-tirosina

de forma cotraduccional, nuestros colaboradores dirigidos por la Dra. Franco, mostraron que la nitración sitio-específica de Hsp90 en Y33 e Y56 desencadena nuevas funciones patológicas que no pueden ser compensadas ni superadas por la Hsp90 nativa. En motoneuronas, la nitración de cualquiera de estos residuos es suficiente para inducir muerte neuronal^{133,177}. En células PC12 en cambio, la nitración en Y33 induce disminuye el metabolismo mitocondrial, mientras que Y56 no mostró efectos sobre la regulación metabólica mitocondrial¹⁷⁴.

No sólo las diferentes formas de Hsp90 nitrada tienen funciones distintas, sino que activan diferentes vías de señalización dependiendo del tipo celular^{133,134,177}. Por ejemplo, mostraron que en células de schwannoma, la Hsp90 nitrada actúa como un interruptor metabólico que incrementa la proliferación tumoral. La Hsp90 nitrada en Y33 disminuye el metabolismo mitocondrial, mientras que la Hsp90 nitrada en Y56 aumenta la glucólisis¹³⁵. Además, en diferentes modelos de cultivo celular, incluyendo moto-neuronas, células PC12 y células de schwannoma, se observó que aproximadamente 1–15 % de la Hsp90 está nitrada en Y33 y/o Y56, con consecuencias biológicas que difieren entre ambos sitios^{135,178}.

Estos datos indican que la nitración sitio-específica de la Hsp90 podría desencadenar efectos patológicos distintos, dependiendo no solo del sitio modificado, sino también del tipo celular en el que se analicen.

El mecanismo mediante el cual la nitración sitio-específica de la Hsp90 en Y33 e Y56 genera nuevas funciones patológicas podría estar vinculado a cambios estructurales distintos inducidos por la nitración de esos residuos críticos. Aquí, utilizando enfoques complementarios, mostramos que la nitración de Hsp90 en Y33 o Y56 tiene un impacto profundo y sitio-específico en la estructura y actividad de la proteína, lo cual se traduce en nuevas funciones biológicas. Las actividades ATPasa y chaperona de Hsp90 dependen de la formación de un dímero funcional que además interactúa con co-chaperonas y proteínas cliente^{116,179–183}. Los resultados aquí discutidos muestran un equilibrio entre estados oligoméricos, en íntima relación con las modificaciones estudiadas. Si bien múltiples estudios han detectado la presencia de oligómeros de Hsp90^{113,184–189}, la base de este cambio en la estructura cuaternaria aún no está clara, pero la nitración selectiva de tirosinas podría jugar un rol importante en este aspecto.

A partir de los resultados experimentales realizados por nuestros colaboradores, se observó (mediante experimentos de AUC) una población hexamérica estable en Hsp90^{NY33} y un dímero en rápido intercambio con especies monoméricas. Esto sugiere que el dímero puede perder estabilidad en solución, pero podría estabilizarse al unirse a proteínas cliente y/o co-chaperonas y al formar oligómeros, como lo indican los ensayos *holdasa* en los que Hsp90^{NY33} proporcionó protección completa de la citrato sintasa frente a la agregación durante el estrés térmico, tal como se había reportado previamente¹³⁴. También es posible que los oligómeros retengan actividad *holdasa* y sean responsables de la nueva función. En contraste, Hsp90^{NY56} se presentó principalmente como un dímero estable, con una población oligomérica menor. Sin embargo, la disminución significativa en las actividades ATPasa y *holdasa* en Hsp90^{NY56} sugiere la presencia de una conformación dimérica alterada en comparación con Hsp90 nativa. Estas diferencias estructurales significativas entre Hsp90^{NY33} y Hsp90^{NY56} pueden explicar sus actividades patológicas distintas. En concordancia, la nitración en Y33 y/o Y56 afectó diferencialmente la actividad ATPasa de Hsp90. Por ejemplo, mientras que NY56 casi abolió la hidrólisis de ATP por completo, NY33 la redujo en un 60%. A nivel molecular, la unión e hidrólisis de ATP por Hsp90 está coordinada por interacciones entre el NTD y el MD que abarcan ambos protómeros del dímero^{116,183,190}. Un residuo crucial en estas interacciones es R392, ubicado en un loop del MD que se encuentra próximo al NTD en la conformación cerrada. Estudios previos han establecido la importancia de R392 en la estabilización de la conformación cerrada de la Hsp90 mediante una interacción polar con el fosfato-γ del ATP¹⁶⁵, mientras que otros residuos en el loop del MD interactúan con Y33 en el NTD del otro protómero¹⁸³. Los resultados aquí obtenidos mostraron un cambio en esta interfaz entre dominios tras la nitración en Y33. En presencia de NY33, la interacción cercana entre ATP y R392 se vio perturbada, y el aumento en la distancia (~7 Å a ~14 Å) entre estos residuos interactuantes podría desestabilizar la conformación cerrada unida a ATP. Esto es similar a los efectos observados cuando R392 se muta a un residuo menos polar que ya no puede interactuar con ATP, resultando en una pérdida significativa de actividad ATPasa¹¹⁶. La menor tasa de hidrólisis de ATP observada en Hsp90^{NY33} puede, por lo tanto, explicarse por la pérdida de estabilidad evidente en la conformación unida a ATP. De manera interesante, R392 y Y33 están casi estrictamente conservados, lo que sugiere que ambos residuos son críticos para la función de Hsp90 (Fig. 21). También

se observó que las mayores interacciones entre NY56 y residuos localizados en el *ATP-lid* afectan la flexibilidad del lid. El cierre del *lid* tras la unión de ATP impulsa la dimerización de los NTDs de la Hsp90, formando la conformación cerrada y activa de la Hsp90¹¹⁶. Una menor flexibilidad del *lid* afectaría la entrada del ATP a su bolsillo de unión, así como el cierre subsecuente del *lid* y la dimerización de los NTDs. La dinámica del *ATP-lid* no sólo modula la unión de nucleótidos, sino también la dinámica de apertura y cierre del dímero completo. Así, además del efecto sobre la hidrólisis de ATP, la nitración en Y56 podría afectar otras actividades de Hsp90, incluyendo su capacidad para unirse eficazmente a clientes¹⁹¹, lo que podría explicar la disminución del 50% observada en la actividad *holdasa* de Hsp90^{NY56}. En términos de actividades intrínsecas de la Hsp90, como se mencionábamos recientemente, el comportamiento de los residuos nitrados depende en gran medida, primero, del estado de protonación del grupo nitro y, segundo, del estado abierto o cerrado del *ATP-lid*. Dadas las conformaciones transitorias del *ATP-lid* en la Hsp90 humana en solución¹⁹², así como la falta de predictibilidad asociada a determinar el estado de protonación de un residuo NY, es esperable que esta proteína exista en una mezcla de estados conformacionales en solución, y la interacción resultante dé lugar a los efectos observados en los ensayos *in vitro*, pudiendo alterar la interacción de la Hsp90 con interactores celulares. Estudios previos han discutido la oligomerización como un mecanismo protector en Hsp90, permitiendo que conserve su función bajo condiciones de estrés¹⁸⁹.

Los entornos estresantes descritos en la literatura se limitan a condiciones de alta temperatura (por encima de 49°C) o presencia excesiva de cationes divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}). Los resultados aquí mostrados permiten proponer un escenario adicional en el cual el estrés oxidativo y nitrosativo en condiciones patológicas puede causar nitración y, dependiendo del sitio de nitración, la subsecuente oligomerización de la Hsp90, con los oligómeros reteniendo funcionalidad. Así, el dímero de la Hsp90 con una conformación alterada desencadenada por la nitración en Y56, y los oligómeros formados por la nitración en Y33, tienen el potencial de establecer asociaciones alteradas con co-chaperonas¹⁸¹ y proteínas cliente, redefiniendo el interactoma de la Hsp90¹⁸⁹ y conduciendo a las funciones patológicas observadas en estados de enfermedad con inflamación crónica subyacente. En los últimos 25 años, evidencia creciente ha respaldado la Hsp90 como un objetivo terapéutico excepcional para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y cáncer, pero la toxicidad asociada

ha obstaculizado el éxito de sus inhibidores¹⁹³. Una comprensión integral de los cambios funcionales y estructurales inducidos por la nitración en la Hsp90 podría conducir al desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas que apunten selectivamente a las formas nitradas de la misma e inhiban su función patológica.

5. PERSPECTIVAS

La complejidad del sistema de estudio y los resultados obtenidos y discutidos en esta Tesis, abren nuevas interrogantes a explorar en el futuro. Desde el punto de vista estructural y biofísico, nos quedan muchas preguntas por contestar en relación a cómo estas modificaciones postraduccionales modulan los procesos de apertura y cierre del dímero y las conformaciones del *ATP-lid*.

En este sentido, futuras líneas de investigación podrían enfocarse en explorar de manera más profunda estos cambios estructurales mediante metodologías de simulación computacional que apliquen técnicas de muestreo avanzado. Una primera aproximación podría consistir en aplicar métodos modernos de predicción estructural, como *AlphaFold2*¹⁵², que si bien se ha utilizado tradicionalmente para obtener estructuras estáticas, recientemente ha mostrado capacidad para inferir conformaciones alternativas. En combinación con análisis de frustración energética y estrategias basadas en perturbaciones de los alineamientos de secuencia múltiple, sería posible identificar estados conformacionales relevantes asociados a la nitración y generar hipótesis estructurales de bajo costo computacional. De forma complementaria, técnicas de muestreo avanzado como metadinámica^{194,195}, WESTPA¹⁹⁶ o similares, también permitirían caracterizar el paisaje termodinámico de transiciones locales asociadas a la apertura/cierre del *ATP-lid* o a fluctuaciones del dímero. Utilizando variables colectivas apropiadas (por ejemplo, RMSD o distancias interdominio) sería posible reconstruir perfiles de energía libre y cuantificar cómo la nitración altera las barreras energéticas que gobiernan estos movimientos. Asimismo, estos métodos permitirían identificar rutas de transición de mínima energía y describir con mayor detalle eventos conformacionales más globales en la proteína.

Por otro lado, el avance computacional podría beneficiarse enormemente de una correlación directa con datos estructurales experimentales, en particular, la obtención de estructuras resueltas por cryo-EM de estados mono-nitrados. Esto, sumado a técnicas capaces de capturar cambios dinámicos, como el intercambio protón-deuterio acoplado a espectrometría de masas (HDX-MS)¹⁹⁷, ayudarían a evaluar la flexibilidad del *ATP-lid* y observar si la nitración en Y33/Y56 inducen alteraciones en la dinámica de dicha región. Asimismo, experimentos de unión a nucleótidos y análogos, combinados con técnicas basadas en NMR, o mediciones de fluorescencia, podrían proporcionar información de los efectos en la nitración en la afinidad por el ATP y en la estabilidad de los estados abierto/cerrado del *ATP-lid*.

La integración de ambas aproximaciones, computacional y estructural, permitiría alcanzar una comprensión más completa del modo en que la nitración modula la estructura y dinámica de la Hsp90. Estos abordajes podrían extenderse al estudio de otras modificaciones postraduccionales en diferentes proteínas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Storz, G.; Imlay, J. A. Oxidative Stress. *Curr. Opin. Microbiol.* **1999**, 2 (2), 188–194. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)80033-2](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)80033-2).
- (2) Turell, L.; Zeida, A.; Trujillo, M. Mechanisms and Consequences of Protein Cysteine Oxidation: The Role of the Initial Short-Lived Intermediates. *Essays Biochem.* **2020**, 64 (1), 55–66. <https://doi.org/10.1042/EBC20190053>.
- (3) Roos, G.; Messens, J. Protein Sulfenic Acid Formation: From Cellular Damage to Redox Regulation. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, 51 (2), 314–326. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.031>.
- (4) Winterbourn, C. C. Superoxide as an Intracellular Radical Sink. *Free Radic. Biol. Med.* **1993**, 14 (1), 85–90. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90512-S](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90512-S).
- (5) Levine, R. L.; Moskovitz, J.; Stadtman, E. R. Oxidation of Methionine in Proteins: Roles in Antioxidant Defense and Cellular Regulation. *IUBMB Life* **2000**, 50 (4), 301–307. <https://doi.org/10.1080/15216540051081056>.
- (6) Vogt, W. Oxidation of Methionyl Residues in Proteins: Tools, Targets, and Reversal. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, 18 (1), 93–105. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00158-G](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00158-G).
- (7) Boschi-Muller, S.; Olry, A.; Antoine, M.; Branlant, G. The Enzymology and Biochemistry of Methionine Sulfoxide Reductases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **2005**, 1703 (2), 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2004.09.016>.
- (8) Lyman, S. V.; Jiang, Q.; Hurst, J. K. Mechanism of Carbon Dioxide-Catalyzed Oxidation of Tyrosine by Peroxynitrite. *Biochemistry* **1996**, 35 (24), 7855–7861. <https://doi.org/10.1021/bi960331h>.
- (9) Maskos, Z.; Rush, J. D.; Koppenol, W. H. The Hydroxylation of Phenylalanine and Tyrosine: A Comparison with Salicylate and Tryptophan. *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, 296 (2), 521–529. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90606-W](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90606-W).
- (10) Yang, Y.-S.; Wang, C.-C.; Chen, B.-H.; Hou, Y.-H.; Hung, K.-S.; Mao, Y.-C. Tyrosine Sulfation as a Protein Post-Translational Modification. *Molecules* **2015**, 20 (2), 2138–2164. <https://doi.org/10.3390/molecules20022138>.
- (11) Fitzpatrick, P. F. Mechanism of Aromatic Amino Acid Hydroxylation. *Biochemistry* **2003**, 42 (48), 14083–14091. <https://doi.org/10.1021/bi035656u>.
- (12) Kikugawa, K.; Kato, T.; Okamoto, Y. Damage of Amino Acids and Proteins Induced by Nitrogen Dioxide, a Free Radical Toxin, in Air. *Free Radic. Biol. Med.* **1994**, 16 (3), 373–382. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)90039-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)90039-6).
- (13) Yamakura, F.; Ikeda, K. Modification of Tryptophan and Tryptophan Residues in Proteins by Reactive Nitrogen Species. *Nitric Oxide* **2006**, 14 (2), 152–161. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2005.07.009>.
- (14) Ferger, B.; Themann, C.; Rose, S.; Halliwell, B.; Jenner, P. 6-Hydroxydopamine Increases the Hydroxylation and Nitration of Phenylalanine *in Vivo*: Implication of Peroxynitrite Formation. *J. Neurochem.* **2001**, 78 (3), 509–514. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00429.x>.
- (15) Lee, J.-W.; Helmann, J. D. The PerR Transcription Factor Senses H₂O₂ by Metal-Catalysed Histidine Oxidation. *Nature* **2006**, 440 (7082), 363–367.

<https://doi.org/10.1038/nature04537>.

- (16) Hougland, J. L.; Darling, J.; Flynn, S. Protein Posttranslational Modification. In *Molecular Basis of Oxidative Stress*; Villamena, F. A., Ed.; Wiley, 2013; pp 71–92. <https://doi.org/10.1002/9781118355886.ch3>.
- (17) Kehm, R.; Baldensperger, T.; Raupbach, J.; Höhn, A. Protein Oxidation - Formation Mechanisms, Detection and Relevance as Biomarkers in Human Diseases. *Redox Biol.* **2021**, *42*, 101901. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101901>.
- (18) Chondrogianni, N.; Petropoulos, I.; Grimm, S.; Georgila, K.; Catalgol, B.; Friguet, B.; Grune, T.; Gonos, E. S. Protein Damage, Repair and Proteolysis. *Mol. Aspects Med.* **2014**, *35*, 1–71. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.09.001>.
- (19) Go, Y.-M.; Chandler, J. D.; Jones, D. P. The Cysteine Proteome. *Free Radic. Biol. Med.* **2015**, *84*, 227–245. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.022>.
- (20) Janssen-Heininger, Y. M. W.; Mossman, B. T.; Heintz, N. H.; Forman, H. J.; Kalyanaram, B.; Finkel, T.; Stamler, J. S.; Rhee, S. G.; Van Der Vliet, A. Redox-Based Regulation of Signal Transduction: Principles, Pitfalls, and Promises. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, *45* (1), 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.03.011>.
- (21) Hawkins, C. L.; Davies, M. J. Detection, Identification, and Quantification of Oxidative Protein Modifications. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294* (51), 19683–19708. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.006217>.
- (22) Fisher, M. Lehninger Principles of Biochemistry, 3rd Edition; By David L. Nelson and Michael M. Cox. *Chem. Educ.* **2001**, *6* (1), 69–70. <https://doi.org/10.1007/s00897000455a>.
- (23) Gallivan, J. P.; Dougherty, D. A. Cation- π Interactions in Structural Biology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96* (17), 9459–9464. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.17.9459>.
- (24) Chothia, C. The Nature of the Accessible and Buried Surfaces in Proteins. *J. Mol. Biol.* **1976**, *105* (1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(76\)90191-1](https://doi.org/10.1016/0022-2836(76)90191-1).
- (25) Zamyatnin, A. A. Protein Volume in Solution. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1972**, *24*, 107–123. [https://doi.org/10.1016/0079-6107\(72\)90005-3](https://doi.org/10.1016/0079-6107(72)90005-3).
- (26) Radi, R. Protein Tyrosine Nitration: Biochemical Mechanisms and Structural Basis of Functional Effects. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46* (2), 550–559. <https://doi.org/10.1021/ar300234c>.
- (27) Ischiropoulos, H.; Beckman, J. S. Oxidative Stress and Nitration in Neurodegeneration: Cause, Effect, or Association? *J. Clin. Invest.* **2003**, *111* (2), 163–169. <https://doi.org/10.1172/JCI200317638>.
- (28) Suskiewicz, M. J. The Logic of Protein Post-translational Modifications (PTMs): Chemistry, Mechanisms and Evolution of Protein Regulation through Covalent Attachments. *BioEssays* **2024**, *46* (3), 2300178. <https://doi.org/10.1002/bies.202300178>.
- (29) Stewart, V.; Ronald, P. C. Sulfotyrosine Residues: Interaction Specificity Determinants for Extracellular Protein–Protein Interactions. *J. Biol. Chem.* **2022**, *298* (8), 102232. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102232>.
- (30) Hunter, T. Tyrosine Phosphorylation: Thirty Years and Counting. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2009**, *21* (2), 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.01.028>.

- (31) Ardito, F.; Giuliani, M.; Perrone, D.; Troiano, G.; Muzio, L. L. The Crucial Role of Protein Phosphorylation in Cell Signaling and Its Use as Targeted Therapy (Review). *Int. J. Mol. Med.* **2017**, *40* (2), 271–280. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3036>.
- (32) Kumar, R.; Goel, H.; Solanki, R.; Rawat, L.; Tabasum, S.; Tanwar, P.; Pal, S.; Sabarwal, A. Recent Developments in Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors: A Promising Mainstay in Targeted Cancer Therapy. *Med. Drug Discov.* **2024**, *23*, 100195. <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2024.100195>.
- (33) Bartesaghi, S.; Radi, R. Fundamentals on the Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration. *Redox Biol.* **2018**, *14*, 618–625. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.09.009>.
- (34) Davies, M. J. Protein Oxidation and Peroxidation. *Biochem. J.* **2016**, *473* (7), 805–825. <https://doi.org/10.1042/BJ20151227>.
- (35) Domigan, N. M.; Charlton, T. S.; Duncan, M. W.; Winterbourn, C. C.; Kettle, A. J. Chlorination of Tyrosyl Residues in Peptides by Myeloperoxidase and Human Neutrophils. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (28), 16542–16548. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.28.16542>.
- (36) Lima, V. V.; Spitler, K.; Choi, H.; Webb, R. C.; Tostes, R. C. O-GlcNAcylation and Oxidation of Proteins: Is Signalling in the Cardiovascular System Becoming Sweeter? *Clin. Sci.* **2012**, *123* (8), 473–486. <https://doi.org/10.1042/CS20110638>.
- (37) Bathish, B.; Paumann-Page, M.; Paton, L. N.; Kettle, A. J.; Winterbourn, C. C. Peroxidasin Mediates Bromination of Tyrosine Residues in the Extracellular Matrix. *J. Biol. Chem.* **2020**, *295* (36), 12697–12705. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014504>.
- (38) Narita, T.; Weinert, B. T.; Choudhary, C. Functions and Mechanisms of Non-Histone Protein Acetylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *20* (3), 156–174. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0081-3>.
- (39) Tosatto, L.; Coscia, F. A Glance at Post-Translational Modifications of Human Thyroglobulin: Potential Impact on Function and Pathogenesis. *Eur. Thyroid J.* **2022**, *11* (3), e220046. <https://doi.org/10.1530/ETJ-22-0046>.
- (40) Beckman, J. S.; Koppenol, W. H. Nitric Oxide, Superoxide, and Peroxynitrite: The Good, the Bad, and Ugly. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **1996**, *271* (5), C1424–C1437. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1996.271.5.C1424>.
- (41) Ferrer-Sueta, G.; Campolo, N.; Trujillo, M.; Bartesaghi, S.; Carballal, S.; Romero, N.; Alvarez, B.; Radi, R. Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (3), 1338–1408. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00568>.
- (42) Abello, N.; Kerstjens, H. A. M.; Postma, D. S.; Bischoff, R. Protein Tyrosine Nitration: Selectivity, Physicochemical and Biological Consequences, Denitration, and Proteomics Methods for the Identification of Tyrosine-Nitrated Proteins. *J. Proteome Res.* **2009**, *8* (7), 3222–3238. <https://doi.org/10.1021/pr900039c>.
- (43) Souza, J. M.; Peluffo, G.; Radi, R. Protein Tyrosine Nitration--Functional Alteration or Just a Biomarker? *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, *45* (4), 357–366. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.04.010>.
- (44) Pacher, P.; Beckman, J. S.; Liaudet, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol. Rev.* **2007**, *87* (1), 315–424.

<https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2006>.

- (45) Ott, C.; Tomasina, F.; Campolo, N.; Bartesaghi, S.; Mastrogiovanni, M.; Leyva, A.; Batthyány, C.; Meinl, W.; Grune, T.; Radi, R. Decreased Proteasomal Cleavage at Nitrotyrosine Sites in Proteins and Peptides. *Redox Biol.* **2021**, *46*, 102106. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102106>.
- (46) Gow, A. J.; Duran, D.; Malcolm, S.; Ischiropoulos, H. Effects of Peroxynitrite-induced Protein Modifications on Tyrosine Phosphorylation and Degradation. *FEBS Lett.* **1996**, *385* (1–2), 63–66. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00347-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00347-X).
- (47) Grune, T.; Blasig, I. E.; Sitte, N.; Roloff, B.; Haseloff, R.; Davies, K. J. A. Peroxynitrite Increases the Degradation of Aconitase and Other Cellular Proteins by Proteasome. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (18), 10857–10862. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.18.10857>.
- (48) Souza, J. M.; Choi, I.; Chen, Q.; Weisse, M.; Daikhin, E.; Yudkoff, M.; Obin, M.; Ara, J.; Horwitz, J.; Ischiropoulos, H. Proteolytic Degradation of Tyrosine Nitrated Proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *380* (2), 360–366. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.1940>.
- (49) Berlett, B. S.; Friguet, B.; Yim, M. B.; Chock, P. B.; Stadtman, E. R. Peroxynitrite-Mediated Nitration of Tyrosine Residues in Escherichia Coli Glutamine Synthetase Mimics Adenylation: Relevance to Signal Transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93* (5), 1776–1780. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.5.1776>.
- (50) Ischiropoulos, H. Biological Tyrosine Nitration: A Pathophysiological Function of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species. *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *356* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0755>.
- (51) Monteiro, H. P. Signal Transduction by Protein Tyrosine Nitration: Competition or Cooperation with Tyrosine Phosphorylation-Dependent Signaling Events? *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, *33* (6), 765–773. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00893-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00893-6).
- (52) Monteiro, H. P.; Arai, R. J.; Travassos, L. R. Protein Tyrosine Phosphorylation and Protein Tyrosine Nitration in Redox Signaling. *Antioxid. Redox Signal.* **2008**, *10* (5), 843–890. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1853>.
- (53) Heijnen, H. F. G.; Van Donselaar, E.; Slot, J. W.; Fries, D. M.; Blachard-Fillion, B.; Hodara, R.; Lightfoot, R.; Polydoro, M.; Spielberg, D.; Thomson, L.; Regan, E. A.; Crapo, J.; Ischiropoulos, H. Subcellular Localization of Tyrosine-Nitrated Proteins Is Dictated by Reactive Oxygen Species Generating Enzymes and by Proximity to Nitric Oxide Synthase. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, *40* (11), 1903–1913. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.09.006>.
- (54) Radi, R.; Cassina, A.; Hodara, R.; Quijano, C.; Castro, L. Peroxynitrite Reactions and Formation in Mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, *33* (11), 1451–1464. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)01111-5](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01111-5).
- (55) Koeck, T.; Fu, X.; Hazen, S. L.; Crabb, J. W.; Stuehr, D. J.; Aulak, K. S. Rapid and Selective Oxygen-Regulated Protein Tyrosine Denitration and Nitration in Mitochondria. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (26), 27257–27262. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401586200>.
- (56) Ghafourifar, P.; Colton, C. A. Compartmentalized Nitrosation and Nitration in

- Mitochondria. *Antioxid. Redox Signal.* **2003**, *5* (3), 349–354. <https://doi.org/10.1089/152308603322110913>.
- (57) Valdez, L. B.; Alvarez, S.; Arnaiz, S. L.; Schöpfer, F.; Carreras, M. C.; Poderoso, J. J.; Boveris, A. Reactions of Peroxynitrite in the Mitochondrial matrix11Paper Dedicated to the Memory of Prof. Lars Ernster, Convener of ICRO-UNESCO in a Series of ICRO Courses in Buenos Aires. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *29* (3–4), 349–356. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00301-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00301-4).
 - (58) Cruthirds, D. L.; Novak, L.; Akhi, K. M.; Sanders, P. W.; Thompson, J. A.; MacMillan-Crow, L. A. Mitochondrial Targets of Oxidative Stress during Renal Ischemia/Reperfusion. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *412* (1), 27–33. [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(03\)00039-0](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(03)00039-0).
 - (59) Ren, X.-Y.; Li, Y.-N.; Qi, J.-S.; Niu, T. Peroxynitrite-Induced Protein Nitration Contributes to Liver Mitochondrial Damage in Diabetic Rats. *J. Diabetes Complications* **2008**, *22* (5), 357–364. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2007.06.013>.
 - (60) Turko, I. V.; Li, L.; Aulak, K. S.; Stuehr, D. J.; Chang, J.-Y.; Murad, F. Protein Tyrosine Nitration in the Mitochondria from Diabetic Mouse Heart. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (36), 33972–33977. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303734200>.
 - (61) Greenacre, S. A. B.; Ischiropoulos, H. Tyrosine Nitration: Localisation, Quantification, Consequences for Protein Function and Signal Transduction. *Free Radic. Res.* **2001**, *34* (6), 541–581. <https://doi.org/10.1080/10715760100300471>.
 - (62) Peluffo, G.; Radi, R. Biochemistry of Protein Tyrosine Nitration in Cardiovascular Pathology. *Cardiovasc. Res.* **2007**, *75* (2), 291–302. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.04.024>.
 - (63) Turko, I. V.; Murad, F. Protein Nitration in Cardiovascular Diseases. *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54* (4), 619–634. <https://doi.org/10.1124/pr.54.4.619>.
 - (64) Tsuji, C.; Shioya, S.; Hirota, Y.; Fukuyama, N.; Kurita, D.; Tanigaki, T.; Ohta, Y.; Nakazawa, H. Increased Production of Nitrotyrosine in Lung Tissue of Rats with Radiation-Induced Acute Lung Injury. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* **2000**, *278* (4), L719–L725. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2000.278.4.L719>.
 - (65) Kaminsky, D. A.; Mitchell, J.; Carroll, N.; James, A.; Soultanakis, R.; Janssen, Y. Nitrotyrosine Formation in the Airways and Lung Parenchyma of Patients with Asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1999**, *104* (4), 747–754. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(99\)70283-6](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(99)70283-6).
 - (66) Haddad, I. Y.; Pataki, G.; Hu, P.; Galliani, C.; Beckman, J. S.; Matalon, S. Quantitation of Nitrotyrosine Levels in Lung Sections of Patients and Animals with Acute Lung Injury. *J. Clin. Invest.* **1994**, *94* (6), 2407–2413. <https://doi.org/10.1172/JCI117607>.
 - (67) Ghosh, S.; Janocha, A. J.; Aronica, M. A.; Swaidani, S.; Comhair, S. A. A.; Xu, W.; Zheng, L.; Kaveti, S.; Kinter, M.; Hazen, S. L.; Erzurum, S. C. Nitrotyrosine Proteome Survey in Asthma Identifies Oxidative Mechanism of Catalase Inactivation. *J. Immunol.* **2006**, *176* (9), 5587–5597. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.9.5587>.
 - (68) Hanazawa, T.; Kharitonov, S. A.; Barnes, P. J. Increased Nitrotyrosine in Exhaled Breath Condensate of Patients with Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2000**, *162* (4), 1273–1276. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.162.4.9912064>.

- (69) Sugiura, H.; Komaki, Y.; Koarai, A.; Ichinose, M. Nitritative Stress in Refractory Asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2008**, *121* (2), 355–360. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.11.009>.
- (70) Castegna, A.; Thongboonkerd, V.; Klein, J. B.; Lynn, B.; Markesbery, W. R.; Butterfield, D. A. Proteomic Identification of Nitrated Proteins in Alzheimer's Disease Brain. *J. Neurochem.* **2003**, *85* (6), 1394–1401. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01786.x>.
- (71) Reynolds, M. R.; Berry, R. W.; Binder, L. I. Nitration in Neurodegeneration: Deciphering the “Hows” “nYs.” *Biochemistry* **2007**, *46* (25), 7325–7336. <https://doi.org/10.1021/bi700430y>.
- (72) Sultana, R.; Poon, H. F.; Cai, J.; Pierce, W. M.; Merchant, M.; Klein, J. B.; Markesbery, W. R.; Butterfield, D. A. Identification of Nitrated Proteins in Alzheimer's Disease Brain Using a Redox Proteomics Approach. *Neurobiol. Dis.* **2006**, *22* (1), 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.10.004>.
- (73) Demicheli, V.; Moreno, D. M.; Radi, R. Human Mn-Superoxide Dismutase Inactivation by Peroxynitrite: A Paradigm of Metal-Catalyzed Tyrosine Nitration *in Vitro* and *in Vivo*. *Metallomics* **2018**, *10* (5), 679–695. <https://doi.org/10.1039/C7MT00348J>.
- (74) Danielson, S. R.; Held, J. M.; Schilling, B.; Oo, M.; Gibson, B. W.; Andersen, J. K. Preferentially Increased Nitration of α -Synuclein at Tyrosine-39 in a Cellular Oxidative Model of Parkinson's Disease. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (18), 7823–7828. <https://doi.org/10.1021/ac901176t>.
- (75) Porter, J. J.; Jang, H. S.; Haque, M. M.; Stuehr, D. J.; Mehl, R. A. Tyrosine Nitration on Calmodulin Enhances Calcium-Dependent Association and Activation of Nitric-Oxide Synthase. *J. Biol. Chem.* **2020**, *295* (8), 2203–2211. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010999>.
- (76) García-Heredia, J. M.; Díaz-Moreno, I.; Nieto, P. M.; Orzáez, M.; Kocanis, S.; Teixeira, M.; Pérez-Payá, E.; Díaz-Quintana, A.; De La Rosa, M. A. Nitration of Tyrosine 74 Prevents Human Cytochrome c to Play a Key Role in Apoptosis Signaling by Blocking Caspase-9 Activation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2010**, *1797* (6–7), 981–993. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2010.03.009>.
- (77) Ritossa, F. A New Puffing Pattern Induced by Temperature Shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* **1962**, *18* (12), 571–573. <https://doi.org/10.1007/BF02172188>.
- (78) Lindquist, S.; Craig, E. A. The Heat-Shock Proteins. *Annu. Rev. Genet.* **1988**, *22* (1), 631–677. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.22.120188.003215>.
- (79) Pearl, L. H.; Prodromou, C. Structure and Mechanism of the Hsp90 Molecular Chaperone Machinery. *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, *75* (1), 271–294. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142738>.
- (80) Taipale, M.; Jarosz, D. F.; Lindquist, S. HSP90 at the Hub of Protein Homeostasis: Emerging Mechanistic Insights. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11* (7), 515–528. <https://doi.org/10.1038/nrm2918>.
- (81) Schopf, F. H.; Biebl, M. M.; Buchner, J. The HSP90 Chaperone Machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18* (6), 345–360. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.20>.
- (82) Prodromou, C.; Morgan, R. M. L. “Tuning” the ATPase Activity of Hsp90. In

- Regulation of Ca²⁺-ATPases, V-ATPases and F-ATPases*; Chakraborti, S., Dhalla, N. S., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2016; pp 469–490. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24780-9_23.
- (83) Burrows, F.; Zhang, H.; Kamal, A. Hsp90 Activation and Cell Cycle Regulation. *Cell Cycle* **2004**, *3* (12), 1530–1536. <https://doi.org/10.4161/cc.3.12.1277>.
 - (84) Pearl, L. H.; Prodromou, C. Structure and in Vivo Function of Hsp90. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10* (1), 46–51. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(99\)00047-0](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(99)00047-0).
 - (85) Echeverria, P. C.; Picard, D. Molecular Chaperones, Essential Partners of Steroid Hormone Receptors for Activity and Mobility. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2010**, *1803* (6), 641–649. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.11.012>.
 - (86) Echeverria, P. C.; Figueras, M. J.; Vogler, M.; Kriehuber, T.; De Miguel, N.; Deng, B.; Dalmasso, M. C.; Matthews, D. E.; Matrajt, M.; Haslbeck, M.; Buchner, J.; Angel, S. O. The Hsp90 Co-Chaperone P23 of Toxoplasma Gondii: Identification, Functional Analysis and Dynamic Interactome Determination. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2010**, *172* (2), 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.04.004>.
 - (87) Seo, Y.-S.; Lee, S.-K.; Song, M.-Y.; Suh, J.-P.; Hahn, T.-R.; Ronald, P.; Jeon, J.-S. The HSP90-SGT1-RAR1 Molecular Chaperone Complex: A Core Modulator in Plant Immunity. *J. Plant Biol.* **2008**, *51* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/BF03030734>.
 - (88) Albakova, Z. HSP90 Multi-Functionality in Cancer. *Front. Immunol.* **2024**, *15*, 1436973. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1436973>.
 - (89) Balch, W. E.; Morimoto, R. I.; Dillin, A.; Kelly, J. W. Adapting Proteostasis for Disease Intervention. *Science* **2008**, *319* (5865), 916–919. <https://doi.org/10.1126/science.1141448>.
 - (90) Gidalevitz, T.; Prahlad, V.; Morimoto, R. I. The Stress of Protein Misfolding: From Single Cells to Multicellular Organisms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3* (6), a009704–a009704. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009704>.
 - (91) Powers, E. T.; Morimoto, R. I.; Dillin, A.; Kelly, J. W.; Balch, W. E. Biological and Chemical Approaches to Diseases of Proteostasis Deficiency. *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78* (1), 959–991. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.114844>.
 - (92) Voisine, C.; Pedersen, J. S.; Morimoto, R. I. Chaperone Networks: Tipping the Balance in Protein Folding Diseases. *Neurobiol. Dis.* **2010**, *40* (1), 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.05.007>.
 - (93) Neckers, L.; Workman, P. Hsp90 Molecular Chaperone Inhibitors: Are We There Yet? *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18* (1), 64–76. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1000>.
 - (94) Miyata, Y.; Koren, J.; Kiray, J.; Dickey, C. A.; Gestwicki, J. E. Molecular Chaperones and Regulation of Tau Quality Control: Strategies for Drug Discovery in Tauopathies. *Future Med. Chem.* **2011**, *3* (12), 1523–1537. <https://doi.org/10.4155/fmc.11.88>.
 - (95) K. Kalia, S.; V. Kalia, L.; J. McLean, P. Molecular Chaperones as Rational Drug Targets for Parkinsons Disease Therapeutics. *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets* **2010**, *9* (6), 741–753. <https://doi.org/10.2174/187152710793237386>.
 - (96) Geller, R.; Taguwa, S.; Frydman, J. Broad Action of Hsp90 as a Host Chaperone

- Required for Viral Replication. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2012**, 1823 (3), 698–706. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.11.007>.
- (97) Shonhai, A.; G. Maier, A.; M. Przyborski, J.; L. Blatch, G. Intracellular Protozoan Parasites of Humans: The Role of Molecular Chaperones in Development and Pathogenesis. *Protein Pept. Lett.* **2011**, 18 (2), 143–157. <https://doi.org/10.2174/092986611794475002>.
- (98) Johnson, J. L. Evolution and Function of Diverse Hsp90 Homologs and Cochaperone Proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2012**, 1823 (3), 607–613. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.09.020>.
- (99) Johnson, J. L.; Brown, C. Plasticity of the Hsp90 Chaperone Machine in Divergent Eukaryotic Organisms. *Cell Stress Chaperones* **2009**, 14 (1), 83–94. <https://doi.org/10.1007/s12192-008-0058-9>.
- (100) Lund, P. A. Microbial Molecular Chaperones. In *Advances in Microbial Physiology*; Elsevier, 2001; Vol. 44, pp 93–140. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(01\)44012-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(01)44012-4).
- (101) Zuehlke, A. D.; Beebe, K.; Neckers, L.; Prince, T. Regulation and Function of the Human HSP90AA1 Gene. *Gene* **2015**, 570 (1), 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.06.018>.
- (102) Maiti, S.; Picard, D. Cytosolic Hsp90 Isoform-Specific Functions and Clinical Significance. *Biomolecules* **2022**, 12 (9), 1166. <https://doi.org/10.3390/biom12091166>.
- (103) Jackson, S. E. Hsp90: Structure and Function. In *Topics in Current Chemistry*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2012; pp 155–240. https://doi.org/10.1007/128_2012_356.
- (104) Lavery, L. A.; Partridge, J. R.; Ramelot, T. A.; Elnatan, D.; Kennedy, M. A.; Agard, D. A. Structural Asymmetry in the Closed State of Mitochondrial Hsp90 (TRAP1) Supports a Two-Step ATP Hydrolysis Mechanism. *Mol. Cell* **2014**, 53 (2), 330–343. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.12.023>.
- (105) Subbarao Sreedhar, A.; Kalmár, É.; Csermely, P.; Shen, Y.-F. Hsp90 Isoforms: Functions, Expression and Clinical Importance. *FEBS Lett.* **2004**, 562 (1–3), 11–15. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(04\)00229-7](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(04)00229-7).
- (106) Csermely, P.; Schnaider, T.; So"ti, C.; Prohászka, Z.; Nardai, G. The 90-kDa Molecular Chaperone Family. *Pharmacol. Ther.* **1998**, 79 (2), 129–168. [https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(98\)00013-8](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(98)00013-8).
- (107) Tsutsumi, S.; Mollapour, M.; Prodromou, C.; Lee, C.-T.; Panaretou, B.; Yoshida, S.; Mayer, M. P.; Neckers, L. M. Charged Linker Sequence Modulates Eukaryotic Heat Shock Protein 90 (Hsp90) Chaperone Activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, 109 (8), 2937–2942. <https://doi.org/10.1073/pnas.1114414109>.
- (108) Prodromou, C.; Roe, S. M.; O'Brien, R.; Ladbury, J. E.; Piper, P. W.; Pearl, L. H. Identification and Structural Characterization of the ATP/ADP-Binding Site in the Hsp90 Molecular Chaperone. *Cell* **1997**, 90 (1), 65–75. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80314-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80314-1).
- (109) Sullivan, W.; Stensgard, B.; Caucutt, G.; Bartha, B.; McMahon, N.; Alnemri, E. S.; Litwack, G.; Toft, D. Nucleotides and Two Functional States of Hsp90. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272 (12), 8007–8012. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.12.8007>.
- (110) Prodromou, C. The ATPase Cycle of Hsp90 Drives a Molecular Clamp' via

- Transient Dimerization of the N-Terminal Domains. *EMBO J.* **2000**, *19* (16), 4383–4392. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.16.4383>.
- (111) Scheibel, T.; Weikl, T.; Buchner, J. Two Chaperone Sites in Hsp90 Differing in Substrate Specificity and ATP Dependence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95* (4), 1495–1499. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.4.1495>.
- (112) Tsutsumi, S.; Mollapour, M.; Graf, C.; Lee, C.-T.; Scroggins, B. T.; Xu, W.; Haslerova, L.; Hessling, M.; Konstantinova, A. A.; Trepel, J. B.; Panaretou, B.; Buchner, J.; Mayer, M. P.; Prodromou, C.; Neckers, L. Hsp90 Charged-Linker Truncation Reverses the Functional Consequences of Weakened Hydrophobic Contacts in the N Domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16* (11), 1141–1147. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1682>.
- (113) Shiau, A. K.; Harris, S. F.; Southworth, D. R.; Agard, D. A. Structural Analysis of E. Coli Hsp90 Reveals Dramatic Nucleotide-Dependent Conformational Rearrangements. *Cell* **2006**, *127* (2), 329–340. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.027>.
- (114) Scheibel, T.; Siegmund, H. I.; Jaenicke, R.; Ganz, P.; Lilie, H.; Buchner, J. The Charged Region of Hsp90 Modulates the Function of the N-Terminal Domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96* (4), 1297–1302. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1297>.
- (115) Louvion, J.-F.; Warth, R.; Picard, D. Two Eukaryote-Specific Regions of Hsp82 Are Dispensable for Its Viability and Signal Transduction Functions in Yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93* (24), 13937–13942. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13937>.
- (116) Meyer, P.; Prodromou, C.; Hu, B.; Vaughan, C.; Roe, S. M.; Panaretou, B.; Piper, P. W.; Pearl, L. H. Structural and Functional Analysis of the Middle Segment of Hsp90: Implications for ATP Hydrolysis and Client Protein and Cochaperone Interactions. *Mol. Cell* **2003**, *11* (3), 647–658. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00065-0](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00065-0).
- (117) Huai, Q.; Wang, H.; Liu, Y.; Kim, H.-Y.; Toft, D.; Ke, H. Structures of the N-Terminal and Middle Domains of E. Coli Hsp90 and Conformation Changes upon ADP Binding. *Structure* **2005**, *13* (4), 579–590. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.12.018>.
- (118) Meng, X.; Devin, J.; Sullivan, W. P.; Toft, D.; Baulieu, E.-E.; Catelli, M.-G. Mutational Analysis of Hsp90 α Dimerization and Subcellular Localization: Dimer Disruption Does Not Impede ‘in Vivo’ Interaction with Estrogen Receptor. *J. Cell Sci.* **1996**, *109* (7), 1677–1687. <https://doi.org/10.1242/jcs.109.7.1677>.
- (119) Soñti, C.; Vermes, Á.; Haystead, T. A. J.; Csermely, P. Comparative Analysis of the ATP-binding Sites of Hsp90 by Nucleotide Affinity Cleavage: A Distinct Nucleotide Specificity of the C-terminal ATP-binding Site. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270* (11), 2421–2428. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03610.x>.
- (120) Altieri, D. C.; Stein, G. S.; Lian, J. B.; Languino, L. R. TRAP-1, the Mitochondrial Hsp90. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2012**, *1823* (3), 767–773. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.08.007>.
- (121) Altieri, D. C. Hsp90 Regulation of Mitochondrial Protein Folding: From Organelle Integrity to Cellular Homeostasis. *Cell. Mol. Life Sci.* **2013**, *70* (14), 2463–2472. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1177-0>.

- (122) Krukenberg, K. A.; Street, T. O.; Lavery, L. A.; Agard, D. A. Conformational Dynamics of the Molecular Chaperone Hsp90. *Q. Rev. Biophys.* **2011**, *44* (2), 229–255. <https://doi.org/10.1017/S0033583510000314>.
- (123) Li, J.; Soroka, J.; Buchner, J. The Hsp90 Chaperone Machinery: Conformational Dynamics and Regulation by Co-Chaperones. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2012**, *1823* (3), 624–635. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.09.003>.
- (124) Voss, A. K.; Thomas, T.; Gruss, P. Mice Lacking HSP90 β Fail to Develop a Placental Labyrinth. *Development* **2000**, *127* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1242/dev.127.1.1>.
- (125) Hoter, A.; El-Sabban, M. E.; Naim, H. Y. The HSP90 Family: Structure, Regulation, Function, and Implications in Health and Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (9), 2560. <https://doi.org/10.3390/ijms19092560>.
- (126) Chen, S.; Smith, D. F. Hop as an Adaptor in the Heat Shock Protein 70 (Hsp70) and Hsp90 Chaperone Machinery. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (52), 35194–35200. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.52.35194>.
- (127) Johnson, J. L.; Toft, D. O. A Novel Chaperone Complex for Steroid Receptors Involving Heat Shock Proteins, Immunophilins, and P23. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (40), 24989–24993. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)31487-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)31487-4).
- (128) Jing, E.; Sundararajan, P.; Majumdar, I. D.; Hazarika, S.; Fowler, S.; Szeto, A.; Gesta, S.; Mendez, A. J.; Vishnudas, V. K.; Sarangarajan, R.; Narain, N. R. Hsp90 β Knockdown in DIO Mice Reverses Insulin Resistance and Improves Glucose Tolerance. *Nutr. Metab.* **2018**, *15* (1), 11. <https://doi.org/10.1186/s12986-018-0242-6>.
- (129) Kuan, Y.-C.; Hashidume, T.; Shibata, T.; Uchida, K.; Shimizu, M.; Inoue, J.; Sato, R. Heat Shock Protein 90 Modulates Lipid Homeostasis by Regulating the Stability and Function of Sterol Regulatory Element-Binding Protein (SREBP) and SREBP Cleavage-Activating Protein. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292* (7), 3016–3028. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.767277>.
- (130) Angelo, G.; Lamon-Fava, S.; Sonna, L. A.; Lindauer, M. L.; Wood, R. J. Heat Shock Protein 90 β : A Novel Mediator of Vitamin D Action. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *367* (3), 578–583. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.12.179>.
- (131) Luo, S.; Zhang, B.; Dong, X.; Tao, Y.; Ting, A.; Zhou, Z.; Meixiong, J.; Luo, J.; Chiu, F. C. A.; Xiong, W. C.; Mei, L. HSP90 β Regulates Rapsyn Turnover and Subsequent AChR Cluster Formation and Maintenance. *Neuron* **2008**, *60* (1), 97–110. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.08.013>.
- (132) Ye, Y.; Quijano, C.; Robinson, K. M.; Ricart, K. C.; Strayer, A. L.; Garner, M. A.; Shacka, J. J.; Kirk, M.; Barnes, S.; Accavitti-Loper, M. A.; Radi, R.; Beckman, J. S.; Estévez, A. G. Prevention of Peroxynitrite-Induced Apoptosis of Motor Neurons and PC12 Cells by Tyrosine-Containing Peptides. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (9), 6324–6337. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610800200>.
- (133) Franco, M. C.; Ye, Y.; Refakis, C. A.; Feldman, J. L.; Stokes, A. L.; Basso, M.; Melero Fernández De Mera, R. M.; Sparrow, N. A.; Calingasan, N. Y.; Kiaei, M.; Rhoads, T. W.; Ma, T. C.; Grumet, M.; Barnes, S.; Beal, M. F.; Beckman, J. S.; Mehl, R.; Estévez, A. G. Nitration of Hsp90 Induces Cell Death. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110* (12). <https://doi.org/10.1073/pnas.1215177110>.

- (134) Franco, M. C.; Ricart, K. C.; Gonzalez, A. S.; Dennys, C. N.; Nelson, P. A.; Janes, M. S.; Mehl, R. A.; Landar, A.; Estévez, A. G. Nitration of Hsp90 on Tyrosine 33 Regulates Mitochondrial Metabolism. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290* (31), 19055–19066. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.663278>.
- (135) Logan, I. E.; Nguyen, K. T.; Chatterjee, T.; Manivannan, B.; Paul, N. P.; Kim, S. R.; Sixta, E. M.; Bastian, L. P.; Marean-Reardon, C.; Karajannis, M. A.; Fernández-Valle, C.; Estevez, A. G.; Franco, M. C. Selective Nitration of Hsp90 Acts as a Metabolic Switch Promoting Tumor Cell Proliferation. *Redox Biol.* **2024**, *75*, 103249. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2024.103249>.
- (136) Carugo, O.; Djinić-Carugo, K. Structural Biology: A Golden Era. *PLOS Biol.* **2023**, *21* (6), e3002187. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002187>.
- (137) Nussinov, R.; Tsai, C.-J.; Shehu, A.; Jang, H. Computational Structural Biology: Successes, Future Directions, and Challenges. *Molecules* **2019**, *24* (3), 637. <https://doi.org/10.3390/molecules24030637>.
- (138) Soares, C. M.; Lousa, D. Structural Bioinformatics: Exciting Times in a Rapidly Evolving Field. *FEBS Open Bio* **2025**, *15* (2), 200–201. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13968>.
- (139) Chatterjee, T.; Taboada, A.; Logan, I. E.; Paul, P. N.; Huerta, M.; Reardon, P.; Radi, R.; Zeida, A.; Franco, M. C. Nitration-Driven Structural Changes in Hsp90 Linked to Gain of Pathological Functions. *Biochem. J.* **2025**, *482* (16), 1209–1228. <https://doi.org/10.1042/BCJ20253230>.
- (140) Frenkel, D.; Smit, B. Introduction. In *Understanding Molecular Simulation*; Elsevier, 2002; pp 1–6. <https://doi.org/10.1016/B978-012267351-1/50003-1>.
- (141) Leach, A. R. *Molecular Modelling: Principles and Applications*, 2nd ed.; Prentice Hall: Harlow, England ; New York, 2001.
- (142) Wang, E.; Sun, H.; Wang, J.; Wang, Z.; Liu, H.; Zhang, J. Z. H.; Hou, T. End-Point Binding Free Energy Calculation with MM/PBSA and MM/GBSA: Strategies and Applications in Drug Design. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (16), 9478–9508. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00055>.
- (143) Adediwura, V. A.; Koirala, K.; Do, H. N.; Wang, J.; Miao, Y. Understanding the Impact of Binding Free Energy and Kinetics Calculations in Modern Drug Discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2024**, *19* (6), 671–682. <https://doi.org/10.1080/17460441.2024.2349149>.
- (144) Miller, B. R.; McGee, T. D.; Swails, J. M.; Homeyer, N.; Gohlke, H.; Roitberg, A. E. *MMPBSA.py*: An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, *8* (9), 3314–3321. <https://doi.org/10.1021/ct300418h>.
- (145) Genheden, S.; Ryde, U. The MM/PBSA and MM/GBSA Methods to Estimate Ligand-Binding Affinities. *Expert Opin. Drug Discov.* **2015**, *10* (5), 449–461. <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1032936>.
- (146) Massova, I.; Kollman, P. A. Combined Molecular Mechanical and Continuum Solvent Approach (MM-PBSA/GBSA) to Predict Ligand Binding. *Perspect. Drug Discov. Des.* **2000**, *18* (1), 113–135. <https://doi.org/10.1023/A:1008763014207>.
- (147) Onuchic, J. N.; Luthey-Schulten, Z.; Wolynes, P. G. Theory of Protein Folding: The Energy Landscape Perspective. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1997**, *48* (1), 545–600. <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.48.1.545>.

- (148) Bryngelson, J. D.; Wolynes, P. G. Spin Glasses and the Statistical Mechanics of Protein Folding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**, *84* (21), 7524–7528. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.21.7524>.
- (149) Ferreira, D. U.; Hegler, J. A.; Komives, E. A.; Wolynes, P. G. Localizing Frustration in Native Proteins and Protein Assemblies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104* (50), 19819–19824. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709915104>.
- (150) Parra, R. G.; Schafer, N. P.; Radusky, L. G.; Tsai, M.-Y.; Guzovsky, A. B.; Wolynes, P. G.; Ferreira, D. U. Protein Frustratometer 2: A Tool to Localize Energetic Frustration in Protein Molecules, Now with Electrostatics. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44* (W1), W356–W360. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw304>.
- (151) Rausch, A. O.; Freiburger, M. I.; Leonetti, C. O.; Luna, D. M.; Radusky, L. G.; Wolynes, P. G.; Ferreira, D. U.; Parra, R. G. FrustratometerR: An R-Package to Compute Local Frustration in Protein Structures, Point Mutants and MD Simulations. *Bioinformatics* **2021**, *37* (18), 3038–3040. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab176>.
- (152) Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O.; Tunyasuvunakool, K.; Bates, R.; Žídek, A.; Potapenko, A.; Bridgland, A.; Meyer, C.; Kohl, S. A. A.; Ballard, A. J.; Cowie, A.; Romera-Paredes, B.; Nikolov, S.; Jain, R.; Adler, J.; Back, T.; Petersen, S.; Reiman, D.; Clancy, E.; Zielinski, M.; Steinegger, M.; Pacholska, M.; Berghammer, T.; Bodenstein, S.; Silver, D.; Vinyals, O.; Senior, A. W.; Kavukcuoglu, K.; Kohli, P.; Hassabis, D. Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold. *Nature* **2021**, *596* (7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
- (153) Varadi, M.; Anyango, S.; Deshpande, M.; Nair, S.; Natassia, C.; Yordanova, G.; Yuan, D.; Stroe, O.; Wood, G.; Laydon, A.; Žídek, A.; Green, T.; Tunyasuvunakool, K.; Petersen, S.; Jumper, J.; Clancy, E.; Green, R.; Vora, A.; Lutfi, M.; Figurnov, M.; Cowie, A.; Hobbs, N.; Kohli, P.; Kleywegt, G.; Birney, E.; Hassabis, D.; Velankar, S. AlphaFold Protein Structure Database: Massively Expanding the Structural Coverage of Protein-Sequence Space with High-Accuracy Models. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50* (D1), D439–D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>.
- (154) Meagher, K. L.; Redman, L. T.; Carlson, H. A. Development of Polyphosphate Parameters for Use with the AMBER Force Field. *J. Comput. Chem.* **2003**, *24* (9), 1016–1025. <https://doi.org/10.1002/jcc.10262>.
- (155) Moreno, D. M.; Martí, M. A.; De Biase, P. M.; Estrin, D. A.; Demicheli, V.; Radi, R.; Boechi, L. Exploring the Molecular Basis of Human Manganese Superoxide Dismutase Inactivation Mediated by Tyrosine 34 Nitration. *Arch. Biochem. Biophys.* **2011**, *507* (2), 304–309. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.12.011>.
- (156) Socher, E.; Sticht, H. Mimicking Titration Experiments with MD Simulations: A Protocol for the Investigation of pH-Dependent Effects on Proteins. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 22523. <https://doi.org/10.1038/srep22523>.
- (157) Gohda, K. Understanding of ATP-Lid Conformational Dynamics in the N-Terminal Domain of Hsp90 and Its Mutants by Use of a Computational Biochemistry Approach. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2025**, 1–12. <https://doi.org/10.1080/07391102.2025.2487202>.
- (158) Hessling, M.; Richter, K.; Buchner, J. Dissection of the ATP-Induced Conformational Cycle of the Molecular Chaperone Hsp90. *Nat. Struct. Mol. Biol.*

- 2009**, 16 (3), 287–293. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1565>.
- (159) Henot, F.; Rioual, E.; Favier, A.; Macek, P.; Crublet, E.; Josso, P.; Brutscher, B.; Frech, M.; Gans, P.; Loison, C.; Boisbouvier, J. Visualizing the Transiently Populated Closed-State of Human HSP90 ATP Binding Domain. *Nat. Commun.* **2022**, 13 (1), 7601. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35399-8>.
- (160) Huck, J. D.; Que, N. L. S.; Sharma, S.; Taldone, T.; Chiosis, G.; Gewirth, D. T. Structures of Hsp90 α and Hsp90 β Bound to a Purine-scaffold Inhibitor Reveal an Exploitable Residue for Drug Selectivity. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2019**, 87 (10), 869–877. <https://doi.org/10.1002/prot.25750>.
- (161) Wright, L.; Barril, X.; Dymock, B.; Sheridan, L.; Surgenor, A.; Beswick, M.; Drysdale, M.; Collier, A.; Massey, A.; Davies, N.; Fink, A.; Fromont, C.; Aherne, W.; Boxall, K.; Sharp, S.; Workman, P.; Hubbard, R. E. Structure-Activity Relationships in Purine-Based Inhibitor Binding to HSP90 Isoforms. *Chem. Biol.* **2004**, 11 (6), 775–785. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.03.033>.
- (162) Yun, T. J.; Harning, E. K.; Giza, K.; Rabah, D.; Li, P.; Arndt, J. W.; Luchetti, D.; Biamonte, M. A.; Shi, J.; Lundgren, K.; Manning, A.; Kehry, M. R. EC144, a Synthetic Inhibitor of Heat Shock Protein 90, Blocks Innate and Adaptive Immune Responses in Models of Inflammation and Autoimmunity. *J. Immunol.* **2011**, 186 (1), 563–575. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000222>.
- (163) Khandelwal, A.; Kent, C. N.; Balch, M.; Peng, S.; Mishra, S. J.; Deng, J.; Day, V. W.; Liu, W.; Subramanian, C.; Cohen, M.; Holzbeierlein, J. M.; Matts, R.; Blagg, B. S. J. Structure-Guided Design of an Hsp90 β N-Terminal Isoform-Selective Inhibitor. *Nat. Commun.* **2018**, 9 (1), 425. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02013-1>.
- (164) Neumann, H.; Hazen, J. L.; Weinstein, J.; Mehl, R. A.; Chin, J. W. Genetically Encoding Protein Oxidative Damage. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130 (12), 4028–4033. <https://doi.org/10.1021/ja710100d>.
- (165) Cunningham, C. N.; Southworth, D. R.; Krukenberg, K. A.; Agard, D. A. The Conserved Arginine 380 of Hsp90 Is Not a Catalytic Residue, but Stabilizes the Closed Conformation Required for ATP Hydrolysis. *Protein Sci.* **2012**, 21 (8), 1162–1171. <https://doi.org/10.1002/pro.2103>.
- (166) Cunningham, C. N.; Krukenberg, K. A.; Agard, D. A. Intra- and Intermonomer Interactions Are Required to Synergistically Facilitate ATP Hydrolysis in Hsp90. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283 (30), 21170–21178. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800046200>.
- (167) Frieg, B.; Görg, B.; Qvartrskhava, N.; Jeitner, T.; Homeyer, N.; Häussinger, D.; Gohlke, H. Mechanism of Fully Reversible, pH-Sensitive Inhibition of Human Glutamine Synthetase by Tyrosine Nitration. *J. Chem. Theory Comput.* **2020**, 16 (7), 4694–4705. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.0c00249>.
- (168) Demicheli, V.; Tomasina, F.; Sastre, S.; Zeida, A.; Tórtora, V.; Lima, A.; Batthyány, C.; Radi, R. Cardiolipin Interactions with Cytochrome c Increase Tyrosine Nitration Yields and Site-Specificity. *Arch. Biochem. Biophys.* **2021**, 703, 108824. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108824>.
- (169) Demicheli, V.; Moreno, D. M.; Jara, G. E.; Lima, A.; Carballal, S.; Ríos, N.; Batthyány, C.; Ferrer-Sueta, G.; Quijano, C.; Estrín, D. A.; Martí, M. A.; Radi, R. Mechanism of the Reaction of Human Manganese Superoxide Dismutase with Peroxynitrite: Nitration of Critical Tyrosine 34. *Biochemistry* **2016**, 55 (24),

- 3403–3417. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00045>.
- (170) Martinez, A.; Peluffo, G.; Petruk, A. A.; Hugo, M.; Piñeyro, D.; Demicheli, V.; Moreno, D. M.; Lima, A.; Batthyány, C.; Durán, R.; Robello, C.; Martí, M. A.; Larrieux, N.; Buschiazio, A.; Trujillo, M.; Radi, R.; Piacenza, L. Structural and Molecular Basis of the Peroxynitrite-Mediated Nitration and Inactivation of Trypanosoma Cruzi Iron-Superoxide Dismutases (Fe-SODs) A and B. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289* (18), 12760–12778. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.545590>.
 - (171) Abriata, L. A.; Cassina, A.; Tórtora, V.; Marín, M.; Souza, J. M.; Castro, L.; Vila, A. J.; Radi, R. Nitration of Solvent-Exposed Tyrosine 74 on Cytochrome c Triggers Heme Iron-Methionine 80 Bond Disruption. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (1), 17–26. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807203200>.
 - (172) Tomasina, F.; Martínez, J.; Zeida, A.; Chiribao, M. L.; Demicheli, V.; Correa, A.; Quijano, C.; Castro, L.; Carnahan, R. H.; Vinson, P.; Goff, M.; Cooper, T.; McDonald, W. H.; Castellana, N.; Hannibal, L.; Morse, P. T.; Wan, J.; Hüttemann, M.; Jemmerson, R.; Piacenza, L.; Radi, R. De Novo Sequencing and Construction of a Unique Antibody for the Recognition of Alternative Conformations of Cytochrome c in Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2022**, *119* (47), e2213432119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2213432119>.
 - (173) Giasson, B. I.; Duda, J. E.; Murray, I. V. J.; Chen, Q.; Souza, J. M.; Hurtig, H. I.; Ischiropoulos, H.; Trojanowski, J. Q.; -Y. Lee, V. M. Oxidative Damage Linked to Neurodegeneration by Selective α -Synuclein Nitration in Synucleinopathy Lesions. *Science* **2000**, *290* (5493), 985–989. <https://doi.org/10.1126/science.290.5493.985>.
 - (174) Ramdial, K.; Franco, M. C.; Estevez, A. G. Cellular Mechanisms of Peroxynitrite-Induced Neuronal Death. *Brain Res. Bull.* **2017**, *133*, 4–11. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.05.008>.
 - (175) Estévez, A. G.; Spear, N.; Thompson, J. A.; Cornwell, T. L.; Radi, R.; Barbeito, L.; Beckman, J. S. Nitric Oxide-Dependent Production of cGMP Supports the Survival of Rat Embryonic Motor Neurons Cultured with Brain-Derived Neurotrophic Factor. *J. Neurosci.* **1998**, *18* (10), 3708–3714. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-10-03708.1998>.
 - (176) Uversky, V. N.; Yamin, G.; Munishkina, L. A.; Karymov, M. A.; Millett, I. S.; Doniach, S.; Lyubchenko, Y. L.; Fink, A. L. Effects of Nitration on the Structure and Aggregation of α -Synuclein. *Mol. Brain Res.* **2005**, *134* (1), 84–102. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.11.014>.
 - (177) Jandy, M.; Noor, A.; Nelson, P.; Dennys, C. N.; Karabinas, I. M.; Pestoni, J. C.; Singh, G. D.; Luc, L.; Devyldere, R.; Perdomo, N.; Mitchell, C. E.; Adams, L.; Fuse, M. A.; Mendoza, F. A.; Marean-Reardon, C. L.; Mehl, R. A.; Estevez, A. G.; Franco, M. C. Peroxynitrite Nitration of Tyr 56 in Hsp90 Induces PC12 Cell Death through P2X7R-Dependent PTEN Activation. *Redox Biol.* **2022**, *50*, 102247. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102247>.
 - (178) Pestoni, J. C.; Klingeman Plati, S.; Valdivia Camacho, O. D.; Fuse, M. A.; Onatunde, M.; Sparrow, N. A.; Karajannis, M. A.; Fernández-Valle, C.; Franco, M. C. Peroxynitrite Supports a Metabolic Reprogramming in Merlin-Deficient Schwann Cells and Promotes Cell Survival. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294* (30), 11354–11368. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.007152>.
 - (179) Wang, R. Y.-R.; Noddings, C. M.; Kirschke, E.; Myasnikov, A. G.; Johnson, J. L.;

- Agard, D. A. Structure of Hsp90–Hsp70–Hop–GR Reveals the Hsp90 Client-Loading Mechanism. *Nature* **2022**, 601 (7893), 460–464. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04252-1>.
- (180) Southworth, D. R.; Agard, D. A. Client-Loading Conformation of the Hsp90 Molecular Chaperone Revealed in the Cryo-EM Structure of the Human Hsp90:Hop Complex. *Mol. Cell* **2011**, 42 (6), 771–781. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.04.023>.
- (181) Lepvrier, E.; Moullintraffort, L.; Nigen, M.; Goude, R.; Allegro, D.; Barbier, P.; Peyrot, V.; Thomas, D.; Nazabal, A.; Garnier, C. Hsp90 Oligomers Interacting with the Aha1 Cochaperone: An Outlook for the Hsp90 Chaperone Machineries. *Anal. Chem.* **2015**, 87 (14), 7043–7051. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00051>.
- (182) Mollapour, M.; Tsutsumi, S.; Donnelly, A. C.; Beebe, K.; Tokita, M. J.; Lee, M.-J.; Lee, S.; Morra, G.; Bourboulia, D.; Scroggins, B. T.; Colombo, G.; Blagg, B. S.; Panaretou, B.; Stetler-Stevenson, W. G.; Trepel, J. B.; Piper, P. W.; Prodromou, C.; Pearl, L. H.; Neckers, L. Swe1Wee1-Dependent Tyrosine Phosphorylation of Hsp90 Regulates Distinct Facets of Chaperone Function. *Mol. Cell* **2010**, 37 (3), 333–343. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.005>.
- (183) Ali, M. M. U.; Roe, S. M.; Vaughan, C. K.; Meyer, P.; Panaretou, B.; Piper, P. W.; Prodromou, C.; Pearl, L. H. Crystal Structure of an Hsp90–Nucleotide–P23/Sba1 Closed Chaperone Complex. *Nature* **2006**, 440 (7087), 1013–1017. <https://doi.org/10.1038/nature04716>.
- (184) Moullintraffort, L.; Bruneaux, M.; Nazabal, A.; Allegro, D.; Giudice, E.; Zal, F.; Peyrot, V.; Barbier, P.; Thomas, D.; Garnier, C. Biochemical and Biophysical Characterization of the Mg²⁺-Induced 90-kDa Heat Shock Protein Oligomers. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285 (20), 15100–15110. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.094698>.
- (185) Lepvrier, E.; Thomas, D.; Garnier, C. Hsp90 Quaternary Structures and the Chaperone Cycle: Highly Flexible Dimeric and Oligomeric Structures and Their Regulation by Co-Chaperones. *Curr. Proteomics* **2018**, 16 (1), 5–11. <https://doi.org/10.2174/1570164615666180522095147>.
- (186) Chadli, A.; Ladjimi, M. M.; Baulieu, E.-E.; Catelli, M. G. Heat-Induced Oligomerization of the Molecular Chaperone Hsp90. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274 (7), 4133–4139. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.7.4133>.
- (187) Lee, C.-C.; Lin, T.-W.; Ko, T.-P.; Wang, A. H.-J. The Hexameric Structures of Human Heat Shock Protein 90. *PLoS ONE* **2011**, 6 (5), e19961. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019961>.
- (188) Nemoto, T.; Matsusaka, T.; Ota, M.; Takagi, T.; Collinge, D. B.; Walther-Larsen, H. Dimerization Characteristics of the 94-kDa Glucose-Regulated Protein. *J. Biochem. (Tokyo)* **1996**, 120 (2), 249–256. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021406>.
- (189) Nemoto, T.; Sato, N. Oligomeric Forms of the 90-kDa Heat Shock Protein. *Biochem. J.* **1998**, 330 (2), 989–995. <https://doi.org/10.1042/bj3300989>.
- (190) Jackson, S. E. Hsp90: Structure and Function. In *Molecular Chaperones*; Jackson, S., Ed.; Topics in Current Chemistry; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2012; Vol. 328, pp 155–240. https://doi.org/10.1007/128_2012_356.
- (191) Krukenberg, K. A.; Southworth, D. R.; Street, T. O.; Agard, D. A. pH-Dependent

- Conformational Changes in Bacterial Hsp90 Reveal a Grp94-Like Conformation at pH 6 That Is Highly Active in Suppression of Citrate Synthase Aggregation. *J. Mol. Biol.* **2009**, 390 (2), 278–291. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.04.080>.
- (192) Southworth, D. R.; Agard, D. A. Species-Dependent Ensembles of Conserved Conformational States Define the Hsp90 Chaperone ATPase Cycle. *Mol. Cell* **2008**, 32 (5), 631–640. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.10.024>.
- (193) Sanchez, J.; Carter, T. R.; Cohen, M. S.; Blagg, B. S. J. Old and New Approaches to Target the Hsp90 Chaperone. *Curr. Cancer Drug Targets* **2020**, 20 (4), 253–270. <https://doi.org/10.2174/1568009619666191202101330>.
- (194) Laio, A.; Parrinello, M. Escaping Free-Energy Minima. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, 99 (20), 12562–12566. <https://doi.org/10.1073/pnas.202427399>.
- (195) Barducci, A.; Bussi, G.; Parrinello, M. Well-Tempered Metadynamics: A Smoothly Converging and Tunable Free-Energy Method. *Phys. Rev. Lett.* **2008**, 100 (2), 020603. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.100.020603>.
- (196) Zwier, M. C.; Adelman, J. L.; Kaus, J. W.; Pratt, A. J.; Wong, K. F.; Rego, N. B.; Suárez, E.; Lettieri, S.; Wang, D. W.; Grabe, M.; Zuckerman, D. M.; Chong, L. T. WESTPA: An Interoperable, Highly Scalable Software Package for Weighted Ensemble Simulation and Analysis. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, 11 (2), 800–809. <https://doi.org/10.1021/ct5010615>.
- (197) Narang, D.; Lento, C.; J. Wilson, D. HDX-MS: An Analytical Tool to Capture Protein Motion in Action. *Biomedicines* **2020**, 8 (7), 224. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8070224>.

7. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DE ESTA TESIS

Como se mencionó oportunamente, el fruto de la colaboración científica con el grupo dirigido por la Dra. Maria Clara Franco fue recientemente publicado:

Chatterjee, T.; Taboada, A.; Logan, I. E.; Paul, P. N.; Huerta, M.; Reardon, P.; Radi, R.; Zeida, A.; Franco, M. C. "Nitration-Driven Structural Changes in Hsp90 Linked to Gain of Pathological Functions" *Biochem. J.* **2025**, 482 (16), 1209–1228. <https://doi.org/10.1042/BCJ20253230>.

Además se tuvo la oportunidad de presentar estos resultados en distintos eventos científicos nacionales e internacionales:

- "Consecuencias estructurales y funcionales de la nitración de la chaperona Hsp90". Póster presentado en: LI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica (SAB), Córdoba, Argentina, 2023.
- "Structural and functional consequences of Hsp90 chaperone nitration". Póster presentado en: XIII Jornadas de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular (SBBM), Montevideo, Uruguay, 2023. (Premio obtenido a mejor Póster).
- "Structural and functional consequences of Hsp90 chaperone nitration". Presentación oral en el marco de la 30ª conferencia anual de la Society for Redox Biology and Medicine (SfRBM), Punta del Este, Uruguay, 2023.
- "Structural and functional consequences of Hsp90 chaperone nitration". Póster presentado en: II Simposio CONESUL, Buenos Aires, Argentina, 2024.
- "Consecuencias estructurales y funcionales de la nitración de la chaperona Hsp90". Presentación oral en el VIII Simposio CEINBIO, Rivera, Uruguay, 2025.

8. AGRADECIMIENTOS

A Ari, por su gran capacidad como tutor, su claridad a la hora de explicar y su disposición para enseñar.

A Rafael, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y formarme en un espacio donde se trabaja de manera excelente, y que además me abrió puertas a experiencias que enriquecieron mi trayectoria.

A nuestras colaboradoras de este trabajo, Maca y Tilo, cuyo aporte hizo posible parte de los resultados presentados y también la publicación de un artículo científico.

A los integrantes del tribunal, Laura, Diego y Pablo, por su tiempo y disposición para leer y evaluar este trabajo de Tesis.

A la Plataforma de Bioquímica Computacional y Estructural, Seba, Ari y los Santis (Sastre y Mansilla), por el espacio de trabajo compartido, siempre abierto a discutir resultados e intercambiar ideas. En particular gracias a Santi Sastre, que fue un gran compañero y me ayudó incontables veces a resolver problemas que yo solo no podía destrabar, además de acompañar incontables veces para tomar café.

A mis compañeros del “call center”, por generar siempre un ambiente muy ameno y divertido. Todo este trayecto fue realmente disfrutable, en gran parte gracias a ustedes: Jose, Nico, Jenny, Inés, Mati, Rodri, Marce, Guille, Lore, Gabi, Mauri y al resto del grupo. A todos los integrantes del Departamento de Bioquímica y Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO).

A la Universidad de la República en general y la Facultad de Medicina. A las agencias que financiaron el trabajo: PEDECIBA Bioinformática, ANII; y también a la plataforma de cómputo Clusteruy.

Agradezco también a las personas fuera del ámbito de trabajo que, de una forma u otra, acompañaron este proceso.