# Modelado de la estructura tridimensional de proteínas para las que no hay homólogos con estructura resuelta- versión 2016 - informe

## *2. RESUMEN*

SE UTILIZARON HERRAMIENTAS DE SC. PARA ANALIZAR DIVERSOS SITEMAS MCROMOLECULARES Y MODELAR PROTEÍNAS, COMO HERRAMIENTAS PARA COMPLEMENTAR DATOS EXPERIMENTALES QUE PERMITEN OBTENER EXPLICACIONES A NIVEL ATÓMICO DE FENÓMENOS QUE INVOLUCRAN INTERACCIÓN ENTRE LIGANDOS Y MACROMOLÉCULAS Y QUE SON INVESTIGADOS EN FORMA EXPERIMENTAL, PERO CON MENOR NIVEL DE DETALLE. EN PARTICULAR SE AVANZÓ EN EL ESTUDIO DE LA CYANURO DEHYDRATAS BACTERIANA, LA COLINA MONOXIGENASA DE PLANTAS, LAS PIROFOSFATASAS INORGÁNICAS SOLUBLES DE ARABIDOPSIS, UN CANAL DE FOSFATO DE NICOTIANA SP Y LOS COMPLEJOS DE DERIVADOS CITOTÓXICOS DE TIAZOLO[5,4b]QUINOLINA INTERCALADA AL DNA. COMO PRODUCTOS SE PUBLICARON 2 TRABAJOS Y SE SOMETIÓ UNO MÁS. SE CONCLUYÓ EL TRABAJO DE UN POSDOC Y HAY DOS ALUMNOS DE DOCOTRADO EN EL PROCESO DE ESCRITURA DE TESIS Y DOS MÁS AVANZARON EN SU INVESTIGACIÓN.

## *3. RESULTADOS*

CIANURO DEHYDRATASA

Se realizó el ajuste del modelo de la Cianuro dehydratasa de *Rodococcus* mediante simulaciones de dinámica molecular, obteniendo una estructura cuya calificación por ROSETTA-design/HMMer recuperó su propia secuencia de la base de datos en el primer lugar de la lista y con un índice cercano a 0.5 para la "relevancia biológica". Esto indica que el modelo es lo mejor que se puede obtener considerando el sesgo propio de los campos de fuerza.

Se realizaron la mutaciones *in sílico,* el acoplamiento molecular de cianuro a la proteína original y simulaciones de Dinámica molecular corta de los complejos con repeticiones, para un total de 120 simulaciones. Los resultados revelaron que sólo algunos de los complejos fueron estables y confirmaron el efecto desestabilizante de las mutaciones sobre la unión de cianuro. Además, permitieron ubicar un posible sitio de interacción con cianuro que no es el sitio activo, pues no involucra a ninguno de los residuos que han sido identificados como esenciales para la actividad por estudios previos. Los resultados forman parte del informe de la Estancia POSDOCTORAL del Dr. DR. MENANDRO CAMARILLO CADENA sometido a CONCyT y se incluirán en una publicación que está en preparación.

COLINA MONOXIGENASA.

La colina monoxigenasa de *Spinacea oleraceae* (espinaca) representó un verdadero desafío, ya que nuestros intentos iniciales produjeron modelos con baja relevancia biológica. Nuestros intentos por simular mediante MD a la proteína para hacerla converger a una estructura cercana a la biológicamente relevante no tuvieron éxito, debido a la presencia de los centros $Cys_2Fe_2S_2$ e $His_2$-Fe-Asp $O_2$. Para los que se desconoce incluso el estado de espín de los centro metálicos. A fin de poder simular esta proteína construímos diversos modelos basados en moldes muy lejanos en la filogenia y tuvimos que desarrollar topologías razonables para los centros metálicos. Este trabajo nos tomó cerca de 6 meses, antes de poder realmente someter las simulaciones productivas. RAZÓN POR LA CUAL NO SE UTILIZÓ TODO EL TIEMPO ORIGINALMENTE SOLICITADO.

Afortunadamente, luego de numerosos intentos infructuosos, la sexta ronda de modelado tuvo éxito dando lugar a un modelo, que al igual que el de la cianuro dehydratasa recuperó en el protocolo ROSETTA-design/HMMer su propia secuencia de la base de datos, en el primer lugar de la lista y con un índice cercano a 0.5 para la "relevancia biológica". A partir de este modelo realizamos el acoplamiento molecular del sustrato y modelamos las proteínas ortólogas de Arabidopsis, Arróz, Maíz Soya, trigo y Cebada, tras lo cual se realizó el acoplamiento molecular del sustrato y el análisis del sitio activo. Se está conformando un publicación que se someterá en 2017. Este trabajo es la parte central de la tesis doctoral de JAVIER CARRILLO CAMPOS, quien también estará terminando su doctorado en 2017.

PIROFOSFATASAS INORGÁNICAS SOLUBLES.

Como parte del trabajo doctoral de la M. en. C. MORAYNA GUTIÉRREZ LUNA, quién es alumna de mi grupo de laboratorio, se realizó el análisis filogenético y la comparación estructural de las proteínas de *Arabidopsis thaliana*, contra las ya resueltas de Bacterias termófilas (*P. horikoshii*) y levadura (*S. cereviciae*). Para este trabajo se aprovecharon las herramientas de suporcómputo, para acortar los tiempos de muestreo de los árboles filogenéticos y las comparaciones estructurales, lo que complementó los datos experimentales que forman parte de dicho trabajo. La tesis de la M. en. C. MORAYNA GUTIÉRREZ LUNA se encuentra en fase de escritura y se publicó el trabajo 1 (con agradecimiento a SC).

CANAL DE FOSFATO EN NICOTIANA.

Las proteínas de membrana se encuentran entre las más difíciles de modelar, dado que se cuenta con una número muy limitado de estructuras conocidas por métodos experimentales. Además, las simulaciones de Dinámica Molecular en membranas suelen restringir los cambios conformacionales de las proteínas, de manera que los modelos que presentan una arreglo incorrecto de las regiones transmembranales suelen no converger hacia el modelo correcto. En este caso, la proteína de interés (NaSIPP) es una proteína que interactúa con otros componentes celulares recientemente identificados para regular el rechazo del polen propio y evitar la endogamia en diversas plantas de la familia Solanaceae. Para modelar esta proteína se empelaron métodos diversos de modelado y de cerca de 100 diversos arreglos posibles para la orientación de los cruces transmembranales, se eligieron aquellos con mejor valor del índice ROSETTA DESIGN/HMMER. El modelo mejor, se sometió a casi 1 μs de simulación en una membrana explícita de mixta de fosfolípidos/colesterol/esfingolípidos que asemeja la composición de las membrana mitocondriales de las levaduras. Los resultados de este trabajo forman parte de la tesis doctoral de la M. en C. LILIANA GARCÍA VALENCIA, bajo la dirección del Dr. Felipe García Cruz. La tesis de la alumna está en fase de escritura y se sometío el manuscrito 3.

INTERCALACIÓN DE TIAZOLOQUINOLINAS EN EL DNA.

En colaboración con el Dr. ALFONSO LIRA ROCHA, se ha venido estudiando el mecanismo de acción de compuesto con potencial como fármacos antitumorales derivados de la quiazolo[5,4b]quinolina (TZQ). Utilizado método semiempíricos LMO y PM7 fue posible optimizar la geometría completa de complejos DNA-TZQ con secuencias de DNA de doble cadena de 10 pares de bases, tratando absolutamente a todos los átomos bajo el mismo nivel de teoría. Gracias a esta aproximación, fue posible determinar aspectos de la intercalación que no había podido ser identificados en trabajos anteriores. Los resultados son parte de la tesis del alumno FRANCISCO J. REYES-RANGEL, bajo la dirección del Dr. ALFONSO LIRA ROCHA. El trabajo está el la fase final de su trabajo de doctorado y los resultados se publicaron en el artículo 2 (con agradecimiento a SC).

## *4. CÁLCULOS REALIZADOS*

Se realizó el ajuste del modelo de la Cianuro dehydratasa de *Rodococcus* mediante simulaciones de dinámica molecular. Se realizaron la mutaciones *in sílico* de tres residuos del triptofano de sitio activo por glicina, por serina y por alanina. Se realizó el acoplamiento molecular de cianuro a la proteína original y las tres mutantes obteniendose varios posibles complejos. Se realizaron simulaciones de Dinámica molecular corta de los complejos con repeticiones, para un total de 120 simulaciones.

Se desarrollaron topologías para los centros Fe-S y Fe-mononuclear de una MONOXIGENASA bacteriana y se modeló la estructura tridimensional de la COLINA MONOXIGENASA de *Spinacea oleraceae* combinando modelado parcial por homología, predicción ab initio y simulaciones extensas de dinámicia molecular. A partir de este modelo realizamos el acoplamiento molecular del sustrato y modelamos las proteínas ortólogas de Arabidopsis, Arróz, Maíz Soya, trigo y Cebada, tras lo cual se realizó el acoplamiento molecular del sustrato y el análisis del sitio activo.

Se realizó un alineamiento y muestreo de los árboles filogenéticos y comparaciones estructurales iterativas de pirofosfatasas para complementar el trabajo de análisis de las pirofosfatasas inorgánicas solubles de Arabidopsis. El tiempo requerido fue poco, pero no por ello resulta menos importante para el éxito proyecto.

Por simulación extensa con MD se refinó un modelo crudo de la proteína membrananl NaSIPP de *Nicotiana tabacum* en el que fue posible estudiar la interacción con las proteínas involucradas en el rechazo del polen y proponer los mecanismos moleculares que sustentan su posible involucramiento en el rechazo del polen.

Optimización de la geometría completa de complejos DNA-TZQ con secuencias de DNA de doble cadena de 10 pares de bases, tratando absolutamente a todos los átomos bajo el mismo nivel de teoría, para un conjunto extenso de complejos con diferentes derivados citotóxicos.

## *5. SOFTWARE UTILIZADO:*

Principalmente GROMACS y algunas herramientas complementarias, como MAFFT-LINSI Y MR. BAYES, Y MOPAC 2016.

## *6. RECURSOS UTILIZADOS:*

~75000 H CPU.

## 7. LISTA DE COLABORADORES

*Proponente responsable:* ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

*Participante:* DRA. ROSARIO A. MUÑOZ CLARES, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

*Participante:* JAVIER CARRILLO CAMPOS, DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICA, UNAM.

*Participante:* DRA GEORGINA GARZA RAMOS, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

Participante: DR. MENANDRO CAMARILLO CADENA, POSDOCTORANTE APOYADO POR CONACYT, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

*Participante:* DR. ALFONSO LIRA ROCHA, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

Participante: FRANCISCO REYES RANGEL, ALUMNO DE DOCOTRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

Participante: MORAYNA ANDRADE LUNA, ALUMNA DE DOCOTRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

*Participante:* DR. FELIPE CRUZ GARCÍA, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

Participante: LILIANA GARCÍA VALENCIAL, ALUMNA DE DOCOTRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

## *8. LISTA DE TRABAJOS PUBLICADOS*

1. Gutiérrez-Luna, F.M., Navarro de la Sancha, E., Valencia-Turcotte, L.G., Vázquez-Santana, S., **Rodriguez-Sotres, R*.** (2016). Evidence for a non-overlapping subcellular localization of the family i isoforms of soluble inorganic pyrophosphatase in *Arabidopsis thaliana*, Plant Science 253:229-242 **Corresponding Author. Doi: 10.1016/j.plantsci.2016.10.005.*

*2*. Francisco J. Reyes-Rangel, A. Kémish López-Rodríguez, Laura V. Pastrana-Cancino, Marco. A. Loza-Mejía, José D. Solano, **Rogelio Rodríguez-Sotres,** Alfonso Lira-Rocha. (2016) Synthesis, cytotoxic activity, DNA binding and molecular docking studies of novel 9-anilinothiazolo[5,4-b]quinoline derivatives. *Medicinal Chemistry Research.* 25: 2976-2988. http://dx.doi.org/10.1007/s00044-016-1718-4

3. (sometido) Liliana E. García-Valencia, Carlos E. Bravo-Alberto, Hen-Ming Wu, **Rogelio Rodríguez-Sotres**, Alice Y. Cheung and Felipe Cruz-García (2017) The stigmatic protein NaStEP physically interacts with NaSIPP, a novel mitochondrial pollen tube phosphate transporter that mediates self-incompatibility in *Nicotiana*. Submitted to Plant Physiology, Dec/2016.

## *9 FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS.*

SE ENCUENTRAN EN LA FASE DE ESCRITURA DE SU TESIS DOCTORAL:

MORAYNA ANDRADE LUNA, ALUMNA DE DOCOTRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

LILIANA GARCÍA VALENCIAL, ALUMNA DE DOCOTRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

EN LA FASE FINAL DE SU TRABAJO:

FRANCISCO REYES RANGEL, ALUMNO DE DOCOTRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

SE CONCLUYÓ LA ESTANCIA POSDOCTORAL DE:

EL DR. MENANDRO CAMARILLO CADENA, APOYADO POR CONACYT.

*ATENTAMENTE*

*POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU*

*ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES*

*RESPONSABLE.*