

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias. Departamento de Biología Molecular
Centro de Biología Molecular-“Severo Ochoa”

IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS Y
FÁRMACOS INHIBIDORES BASADOS
EN UN NUEVO MECANISMO DE
INACTIVACIÓN DESCUBIERTO PARA
p38 MAPK

Tesis Doctoral
Pedro Manuel Campos Muelas

Madrid, 2015

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias. Departamento de Biología Molecular
Centro de Biología Molecular-“Severo Ochoa”

IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS Y
FÁRMACOS INHIBIDORES BASADOS
EN UN NUEVO MECANISMO DE
INACTIVACIÓN DESCUBIERTO PARA
p38 MAPK

Memoria presentada por el licenciado en Bioquímica
PEDRO MANUEL CAMPOS MUELAS
Para aspirar al grado de
DOCTOR EN CIENCIAS

Directores de esta tesis:
Dra. Cristina Murga Montesinos
Profesora Titular de Bioquímica y Biología Molecular
Y
Dr. Federico Mayor Menéndez
Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular/Centro de Biología Molecular-“Severo Ochoa” (CSIC-UAM) de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid gracias a la ayuda de una beca del Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia del Gobierno de España.

A Paula.

“Cada vez que enseñes, enseña también
a dudar de aquello que enseñas”

José Ortega y Gasset

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Desde que tengo recuerdos he tenido claro que quería dedicarme a la ciencia, siempre he tenido (y sigo teniendo) un apetito insaciable por el saber, saber cómo funcionan los objetos, las máquinas, la naturaleza, etc. Cuando me di cuenta de que las máquinas más complejas que existen en el universo conocido son los seres vivos tuve claro que aprender sus engranajes y funcionamiento a nivel molecular iba a ser mi mayor reto y por eso decidí estudiar bioquímica y convertirme en investigador.

Quiero agradecer a Fede la oportunidad de realizar la tesis doctoral en su laboratorio, gracias a él he podido cumplir la primera parte de mi reto. Gracias además por su espíritu crítico, sus buenas ideas y su toque de maestría que ha aportado gran calidad a este trabajo. Gracias por saber enseñar con tranquilidad lo que esconden unos resultados aparentemente incoherentes.

También quiero dar las gracias a Cristina por todo el tiempo que ha dedicado a enseñarme no sólo a hacer ciencia sino también a ser y pensar como científico, por su rigor, su apoyo, su constancia, por mantener mi motivación siempre alta, por responder incansablemente a mis dudas, pero especialmente por darme el empujón justo, dejarme ser autónomo, dejarme decidir y, muchas veces, equivocarme. Desde luego, donde más he aprendido es cuando las cosas han salido mal. Cada vez que me he equivocado me he tenido que esforzar el doble en estudiar lo que estaba haciendo y gracias a eso he adquirido un conocimiento más profundo de lo que hacía.

Gracias también a los dos por permitirme aprovechar una gran oportunidad profesional antes de terminar la tesis y por ayudarme a presentarla aunque haya tenido que ser un poco más tarde.

Gracias a todos los compañeros del laboratorio por la convivencia y los buenos consejos, y en general a los amigos del CBMSO con quien también he pasado buenos momentos, debatido temas científicos y discutido como realizar los experimentos. Ha sido muy provechoso. Un agradecimiento especial también a los compañeros técnicos del laboratorio por su disponibilidad y gran labor proporcionando un apoyo vital que ha sido imprescindible para la realización de esta tesis.

Gracias a Ángel Ortiz, Antonio Morreale y Rubén Gil del Grupo de Bioinformática del CBMSO y a Annemieke Kavelaars, Cobi Heijnen y Hanneke Willemen de la Universidad de Utrecht, Holanda, por vuestra colaboración sin la cual no habría sido posible la realización de esta tesis.

Para terminar, gracias a mi familia, en especial a Paula, por acompañarme y apoyarme siempre incondicionalmente.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ARE	Elementos ricos en adeninas y uracilos
ARN _m	Acido Ribonucleico mensajero
ASK1	Quinasa reguladora de la señal apoptótica
ATF2	Factor activador de la transcripción 2
CHOP	Proteína homóloga de C/EBP (proteína potenciadora de la unión a CCAAT)
CK1	Caseína quinasa 1
CMPD1	Compuesto 1 (<i>Compound 1</i>)
COX-2	Ciclooxigenasa 2
DLK	Proteína quinasa asociada a la muerte
DUSP	Fosfatasa de especificidad dual
EEA1	Antígeno temprano de endosomas 1
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
Elk1	Proteína con dominio ETS
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERK	Quinasa regulada por señal extracelular
ETS	Factor específico de transformación E26
GAK	Quinasa asociada a ciclina G
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G
GRK	Quinasa de GPCR
GSK	Quinasa de glucógeno sintasa
HSP27	Proteína de choque térmico 27
HuR	Antígeno humano R
IL	Interleuquina
Imp	Importina
IFN γ	Interferón- γ
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
IRS	Sustrato del receptor de insulina
JAK	Quinasa de janus
JIP	Proteína de interacción con JNK
JNK	Quinasa del extremo N-terminal de jun
Lck	Tirosín quinasa específica de leucocitos
LPS	Lipopolisacárido
MAPK	Quinasa activada por mitógeno
MCP-1	Proteína de reclutamiento de monocitos
MEF2A/C	Factor potenciador de miocito 2A/C
MK (MAPKAPK)	Proteína quinasa activada por MAPK
MKK (MAP2K)	Quinasa de MAPK
MKKK (MAP3K)	Quinasa de MAPKK
MKP	Fosfatasa de MAPK
MLK	Quinasa de la cadena ligera de miosina
MMP	Metaloproteasa de la matriz
Mnk	Quinasa de interacción con MAPK
MSK	Quinasa activada por mitógenos y estrés
NES	Secuencia de exportación del núcleo
NFAT	Factor nuclear de células T activadas
NF κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las

ABREVIATURAS

	células B activadas
NLK	Quinasa similar a Nemo
NLS	Secuencia de localización nuclear
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PP2A	Proteína fosfatasa 2A
PRAK	Quinasa activada/regulada por p38
PTP	Proteína tirosín fosfatasa
Rsk	Quinasa de la subunidad S6 del ribosoma
RTK	Receptor tirosín quinasa
SAP-1	Factor activador de intercambio 1
SAPK	Proteína quinasa activada por estrés
SPR	Resonancia del plasmón de superficie
Syk	Tirosín quinasa del bazo
TAB1	Proteína de unión a TAK1
TAK1	Quinasa de TGF β
TAK1	Quinasa activada por TGF β
TCR	Receptor de linfocitos T
TGF β	Factor de crecimiento tumoral β
TNF α	Factor de necrosis tumoral α
TTP	Tristetraprolina
UTR	Región no traducida del ARNm

ÍNDICE

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	11
ABREVIATURAS	15
ÍNDICE.....	21
SUMMARY	29
RESUMEN.....	31
INTRODUCCIÓN.....	35
1. QUINASAS.....	35
1.1. MAPK.....	35
1.1.1. MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE MAPK.....	35
1.1.2. TIPOS DE MAPK.	37
1.1.3. IDENTIFICACIÓN DE LA SUBFAMILIA DE p38.	37
1.1.4. SUSTRATOS Y FUNCIONES DE p38.....	37
1.1.5. MECANISMOS ALTERNATIVOS DE ACTIVACIÓN.....	38
1.1.5.1. AUTOFOSFORILACIÓN DE p38.	38
1.1.5.2. ACTIVACIÓN POR EL TCR.....	38
1.1.5.3. AUTOFOSFORILACIÓN ESPONTANEA EN p38 β 2.....	39
1.1.6. ATENUACIÓN DE LA RUTA DE p38.	39
1.1.7. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE p38.....	40
1.1.8. ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE p38.	41
“Switch pocket”.....	41
Dominio DFG.....	41
Residuo “gatekeeper”.....	42
“Flip” de la glicina.....	42
1.1.9. DOMINIOS DE INTERACCIÓN CON SUSTRATOS Y ACTIVADORES.....	43
1.1.9.1. SURCO DE ANCLAJE.....	43
1.1.9.2. DOMINIO DEF.....	44
2. p38 y GRK2.....	45
3. p38 EN SITUACIONES PATOLÓGICAS.....	47
3.1. p38 COMO DIANA PARA EL DOLOR CRÓNICO.....	47
3.2. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES.....	47
3.3. PATOLOGIAS INFLAMATORIAS Y AUTOINMUNES.....	48
3.4. CÁNCER.....	49
3.5. ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS.....	49

4. INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE p38.....	49
4.1. TIPOS DE INHIBIDORES DE QUINASAS.....	50
Inhibidores Tipo I:	50
Inhibidores Tipo II:.....	51
Inhibidores Tipo III:	51
Inhibidores Tipo IV:	51
Inhibidores Tipo V:	51
4.2. INHIBIDORES IRREVERSIBLES: INHIBICIÓN COVALENTE.....	52
4.3. DESARROLLO DE INHIBIDORES CONTRA EL SURCO DE ANCLAJE.....	52
4.3.1. DISEÑO DE PÉPTIDOS COMO INHIBIDORES DE p38.....	52
4.3.1.1. PÉPTIDOS TRANSPORTADORES.	53
4.3.1.2. AMINOÁCIDOS D.....	53
4.3.2. TÉCNICAS COMPUTACIONALES EN EL DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS FÁRMACOS.....	54
MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
1. REACTIVOS:.....	59
1.1. Diseño y síntesis de péptidos:.....	59
1.2. Construcciones:	60
1.3. Clonajes:	61
2. PROCEDIMIENTOS:	61
2.1. Mutagénesis dirigida en p38 β 2:	61
2.2. Expresión y purificación de proteínas:	61
2.3. Experimentos de fosforilación <i>in vitro</i> con ³² P γ ATP:.....	62
2.4. Defosforilación <i>in vitro</i> :	62
2.5. Experimentos de cosedimentación (“ <i>Pull-down</i> ”):	62
2.6. Electroforesis y Western blot:	62
2.7. Inhibición <i>in vitro</i> por péptidos y moléculas de la activación y actividad de p38:	63
2.8. Inhibición de la secreción de TNF en células monocíticas humanas, THP-1: 63	
2.9. Evaluación de la toxicidad de las moléculas mediante el análisis de la incorporación de yoduro de propidio:	64
2.10. Modelo de hiperalgesia inducida por carragenato en ratones GRK2 ^{+/-} :.....	65
2.11. Cribado virtual de librerías de compuestos en base a datos estructurales derivados de la cristalización del dominio de anclaje de p38 MAPK:.....	65
2.11.1. Preparación del receptor:	66
2.11.2. Preparación de la quimiotecas de ligandos:.....	67
2.11.3. Filtrado de moléculas:	68

2.11.4. Cribado final de moléculas:.....	69
2.11.5. Actualización de términos energéticos:.....	69
2.11.6. Dinámica molecular:.....	69
OBJETIVOS.....	73
RESULTADOS	77
1. INACTIVACIÓN DE p38 POR LA FOSFORILACIÓN MEDIADA POR GRK2:	77
1.1. El mutante de p38 α -T123D, que imita la fosforilación por GRK2, tiene bloqueada su interacción tanto con sus activadores como con sus sustratos.....	77
1.2. p38 β 2 también es fosforilable por GRK2 en el residuo equivalente a la T123 de p38 α	78
1.3. El mutante p38 β 2S123D muestra una reducción de la actividad catalítica independiente de la interacción a través del surco de anclaje.	78
1.4. El mutante de p38 β 2-S123D muestra una interacción reducida con sustratos y activadores.	79
1.5. Efecto de la introducción de una carga negativa en la entrada del surco sobre la fosforilación de sustratos con diferente dependencia de anclaje.	80
1.6. p38 α activada por MKK6 es fosforilada por GRK2 menos eficazmente que la p38 α inactiva.	81
1.7. La S/T123 puede ser defosforilada por la proteína fosfatasa 2A (PP2A).	82
2. DESARROLLO Y ANÁLISIS DE INHIBIDORES PEPTÍDICOS DE p38 BASADOS EN SU INTERACCIÓN CON EL SURCO DE ANCLAJE.	84
2.1 Péptidos diseñados a partir de las secuencias de unión al surco de anclaje presentes en MKK6 y MKK3b.	84
2.2. Péptidos diseñados a partir del motivo-D presente en MEF2A.....	86
2.3. Péptidos diseñados a partir del motivo-D en MK2.....	88
2.4. El aumento de la capacidad inhibitoria de pepMEF2AxCys por la sustitución de la posición Φ_{B+1} por una cisteína puede ser revertido en un ambiente reductor.	90
2.5. El péptido TAT-MEF2AxCys puede inhibir procesos dependientes de p38 como la secreción de TNF α estimulada por LPS.....	91
2.6. El péptido TAT-MEF2AxCys inhibe la activación y la actividad de p38 en monocitos THP-1.....	92
2.7. El péptido de MEF2A con aminoácidos D y secuencia inversa (D-TAT- MEF2AxCys), produce una inhibición de la secreción de TNF α similar a la obtenida con aminoácidos L y secuencia directa.....	93
2.8. El péptido TAT-MEF2AxCys puede reducir la hiperalgesia inducida por carragenato en ratones GRK2 ^{+/-}	93
3. ANÁLISIS DE PEQUEÑAS MOLÉCULAS INHIBIDORAS DE p38 A TRAVÉS DEL SURCO DE ANCLAJE.	95

3.1. Dos de los compuestos seleccionados mediante el cribado virtual muestran actividad inhibitoria sobre la activación de p38.	95
3.2. Segundo cribado virtual dando prioridad a aquellas moléculas que se ajustan a las Reglas de Lipinski.....	97
3.3. Búsqueda de análogos más potentes por cribado virtual a partir de las estructuras de las siete moléculas con mayor capacidad inhibitoria.	98
3.4. Análisis de la actividad de las moléculas seleccionadas sobre la secreción de TNF α en monocitos THP-1.....	99
3.5. Análisis por ioduro de propidio de la toxicidad de las moléculas.....	100
3.6. Análisis de nuevas moléculas obtenidas mediante síntesis dirigida: análogos del 6946893.	101
3.7. Efectos de la molécula FGA-15 sobre los niveles de activación y actividad de p38.	103
3.8. Análisis de nuevas moléculas obtenidas mediante síntesis dirigida: análogos del STOCK2S-05380.....	104
4. CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS DE LAS MOLÉCULAS SELECCIONADAS SOBRE LA CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DE P38.....	107
4.1. Efecto de la molécula STOCK2S-05380 sobre la cascada de señalización de p38.	107
4.2. Efecto de la molécula STOCK2S-05380 sobre el perfil de secreción de citoquinas: inhibición de la secreción de citoquinas dependientes de la activación de p38.	108
4.3. Efecto de la molécula FGA-5 sobre la cascada de señalización de p38.....	110
4.4. Efecto de la molécula FGA-17 sobre la cascada de señalización de p38.....	111
4.5. Efecto de la molécula FGA-19 sobre la cascada de señalización de p38.....	111
5. ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE P38 POR COMPUESTOS DISEÑADOS SOBRE EL DOMINIO DE ANCLAJE EN UN MODELO ANIMAL.	112
5.1. Efecto de la molécula STOCK2S-05380 en la inhibición de p38 en un modelo de hiperalgesia inducida en ratones.	112
5.2. La molécula FGA-19 es un potente inhibidor de la hiperalgesia inducida en ratones con niveles reducidos de GRK2 en macrófagos, granulocitos y microglía (LysM-GRK2 ^{+/-}).	113
DISCUSIÓN	119
1. Impacto funcional e implicaciones fisiológicas de la regulación de p38 por GRK2.	119
2. Importancia de las interacciones a través de dominios de anclaje:	123
3. Inhibición farmacológica de p38.	127
4. Inhibición de p38 mediante péptidos dirigidos contra el surco de anclaje.....	127
5. Desarrollo de pequeñas moléculas inhibitoras de p38 a través del surco de anclaje.	130
CONCLUSIONES	137

BIBLIOGRAFÍA	141
ANEXO 1: COMPUESTOS SELECCIONADOS POR CRIBADO VIRTUAL	155
ANEXO 2: PUBLICACIONES	¡Error! Marcador no definido.

SUMMARY/RESUMEN

SUMMARY

p38 MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) signaling pathway is preferentially activated by different kinds of stress such as inflammation and oxidative stress and is implicated in diverse biological processes such as proliferation, differentiation, apoptosis and survival. p38 exerts its activity through the regulation of the expression of many genes including proinflammatory cytokines. The development of a strong, selective and safe inhibitor capable of regulating p38 activity has been pursued by academia and pharmaceutical industry during the last years without success, mainly because of the lack of selectivity and toxic secondary effects.

The discovery in our lab of a new inhibitory phosphorylation of p38 α by the multifunctional G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) in threonine 123, a residue located at the entrance of the p38's docking groove, has led us to the development of a new inhibitory strategy targeting this domain. The docking groove is a specific MAPK family cleft that confers affinity and specificity towards MAPK molecular partners. In this project we have characterized the effects of p38 phosphorylation by GRK2, and we have unveiled that it is able to block the interaction of p38 with both upstream activators and downstream substrates. We have also shown that GRK2 can phosphorylate the p38 β 2 isoform, in a serine at position 123. Moreover, a mutant of p38 β 2 that mimics GRK2 phosphorylation phosphorylates less efficiently those substrates that interact with p38 via the docking groove. Furthermore, this mutant shows an altered catalytic activity also towards docking-independent substrates. We have also characterized that GRK2 preferentially targets inactive p38, and that this phosphorylation can be reverted *in vitro* by PP2A phosphatase.

Based on these results, we have developed a series of peptides designed from the D-motif of several molecular partners of p38 including MK2, MKK6 and MEF2A to try to inhibit p38 activity and/or activation. Several of these peptides showed an inhibitory activity towards p38 both *in vitro* and in cells in the micromolar range. The most effective one was based on MEF2A, linked to the cell-penetrating TAT peptide and whose sequence was modified introducing a cysteine to try to establish a disulfide bond with cysteine 119 in p38. The resulting peptide, TAT-MEF2AxCys, showed greater potency than the original MEF2A sequence, probably due to the formation of this disulfide bond since its inhibitory effect can be overcome by treatment with a reducing agent. This peptide inhibits p38 activity *in vitro* with an IC₅₀ of 3.7 μ M and completely blocks TNF α secretion in human monocytic THP-1 cells at a 10 μ M concentration with an IC₅₀ of 3 μ M. Replacement of L-aminoacids by D-enantiomers, thus creating protease-resistant peptides, maintains the inhibitory efficacy. However, both peptides decreased the viability of the THP-1 cells at concentrations not much higher than those required for the observed inhibitory effects.

As an alternative approach, we have identified small molecule p38 inhibitors based on virtual screening on the p38 docking groove. Several families of compounds were found to have inhibitory activity *in vitro* and in cells towards the p38 route. Among them, the benzo-oxadiazol family, in particular the FGA-19 compound, completely abrogated p38 activity and TNF α secretion at concentrations of 10 μ M in THP-1 cells with an IC₅₀ of 1.8 μ M and a reliable safety profile with two orders of magnitude between mean active and toxic doses. Interestingly, both the TAT-MEF2AxCys peptide and the small molecule FGA-19 can act as effective p38 inhibitors in a murine model of inflammatory hyperalgesia, reducing mice pain sensitivity for at least 5 days, to a level similar to that in control animals, at lower dose and lasting longer than established ATP-competitive p38 inhibitors.

RESUMEN

La vía de señalización de p38 MAPK puede ser activada por diferentes estímulos como inflamación o estrés oxidativo, y está implicada en multitud de procesos celulares como proliferación, diferenciación, apoptosis y supervivencia mediante la regulación de la expresión de diversos genes, incluyendo citoquinas proinflamatorias. El desarrollo de un inhibidor potente, selectivo y seguro para p38 ha sido un objetivo perseguido por la ciencia básica y la industria farmacéutica durante los últimos años que no se ha conseguido principalmente por falta de selectividad y efectos secundarios.

El descubrimiento en nuestro laboratorio de un nuevo mecanismo de inhibición de p38 α mediante la fosforilación por GRK2 (quinasa de receptores acoplados a proteínas G) en el residuo treonina 123, situado a la entrada del surco de anclaje de p38, nos ha permitido desarrollar una estrategia alternativa de inhibición dirigida a este dominio. El surco de anclaje es un dominio exclusivo de las MAPK que aporta afinidad y especificidad hacia sus sustratos y moduladores. En este trabajo hemos descubierto que la fosforilación de p38 por GRK2 puede bloquear la interacción de p38 con sustratos y activadores. Igualmente, hemos demostrado que GRK2 también puede fosforilar a la isoforma p38 β 2 en la serina 123. El mutante de p38 β 2 que imita la fosforilación por GRK2 fosforila con menos eficiencia aquellos sustratos que interactúan con p38 a través del surco de anclaje. Además, este mutante muestra una capacidad catalítica alterada sobre sustratos independientes del surco de anclaje. Adicionalmente, hemos demostrado que GRK2 fosforila preferentemente a p38 en estado inactivo y que PP2A puede revertir *in vitro* esta fosforilación.

Según estos resultados, hemos desarrollado una serie de péptidos diseñados a partir de los motivos-D de diversas proteínas que interactúan con p38 incluyendo MKK6, MK2 y MEF2A para intentar inhibir la actividad y/o la activación de p38. Algunos de estos péptidos mostraron actividad inhibitoria sobre p38 *in vitro* y en células en el rango micromolar. El más eficaz fue el diseñado a partir de MEF2A fusionado con el péptido transportador de membrana TAT, y cuya secuencia fue modificada introduciendo una cisteína para intentar establecer un puente disulfuro con la cisteína 119 de p38. El péptido resultante, TAT-MEF2AxCys, mostró una potencia superior al péptido original de MEF2A, probablemente debido a la formación de este enlace, ya que el efecto inhibitorio es atenuado en presencia de un agente reductor. Este péptido inhibió la actividad de p38 *in vitro* con una IC₅₀ de 3,7 μ M y bloqueó completamente la secreción de TNF α en la línea monocítica humana THP-1 a una concentración de 10 μ M y con una IC₅₀ de 3 μ M. La sustitución de los aminoácidos L por sus enantiómeros D, siendo así resistentes a proteasas, mantuvo el efecto inhibitorio. Sin embargo, ambos péptidos redujeron la viabilidad de las células THP-1 a concentraciones no mucho mayores que las requeridas para la inhibición.

Como aproximación alternativa, hemos identificado compuestos inhibidores de p38 seleccionados mediante cribado virtual dirigido al surco de anclaje de p38. Algunas familias de compuestos mostraron actividad inhibitoria de la ruta de p38 *in vitro* y en células. Entre ellas, la familia de benzo-oxadiazoles, en concreto el compuesto FGA-19, bloqueó completamente la actividad de p38 y la secreción de TNF α en células THP-1 a una concentración de 10 μ M, con una IC₅₀ de 1,8 μ M y con una ventana de dos órdenes de magnitud entre las dosis inhibitorias y las dosis tóxicas medias. Es interesante resaltar que ambos, péptido TAT-MEF2AxCys y el compuesto FGA-19, pueden inhibir eficazmente p38 en un modelo murino de hiperalgesia inflamatoria, reduciendo la sensibilidad al dolor de los ratones, durante al menos 5 días, a niveles similares a los encontrados en los ratones control, con una concentración menor y un efecto más prolongado que el de inhibidores establecidos de p38 competitivos para el ATP.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Durante la evolución, los organismos pluricelulares han ido desarrollando mecanismos cada vez más complejos para adaptarse al medio que les rodea. Dentro del propio organismo se han desarrollado paralelamente sistemas de coordinación entre células para sincronizar las funciones de los diferentes tejidos, necesarias para el funcionamiento integrado del organismo y su relación con el ambiente. Así, en cada célula existen sofisticadas redes de señalización formadas por una gran variedad de proteínas (Pires-daSilva et al. 2003). Muchas de ellas se organizan en cascadas con diferentes escalones que se van activando consecutivamente para generar una respuesta a un determinado estímulo o conjunto de estímulos. La organización de los elementos en cascada favorece la amplificación de la respuesta y múltiples puntos de control, y su arquitectura controla la especificidad de la transmisión de la señal garantizando la adecuada respuesta de la célula ante cada situación (Yang et al. 2013).

1. QUINASAS.

Las proteínas quinasas son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo fosfato desde una molécula de ATP, generalmente a un aminoácido hidroxilado, como serina, treonina y tirosina, situado en otra proteína denominada sustrato (Roskoski 2015), o bien a moléculas implicadas en el metabolismo celular. La fosforilación es un mecanismo de regulación de la función de las proteínas muy rápido y está muy conservado entre especies, desde bacterias a plantas y vertebrados superiores. Desde la secuenciación del genoma humano se calcula que en humanos existen 518 quinasas y 106 pseudogenes, y se estima que el 30% de las proteínas son sustrato de alguna quinasa. Al conjunto de todas las quinasas de un organismo se le conoce actualmente como quinoma (Manning et al. 2002). Prácticamente todas las acciones celulares están regulados en algún punto por quinasas, incluyendo procesos como el metabolismo, el ciclo celular, la diferenciación, organización del citoesqueleto, movimiento celular y apoptosis entre otros (Roskoski 2015). El mal funcionamiento de estas enzimas suele provocar la deficiente regulación de las vías de señalización, participando de manera causal o contribuyendo a numerosas enfermedades como cáncer, diabetes e inflamación. Por tanto, la modulación de la actividad quinasa mediante compuestos de bajo peso molecular es un procedimiento que ha sido aplicado en el tratamiento de diversas patologías, y el desarrollo de estos moduladores farmacológicos se ha convertido en uno de los principales objetivos de la industria farmacéutica (Lamba et al. 2012).

1.1. MAPK.

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) son una familia de serina/treonina quinasas organizadas en cascadas de señalización activadas por diferentes estímulos extracelulares como factores de crecimiento, mitógenos, hormonas, estrés y factores inflamatorios; o intracelulares como estrés oxidativo o rotura del ADN. Las vías de señalización de MAPK contribuyen a la regulación de numerosos procesos celulares como el crecimiento, diferenciación, supervivencia y apoptosis (Cargnello et al. 2011).

1.1.1. MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE MAPK.

Las cascadas de señalización de MAPK están organizadas en 3 escalones, donde unas MAPKKK, que se activan habitualmente al interactuar con GTPasas monoméricas en respuesta a un estímulo externo, fosforilan a las MAPKK y estas a su vez fosforilan a las MAPK, generando una respuesta lineal (Figura I-1). En el caso de p38MAPK,

INTRODUCCIÓN

diversos estímulos como estrés osmótico, estrés oxidativo, radiación ultravioleta, hipoxia, isquemia o varias citoquinas inflamatorias activan sus respectivas MAPKK (MKK3 y MKK6) que fosforilan y activan p38 en la secuencia consenso de fosforilación, TXY, aunque se ha descrito que otra MAPKK, MKK4, también puede fosforilar p38 en cierta medida (Haeusgen et al. 2014). Todas las MAPK presentan un segmento de aminoácidos flexible llamado “bucle de activación” que hace de interruptor molecular para determinar el estado de activación de la quinasa. La fosforilación en la secuencia TXY, que se encuentra en este dominio, por parte de las MAPKK promueve un desplazamiento del mismo provocando un cambio conformacional que permite el acceso del ATP al centro activo y un mejor acoplamiento con los sustratos, lo que confiere a la MAPK una actividad catalítica mucho mayor (Cargnello et al. 2011). Una vez activadas, las MAPK puede fosforilar serinas o treoninas seguidas de una prolina en multitud de sustratos nucleares (como diversos factores de transcripción que modifican el patrón de expresión génica), o sustratos citosólicos modificando funciones como la diferenciación, migración o el ciclo celular (Denise Martin et al. 2012). A pesar de la similitud entre las diferentes rutas de MAPK, existen mecanismos de reconocimiento que garantizan la linealidad de cada ruta. Estos mecanismos pueden basarse en dominios de interacción o en proteínas intermediarias llamadas proteínas andamio o *scaffold*. De este modo, dentro de una misma ruta, una MAPKK puede discriminar entre isoformas de MAPK dirigiendo la señal en un determinado sentido. Incluso, una misma isoforma de MAPK puede activar en determinadas situaciones un subgrupo de sustratos que en otras situaciones no podría fosforilar (Lu et al. 2006). Recientemente se están intensificando los estudios sobre el reconocimiento de proteínas a través de dominios de interacción que controlan las preferencias de las distintas MAPK (Gogl et al. 2013).

MODULO:	ERK	JNK	p38
RECEPTOR	RTKs, GPCRs	citoquinas, GPCRs	estrés, citoquinas
MAP3K	Raf, TPL2	MEKK, MLK, TAK, ASK, TPL2	MEKK, MLK, TAK, ASK, TPL2
MAP2K	MEK1/2	MKK4/7	MKK3/6
MAPK	ERK1/2	JNK1/2/3	p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$
SUSTRATOS	Elk1, c-myc MK1 Ets1/2 Rsk2/3 Mnk1/2	C-Jun, JunD, ATF2, Elk1, Sap1	MK2/3/5, ATF2, MEF2C, GAD153, Msk1, Mnk1, EE1A, Rab5GDI, EGFR, Tau

Figura I-1. Representación esquemática de las cascadas de señalización de MAPK. Adaptado de (Mayor et al. 2007)

1.1.2. TIPOS DE MAPK.

Las MAPK son enzimas conservadas en todos los organismos eucariotas. En mamíferos, se han caracterizado 14 MAPK pertenecientes a 7 subfamilias diferentes. Se pueden clasificar en convencionales y atípicas por su capacidad para ser activadas por MAPKK. Las cuatro subfamilias convencionales comprenden las quinasas reguladas por señal extracelular (ERK1 y ERK2), las quinasas del extremo N-terminal de c-jun (JNK1, JNK2 y JNK3), las p38 (p38 α , p38 β , p38 γ y p38 δ) y ERK5. Las tres subfamilias atípicas de MAPK son las formadas por las quinasas ERK3 y ERK4, quinasa similar a Nemo (NLK) y ERK7 (Coulombe et al. 2007). Estas subfamilias comparten una homología del 60% en el dominio quinasa y una especificidad común de sustrato ya que todas ellas fosforilan serinas y treoninas seguidas de una prolina. El aminoácido que se encuentra entre la tirosina y la treonina fosforiladas en la secuencia TXY es diferente e identificativo de cada subfamilia: en la subfamilia p38 este aminoácido es una glicina, en las subfamilias de ERK1/2, ERK5 y ERK7 es un ácido glutámico y en la subfamilia de JNK es una prolina. En las MAPK atípicas no se conoce con precisión cuál es el mecanismo de activación de estas subfamilias ya que la secuencia de activación y otras características no son las habituales entre las MAPK convencionales (Cargnello et al. 2011).

1.1.3. IDENTIFICACIÓN DE LA SUBFAMILIA DE p38.

Las quinasas p38 se describieron en 1994 como proteínas homólogas de la proteína Hog1 de levaduras. Fueron inicialmente identificadas como proteínas de respuesta ante estímulos inflamatorios como el LPS (lipopolisacárido) bacteriano y como diana de pirimidilimidazoles, inhibidores de la producción de citoquinas proinflamatorias. Existen cuatro isoformas convencionales de p38: p38 α es ubicua y tiene unos niveles de expresión significativos en la mayoría de los tipos celulares; p38 β se expresa en la mayoría de tipos celulares pero es especialmente abundante en el cerebro; p38 γ sólo se expresa en músculo esquelético; y p38 δ sólo se encuentra en pulmón, riñón y glándulas endocrinas (Cuadrado et al. 2010). En la mayoría de los tejidos, p38 α es la isoforma más expresada y, por tanto, ha sido la más estudiada y sobre la que más se ha publicado. Otros nombres por los que se conoce p38 α son CSBP, RK y SAPK2a. Todas las p38 se activan principalmente por MKK3 y MKK6, que a su vez se pueden activar por MKKK1-4, MLK, ASK1, TAK1 y DLK, entre otras (Cuadrado et al. 2010). La cascada de p38 es activada por numerosos estímulos extracelulares como mediadores de inflamación, citoquinas y lipopolisacárido bacteriano, además de estímulos de estrés fisiológico o patológico como estrés osmótico, genotóxico, oxidativo o incluso radiaciones ionizantes (Cargnello et al. 2011).

1.1.4. SUSTRATOS Y FUNCIONES DE p38.

Al activarse p38, puede fosforilar otras quinasas como MNK1/2, MSK1/2, RSK, y MAPKAPK2/3/5, y factores de transcripción como ATF2/6, MEF2A/C/D, CHOP, Elk1, SAP-1a y NF κ B, que son los que finalmente ejercen las funciones nucleares de la ruta de p38 (Gong et al. 2010; Cargnello et al. 2011). Progresivamente se están descubriendo nuevas proteínas que pueden activarse por p38 como EEA1, EGFR, Rab5GDI, GSK3 β y Tau con lo que se siguen descubriendo nuevas funciones asociadas con p38 (Reynolds et al. 1997; Mace et al. 2005; Cuenda et al. 2007; Thornton et al. 2008). La familia de p38 es un componente fundamental en las respuestas inmunes e inflamatorias. Asimismo, p38 α es importante en multitud de procesos de diferenciación de timocitos y adipocitos (He et al. 2013), desarrollo y mantenimiento de la estructura ósea (Thouverey et al. 2015), o formación de tumores y resistencia a agentes antitumorales (Kim et al.

2015; Yan et al. 2015). Por otro lado, p38 α es esencial para el desarrollo embrionario ya que los embriones modificados genéticamente que no expresan p38 α mueren entre el día 10 y 11 de la gestación (Allen et al. 2000). Además, está ampliamente reconocido que p38 α estabiliza los ARN mensajeros (ARNm) de citoquinas inflamatorias como TNF α e IL1 β a través de la fosforilación e inactivación de la proteína TTP (tristetraprolina) directamente o a través de su sustrato MK2 (Hitti et al. 2006). TTP en su conformación activa se une a AREs (elementos ricos en adeninas y uracilos) en la región 3'UTR (región del ARNm no traducida) de los ARNm promoviendo su degradación (Mahtani et al. 2001).

Así como p38 está implicada en multitud de procesos fisiológicos, también cumple un papel muy importante en patologías como artritis reumatoide (Goldstein et al. 2010), asma (Chung 2011), enfermedad de Crohn (Zhang et al. 2015), Alzheimer (Munoz et al. 2010), fallo cardíaco (Arabacilar et al. 2015), cáncer (Gupta et al. 2015) y dolor neuropático (Lin et al. 2014). En enfermedades inflamatorias p38 juega un papel central puesto que regula transcripcional y postranscripcionalmente la expresión de enzimas como COX-2 e iNOS, y citoquinas como TNF α , IL-1 β e IL-6, por ejemplo, regulando la actividad de las proteínas TTP, HuR y KRSP que estabilizan los ARNm de las citoquinas que basalmente son muy inestables (Tiedje et al. 2014).

1.1.5. MECANISMOS ALTERNATIVOS DE ACTIVACIÓN.

1.1.5.1. AUTOFOSFORILACIÓN DE p38.

Aunque la ruta de activación canónica de p38 es a través de la cascada de MAPK, se han propuesto otros posibles mecanismos de activación alternativos. Mediante ensayos de doble híbrido se descubrió que TAB1 (TAK1 Binding Protein 1) interacciona con p38 α promoviendo su autofosforilación y se sugirió que esta ruta alternativa de activación puede estar implicada en el desarrollo de isquemia cardíaca y enfermedades inflamatorias (Martin et al. 2015). TAB1 estabiliza la forma activa de p38 α e induce cambios conformacionales en el bucle de activación que provocan que una molécula de p38 α pueda fosforilarse a sí misma en ese mismo bucle (autofosforilación en *cis*) (De Nicola et al. 2013). Además, p38 α , al fosforilar a su vez a TAB1 impide que pueda activarse TAK1, activador de MKK6 y de la ruta de p38, lo que inhibe el ciclo de retroalimentación (Cheung et al. 2003). Curiosamente, en cardiomiocitos neonatales de rata se ha visto que aunque TAB1 provoca un incremento en la actividad de p38 α , no se produce ninguno de los procesos dependientes de ésta, quizá debido a que p38 α es retenida por TAB1 en el citosol impidiendo la fosforilación de los sustratos nucleares (Lu et al. 2006).

1.1.5.2. ACTIVACIÓN POR EL TCR.

En linfocitos T, p38 está implicada en la producción de IFN γ (interferón- γ) y la diferenciación a linfocitos T CD4⁺. Se ha observado en estas células que la estimulación del TCR (receptor de antígenos de células T) activa la tirosín-quinasa Zap70, que provoca la fosforilación de p38 α y p38 β 2 en la tirosina 323 situada en el bucle L16, de forma independiente a la ruta canónica de activación. Esta fosforilación provoca cambios conformacionales que inducen a p38 a fosforilar otras moléculas de p38 en el motivo de activación TGY (autofosforilación en *trans*), aunque sólo en la treonina 180, lo que da lugar a una respuesta submáxima de p38 pero suficiente para la fosforilación de algunos sustratos como ATF2 (Salvador et al. 2005; Nguyen et al. 2015). Se ha demostrado que los mutantes en la región del bucle L16 que resultan en la activación de p38 pueden formar dímeros lo que desencadena la trans-autofosforilación de otras

moléculas de p38, y podría explicar por qué la fosforilación de la tirosina 323 provoca la activación de p38 (Diskin et al. 2007). La trans-autofosforilación en un solo residuo en el motivo TGY tras la fosforilación por Zap70 proporciona un cambio en la selectividad de sustrato: mientras p38 activada por MKK6 puede fosforilar sustratos como MK2, MEF2A o ATF2, p38 activada por Zap70 puede fosforilar ATF2, pero muy débilmente otros sustratos como MK2 y MEF2A (Mittelstadt et al. 2009).

1.1.5.3. AUTOFOSFORILACIÓN ESPONTÁNEA EN p38 β 2.

Se ha observado que al purificar p38 β 2 recombinante de bacterias, ésta tiene cierta actividad catalítica, a diferencia de otras isoformas de p38. El grupo de Engelberg defiende que esta actividad catalítica se debe a una autofosforilación espontánea en la treonina 180 que se produce en *cis* (Beenstock et al. 2014). La capacidad de autofosforilación en ausencia de cualquier otra proteína sólo se ha encontrado en p38 β 2, y no en otras MAPK. Sin embargo, sí es común en otros grupos de quinasas, por lo que parece que este mecanismo de autofosforilación ha permanecido limitado en la evolución de las MAPK (Beenstock et al. 2014).

1.1.6. ATENUACIÓN DE LA RUTA DE p38.

La magnitud y la duración de la activación de p38 son aspectos críticos en la señalización y definen el tipo de respuesta que se va a producir. Asimismo, la distribución espacial de p38 puede determinar el tipo de respuesta, principalmente por el conjunto de sustratos a los que va a tener acceso en una determinada localización subcelular. La regulación espaciotemporal de la señalización por p38 es compleja y puede depender de otros muchos factores como la asociación a proteínas andamio, la tasa de internalización de receptores de membrana o mecanismos de inactivación directa como la acción de fosfatasas. Se ha observado que la activación suele tener una escala temporal de minutos tras lo cual se atenúa, lo que indica que los mecanismos de inactivación de p38 existen de manera generalizada en diferentes tipos celulares. El principal mecanismo de regulación es la eliminación de las fosforilaciones activadoras por parte de enzimas especializadas en esta función conocidas como fosfatasas (Owens et al. 2007). Se han descrito varias fosfatasas para MAPK: serina/treonina fosfatasas como PP2A, tirosín-fosfatasas (familia PTP), y fosfatasas duales que suelen ser específicas de MAPK, conocidas como DUSP o MKP (Peti et al. 2013). Se ha demostrado que las MKP regulan la respuesta inflamatoria y la actividad de las MAPK en general. Se dividen en tres grupos dependiendo de la localización subcelular: nuclear como MKP-1; citosólica como MKP-3 (específicas de ERK); o ambas, nuclear y citosólica, como MKP-5. Sus niveles están estrictamente regulados: su expresión suele inducirse por las mismas quinasas a las que inactivan y se degradan aproximadamente una hora después de sintetizarse (Huang et al. 2012).

En enfermedades inflamatorias pulmonares como el asma, las células de músculo liso bronquial promueven y regulan el estado inflamatorio de los bronquios mediante la secreción de diversas citoquinas como IL-6. Se ha visto que, tras la activación de p38 por TNF α en células de músculo liso bronquial en cultivo, p38 estimula la expresión de MKP-1 que a su vez defosforila a p38 poco tiempo después disminuyendo la secreción de citoquinas (Prabhala et al. 2015). Asimismo, la inhibición de MKP-1 en células A549 de epitelio pulmonar estimuladas con TNF α y otras citoquinas aumenta la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-6 e IL-8 por la sobreactivación de p38 (Turpeinen et al. 2010).

Otras investigaciones muestran que MKP-5 también actúa sobre p38 regulando su actividad. En la línea de macrófagos murinos J774 estimulados con LPS, el

silenciamiento genético o la inhibición de MKP-5 provoca el aumento de la fosforilación de p38, pero no de ERK ni JNK (Hommo et al. 2015).

Al igual que p38, las fosfatasa están implicadas en el desarrollo del dolor neuropático. Cuando se sobreexpresa MKP-1 en células de microglía murina BV-2 se impide la fosforilación de p38 inducida por LPS, bloqueando la producción de citoquinas. Igualmente, cuando se transfecta y sobreexpresa MKP-1 en la médula espinal de ratas a las que se les ha producido una lesión en los nervios periféricos, se atenúa la hipersensibilidad táctil provocada por esta lesión, un síntoma típico del dolor neuropático periférico (Ndong et al. 2012). De este modo, las fosfatasa de MAPK también están siendo objetivo para el desarrollo de fármacos antiinflamatorios que aumenten su actividad (Peti et al. 2013).

1.1.7. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE p38.

Basalmente, p38 α puede encontrarse en el citoplasma, y, en respuesta a un estímulo, se puede translocar al núcleo para fosforilar sus sustratos nucleares. p38 puede volver al citosol cuando desaparece el estímulo y la inactivación de p38 parece imprescindible para su exportación al citosol, proceso que es dependiente del transporte por dineína a través de los microtúbulos (Gong et al. 2010). Se ha descrito que la translocación nuclear de p38 es dependiente principalmente de sus sustratos MAPKAPK2 (MK2), MAPKAPK3 (MK3) y MAPKAPK5 (MK5), ya que p38 no tiene la secuencia de localización nuclear (NLS) que sí tienen las MKs (Engel et al. 1998; Gong et al. 2010). La región C-terminal de MK2, que contiene la NLS, tiene una energía de interacción con p38 ($\Delta G = -8,9 \text{ kcal/mol}$) similar a la obtenida con la proteína completa ($\Delta G = -10,9 \text{ kcal/mol}$) lo que puede indicar que esta región es importante para la interacción con p38, ya que es donde también se encuentra la secuencia de interacción (*docking*) con MAPK (Lukas et al. 2004).

Otras publicaciones, sin embargo, defienden que en estado basal p38 se encuentra unida a las MKs en el núcleo y, en respuesta a un estímulo, p38 se activa y fosforila a las MKs que sufren un cambio conformacional por el que exponen una secuencia de exportación del núcleo (NES) y se translocan junto con p38 al citoplasma a través del complejo del poro en un proceso mediado por exportina-1 (Engel et al. 1998; Li et al. 2008). Experimentos de SPR (resonancia del plasmón de superficie) han demostrado que la afinidad de p38 por MK2 se reduce significativamente tras la activación de MK2, lo que liberaría p38 para fosforilar otros sustratos en el núcleo (Meng et al. 2002; Lukas et al. 2004; Gong et al. 2010). p38 fosforila a MK2 en varios residuos, y cada uno juega un papel distinto: la fosforilación de la treonina 334 es la más importante para la translocación al citosol tras la activación de la vía (Engel et al. 1998); por otro lado, la fosforilación de la treonina 222 y serina 272 son necesarias para la activación de MK2 (Ben-Levy et al. 1995).

Recientemente se ha descrito un segundo sistema de localización nuclear independiente de secuencias NLS donde p38 forma un complejo ternario con importinas que puede ser Imp3/Imp7/p38 o Imp3/Imp9/p38. Estos heterotrímeros viajan hasta la membrana nuclear donde Imp7 o Imp9 acompañan a p38 hasta el núcleo en un proceso dependiente de Ran, mientras que Imp3 permanece en el citosol (Zehorai et al. 2014).

Como se ha comentado anteriormente, se ha observado en cardiomiocitos neonatales de rata que TAB1 se une a p38 α reteniéndola en el citosol y evitando que ejerza funciones asociadas con la ruta canónica como la inducción de la expresión de citoquinas inflamatorias, marcadores cardíacos o cambios morfológicos, por lo que la activación de la ruta de TAB1 compite con la ruta de activación canónica de p38 (Lu et al. 2006).

1.1.8. ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE p38.

La estructura tridimensional de p38 se ha estudiado detalladamente ya que se han resuelto las estructuras de las cuatro isoformas de p38. También se ha conseguido cristalizar la conformación activa de p38 (Zhang et al. 2011b) así como diversos mutantes activos e inactivos. Actualmente (octubre, 2015), la búsqueda de estructuras tridimensionales en el servidor público “Protein Data Bank” (<http://www.rcsb.org>) de “p38 α ” genera 228 resultados, de los cuales casi la mitad se han obtenido en los últimos 5 años y 194 estructuras corresponden a modelos tridimensionales de p38 con inhibidores, lo que refleja el gran interés por p38 y por desarrollar inhibidores eficaces.

p38 consta de dos lóbulos, el N-terminal, más pequeño, que consta de los aminoácidos 1 al 108 y del 321 al 360, y el C-terminal, más grande, que abarca desde el 109 al 320 (según la numeración de la isoforma p38 α humana que se utilizará a lo largo de toda la tesis). Entre los dos lóbulos se encuentra la región del “*hinge*” o bisagra donde se localiza el bolsillo de unión a ATP. La fosforilación de p38 en el bucle de activación conlleva un desplazamiento de éste que permite la entrada del ATP y el acoplamiento con sustratos (Chang et al. 2002).

Existen determinadas regiones claves en p38, algunas compartidas con otros grupos de quinasas, que se han identificado gracias al desarrollo de inhibidores que interactúan a través de estas zonas:

“*Switch pocket*”.

Es una región cercana al bolsillo de unión a ATP, formada por dos argininas en el lóbulo pequeño, 67 y 70 y por tres argininas en el lóbulo grande, 149, 186 y 189 (Figura I-2). Las argininas, cargadas positivamente, del lóbulo pequeño se unen a la treonina 180 cuando está fosforilada y por tanto cargada negativamente, estabilizando el bucle de activación en la posición correspondiente a la conformación activa de p38. A su vez, las argininas del lóbulo grande se unen a la tirosina 182 ayudando a la estabilización de la conformación activa. Este conjunto de aminoácidos cargados positiva y negativamente se ha llamado *switch pocket* o “interruptor” ya que dependiendo de la fosforilación y, por tanto, de la carga del bucle de activación, este bucle se encuentra en una posición activa o inactiva. Además, existe una serie de aminoácidos cargados negativamente, Asp176, Asp177 y Glu178, situados en el lado opuesto que repelen la carga negativa del dominio TGY cuando está fosforilado “empujando” el bucle hacia la conformación activa. Cuando el dominio TGY no está fosforilado, estos aminoácidos cargados negativamente retienen el bucle de activación en la posición inactiva a través de varios puentes de hidrógeno con el dominio TGY. Además, ayudan a posicionar la treonina 185 del centro activo cerca del aspártico 150, responsable de la actividad catalítica, a modo de pseudosustrato. Este mecanismo de interruptor está muy extendido entre las quinasas, lo que refleja la conservación evolutiva de este proceso regulatorio. Algunos inhibidores de tipo II (ver sección 4) como el BIRB-796 de Boehringer Ingelheim basan su mecanismo de acción en la interacción con las argininas del *switch pocket* evitando que p38 adquiera la conformación activa (Ahn et al. 2010; Swann et al. 2010).

Dominio DFG.

En el lóbulo grande y flanqueando el centro activo se encuentra el dominio DFG (Aspartato-Fenilalanina-Glicina), muy conservado entre las proteínas de la familia de las quinasas. La cadena lateral de la fenilalanina 169 normalmente se encuentra insertada en un bolsillo hidrofóbico situado entre los dos lóbulos en una conformación llamada “*DFG-in*”. En presencia de inhibidores de tipo II y III, como el BIRB-796, el dominio DFG se mueve, desplazando la fenilalanina unos 10Å a una posición diferente (“*DFG-out*”) que descubre un nuevo bolsillo hidrofóbico que es ocupado por el

inhibidor. A su vez, la fenilalanina se sitúa en una posición que interfiere estéricamente con el bolsillo de unión a ATP, concretamente con la posición de los fosfatos, inactivando p38 (Pargellis et al. 2002). Por resultados obtenidos por RMN (Resonancia Magnética Nuclear) y DM (simulaciones de Dinámica Molecular) se ha observado que existe un equilibrio dinámico entre las dos conformaciones en ausencia de inhibidores y, aunque es menos frecuente la conformación *DFG-out*, los inhibidores de tipo II retienen la quinasa en esta conformación inactiva (Filomia et al. 2010).

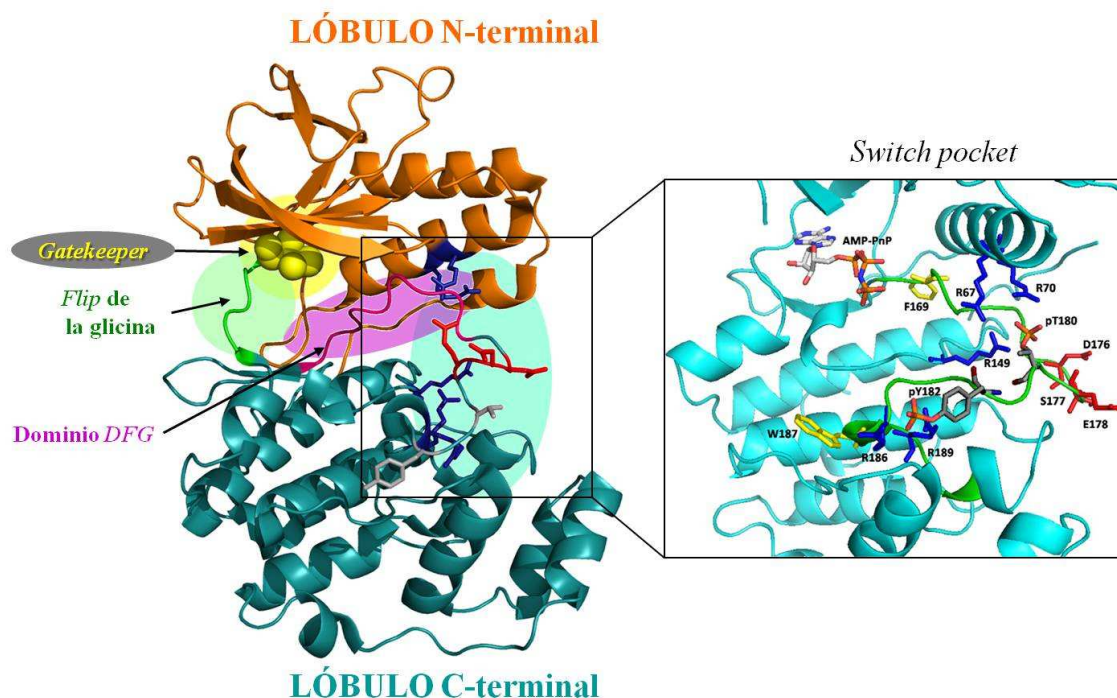


Figura I-2. Representación tridimensional utilizando el software Pymol de las principales regiones en p38 α (Estructura PDB: 3NNU). Se han resaltado el residuo *gatekeeper* (esferas en amarillo), *flip* de la glicina (en verde) y el dominio *DFG* (en magenta). En el cuadro adjunto se ha ampliado la región del *switch pocket*. Se han resaltado en la figura y en el cuadro los aminoácidos cargados positivamente (en azul oscuro), los cargados negativamente (en rojo) y la treonina y tirosina del bucle de activación (en gris). Además, se han resaltado y etiquetado los aminoácidos implicados en el desplazamiento del bucle de activación. Adaptado de (Ahn et al. 2010).

Residuo “*gatekeeper*”.

Es un aminoácido situado a la entrada del bolsillo de ATP, que forma un bolsillo hidrofóbico por donde interaccionan algunos inhibidores de tipo I y II. En p38 α y p38 β es la treonina 106, pero en p38 γ y p38 δ es una metionina, un aminoácido más voluminoso que no permite la entrada de inhibidores al bolsillo de ATP, proporcionando selectividad hacia estas isoformas. Es lo que ocurre con el inhibidor SB203580 que interacciona con este bolsillo pudiendo inhibir p38 α y p38 β pero no p38 δ y p38 γ . El residuo *gatekeeper* es el responsable de esta selectividad (Moallem et al. 2012).

“*Flip*” de la glicina.

El *flip* de la glicina 110 es un pequeño reordenamiento conformacional en la región bisagra de p38 inducido por inhibidores generalmente dirigidos hacia el bolsillo de ATP, que consiste en una torsión de 180° para que el oxígeno carbonílico y la amina de la glicina 110 y la amina de la metionina 109 puedan formar puentes de hidrógeno con los inhibidores. Este *flip* proporciona selectividad a los inhibidores de p38 sobre otras quinazas que no tienen una glicina en esta posición. Aunque 46 de las 518 quinazas

pueden hacer este reajuste conformacional, sólo 3 tienen un treonina como *gatekeeper*, por lo que utilizar estas dos características conjuntamente en el proceso de diseño basado en la estructura de la proteína puede proporcionar una gran selectividad a los inhibidores de p38 (Martz et al. 2012).

1.1.9. DOMINIOS DE INTERACCIÓN CON SUSTRATOS Y ACTIVADORES.

La diana de fosforilación de las MAPK es una serina o treonina seguida por una prolina. Esta diana es utilizada por todas las MAPK y por otros grupos de quinasas, por lo que se hace necesario que existan sistemas que dirijan las quinasas hacia determinados sustratos. La eficiencia y especificidad de la señalización por MAPK está promovida principalmente por interacciones especializadas entre dominios de interacción proteína-proteína entre las MAPK y el resto de componentes de la cascada de señalización. Estas interacciones son muy eficientes y esenciales para la correcta transducción de la señal a través de las complejas rutas de señalización (Mayor et al. 2007). Además de afinidad y especificidad, estos dominios también son importantes para regular la actividad, la localización subcelular y el tipo de sustrato para cada MAPK. Concretamente, en nuestro laboratorio hemos descrito (ver sección 2) un nuevo sistema de regulación de la actividad de p38 a través de la fosforilación por GRK2 de la treonina 123 (Peregrin et al. 2006), aminoácido incluido en uno de estos dominios de interacción: el surco de anclaje.

Se han identificado al menos 2 tipos de dominios de interacción en p38:

1.1.9.1. SURCO DE ANCLAJE.

El surco de anclaje está localizado en la superficie de la proteína entre los dominios C y N terminal, en el lado opuesto al bolsillo de ATP, e interactúa con los llamados motivos-D, secuencias de aminoácidos lineales y cortas que están presentes en activadores, sustratos, fosfatasas y otras proteínas de interacción con p38.

El surco de anclaje consta de dos regiones (Figura I-3): el dominio CD (Dominio Común) y el dominio ED (Glutámico-Aspártico) (Tanoue et al. 2001). El dominio CD consiste en una región cargada negativamente identificada principalmente por los aminoácidos Glu81, Asp 313, Asp315 y Asp316, y que es capaz de atraer a través de interacciones electrostáticas a los aminoácidos cargados positivamente de los motivos-D (Chang et al. 2002; ter Haar et al. 2007; White et al. 2007). El dominio ED es un bolsillo muy hidrofóbico que interactúa con el motivo-D a través de interacciones principalmente apolares, por ejemplo, con las cadenas laterales de los aminoácidos Ala111, Ile116, Leu122, His126, Val158, Asn159, Glu160, Asp161 y Cys162 (Chang et al. 2002). Estos bolsillos de interacción son muy similares entre todas las MAPK pero contienen algunas características diferenciadoras que los hacen altamente selectivos sobre diferentes sustratos.

Por otro lado, el motivo-D (también llamado dominio-D, sitio-D, KIM -Motivo de Interacción con Quinasas-, dominio- δ o dominio DEJL) es una secuencia presente en las proteínas que interactúan con p38 mediante su surco de anclaje. El motivo-D consiste en 2 ó 3 aminoácidos básicos a una distancia de entre 2 y 6 aminoácidos de un grupo hidrofóbico que consta de dos aminoácidos pequeños apolares separados de un aminoácido cualquiera. La secuencia concreta no presenta un consenso claro, pero las pequeñas diferencias entre los diferentes motivos dirigen a las proteínas hacia una MAPK u otra y establecen la eficiencia y duración de la interacción. La secuencia canónica sería $\Psi_{2-3}\text{-X}_{2-6}\text{-}\Phi_A\text{-X-}\Phi_B$ donde Ψ representa un aminoácido cargado positivamente, X un aminoácido cualquiera y Φ un aminoácido apolar. Según Garai et al. los contactos directos de los aminoácidos más conservados son los que

proporcionarían la afinidad, mientras que los aminoácidos intermedios son los que determinarían el modo de unión y la especificidad entre las MAPK. Activadores de p38 como MKK6 y MKK3b contienen esta secuencia, así como los sustratos MEF2A/C, MK2, PRAK, SAP-1 y NFAT4 (Garai et al. 2012). Incluso la proteína TAB1, que promueve la autofosforilación de p38, posee un motivo-D reducido que interacciona solamente con el dominio ED (De Nicola et al. 2013; Xin et al. 2013).

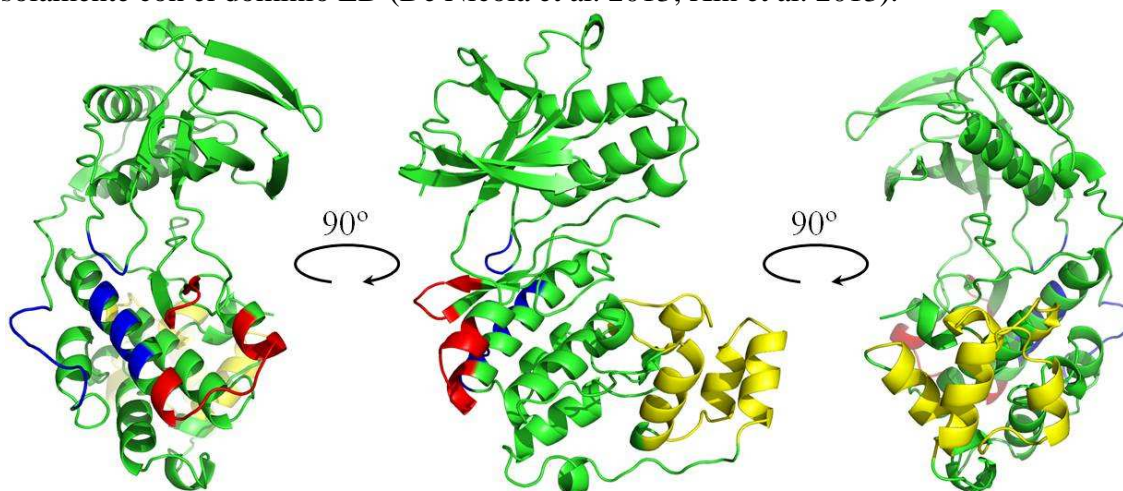


Figura I-3. Representación tridimensional utilizando el software Pymol de los dominios de interacción en p38 α (Estructura PDB: 1LEW). Se ha resaltado el surco de anclaje formado por el dominio CD (en azul) y el dominio ED (en rojo), y el dominio DEF (en amarillo).

Existen dos tipos de motivos-D que se unen al surco de anclaje: el motivo-D clásico, que responde a la secuencia canónica de N a C-terminal y está presente en activadores como MKK6 y MKK3b y sustratos como MEF2A. Por otro lado está el motivo-D inverso, que presenta una secuencia muy similar a la canónica pero en sentido inverso, de C a N-terminal, y que está presente sobre todo en sustratos que a su vez son proteínas quinasa como MK2, MNK y MSK (Garai et al. 2012). Según lo publicado hasta el momento, el motivo-D clásico puede distinguir eficazmente entre JNK por un lado y p38 y ERK por otro; pero el motivo-D inverso no reconocería en ningún caso a JNK, aunque podría discriminar entre p38 y ERK según la secuencia (Garai et al. 2012).

Existen 10 estructuras por cristalografía de rayos X publicadas hasta 2015 que exploran las interacciones entre el surco de anclaje de p38 y el motivo-D de distintas proteínas, además de otras publicaciones con otras MAPK y proteínas que contienen motivos de unión, como por ejemplo las estructuras de JNK con ATF2 o JIP (Laughlin et al. 2012), y ERK2 con RSK o MK2 (Gogl et al. 2013). Por otro lado, existen proteínas que interactúan con p38 que no presentan esta secuencia, y por tanto, deben interactuar con p38 a través de otra región como el dominio DEF (ver más abajo).

1.1.9.2. DOMINIO DEF.

El dominio DEF, aunque fue inicialmente descubierto en ERK1/2, también está presente en p38. Es una cavidad que se forma transitoriamente mediante cambios conformacionales en el lóbulo mayor C-terminal tras la activación de p38 y tiene un carácter principalmente hidrofóbico, que puede acomodar un motivo apolar existente en determinados sustratos, normalmente formado por la secuencia Phe-Xaa-Phe y situado próximo al sitio de fosforilación, por lo que también se le ha llamado motivo FXF (Diskin et al. 2008; Tzarum et al. 2013). Tanto la estructura tridimensional de p38 activada por fosforilación en el bucle de activación como la de mutantes constitutivamente activos muestran la formación de este bolsillo de interacción (Diskin

et al. 2007; Zhang et al. 2011b). Los residuos que forman esta región están situados entre el motivo TGY (residuos 180-182), la hélice F (residuos 190-203), la hélice G (residuos 227-237) y las hélices 1L14 y 2L14 (residuos 240-262), y son principalmente Met194, Leu195, His228, Ile229 y Tyr258 (Figura I-3). La región entre los residuos 240 y 262 es conocida como "inserto de MAPK", una secuencia incluida en el dominio quinasa que es casi exclusiva de las MAPK (también se ha encontrado en la familia de quinasas CDK2). La mutación de estos residuos reduce significativamente la capacidad de p38 de fosforilar sustratos como ATF2, Elk-1 y MBP, aunque no parece tener efecto sobre la fosforilación de MK2 (Tzarum et al. 2013). Ocurre lo contrario cuando las mutaciones se realizan sobre aminoácidos del dominio CD: la fosforilación de MK2 se reduce considerablemente mientras que la fosforilación de ATF2, Elk-1 o MBP no disminuye tanto (Kumar et al. 1997). Por consiguiente, se pueden distinguir claramente dos subgrupos de sustratos dependiendo del dominio de anclaje con el que interaccionen.

Por otro lado, los mutantes de p38 en el dominio DEF tienen muy disminuida la capacidad autofosforiladora respecto a la proteína silvestre, lo que sugiere que la trans-autofosforilación de p38 está mediada por este dominio (Tzarum et al. 2013).

El uso de estos dominios de interacción como diana terapéutica representaría una nueva vía para el desarrollo de inhibidores no sólo específicos de p38 sino también selectivos para determinados subgrupos de sustratos. Esto permitiría el silenciamiento de determinadas vías, sin la necesidad de inhibir toda la actividad quinasa, lo que podría ayudar a evitar los efectos adversos inesperados o tóxicos que se han producido con otros inhibidores que bloquean completamente la actividad de p38.

2. p38 y GRK2.

Las GRKs (quinasas de receptores acoplados a proteínas G o GPCR) se describieron inicialmente como proteínas quinasa que finalizan la señalización de los GPCRs a ciertas rutas intracelulares moduladas por proteínas G heterotriméricas mediante la fosforilación de residuos serina/treonina de receptores activados por agonista, favoreciendo de este modo el reclutamiento de las β -arrestinas y promoviendo el desacoplamiento de las proteínas G, así como procesos de internalización, reciclaje o degradación de los GPCR. Las β -arrestinas unidas a los GPCR activados y fosforilados actúan tanto para detener como para transducir la señal a diversas rutas, incluidas las MAPK. Además, recientemente se ha descubierto que las GRKs pueden fosforilar numerosos sustratos de membrana no GPCRs, así como sustratos citosólicos como tubulina, radixin y ezrina que diversifican las funciones de estas quinasas. Además se han identificado diversas moléculas con las que las GRKs interaccionan de modo independiente de la actividad quinasa como actina, tubulina, PI3K, GIT, IRS1 y caveolina entre otros (Mayor et al. 2011; Evron et al. 2012; Sato et al. 2015).

Dada la complejidad funcional de las GRKs y de su interactoma, estas proteínas están sometidas a una sofisticada regulación, tanto de sus niveles totales, como de su actividad y su localización subcelular. GRK2, anteriormente conocida como β ARK1 por fosforilar el receptor β -adrenérgico, se expresa ubicuamente y es la quinasa mejor caracterizada de esta familia. La estructura tridimensional de GRK2 determinada por cristalografía muestra que está dividida en tres regiones: una zona N-terminal que incluye un dominio de regulación de subunidades alfa de proteínas G (RH), un dominio central catalítico y un dominio C-terminal de homología a pleckstrina (PH). Los dominios N- y C-terminales parecen ser los que determinan la especificidad de sustratos

de GRK2. El dominio C-terminal además regula la distribución subcelular de GRK2 ya que al unirse a fosfolípidos y proteínas de membrana puede translocarse a la membrana celular (Beautrait et al. 2014).

La actividad y estabilidad de GRK2 también está modulada por fosforilación de aminoácidos específicos por c-Src o por ERK, entre otras. La fosforilación por c-Src incrementa la actividad catalítica de la quinasa, mientras que ERK bloquea la interacción de GRK2 con las subunidades G $\beta\gamma$ de las proteínas G reduciendo su capacidad para fosforilar a los receptores GPCR (Penela et al. 2003). Tanto la fosforilación por c-Src como por ERK inducen la degradación de GRK2 por la vía del proteasoma (Elorza et al. 2003).

En nuestro laboratorio, para investigar si otras MAPK distintas de ERK podrían influir en las funciones de GRK2, se analizó si p38 α podría fosforilar a GRK2 en ensayos *in vitro* con proteínas purificadas, y se descubrió que no la fosforilaba, mientras que p38 α sí aparecía fosforilada. Un estudio más detallado mostró que GRK2 podía fosforilar p38 α con las siguientes constantes cinéticas: una Km de 80nM y una velocidad máxima de 0,9nmol.mg⁻¹.min⁻¹, similares a las obtenidas con sustratos conocidos de GRK2 como fosducina (Km=40nM) (Ruiz-Gomez et al. 2000) y el receptor β 2-adrenérgico (Km=260nM) (Benovic et al. 1986). Para averiguar el sitio de fosforilación por GRK2 se realizaron estudios de espectrometría de masas (MALDI-TOF) y se determinó que p38 α era fosforilada en la treonina 123, un residuo localizado en el surco de anclaje, concretamente en el dominio ED. Cuando este residuo era mutado a otro no fosforilable, p38 perdía la capacidad de ser fosforilada por GRK2 (Peregrin et al. 2006). Además, se descubrió que p38 y GRK2 interactúan y coprecipitan en células estimuladas con isoproterenol. Mayores niveles y actividad de GRK2 pueden reducir procesos dependientes de p38 como la diferenciación de células preadipocíticas o la secreción de citoquinas proinflamatorias en respuesta a LPS (Peregrin et al. 2006). Esta fosforilación inhibitoria representa un mecanismo de regulación novedoso para la familia de las MAPK.

Esta correlación inversa entre los niveles de GRK2 y la activación de p38 se ha descrito también en otros sistemas. Por ejemplo, los ratones hemizigotos para GRK2 (GRK2^{+/-}) con un 50% de expresión de GRK2 respecto a ratones silvestres en medula espinal y ganglios espinales (entre otros tejidos) presentan una hiperalgesia inducida por inflamación (provocada por la inyección de carragenato o IL-1 β) más intensa y más prolongada que los ratones control. Incluso cuando se reducen los niveles de GRK2 al 50% específicamente en microglía, granulocitos y macrófagos, esto es suficiente para provocar la misma hiperalgesia que en los ratones GRK2^{+/-}. Esta reducción en los niveles de GRK2 se correlaciona con unos niveles de activación de p38 significativamente elevados en médula espinal, y cuando estos ratones son tratados con inhibidores específicos de p38 se revierte la hiperalgesia a los niveles basales de los ratones silvestres (Eijkelkamp et al. 2010). Además, los autores indican que la inflamación crónica podría reducir los niveles de GRK2 en microglía y macrófagos lo que puede ser suficiente para prolongar la hiperalgesia (Willemen et al. 2010).

En otro contexto, p38 regula la diferenciación y formación de miocitos de músculo esquelético. Se ha observado que la inhibición de p38 evita la fusión de mioblastos murinos en cultivo y la expresión de genes específicos de la diferenciación muscular. Por el contrario, cuando se provoca la sobreactivación p38 en estos mioblastos se induce la diferenciación y la formación de miotubos (Perdiguero et al. 2007). Contrariamente, se ha detectado una reducción en los niveles de GRK2 durante la diferenciación de mioblastos en cultivo. Cuando se sobreexpresa GRK2, p38 no se activa completamente y los mioblastos no se diferencian correctamente. Sin embargo, se

detecta un aumento de la fosforilación inactivadora en la treonina 123, residuo fosforilable por GRK2. En cambio, si se sobreexpresa un mutante de GRK2 sin actividad catalítica, p38 puede activarse con normalidad y los mioblastos pueden diferenciarse completamente a la vez que la fosforilación de la treonina 123 se ve reducida (García-Guerra et al. 2014).

3. p38 EN SITUACIONES PATOLÓGICAS.

La mayoría de las investigaciones sobre p38 se han centrado en su función en células proinflamatorias y en su relevante papel en la señalización de citoquinas (ver más abajo). En este sentido, p38 es un elemento muy importante en enfermedades como la artritis reumatoide, esclerosis múltiple, aterosclerosis y enfermedad pulmonar obstructiva crónica, así como dolor crónico (Gupta et al. 2015). Varios estudios en animales y análisis clínicos en humanos donde se ha demostrado la eficacia de inhibidores de p38 en enfermedades inflamatorias corroboran la hipótesis de que p38 está implicada de manera causal en el inicio o el desarrollo de este tipo de enfermedades (Goldstein et al. 2010). Asimismo, p38 juega un papel central en el establecimiento y la progresión del fallo cardíaco, en cáncer y en enfermedades neurodegenerativas (ver más abajo).

3.1. p38 COMO DIANA PARA EL DOLOR CRÓNICO.

El dolor crónico puede originarse a partir de una infección, dolor articular, trauma o un daño directo de los nervios. Existen varios tipos de dolor crónico: nociceptivo, neuropático, hipersensibilidad periférica e hipersensibilidad central (Lin et al. 2014). Algunas publicaciones indican que la activación de p38 en la médula espinal tiene un papel decisivo en la patogénesis del daño neuropático. Se han encontrado dos isoformas en la médula espinal, p38 α en neuronas y p38 β 2 en la microglía. p38 α parece ser responsable de la hipersensibilidad central y p38 β 2 de la periférica (Svensson et al. 2005). Se ha demostrado que la hipersensibilidad puede ser bloqueada con la administración en la médula espinal de inhibidores de p38 como el SB203580 o UR13870 (Galan-Arriero et al. 2015; Wang et al. 2015). Estos descubrimientos sugieren que p38 puede ser una diana terapéutica para el tratamiento del dolor crónico asociado con inflamación. De hecho, dos inhibidores de p38, ARRY-797 y SCIO-469, han demostrado en análisis clínicos efectos analgésicos en dolor provocado por cirugía dental (Carter et al. 2008; Tong et al. 2012).

Como se ha visto anteriormente, ratones hemizigotos para GRK2 en microglía, granulocitos y macrófagos de la médula espinal presentan una mayor sensibilidad al dolor, provocada por una inflamación más pronunciada y crónica que es dependiente de p38. La administración de inhibidores específicos de p38 a estos ratones hemizigotos para GRK2 produce una reversión a la situación basal (Eijkelkamp et al. 2010).

Gracias a la dependencia de p38 en este sistema de hiperalgesia crónica, este modelo animal ha sido utilizado para evaluar los compuestos y péptidos inhibidores del surco de anclaje de p38 que se desarrollan en esta tesis, con resultados muy prometedores (Willemen et al. 2014).

3.2. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES.

Se ha detectado la activación de p38 en modelos animales de fallo cardíaco (Bellahcene et al. 2006). Además, p38 está activada habitualmente en procesos de la enfermedad cardiovascular como el acondicionamiento isquémico, la lesión por isquemia o el infarto de miocardio. También se ha descrito que la activación de p38 parece contribuir a la progresión de la disfunción cardiovascular causando la muerte de miocitos durante

la isquemia cardíaca, el remodelado fibrótico, la hipertrofia cardíaca y la sobrecarga por presión (Arabacilar et al. 2015). Por todo ello, se han realizado multitud de estudios en animales y pacientes con la intención de atenuar el fallo cardíaco mediante el uso de inhibidores de p38: en ratones, estos compuestos reducen la región dañada tras un infarto, atenúan la fibrosis y apoptosis y aumentan la supervivencia de los ratones tratados (Martin et al. 2015).

Se ha observado que la inhibición farmacológica de la ruta de p38 puede recuperar la función cardíaca en modelos animales de enfermedades coronarias como la cardiomiopatía hipertrófica en ratones con p38 sobreactivada (Auger-Messier et al. 2013), prevenir del daño cardíaco en un modelo de isquemia/reperfusión en ratas (Surinkaew et al. 2013) y mejorar la contractilidad del tejido muscular cardíaco (Cross et al. 2009). Igualmente, la inhibición farmacológica o genética de p38 en ratones previene del daño cardíaco causado por fibrosis y apoptosis, y el daño tisular secundario a la situación de hipertensión en otros órganos (Olzinski et al. 2005).

3.3. PATOLOGIAS INFLAMATORIAS Y AUTOINMUNES.

La artritis reumatoide es una de las enfermedades autoinmunes más frecuentes y se caracteriza por el engrosamiento de la membrana sinovial de las articulaciones, con proliferación de sinoviocitos y extensa infiltración de células inflamatorias (Coulthard et al. 2009). Se ha demostrado que p38 α se activa en esta situación por MKK3 y MKK6. p38 α regula la producción de IL-1 β , IL-6 y otras citoquinas implicadas en el proceso, además de TNF α . El uso de inhibidores de p38 en pacientes reduce la secreción de estas citoquinas y, por tanto, la inflamación y la destrucción de hueso y cartílago (Bonilla-Hernan et al. 2011). De hecho, la administración de glucocorticoides, que tiene una acción antiinflamatoria, sobreactiva a la fosfatasa MKP-1, que desactiva p38 (Toh et al. 2004). Además, los ratones manipulados genéticamente que carecen de MAPKAPK2 (principal efector de p38 en la regulación de la expresión de citoquinas) son resistentes a la artritis inducida por colágeno (Hegen et al. 2006).

La enfermedad de Crohn es una forma crónica y recurrente de la enfermedad inflamatoria intestinal. La ruptura de la barrera intestinal provoca una fuerte reacción inflamatoria junto con la secreción de citoquinas como IL-1 β y TNF α . La implicación de estas citoquinas en la enfermedad es determinante y dependiente de p38. A la vez, la activación de p38 inhibe la proliferación del epitelio intestinal y promueve su apoptosis alterando la integridad de la barrera intestinal (Zhang et al. 2015). De hecho, en pacientes con enfermedad de Crohn se han registrado en la mucosa intestinal niveles elevados de la actividad de p38 así como niveles altos de ATF2 y HSP70 fosforilados (Coulthard et al. 2009).

p38 participa también en el desarrollo del asma y de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), patologías crónicas causadas por la inflamación y obstrucción de las vías aéreas. Se ha descrito que p38 se activa en macrófagos infiltrados en el pulmón de pacientes con EPOC y asma estimulando la producción de TNF α y otras citoquinas, y la inhibición de p38 reduce la secreción de las mismas. Los agentes oxidantes del humo provocan la secreción de mucina por el epitelio pulmonar y la permeabilidad de la barrera alveolo-capilar, procesos asociados con la activación de p38 (Chung 2011). Estudios en ratones KO para MAPKAPK2 han revelado que la ruta de p38 sería una diana útil para el tratamiento de esta enfermedad puesto que estos ratones presentan menor inflamación y menor respuesta ante alérgenos (Gorska et al. 2007).

3.4. CÁNCER.

Es una patología caracterizada por la desdiferenciación de las células junto con replicación ilimitada, evasión de la apoptosis, migración y metástasis. La formación de tumores suele ir acompañada de una respuesta inflamatoria. Así, diversas células del sistema inmune como macrófagos y linfocitos pueden infiltrarse y regular la formación del tumor mediante la secreción de citoquinas (Gupta et al. 2015).

Algunas publicaciones relacionan la activación de p38 con la resistencia a cisplatino y otros agentes antitumorales que provocan la apoptosis de las células tumorales. De este modo, se ha observado la activación de p38 en diversos tipos de cáncer resistentes como el de hígado, de mama y colorectal entre otros. La inhibición de p38 sensibiliza las células a cisplatino en tumores que han desarrollado resistencia a este agente y reduce el tamaño y la gravedad de tumores de mama en ratones (Pereira et al. 2013).

Por otro lado, se ha descrito que p38 regula la expresión de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9, que degradan la matriz extracelular y permiten que las células tumorales se extiendan provocando metástasis. Algunos agentes antitumorales como baicaleína o emetina reducen los niveles de estas metaloproteasas en cáncer gástrico y en cáncer de pulmón no microcítico, respectivamente, a través de la inhibición de p38 (Kim et al. 2015; Yan et al. 2015).

3.5. ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS.

La actividad de p38 está aumentada en neuronas de pacientes con Alzheimer, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple y Parkinson. p38 α y p38 β 2 son las isoformas expresadas mayoritariamente en el cerebro y están frecuentemente activadas en modelos animales de neurodegeneración. Además, Tau es fosforilada en varios sitios por p38, y p38 activada colocaliza en depósitos de proteína Tau (Reynolds et al. 1997; Lauretti et al. 2015). Tanto la hiperfosforilación por p38 como el depósito de Tau se relacionan con una disminución de la capacidad de formación de microtúbulos y con la acumulación de neurofilamentos en el axón, por lo que se cree que p38 estaría implicada en el desarrollo de algunas patologías neurodegenerativas (Rubio-Perez et al. 2012).

4. INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE p38.

Existen más de 500 quinasas en el genoma humano y actualmente son la segunda familia de proteínas en importancia, tras los GPCR, entre las utilizadas como dianas farmacológicas. Todas las quinasas comparten un alto grado de similitud estructural en el bolsillo de unión a ATP, por lo que conseguir inhibidores que actúen sobre el bolsillo de ATP (Inhibidores tipo I) y sean específicos sigue siendo un reto en química médica (Godl et al. 2003). En los últimos años, p38 se ha convertido en una de las principales dianas farmacológicas para el tratamiento de enfermedades de diversa etiología. Desde la aparición del SB203580 en 1993 desarrollado por Smith Kline Beecham (Olivera et al. 1993) se han intensificado los esfuerzos en desarrollar inhibidores de p38. En los siguientes 10 años se publicaron más de 10.000 artículos y patentes describiendo la caracterización de otros inhibidores de p38, todos competitivos para el ATP, con una actividad en el rango bajo nanomolar. Posteriormente, en 2002, Boehringer Ingelheim desarrolló y publicó el primer inhibidor alostérico de p38 que no es competitivo de ATP, el BIRB-796 o Doramapimod, que llegó a fase clínica IIb/III para psoriasis, artritis reumatoide y enfermedad de Crohn (Pargellis et al. 2002). Dos años después, Deciphera Pharmaceuticals patentó una nueva clase de moléculas que se anclan al *switch pocket* de p38 en su conformación inactiva donde también interacciona el BIRB-796 (Swann et al. 2010). Los esfuerzos por desarrollar inhibidores de p38 han

dejado un acervo de 183 estructuras tridimensionales con inhibidores que han sido publicadas. Asimismo, la búsqueda en el servidor “pubmed” de los términos “inhibitor” y “p38” devuelve unos 11.000 resultados, un tercio de los que se obtienen buscando sólo “p38”.

Sin embargo, los esfuerzos realizados hasta ahora para desarrollar fármacos eficaces contra p38 no han conseguido superar todas las fases clínicas, principalmente debido a efectos secundarios indeseados. Por ejemplo, en el caso del SB203580 se ha descrito una hepatotoxicidad severa debido a la interferencia con el citocromo P450 ya que tanto pirimidinas como imidazoles (componentes del SB203580) pueden unirse al hierro hemo del citocromo P450 (Laufer et al. 2003).

Se ha demostrado, además, que la toxicidad de estos compuestos puede producirse por la falta de especificidad al estar dirigidos contra el bolsillo de ATP, muy conservado y similar entre las quinasas, inhibiendo vías de señalización no relacionadas y alterando el correcto funcionamiento de la célula (Zhang et al. 2008). Volviendo al caso del SB203580, esta molécula puede inhibir a RICK, GAK o CK1 a la misma dosis que p38 (Godl et al. 2003), aunque tampoco está totalmente claro si los efectos tóxicos se producen por la inhibición inespecífica de otras quinasas o por la excesiva inhibición de p38 en el organismo (Gupta et al. 2015).

Por tanto, interesa desarrollar una nueva generación de inhibidores de quinasas eficaces, que no sean competitivos del bolsillo de ATP, que se puedan administrar oralmente y no resulten tóxicos. Por este motivo, la industria farmacéutica está dirigiendo sus esfuerzos a desarrollar nuevos inhibidores de quinasas que actúen alostéricamente (inhibidores tipo II y III) y que puedan conferir más especificidad, modificando la capacidad catalítica de la quinasa mediante cambios conformacionales u otros mecanismos independientes de la competición con ATP. A través de diferentes estrategias se han desarrollado algunos inhibidores de p38 muy potentes y selectivos incluso respecto a otras quinasas muy relacionadas, lo que ha llevado a que 20 de ellos hayan pasado a ensayos clínicos. De éstos, algunos han llegado a fase II (ARRY-797, BIRB796, SCIO469 y VX745) pero, finalmente, todos ellos han mostrado efectos adversos, entre otros, sobre el hígado, sistema nervioso, piel y riñón. Debido a la diversidad de procesos dependientes de p38, ha sido imposible determinar con exactitud si estos efectos adversos son producidos por la inhibición de p38 o por la toxicidad de los inhibidores (Genovese 2009).

4.1. TIPOS DE INHIBIDORES DE QUINASAS.

Los inhibidores de quinasas descritos hasta ahora se han organizado en los siguientes grupos:

Inhibidores Tipo I:

Son inhibidores que ocupan el bolsillo de unión de ATP, por lo que son competitivos para el ATP e interaccionan esencialmente con la conformación activa de las quinasas. Suelen ser inhibidores muy potentes y reversibles, aunque poco selectivos al tener como diana una región muy conservada entre todas las quinasas. Algunos ocupan otras regiones adyacentes y se consigue así aumentar su especificidad. Pertenecen a este grupo la mayoría de inhibidores desarrollados hasta ahora para p38 como el SB203580, SKF-86002, Pamapimod, SC409 y FR167653. El inhibidor de referencia en numerosas publicaciones, y que ha permitido estudiar en profundidad las funciones de p38 en procesos fisiológicos y patológicos, es el SB203580, un inhibidor de la familia de los piridinil-imidazoles. Presenta una IC_{50} *in vitro* de 100nM aunque se han desarrollado posteriormente análogos más potentes y selectivos como el SB239063 (IC_{50} =44nM) o el SB220025 (IC_{50} =60nM) (Liu et al. 2013).

Inhibidores Tipo II:

Estos nuevos inhibidores se desarrollaron para evitar la falta de selectividad de los inhibidores competitivos del ATP (Pargellis et al. 2002). Al estar dirigidos contra regiones menos conservadas entre quinasas, podrían ser más selectivos. Son inhibidores alostéricos que inducen la transición *DFG-in* a *DFG-out*, por lo que su interacción provoca cambios conformacionales que estabilizan la quinasa en una conformación inactiva. Cuando la quinasa está fosforilada el bucle de activación adopta una posición estable y el inhibidor no puede interaccionar, por lo que estos inhibidores sólo pueden actuar sobre la quinasa inactiva. Aunque no interaccionan con el bolsillo de ATP, provocan el desplazamiento de la fenilalanina 169 (en el caso de p38 α) que se sitúa cerca del centro activo impidiendo la entrada del ATP (Liu et al. 2006; Liu et al. 2013). El inhibidor de p38 más conocido de este grupo es el BIRB-796. También pertenecen a este grupo los inhibidores desarrollados por Deciphera como el DP-802 y DP-1376 (Ahn et al. 2010).

Inhibidores Tipo III:

Son inhibidores alostéricos que se unen a un bolsillo hidrofóbico adyacente al bolsillo de ATP y presente en la conformación inactiva. No impiden la entrada de ATP, por lo que tanto inhibidor como ATP se pueden encontrar unidos a la vez a la quinasa (Ohren et al. 2004). No existen inhibidores de este tipo para p38, pero el inhibidor más conocido de esta clase es el PD184352, que inhibe muy eficazmente MEK1 (Ohren et al. 2004).

Inhibidores Tipo IV:

A este grupo pertenecen aquellos inhibidores que no son competitivos de ATP ni ocupan bolsillos hidrofóbicos próximos al bolsillo de ATP. Son inhibidores que o bien bloquean la conformación inactiva de la proteína a través de interacciones intramoleculares o impiden la interacción con otras proteínas o sustratos limitando así su actividad. A este grupo pertenecen los inhibidores desarrollados contra el surco de anclaje (como los inhibidores que se describen en este trabajo) o contra el dominio DEF (Comess et al. 2011). Otro ejemplo de inhibidor de Tipo IV para p38 sería el CMPD1. Aunque no existe evidencia cristalográfica del modo de unión de CMPD1 a p38, a través de experimentos de espectrometría de masas se ha observado que interacciona por una región próxima al surco de anclaje. CMPD1 inhibe la fosforilación de sustratos dependientes del surco de anclaje como MK2 con una K_i^{app} *in vitro* de 330nM, mientras que no afecta a otros independientes como ATF2 ($IC_{50}=20\mu M$). Aunque no se conoce con certeza el sitio y el modo de interacción, mediante experimentos de intercambio de deuterio se sabe que no se une al surco de anclaje sino a una región cercana al centro activo pero fuera del bolsillo de ATP, solapándose con parte del sitio de unión del BIRB796 (Davidson et al. 2004).

Inhibidores Tipo V:

Debido a que los inhibidores alostéricos, a pesar de su potencial para ser muy selectivos, suelen tener una potencia limitada, algunos investigadores han propuesto un quinto tipo de inhibidores que unirían covalentemente un inhibidor competitivo de ATP con otro alostérico, lo que proporcionaría selectividad y afinidad por la quinasa, aunque por el momento no se ha desarrollado ninguna combinación efectiva (Lamba et al. 2012).

4.2. INHIBIDORES IRREVERSIBLES: INHIBICIÓN COVALENTE.

La inhibición irreversible consiste normalmente en la formación de un enlace covalente entre un grupo tiol del inhibidor y una cisteína de la proteína. Aunque es menos común, también puede dirigirse hacia otros aminoácidos nucleófilos. Una vez el inhibidor se une a la quinasa, ésta queda inactivada permanentemente y sólo se recupera la función con la producción de nueva enzima. Según la tasa de recambio de la proteína, la farmacocinética de estos compuestos puede variar sensiblemente. La inhibición irreversible presenta ventajas como una farmacodinámica prolongada debido a un mayor tiempo de residencia, a menudo mayor potencia inhibidora y la posibilidad de validar la especificidad farmacológica a través de la mutación del aminoácido diana. Normalmente los inhibidores irreversibles se han desarrollado por la incorporación de un grupo electrofílico a un inhibidor previo con una afinidad mínima en el rango micromolar, ya que es necesaria la correcta colocación del inhibidor para que se pueda formar la unión covalente. Este factor aporta además una gran selectividad, ya que el inhibidor sólo será activo en la quinasa que tenga una cisteína en la posición precisa para la que fue diseñado el inhibidor. Igualmente, es conveniente que existan a la vez interacciones no covalentes que dirijan el inhibidor hacia la diana, ya que una reactividad no específica puede resultar en la modificación covalente de proteínas o ADN lo que puede provocar efectos tóxicos indeseables. La gran mayoría de los inhibidores se han desarrollado contra el grupo tiol de las cisteínas y casi siempre contra una cisteína del centro activo (Liu et al. 2013).

4.3. DESARROLLO DE INHIBIDORES CONTRA EL SURCO DE ANCLAJE.

Las interacciones a través del surco de anclaje son clave para el reconocimiento de los sustratos, por lo que impedir estas interacciones puede ser una estrategia muy eficaz para la inhibición de p38.

4.3.1. DISEÑO DE PÉPTIDOS COMO INHIBIDORES DE p38.

Estudios recientes de cristalografía han permitido determinar con precisión cuál es la estructura y la secuencia de los aminoácidos que se unen al surco de anclaje y por dónde se unen: Chang y colaboradores han cristalizado p38 junto con los motivos-D de MEF2A y MKK3b (Chang et al. 2002), y Vertex Pharmaceuticals lo ha hecho con MK2 (ter Haar et al. 2007). Recientemente, otros grupos han cristalizado p38 con los motivos-D de MKK6, TAB1 y MKP-5 (Zhang et al. 2011a; Garai et al. 2012; De Nicola et al. 2013). En estas estructuras, se puede ver claramente que la treonina 123, el residuo fosforilado por GRK2 en p38 (Peregrin et al. 2006), se ubica precisamente a la entrada de este dominio de anclaje, concretamente en el dominio ED entre el bucle L8 y la hélice α e, por donde se ha podido definir que las interacciones con los motivos-D se basan fundamentalmente en contactos de tipo hidrofóbico. Por tanto, la presencia de un grupo fosfato o un grupo voluminoso podría impedir el anclaje de los motivos-D. Además, mutaciones en los residuos Ile116 o Gln120, que están muy próximos en la estructura a la Thr123, impiden la interacción de p38 con otras proteínas (Chang et al. 2002). La utilización de péptidos sintéticos que ocupen el surco de anclaje y, por tanto, compitan por la interacción de diferentes MAPK con sus sustratos y activadores, ha demostrado ser una herramienta eficaz a la hora de inhibir la fosforilación de proteínas por MAPKs de la familia JNK (Bogoyevitch et al. 2005). Existen casos que han utilizado esta estrategia anteriormente con gran éxito. Por ejemplo, el laboratorio de C. Bonny identificó en 2001 un péptido inhibidor de JNK a partir de la secuencia de una proteína relacionada llamada JIP-1 con una IC₅₀ de 1 μ M (Bonny et al. 2001). Este inhibidor de tipo peptídico desarrollado en 2001 para JNK se comercializa actualmente como XG-102 por la compañía Xygen Pharma, se encuentra en ensayos clínicos de fase

II con indicaciones para diabetes, Alzheimer y enfermedades inflamatorias, y ha sido objeto de numerosas publicaciones. Concretamente, en agosto de 2014, iniciaron ensayos clínicos fase III para el tratamiento de la inflamación tras la cirugía ocular de cataratas (Silverstein 2014). Aunque el estudio continúa en desarrollo, han podido demostrar que una dosis de 900µg/kg no es tóxica y reduce la inflamación intraocular durante al menos 28 días (Beydoun et al. 2015).

Otro grupo de investigadores ha desarrollado un péptido inhibidor de p38 a partir del motivo-D de MKK3b con una IC50 *in vitro* de 3,5µM. El péptido fue activo en ensayos celulares donde se ha visto inhibición de la activación y actividad de p38, y la inhibición de la secreción de citoquinas en respuesta a LPS, aunque presentó una IC50 pobre de aproximadamente 10µM. En ensayos de inflamación aguda en respuesta a LPS realizados en ratones han registrado un inhibición moderada del 34% con la dosis más alta de 25mg/kg (Fu et al. 2008).

4.3.1.1. PÉPTIDOS TRANSPORTADORES.

Para la mayoría de macromoléculas, la membrana celular es una barrera impermeable en ausencia de transportadores adecuados, pero existen algunas proteínas que pueden atravesarla fácilmente. Estas proteínas contienen péptidos con una secuencia específica que les confiere esa capacidad. Los péptidos transportadores más conocidos y usados son el dominio transportador de la proteína TAT del VIH-1, el homeodominio de Antennapedia (también llamado penetratrina), FGF12 (factor de crecimiento de fibroblastos), y una secuencia artificial formada por 9 argininas seguidas (R9). Estos péptidos pueden transportar otros péptidos, proteínas, fragmentos de ADN, ARN de interferencia, virus, e incluso moléculas orgánicas como inhibidores o fluorocromos. Por su capacidad para distribuir péptidos, proteínas, RNA de interferencia y poder alterar el comportamiento de las células en cultivo o en organismos completos, han sido muy atractivos para la investigación y han sido ampliamente utilizados *in vitro* e *in vivo* (Ramsey et al. 2015). Cómo se produce la internalización sigue siendo objeto de un intenso debate y depende del tipo de péptido y de la carga transportada, pero parece que no está implicado ningún tipo de receptor y se cree que la primera aproximación a la membrana se produce por interacciones electrostáticas con glucosaminoglicanos y lípidos de la propia membrana plasmática que están cargados negativamente. El mecanismo posterior puede ser directamente a través de la membrana y/o a través de varias rutas endocíticas que pueden simultanearse: macropinocitosis, vesículas de clatrina dependientes de colesterol, o vesículas de caveolina (Brock 2014; Copolovici et al. 2014). Aunque el mecanismo de transporte es similar para todos los péptidos, el péptido TAT parece ser hasta la fecha el más permeable y menos tóxico, por lo que es el que hemos utilizado para el diseño de los péptidos en este trabajo.

4.3.1.2. AMINOÁCIDOS D.

En todos los organismos, la estructura primaria de una proteína es una cadena polipeptídica constituida a partir de la información genética. Esta cadena tiene una direccionalidad y de forma estándar se describe su secuencia de N-terminal a C-terminal, en el orden en el que es sintetizada. Los aminoácidos tienen un carbono- α central con 4 sustituyentes diferentes por lo que son carbonos asimétricos o quirales. Según la disposición tridimensional de los sustituyentes del carbono- α , todos los aminoácidos pueden tener dos estereoisómeros enantiomeros, D y L, que son uno la imagen especular del otro, menos la glicina, ya que su carbono- α no es quiral. A pesar de que existen aminoácidos D en la naturaleza, la gran mayoría de proteínas y polipéptidos están formados exclusivamente de aminoácidos L. Por consiguiente, las

INTRODUCCIÓN

enzimas proteolíticas o peptidasas están especializadas en actuar sobre proteínas con estos aminoácidos, por lo que resulta muy interesante desde el punto de vista farmacológico sintetizar péptidos con aminoácidos D, que no puedan o sean difícilmente degradados por peptidasas en el organismo.

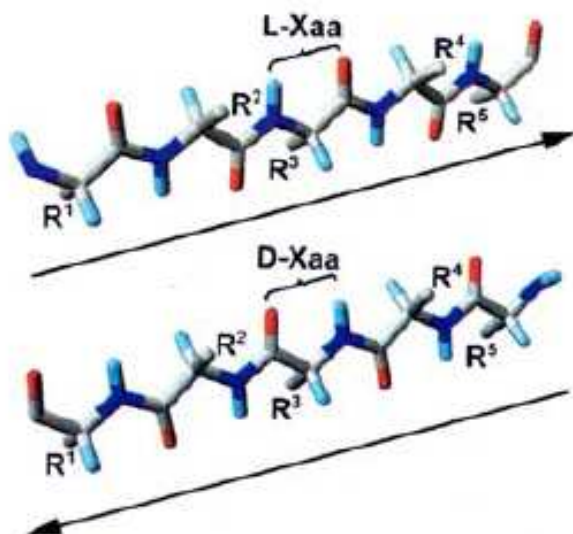


Figura I-4. Representación tridimensional de una cadena polipeptídica normal y una formada por aminoácidos D en sentido inverso. Extraído de (Fischer 2003).

Si se sintetiza un péptido con aminoácidos D, la disposición espacial de las cadenas laterales de los aminoácidos cambiará de orientación espacial mientras que el esqueleto peptídico mantendrá la misma posición (Figura I-4). A la hora de diseñar un péptido inhibidor, suele ser más importante que se mantenga la posición de las cadenas laterales que la del esqueleto peptídico, por lo que puede ser preferible sintetizar un péptido *retroinverso*, es decir, con aminoácidos D y con la secuencia inversa, lo que permite mantener la posición espacial de las cadenas laterales aunque el sentido del esqueleto peptídico se invierta (Fischer 2003). Se ha demostrado que péptidos *retroinverso* con aminoácidos D que incluyen un péptido transportador atraviesan la membrana plasmática con la misma eficiencia que los péptidos L, pero son mucho más resistentes a la degradación por proteasas y pueden durar, al menos en células en cultivo, más de 15 días desde la adición frente a las 24-48h de un péptido normal (Bonny et al. 2001).

4.3.2. TÉCNICAS COMPUTACIONALES EN EL DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS FÁRMACOS.

El cribado virtual (o VS, *virtual screening*) es una técnica muy potente que ha adquirido una gran importancia en el desarrollo de fármacos. Permite identificar moléculas determinadas como un punto de partida para el diseño de nuevos fármacos. La cantidad de algoritmos y programas informáticos que utilizan simulaciones de interacción entre dianas y ligandos crece cada vez más deprisa (Lavecchia et al. 2013).

Para el desarrollo de estas técnicas es imprescindible que se haya resuelto la estructura tridimensional de la proteína diana, que sean estructuras con una buena resolución (menos de 2,5Å) y un profundo conocimiento de la estructura y dinámica de la proteína objeto de estudio. Cuando se ha identificado un compuesto activo, la optimización de éste dependerá del entendimiento de las interacciones que se producen, ya sean electrostáticas, puentes de hidrógeno o hidrofóbicas, y de las interacciones que se podrían aprovechar en la proximidad de la superficie de interacción entre inhibidor y proteína. Paralelamente, se utilizan programas informáticos que analizan los enlaces rotables del inhibidor y la probabilidad de cada posible conformero (estructura con una determinada posición de cada enlace rotable), además de las posibilidades de

solvatación del inhibidor y la interacción con moléculas de agua que influyen decisivamente en la interacción con la proteína (Schnieders et al. 2012).

Posteriormente, se realizan estudios de dinámica molecular para el estudio de la interacción y para conocer la afinidad y energía libre de la interacción. En estos programas se realizan simulaciones de entre un microsegundo y un milisegundo, donde se observa la flexibilidad de la proteína para acomodar el inhibidor y los posibles cambios conformacionales que se puedan producir (Schnieders et al. 2012).

Algunos grupos de investigación ya han utilizado esta aproximación para la inhibición de MAPK a través del surco de anclaje: Hancock y colaboradores han seleccionado un compuesto inhibidor de ERK a partir de una biblioteca de 800.000 moléculas con una IC₅₀ de aproximadamente 20μM en ensayos de proliferación celular que inhibe eficazmente la fosforilación de sustratos específicos como Rsk-1 y Elk-1 (Hancock et al. 2005). Se trató de evolucionar este compuesto en un trabajo posterior y se mejoró la eficacia del compuesto entre 2 y 4 veces (Boston et al. 2011). Aunque no se pueda considerar un inhibidor eficaz para ser trasladado a ensayos clínicos, representa un paso prometedor en el desarrollo de inhibidores alostéricos no competitivos de ATP dirigidos contra el surco de anclaje.

Es interesante resaltar que el inhibidor de p38, CMPD1 mencionado anteriormente, selectivo del sustrato MK2, se desarrolló mediante técnicas computacionales y consigue bloquear la fosforilación de MK2 con una K_i^{app} de 330nM (Davidson et al. 2004).

En este trabajo caracterizamos el efecto de la fosforilación de p38 por GRK2 en la treonina 123 situada en el dominio ED del surco de anclaje mediante diferentes técnicas bioquímicas. Por otro lado, describimos el diseño y desarrollo de inhibidores sintéticos para este dominio en p38 por técnicas computacionales, así como de un péptido inhibidor irreversible y permeable a las membranas celulares dirigidos igualmente contra este dominio en p38. Hasta donde llega nuestro conocimiento, sería la primera vez que se desarrolla un inhibidor con IC₅₀ en el rango bajo μM basado en el surco de anclaje en p38.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. REACTIVOS:

Heparina (H4784), ATP (A7699), fluoruro sódico (S7920), EDTA (E9884), β -mercaptoetanol (M6250), rojo Ponceau (49904), Tween-20 (93773), azida sódica (S8032), Tritón x-100(X100), glutatión (G4251), carbacol (c-4382), LPS (E.coli 026:B6 #L2654) y el anticuerpo anti-Histidina (H 1029) fueron suministrados por Sigma-Aldrich. La resina "Probond" (R801-01), p38 α recombinante (PV3305) y MBP (Myelin Basic Protein. Cat. N° 13228010) fueron obtenidos de Invitrogen. Sistema de detección ECL Plus (RPN2132), Glutatión-Sefarosa 4B (17-0756-01), kit de ELISA para la detección de TNF α (RPN 5967) y 32 P γ ATP (3.000Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l) fueron suministrados por GE-Healthcare. SB203580 (V1161) fue proporcionado por Promega. MKK6 (14-303), y PP2A (14-111) fueron suministrados por Upstate-Millipore. El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 30% fue obtenido de Foret. El TNF α de ratón (315-01A) fue suministrado por Peprotech, Inc. Los compuestos químicos seleccionados por cribado fueron proporcionados por las casas ChemBridge, Asinex, IBScreen, Specs, Enamine, Life Chemicals y ComGenex.

El PMSF y la benzamidina fueron suministrados por Boehringer Mannheim. Ampicilina (10835242001), albúmina de suero (10735094001) e IPTG (10724815001) se obtuvieron de Roche. TEMED (161-0801), SDS (161-0301), persulfato amónico (161-0700), azul de bromofenol (161-0404), patrones de peso molecular conocido (161-0374), papel de nitrocelulosa (162-0115), azul de Coomassie (161-0406) y reactivo de Bradford (500-0205) se obtuvieron de Bio-Rad. Las placas de 24 pocillos (353047) son de la compañía BD Falcon.

Los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano fueron obtenidos de Nordic Immunology. El anticuerpo anti-GRK2 (AbPF2) se generó en nuestro laboratorio a partir de suero policlonal (Murga et al. 1996). Los anticuerpos anti-GST (sc-138), anti-ERK1 (sc-93), anti ERK2 (sc-154) y anti-actina (sc-1616) se obtuvieron de Santa Cruz. Anti-MK2 (3042), anti-P-MK2 (Thr334) (3041), anti-p38 (9212), anti-P-p38 (TGY) (9211), anti-P-ERK (9101), anti-JNK (9252), anti-P-JNK (9251), anti-MEF2A (9736), anti-HSP27 (2402) y anti-P-HSP27 (2405) se obtuvieron de Cell signaling. Anti-P-MEF2A (ab30644) fue proporcionado por Abcam y anti-P-p38 (T123) fue generado y purificado por Pacific Immunology para nuestro laboratorio (Peregrin et al. 2006). El péptido "APR" (APRTPGGRR) fue sintetizado por el servicio de proteómica del CBM-"Severo Ochoa".

Todos los demás productos empleados son de la más alta calidad disponible comercialmente.

1.1. Diseño y síntesis de péptidos:

Se seleccionaron para su síntesis *in vitro* diferentes péptidos que contuvieran el motivo-D de la proteína MKK3b humana comprendidos entre los aminoácidos 15 y 32 (NCBI Reference Sequence: NP_659731.1) (Tabla MM-1). Para los péptidos derivados de MKK6 humana se seleccionó la secuencia entre los aminoácidos 4 y 21 (NCBI Reference Sequence: NP_002749). Para los péptidos derivados de MEF2A humana se seleccionaron secuencias entre los aminoácidos 269 y 280 (NCBI Reference Sequence: NP_005578.2). Para los péptidos derivados de MAPKAPK2 humana se seleccionaron secuencias entre los aminoácidos 369 y 400 (NCBI Reference Sequence: NP_116584.2).

MATERIALES Y MÉTODOS

Los péptidos sintetizados a partir de aminoácidos L fueron contratados a la compañía JPT Peptide Technologies. Los péptidos sintetizados a partir de aminoácidos D fueron contratados al servicio EvoQuest de Invitrogen. Los péptidos sintetizados a partir de aminoácidos L junto con la secuencia transportadora TAT (GRKKRRQRRRPP) fueron sintetizados y analizados por el servicio de Proteómica del CBMSO. En todos los casos las secuencias fueron confirmadas y la pureza de cada preparación analizada por HPLC fue de al menos un 90%.

Péptidos diseñados a partir de la secuencia y el cristal de MKK3b y MKK6:

	15	32
pepMKK3b1	SKGKSKRKKDLRISCNSK	
pepMKK3bc	KKDLRISC	
pepMKK3bs	RDSLKCIK	
	4	21
pepMKK61	SKGK-KRNPGLKIPKEAFE	

Péptidos diseñados a partir de la secuencia y el cristal de MEF2A:

	269	280
pepMEF2A1	RKPDLRVVIPPS	
pepMEF2Ac	KPDLRVVIPP	
pepMEF2AxCys	KPDLRVVICP	
pepMEF2AxArg	KPDLRVRIPP	
pepMEF2As	PDIKLPVRPSRV	

Péptidos diseñados a partir de la secuencia y el cristal de MK2:

	369	400
pepMK2a	QIKIKKIEDAS	
pepMK2b	QIKIKKIEDAS NPLLLKRRKKA	
pepMK2c	LLLKRRKKA RALEA	
pepMK2d	NPLLLKRRKKA RALEAAALAH	
pepMK2e	NPLLLKRRKKA	
pepMK2xCys	PCIKIKKIEDAS NPLLLKRRKKA	
pepMK2s	KIEKAQILKKP ISKLRNARDKL	
pepMK2es	LKARLPRKNLK	

Tabla MM-1. Relación de péptidos diseñados y sintetizados a partir de motivos-D de activadores y sustratos para inhibir p38 a través del surco de anclaje. Se incluye en la parte superior de cada grupo la primera y última posición original de los aminoácidos en la proteína.

1.2. Construcciones:

pGEX4T1-p38 β 2WT fue cedido por el Dr. Phil Cohen (University of Dundee, Scotland). pGEX4T1-p38 α WT y los mutantes T123A y T123D fueron desarrollados en el laboratorio mediante mutagénesis dirigida utilizando el sistema QuickChange (Stratagene) (tesis de la Dra. Sandra Peregrín Pedrique). pTrc-His2B-MK2 se obtuvo según se describe en *Clonajes*. pGEX-ATF2 fue cedido por el Dr. J. Silvio Gutkind (NIH, Bethesda, MD). pGEX-MEF2A fue suministrado por el Dr. J. Jan (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA).

1.3. Clonajes:

Para la expresión y purificación de MAPKAPK2 (MK2) con una cola de seis histidinas, se solicitó al Dr. Phil Cohen (University of Dundee, Scotland) el plásmido pFTX5-MK2DN1, que codifica para una proteína MK2 humana defectiva para la región N-terminal, rica en prolinas, para una expresión más estable. Se amplificó este mutante por PCR usando los siguientes oligonucleótidos: 5'-GGG GCC ATG GTC AAG TCC GGC C-3'; y 5' CCCC CTC GAG GTG GGC CAG AGC CGC AGC-3'. El producto de PCR se subclonó en el vector pTrcHis2B utilizando las enzimas de restricción NcoI y XhoI (dianas subrayadas en los oligonucleótidos).

Los aminoácidos 1-101 de CHOP fueron previamente subclonados en pGEX2T en el laboratorio para su expresión como proteína de fusión con GST mediante amplificación por PCR de esa región usando como molde la secuencia de la proteína de fusión GAL4-CHOP cedida por el Dr. J. Silvio Gutkind.

2. PROCEDIMIENTOS:

2.1. Mutagénesis dirigida en p38 β 2:

El reemplazamiento de la serina 123 de p38 β 2 humana por alanina o ácido aspártico se realizó con el sistema QuickChange (Stratagene), usando la construcción pGEX4T1-p38 β 2 como molde. Los oligonucleótidos utilizados para la sustitución de la serina por alanina son: *forward* 5' G TGC CAG GCG CTG GCC GAC GAG CAC GTT CAA TTC CTG G 3'; *reverse* 5' C CAG GAA TTG AAC GTG CTC GTC GGC CAG CGC CTG GCA C 3'. Para la sustitución de la serina por ácido aspártico: *forward* 5' G TGC CAG GCG CTG GAC GAC GAG CAC GTT CAA TTC CTG G 3'; *reverse* 5' C CAG GAA TTG AAC GTG CTC GTC GTC CAG CGC CTG GCA C 3'. Los tripletes que introducen la mutación se encuentran subrayados. Cada construcción fue confirmada por secuenciación mediante un secuenciador automático ABI DNA del servicio de secuenciación del SIDI-UAM.

2.2. Expresión y purificación de proteínas:

La proteína GRK2 bovina se purificó de células Sf9 de insecto infectadas con baculovirus siguiendo protocolos establecidos (Murga et al. 1996).

Para la purificación de las proteínas de fusión con GST, se transformaron bacterias *Escherichia coli* cepa BL21 con las construcciones de GST-p38 β 2, tanto la secuencia silvestre (WT) como los mutantes realizados en este proyecto, y las construcciones de GST-p38 α ya disponibles en el laboratorio (Tesis Doctoral de la Dra. Sandra Peregrín Pedrique). Se crecieron en medio LB con ampicilina (100 μ g/ml) y se indujeron con IPTG a una concentración final de 1mM durante 5h a 37°C. Se lisaron las bacterias en 30ml de tampón de lisis (PBS, EDTA 10mM, lizozima 1mg/ml, PMSF 1mM, Benzamidina 20 μ g/ml, DTT 5mM, Tritón X-100 1%) y se sonicaron los lisados (3x30seg). Se separaron las proteínas solubles de las insolubles por centrifugación a 8000xg durante 15min. A partir de la fracción soluble o insoluble se purificaron las proteínas utilizando columnas de 2ml de Glutación-Sefarosa. Se lavaron las columnas con 100-200ml de PBS y se eluyeron las proteínas con 2ml de Tris 50mM, pH 8.0, glutatión 10mM. Se añadió glicerol a las eluciones hasta el 20% para su conservación a -80°C. Se comprobó la pureza y concentración de las proteínas por tinción de geles SDS-PAGE con azul de Coomassie y por el método Bradford.

Para la expresión y purificación de His-MK2 se siguió el mismo protocolo que para GST-p38 utilizando como tampón de lisis: tampón fosfato 50mM pH 8.0, NaCl 500mM, lizozima 1mg/ml, PMSF 1mM, Benzamidina 20 μ g/ml. En este caso se

utilizaron columnas de Níquel para su purificación (Probond, de Invitrogen). Se eluyeron las proteínas con tampón fosfato 50mM pH 8.0, NaCl 500mM, Imidazol 250mM.

2.3. Experimentos de fosforilación *in vitro* con $^{32}\text{P}\gamma\text{ATP}$:

Para los experimentos de fosforilación de p38 por GRK2 y MKK6 *in vitro* con proteínas purificadas, se incubaron las proteínas quinasas GRK2 (25nM) y MKK6 (10nM), junto con GST-p38 α (300nM) o GST-p38 β (300nM) en su forma inactiva como sustratos en un volumen final de 40 μl de tampón de reacción (Hepes 25mM pH 7.2, MgAc 10mM, NaF 5mM, DTT 2mM, 50 μM ATP y 2000-4000cpm/pmol $^{32}\text{P}\gamma\text{ATP}$). Para los experimentos de fosforilación de sustratos de p38 *in vitro*, se incubaron las quinasas GST-p38 β inactiva (300nM) junto con los sustratos MBP (500nM), CHOP (250nM), ATF2 (500nM), MK2 (450nM) o el péptido APR (0,5-10mM), en el mismo tampón de reacción en un volumen final de 25-40 μl en presencia o no de los compuestos inhibidores y de sus correspondientes controles con vehículo. Después de incubar 30min a 30°C con agitación, se resolvieron las proteínas por SDS-PAGE del 7 ó del 10% y se revelaron por autorradiografía. La cantidad de fosfato incorporado en cada proteína se calculó midiendo la radiación Cerenkov de cada banda en comparación con el tampón de reacción cuya concentración de ATP es conocida (Murga et al. 1996).

En los ensayos de fosforilación del péptido diana, se precipitaron las proteínas con ácido tricloroacético (TCA) al 30% mientras el péptido, que se mantiene en el sobrenadante, se impregnó en papel Whatman P81 y se lavó en ácido fosfórico 75mM dos veces en 1L durante 1h y una vez en 2L durante 16h. La incorporación de radiactividad fue cuantificada en un contador de centelleo líquido (1219RACKBETA Liquid scintillation counter). Los valores de IC50 fueron obtenidos por regresión no lineal utilizando el complemento “Solver” de Excel (Brown 2001).

2.4. Defosforilación *in vitro*:

Los ensayos de defosforilación se realizaron en dos pasos: un primer proceso de fosforilación como se ha descrito en el apartado “Experimentos de fosforilación *in vitro* con $^{32}\text{P}\gamma\text{ATP}$ ” en ausencia de fluoruro sódico y $^{32}\text{P}\gamma\text{ATP}$, en las mismas condiciones y concentraciones descritas arriba, y un segundo paso de defosforilación con la proteína fosfatasa PP2A a una concentración de 60 nM, en 25 μl durante 30 min a 30°C en Hepes 25mM pH 7,2, MgAc 10mM, NaCl 0,1M, β -mercaptoetanol 60 μM , EGTA 1mM, MnCl₂ 0,1mM, DTT 1mM y EDTA 10mM. Se resolvieron las proteínas por SDS-PAGE y se revelaron por Western blot con los anticuerpos específicos y fosfoanticuerpos para cuantificar el grado de defosforilación.

2.5. Experimentos de cosedimentación (“Pull-down”):

La cantidad de proteína indicada en cada pie de figura se incubó en un tampón favorable para la interacción (Tris 25mM pH 7,5, NaCl 0,25M, MgCl₂ 10mM, NaF 5mM, ATP 50 μM y BSA 0,5%) durante 30 min a 30°C en agitación. Se precipitaron las proteínas unidas a la resina de Glutación-Sefarosa por centrifugación y el precipitado fue lavado 3 veces (10ml) con el mismo tampón de interacción con Tritón X-100 0,5%. Los complejos precipitados se analizaron por Western blot.

2.6. Electroforesis y Western blot:

Para separar las proteínas se utilizaron geles SDS-PAGE del 7 o del 10% de acrilamida. Para el análisis por Western blot, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Tras la transferencia, las membranas se incubaron en solución de bloqueado (TBS, Tween-20 0,1%, leche desnatada 5%) durante 1 h. Después, las membranas se

incubaron con el anticuerpo primario durante 16 h a 4°C. Posteriormente se lavaron 3 veces en tampón de lavado (TBS, Tween-20 0,1%), se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1h y se volvieron a lavar. Los inmunocomplejos formados se detectaron por autorradiografía con el sistema ECL-Plus siguiendo las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos usados se indican en *Reactivos*.

2.7. Inhibición *in vitro* por péptidos y moléculas de la activación y actividad de p38:

En los ensayos de inhibición *in vitro* de la activación de p38 se incubaron p38 α a una concentración de 300nM junto con el péptido inhibidor o molécula a diferentes concentraciones entre 0,1 μ M y 1mM en un buffer de reacción Tris 25mM pH 7,5, EGTA 50 μ M, ortovanadato 50 μ M y β -mercaptoetanol 0,05% en un volumen de 30 μ l durante 15 minutos a 30°C. Posteriormente se añadieron MKK6_{CAM} (mutante constitutivamente activo) (Raingeaud et al. 1996) a una concentración final de 15nM, MgAc a 2,5mM y ATP a 25 μ M y se incubó durante 15 minutos a 30°C hasta un volumen final de 40 μ l. Pasado el tiempo de incubación se detuvo la reacción con buffer de Laemli y se resolvieron las proteínas mediante SDS-PAGE. Se detectó la activación de p38 como fosforilación del bucle de activación mediante anticuerpos específicos.

En los ensayos de inhibición *in vitro* de la actividad de p38 se preincubaron p38 a 1nM junto con las diferentes moléculas y péptidos a concentraciones entre 0,1 y 100 μ M en un buffer Tris 50mM pH 7,5, EGTA 1mM, MgCl 10mM, ortovanadato 50 μ M, DTT 2mM, ATP 25 μ M en un volumen final de 40 μ l durante 10 minutos tras lo cual se añadió el sustrato MEF2A a una concentración de 10nM y se incubó durante 15 minutos a 30°C. Tras la incubación se detuvo la reacción con buffer de Laemli y se resolvieron las proteínas mediante SDS-PAGE. Se detectó la actividad de p38 como la fosforilación del sustrato MEF2A utilizando anticuerpos específicos.

2.8. Inhibición de la secreción de TNF en células monocíticas humanas, THP-1:

Las células THP-1 se crecieron en medio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado con suero fetal bovino (FBS, Biowhittaker, Cat. N. DE14-801F) al 10%, glutamina 2mM, piruvato 1mM, y una mezcla estándar de antibióticos suministrada por el servicio de cultivos del CBMSO que incluye penicilina (100U/ml) y estreptomina (0,1mg/ml).

Para realizar los experimentos de secreción de TNF α se centrifugaron y resuspendieron en medio RPMI 1640 sin suero a una concentración final de 2x10⁶ células/ml y se repartieron a razón de 500 μ l por pocillo en placas de 24 pocillos. Se incubaron las placas durante 1h a 37°C y 5% de CO₂ en atmósfera húmeda, y se añadió LPS a una concentración final de 0,5 a 2 μ g/ml y se incubaron de nuevo las células durante 2 a 16h, tras lo que se centrifugaron para sedimentar las células. Se recuperaron los sobrenadantes y se guardaron a -20°C. Posteriormente se realizó el análisis del contenido de TNF α por ELISA siguiendo el protocolo del fabricante. La concentración de TNF α se determinó utilizando una recta patrón de cantidades conocidas de TNF α .

Para determinar las condiciones óptimas de ensayo de la secreción de TNF α se realizaron los siguientes experimentos:

- Estudio a diferentes tiempos (2-16h) en tres tipos celulares de macrófagos: U927, Monomac1 y THP-1 a una concentración fija de LPS 0,5 μ g/ml (Figura MM1).
- Estudio a diferentes concentraciones de LPS en tres tipos celulares de macrófagos a un tiempo fijo de 4h (Figura MM2).

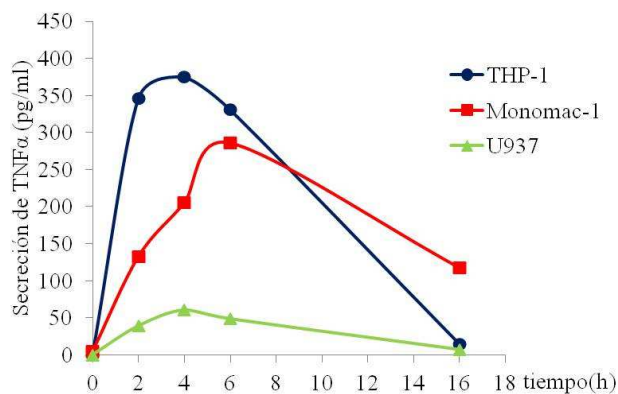


Figura MM-1. Secreción de TNF α en respuesta a LPS a diferentes tiempos utilizando los tipos celulares THP-1 (azul), Monomac-1 (rojo) y U937 (verde). 2×10^6 células/ml de cada tipo celular fueron estimuladas con LPS ($0,5 \mu\text{g/ml}$) y se recogieron los medios de cultivo a diferentes tiempos (2-16h) para cuantificar la cantidad de TNF α secretado mediante ELISA.

Para los ensayos de inhibición de la secreción de TNF α se seleccionó la línea celular THP-1 por ser la que más TNF α produjo y la más comúnmente utilizada para medir la inhibición de citoquinas dependientes de p38. Se determinó que el tiempo óptimo de incubación con LPS (tiempo que provocó una producción máxima) fue de 4h. Asimismo, se determinó que la concentración mínima de LPS que inducía una mayor secreción de TNF α fue $1 \mu\text{g/ml}$, aunque la concentración se optimizó para cada nueva preparación de LPS. Se administraron concentraciones de entre 1 y $1000 \mu\text{M}$ de las moléculas indicadas disueltas en DMSO para una concentración final de DMSO del 0,5%.

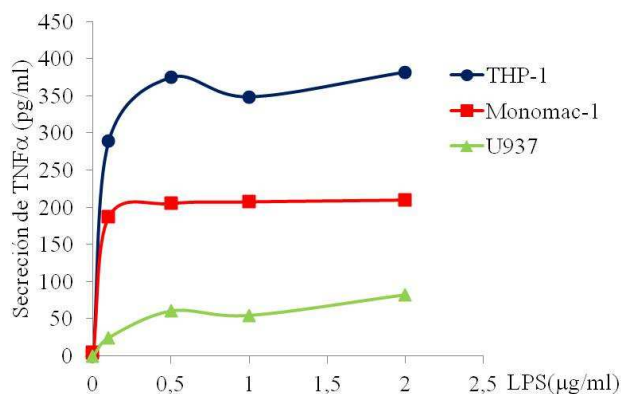


Figura MM-2. Secreción de TNF α en respuesta a diferentes concentraciones de LPS. 2×10^6 células/ml de cada tipo celular: THP-1 (azul), Monomac-1 (rojo) y U937 (verde) fueron estimuladas con diferentes concentraciones de LPS (0,1-2 $\mu\text{g/ml}$) durante 4h para cuantificar la cantidad de TNF α secretado mediante ELISA.

2.9. Evaluación de la toxicidad de las moléculas mediante el análisis de la incorporación de yoduro de propidio:

Se centrifugaron y resuspendieron células THP-1, previamente cultivadas en medio de crecimiento, en medio RPMI 1640 sin suero a una concentración final de 2×10^6 células/ml y se repartieron a razón de $500 \mu\text{l}$ por pocillo en placas de 24 pocillos. Se administraron concentraciones de entre 1 y $1000 \mu\text{M}$ de las moléculas indicadas disueltas en DMSO para una concentración final de DMSO del 0,5%. Se incubaron las placas durante 4h, tras lo cual se centrifugaron para sedimentar las células. Se resuspendieron las células en solución de tinción (PBS 1x, BSA 1%, FBS 1%, NaN_3 0,01%, yoduro de propidio $1 \mu\text{g/ml}$). Se conservaron en hielo entre 30 y 60min y se analizaron por su incorporación de yoduro de propidio en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson). Las células que estén entrando en apoptosis incorporarán yoduro de propidio y emitirán fluorescencia al estimularse por láser azul (488nm). Los resultados se analizaron utilizando el software Cell Quest Pro (Becton Dickinson).

2.10. Modelo de hiperalgesia inducida por carragenato en ratones GRK2^{+/-}:

Estos experimentos fueron realizados en virtud de una colaboración con nuestro grupo por la Dra. Hanneke Willemen en la Universidad de Utrecht, Holanda. Se utilizaron ratones GRK2^{+/-} que presentan una hiperalgesia termal más prologada que los ratones silvestres (*wild type*, WT) (20 días respecto a 2-3 días de los WT) tras la inflamación producida por inyección intraplantar de carragenato. Se ha demostrado que la hiperalgesia crónica que presentan los ratones GRK2^{+/-} está asociada con una activación de la microglía y un aumento de la activación de p38 y los niveles de TNF α en la médula espinal (Eijkelkamp et al., 2010).

Adicionalmente, se generaron ratones con niveles reducidos de GRK2 específicamente en macrófagos, granulocitos y microglía (LysM-GRK2^{+/-}). Se cruzaron ratones transgénicos con la recombinasa Cre bajo el promotor de la lisozima M (LysM-Cre), específica de macrófagos y microglía, con ratones transgénicos con GRK2 flanqueado por secuencias Lox (GRK2-fLox), ambos obtenidos de Jackson Laboratories. Los ratones obtenidos (LysM-GRK2^{+/-}) del cruce expresan Cre en macrófagos, granulocitos y microglía eliminando un alelo del gen de GRK2 con lo que se reduce la expresión de GRK2 en estos tipos celulares. Estos ratones muestran la misma hiperalgesia termal prolongada que los ratones GRK2^{+/-} en todas sus células (Willemen et al., 2010).

Se utilizaron ratones hembra C57BL/6 de entre 12 y 14 semanas de edad heterocigotos para GRK2, GRK2^{+/-}, o LysM-GRK2^{+/-} a la vez que los controles WT y LysM-GRK2^{+/+}, respectivamente. Se les inyectó por vía intraplantar en la pata trasera 20 μ l de una solución salina con carragenato al 2% lo que les genera una hiperalgesia de origen inflamatorio. Se inyectó el mismo volumen de solución salina en los ratones usados como control. A los 6-7 días, mientras todavía mantienen la hiperalgesia, se les inyectó por vía intratecal 5 μ l de cada inhibidor, o el inhibidor de p38 SB239063 como control, con un 20% de DMSO y a una concentración de entre 0,4 y 2 mg/ml para los péptidos y entre 0,03 y 0,8 mg/ml para las moléculas. En las sucesivas horas después de la administración del inhibidor se analizó el tiempo de respuesta del ratón frente a un foco de calor que induce dolor y se cuantificó la latencia como indicador del grado de hiperalgesia. Se representa la hiperalgesia como la reducción en el porcentaje de tiempo que tardan los ratones en responder al dolor respecto al tiempo que tardaron antes de la inyección de carragenato (Eijkelkamp et al. 2010). Toda la experimentación animal se realizó de acuerdo a las indicaciones de la Comisión Europea y los protocolos utilizados han sido aprobados por el Comité de experimentación animal del Centro Médico Universitario de Utrecht, Holanda.

2.11. Cribado virtual de librerías de compuestos en base a datos estructurales derivados de la cristalización del dominio de anclaje de p38 MAPK:

Con el objetivo de descubrir nuevos inhibidores para la proteína p38 MAPK se ha empleado un paquete de técnicas computacionales, divididas en varios pasos consecutivos, conocidas como cribado virtual de quimiotecas, que muestrean una base de datos de un millón de ligandos sobre la estructura tridimensional del surco de anclaje de p38 MAPK para seleccionar aquéllos que presenten una mayor energía de interacción estimada (Figura MM3). Este estudio se realizó en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Antonio Morreale en el CBMSO.

El cribado virtual está basado en el análisis de *Docking*: cada ligando se mueve por la superficie de interacción deseada calculando la afinidad del ligando en cada posición posible para seleccionar los ligandos que se unan con mayor afinidad.

El cribado virtual para p38 MAPK se realizó en varias etapas:

2.11.1. Preparación del receptor:

De las estructuras de p38 presentes en la base de datos de estructuras de proteínas (PDB, Protein Data Bank; www.rcsb.org) se seleccionó la codificada como 1LEW por tener la mejor resolución (2,3 Å) y ausencia de átomos no definidos. Se eliminaron las moléculas de agua. Se añadieron los átomos de hidrógeno (no presentes en la estructura cristalográfica) mediante el programa H++ Web server (Gordon et al. 2005) con los parámetros del software AMBER y se asignaron las cargas y radios de cada átomo con el campo de fuerzas del software AMBER. Para las simulaciones se utilizó una concentración salina de 0,15M y unas constantes dieléctricas interna y externa de 4 y 80, respectivamente.

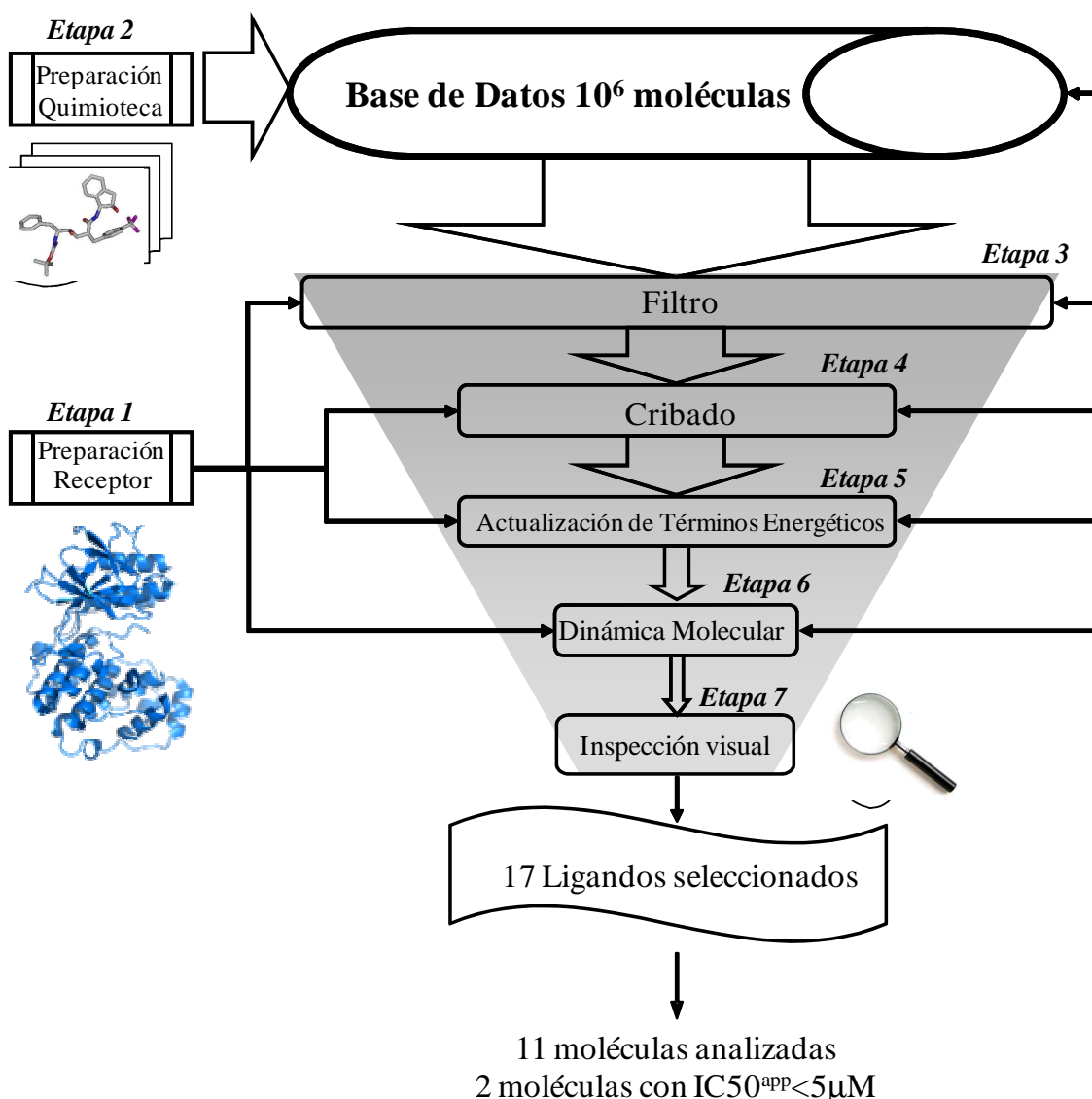


Figura MM-3. Esquema del flujo de trabajo del cribado virtual de inhibidores afines al surco de anclaje de p38. Modificado de una figura preparada por el Dr. A. Morreale.

Cabe destacar que, debido a los dos posibles estados de la histidina en posición 126 (puede estar protonado el nitrógeno en posición Delta o el nitrógeno en Epsilon) se estudiaron las dos posibilidades.

Para agilizar el procesamiento informático se limitó el tamaño de la malla al surco de anclaje con un margen de 5 Å. En la figura MM4 puede verse la malla para el átomo de carbono en color verde y, superpuesto en violeta, el péptido de MEF2A, que como puede observarse coincide en gran parte con la malla calculada para el surco de anclaje. Antes de poder aplicar el software *CDOCK* (desarrollado en la propia Unidad de Bioinformática del CBMSO) se necesita calcular las mallas de interacción para los átomos más habituales (C, N, O, S, P, H, F, Cl, I y Br) sobre p38 que son obtenidas con el programa *CGRID* (desarrollado en la Unidad de Bioinformática del CBMSO) (Perez et al. 2001), mallas que representan el espacio alrededor de la enzima que puede ser ocupado por una molécula bioactiva (Figura MM4). Gracias a estas mallas, *CDOCK* puede calcular rápidamente la interacción de un ligando con la proteína mediante simples interpolaciones.

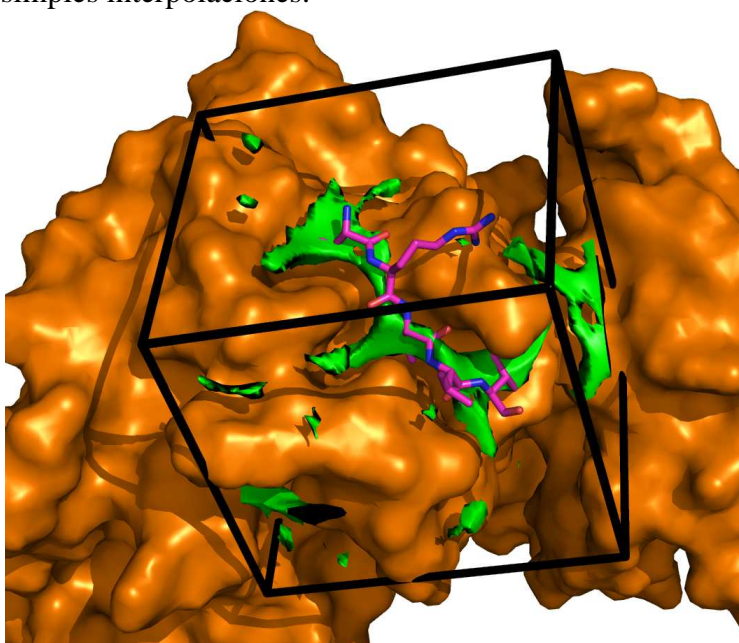


Figura MM-4. Malla calculada con *CGRID* sobre p38 α (en naranja) (Estructura PDB: 1LEW) para el átomo de C (en verde), representada a un nivel de -1kcal/mol. Superpuesto en violeta se encuentra el péptido de MEF2A. Los límites de la malla se han representado como líneas negras. Modificado de una figura preparada por el Dr. A. Morreale.

Paralelamente, se calcularon los puntos farmacofóricos (figura MM5) dentro del surco de anclaje utilizando los programas *CDOCK* utilizando sondas como el benceno y agua, para detectar regiones hidrofóbicas o polares, respectivamente, además de interacciones por puentes de hidrogeno. La región resultante es codificada mediante funciones utilizando el algoritmo GAGA (desarrollado por la Unidad de Bioinformática del CBMSO) (Wang et al. 2004) para producir una versión en negativo del surco de anclaje. Se pudo comprobar que para los dos estados de la histidina 126, los puntos farmacofóricos eran los mismos.

2.11.2. Preparación de la quimiotecas de ligandos:

En esta etapa se procesó toda la información relativa a los ligandos que serán utilizados en el cribado: se añadieron los átomos de H ausentes, se calculó la estructura tridimensional de cada ligando (software *CORINA*) (Sadowski et al. 1994), se asignaron las cargas parciales de cada átomo y la carga global (software *MOPAC*) (Stewart 1990) y se realizó un análisis conformacional de cada ligando (software *ALFA*) (Gil-Redondo 2010). Como resultado se obtuvo una base de datos con 9 millones de confórmeros.

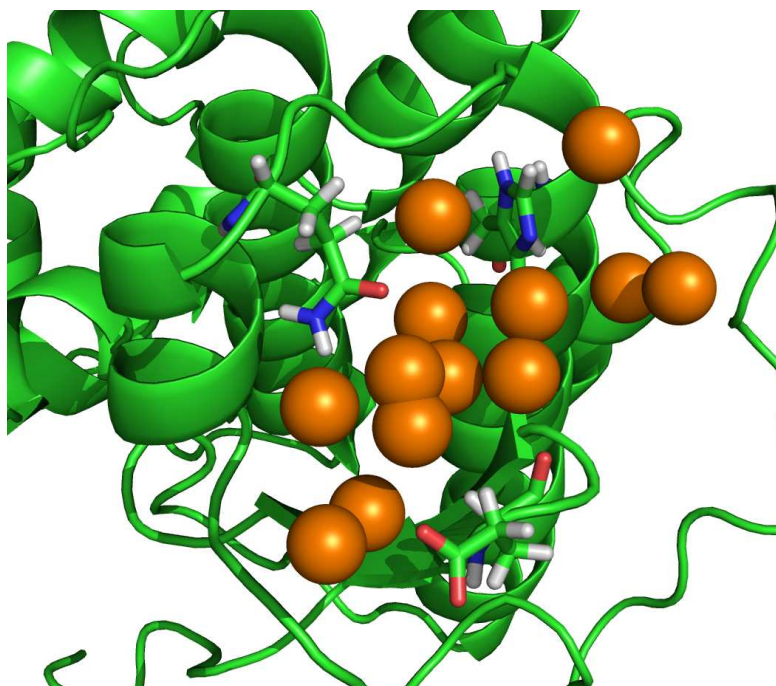


Figura MM-5. Detalle del surco de anclaje de p38 α (en verde). Las esferas naranjas representan los puntos farmacofóricos calculados con los programas *CDOCK* y *GAGA*. Modificado de una figura preparada por el Dr. A. Morreale.

2.11.3. Filtrado de moléculas:

Con el fin de reducir el cálculo que supone hacer un *docking* exhaustivo de cada conformero se utilizó el programa *DOCK* para hacer un filtrado inicial. El programa *DOCK* sólo discrimina entre ligandos que pueden adaptarse a la región diana y los que no utilizando los puntos farmacofóricos calculados con *CDOCK*. *DOCK* asigna una puntuación a cada conformero y se seleccionaron aquellos con una puntuación superior a 2,5 veces el Zscore por encima de la media lo que supone un total de 89068 conformeros de 45488 moléculas (figura MM6).

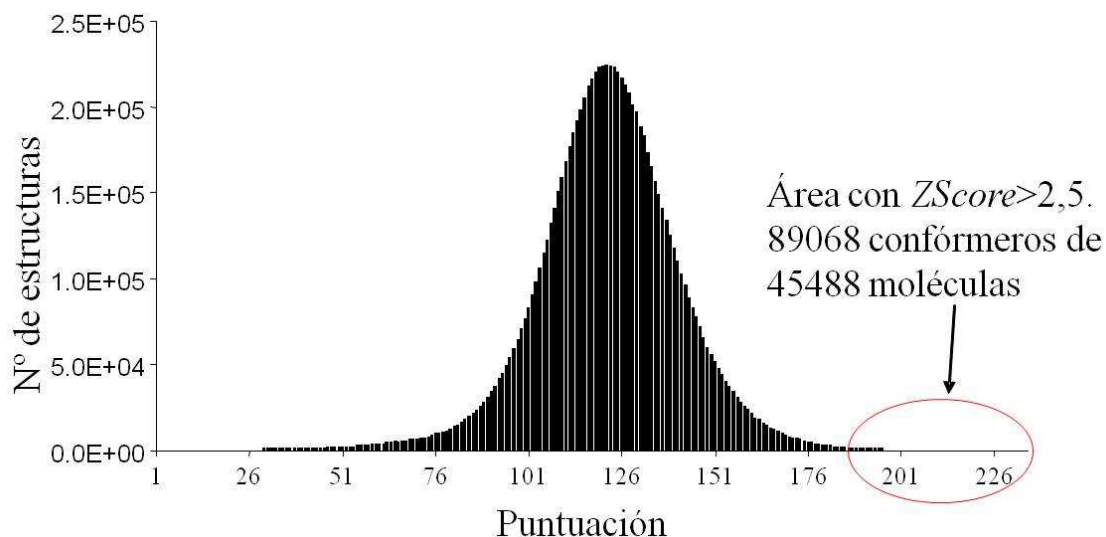


Figura MM-6. Representación del número de estructuras según su puntuación en el programa *DOCK*. Las moléculas que se ajustan mejor a la diana tienen una puntuación mayor. Se seleccionaron aquellas moléculas con una puntuación superior 2,5 veces el Zscore por encima de la media. Modificado de una figura preparada por el Dr. A. Morreale.

2.11.4. Cribado final de moléculas:

Para este cribado se utilizó el programa *CDOCK* utilizando las mallas generadas con *CGRID*. Se realizaron dos cribados en paralelo ya que las superficies generadas son diferentes dependiendo del diferente estado de la histidina 126. Se calcularon las interacciones coulómbicas y de van der Waals entre cada ligando y el surco de anclaje obteniendo una nueva lista de puntuaciones más precisa.

2.11.5. Actualización de términos energéticos:

Para actualizar los términos energéticos se calcularon una nueva interacción coulómbica más precisa, la desolvatación del ligando y del receptor, la componente no polar y el número de puentes de hidrógeno formados utilizando el programa *ISM* (desarrollado en la Unidad de Bioinformática del CBMSO) (Morreale et al. 2007). Se tomaron las 100 mejores moléculas para cada estado de la histidina 126, por lo que se seleccionaron 200 candidatos en total.

2.11.6. Dinámica molecular:

Se sometieron todos los candidatos a un proceso de Dinámica Molecular (DM) usando la aproximación MM-GBSA para la estimación de la energía del microestado (Kollman et al. 2000). Con el proceso de DM se pretende relajar la estructura de la molécula dentro del surco de anclaje de p38 optimizando las interacciones responsables de la interacción, y para incorporar la flexibilidad inherente de la proteína y el efecto del solvente.

El proceso de DM consta de 3 pasos: adición controlada de energía para llevar el sistema a la temperatura de trabajo (300 K); dejar que el sistema redistribuya la energía hasta que alcance de nuevo el equilibrio; y, finalmente, la simulación durante 200 ps, de donde se extraen los datos de energía de interacción entre los ligandos y la proteína que serán promediados para obtener las energías de interacción finales. La evolución del sistema se controla calculando la temperatura, la energía, etc.

Los 200 candidatos se reordenaron según la energía de interacción y se seleccionaron los 10 mejores candidatos (Tabla MM-2).

Molécula	Proveedor	E_{int} (kcal/mol)
6624863	ChemBridge	-31.997
ASN03775353	Asinex	-31.252
7981989	ChemBridge	-30.675
6946893	ChemBridge	-27.676
7372138	ChemBridge	-27.394
7677902	ChemBridge	-25.284
7679969	ChemBridge	-25.187
BAS01848008	Asinex	-24.774
7987598	ChemBridge	-24.634
ASN05098723	Asinex	-22.242

Tabla MM-2. Selección de 10 moléculas entre las encontradas por cribado virtual ordenadas de mayor a menor energía de interacción (E_{int}) calculada como ΔG teórico mediante software de Dinámica Molecular.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es el de profundizar en el estudio de la regulación de la actividad de p38 mediante la fosforilación por GRK2 y aprovechar los conocimientos derivados de este estudio para desarrollar inhibidores eficaces y selectivos de p38. Los objetivos concretos de cada fase se pueden describir como sigue:

1. Dilucidar si la fosforilación de p38 por GRK2 afecta directamente a la actividad de p38, a su interacción con reguladores y sustratos, o a ambos parámetros.
2. Analizar cómo afecta la activación de p38 a su fosforilación por GRK2 y cómo pueden influir ambas fosforilaciones (por MKK6 y por GRK2) en la defosforilación de p38 por fosfatasas.
3. Diseñar péptidos permeables a la membrana a partir de los motivos-D de reguladores y sustratos de p38 para intentar inhibir su actividad. Analizar la capacidad inhibitoria de estos péptidos en ensayos celulares y moleculares.
4. Desarrollar un cribado virtual de compuestos inhibidores de p38 dirigidos contra el surco de anclaje. Analizar sus efectos sobre la activación y actividad de p38 mediante ensayos *in vitro* y celulares para identificar compuestos inhibidores.
5. Analizar el efecto *in vivo* de los mejores péptidos y compuestos inhibidores en un modelo animal de dolor inflamatorio asociado con p38.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. INACTIVACIÓN DE p38 POR LA FOSFORILACIÓN MEDIADA POR GRK2:

1.1. El mutante de p38 α -T123D, que imita la fosforilación por GRK2, tiene bloqueada su interacción tanto con sus activadores como con sus sustratos.

Según había descrito nuestro grupo (Peregrin et al. 2006), al mutar en p38 α el residuo treonina 123 a alanina (que conserva la estructura de la treonina pero carece del grupo hidroxilo fosforilable), p38 puede seguir siendo fosforilado por MKK6 y conserva una actividad sobre ATF2 similar a la proteína silvestre p38 α WT. Sin embargo, cuando se sustituye este residuo por un ácido aspártico, que imita la carga negativa del fosfato introducido por GRK2, se bloquea la fosforilación por MKK6 y se reduce severamente la actividad sobre sustratos. Nuestra hipótesis de trabajo era que, dado que la T123 se sitúa a la entrada del surco de anclaje (un importante dominio de interacción en p38) la fosforilación de p38 por GRK2 impediría la interacción de p38 con sus sustratos y activadores.

Para comprobar si las deficiencias en la fosforilación por el mutante T123D eran debidas a una reducción en la interacción entre quinasa y activador, quinasa y sustrato, o ambos, se realizaron ensayos de cosedimentación con GST-p38 α WT y los mutantes T123A y T123D, tanto con MKK6, un activador de p38 (Figura 1A), como con MK2, un sustrato específico de p38 (Figura 1B). Estos experimentos demuestran que mientras el mutante T123A es capaz de unirse tanto a MKK6 como a MK2 sin diferencias apreciables respecto al enzima WT, la interacción en el mutante T123D está bloqueada en ambos casos. Estos datos sugieren que la incorporación de una carga negativa en la posición 123 estaría impidiendo la activación y actividad de p38 reduciendo la interacción tanto con activadores como con sustratos.

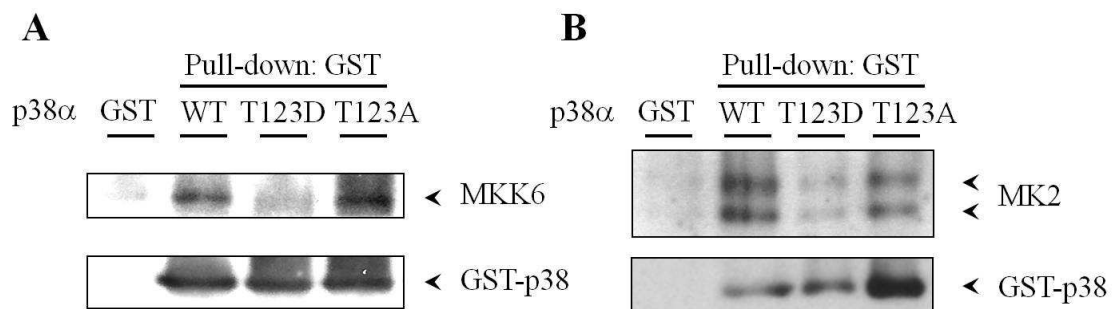


Figura 1. La mutación fosfomimética T123D en p38 α reduce la interacción de p38 α con su activador MKK6 y el sustrato MK2. A) Se incubaron las proteínas recombinantes purificadas GST-p38 α WT, el mutante fosfomimético GST-p38 α T123D y el mutante no fosforilable GST-p38 α T123A junto con el activador MKK6. Se incluyó un control negativo utilizando GST. Tras la reacción se precipitaron las proteínas con resina Glutati6n-Sefarosa por centrifugaci6n. Los precipitados se sometieron a Western blot con los anticuerpos indicados. B) Se realiz6 el mismo proceso que en A pero utilizando el sustrato MK2 en lugar de MKK6. Experimento representativo de dos independientes.

1.2. p38β2 también es fosforilable por GRK2 en el residuo equivalente a la T123 de p38α.

Para averiguar si la fosforilación por GRK2 afecta únicamente a la interacción con sustratos y activadores o influye además en la propia capacidad catalítica de p38, decidimos analizar la actividad de p38 y el mutante fosfomimético p38αT123D *in vitro*. Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales, si p38α no es activada previamente (mediante fosforilación por MMK3/6) presenta una actividad muy baja que no es susceptible de ser cuantificada por métodos enzimáticos (datos no mostrados). Por lo tanto, al menos con la isoforma α, no era posible discriminar si la fosforilación de p38 por GRK2 afecta también a la actividad catalítica de la enzima. Por ello, decidimos utilizar la isoforma p38β2 que presenta unos niveles basales de actividad cuantificables en ausencia de activación, debido a su autofosforilación (Beenstock et al. 2014).

Antes de realizar estos experimentos comprobamos si p38β2 también se fosforilaba por GRK2 en la posición equivalente a T123 en p38α, que, por homología de secuencia, es la S123. Para ello, se desarrollaron y purificaron las proteínas correspondientes a los mutantes GST-p38β2-S123A y -S123D, los cuales no deberían ser fosforilados por GRK2. Se realizaron ensayos

quinasa *in vitro* con la proteína silvestre (WT) y los mutantes usando ³²PγATP y GRK2 como quinasa. En la figura 2 se puede observar que p38β2WT se fosforila por GRK2 y que el principal sitio fosforilable es la S123, ya que el mutante en ese único aminoácido sólo muestra una fosforilación residual al incubarlo con GRK2, si bien no es totalmente descartable que otros residuos de p38β2 puedan ser fosforilados *in vitro* por GRK2, aunque con menor eficiencia. Los resultados con el mutante S123A son similares a los obtenidos con el S123D (resultados no mostrados).

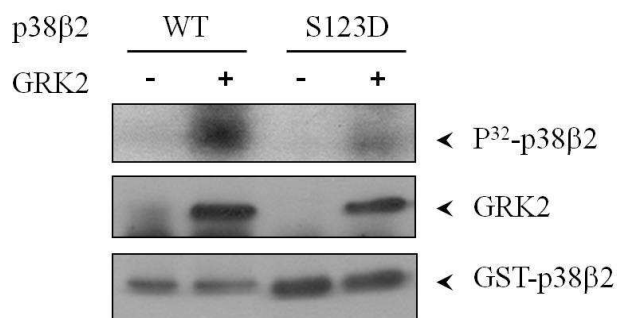


Figura 2. GRK2 fosforila a p38β2. Se incubaron p38β2 y GRK2 purificadas en presencia de ³²PγATP. Las reacciones se resolvieron mediante SDS-PAGE y la fosforilación de la proteína p38β2 se detectó mediante autorradiografía. Se realizó en paralelo un Western blot con las mismas reacciones para confirmar la presencia de ambas proteínas y se detectaron con anticuerpos específicos. Experimento representativo de tres independientes.

1.3. El mutante p38β2S123D muestra una reducción de la actividad catalítica independiente de la interacción a través del surco de anclaje.

Una vez confirmado que GRK2 también fosforila a p38β2 *in vitro*, se decidió evaluar si la fosforilación por GRK2 afecta a la actividad enzimática de p38β2. Se realizaron ensayos quinasa *in vitro* con ³²PγATP utilizando p38β2 y el péptido diana “APR” (APRTPGGRR), que carece de secuencias de anclaje pero contiene la secuencia diana de fosforilación, como sustrato. Las diferencias de actividad entre p38β2WT y el mutante S123D, al no realizarse la interacción con el péptido APR a través del surco de anclaje, se podrían atribuir exclusivamente a diferencias en la capacidad catalítica de p38. Como puede verse en la figura 3A, el mutante S123D presenta una menor actividad que la proteína WT. El análisis de las constantes cinéticas mediante la representación de inversos o de Lineweaver-Burk (Figura 3B) indicó pequeñas

diferencias en la constante de Michaelis-Menten (K_m) (2,5mM para la proteína WT y 2,9mM para el mutante S123D, sólo un 16% superior), por lo que la afinidad del péptido por el centro activo es muy parecida en los dos casos, dato coherente con la falta de un dominio-D en dicho péptido. Respecto a la velocidad máxima (V_{max}), se produce una reducción en el mutante de más del 50% (con una tendencia que roza la significatividad) indicando que la reacción catalizada por el S123D es menos eficiente. Estos resultados sugieren que introducir una carga negativa a la entrada del surco de anclaje, además de impedir la interacción con sustratos dependientes de anclaje, también puede producir determinados cambios conformacionales que se transmiten al centro activo de la quinasa afectando a la catálisis.

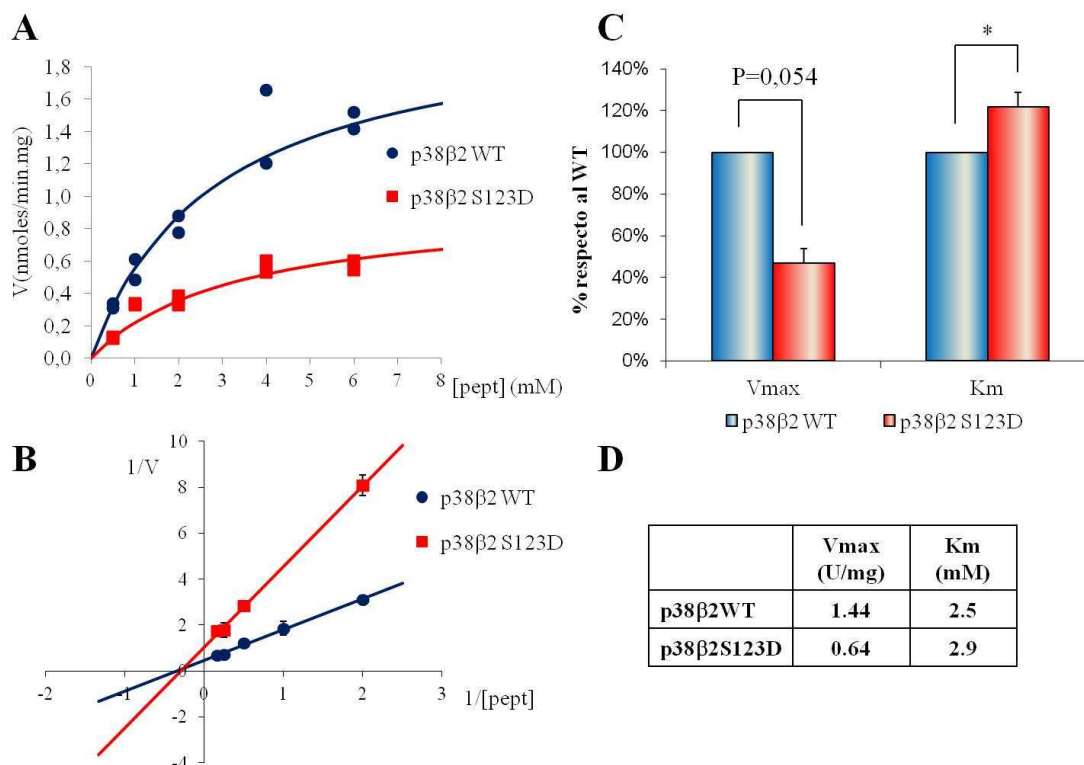


Figura 3. La mutación fosfomimética p38β2S123D afecta negativamente a la capacidad catalítica de p38. Se realizó una reacción quinasa con p38β2 y el mutante fosfomimético p38β2S123D utilizando como sustrato un péptido fosforilable por p38 en presencia de $^{32}P\gamma$ ATP. Se cuantificaron los niveles de radiactividad para cada reacción en un contador de centelleo. A) Representación gráfica de la velocidad de reacción en función de la concentración de péptido. B) Representación de inversos o de Lineweaver-Burk para la determinación de las constantes cinéticas. Datos correspondientes a un experimento representativo de un total de 3 experimentos independientes. C y D) Comparación de las constantes enzimáticas V_{max} y K_m para p38β2 y p38β2S123D. 1 Unidad= 1 nmol de fosfato incorporado/min. Media +/- SEM de tres experimentos independientes (* $P < 0,05$).

1.4. El mutante de p38β2-S123D muestra una interacción reducida con sustratos y activadores.

Para averiguar si la mutación en S123 en la isoforma p38β2 produce el mismo efecto que en p38α bloqueando su interacción con activadores y sustratos, se realizaron los mismos ensayos de cosedimentación con las proteínas GST-p38β2WT y los mutantes S123A y S123D, con el activador MKK6 y con el sustrato MK2. Tanto con MKK6 (Figura 4A) como con MK2 (Figura 4B) se observa que mientras el mutante S123A apenas ve reducida su interacción respecto al WT, el mutante S123D no tiene capacidad

RESULTADOS

para interactuar, por lo que podemos inferir que la fosforilación de GRK2 también estaría afectando a la capacidad de interacción en p38 β 2. Tanto en los experimentos con p38 α como con p38 β 2 se observan dos bandas de migración en gel correspondientes a MK2 que responden del mismo modo en los experimentos, por lo que la banda inferior podría corresponder a una proteólisis durante el almacenamiento de la proteína recombinante.

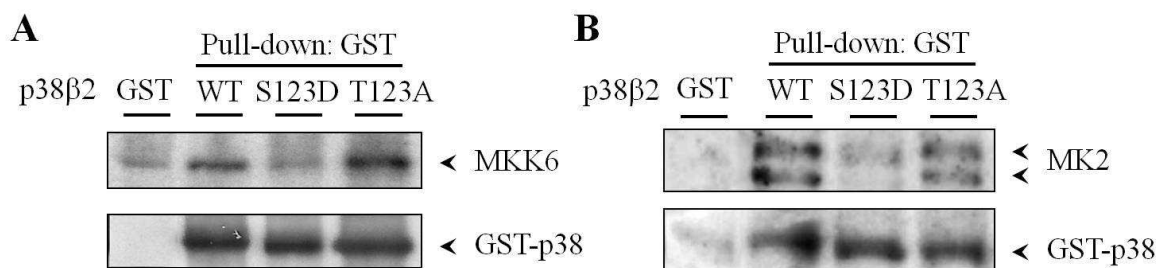


Figura 4. La mutación fosfomimética S123D de p38 β 2 puede reducir la interacción con su activador MKK6 y el sustrato MK2. A) Se incubaron las proteínas recombinantes purificadas GST-p38 β 2WT, el mutante fosfomimético GST-p38 β 2S123D y el mutante no fosforilable GST-p38 β 2S123A junto con el activador MKK6. Se incluyó un control negativo utilizando GST. Tras la reacción se precipitaron las proteínas con resina Glutation-sefarosa por centrifugación. Los precipitados se sometieron a Western blot con los anticuerpos indicados. B) Se realizó el mismo proceso que en A pero utilizando el sustrato MK2 en lugar de MKK6. Experimento representativo de dos independientes.

1.5. Efecto de la introducción de una carga negativa en la entrada del surco sobre la fosforilación de sustratos con diferente dependencia de anclaje.

Para determinar cómo afecta la falta de interacción a través del surco de anclaje a la actividad de p38 se realizaron unos experimentos *in vitro* utilizando el mutante fosfomimético p38 β 2S123D en ausencia de MKK6 en los que se utilizaron diversos sustratos de p38 con diferente dependencia del surco de anclaje. Se realizaron unos ensayos quinasa con p38 β 2WT, cuya actividad en ausencia de activadores podemos cuantificar, y el mutante fosfomimético S123D, utilizando diversos sustratos con diferencias en su dependencia de la interacción por el surco de anclaje: totalmente dependiente como MK2, y otros independientes como el sustrato general de quinasa MBP, CHOP (GADD153) y ATF2. Respecto a MBP, se ha descrito que puede ser fosforilado, aparentemente, en ausencia de interacción por el surco de anclaje (Kumar et al. 1997), y CHOP es un sustrato de bajo peso molecular sin motivo-D aparente. ATF2, no tiene un motivo-D de interacción con MAPK evidente y, aunque se han propuesto algunas secuencias como posibles motivos-D, no se ha confirmado que ninguna efectivamente lo sea. Al cuantificar la actividad del mutante S123D, se observa que los sustratos independientes de anclaje, MBP, CHOP y ATF2, son fosforilados un 33,8%, un 34,5% y un 33,7% respectivamente, mientras que el sustrato dependiente, MK2, se fosforila un 24,2% respecto a la proteína WT (Figura 5). Para todos los sustratos se observa una pérdida de actividad que podría ser debida a que la proteína mutante es catalíticamente menos activa, en línea con los datos obtenidos con el péptido APR, cuya fosforilación es independiente de ningún tipo de anclaje, que se fosforila por la proteína mutante un 44% de lo que se fosforila por la WT (Figura 3). El hecho de que para MK2 se aprecie una reducción algo superior que para MBP, CHOP y ATF2 sugeriría una mayor dependencia de la interacción por el surco de anclaje de este sustrato para ser fosforilado. Estos resultados son coherentes con la hipótesis de que GRK2 estaría inhibiendo la fosforilación de sustratos de p38 en general, pero aquéllos dependientes de

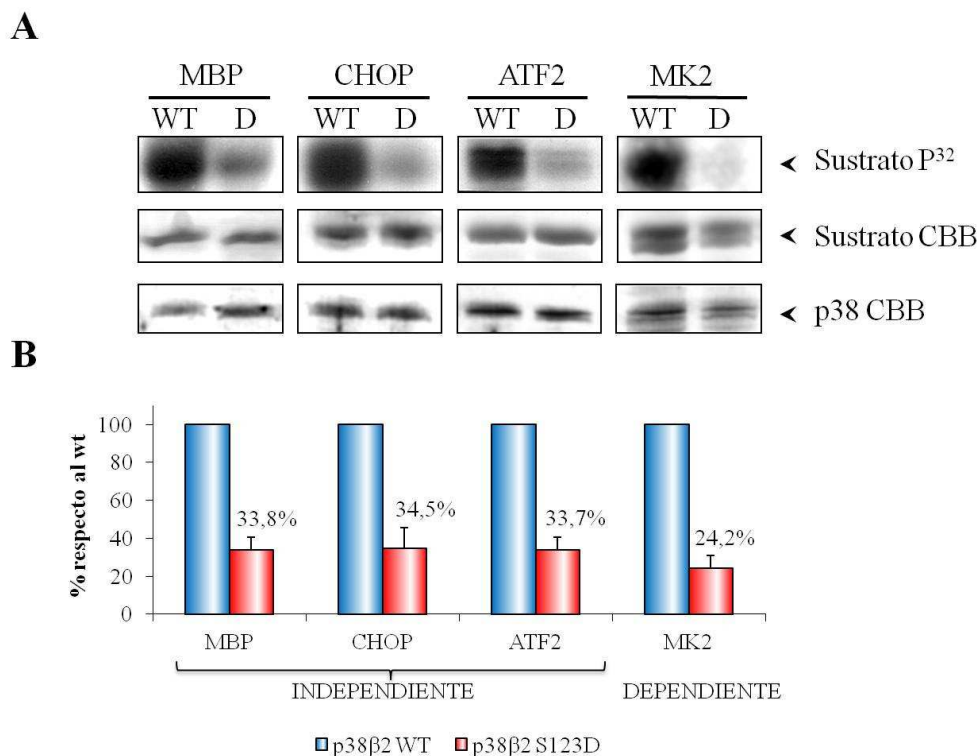


Figura 5. El mutante fosfomimético p38β2D fosforila menos eficientemente sustratos dependientes del surco de anclaje. Se incubó p38β2WT (rotulado como WT) y p38β2-S123D (rotulado como D) junto con los sustratos MBP, CHOP, ATF2 y MK2, con diferente dependencia del surco de anclaje para interactuar con p38, en presencia de ³²PγATP. A) Se detectó la cantidad de proteína fosforilada mediante autoradiografía y se cuantificó mediante densitometría de las películas. Debajo de cada blot se adjunta la cantidad de proteína total según el gel teñido con Azul de Coomassie (CBB) tanto para los sustratos como para p38. B) En el gráfico se representan los niveles de fosforilación de cada sustrato por el mutante p38β2-S123D (barras rojas) respecto al 100% representado por la proteína WT (barras azules). Media +/- SEM de tres experimentos independientes.

anclaje se verían más afectados por esta fosforilación inhibitoria que los más independientes de anclaje.

1.6. p38α activada por MKK6 es fosforilada por GRK2 menos eficazmente que la p38α inactiva.

Los efectos funcionales de un inhibidor de p38 pueden ser muy diferentes si actúan sobre la proteína inactiva, activa o ambas. El bloqueo en la interacción por el surco de anclaje inhibe la activación y actividad de p38, pero si se produce en p38 activa podría afectar además a la interacción con aquellas fosfatasa que también tienen un motivo-D y, como consecuencia, a la propia inactivación de p38. Por lo tanto, se decidió estudiar si GRK2 podría fosforilar también a la forma activa de p38 y si se produce en el mismo grado que a la forma inactiva. Para ello, se han realizado unos experimentos de fosforilación *in vitro* por GRK2 de p38α preactivada por MKK6 (y posteriormente purificada) comparándolo con p38α inactiva.

Con el fin de reducir la alta autofosforilación que observamos en la p38 preactivada por MKK6 y poder así compararla de manera adecuada con p38α inactiva, empleamos el inhibidor SB203580, que actúa sobre p38, y comprobamos que éste no afecta a la capacidad catalítica de GRK2 (Figura 6A). Tras incubación GRK2 con p38 inactiva o p38 activada por MKK6 con ³²PγATP y en presencia de SB203580, observamos que podemos detectar la fosforilación de p38 en ambos casos (Figura 6B). Sin embargo, en

RESULTADOS

estos experimentos se observa un mayor grado de fosforilación en p38 inactiva (30 veces comparado con el basal) que en la activada (6 veces) (Figura 6C) lo que podría indicar que, de algún modo, los cambios conformacionales que sufre p38 al activarse podrían estar afectando a la accesibilidad de la S/T123 para GRK2. Según estos resultados, GRK2 tendría menor capacidad para inhibir a p38 una vez activada por MKK6, lo que podría ser un mecanismo para “proteger” la p38 activa durante más tiempo. Por otro lado, existe la posibilidad de que la fosforilación por GRK2 de p38 activada, aún siendo menor, module la inactivación por fosfatasas de esa p38. Estas son dos hipótesis de trabajo que quedan por investigar en el futuro.

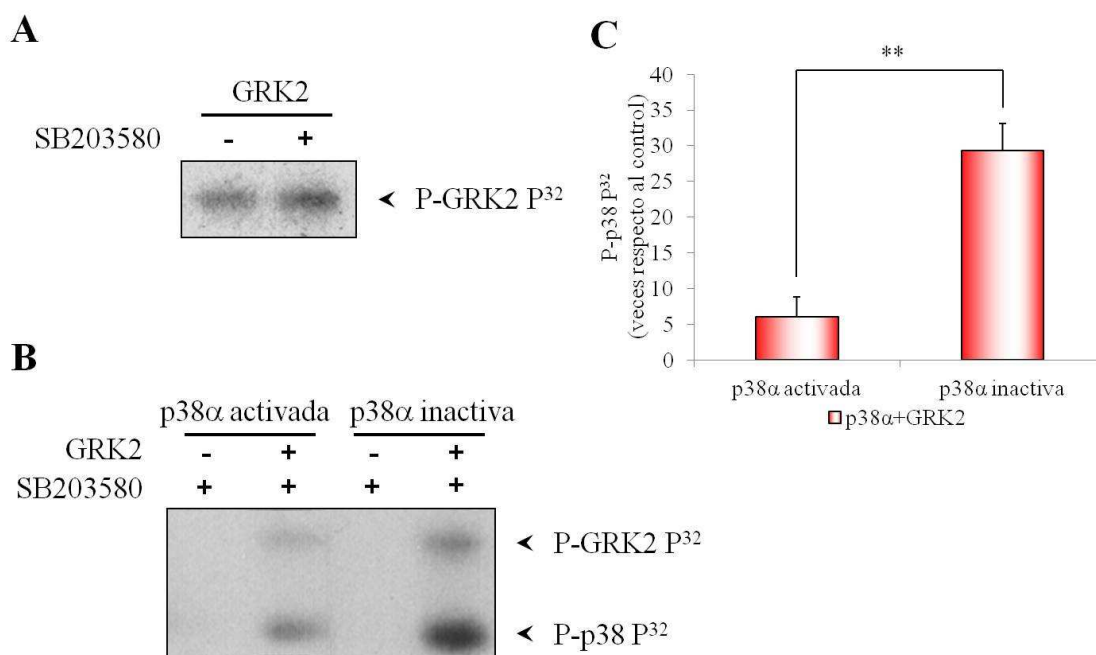


Figura 6. GRK2 puede fosforilar a p38α activa aunque con menor eficiencia que a la inactiva. A) Se incubó GRK2 con ³²PγATP para detectar la autofosforilación de GRK2, con y sin SB203580 para confirmar que éste no tiene efecto sobre la actividad de GRK2. B) Se incubó GRK2 junto con la misma cantidad de p38 activada previamente por MKK6 o p38 inactiva, en presencia del inhibidor de p38 SB203580 para eliminar la posible autofosforilación de p38, junto con ³²PγATP y se detectó la proteína fosforilada mediante autorradiografía y se cuantificó mediante densitometría de las películas. C) Representación gráfica de la fosforilación de p38 activa e inactiva por GRK2 respecto al control, (niveles de autofosforilación en ausencia de GRK2). Los valores representan la media +/- SEM de 4 experimentos independientes (**P<0,005).

1.7. La S/T123 puede ser defosforilada por la proteína fosfatasa 2A (PP2A).

La fosforilación es un mecanismo rápido y reversible de regulación postranscripcional gracias a la acción coordinada y opuesta de quinasas y fosfatasas. Las fosfatasas actúan hidrolizando el enlace fosfodiéster dando como resultado la proteína defosforilada y una molécula de ortofosfato libre.

Se diseñaron unos experimentos de defosforilación del residuo T/S123 en p38α y p38β2. Se pensó inicialmente en la proteína PP2A como posible fosfatasa, ya que actúa en muchos procesos celulares y es capaz de defosforilar un amplio abanico de proteínas incluyendo p38 (Sundaresan et al. 2002).

En primer lugar y como control, se incubaron p38 α y p38 β 2 con MKK6 (Figura 7A) ya que está descrito que PP2A es capaz de defosforilar p38 en el bucle de activación (Sundaresan et al. 2002), y se añadió a cada reacción vehículo o PP2A en un tampón con EDTA para bloquear la actividad quinasa. Como se puede apreciar en la figura 7A, la fosforilación de p38 por MKK6 que se observa en presencia del vehículo, desaparece en gran parte o totalmente tanto en p38 α como en p38 β 2 cuando se tratan con PP2A.

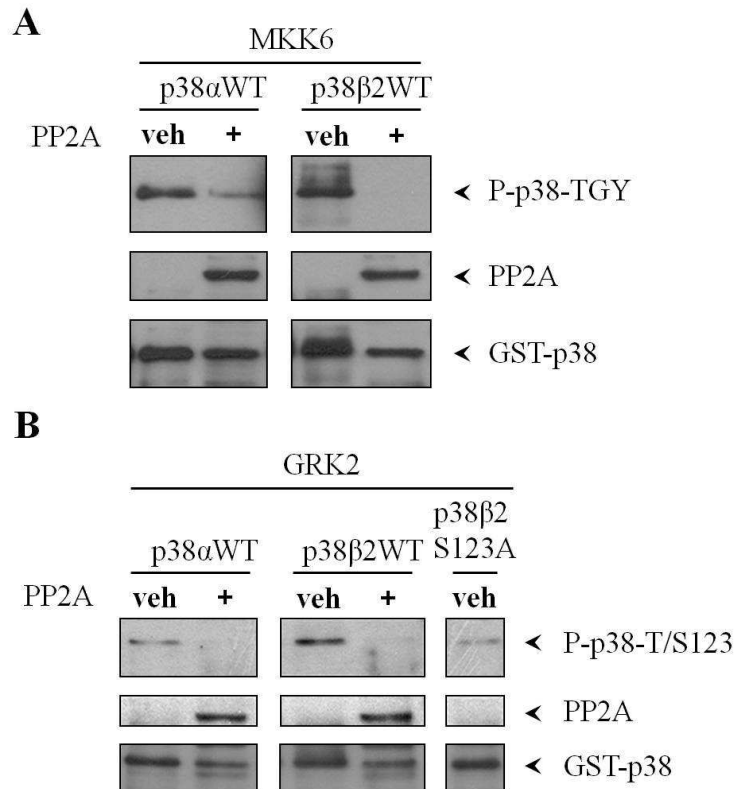


Figura 7. El residuo fosforilado por GRK2 en p38 puede ser defosforilado por PP2A. A) p38 α WT y p38 β 2WT recombinantes fueron activadas por MKK6 *in vitro* antes de ser incubadas con PP2A, capaz de defosforilar los aminoácidos fosforilados por MKK6. Durante la incubación con PP2A se añadió EDTA para bloquear la actividad quinasa. Los niveles de fosforilación de p38 con PP2A o con vehículo (veh), y la cantidad de proteína p38 y PP2A total fueron analizados mediante Western blot con anticuerpos específicos. B) p38 α WT y p38 β 2WT recombinantes fueron fosforiladas por GRK2 en las mismas condiciones que en “A” antes de ser incubadas con PP2A. Se incluye un carril con el mutante no fosforilable p38 β 2S123A como control negativo de la fosforilación en el residuo 123. Experimento representativo de dos independientes.

Cuando incubamos p38 fosforilada en T/S123, por incubación previa con GRK2, con PP2A también desaparece la fosforilación tanto en p38 α como en p38 β 2 (Figura 7B). Como comparación respecto al nivel basal de fosforilación por GRK2, se ha incluido un control con p38 β 2S123A. Estos resultados demuestran que PP2A pueden contrarrestar la fosforilación de p38 en S/T123 por GRK2, lo que favorece la hipótesis de que esta interacción funcional es un proceso dinámico que puede ser regulado en la célula.

2. DESARROLLO Y ANÁLISIS DE INHIBIDORES PEPTÍDICOS DE p38 BASADOS EN SU INTERACCIÓN CON EL SURCO DE ANCLAJE.

En este trabajo, hemos partido de la modulación alostérica de p38 mediante el surco de anclaje, importante por su interacción tanto con activadores como con sustratos, para diseñar nuevos inhibidores. La generación de inhibidores que no interaccionan con el bolsillo de ATP podría evitar desencadenar la respuesta tóxica que se ha producido con los inhibidores competitivos del ATP. Decidimos utilizar dos estrategias paralelas para producir inhibidores específicos de la interacción con este dominio: péptidos derivados de la secuencia de diversos activadores y sustratos de p38, y pequeñas moléculas diseñadas mediante técnicas bioinformáticas como el cribado virtual, dinámica molecular y “docking” virtual (Figura 8).

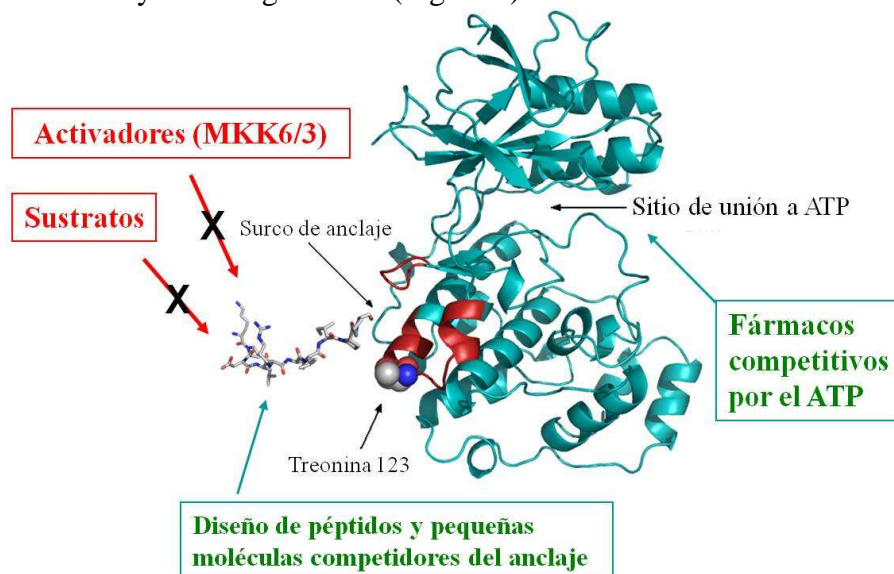


Figura 8. Diagrama donde se representa la estructura tridimensional de p38 y los objetivos de este trabajo en el desarrollo de inhibidores del surco de anclaje (estructura PDB: 1LEW). Se ha resaltado en rojo los aminoácidos implicados en el surco de anclaje y se muestra la localización del sitio de modulación por fosforilación T123. Junto al surco de anclaje se representa un ejemplo de péptido con motivo-D con capacidad para unirse a este dominio.

2.1 Péptidos diseñados a partir de las secuencias de unión al surco de anclaje presentes en MKK6 y MKK3b.

El uso de pequeños péptidos o dominios para inhibir una determinada actividad enzimática es un mecanismo desarrollado por la propia naturaleza. Por ejemplo, en el caso de las distintas isoformas de la PKC, se presenta en su extremo N-terminal un dominio lineal llamado pseudosustrato que se une al centro activo de la propia PKC. Este dominio presenta la secuencia consenso que suele reconocer y fosforilar PKC pero, en lugar de una serina o treonina fosforilable, contiene una alanina, de modo que mantiene a la proteína en estado inactivo hasta que un estímulo activador libera el dominio pseudosustrato del centro catalítico (Steinberg 2008). Este mecanismo ha sido adaptado por diversos grupos de investigación que para inhibir a determinadas enzimas han utilizado dominios de proteínas que interaccionan habitualmente con ellas. Por ejemplo, el grupo del Dr. C. Bonny diseñó un péptido inhibidor de JNK a partir de una proteína andamio, JIP-1, que suele estar unida a JNK y que puede inhibir la actividad quinasa de JNK *in vitro* y en células (Bonny et al. 2001). Siguiendo la misma estrategia, y según nuestra hipótesis de que la interacción a través del surco de anclaje podría ser suficiente para impedir el correcto ensamblaje de activadores y sustratos, se decidió

diseñar una serie de péptidos a partir de la secuencia consenso de unión al surco de anclaje a MAPK presentes en MKK6 y MKK3b (Enslin et al. 2000) (Figura 9), con una alta afinidad por este dominio de p38 (Chang et al. 2002). Se diseñaron 2 péptidos a partir de MKK3b según la estructura del cristal descrito por el grupo del Dr. Goldsmith (estructura PDB: 1LEZ): uno con la secuencia completa utilizada para hacer el cristal (pepMKK3bl) y otro únicamente con los aminoácidos que aparecen en la estructura cristalizada (pepMKK3bc). En la nomenclatura utilizada en esta tesis, se ha añadido el prefijo “pep” a los péptidos para diferenciarlos de las proteínas completas que los contienen. El péptido de MKK6 (pepMKK6l) corresponde a la secuencia homóloga en pepMKK3bl, aunque en el momento de la elección de las secuencias no existía evidencia cristalográfica, pero sí bioquímica, de que ésta era la secuencia responsable de la interacción a través del surco de anclaje (Enslin et al. 2000). Posteriormente se ha publicado la estructura de p38 con el motivo-D de MKK6 y se confirma que ésta es la secuencia que interacciona con el surco de anclaje (Garai et al. 2012) (Estructura PDB: 2Y8O). Adicionalmente se sintetizó un péptido desordenado a partir de pepMKK3bc (pepMKK3bs), con la misma composición de aminoácidos pero en una secuencia aleatoria, para confirmar si el efecto observado es específico de la secuencia.

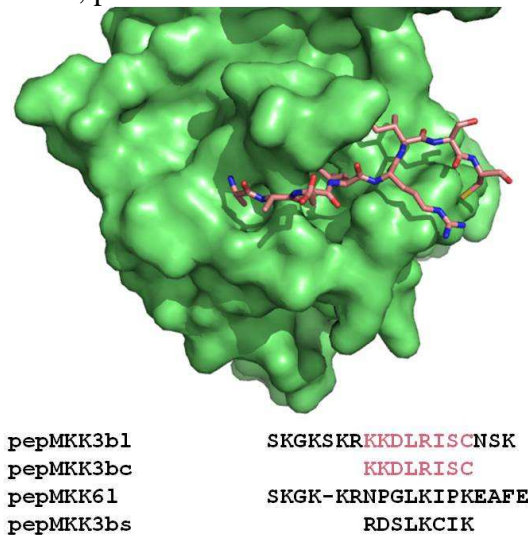


Figura 9. Péptidos diseñados a partir de MKK3b y MKK6. Representación tridimensional utilizando el software Pymol de la superficie accesible de p38 α (en verde) junto con la representación en forma de barras del motivo-D de MKK3b (en rosa) situado en el surco de anclaje de p38 (Estructura PDB: 1LEZ). Se incluyen las secuencias de los péptidos diseñados a partir de MKK3b y MKK6 para los experimentos de inhibición. Como control negativo se diseñó un péptido con los mismos aminoácidos pero en una secuencia desordenada (pepMKK3bs).

Con estos péptidos se realizaron experimentos de fosforilación *in vitro* utilizando p38 α como sustrato y no como quinasa para obviar posibles efectos producidos sobre la actividad catalítica de p38 α . Se incubaron las proteínas purificadas p38 α y MKK6_{CAM}, mutante constitutivamente activo (Raingeaud et al. 1996), en presencia de ATP y diferentes concentraciones de péptido. Antes de la reacción se realizó una preincubación con el péptido sin MKK6 en el tampón de reacción durante 10 minutos para permitir el correcto ensamblaje entre el péptido y p38. Tras la reacción se analizó la fosforilación de p38 por Western blot utilizando anticuerpos específicos para la forma fosforilada de p38 α (P-T180, P-Y182) lo que permite cuantificar el grado de activación de p38 α y, por tanto, la capacidad de inhibición de la misma por los péptidos. El grado de fosforilación se normalizó con un anticuerpo para p38 total. El mayor efecto inhibitorio observado se obtuvo con pepMKK3bl con una IC₅₀ (concentración inhibitoria media, calculada como la concentración a la que el efecto inhibitorio es del 50% respecto a la inhibición máxima obtenida en este tipo de ensayo) de 4,4 μ M (Figura 10A), muy similar al descrito anteriormente de 3,5 μ M (Fu et al. 2008). Sin embargo, los péptidos pepMKK3bc (560 μ M) y pepMKK6l (117 μ M) no inhibieron eficazmente p38 a pesar de su similitud (Figuras 10B y 10C). Es interesante destacar que MKK3b dispone de una

RESULTADOS

cisteína en posición Φ_B+2 que no aparece en MKK6 ni en ningún otro motivo-D, que, por proximidad, podría formar un puente disulfuro con la cisteína 119 de p38 en determinadas condiciones, según se observa en la estructura cristalizada de p38 con el péptido de MKK3b. La presencia de esta cisteína podría explicar la diferencia de actividad entre pepMKK3bl y pepMKK6l (ver Discusión). Sin embargo, el péptido pepMKK3bc, más corto que el pepMKK3bl pero con la cisteína en Φ_B+2 , fue menos eficaz, probablemente porque existen determinantes de la interacción que quedaron excluidos en este péptido y/o el péptido no se pudo posicionar correctamente para formar el puente disulfuro. Esta parte del péptido no se resolvió en el cristal aunque sí formaba parte del péptido utilizado, por lo que parece determinante para su correcto anclaje al surco de p38 α . No se observó inhibición con el péptido desordenado (pepMKK3bs) a ninguna concentración ensayada (hasta 1mM, resultados no mostrados) por lo que la inhibición registrada en el ensayo se puede atribuir a la secuencia concreta de cada péptido.

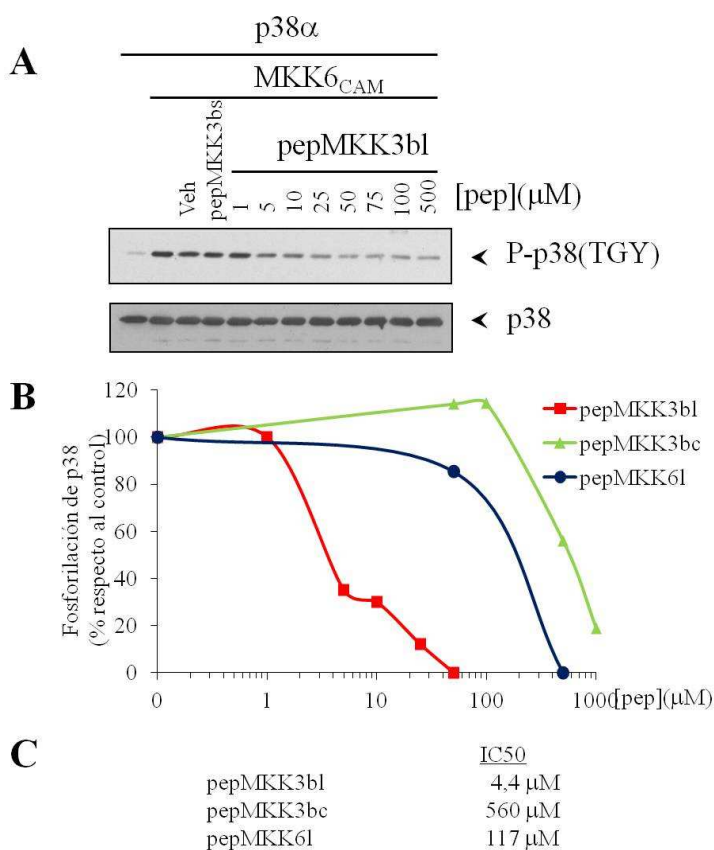


Figura 10. El motivo-D de MKK3b puede bloquear la activación de p38 α al unirse al surco de anclaje. p38 α inactiva recombinante fue incubada con MKK6 en presencia de los péptidos diseñados a partir de los motivos-D de MKK3b y MKK6 a diferentes concentraciones para evaluar su capacidad inhibitoria. Los niveles de fosforilación y los niveles totales de p38 α fueron analizados mediante Western blot y cuantificados para evaluar el grado de inhibición. A) Western blot representativo de la inhibición de la fosforilación por el péptido pepMKK3bl. B) En la gráfica se muestran la cuantificación del efecto de los diferentes péptidos sobre la fosforilación de p38 por MKK6 en función de su concentración relativizada al 100% del control con vehículo. Valores medios de dos experimentos independientes. C) Relación de las IC₅₀ de los péptidos analizados.

2.2. Péptidos diseñados a partir del motivo-D presente en MEF2A.

Como aproximación paralela se diseñaron 5 péptidos a partir del motivo-D presente en MEF2A (Chang et al. 2002) (PDB: 1LEW) para competir la interacción con p38 (Figura 11). Igual que para MKK3b, se diseñó un péptido con la secuencia completa utilizada para la cristalización (pepMEF2A1) y un péptido con la secuencia que aparece resuelta en la estructura (pepMEF2Ac). Adicionalmente, se diseñó un péptido modificado sustituyendo la prolina Φ_B+1 por la cisteína presente en MKK3b (pepMEF2AxCys), que podría formar un puente disulfuro con la cisteína 119 de p38. A pesar de que en el motivo de MKK3b la cisteína está en Φ_B+2 , se decidió colocarla en Φ_B+1 porque en el cristal con el péptido de MEF2A, éste está ligeramente desplazado respecto al de MKK3b y el residuo en Φ_B+1 está mejor posicionado para establecer el puente disulfuro

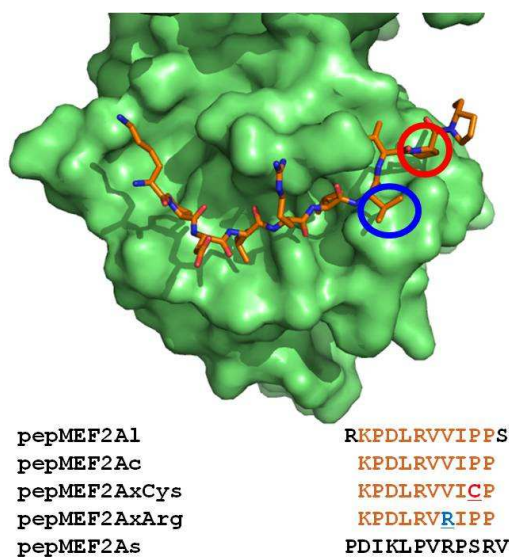


Figura 11. Péptidos diseñados a partir de la secuencia de MEF2A. Representación tridimensional utilizando el software Pymol de la superficie accesible de p38 α (en verde) junto con la representación en forma de barras del motivo-D de MEF2A (en naranja) situado en el surco de anclaje de p38 (Estructura PDB: 1LEW). Se ha resaltado el aminoácido mutado a cisteína en el péptido pepMEF2AxCys (Φ_{B+1} , círculo rojo) y el aminoácido mutado en el péptido pepMEF2AxArg (Φ_{B-1} , círculo azul). Se incluyen las secuencias de los péptidos diseñados a partir de MEF2A para los experimentos de inhibición. Como control negativo se diseñó un péptido con los mismos aminoácidos en una secuencia desordenada (pepMEF2As).

con la cisteína 119 de p38. En la figura 12 se muestra una representación teórica del puente disulfuro que podría formarse entre p38 y el péptido de MKK3b (Figura 12A). En la posición Φ_{B+1} del péptido MEF2A hay una prolina (Figura 12B) pero está correctamente posicionada para sustituirla por una cisteína para formar ese puente disulfuro (Figura 12C). También se diseñaron otros dos péptidos: uno sustituyendo la valina Φ_{A+1} por una arginina presente también en MKK3b (pepMEF2AxArg), que podría formar un enlace electrostático con el carboxilo de la cisteína 119, y otro péptido desordenado a partir del pepMEF2A (pepMEF2As). Se realizaron los mismos experimentos de fosforilación *in vitro* que con los péptidos de MKK3b y MKK6. En este caso, el mayor efecto inhibitorio se observó con pepMEF2AxCys con una IC₅₀ de 3,7 μ M (Figura 13A), unas 250 veces más activo que el péptido original pepMEF2Ac (911 μ M) sin cisteína en Φ_{B+1} , lo que podría apoyar la hipótesis de que se esté formando un puente disulfuro con la cisteína 119 de p38.

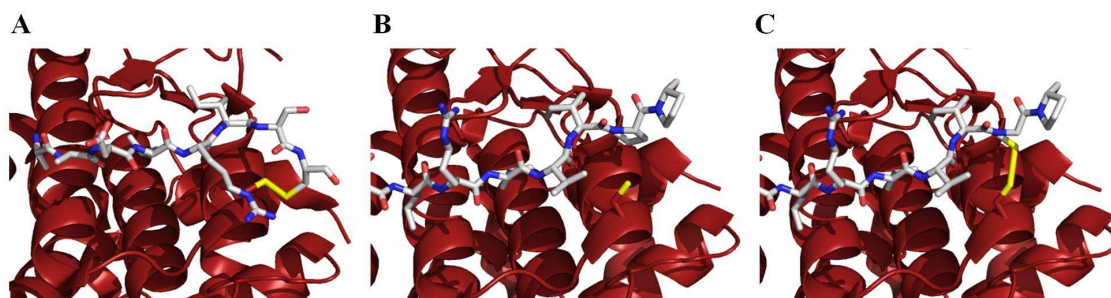


Figura 12. La prolina del motivo-D de MEF2A en la posición Φ_{B+1} (mutada a cisteína) está a la distancia adecuada para formar un puente disulfuro con p38 α . A) Péptido de MKK3b (1LEZ) donde se aprecia la formación de un puente disulfuro (amarillo) entre p38 α y dicho péptido. B) Péptido de MEF2A en el surco de anclaje de p38 α (1LEW). C) Representación teórica de la posible formación de un puente disulfuro entre el péptido de MEF2A mutado a cisteína en la posición Φ_{B+1} (pepMEF2AxCys) y la cisteína 119 de p38 α (1LEW modificado).

Respecto a los otros péptidos, (Figuras 13B y 13C) su capacidad de inhibición es muy limitada, si bien pepMEF2AxArg presentó una IC₅₀ de 402 μ M, aproximadamente la mitad que el original pepMEF2Ac, lo que indica que se podría estar formando una interacción electrostática adicional con el carboxilo de la cisteína 119. pepMEF2A1, dos aminoácidos más largo, fue ligeramente más activo (628 μ M) que pepMEF2Ac (911 μ M) por lo que los dos aminoácidos añadidos podrían aportar alguna interacción adicional,

RESULTADOS

especialmente la arginina en Φ_A -6 ya que aporta una carga positiva que podría interactuar con el dominio CD. Tampoco se observó en este caso inhibición con el péptido desordenado (pepMEF2As) a ninguna concentración ensayada (hasta 1mM, resultados no mostrados).

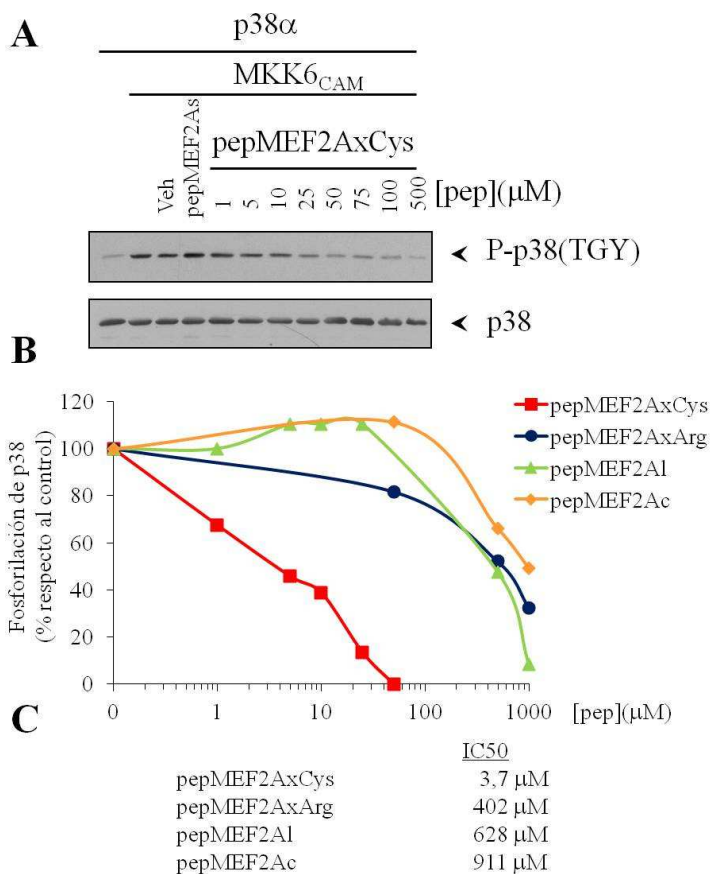


Figura 13. El motivo-D de MEF2A mutado en Φ_B +1 a cisteína puede inhibir eficazmente la activación de p38 α . p38 α inactiva recombinante fue incubada con MKK6 en presencia de los péptidos diseñados a partir de los motivos-D de MEF2A a diferentes concentraciones para evaluar la capacidad inhibitoria de los péptidos. Los niveles de fosforilación y los niveles totales de p38 α fueron analizados mediante Western blot y cuantificados para evaluar el grado de inhibición. A) Western blot representativo de la inhibición de la fosforilación por el péptido pepMEF2AxCys. B) En la gráfica se muestra la cuantificación del efecto de los diferentes péptidos sobre la fosforilación de p38 α por MKK6 en función de su concentración relativizada al 100% del control con vehículo. Valores medios de dos experimentos independientes. C) Relación de las IC₅₀ de los péptidos analizados.

2.3. Péptidos diseñados a partir del motivo-D en MK2.

Para MK2 (MAPKAPK2) se diseñaron igualmente unos péptidos a partir del motivo-D. Casi simultáneamente, los laboratorios del Dr. ter Haar y del Dr. White desvelaron por cristalografía por primera vez que el motivo-D de MK2 está en sentido contrario respecto al clásico motivo-D en MKK3b y MKK6, es decir que el motivo " $\Phi_A X \Phi_B$ " en MK2 está en N-terminal respecto a la región básica (ter Haar et al. 2007; White et al. 2007). Posteriormente, se ha comprobado por cristalización que todas las MAPKAPK como RSK1, MSK1 y la propia MK2, presentan el motivo-D en sentido inverso respecto al clásico motivo-D (Garai et al. 2012). Se diseñaron 6 péptidos con diferentes longitudes que abarcan en mayor o menor medida el surco de anclaje basándose en las cristalografías publicadas (Estructuras PDB: 2ONL y 2OKR), y dos péptidos desordenados, uno a partir de pepMK2b (pepMK2bs) y otro a partir de pepMK2e (pepMK2es) (Figura 14). Los péptidos pepMK2c y pepMK2d se sintetizaron antes de la publicación de las cristalografías por lo que se basaban en la hipótesis de que el motivo $\Phi_A X \Phi_B$ está en C-terminal respecto a la región básica como en el motivo-D clásico. Los péptidos pepMK2a y pepMK2b se diseñaron después de la publicación de las cristalografías por lo que se sintetizaron según el motivo-D inverso (motivo $\Phi_A X \Phi_B$ en N-terminal respecto a la región básica). Se diseñó también un péptido modificado con una cisteína en lugar de una glutamina en la posición Φ_B +1 (pepMK2bxCys), presente

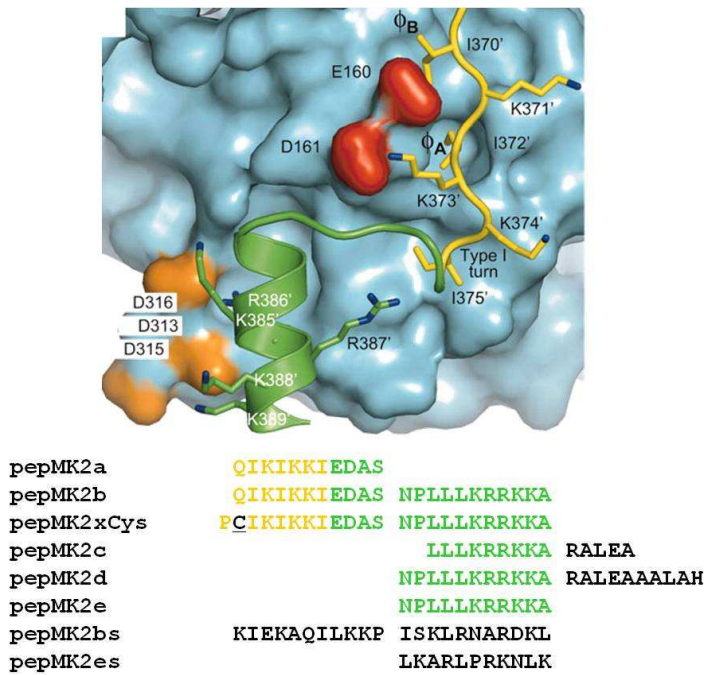


Figura 14. Péptidos diseñados a partir de MK2. Representación de la superficie accesible de p38α (En azul) junto con el motivo-D de MK2 que abarca el dominio ED (péptido en amarillo) y el dominio CD (péptido en verde) situado en el surco de anclaje de p38. Se han resaltado los aminoácidos clave de la interacción por el dominio ED (E160 y D161, en rojo) y los aminoácidos clave en la interacción por el dominio CD (D313, D315 y D316, en naranja). Se incluyen las secuencias de los péptidos diseñados a partir de MK2 para los experimentos de inhibición. Como control negativo se diseñaron dos péptidos con los mismos aminoácidos pero con una secuencia desordenada (pepMK2bs y pepMK2es). Figura adaptada de (ter Haar et al. 2007).

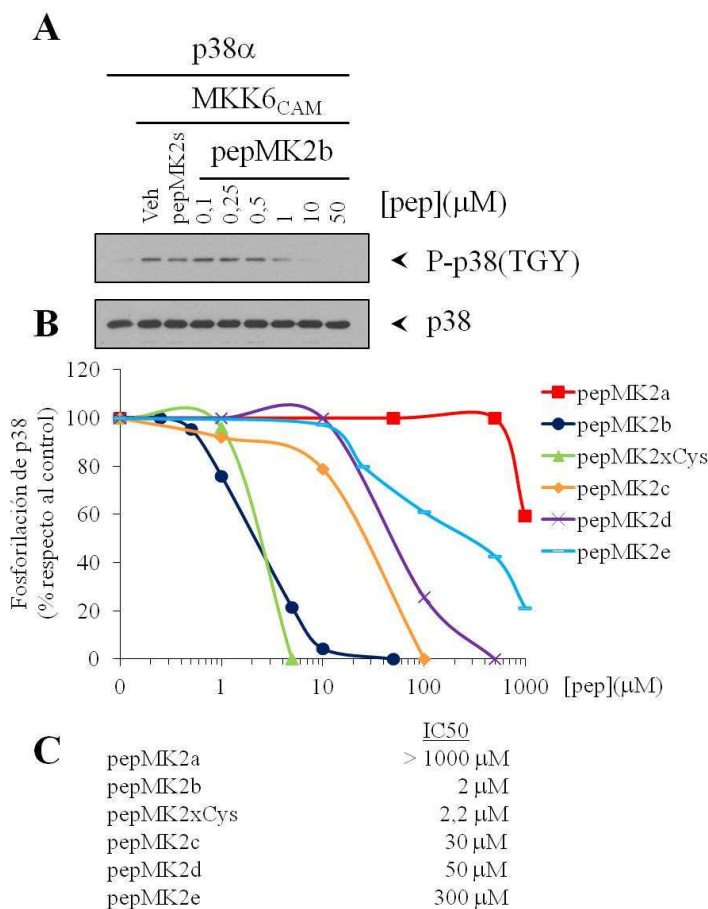


Figura 15. Únicamente el péptido de MK2 que abarca las dos regiones del surco de anclaje inhibe eficazmente la activación de p38α. p38α inactiva recombinante fue incubada con MKK6 en presencia de los péptidos diseñados a partir de los motivos-D de MK2 a diferentes concentraciones para evaluar su capacidad inhibitoria. Los niveles de fosforilación y los niveles totales de p38 fueron analizados mediante Western blot y cuantificados para evaluar el grado de inhibición. A) Western blot representativo de dos experimentos independientes de la inhibición de la fosforilación por el péptido pepMK2b. B) En la gráfica se muestra la cuantificación del efecto de los diferentes péptidos sobre la fosforilación de p38α por MKK6 en función de su concentración relativizada al 100% del control con vehículo. Valores medios de dos experimentos independientes. C) Relación de las IC₅₀ de los péptidos analizados.

RESULTADOS

en MKK3b, y otro con la región básica sólo para evaluar cuál de las dos partes del motivo-D contribuye más a la capacidad inhibitoria (pepMK2e). Con estos péptidos se realizaron los mismos experimentos de fosforilación *in vitro* que anteriormente. Es de interés indicar que los péptidos de MK2 que sólo contienen el motivo hidrofóbico (pepMK2a) o sólo la región básica (pepMK2e) presentaron una capacidad inhibitoria muy baja sólo detectable a 1 y 0,5mM, respectivamente, mientras que cuando se juntan en el mismo péptido pueden inhibir p38 muy eficazmente ($IC_{50}=2\mu M$) (Figura 15A), lo que indicaría que las dos regiones colaboran para un correcto anclaje. pepMK2c y pepMK2d inhiben con IC_{50} de 30 y 50 μM , más bajas que pepMK2e a pesar de no contener el motivo hidrofóbico (Figuras 15B y 15C). Curiosamente, con pepMK2bxCys no se ha observado un incremento significativo en la inhibición, posiblemente porque la afinidad del péptido por el surco de anclaje ya es muy alta para un péptido de estas características o porque su cisteína no queda orientada en la posición correcta para formar un puente disulfuro con la cisteína 119.

2.4. El aumento de la capacidad inhibitoria de pepMEF2AxCys por la sustitución de la posición Φ_{B+1} por una cisteína puede ser revertido en un ambiente reductor.

El aumento observado en la inhibición de p38 al incluir una cisteína en la posición Φ_{B+1} del péptido pepMEF2A es compatible con la posible formación de un puente disulfuro entre ésta y la cisteína 119 de p38. Para confirmar esta hipótesis se realizaron experimentos *in vitro* de fosforilación de p38 por MKK6 en presencia de pepMEF2AxCys y dosis crecientes de DTT, un potente agente reductor que evita la formación de puentes disulfuro entre cadenas peptídicas. Se observó que a 1mM de DTT, una concentración inferior a la de agentes reductores como el glutatión existentes en la célula (aproximadamente 7mM) (Montero et al. 2013), no varía la inhibición respecto al ensayo sin DTT, pero a la concentración saturante de 10mM (superior a la concentración de glutatión en la célula) la inhibición obtenida con pepMEF2AxCys se reduce significativamente, con un descenso en la inhibición del 47% al 2% a 2,5 μM de péptido y del 96% al 38% a 25 μM (Figura 16). Estos resultados respaldan la hipótesis de que se está formando un puente disulfuro, ya que, aunque probablemente la incubación con DTT no impida totalmente la formación de dicho puente, un ambiente

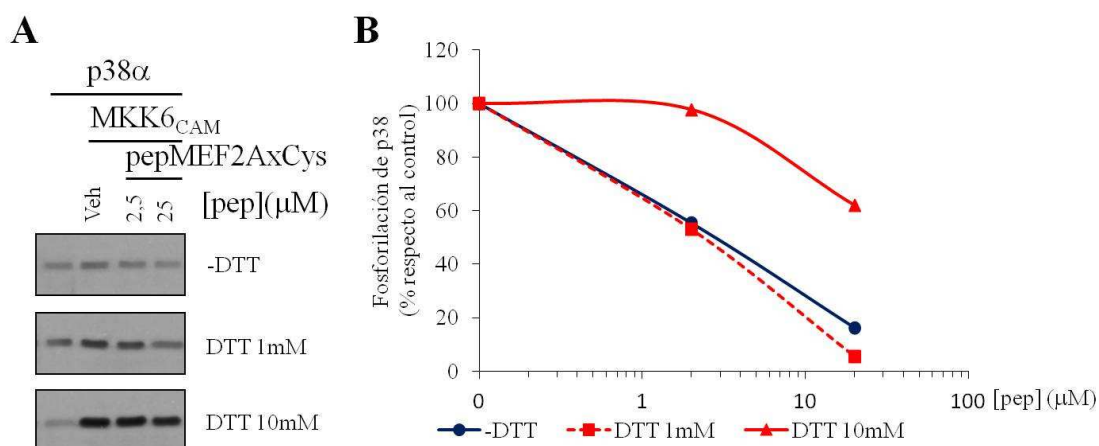


Figura 16. El agente reductor DTT reduce la capacidad inhibitoria del péptido pepMEF2AxCys. Se incubó p38 α inactiva recombinante junto con MKK6 en presencia de diferentes concentraciones del agente reductor DTT y el péptido pepMEF2AxCys (2,5 y 25 μM). Se analizaron las reacciones mediante Western blot y se cuantificaron los niveles de fosforilación de p38. En la gráfica se muestra la cuantificación del efecto del péptido relativo al 100% del control con vehículo de cada condición.

reductor disminuye la capacidad del péptido pepMEF2AxCys para inhibir la activación de p38. Cabe destacar que sin DTT la fosforilación de p38 es más baja porque es necesario un cierto ambiente reductor para el correcto funcionamiento de la actividad quinasa.

2.5. El péptido TAT-MEF2AxCys puede inhibir procesos dependientes de p38 como la secreción de TNF α estimulada por LPS.

Se seleccionaron los péptidos de mayor efecto inhibitorio en experimentos *in vitro*: pepMKK3bl, pepMEF2AxCys y pepMK2b, para comprobar si las inhibiciones obtenidas *in vitro* pueden observarse también sobre p38 en cultivos celulares. Para que los péptidos puedan tener efecto sobre las dianas intracelulares, deben entrar al interior de la célula, y dado que la membrana plasmática es impermeable a las macromoléculas, se sintetizaron péptidos de fusión con la secuencia TAT (GRKKRRQRRR) en el extremo N-terminal (ver sección 4.3.1 de la Introducción), que confiere la capacidad de atravesar las membranas celulares y translocarse al interior celular (Vives et al. 1997). Tras la secuencia TAT se incluyeron dos prolinas para evitar la formación de estructuras secundarias con la parte inhibidora del péptido. Para distinguirlos de los péptidos sin TAT, se ha cambiado el prefijo “pep” por “TAT”. Se utilizó un ensayo de secreción de TNF α en respuesta a LPS en la línea celular monocítica humana THP-1, por ser un proceso ampliamente descrito como estrictamente dependiente de la actividad de las quinasas p38 (Hill et al. 2008). Se preincubaron durante 1 hora los cultivos de células THP-1 con los péptidos más activos *in vitro* (TAT-MEF2AxCys, TAT-MKK3bl y TAT-MK2b) y sus respectivos péptidos desordenados a concentraciones de entre 0,01 y 100 μ M y posteriormente se estimularon con LPS para inducir la secreción de TNF α . La cantidad de TNF α secretada al medio se cuantificó y los resultados obtenidos muestran que el péptido TAT-MEF2AxCys puede bloquear completamente la secreción de TNF α a 10 μ M (Figura 17), mientras que la secuencia desordenada TAT-MEF2As no produce ninguna inhibición significativa, por lo que el efecto observado se puede atribuir a la secuencia concreta del péptido. Por otro lado, los péptidos TAT-MKK3bl y TAT-MK2b no presentaron ningún efecto en las concentraciones utilizadas (resultados no mostrados). Es importante destacar que la fusión con la secuencia TAT no siempre consigue que los péptidos resultantes sean permeables, debido a que la secuencia concreta de algunos péptidos puede alterar el transporte a través de la membrana (Copolovici et al. 2014), lo que podría explicar su falta de actividad en este sistema.

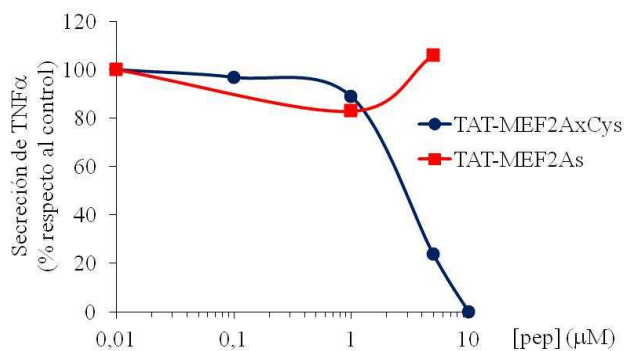


Figura 17. El péptido permeable de MEF2A mutado a cisteína puede inhibir la secreción de TNF α en la línea celular monocítica humana THP-1. Se estimularon células THP-1 con LPS durante 4h en presencia del péptido TAT-MEF2AxCys y TAT-MEF2As (secuencia desordenada). Se recogieron los sobrenadantes y se analizó la secreción de TNF α mediante ELISA. En la gráfica se muestra la cuantificación del efecto del péptido relativo al 100% (vehículo). Experimento representativo de dos independientes.

2.6. El péptido TAT-MEF2AxCys inhibe la activación y la actividad de p38 en monocitos THP-1.

Para observar el efecto del péptido de fusión sobre la activación y actividad de p38 en células se optó por medir por Western blot los niveles de fosforilación de p38 y sus sustratos en el mismo ensayo de estimulación por LPS de células THP-1 que se ha utilizado para medir la inhibición en la secreción de TNF α . Se preincubaron las células en cultivo con los péptidos de fusión a diferentes concentraciones entre 1 y 250 μ M, se estimularon con LPS durante 30 minutos y posteriormente fueron lisadas para analizar por Western blot. Se observó que cuando las células eran incubadas con el péptido TAT-MEF2AxCys la activación de p38 se reducía de forma dosis dependiente hasta más del 90% a 5 μ M (Figura 18), una concentración muy similar a la que consigue inhibir la secreción de TNF α . Sin embargo, cuando las células eran preincubadas con el péptido desordenado TAT-MEF2As, no se apreciaba una inhibición significativa en la activación de p38. Adicionalmente, se observó que la actividad de p38, medida como fosforilación de sustratos específicos como MK2 o HSP27, se reducía de forma dependiente de dosis y en un grado similar al observado para la inhibición de la activación de p38. En el caso de los péptidos TAT-MKK3bl y TAT-MK2b, no se obtuvieron inhibiciones significativas ni en la activación ni en la actividad a las concentraciones utilizadas (resultados no mostrados) como sucedía en la inhibición de la secreción de TNF α .

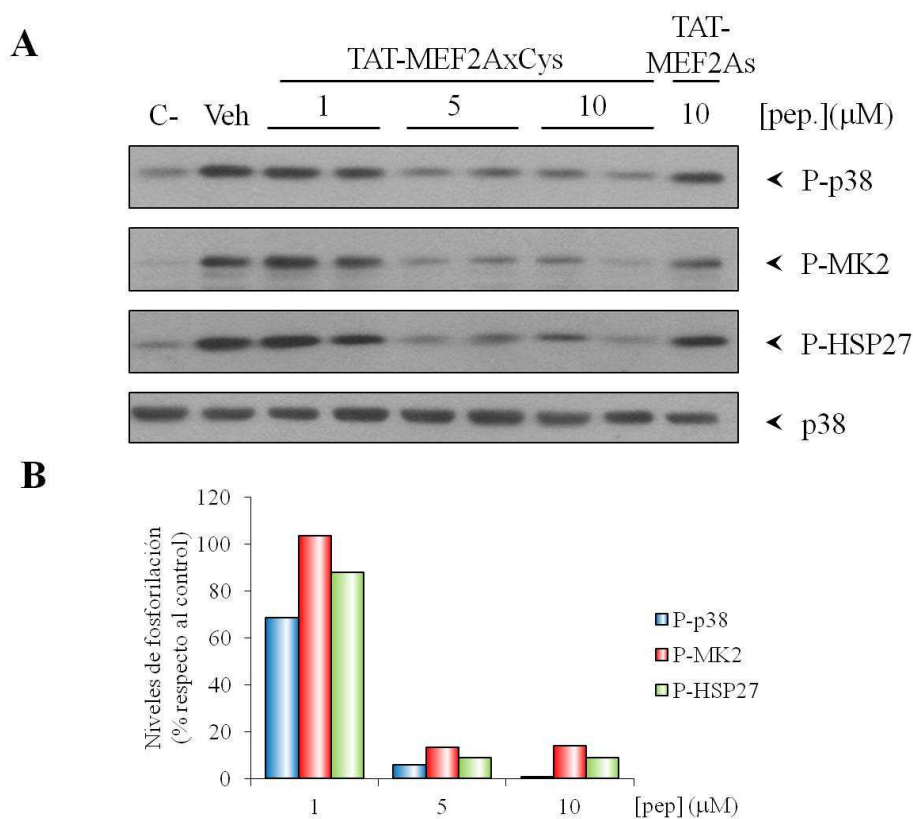


Figura 18. La inhibición de la secreción de TNF α por el péptido TAT-MEF2AxCys se correlaciona con la reducción de los niveles de activación y actividad de p38. A) Lisados de células THP-1 estimuladas con LPS durante 30 min en presencia de diferentes concentraciones del péptido TAT-MEF2AxCys y el péptido desordenado (TAT-MEF2As) fueron analizados mediante Western blot para evaluar la inhibición de la activación de p38 (P-p38) y su actividad sobre los sustratos MK2 y HSP27 (P-MK2 y P-HSP27). Para la normalización de los datos se cuantificaron los niveles totales de p38 (p38). B) Cuantificación de los niveles de fosforilación de p38, MK2 y HSP-27 respecto al control positivo sin péptido. Experimento representativo de dos independientes.

2.7. El péptido de MEF2A con aminoácidos D y secuencia inversa (D-TAT-MEF2AxCys), produce una inhibición de la secreción de TNF α similar a la obtenida con aminoácidos L y secuencia directa.

Utilizando la secuencia del péptido TAT-MEF2AxCys, se sintetizó un péptido con la misma secuencia pero con aminoácidos D y en sentido inverso. Los aminoácidos D y L son enantiómeros entre sí, pero los aminoácidos D, salvo excepciones muy concretas, no se encuentran en la naturaleza y en eucariotas no pueden ser reconocidos y degradados por proteasas (Asano et al. 1989). Gracias a este diseño se mantiene la posición de las cadenas laterales de los aminoácidos cambiando únicamente la orientación del enlace peptídico y se consigue que la vida media en la célula o un organismo completo sea mucho mayor (Bonny et al. 2001). Se analizó el péptido D-TAT-MEF2AxCys en el mismo ensayo de secreción de TNF α en respuesta a LPS, y se obtuvo una actividad inhibidora de la misma magnitud que la obtenida con el péptido con aminoácidos L (Figura 19). Este resultado parece indicar que la interacción entre el péptido y p38 está determinada principalmente por la posición espacial de las cadenas laterales del péptido, y que resultaría viable utilizar péptidos D con secuencias inversas para experimentos *in vivo* dado que su eficacia inhibidora sería similar. Es de destacar, sin embargo, que ambos péptidos, y en particular el D, mostraron en estos ensayos en monocitos un perfil de toxicidad considerable (Figura 19), lo que podría indicar una ventana de concentraciones terapéuticas limitada, que habría que explorar en mayor detalle.

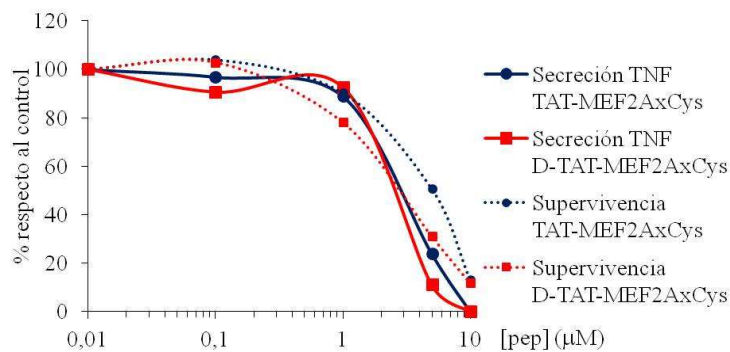


Figura 19. La sustitución por D-aminoácidos en el péptido TAT-MEF2AxCys no altera la inhibición de la secreción de TNF α . Se estimularon células THP-1 con LPS durante 4h en presencia del péptido con D-aminoácidos D-TAT-MEF2AxCys (rojo) en comparación con el péptido con L-aminoácidos (azul). Se recogieron los sobrenadantes y se analizó la secreción de TNF α mediante ELISA (líneas continuas). Además, se evaluó la supervivencia de las células incubadas con el compuesto mediante la incorporación de yoduro de propidio (IP) y análisis mediante citometría de flujo (líneas punteadas). Se representan los porcentajes de células marcadas con IP respecto al total de células analizadas y el de TNF α secretado respecto al valor en ausencia de compuesto (vehículo) tomado como el 100%. Experimento representativo de dos independientes.

2.8. El péptido TAT-MEF2AxCys puede reducir la hiperalgesia inducida por carragenato en ratones GRK2^{+/-}.

Para establecer si el efecto inhibidor de los péptidos observado *in vitro* y en cultivos celulares podría utilizarse para el tratamiento de enfermedades inflamatorias que dependan de la activación de p38 se utilizó un modelo de hiperalgesia inflamatoria inducida por carragenato en ratones GRK2^{+/-} que ha sido puesto a punto por el grupo de la Dra. A. Kavelaars (Eijkelkamp et al. 2010). Los experimentos fueron realizados por la Dra. Hanneke Willemsen. Los ratones hemizigotos GRK2^{+/-} sufren una hiperalgesia crónica inducida por carragenato de la que tardan 20 días en recuperarse y que no muestran los ratones WT, los cuales resuelven dicha hiperalgesia en 2-3 días.

RESULTADOS

En la figura 20 se observa que al administrar a los ratones $GRK2^{+/-}$ el inhibidor de p38 SB239063 se atenúa la hiperalgesia crónica y los ratones presentaban una recuperación parcial, proceso que correlaciona con una reducción en la secreción de $TNF\alpha$ (dependiente de p38), indicando que en ratones con menor expresión de GRK2 la sensibilidad al dolor es dependiente de p38, aunque el efecto de los inhibidores sólo dure unas horas. Podría especularse que en los ratones $GRK2^{+/+}$, GRK2 podría estar inhibiendo la actividad de p38 y ayudando a resolver el proceso inflamatorio con mayor eficacia.

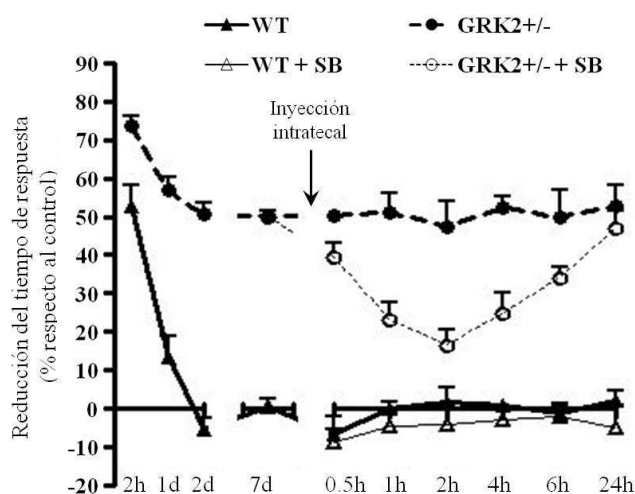


Figura 20. La hiperalgesia inducida por inflamación puede ser revertida por el inhibidor de p38 SB239063. Ratones WT y hemizigotos para GRK2 ($GRK2^{+/-}$) fueron inyectados con carragenato para inducir una hiperalgesia por inflamación. A los siete días se inyectaron por vía intratecal 5 μ g del inhibidor específico de p38 SB239063 (SB) en una solución salina con DMSO al 20%. Se analizó la hiperalgesia termal de los ratones aplicando una placa de calor a la pata tratada durante sucesivas horas tras la administración del inhibidor. En la gráfica se muestra la cuantificación de la reducción del tiempo de respuesta respecto al tiempo empleado antes de la inyección de carragenato (n=2 ratones por grupo).

Decidimos utilizar este modelo para comprobar *in vivo* la eficacia terapéutica del péptido inhibidor TAT-MEF2AxCys. No se utilizó el péptido con D-aminoácidos, por el elevado coste económico que suponía sintetizar la cantidad necesaria para el tratamiento en ratones al ser aminoácidos artificiales.

En nuestros resultados observamos que con el péptido TAT-MEF2AxCys se reduce el tiempo de respuesta (es decir, el grado de hiperalgesia) del 42% al 17% con una dosis de 2 μ g por ratón y hasta el 11% con 10 μ g por ratón durante un máximo de 6 horas, mientras que el péptido desordenado (TAT-MEF2As) no produce un cambio significativo en la respuesta (Figura 21). El inhibidor comercial de p38, SB239063, también produce una reducción en el tiempo de respuesta del 42% al 17%. Es interesante destacar que, adicionalmente, a partir del día 1 tras la inyección del péptido y hasta el día 8, se observa una inhibición de la hiperalgesia del 37% al 19% con ambas dosis del péptido TAT-MEF2AxCys, reducción sostenida que no se observa con el inhibidor SB239063, lo que aportaría mayor valor terapéutico al péptido descrito.

Estos resultados refuerzan la hipótesis de que la inhibición de p38 utilizando el surco de anclaje puede ser una estrategia viable para el tratamiento de patologías relacionadas con la sobreactivación o la activación prolongada de p38.

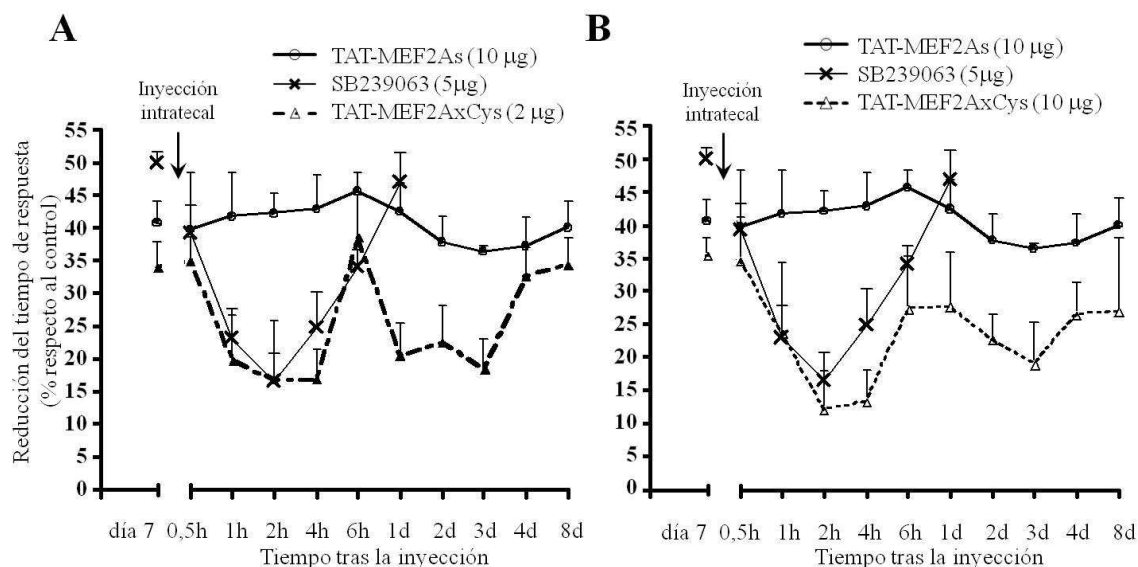


Figura 21. TAT-MEF2AxCys puede revertir la hiperalgesia inducida por inflamación en ratones GRK2^{+/-} mejorando el efecto del SB239063. Ratones GRK2^{+/-} fueron inyectados con carragenato para inducir una hiperalgesia por inflamación. A los siete días se inyectaron por vía intratecal el péptido TAT-MEF2AxCys, TAT-MEF2As (péptido desordenado) o el inhibidor de p38 SB239063 en una solución salina con DMSO al 20%. Se tomaron medidas aplicando una placa de calor a la pata tratada durante las primeras 6 horas y durante 8 días tras la administración del compuesto. En la gráfica se muestra la cuantificación de la hiperalgesia termal de los ratones como la reducción del tiempo de respuesta respecto al tiempo empleado antes de la inyección de carragenato (n=2 ratones por grupo).

3. ANÁLISIS DE PEQUEÑAS MOLÉCULAS INHIBIDORAS DE p38 A TRAVÉS DEL SURCO DE ANCLAJE.

3.1. Dos de los compuestos seleccionados mediante el cribado virtual muestran actividad inhibitoria sobre la activación de p38.

El diseño de fármacos basado en la estructura del receptor o diana ha experimentado un gran auge en los últimos años. La mejora en las técnicas de determinación estructural, así como los proyectos de genómica estructural y funcional, están incrementando considerablemente el número de dianas disponibles para una intervención terapéutica. Esta disponibilidad de estructuras de macromoléculas biológicas, junto con el aumento en la velocidad de cálculo de los ordenadores modernos, ha propiciado un enorme interés en las técnicas computacionales de búsqueda de moléculas bioactivas basadas en la simulación de reconocimiento ligando-receptor. En ellas se lleva a cabo una simulación de reconocimiento molecular, comúnmente llamada “docking”, con cada una de las moléculas contenidas en una quimioteca o catálogo de moléculas, compiladas a partir de los catálogos proporcionados por diferentes casas comerciales. La unidad de bioinformática del CBMSO realizó un primer cribado a partir de una biblioteca de un millón de moléculas recopiladas en la base de datos ZINC (Irwin et al. 2012), seleccionando inicialmente 200 candidatos, que se reordenaron mediante un proceso de dinámica molecular. Finalmente se seleccionaron 10 candidatos (ver detalles en Materiales y Métodos, Fig. MM-6 y Tabla MM-2). Para evaluar el efecto de esas moléculas sobre p38 se realizaron los mismos experimentos de fosforilación *in vitro* que para los péptidos: se incubó p38 α purificada junto con MKK6 para evaluar el efecto de

RESULTADOS

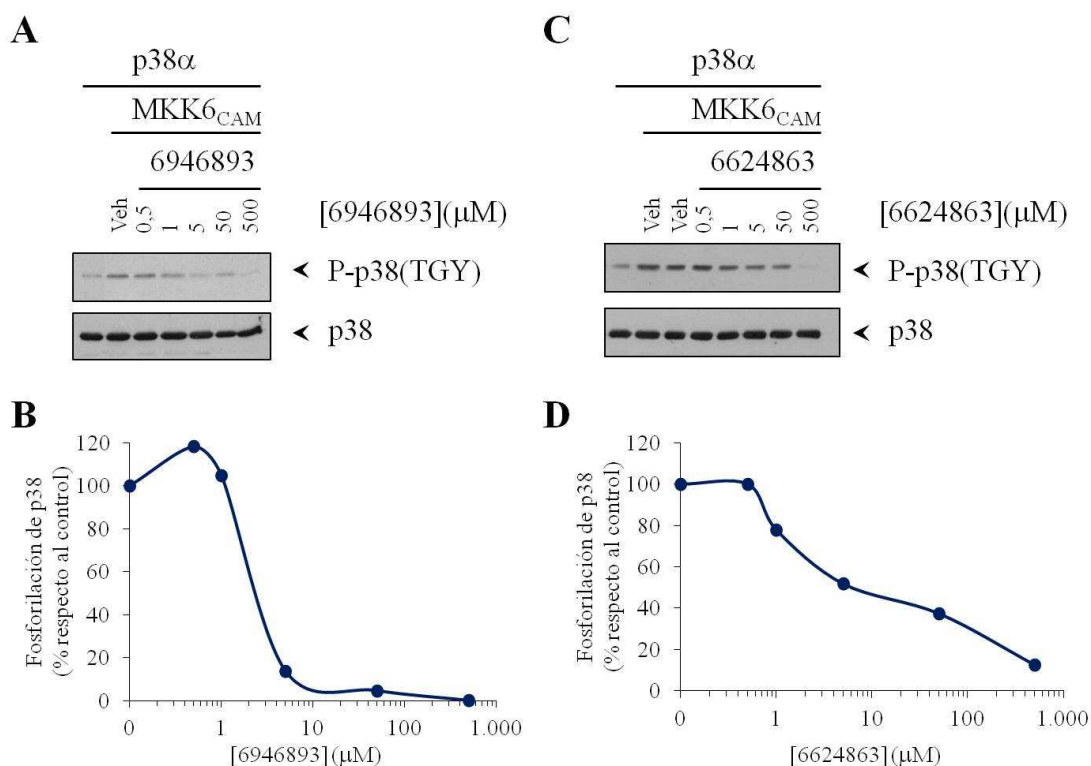


Figura 22. Los compuestos 6946893 y 6624863 seleccionados por cribado virtual pueden inhibir la activación de p38 con una IC₅₀ en el rango micromolar. p38α inactiva recombinante fue incubada con MKK6 en presencia de los compuestos a diferentes concentraciones para evaluar su posible capacidad inhibitoria. Los niveles de fosforilación y los niveles totales de p38α fueron analizados mediante Western blot y cuantificados. A y B) Western blot representativos de la inhibición de la fosforilación por los compuestos. C y D) En las gráficas se muestra la cuantificación del efecto de cada compuesto relativo al 100% (vehículo) en función de la concentración de molécula. Experimentos representativos de dos independientes.

Molécula	Proveedor	E _{int} (kcal/mol)	IC ₅₀ (μM)
6946893	ChemBridge	-27.676	2,4
6624863	ChemBridge	-31.997	5
ASN03775353	Asinex	-31.252	100
7981989	ChemBridge	-30.675	200
7677902	ChemBridge	-25.284	200
7679969	ChemBridge	-25.187	500
ASN05098723	Asinex	-22.242	500
BAS01848008	Asinex	-24.774	700
7372138	ChemBridge	-27.394	>1000
7987598	ChemBridge	-24.634	>1000

Tabla 1. IC₅₀ de las 10 moléculas seleccionadas por cribado virtual ordenadas según su capacidad inhibitoria y comparación con la energía de interacción (E_{int}) calculada como ΔG teórico en kcal/mol.

la presencia de las moléculas candidatas a diferentes concentraciones entre 1 y 1000 μM sobre la interacción funcional entre MKK6 y p38α.

De las moléculas analizadas sólo dos resultaron significativamente activas: 6946893 con una IC₅₀ de 2,4 μM y 6624863 con una IC₅₀ de 5μM (Figura 22). El resto presentaron IC₅₀ superiores a 100μM como se puede observar en la Tabla 1. Además, si se compara gráficamente la energía de interacción experimental, que como aproximación puede calcularse a partir de los valores de IC₅₀ obtenidos en los experimentos *in vitro* mediante la fórmula ΔG=RTln(IC₅₀) (Rizzo et al. 2001), con la energía de interacción teórica obtenida durante el cribado virtual mediante Dinámica

Molecular (ver Materiales y Métodos), se observa que los valores muestran una correlación positiva entre la afinidad teórica y la inhibición empírica, lo que demuestra el carácter predictivo del software utilizado para el cribado virtual (Figura 23) (Kollman et al. 2000).

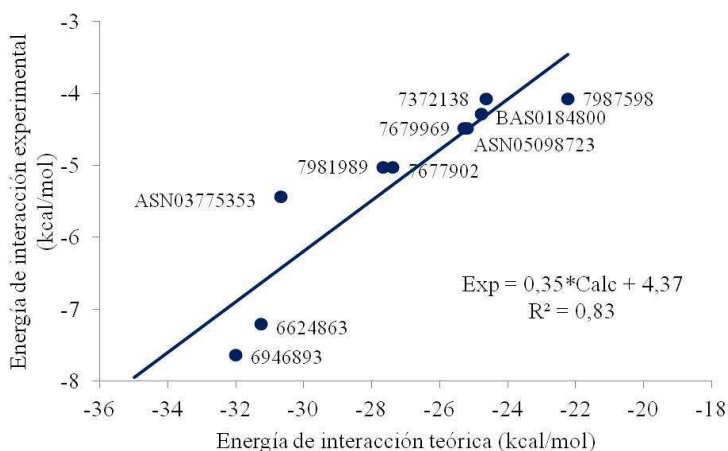


Figura 23. Comparación entre los datos de la energía de unión ligando-receptor calculada de manera teórica y la obtenida a partir de los datos experimentales de actividad. La energía de interacción experimental se calculó mediante la fórmula $\Delta G = RT \ln(IC_{50})$. La energía de interacción teórica se calculó utilizando software de Dinámica Molecular (Ver Materiales y Métodos). Se incluye la ecuación de la recta estimada por regresión lineal que relaciona el valor experimental (Exp) con el valor teórico calculado mediante software (Calc). También se incluye el coeficiente de correlación R^2 .

3.2. Segundo cribado virtual dando prioridad a aquellas moléculas que se ajustan a las Reglas de Lipinski.

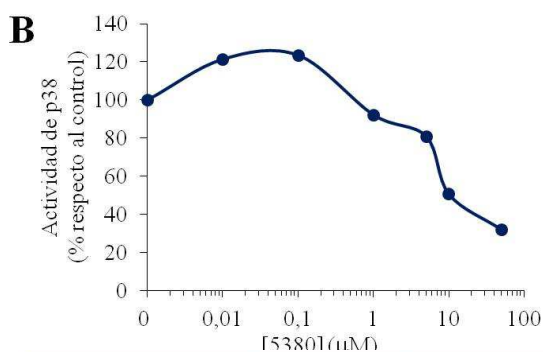
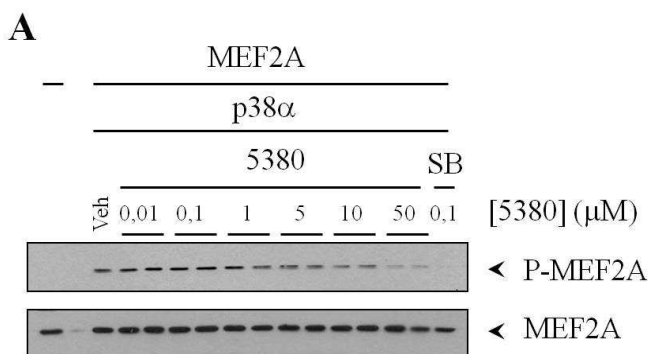
Con intención de encontrar más moléculas activas y que además posean características que favorezcan una adecuada farmacocinética se realizó un segundo cribado virtual en paralelo pero dando preferencia a aquellas que se ajustan a las Reglas de Lipinski (Lipinski et al. 2001), cuatro características que evalúan la capacidad farmacológica de un compuesto químico:

- No más de 5 donadores de puente de hidrógeno (suma de OH y NH).
- Peso molecular menor a 500 Da.
- Solubilidad, medida como logP, que debe ser menor que 5 (coeficiente de partición octanol/agua).
- No más de 10 aceptores de puentes de hidrógeno (suma de N y O).

Según estas reglas, si uno de los parámetros no se cumple, la probabilidad de que una molécula sea bioactiva es menor al 10%. Sólo algunos fármacos de los existentes incumplen alguna de las reglas y todos pertenecen a unos pocos grupos con características especiales: antibióticos, antifúngicos, vitaminas y glicósidos cardíacos (Lipinski et al. 2001).

Siguiendo estos criterios se seleccionaron 8 moléculas (con la mejor energía de interacción posible siempre que a la vez cumplieran las Reglas de Lipinski), y se cuantificó su actividad mediante experimentos *in vitro*, en este caso analizando la actividad de p38 α : se incubaron las proteínas purificadas p38 activa y MEF2A en presencia de las moléculas a diferentes concentraciones entre 0,01 y 200 μ M. De las moléculas analizadas sólo dos moléculas muy relacionadas estructuralmente tuvieron una actividad inhibitoria significativa: STOCK2S-05380 con una IC₅₀ de 10 μ M (Figura 24) y STOCK2S-11997 con una IC₅₀ de 20 μ M. Dos presentaron IC₅₀ en torno a

RESULTADOS



Molécula	Proveedor	IC50 (μM)
STOCK2S-05380	IBScreen	10
STOCK2S-11997	IBScreen	20
STOCK3X-03076	IBScreen	200
STOCK3S-94522	IBScreen	200
STOCK4S-22944	IBScreen	>500
STOCK1N-55509	IBScreen	>500
CGX-03245710	ComGenex	>500
CGX-03246279	ComGenex	>500

Figura 24. El compuesto STOCK2S-05380 (5380), seleccionado en el segundo cribado, inhibe la actividad de p38. p38 activa fue incubada con el sustrato MEF2A para evaluar la inhibición por el compuesto de la actividad quinasa. Los niveles de fosforilación y totales de MEF2A fueron analizados mediante Western blot y cuantificados. A) Western blot representativo de la inhibición de la actividad de p38 sobre MEF2A a diferentes concentraciones del compuesto. B) Curva de efecto del compuesto respecto al control con vehículo (100%) en función de su concentración.

Tabla 2. IC50 de las moléculas seleccionadas en el segundo cribado virtual ordenadas según su capacidad inhibitoria.

200μM y 4 moléculas no llegaron a presentar inhibición a las concentraciones testadas (Tabla 2).

3.3. Búsqueda de análogos más potentes por cribado virtual a partir de las estructuras de las siete moléculas con mayor capacidad inhibitoria.

Se realizó una tercera ronda de cribado virtual sobre un subconjunto de moléculas análogas a las siete mejores obtenidas en los cribados previos con el objetivo de conseguir moléculas con capacidad inhibitoria a concentraciones menores. Las moléculas que se utilizaron para la búsqueda fueron: 7981989, 6624863, 7677902, 6944893, ASN03775353, STOCK2S-05380 y STOCK3S-03076. Se analizaron todos los análogos en experimentos *in vitro* cuantificando la actividad de p38 como fosforilación de MEF2A de manera similar a los realizados con las anteriores moléculas. Se analizaron a concentraciones entre 0,1 y 100μM y sólo la molécula 6586700 (análogo de STOCK2S-05380) presentó una actividad inhibitoria con una IC50 de 8μM, que no mejoró significativamente la actividad de su precursor (Figura 25). El resto de análogos no fueron activos a las concentraciones ensayadas (Tabla 3).

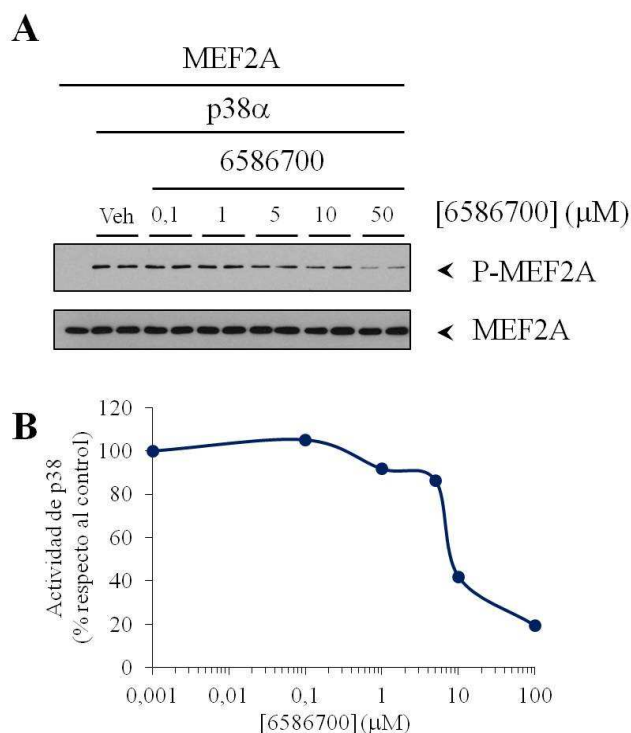


Figura 25. El compuesto 6586700 seleccionado por homología con STOCK2S-05380 inhibe la actividad de p38. p38 α activa fue incubada con el sustrato MEF2A para evaluar la inhibición por el compuesto de la actividad quinasa. Los niveles de fosforilación y totales de MEF2A fueron analizados mediante Western blot y cuantificados. A) Western blot representativo de la inhibición de la actividad de p38 sobre MEF2A a diferentes concentraciones del compuesto. B) Curva de efecto del compuesto respecto al control con vehículo (100%) en función de su concentración.

Molécula	Proveedor	Precursor	IC50 (μ M)
T5238943	Enamine	7981989	>100
7972409	ChemBridge	6624863	>100
6627826	ChemBridge	6624863	>100
F2038-0306	Life Chemicals	7677902	>100
9000459	ChemBridge	7677902	>100
T5320027	Enamine	6946893	>100
5705342	ChemBridge	6946893	>100
ASN04369018	Asinex	ASN03775353	>100
ASN04369941	Asinex	ASN03775353	>100
6586700	ChemBridge	STOCK2S-05380	8
AF-399/42487693	Specs	STOCK2S-05380	>100
7628716	ChemBridge	STOCK3X-03076	>100
BAS00085417	Asinex	STOCK3X-03076	>100

Tabla 3. Moléculas seleccionadas en el tercer cribado virtual. Se muestra la molécula precursora a partir de la cual se ha buscado cada análogo y su IC50.

3.4. Análisis de la actividad de las moléculas seleccionadas sobre la secreción de TNF α en monocitos THP-1.

Se decidió analizar si los compuestos más eficaces *in vitro* mostraban capacidad para la inhibición de la secreción de TNF α inducida por LPS en la línea THP-1 de monocitos humanos, un proceso dependiente de p38. Para realizar estos ensayos se incubaron células THP-1 con los compuestos seleccionados a concentraciones entre 0,1 y 1000 μ M y se estimularon con LPS. Posteriormente, se recogieron los sobrenadantes y se analizaron mediante ELISA para la detección de TNF α en el medio. Se analizaron los compuestos 6946893 (Figura 26A), 6624863, STOCK2S-05380 (Figura 26B), STOCK2S-11997 (Figura 26C) y 6586700 (Figura 26D) y se obtuvieron IC50 en células de 10, 12, 2, 3 y 2 μ M, respectivamente (Tabla 4). Estas moléculas presentan una IC50 similar *in vitro* y en células, lo que parece indicar que la inhibición de p38 que se aprecia *in vitro* se puede estar produciendo también en el interior celular.

3.5. Análisis por ioduro de propidio de la toxicidad de las moléculas.

Para demostrar que la reducción en la secreción de TNF α se debe a una disminución de la señalización a través de p38 y no a una reducción del número de células viables y para descartar posibles moléculas inadecuadas por su toxicidad, se realizaron en paralelo unos ensayos analizando por citometría la fluorescencia por ioduro de propidio en células THP-1, un indicador del proceso de muerte celular que permite que las células se vuelvan permeables a este compuesto y se muestren fluorescentes. De este modo la intensidad de la fluorescencia emitida es inversamente proporcional a la supervivencia celular (ver Materiales y Métodos). Según los resultados obtenidos, algunas de las moléculas con bajo IC₅₀(cel) resultaron ser más tóxicas y fueron eliminadas de futuros análisis, como 6586700 ó la STOCK2S-11997, ambos con una TD₅₀ (dosis tóxica media, calculada como la concentración a la que el efecto tóxico es del 50% respecto a todas las células contadas) de 8 μ M (Tabla 4). Por el contrario, la molécula STOCK2S-05380, con una IC₅₀ baja, presentó una toxicidad menor (TD₅₀= 35 μ M) y una razonablemente alta ratio TD₅₀/IC₅₀(cel), por lo que se decidió seleccionarla para futuros análisis, así como a la molécula 6946893, que aunque con una IC₅₀ superior al STOCK2S-05380 mostraba una TD₅₀ superior a 1mM, y por tanto una muy conveniente ratio TD₅₀/IC₅₀(cel).

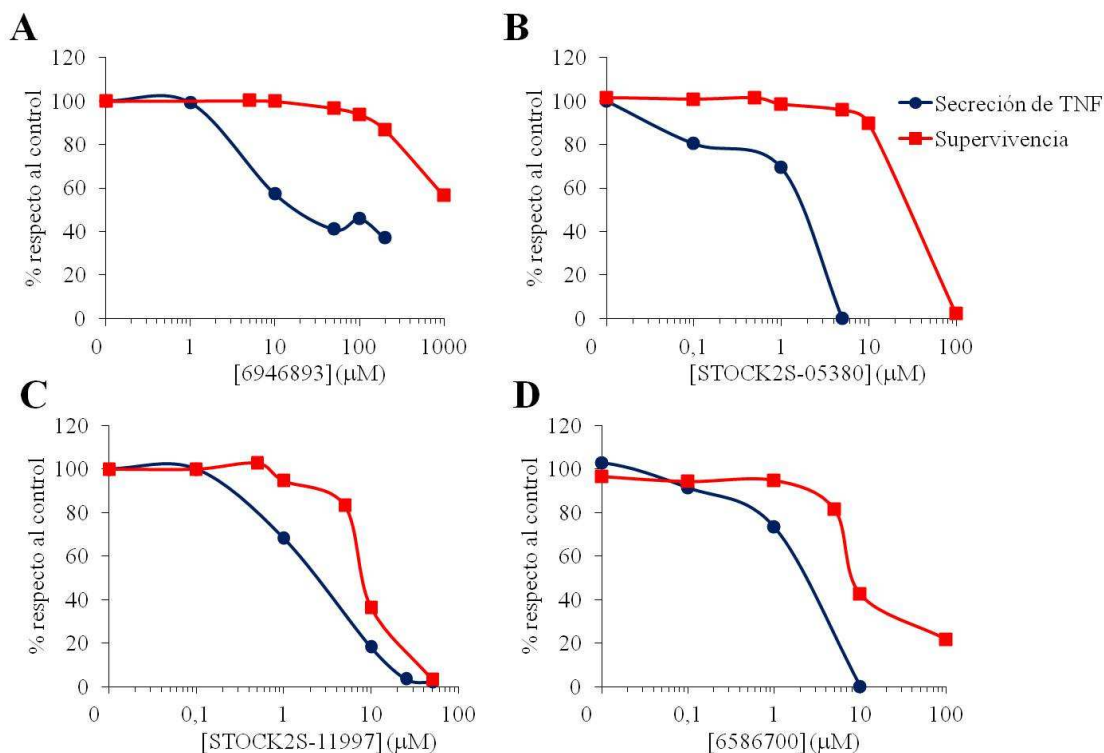


Figura 26. Inhibición de la secreción de TNF α por los compuestos más activos. A-D) Se estimularon células THP-1 con LPS durante 4h en presencia de los compuestos indicados. Se recogieron los sobrenadantes y se analizó la secreción de TNF α mediante ELISA (azul). Además, se evaluó la supervivencia de las células incubadas con el compuesto por incorporación de ioduro de propidio (IP) y análisis mediante citometría de flujo (rojo). Se representan los porcentajes de células marcadas con IP respecto al total de células analizadas o el porcentaje de TNF α secretado respecto al valor en ausencia de compuesto (vehículo) tomado como el 100%. Experimentos representativos de dos independientes.

Molécula	IC50(cel) (μM)	TD50(μM)	TD50/IC50(cel)
6946893	10	>1000	>100
6624863	12	>1000	>80
STOCK2S-05380	2	35	17,5
STOCK2S-11997	3	8	2,7
6586700	2	8	4

Tabla 4. Valores de IC50 de la inhibición de la secreción de TNF α por las moléculas seleccionadas y su toxicidad. Asimismo, se relaciona el cociente TD50/IC50(cel) que indica la posible ventana terapéutica de los compuestos. IC50 (cel), concentración de compuesto a la que el efecto inhibitorio es del 50%. TD50, dosis tóxica media, calculada como la concentración a la que el efecto tóxico es del 50% respecto al total de células medidas en el ensayo.

3.6. Análisis de nuevas moléculas obtenidas mediante síntesis dirigida: análogos del 6946893.

De acuerdo con los resultados en apartados anteriores, se seleccionaron las moléculas STOCK2S-05380 y 6946893 para la síntesis química de análogos.

A partir de la molécula 6946893, se sintetizaron 8 análogos de estructura similar con un bloque común de isatina (Figura 27). El primer análogo de la serie, FGA-8, fue la isatina sin ninguna modificación para comprobar si de por sí el núcleo químico común a esta serie era capaz de producir alguna inhibición sobre p38. Se analizó el efecto de las 8 moléculas sobre la actividad de p38 *in vitro*. Se encontró que las moléculas FGA-8, FGA-9 y FGA-10 tenían IC50 mayores que el compuesto 6946893. Las moléculas FGA-11, FGA-12, FGA-13, FGA-14 y FGA-15 mostraron IC50 iguales o mejores que la 6946893, con valores de 10, 40, 50, 50 y 10 μM , respectivamente (Tabla 5 y Figura 28). En los ensayos celulares sólo FGA-12 y FGA-15 presentaron valores de inhibición de interés con IC50(cel) de 50 y 60 μM , respectivamente, aunque fueron mayores que la molécula de partida (Figura 29). FGA-12 y FGA-15 no presentaron una toxicidad significativa registrando un 8 y 26% de muerte celular, respectivamente, a 100 μM .

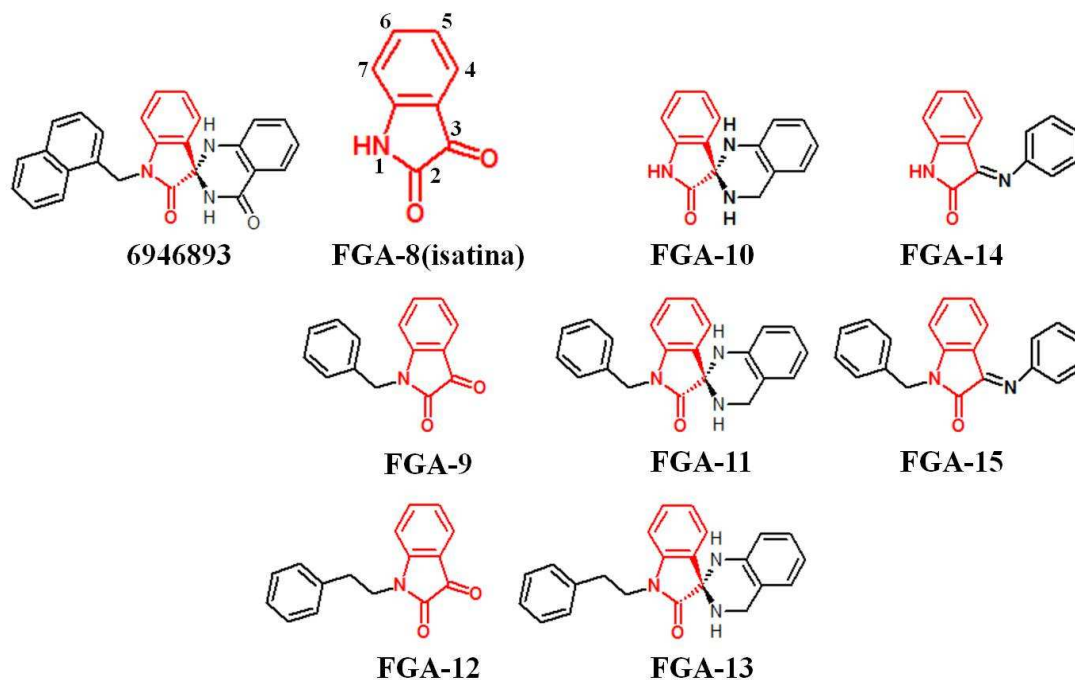


Figura 27. Análogos para la mejora química del compuesto 6946893. Se ha resaltado en rojo el núcleo central de isatina en todas las moléculas. Se incluye la numeración en la estructura del FGA-8.

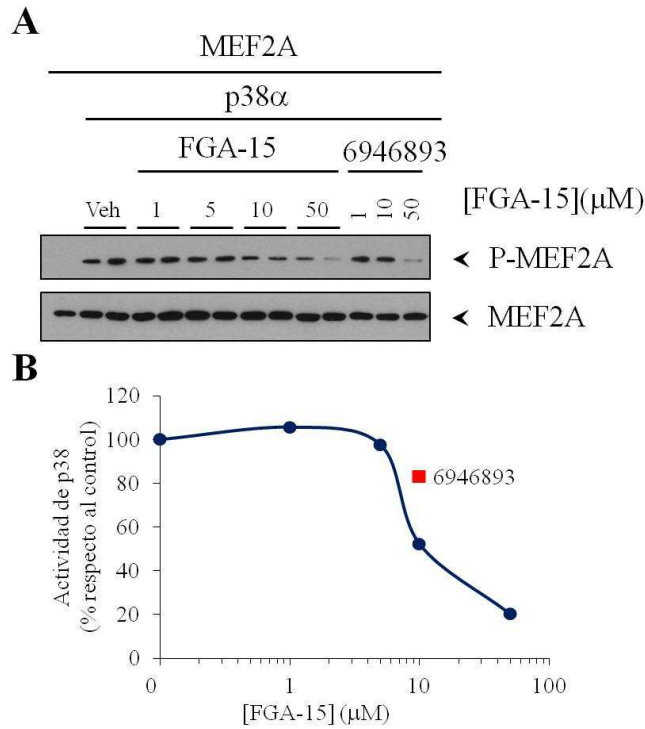


Figura 29. El compuesto FGA-15 es más activo in vitro que su precursor 6946893. p38 activa fue incubada con el sustrato MEF2A para evaluar la inhibición por el compuesto de la actividad quinasa. Los niveles de MEF2A fosforilado y totales fueron analizados mediante Western blot y cuantificados. A) Western blot representativo de la inhibición de la actividad de p38 a diferentes concentraciones del compuesto y del precursor 6946893 como comparación. B) Curva de efecto del compuesto en función de su concentración respecto al control sin compuesto (vehículo) tomado como el 100%. Se ha incluido un punto para el 6946893 como comparación (cuadrado rojo). Experimento representativo de dos independientes.

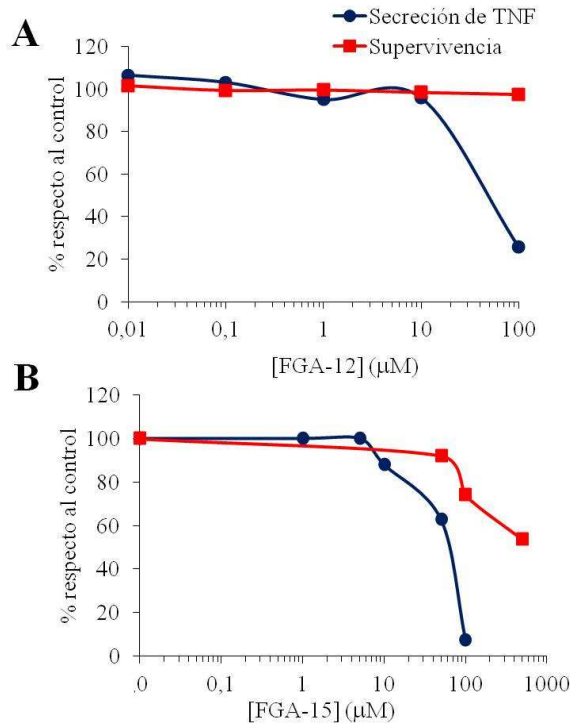


Figura 28. A pesar de ser mejores inhibidores in vitro que su precursor, los compuestos FGA-12 y FGA-15 son menos potentes en la inhibición de la secreción de TNFα. Se estimularon células THP-1 con LPS durante 4h en presencia de los compuestos. Se recogieron los sobrenadantes y se analizó la secreción de TNFα (azul). Igualmente, se evaluó la supervivencia de las células incubadas con los compuestos mediante la incorporación de yoduro de propidio (IP) y análisis mediante citometría de flujo (rojo). Se representan los porcentajes de células marcadas con IP respecto al total de células analizadas o el porcentaje de TNFα secretado respecto al valor en ausencia de compuesto (vehículo) tomado como el 100%. Experimentos representativos de dos independientes.

Molécula	IC50(μ M)	IC50(cel) (μ M)	TD50(μ M)	TD50/IC50(cel)
6946893(precursor)	50	10	>1000	>100
FGA-8 (isatina)	>50	>100		
FGA-9	>50	>100		
FGA-10	>50	>100		
FGA-11	10	>100		
FGA-12	40	50	>100	>2
FGA-13	50	>100		
FGA-14	50	>100		
FGA-15	10	60	500	>8

Tabla 5. Resultados *in vitro* y en células de los compuestos derivados del proceso de mejora química del compuesto 6946893. IC50, concentración de compuesto a la que el efecto inhibitorio es del 50% de la inhibición máxima obtenida para ese compuesto *in vitro* con proteínas recombinantes. IC50(cel), concentración de compuesto a la que el efecto inhibitorio es del 50% de la inhibición máxima obtenida para ese compuesto en ensayos celulares de secreción de TNF α . TD50, dosis tóxica media, calculada como la concentración a la que el efecto tóxico es del 50% respecto al total de células medidas en el ensayo.

3.7. Efectos de la molécula FGA-15 sobre los niveles de activación y actividad de p38.

En paralelo a los experimentos de secreción de TNF α , se decidió analizar los niveles de fosforilación de p38 y sus sustratos más directos HSP27 y MK2 en células THP-1 estimuladas con LPS mediante Western blot en presencia del compuesto FGA-15. Este análisis serviría para confirmar si el efecto inhibitorio observado en la secreción de TNF α correlacionaba con una inhibición directa por las moléculas de la activación y actividad de p38. Otro objetivo era analizar si la pérdida de inhibición en los ensayos celulares respecto a los *in vitro* era debida a que existía una menor eficacia del compuesto en células. 15 minutos tras la adición de LPS ya se puede observar un incremento en los niveles de fosforilación de p38, que van aumentando hasta los 60 minutos. Se analizaron muestras de células THP-1 a diferentes tiempos en presencia del compuesto FGA-15 a 10 y 25 μ M, concentraciones que estaban por debajo de la IC50 observada en la inhibición de la secreción de TNF α , pero por encima de la IC50 obtenida *in vitro*. Como se observa en la Figura 30, a la concentración de 10 μ M no se produce prácticamente ningún efecto inhibitorio. Por el contrario, a algunos tiempos concretos se produce una cierta activación de la cascada de p38. Sin embargo, a 25 μ M se observa una reducción respecto al control en los niveles de P-p38 (22% de reducción), P-HSP27 (21%) y P-MK2 (14%) (Figura 30), lo que es coherente con los resultados obtenidos a la misma concentración sobre la inhibición de la secreción de TNF α . La diferencia de inhibición entre los resultados celulares y los obtenidos *in vitro* podría deberse a una pérdida de eficacia del compuesto en células por degradación, falta de permeabilidad o mala solubilidad en el medio de cultivo.

Analizando los resultados del conjunto de estos experimentos podemos concluir que el núcleo de isatina por sí solo no es suficiente para producir la inhibición de p38 *in vitro*. En cuanto a la posición 1 de la isatina, la presencia de un grupo hidrofóbico, como un fenilo, a una distancia de como máximo dos enlaces del núcleo de isatina parece necesaria para la inhibición. En cuanto a la posición 3, también parece preferible un fenilo separado de la isatina por no más de dos enlaces. De las dos combinaciones analizadas parece preferible que el fenilo se encuentre libre en lugar de unido al núcleo por un segundo anillo ya que la FGA-14 funciona mejor que la FGA-10 y la FGA-15

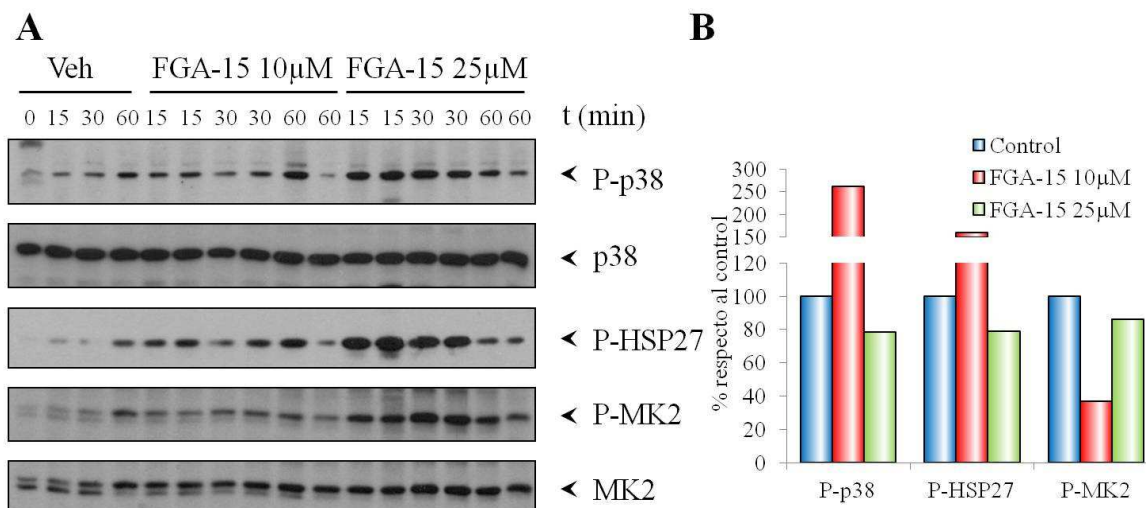


Figura 30. Efecto bifásico de FGA-15 sobre la vía de señalización de p38. A) Lisados de células THP-1 estimuladas con LPS durante 15, 30 y 60 min en presencia de diferentes concentraciones de FGA-15 fueron analizados mediante Western blot para evaluar el grado de estimulación de p38 (P-p38) y su actividad sobre los sustratos HSP27 y MK2 (P-HSP27 y P-MK2). B) En el gráfico se representan los niveles de fosforilación a los 60 min de p38, HSP27 y MK2. Para la normalización de los datos se cuantificaron los niveles totales de p38 y MK2 (HSP27 fue normalizado respecto a p38), y se representan respecto al control sin compuesto (vehículo) tomado como el 100%. Experimento representativo de dos independientes.

mejor que la FGA-11. Aún así, estas moléculas funcionaron peor que la original en experimentos celulares, es posible que por ser menos solubles o menos permeables a la membrana plasmática ya que *in vitro* sí fueron inhibidores más eficaces. Con estos resultados podemos concluir que ninguno de los análogos sintetizados fue más potente que la molécula 6946893.

3.8. Análisis de nuevas moléculas obtenidas mediante síntesis dirigida: análogos del STOCK2S-05380.

De la molécula 5380 se sintetizaron 8 análogos con una estructura muy similar manteniendo en todas un bloque común de Cl-NBD (Cloro-NitroBenzoxoDiazol) (Figura 31). El primer análogo de la serie, FGA-5, es el propio Cl-NBD para comprobar si este bloque común es capaz de producir alguna inhibición sobre p38. Se analizó la capacidad inhibitoria de los 8 análogos sobre la actividad de p38 *in vitro*: las moléculas FGA-6, FGA-16, FGA-18 y FGA-20 se descartaron para futuros ensayos por tener una IC₅₀ *in vitro* mayor que la molécula de partida. Se seleccionaron las moléculas FGA-5, FGA-7, FGA-17 y FGA-19 para los experimentos celulares por ser más activas que la original 5380 (IC₅₀=10 μ M) con valores de IC₅₀ de 0,1, 8, 5 y 6,3 μ M, respectivamente (Tabla 6). Posteriormente, se analizó la capacidad inhibitoria de estos análogos sobre la secreción de TNF α en monocitos. Se descartó el FGA-7 por tener una IC₅₀(cel) de 45 μ M muy superior a la del precursor STOCK2S-05380. Tres moléculas registraron IC₅₀(cel) similares o mejores al STOCK2S-05380: FGA-5, FGA-17 y FGA-19 con valores de 0,8, 3 y 1,8 μ M, respectivamente (Tabla 6).

Según estos resultados, el núcleo central de Cl-NBD representado por el FGA-5 es 100 veces más potente *in vitro* que el precursor 5380 (Figura 32A y C), pero dado que es un compuesto mucho más pequeño, es probable que se esté uniendo a p38 por varios sitios (de forma específica o inespecífica) y la acción conjunta de varias moléculas de compuesto sobre p38 podría lograr una inhibición mayor. El análogo FGA-16 fue

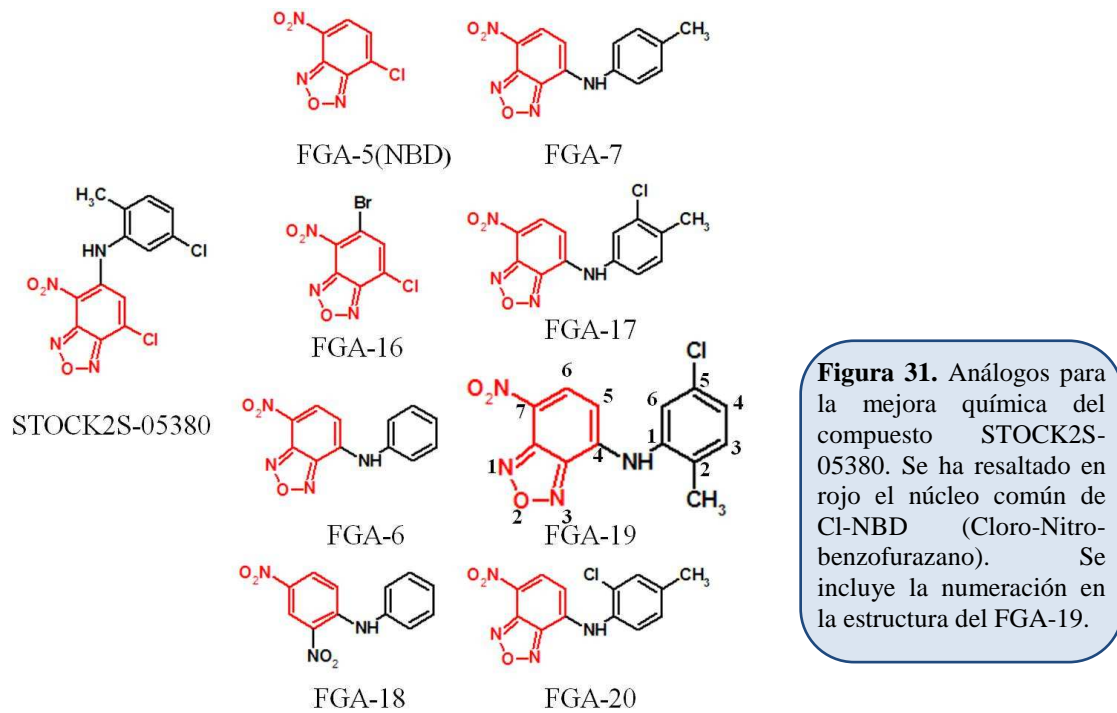


Figura 31. Análogos para la mejora química del compuesto STOCK2S-05380. Se ha resaltado en rojo el núcleo común de Cl-NBD (Cloro-Nitrobenzofurazano). Se incluye la numeración en la estructura del FGA-19.

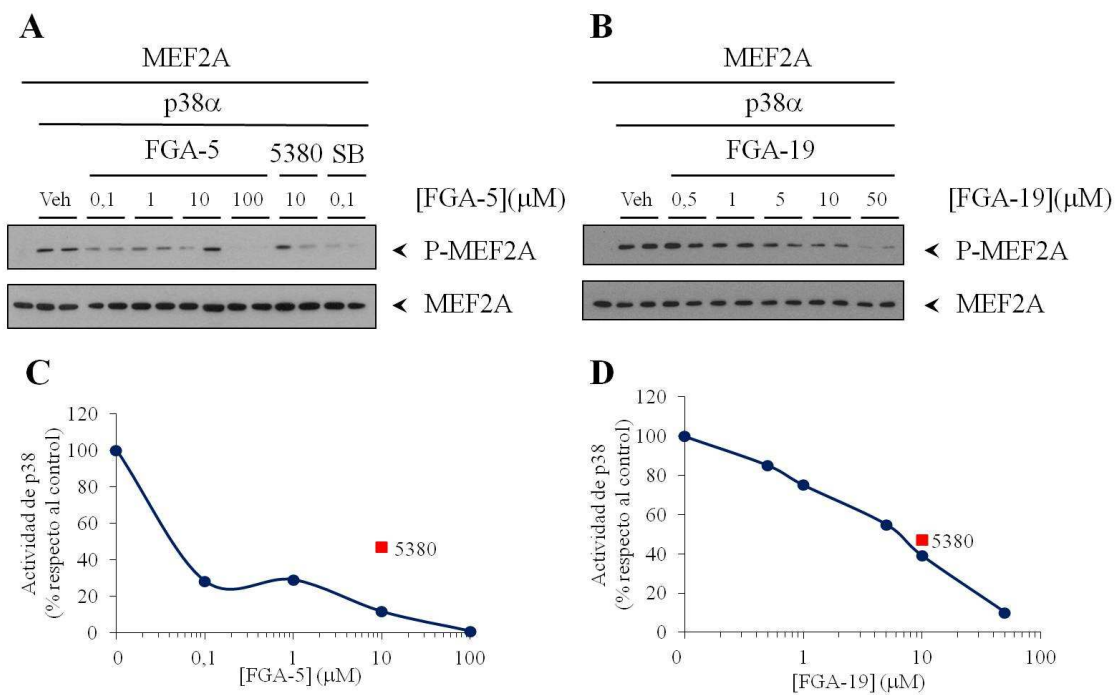


Figura 32. Los compuestos FGA-5 y FGA-19 son más activos *in vitro* que su precursor STOCK2S-05380. p38 activa fue incubada con el sustrato MEF2A para evaluar el efecto de los compuestos sobre la actividad quinasa. Los niveles de fosforilación y totales de MEF2A fueron analizados mediante Western blot y cuantificados. A y B) Western blot representativos de la inhibición de la actividad de p38α a diferentes concentraciones de cada compuesto y del precursor STOCK2S-05380 (5380) y del inhibidor específico de p38 SB203580 (SB) como comparación. C y D) Curva de efecto de cada compuesto en función de su concentración respecto al control sin compuesto (vehículo) tomado como el 100%. Se ha incluido un punto para el STOCK2S-05380 como comparación (cuadrado rojo). Experimentos representativos de dos independientes.

RESULTADOS

Molécula	IC50(μ M)	IC50(ce)l (μ M)	TD50(μ M)	TD50/IC50(ce)l
STOCK2S-05380(precursor)	10	2	35	17,5
FGA-5 (Cl-NBD)	0,1	0,8	30	37,5
FGA-6	50			
FGA-7	8	45		
FGA-16	>50			
FGA-17	5	3	55	18,3
FGA-18	>50			
FGA-19	6,3	1,8	200	111
FGA-20	>50			

Tabla 6. Resultados *in vitro* y en células de los derivados del proceso de mejora química del compuesto STOCK2S-05380. IC50, concentración de compuesto a la que el efecto inhibitorio es del 50% del máximo obtenido para ese compuesto *in vitro* con proteínas recombinantes. IC50 (ce)l, concentración de compuesto a la que el efecto inhibitorio es del 50% del máximo obtenido para ese compuesto en ensayos celulares de secreción de TNF α . TD50, dosis tóxica media, calculada como la concentración a la que el efecto tóxico es del 50% respecto al total de células medidas en el ensayo.

sintetizado a partir de Cl-NBD añadiendo un átomo de bromo en la posición 6, pero esto provocó la pérdida total de inhibición. El resto de análogos se sintetizó modificando el núcleo de Cl-NBD por la posición 4 por ser más sencilla la síntesis de análogos, y por ser equivalente en el modelo virtual. Según los resultados, los análogos que conservaban un átomo de cloro y un grupo metilo en el fenilo fueron los que mayor inhibición de la actividad de p38 produjeron (Figura 32B y D) siendo la posición 2 del metilo y 5 del cloro, presentes en FGA-19, las posiciones más favorables para la inhibición.

En línea con lo que observamos *in vitro*, FGA-5 muestra una capacidad de inhibición de la secreción de TNF α mayor que el precursor STOCK2S-05380 (Figura 33A), aunque no cabe descartar, por sus características estructurales, como un menor tamaño, que exista una mayor probabilidad de acciones inespecíficas sobre p38 u otras proteínas celulares. Paralelamente a los resultados obtenidos *in vitro*, FGA-17 y FGA-19 también

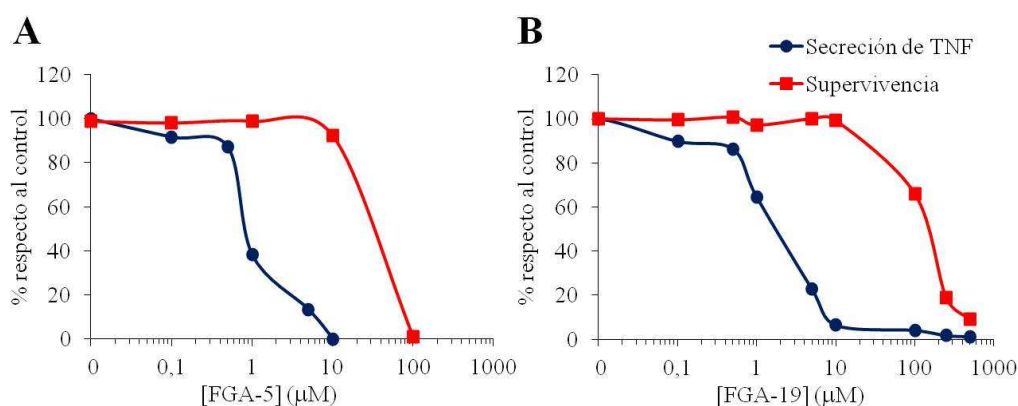


Figura 33. Los compuestos FGA-5 y FGA-19 tienen un mayor efecto en la inhibición de la secreción de TNF α que su precursor, pero sólo FGA-19 mostró un menor perfil tóxico. Se estimularon células THP-1 con LPS durante 4h en presencia del compuesto. Se recogieron los sobrenadantes y se analizó la secreción de TNF α (azul). Igualmente, se evaluó la supervivencia de las células incubadas con los compuestos mediante la incorporación de yoduro de propidio (IP) y análisis mediante citometría de flujo (rojo). Se representan los porcentajes de células marcadas con IP respecto al total de células analizadas o el porcentaje de TNF α secretado respecto al valor en ausencia de compuesto (vehículo) tomado como el 100%. Experimentos representativos de dos independientes.

fueron más eficaces que el compuesto STOCK2S-05380 en las células THP-1, siendo FGA-19, con el metilo y el cloro en posiciones 2 y 5, respectivamente, la más activa en este sistema (Figura 33B). Cabe destacar que el cambio de posición del fenilo de la posición 6 a la 4 mejoró 6,3 veces el ratio TD50/IC50(cel) lo que apuntaría a que esta modificación puede aportar un rango de eficacia en ausencia de efectos tóxicos más amplio. Por otra parte, es significativo que el cambio de posición del grupo metilo o del cloro es suficiente para provocar la pérdida de inhibición, como en el caso del FGA-20 (Tabla 6).

Para confirmar este extremo, se sintetizaron nuevos compuestos en base al FGA-19 (Figura 34), que o bien mantenían los sustituyentes en posición 2 y 5 cambiando el metilo por un grupo OH (FGA-29) o situaban en el anillo sustituyentes metilo e hidroxilo en posiciones 2 y 4 (FGA-23). En experimentos en células THP-1 el compuesto FGA-29 mostró un perfil de acción similar al de FGA-19, mientras que el FGA-23 mostraba mucha menor actividad. Todo ello indica que la presencia de sustituyentes en posiciones 2 y 5 es relevante para el efecto deseado.

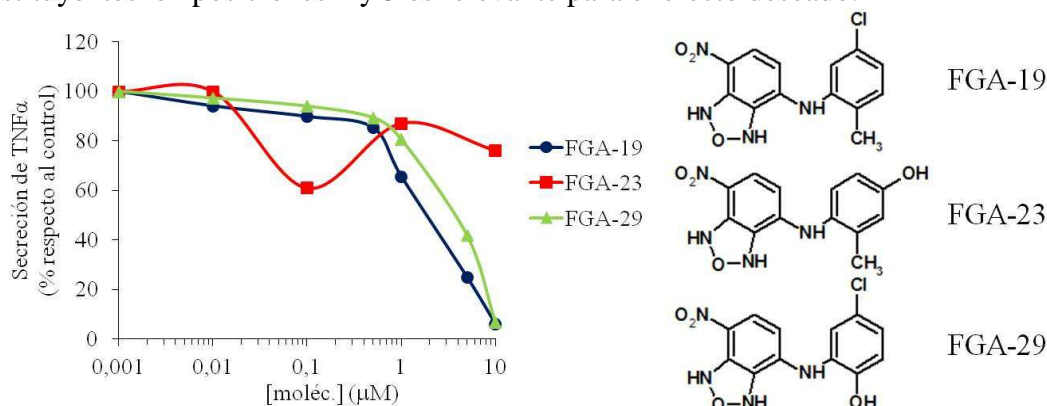


Figura 34. La presencia de sustituyentes en posiciones 2 y 5 son determinantes para el efecto inhibitorio. Se estimularon células THP-1 con LPS durante 4h en presencia de los compuestos indicados. Se recogieron los sobrenadantes y se analizó la secreción de TNF α . En la gráfica se muestra la cuantificación del efecto de los compuestos relativo al 100% (vehículo). Experimento representativo de dos independientes.

4. CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS DE LAS MOLÉCULAS SELECCIONADAS SOBRE LA CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DE P38.

4.1. Efecto de la molécula STOCK2S-05380 sobre la cascada de señalización de p38.

Con el fin de determinar si la inhibición en la secreción de TNF α por la molécula STOCK2S-05380 correlaciona con la inhibición de p38, se decidió cuantificar por Western Blot la cantidad de p38 fosforilada y la actividad sobre sus sustratos. Se observó que a los 30 y 60 minutos de añadir el estímulo, en presencia de STOCK2S-05380 a 1 μ M se reduce la activación de p38 en un 70%, y también se observa menor fosforilación de sustratos de p38, lo que sería coherente con el perfil de la inhibición observada en la secreción de TNF α (Figura 35). Sin embargo, al aumentar la concentración de la molécula a 5 μ M se pierde en buena parte el efecto inhibitorio, lo que podría ser debido a un posible efecto tóxico, ya que p38 está implicada en la respuesta a estrés genotóxico y podría estar activándose por nuestros compuestos por rutas alternativas. En línea con esta idea, el compuesto a 5 μ M estimula la vía de JNK (Fig.35). En los ensayos de toxicidad se observó que esta molécula dispara una respuesta tóxica con una TD50 de 35 μ M, una dosis cercana a la IC50(cel).

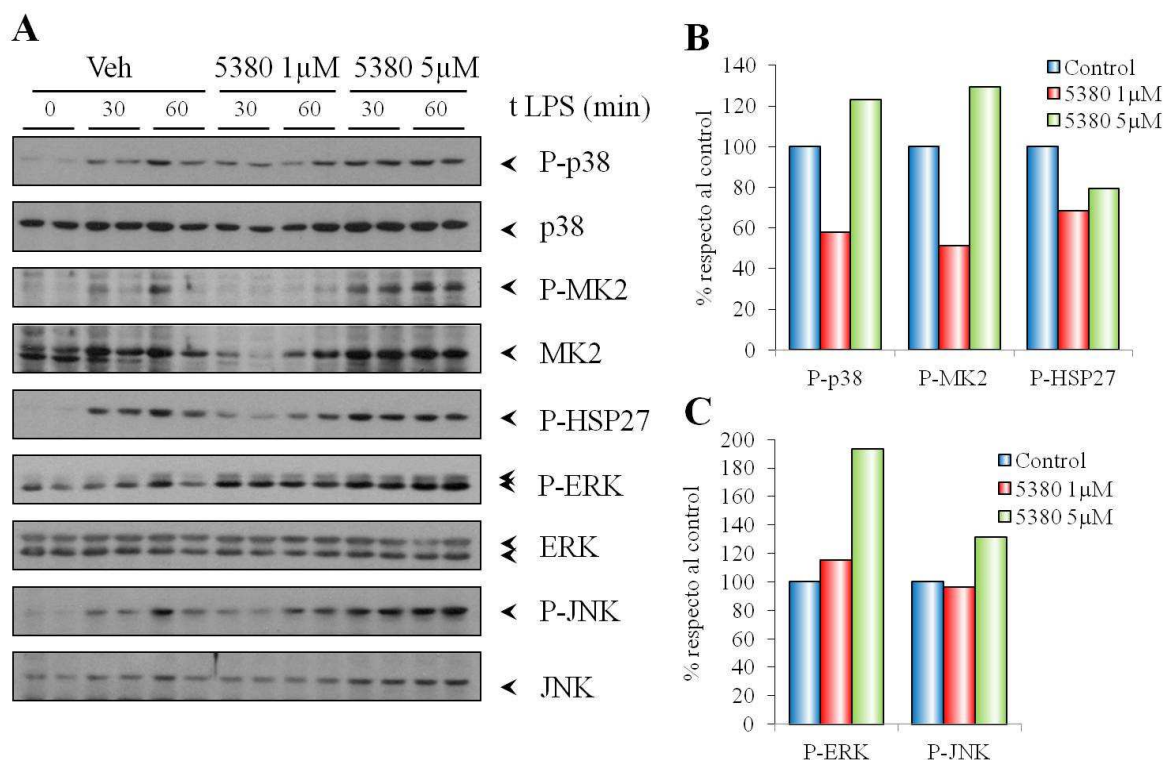


Figura 35. Efecto del compuesto STOCK2S-05380 (5380) en la activación de la ruta de p38 en THP-1. A) Lisados de células THP-1 estimuladas con LPS durante 30 y 60 min en presencia de diferentes concentraciones de STOCK2S-05380 fueron analizados mediante Western blot para evaluar el estado de fosforilación de p38 (P-p38) y su actividad sobre los sustratos HSP27 y MK2 (P-HSP27 y P-MK2). También se analizó la activación de las MAPK relacionadas ERK y JNK (P-ERK y P-JNK) para evaluar la especificidad del compuesto. Para la normalización de los datos se cuantificaron los niveles totales de p38, MK2, ERK y JNK. Las dos bandas observadas en ERK corresponden a ERK1 y ERK2 que responden del mismo modo al tratamiento. B y C) En los gráficos se representan los niveles de fosforilación a los 60 min de p38, MK2, HSP27, ERK y JNK normalizados respecto a las proteínas totales (HSP27 fue normalizado respecto a p38) y representados respecto al control sin compuesto (vehículo) tomado como el 100%. Experimento representativo de dos independientes.

4.2. Efecto de la molécula STOCK2S-05380 sobre el perfil de secreción de citoquinas: inhibición de la secreción de citoquinas dependientes de la activación de p38.

Para explorar si la molécula STOCK2S-05380 puede afectar a otros procesos dependientes o independientes de p38 o a otras cascadas de señalización, se decidió analizar un perfil de 23 citoquinas dependientes de distintas rutas de señalización. Se seleccionó un *array* de citoquinas que incluye interleuquinas como IL-1 α e IL-6 que son dependientes de p38 y otras como Rantes o Gro que son independientes. El perfil se realizó sobre el sobrenadante de cultivos de células THP-1 estimuladas por LPS en presencia de un inhibidor comparador de p38 como SB205380 y la molécula STOCK2S-05380 a concentraciones subóptimas próximas a su IC₅₀(cel) para este tipo de experimento. Se observó que al estimular con LPS se provoca la secreción de 13 de las 23 citoquinas en diferentes cantidades (Figura 36). De éstas, tanto el SB205380 como la STOCK2S-05380 inhiben la secreción de algunas citoquinas relacionadas con la cascada de p38 como IL-6, IL-1 α , IL-15, IL-3 y TNF α (Tabla 7). Otras citoquinas

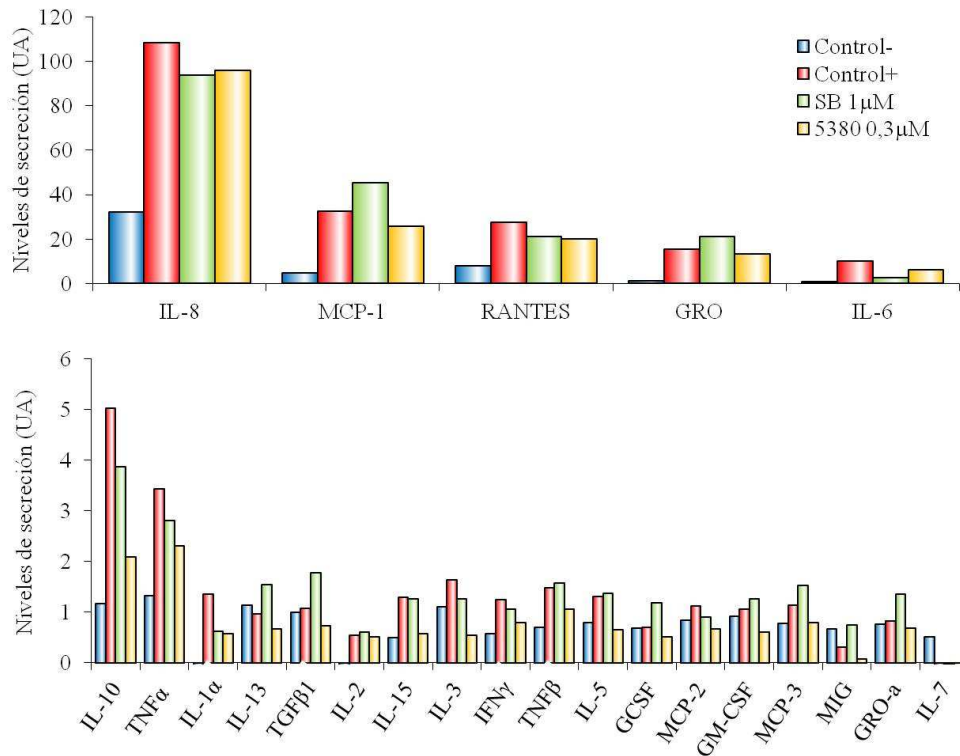


Figura 36. El compuesto STOCK2S-05380 inhibe selectivamente la secreción de citoquinas dependientes de la ruta de p38. Se estimularon células THP-1 con LPS durante 4h en presencia del compuesto STOCK2S-05380 (5380) tras lo que se recogieron los sobrenadantes y se analizaron mediante un panel de secreción de 23 citoquinas. Por claridad se han dividido los resultados en citoquinas más y menos secretadas (panel superior e inferior, respectivamente). Se ha incluido como comparación el efecto del inhibidor específico de p38, SB203580 (SB) a 1µM. Control +, células tratadas con LPS y vehículo; Control -, células tratadas con vehículo.

CITOQUINA	Nivel de secreción	Inhibición por SB	Inhibición por 5380
IL-8	Alto	19%	17%
MCP-1	Alto	-46%	25%
RANTES	Alto	34%	38%
GRO	Alto	-42%	14%
IL-6	Alto	83%	41%
IL-10	Medio	30%	76%
TNFα	Medio	29%	53%
IL-1α	Bajo	46%	49%
IL-15	Bajo	3%	91%
IL-3	Bajo	68%	204%
IFNγ	Bajo	27%	67%
TNFβ	Bajo	-11%	54%
IL-5	Bajo	-10%	125%
IL-2	Bajo	-5%	2%
GCSF	No		
MCP-2	No		
GM-CSF	No		
MCP-3	No		
MIG	No		
GRO-a	No		
IL-13	No		
TGFβ1	No		
IL-7	No		

Tabla 7. Resumen de resultados del efecto de la molécula STOCK2S-05380 (5380) sobre la secreción de citoquinas: comparativa con SB203580 (SB). Se muestra el porcentaje de inhibición de la secreción de cada citoquina en presencia de SB o del compuesto 5380 relativo al control sin inhibidor (células THP-1 tratadas con LPS y vehículo). Se han resaltado en verde los valores de inhibición de más de un 50%, en amarillo entre un 25 y un 50%, y en rojo los de menos de un 25%. Se indican con un signo negativo aquellos valores en los que se produjo un aumento en la secreción.

RESULTADOS

secretadas no dependientes de p38 no son inhibidas por SB203580 ó STOCK2S-05380, como la IL-8, MCP-1, Rantes o Gro. Aunque los resultados son similares, el perfil de inhibición de los dos compuestos no es idéntico. Estos resultados ayudan a corroborar la hipótesis de que la molécula STOCK2S-05380 está inhibiendo los efectos celulares de p38 con una razonable especificidad, similar a la de inhibidores comerciales. El resto de citoquinas no son estimuladas por LPS y la presencia de los inhibidores tampoco altera en gran medida su secreción salvo casos muy particulares.

4.3. Efecto de la molécula FGA-5 sobre la cascada de señalización de p38.

Se realizaron ensayos por Western blot similares a los de la molécula STOCK2S-05380, observándose resultados parecidos. Se produce cierta inhibición de la fosforilación de p38 a 1 μ M, pero a 5 μ M se observa una activación de p38 (Figura 37). El mismo perfil se observa para la fosforilación de los sustratos MK2 y HSP27: se registra cierta inhibición a 1 μ M pero a 5 μ M se detecta una activación que para MK2 llega a ser casi 9 veces mayor que la activación por LPS. Como con el compuesto anterior, estos resultados podrían indicar la activación de una respuesta genotóxica iniciada por p38 incluso a concentraciones bajas (recordemos que la TD50 es de 30 μ M) lo que, de confirmarse, indicarían que este compuesto no sería conveniente para su uso *in vivo* como inhibidor de p38.

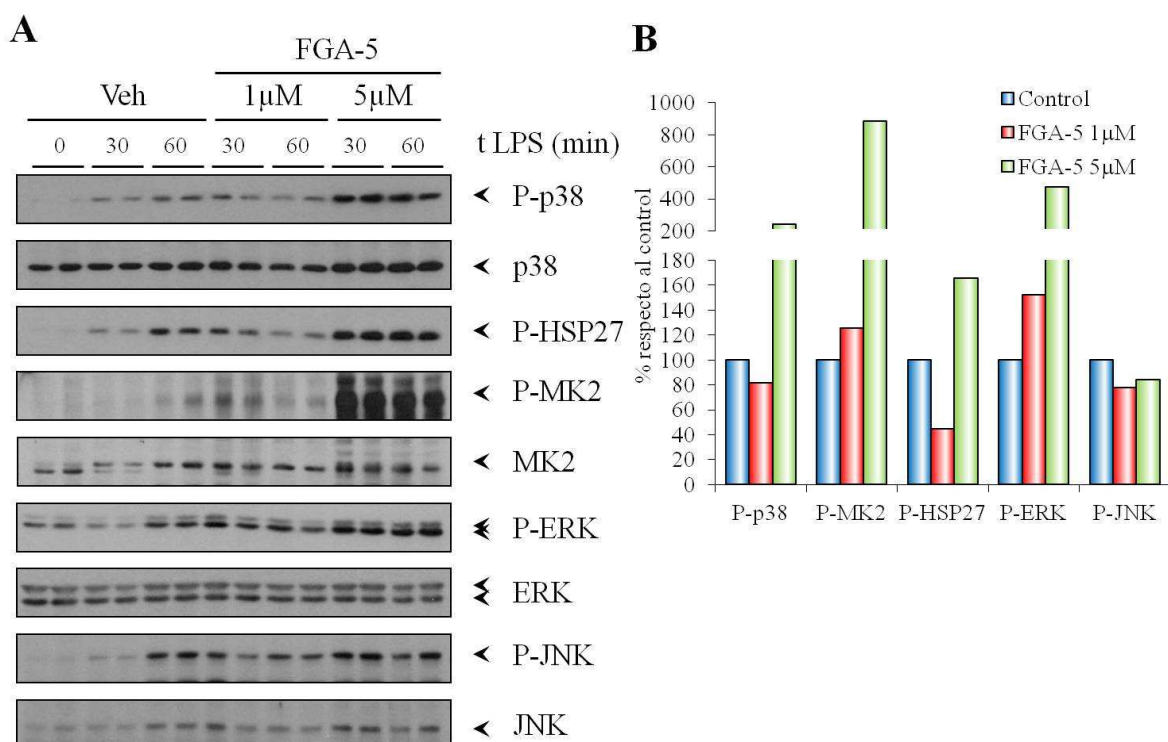


Figura 37. Efecto del compuesto FGA-5 sobre la ruta de p38 en THP-1. A) Lisados de células THP-1 estimuladas con LPS durante 30 y 60 min en presencia de diferentes concentraciones de FGA-5 fueron analizados mediante Western blot para evaluar su efecto sobre la activación de p38 (P-p38) y su actividad sobre los sustratos HSP27 y MK2 (P-HSP27 y P-MK2). También se analizó la activación de las MAPK relacionadas ERK y JNK (P-ERK y P-JNK) para evaluar la especificidad del compuesto. Para la normalización de los datos se cuantificaron los niveles totales de p38, MK2, ERK y JNK. Las dos bandas observadas en ERK corresponden a ERK1 y ERK2 que responden del mismo modo al tratamiento. B) En el gráfico se representan los niveles de fosforilación a los 60 min de p38, MK2, HSP27, ERK y JNK normalizados respecto a las proteínas totales (HSP27 fue normalizado respecto a p38) y representados respecto al control sin compuesto (vehículo) tomado como el 100%. Experimento representativo de dos independientes.

4.4. Efecto de la molécula FGA-17 sobre la cascada de señalización de p38.

En el caso de la molécula FGA-17 se observó una inhibición dosis dependiente de la fosforilación de p38 con inhibiciones del 25 y 77% a 1 y 5 μM , respectivamente medido a los 60 minutos desde el inicio de la estimulación (Figura 38). Asimismo, se registraron inhibiciones similares en la fosforilación de sus sustratos MK2 y HSP27. A los tres tiempos a los que se midió la activación y actividad de p38 la inhibición registrada fue muy similar. Para esta molécula no se observó una activación de la cascada de p38 al aumentar la concentración. Una posible explicación es que la mayor TD50 de esta molécula (55 μM) y la mayor diferencia con su IC50 evitan el desencadenamiento de la respuesta a estrés genotóxico a esas concentraciones. La potencia de la inhibición de la secreción de TNF α (IC50(cel)=3 μM) es muy similar a la calculada para la activación y actividad de p38 observada en estos experimentos, lo que sugiere que existe una correlación entre los efectos de este compuesto en la activación y actividad *in vitro* de p38 y en la secreción de TNF α .

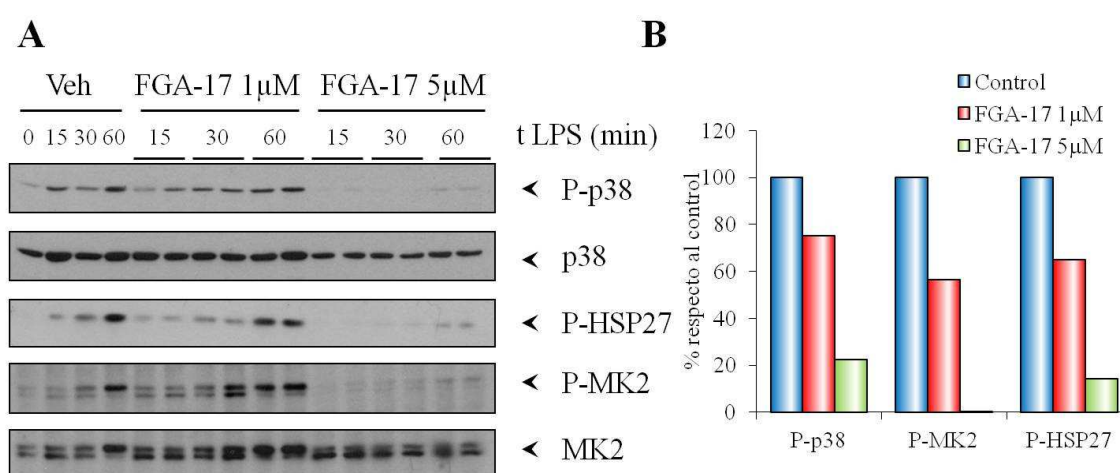


Figura 38. Caracterización del efecto del compuesto FGA-17 sobre la ruta de p38 en THP-1. A) Lisados de células THP-1 estimuladas con LPS durante 15, 30 y 60 min en presencia de diferentes concentraciones de FGA-17 fueron analizados mediante Western blot para evaluar la inhibición de la activación de p38 (P-p38) y su actividad sobre los sustratos HSP27 y MK2 (P-HSP27 y P-MK2). Para la normalización de los datos se cuantificaron los niveles totales de p38 y MK2. En la banda de MK2 se observa una segunda banda con menor migración que sería probablemente la forma fosforilada de MK2 ya que su aparición es paralela a la activación de MK2. B) En el gráfico se representan los niveles de fosforilación a los 60 min de p38, MK2 y HSP27 normalizados respecto a sus totales (HSP27 fue normalizado respecto a p38) y representados respecto al control sin compuesto (vehículo) tomado como el 100%. Experimento representativo de dos independientes.

4.5. Efecto de la molécula FGA-19 sobre la cascada de señalización de p38.

En los experimentos realizados para la molécula FGA-19 se observaron resultados muy similares a los obtenidos con la FGA-17, aunque de mayor potencia. Esto puede indicar que la pequeña diferencia en la estructura entre las dos moléculas no afecta significativamente al modo de interacción con p38 pero sí aumenta su eficacia. Se registró también una dependencia de la dosis con inhibiciones de p38 del 32% y 78% a 1 y 5 μM , respectivamente (Figura 39), algo mayores a las obtenidas con la FGA-17, sobre todo en el caso del sustrato MK2 cuya fosforilación a 1 μM era inhibida en un 43% con FGA-17 y un 81% con FGA-19. Las inhibiciones registradas en los sustratos también se correlacionan con la inhibición de p38. Igual que sucede con FGA-17, la inhibición de la activación y actividad de p38 se correlaciona con la inhibición de la secreción de TNF α (IC50(cel)=1,8 μM). No se observa una activación de la cascada de

RESULTADOS

p38 al aumentar la dosis, teniendo una TD50 de 200 μ M. En ese contexto, el efecto del compuesto FGA-19 no es de activación, si no de cierta inhibición de la quinasa JNK1, a la mayor concentración testada. Teniendo una relación TD50/IC50(cel) de 111 veces, la ventana terapéutica en células de este compuesto es la más alta de entre los analizados, por lo que se seleccionó para los ensayos en animales.

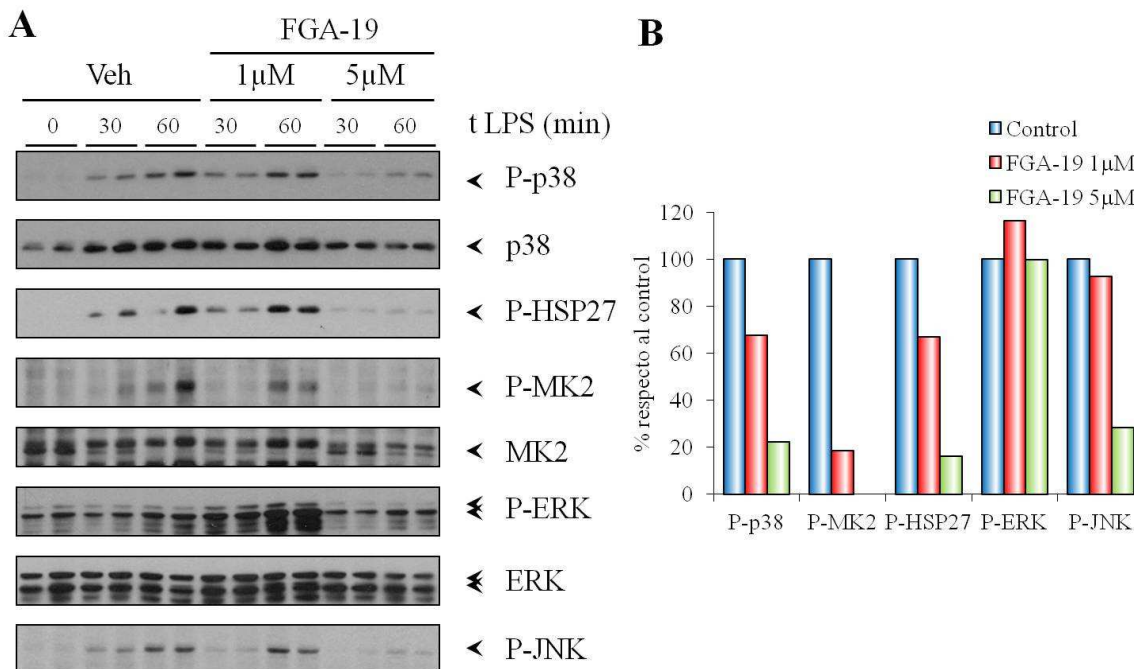


Figura 39. El compuesto FGA-19 inhibe eficazmente la ruta de p38 y es el mejor compuesto de la serie. A) Lisados de células THP-1 estimuladas con LPS durante 30 y 60 min en presencia de diferentes concentraciones de FGA-19 fueron analizados mediante Western blot para evaluar el efecto sobre la activación de p38 (P-p38) y su actividad sobre los sustratos HSP27 y MK2 (P-HSP27 y P-MK2). También se analizó la activación de las MAPK relacionadas ERK y JNK (P-ERK y P-JNK) para evaluar la especificidad del compuesto. Para la normalización de los datos se cuantificaron los niveles totales de p38, MK2 y ERK. Las dos bandas observadas en ERK corresponden a ERK1 y ERK2 que responden del mismo modo al tratamiento. B) En el gráfico se representan los niveles de fosforilación a los 60 min de p38, MK2, HSP27, ERK y JNK normalizados respecto a las proteínas totales (HSP27 y JNK fueron normalizados respecto a p38) y representados respecto al control sin compuesto (vehículo) tomado como el 100%. Experimento representativo de dos independientes.

5. ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE P38 POR COMPUESTOS DISEÑADOS SOBRE EL DOMINIO DE ANCLAJE EN UN MODELO ANIMAL.

5.1. Efecto de la molécula STOCK2S-05380 en la inhibición de p38 en un modelo de hiperalgesia inducida en ratones.

Para evaluar si el efecto inhibitor de la molécula STOCK2S-05380 observado *in vitro* y en cultivos celulares podría trasladarse al tratamiento de enfermedades inflamatorias dependientes de p38, se utilizó el modelo de hiperalgesia inducida por inflamación en ratones GRK2^{+/-} como se hizo con el péptido L-TAT-MEF2AxCys, en el laboratorio del grupo de A. Kavelaars. Se administró a los ratones, que habían sido sensibilizados 7 días antes con carragenato por vía intratecal, una dosis de 4 μ g de la molécula STOCK2S-05380 o de 5 μ g del inhibidor SB239063. Se midió la respuesta dolorosa a un foco de calor en las sucesivas horas y durante los 8 primeros días. En los experimentos realizados en presencia de la molécula STOCK2S-05380 se observó un aumento en el tiempo de respuesta a las 2 horas correspondiente al 30% del observado

con el inhibidor SB239063. Si bien el efecto analgésico del STOCK2S-05380 es menor que el del SB239063, dicho efecto es mucho más prolongado y persistente a una única dosis que el del SB239063: la duración del efecto fue de 3 días del STOCK2S-05380 respecto a las 6 horas de SB (Figura 40).

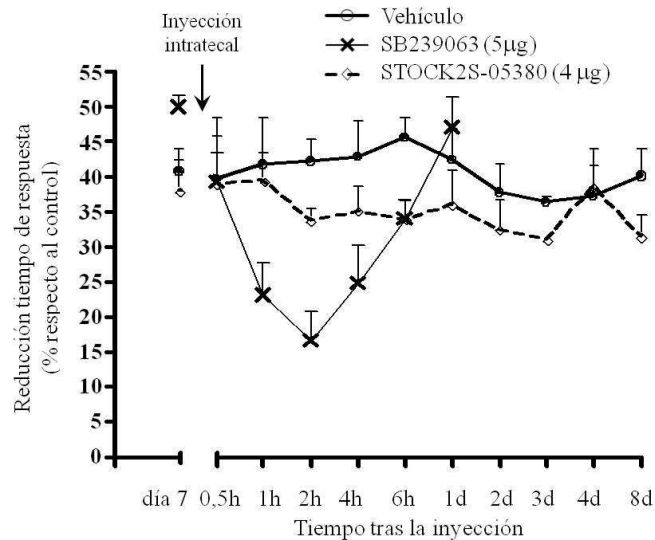


Figura 40. STOCK2S-05380 revierte moderada pero persistentemente la hiperalgesia inducida por inflamación en ratones GRK2^{+/+}. Ratones GRK2^{+/+} fueron inyectados con carragenato para inducir una hiperalgesia por inflamación. A los siete días se inyectó por vía intratecal el compuesto o, como comparación, el inhibidor de p38 SB239063 en una solución salina con DMSO al 20%. Se tomaron medidas de la hiperalgesia termal de los ratones aplicando una placa de calor a la pata tratada durante las primeras 6 horas y durante 8 días tras la administración del compuesto. En la gráfica se muestra la cuantificación de la reducción del tiempo de respuesta en porcentaje respecto al tiempo empleado antes de la inyección de carragenato (n=2 ratones por grupo).

5.2. La molécula FGA-19 es un potente inhibidor de la hiperalgesia inducida en ratones con niveles reducidos de GRK2 en macrófagos, granulocitos y microglía (LysM-GRK2^{+/+}).

Para analizar el compuesto FGA-19 se utilizó el modelo de hiperalgesia inflamatoria inducida utilizando ratones LysM-GRK2^{+/+}, a los que les falta una copia del gen de GRK2 únicamente en macrófagos, granulocitos y microglía y, por tanto, expresan niveles inferiores de proteína exclusivamente en esas células. Estos ratones presentan la misma hiperalgesia prolongada que los ratones que son hemizigotos para GRK2 en todas sus células. En este caso se administraron diferentes cantidades de la molécula FGA-19 entre 0,5 y 1,5µg o 5µg del inhibidor SB239063 por vía intratecal en ratones que habían sido sensibilizados con carragenato 6 días antes. Al medir la respuesta al dolor se observó un efecto transitorio con 0,5µg similar al obtenido con 5µg de SB239063. Al aumentar la dosis a 1 y 1,5µg, la mejora en el tiempo de respuesta fue total desde media hora después de la inyección del compuesto y durante los 5 días durante los que se tomaron medidas (Figura 41), un efecto mucho más amplio y prolongado que el obtenido por el conocido inhibidor de p38 SB239063 cuyo efecto analgésico sólo duró 6 horas. Estos resultados demuestran el amplio potencial terapéutico, no sólo de esta familia de compuestos, sino también la efectividad de inhibir p38 por el surco de anclaje por el que interacciona con activadores y sustratos.

RESULTADOS

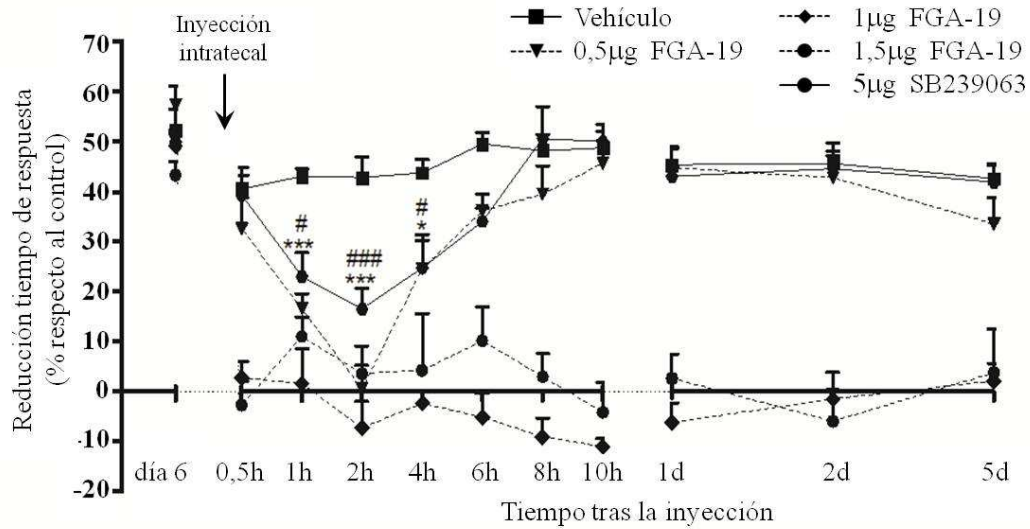


Figura 41. FGA-19 revierte la hiperalgesia inducida por inflamación en ratones *LysM-GRK2^{+/-}* a una menor dosis y durante un tiempo más prolongado que inhibidores establecidos para p38. Ratones con niveles reducidos de GRK2 selectivamente en macrófagos, granulocitos y microglía fueron inyectados con carragenato para inducir una hiperalgesia por inflamación. A los 6 días se inyectaron por vía intratecal las dosis indicadas de FGA-19 o el inhibidor de p38 SB239063 en una solución salina con DMSO al 20%. Se determinó la hiperalgesia termal de los ratones aplicando una placa de calor a la pata tratada durante las primeras 10 horas y durante los siguientes 5 días tras la administración del compuesto. En la gráfica se muestra la cuantificación de la reducción del tiempo de respuesta el porcentaje respecto al tiempo empleado antes de la inyección de carragenato (n= 4-8 por grupo). *P<0,05 y ***P<0,001 para 0,5µg de FGA-19 comparado con el vehículo: #P<0,05 y ###P<0,001 para 5µg de SB239063 comparado con el vehículo.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Nuestro grupo de investigación ha identificado un nuevo sitio de fosforilación de p38 por la quinasa GRK2 en el surco de anclaje, un dominio clave en la funcionalidad de p38, lo que representa un nuevo mecanismo de regulación para las MAPK. En este trabajo hemos caracterizado cómo afecta esta fosforilación a la interacción de p38 con sus sustratos y a su actividad catalítica. También nos hemos centrado en este dominio regulador para desarrollar un inhibidor peptídico y una molécula inhibidora que podrían ser de potencial aplicación en situaciones y patologías en las que la ruta de p38 esté implicada.

1. Impacto funcional e implicaciones fisiológicas de la regulación de p38 por GRK2.

En este trabajo se ha demostrado que la mutación a aspartato de la treonina 123, que simularía la fosforilación por GRK2 que tiene lugar en este residuo situado a la entrada del surco de anclaje, puede impedir la unión a p38 de activadores como MKK6, evitando que p38 sea estimulada. Además, esta mutación bloquea la unión de, al menos, un subgrupo de sustratos a p38, lo que alteraría algunas rutas de señalización celular dependientes de p38. Por otra parte, compuestos o péptidos dirigidos contra el surco de anclaje también evitan la activación y actividad de p38 *in vitro* y en células. Este doble impacto sobre los procesos de activación y sobre la interacción con sustratos podría explicar por qué la fosforilación en la T123 provoca una inhibición eficaz de los efectos celulares de p38 a pesar de no actuar directamente sobre el centro activo. Curiosamente, los aminoácidos adyacentes a la T123 en la secuencia de las cuatro isoformas de p38 son dos aminoácidos ácidos (aspartato o glutamato), pero al estar orientados en la estructura hacia el interior de la proteína no afectan al anclaje de otras proteínas y por tanto no presentan el mismo efecto estérico que la fosforilación por GRK2 en la que, presumiblemente, el fosfato incorporado quedaría expuesto al medio (Chang et al. 2002).

Esta regulación de p38 por GRK2 se correlaciona con lo observado en algunos procesos celulares. Por ejemplo, cuando se sobreexpresa GRK2 en preadipocitos 3T3L1 y se estimula su diferenciación a adipocitos, proceso que ha sido demostrado estrictamente dependiente de p38 (Engelman et al. 1998), se diferencian en menor proporción que células con niveles basales de GRK2. Sin embargo, cuando se transfecta un mutante sin actividad quinasa, GRK2-K220R, las células se diferencian más eficientemente. En experimentos celulares realizados en el laboratorio, se ha observado que hay una correlación entre los niveles y actividad de GRK2 y la fosforilación en la treonina 123 de p38 α . Además se ha observado una relación inversa entre los niveles de p38-fosfo-TGY y p38-fosfo-T123 (Peregrin et al. 2006). Otros procesos dependientes de la actividad de p38, como la secreción de citoquinas en diversos tipos celulares del sistema inmune, también se ven afectados por la actividad de GRK2. Los macrófagos extraídos de ratones GRK2^{+/-}, que expresan la mitad de proteína GRK2, muestran mayores niveles de secreción de citoquinas en respuesta a LPS (Peregrin et al. 2006). Por otro lado, se ha demostrado que la activación de p38 es imprescindible para el desarrollo de diversos procesos inflamatorios como la artritis reumatoide, enfermedad obstructiva pulmonar o enfermedad inflamatoria intestinal, y su inhibición ha resultado una estrategia eficaz para el tratamiento de estas enfermedades (Goldstein et al. 2010). En relación inversa a este hecho, muestras de modelos animales de artritis, o de diversas patologías inflamatorias crónicas humanas como la esclerosis múltiple contienen niveles

DISCUSIÓN

significativamente bajos de GRK2, lo que favorece nuestra hipótesis de que pudiera existir una relación funcional inversa entre GRK2 y p38 (ver referencias en [Peregrin et al. 2006] (Peregrin et al. 2006)).

También se ha observado que los ratones GRK2^{+/-} presentan una hiperalgesia inducida por inflamación que no aparece en ratones silvestres y que puede ser revertida por inhibidores de p38 (Eijkelkamp et al. 2010), como ya se ha detallado en otras secciones de esta memoria. Cabe destacar que se ha publicado que la hiperalgesia inducida por citoquinas inflamatorias como IL-1 β y TNF α es también reducida en intensidad y tiempo por la isoforma GRK6, ya que en ratones KO para GRK6 la hiperalgesia aumenta de 6 horas a 8 días, y es inducida por una concentración 100 veces menor de citoquinas que en ratones WT. De hecho, han comprobado que la activación de p38 en esta situación es mayor en ratones GRK6^{-/-} (Eijkelkamp et al. 2012). Si bien es interesante especular con la posibilidad de que GRK6 estuviera fosforilando a p38 como lo hace GRK2, quedaría por comprobar si GRK6 puede fosforilar directamente a p38 en la misma treonina 123, o si, por el contrario, su regulación es indirecta y se produce mediante otro mecanismo.

Podemos deducir que, en todas estas situaciones, GRK2 podría estar ayudando a controlar negativamente la actividad de p38 ya que al reducir la concentración de GRK2 hay un aumento en la actividad de p38 en respuesta a estímulos. No existe evidencia directa sistemática de que en estos procesos GRK2 esté regulando p38 a través de la fosforilación en la T123 ya que los anticuerpos generados contra la fosforilación de este residuo no tienen la suficiente sensibilidad en muchos sistemas celulares. Sin embargo, dado que la fosforilación por GRK2 es inhibitoria, que ningún otro residuo es fosforilado más eficientemente por GRK2 que la T123 y que en situaciones en las que se ha utilizado una versión sin actividad quinasa de GRK2 no se afecta la actividad de p38, podemos sugerir que el control de p38 por GRK2 muy probablemente se produzca por fosforilación de la T123. En apoyo de esta idea, cabe destacar la modulación por GRK2 de la diferenciación y formación de miocitos de músculo esquelético, proceso dependiente de p38 (Perdiguero et al. 2007). La sobreexpresión de GRK2 impide el correcto perfil temporal de activación de p38 y provoca que los mioblastos no se diferencien correctamente, en paralelo a un aumento de la fosforilación inactivadora en la T123. El mismo efecto en diferenciación se observa tras expresar el mutante p38 α T123D, que simularía la fosforilación inhibitoria de GRK2 (García-Guerra et al. 2014).

La interacción funcional entre GRK2 y p38 puede tener relevantes consecuencias patofisiológicas en otros contextos. Es interesante destacar que los niveles y actividad de GRK2 están aumentados en fallo cardíaco y algunas otras patologías cardiovasculares como hipertrofia cardíaca e hipertensión arterial. Además, se ha publicado que p38 está implicado en el inicio y progresión del fallo cardíaco regulando procesos como el remodelado y contracción de tejido miocárdico (Petrich et al. 2004). Varias publicaciones muestran que la actividad de p38 se reduce en las fases tardías del fallo cardíaco, mientras que los niveles de GRK2 van aumentando en paralelo a la gravedad de esta patología, por lo que es tentador especular con la posibilidad de que la fosforilación en la T123 pudiera tener un papel en la inactivación progresiva de p38 a lo largo de este proceso.

La fosforilación en Ser/Thr123 produce sobre p38 una inhibición que puede ser de tipo competitivo o bien no competitivo dependiendo del tipo de sustrato sobre el que se mida. Como demostramos en esta tesis doctoral, el mecanismo de inhibición que esta fosforilación consigue puede ser no competitivo cuando se determina la actividad de p38 frente a sustratos que son independientes de interacciones vía motivos-D. Según nuestros resultados, el mutante fosfomimético de p38 β 2 presenta una K_m hacia sustratos no dependientes de anclaje similar a la proteína silvestre, mientras que la V_{max} se ve reducida en torno a la mitad, lo cual es una característica de un inhibidor no competitivo. Por otro lado, la reducción en la actividad de p38 por la fosforilación de GRK2 podría además ser competitiva hacia sustratos dependientes de anclaje al afectar al lugar de interacción con estos sustratos. Datos obtenidos en nuestro laboratorio indican que la K_m de MEF2A por p38 α aumenta casi 10 veces en presencia de inhibidores dirigidos contra el surco de anclaje si se mide la actividad de p38 hacia sustratos con motivos-D, lo que es indicativo de este efecto competitivo (Willemen et al. 2014). En resumen, de estos experimentos podríamos deducir que la inhibición de p38 tras fosforilación en la S/T123 no sólo se produce por un impedimento de tipo estérico que derivaría en una inhibición de tipo competitivo, sino que también podría alterar la conformación de la proteína afectando de algún modo a su centro activo y, por tanto, a su capacidad catalítica, cualidad característica de inhibidores alostéricos no competitivos. Estos resultados sugieren además la hipótesis de que GRK2 podría estar dirigiendo la señal selectivamente hacia determinadas vías cuando p38 es fosforilada por GRK2, ya que unos sustratos se verían afectados en mayor medida que otros.

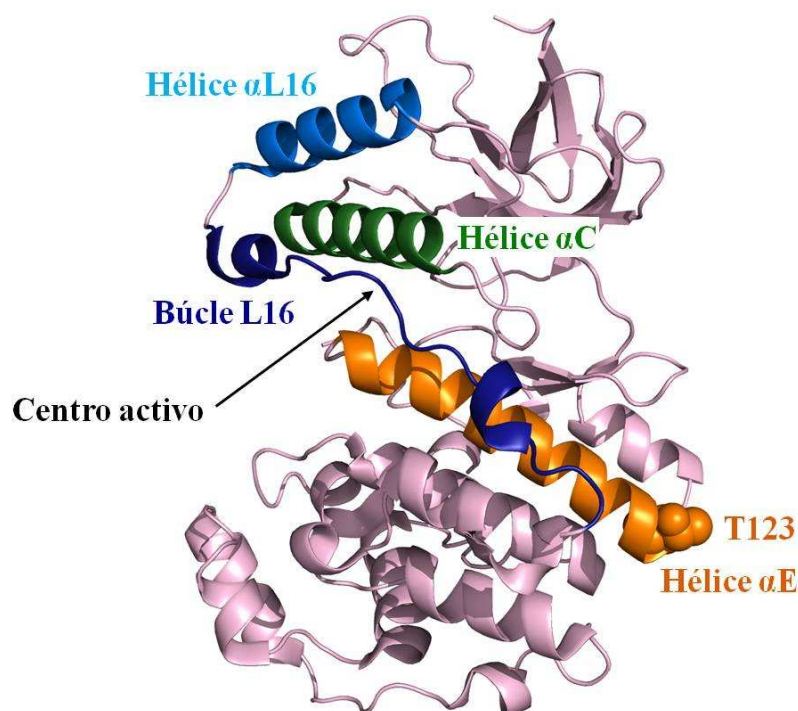


Figura D-1. El surco de anclaje (hélice αE , la hélice $\alpha L16$ y el bucle L16 pueden regular alostéricamente la actividad de p38 a través de la hélice αC que forma parte del centro activo. Representación tridimensional de p38 utilizando el software Pymol. Se han resaltado la T123 (esferas naranjas), la hélice αE (naranja), el bucle L16 (azul oscuro), la hélice $\alpha L16$ (azul claro) y la hélice αC (verde).

En este sentido, el residuo S/T123 se encuentra a la cabeza de la hélice αE que, en su parte final, forma parte del centro activo (Chang et al. 2002). Es probable que por medio de oscilaciones conformacionales, la fosforilación en S/T123 pueda provocar cambios en el otro extremo de la hélice que puedan perturbar estructuras implicadas en efectuar la catálisis, como aquéllas que conforman el centro activo, induciendo un posicionamiento ineficiente del sustrato o del ATP en el estado de transición de p38 y dando así como resultado una menor velocidad de reacción. Estos cambios conformacionales también podrían transmitirse desde la treonina fosforilada a través del bucle L16 hasta el centro activo (Figura D-1). Se ha descrito que el bucle L16, que forma parte del dominio CD del surco de anclaje y se encuentra muy próximo al dominio ED donde está la treonina 123, está directamente conectado con la hélice $\alpha L16$ que interacciona estrechamente y regula la hélice αC que forma parte del centro activo. De este modo, es tentador sugerir que el surco de anclaje (hélice αE), la hélice $\alpha L16$, el bucle L16 y la hélice αC podrían estar formando un complejo sistema de regulación alostérica (Nguyen et al. 2015). De hecho, la fosforilación de p38 por Zap70 en la tirosina 323, que se encuentra en el bucle L16 provoca cambios conformacionales que tienen como consecuencia cambios en la capacidad catalítica de p38 dado que incrementan la autofosforilación de la quinasa (Salvador et al. 2005). La distinta eficacia de la fosforilación por GRK2 de la forma inactiva y activada de p38 que hemos encontrado es también consistente con una interacción conformacional entre los dominios de activación y el surco de anclaje.

En cuanto a la reversibilidad del proceso, en esta tesis demostramos que la fosforilación de p38 por GRK2 puede ser revertida por PP2A (Figura 7). Esta fosfatasa puede defosforilar, al menos *in vitro*, los dos sitios fosforilables de p38: uno activador y otro inhibidor. Por ello, podemos inferir que el estado de activación de p38 dependerá al menos en parte de factores como la localización subcelular y su posible colocación o interacción con PP2A. Existen fosfatasas más específicas como las de la familia MKP que sólo defosforilarían los fosfatos del bucle de activación, pero estas fosfatasas requieren del surco de anclaje para unirse a p38 por lo que probablemente interaccionarían peor con p38 fosforilada en la T123. Nuestros resultados demuestran además que GRK2 puede seguir fosforilando p38 después de haber sido activada, aunque en menor medida, por lo que si la fosforilación en la T123 se produce después de la activación, cabe la posibilidad de que las fosfatasas dependientes de anclaje tengan más dificultad para actuar. Esto es coherente con el hecho de que la proteína p38, ya inhibida por la fosforilación en la T123, no necesitase ser además defosforilada para apagar su actividad (y, por tanto, su ruta de señalización).

Por otro lado, la búsqueda de nuevas quinasas que puedan fosforilar este tipo de residuos resulta de gran interés. CK2 es un quinasa ubicua con un gran número de sustratos conocidos y una diana de fosforilación similar al entorno de la S/T123. Además, CK2 regula procesos de proliferación y control del ciclo celular. Nuestro grupo cuenta con datos preliminares que apuntan a que existe una fosforilación de p38 β 2 (pero no de p38 α) por CK2 en la S123. De confirmarse, estos datos indicarían que este tipo de regulación negativa puede no ser exclusiva de procesos mediados por GRKs y podría ser producida por otro tipo de estímulos. En consecuencia, resultará importante estudiar qué otras quinasas pueden fosforilar p38, y también qué otras MAPK pueden ser fosforiladas en el surco de anclaje ya sea por GRK2 u otras quinasas, lo que abre una nueva línea de investigación a partir de nuestro trabajo.

2. Importancia de las interacciones a través de dominios de anclaje:

Estudios de cristalografía de rayos X sobre p38 unido a péptidos que contienen los motivos-D de MKK3b y MEF2A (Chang et al. 2002), y los más recientes sobre el complejo p38-MK2 (ter Haar et al. 2007), p38-MKK6 (Garai et al. 2012), p38-MKP5 (Zhang et al. 2011a) y p38-TAB1 (De Nicola et al. 2013; Xin et al. 2013), han sentado las bases de la caracterización molecular de las interacciones a través del surco de anclaje, y han revelado nuevos detalles importantes que antes habían pasado desapercibidos. El surco de anclaje es una región común y exclusiva entre todas las MAPK, pues no aparece en ningún otro tipo de quinasas. Se han descrito para p38 y en general para las MAPK más zonas de interacción como el dominio DEF (Gum et al. 1999), pero el surco de anclaje parece el más importante en cuanto a afinidad y especificidad para las MAPK, puesto que cuando se bloquean sus interacciones, se pierde la mayor parte de la actividad, como se ha mostrado en algunas publicaciones (Tanoue et al. 2001) y también en este trabajo.

Resulta muy interesante que GRK2 fosforile a p38 precisamente en el dominio de interacción con activadores y sustratos de mayor importancia, lo que destaca la posible relevancia del proceso. Según la información cristalográfica publicada, la fosforilación de esta T123, podría distorsionar la interacción con sustratos, fosfatasa y activadores al introducir una carga negativa en esa zona (Figura D-2). Por otro lado, no podemos descartar que, por su proximidad, cambiara el pKa del imidazol de la histidina 126 modificando su carga eléctrica y afectando indirectamente a la interacción con los motivos-D. Estas observaciones se ven reforzadas por resultados obtenidos en modelos moleculares donde se ha calculado la energía libre de interacción a partir de la suma de las energías de disociación de los enlaces presentes en los modelos de anclaje a partir de estructuras obtenidas por cristalografía. Según estos cálculos, al introducir un aspartato en la posición 123 de p38 α se produce un reducción del 12% en la energía libre de interacción de p38 α con MEF2A que cambia de -13,56 a -11,88 kcal.mol⁻¹ (Tesis Doctoral de la Dra. Sandra Peregrín Pedrique). La magnitud de este cambio coincide con resultados anteriores derivados de mutaciones en residuos clave para la interacción que provocan cambios de energía libre del mismo orden (~2 Kcal.mol⁻¹) (Sundaresan et al. 2002).

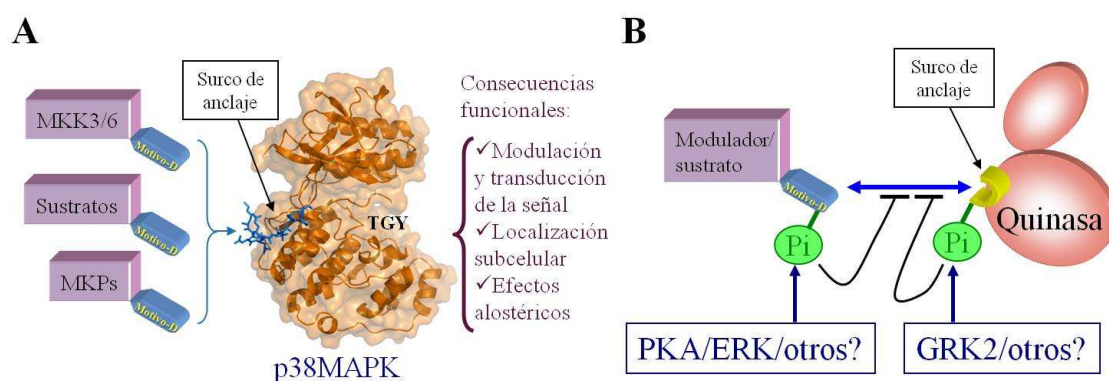


Figura D-2. Interacciones a través del surco de anclaje: regulación a través de fosforilaciones. A) Representación esquemática utilizando el software Pymol de un motivo-D (azul) uniéndose a p38 α (naranja) a través del surco de anclaje, situado en el lado opuesto al bucle de activación (TGY) (Estructura PDB: 1LEW). Se detallan a la derecha las consecuencias funcionales de las interacciones a través del surco. B) PKA y ERK fosforilan los motivos-D de PTP-SL o HePTP y Rsk, respectivamente (ver texto), mientras que GRK2 fosforila el surco de anclaje de p38. Ambas fosforilaciones pueden bloquear las interacciones de diversas MAPK a través del surco. Figura adaptada de (Mayor et al. 2007).

Esta fosforilación podría no ser un mecanismo aislado de regulación a través de dominios de anclaje, ya que se ha descrito que PKA fosforila a PTP-SL en el motivo-D, motivo estructural a través del cual PTP-SL interacciona con ERK1/2 y p38, y que dicha fosforilación reduciría la interacción. Puesto que la acción de PTP-SL es inhibir las rutas de MAPK, esta fosforilación mantiene la activación de la ruta de ERK1/2 y p38 en lugar de desactivar la señalización. Sin embargo, los autores indican que este proceso estaría limitado a algunos tipos celulares neuronales debido a la restringida expresión de PTP-SL (Blanco-Aparicio et al. 1999). De forma similar, PKA también fosforila el motivo-D de otra fosfatasa, HePTP, lo que interfiere en la interacción entre HePTP y ERK o p38 (Saxena et al. 1999). Además, se ha descrito que Rsk puede ser fosforilada en el motivo-D por ERK, lo que también bloquea la interacción entre ambas proteínas (Roux et al. 2003).

La localización subcelular de p38 es también muy relevante para definir el tipo de respuesta final que la célula tendrá ante un estímulo dado, y también puede venir determinada por las fosfatasas que tienen dominios de interacción con quinasas o motivos-D y suelen mantener a p38 en el citosol (Blanco-Aparicio et al. 1999). Por otro lado, p38 y MK2 forman un dímero basado en interacciones vía motivos-D. Está descrito que este dímero se encuentra en el citosol en estado basal. Al activarse, p38 y MK2 fosforilan a sus sustratos y entrarían al núcleo y, al inactivarse, saldrían de nuevo al citosol (Gong et al. 2010). Además, TAB1 también retiene a p38 en el citosol compitiendo con MK2 (Lu et al. 2006). Se desconoce por el momento cómo la fosforilación de p38 en la T123 podría afectar a las interacciones p38-MK2 y p38-TAB1 en células o tejidos, y también si podría alterar su distribución subcelular y/o dirigir el tipo de señalización de p38 hacia una serie de sustratos o una respuesta celular diferente, pero ambos son campos de estudio de mucho interés.

Los principales sustratos descritos para p38, como MEF2A y MK2, y los activadores MKK6 y MKK3b tienen motivos-D con una secuencia aparentemente poco conservada, pero con una similitud suficiente para ser reconocida: dos aminoácidos hidrofóbicos separados por un aminoácido cualquiera, y 2 a 5 aminoácidos cargados positivamente separados por de 2 a 6 aminoácidos cualquiera. La secuencia de los motivos-D es muy parecida entre las diferentes rutas de MAPK, por lo que existen sustratos con motivos-D que cumplen los requisitos para interaccionar con más de una MAPK y, por tanto, pueden ser fosforilados por todas aquellas que lo reconozcan, como por ejemplo ATF2, que puede ser fosforilado por p38, JNK y en menor medida por ERK. Las diferencias que existen entre cada motivo-D son las que aportan selectividad hacia una determinada MAPK. Estas diferencias no son aleatorias. Por ejemplo, si el motivo-D contiene una prolina en la posición Φ_A-3 , ésta se ubica en un bolsillo hidrofóbico que sólo existe en ERK (Garai et al. 2012). Por otro lado, existe un amplio abanico de sustratos de p38 sin un motivo-D aparente pero que interaccionan eficientemente por otros dominios (como el DEF) y pueden ser fosforilados activamente por p38. Ese es el caso de EEA1 (Mace et al. 2005), Rab5GDI (Zwang et al. 2006), Glucógeno Sintasa (Kuma et al. 2004) o Tau (Lauretti et al. 2015). Tampoco la trans-autofosforilación de p38 parece estar mediada por interacciones a través del surco de anclaje, sino que sería el dominio DEF el responsable del reconocimiento de una molécula de p38 por otra (Tzarum et al. 2013). Pero, curiosamente, la cis-autofosforilación inducida por TAB1 sí depende del surco de anclaje ya que TAB1 presenta un motivo-D que interacciona con el dominio ED. Sin embargo, no es el único anclaje de TAB1 ya que esta proteína presenta otro dominio que se une a un bolsillo de interacción de p38 α que parece exclusivo de la interacción con TAB1 (De Nicola et al. 2013).

La selectividad de sustrato a través del surco de anclaje ha sido clave en la evolución y funcionalidad de diferentes MAPK y también entre isoformas de p38. Un ejemplo de su importancia se puede apreciar en que la especificidad de sustrato entre p38 α y p38 δ se determina por 12 aminoácidos en la región del surco de anclaje: si se cambian estos 12 aminoácidos en p38 α por los de p38 δ no se fosforilan sustratos específicos de p38 α dependientes de motivos-D como MK2, y viceversa (Gum et al. 1999). Por tanto, la inhibición a través de la fosforilación del surco de anclaje podría significar un cambio muy significativo en la selectividad de sustratos, silenciando determinadas respuestas, pero manteniendo activas otras. Es decir, se podría actuar sobre determinadas funciones sin impedir por completo la actividad de p38, lo que posibilitaría evitar la toxicidad que se ha observado con la mayoría de inhibidores diseñados para detener la actividad catalítica de esta quinasa y que bloquean muy eficazmente la actividad de p38 sobre muy diversos sustratos.

En esta tesis doctoral hemos utilizado la isoforma p38 β 2, que tiene una actividad basal cuantificable, para responder a la cuestión de si la actividad de p38 se ve afectada por la fosforilación por GRK2 independientemente de sus efectos sobre la activación de p38 por MKK6. p38 β 2 presenta una alta homología con p38 α , con una identidad de secuencia del 75%, siendo el miembro de la familia de p38 con mayor similitud con p38 α y expresión en todos los tejidos. El análisis de las secuencias determina que el residuo que estaría en la posición equivalente a la T123 en p38 α es la serina 123 en p38 β 2, aminoácido que también es fosforilado por GRK2. Curiosamente, dos grupos independientes clonaron una variante de procesamiento alternativo de p38 β 2, llamada p38 β , que incluye un inserto de 8 aminoácidos que está ausente en p38 β 2, o cualquier otra isoforma de p38 (Jiang et al. 1996; Kumar et al. 1997). El inserto de 8 aminoácidos se localiza justamente en el dominio ED, en el bucle entre las hélices α D y α E, que es precisamente donde se sitúa la S123 de p38 β 2, distorsionando la estructura del surco y alterando la capacidad para unir sustratos. En estos trabajos se muestra que esta isoforma presenta una actividad significativamente reducida sobre sustratos dependientes de anclaje en un grado variable dependiendo de su requerimiento de anclaje para su fosforilación (ATF2, MK2 y MK3), pero no han visto que esté afectada la fosforilación de sustratos independientes de interacciones con el surco como MBP. Sin embargo, esta isoforma parece tener poca relevancia fisiológica, aparte de por su incapacidad para fosforilar la mayoría de sustratos de p38, porque su nivel de expresión es muy limitado (Jiang et al. 1996). Se ha sugerido que esta isoforma puede ser el producto de un ARN mensajero inmaduro de p38 β 2 que no ha eliminado esta secuencia como intrón. Además de su baja expresión y de compartir el mismo gen, el inserto de ADN que produce la p38 con estos 8 aminoácidos adicionales presenta características típicas de intrones y al transfectar células con la secuencia de p38 β 2 incluyendo este inserto, su ARN mensajero no se traduce (Jiang et al. 1996). La expresión en momentos concretos del ciclo celular o en algunos tejidos de esta variante de p38 β 2 podría haber supuesto una alternativa natural para la regulación de la actividad de p38 a través del surco de anclaje.

Aunque p38 α y p38 β 2 presentan un alto grado de homología, también se observan ciertas diferencias que pueden influir en el efecto de la fosforilación por GRK2. Por ejemplo, p38 β 2 muestra una actividad catalítica en ausencia de activación por MKK mayor que p38 α . Por otro lado, p38 β 2 no presenta el segundo sitio de interacción con TAB1, por lo que la interacción entre ambas proteínas es más dependiente del surco de anclaje (De Nicola et al. 2013).

En el lado de los sustratos, existe una variante de procesamiento alternativo de MK2, MK2b, cuya única diferencia en la secuencia con MK2 (MK2a) es que carece de la región que contiene el motivo-D (últimos 30 aminoácidos), por lo que tampoco puede establecer interacciones a través del surco de anclaje. Esta variante tiene unos niveles de expresión muy bajos comparados con MK2a, y tampoco ha sido objeto de muchos estudios. Su capacidad de interacción con p38 es más de 2000 veces menor que la de la isoforma MK2a (K_d mayor a $5\mu\text{M}$ respecto a $2,5\text{nM}$ para MK2a). Además, al utilizar los 30 aminoácidos que diferencian la isoforma a de la b, se observa que interactúan con p38 con una afinidad similar a la de la proteína completa ($K_d=20\text{nM}$) (Lukas et al. 2004). Estos resultados refuerzan la hipótesis de que el motivo-D es imprescindible para la fosforilación por p38 en los sustratos que dependen de él. Los resultados aquí expuestos confirman que cualquier tipo de interferencia en las interacciones por anclaje puede abolir la fosforilación por p38 y puede ser la base molecular que redirija las vías de respuesta de p38 hacia ciertos subgrupos de sustratos de manera preferencial sobre otros, como ya han indicado otros investigadores (Davidson et al. 2004).

Es muy llamativo que la fosforilación de sustratos independientes del surco de anclaje como CHOP, ATF2 o MBP, por una versión de p38 β 2 alterada en el surco de anclaje o por el mutante fosfomimético p38 β 2S123D no esté tan reducida como la de sustratos dependientes como MK2 ((Kumar et al. 1997) y resultados aquí expuestos). Por otro lado, al mutar el dominio DEF, se reduce la fosforilación de sustratos como Elk-1, ATF2 y MBP (Tzarum et al. 2013) que interactúan por este dominio, pero no la de sustratos como MK2, que no interactúa con el dominio DEF. Estos datos sugieren que hay al menos dos subgrupos de sustratos de p38 dependiendo del lugar por el que se anclan, y que GRK2 podría jugar un importante papel en la “decisión” sobre qué subgrupo de sustratos va a transmitir la señal. Esto podría significar que en distintas situaciones fisiológicas dependientes de la ruta de p38 se producirán diferentes tipos de respuesta dependiendo de los niveles o del estado de activación de GRK2. Con el uso de inhibidores de p38 específicos del surco de anclaje se podría bloquear la vía de señalización de p38 pero a la vez se podría estar canalizando la respuesta en una dirección distinta, en lugar de inhibirla completamente. Lo mismo se podría decir para putativos inhibidores específicos del dominio DEF, que podrían limitar la activación de un subgrupo diferente de sustratos (Davidson et al. 2004). No existen evidencias por ahora de que otras quinasas fosforilen el surco de anclaje ni el dominio DEF, por lo que, por ahora, GRK2 sería la única enzima externa a la ruta que interviniera en esta selección.

En cuanto a otras MAPK, JNK3 presenta en la misma posición un ácido aspártico que equivaldría a un aminoácido fosforilado, y Hog1, equivalente a p38 y JNK en levaduras, tiene un ácido glutámico, y sin embargo, son proteínas que siguen teniendo capacidad para fosforilar a sus respectivos sustratos. Estos datos, junto con la observación de que las interacciones por anclaje en JNK son diferentes a las descritas para p38 (Mooney et al. 2004), sugieren que una carga negativa en esta región puede servir para establecer una selectividad de sustrato o de reguladores en lugar de inhibir totalmente la actividad quinasa, ya que algunas de las MAPK con carga negativa en este sitio no son proteínas inactivas. Estas evidencias refuerzan la hipótesis de que la fosforilación en el sitio de anclaje puede servir de “interruptor molecular”, de forma que la p38 fosforilada en este dominio activaría preferentemente sustratos independientes de interacciones vía motivos-D, mientras que los sustratos dependientes de este tipo de anclaje no serían eficazmente fosforilados.

3. Inhibición farmacológica de p38.

El papel de p38 en la regulación de importantes respuestas celulares, sobre todo inflamatorias, ha convertido a esta quinasa en una potencial diana terapéutica. A pesar de los muchos esfuerzos y recursos dedicados a la búsqueda de inhibidores de p38, todavía no se ha podido desarrollar con éxito un inhibidor eficaz. Han surgido varios inconvenientes por los cuales los inhibidores de p38 no han prosperado, como son la falta de efectividad en el tratamiento final y efectos tóxicos durante los ensayos clínicos en humanos que no se detectaron o no se presentaron en los modelos animales de las enfermedades para los que se analizaron (Hammaker et al. 2010). El origen de la toxicidad es diverso. En el caso de los inhibidores competitivos de ATP, tipo I, o de los que afectan al bolsillo de ATP, tipo II, han resultado ser muy inespecíficos por estar dirigidos contra un sitio altamente conservado entre todas las quinasas, provocando efectos secundarios indeseados (Coulthard et al. 2009). Por otro lado, cuando se han desarrollado inhibidores alostéricos no dirigidos contra el bolsillo de ATP, parece que una inhibición potente de la señalización de p38 puede disparar una señalización compensatoria por otras vías debido a la interconexión entre las diferentes rutas de señalización (Cohen 2009). También se ha descrito que el uso sistémico de estos inhibidores produce efectos tóxicos en otros tejidos no implicados en el desarrollo de la enfermedad que se pretende tratar, como la toxicidad hepática que se ha observado con el BIRB-796 (Iwano et al. 2011) y el SB203580 (Dominguez et al. 2005), y la toxicidad en el sistema nervioso central (Lee et al. 2005).

Como una posible alternativa a los efectos secundarios adversos encontrados con estos inhibidores, decidimos aprovechar el mecanismo de inhibición por GRK2 a través del surco de anclaje de p38 para diseñar compuestos o péptidos que pudieran inhibir o modular la actividad de p38 de forma independiente de su estado de activación y del bolsillo del ATP, y de este modo conseguir una inhibición menos problemática desde el punto de vista terapéutico. El descubrimiento de un mecanismo natural por el cual GRK2 puede inhibir la activación y actividad de p38 mediante la fosforilación de la treonina 123 situada en el surco de anclaje (Peregrin et al. 2006) nos alentó para diseñar y desarrollar inhibidores basados en este proceso. Para ello, nos centramos en dos estrategias: el diseño de péptidos inhibidores a partir de los motivos-D de activadores y sustratos, que ya de por sí presentan una alta afinidad por el surco de anclaje, y la búsqueda de pequeñas moléculas inhibidoras partiendo de un cribado virtual.

4. Inhibición de p38 mediante péptidos dirigidos contra el surco de anclaje.

Diseñamos varios péptidos a partir de los motivos-D de los activadores MKK3b y MKK6 y de los sustratos MEF2A y MK2. Los valores de inhibición sólo fueron realmente eficaces en el caso de los péptidos diseñados a partir de MK2 y MKK3b. En lo que concierne a los derivados de MK2, únicamente tuvo efecto el péptido que abarcaba a la vez ambos dominios ED y CD, mientras que los péptidos dirigidos exclusivamente al dominio CD (pepMK2e) o al dominio ED (pepMK2a) no presentaron prácticamente eficacia como inhibidores, lo que podría explicar el muy escaso potencial inhibidor del resto de péptidos dirigidos esencialmente contra el dominio ED. Cabe señalar que la afinidad de p38 por MK2 es mucho mayor que por el resto de sustratos (ter Haar et al. 2007) coherente con el hecho de que este péptido sea mucho más activo que los otros. Probablemente por este motivo p38 suele estar unida fuertemente a MK2 en la célula (Gong et al. 2010). Por otra parte, la notable actividad detectada para el

péptido derivado MKK3b podría deberse a la presencia de una cisteína que formaría un puente disulfuro con la cisteína 119 de p38. Para confirmar esta hipótesis se decidió diseñar un péptido a partir del motivo-D de MEF2A incorporando esta cisteína en la posición más propicia para la formación de ese puente disulfuro. El resultado fue una mejora de la IC50 de aproximadamente 250 veces, por lo que podemos concluir que esta cisteína contribuye al efecto inhibitorio. Además, en nuestros experimentos hemos observado que al aumentar la concentración de agentes reductores, que puedan impedir la formación del puente disulfuro, se reduce considerablemente la inhibición de p38 por el péptido MEF2A-Cys, lo que refuerza la hipótesis de que el puente se esté formando y ello suceda en mayor medida en condiciones oxidantes. Sin embargo, una sustitución similar no supuso una mejora en el péptido con la secuencia de MK2, lo que podría explicarse probablemente por una orientación de la cisteína poco propicia a formar este enlace: dado que la secuencia de unión de MK2 se dispone en el surco de anclaje en sentido contrario al de los otros motivos-D, es posible que ello altere la orientación, prevista en base a la estructura de p38 con MEF2A, en particular para este residuo.

En una simulación virtual con el péptido de MEF2A modificado se puede ver que la cisteína en el péptido puede orientarse y está a la distancia correcta para formar el puente disulfuro (Figura 12). Al incluir una cisteína en el péptido inhibitor, éste se convertiría en un inhibidor de tipo irreversible, donde el enlace covalente que se formaría entre el péptido y p38 haría que la capacidad de inhibición aumente. Una vez que un inhibidor irreversible se ha unido a su diana, la única forma de reponer la actividad enzimática es con la síntesis de nueva proteína, por lo que si la tasa de recambio de una proteína es baja, hará que el efecto inhibitorio sea muy prolongado. En el caso de p38, su vida media medida en células HeLa en ausencia de estímulos específicos es de 40h (Jackson et al. 2003), por lo que el uso de este tipo de inhibidores para p38 permitiría reducir la frecuencia del tratamiento respecto a uno reversible. Puede especularse igualmente que la eficacia de este tipo de inhibidores dependería del estado redox celular, siendo especialmente activos en condiciones de estrés oxidativo. Además, el aprovechamiento de esta interacción supone la ventaja adicional de aportar selectividad, ya que p38 α y β 2 son las únicas MAPK con una cisteína en esta posición. Es interesante destacar que normalmente la inhibición covalente ha estado normalmente dirigida hacia cisteínas del centro activo o próximas (Liu et al. 2013) por lo que utilizar una cisteína fuera del centro activo de una quinasa sería una aproximación novedosa.

Los péptidos fueron analizados en un modelo de secreción de TNF α por monocitos THP-1, una de las líneas monocíticas más establecidas para medir inhibición de p38. Sólo el péptido a partir de MEF2A modificado con cisteína fue eficaz en este ensayo, mientras los péptidos de MKK3 y MK2 no resultaron activos. Aunque existen numerosas publicaciones donde se ha conseguido transportar péptidos, proteínas e incluso oligonucleótidos a través de la membrana plasmática utilizando péptidos transportadores como el TAT, es probable que los péptidos de MKK3b y MK2 no fueran activos por tener alguna característica diferencial que dificulte su permeabilidad. El potencial transportador de estos péptidos radica en su carácter anfipático y en la presencia de varias cargas positivas y estas características pueden resultar alteradas por la carga intrínseca de la secuencia que transporten. Se ha descrito que con péptidos transportadores artificiales formados exclusivamente por argininas, la cantidad óptima de cargas positivas es de 8 ó 9 (Jones et al. 2012). Debido a su carácter básico, los motivos-D presentan un alto número de cargas positivas y aunque en el caso del péptido TAT-MEF2AxCys la cantidad de cargas positivas totales es de 9, para los péptidos de MKK3 y MK2 es de 16, lo que podría explicar que no funcionaran en los ensayos celulares simplemente por falta de una permeabilidad adecuada y no por una unión

defectuosa a la diana. Además, se ha descrito que el transporte por péptidos ha fracasado anteriormente debido a un secuestro en endosomas (Brock 2014) lo que también podría explicar la inactividad de estos péptidos en nuestros ensayos. Para confirmar estos extremos se tendrían que realizar experimentos de cuantificación del transporte de péptido a través de la membrana y de la acumulación del mismo dentro de la célula utilizando, por ejemplo, péptidos marcados con un fluoróforo y microscopía cuantitativa de fluorescencia.

Por otro lado, dado que el péptido de MK2 se coloca sobre el surco de anclaje en un sentido inverso al de MEF2A, la secuencia transportadora se localizaría en el lado opuesto, cerca del dominio ED, lo que también podría interferir con el correcto anclaje del péptido en el surco. Otra explicación alternativa sería que el acoplamiento de los péptidos con p38 no fuera completo: según nuestros resultados, la adición o eliminación de 1 aminoácido en uno de los extremos del péptido es suficiente para que la IC50 se eleve drásticamente, por lo que es difícil imitar con péptidos del motivo-D la interacción que tendrían cuando dichas secuencias están incluidas en la proteína completa. De hecho, la afinidad de estos péptidos dirigidos contra el surco de anclaje es del orden bajo micromolar, y gran parte de la energía de estas interacciones seguramente se emplee en promover los cambios conformacionales inducidos por la unión a estos péptidos. Teniendo esto en cuenta, una molécula que sea capaz de unirse al surco de anclaje sin provocar estos cambios conformacionales podría, hipotéticamente, tener una afinidad más alta (Akella et al. 2008), dado que la energía empleada en inducir cambios conformacionales en enzimas alostéricas suele estar en el rango de kilocalorías/mol. Sin embargo, este aumento en la afinidad sería probablemente a costa de la pérdida de cambios conformacionales inducidos por los péptidos que pueden ser importantes para su efecto inhibitorio.

Los péptidos formados por aminoácidos D proporcionan la ventaja de no ser hidrolizables por proteasas presentes en las células ya que éstas son específicas de aminoácidos L. Si bien se han descubierto proteasas de estereoisómeros de aminoácidos D (Asano et al. 1989), al no encontrarse en eucariotas no representarían un inconveniente para la vida media de péptidos-D utilizables como fármacos en animales y humanos. Por ello, decidimos sintetizar la versión D del péptido TAT-MEF2AxCys, que había mostrado un buen funcionamiento en los ensayos celulares. En los péptidos D la posición del enlace peptídico cambia y si se producen interacciones entre el esqueleto del motivo-D y el surco de anclaje, éstas se perderían al utilizar aminoácidos D. Sin embargo, tal y como se ha descrito en otras publicaciones, son las cadenas laterales de los aminoácidos de los motivos-D los que aportan la afinidad y selectividad por el surco de anclaje (Garai et al. 2012), por lo que la utilización de aminoácidos D no debería afectar en gran medida a la eficacia del péptido. Los resultados que hemos obtenido confirman esta hipótesis, ya que la secreción de TNF α es inhibida en la misma medida por el péptido MEF2A-Cys con aminoácidos D y L, por lo que la síntesis de péptidos con aminoácidos D podría ser una estrategia válida para alargar la vida media del péptido. Es de destacar, sin embargo, que ambos péptidos, y en particular el D, mostraron en estos ensayos en monocitos efectos tóxicos a concentraciones similares a las concentraciones eficaces, lo que podría anticipar una ventana terapéutica limitada, que habría que explorar en mayor detalle.

En todo caso, los datos que hemos obtenido en el modelo de hiperalgesia en ratones, en el que el péptido con la secuencia de MEF2A es más potente que el inhibidor comercial SB203580, y sus efectos mucho más prolongados (hasta 8 días, mientras que el SB203580 sólo es eficaz durante 6h) sugieren que esta estrategia de inhibición de p38 puede ser de interés terapéutico.

5. Desarrollo de pequeñas moléculas inhibitoras de p38 a través del surco de anclaje.

Paralelamente al desarrollo de inhibidores peptídicos, se realizó un cribado virtual de una librería de 1 millón de compuestos sobre la estructura tridimensional descrita para p38. La búsqueda permitió identificar diferentes estructuras químicas para las que se ensayó su capacidad inhibitoria en experimentos *in vitro* y en la secreción de TNF α por la línea celular monocítica THP-1. Se obtuvieron dos compuestos con actividad en el rango bajo micromolar *in vitro* que, sin embargo, no fueron capaces de inhibir eficazmente la actividad de p38 en células, por lo que se realizó una segunda ronda de cribado dando prioridad a aquellas moléculas que cumplieran con las reglas de Lipinski para mejorar su eficacia en ensayos celulares. En esta segunda fase se identificó un grupo de moléculas de la familia de los benzo-oxadiazoles, que sí consiguieron mantener su capacidad inhibitoria en cultivos celulares en el mismo rango bajo micromolar. La optimización de este grupo de moléculas permitió desarrollar un compuesto que ha sido eficaz incluso en ensayos animales, el FGA-19. Los resultados obtenidos desde la inhibición *in vitro* hasta los ensayos celulares y la experimentación animal, parecen indicar que el efecto inhibitorio de la secreción de citoquinas y de la hiperalgesia inducida por inflamación de estos compuestos es a través de la inhibición de la ruta de p38. El patrón de inhibición en la secreción de citoquinas por esta familia de compuestos es muy similar al obtenido con el inhibidor de p38 SB203580: el compuesto STOCK2S-05380, químicamente relacionado con el FGA-19, inhibe la secreción de citoquinas cuya secreción es dependiente de p38 como TNF α o IL-6, y no de otras independientes de esa ruta como MCP-1 o IL-8. Nuestros resultados también indican que la presencia de sustituyentes metilo y cloro en las posiciones 2 y 5 en la estructura del FGA-19 son relevantes para el efecto deseado, lo que pone las bases para el desarrollo de compuestos con mejores propiedades inhibitorias, farmacocinéticas o de solubilidad.

Esta nueva estrategia de inhibición de p38 presenta un modo de acción que tiene el potencial de ser más selectivo y, por tanto, de evitar la toxicidad que han presentado otros inhibidores diseñados para unirse al bolsillo de unión a ATP, dominio mucho más conservado entre distintas familias de quinasas. Por ello, esta familia de inhibidores de p38 con estructura de benzo-oxadiazoles podrían no presentar los problemas tóxicos que los piridinil-imidazoles (SB203580) y las diaril-ureas (BIRB-796) han mostrado en ensayos clínicos (Dominguez et al. 2005; Iwano et al. 2011). Aunque los experimentos realizados en células y en animales y presentados en esta tesis no estaban diseñados para determinar la toxicidad sino la eficacia, las pruebas preliminares de muerte celular realizadas en THP-1 y en médula espinal indican que estos compuestos no afectan de forma importante a la viabilidad celular. Serían necesarios experimentos diseñados *ad hoc* en modelos preclínicos para confirmar este extremo.

Por otro lado, se ha sugerido que una inhibición total de p38 podría provocar efectos tóxicos. Por ejemplo, uno de los principales efectos conocidos de la inhibición de p38 es la sobreactivación de la ruta de JNK, que puede afectar a la viabilidad de algunos tipos celulares, y que ocurre por la pérdida de la retroalimentación negativa sobre quinasas de la ruta de las MAPK como MLK2/3 o TAK1 que también están controlando la actividad de JNK (Cheung et al. 2003). Sin embargo, en nuestros experimentos en monocitos THP-1 hemos comprobado que la activación de JNK también se inhibe por FGA-19, aunque en menor medida que la de p38. Desconocemos si este efecto es debido a una inhibición cruzada directa del compuesto o a que se ponen en marcha los mecanismos compensatorios antes aludidos. En ciertos contextos, una falta relativa de especificidad en el efecto de pequeñas moléculas no tiene por qué ser necesariamente un

inconveniente. En algunos casos, la inhibición de quinasas relacionadas puede ser incluso beneficiosa para el tratamiento de una enfermedad. Por ejemplo, cuando otras quinasas aparte de la diana cooperan en el inicio o progreso de la enfermedad, su inhibición conduce a un efecto más amplio, con lo que el efecto final del tratamiento contra la patología resulta más eficaz. Un caso paradigmático es el del Fostamatinib, inhibidor de Syk, que ha sido desarrollado para el tratamiento de la artritis reumatoide y se ha demostrado eficaz en análisis clínicos de fase II. Aparte de Syk además puede inhibir Flt-3, Retm, c-Kit y Lck y JAK-1/3 entre otras, y estos efectos pleiotrópicos aportan un beneficio terapéutico para el tratamiento de la artritis (Jakus et al. 2010).

Los ensayos clínicos con diversos inhibidores de p38 para la indicación de inflamación crónica no han dado hasta el momento resultados satisfactorios bien por efectos secundarios tóxicos o por falta de actividad *in vivo*. En este sentido, es de destacar que se han detectado niveles bajos de GRK2 en pacientes con enfermedades autoinmunes e inflamatorias como la artritis reumatoide o esclerosis múltiple (Penela et al. 2009), y que datos preliminares de nuestro grupo indican que la inhibición de la secreción de TNF α por FGA-19 es mayor en macrófagos GRK2^{+/-} que en células WT (Willemen et al. 2014), lo cual permite especular que estas moléculas serían particularmente activas en los diversos contextos inflamatorios donde se ha descrito una menor expresión de GRK2.

Por otra parte, se ha demostrado la importancia de p38 en la regulación del dolor de etiología inflamatoria en ratones y humanos (Kavelaars et al. 2011; Galan-Arriero et al. 2015) ya que p38 está sobreactivada en células de microglía de la médula espinal en modelos murinos de dolor neuropático, aunque es una indicación relativamente menos explorada ya que pocos laboratorios cuentan con la experiencia adecuada para realizar análisis pre-clínicos y clínicos para el tratamiento del dolor. En concreto, Array Biopharma ha realizado dos ensayos clínicos de Fase II en el tratamiento del dolor dental posoperatorio tras la extracción del tercer molar con resultados muy positivos con su inhibidor ARRY-797 (Remmers et al. 2008). Además, están realizando análisis clínicos con este mismo inhibidor en otros modelos como osteoartritis, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante y cardiomiopatía dilatada (Muchir et al. 2012) (<http://www.clinicaltrials.gov>).

Estudios realizados sobre el papel de GRK2 en hiperalgesia, demuestran que la reducción selectiva de los niveles de GRK2 únicamente en macrófagos, granulocitos y microglía (LysM-GRK2^{+/-}) en ratones con niveles normales de GRK2 en otros tipos celulares es suficiente para provocar la hiperalgesia inducida (Kavelaars et al. 2011). Se utilizaron estos ratones para comprobar si el inhibidor FGA-19 era eficaz en este modelo. Los resultados que hemos obtenido *in vivo* con esta familia de inhibidores son muy prometedores e incluso muestran algunas ventajas sobre los obtenidos con inhibidores establecidos para p38 en este modelo de dolor inflamatorio. En el caso del FGA-19, se consigue el mismo efecto analgésico a las 2h con una cantidad 10 veces menor de este compuesto que del SB239063: 0,5 μ g de FGA-19 frente a 5 μ g de SB239063 (ambos con pesos moleculares similares). Por otro lado, FGA-19 proporciona una inhibición del dolor mucho más prolongada que puede durar más de 5 días en lugar de transitoria como la de compuestos comerciales que se mantiene únicamente unas horas. La inyección de una sola dosis de FGA-19 fue suficiente para revertir la hiperalgesia lo cual indica que bloquear p38 únicamente en el componente inflamatorio de la hiperalgesia es clave para revertir la enfermedad, y confirma el efecto de nuestros compuestos en células inmunes *in vivo*.

DISCUSIÓN

Curiosamente, nuestros inhibidores consiguieron una reducción del dolor inflamatorio prolongada en el tiempo, al igual que se obtuvo con el péptido dirigido contra el surco de anclaje, lo que favorece la hipótesis de que este tipo de inhibidores pueden tener un mecanismo de inhibición terapéuticamente más ventajoso que la inhibición competitiva por el ATP. Esto podría explicarse por varios motivos. En primer lugar, nuestros inhibidores no reconocerían el bolsillo de unión de ATP, y no tendrían que competir con las altas concentraciones intracelulares de este nucleótido. Por ello, tendrían el potencial de ser más eficaces *in vivo* que otros inhibidores cuyo mecanismo es la competición por el ATP. En segundo lugar, nuestras moléculas podrían interactuar tanto con la proteína activa como con la inactiva, al contrario de lo que ocurre con los inhibidores alostéricos que provocan la conformación *DFG-out*, y que sólo pueden actuar sobre la proteína inactiva, con lo que tendrían menor efecto en condiciones en las que p38 está activa, precisamente aquellas más relacionadas con las patologías que se pretende combatir y en las que nuestros compuestos podrían tener un papel relevante.

En resumen, en este trabajo hemos caracterizado el efecto funcional de la regulación de p38 por la fosforilación en la treonina/serina 123 por parte de GRK2, aportando nuevos datos para entender el funcionamiento de esta compleja cascada de señalización celular. Nuestros resultados sugieren que la modulación por GRK2 puede afectar de modo significativo la transmisión de la señal en la ruta p38 no solamente previniendo su activación sino facilitando la selección preferente de determinados sustratos, lo que quizás podría ayudar a explicar por qué p38 puede ejercer funciones aparentemente contradictorias como la supervivencia y la apoptosis.

Por otra parte, hemos aprovechado la capacidad moduladora del surco de anclaje de p38 para desarrollar y patentar nuevas moléculas de potencial interés farmacológico. Se ha desarrollado un péptido inhibidor dirigido contra el surco de anclaje de p38 con una IC50 en rango bajo micromolar en experimentos *in vitro*, permeable a las membranas celulares, que parece que puede unirse a p38 de forma covalente mediante un puente disulfuro y que muestra una notable actividad en ensayos celulares en monocitos humanos y en modelos de hiperalgesia inflamatoria en ratones. El diseño de nuestro péptido permite plantear que otros péptidos similares podrían ser modificados de manera sencilla en su secuencia para generar un abanico de inhibidores potentes y específicos al menos para las MAP quinasas, que presentan este tipo de surco de anclaje.

En paralelo, hemos desarrollado una familia de inhibidores, del grupo de los benzo-oxadiazoles, también dirigidos contra el surco de anclaje de p38, que han demostrado ser capaces de inhibir la cascada de p38 *in vitro* y en modelos celulares en el rango bajo micromolar y ser eficaces en modelos animales de dolor inflamatorio crónico, donde muestran un impacto más potente y sobre todo más duradero que los inhibidores canónicos de p38. Aunque su potencia no sea competitiva para un uso farmacéutico, establece la plataforma para generar por mejora química u otros métodos, nuevos análogos que sean más eficaces, que puedan llegar a superar ensayos clínicos y aplicarse en el futuro para el tratamiento de algunas afecciones en las que p38 esté implicada.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. GRK2 puede fosforilar a las isoformas p38 α y p38 β 2 en un residuo equivalente a la treonina 123, situado en la entrada del surco de anclaje. El análisis del impacto funcional de esa fosforilación con mutantes fosfomiméticos sugiere que la fosforilación de p38 por GRK2 provoca una reducción en la interacción con sustratos y con activadores, así como disminuye su actividad catalítica, de forma más marcada sobre sustratos dependientes de interacciones mediadas por el surco de anclaje. Por otra parte, la fosforilación de p38 por GRK2 parece ser preferencial sobre la forma inactiva de p38 y puede ser revertida por fosfatasa como PP2A. Estos datos apoyan la existencia de una relación funcional inversa entre GRK2 y p38 en diversos contextos fisiopatológicos y sugieren la hipótesis de que GRK2 podría estar redirigiendo selectivamente la actividad de p38 hacia determinados sustratos.
2. Se puede conseguir una inhibición de la actividad molecular y celular de p38 con una potencia de bajo micromolar mediante el uso de péptidos que contienen dominios-D diseñados para interactuar con el surco de anclaje de esta quinasa.
3. En particular, el péptido TAT-MEF2AxCys, basado en la secuencia de MEF2A, es el péptido inhibidor más potente identificado en este trabajo, posiblemente porque es capaz de formar un puente disulfuro covalente con la cisteína 119 de p38, ya que la inhibición observada *in vitro* por este péptido se revierte en presencia de agentes reductores. TAT-MEF2AxCys inhibe la activación y actividad de p38 con una IC₅₀ en rango bajo micromolar en experimentos *in vitro* e inhibe la secreción de citoquinas inflamatorias (TNF α) por células monocíticas humanas (THP-1) estimuladas con lipopolisacárido bacteriano con una IC₅₀ en el rango bajo micromolar, aunque también afectan a la viabilidad de estas células en el mismo rango de concentraciones.
4. Hemos identificado y desarrollado, mediante sucesivas rondas de cribado virtual, ensayos *in vitro* y celulares y modificación química, una familia de compuestos inhibidores del grupo de los benzo-oxadiazoles, también dirigidos contra el surco de anclaje de p38 y cuyo cabeza de serie es el compuesto denominado FGA-19, que reducen eficazmente la activación y actividad de p38 *in vitro*, así como la secreción de TNF α por células THP-1, a unas concentraciones en el rango bajo micromolar y sin afectar a la viabilidad de las células en el mismo rango de concentraciones. La presencia de sustituyentes en las posiciones 2 y 5 en la estructura del FGA-19 son importantes para su actividad.
5. Tanto el péptido TAT-MEF2AxCys como el compuesto FGA-19, son capaces de revertir la hiperalgesia inducida por carragenato en un modelo de hiperalgesia inflamatoria en ratones GRK2^{+/-}, proceso asociado con la microglía y dependiente de la actividad de p38, durante al menos 5 días, mejorando el efecto analgésico y con efectos mucho más prolongados que el inhibidor comercial de p38 SB239063. Estos datos sugieren que estrategias de inhibición dirigidas al surco de anclaje de p38 pueden ser de interés terapéutico.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Ahn, Y. M., M. Clare, et al. (2010). "Switch control pocket inhibitors of p38-MAP kinase. Durable type II inhibitors that do not require binding into the canonical ATP hinge region." *Bioorg Med Chem Lett* **20**(19): 5793-5798.
- Akella, R., T. M. Moon, et al. (2008). "Unique MAP Kinase binding sites." *Biochim Biophys Acta* **1784**(1): 48-55.
- Allen, M., L. Svensson, et al. (2000). "Deficiency of the stress kinase p38alpha results in embryonic lethality: characterization of the kinase dependence of stress responses of enzyme-deficient embryonic stem cells." *J Exp Med* **191**(5): 859-870.
- Arabacilar, P. and M. Marber (2015). "The case for inhibiting p38 mitogen-activated protein kinase in heart failure." *Front Pharmacol* **6**: 102.
- Asano, Y., A. Nakazawa, et al. (1989). "Properties of a novel D-stereospecific aminopeptidase from *Ochrobactrum anthropi*." *J Biol Chem* **264**(24): 14233-14239.
- Auger-Messier, M., F. Accornero, et al. (2013). "Unrestrained p38 MAPK activation in *Dusp1/4* double-null mice induces cardiomyopathy." *Circ Res* **112**(1): 48-56.
- Beautrait, A., K. R. Michalski, et al. (2014). "Mapping the putative G protein-coupled receptor (GPCR) docking site on GPCR kinase 2: insights from intact cell phosphorylation and recruitment assays." *J Biol Chem* **289**(36): 25262-25275.
- Beenstock, J., S. Ben-Yehuda, et al. (2014). "The p38beta mitogen-activated protein kinase possesses an intrinsic autophosphorylation activity, generated by a short region composed of the alpha-G helix and MAPK insert." *J Biol Chem* **289**(34): 23546-23556.
- Bellahcene, M., S. Jacquet, et al. (2006). "Activation of p38 mitogen-activated protein kinase contributes to the early cardiodepressant action of tumor necrosis factor." *J Am Coll Cardiol* **48**(3): 545-555.
- Ben-Levy, R., I. A. Leighton, et al. (1995). "Identification of novel phosphorylation sites required for activation of MAPKAP kinase-2." *EMBO J* **14**(23): 5920-5930.
- Benovic, J. L., R. H. Strasser, et al. (1986). "Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(9): 2797-2801.
- Beydoun, T., C. Deloche, et al. (2015). "Subconjunctival injection of XG-102, a JNK inhibitor peptide, in patients with intraocular inflammation: a safety and tolerability study." *J Ocul Pharmacol Ther* **31**(2): 93-99.
- Blanco-Aparicio, C., J. Torres, et al. (1999). "A novel regulatory mechanism of MAP kinases activation and nuclear translocation mediated by PKA and the PTP-SL tyrosine phosphatase." *J Cell Biol* **147**(6): 1129-1136.
- Bogoyevitch, M. A., R. K. Barr, et al. (2005). "Peptide inhibitors of protein kinases-discovery, characterisation and use." *Biochim Biophys Acta* **1754**(1-2): 79-99.
- Bonilla-Hernan, M. G., M. E. Miranda-Carus, et al. (2011). "New drugs beyond biologics in rheumatoid arthritis: the kinase inhibitors." *Rheumatology (Oxford)* **50**(9): 1542-1550.
- Bonny, C., A. Oberson, et al. (2001). "Cell-permeable peptide inhibitors of JNK: novel blockers of beta-cell death." *Diabetes* **50**(1): 77-82.

- Boston, S. R., R. Deshmukh, et al. (2011). "Characterization of ERK docking domain inhibitors that induce apoptosis by targeting Rsk-1 and caspase-9." BMC Cancer **11**: 7.
- Brock, R. (2014). "The uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides: putting the puzzle together." Bioconjug Chem **25**(5): 863-868.
- Brown, A. M. (2001). "A step-by-step guide to non-linear regression analysis of experimental data using a Microsoft Excel spreadsheet." Comput Methods Programs Biomed **65**(3): 191-200.
- Cargnello, M. and P. P. Roux (2011). "Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases." Microbiol Mol Biol Rev **75**(1): 50-83.
- Carter, L., K. Litwiler, et al. (2008). ARRY-797, a novel p38 MAP kinase inhibitor: results of a 14-day phase I study (abstract 359). American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, San Francisco, CA.
- Cohen, P. (2009). "Targeting protein kinases for the development of anti-inflammatory drugs." Curr Opin Cell Biol **21**(2): 317-324.
- Comess, K. M., C. Sun, et al. (2011). "Discovery and characterization of non-ATP site inhibitors of the mitogen activated protein (MAP) kinases." ACS Chem Biol **6**(3): 234-244.
- Copolovici, D. M., K. Langel, et al. (2014). "Cell-penetrating peptides: design, synthesis, and applications." ACS Nano **8**(3): 1972-1994.
- Coulombe, P. and S. Meloche (2007). "Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions." Biochim Biophys Acta **1773**(8): 1376-1387.
- Coulthard, L. R., D. E. White, et al. (2009). "p38(MAPK): stress responses from molecular mechanisms to therapeutics." Trends Mol Med **15**(8): 369-379.
- Cross, H. R., M. Li, et al. (2009). "Effect of p38 MAP kinases on contractility and ischemic injury in intact heart." Acta Physiol Hung **96**(3): 307-323.
- Cuadrado, A. and A. R. Nebreda (2010). "Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling." Biochem J **429**(3): 403-417.
- Cuenda, A. and S. Rousseau (2007). "p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases." Biochim Biophys Acta **1773**(8): 1358-1375.
- Chang, C. I., B. E. Xu, et al. (2002). "Crystal structures of MAP kinase p38 complexed to the docking sites on its nuclear substrate MEF2A and activator MKK3b." Mol Cell **9**(6): 1241-1249.
- Cheung, P. C., D. G. Campbell, et al. (2003). "Feedback control of the protein kinase TAK1 by SAPK2a/p38alpha." Embo J **22**(21): 5793-5805.
- Chung, K. F. (2011). "p38 mitogen-activated protein kinase pathways in asthma and COPD." Chest **139**(6): 1470-1479.
- Davidson, W., L. Frego, et al. (2004). "Discovery and characterization of a substrate selective p38alpha inhibitor." Biochemistry **43**(37): 11658-11671.
- De Nicola, G. F., E. D. Martin, et al. (2013). "Mechanism and consequence of the autoactivation of p38alpha mitogen-activated protein kinase promoted by TAB1." Nat Struct Mol Biol **20**(10): 1182-1190.
- Denise Martin, E., G. F. De Nicola, et al. (2012). "New therapeutic targets in cardiology: p38 alpha mitogen-activated protein kinase for ischemic heart disease." Circulation **126**(3): 357-368.
- Diskin, R., D. Engelberg, et al. (2008). "A novel lipid binding site formed by the MAP kinase insert in p38 alpha." J Mol Biol **375**(1): 70-79.

- Diskin, R., M. Lebediker, et al. (2007). "Structures of p38alpha active mutants reveal conformational changes in L16 loop that induce autophosphorylation and activation." *J Mol Biol* **365**(1): 66-76.
- Dominguez, C., D. A. Powers, et al. (2005). "p38 MAP kinase inhibitors: many are made, but few are chosen." *Curr Opin Drug Discov Devel* **8**(4): 421-430.
- Eijkelkamp, N., C. J. Heijnen, et al. (2012). "G protein-coupled receptor kinase 6 acts as a critical regulator of cytokine-induced hyperalgesia by promoting phosphatidylinositol 3-kinase and inhibiting p38 signaling." *Mol Med* **18**: 556-564.
- Eijkelkamp, N., C. J. Heijnen, et al. (2010). "GRK2: a novel cell-specific regulator of severity and duration of inflammatory pain." *J Neurosci* **30**(6): 2138-2149.
- Elorza, A., P. Penela, et al. (2003). "MAPK-dependent degradation of G protein-coupled receptor kinase 2." *J Biol Chem* **278**(31): 29164-29173.
- Engel, K., A. Kotlyarov, et al. (1998). "Leptomycin B-sensitive nuclear export of MAPKAP kinase 2 is regulated by phosphorylation." *EMBO J* **17**(12): 3363-3371.
- Engelman, J. A., M. P. Lisanti, et al. (1998). "Specific inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase block 3T3-L1 adipogenesis." *J Biol Chem* **273**(48): 32111-32120.
- Enslin, H., D. M. Brancho, et al. (2000). "Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms." *Embo J* **19**(6): 1301-1311.
- Evron, T., T. L. Daigle, et al. (2012). "GRK2: multiple roles beyond G protein-coupled receptor desensitization." *Trends Pharmacol Sci* **33**(3): 154-164.
- Filomia, F., F. De Rienzo, et al. (2010). "Insights into MAPK p38alpha DFG flip mechanism by accelerated molecular dynamics." *Bioorg Med Chem* **18**(18): 6805-6812.
- Fischer, P. M. (2003). "The design, synthesis and application of stereochemical and directional peptide isomers: a critical review." *Curr Protein Pept Sci* **4**(5): 339-356.
- Fu, J., X. Meng, et al. (2008). "Inhibition of inflammation by a p38 MAP kinase targeted cell permeable peptide." *Med Chem* **4**(6): 597-604.
- Galan-Arriero, I., G. Avila-Martin, et al. (2015). "Early treatment with UR13870, a novel inhibitor of p38alpha mitogenously activated protein kinase, prevents hyperreflexia and anxiety behaviors, in the spared nerve injury model of neuropathic pain." *Neurosci Lett*.
- Garai, A., A. Zeke, et al. (2012). "Specificity of linear motifs that bind to a common mitogen-activated protein kinase docking groove." *Sci Signal* **5**(245): ra74.
- Garcia-Guerra, L., R. Vila-Bedmar, et al. (2014). "Skeletal muscle myogenesis is regulated by G protein-coupled receptor kinase 2." *J Mol Cell Biol* **6**(4): 299-311.
- Genovese, M. C. (2009). "Inhibition of p38: has the fat lady sung?" *Arthritis Rheum* **60**(2): 317-320.
- Gil-Redondo, R. (2010). Desarrollo y utilización de métodos computacionales en la mejora del proceso de obtención de nuevos fármacos. *Departamento de Biología Molecular*, Universidad Autónoma de Madrid.
- Godl, K., J. Wissing, et al. (2003). "An efficient proteomics method to identify the cellular targets of protein kinase inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(26): 15434-15439.

- Gogl, G., I. Toro, et al. (2013). "Protein-peptide complex crystallization: a case study on the ERK2 mitogen-activated protein kinase." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **69**(Pt 3): 486-489.
- Goldstein, D. M., A. Kuglstatter, et al. (2010). "Selective p38alpha inhibitors clinically evaluated for the treatment of chronic inflammatory disorders." J Med Chem **53**(6): 2345-2353.
- Gong, X., X. Ming, et al. (2010). "Mechanisms regulating the nuclear translocation of p38 MAP kinase." J Cell Biochem **110**(6): 1420-1429.
- Gordon, J. C., J. B. Myers, et al. (2005). "H⁺⁺: a server for estimating pK_as and adding missing hydrogens to macromolecules." Nucleic Acids Res **33**(Web Server issue): W368-371.
- Gorska, M. M., Q. Liang, et al. (2007). "MK2 controls the level of negative feedback in the NF-kappaB pathway and is essential for vascular permeability and airway inflammation." J Exp Med **204**(7): 1637-1652.
- Gum, R. J. and P. R. Young (1999). "Identification of two distinct regions of p38 MAPK required for substrate binding and phosphorylation." Biochem Biophys Res Commun **266**(1): 284-289.
- Gupta, J. and A. R. Nebreda (2015). "Roles of p38alpha mitogen-activated protein kinase in mouse models of inflammatory diseases and cancer." FEBS J **282**(10): 1841-1857.
- Haeusgen, W., L. Tueffers, et al. (2014). "Map2k4delta - identification and functional characterization of a novel Map2k4 splice variant." Biochim Biophys Acta **1843**(5): 875-884.
- Hammaker, D. and G. S. Firestein (2010). "'Go upstream, young man': lessons learned from the p38 saga." Ann Rheum Dis **69** Suppl 1: i77-82.
- Hancock, C. N., A. Macias, et al. (2005). "Identification of novel extracellular signal-regulated kinase docking domain inhibitors." J Med Chem **48**(14): 4586-4595.
- He, Q., C. Huang, et al. (2013). "alpha-Naphthoflavone inhibits 3T3-L1 pre-adipocytes differentiation via modulating p38MAPK signaling." Int J Clin Exp Pathol **6**(2): 168-178.
- Hegen, M., M. Gaestel, et al. (2006). "MAPKAP kinase 2-deficient mice are resistant to collagen-induced arthritis." J Immunol **177**(3): 1913-1917.
- Hill, R. J., K. Dabbagh, et al. (2008). "Pamapimod, a novel p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor: preclinical analysis of efficacy and selectivity." J Pharmacol Exp Ther **327**(3): 610-619.
- Hitti, E., T. Iakovleva, et al. (2006). "Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 regulates tumor necrosis factor mRNA stability and translation mainly by altering tristetraprolin expression, stability, and binding to adenine/uridine-rich element." Mol Cell Biol **26**(6): 2399-2407.
- Hommo, T., M. Pesu, et al. (2015). "Regulation of Inflammatory Cytokine Production by MKP-5 in Macrophages." Basic Clin Pharmacol Toxicol **117**(2): 96-104.
- Huang, C. Y. and T. H. Tan (2012). "DUSPs, to MAP kinases and beyond." Cell Biosci **2**(1): 24.
- Irwin, J. J., T. Sterling, et al. (2012). "ZINC: a free tool to discover chemistry for biology." J Chem Inf Model **52**(7): 1757-1768.
- Iwano, S., Y. Asaoka, et al. (2011). "A possible mechanism for hepatotoxicity induced by BIRB-796, an orally active p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor." J Appl Toxicol **31**(7): 671-677.
- Jackson, A. L., S. R. Bartz, et al. (2003). "Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi." Nat Biotechnol **21**(6): 635-637.

- Jakus, Z., E. Simon, et al. (2010). "Genetic deficiency of Syk protects mice from autoantibody-induced arthritis." *Arthritis Rheum* **62**(7): 1899-1910.
- Jiang, Y., C. Chen, et al. (1996). "Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta)." *J Biol Chem* **271**(30): 17920-17926.
- Jones, A. T. and E. J. Sayers (2012). "Cell entry of cell penetrating peptides: tales of tails wagging dogs." *J Control Release* **161**(2): 582-591.
- Kavelaars, A., N. Eijkelkamp, et al. (2011). "Microglial GRK2: a novel regulator of transition from acute to chronic pain." *Brain Behav Immun* **25**(6): 1055-1060.
- Kim, J. H., E. B. Cho, et al. (2015). "Emetine inhibits migration and invasion of human non-small-cell lung cancer cells via regulation of ERK and p38 signaling pathways." *Chem Biol Interact.*
- Kollman, P. A., I. Massova, et al. (2000). "Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models." *Acc Chem Res* **33**(12): 889-897.
- Kuma, Y., D. G. Campbell, et al. (2004). "Identification of glycogen synthase as a new substrate for stress-activated protein kinase 2b/p38beta." *Biochem J* **379**(Pt 1): 133-139.
- Kumar, S., P. C. McDonnell, et al. (1997). "Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles." *Biochem Biophys Res Commun* **235**(3): 533-538.
- Lamba, V. and I. Ghosh (2012). "New directions in targeting protein kinases: focusing upon true allosteric and bivalent inhibitors." *Curr Pharm Des* **18**(20): 2936-2945.
- Laufer, S. A., G. K. Wagner, et al. (2003). "Novel substituted pyridinyl imidazoles as potent anticytokine agents with low activity against hepatic cytochrome P450 enzymes." *J Med Chem* **46**(15): 3230-3244.
- Laughlin, J. D., J. C. Nwachukwu, et al. (2012). "Structural mechanisms of allostery and autoinhibition in JNK family kinases." *Structure* **20**(12): 2174-2184.
- Lauretti, E. and D. Pratico (2015). "Glucose deprivation increases tau phosphorylation via P38 mitogen-activated protein kinase." *Aging Cell.*
- Lavecchia, A. and C. Di Giovanni (2013). "Virtual screening strategies in drug discovery: a critical review." *Curr Med Chem* **20**(23): 2839-2860.
- Lee, M. R. and C. Dominguez (2005). "MAP kinase p38 inhibitors: clinical results and an intimate look at their interactions with p38alpha protein." *Curr Med Chem* **12**(25): 2979-2994.
- Li, Q., N. Zhang, et al. (2008). "Determinants that control the distinct subcellular localization of p38alpha-PRAK and p38beta-PRAK complexes." *J Biol Chem* **283**(16): 11014-11023.
- Lin, X., M. Wang, et al. (2014). "p38 MAPK: a potential target of chronic pain." *Curr Med Chem* **21**(38): 4405-4418.
- Lipinski, C. A., F. Lombardo, et al. (2001). "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings." *Adv Drug Deliv Rev* **46**(1-3): 3-26.
- Liu, Q., Y. Sabnis, et al. (2013). "Developing irreversible inhibitors of the protein kinase cysteinome." *Chem Biol* **20**(2): 146-159.
- Liu, Y. and N. S. Gray (2006). "Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations." *Nat Chem Biol* **2**(7): 358-364.
- Lu, G., Y. J. Kang, et al. (2006). "TAB-1 modulates intracellular localization of p38 MAP kinase and downstream signaling." *J Biol Chem* **281**(9): 6087-6095.

- Lukas, S. M., R. R. Kroe, et al. (2004). "Catalysis and function of the p38 alpha.MK2a signaling complex." *Biochemistry* **43**(31): 9950-9960.
- Mace, G., M. Miaczynska, et al. (2005). "Phosphorylation of EEA1 by p38 MAP kinase regulates mu opioid receptor endocytosis." *Embo J* **24**(18): 3235-3246.
- Mahtani, K. R., M. Brook, et al. (2001). "Mitogen-activated protein kinase p38 controls the expression and posttranslational modification of tristetraprolin, a regulator of tumor necrosis factor alpha mRNA stability." *Mol Cell Biol* **21**(19): 6461-6469.
- Manning, G., D. B. Whyte, et al. (2002). "The protein kinase complement of the human genome." *Science* **298**(5600): 1912-1934.
- Martin, E. D., R. Bassi, et al. (2015). "p38 MAPK in cardioprotection - are we there yet?" *Br J Pharmacol* **172**(8): 2101-2113.
- Martz, K. E., A. Dorn, et al. (2012). "Targeting the hinge glycine flip and the activation loop: novel approach to potent p38alpha inhibitors." *J Med Chem* **55**(17): 7862-7874.
- Mayor, F., Jr., M. Jurado-Pueyo, et al. (2007). "Interfering with MAP kinase docking interactions: implications and perspective for the p38 route." *Cell Cycle* **6**(5): 528-533.
- Mayor, F., Jr., E. Lucas, et al. (2011). "G Protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2): A novel modulator of insulin resistance." *Arch Physiol Biochem* **117**(3): 125-130.
- Meng, W., L. L. Swenson, et al. (2002). "Structure of mitogen-activated protein kinase-activated protein (MAPKAP) kinase 2 suggests a bifunctional switch that couples kinase activation with nuclear export." *J Biol Chem* **277**(40): 37401-37405.
- Mittelstadt, P. R., H. Yamaguchi, et al. (2009). "T cell receptor-mediated activation of p38{alpha} by mono-phosphorylation of the activation loop results in altered substrate specificity." *J Biol Chem* **284**(23): 15469-15474.
- Moallem, S. A., F. Hadizadeh, et al. (2012). "Synthesis and Evaluation of Pyridinyltriazoles as Inhibitors of p38 MAP Kinase." *Iran J Basic Med Sci* **15**(4): 945-950.
- Montero, D., C. Tachibana, et al. (2013). "Intracellular glutathione pools are heterogeneously concentrated." *Redox Biol* **1**: 508-513.
- Mooney, L. M. and A. J. Whitmarsh (2004). "Docking interactions in the c-Jun N-terminal kinase pathway." *J Biol Chem* **279**(12): 11843-11852.
- Morreale, A., R. Gil-Redondo, et al. (2007). "A new implicit solvent model for protein-ligand docking." *Proteins* **67**(3): 606-616.
- Muchir, A., W. Wu, et al. (2012). "Abnormal p38alpha mitogen-activated protein kinase signaling in dilated cardiomyopathy caused by lamin A/C gene mutation." *Hum Mol Genet* **21**(19): 4325-4333.
- Munoz, L. and A. J. Ammit (2010). "Targeting p38 MAPK pathway for the treatment of Alzheimer's disease." *Neuropharmacology* **58**(3): 561-568.
- Murga, C., A. Ruiz-Gomez, et al. (1996). "High affinity binding of beta-adrenergic receptor kinase to microsomal membranes. Modulation of the activity of bound kinase by heterotrimeric G protein activation." *J Biol Chem* **271**(2): 985-994.
- Ndong, C., R. P. Landry, et al. (2012). "Mitogen activated protein kinase phosphatase-1 prevents the development of tactile sensitivity in a rodent model of neuropathic pain." *Mol Pain* **8**: 34.
- Nguyen, T., Z. Ruan, et al. (2015). "Co-conserved MAPK features couple D-domain docking groove to distal allosteric sites via the C-terminal flanking tail." *PLoS One* **10**(3): e0119636.

- Ohren, J. F., H. Chen, et al. (2004). "Structures of human MAP kinase kinase 1 (MEK1) and MEK2 describe novel noncompetitive kinase inhibition." Nat Struct Mol Biol **11**(12): 1192-1197.
- Olivera, D. L., J. T. Laydon, et al. (1993). "Effects of pyridinyl imidazole compounds on murine TNF-alpha production." Agents Actions **39 Spec No**: C55-57.
- Olzinski, A. R., T. A. McCafferty, et al. (2005). "Hypertensive target organ damage is attenuated by a p38 MAPK inhibitor: role of systemic blood pressure and endothelial protection." Cardiovasc Res **66**(1): 170-178.
- Owens, D. M. and S. M. Keyse (2007). "Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases." Oncogene **26**(22): 3203-3213.
- Pargellis, C., L. Tong, et al. (2002). "Inhibition of p38 MAP kinase by utilizing a novel allosteric binding site." Nat Struct Biol **9**(4): 268-272.
- Penela, P., C. Ribas, et al. (2009). "New roles of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) in cell migration." Cell Adh Migr **3**(1): 19-23.
- Penela, P., C. Ribas, et al. (2003). "Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases." Cell Signal **15**(11): 973-981.
- Perdiguero, E., V. Ruiz-Bonilla, et al. (2007). "Genetic analysis of p38 MAP kinases in myogenesis: fundamental role of p38alpha in abrogating myoblast proliferation." EMBO J **26**(5): 1245-1256.
- Peregrin, S., M. Jurado-Pueyo, et al. (2006). "Phosphorylation of p38 by GRK2 at the docking groove unveils a novel mechanism for inactivating p38MAPK." Curr Biol **16**(20): 2042-2047.
- Pereira, L., A. Igea, et al. (2013). "Inhibition of p38 MAPK sensitizes tumour cells to cisplatin-induced apoptosis mediated by reactive oxygen species and JNK." EMBO Mol Med **5**(11): 1759-1774.
- Perez, C. and A. R. Ortiz (2001). "Evaluation of docking functions for protein-ligand docking." J Med Chem **44**(23): 3768-3785.
- Peti, W. and R. Page (2013). "Molecular basis of MAP kinase regulation." Protein Sci **22**(12): 1698-1710.
- Petrich, B. G. and Y. Wang (2004). "Stress-activated MAP kinases in cardiac remodeling and heart failure; new insights from transgenic studies." Trends Cardiovasc Med **14**(2): 50-55.
- Pires-daSilva, A. and R. J. Sommer (2003). "The evolution of signalling pathways in animal development." Nat Rev Genet **4**(1): 39-49.
- Prabhala, P., K. Bunge, et al. (2015). "Temporal regulation of cytokine mRNA expression by tristetraprolin: dynamic control by p38 MAPK and MKP-1." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **308**(9): L973-980.
- Raingaud, J., A. J. Whitmarsh, et al. (1996). "MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway." Mol Cell Biol **16**(3): 1247-1255.
- Ramsey, J. D. and N. H. Flynn (2015). "Cell-penetrating peptides transport therapeutics into cells." Pharmacol Ther.
- Remmers, A. E., C. Martinez, et al. (2008). Potent Clinical Anti-inflammatory and Analgesic Activity of a Novel p38α Inhibitor ARRY-797. Proceeding of the American College of Rheumatology 2008 Annual Meeting.
- Reynolds, C. H., A. R. Nebreda, et al. (1997). "Reactivating kinase/p38 phosphorylates tau protein in vitro." J Neurochem **69**(1): 191-198.

- Rizzo, R. C., J. Tirado-Rives, et al. (2001). "Estimation of binding affinities for HEPT and nevirapine analogues with HIV-1 reverse transcriptase via Monte Carlo simulations." *J Med Chem* **44**(2): 145-154.
- Roskoski, R., Jr. (2015). "A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors." *Pharmacol Res.*
- Roux, P. P., S. A. Richards, et al. (2003). "Phosphorylation of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) regulates extracellular signal-regulated kinase docking and RSK activity." *Mol Cell Biol* **23**(14): 4796-4804.
- Rubio-Perez, J. M. and J. M. Morillas-Ruiz (2012). "A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines." *ScientificWorldJournal* **2012**: 756357.
- Ruiz-Gomez, A., J. Humrich, et al. (2000). "Phosphorylation of phosducin and phosducin-like protein by G protein-coupled receptor kinase 2." *J Biol Chem* **275**(38): 29724-29730.
- Sadowski, J., J. Gasteiger, et al. (1994). "Comparison of Automatic Three-Dimensional Model Builders Using 639 X-Ray Structures." *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **34**(4): 1000-1008.
- Salvador, J. M., P. R. Mittelstadt, et al. (2005). "Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases." *Nat Immunol* **6**(4): 390-395.
- Sato, P. Y., J. K. Chuprun, et al. (2015). "The evolving impact of g protein-coupled receptor kinases in cardiac health and disease." *Physiol Rev* **95**(2): 377-404.
- Saxena, M., S. Williams, et al. (1999). "Crosstalk between cAMP-dependent kinase and MAP kinase through a protein tyrosine phosphatase." *Nat Cell Biol* **1**(5): 305-311.
- Schnieders, M. J., T. S. Kaoud, et al. (2012). "Computational insights for the discovery of non-ATP competitive inhibitors of MAP kinases." *Curr Pharm Des* **18**(9): 1173-1185.
- Silverstein, S. M. (2014) Efficacy and Safety of XG-102 in Reduction of Post-cataract Surgery Intraocular Inflammation. ClinicalTrials.gov(Internet) Bethesda (MD): National Library of Medicine (USA). NLM Id: NCT02235272
- Steinberg, S. F. (2008). "Structural basis of protein kinase C isoform function." *Physiol Rev* **88**(4): 1341-1378.
- Stewart, J. J. (1990). "MOPAC: a semiempirical molecular orbital program." *J Comput Aided Mol Des* **4**(1): 1-105.
- Sundaresan, P. and R. W. Farndale (2002). "P38 mitogen-activated protein kinase dephosphorylation is regulated by protein phosphatase 2A in human platelets activated by collagen." *FEBS Lett* **528**(1-3): 139-144.
- Surinkaew, S., S. Kumphune, et al. (2013). "Inhibition of p38 MAPK during ischemia, but not reperfusion, effectively attenuates fatal arrhythmia in ischemia/reperfusion heart." *J Cardiovasc Pharmacol* **61**(2): 133-141.
- Svensson, C. I., B. Fitzsimmons, et al. (2005). "Spinal p38beta isoform mediates tissue injury-induced hyperalgesia and spinal sensitization." *J Neurochem* **92**(6): 1508-1520.
- Swann, S. L., P. J. Merta, et al. (2010). "Biochemical and biophysical characterization of unique switch pocket inhibitors of p38alpha." *Bioorg Med Chem Lett* **20**(19): 5787-5792.
- Tanoue, T., R. Maeda, et al. (2001). "Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions." *EMBO J* **20**(3): 466-479.

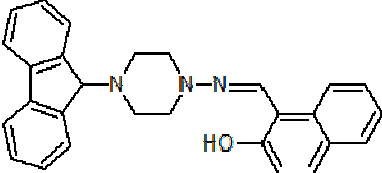
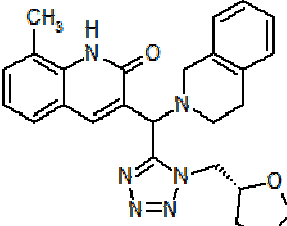
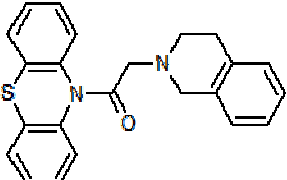
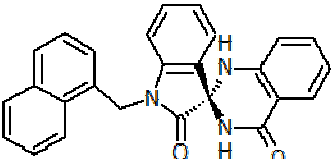
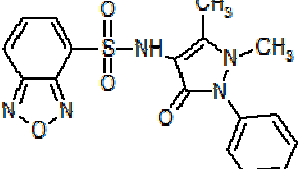
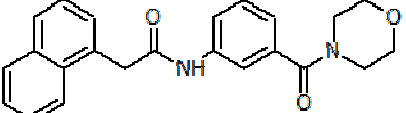
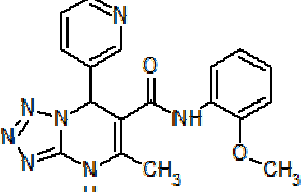
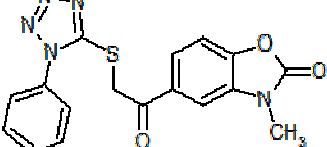
- ter Haar, E., P. Prabhakar, et al. (2007). "Crystal structure of the p38 alpha-MAPK kinase 2 heterodimer." *J Biol Chem* **282**(13): 9733-9739.
- Thornton, T. M., G. Pedraza-Alva, et al. (2008). "Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation." *Science* **320**(5876): 667-670.
- Thouverey, C. and J. Caverzasio (2015). "Focus on the p38 MAPK signaling pathway in bone development and maintenance." *Bonekey Rep* **4**: 711.
- Tiedje, C., H. Holtmann, et al. (2014). "The role of mammalian MAPK signaling in regulation of cytokine mRNA stability and translation." *J Interferon Cytokine Res* **34**(4): 220-232.
- Toh, M. L., Y. Yang, et al. (2004). "Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1, a negative regulator of the mitogen-activated protein kinases, in rheumatoid arthritis: up-regulation by interleukin-1beta and glucocorticoids." *Arthritis Rheum* **50**(10): 3118-3128.
- Tong, S. E., S. E. Daniels, et al. (2012). "Novel p38alpha mitogen-activated protein kinase inhibitor shows analgesic efficacy in acute postsurgical dental pain." *J Clin Pharmacol* **52**(5): 717-728.
- Turpeinen, T., R. Nieminen, et al. (2010). "Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 negatively regulates the expression of interleukin-6, interleukin-8, and cyclooxygenase-2 in A549 human lung epithelial cells." *J Pharmacol Exp Ther* **333**(1): 310-318.
- Tzarum, N., N. Komornik, et al. (2013). "DEF pocket in p38alpha facilitates substrate selectivity and mediates autophosphorylation." *J Biol Chem* **288**(27): 19537-19547.
- Vives, E., P. Brodin, et al. (1997). "A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus." *J Biol Chem* **272**(25): 16010-16017.
- Wang, K., M. Murcia, et al. (2004). "Gaussian mapping of chemical fragments in ligand binding sites." *J Comput Aided Mol Des* **18**(2): 101-118.
- Wang, P., H. Ouyang, et al. (2015). "Antinociceptive effect of intrathecal amiloride on neuropathic pain in rats." *Neurosci Lett*.
- White, A., C. A. Pargellis, et al. (2007). "Molecular basis of MAPK-activated protein kinase 2:p38 assembly." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(15): 6353-6358.
- Willemen, H. L., P. M. Campos, et al. (2014). "A novel p38 MAPK docking-groove-targeted compound is a potent inhibitor of inflammatory hyperalgesia." *Biochem J* **459**(3): 427-439.
- Willemen, H. L., N. Eijkelkamp, et al. (2010). "Microglial/macrophage GRK2 determines duration of peripheral IL-1beta-induced hyperalgesia: contribution of spinal cord CX3CR1, p38 and IL-1 signaling." *Pain* **150**(3): 550-560.
- Xin, F. and J. Wu (2013). "Crystal structure of the p38alpha MAP kinase in complex with a docking peptide from TAB1." *Sci China Life Sci* **56**(7): 653-660.
- Yan, X., X. Rui, et al. (2015). "Baicalein inhibits the invasion of gastric cancer cells by suppressing the activity of the p38 signaling pathway." *Oncol Rep* **33**(2): 737-743.
- Yang, S. H., A. D. Sharrocks, et al. (2013). "MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation." *Gene* **513**(1): 1-13.
- Zehorai, E. and R. Seger (2014). "Beta-like importins mediate the nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases." *Mol Cell Biol* **34**(2): 259-270.
- Zhang, D., L. Wang, et al. (2015). "Vacuolar protein sorting 4B regulates apoptosis of intestinal epithelial cells via p38 MAPK in Crohn's disease." *Exp Mol Pathol* **98**(1): 55-64.

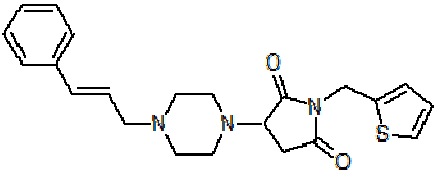
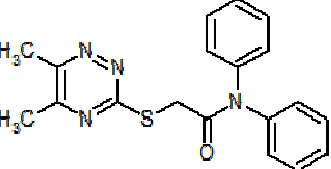
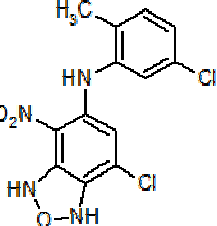
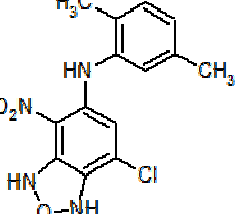
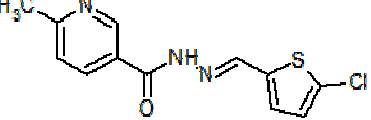
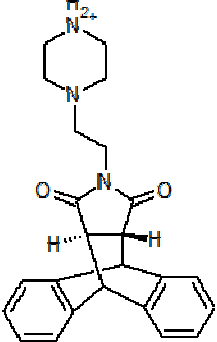
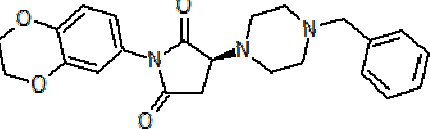
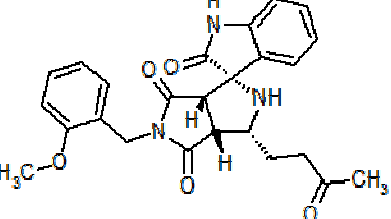
BIBLIOGRAFÍA

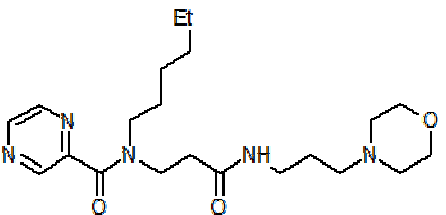
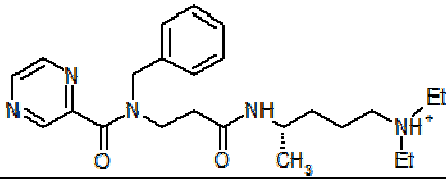
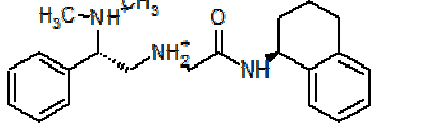
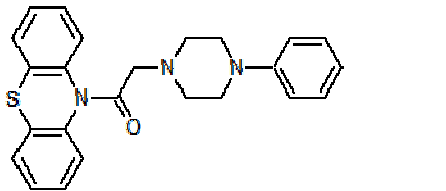
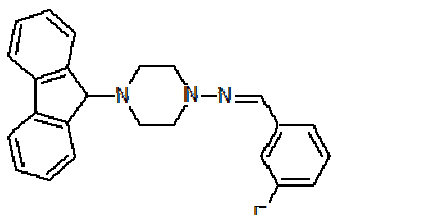
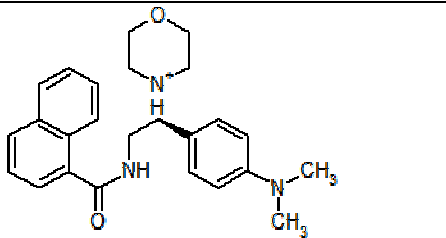
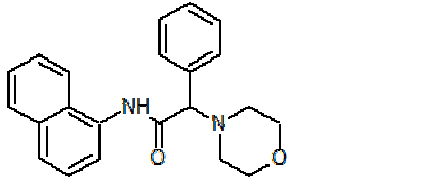
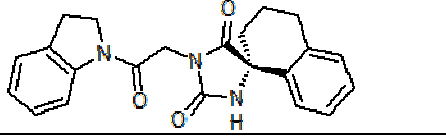
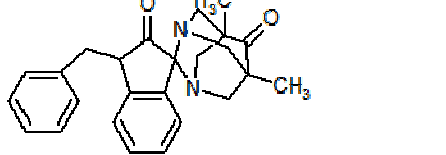
- Zhang, X., A. Crespo, et al. (2008). "Turning promiscuous kinase inhibitors into safer drugs." Trends Biotechnol **26**(6): 295-301.
- Zhang, Y. Y., J. W. Wu, et al. (2011a). "A distinct interaction mode revealed by the crystal structure of the kinase p38alpha with the MAPK binding domain of the phosphatase MKP5." Sci Signal **4**(204): ra88.
- Zhang, Y. Y., J. W. Wu, et al. (2011b). "Mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 3-mediated cross-talk between MAPKs ERK2 and p38alpha." J Biol Chem **286**(18): 16150-16162.
- Zwang, Y. and Y. Yarden (2006). "p38 MAP kinase mediates stress-induced internalization of EGFR: implications for cancer chemotherapy." EMBO J **25**(18): 4195-4206.

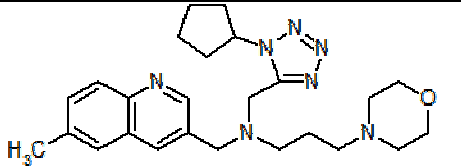
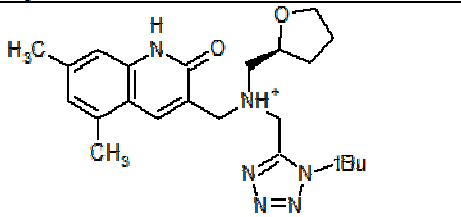
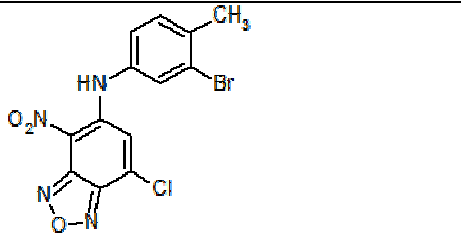
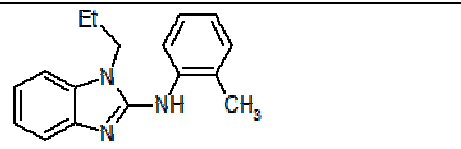
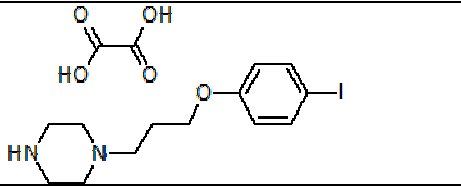
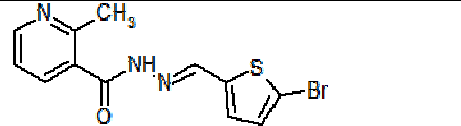
ANEXOS

ANEXO 1: COMPUESTOS SELECCIONADOS POR CRIBADO VIRTUAL

Estructura	N° Compuesto	Proveedor
	6624863	ChemBridge
	ASN03775353	ChemBridge
	7981989	ChemBridge
	6946893	ChemBridge
	7372138	ChemBridge
	7677902	ChemBridge
	7679969	ChemBridge
	BAS01848008	Asinex

	7987598	ChemBridge
	ASN05098723	Asinex
	STOCK2S-05380	IBScreen
	STOCK2S-11997	IBScreen
	STOCK3X-03076	IBScreen
	STOCK3S-94522	IBScreen
	STOCK4S-22944	IBScreen
	STOCK1N-55509	IBScreen

	CGX-03246279	ComGenex
	CGX-03246279	ComGenex
	T5238943	Enamine
	7972409	ChemBridge
	6627826	ChemBridge
	F2038-0306	Life Chemicals
	9000459	ChemBridge
	T5320027	Enamine
	5705342	ChemBridge

	ASN04369018	Asinex
	ASN04369941	Asinex
	6586700	ChemBridge
	AF-399/424877693	Specs
	7628716	ChemBridge
	BAS00085417	Asinex